

# 超微粉碎技术对灵芝中三萜类成分溶出的影响<sup>△</sup>

张福君\*, 瞿晶田, 王 强(天津中医药大学第一附属医院药学部, 天津 300192)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0599-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.06

**摘要** 目的:研究超微粉碎技术对灵芝中三萜类成分溶出的影响。方法:采用紫外-可见分光光度法测定灵芝中三萜类成分总提取率,高效液相色谱法(HPLC)测定灵芝中9种三萜类成分(灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H)含量,比较30、50、80目灵芝普通粉和300目灵芝超微粉中三萜类成分总提取率及9种三萜类成分的含量。结果:30、50、80、300目灵芝粉中三萜类成分总提取率分别为(0.74±0.08)%、(0.75±0.06)%、(0.78±0.06)%、(1.09±0.10)% (RSD<2%, n=3);随着灵芝粉目数的增大,三萜类成分含量逐渐增大,其中300目含量最大,显著高于灵芝普通粉(P<0.05)。结论:灵芝经超微粉碎后三萜类成分的溶出增加。

**关键词** 灵芝;超微粉碎技术;三萜类成分;高效液相色谱法

## Effects of Ultrafine Grinding Technology on the Dissolution of Triterpenoids from *Ganoderma lucidum*

ZHANG Fujun, QU Jingtian, WANG Qiang (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital to Tianjin University of TCM, Tianjin 300192, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of ultrafine grinding technology on the dissolution of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. METHODS: UV spectrophotometry was used to determine total extraction rates of triterpenoids from *G. lucidum*. HPLC method was used to determine the contents of 9 kinds of triterpenoids (ganoderic acid A, ganoderic acid B, ganoderic acid C, ganoderic acid C1, ganoderic acid C2, ganoderic acid D, ganoderic acid E, ganoderic acid G, ganoderic acid H) from *G. lucidum*. The total extraction rates and the contents of 9 kinds of triterpenoids were compared between 30, 50, 80 mesh common *G. lucidum* powder and 300 mesh *G. lucidum* ultramicro powder. RESULTS: The total extraction rates of triterpenoids from 30, 50, 80, 300 mesh *G. lucidum* powder were (0.74±0.08)%, (0.75±0.06)%, (0.78±0.06)%, (1.09±0.10)% (RSD<2%, n=3), respectively. With the increase of the mesh number of *G. lucidum* powder, the contents of triterpenoids were increased gradually, and were the highest in 300 mesh, which was significant higher than common *G. lucidum* powder (P<0.05). CONCLUSIONS: After ultrafine grinding, the dissolution of triterpenoids from *G. lucidum* is increased.

**KEYWORDS** *Ganoderma lucidum*; Ultrafine grinding technology; Triterpenoids; HPLC

灵芝(*Ganoderma lucidum*)为担子菌类多孔菌科灵芝属真菌,有红色、黄色、白色和紫色等<sup>[1]</sup>。我国鲁、云、贵、吉、浙、苏、闽等省份分布着赤灵芝、紫灵芝、薄盖灵芝等20多种灵芝,其中以泰山赤灵芝最为出名<sup>[2]</sup>。在祖国医学中,灵芝应用由来已久,具有宁心安神、滋补强壮的功能,广泛治疗高血压、高血脂、慢性肝炎、慢性肾炎、关节炎、失眠症、神经衰弱、支气管炎、胃溃疡、气喘病、动脉硬化、糖尿病、白细胞减少症、厌食、蘑菇中毒、病后身体虚弱等症<sup>[3]</sup>。

超微粉碎技术是指利用超细化的机械加工手段使粉体克服固体内部凝聚力使之粉碎至10~25 μm的操作技术。早在20世纪90年代,我国中药行业就引入了超微粉碎技术,近年来该技术发展迅速。超微粉碎技术可显著增加中药溶出量和溶出率,提高有效成分生物利

用度和溶出量<sup>[4]</sup>。本文研究了灵芝经超微粉碎后对其中主要成分三萜类成分(灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H)溶出的影响,旨在为灵芝中的进一步开发提供试验依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

Q65-1CN电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); Mastersizer 2000激光粒度分析仪(英国Malvern公司); SYFM-8 II超微粉碎机(济南天方机械有限公司); UV-9600紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司); 1200高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司)。

#### 1.2 药材与试剂

灵芝(批号:151106)购自河北安国市伊康药业有限公司,由天津中医药大学王传福教授鉴定为担子菌类多孔菌科灵芝;齐墩果酸、灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603648)

\*主管药师。研究方向:中药鉴定。E-mail:shuomingshu2009@126.com

灵芝酸H对照品(批号:111985-201601、10356、1230-5026、35105、4150-896、12538、465601、236110、10233-365、107892)均购自中国食品药品检定研究院,纯度:均≥99%;甲醇、乙酸乙酯、香草醛、冰醋酸、高氯酸等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 灵芝普通粉和超微粉的制备

灵芝普通粉:取适量灵芝药材常规粉碎,分别过30、50、80目筛,收集各组药材粉末。灵芝超微粉:先将灵芝药材粗粉碎,干燥至水分约为5%,经超微粉碎机粉碎45 min,经激光粒度仪测定90%粒径分布 $[d_{(90)}]<25\ \mu\text{m}$ ,过300目筛,即得。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H对照品各5 mg于10 mL量瓶中,甲醇溶解、定容,量取1 mL转移至10 mL量瓶中,甲醇定容,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取灵芝普通粉和超微粉样品各1 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加入50 mL乙酸乙酯,超声(80 Hz, 60 W)提取30 min,过滤、蒸干至无醇味,加甲醇转移至10 mL量瓶中,定容。

### 2.3 三萜类成分总提取率比较

按照2015年版《中国药典》(一部)灵芝项下三萜甾醇含量测定法测定三萜总提取率,三萜总提取率(%)=三萜总提取量/药材质量 $\times 100\%$ 。精密量取齐墩果酸对照品或供试品溶液置于15 mL具塞试管中,挥干,冷却,精密加入新配制的5%香草醛冰醋酸溶液0.2 mL,高氯酸0.8 mL,70℃水浴15 min后,立即冰浴5 min,加入乙酸乙酯4 mL。紫外-可见分光光度法于546 nm波长处测定吸光度,以齐墩果酸含量计算三萜类成分总提取率。结果,30、50、80目灵芝普通粉和300目灵芝超微粉三萜类成分总提取率分别为 $(0.74\pm 0.08)\%$ 、 $(0.75\pm 0.06)\%$ 、 $(0.78\pm 0.06)\%$ 、 $(1.09\pm 0.10)\%$ ( $\text{RSD}<2\%$ ,  $n=3$ ),300目灵芝超微粉中三萜类成分总提取率显著高于灵芝普通粉( $P<0.05$ )。

### 2.4 9种三萜类成分的含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性考察 色谱柱:Agilent XDB C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~30 min, 26%~29% A; 30~58 min, 29%~35% A; 58~73 min, 35%~38% A);柱温:35℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:252 nm;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。该色谱条件下,取“2.2.1”“2.2.2”项下溶液进样测定,结果各个峰分离度均大于1.5。色谱图见图1。

2.4.2 线性关系与定量限考察 精密吸取混合对照品

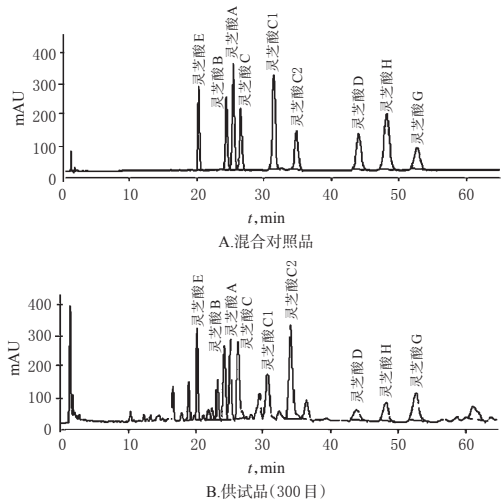


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

溶液0.25、0.50、0.75、1.0、1.5 mL于10 mL量瓶中,甲醇定容后摇匀,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,以各成分进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果见表1。

表1 9种三萜类成分的线性关系和定量限

Tab 1 Linear relationship and limit of quantitation of 9 kinds of triterpenoids

成分	线性方程	r	线性范围, $\mu\text{g}$	定量限, $\mu\text{g}$
灵芝酸A	$y=0.935x-0.276$	0.999 6	5.25~84.00	0.31
灵芝酸B	$y=1.231x-2.013$	0.999 2	8.45~135.20	0.15
灵芝酸C	$y=0.883x+0.315$	0.999 2	3.15~50.40	0.45
灵芝酸C1	$y=1.159x-0.258$	0.999 0	6.20~99.20	0.63
灵芝酸C2	$y=0.951x+0.363$	0.999 6	4.50~144.00	0.25
灵芝酸D	$y=1.130x-0.403$	0.999 8	10.85~173.60	0.21
灵芝酸E	$y=0.859x-0.385$	0.999 2	5.10~81.60	0.11
灵芝酸G	$y=0.719x-0.423$	0.999 9	4.75~152.00	0.09
灵芝酸H	$y=1.263x+3.125$	0.999 2	5.65~90.40	0.12

2.4.3 精密度、稳定性、重复性试验 取供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样6次,计算各成分峰面积RSD以考察精密度;取供试品溶液,分别在0、2、4、8、16、24 h时,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样6次,计算各成分峰面积RSD以考察稳定性;取300目灵芝粉末6份,按“2.2.2”项下方法平行制成供试品溶液并测定,计算各成分峰面积RSD以考察重复性。精密度、稳定性和重复性试验结果见表2。

由表2可知,灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H峰面积的RSD均不大于2%( $n=6$ ),表明本方法精密度、重复性良好,24 h内供试品溶液稳定。

2.4.4 加样回收率试验 取已知含量的300目灵芝粉末3份,分别精密加入9种混合对照品溶液1.5 mL,按“2.2.2”项下方法平行制成供试品溶液并进样测定,计算各成分回收率。结果,灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵

芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H的回收率为98.11%~103.83% (RSD≤1.56%, n=3),符合相关要求,结果见表3。

表2 精密度、稳定性和重复性试验结果(% , n=6)

Tab 2 Results of precision test, stability test and reproducibility test(% , n=6)

成分	RSD		
	精密度试验	稳定性试验	重复性试验
灵芝酸A	1.77	1.14	1.57
灵芝酸B	0.47	0.93	0.86
灵芝酸C	0.30	1.79	0.96
灵芝酸C1	1.16	1.70	1.01
灵芝酸C2	0.63	0.92	1.32
灵芝酸D	1.26	1.14	0.76
灵芝酸E	1.15	0.34	1.53
灵芝酸G	1.35	1.25	0.45
灵芝酸H	0.86	0.35	0.47

表3 加样回收率试验结果(% , n=3)

Tab 3 Results of recovery tests(% , n=3)

成分	平均加样回收率	RSD
灵芝酸A	103.83	0.93
灵芝酸B	98.11	0.36
灵芝酸C	103.80	1.56
灵芝酸C1	100.14	1.07
灵芝酸C2	102.90	0.31
灵芝酸D	99.05	0.40
灵芝酸E	102.59	0.70
灵芝酸G	100.04	0.88
灵芝酸H	103.05	1.10

2.4.5 样品含量测定 取“2.1”项下灵芝普通粉与灵芝超微粉各3份,按“2.2.2”项下方法处理后,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果,随着灵芝粉目数的增大,灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C、灵芝酸C1、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸E、灵芝酸G、灵芝酸H含量逐渐增大,其中300目含量最大,结果见表4。

表4 不同目数灵芝粉的含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 4 Results of content determination from the different mesh *G. lucidum* powder(mg/g, n=3)

成分	30目	50目	80目	300目
灵芝酸A	0.006 6	0.007 2	0.008 2	0.009 8
灵芝酸B	0.038 5	0.039 2	0.041 5	0.053 8
灵芝酸C	0.005 8	0.006 2	0.007 3	0.009 5
灵芝酸C1	0.025 3	0.031 8	0.043 2	0.075 6
灵芝酸C2	0.028 1	0.031 5	0.038 6	0.067 8
灵芝酸D	0.007 5	0.008 2	0.008 6	0.013 5
灵芝酸E	0.029 2	0.030 7	0.032 3	0.042 1
灵芝酸G	0.017 5	0.023 5	0.024 7	0.036 8
灵芝酸H	0.015 9	0.018 5	0.023 7	0.037 2

### 3 讨论

超微粉碎技术是一种将固体材料粉碎成10~25 μm粉体的技术,在食品、医药和化妆品领域具有广泛应用。目前常用的粉碎机有振动超细粉碎机、气流粉碎机、研磨剪切超细粉碎机、高速搅拌研磨机等<sup>[4-6]</sup>。超微

粉碎技术在中药材领域的应用逐渐受到重视,该技术不仅粉碎速度快,粉末粒度小而均匀,而且药材细胞破壁率高,有利于提高有效成分的溶出率<sup>[7]</sup>。

三萜类化合物是灵芝的主要有效成分之一,目前在灵芝中已知的三萜类化合物已有100多种,既往研究显示,灵芝三萜具有抗人类免疫缺陷病毒(HIV)、护肝、抗高血压、抑制组胺释放、抗肿瘤等广泛的药理活性<sup>[8-10]</sup>。而三萜类成分的提取率直接关系到灵芝药效的发挥。本研究建立了灵芝中9种三萜类成分的HPLC分析方法,经精密度试验、稳定性试验、重复性试验等考察,该方法全部达标。本研究结果显示,30、50、80目灵芝普通粉和300目灵芝超微粉三萜类成分总提取率分别为(0.74±0.08)%、(0.75±0.06)%、(0.78±0.06)%、(1.09±0.10)%、300目灵芝超微粉三萜类成分总提取率显著高于灵芝普通粉(P<0.05),表明超微粉碎技术有助于灵芝三萜类成分的溶出。

目前,超微粉碎技术能促进中药材中有效成分的溶出已得到广泛证实。如何春龙等<sup>[11]</sup>报道称,通过采用灵芝超微粉和普通粉的三萜类成分指纹图谱分析方法,发现灵芝药材经过超微粉碎后三萜类成分种类没有改变,但单含量提高,认为该技术能有效促进灵芝三萜类成分的溶出,与本研究结果一致。吴长辉<sup>[12]</sup>报道称,采用超微粉碎技术将灵芝粉碎成300目粉体,可大幅提高灵芝总多糖的提出率和溶出速度。黄建城<sup>[13]</sup>报道称,采用超微粉碎技术粉碎灵芝能明显提高灵芝多糖提取率。这主要是由于超微粉碎技术一方面提高了药材细胞的破壁率,有助于有效成分的溶出,另一方面超微粉具有很强的表面亲和性、吸附性和溶解性,可提高有效成分释放速率<sup>[14-15]</sup>。因此,超微粉碎技术在中药提取中具有极大的优势,可以提高中药中有效成分的溶出和临床药效,适合溶出度较低的中药制剂的生产,有利于减少药材用量、节约成本。

综上所述,灵芝经超微粉碎后,有助于灵芝三萜类成分的溶出,降低其临床使用量,从而节约药材用量。

### 参考文献

- [1] 李国华,李晔,梅锡玲,等.灵芝三萜类化合物研究进展[J].中草药,2015,46(12):1858-1862.
- [2] 贾红岩,王亚涛,张芝华,等.高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量[J].微生物学通报,2017,44(1):238-244.
- [3] 李保明,古海锋,李晔,等. HPLC 测定不同产地灵芝中9种三萜酸[J].中国中药杂志,2012,36(23):3599-3603.
- [4] 吴会清.灵芝多糖对S180荷瘤小鼠血清细胞因子水平与脏器指数的影响[J].中国药房,2014,25(35):3273-3275.
- [5] XU ZK,GAO J,QIN JP,et al. Research on ultrafine grinding technology of improving dissolution rates of effective



# 木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶对小鼠巨噬细胞RAW264.7的抗炎作用研究<sup>Δ</sup>

刘立新<sup>1\*</sup>, 邹冬玉<sup>1</sup>, 张羽男<sup>1#</sup>, 张强<sup>2</sup>, 张楠楠<sup>1</sup>(1.佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.佳木斯大学公共卫生学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

中图分类号 R361<sup>+</sup>.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0602-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.07

**摘要** 目的:研究木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶的抗炎作用及机制。方法:以正常小鼠巨噬细胞RAW264.7为对照,以脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞为炎症模型,采用MTT法检测不同浓度(10、20、40、80 μmol/L)的木犀草素·4,4'-联吡啶和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶作用细胞2 h后的细胞活性;荧光定量聚合酶链式反应法测定40 μmol/L浓度时细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶2(COX-2)mRNA的表达,酶联免疫吸附法测定40 μmol/L浓度时细胞中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)蛋白表达,Western blot法测定40 μmol/L浓度时细胞中核转录因子p65(NF-κB p65)蛋白表达。结果:与正常细胞比较,LPS诱导后RAW264.7细胞活性明显降低( $P<0.01$ ),iNOS和COX-2 mRNA表达水平及TNF-α、IL-6、NF-κB p65蛋白表达水平均明显升高( $P<0.01$ )。木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶均能增强LPS诱导后RAW264.7细胞活性( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且呈浓度依赖性;4,4'-联吡啶对LPS诱导后RAW264.7细胞活性无明显影响;40 μmol/L浓度下,木犀草素和木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶可使LPS诱导后细胞中iNOS和COX-2 mRNA表达水平及TNF-α、IL-6、NF-κB p65蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),其中木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶降低效果强于木犀草素( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:木犀草素·4,4'-联吡啶药物共晶可能通过下调NF-κB信号来抑制炎症相关因子产生,其抗炎作用优于木犀草素。  
**关键词** 木犀草素;4,4'-联吡啶;药物共晶;小鼠巨噬细胞RAW264.7;抗炎作用

## Anti-inflammatory Effect of the Luteolin·4,4'-dipyridy Co-crystal on Macrophage RAW264.7 in Mice

LIU Lixin<sup>1</sup>, ZOU Dongyu<sup>1</sup>, ZHANG Yunan<sup>1</sup>, ZHANG Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Nannan<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China; 2.College of Public Health, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

- components in Sanjie Zhentong capsule[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2015, 40(10):1945-1947.
- [6] 张静, 李佳伟, 张永静. 超微粉碎技术在中药中的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2015, 16(5):150-153.
- [7] 丁圣清, 郁省, 王冬东, 等. 中药饮片超微粉碎实现剂型改革的初步试验[J]. 中国药业, 2016, 25(23):38-42.
- [8] 李鹏, 魏晓霞, 南婷婷, 等. 灵芝三萜酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(23):1914-1918.
- [9] HA DO T, LOAN LE T, HUNG TM, et al. An improved HPLC-DAD method for quantitative comparisons of triterpenes in ganoderma lucidum and its five related species originating from vietnam[J]. *Molecules*, 2015, 20(1): 1059-1077.
- [10] 李守信, 邱新建, 贺凤成, 等. 红参超微粉的质量标准研究[J]. 中国药房, 2014, 25(3):256-259.
- [11] 何春龙, 张屏, 鞠爱华, 等. 灵芝超微粉, 普通粉和灵芝提取物高效液相色谱指纹图谱的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2):575-578.
- [12] 吴长辉. 超微粉碎对灵芝中多糖、三萜的影响[J]. 中国执业药师, 2015(8):18-23.
- [13] 黄建城. 膜分离及超微粉碎技术在灵芝制剂中的应用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- [14] 孙源源, 杜光. 超微粉碎技术在中药中的应用进展[J]. 医药导报, 2014, 33(1):69-71.
- [15] 贾海玲, 王健, 张萍, 等. 河北省精神卫生机构老年抑郁症患者药物使用的调查分析[J]. 中国药房, 2017, 28(21):2895-2898.

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81641120);黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题(No.2017-421)。

\* 讲师, 博士。研究方向:天然药物活性成分。电话:0454-8610758。E-mail:liulixin\_2003@163.com

# 通信作者:副教授, 博士。研究方向:天然药物共晶设计合成。电话:0454-8610758。E-mail:zhangyunan79@163.com

(收稿日期:2017-07-04 修回日期:2017-12-26)

(编辑:刘明伟)