

不同品种灵芝主要活性成分分析

齐川, 周慧, 斯金平, 刘京晶*, 张新风

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 天然药物研发中心, 浙江 临安 311300)

[摘要] **目的:** 对不同品种灵芝子实体中 4 类活性成分进行测定分析, 为灵芝品种专用化育种提供依据。**方法:** 采用紫外分光光度法测定灵芝样品总多糖、总三萜和蛋白质含量; 采用反相高效液相色谱法测定灵芝样品麦角甾醇含量。**结果:** 不同品种灵芝子实体中总多糖、总三萜、蛋白质均为含量较高的主要成分, 但麦角甾醇的含量极低; 4 类成分在不同灵芝品种中含量差异显著, 含量之间未发现有相关性。**结论:** 灵芝多糖、三萜、蛋白质这 3 类各具典型功效的主要成分含量测定对灵芝子实体的质量控制均有重要的意义, 并且可为制剂生产、临床应用的专用品种选育提供科学依据。

[关键词] 灵芝; 品种; 活性成分; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0096-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1738.018.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:38

Analysis of the Main Active Ingredients from Different Varieties of *Ganoderma lucidum*

QI Chuan, ZHOU Hui, SI Jin-ping, LIU Jing-jing*, ZHANG Xin-feng

(Nurturing Station for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Research and Development Center for Natural Medicine, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China)

[Abstract] **Objective:** Four kinds of different active ingredients from the fruiting bodies from different varieties of *Ganoderma lucidum* have been detected. The experimental data could be used as the basis of the special medicinal varieties breeding. **Method:** The content of total polysaccharides, triterpenoid and protein was determined by UV spectrophotometer. Ergosterol was determined by HPLC. **Result:** Total polysaccharides, triterpenoid and protein were the main components of different sources of *Ganoderma lucidum*. Ergosterol content was very low in the fruiting bodies. The content of the four ingredients was significantly different in different sources of *G. lucidum*. In addition, there were no correlations among the content of these four ingredients. **Conclusion:** Determination of polysaccharides, triterpenoid and protein was meaningful in the quality control of *G. lucidum*, and it can provide scientific basis for the breeding of special varieties.

[Key words] *Ganoderma lucidum*; varieties; active ingredients; quality control

灵芝来源于多孔菌科灵芝属真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang, 具有补气安神、止咳平喘

的功效^[1], 主治虚劳、心悸、失眠、头晕、神疲乏力、久咳气喘、冠心病、矽肺、肿瘤等^[2]。其子实体临床用于提高免疫力、治疗肝炎、失眠多梦、癌症放疗后白细胞减少等症状^[3-7], 功效显著, 亦多用于人体保健品, 具有很高的经济价值。随着灵芝产业的发展, 野生灵芝远不能满足市场的需求, 20 世纪 80 年代开始了灵芝野生菌种驯化、栽培品种选育工作^[8]。随着现代育种技术的发展, 中药材栽培品种的选育理念正在由注重产量的提高转变为质量和产量并重, 因此对品种药用价值的质量评价具有重要

[收稿日期] 20120228(012)

[基金项目] 浙江省重大科技专项项目(2009C02005)

[第一作者] 齐川, 硕士, 从事中药材品种选育及评价研究, E-mail: qichuan19870409@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 刘京晶, 博士, 讲师, 从事中药材质量分析研究, E-mail: jing_jing_6@163.com

的意义。

灵芝子实体中主要含有三萜类(包括多种灵芝酸类化合物)、多糖及蛋白质等活性成分^[2,9-10]。现代药理研究表明,灵芝多糖具有显著的提高免疫力抗肿瘤功效、清除自由基抗衰老等活性,三萜类具有保肝、辅助降血压、抗组胺、抗 HIV 等活性,蛋白质类具有促进淋巴细胞增殖调节免疫等活性^[9,11-12]。此外,灵芝也含有真菌类的特征成分麦角甾醇,其含量与真菌生物量存在相关关系,是真菌生物量的重要标志物之一^[13-14]。本文采用紫外分光光度法和 HPLC 分别测定这 4 类活性成分,对不同品种的灵芝子实体进行全面的品质评价,探讨药材品种专用化育种过程中质量评价指标的选择。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),UV 2500 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),电恒温水浴锅,AB104-N 电子分析天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司),SWB5200 型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司),Heraeus 高速离心机,*D*-葡萄糖、熊果酸、牛血清蛋白对照品(中国药品生物制品检定所)、麦角甾醇(本实验室自制,经面积归一化法检测纯度 97%),Folin-酚蛋白定量试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),5% 香草醛-冰乙酸,苯酚,无水乙醇、丙酮、浓硫酸(分析纯),乙腈(色谱纯)。

1.2 供试样品 不同品种的灵芝样品采集或购买来源见表 1,经浙江农林大学斯金平教授鉴定。

表 1 灵芝供试样品

样品品种	药材基源	产地
多粉灵芝	<i>G. lucidum</i>	浙江龙泉(基地采集)
少粉灵芝	<i>G. lucidum</i>	浙江龙泉(基地采集)
龙泉赤芝	<i>G. lucidum</i>	浙江龙泉(基地采集)
黄山灵芝	<i>G. lucidum</i>	安徽黄山(基地采集)
泰山灵芝	<i>G. lucidum</i>	山东泰山(基地采集)
GL1	<i>G. lucidum</i>	浙江武义(市场购买)
GL2	<i>G. lucidum</i>	吉林长白山(市场购买)
GL3	<i>G. lucidum</i>	上海(市场购买)
GL4	<i>G. lucidum</i>	福建浦城(市场购买)
GL5	<i>G. lucidum</i>	北京(市场购买)
紫芝	<i>G. sinense</i>	浙江龙泉(基地采集)

2 方法

2.1 总多糖含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 称取灵芝子实体干燥

粗粉 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入 80% 的无水乙醇 100 mL,85 °C 回流提取 2 次,每次 0.5 h,过滤弃去滤液,加蒸馏水 100 mL,100 °C 回流提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,定容至 250 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的 *D*-无水葡萄糖对照品 10.0 mg 于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水配制成 0.10 g·L⁻¹ 的对照品溶液,置冰箱中备用。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.3,0.6,0.9,1.2,1.5,1.8 mL 分别置于具塞试管中,加蒸馏水至 2.0 mL,摇匀后置冰浴中加入 5% 的苯酚溶液 1 mL、浓硫酸溶液 5 mL,摇匀,静置 5 min,于沸水浴中加热 15 min,冷却至室温,以蒸馏水 2.0 mL 为空白,同法操作,于 490 nm 波长处测定其吸光度(*A*)^[15-17]。以质量浓度(*C*)为横坐标,*A* 为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $A = 17.91016C + 0.01343$ ($r = 0.9997$),线性范围为 0.015 ~ 0.090 g·L⁻¹。

2.1.4 精密密度试验 精密量取 0.10 g·L⁻¹ 的对照品溶液 6 份,各 0.9 mL,加水至 2.0 mL,按 2.1.3 方法连续测定,结果 RSD 2.7%,表明仪器精密密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取同一样品 6 份,按 2.1.1 制备供试品溶液,按 2.1.3 方法测定,计算总多糖含量,结果 RSD 3.8%,表明重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液 2.0 mL,按 2.1.3 方法操作,分别于 0,1,2,3,4 h 测定 *A*,结果吸光度 RSD 1.7%,表明对照品溶液在 4 h 内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 取同一批已知含量的供试品 6 份各 0.5 g,分别加入适量葡萄糖溶液,按 2.1.1 制备供试品溶液,按 2.1.3 测定 *A*,回收率在 98.0% ~ 104.1%,RSD 3.6%。

2.1.8 样品含量测定 分别取表 1 样品,按 2.1.1 制备供试品溶液,平行 3 份。精密吸取 2 mL 至试管中,按 2.1.3 测定其吸光度,计算结果见表 2。

2.2 总三萜含量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 称取灵芝子实体干燥粗粉 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入无水乙醇 50 mL 浸泡 1 h 后回流 2 h,放冷后补足差重,过滤、取续滤液,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的熊果酸对照品 10.0 mg 置 50 mL 量瓶内,加无水

表 2 灵芝子实体总多糖、总三萜、
蛋白质和麦角甾醇含量 ($n=3$)

品种	mg·g ⁻¹			麦角甾醇
	总多糖	总三萜	蛋白质	
多粉灵芝	25.45 a	8.15 a	14.14 d	0.31 d
少粉灵芝	24.00 a	8.18 a	16.48 c	0.37 c
龙泉赤芝	18.60 b	9.48 a	23.14 a	0.17 e
黄山灵芝	13.98 b	9.57 a	16.25 c	0.75 b
泰山灵芝	10.70 c	9.64 a	17.52 b	0.85 a
GL1	14.57 bc	8.12 a	14.55 d	0.36 c
GL2	9.16 cd	8.11 a	15.15 c	0.24 c
GL3	14.44 c	9.13 a	16.31 c	0.41 cd
GL4	12.56 b	8.91 a	15.64 cd	0.37c
GL5	9.78 d	8.16 a	14.66 d	0.66 b
紫芝	16.43 c	8.78 a	13.95 d	0.03 f

注:不同小写字母表示差异达 5% 显著水平。

乙醇配制成 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液,置冰箱中备用。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取熊果酸对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 分别至试管中, 100 °C 水浴蒸干后加入 5% 的香草醛-冰醋酸溶液 0.5 mL, 摇匀, 加入高氯酸溶液 0.8 mL, 60 °C 水浴 20 min, 取出后于冰浴中加入冰乙酸 5 mL, 摇匀, 室温放置 15 min。以无熊果酸对照品溶液的试管为空白, 同法操作, 于 548 nm 条件下测定吸光度^[18-19]。以熊果酸质量 (X) 为横坐标, 吸光度 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为 $Y = 7.577\ 82X - 0.121\ 19$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.04 ~ 0.24 mg。

2.2.4 精密度试验 精密量取 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液 6 份, 各 0.6 mL, 按 2.2.3 方法连续测定, 结果 RSD 1.5%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取同一样品 6 份, 按 2.2.1 制备供试品溶液, 按 2.2.3 方法测定, 计算总三萜含量, 结果 RSD 3.5%, 表明重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液按 2.2.3 方法操作, 分别于 0, 1, 2, 4, 6 h 测定其吸光度, 结果 RSD 3.3%, 表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 取同一批已知含量的供试品 6 份各 0.5 g, 分别加入适量熊果酸溶液, 按 2.2.1 制备供试品溶液, 按 2.2.3 方法测定, 结果显示回收率在 98.3% ~ 100.4%, RSD 3.2%。

2.2.8 样品含量测定 分别取表 1 样品, 按 2.2.1 制备供试品溶液, 平行 3 份。精密吸取 0.5 mL 至试管中, 按 2.2.3 测定其 A , 计算结果见表 2。

2.3 蛋白质含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 称取灵芝子实体干燥粗粉 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入蒸馏水 100 mL, 超声提取 10 min, 补足差重, 摇匀, 过滤取续滤液适量, 于离心管中以 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 精确称量牛血清蛋白对照品 5 mg, 配成质量浓度为 0.25 g·L⁻¹ 的牛血清蛋白对照品溶液, 置冰箱中备用。

2.3.3 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于试管中, 加蒸馏水至 1 mL, 摇匀。分别在试管中加入试剂盒中的试剂甲 5 mL, 摇匀, 于室温放置 10 min; 加入试剂乙 0.5 mL, 立即摇匀, 于室温保温 30 min 后于 750 nm 波长处测定其吸光度。以 1 mL 蒸馏水为空白, 同法操作。以蛋白质质量浓度为横坐标 (C), 吸光度为纵坐标 (A) 绘制标准曲线, 蛋白质含量标准曲线为 $A = 2.166\ 0C + 0.027\ 1$ ($r = 0.999\ 5$), 线性范围 0.025 ~ 0.250 g·L⁻¹。

2.3.4 精密度试验 精密量取 0.25 g·L⁻¹ 的对照品溶液 6 份, 各 0.4 mL, 加水至 1 mL, 按 2.3.3 方法连续测定, 结果吸光度 RSD 2.7%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一样品 6 份, 按 2.3.1 制备供试品溶液, 按 2.3.3 方法测定, 计算蛋白质含量, 结果 RSD 3.9%, 表明重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液 1.0 mL, 按 2.3.3 方法测定, 分别于 0, 1, 2, 3 h 测定其 A , 结果表明供试品溶液的吸光度 RSD 2.4%, 表明供试品溶液在 3 h 内稳定。

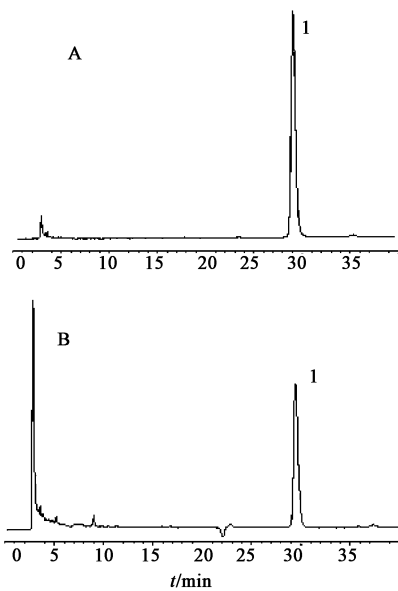
2.3.7 加样回收率试验 取同一批已知含量的供试品 6 份各 0.5 g, 分别加入适量牛血清蛋白溶液, 按 2.3.1 制备供试品溶液, 按 2.3.3 测定 A , 结果回收率在 98% ~ 101%, RSD 2.3%。

2.3.8 样品含量测定 分别取表 1 样品, 按 2.3.1 制备供试品溶液, 平行 3 份。精密吸取 1.0 mL 至试管中, 按 2.3.3 测定其吸光度值, 计算结果见表 2。

2.4 麦角甾醇含量测定 灵芝子实体中麦角甾醇含量测定采用 HPLC, 色谱柱为 SunFire™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 100% 甲醇, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 282 nm^[20]。对照品和供试品色谱图见图 1, 结果见表 2。

3 结果

灵芝子实体总多糖、总三萜、蛋白质和麦角甾醇



A. 对照品; B. 多粉灵芝; 1. 麦角甾醇

图1 灵芝子实体中麦角甾醇测定 HPLC

含量测定结果,样品按“2方法”依次测定计算,结果汇总于表2,绘制柱状图见图2,并采用DPS软件进行方差分析。

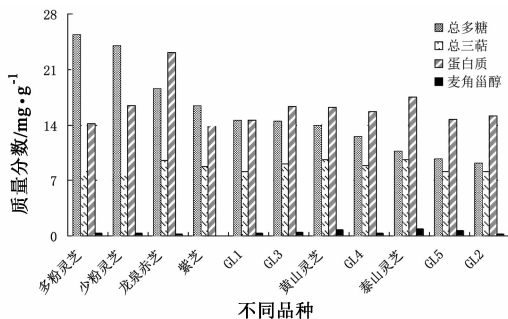


图2 不同品种灵芝子实体总多糖、总三萜、蛋白质和麦角甾醇含量

4 讨论

对灵芝子实体中4类活性成分进行了含量测定,其中多糖含量是药典规定对该药材质量控制的法定指标,由表2、图2可知,所测品种中多粉灵芝、少粉灵芝总多糖含量最高,龙泉赤芝、紫芝次之,GL5、GL2最低,最高含量品种为最低者的2.8倍。不同来源灵芝样品的总多糖含量差异显著,含量在 $9.16 \sim 25.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其中浙江龙泉所产的灵芝子实体含量最高,黄生权等对全国六省灵芝样品的考察结果亦表明浙江龙泉所产灵芝子实体的多糖含量较高^[21]。本文所测定不同来源的灵芝子实体中,总三萜含量并无显著差异,含量在 $8.11 \sim 9.64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。蛋白质也是灵芝子实体中含量较高的一类活性成分,所测样品中以龙泉赤芝含量最高,紫芝含量最低,在不同品种中含量差异显著,范围在 $13.95 \sim$

$23.14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。麦角甾醇在子实体中含量很低,虽在不同品种间有极大的差异,但对各样品总含量的贡献微小,也未见与临床疗效相关的活性报道,几乎可以忽略不计。此外,4类成分含量之间未见相关性。

灵芝子实体中多糖、三萜和蛋白质这3种主要活性成分含量均较高,对其进行全面的质量控制和功能评价需要进行多指标综合测试。在品种选育方面,中药材不同于农作物的突出特点就是注重成分积累和功效,由于不同品种的灵芝子实体中总多糖含量有较大的差异,因此在药品或保健品研发时对原材料的选择上,若目标是侧重应用于提高免疫力方面疗效的成品,原料应侧重于选育多糖含量较高的专用品种。三萜类成分是近年来对灵芝研究中发现的一类具有很强活性的物质,在药品或保健品研发时原材料的选择方面,若目标是侧重应用于提高保肝护肝等方面疗效的成品,原料应侧重于选育三萜含量较高的专用品种。因蛋白质也是灵芝子实体中的主要活性成分,以总蛋白为质量控制指标对灵芝品种选育也有重要的意义。

总之,针对专用化的品种选育应以有代表性的活性成分为指标。可通过对灵芝原药材优良品种的限定,综合控制多糖类、三萜类和总蛋白成分含量,加强对制剂均一性和临床疗效稳定性的控制。本文为灵芝品种的选育提供了新的方向和科学依据,有一定的现实指导意义。但限于本次实验样品量有限,将在进一步品种选育过程中,扩大样本量深入研究探讨。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 174.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 234.
- [3] 张海明, 邱幸凡. 治疗癌症化疗后白细胞减少经验介绍[J]. 新中医, 2011, 43(8): 168.
- [4] 卢良威. 中医药抗乙型肝炎临床研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 34(2): 173.
- [5] 何显忠. 灵芝临床应用及药理作用[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(6): 573.
- [6] 饶发元. 灵芝的临床应用与国内外研究[J]. 四川中医, 2001, 19(12): 17.
- [7] John W M Yuen, Mayur Danny I Gohel. Anticancer effects of *ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence [J]. Nutr Cancer, 2005, 53(1): 11.
- [8] 斯金平, 何伯伟. 药用植物遗传改良与育种案例[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 90.

灯盏细辛的抗氧化活性研究

党翠芝¹, 黄小燕^{1*}, 杨庆雄², 艾俊丽¹, 田猛¹

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州师范大学化学与材料科学学院, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:研究灯盏细辛6个化合物的抗氧化活性。方法:以灯盏细辛为原料,采用有机溶剂提取法和色谱柱法对灯盏细辛中化学成分进行提取与分离,利用核磁共振等波谱学方法进行结构鉴定,体外法检测6个化合物对1-二苯基-2-苦味酰肼自由基清除法(DPPH),2,2'-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基清除法(ABTS),O₂⁻·自由基和·OH自由基的清除能力,并以维生素C(Vc)为阳性对照,结果:6个化合物对DPPH,ABTS,O₂⁻·,·OH自由基均具有清除作用,且与浓度呈良好的量效关系,6个化合物清除自由基能力与Vc相似。结论:灯盏细辛中的6个化合物均具有较强的抗氧化活性。

[关键词] 灯盏细辛; 自由基; 清除能力; 抗氧化活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0100-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1745.036.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:45

Antioxidant Activity of Constituents from *Erigeron breviscapus*

DANG Cui-zhi¹, HANG Xiao-yan^{1*}, YANG Qing-xiong², AI Jun-li¹, TIAN Meng¹

(1. School of Life Sciences, Guiyang 550001, China;

2. School of Chemistry and Material Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[收稿日期] 20120401(012)

[基金项目] 贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外G字[2010]7023);贵州师范大学生命科学学院

[第一作者] 党翠芝, 硕士, 从事中药资源活性分析研究, Tel: 13511940971, E-mail: dangcuizhi1986@163.com

[通讯作者] *黄小燕, 硕士, 教授, 从事植物学的研究, Tel: 13984043718, E-mail: huangxy666@126.com.com

- [9] Bojana Boh, Marin Berovic, Jingsong Zhang, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds [J]. *Biotechnology Annual*, 2007 (13): 265.
- [10] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展[J]. *药学报*, 1990, 25(12): 940.
- [11] 叶波平, 王庆华, 周书进, 等. 灵芝蛋白质的分离及其免疫活性研究[J]. *药物生物技术*, 2002, 9(3): 150.
- [12] 陈勇, 曾萍, 温庆伟, 等. 灵芝配方颗粒中麦角甾醇的含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(12): 53.
- [13] Martha B A, Mainul H, Raunel T, et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass [J]. *J Microbiological Methods*, 2002 (50): 227.
- [14] Yuan Jian-Ping, Wang Jiang-Hai, Liu Xin, et al. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC [J]. *Food Chem*, 2007(105): 1755.
- [15] 胡斌杰, 景中建, 郝喜才. 灵芝不同部位多糖含量测定[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(6): 129.
- [16] 黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 等. 破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的分析[J]. *中草药*, 2006, 37(6): 813.
- [17] 史俊青, 张丽萍, 杨春清, 等. 不同品种灵芝多糖含量差异研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13): 104.
- [18] 李保明, 刘超, 王洪庆, 等. 灵芝总三萜酸含量测定方法的研究[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(12): 1234.
- [19] 宋师花, 贾晓斌, 陈彦, 等. 超临界CO₂萃取灵芝子实体中的三萜类成分[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(17): 2104.
- [20] 刘京晶, 黄文华, 吕明亮, 等. HPLC法测定不同品种及段木栽培灵芝子实体中麦角甾醇含量[J]. *中药材*, 2011, 34(2): 187.
- [21] 黄生权. 赤灵芝多糖的提取分离、结构分析与生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

[责任编辑 邹晓翠]