

不同部位灵芝及子实体提取物中 总三萜酸含量测定

冯慧琴¹, 杨明俊¹, 杨晓彤¹, 杨庆尧^{2*}

(1. 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 上海芝草生物技术有限公司, 上海 200234)

摘要: 建立不同部位灵芝及子实体提取物中总三萜酸含量测定方法. 灵芝样品用乙醇提取, 依次经氯仿、5% 碳酸氢钠萃取, 酸化后再用氯仿萃取、浓缩至干, 称重, 即得灵芝总三萜酸量. 结果: 灵芝子实体总三萜酸为 (8.58 ± 0.25) mg/g, 孢子粉为 (3.48 ± 0.03) mg/g, 菌丝体仅为 (1.75 ± 0.09) mg/g; 菌盖总三萜酸含量为 (12.62 ± 0.22) mg/g, 菌柄为 (7.66 ± 0.08) mg/g. 10 批次灵芝子实体的总三萜酸含量范围为 4.34~16.39 mg/g. 灵芝子实体提取物中的总三萜酸含量以醇-水提取物的最高为 (208.70 ± 5.54) mg/g; 碱水提取物的最低, 仅为 (123.07 ± 4.99) mg/g. HPLC 初步分析子实体和孢子及子实体提取物间三萜酸成分大部分相同. 本法适用于灵芝子实体及其提取物、灵芝孢子和菌丝体总三萜酸的含量测定, 结果可靠, 可为灵芝产品质量指标提供依据.

关键词: 灵芝; 总三萜酸; 子实体; 孢子; 菌丝体; 提取物

中图分类号: Q949.329⁺.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2013)02-0192-05

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst 是我国著名的药用真菌, 其中三萜化合物是灵芝的主要活性成分. 据报导从灵芝子实体、孢子及菌丝体中分离的三萜化合物已约 160 种^[1-5], 它们具有抑制肿瘤、保护肝脏、抗氧化、免疫调节、抑制胆固醇合成、抗菌、抗炎、抗病毒等广泛的药理活性^[2, 6-7], 因此三萜化合物的含量是灵芝产品品质鉴定的重要指标. 用 HPLC 方法定量分析灵芝三萜酸成分, 丁平^[8]测定了灵芝不同部位中灵芝酸 B 的含量, 马林^[9]测定灵芝中孢子酸 A、赤芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C 的含量, 马利金^[10]分析红芝中灵芝酸 AC 3 种成分的含量. 本实验参照 Tsuyoshi Nishitoba^[11]分离灵芝酸和赤芝酸方法, 测定了不同部位灵芝及子实体提取物的总三萜酸含量, 而非三萜酸中某一或几个成分.

1 材料与方 法

1.1 材 料

灵芝子实体 (GL-F) 和孢子 (GL-S) 产自金寨; 另 10 批灵芝子实体市购; 灵芝菌丝体: 液体培养, 本所提供; 灵芝水提取物 (GL-WW); 灵芝水醇提取物 (GL-WA); 灵芝醇水提取物 (GL-AW); 灵芝碱水提取物 (GL-LW) 本所提供; 氯仿、碳酸氢钠、乙醇、氢氧化钠、盐酸均为国产分析纯.

1.2 灵芝总三萜酸的制备

取灵芝子实体粉末或孢子或菌丝体 10g, 或灵芝子实体提取物 2g, 精确称重, 加 100 mL 水超声 5

收稿日期: 2012-11-02

基金项目: 上海师范大学横向基金项目 (C-6105-09-DL0703)

作者简介: 冯慧琴 (1965-), 女, 上海师范大学微生物与免疫学研究所副研究员; 杨庆尧 (1936-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院教授.

* 通信作者

min,加95%乙醇100 mL,30℃磁力搅拌30 min,过滤,获醇提取液1;残渣加200 mL 50%乙醇,30℃磁力搅拌30 min,过滤,得醇提取液2,合并醇提取液1、2并浓缩,浓缩液加50 mL氯仿萃取,重复3次,氯仿萃取液中加50 mL 5% NaHCO₃萃取,重复3次,NaHCO₃液用2 mol/L HCl调pH至3,在酸性溶液中加入氯仿50 mL进行萃取,重复3次,酸性氯仿萃取液合并浓缩至干,放置干燥器内24 h,即得灵芝总三萜酸,精确称重,计算:灵芝总三萜酸含量=灵芝总三萜化酸重量(mg)/样品重量(g)。

1.3 灵芝总三萜酸的 HPLC 条件

采用Bechman System Gold高效液相色谱系统,包括125液相泵和168 DAD检测器。色谱柱:Hyper-sil Gold C18(250 mm×4.6 mm 5 μm);流动相:2%乙酸:乙腈=2:1;流速:1.0 mL/min;检测波长:252 nm;进样体积:20 μL;柱温:27℃。

2 结果

2.1 灵芝不同部位的总三萜酸含量比较

分别取灵芝子实体(GL-F)、孢子(GL-S)、液体培养菌丝体(GL-M)、子实体中的菌盖(GL-P)和菌柄(GL-ST),粉碎后按1.2方法制备,计算灵芝总三萜酸含量。结果显示GL-F含总三萜酸(8.58±0.25) mg/g, GL-S的总三萜酸含量为(3.48±0.03) mg/g,而GL-M的总三萜酸含量最少,仅有(1.75±0.09) mg/g(图1)。经t检验, GL-F、GL-S、GL-M三者两两比较差异达极显著水平($p < 0.01$)。GL-P总三萜酸含量为(12.62±0.22) mg/g, GL-ST的含量为(7.66±0.08) mg/g(图1), t检验两者差异极显著($p < 0.01$)。

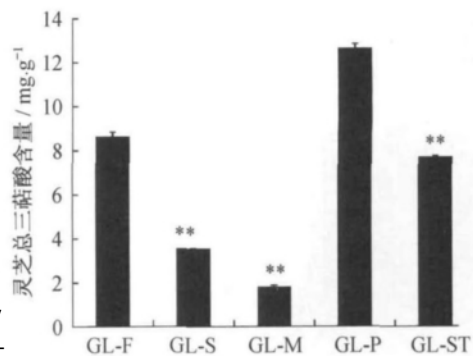


图1 灵芝不同部位总三萜酸含量

2.2 市售灵芝子实体总三萜酸含量比较

将市售10批灵芝子实体分别粉碎后按1.2方法制备,计算灵芝总三萜酸含量。结果表明10批灵芝子实体中总三萜酸含量最高达(16.39±0.58) mg/g,最低仅为(4.34±0.21) mg/g;有4批灵芝总三萜酸含量高于10 mg/g,3批次的含量却低于5 mg/g,不同灵芝子实体的总三萜酸含量差异大(表1)。

表1 市售10批灵芝子实体总三萜酸含量比较

批次	灵芝三萜酸含量 (mg/g)	RSD (%)
1	12.62	1.75
2	10.62	3.66
3	7.66	3.79
4	16.39	3.24
5	10.02	5.58
6	9.80	4.88
7	4.27	5.83
8	8.27	4.88
9	4.34	4.88
10	4.49	5.64

2.3 子实体提取物中灵芝总三萜酸含量的比较

将各提取物按1.2方法制备,计算灵芝三萜酸含量。结果由高至低如下:GL-AW:(208.70±5.54),GL-WA:(184.46±3.75) mg/g, GL-WW:(134.42±5.85) mg/g, GL-CW:(123.07±4.99) mg/g。t检验, GL-AW和GL-WA两者总三萜酸差异显著($p < 0.05$);而GL-WW和GL-CW总三萜酸含量无统计差异($p > 0.05$),但两者分别与GL-WA或GL-AW比较总三萜酸含量均差异极显著($p < 0.01$)。

灵芝子实体提取物所含的灵芝总三萜酸含量因提取方法不同而异,但总三萜酸含量均远高于未经提取的灵芝子实体(GL-F)中的含量, GL-F的总三萜酸为(12.62±0.22) mg/g,其提取物总三萜酸含量则是它的9~16倍(图2)。

2.4 灵芝总三萜酸的 HPLC 的初步分析

HPLC图谱峰显示,灵芝子实体和孢子有23个共有峰,两者所含的三萜酸74%的成分相同,而菌丝体的三萜酸的成分较前两者差异大(表2、图3)。以GL-F序号7峰的峰面积为参照,计算各峰的相对峰面积,从相对峰面积中可推断子实体的总三萜酸含量明显高于孢子和菌丝体(表2)。

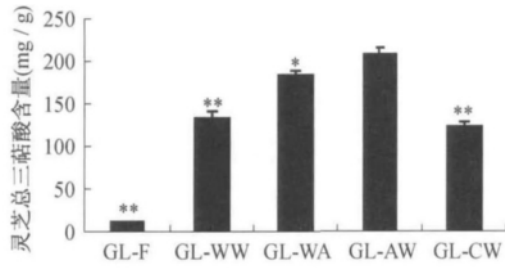


图2 不同灵芝子实体提取物中总三萜酸含量比较

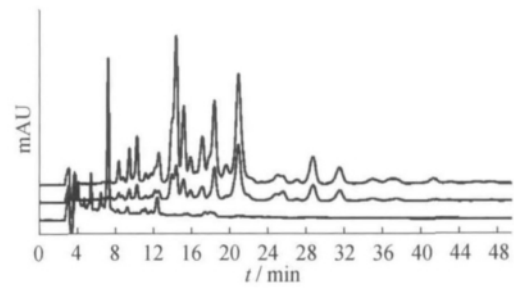


图3 灵芝子实体、孢子粉、菌丝体的 HPLC 图谱

表2 灵芝子实体、孢子和菌丝体 HPLC 图谱峰的保留时间和相对峰面积

编号	序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GL-F	保留时间/min				7.32	8.30	8.73	9.42	10.23		11.15	11.70	
GL-S	保留时间/min				7.27	8.30	8.70	9.42	10.22		11.13	11.70	12.13
GL-M	保留时间/min	5.40	6.42	6.65	7.20	8.20		9.23		10.77	11.10	11.72	12.35
GL-F	相对峰面积				0.12	0.59	0.21	1.00	1.57		0.39	0.35	
GL-S	相对峰面积				0.11	0.24	0.15	0.35	0.55		0.21	0.15	0.38
GL-M	相对峰面积	0.61	0.33	0.11	3.32	0.07		0.18		0.09	0.13	0.09	0.51
	序号	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
GL-F	保留时间/min	12.52		14.35	15.13	15.85	16.38	17.10		18.35	19.57	20.87	23.28
GL-S	保留时间/min	12.50	13.83	14.33	15.12	15.85		17.08		18.35		20.85	23.23
GL-M	保留时间/min		13.77	14.20	15.22	15.57	16.60	17.38	17.95	18.30			
GL-F	相对峰面积	1.68		8.08	3.24	1.21	0.36	2.49		5.19	1.19	7.79	0.11
GL-S	相对峰面积	0.36	1.08	1.38	0.98	0.48		0.91		1.83		4.48	0.04
GL-M	相对峰面积		0.02	0.04	0.06	0.08	0.04	0.18	0.20	0.11			
	序号	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
GL-F	保留时间/min	24.98	25.48	26.98	28.67	31.45	34.88	36.80	37.18	41.23	43.00	45.77	47.23
GL-S	保留时间/min	24.83	25.55	26.97	28.68	31.46	34.88		37.35	41.23			
GL-M	保留时间/min												
GL-F	相对峰面积	0.77	0.40	0.30	1.96	1.38	0.65	0.39	0.40	0.59	0.17	0.27	0.23
GL-S	相对峰面积	0.54	0.63	0.14	1.16	0.89	0.37		0.32	0.18			
GL-M	相对峰面积												

* 相对峰面积以 GL-F 7 号峰为参照

HPLC 图谱分析结果表明 4 种子实体提取物间有 25 个共有峰(表 3、图 4), 它们的总三萜酸成分相同部分近 80%; 以 GL-CW 的序号 8 的峰面积为参照, 计算各峰的相对峰面积, 从中可认定 AW 总三萜酸含量最高, CW 最低(表 3)。

3 讨论

灵芝不同部位其灵芝总三萜酸含量不同。马林等^[9]检测了灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体中灵芝酸 B 及 C、赤芝酸 A 和赤芝孢子酸 A 4 种三萜酸含量, 结果子实体占最多, 其次为孢子粉, 菌丝体最少, 只检出灵芝酸 B; 丁平^[8]测定的不同部位灵芝酸 B 含量顺序为菌盖表皮 > 菌盖子实体 > 菌柄 > 木栓层 > 孢子粉, 菌丝体未检出; 本实验不同部位灵芝中总三萜酸含量与前述文献有相似结果, 菌盖、子实体、菌柄、孢子粉、菌丝体的灵芝总三萜酸含量依次递减, 且菌丝体的三萜酸成分比子实体和孢子的少很多。

实验中子实体提取物的总三萜酸含量远远高于子实体, 提取物中 GL-AW 和 GL-WA 的总三萜酸含量明显超过 GL-WW 和 GL-CW, 用乙醇做溶剂提取灵芝子实体, 可大大提高灵芝产品中的总三萜酸含量, 提升产品质量。

按照 1.4 方法测定灵芝总三萜酸含量, 6 次重复实验 RSD 为 4.38%, 重现性好。本法适用于灵芝子

表3 灵芝子实体提取物 HPLC 图谱峰的保留时间和相对峰面积

编号	序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CW	保留时间/min	5.82	6.42	6.80	7.20	7.52	7.97	8.52	9.40	10.15	10.43	11.45	11.72
AW	保留时间/min	5.90	6.42		7.20	7.48	7.97	8.53	9.40		10.43		11.73
WA	保留时间/min	5.92	6.42		7.20	7.48	7.97	8.52	9.40	10.15	10.42		11.72
W	保留时间/min	5.90	6.40		7.20	7.47	7.95	8.52	9.38	10.15	10.42		11.72
CW	相对峰面积	0.17	0.28	0.12	0.49	0.26	1.90	3.51	1.00	2.04	1.66	4.14	5.93
AW	相对峰面积	0.12	0.18		0.48	0.22	1.84	2.73	0.90		2.99		13.29
WA	相对峰面积	0.09	0.23		0.55	0.24	1.43	2.81	0.97	1.71	1.84		9.14
W	相对峰面积	0.09	0.27		0.45	0.18	1.39	3.00	1.09	1.95	2.11		9.39
	序号	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
CW	保留时间/min	12.28	12.95	13.28	13.70	14.70	15.63	16.43	17.67	19.25	20.52	21.50	22.72
AW	保留时间/min	12.28	12.92		13.72	14.72	15.63	16.47	17.70	19.25	20.55	21.50	22.73
WA	保留时间/min	12.27	12.93	13.25	13.68	14.70	15.63	16.43	17.72	19.25	20.52	21.50	22.72
W	保留时间/min	12.27	12.93		13.68	14.70	15.68	16.43	17.78	19.27	20.52	21.50	22.73
CW	相对峰面积	4.52	1.29	0.70	2.93	5.22	1.42	9.28	1.65	0.67	1.18	0.31	2.05
AW	相对峰面积	4.64	1.60		4.18	7.58	0.96	10.34	0.94	0.72	1.02	0.11	2.14
WA	相对峰面积	3.95	1.33	0.50	2.71	4.80	1.19	8.85	1.46	0.59	1.31	0.04	2.03
W	相对峰面积	3.83	1.33		3.27	4.79	1.11	9.58	1.34	0.60	1.59	0.57	2.51
	序号	25	26	27	28	29	30	31	32				
CW	保留时间/min	24.70	27.22	27.85	29.32	30.92	32.98	36.48					
AW	保留时间/min	24.72		27.77	29.25	30.02	33.08						
WA	保留时间/min	24.72	27.23	27.83	29.30	30.98	33.05	36.45	45.63				
W	保留时间/min	24.73	27.23	27.90	29.32	31.00	33.12	36.48	45.77				
CW	相对峰面积	2.23	0.39	0.46	0.56	0.56	0.32	0.39					
AW	相对峰面积	1.31		0.86	0.31	0.60	0.30						
WA	相对峰面积	1.90	0.38	0.39	0.46	0.49	0.22	0.22	0.29				
W	相对峰面积	2.32	0.60	0.45	0.72	0.48	0.26	0.39	0.22				

* 相对峰面积以 CW 8 号峰为参照

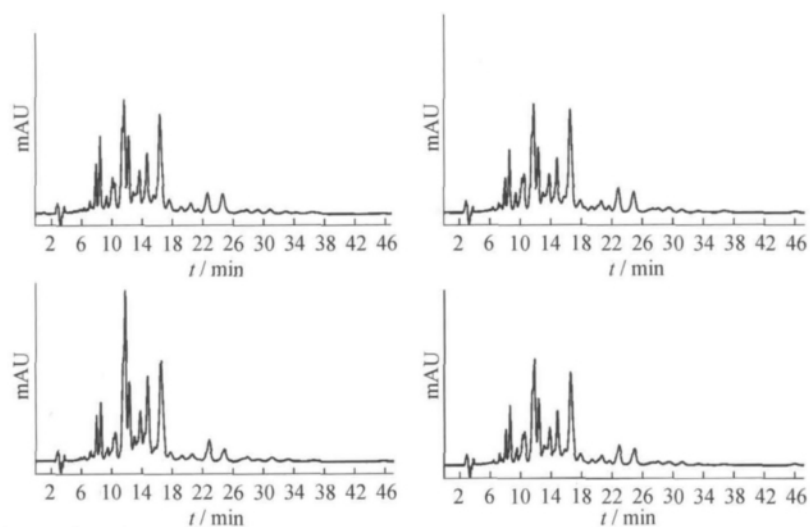


图4 灵芝子实体提取物的 HPLC 图谱

实体、孢子、菌丝体和子实体提取物的总三萜酸含量测定 结果可靠,可为灵芝产品质量指标提供依据。

参考文献:

- [1] 陈若芸,于德泉.灵芝三萜化学成分研究进展[J].药学学报,1990,25(12):940-953.
- [2] 罗俊,林志彬.灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J].药学学报,2002,37(7):574-578.
- [3] ZHOU Y Q, YANG X T, YANG Q Y. Recent advances on triterpenes from *Ganoderma mushroom* [J]. *Food Reviews International* 2006, 22(3):259-273.
- [4] 郝瑞霞,张劲松,唐庆九,等.灵芝子实体中两个新的天然三萜类化学成分的分离、纯化和鉴定[J].菌物学报,2006,25(4):599-602.
- [5] 陈曼,张敕,孙视,等.赤芝子实体中一个新的三萜化合物[J].药学学报,2009,44(7):768-770.
- [6] SMINA T P, MATHEW J, JANARDHANAN K K, et al. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. [J]. *Environmental toxicology and pharmacology* 2011, 32:438-446.
- [7] SHAILESH D, ANITA T, DANIEL S. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *International Immunopharmacology* 2009, 9:1272-1280.
- [8] 丁平,张丹雁,徐鸿华. RP-HPLC 法测定不同部位灵芝中灵芝酸 B 含量[J].中草药,2001,3(4):310-312.
- [9] 马林,吴丰,陈若芸.灵芝三萜成分分析[J].药学学报,2003,38(1):50-52.
- [10] 马利金,姚汝华.红芝酸性物质的 HPLC 和薄层层析分析[J].中国食用菌,1998,17(1):3-4.
- [11] TSUYOSHI N, HIROJI S, TAKANORI K, et al. New bitter C27 and C30 Terpenoids from the Fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi) [J]. *Agric Boi Chem*, 1985, 49(6):1793-1798.

Determination of total triterpenoid acids in different part and extract of *Ganoderma lucidum*

FENG Huiqin¹, YANG Mingjun¹, YANG Xiaotong¹, YANG Qingyao^{2*}

(1. College of Life and Environment Sciences Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. Shanghai Zhi-herb Bio-tech. LTD, Shanghai 200234, China)

Abstract: Aim To develop a method for determination of total triterpenoid acids in different part and extracts of *Ganoderma lucidum*. Method The samples of *Ganoderma lucidum* were extracted with ethanol and successively extracted with CHCl₃ and 5% NaHCO₃, the NaHCO₃ layer was acidified to pH 3 with 2 mol/L HCl, the resulting precipitates were dissolved in CHCl₃ and evaporated in vacuo then weighed. The total triterpenoid acids were obtained. Result The total triterpenoid acids of *Ganoderma lucidum* fruitbody, spore and mycelium were (8.58 ± 0.25) mg/g, (3.48 ± 0.03) mg/g and (1.75 ± 0.09) mg/g respectively. The total triterpenoid acids of pileus and stipe were (12.62 ± 0.22) mg/g and (7.66 ± 0.08) mg/g. The range of total triterpenoid acid content among 10 batches of *Ganoderma lucidum* fruitbody purchased from the market was between 4.34 to 16.39 mg/g. The highest content from 8/8/88/m *Ganoderma lucidum* fruiting body with alcohol-water extracting was (208.70 ± 5.54) mg/g and the lowest content with alkaline solution extracting was (123.07 ± 4.99) mg/g. The composition of total triterpenoid acid from fruitbody, spores and extract of fruitbody analyzed by HPLC were almost the same. This method is reliable for determination of total triterpenoid acid in the fruiting body and its extracts, spore and mycelium from *Ganoderma lucidum*, which provides an indicator for the quality of *Ganoderma lucidum* product.

Key words: *Ganoderma lucidum*; total triterpenoid acids; fruitbody; spore; mycelia; extract of *Ganoderma lucidum*

(责任编辑:顾浩然)