

RP-HPLC 和 UV-VIS 法测定灵芝不同收获期的多糖肽和灵芝酸

王赛贞^{1,2}, 林冬梅¹, 林占熿^{1*}, 林志彬³, 林树钱^{1,2}, 罗虹建¹

1. 福建农林大学 菌草研究所, 福建 福州 350002

2. 福州绿谷生物药业技术研究所, 福建 福州 350002

3. 北京大学医学部 药理系, 北京 100083

摘要: 目的 研究灵芝不同栽培方式和不同收获期中多糖肽和灵芝酸 A、B 的变化, 为灵芝规范化栽培及制定产品质量标准提供依据。方法 RP-HPLC 测定菌草灵芝和仿野生栽培的灵芝提取物的灵芝酸 A、B 的变化。色谱柱为 XB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05%磷酸-乙腈 (65:35), 检测波长 254 nm, 常温, 进样量 50 μL。以灵芝多糖肽为对照品, 采用 Folin-酚试剂法, 通过紫外-可见吸收光谱法检测菌草灵芝和仿野生栽培灵芝不同收获期提取物的多糖肽。结果 灵芝酸 A、B 线性范围分别为 14.8~371.0 和 16.4~409.0 μg/mL, 平均回收率为 95.0%、100.5%, RSD 分别为 1.18%、3.37% (n=6)。灵芝多糖肽在 100~600 μg/mL 与吸光度值呈线性关系, r=0.999 5, 回收率 95%~100%。结论 该方法简便、快速, 可用于灵芝及其产品中多糖肽和灵芝酸 A、B 的质量控制。菌草灵芝沸水提取能将多糖肽和灵芝酸分离, 既简化了灵芝水、醇提取工艺, 又提高经济效益。

关键词: 菌草灵芝; 仿野生栽培灵芝; 灵芝多糖肽; 灵芝酸 A; 灵芝酸 B; RP-HPLC

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)03-0190-04

Determination of polysaccharide peptides and ganoderic acids of *Ganoderma lucidum* in different harvest periods by RP-HPLC and UV-VIS methods

WANG Sai-zhen^{1,2}, LIN Dong-mei¹, LIN Zhan-xi¹, LIN Zhi-bin³, LIN Shu-qian¹, LUO Hong-jian¹

1. Juncao Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. Fuzhou Green Valleys Biological Pharmaceutical Technology Institute, Fuzhou 350002, China

3. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China

Abstract: Objective To study the changes of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptides (GLPP) and ganoderic acids A and B by different cultivation methods, which provides the basis for *G. lucidum* standardized cultivation and establishment of its product quality standard. **Methods** To determine the changes of ganoderic acids A and B between grass-cultivated *G. lucidum* (GCGL) and wood logs cultivated *G. lucidum* (WLCGL) extracts by RP-HPLC method. Chromatography on XB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and the mobile phase was 0.05% phosphoric acid-acetonitrile (65:35) with detection wavelength of 254 nm at ambient temperatures and sample quantity of 50 μL. With GLPP as reference, the content of polysaccharide peptide from GCGL and WLCGL extracts was tested in UV-VIS by using the method of Folin-phenol reagent. **Results** Linear ranges of ganoderic acids A and B were 14.8—371.0 and 16.4—409.0 μg/mL, respectively. The average recovery rate of ganoderic acids A and B were 95.0% and 100.5%, and RSD were 1.18% and 3.37% (n = 6), respectively. In the range of 100—600 μg/mL, linear relationship was between concentrations and absorbance of GLPP, r = 0.999 5, with the recovery rate of 95%—100%. **Conclusion** The method is simple and convenient, which could be used for the quality control of GLPP and the changes of ganoderic acid A and B. It is found that GCGL could be extracted from boiling water, which could separate GLPP and ganoderic acids at the same time. It could not only simplify the alcohol and water extraction process of *G. lucidum*, but also improve the economic efficiency.

Key words: grass-cultivated *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. (GCGL); wood logs cultivated *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. (WLCGL); *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide (GLPP); ganoderic acid A; ganoderic acid B; RP-HPLC

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 是一种珍贵的食药菌。灵芝含有多糖肽、灵芝酸、

甾醇、生物碱和核苷等有效成分, 具有多种生理活性^[1-2]。灵芝多糖肽有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化作

收稿日期: 2012-02-18

作者简介: 王赛贞 (1946—), 高级工程师, 主要从事药用菌活性成分和质量标准的研究。

*通讯作者 林占熿 (1943—), 研究员。E-mail: lzjuncao@163.com Tel: (0591)83789223

用,对放射线损伤及化疗药损伤具有保护功能^[1-4]。灵芝酸是三萜类物质,具有抗肿瘤、保肝、解毒和抗炎的药理功效。至今已从灵芝分离出的灵芝三萜类物质已达150多种。其中灵芝酸A、B均能抑制血管紧张素转换酶作用,一直是国内外学者研究的热门课题^[4-5]。本实验通过RP-HPLC和UV-VIS法测定栽培灵芝不同收获期的多糖肽和灵芝酸A、B含量具有两个特点:其一,用灵芝活性成分GLPPS为对照品来衡量灵芝提取物的质量,较传统用葡萄糖做对照品,更合理。其二,用水提取菌草灵芝能同时得到多糖肽和灵芝酸的全部组分。本实验旨在为选择最佳灵芝药材来源提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 2535 型高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外-可见光检测器(美国 Waters 公司),UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司)、Millipore 纯净水发生器(美国 Millipore 公司)。

灵芝酸A、B对照品由中国医学科学院北京协和医学院药物研究所陈若芸教授赠送,经HPLC检测质量分数分别为97%、95%。灵芝多糖肽(GLPP)对照品从赤芝子实体提取分离制得,经四大光谱鉴定为主链由1→3及1→4交替连接的葡萄糖构成,在部分主链葡萄糖的6位有分支,非还原末端均由葡萄糖构成,经高效凝胶渗透色谱法HPGPC检测其质量分数大于98%。

仿野生栽培灵芝和菌草灵芝分别由福建岁昌生态农业开发有限公司和福建农林大学菌草研究所提供。两种样品用沸水提取、浓缩和干燥制成供试品水提取物,其残渣经干燥用乙醇加热回流提取,清液经浓缩干燥等步骤得醇提取物。

乙腈(色谱纯)为Merck公司产品,Folin-酚试剂为Sigma公司产品,其他试剂为国产分析纯。

2 方法与结果

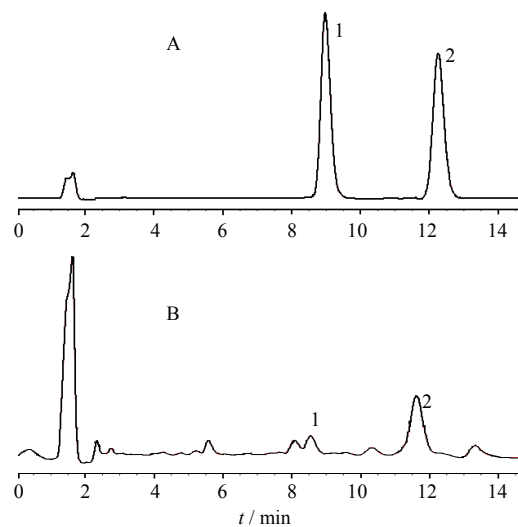
2.1 RP-HPLC 法测定灵芝酸A、B

2.1.1 检测波长的选择 以甲醇为溶剂,配制质量浓度分别为62.2、53.3 μg/mL的灵芝酸A、B混合液在紫外分光光度计220~600 nm扫描,结果在254 nm上有最大的吸收。

2.1.2 色谱条件和系统适应性 色谱柱为XB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Welch Materials 公司),流动相为0.05%磷酸-乙腈(65:35),检测波长254 nm,柱温35℃,进样量50 μL,体积流量1 mL/min。理论塔板数以灵芝酸A、B计均大于

10 000。色谱图见图1。

2.1.3 混合对照品储备液的制备 精确称取灵芝酸A对照品6.21 mg和灵芝酸B对照品5.33 mg,置同一5 mL量瓶中,用甲醇定容,即得灵芝酸A 1.242 mg/mL、灵芝酸B 1.066 mg/mL的混合对照品储备液。



1-灵芝酸B; 2-灵芝酸A

1-ganoderic acid B; 2-ganoderic acid A

图1 混合对照品(A)和菌草灵芝水提取物(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and grass-cultivated *G. Lucidum* water extract (B)

2.1.4 供试品溶液的制备 精确称取适量灵芝提取物,加20 mL氯仿,65℃加热回流2次,每次30 min,冷却,滤过,合并滤液,挥干溶剂。残渣以5 mL甲醇溶解,定容至10 mL,混匀并通过0.45 μm微孔滤膜,取滤液即得。

2.1.5 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液适量,分别稀释2、5、10、20、50倍形成系列混合对照品溶液,分别进样测定,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程:灵芝酸A: $Y=1.16 \times 10^4 X - 5.48 \times 10^4$, $r=0.9999$,灵芝酸B: $Y=1.32 \times 10^4 X + 2.14 \times 10^3$, $r=0.9999$,表明灵芝酸A在24.84~621.2 μg/mL、灵芝酸B在21.24~533 μg/mL线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 取混合对照品溶液,在上述色谱条件下,精密吸取50 μL,重复进样6次,记录色谱峰,计算得灵芝酸A峰面积的RSD为1.1%,灵芝酸B峰面积的RSD为1.7%。结果表明仪器精

密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取菌草灵芝水提取物 200.2 mg, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 50 μ L, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、16 h 进样测定, 记录色谱峰, 计算得灵芝酸 A 峰面积的 RSD 为 2.2%, 灵芝酸 B 峰面积的 RSD 为 0.7%。表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 精确称取菌草灵芝水提取物样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别吸取 50 μ L 进样测定, 记录色谱峰, 计算得灵芝酸 A、B 质量分数的 RSD 分别为 0.9%、1.6%, 表明方法重复性良好。

2.1.9 回收率试验 精密称取 6 份菌草灵芝水提取物, 每份 100.0 mg, 分别准确加入混合对照品溶液(灵芝酸 A 148.40 μ g/mL, 灵芝酸 B 81.80 μ g/mL) 2、3、4 mL 各 2 份, 制备供试品溶液, 分别进样测定, 计算得灵芝酸 A、B 的平均回收率分别为 94.92%、100.50%, RSD 分别为 1.18%、3.37%。

2.1.10 样品测定 分别取菌草灵芝子实体和仿野生灵芝子实体的水提取物和醇提取物样品适量, 按“2.1.4”项下方法制成供试品溶液, 进行测定, 计算灵芝酸 A 和 B 的质量分数, 结果见表 1。

表 1 灵芝子实体不同收获期提取物灵芝酸 A、B 质量分数
Table 1 Contents of ganoderic acids A and B from sporophore of *G. lucidum* extracted in different harvest periods

栽培方式	收获期	灵芝酸 A/%		灵芝酸 B/%	
		沸水提取	乙醇提取	沸水提取	乙醇提取
菌草灵芝子实体	初熟期	1.640	未检出	0.449	未检出
	成熟期	1.584	未检出	0.348	未检出
	过熟期	0.910	未检出	0.204	未检出
仿野生栽培	初熟期	1.106	0.616	0.234	0.124
灵芝子实体	成熟期	0.497	0.410	0.158	0.104
	过熟期	0.298	0.246	0.093	0.068

2.2 紫外-可见吸收光谱法测定灵芝子实体及产品多糖肽^[6]

2.2.1 实验试剂的配制 碱性铜试剂 甲液: 取 NaOH 5 g + Na₂CO₃ 25 g + 水 200 mL 溶解; 乙液: 酒石酸钾 0.25 g + 水 25 mL, 硫酸铜 0.125 g + 水 15 mL, 分别溶解, 并混合。临用时, 两液合并, 定容至 250 mL。Folin-酚试剂 取 2 mol/L 市售 Folin-酚按 1:16 稀释。

2.2.2 检测波长的选择 精确吸取 1 mg/mL GLPP 试液 1 mL, 加甲液 1 mL, 室温放置 10 min, 加 4 mL Folin-酚试剂于 55 $^{\circ}$ C 水浴保温 5 min, 冷却后于

650~800 nm 处扫描。选择最大吸收波长 750 nm 为检测波长。

2.2.3 标准曲线的绘制 精确称取 GLPP 对照品 10.0 mg 置 10 mL 量瓶并定容。分别吸取 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 上述标准液于具塞试管中, 用水定容至 1 mL。加甲液 1 mL, 室温放置 10 min, 再加 4 mL Folin-酚于 55 $^{\circ}$ C 水浴保温 5 min, 冷却至室温, 以第一管为空白。于 750 nm 处测定吸光度。以对照品质量浓度 X (μ g/mL) 为横坐标, 吸光度值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。其回归方程为 $Y=0.0004X+0.00223$, $r=0.9995$ 。

2.2.4 供试品溶液的制备 精确称取样品适量置于 50 mL 量瓶中, 加水 40 mL 于 60 $^{\circ}$ C 水浴加热溶解 30 min, 冷却并定容混匀。滤过, 精确吸取滤液 2 mL, 加无水乙醇 6 mL 混匀, 10 000 r/min 离心 15 min。沉淀加水定容至 5 mL。

2.2.5 精密度试验 精确称取 GLPP 对照品 10.0 mg, 配制成 500 μ g/mL, 按“2.2.3”项下方法制备成测试液, 在 750 nm 连续 6 次测定吸光度值, 其 RSD 为 1.54%。说明本系统精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精确称取初熟期菌草灵芝水提取物 83.98 mg, 按“2.2.4”项下方法制备成供试液, 在 0、0.5、1、2、4 h 先后测定, 其质量浓度平均值 283.12 μ g/mL, 其 RSD 为 0.96%。结果表明在 4 h 内显色良好。

2.2.7 重复性试验 精确称取 6 份初熟期菌草灵芝水提取物 80.0~83.0 mg, 按“2.2.4”项下方法制备成供试液, 先后测定, 其质量浓度平均值为 270.919 μ g/mL, 其 RSD 为 1.97%。

2.2.8 回收率试验 称取 6 份已知质量分数初熟期菌草灵芝水提取物 54.5 mg, 精确加已知质量分数过熟期菌草灵芝水提取物 44、66、88 mg 各 2 份, 按“2.2.4”项下方法制备供试液, 在 750 nm 处测定吸光度, 计算平均回收率为 97.07%, RSD 为 1.5%。

2.2.9 样品测定 称取菌草灵芝和仿野生栽培灵芝沸水和乙醇提取样品各 0.2 g, 按“2.2.4”项下方法制备成供试液, 在 750 nm 处测定吸光度值, 计算质量分数。结果见表 2。

3 讨论

本文探讨不同栽培方式不同收获期的多糖肽以及灵芝酸 A 和 B 的质量分数变化, 具有以下特点。

菌草灵芝沸水提取可将灵芝酸 A、B 完整分离出来, 其样品残渣的乙醇提取物未检出灵芝酸 A 和

表2 灵芝子实体不同收获期提取物的多糖肽质量分数
Table 2 Contents of GLPP from sporophore of *G. lucidum*
extracted in different harvest periods

栽培方式	收获期	多糖肽/%	
		沸水提取	乙醇提取
菌草灵芝子实体	初熟期	43.21	1.16
	成熟期	53.94	未检出
	过熟期	45.89	1.63
仿野生栽培灵芝子实体	初熟期	33.80	0.68
	成熟期	47.05	0.27
	过熟期	36.15	0.35

B。在同等情况下仿野生栽培灵芝水提取物残渣乙醇提取,则检出灵芝酸A和B。

不同栽培方式不同收获期的灵芝酸A>灵芝酸B;沸水提取物的灵芝酸A、B总量>乙醇提取物;灵芝酸A和B为初熟期>成熟期>过熟期。

不同栽培方式不同收获期的沸水提取多糖肽质量分数为成熟期>过熟期>初熟期。乙醇提取多糖肽结果均较低。

灵芝酸和灵芝多糖肽是灵芝的主要有效成分。实验结果,菌草灵芝与仿野生栽培灵芝相比具有组织疏松的特点,在目前的提取工艺下,菌草灵芝沸水提取能将灵芝多糖肽和灵芝酸同时分离,省略醇提步骤,简化生产工序,降低成本,对菌草灵芝提

取物的工业化生产提供技术依据。

用RP-HPLC测定灵芝酸A、B,方法简便、适用、可行。用Lowry法测定灵芝不同收获期多糖肽变化,其对照品采用从灵芝中提取的多糖肽纯品GLPP。经方法学考察,该方法适用、简便可行。采用灵芝活性多糖肽来考察灵芝及其产品的质量为国内首次报道。提取方法仅检测多糖肽和灵芝酸A和B的质量分数变化,尚未进行组分、组分相对质量分数以及结构与药理间相关性的系统研究,有待今后进一步工作。

参考文献

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究 [M]. 第3版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007.
- [2] 何晋浙, 黄霄芸, 张安强, 等. 灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱分析及质控评价 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1125-1129.
- [3] 王赛贞, 林树钱, 林志彬, 等. 灵芝多糖肽中单糖的组成 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 174-176.
- [4] 王明宇, 刘 强, 车庆明, 等. 灵芝三萜类化合物对3种小鼠肝损伤模型的影响 [J]. 药学报, 2000, 35(5): 326-329.
- [5] 林志彬. 灵芝的抗肿瘤作用机制 [J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 391-393.
- [6] 陈 颖, 王赛贞, 林树钱. 用Folin-酚法测定灵芝产品中多糖肽的含量 [J]. 海峡药学, 2007, 19(7): 37-39.