

· 专论 ·

中药指纹图谱与灵芝质量标准研究方法

周选围¹, 林娟², 孙小芬², 唐克轩¹

(1. 上海交通大学农业与生物学院 植物生物技术研发中心, 复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200030;

2. 复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 中药指纹图谱是中药现代化关键问题之一。根据国内外中草药指纹图谱研究进展, 概述了指纹图谱建立中各项技术及应用, 讨论了建立灵芝指纹图谱的一般策略和方法, 指出建立指纹图谱过程中应该注意的问题, 阐明了各项技术在灵芝指纹图谱的研究中的应用现状, 并对前景进行了分析。分析了建立灵芝指纹图谱的基本思路, 为其建立质量控制标准奠定了基础。

关键词: 中药; 指纹图谱; 灵芝; 质量标准

中图分类号: R282.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)08-1121-05

Fingerprint of Chinese materia medica and research methods of quality standard for *Ganoderma* spp.

ZHOU Xuan-wei¹, LIN Juan², SUN Xiao-fen², TANG Ke-xuan¹

(1. Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Fudan-SJTU-Nottingham Plant

Biotechnology R & D Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 2. State Key

Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Key words: Chinese materia medica; fingerprint; *Ganoderma* spp.; quality standard

灵芝是我国传统的药用真菌, 古代为青芝、赤芝、白芝、黄芝、黑芝和紫芝的总称^[1], 现代的灵芝实际上是灵芝家族的总称。我国的灵芝科真菌资源十分丰富, 现有 4 属 98 种, 但目前只有 18 种被人们开发利用^[2]; 《中国药典》2000 年版中首次承认灵芝的药用价值, 作为我国法定中药材的是多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体。卫生部 2001 年发布的“可用于保健食品的真菌菌种名单”中, 有 3 种灵芝科真菌: 灵芝、紫芝和松杉灵芝 *G. tsugae* Murrill。在实际被开发利用的灵芝种类中, 有些(如赤芝 *G. lucidum* 等)已被人工栽培, 作为制药或保健食品生产原材料出口国外或用于国内市场; 有些种类(如薄盖灵芝 *G. capense* (Lloyd Teng 等)已被用于液体深层培养, 获得菌丝体及其代谢产物生产保健食品、药品。中药指纹图谱是中药现代化关键问题之一, 它不仅是一种中药质量控制模式和技术, 更是一种进行中药理论研究和

新药开发的模式和方法, 目前已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的最有效的手段。

1 中药指纹图谱技术

中药指纹图谱是指中药材经适当处理后, 采用一定的分析手段和仪器测得的、能够标识该中药材及其制剂中的各种组分群体特性的共有峰的图谱, 是借用 DNA 指纹图谱发展而来的概念。中药指纹图谱从不同的角度会有不同的称谓, 如化学指纹图谱和生物指纹图谱; 光谱指纹图谱和色谱指纹图谱等。从现代生物技术的观点分析, 它应包括中药 DNA 指纹图谱、蛋白质指纹图谱和化学指纹图谱。

1.1 DNA 指纹图谱(DNA fingerprinting): 主要依靠分子标记来构建不同品种的指纹图谱, 利用聚合酶链反应(PCR)技术从不同生物样品人工合成 DNA 片段, 而这种 DNA 片段的大小、数目因不同的生物而异, 在过去的十多年里, 在 DNA 水平上被公认对中药进行鉴别的比较标准和可靠的方法主要有随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术、限制性核酸

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 上海市科学技术委员会标准专项资助(05DZ05007)

作者简介: 周选围(1962-), 男, 陕西省咸阳市人, 教授, 硕士, 主要从事真菌资源开发利用研究。公开发表论文 70 余篇, 主编出版专著 2 部, 参编教材专著 6 部。 Tel: (021)65642772 Fax: (021)65643552 E-mail: xuanweizhou@163.com xuanweizhou@sjtu.edu.cn

片段多态性(RFLP)技术、简单序列重复(SSR)技术、扩增片段长度多态性(AFLP)技术;另外还包括一些新兴的技术,如序列特征扩增区(sequence characterized amplified regions, SCAR)技术、内部简单序列重复(ISSR)技术、单核苷酸多态性(SNP)技术、相关序列扩增多态性(SRAP)技术和端粒重复扩增(TRAP)技术等^[3]。目前已有一些应用 DNA 分子遗传标记技术鉴别植物中药的研究报道,涉及的药材 20 余种,也涉及其他一些技术,研究的药用植物包括人参、淫羊藿、苍术、甘草、东当归、柴胡、大麻、蒲公英等,对其进行基源鉴定、植物亲缘关系及品质评价的研究。这些技术被大量的研究结果证明,可以更有效地鉴别中药的品种,尤其适合于同属不同种类或同种不同变种、变型品系的鉴别^[4~6]。

1.2 蛋白质指纹图谱(protein fingerprinting):包括蛋白质电泳(同工酶)技术:等电聚焦电泳法(IEF)、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、酸性-PAGE(A-PAGE)、不连续醋酸尿素聚丙烯酰胺电泳(NAU-PAGE)等方法;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),肽质量指纹谱技术(peptide mass fingerprinting, PMF)等^[7]。中药蛋白质指纹图谱的研究刚刚起步,国内外仅见利用电泳技术对为数不多的中药进行了初步的研究,如国内报道的对苦杏仁、山桃仁、桃仁、樱桃仁、郁李仁 5 种李属中药的蛋白质电泳研究;利用蛋白质与过氧化物酶(POD)同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳指纹图谱分析鉴别北沙参农家品种;对百合科 3 种中药的电泳指纹图谱分析;对白首乌蛋白质及同工酶电泳的实验研究等。另对一些有应用前景的蛋白质,如麻疯树毒蛋白^[8]、蓖麻毒蛋白^[9]、天麻抗真菌蛋白等的生物技术研究,也对其他中药蛋白质指纹图谱的研究提供了可以借鉴的思路和方法。

1.3 化学指纹图谱(chemical fingerprinting):按所采用的实验方法主要分为两类:色谱指纹图谱和光(波)谱指纹图谱。色谱指纹图谱主要包括:薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)和高效毛细管电泳(HPCE);光(波)谱指纹图谱主要包括:紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)、质谱(MS);此外还有采用连用分析技术(如 HPLC-MS、GC-MS 等)及 X 射线衍射法获得化学指纹图谱。光谱和波谱指纹图谱由于灵敏度和选择性的限制,所以不能表达中药这样混合体系中各种不同化学成分浓度分布的整体状况,与此相对应,色谱指纹图谱为首选方法,并为 SDA (State Drug

Administration)所推荐。化学指纹图谱技术已广泛应用于各种中药的质量控制之中,在已经确认该品种安全有效的前提下,凭借实用的指纹图谱既可确认产品的真伪,同时又能判断质量的稳定与否^[10]。

2 灵芝质量标准研究方法

对于灵芝生药质量的检测,传统的鉴定方法主要是依靠形态学鉴定,进行形、色、气、味、质地等外观性状检测,该方法简便、直接,缺点是主观性强,其准确性完全取决于检验者的经验判断,且难以鉴定加工炮制后的碎片或粉末药材。目前则是从生物分类学(基原鉴定)、组织学(显微鉴定)、化学(理化鉴定)角度建立了相对比较客观的检测标准;同时,随着科学技术的发展,细胞学、酶学(同工酶分析)、生物化学(蛋白质分析及效价评价)^[11]、血清学(免疫测定)^[12]等生物技术亦逐渐应用灵芝鉴定中来。分子生物学研究发现,中药(不含矿物类)所依赖的生物资源——“物种”的多样性是由于其基因多态性的结果,而基因多态性可在分子水平上检测,它比形态、组织和化学水平的检测更能代表中药变异的遗传标记(genetic marker)。DNA 分子标记技术,也称 DNA 分子诊断技术,是指直接分析遗传物质的多态性来诊断生物内在基因分布规律及其外在性状表现规律的技术。

2.1 质量标准的建立是一个系统工程:我国地域辽阔,地理和气候条件复杂,灵芝种类繁多,长期以来,同一灵芝药材多基源情况较为普遍,使灵芝的品种十分复杂,呈现出“同一品种不同名称,同一名称不同品种”的混乱局面,所以建立可靠统一的标准化管理体系是建立灵芝(包括其他药用真菌)质量标准的前提和基础。另外,从目前市场开发的灵芝产品的情况来看,有灵芝整个子实体、也有切片(饮片)、灵芝粉(颗粒)、灵芝提取物;从发育时期来看,有菌丝体、子实体、孢子粉(破壁与未破壁)及其提取物等。因此就某一种灵芝来说,指纹图谱的建立并利用其进行质量控制,必须解决的问题很多,如有效成分的量、色谱指纹图谱、DNA 指纹图谱、规范化栽培(good agricultural practice, GAP)、贮藏(good supply/storage practice, GSP)和加工(good manufacturing practice, GMP);另外还有菌龄、产地、季节、加工方法、重金属量等。所以质量标准的建立是一个多学科相互融合、多技术综合运用、多部门(生产、科研、管理)分工协作的一个复杂的过程。

目前对灵芝的研究,一方面有些相对重要领域(如资源、蛋白等领域)因各种原因无人涉足,而另一

方面,重复投资、重复研究项目(多以孢子粉破壁、多糖和三萜为主要指标开发产品)的情况仍然存在。科研院所之间尚未形成协调分工、联合攻关和资源共有的局面,科研院所和传统中医药制造产业还没有建立有效的协同机制,科研经费投入不足和以灵芝新品种为主的新药品种匮乏成为中国灵芝产业发展的症结。

2.2 灵芝指纹图谱的建立方法:灵芝指纹图谱构建大致可分为原材料的准备、实验数据的获得、数据分析与评价、指纹图谱的方法检验、图谱的执行等 5 个基本步骤。原料药、生产工艺的规范化是研究色谱指纹图谱的前提,样本的代表性、色谱条件的优化是其专属、可靠、稳定的基本保障。

2.2.1 建立灵芝质量标准的一般策略:灵芝及其制剂的原料主要来源于菌丝体、子实体和孢子粉这 3 种不同发育时期的灵芝材料。这些原料和菌种、培养条件或菌丝体与发酵产物等混合物(菌质)有很大关系。有效部位与子实体栽培条件或菌丝体发酵条件有密切关系。因此,在借用植物药材研究经验的基础上,还必须考虑到灵芝的特殊性。

(1)原材料的准备:固定品种、药和部位(菌丝体、子实体或孢子粉)、产地、采收期和加工方法的 10 批以上药材,以及足够数量的及处方组成和用量固定、生产工艺稳定的中间体或成品。只有保证样品的代表性,才能保证建立的指纹图谱的可靠性。为避免走弯路,应先对现有研究的数据进行分析和整理、收集不同产地或不同品系的菌株、选择分析仪器并准备实验计划。

(2)分析方法的建立:筛选并建立分析方法(包括样品、样品的制备或分离、仪器的操作),验证方法的准确度和精确度,建立质量控制体系,建立分析测试方法的档案,提供给国家认定的质量评价单位或实验室。

(3)实验信息的评价:挑选可应用的技术,建立菌丝体、子实体和孢子粉等不同材料分析的方法,初步界定指纹图谱。

(4)标准图谱的确定:对当前完成的指纹图谱草案进行验收测试,用测试规范对已经确认的实验材料进行试验,对试验结果进行周期性的评价,适当时候转变成可接受的指纹图谱。

(5)指纹图谱的执行;选择指纹图谱的尺度,制定操作规范并颁布执行。

2.2.2 建立灵芝质量标准的方法学:灵芝具有多种营养成分并具有多种生理活性和药理作用,因此有

“功能食品资源”的美誉,所以在世界范围内迅速兴起灵芝的开发热潮。利用灵芝进行保健食品和药品开发主要有 3 个方面:①以子实体为原料,提取有效成分,制成各种功能性食品或药品;②以深层培养液为原料,生产保健饮品,或提取药用成分生产药品;③以孢子粉为原料,开发系列功能性食品或药品^[13]。尽管从开发的层次来讲利用了灵芝生长发育的各个时期—菌丝体、子实体和孢子等,但涉及的灵芝种类仅 2~3 种,仅占目前研究可开发灵芝的 1/4~1/5,占我国灵芝资源的 2%~3%。

就灵芝而言化学指纹图谱目前国内外研究较多,涉及到各类研究手段,但目前公认的还是使用色谱方法,且在这方面也有较为深入的研究^[14,15],这里也就不再赘述。而就 DNA 指纹图谱的研究目前在国内处于起步阶段,而如何建立有效的指纹图谱各家说法不一,但总的基本思路如图 1 所示。

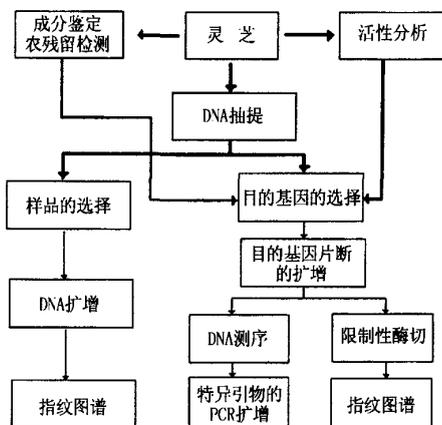


图 1 灵芝 DNA 指纹图谱的建立策略

Fig. 1 Formation strategy of DNA fingerprint of *Ganoderma* spp.

指纹图谱的用途主要有 2 个,一是鉴别真伪,二是分析优劣,优劣即疗效。DNA 指纹图谱所依赖的技术称为 DNA 分子标记技术,是指通过直接分析遗传物质(DNA)的多态性来诊断生物内在基因排布规律及外在性状表现的技术。此类技术大致分为 3 类:①以电泳技术和分子杂交技术为核心的 RFLP 等技术;②以电泳技术和 PCR 技术为核心的 RAPD/SSR/AP-PCR 等 DNA 指纹和 DNA 测序技术;③前两类技术结合的 AFLP、SCAR、DALP、RFLPCPCR、RAPD-PCR 及最新开发的基因芯片诊断技术。单从常用分子标记技术的技术要点来看,SSR 和 AFLP 在物种的多态性程度和技术的重现性方面,无论是在种内还是在种间其多态性程度都

比较高,且又有较好的重现性。当然各种分子标记方法是互补的,任何一种标记技术不可能全面分析所有药材,选择方法应视研究对象的实际需要和可能,以及按照不同标记技术的特点和优势而定,目前存在一些误解,以为指纹图谱使用的技术越先进就越好,这种看法是片面的。当然在具体选用技术时,该技术的普及程度和样品分析的成本也是必须考虑的一个因素。

2.3 灵芝研究中指纹图谱技术的应用:中药指纹图谱应用的主要目的之一就是作为中药质量控制的一种模式,其一是灵芝药材本身指纹图谱的制定,其二是利用灵芝加工成的产品的指纹图谱的制定。就灵芝及其产品的质量控制在而言,目前大多数是针对灵芝的有效成分而采用的化学指纹图谱的方法,如针对灵芝中存在的尿嘧啶、腺嘌呤、腺苷进行的薄层色谱鉴别,或采用紫外分光光度法测定灵芝胶囊中的总核苷^[16];针对灵芝(及其产品)中的多糖,采用可见-紫外分光光度法测定其多糖量^[17];也有对灵芝子实体中醇溶性组分进行比色定量的研究,并认为可以此作为控制灵芝产品质量的标准^[18];也有利用 RP-HPLC 技术建立了灵芝中所含三萜类组分的高效液相指纹图谱,用于灵芝及其制剂的质量控制^[19,20]。在 DNA 指纹图谱的研究中,目前国内主要利用的是 RAPD 技术,如唐传红等^[21]利用 RAPD 和酯酶同工酶技术对来自国内外的 10 个灵芝属代表菌株进行了遗传多样性分析;罗联忠等^[22]从 247 个随机引物中筛选出具有较高多态性扩增检测能力的引物 9 条,对 23 株灵芝菌种进行 RAPD 分析,从 DNA 水平上探讨不同产地的灵芝菌种的差异等。另外,也有利用 AFLP 技术、胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic chromatography, MEKC)针对灵芝种间和种内变异进行研究的一些报道^[23,24],虽然其研究目的并非是针对建立灵芝的指纹图谱而进行的,但说明在灵芝指纹图谱的建立中这些技术是切实可行的,并在该领域有着一定程度上的技术上的先进性。

3 灵芝指纹图谱的研究前景与问题

自从提倡利用指纹图谱对中药产品进行质量评价以来,国内外许多学者都致力于中药指纹图谱的方法学研究。随着中药材化学成分的分离、分析研究的多模式、多柱、多元检测技术基础与平台的建立,药效组分的分析研究及其药效组分的指纹图谱的建立,以及多水平评价的方法学的建立和发展,中药化学指纹图谱已趋于成熟并得到了较为广泛的应用,

并基本形成了利用指纹图谱控制中药材及其产品质量的基本思路:将药材或制剂的特征指纹图谱转化为在特定条件下的特征数据组,再按照药材→质量标准→特征图谱制作条件→特征图谱数据组逐级划分目录的方式存入数据库,而后将待测样品在相同条件下的特征数据组输入计算机进行检索并进行相关检验,就可提供一个对中药材进行快速、准确鉴定及质量评价的客观标准。中药化学指纹图谱研究的基本思路给灵芝指纹图谱的建立和研究策略上提供了有益的参考和在技术上的借鉴。

灵芝在我国的研究和应用有着悠久的历史,已积累了丰富的研究经验,随着进一步对灵芝基因组学、有效化学成分和药理作用的深入研究,阐明基因组与大分子物质、小分子物质和药理活性之间的关系,建立包括 DNA、蛋白和化学指纹图谱在内的灵芝多维指纹图谱将会成为可能,并用于规范现有的灵芝产品的生产和指导开发灵芝新产品。但也不容忽视灵芝指纹图谱的建立还面临许多问题:①材料来源。灵芝属于广布种,收集代表产地的大量样本作为研究对象是必须条件之一,然而灵芝在全国各地均有分布,这就给“代表产地”的确定带来了困难,而指纹图谱研究首先需要解决这个源头问题。②新技术的应用。在灵芝研究中新技术的应用还不够前沿,如灵芝的有效成分是一个复杂的体系,在化学指纹图谱研究中,需要解决分离与检测两大问题,而采用单一分离模式勉为其难,采用传统的检测手段或单一联用技术也易丢失大量信息;在生物指纹图谱研究中,新兴的基因组学指纹图谱及中药蛋白组学指纹图谱在灵芝研究中并未涉足。③规范化程度。从灵芝的制种、栽培(或发酵)到有效成分的提取分离、分析检测,全过程的标准化、规范化程度不够,影响实验室之间的重现性,难以推广。④分析处理手段。尽管从理论上讲,存在众多的数据分析处理方法,但就目前的状况来看,还是缺少对大量信息的统计分析处理,指纹图谱的特征性不够明确、具体。

4 结语

近年来,中药指纹图谱的研究取得了极大的进展,而在灵芝研究和生产方面的应用仍处于初始阶段,尽管灵芝产品不论是在药品还是在保健食品上都得到了一定程度的开发和利用,但总的来讲科技含量较低,大多是原始材料的简单加工,有些产品如灵芝孢子粉、孢子油等缺乏统一的国家标准,出现许多“作坊式”的生产厂家,给相关管理部门带来了一定的困难,严重影响了整个灵芝产业的声誉。迄今为

止,在国内外,灵芝(包括其他真菌类中药材)的生物技术及其质量标准的研究还处于相对薄弱的环节,因此熟悉中药质量标准研究的基本策略和相关技术,加快对灵芝生物技术及质量标准的研究,是我国传统药用真菌产业化、国际化的必由之路。在灵芝指纹图谱的建立中如果能结合分子生物学手段,采用多种分析仪器联用获得的多维指纹图谱,并和药物疗效相结合,则既能反映基因的信息、化学信息,又能反映药效信息,进而阐明基因、化学成分和疗效的相关性,从而建立一个高水平的质量标准。

References:

- [1] Zhou X W, Lin J. Resources of wild *Ganoderma* spp. in China and their development and utilization [J]. *Acta Edib Fungi* (食用菌学报), 1999, 6(1): 58-64.
- [2] Chen T D, Li K B. Resources, taxonomy, ecological distribution, exploitation and utilization of Ganodermataceae from China [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi* (江西农业大学学报), 2004, 26(1): 89-95.
- [3] Hon C C, Chow Y C, Zeng F Y, et al. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(9): 841-846.
- [4] Zhang K Y, Leung H W, Yeung H W, et al. Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67(4): 379-381.
- [5] Yuan M, Hong Y. Heterogeneity of Chinese medical herbs in Singapore assessed by fluorescence AFLP analysis [J]. *Am J Chin Med*, 2003, 31(5): 773-779.
- [6] Hong D Y, Lau A J, Yeo C L, et al. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(22): 8460-8467.
- [7] Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, et al. Peptide mass fingerprinting [J]. *Methods*, 2005, 35(3): 237-247.
- [8] Lin J, Chen Y, Xu Y, et al. Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seed of *Jatropha curcas* [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(7): 858-863.
- [9] Fredriksson S A, Hulst A G, Artursson E, et al. Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(6): 1545-1555.
- [10] Han F M, Cai M, Chen Y. The current research of TCM fingerprinting technique [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 2004, 20(6): 647-651.
- [11] Ye B P, Wang Q H, Zhou S J, et al. Isolating of proteins from Lingzhi and study on its immune activity [J]. *Pharm Biotech* (药物生物技术), 2002, 9(3): 150-152.
- [12] Weng X G. Detect quantification of Ganoderic acid in *Ganoderma lucidum* by enzyme-linked immunoad sorbent assay [J]. *Foreign Med Sci: Tradit Chin Med* (国外医学: 中医中药分册), 2003, 25(1): 47-48.
- [13] Xie Y Z, Zhang Z, Li S Z, et al. Recent Advances in the development and processing works of the lingzhi fungus (*Ganoderma lucidum*) [J]. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2002, 22(6): 43-45.
- [14] Xing Z T, You Q H, Zhang J S, et al. Comparative study on triterpenes in different *Ganoderma* species [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(8): 575-576.
- [15] Huang S M, Yang X L, Huang J, et al. HPLC fingerprinting of triterpenoids from *Anoderma lucidum* [J]. *J Beijing Institute Technol* (北京理工大学学报), 2004, 24(5): 458-461.
- [16] Jiang Y Q. Study on quality control for Lingzhi capsules [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2001, 16(3): 112-113.
- [17] Sun Y F, Zhuang Y X, Huang X C. Studies on the preparation and quality control of the extract from Taishan's *Ganoderma lucidum* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(6): 394-396.
- [18] Huang S M, Yang X L, Wang B W, et al. Study on preparation process and analytical methods of ESAC from *Ganoderma lucidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(4): 332-334.
- [19] Gao J J, Nakamura N, Min B S, et al. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(6): 688-695.
- [20] Deng W H, Huang S M, Zou X W, et al. Establishment of fingerprint of Lingzhi (*Ganoderma lucidum* Karst.) and its preparations by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(3): 352-355.
- [21] Tang C H, Zhang J S, Chen M J, et al. Preliminary study on genetic diversity among ten strains of *Ganoderma* [J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 2005, 28(2): 133-136.
- [22] Luo L Z, Lin S Q, Xie B G, et al. Molecular identification of 23 *Ganoderma* strains [J]. *Strait Pharm* (海峡药学), 2005, 17(2): 83-85.
- [23] Qi J J, Ma R C, Chen X D, et al. Analysis of genetic variation in *Ganoderma lucidum* after space flight [J]. *Adv Space Res*, 2003, 31(6): 1617-1622.
- [24] Cheung H Y, Ng C W, Hood D J. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *Ganoderma* capsules by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 911(1): 119-126.

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和E-mail)。