

不同产地赤芝药材的质量分析

曾 秒, 谢孟君, 祝子喻, 俞月婷, 张 梅*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

摘要:目的 对不同产地批次赤芝 *Ganoderma lucidum* 进行全面的質量评价, 为灵芝药材质量标准的完善及优质赤芝原料药的筛选提供依据。方法 收集 15 批次各 GAP 基地的灵芝药材, 参照《中国药典》2020 年版方法及行业通用方法, 考察其水分、灰分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物, 分别采用比色法、柱前衍生高效液相色谱法 (PMP-HPLC)、高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖含量并进行比较; 采用比色法测定三萜甾醇含量, HPLC 法进行灵芝酸 A 一测多评; 同时对 15 批赤芝的 HPLC 指纹图谱进行差异比较。结果 15 批赤芝药材均符合《中国药典》2020 年版的质量标准要求, 指纹图谱聚类分析和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果表明山东聊城产赤芝能明显区别于其他批次样品。结论 15 批赤芝药材均符合《中国药典》质量标准, 说明国内赤芝 GAP 基地种植质量良好; 同时山东聊城产赤芝能显著区别于其他产地批次赤芝样品, 主要体现在三萜甾醇等有效成分的含量更高。

关键词: 灵芝; 质量评价; 主成分分析; 多糖; 三萜; 指纹图谱

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-7193-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.028

Quality evaluation of *Ganoderma lucidum* from different areas

ZENG Miao, XIE Meng-jun, ZHU Zi-yu, YU Yue-ting, ZHANG Mei

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective A comprehensive quality evaluation analysis of Chizhi [*Ganoderma lucidum* (Leyss. exFr.) Karst.] samples from different batches or origins was conducted to provide a basis for the improvement of the quality standard of Lingzhi (*Ganoderma*) and screening of high-quality *G. lucidum* materials. **Methods** Referring to the method of *Chinese Pharmacopoeia* 2020 edition and common approaches in this field, fifteen batches of *G. lucidum* herbs from each GAP base were collected and examined for moisture, ash, water-soluble leachate, alcohol soluble leachate, the polysaccharide content was compared by determining colorimetric method, precolumn derivatization high performance liquid chromatography (PMP-HPLC), and high performance gel permeation chromatography (HPGPC). The triterpene sterol content was determined by colorimetric method, and the QAMS of ganoderic acid A was evaluated by HPLC method.. The fingerprint profiles of 15 batches of *G. lucidum* were also compared for differences. **Results** All 15 batches of *G. lucidum* met the quality standard requirements of the *Chinese Pharmacopoeia* 2020 edition, the results of fingerprint cluster analysis and principal component analysis (PCA) show that *G. lucidum* of Liaocheng, Shandong Province can be clearly distinguished from other batches of *G. lucidum*. **Conclusion** All 15 batches of *G. lucidum* met the quality standards of the *Chinese Pharmacopoeia*, indicating that the quality of the domestic *G. lucidum* GAP base cultivation is good; at the same time, *G. lucidum* of Liaocheng, Shandong Province can be significantly different from other origin batches of *G. lucidum* samples, mainly in the higher content of active ingredients such as triterpene sterols.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. exFr.) Karst.; quality evaluation; principal component analysis; polysaccharides; triterpenes; fingerprint

灵芝是多孔菌科真菌灵芝的子实体, 由于极高的药用价值而被大规模商业化种植, 其中赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.和紫芝

G. sinense Zhao Xu et Zhang 被纳入《中国药典》2020年版^[1]。古代认为灵芝具有死而复生、延年益寿的功效, 中医用于心神不定、不茶不饭、失

收稿日期: 2023-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774202); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划 (CXTD2018010)

作者简介: 曾 秒, 女, 硕士, 研究方向为药物分析。E-mail: 1220799848@qq.com

*通信作者: 张 梅, 女, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及质量控制与评价研究。E-mail: zhangmei63@cdutcm.edu.cn

眠梦多、肺气虚证咳嗽等。现代研究表明,灵芝在肝损伤^[2]、癌症^[3-4]、心血管疾病^[5]、大脑损伤^[6]、氧化损伤^[7-8]、高血糖^[9-10]、炎症^[8,11]、免疫^[12]、衰老^[13]等疾病上面发挥了巨大作用,有非常重要的研究价值和市场前景。目前灵芝在食品药品方面已经有广泛的应用^[14],我国的灵芝 GAP 基地有必要按照更严格的质量标准,逐步规范化和标准化,不断推动灵芝产业的发展。

灵芝的主要化学成分为多糖类、三萜类化合物、甾醇、氨基酸类、生物碱、核苷类、脂肪酸类以及微量元素等^[15-16],其中多糖和三萜是其主要活性成分,也是研究最多的成分。经过多年的培育,灵芝形成了诸多品种,形态、质地各异,成分含量也有所区别,有效成分质量控制的方法也多种多样^[17-18],其中赤芝在我国应用广泛,在各个省市都有扩大栽培的趋势,但赤芝培育的品种繁多,同时 GAP 基地的种植水平不一。

本实验选用 15 批不同 GAP 种植基地的赤芝药材,对其进行全面的质量分析,为不同 GAP 基地赤芝的种植现状提供质量依据。

1 材料

1.1 药材来源

分别从 5 个省份的 11 个灵芝 GAP 种植基地收集 15 批赤芝药材,由广东省微生物研究所食用菌中心谢意珍研究员鉴定为多孔菌科真菌赤芝 *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体。药材样品来源见表 1。

表 1 灵芝供试样品编号、各培育品种及 GAP 种植基地
Table 1 Test sample number, each cultivated variety and GAP planting base of *G. lucidum*

编号	赤芝培育品种名	地块编号	GAP 种植基地
S1	沪农 1 号 119	16ZHJ03-02	浙江龙泉石隆 2 号基地
S2	韩芝 2 号 206	16ZHJ01-00	浙江龙泉城北
S3	韩芝 1 号	16ZHJ01-01	浙江龙泉城北
S4	美国大片	16SHD01-02	山东聊城冠县靖当铺
S5	韩芝 1 号 119	16ZHJ03-00	浙江龙泉石隆 1 号基地
S6	韩芝 2 号 203	16ZHJ02-00	浙江省龙泉小窖村
S7	韩芝 2 号 206	16FJ01-00	福建省浦城县水北街镇际溪村
S8	龙芝二号	16ZHJ03-01	浙江龙泉石隆村
S9	韩芝	16SHD01-01	山东聊城冠县靖当铺
S10	龙芝 1 号	16SHX02-00	陕西汉中洋县黄安镇
S11	沪农 1 号	16SHX02-02	陕西汉中洋县黄安镇
S12	韩芝 8 号	16SHX01-00	陕西汉中城固五堵
S13	大片灵芝	16SHD01-00	山东聊城冠县靖当铺
S14	赤芝 9 号	16ANH01-00	安徽金寨沙河梅山
S15	沪农 1 号小	16ANH02-00	安徽金寨苏坂

1.2 试剂

对照品齐墩果酸(质量分数为 98%,批号 MUST-16070406,)购于中国科学院成都生物研究所;葡萄糖(质量分数为 99.5%,批号 11083-201609)、岩藻糖(质量分数为 99.7%,批号 112014-201601)购于中国食品药品检定研究院;来苏糖(质量分数为 99%,批号 L115557)、甘露糖(质量分数为 98%,批号 D121716)、葡萄糖醛酸(质量分数为 98%,批号 C10584817)、半乳糖(质量分数为 97%,批号 G100368)购于上海阿拉丁试剂有限公司;右旋糖酐相对分子质量标准(套)对照品(批号 140637~646-201203)购于 Sigma 公司;灵芝酸 A(质量分数为 99%,批号 A0842)、灵芝酸 F(质量分数为 97.3%,批号 A0917)、灵芝酸 H(质量分数为 97.2%,批号 A0931)、灵芝酸 B(质量分数为 99%,批号 A0916)、灵芝烯酸 B(质量分数为 99%,批号 A0923)、灵芝酸 C2(质量分数为 99%,批号 A0911)、灵芝烯酸 C(质量分数为 99%,批号 A0924)、灵芝烯酸 D(质量分数为 98.7%,批号 A0907)、灵芝酸 D(质量分数为 99%,批号 A0906)、灵芝酸 G(质量分数为 99%,批号 A0909)均购于上海诗丹德标准技术服务公司;乙腈为色谱级;三氟乙酸、甲醇、乙醇、浓硫酸、蒽酮、冰醋酸、高氯酸、醋酸乙酯、香草醛、叠氮化钠、硫酸钠、盐酸、氢氧化钠、醋酸铵等均为分析级。

1.3 仪器

GZX-9070MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SX-2-5-12 型箱式电阻炉(北京科伟永兴仪器有限公司);UV3200S 型紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司);安捷伦 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)、示差折光检测器(美国 Agilent 公司)。

2 方法与结果

2.1 一般性检查及浸出物

按照《中国药典》2020 年版四部通则 0832 项下的烘干法和 2302 项下的灰分测定^[19],检测 15 批样品的水分及灰分,结果见表 2。15 批样品均满足《中国药典》的要求,水分为 1.47%~7.28%,灰分在 0.69%~2.79%。

因灵芝水溶性浸出物得率太低,同时为方便同步进行多糖相对分子质量分布、多糖含量、单糖组成测定,水溶性浸出物参考《中国药典》2020 年版设计方案^[1]。取赤芝粉末(过 2 号筛)8 g,精密称

表 2 赤芝质量评价结果

Table 2 Summary table of quality evaluation results of *G. lucidum*

编号	水分/%	灰分/%	水溶性浸出物/%	醇溶性浸出物/%	质量分数/%				
					比色法多糖	PMP-HPLC 法多糖	HPGPC 法多糖	三萜甾醇	灵芝酸
S1	5.88	1.41	6.50	2.57	1.41	0.39	1.35	0.84	0.12
S2	2.52	0.75	7.38	2.74	1.14	0.51	0.82	0.73	0.22
S3	1.97	0.82	7.82	3.26	1.91	0.50	1.87	0.9	0.27
S4	4.03	1.68	10.62	3.46	1.18	0.33	0.98	0.94	0.79
S5	7.28	0.81	9.27	2.88	1.89	0.56	1.95	0.86	0.29
S6	7.12	0.69	9.03	2.61	1.75	0.55	1.53	0.71	0.26
S7	2.32	0.81	8.32	2.45	1.07	0.51	0.83	0.70	0.17
S8	2.61	0.73	8.62	2.69	1.41	0.66	0.99	0.73	0.25
S9	6.86	1.75	8.56	3.40	1.07	0.46	0.91	0.94	0.63
S10	1.47	0.75	9.31	3.19	1.04	0.57	0.72	0.78	0.17
S11	3.93	1.08	13.33	3.93	3.19	0.90	2.51	0.96	0.43
S12	1.93	0.78	9.47	3.64	2.23	0.81	1.65	0.83	0.30
S13	3.02	2.79	16.43	6.39	1.45	0.95	1.16	1.74	0.05
S14	4.83	0.78	8.05	4.20	1.72	0.83	1.26	1.24	0.33
S15	3.28	1.20	7.93	3.41	1.55	0.47	1.43	1.10	0.44

定，置 500 mL 圆底烧瓶中，精密加水 240 mL，静置 1 h，加沸石 2~4 颗，置电热套中，连接回流装置，加热至沸腾，并保持微沸 4 h，趁热抽滤，用 25 mL 热水润洗 3 次，往滤渣及滤纸中再精密加水 240 mL，加热回流 3 h，操作同上，合并滤液。加水至 640 mL，摇匀，量取 320 mL（约为 4 g 样品），置已恒定质量的蒸发皿中，水浴蒸干后，于 105 °C 干燥 3 h，置干燥器中冷却 30 min，迅速精密称定干燥物质量，结果见表 2。15 批样品的水溶性浸出物含量符合《中国药典》2020 年版的要求，质量分数为 6.50%~16.43%。

灵芝醇溶性浸出物参照《中国药典》2020 年版通则 2201^[19]，以水溶性浸出物的方法，将溶剂替换为乙醇，设计步骤如下：灵芝子实体打粉，过筛，取 2~5 号筛之间的粉末约 4 g，精密称定，置 250 mL 平底烧瓶中，精密加入无水乙醇 100 mL，加沸石 2~4 颗，密塞，静置 1 h，连接回流装置，90 °C 水浴回流 1 h（沸腾后开始计时），关闭水浴锅电源并加入冷水降温后，迅速取下平底烧瓶，及时密塞，流水冷却至室温后，在真空度 -0.01~ -0.03 MPa 下抽滤，抽干后每次用 25 mL 无水乙醇洗涤平底烧瓶、滤器和滤渣，共 3 次，滤液转移至已干燥至恒定质量的蒸发皿中，在 90 °C 水浴上蒸干后，于 105 °C 干燥 3 h，置干燥器中冷却 30 min，迅速精密称定质量，以干燥物来计算醇溶性浸出物含量。结果显示 15 批样品的醇溶性浸出物质量分数为 2.45%~6.39%，其中 S13（山东聊城）含量最高。

2.2 比色法测定多糖含量

取“2.1”项下的水溶性浸出物，参照《中国药典》2020 年版中灵芝多糖的含量测定方法（硫酸蒽酮法测定）^[1]，以葡萄糖质量分数为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），制定标准曲线为 $Y=7.0954X+0.0378$ ， $R^2=0.9999$ ，计算供试品溶液中葡萄糖的含量，结果见表 2。15 批样品均符合《中国药典》2020 年版要求，质量分数范围为 1.04%~3.19%，其中样品 S11（陕西汉中泸农 1 号）的多糖含量最高。

2.3 柱前衍生高效液相色谱法（PMP-HPLC）测定多糖含量^[20]

2.3.1 对照品衍生化溶液的制备

取甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、岩藻糖各约 10 mg，葡萄糖约 100 mg，精密称定，用纯净水溶解并定容至 50 mL 量瓶中，摇匀，作为混合对照品溶液备用；取对照品来苏糖约 10 mg，精密称定，用纯净水溶解并定容到 25 mL，摇匀，作为内标对照品溶液备用；精密移取 0.125 mL 混合对照品溶液和 0.125 mL 内标，混匀。加入 0.15 mol/L 的 NaOH 溶液 0.3 mL 和 0.1 mol/L 的 PMP 溶液 0.5 mL，充分混匀后，70 °C 水浴 30 min，冰浴终止反应，加入 0.15 mol/L 的盐酸 0.32 mL 和纯净水 0.65 mL，充分混匀后，12 000 r/min 室温离心 10 min，吸取上清液适量即得。

2.3.2 供试品衍生化溶液的制备

将“2.1”项下 8 g 灵芝子实体的水提物，定容至 10 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后，取 0.25 mL，加入 0.250 mL 三氟乙酸

溶液，充氮气，酒精喷灯封管，置 110 °C 烘箱中水解 4 h，取出，放至室温；加入 0.5 mL 甲醇，60 °C 以下真空减压干燥，反复处理 3 次，至水解液干燥完全；残渣精密加入 0.125 mL 热水和 0.125 mL 内标（来苏糖），超声 30 s，使残渣完全溶解并与内标充分混匀，加入 NaOH 0.3 mL 和 PMP 0.5 mL，充分混匀后，70 °C 水浴保温 30 min，迅速取出，冰浴 30 s 终止反应，加入 0.32 mL 的 HCL 和 0.65 mL 纯净水，充分混匀后，12 000 r/min 室温离心 10 min，小心吸取上清液适量，即得。

2.3.3 色谱条件 色谱柱 Waters Symmetry Shield RP₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，柱温 30 °C，以 18% 乙腈-82% 0.1 mol/L 醋酸铵水溶液为流动相等度洗脱，体积流量为 1 mL/min，检测波长 250 nm，进样量 20 μL，混合对照品色谱图和供试品衍生化溶液色谱图见图 1。

2.3.4 方法学考察 精密度、稳定性、重复率、加样回收率试验根据文献方法^[20]操作，RSD 均小于 3%，方法学考察结果符合要求。

2.3.5 样品的测定 将所测供试品单糖按以下公式计算含量（计算时需扣除子实体的水分），单糖含量见表 3。合计后得到多糖含量，结果见表 2。多糖含量在 0.33%~0.95%，均符合《中国药典》2020 年版规定，其中 S13（山东聊城）含量最高。

$$\text{单糖量} = (R_u/R_s) \times A_s \times (F/W) \times 100$$

R_u 为样品溶液中目标物与内标物的峰值响应比， R_s 为标准溶液中目标物与内标物的峰值响应比， A_s 为经衍生化的标准溶液等分试样中相关分析物的量， W 为相对于样品溶液体积的稀释系数， F 为制备样品溶液所用灵芝子实体的质量

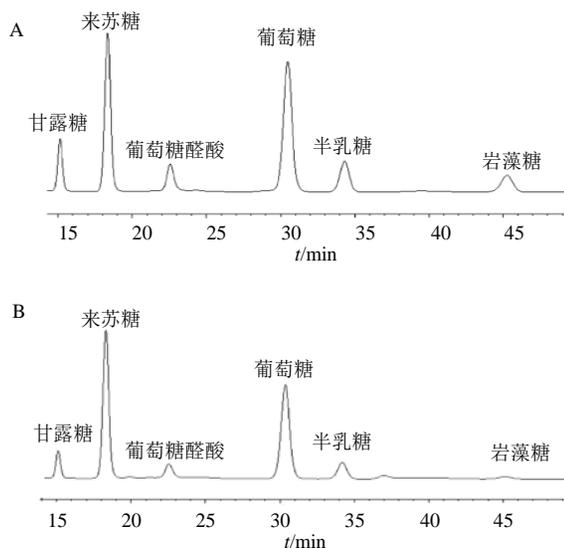


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 衍生化溶液色谱图
Fig. 1 Chromatogram of mixed reference substance (A) and ganoderma lucidum monosaccharide (B)

2.4 高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖含量^[21]

不同来源或种类的灵芝，其多糖成分的相对分子质量有较大差异，HPGPC 法作为测定多糖相对分子质量及含量的常见分析手段，已经成为灵芝质量评价的行业共性方法，本实验也将其纳入不同产地赤芝质量考察的标准之一。

2.4.1 混合对照品溶液的制备 取右旋糖酐及葡萄糖对照品约 50 mg，精密称定，分别加超纯水溶解，定容至 5 mL 量瓶中，制成 10 mg/mL 的右旋糖酐对照品储备液和葡萄糖对照品储备液。混合对照品参数见表 4。

表 3 15 批赤芝中单糖含量

Table 3 Monosaccharides content in 15 batches of *G. lucidum*

编号	甘露糖/(mg·g ⁻¹)	葡萄糖醛酸/(mg·g ⁻¹)	半乳糖/(mg·g ⁻¹)	葡萄糖/(mg·g ⁻¹)	岩藻糖/(mg·g ⁻¹)	合计/(mg·g ⁻¹)
S1	0.784 0	0.571 1	0.963 4	4.657 3	0.293 9	7.269 7
S2	0.426 1	0.191 8	0.731 3	8.502 7	0.111 4	9.963 2
S3	0.520 2	0.302 8	0.837 5	7.963 4	0.178 9	9.802 8
S4	0.484 9	0.310 5	0.607 5	4.827 0	0.069 8	6.299 7
S5	1.362 3	0.503 5	0.986 9	6.924 7	0.621 9	10.399 3
S6	0.373 0	0.132 9	0.652 5	8.965 0	0.095 4	10.218 9
S7	0.449 2	0.130 3	0.706 6	8.649 6	0.106 6	10.042 2
S8	0.509 0	0.197 7	0.671 9	11.343 8	0.133 8	12.856 2
S9	0.510 3	0.281 7	0.551 8	7.088 4	0.118 1	8.550 2
S10	0.495 9	0.143 8	0.875 7	9.666 5	0.137 9	11.319 9
S11	1.447 8	0.594 2	1.082 8	13.564 5	0.592 6	17.281 9
S12	0.881 7	0.344 1	1.378 7	12.753 4	0.450 7	15.808 6
S13	1.224 7	0.234 4	0.612 6	16.007 7	0.277 5	18.356 9
S14	1.055 8	0.282 4	0.739 1	13.652 9	0.111 2	15.841 4
S15	0.716 9	0.455 7	0.652 0	6.988 2	0.196 2	9.009 1

表4 右旋糖酐对照品参数

Table 4 Dextran reference standard parameters

商品标识	峰位/Mp	重均/Mw	数均/Mn	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	GPC 软件峰顶 t/min
葡萄糖	180	180	180	10.02	52.267
D5000	4440	5220	3260	9.67	48.258
D12000	9890	11600	8110	9.99	46.625
D25000	21 400	23 800	18 300	9.80	44.192
D50000	43 500	48 600	35 600	9.68	41.908
D80000	66 700	80 900	55 500	9.52	40.250
D150000	123 600	147 600	100 300	9.00	38.408
D270000	196 300	273 000	164 200	9.30	36.892
D410000	276 500	409 800	236 300	9.23	36.250
D670000	401 300	667 800	332 800	9.19	34.667

2.4.2 供试品溶液的制备 取“2.1”项下的水溶性浸出物滤液 160 mL(约 2 g 样品),沸水浴蒸干,用 5 mL 热水超声溶解,缓慢加入无水乙醇至总体积约 40 mL,超声,4 °C 下静置 12 h,4000 r/min,4 °C 离心 30 min,弃上清液后真空干燥,沉淀物用热水溶解并转移至 10 mL 量瓶中,密塞封口,50 °C 超声 10 min,放至室温,定容至刻度线,摇匀,取溶液约 5 mL,室温下 4000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,取 3 mL 左右续滤液备用。

2.4.3 色谱条件 采用串联凝胶色谱柱 TSK-GEL (300 mm \times 7.8 mm, 10 μm),柱温 35 °C;流动相为 0.71% Na₂SO₄ 硫酸钠水溶液,体积流量 0.5 mL/min,进样量 20 μL 。

2.4.4 标准曲线绘制 以各对照品峰位相对分子质量的对数作为纵坐标(Y),峰顶时间作为横坐标(X),凝胶渗透色谱专用软件校正标准曲线得 $\lg Y = 10.4914 - 0.1624X$, $R^2 = 0.9982$ 。

2.4.5 方法学考察 精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验按照参考文献方法^[21]操作,RSD 均小于 3%,方法学考察结果符合要求。

2.4.6 样品测定 将 Y 值设为 5000 和 400 000 代入标准曲线公式,求得对应峰位相对分子质量下的峰顶时间 X1 和 X2,对各供试品图谱 X1 到 X2 之间的响应面积进行积分,获得峰位相对分子质量 5000~400 000 的响应面积 S1;积分标识相对分子质量为 5000~670 000 的右旋糖酐对照品图谱,获得各进样对照品的对应峰面积,并统一折算成 10 mg/mL 浓度的峰面积,然后求得平均峰面积 S2。代入下式求得多糖含量,具体测定结果见表 2。结果表明 15 批赤芝药材多糖含量在 0.72%~2.51%,其中赤芝 S11(陕西汉中泸农 1 号)的多糖含量最高。

$$\text{多糖含量} = S1/S2 \times 10 \times 10 / \text{子实体质量} / 1000$$

2.5 比色法测定总三萜及甾醇含量^[1]

2.5.1 对照品溶液的制备 取干燥至恒定质量的齐墩果酸对照品约 10 mg,精密称定,加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,制成含齐墩果酸 0.2 mg/mL 的对照品储备液。

2.5.2 供试品溶液的制备 灵芝子实体打粉,过筛,取 2~5 号筛之间的粉末约 2 g,精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇 100 mL,加沸石 2~4 颗,密塞,称定质量,静置 1 h,水浴回流 1 h,冷却至室温,称定质量,用无水乙醇补足失重,摇匀,取适量过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液约 2 mL 备用。

2.5.3 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,分别置 15 mL 具塞试管中,挥干,预冷 2 min 后精密加入新配制的香草醛冰醋酸溶液(精密称取香草醛 0.5 g,加冰醋酸使溶解成 10 mL,即得)0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,具塞,从冰浴取出,涡旋混匀,移入 70 °C 水浴中加热 15 min,立即取出置冰浴中冷却 5 min,取出置室温水浴中回温 5 min,精密加入醋酸乙酯 4 mL,涡旋混匀,采用石英比色皿,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(通则 0401)^[19],在 546 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线 $Y = 8.0954X + 0.0388$, $R^2 = 0.9999$ 。

2.5.4 样品的测定 精密量取供试品溶液 0.2 mL,置 15 mL 具塞试管中,照标准曲线制备项下的方法,自“挥干”起,同法操作,测定吸光度,从标准曲线计算供试品溶液中齐墩果酸的含量,结果见表 2。15 批赤芝都满足《中国药典》2020 年版要求,范围在 0.70%~1.74%,其中赤芝 S13(山东聊城产)三萜甾醇含量最高。

2.6 HPLC 法测定灵芝酸含量^[22]

2.6.1 色谱条件 色谱柱 Waters Symmetry Shield

RP₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 257 nm, 进样量 20 μL, 柱温 20 ℃。以 0.1% 磷酸水 (A) -乙腈 (B) 作为流动相, 洗脱程序为 0~10 min, 85%~75% A; 10~58 min, 75%~71% A; 58~60 min, 71%~69% A; 60~68 min, 69% A; 68~78 min, 69%~64% A; 78~98 min, 64% A; 98~100 min, 64%~0% A。

2.6.2 混合对照品溶液的制备 取灵芝酸 A 约 4 mg, 灵芝酸 B、灵芝烯酸 B、灵芝酸 C2、灵芝烯酸 C、灵芝烯酸 D、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝酸 G、灵芝酸 H 各约 2 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并定容到 10 mL 量瓶中, 摇匀备用。制得各对照品溶液均为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.6.3 灵芝酸 A 对照品溶液的制备 取灵芝酸 A 对照品约 10 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并定容到 25 mL 量瓶中, 配制成 0.442 mg/mL 的灵芝酸 A 的对照品原液, 再逐步稀释为 0.331 500、0.221 000、0.110 500、0.055 250、0.027 625 mg/mL 的对照品溶液。

2.6.4 供试品溶液的制备 精密称定赤芝粉末 3 g, 加入 150 mL 醋酸乙酯, 水浴回流 1 h, 抽滤, 用 25 mL 醋酸乙酯洗涤 3 次, 合并滤液, 85 ℃ 水浴挥干, 用甲醇 5 mL 溶解残渣并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

2.6.5 标准曲线的绘制 将“2.6.3”项不同质量浓度的灵芝酸 A 对照品溶液分别进样, 以质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得 $Y=11\,290.231\,6X+11.852\,7$, $R^2=0.999\,9$ 。

2.6.6 方法学考察 精密度、稳定性、重复率、加样回收率试验根据参考文献方法^[22], RSD 均小于 3%, 方法学考察结果符合要求。

2.6.7 样品测定 将混合对照品和供试品溶液分别进样, 色谱图见图 2。以灵芝酸 A 标准曲线进行计算, 其他目标峰按换算因子全部折算为灵芝酸 A, 求和即得灵芝酸总量, 结果见表 2。结果表明 15 批赤芝药材灵芝酸含量在 0.05%~0.79%, 其中山东聊城产赤芝 S4、S9 的灵芝酸含量较高。

$$\text{灵芝酸量} = (R_u/R_s) \times A_s \times (F/W) \times 100$$

R_u 为样品溶液中目标物的峰面积, R_s 为标准溶液中灵芝酸 A 的峰面积, A_s 为标准溶液中灵芝酸 A 的浓度, W 为制备样品溶液的灵芝子实体质量, F 为与灵芝酸 A 的相对响应因子

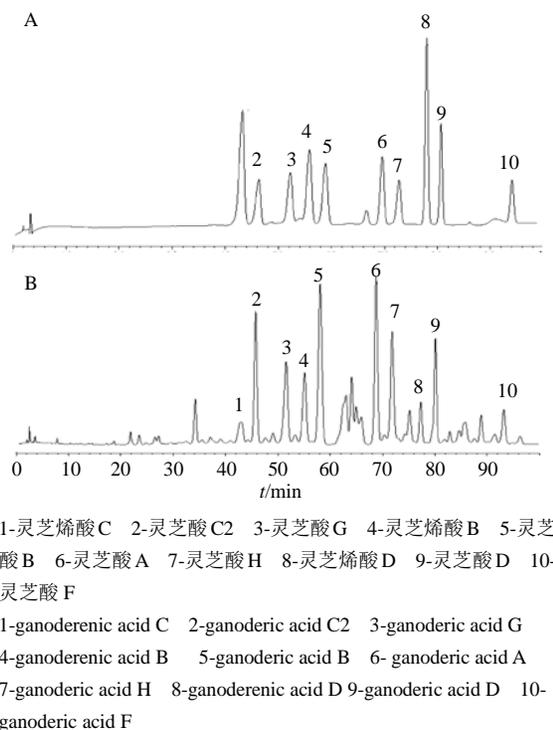


图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液灵芝酸含量测定色谱图

Fig. 2 Chromatogram for determination of *Ganoderma lucidum* acid content in mixed reference substance (A) and test substance (B) solution

2.7 指纹图谱的建立

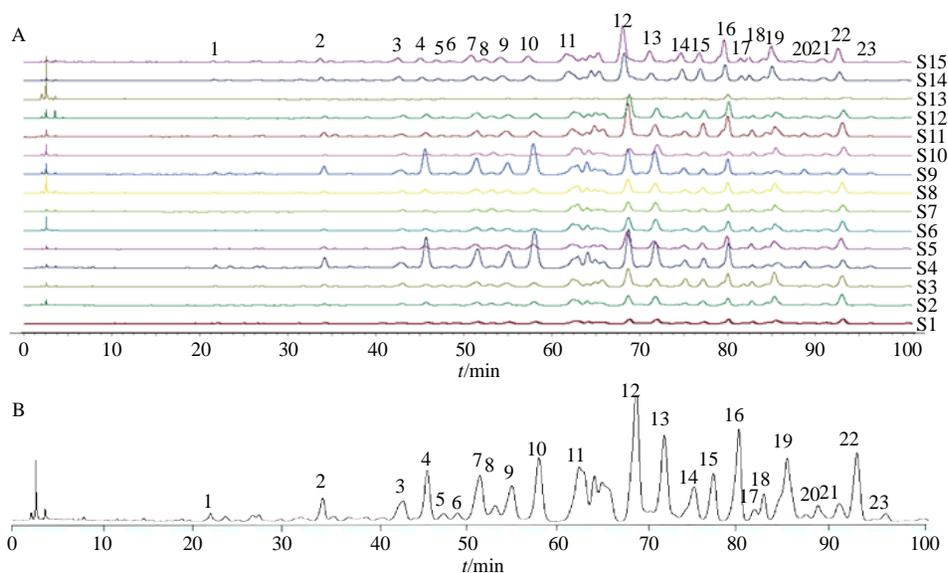
2.7.1 供试品溶液的制备 取灵芝细粉约 3 g, 精密称定, 加入 250 mL 洁净干燥平底烧瓶, 精密加入 150 mL 醋酸乙酯, 加沸石 2~3 颗, 具塞, 静置浸泡 1 h, 水浴回流 1 h, 抽滤, 用 25 mL 醋酸乙酯洗涤平底烧瓶、滤纸和滤渣, 重复 3 次, 滤液入洁净干燥蒸发皿, 水浴挥干, 用 5 mL 甲醇溶解残渣并完全转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

2.7.2 混合对照品溶液的制备 同“2.6.2”项

2.7.3 色谱条件 同“2.6.1”项。

2.7.4 方法学考察 同时取赤芝 S15 的供试品溶液进行精密度、重复性和稳定性的验证, 各项 RSD 均小于 3%, 方法学考察结果符合要求。

2.7.5 指纹图谱的建立 将 15 批赤芝的指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版), 以赤芝 S15 指纹图谱作为参考谱图, 进行峰匹配, 以中位数生成对照图谱, 得到 15 批赤芝指纹图谱和对照指纹图谱见图 3, 共得到 23 个共有峰, 同时对指纹图谱进行相似度评价, 结果见表 5。



2-灵芝烯酸 C 3-灵芝酸 C2 5-灵芝酸 G 6-灵芝烯酸 B 8-灵芝酸 B 12-灵芝酸 A 15-灵芝酸 H 17-灵芝烯酸 D 19-灵芝酸 D 23-灵芝酸 F
2-ganoderenic acid C 3-ganoderic acid C2 5-ganoderic acid G 6-ganoderenic acid B 8-ganoderic acid B 12-ganoderic acid A 15-ganoderic acid H
17-ganoderenic acid D 19-ganoderic acid D 23-ganoderic acid F

图3 15批赤芝指纹图谱(A)与对照指纹图谱(B)

Fig. 3 Overview of fingerprints (A) of 15 batches of *G. lucidum* and reference fingerprint (B)

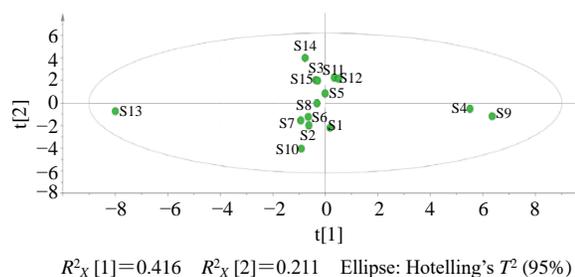
表5 15批赤芝指纹图谱相似度

Table 5 Similarity of fingerprints of 15 batches of *G. lucidum*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.927	S9	0.831
S2	0.924	S10	0.861
S3	0.945	S11	0.966
S4	0.897	S12	0.956
S5	0.976	S13	0.778
S6	0.957	S14	0.944
S7	0.916	S15	0.962
S8	0.969		

以共有峰的峰面积为变量,将15批赤芝的峰面积经归一化处理后,进行主成分分析(principal component analysis, PCA),自动拟合得到4个主成分, R^2_x 为 0.969, Q^2 为 0.57 (>0.5),模型拟合较好且有良好的预测性,结果见图4。15批赤芝分成了3组,山东聊城的赤芝(S4、S9、S13)与其余批次的赤芝差异较大。

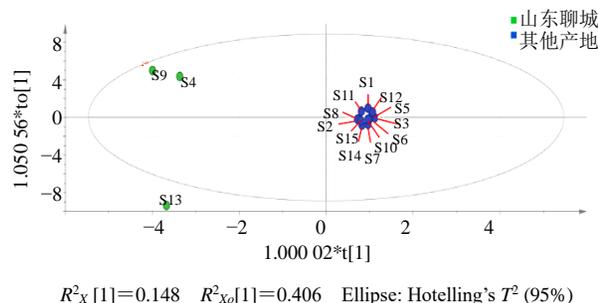
根据PCA的结果,将15批赤芝分成2组,一组为山东聊城组,一组为其他产地,进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)(图5),自动拟合得到6个主成分, R^2_x 为 0.936, Q^2 为 0.96。选择 $VIP \geq 1$ 的色谱峰作为区分山东聊城与其他产地赤



$R^2_x [1]=0.416$ $R^2_x [2]=0.211$ Ellipse: Hotelling's T^2 (95%)

图4 15批赤芝PCA图

Fig. 4 15 batches of *G. lucidum* PCA diagram



$R^2_x [1]=0.148$ $R^2_{xo}[1]=0.406$ Ellipse: Hotelling's T^2 (95%)

图5 15批赤芝OPLS-DA图

Fig. 5 15 batches of *G. lucidum* OPLS-DA diagram

芝的标志差异物(色谱峰以保留时间计),VIP值见图6,其中 $VIP \geq 1$ 的色谱峰有8个,分别为峰19(灵芝酸D)、18、4、9、15(灵芝酸H)、23(灵芝酸F)、21、5(灵芝酸G)。

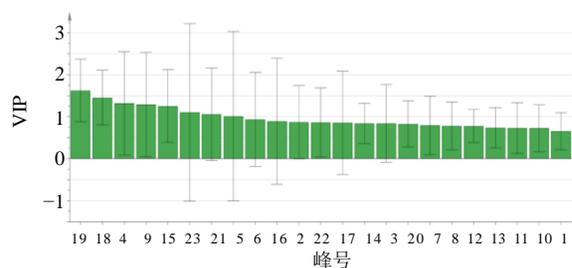


图 6 15 批赤芝的 VIP 图

Fig. 6 VIP chart of 15 batches of *G. lucidum*

3 讨论

本实验对 15 批不同产地和批次的赤芝,进行了全面质量控制方法考察,15 批赤芝全部符合《中国药典》2020 年版的要求。灵芝产业庞大,市面上存在跟风种植的情况,针对未来中药材产业升级以及绿色农业的趋势,国内需要加快 GAP 的建设,中国作为灵芝药材大国和市场需求大国,灵芝 GAP 基地更应该以严格的质量标准,逐步规范化、标准化,不断推动灵芝产业的发展。

对比 3 种多糖质量评价方法的结果可知,测定方法不同,测定结果有显著差异。灵芝多糖种类繁多,结构复杂,是由 3 股单糖链构成的具有螺旋状立体构型(三维结构)的葡聚糖^[23],主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖和阿拉伯糖通过不同比例和不同糖苷键类型连接构成,活性多糖有效成分附着在细胞壁内侧,大部分直接与蛋白质形成分子络合物^[24],而 3 种多糖检测方法都是基于醇沉淀除杂工艺,因此非糖类物质容易与目标多糖同步沉淀成为代测物。硫酸蒽酮法测定总多糖,原理是氧化出醛基与蒽酮结合并显色,在固定波长下检测,这些非糖类化合物会参与显色反应,或本身在测定波长下以强吸收的方式形成干扰误差。HPGPC 法的原理是基于不同分子量在凝胶色谱柱中的分离情况,因此待测定物的计算也会受到杂质干扰。总之,可以综合 3 种多糖的考察方式,视实际情况选择评价手段。

对灵芝药材中三萜类成分进行含量测定结果表明,甾醇作为灵芝最重要的活性成分之一,是灵芝质量的重要指标,《中国药典》测定灵芝三萜和甾醇,但由于灵芝三萜提取率低、杂质多,紫外分光光度法的测定容易受到提取物中皂苷、油酸等物质干扰,导致特异性不强,三萜甾醇含量与实际有较大的差异;目前从灵芝中已分离出 300 多种三萜类成分^[25],其中灵芝酸是最主要的成分,针对三萜中的灵芝酸,

以灵芝酸 A 来计算 10 种灵芝酸含量,该测定物质较明确,但未将甾醇部位纳入灵芝活性成分的考察。

指纹图谱的 PCA 分析和 OPLS-DA 分析结果中山东聊城的 S13、S4、S9 与其他批次的差异较大,其中 S13 中三萜甾醇含量最高,灵芝酸含量最低,可能是 S13 中中性三萜和甾醇等脂溶性成分的含量更高;S4、S9 中灵芝酸含量较高,三萜甾醇含量居中。

山东聊城 GAP 基地赤芝在三萜或甾醇等脂溶性成分上区别于其他产地批次的赤芝,经 VIP 分析得到 8 个与其他批次不同的主要色谱峰,可见灵芝酸类成分在区分山东聊城和其他产地的灵芝上具有重要意义,同时挖掘指纹图谱的标志差异峰也可以为不同产地灵芝的质量评价提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 195-196.
- [2] Wu H H, Tang S S, Huang Z Q, *et al.* Hepatoprotective effects and mechanisms of action of triterpenoids from Lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) on α -amanitin-induced liver injury in mice [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2016, 18(9): 841-850.
- [3] Ahmad M F. *Ganoderma lucidum*: A rational pharmacological approach to surmount cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113047.
- [4] Cao Y, Xu X W, Liu S J, *et al.* *Ganoderma*: A cancer immunotherapy review [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1217.
- [5] Kuok Q Y, Yeh C Y, Su B C, *et al.* The triterpenoids of *Ganoderma tsugae* prevent stress-induced myocardial injury in mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(10): 1892-1896.
- [6] Yu N H, Huang Y P, Jiang Y, *et al.* *Ganoderma lucidum* triterpenoids (GLTs) reduce neuronal apoptosis via inhibition of ROCK signal pathway in APP/PS₁ transgenic Alzheimer's disease mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9894037.
- [7] Wang C F, Liu X M, Lian C L, *et al.* Triterpenes and aromatic meroterpenoids with antioxidant activity and neuroprotective effects from *Ganoderma lucidum* [J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4353.
- [8] Jiang G Y, Lei A T, Chen Y, *et al.* The protective effects of the *Ganoderma atrum* polysaccharide against acrylamide-induced inflammation and oxidative damage in rats [J]. *Food Funct*, 2021, 12(1): 397-407.

- [9] Li L, Xu J X, Cao Y J, *et al.* Preparation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide-chromium (III) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high-fat and high-fructose diet-induced pre-diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 782-793.
- [10] Xiao C, Wu Q P, Xie Y Z, *et al.* Hypoglycemic mechanisms of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 in db/db mice via RNA-seq and iTRAQ [J]. *Food Funct*, 2018, 9(12): 6495-6507.
- [11] Ko H H, Hung C F, Wang J P, *et al.* Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(1): 234-239.
- [12] Ren L, Zhang J, Zhang T H. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. *Food Chem*, 2021, 340: 127933.
- [13] Wang J, Cao B, Zhao H P, *et al.* Emerging roles of *Ganoderma lucidum* in anti-aging [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 691-707.
- [14] Bishop K S, Kao C H J, Xu Y Y, *et al.* From 2000years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals [J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 56-65.
- [15] Gong T, Yan R Y, Kang J, *et al.* Chemical components of *Ganoderma* [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1181: 59-106.
- [16] Baby S, Johnson A J, Govindan B. Secondary metabolites from *Ganoderma* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 66-101.
- [17] 邢佳慧. 灵芝属的物种多样性、分类与系统发育研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [18] 姜涛, 施枝江, 姚艺新, 等. 不同品种灵芝多指标的质量评价研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(12): 2847-2855.
- [19] 中国药典 [S]. 四部. 2020:114-115, 232.
- [20] 王浩豪, 戴军, 陈尚卫, 等. 灵芝孢子粉多糖的 PMP-HPLC 指纹分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(12): 133-136.
- [21] 赛贞, 林树钱, 林志彬, 等. 高效凝胶渗透色谱法测定双灵固本散中多糖肽的峰位分子量 [J]. *中成药*, 2007 (9): 1386-1388.
- [22] 罗舒, 宋怡, 罗霞, 等. 灵芝中 10 种灵芝酸类成分含量一测多评法的建立 [J]. *中国药房*, 2023, 34(14): 1703-1706.
- [23] Synytsya A, Novák M. Structural diversity of fungal glucans [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 792-809.
- [24] Kumakura K, Hori C, Matsuoka H, *et al.* Protein components of water extracts from fruiting bodies of the reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules [J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(2): 529-535.
- [25] Xia Q, Zhang H, Sun X. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma spp.* [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 17478-17535.

[责任编辑 时圣明]