

不同来源段木灵芝子实体指纹图谱及灵芝酸 A、灵芝酸 B 含量测定研究

何倩^{1,2}, 李国辉², 何燕飞², 江桃山¹, 陈存武^{2*}

¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; ²皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012

摘要:人工栽培灵芝常选用不同的段木进行, 而其中成分存在较大差异, 从而影响灵芝。为比较成分差异, 建立灵芝子实体 HPLC 指纹图谱, 测定灵芝酸 A、B 含量, 为不同段木灵芝子实体的质量评价及栽培技术提供参考。采用 Diamonsil C₁₈(2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 共标定了 18 个共有峰, 指出了灵芝酸 A、灵芝酸 B。15 批次灵芝子实体图谱相似度范围在 0.601 ~ 0.986, 主成分分析将其分为 4 类, 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)共筛选出 7 个 VIP > 1.0 的差异性成分。经含量测定, 发现柳树 + 桦树该段木中灵芝酸 A 含量为 2.29 mg/g, 灵芝酸 B 含量为 0.47 mg/g, 二者均为最高, 推测其含量可能与栽培段木有关。该方法可用于评估不同来源段木灵芝子实体质量, 筛选合适的灵芝栽培段木, 指导灵芝栽培。

关键词:灵芝子实体; 指纹图谱; 主成分分析; 含量测定

中图分类号: S567.3 + 1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024) Suppl-0013-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.S.002

Study on fingerprints of *Ganoderma lucidum* from different wood segments and content determination of ganoderic acid A and ganoderic acid B

HE Qian^{1,2}, LI Guo-hui², HE Yan-fei², JIANG Tao-shan¹, CHEN Cun-wu^{2*}

¹School of Life Sciences, Anhui Agricultural University Hefei 230036, China;

²Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Luan 237012, China

Abstract: In the artificial cultivation of *Ganoderma lucidum*, different wood segments are often used and there are significant differences in their composition that affect *G. lucidum*. In order to compare the differences in components, HPLC fingerprints of *G. lucidum* was performed and the content of ganoderic acid A and B was determined, which provides a reference for the quality evaluation and cultivation techniques of different wood segments of *G. lucidum*. The analysis was performed on Diamonsil C₁₈(2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase in a gradient elution mode, a total of 18 common peaks were calibrated and ganoderic acid A and ganoderic acid B were identified. The similarity of the 15 batches of *G. lucidum* ranged from 0.601 to 0.986. Principal component analysis divides them into four categories, and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) selects seven differential components with VIP > 1.0. The content determination showed that the content of ganoderic acid A and ganoderic acid B in the willow + birch wood segment was 2.29 mg/g and 0.47 mg/g, respectively. Both were the highest, suggesting that their content might be related to the cultivated segment of the wood. This method can be used to evaluate the quality of *G. lucidum* from different wood segments, screen suitable *G. lucidum* cultivated wood segments, and guide *G. lucidum* cultivation.

Key words: *Ganoderma lucidum*; fingerprint; principal component analysis; content determination

灵芝 (*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang) 是灵芝科、

灵芝属真菌, 具有珍贵的药用价值。20 世纪 50 年代, 中国科学院微生物研究所的研究人员成功培育灵芝, 此后, 灵芝子实体人工栽培和灵芝菌丝体深层发酵在我国逐渐普及, 为灵芝产品和产业发展奠定了重要基础。20 世纪 70 年代, 在前期化学和药理

收稿日期: 2023-07-31

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 安徽省自然科学基金(2208085QH273); 安徽省现代中药产业共性技术研究中心建设协同创新项目(GXXT-2022-087)

* 通信作者 Tel: 86-013966298236; E-mail: cunwuchen@126.com

研究的基础上,灵芝的临床研究得到开展,初步证明了灵芝的治疗功效。随着种植面积的增加和相关产品的开发,灵芝开始出现商业化^[1]。传统上,灵芝是在切割原木或散装袋上栽培的,大部分生物活性都是在灵芝子实体中发现的。然而,灵芝菌丝体的化学成分与子实体的化学成分不同,它们在健康益处方面存在潜在差异^[2]。一般来说,子实体被认为比菌丝体具有更好的功效^[3]。

目前,灵芝人工栽培技术已得到规模化生产,在种植栽培过程中选用不同的段木,实现了产业化开发利用。但从植物代谢及次生代谢物合成的角度分析,不同的段木所含营养物质必然存在较大差异,那么以其作为段木种植对灵芝的生长及有效成分也必然产生较大影响。总之,由于灵芝种类繁多,不同产区、不同段木的灵芝子实体成分及含量都有较大差异,不同产地的药材可能因生长环境、土壤气候等因素在成分上产生较大差异^[4]。但目前尚未看到关于对选用不同段木栽培灵芝成分变化的系统研究。为此,本研究建立了 15 批次不同来源段木的灵芝子实体的 HPLC 指纹图谱,并测定了其中灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012. 130723 版)进行相似度评价,同时进行主成分分析,比较不同来源段木的灵芝子实体在成分上的差异,从而比较选用不同段木栽培的优劣差异,旨在筛选优质灵芝栽培段木,为不同段木的灵芝种植及栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灵芝酸 A(批号 J19HB185432)、灵芝酸 B(批号 A01GB143569)(质量分数均 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司);甲醇(色谱纯,OCEANPAK 公司);乙腈(色谱纯,AppliChem 公司);乙醇(分析纯,无锡市展望化工试剂有限公司);磷酸(分析纯,西陇科学股份有限公司);水为自制超纯水。

1.2 灵芝子实体样品信息

实验所用材料选用安徽省六安市金安区毛坦厂镇凤凰冲村人工栽培灵芝,经皖西学院陈存武教授鉴定为灵芝属真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* 的干燥子实体(药材信息见表 1)。灵芝栽培过程中选择通风良好、水源清洁、排灌方便的场所,培养室应保持洁净、通风、控温、遮光,根据灵芝子实体生长的适宜温度,可安排在农历 11 月中旬伐木,下旬断木,装袋、灭菌,12 月上旬接种完毕。经过断木、装袋、灭

菌、接种、发菌、上床埋土、出芝管理、套袋喷粉等一系列过程,到 9~10 月灵芝陆续停止喷粉,在喷粉结束后开始采收灵芝子实体,采收后的灵芝子实体尽快晒干,再用聚丙烯袋包装好,以防受潮霉变,最终得到灵芝子实体样品。

表 1 灵芝药材样品信息

样品号 Sample No.	段木品种 Wood variety	来源 Source
S1-1	柳树 + 桦树	安徽省六安市金安区毛坦厂镇凤凰冲村
S1-2		
S1-3		
S2-1	小橡栗 + 桦树	
S2-2		
S2-3		
S3-1	藤树 + 桦树	
S3-2		
S3-3		
S4-1	黄栗头	
S4-2		
S4-3		
S5-1	桦树 + 黄栗头	
S5-2		
S5-3		

1.3 仪器与设备

电热恒温水浴锅(HH-21-8,合肥右科仪器设备有限公司);Waters 2695 高效液相色谱仪(配有 Waters 2996 检测器)(美国 Waters 公司);台式高速冷冻离心机(H1-16KR,湖南可成仪器设备有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件

柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L;运行时间 62 min;色谱柱为 Diamonsil C₁₈(2)(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)。流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液,乙腈比例变化如下:0~10 min,0% \rightarrow 20%;10~30 min,20% \rightarrow 40%;30~40 min,40% \rightarrow 50%;40~45 min,50% \rightarrow 80%;45~50 min,80% \rightarrow 95%;50~54 min,95%,54~55 min,95% \rightarrow 5%。

1.4.2 对照品溶液的制备

分别精密称取灵芝酸 A、灵芝酸 B 对照品适量,加甲醇分别制成含 10 mg/mL 的灵芝酸 A 储备液、

灵芝酸 B 储备液。取两种储备液分别稀释 2 倍,分别得浓度为 5 mg/mL 的灵芝酸 A 溶液、灵芝酸 B 溶液,取同体积储备液混合,得混合溶液中灵芝酸 A、B 浓度各为 2.5 mg/mL。该溶液倍比稀释,得浓度为 0.078、0.156、0.3125、0.625、1.25、2.5 mg/mL 的混合标准品溶液。

1.4.3 供试品溶液的制备

精确称取不同段木灵芝子实体的干燥粉末 5.0 g,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 75% 乙醇 50 mL,100 °C 水浴加热回流提取,根据提取前后质量定容后,取提取液,离心后取上清液以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液,采用高效液相色谱法对提取液进行测定。

1.5 数据处理

使用仪器自带的分析软件 Empower3 对 HPLC 图谱进行定性及定量分析;运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版)进行相似度评价;运用 SIMCA14.1 软件进行主成分分析,比较不同来源段木的灵芝子实体在成分上的差异。

2 结果与分析

2.1 不同段木灵芝子实体 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 精密度试验

取 S1-1 样品粉末,按“1.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进行检测,连续进样 6 次,记录色谱图并积分,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.13% ~ 1.1%,各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.62% ~ 2.1%,表明仪器精密度良好。

2.1.2 重复性试验

取 S1-1 样品粉末,按“1.4.3”项下制备方法平

行制备 6 份,按“1.4.1”项下的色谱条件进行进样检测,记录色谱图并积分,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算 RSD 值。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.23% ~ 0.29%,各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.19% ~ 1.3%,表明该方法制备的供试品溶液重复性良好。

2.1.3 稳定性试验

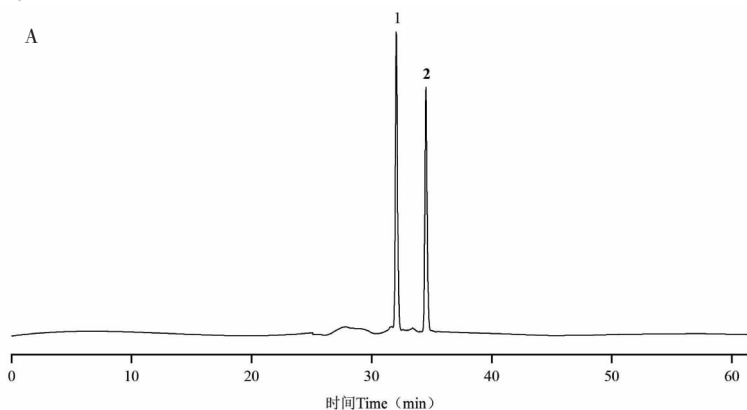
取 S1-1 样品粉末,按“1.4.3”项下制备供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件分别进样,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,记录色谱图并积分,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积并计算 RSD 值。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.030% ~ 0.15%,各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.45% ~ 1.4%,表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.4 指纹图谱的建立及共有峰的标定

取 15 批次不同来源段木的灵芝子实体干燥样品,按“1.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进行检测,得到 HPLC 图谱。以 AIA 格式将 15 批次样品图谱导出为 cdf 格式文件并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版),通过与混合标准品溶液 HPLC 图谱比对,指认出其中两个三萜酸,分别为灵芝酸 A 和灵芝酸 B。混合对照品色谱图见图 1A、样品色谱图见图 1B 及叠加图谱见图 1C,其中 R 是对照图谱。

2.1.5 相似度评价

将 15 批次灵芝子实体 HPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版)进行相似度评价,设置 S1-1 为参照图谱,以中位数方法生成对照图谱,进行 18 个共有峰匹配并生成对照图谱,计算相似度。结果表明,15 批次灵芝子实体图谱与对照图谱相似度范围在 0.601 ~ 0.986,说明



续图 1(Continued Fig.1)

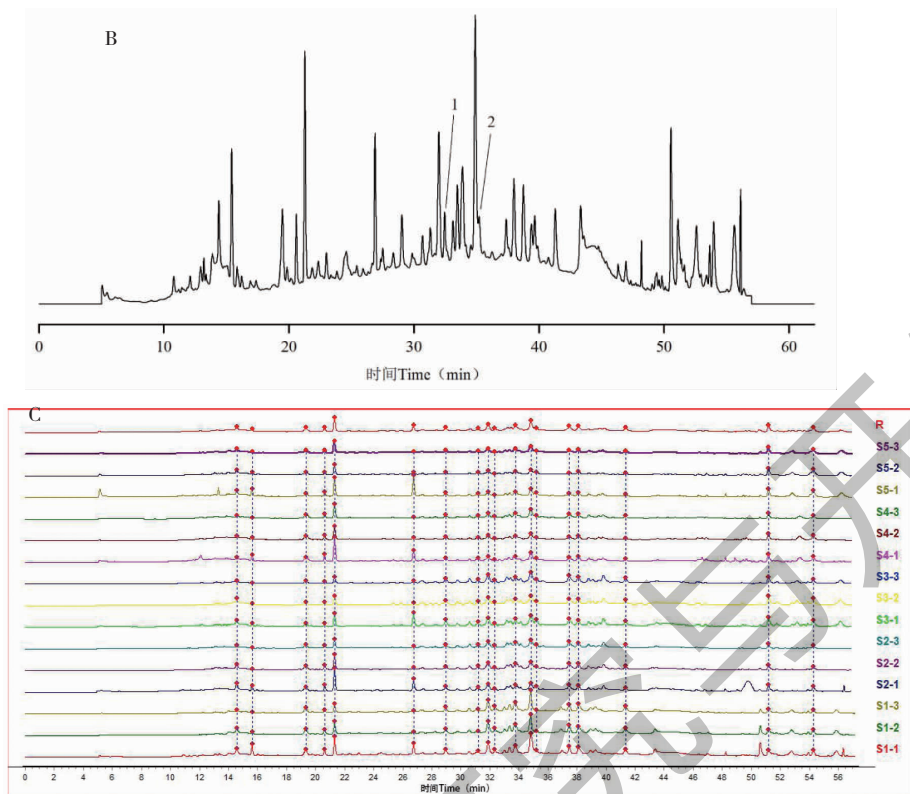


图1 混合对照品(A)、供试品(B)色谱图及15批次灵芝子实体叠加指纹图谱(C)

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substance (A) and test sample(B) and superimposed fingerprint of 15 batches of *G. lucidum* (C)

注:1:灵芝酸B;2:灵芝酸A。Note:1;Ganoderic acid B;2;Ganoderic acid A.

不同段木灵芝子实体成分存在一定差异(见表2)。其中,差异最大的为S1-3和S5-1,差异最小的为S4-2和S5-3。对药材图谱进行分析可以看出,不同来源

段木灵芝子实体中主要的色谱峰基本一致,相似度较高,这说明不同来源段木的灵芝子实体其成分的组成基本上是一致的,但成分的含量存在差异。

表2 不同来源段木灵芝子实体指纹图谱相似度评估结果

Table 2 Similarity evaluation results of fingerprints of different wood segments of *G. lucidum*

样品 Sample	S1-1	S1-2	S1-3	S2-1	S2-2	S2-3	S3-1	S3-2	S3-3	S4-1	S4-2	S4-3	S5-1	S5-2	S5-3
S1-1	1.000	0.962	0.919	0.938	0.940	0.926	0.950	0.931	0.914	0.904	0.949	0.910	0.822	0.849	0.960
S1-2	0.962	1.000	0.974	0.860	0.947	0.953	0.905	0.937	0.952	0.810	0.923	0.920	0.687	0.790	0.943
S1-3	0.919	0.974	1.000	0.788	0.921	0.959	0.849	0.878	0.959	0.756	0.861	0.901	0.601	0.673	0.874
S2-1	0.938	0.860	0.788	1.000	0.930	0.865	0.944	0.885	0.815	0.979	0.956	0.907	0.922	0.906	0.955
S2-2	0.940	0.947	0.921	0.930	1.000	0.980	0.912	0.925	0.936	0.910	0.973	0.981	0.750	0.832	0.962
S2-3	0.926	0.953	0.959	0.865	0.980	1.000	0.893	0.911	0.973	0.841	0.927	0.955	0.672	0.747	0.918
S3-1	0.950	0.905	0.849	0.944	0.912	0.893	1.000	0.960	0.905	0.897	0.923	0.864	0.871	0.881	0.952
S3-2	0.931	0.937	0.878	0.885	0.925	0.911	0.960	1.000	0.942	0.833	0.934	0.870	0.750	0.884	0.961
S3-3	0.914	0.952	0.959	0.815	0.936	0.973	0.905	0.942	1.000	0.778	0.883	0.893	0.635	0.721	0.895
S4-1	0.904	0.810	0.756	0.979	0.910	0.841	0.897	0.833	0.778	1.000	0.934	0.904	0.915	0.875	0.920
S4-2	0.949	0.923	0.861	0.956	0.973	0.927	0.923	0.934	0.883	0.934	1.000	0.962	0.819	0.918	0.985
S4-3	0.910	0.920	0.901	0.907	0.981	0.955	0.864	0.870	0.893	0.904	0.962	1.000	0.750	0.815	0.939
S5-1	0.822	0.687	0.601	0.922	0.750	0.672	0.871	0.750	0.635	0.915	0.819	0.750	1.000	0.871	0.832
S5-2	0.849	0.790	0.673	0.906	0.832	0.747	0.881	0.884	0.721	0.875	0.918	0.815	0.871	1.000	0.934
S5-3	0.960	0.943	0.874	0.955	0.962	0.918	0.952	0.961	0.895	0.920	0.985	0.939	0.832	0.934	1.000

续表 2(Continued Tab. 2)

样品 Sample	S1-1	S1-2	S1-3	S2-1	S2-2	S2-3	S3-1	S3-2	S3-3	S4-1	S4-2	S4-3	S5-1	S5-2	S5-3
对照指纹图谱 Reference fingerprint	0.982	0.963	0.922	0.956	0.979	0.958	0.966	0.960	0.939	0.927	0.978	0.954	0.829	0.882	0.986

2.1.6 化学计量学分析

2.1.6.1 主成分分析

以峰 2 为 S 峰,分别计算其他共有峰的相对峰面积,以各共有峰的相对峰面积为变量,采用 SIMCA14.1 软件,进行无监督模式下主成分分析(prin-

cipal component analysis, PCA)。结果显示(见图 2),15 批次灵芝子实体药材被分为 4 类,编号 S1 为 I 类,编号 S2、S4 为 II 类,编号 S3 为 III 类,编号 S5 为 IV 类,表明不同段木灵芝子实体在成分上存在一定差异。

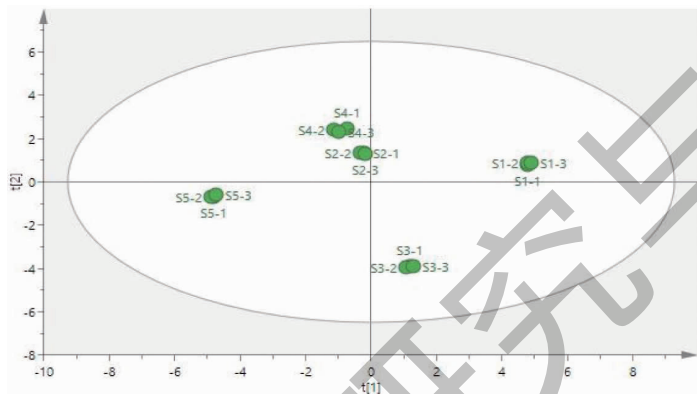


图 2 主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis

2.1.6.2 正交偏最小二乘法-判别式分析

将灵芝子实体各共有峰的相对峰面积导入 SIMCA14.1 软件中进行正交偏最小二乘法-判别式分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),运用统计学方法将模型随机排列 200 次做置换检验,结果见图 3。位于左侧的模型解释程度 R^2 值和模型预测能力 Q^2 值均小于最右边的值,其中 R^2 为 0.994, Q^2 为 0.988,均大于 0.5,

说明 OPLS-DA 模型未出现过拟合现象,所建立的模型有效,OPLS-DA 将 15 批次灵芝子实体分为 4 类(见图 4),为寻找 15 批次灵芝子实体药材成分的差异,对变量进行重要性投影(variable Importance in the projection, VIP)分析(见图 5),其中色谱峰 1、17、2、13、18、16、11 的 VIP 值大于 1.0,是引起不同批次样品差异的主要因素,目前峰 11 已知为灵芝酸 B,其余成分有待于进一步研究。

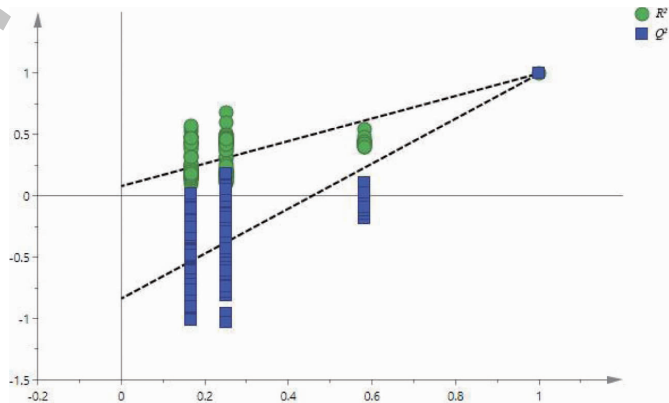


图 3 模型置换检验图

Fig. 3 Model permutation test diagram

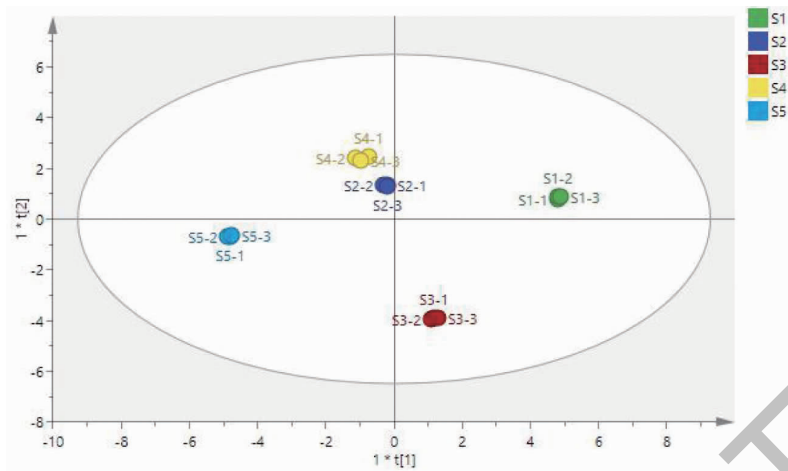


图4 OPLS-DA 图

Fig. 4 OPLS-DA diagram

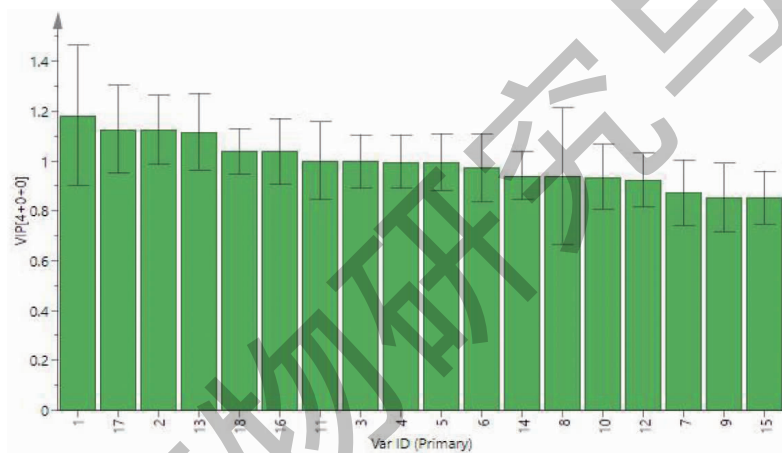


图5 VIP 图

Fig. 5 VIP diagram

2.2 灵芝子实体中灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量测定

2.2.1 线性关系考察

吸取“1.4.2”项下配制的混合标准品溶液,过 0.22 μL 微孔滤膜滤过,依次将浓度为 0.078、

0.156、0.312 5、0.625、1.25、2.5 mg/mL 的混合标准品溶液以“1.4.1”项下的色谱条件进行测定分析。以峰面积(Y)为纵坐标,对照品中灵芝酸 A、B 浓度(X)为横坐标,进行线性回归(见表 3)。

表3 各成分线性考察结果

Table 3 Linear relationship results of various constituents

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range (mg/mL)
灵芝酸 A Ganoderic acid A	$Y = 283\ 981X - 10\ 139$	0.999 6	0.078 ~ 2.5
灵芝酸 B Ganoderic acid B	$Y = 290\ 081X + 8\ 627.1$	0.999 8	0.078 ~ 2.5

2.2.2 精密度试验

按“1.4.2”项下方法制备混合对照品溶液,取

1.25 mg/mL 混合对照品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进行检测,连续进样 6 次,记录色谱图并积

分,记录灵芝酸 A、灵芝酸 B 的峰面积并计算 RSD 值。结果表明,灵芝酸 A、灵芝酸 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.47%、0.20%,表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验

取 S1-1 样品粉末,按“1.4.3”项下制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进行进样检测分析,记录色谱图并积分,计算灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量,并计算测定结果的 RSD 值。灵芝酸 A、灵芝酸 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.52%、2.2%,表明该制备供试品方法重复性良好,计算得 S1-1 样品中灵芝酸 A 含量为 2.23 mg/g,灵芝酸 B 含量为 0.46 mg/g。

2.2.4 稳定性试验

取 S1-1 样品粉末,按“1.4.3”项下制备供试品

溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,记录灵芝酸 A、灵芝酸 B 的峰面积并计算 RSD 值。灵芝酸 A、灵芝酸 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.19%、1.2%,表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 加样回收率实验

精密称取已测得含量的 S1-1 样品粉末 0.5 g,共 9 份,分为三组,每组平行 3 份,按供试品含量的 50%、100%、150% 的比例加入灵芝酸 A 及灵芝酸 B 对照品,按“1.4.3”项下的方法制备 9 份供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进样测定,计算加样回收率。灵芝酸 A 平均回收率为 97.28%,RSD 为 1.1%,灵芝酸 B 平均回收率为 98.37%,RSD 为 1.2% (见表 4),符合药典关于 HPLC 方法学研究的规定。

表 4 加样回收率试验
Table 4 Sample recovery test

成分 Component	称样量 Sample weight (g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average (%)	RSD (%)
灵芝酸 A Ganoderic acid A	0.500 2	1.115 4	0.557 5	1.663 9	98.39	97.28	1.06
	0.500 7	1.116 6	0.557 5	1.649 8	95.64		
	0.501 2	1.117 7	0.557 5	1.663 5	97.90		
	0.500 8	1.116 8	1.115 0	2.216 3	98.61		
	0.500 3	1.115 7	1.115 0	2.200 9	97.33		
	0.502 1	1.119 7	1.115 0	2.197 7	96.68		
	0.501 6	1.118 6	1.672 5	2.759 5	98.11		
	0.502 5	1.120 5	1.672 5	2.734 2	96.48		
	0.501 3	1.117 9	1.672 5	2.729 8	96.38		
灵芝酸 B Ganoderic acid B	0.500 2	0.230 1	0.115 0	0.340 2	95.74	98.37	1.22
	0.500 7	0.230 3	0.115 0	0.342 5	97.57		
	0.501 2	0.230 5	0.115 0	0.345 2	99.74		
	0.500 8	0.230 4	0.230 0	0.458 8	99.30		
	0.500 3	0.230 1	0.230 0	0.457 6	98.91		
	0.502 1	0.231 0	0.230 0	0.457 7	98.57		
	0.501 6	0.230 7	0.345 0	0.568 1	97.80		
	0.502 5	0.231 2	0.345 0	0.571 5	98.64		
	0.501 3	0.230 6	0.345 0	0.572 3	99.04		

2.2.6 样品含量测定

分别取 15 批次灵芝子实体样品,按“1.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.4.1”项下的色谱条件进行进样检测分析,以平均相对峰面积按标准曲

线法计算各批次样品中灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量,结果见表 5。结果表明,不同来源段木的灵芝子实体中灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量差异较大,其中柳树+桦树该段木中灵芝酸 A、灵芝酸 B 含量均为最多,

其次为藤树+桦树段木,推测灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量可能与栽培段木有关,其原因有待于进一步探讨研究。

表 5 15 批次不同段木灵芝子实体中灵芝酸 A、灵芝酸 B 成分的含量

Table 5 Contents of ganoderic acid A and ganoderic acid B in 15 batches of different wood segments of *G. lucidum*

样品 Sample	含量 Content (mg/g)			
	灵芝酸 A Ganoderic acid A	平均值 Average value	灵芝酸 B Ganoderic acid B	平均值 Average value
S1-1	2.32	2.29	0.47	0.47
S1-2	2.29		0.49	
S1-3	2.25		0.45	
S2-1	1.36	1.36	0.24	0.25
S2-2	1.39		0.27	
S2-3	1.32		0.23	
S3-1	1.86	1.86	0.38	0.36
S3-2	1.90		0.35	
S3-3	1.83		0.36	
S4-1	1.42	1.45	0.16	0.16
S4-2	1.52		0.15	
S4-3	1.41		0.17	
S5-1	1.23	1.23	0.11	0.11
S5-2	1.27		0.12	
S5-3	1.19		0.11	

3 讨论与结论

灵芝具有丰富的药理活性,有很好的发展前景,对其实验研究多种多样。然而,对于不同段木灵芝子实体的对比研究较少,本研究采用 HPLC 法建立灵芝子实体指纹图谱,并对 15 批次不同来源段木的灵芝子实体成分进行含量测定,比较不同来源段木的灵芝子实体在成分上的差异,从而比较选用不同段木栽培的优劣差异。为此,本研究前期考察了不同浓度乙醇提取条件对成分含量的影响,最终选择 75% 乙醇加热回流提取为最佳制备方法,采用高效液相色谱法对提取液进行测定。

前期对流动相进行考察,选用甲醇作为流动相时,会出现压力增高的情况,色谱图基线漂移明显,而选用乙腈作为流动相进行检测时,乙腈 HPLC 吸收小且灵敏度较高,最终选定流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液。通过摸索乙腈不同时间段的比例对出峰时间的影响,最终选定的色谱条件中乙腈比例变化如下:0~10 min,0%→20%;10~30 min,20%→40%;30~40 min,40%→50%;40~45 min,50%→80%;45~50 min,80%→95%;50~54 min,95%;54~55 min,95%→5%。经指纹图谱分析,不同来源段木的灵芝子实体色谱峰的个数、相对保留时间、相

对峰面积均存在一定差异。15 批次灵芝子实体图谱与对照图谱相似度范围在 0.601~0.986,其中,差异最大的为 S1-3 和 S5-1,差异最小的为 S4-2 和 S5-3。

灵芝的活性成分十分丰富,如多糖、三萜类、甾醇、腺苷、氨基酸等^[5],具有多种生物学活性,如抗癌^[6,7]、抗炎^[8]、保肝^[9]、抗糖尿病^[10]、保护心脏^[11]、免疫调节^[12]、抗氧化^[13]及抗衰老^[14]等。灵芝子实体是灵芝的药用部位,可用于制成灵芝口服液、灵芝胶囊、灵芝茶等中药制剂,具有多种药理作用,常被用于辅助调节人体免疫系统、改善亚健康状态、防治肝病、抗肿瘤等。灵芝酸是灵芝的主要药理成分之一,具有抗炎、抗氧化、治疗肝细胞癌^[15]等药理作用。有研究表明,灵芝酸 A 可调节卵清蛋白诱导的小鼠哮喘肺部炎症^[16],对过量饮酒小鼠肝损伤和肠道微生物紊乱具有保护作用,用其进行干预可显著减轻酒精性肝损伤,有望成为预防酒精性肝损伤的一种新型功能食品成分^[17]。灵芝酸 B 对小鼠脂多糖诱导的肺炎具有保护作用,其机制与 Rho/NF- κ B 信号通路的调控有关^[18]。灵芝酸可减轻组织炎症和细胞凋亡来预防肾缺血再灌注损伤,有可能成为预防肾缺血再灌注损伤诱导的急性肾损伤的候选药

物^[19]。本研究对这两种灵芝酸进行含量测定,发现样品中灵芝酸 A 含量大于灵芝酸 B 含量,其中柳树+桦树该段木的灵芝酸 A、灵芝酸 B 含量均为最高。不同来源段木的灵芝子实体中灵芝酸 A、灵芝酸 B 含量存在差异,其原因可能是生长环境、土壤气候、段木成分、栽培方式等对药材次生代谢产物的积累产生影响,从而导致药材相似度以及含量的差异性^[20],为以后选择合适的段木进行灵芝栽培提供参考。

本研究建立了灵芝子实体 HPLC 指纹图谱,建立了灵芝子实体中灵芝酸 A、灵芝酸 B 的含量测定方法,结果表明柳树+桦树该段木的灵芝酸 A 及灵芝酸 B 含量均为最高,其中灵芝酸 A 含量为 2.29 mg/g,灵芝酸 B 含量为 0.47 mg/g,且灵芝酸 A 含量高于灵芝酸 B 含量,推测灵芝酸 A、灵芝酸 B 含量的高低可能与栽培段木有关,为灵芝子实体资源的合理运用、筛选优质灵芝栽培段木提供参考。

参考文献

- 1 He BW, Xu DL, Ma L, et al. Development and safety manufacturing of *Ganoderma* industry in Zhejiang[J]. *Edible Med Mushroom*, 2016, 24: 353-357.
- 2 Bishop KS, Kao CH, Xu Y, et al. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals[J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 56-65.
- 3 Hsu KD, Cheng KC. From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 9037-9051.
- 4 Li ZY, Liang YY, Lyu WS, et al. Establishment of UPLC fingerprint of *Verbenae Herba* and determination of index components[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 551-561.
- 5 Tong T, Yan R, Kang J, et al. Chemical components of *Ganoderma*[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1181: 59-106.
- 6 Ahmad MF. *Ganoderma lucidum*: a rational pharmacological approach to surmount cancer [J]. *Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113047.
- 7 Chen C, Chen J, Wang Y, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibits HSC activation and liver fibrosis via targeting inflammation, apoptosis, cell cycle, and ECM-receptor interaction mediated by TGF- β /Smad signaling [J]. *Phytomedicine*, 2023, 110: 154626.
- 8 Tiyah SW, Ratnaningtyas NI, Wibowo ES, et al. *Ganoderma lucidum* as anti-inflammatory agent on the level of albumin and globulin in rat (*Rattus norvegicus*) rheumatoid arthritis (RA) model[J]. *Proceeding ICMA-SURE*, 2023, 2: 85-93.
- 9 de Mendonca DEA, de Godoy MAF, Lucredi NC, et al. Toxicogenic effects of the mushroom *Ganoderma lucidum* on human liver and kidney tumor cells and peripheral blood lymphocytes[J]. *Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116226.
- 10 Hussein A, Ghonimy A, Jiang HL, et al. LC/MS analysis of mushrooms provided new insights into dietary management of diabetes mellitus in rats[J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11: 2321-2335.
- 11 Veena RK, Janardhanan KK. Bioactive total triterpenes extracted from fruiting bodies and mycelia of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst ameliorate doxorubicin-induced myocardial injury in rats[J]. *Trans R Soc S Afr*, 2023, 77: 237-245.
- 12 Ahmad MF, Ahmad FA, Khan MI, et al. *Ganoderma lucidum*: A potential source to surmount viral infections through β ? glucans immunomodulatory and triterpenoids antiviral properties[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 769-779.
- 13 Pavlović MO, Stajić M, Gašić U, et al. The chemical profiling and assessment of antioxidative, antidiabetic and antineurodegenerative potential of Kombucha fermented *Camellia sinensis*, *Coffea arabica* and *Ganoderma lucidum* extracts[J]. *Food Funct*, 2023, 14: 262-276.
- 14 Zhang R, Zhang J, Guo X, et al. Molecular mechanisms of the chemical constituents from anti-inflammatory and antioxidant active fractions of *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki [J]. *Curr Res Food Sci*, 2023, 6: 100441.
- 15 Ge Y, Shen R, Xu J, et al. Network pharmacological analysis on mechanism of ganoderic acid in treatment of hep-atocellular carcinoma[J]. *J Guizhou Univ Tradit Chin Med* (贵州中医药大学学报), 2023, 45: 69-76.
- 16 Lu X, Xu C, Yang R, et al. Ganoderic acid A alleviates OVA-induced asthma in mice [J]. *Inflammation*, 2021, 44: 1908-1915.
- 17 Cao YJ, Huang ZR, You SZ, et al. The protective effects of ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* fruiting body on alcoholic liver injury and intestinal microflora disturbance in mice with excessive alcohol intake[J]. *Foods*, 2022, 11: 949.
- 18 Shi J, Wang H, Liu J, et al. Ganoderic acid B attenuates LPS-induced lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106990.
- 19 Shao G, He J, Meng J, et al. Ganoderic acids prevent renal ischemia reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 10229.
- 20 Duo JC, Li CX, Xu XL, et al. HPLC fingerprints analysis of *Aconitum flavum* Hand. -Mazz. from different areas and content determination of four alkaloids [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 200-207.