

分光光度法测定灵芝三萜含量的干扰因素探讨

程池露^{1,2}, 汪昆³, 王金艳¹, 唐传红¹, 张劲松¹, 冯娜^{1*}, 唐庆九^{1*}

1 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
国家食用菌加工技术研发分中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403

2 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

3 华东理工大学化工学院 制药工程与过程化学教育部工程研究中心 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237

摘要: 根据药典方法, 以齐墩果酸为对照品, 对灵芝中含有的三萜、甾醇和脂肪酸 3 种类型化合物进行分光光度法测定, 并对影响三萜含量测定的因素进行分析。结果表明灵芝中的甾醇和脂肪酸类化合物会干扰所有的测定结果, 尤其影响灵芝孢子中三萜含量的测定。灵芝子实体中三萜化合物的结构特征, 造成了其测定值远远低于真实值。因此, 分光光度法不适用于测定灵芝子实体、菌丝体和孢子及其相关产品中的三萜含量。

关键词: 分光光度法; 三萜; 甾醇; 脂肪酸

[引用本文] 程池露, 汪昆, 王金艳, 唐传红, 张劲松, 冯娜, 唐庆九, 2022. 分光光度法测定灵芝三萜含量的干扰因素探讨. 菌物学报, 41(10): 1716-1725

Cheng CL, Wang C, Wang JY, Tang CH, Zhang JS, Feng N, Tang QJ, 2022. Discussion on interference factors in determination of triterpenes in *Ganoderma lingzhi* by spectrophotometric method. Mycosystema, 41(10): 1716-1725

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科创字(2018)第 1-1 号]; 上海市农业科学院卓越团队建设计划资助[沪农科卓(2022)003]

Supported by Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (20180101) and SAAS Program for Excellent Research Team (G2022003).

*Corresponding authors. E-mail: fengna006@163.com, tangqingjiu@saas.sh.cn

Received: 2022-02-11, accepted: 2022-03-01

Discussion on interference factors in determination of triterpenes in *Ganoderma lingzhi* by spectrophotometric method

CHENG Chilu^{1,2}, WANG Chan³, WANG Jinyan¹, TANG Chuanhong¹, ZHANG Jingsong¹, FENG Na^{1*}, TANG Qingjiu^{1*}

1 National Engineering Research Center of Edible Fungi; National R&D Center for Edible Fungal Processing; Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, China; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

2 College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Engineering Research Centre of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education; Shanghai Key Laboratory of New Drug Design; School of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: According to the method proposed by Pharmacopoeia, the triterpenes, sterols and fatty acids in *Ganoderma lingzhi* were determined by spectrophotometry with oleanolic acid as the control substance, and the factors affecting the determination of triterpenes were analyzed. The results showed that sterols and fatty acids in fruiting bodies, especially in spores, could interfere with all the determination results. Because of the structural characteristics of triterpenes in *Ganoderma lingzhi* fruiting bodies, the measured value is much lower than the real value. Therefore, spectrophotometry is not suitable for the determination of triterpenes in fruiting bodies, mycelia, spores and related products of *Ganoderma lingzhi*.

Keywords: spectrophotometric method; triterpenes; sterols; fatty acids

灵芝 *Ganoderma lingzhi* Sheng H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai 隶属于担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、多孔菌目 Polyporales、多孔菌科 Polyporaceae、灵芝属 *Ganoderma* P. Karst (戴玉成等 2013), 是被列入药食同源目录的中药材之一, 具有安神、补气和增智等功效。

三萜是灵芝的重要活性成分之一, 具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、保护肝脏和免疫调节等方面的作用(Gao *et al.* 2003; Feng *et al.* 2013; Jiao *et al.* 2016; Zolj *et al.* 2018; Peng *et al.* 2019)。因此三萜的含量是评价灵芝及其产品质量的重要指标之一。目前关于灵芝及其产品中三萜含量的测定主要参考药典方法和农业农村部标准。药典方法至今仍为分光光度法:以齐墩果酸或熊

果酸为对照品, 5%香草醛-冰醋酸溶液和高氯酸为显色剂, 通过分光光度计对样品进行测定(国家药典委员会 2020)。2013 年农业农村部开始推行高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC), 此方法可以测定灵芝酸 A 和 B 的含量[农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海)和上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 2013]。由于灵芝三萜化合物制备困难、价格昂贵, 使用高效液相法测定灵芝三萜的方法至今未被广泛推广, 目前各质检机构在检测灵芝原料和相关产品时使用的仍然是分光光度法。

本课题组此前的研究已证实, 除三萜外, 甾醇、脂肪酸类化合物也会在分光光度法中显色, 而不同的三萜、甾醇和脂肪酸, 与香草醛-高氯

酸发生反应后显色程度有很大不同(张忠等 2016)。但限于当时对照品种类有限,并未对灵芝中含量较高的多种三萜、甾醇和脂肪酸进行全面系统地测定和评价。本研究在前期制备了多个化合物的基础上(岳亚文等 2020),针对在灵芝中含量较高的主要三萜、甾醇和脂肪酸进行分光光度法测定,探讨这些化合物发生化学显色的结构特征,并进一步解释造成分光光度法测定三萜含量偏差的主要原因。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

NL TRA 超纯水仪(ELGA Lab Water 公司),超高效液相色谱仪(Agilent LC1290 infinity II,安捷伦公司),超声波清洗器(KQ2200E,昆山市超声仪器有限公司),电子天平(FA2004A,上海精密科学仪器有限公司),酶标仪(Synergy HT96, Bio-Tik 公司)。

齐墩果酸和脂肪酸等对照品购自 Sigma 公司,部分菌丝体中三萜对照品为实验室自制,其余三萜和甾醇对照品购自国家标准物质中心,纯度均 $\geq 98\%$ 。蒸馏水(实验室自制),香兰素、冰醋酸、高氯酸和乙酸乙酯(分析纯,国药集团药业股份有限公司)。灵芝子实体、菌丝体和孢子均来自沪农 1 号灵芝品种,其中,子实体和孢子材料由浙江龙泉基地提供,发酵菌丝体分为上层菌皮与下层菌球,其获取方式同骆军鑫等(2014)的报道。

1.2 超高效液相色谱分析样品中的三萜

取沪农 1 号灵芝子实体、菌皮、菌球和孢子材料,各精确称量 1.5 g,加入无水乙醇 30 mL,超声提取 60 min,过 0.2 μm 滤膜后,上样测定。

色谱分析方法:选用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱,1.8 μm ,2.1 mm $\times$ 150 mm。检测波长:254 nm。柱温:35 $^{\circ}\text{C}$ 。上样量:2 μL 。流速:0.4 mL/min。流动相:0.01%醋酸水溶液(A)-乙腈

(B)。洗脱程序:0 min,74% A,26% B;18 min,73% A,27% B;28 min,65% A,35% B;31 min,40% A,60% B;36 min,10% A,90% B;40 min,0% A,100% B;44 min,74% A,26% B。

1.3 分光光度法测定样品中的三萜

参照中华人民共和国药典(2020 版)对样品进行分光光度法测定(国家药典委员会 2020)。

1.3.1 对照品和供试品溶液的制备

齐墩果酸对照品溶液的制备:取齐墩果酸对照品精密称定,加甲醇制成 200 $\mu\text{g/mL}$ 溶液。

三萜、甾醇和脂肪酸对照品溶液的制备:将各化合物对照品精密称定,加甲醇制成 1 mg/mL 溶液。

灵芝生物样品的提取:精确称量沪农 1 号灵芝子实体、发酵的菌皮和菌球、孢子各样品 1.5 g 置具塞锥形瓶中,加乙醇 30 mL,超声处理 60 min,过滤,得上清液。

1.3.2 标准曲线的制备

精密量取齐墩果酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mL,分别置 15 mL 具塞试管中,挥干,放冷,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)0.2 mL、高氯酸 0.8 mL,摇匀,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min,立即置冰浴中冷却 5 min,取出,精密加入乙酸乙酯 4 mL,摇匀,以相应试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法,在 546 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.3.3 化合物的分光光度法测定

各取 40 μL 的化合物溶液置 15 mL 具塞试管中,按 1.3.2 的步骤,自“挥干”起,同法操作,测定吸光度并根据标准曲线计算含量。

1.3.4 灵芝生物样品的分光光度法测定

精密量取各灵芝生物样品提取液 0.2 mL,分别置 15 mL 具塞试管中,按 1.3.2 的步骤,自“挥干”起,同法操作,测定吸光度,根据标准曲线计算生物样品中三萜含量。

2 结果与分析

2.1 超高效液相法对灵芝子实体、菌丝体(菌皮、菌球)和孢子的分析

实验在三萜化合物较为适合的紫外吸收波长 254 nm 下进行检测, 因此色谱图中可以观察到灵芝生物样品中大部分的三萜化合物(图 1), 灵芝子实体中的三萜种类最多, 菌皮中的三萜种类较少但单个三萜化合物含量较高, 而菌球和孢子在同等提取和前处理条件下, 几乎检测不到三萜的存在。甾醇类化合物是灵芝子实体、菌丝体和孢子中均广泛存在的一类物质(Lin & Yang 2019), 但由于甾醇类化合物结构复杂多样, 此类化合物的紫外吸收没有统一的波段, 有的化合物甚至没有紫外吸收。而灵芝中饱和和不共轭的脂肪酸类化合物也没有紫外吸收, 因此, 在 254 nm 波段下, 灵芝子实体、菌丝体和孢子中的大部分甾醇和脂肪

酸化合物不能被检测到。
2.2 分光光度法对灵芝子实体、菌丝体(上层菌皮)、菌球和孢子中三萜含量的测定

分光光度法测定结果与液相色谱检测所观察到的现象并不一致, 分光光度法测定的结果(表 1)中, 灵芝发酵获得的上层菌皮里的三萜含量最高, 孢子次之, 子实体较低, 菌球中的三萜含量最低。此结果证明了采用分光光度法来测定灵芝中的三萜含量是不准确的。为探讨这一现象发生的原因, 接着将灵芝子实体、菌丝体和孢子中报道的含量较高的三萜、甾醇和脂肪酸三类化合物逐一进行了分光光度法的测定。

2.3 受试化合物分光光度法检测

实验中, 所有受试化合物的实际值均为 40 μg。分光光度法测定这些化合物的结果见表 2、表 3、表 4 和表 5, 除了 lanosta-7,9(11),

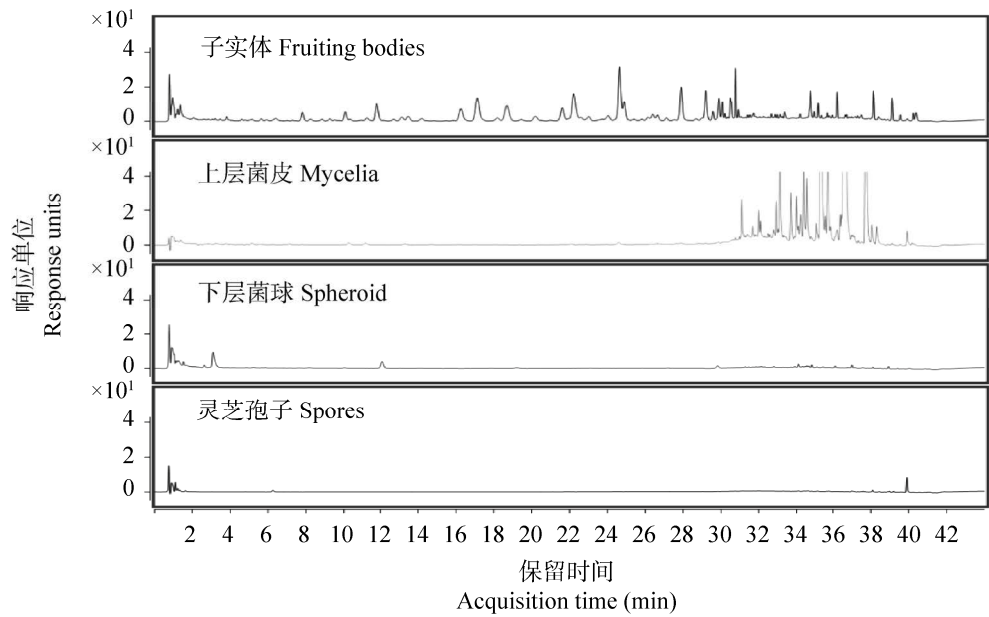


图 1 四种生物样品的超高效液相色谱图谱
Fig. 1 UPLC chromatogram of four samples of *Ganoderma lingzhi*.

表 1 四种样品分光光度法测定结果

样品 Samples	子实体 Fruiting bodies	菌皮 Mycelia	菌球 Spheroid	孢子 Spores
总三萜含量 Total content of triterpenes (%)	1.28±0.07	4.10±0.10	0.84±0.07	3.56±0.06

表 2 灵芝酸类化合物的特征性官能团和测定值
Table 2 Structural functional group and measured values of ganoderic acids determined by spectrophotometric method

种类 Types	化合物 Compounds	C3 位官能团 Functional group on C3	双键位置 Position of double bond	测定值 Measured value (μg)
灵芝烯酸 Ganoderenic acids	Ganoderenic acid B	3β-OH	8-9, 20-22	8.52±0.15
	Ganoderenic acid D	3=O	8-9, 20-22	8.72±0.09
	Ganoderenic acid C	3β-OH	8-9, 20-22	11.11±0.23
	Ganoderenic acid F	3=O	8-9, 20-22	13.74±0.17
	Ganoderenic acid A	3=O	8-9, 20-22	14.29±0.09
	Ganoderenic acid E	3=O	8-9, 20-22	14.99±0.31
灵芝酸 (含有共轭双键) Ganoderic acids (Conjugated double bonds)	Ganoderic acid TQ	3=O	7-8(9-11), 24-25	8.86±0.10
	Ganoderic acid SZ	3=O	7-8(9-11), 24-25	9.77±0.23
	Ganoderic acid Jb	3β-OH	7-8(9-11), 24-25	10.36±0.23
	Ganoderic acid TN	3β-OH	7-8(9-11), 24-25	13.79±0.23
	Ganoderic acid Y	3β-OH	7-8(9-11), 24-25	16.18±0.23
	Ganoderic acid T1*	3α-OAc	7-8(9-11), 24-25	18.47±0.09
	Ganoderic acid T*	3α-OAc	7-8(9-11), 24-25	18.47±0.09
	Ganoderic acid Mk*	3α-OH	7-8(9-11), 24-25	18.87±0.09
	Ganoderic acid Me*	3α-OAc	7-8(9-11), 24-25	19.42±0.15
	Ganoderic acid P*	3α-OH	7-8(9-11), 24-25	20.49±0.29
	Ganoderic acid TR	3=O	7-8(9-11), 24-25	22.10±0.15
	Ganoderic acid R*	3α-OAc	7-8(9-11), 24-25	22.20±0.09
	Ganoderic acid S*	3α-OH	7-8(9-11), 24-25	24.14±0.09
	Lanosta-7,9(11),24-trien-3α-hydroxy-26-oic acid*	3α-OH	7-8(9-11), 24-25	41.91±0.09
	Ganoderic acid A	3=O	8-9	6.73±0.15
灵芝酸 (不含共轭双键) Ganoderic acids (No conjugated double bonds)	Ganoderic acid LM2	3=O	8-9, 24-25	7.63±0.15
	Ganoderic acid N	3=O	8-9	7.78±0.15
	Ganoderic acid C6	3β-OH	8-9	8.03±0.17
	Ganoderic acid F	3=O	8-9	8.72±0.23
	Ganoderic acid K	3β-OH	8-9	9.02±0.23
	Ganoderic acid G	3β-OH	8-9	9.57±0.15
	Ganoderic acid B	3β-OH	8-9	9.67±0.17
	Ganoderic acid H	3β-OH	8-9	10.06±0.05
	Ganoderic acid I	3β-OH	8-9	10.91±0.15
	Ganoderic acid C2	3β-OH	8-9	11.01±0.09
	Ganoderic acid L	3β-OH	8-9	11.21±0.15
	12-Hydroxy-ganoderic acid D	3=O	8-9	11.21±0.20
	Ganoderic acid DM	3=O	8-9, 24-25	12.35±0.31
	20-Hydroxyganoderic acid G	3β-OH	8-9	12.75±0.23
	Ganoderic acid D	3=O	8-9	13.50±0.09
	7-Oxo-ganoderic acid Z	3β-OH	8-9, 24-25	16.38±0.09
	23S-hydroxy-11,15-dioxo-ganoderic acid DM	3β-OH	8-9, 24-25	19.32±0.09
	Ganoderic acid AM1	3β-OH	8-9	22.05±0.08
	Ganoderic acid Z	3β-OH	8-9, 24-25	26.28±0.75

注：标 “*” 的化合物均为本实验室从灵芝菌丝体中制备得到。下同
Note: Compounds marked with “*” were isolated from mycelia of *Ganoderma lingzhi* in our laboratory. The same below.

表 3 灵芝酮、醛、醇、内酯类化合物的特征性官能团和测定值

Table 3 Structural functional group and measured values of ganoderma ketones, aldehydes, alcohols, lactones determined by spectrophotometric method

化合物 Compounds	C3 位官能团 Functional group on C3	双键位置 Position of double bond	测定值 Measured value (μg)
Ganoderiol A	3β-OH	7-8(9-11)	7.23±0.23
Ethyl ganoderate J	3=O	8-9	10.36±0.23
3β,7β,15β-Trihydroxy-11-oxo-lanosta-8-en-24->20 lactone	3β-OH	8-9	11.76±0.31
Ganoderlactone D	3β-OH	8-9	12.30±0.23
Ganolactone B	3β-OH	8-9	13.05±0.23
Lucialdehyde B	3=O	8-9, 24-25	13.65±0.38
Ganoderal A	3=O	7-8(9-11), 24-25	15.59±0.09
Ganodermanondiol*	3=O	7-8(9-11)	19.52±0.09
Ganoderone A	3β-OH	8-9, 24-25	21.46±0.31
Lucidal	3β-OH	8-9, 24-25	27.08±0.09
Ganodermanontriol*	3=O	7-8(9-11)	27.28±0.09
Lucialdehyde A	3β-OH	7-8(9-11), 24-25	30.31±0.26
Ganoderol A	3=O	7-8(9-11), 24-25	31.26±0.31
Ganoderiol F	3=O	7-8(9-11), 24-25	38.27±0.70
Ganoderol B*	3β-OH	7-8(9-11), 24-25	39.76±0.53

表 4 甾醇类化合物的特征性官能团和测定值

Table 4 Structural functional group and measured values of sterols determined by spectrophotometric method

化合物 Compounds	C3 位官能团 Functional group on C3	双键位置 Position of double bond	测定值 Measured value (μg)
Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one	3=O	4-5(6-7)(8-14), 22-23	7.71±0.17
β-Sitosterol	3β-OH	5-6	8.31±0.09
Cervisterol	3β-OH	7-8, 22-23	16.04±0.10
Ergosterol peroxide	3β-OH	6-7, 22-23	20.45±0.12
3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-one	3β-OH	7-8, 22-23	21.50±0.17
Ergosterol	3β-OH	5-6(7-8)22-23	21.79±0.10
3,5,9-Trihydroxyergosta-7,22-dien-6-one	3β-OH	7-8, 22-23	22.59±0.10
5,8-Epidioxyergosta6,9(11),22-trien-3-ol	3β-OH	6-7, 9-11, 22-23	22.71±0.03
6-O-Methylcervisterol	3β-OH	7-8, 22-23	31.04±0.10
Stellasterol	3β-OH	7-8, 22-23	33.51±0.40

24-trien-3α-hydroxy-26-oic acid 这个三萜化合物的测定值超过实际值，达到了 41.91 μg，其余所有化合物的测定值均小于实际值。对于三萜类化合物来说，菌丝体中的灵芝酸类化合物(含有 1 对共轭双键和 1 个支链末端双键)与中性三萜化合物(灵芝酮、醛、醇、内酯等无末端羧基的化合物)的测定值比大部分的其他结构类别的灵芝

三萜类化合物要高。比如 ganoderic acid P、ganoderic acid TR、ganoderic acid R、ganoderic acid S、lanosta-7,9(11),24-trien-3α-hydroxy-26-oic acid、ganoderone A、lucidal、ganodermanontriol、lucialdehyde A、ganoderol A、ganoderiol F 和 ganoderol B 的测定值都能超过 20 μg。被检测的所有类型三萜化合物中，均有测定值小于 10 μg

的化合物。但值得注意的是,结构中无共轭双键的灵芝酸类和灵芝烯酸类化合物,是灵芝子实体中含量较高的一类三萜化合物,也是被众多研究者重点进行分析检测的研究对象,这类化合物在分光光度法测定中的响应最弱,大部分的测定值都低于 20 μg ,其中, ganoderic acid A 的测定值仅为 6.73 μg ,是所有化合物中的最低值。

表 5 脂肪酸类化合物的特征性官能团和测定值
Table 5 Structural functional group and measured values of fatty acids determined by spectrophotometric method

化合物 Compounds	双键位置 Position of double bond	测定值 Measured value (μg)
Stearic acid		7.94 $\pm$ 0.26
Nonadecanoic acid		7.88 $\pm$ 0.17
Palmitic acid		8.63 $\pm$ 0.26
Behenic acid		9.49 $\pm$ 0.26
Benzoic acid		10.06 $\pm$ 0.20
Linoleic acid	6-7, 9-10	25.29 $\pm$ 0.79
Oleic acid	9-10	25.75 $\pm$ 0.70

除三萜化合物外,实验中所有的甾醇和脂肪酸化合物也都会在香草醛-冰醋酸-高氯酸体系下发生显色反应,在 546 nm 处存在可见光吸收。其中甾醇类化合物的测定值多数都能达到 20 μg 以上,而 6-O-methylcerevisterol 和 stellersterol 两个化合物的测定值更是超过 30 μg ,比多数的三萜类化合物都要高。脂肪酸类的化合物中 linoleic acid 和 oleic acid 的测定值要显著高于其他脂肪酸类化合物。这表明分光光度法测定灵芝三萜含量时不但不能准确反映三萜的含量,还会受到灵芝中甾醇、脂肪酸类化合物的干扰。

2.4 受试化合物结构对分光光度法测定结果的影响

分光光度法测定三萜化合物含量的具体作用原理仍不清楚。比较公认的说法是:三萜在无水条件下与强酸、中等强酸或路易斯酸作用,使得结构上的羟基脱水,增加双键结构,再经双键

移位、双分子缩合等反应生成共轭双烯系统,又在酸作用下形成阳碳离子而呈色。因此,全饱和的、C3 位无羟基或羰基的化合物呈阴性反应。本来就有共轭双键的化合物显色很快,只有孤立双键的化合物显色较慢(裴月湖等 2016)。

本研究为探讨灵芝中三萜、甾醇和脂肪酸与检测试剂是否发生反应及显色程度的规律,专门总结了受试化合物中 C3 位官能团的取代情况和双键的个数和位置与测定值的关系。三萜化合物,根据其双键特征可分为灵芝酸(1 个双键)、灵芝烯酸(2 个双键)、菌丝体灵芝酸(1 对共轭双键和 1 个支链末端双键)和灵芝酮、醛、醇等中性三萜 4 种类型。其中,菌丝体灵芝酸和部分灵芝酮、醛、醇类中性三萜的测定值普遍较高,推测与其结构自身就有共轭双键有关(但 ganoderiol A 是例外)。

从实验结果可以看出, C3 上的取代和主链羟基的位置在三萜化合物的显色方面有着重要作用。一方面当化合物的结构在主链上除了 C3 位没有其他羟基取代时, C3 位连接有羟基的化合物要比 C3 位连接有酮基的化合物显色能力更强。这一结论可以从化合物 lucialdehyde B 和 lucidal、ganoderol A 和 lucialdehyde A、ganoderol A 和 ganoderol B、ganoderic acid TQ 和 ganoderic acid TN、ganoderic acid SZ 和 ganoderic acid Y 之间的结构与测定值的比较得出。另一方面,从另一类化合物如 ganoderenic acid C 和 ganoderenic acid A、ganoderenic acid D 和 ganoderenic acid F、ganoderic acid Jb 和 ganoderic acid TR 之间的对比可以看出,当化合物在主链上还有更多的羟基取代时, C3 上是酮基取代的化合物要比 C3 位是羟基取代的化合物显色能力更强。值得注意的是,在菌丝体灵芝酸中, C3 位的羟基取代为 α 构型时,相较于 β 构型,其测定值普遍偏高; C3 位为乙酰氧基取代时,菌丝体中的三萜化合物也具有较高的测定值。

而在甾醇类化合物中, C3 位的羟基对化合物的显色必不可少, C3 位没有羟基取代的化合物 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one 的测定值最低。脂肪酸类化合物中, 双键对其显色至关重要, 没有双键的几种饱和脂肪酸: stearic acid、nonadecanoic acid、palmitic acid、behenic acid 和 benzoic acid 的测定值较低, 这与 Knight *et al.* (1972) 的研究结果相符。

3 讨论

灵芝在不同生长时期, 其三萜的含量与种类有很大不同。在菌丝体时期, 灵芝酸 S、灵芝酸 T 和灵芝酸 Mk 等 60 多种特有的灵芝酸和少数几种灵芝醇生成于静置发酵产生的上层菌皮表层的分生孢子中, 而下层的菌球中三萜含量较低(Fang & Zhong 2002)。灵芝子实体形成后, 其中的三萜化合物更加丰富。据报道, 灵芝子实体中的三萜有 160 余种, 按照结构的不同可以分为灵芝酸、烯酸、酮、醛、醇和内酯等多种类型(Lin & Yang 2019)。灵芝孢子中的三萜种类则最少, 目前仅有 30 余种化合物被报道(Ma *et al.* 2011; Lin & Yang 2019)。甾醇、脂肪酸则是灵芝不同生长阶段都共有的化学成分(Lin & Yang 2019)。

据报道, 灵芝孢子中的三萜不仅种类少, 其含量也很低, 需要浓缩 100 倍左右才能达到高效液相色谱检测的检出限(杨志空等 2020a), 因此在本研究的提取条件下, 孢子提取物在检测结果中无色谱峰出现。作为灵芝的生殖和储能器官, 灵芝孢子中含有比灵芝子实体和菌丝体更高含量的甾醇和脂肪酸类成分, 其中麦角甾醇、油酸和亚油酸在以往的研究中, 已被证实在孢子中含量较高(孟凡冰等 2013; 华正根等 2018; Liu *et al.* 2020; 杨志空等 2020b), 而这 3 种化合物在分光光度法检测中的测定值也相对较高, 因此, 可以确定这几种甾醇和脂肪酸干扰了灵芝

孢子三萜含量的测定结果。

根据现有的研究, 灵芝子实体中含量较高的三萜为 ganoderic acid A、ganoderic acid B、ganoderic acid C2、ganoderic acid D、ganoderic acid H、ganoderic acid G、ganoderenic acid A、ganoderenic acid B 和 ganoderenic acid D 等灵芝酸、灵芝烯酸类化合物(Da *et al.* 2012; 李保明等 2012)。但这些含量较高的灵芝酸和灵芝烯酸类化合物在香草醛-冰醋酸-高氯酸显色体系下的显色效果均较差, 其测定值与实际值比较, 这类化合物的总体含量被低估了 75%左右。推测这是造成分光光度法检测时灵芝子实体中三萜测定值要比菌丝体和孢子粉偏低的主要原因。

与子实体中的三萜相比, 灵芝发酵上层菌皮中的三萜种类较少, 但单个化合物含量却很高。ganoderic acid P、ganoderic acid S、ganoderic acid T 和 ganoderic acid Mk 等是灵芝上层菌皮中含量较高的几种三萜类化合物(徐军伟 2009; 岳亚文等 2020), 在分光光度法检测时其测定值远高于子实体中的三萜化合物, 推测这是造成灵芝上层菌皮的分光光度法测定值较高的主要原因。灵芝发酵的下层菌球中, 几乎没有任何三萜化合物, 因此, 在分光光度法检测中, 其测定值最低。

本研究表明分光光度法并不适用于测定灵芝及其产品中三萜的总含量。灵芝中甾醇、脂肪酸的存在均会成为分光光度法测定结果的干扰因素, 影响测定的准确性, 尤其是当测试对象为灵芝孢子时, 结果会呈现出非常明显的假阳性。齐墩果酸不适用于作为化学法测定灵芝三萜的标准品, 其作为标准品会造成灵芝三萜含量的测定值远小于实际值。随着制备技术的进步和分析仪器的普及, 建议在相关的政策法规中, 用更加精确全面的高效液相色谱法逐渐取代无专属检验能力的分光光度法。

[REFERENCES]

- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2020 edition. China Medical Science Press, Beijing. 195-196 (in Chinese)
- Da J, Wu WY, Hou JJ, Long HL, Yao S, Yang Z, Cai LY, Yang M, Jiang BH, Liu X, Cheng CR, Li YF, Guo DA, 2012. Comparison of two officinal Chinese pharmacopoeia species of *Ganoderma* based on chemical research with multiple technologies and chemometric analysis. *Journal of Chromatography A*, 1222: 59-70
- Dai YC, Cao Y, Zhou LW, Wu SH, 2013. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China. *Mycosystema*, 32(6): 947-952 (in Chinese)
- Fang QH, Zhong JJ, 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress*, 18(1): 51-54
- Feng L, Yuan L, Du M, Chen Y, Zhang MH, Gu JF, He JJ, Wang Y, Cao W, 2013. Anti-lung cancer activity through enhancement of immunomodulation and induction of cell apoptosis of total triterpenes extracted from *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. *Molecules*, 18(8): 9966-9981
- Gao Y, Zhou S, Min H, Xu AL, 2003. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllphoromycetidae): a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(3): 235-246
- Hua ZG, Wang JL, Zhu LP, Wu CH, Yao WX, Li Y, 2018. Study on the extraction of triterpenes and sterols from *Ganoderma lucidum* by supercritical CO₂ under high pressure. *Edible Fungi of China*, 37(5): 62-65, 69 (in Chinese)
- Jiao Y, Xie T, Zou LH, Wei Q, Qiu L, Chen LX, 2016. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma curtisii* and their NO production inhibitory activities of LPS-induced microglia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26(15): 3556-3561
- Knight JA, Anderson S, Rawle JM, 1972. Chemical basis of the sulfophospho-vanillin reaction for estimating total serum lipid. *Clinical Chemistry*, 18(3): 198-201
- Li BM, Gu HF, Li Y, Liu C, Wang HQ, Kang J, Wu CH, Chen RY, 2012. Determination of nine triterpenoid acids from *Ganoderma lucidum* of different producing areas by HPLC. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 37(23): 3599-3603 (in Chinese)
- Lin ZB, Yang BX, 2019. *Ganoderma* and health: biology, chemistry and industry. Springer Nature, Heidelberg. 59-106
- Liu MT, Chen LX, Zhao J, Li SP, 2020. *Ganoderma* spore powder contains little triterpenoids. *Chinese Medicine*, 15: 111
- Luo JX, Zhang JS, Jia W, Feng N, Yang Y, Tang QJ, Liu YF, Zhang H, 2014. Influences of culture methods on the yield and antineoplastic activity of intracellular triterpene of *Ganoderma lucidum* mycelia. *Acta Agriculturae Shanghai*, 30(2): 33-37 (in Chinese)
- Ma BJ, Ren W, Zhou Y, Ma JC, Ruan Y, Wen CN, 2011. Triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. *North American Journal of The Medical Sciences*, 3(11): 495-498
- Meng FB, Li YC, Zhong G, 2013. Extraction and fatty acid compositions analysis of spore oil from *Ganoderma lucidum*. *Food Science*, 34(2): 42-45 (in Chinese)
- Ministry of Agriculture Mushroom Product Quality Supervision and Testing Center (Shanghai), Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, 2013. Determination of ganoderic acid in ganoderma products by HPLC. Agriculture Industry Standard (Recommended) NY/T 2278-2012 (in Chinese)
- Pei YH, Lou HX, Zhang WD, Qiu F, Zhang YH, 2016. Medicinal chemistry of natural products. 7th ed. People's Medical Publishing House, Beijing. 233 (in Chinese)
- Peng XR, Li L, Dong JR, Lu SY, Lu J, Li XN, Zhou L, Qiu MH, 2019. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, 157: 103-110
- Xu JW, 2009. Production of individual ganoderic acids and identification of differentially expressed genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*. PhD Dissertation, East China University of Science and Technology, Shanghai. 1-103 (in Chinese)
- Yang ZK, Han W, Feng N, Zhang JS, Wang CG, Zhou J, Wang JY, Tang QJ, 2020a. Determination of triterpenoids in *Ganoderma lingzhi* spore powder by HPLC. *Mycosystema*, 39(1): 184-192 (in Chinese)
- Yang ZK, Wang JY, Feng N, Zhang JS, Wang CG, Yan PL, Zhou J, Tang QJ, Han W, 2020b. Determination of liposoluble components in *Ganoderma lingzhi* spore powder. *Mycosystema*, 39(10): 1971-1980 (in Chinese)
- Yue YW, Zhou S, Feng J, Wang JY, Tang QJ, Liu YF, Zhang JS, Feng N, Han W, 2020. Active components in mycelia of sporeless *Ganoderma lingzhi*. *Mycosystema*, 39(1): 128-136 (in Chinese)
- Zhang Z, Zhang JS, Liu YF, Zhou S, Wang JY, Yu HZ, Tang QJ, 2016. Discussion on the determination of total triterpenes in *Ganoderma lucidum* by spectrophotometry. *Acta Agriculturae Shanghai*, 32(1): 61-65 (in Chinese)
- Zolj S, Smith MP, Goines JC, Ali TS, Huff MO, Robinson DL, Lau JM, 2018. Antiproliferative effects of a triterpene-enriched extract from lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (agaricomycetes), on human lung cancer cells. *International Journal of*

Medicinal Mushrooms, 20(12): 1173-1183

[附中文参考文献]

- 戴玉成, 曹云, 周丽伟, 吴声华, 2013. 中国灵芝学名之管见. 菌物学报, 32(6): 947-952
- 国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社. 195-196
- 华正根, 王金亮, 朱丽萍, 吴长辉, 姚渭溪, 李晔, 2018. 高压超临界 CO₂ 提取灵芝三萜和甾醇成分的研究. 中国食用菌, 37(5): 62-65, 69
- 李保明, 古海锋, 李晔, 刘超, 王洪庆, 康洁, 吴长辉, 陈若芸, 2012. HPLC 测定不同产地灵芝中 9 种三萜酸. 中国中药杂志, 37(23): 3599-3603
- 骆军鑫, 张劲松, 贾薇, 冯娜, 杨炎, 唐庆九, 刘艳芳, 章慧, 2014. 培养方法对灵芝菌丝体胞内三萜产量和抗肿瘤活性的影响. 上海农业学报, 30(2): 33-37
- 孟凡冰, 李云成, 钟耕, 2013. 灵芝孢子油的提取及脂肪酸检测. 食品科学, 34(2): 42-45
- 农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海), 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 2013.

灵芝产品中灵芝酸含量的测定高效液相色谱法. 农业部备案标准 NY/T 2278-2012

- 裴月湖, 娄红祥, 张卫东, 邱峰, 张勇慧, 2016. 天然药物化学. 第七版. 北京: 人民卫生出版社. 233
- 徐军伟, 2009. 灵芝细胞在液体静置培养和振荡培养中单体灵芝酸的生产及差异表达基因的鉴定. 华东理工大学博士论文, 上海. 1-103
- 杨志空, 韩伟, 冯娜, 张劲松, 王晨光, 周靖, 王金艳, 唐庆九, 2020a. HPLC 法测定灵芝孢子粉中三萜含量. 菌物学报, 39(1): 184-192
- 杨志空, 王金艳, 冯娜, 张劲松, 王晨光, 严培兰, 周靖, 唐庆九, 韩伟, 2020b. 灵芝孢子粉中脂溶性成分分析方法建立. 菌物学报, 39(10): 1971-1980
- 岳亚文, 周帅, 冯杰, 王金艳, 唐庆九, 刘艳芳, 张劲松, 冯娜, 韩伟, 2020. 一种无孢灵芝菌丝体的活性成分. 菌物学报, 39(1): 128-136
- 张忠, 张劲松, 刘艳芳, 周帅, 王金艳, 于华崢, 唐庆九, 2016. 分光光度法测定灵芝总三萜含量方法探讨. 上海农业学报, 32(1): 61-65