

曹 正, 凡军民, 谢春芹, 等. 不同灵芝菌株功能性成分含量及其抗氧化活性比较[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 281–283.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.080

不同灵芝菌株功能性成分含量及其抗氧化活性比较

曹 正, 凡军民, 谢春芹, 吕兴萍, 朱怡婷

(江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400)

摘要:采用不同方法提取并比较 4 种不同灵芝菌株功能性成分的含量及其抗氧化活性。结果表明:黑灵芝的多糖含量最高($P < 0.05$), 达 6.55 mg/g; 大红芝的甘露醇含量最高($P < 0.05$), 达 21.92 mg/g; 黑灵芝的总三萜含量最高($P < 0.05$), 达 170.53 mg/g; 在 1.0 mg/mL 浓度下, 赤芝、大红芝、黑灵芝、灵芝 902 多糖对 DPPH 自由基的清除率分别为 81.88%、80.92%、80.30%、76.38%。由结果可见, 不同灵芝菌株间的多糖、甘露醇和总三萜含量存在差异。抗氧化试验结果表明, 4 种灵芝菌株多糖清除 DPPH 自由基活性均较强, 随着浓度的增大而升高。

关键词:灵芝; 多糖; 甘露醇; 总三萜; 抗氧化活性

中图分类号: S567.3⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0281-02

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种名贵的药用真菌,在亚洲作为药材使用已有 2 000 多年的历史。经现代药理学研究证明,灵芝具有抗肿瘤、免疫调节、镇静安神、强心及抗心肌缺血、调节血脂、平喘、保肝、降血糖、抗缺氧、清除自由基以及延缓衰老等药理作用^[1-2]。这些药理活性与灵芝中多糖、三萜类、腺苷、生物碱、油脂类、甾醇类等功能性成分密切相关,其中多糖、三萜类化合物被认为是其主要药效成分,其含量成为衡量灵芝质量高低的重要指标^[3-4]。目前,对不同灵芝菌株甘露醇含量的比较分析尚未见报道。

由于灵芝种类繁多,品种间的不同均可能会引起功能性成分在产量表达上的差异^[3]。因此,本研究选取不同灵芝菌株,对其多糖、甘露醇及总三萜含量进行测定比较,并对多糖抗氧化活性进行研究,以期对灵芝的进一步研究和开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大红芝、黑灵芝、灵芝 902、赤芝,均采于江苏农博园食用菌基地。

1.2 试剂

95%乙醇、浓硫酸、苯酚、香草醛、高氯酸、冰乙酸、乙酸铵、乙酰丙酮、浓盐酸、高碘酸钠、L-鼠李糖、无水乙醇,均为国产分析纯;葡萄糖、甘露醇标准品,均购自阿拉丁试剂有限公司;齐墩果酸标准品,购自南京替斯艾中中药研究所;1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器

756 型紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);

收稿日期:2015-07-30

基金项目:江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2014]275);2015 年江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号:201513103022X)。作者简介:曹 正(1967—),男,江苏靖江人,硕士,副教授,主要从事食用菌真菌的研究。E-mail:963243057@qq.com。

通信作者:凡军民,博士,副教授,主要从事生物制药的教学和研究工作。E-mail:147866596@qq.com。

司);DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司);FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ 3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司);TDL-5A 低速台式大容量离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);RE-5203 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);LGJ-12 普通型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 灵芝的预处理 将新鲜灵芝子实体去杂、切块、烘干、粉碎。

1.4.2 灵芝功能性成分的提取

1.4.2.1 多糖的提取与制备 脱脂:取灵芝子实体粉末,加入 6 倍体积的 95%乙醇室温浸泡 48 h,重复 3 次,滤渣风干待用。沸水提取:精确称取 0.500 0 g 脱脂的灵芝粉末,加 100 mL 水,沸水浴提取 2 h,冷却至室温,过滤,上清液定容至 100 mL;移取 20.0 mL 提取液,缓缓加入 80.0 mL 95%乙醇,静置过夜,3 000 r/min 离心 15 min,沉淀物溶解定容至 100 mL,溶液待测。多糖的制备:将沸水提取液减压浓缩,浓缩 5~10 倍,离心除沉淀;在浓缩液中缓缓加入 95%乙醇(体积比 1:4),静置过夜、离心,沉淀物用蒸馏水溶解。透析:截留分子量为 10 ku,截留液冷冻干燥。

1.4.2.2 甘露醇的提取 精确称取 0.500 0 g 灵芝粉末,加 100 mL 水,沸水浴提取 2 h,冷却至室温,过滤,上清液加水定容至 100 mL,溶液待测。

1.4.2.3 总三萜的提取 精确称取 0.500 0 g 灵芝粉末,加入 10.0 mL 无水乙醇,浸泡 20 min,超声波提取 30 min 后,摇匀、过滤,滤液加水定容至 50 mL,溶液待测。

1.4.3 灵芝功能性成分的测定

1.4.3.1 多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[5]。标准曲线的绘制:分别移取 0.0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL 的 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液于 6 支试管中,加水至总体积为 2.0 mL,再加入 1.0 mL 5%苯酚溶液,混匀后迅速加入 5 mL 硫酸摇匀冷却,

室温放置 20 min,于 490 nm 处测吸光度。以质量为横坐标、 $D_{490\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。样品的测定:移取多糖提取液 1.0 mL,按上述同样操作显色,根据标准曲线计算多糖含量。

1.4.3.2 甘露醇含量测定 采用高碘酸钠比色法^[6]。标准曲线的绘制:分别移取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 25 $\mu\text{g/mL}$ 甘露醇标准溶液于具塞试管中,加蒸馏水至总体积为 2.0 mL,加 1.0 mL 高碘酸钠试液,混匀,室温放置 10 min;加 2.0 mL 0.1 % 鼠李糖,再加 4.0 mL 新配制的 Nash 试剂,53 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,于 420 nm 测吸光度。以质量为横坐标、 $D_{420\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。样品的测定:移取 1.0 mL 甘露醇提取液,按上述同样操作显色,根据标准曲线计算甘露醇含量。

1.4.3.3 总三萜含量测定 采用高氯酸-香草醛显色法^[7]。标准曲线的绘制:分别移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 200 $\mu\text{g/mL}$ 齐墩果酸溶液于具塞试管中,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干;加 0.4 mL 5% 香草醛-冰乙酸液,摇匀;再加入 0.6 mL 高氯酸,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,冰浴冷却,加 5.0 mL 冰乙酸,摇匀,置室温 15 min,于 545 nm 处测定吸光度。以质量为横坐标、 $D_{545\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。样品的测定:移取 1.0 mL 总三萜提取液于具塞试管中,按上述同样操作显色,根据标准曲线计算三萜酸含量。

1.4.4 抗氧化活性测定 用 DPPH 法测定^[8],分别吸取 4.0 mL 不同浓度样液与 0.2 mmol/L DPPH 溶液,加入具塞试管中摇匀,黑暗条件下于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 517 nm 处测吸光度,以维生素 C 作为阳性对照。清除率计算公式:清除率 = $[1 - (D_i - D_j)/D_0] \times 100\%$ 。式中: D_i 为不同多糖含量下的吸光度; D_j 为用无水乙醇代替 DPPH 溶液时测得的不同多糖含量本底吸光度; D_0 为用水代替多糖样品时测得空白对照吸光度。每个浓度平行做 3 次试验,计算清除率的平均值。

1.4.5 结果计算 采用软件 SPSS 13.0,用 Duncan's 法对试验结果进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同灵芝菌株的多糖含量比较

以葡萄糖标准溶液绘制标准曲线,建立线性回归方程: $Y = 6.5024X + 0.0206$, $r^2 = 0.9974$ 。式中: Y 为 $D_{490\text{ nm}}$; X 为葡萄糖溶液的浓度,mg/g。

由表 1 可见,不同灵芝菌株多糖含量间差异明显,黑灵芝中的多糖含量最高,达 6.55 mg/g;其次是大红芝、灵芝 902,多糖含量分别为 6.04、5.76 mg/g ($P < 0.05$);赤芝含量最低,多糖含量为 4.80 mg/g,与其他灵芝中的多糖含量差异极显著。

2.2 不同灵芝菌株的甘露醇含量

以甘露醇标准溶液绘制标准曲线,建立线性回归方程: $Y = 8.864X + 0.0601$, $r^2 = 0.9977$ 。式中: Y 为 $D_{420\text{ nm}}$; X 为甘

灵芝品种	DPPH 自由基清除率 (%)			
	1.0 mg/mL 多糖	1.5 mg/mL 多糖	3.0 mg/mL 多糖	4.5 mg/mL 多糖
大红芝	80.92 \pm 0.28b	83.15 \pm 0.41b	85.04 \pm 0.78b	86.32 \pm 1.29b
黑灵芝	80.30 \pm 3.68b	82.71 \pm 0.74b	83.79 \pm 3.14b	84.66 \pm 0.39b
赤芝	81.88 \pm 0.85b	84.67 \pm 0.53b	86.36 \pm 1.35b	87.00 \pm 1.75b
灵芝 902	76.38 \pm 0.44c	76.28 \pm 0.81c	76.45 \pm 3.99c	76.59 \pm 2.34c
维生素 C(CK)	97.63 \pm 0.01a	97.85 \pm 0.03a	97.88 \pm 0.02a	97.64 \pm 0.01a

表 1 不同灵芝菌株的多糖含量比较	
灵芝子实体	多糖含量 (mg/g)
灵芝 902	5.76 \pm 0.18bB
赤芝	4.80 \pm 0.19cC
黑灵芝	6.55 \pm 0.00aA
大红芝	6.04 \pm 0.31bAB

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

露醇溶液的浓度,mg/g。

由表 2 可见,不同灵芝菌株甘露醇含量差异明显,大红芝中所含的甘露醇含量最高,达 21.92 mg/g,其次是赤芝,甘露醇含量达 18.16 mg/g,黑灵芝、灵芝 902 的甘露醇含量较低,分别为 8.80、5.05 mg/g。

表 2 不同灵芝菌株的甘露醇含量比较	
灵芝子实体	甘露醇含量 (mg/g)
灵芝 902	5.05 \pm 0.20dD
赤芝	18.16 \pm 0.51bB
黑灵芝	8.80 \pm 0.62cC
大红芝	21.92 \pm 0.22aA

2.3 不同灵芝菌株的总三萜含量的比较

以齐墩果酸标准溶液绘制标准曲线,并建立线性回归方程: $Y = 0.031X + 0.0698$, $r^2 = 0.9963$ 。式中: Y 为 $D_{545\text{ nm}}$; X 为齐墩果酸溶液的浓度,mg/g。

由表 3 可见,不同灵芝菌株总三萜含量差异明显,黑灵芝中的总三萜含量最高,达 170.53 mg/g;其次是大红芝、赤芝,总三萜含量分别达 149.62、131.27 mg/g;灵芝 902 的总三萜含量最低,为 66.67 mg/g。

表 3 不同灵芝菌株的总三萜含量比较	
灵芝子实体	总三萜含量 (mg/g)
灵芝 902	66.67 \pm 0.95dD
赤芝	131.27 \pm 2.53cC
黑灵芝	170.53 \pm 6.08aA
大红芝	149.60 \pm 1.10bB

2.4 灵芝多糖抗氧化活性比较

由表 4 可知,4 种不同灵芝菌株多糖清除 DPPH 自由基活性随着多糖含量的增大而升高。在 1.0 ~ 4.5 mg/mL 多糖含量范围内,同一浓度下赤芝、大红芝、黑灵芝的提取多糖清除 DPPH 自由基能力差异不显著,灵芝 902 多糖清除能力最差 ($P < 0.05$);在 1.0 mg/mL 浓度下,赤芝、大红芝、黑灵芝、灵芝 902 多糖对 DPPH 自由基的清除率分别为 81.88%、80.92%、80.30%、76.38%。

表 4 不同灵芝菌株提取多糖清除 DPPH 自由基活性比较				
灵芝品种	DPPH 自由基清除率 (%)			
	1.0 mg/mL 多糖	1.5 mg/mL 多糖	3.0 mg/mL 多糖	4.5 mg/mL 多糖
大红芝	80.92 ±0.28b	83.15 ±0.41b	85.04 ±0.78b	86.32 ±1.29b
黑灵芝	80.30 ±3.68b	82.71 ±0.74b	83.79 ±3.14b	84.66 ±0.39b
赤芝	81.88 ±0.85b	84.67 ±0.53b	86.36 ±1.35b	87.00 ±1.75b
灵芝 902	76.38 ±0.44c	76.28 ±0.81c	76.45 ±3.99c	76.59 ±2.34c
维生素 C(CK)	97.63 ±0.01a	97.85 ±0.03a	97.88 ±0.02a	97.64 ±0.01a

赵天明. 基于绿色溶剂的天然产物提取技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 283–286.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.081

基于绿色溶剂的天然产物提取技术研究进展

赵天明

(贵州理工学院制药工程学院, 贵州贵阳 550003)

摘要:介绍了超临界 CO₂、水、室温离子液体和低共熔溶剂、生物质基溶剂、天然油脂、定制合成的绿色溶剂和混合绿色溶剂 7 类基于绿色溶剂的提取方法及应用进展, 并对这些技术的优缺点及存在问题进行分析, 同时也指出天然产物提取产业的几个发展趋势。

关键词:天然产物; 绿色提取; 绿色溶剂; 超临界 CO₂; 生物基溶剂; 定制合成的绿色溶剂

中图分类号:TQ028 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0283-04

传统的天然产物提取技术具有能耗高、大量使用石化溶剂、污染环境和提取率低的特点。随着各国对环境问题的重视和人们对“绿色”“天然”产品需求的不断增加, 天然产物高效绿色提取技术越来越受到研究者的重视。与天然产物密切相关的制药、食品和化妆品产业都在寻求开发绿色高效的天然产物提取技术, 因而各类绿色提取方法不断涌现。2012 年, Chemat 等提出“天然产物绿色提取”的定义为“发现或设计提取工艺, 减少能耗, 使用可代替(或绿色)溶剂和可再生天然产物, 并得到安全高质量的提取物产品”, 从能耗、溶剂、提取原料和产物角度综合地对天然产物绿色提取过程进行阐释^[1]。因为绝大多数的提取技术都须要使用溶剂作为媒介, 溶剂及其相关提取技术的选择很大程度上决定了提取过程的能耗和提取产品的质量, 因此提取方法的“绿色”主要体现在“溶剂”上, 本研究主要从溶剂的角度对现有的基于绿色溶剂

的天然产物提取技术进行综述, 介绍与这些绿色溶剂相关的提取方法及最新应用进展。

1 基于绿色溶剂的天然产物提取技术

对于天然产物绿色提取技术, 主要利用场辅助技术达到高效提取的目的, 而“绿色”主要体现在提取溶剂的绿色化, 即在提取过程中使用绿色溶剂或可替代溶剂。常用的场辅助技术包括微波场(如微波辅助萃取)、超声场(如超声辅助萃取)、电场(如高压脉冲电场提取)、热场(如加热回流提取)和压力场(如超临界流体萃取)等, 这些场辅助技术目前都已有从实验室到产业化的设备。在提取过程中, 即可使用单一场辅助技术, 也可使用耦合场辅助技术来协同强化提取过程, 如超声强化超临界提取^[2]、超声微波协同萃取^[3]等。目前研究应用的绿色溶剂主要包括水、超临界 CO₂、生物质基溶剂、室温离子液体和低共熔溶剂、天然油脂和定制合成的绿色溶剂等。在天然产物提取过程中, 既可使用上述的单一绿色溶剂, 也可使用混合绿色溶剂。除了这些绿色溶剂, 无溶剂过程作为绿色化学的重要组成实际可看成是最好的“绿色溶剂”。

1.1 无溶剂提取法

在古代, 无溶剂提取法就已经应用在了天然产物的提取

植物药分册, 2006, 21(4): 152–155.

[2] 林志彬. 灵芝抗氧化清除自由基作用的研究[J]. 菌物研究, 2014, 12(2): 63–70.

[3] 赵明文, 王晨光, 鲍 鹏, 等. 不同灵芝菌株体中三萜与多糖含量的比较[J]. 中国食用菌, 2003, 22(2): 43–45.

[4] 谢丽源, 彭卫红, 黄忠乾, 等. 不同栽培基质灵芝与不同灵芝菌株活性差异及相关性分析[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 325–330.

[5] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. 食品工业科技, 2006, 2: 193–195.

[6] 温 鲁, 尹起范, 唐玉玲, 等. 蚕虫草与有关虫草活性成分检测比较[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 155–157.

[7] 陆震鸣, 陶文沂, 许泓瑜, 等. 樟芝菌粉三萜类化合物含量的测定[J]. 中成药, 2008, 30(3): 402–405.

[8] 张志军, 李淑芳, 魏雪生. 灵芝多糖清除自由基活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 167–170.

收稿日期: 2016–04–11

基金项目: 贵州省留学人员科技创新项目[编号: 黔人项目资助合同(2015)18 号]。

作者简介: 赵天明(1985—), 男, 博士, 研究方向为天然产物开发与利用。E-mail: zhaotm2003@163.com。

3 结论与讨论

本研究表明, 黑灵芝的多糖含量最高, 达 6.55 mg/g; 大红芝的甘露醇含量最高, 达 21.92 mg/g; 黑灵芝的总三萜含量最高, 达 170.53 mg/g; 在 1.0 mg/mL 浓度下, 赤芝、大红芝、黑灵芝、灵芝 902 清除 DPPH 自由基活性分别为 81.88%、80.92%、80.30%、76.38%。4 种灵芝菌株间的功能性成分多糖、甘露醇和总三萜含量及其抗氧化活性存在显著差异。4 种灵芝菌株的多糖清除 DPPH 自由基活性均随着浓度的增大而升高。灵芝多糖具有较强的抗氧化能力, 其抗氧化能力可能与其他成分如酚类、黄酮、活性物质共同作用产生, 需要进一步对其他活性物质进行测定分析。

参考文献:

[1] 张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·