

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2019.06.017

酸浸高压法破壁对灵芝孢子中三种主要成分变化影响的研究

吕思敏¹, 何小冰¹, 张丽婷¹, 丁鸿燕¹, 戚怡², 吴铁^{1,2}

(1. 广东医科大学 广东润和生物科技有限公司辅酶 Q10 联合研究中心, 广东 东莞 523808; 2. 广东医科大学, 广东 东莞 523808)

摘要: 研究酸浸高压法对未破壁灵芝孢子中灵芝多糖、灵芝总三萜和麦角固醇含量的影响, 与未经酸浸高压的未破壁及已破壁的灵芝孢子进行含量比较。以无水葡萄糖为对照品, 用紫外-可见分光光度法, 对灵芝孢子的灵芝多糖含量进行测定; 以齐墩果酸为对照品, 用紫外-可见分光光度法, 对灵芝孢子的灵芝总三萜含量进行测定; 以麦角固醇为对照品, 用反相高效液相色谱法, 对灵芝孢子的麦角固醇含量进行测定, 根据结果对三种成分含量进行比较。结果表明, 经酸浸高压的未破壁灵芝孢子, 其灵芝多糖的含量明显高于未经酸浸高压的未破壁及已破壁灵芝孢子, 其灵芝总三萜和麦角固醇的含量明显高于未经酸浸高压的未破壁灵芝孢子。酸浸高压法可作为一种新的灵芝孢子破壁方法, 该法获得的灵芝多糖、灵芝总三萜和麦角固醇的含量明显高于对照组。

关键词: 酸浸泡; 高压; 破壁; 灵芝孢子

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2019)06-0093-05

Study on the changes of three main components in ganoderma lucidum spores by acid leaching and high pressure method

LV Si-min¹, HE Xiao-bing¹, ZHANG Li-ting¹, DING Hong-yan¹, QI Yi², WU Tie^{1,2}

(1. Guangdong Medical University Guangdong Runhe Biological Technology Co., Ltd. Coenzyme Q10 Research Institute, Dongguan Guangdong 523808; 2. Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808)

Abstract: The effects of acid leaching high pressure method on the content of ganoderma lucidum polysaccharides, ganoderma lucidum total triterpenoids and ergosterol in unbroken ganoderma lucidum spores were compared with those of unbroken and broken ganoderma lucidum spores without being treated by acid leaching and high pressure. The content of ganoderma lucidum polysaccharides in ganoderma lucidum spores was determined by UV-visible spectrophotometry with anhydrous glucose as reference substance; the content of ganoderma lucidum total triterpenoids in ganoderma lucidum spores was determined by UV-visible spectrophotometry with oleanolic acid as reference substance; the content of ergosterol of Ganoderma lucidum spores was determined by reversed-phase high performance liquid chromatography with ergosterol as a reference substance, and the contents of the three components were compared according to the results. The results showed that for unbroken ganoderma lucidum spores treated

收稿日期: 2019-03-19

基金项目: 广东医科大学·广东润和生物科技有限公司共建辅酶 Q10 联合研究中心项目 (2XX14002)

作者简介: 吕思敏, 1988 年出生, 女, 硕士.

通讯作者: 吴铁, 1955 年出生, 男, 硕士, 教授.

by acid-leaching and high-pressure, its content of ganoderma lucidum polysaccharides was significantly higher than that of both unbroken and broken ganoderma lucidum spores without being treated by acid leaching and high-pressure, and the content of ganoderma lucidum total triterpenoids and ergosterol was significantly higher than that of unbroken ganoderma lucidum spores without being treated by acid leaching and high-pressure. The acid leaching high pressure method can be used as a new method for breaking the wall of ganoderma lucidum spores. The content of ganoderma lucidum polysaccharide, ganoderma lucidum total triterpenoids and ergosterol obtained by this method is significantly higher than that of the control group.

Key words: acid leaching; high pressure; wall-breaking; ganoderma lucidum spore

灵芝孢子是灵芝在生长成熟期,从灵芝菌褶中弹射出来,极其微小的卵形生殖细胞即灵芝的种子,具有灵芝的全部遗传物质和保健作用,其药用价值日益受到重视。研究发现^[1-2],灵芝孢子含有多种活性物质如多糖、三萜、有机锗、核苷、氨基酸、甾醇、微量元素硒等。多糖是最有效的成分之一,具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、提高免疫力和抗氧化的作用^[3]。灵芝三萜可提高机体免疫力,抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗 HIV,降血脂、降血糖,保肝等作用^[4-5],最近研究发现^[6],其具有补体,诱导 NADPH 的作用。麦角固醇在紫外线照射下,麦角固醇可转化为维生素 D2 前体,是生产黄体酮、氢化可的松、维生素 D2 等的主要原料^[7-9]。由于灵芝孢子具有双层细胞壁,导致其细胞壁坚韧,不易破解,使其中的有效成分难以被人体吸收利用,目前,国内外有关对灵芝孢子的破壁方法主要有生物法、化学法、物理法、机械法和综合法 5 种。其中,生物法需要时间较长,难以去除残留的酶液或微生物等;化学法中提取试剂易导致有效成分变性,且溶剂残留不易去除;物理法的能量消耗较大,且设备较为复杂、投资较大;机械法的机械投资大、运行成本较高,因此灵芝孢子破壁技术和方法绝大多数是同时或先后使用综合法,以增加灵芝孢子的破壁率。本实验采用盐酸浸泡未破壁的灵芝孢子,然后放进高压锅高压,降温后取出检测灵多糖、灵芝总三萜和灵芝麦角固醇的含量,与未经酸浸高压的未破壁灵芝孢子及已破壁的灵芝孢子进行对照。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

FR223CN 电子天平:奥豪斯仪器有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司;紫外-可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;水浴锅:上海爱明仪器有限公司;超声波清理器:上海科导超声仪器有限公司;离心机:上海安亭科学仪器厂制造;旋转蒸发仪:上海爱朗仪器有限公司。

1.1.2 试剂药品

齐墩果酸对照品:上海源叶生物科技有限公司;无水葡萄糖:上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖:上海源叶生物科技有限公司;麦角固醇:上海源叶生物科技有限公司;未破壁灵芝孢子:安徽金寨乔康药业有限公司;已破壁灵芝孢子:安徽金寨乔康药业有限公司;无水乙醇、氯仿、高氯酸、浓硫酸、浓盐酸均为分析纯,蒸馏水,硫酸蒽酮溶液(现配现用),6%苯酚(现配现用),5%香草醛-冰乙酸(现配现用)。

1.2 实验方法

1.2.1 灵芝孢子的前处理

1.2.1.1 酸浸高压灵芝孢子的处理 称取 40 g 未破壁灵芝孢子 2 份,分别加上 65 mL 的 1%盐酸(1%盐酸的配制为 2.35 mL 浓盐酸+97.65 mL 纯化水)浸泡 1 h,放进高压锅高压(约 30 min 升温至 121 ℃,在 121 ℃ 维持 30 min,约 2 h 降温至 65 ℃),高压降温后取出,得到 2 份酸浸高压灵芝孢子。把酸浸高压灵芝孢子置于 65 ℃ 烘箱

烘干至恒重,之后置于4℃冰箱保存。

1.2.1.2 实验前灵芝孢子的处理 于4℃冰箱取出酸浸高压灵芝孢子、未破壁灵芝孢子及已破壁灵芝孢子(机械法破壁),放入65℃烘箱烘干至恒重,然后进行实验。

1.2.2 灵芝多糖的提取

1.2.2.1 对照品溶液的制备 取适量无水葡萄糖对照品,精密称量,加水制成0.12 mg/mL的溶液。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 取1 g上述灵芝孢子各两份,精密称量,置于圆底烧瓶中,加水30 mL,静置1 h,在(95±2)℃下加热回流4 h,趁热过滤,用少量热水洗涤滤器和滤渣,将滤渣及滤纸置烧瓶中,加水30 mL,加热回流3 h,趁热过滤,合并滤液,90℃旋蒸至干,残渣用水2.5 mL溶解,边搅拌边缓慢滴加乙醇37.5 mL,摇匀,在4℃下放置12 h,3 000 r/min离心10 min,弃去上清液,沉淀物用热水溶解,转移至25 mL量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,取溶液适量,3 000 r/min离心10 min,精密量取上清液适量,加水至2 mL,摇匀,即得供试品溶液。

1.2.3 灵芝总三萜的提取

1.2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取95%干燥2 h的齐墩果酸对照品10.0 mg,用无水乙醇溶解,移入容量瓶中,定容至100 mL,作为标准品储备液(0.1 mg/mL)保存于4℃冰箱中。

1.2.3.2 供试品溶液的制备 取0.2 g上述灵芝孢子各两份,准确至1 mg。置于150 mL圆底烧瓶中,加入30 mL氯仿。在(60±1)℃水浴中,回流2 h,常压过滤,滤渣加入30 mL氯仿,再于(60±1)℃水浴中,回流1 h,常压过滤。合并滤液,在30℃水浴蒸干。加入无水乙醇约40 mL,在70℃水浴中加热,并摇动至其完全溶解。冷却至室温后,用无水乙醇定容至相应刻度,得待测液。

1.2.4 灵芝麦角固醇的提取

1.2.4.1 液相条件 Agilent 1200 高效液相色谱仪;色谱柱 Eclipse Plus C18(4.6×250 mm,5 mm);流动相:V(乙腈):V(无水乙醇)为60:40;流速:1.0 mL/min,柱温30℃,波长:284 nm,进样量:20 μL,检测时间:30 min。

1.2.4.2 对照品溶液的制备 称取20 mg麦角固醇至25 mL容量瓶中,加入10 mL无水乙醇,超声5 min,放冷后加入无水乙醇定容,为麦角固醇母液(800 μg/mL)。

1.2.4.3 供试品溶液的制备 取1 g上述灵芝孢子各两份于100 mL圆底烧瓶中,加上30 mL无水乙醇,于80℃下回流70 min,然后抽滤,用2 mL无水乙醇洗涤残渣3次;取滤液于60℃下旋蒸至干,待冷却后加入2 mL无水乙醇溶解,超声10 s,超声时圆底烧瓶360°旋转,转移至10 mL容量瓶中,再加入4 mL无水乙醇溶解(2次),均转入10 mL容量瓶中,定容至刻度,摇匀;测前用0.22 μm滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 灵芝多糖的测定

2.1.1 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL,分别置10 mL具塞试管中,各稀释至2.0 mL,迅速精密加入硫酸蒽酮溶液(精密称取蒽酮0.1 g,加硫酸100 mL使溶解,摇匀)6 mL,立即摇匀,放置15 min后,立即置冰浴中冷却15 min,取出,以相应的试剂为空白同步显色操作,按照紫外-可见分光光度法,在625 nm波长处测定吸光度,以吸光度 y 为纵坐标,浓度 x 为横坐标,绘制标准曲线。求得回归方程为 $y=7.8016x-0.039$, $R^2=0.9975$,灵芝多糖线性范围为:0.012~0.096 mg/mL。

2.1.2 灵芝多糖的含量测定

精密量取上述供试品溶液2 mL,置10 mL EP管中,照标准曲线的制备项下的方法操作,然后计算含量。结果见表1。从表中结果可知,酸浸高压灵芝孢子、未破壁灵芝孢子及已破壁灵芝孢子的灵芝多糖平均含量分别为5.42%、0.67%、1.37%,酸浸高压灵芝孢子的灵芝多糖平均含量为未破壁灵芝孢子多糖平均含量的8倍,为已破壁灵芝孢子多糖平均含量4倍。按照药典方法检测,含灵芝多糖以无水葡萄糖计算,不得少于0.90%,则酸浸高压灵芝孢子和已破壁灵芝孢子符合要求。

表 1 灵芝多糖的含量测定

样品编号	重量/g	定容体积/mL	取样体积/mL	吸光度/A	回归浓度/(mg/mL)	含量/%	平均含量/%
1	1	25	0.05	0.386	0.054	5.45	5.42
2	1	25	0.05	0.382	0.054	5.40	0.04
3	1	25	0.2	0.164	0.026	0.65	0.67
4	1	25	0.2	0.178	0.028	0.70	0.03
5	1	25	0.2	0.422	0.059	1.48	1.37
6	1	25	0.2	0.355	0.051	1.26	0.15

注：样品编号 1、2 为酸浸高压灵芝孢子，样品编号 3、4 为未破壁灵芝孢子；样品编号 5、6 为已破壁灵芝孢子

2.2 灵芝总三萜的测定

2.2.1 标准曲线的制备

取标准品储备液 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 mL 置于 10 mL EP 管中，常压水浴蒸干溶剂（98~100 ℃）。加入新配置的 5%香草醛-冰乙酸溶液 0.20 mL 和高氯酸 0.80 mL，摇匀。在 70 ℃水浴加热 15 min，取出，冰水冷却 5 min，用自来水浴调至室温。用移液管准确移取冰乙酸 5.00 mL 稀释，摇匀。以试剂空白做参比，在 30 min 内用紫外可见分光光度计在 545 nm 处测吸光度值。以吸光度为纵坐标 y，以三萜含量为横坐标，绘制标准曲线，求出直线回归方程并计算相关系数。求得回归方程为 $y=8.2886x-0.040$ ， $R^2=0.996$ ，灵

芝总三萜线性范围为 0.01~0.12mg。

2.2.2 灵芝总三萜含量测定

吸取适量待测液，于 10 mL EP 管中，常压水浴蒸干溶剂。照标准曲线的制备项下的方法操作，然后计算含量。结果见表 2。从表中结果可知，酸浸高压灵芝孢子、未破壁灵芝孢子及已破壁灵芝孢子的灵芝总三萜平均含量分别为 2.799%（g/g）、0.591%（g/g）、6.424%（g/g），酸浸高压灵芝孢子的灵芝总三萜平均含量为未破壁灵芝孢子总三萜平均含量的 5 倍。按照安徽省地方标准检测，灵芝总三萜/(%)为孢子粉不得少于 2.0，则酸浸高压灵芝孢子和已破壁灵芝孢子符合要求。

表 2 灵芝总三萜的含量测定

试样编号	重量/g	定容体积/mL	取样量/mL	吸光度/A	回归含量/mg	含量/(g/100 g)	平均含量/(g/100 g)
1	0.2	100	1	0.438	0.058	2.883	2.799
2	0.2	100	1	0.410	0.054	2.715	0.119
3	0.2	50	1	0.139	0.022	0.540	0.591
4	0.2	50	1	0.173	0.026	0.642	0.072
5	0.2	200	1	0.486	0.063	6.346	6.424
6	0.2	200	1	0.499	0.065	6.503	0.111

注：试样编号 1、2 为酸浸高压灵芝孢子，试样编号 3、4 为未破壁灵芝孢子；试样编号 5、6 为已破壁灵芝孢子

2.3 灵芝麦角固醇的测定

2.3.1 标准曲线的制备

取麦角固醇母液稀释为 50 μg/mL 的标品溶液，按浓度梯度稀释至 0.390 6 μg/mL 的标品溶液。分别取上述标品溶液，低浓度到高浓度依次进样，以麦角固醇浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，做回归曲线。求得回归曲线为： $y=22.395x+2.713$ ， $R^2=1$ ，线性范围为：0.390 6~50 μg/mL。

2.3.2 灵芝麦角固醇的含量测定

按色谱条件进样，求得麦角固醇的浓度，然后计算含量。结果见表 3。从表中结果可知，酸

浸高压灵芝孢子、未破壁灵芝孢子及已破壁灵芝孢子的灵芝麦角固醇平均含量分别为 0.115、0.003、0.349 mg/g，酸浸高压灵芝孢子的灵芝麦角固醇平均含量为未破壁灵芝孢子麦角固醇平均含量的 38 倍。

用盐酸浸泡是利用无机或有机酸、碱等破坏灵芝孢子细胞壁中几丁质、纤维素等成分的结构，使其有效成分易于溶出；盐酸浸泡后高压是利用高压均质机的撞击、剪切、空化、湍流等作用，将物料“研磨”成微小的颗粒，达到均质化的效果；然后利用“相似相溶”原理，采用溶剂提取

表3 灵芝麦角固醇的含量测定

编号	取样量/g	定容体积/mL	峰面积/mAU	回归浓度/($\mu\text{g/mL}$)	含量/(mg/g)	平均含量/(mg/g)
1	1	10	258.208	11.409	0.114	0.115
2	1	10	260.603	11.515	0.115	0.001
3	1	10	9.174	0.289	0.003	0.003
4	1	10	9.364	0.297	0.003	0.000
5	1	10	774.527	34.464	0.345	0.349
6	1	10	793.155	33.295	0.353	0.006

注：编号1、2为酸浸高压灵芝孢子，编号3、4为未破壁灵芝孢子；编号5、6为已破壁灵芝孢子

法使灵芝孢子在溶剂中长时间浸泡或回流，从而使有效成分扩散到溶剂中，从而达到提高灵芝多糖、灵芝总三萜和麦角固醇的含量。灵芝孢子十分微小，且细胞壁十分坚韧，单独使用一种破壁方法作用难以快速、彻底的破坏灵芝孢子壁，因此，联合运用多种方法对灵芝孢子进行破壁，以增加灵芝孢子的破壁率^[10]。

3 结论

经酸浸高压法得到的灵芝孢子，其灵芝多糖的含量明显高于未破壁及已破壁的灵芝孢子，其灵芝总三萜和麦角固醇的含量明显高于未破壁的灵芝孢子。酸浸高压法可作为灵芝孢子的一种破壁方法，为加大对灵芝孢子破壁技术的深入研究，找到高效、经济、合理的破壁方法，使灵芝孢子的有效成分和药用价值达到最大化的利用而提供基础。

参考文献：

[1] 丁霄霄, 李凤伟, 余晓红. 响应面法优化复合酶提取灵芝总三萜工艺[J]. 食品工业, 2018, 39(8): 40-44.

- [2] 王朝川. 灵芝成分及功能的研究现状[J]. 中国果菜, 2018, 38(8): 45-47.
- [3] 贾少杰, 解修超, 邓百万, 等. 微波辅助法提取灵芝多糖工艺的优化及抑菌活性[J]. 北方园艺, 2018(18): 118-125.
- [4] 李康, 娜银, 王兴亚. 灵芝破壁孢子粉总三萜提取工艺优化及体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1219-1224.
- [5] 邹玉莲, 甘陈灵, 李鹏. 灵芝多糖现代药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(8): 28-30.
- [6] 梁磊, 黄清铨, 王庆福, 等. 响应面优化微波-超声波协同提取灵芝三萜工艺及其清除自由基活性[J]. 菌物学报, 2017, 36(4): 512-521.
- [7] 刘国杰. CO₂超临界萃取深层发酵灵芝真菌菌丝体中麦角固醇的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1346-1348.
- [8] 孙金旭, 魏连秋, 朱会霞. 灵芝深层发酵中麦角甾醇含量的测定[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2267-2270.
- [9] 朱会霞. 不同培养方式对灵芝中麦角固醇产量的影响研究[J]. 北方园艺, 2014(4): 127-129.
- [10] 杨杭, 刘凤, 练心洁, 等. 灵芝孢子的破壁方法及其药理作用研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 364-368. ㊟

广告

欢迎订阅 2020 年《中国粮油学报》

《中国粮油学报》是中国科学技术协会主管、中国粮油学会主办的全国食品工业类中文核心期刊。主要刊载谷物、油脂化学、工艺学等方面的研究成果。栏目包括：稻谷、小麦、玉米、大豆、杂粮、淀粉、蛋白、油脂、饲料、储藏、加工工艺、粮物流、信息自动化、标准与检测方法及综述。

《中国粮油学报》是国内外公开发行的一级刊物，邮发代号：80-720，国内统一连续出版物号：CN 11-2864/TS，国际标准连续出版物号：ISSN 1003-0174。月刊，每月25日出版，铜版印刷，大16开146页，每期定价69.00元，全年定价828.00元（含平刷邮费）。

地址：北京市西城区百万庄大街11号粮科大厦（100037）

银行汇款开户行：交通银行北京百万庄支行

户名：中国粮油学会

账号：110060774018010013416

电话：010-68357510 010-68357810

网址：www.lyxuebao.net

E-mail: lyxb@ccoaoonline.com

《中国粮油学报》微信服务号：可搜索“中国粮油学报”或“lyxuebao”关注。欢迎投稿，欢迎订阅！

