

灵芝深层发酵中麦角甾醇含量的测定

孙金旭, 魏连秋, 朱会霞
(衡水学院, 河北衡水 053000)

摘要: 利用HPLC法研究了灵芝真菌发酵过程中胞内外麦角固醇的含量, 经紫外全波长扫描, 确定测定波长为282 nm, 研究表明: 此方法测定麦角固醇含量最大标准偏差为0.92%, 得到线性回归方程为 $y=28685x-382.61$ ($R=0.9998$), 该回归方程在20~500 μg 的范围内。精密试验, 灵芝真菌发酵胞内外麦角固醇含量RSD分别为0.40%和1.96%, 说明此试验设计条件精密良好, 经加标后, 麦角固醇的回收率在96.82~102.50%之间, 表明此方法用于测定灵芝真菌发酵过程中麦角固醇含量准确、可行, 经测定灵芝真菌发酵至120 h, 麦角固醇含量增至最高, 胞内含量达到0.64 mg/g, 胞外含量达到0.07 mg/mL。

关键词: 灵芝; 麦角固醇; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2013)9-2267-2270

Determination of Ergosterol by HPLC in the Fermentation of *Ganoderma lucidum*

SUN Jin-xu, WEI Lian-qiu, ZHU Hui-xia
(Heng shui College, Heng shui 053000, China)

Abstract: The ergosterol content in fermentation of *Ganoderma lucidum* was determined by HPLC at 282 nm. The results showed that the maximum standard deviation was 0.92% and the linear regression equation $y=28685x-382.61$ ($R=0.9998$) in the range of 20~500 μg . The precision test showed that *Ganoderma lucidum* extracellular and intracellular ergosterol content of RSD were 0.40% and 1.96%, respectively. The spike recoveries for ergosterol were between 96.82 and 102.50%. The method was feasibility and accurate for determination of ergosterol content in fermentation of *Ganoderma lucidum*. The ergosterol content of *Ganoderma lucidum* extracellular and intracellular were 0.07 mg/mL and 0.64mg/g, respectively, after fermentation for 120 h.

Key words: *Ganoderma lucidum*; ergosterol; HPLC

灵芝(*Ganoderma lucidum*), 担子菌纲、多孔菌科、灵芝属真菌赤芝和紫芝的总称。经研究灵芝的主要成分为多糖、三萜、有机酸、麦角固醇等。动物药理表明, 灵芝对神经系统有抑制作用, 循环系统有降压和加强心脏收缩力的作用, 对呼吸系统有祛痰作用, 此外, 还有护肝、提高免疫功能, 抗菌等作用。主治虚劳、咳嗽、气喘、失眠、消化不良, 恶性肿瘤等作用[1~3]。

灵芝中麦角固醇含量较高, 一般麦角固醇在灵芝中的含量可达到0.2%以上, 紫外线照射下, 麦角固醇可转化为 VD_2 前体, 是生产黄体酮、氢化可的松、 VD_2 等的主要原料, 市场需求较大[4~5], 本研究建立了HPLC法测定灵芝真菌发酵过程中麦角固醇含量的测

定方法, 以为灵芝真菌发酵生产麦角固醇的控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

灵芝真菌(*Ganoderma Lucidum*)(本实验室保藏)麦角甾醇标准品(购于国家标准物质网纯度 $\geq 98.5\%$)。

1.2 主要仪器

高效液相色谱, Agilent1100 美国; 旋蒸仪, 型号: EV311, 莱伯泰科有限公司; 电子天平, 上海田宫称重制造有限公司; 10 L 发酵罐, 中国丽, 上海高机生物有限公司; 分光光度计 UV-250 日本岛津。

1.3 方法

收稿日期: 2013-02-21

基金项目: 衡水学院教改课题项目(jg2012061)

作者简介: 孙金旭(1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程、食品等方面的研究

1.3.1 色谱测定条件^[6-7]

色谱柱 安捷伦 C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (色谱级) 流速 1.2 mL/min, 检测波长待定, 柱温 30℃, 进样量 10 μL

1.3.2 麦角甾醇标准品处理

精确称取麦角甾醇标准品 10 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 无水乙醇定容, 摇匀既得。

1.3.3 灵芝真菌深层培养条件^[8]

A 培养基

斜面培养基: 马铃薯 200.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.5 g/L、KH₂PO₄ 3.0 g/L、VB₁ 0.01 g/L、琼脂 20.0 g/L、20% 的土豆汁配制。

种子培养基: 葡萄糖 30.0 g/L、黄豆粉 10.0 g/L、酵母膏 1.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、KH₂PO₄ 1.0 g/L、VB₁ 0.01 g/L、pH 6.0, 蒸馏水配制。

发酵培养基: 碳源为葡萄糖 3.6%、氮源为蛋白胨 0.4%、pH 6.0、酵母膏 0.2%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、VB₁ 0.005%。

B 培养方法

种子液的培养: 从 28℃ 培养 6 d 的斜面上用接种钩切 1 cm² 带培养基的菌体转入装有 150 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 28℃、150 r/min 培养 3 d。

发酵培养: 将种子以 10% 的接种量, 接入装有 70% 的 10 L 发酵罐中, 转速 100 r/min, 通气量 2.5 L/min, 28℃ 培养 6 d。

1.3.4 灵芝发酵样品处理方法

A 灵芝真菌菌丝体处理

取一定量灵芝发酵液, 3000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 水洗菌体、再离心, 至上清液不带发酵液颜色为止, 收集菌体, 在 60℃ 恒温烘箱中烘干至恒重, 在干燥器中冷却至常温, 称量, 捣碎后, 精确称量 1 g 样品于 500 mL 三角瓶中, 添加 20 mL 甲醇溶液, 超声提取 1 h, 待静止后取上清液, 0.45 μm 滤膜过滤后, 量取体积, 4℃ 保藏待用。

B 灵芝真菌发酵液处理

取一定量灵芝发酵液, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 量取体积, 真空旋蒸 (温度 35℃) 至干, 无水乙醇溶解, 0.45 μm 滤膜过滤后, 量取体积, 4℃ 保藏待用。

1.3.5 回收率计算

回收率计算公式如下:

$$A = \frac{W + Z - E}{W + Z} \times 100\%$$

注: A: 回收率; W: 原灵芝真菌发酵中麦角甾醇含量

mg; Z: 加标量 mg; E: 加标后测定混合液中麦角甾醇含量 mg。

2 结果与讨论

2.1 全波长扫描图

为确定灵芝发酵液中麦角甾醇的高效液相色谱测定波长, 以麦角甾醇标准品为测定样品, 紫外分光光度法进行其在 200~500 nm 下的全波长扫描, 扫描结果如图 1 所示。

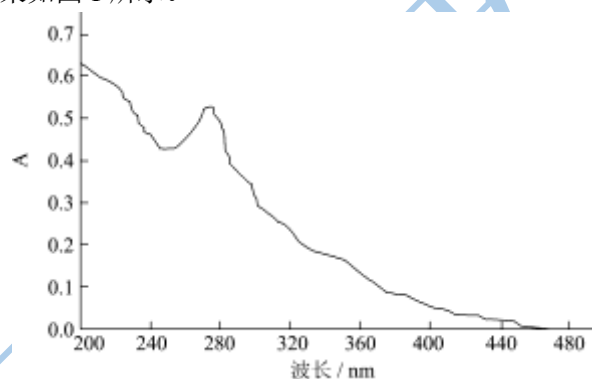


图 1 麦角甾醇紫外全波长扫描结果

Fig.1 Full wavelength scanning of ergosterol

如图 1 所示, 麦角甾醇标准品在 200~500 nm 下紫外扫描后, 在 282 nm 处有唯一最大吸收峰, 表明麦角甾醇紫外测定的最适波长为 282 nm。

2.2 标准品液相色谱图

麦角甾醇标准品 HPLC 测定条件为: 色谱柱 安捷伦 C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (色谱级) 流速 1.2 mL/min, 检测波长 282 nm, 柱温 30℃, 进样量 10 μL, 此条件下麦角甾醇标准品的测定结果如图 2 所示。

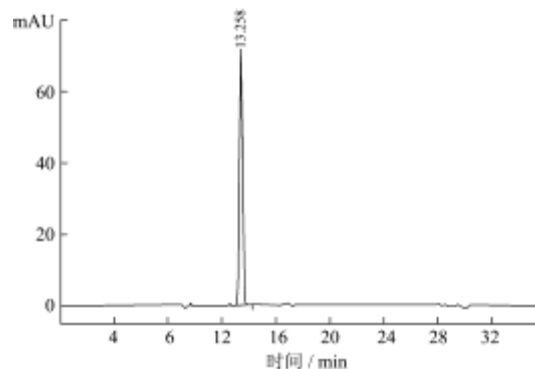


图 2 麦角甾醇标准品 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram for ergosterol standard

由图 2 可知, 麦角甾醇标准品在设定的测定条件下, 在 13.258 min 处有单一峰, 表明该测定条件适宜

于麦角甾醇的测定。

2.3 标准曲线制备及线性范围考察

准确称取一定量的麦角甾醇标准品，转入 50 mL 容量瓶中，无水乙醇定容，待用，以此为基液，分别配置成 0.04 mg/mL、0.08 mg/mL、0.12 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL，此 5 份标准液在上述色谱条件下进样测定，以峰面积为纵坐标，以麦角甾醇浓度为横坐标进行回归，得到线性回归方程为 $y=28685x-382.61$ ($R=0.9998$)，该回归方程在 20~500 μg 的范围内，线性关系良好。

2.4 重复性试验

精密称取同一份经处理后麦角甾醇标准品，均匀的分为 5 份，经 HPLC 测定其中麦角甾醇含量，计算平均值及 RSD 值，结果如表 3 所示。

表 3 重复性试验

Table 3 Result of repetitive test

| 进样次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 平均值 | RSD/% |
|----------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 麦角甾醇含量/(mg/mL) | 0.43 | 0.43 | 0.42 | 0.43 | 0.43 | 0.43 | 0.92 |

同一份麦角甾醇标准品分 5 次进样后，其 RSD 值为 0.92%，表明该方法的重复性均达到分析的要求。

2.5 精密度试验

分别取灵芝真菌胞内外发酵液产物，经处理后，分别装于 5 个样品测定瓶内，经微孔过滤膜过滤后，重复测定 5 次，取其峰面积值，计算麦角甾醇含量，结果如表 4 所示。

表 4 精密度试验

Table 4 The accuracy tests

| 进样次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | RSD/% |
|------------|------|------|------|------|------|-------|
| 胞内/(mg/g) | 0.63 | 0.64 | 0.63 | 0.64 | 0.65 | 0.40 |
| 胞外/(mg/mL) | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 1.96 |

由表 4 可知，根据 5 次测定时的出峰面积计算得出灵芝真菌发酵胞内外麦角甾醇含量 RSD 分别为 0.40% 和 1.96%，说明此试验设计条件精密度良好。

2.6 回收率试验

取灵芝真菌发酵液处理后，菌体和发酵液平均分成 3 份，经处理后，分别测定麦角甾醇含量，分别取麦角甾醇标准品配置成不同浓度，添加入处理液中，经过滤膜过滤后分别测定麦角甾醇含量，计算回收率，结果如表 5 所示。

由表 5 可知，经加标后，麦角甾醇的回收率在

96.82~102.50% 之间，表明回收良好，此方法适宜于灵芝真菌中麦角甾醇含量的测定。

表 5 回收率试验

Table 5 Recovery rates

| 名称 | 1 | 2 | 3 |
|-------------------|-------|--------|-------|
| 样品麦角甾醇含量/(mg/mL) | 0.16 | 0.16 | 0.16 |
| 胞内 加标量/(mg/mL) | 0.10 | 0.20 | 0.30 |
| 混合样麦角甾醇含量/(mg/mL) | 0.26 | 0.37 | 0.45 |
| 回收率/% | 98.63 | 102.50 | 97.26 |
| 样品麦角甾醇含量/(mg/mL) | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 胞外 加标量/(mg/mL) | 0.01 | 0.02 | 0.03 |
| 混合样麦角甾醇含量/(mg/mL) | 0.02 | 0.03 | 0.04 |
| 回收率/% | 96.82 | 101.31 | 96.89 |

2.7 灵芝发酵胞内外麦角甾醇液相色谱图

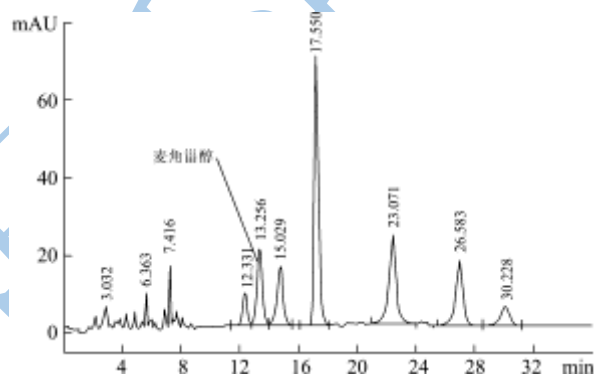


图 3 灵芝真菌胞内麦角甾醇 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of intracellular ergosterol of *Ganoderma lucidum*

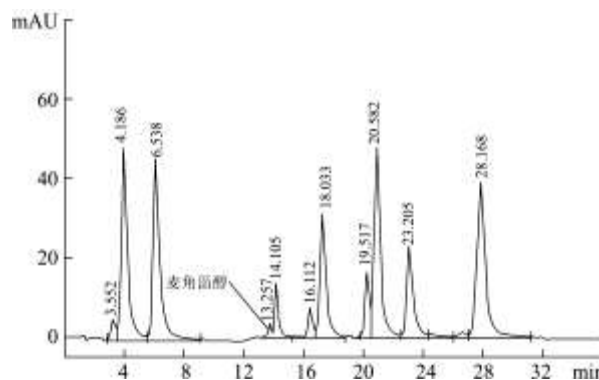


图 4 灵芝真菌胞外麦角甾醇 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram for extracellular ergosterol of *Ganoderma lucidum*

根据设定的 HPLC 色谱条件，对经处理后的灵芝真菌发酵液进样测定，结果如图 3、4 所示。

由图 3、4 可知，在设定的色谱条件下，色谱峰之间的分离效果较好，和麦角甾醇标准品出峰时间相比，灵芝真菌胞内外处理样品之间在相应的位置都有单一峰出现，说明该方法能够成功的将灵芝真菌胞内外的

成分分开, 该液相色谱条件适宜于灵芝真菌中的麦角固醇含量的测定分析。

2.8 灵芝真菌深层发酵过程中麦角固醇含量

变化测定

灵芝真菌深层发酵过程中, 灵芝真菌胞内外麦角固醇含量变化情况如图5所示。

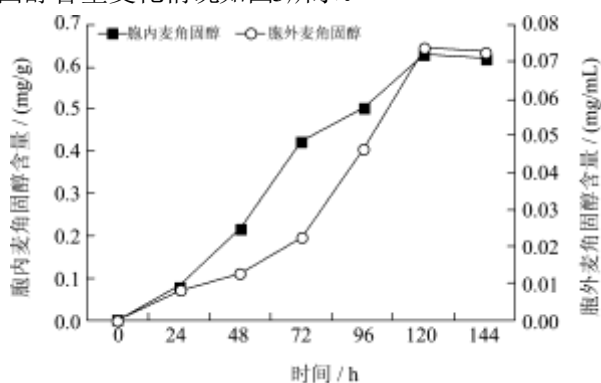


图5 灵芝真菌发酵过程中麦角固醇含量测定结果

Fig.5 The ergosterol content in the fermentation of *Ganoderma lucidum*

由图5可知, 随发酵时间的延长, 菌体量的增加, 麦角固醇胞内外含量不断增加, 发酵至120 h时, 麦角固醇含量增至最高, 胞内含量达到0.64 mg/g, 胞外含量达到0.07 mg/mL, 之后随发酵时间的延长, 灵芝真菌胞内外麦角固醇含量不断降低。灵芝真菌发酵过程中, 胞内外麦角固醇含量的变化规律与灵芝真菌菌体产量呈正相关。

3 结论

本实验采用高效液相色谱法测定灵芝真菌发酵过程中胞内外麦角固醇含量, 经过精密度实验、重复性实验、回收率实验验证, 该方法均符合测定要求, 该方法具有快速、灵敏、准确的特点, 适用于灵芝真菌发酵过程中麦角固醇含量的测定, 经测定, 灵芝真菌发酵至120 h, 麦角固醇含量增至最高, 胞内含量达到0.64 mg/g, 胞外含量达到0.07 mg/mL。

参考文献

- [1] 翟旭峰, 胡明华, 冯梦莹, 等. 超声提取灵芝多糖的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1704-1707
- [2] 黄生权, 姚松君, 刘翠玲. 不同生长期的灵芝三萜含量测定及变化规律研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 1015-1018
- [3] 冯敏. 东方神奇仙草: 现代科学论灵芝[M]. 北京: 科学出版社, 2005
- [4] 张萱. 灵芝活性成分的提取工艺及抗肿瘤成分的研究[D]. 天津: 天津大学, 2006
- [5] Yasuharu Y, Masami Y, Kiyoshi S. Antitumor Promoting Effect of an Active Component of Polyporus Ergosterol and Related Compounds on Rat Urinary Bladder Carcinogenesis in a Short-Term Test with Concanavalin A [J]. Biol. Pharm. Bull. 2000, 23(11): 1298
- [6] 邓玉清, 王纪, 虞龙. 微生物麦角甾醇的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 45
- [7] 张方英, 方保梅, 张静. 灵芝制品中麦角甾醇的检测方法[J]. 江苏农学院学报, 1997, 19: 22
- [8] 朱会霞, 孙金旭. 灵芝真菌摇瓶发酵条件优化研究[J]. 中国酿造, 2008, 198(21): 30-33