

泰山赤灵芝中灵芝酸和灵芝酸 A 的测定

王文正, 李腾, 李霞* (山东省农业科学院质量标准研究所, 山东济南 250100)

摘要 [目的]研究泰山赤灵芝中灵芝酸的检测方法并应用该方法测定灵芝酸 A 的含量。[方法]利用反相高效液相色谱和电喷雾质谱联用技术,通过研究已知的灵芝酸化合物的相对分子质量及结构特征,鉴定泰山赤灵芝中生物碱提取物中的灵芝酸类化合物,并通过灵芝酸 A 标准品的标准曲线测定其中灵芝酸 A 的含量。[结果]在泰山赤灵芝样本中检测到灵芝酸 A、A₁、B、C₁、R、beta、delta、epsilon、gamma、zeta,灵芝酸 A 的含量为 115.4 μg/g。[结论]泰山赤灵芝含有较高的灵芝酸,液质联用仪对泰山赤灵芝天然产物结构的分析以及含量测定准确可靠。

关键词 泰山赤灵芝;灵芝酸;灵芝酸 A;液质联用仪;含量测定

中图分类号 S567.3⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0123-03

Measure of Ganoderma Lucidum Acid and Ganoderma Lucidum Acid A in Taishan *Ganoderma Lucidum*

WANG Wen-zheng, LI Teng, LI Xia* (Institute of Quality Standard, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100)

Abstract [Objective] The research aimed to study detection method of ganoderma lucidum acid in Taishan *Ganoderma lucidum* and application of the method for determining the content of ganoderma lucidum acid A. [Method] Using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization mass spectrometry technology, through the study of ganoderma lucidum acid known compounds and the relative molecular mass of the structure characteristics, identification of ganoderma lucidum acid compounds of Taishan *Ganoderma lucidum* alkaloids in the extracts, and to determining the content of ganoderma lucidum acid A through the standard curve of the standard of ganoderma lucidum acid A. [Result] We detected ganoderma lucidum acid A, A₁, B, C₁, R, beta, delta, epsilon, gamma, zeta in Taishan *Ganoderma lucidum* samples, ganoderma lucidum acid A content of 115.4 μg/g. [Conclusion] It contents high level ganoderma lucidum acid in Taishan *Ganoderma lucidum*, liquid chromatograph/mass spectrometer (LC/MS) of Taishan *Ganoderma lucidum* natural product structure analysis and content determination is accurate and reliable.

Key words Taishan *Ganoderma lucidum*; Ganoderma lucidum acid; Ganoderma lucidum acid A; Liquid mass combination; Content determination

灵芝为《中华人民共和国药典》收录的常用中药。赤灵芝作为中药灵芝的主流品种,具有提高机体免疫功能、改善血液循环、提高心脑血管供血供氧能力、提高细胞和组织生理功能以及安神、解惊、解毒等功效^[1-3]。灵芝有效成分包括灵芝多糖、灵芝酸、腺苷、赤芝孢子内酯 A、赤芝孢子酸 A、灵芝碱甲、灵芝碱乙、油酸、灵芝总碱、薄醇醚、灵芝纤维素等。灵芝中的很多三萜类化合物即灵芝酸具有生理活性,如 ganoderic acid A、B、C 和 D 能够抑制小鼠肌肉细胞组胺的释放, ganoderic acid F 有很强的抑制血管紧张素酶的活性,赤芝孢子酸 A 对 CCl₄ 和半乳糖胺及丙酸杆菌造成的小鼠转氨酶升高均有降低作用,赤芝孢子内酯 A 具有降低胆固醇作用^[4-5]。因此对灵芝酸的进一步深入研究将有利于灵芝有效成分的寻找和进一步阐明其生理活性。

一般用于药物化学成分的研究技术包括红外、紫外、质谱和核磁共振等。近年来,由于高效液相色谱与质谱联用(LC/MS)技术的出现,LC/MS 已成为现代分析手段中必不可少的组成部分。液质联用技术将色谱的高分离性能和质谱的高鉴别特点相结合,组成了较完美的现代分析技术。在药物的含量测定、药物动力学研究的代谢物分析等试验中成为重要的分析手段^[6-10]。该试验借助 LC/MS 技术进一步对泰山赤灵芝的有效成分进行分析,并测定其中灵芝酸 A 的含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 美国 Waters Alliance 2695 HPLC, ZQ 电喷雾质谱仪,索氏提取器。甲醇为色谱纯,无水乙醇为分析纯,水为双蒸水,泰山赤灵芝、标准品灵芝酸 A 由泰山赤灵芝开发公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 标准品储备液的制备。精密称取标准品,用甲醇配制成 1.5 g/L 的标准溶液,冷藏备用。

1.2.2 供试品溶液的制备。均匀称取泰山赤灵芝样品粉末(过 40 目筛)40.3 g,于索氏提取器中,以 400 mL 无水乙醇提取 24 h,得提取液 286 mL,以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,作为供试液。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件。采用 Waters Symmetry shield RP18 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm);进样体积 10 μL;流动相由甲醇(含 0.1% 甲酸)和水(含 0.1% 甲酸)组成,流速 0.2 mL/min;梯度洗脱程序为:0 ~ 20 min 甲醇由 5% 线性增至 100% (体积百分数);20 ~ 25 min 用 100% 甲醇洗脱。

1.3.2 电喷雾(ESI)条件。离子源温度 120 °C,脱溶剂温度 200 °C,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 60 V,萃取电压 2.5 V,聚焦透镜电压 0.5 V,锥孔气体流速 42 L/h,脱溶剂流速 311 L/h。

1.3.3 质谱(MS)分析条件。检测负离子(ES⁻),离子电压 1.0 V,光电倍增器电压 650 V,分析室真空度 2.6e⁻⁵。

1.3.4 紫外检测。在质谱检测的同时,采用二极管阵列(PDA)220 ~ 350 nm 紫外检测器分析样品,进行紫外检测。

基金项目 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2017A03)。
作者简介 王文正(1965—),女,山东菏泽人,研究员,从事农产品质量安全检测工作。*通讯作者,副研究员,博士,从事农产品质量安全检测工作。

收稿日期 2017-09-30

1.4 标准曲线 取“1.2.1”标准品灵芝酸 A 储备液,用甲醇逐级稀释,配制成灵芝酸 A 标准系列使用液,灵芝酸 A 的浓度分别为 0、7.5、15.0、30.0、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由标准品的浓度和其相应峰面积绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 不同种类灵芝酸的测定 根据灵芝酸的基本结构图(图 1),得出目前主要的灵芝酸化合物中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 不同取代基的官能团结构以及各种灵芝酸活性成分的化学式、分子量(表 1)。

泰山赤灵芝粉末处理后的供试液,用液质联用仪测定,得到灵芝酸的选择离子图(图 2)。根据表 1 中已知的灵芝

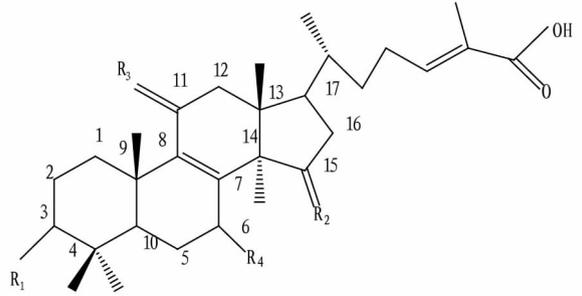


图 1 灵芝酸的基本结构

Fig. 1 The basic structure of *Ganoderma lucidum* acid

表 1 目前已知的主要的灵芝酸化合物的结构信息

Table 1 Structure information of the major known *Ganoderma lucidum* acid compounds currently

化合物 Compound	分子量 Molecular weight	化学式 Chemical formula	取代基 Substituent group			
			R_1	R_2	R_3	R_4
Ganoderic acid R	553.757 2	$C_{34}H_{50}O_6$	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$		
Ganoderic acid A_1	517.682 0	$C_{30}H_{46}O_7$	O	CH_2OH CH_3	O	OH CH_3
Ganoderic acid B	515.666 1	$C_{30}H_{44}O_7$	OH	O	O	OH
Ganoderic acid A	515.666 1	$C_{30}H_{44}O_7$	O	OH	O	OH
Ganoderic acid delta	515.666 1	$C_{30}H_{44}O_7$	O	$\alpha-OH$	O	OH
Ganoderic acid gamma	515.666 1	$C_{30}H_{44}O_7$	O	$\beta-OH$	O	OH
Ganoderic acid epsilon	515.666 1	$C_{30}H_{44}O_7$	OH	O	O	OH
Ganoderic acid C_1	513.650 2	$C_{30}H_{42}O_7$	OH			
Ganoderic acid beta	513.693 3	$C_{31}H_{46}O_6$	OH	O	O	OH
Ganoderic acid zeta	513.650 2	$C_{30}H_{42}O_7$	OH	O	O	O

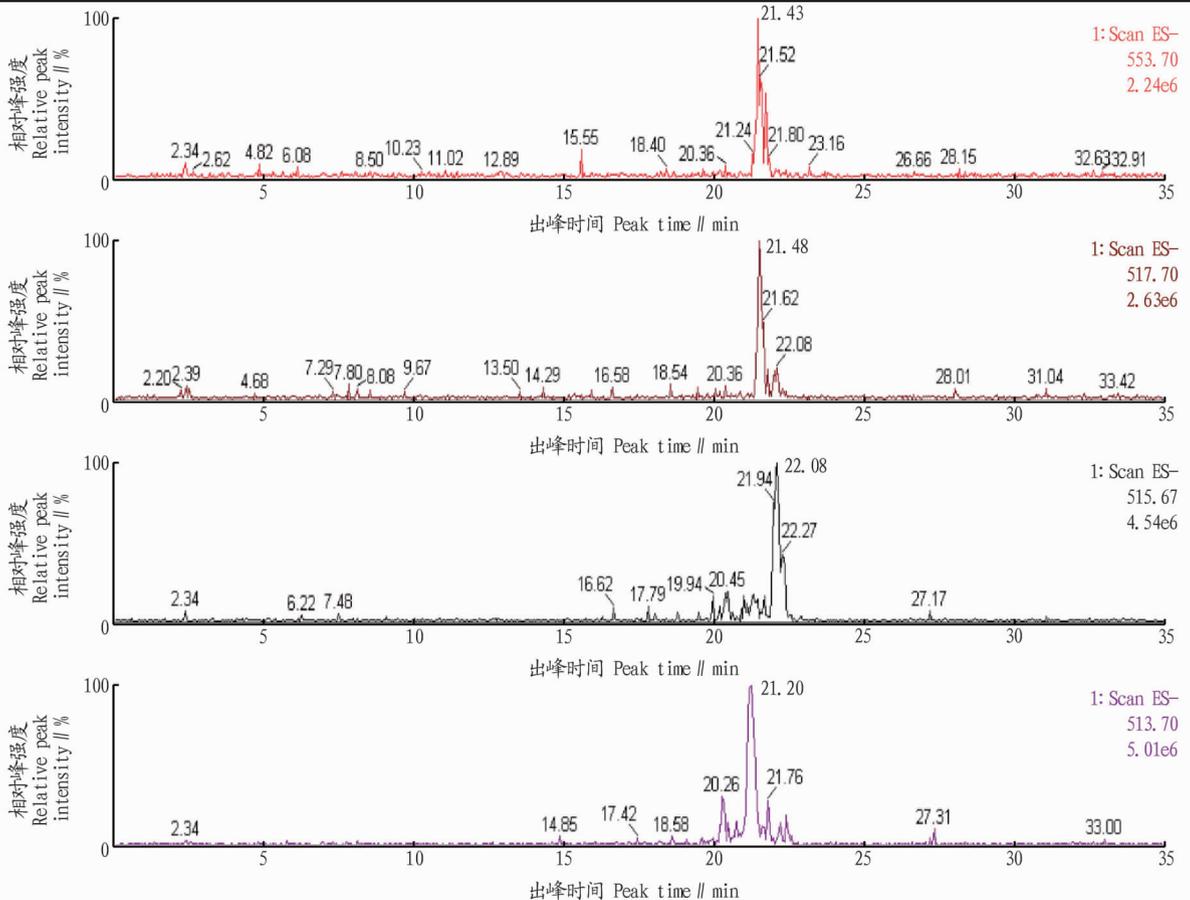


图 2 由不同分子量构建的灵芝酸的选择离子图

Fig. 2 Selective ion map of *Ganoderma lucidum* acid constructed from different molecular weights

酸分子量和图 2 可知,由分子量 553.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 R;由分子量 517.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 A₁;由分子量 515.67 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 delta、灵芝酸 gamma、灵芝酸 epsilon;由分子量 513.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 C₁、灵芝酸 zeta、灵芝酸 beta。

2.2 灵芝酸 A 含量的测定 由标准品的浓度和其相应峰面积得到标准曲线方程为 $y = 48\ 233x + 218\ 717$ ($R^2 = 0.998\ 9$),说明峰面积与灵芝酸 A 标准品线性关系良好(图 3)。将样品测定灵芝酸 A 的峰面积(图 4)带入标准曲线,得样品中灵芝酸 A 的含量为 115.4 $\mu\text{g/g}$ 。并做加标回收试验得出,加标回收率在 97.16% ~ 102.44%。

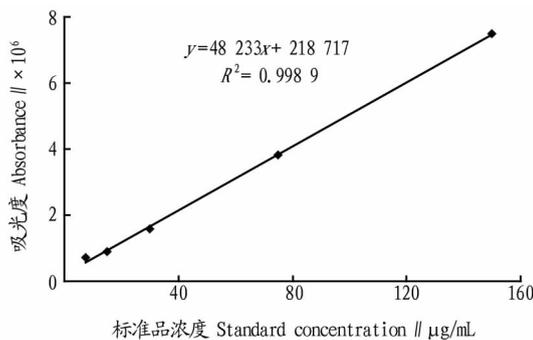


图 3 灵芝酸 A 标准品的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *Ganoderma lucidum* acid A standard

3 结论

利用反相高效液相色谱和电喷雾质谱联用技术,通过研究已知的灵芝酸化合物的相对分子质量及结构特征,鉴定泰山赤灵芝中生物碱提取物中的灵芝酸类化合物,并通过灵芝酸 A 标准品的标准曲线测定其中灵芝酸 A 的含量。结果发现,标准曲线的相关系数为 0.998 9,峰面积与灵芝酸 A 标准品线性关系良好,加标回收率在 97.16% ~ 102.44%,样品中

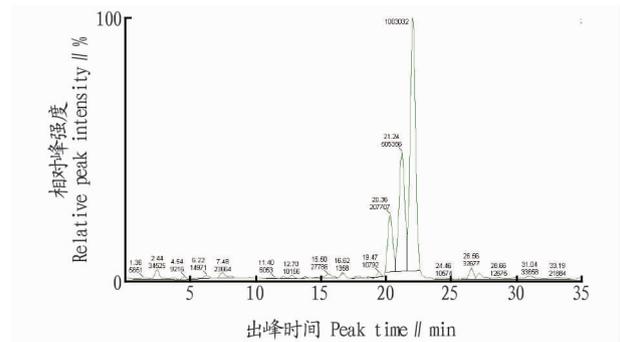


图 4 样品中灵芝酸 A 的峰面积

Fig. 4 Peak area of *Ganoderma lucidum* acid sample

灵芝酸 A 的含量为 115.4 $\mu\text{g/g}$ 。表明该方法用于泰山赤灵芝中灵芝酸 A 的测定准确、可靠。相对于其他分析技术,液质联用技术是一种快速灵敏的分析技术,准确性和回收率更高^[11-12]。下一步将利用其优势,进一步分析泰山赤灵芝的活性成分,研究并发现其他活性成分。

参考文献

- [1] 金善姬. 谈灵芝的药用价值[J]. 中国社区医师, 2007(21): 35.
- [2] 张冬梅. 灵芝的药用价值及开发利用[J]. 中国林副特产, 1998(3): 43.
- [3] 王维源. 灵芝的药用价值[J]. 今日科技, 1998(10): 4-5.
- [4] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展[J]. 药学报, 1990, 25(12): 940-953.
- [5] 北京医学院药理教研组. 灵芝的药理研究: I. 灵芝子实体制剂的药理作用[J]. 北京医学院学报, 1974(4): 246-254.
- [6] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 477-486.
- [7] 王勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 白山草乌中二萜生物碱的电喷雾串联质谱分析[J]. 质谱学报, 2002, 23(3): 160-163.
- [8] KOCH D E, ISAZA R, CARPENTER J W, et al. Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(3): 577-584.
- [9] 周燕, 王明奎, 廖循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 174-178.
- [10] 刘罡一, 汪国权, 张慧, 等. 中草药及制剂中吴茱萸内酯的 LC-MS/MS 测定方法[J]. 中成药, 2003, 25(2): 144-146.
- [11] 孙金旭. 灵芝中灵芝酸的测定研究[J]. 食品研究与开发, 2015(8): 13-15.
- [12] 翁小刚. 酶免疫测定法定量检测灵芝中的灵芝酸 A[J]. 国外医学(中医中药分册), 2003, 25(1): 47-48.
- [13] 林林业大学, 2009.
- [14] 徐冰心, 刘敏, 林秀芳, 等. 胃蛋白酶水解松仁蛋白的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2672-2674.
- [15] 慕蕾, 王振宇. 红松松仁抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2010(7): 78-82.
- [16] 李基洪, 黄来发. 饮料和冷饮配方 1800 例[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 210-211.
- [17] 苏晓雨, 王振宇. 植物来源生物活性蛋白研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 293-296.
- [18] 吴琼英, 马海乐, 田呈瑞. 松仁饮料的加工技术[J]. 食品工业, 2001(2): 28-29.
- [19] 张立钢, 鄂志强. 松仁牛乳饮料的研制及体系稳定性研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(4): 29-31.
- [20] 饶国华, 陈锦屏, 赵谋明. 酸性红枣松仁复合蛋白饮料稳定性研究: 乳浊液对稳定性的影响[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(1): 175-178.
- [21] 夏光辉, 徐晶, 孟祥红. 松仁蛋白饮料的制作及试验分析[J]. 通化师范学院学报, 2008, 29(12): 37-38.
- [22] 吴建平. 日本生理活性肽的市场动态[J]. 食品工业, 1998(3): 8-9.
- [23] 杨国玲, 文永均, 胡晓愚, 等. 胸腺相关肽及其自旋标记类似物的抗氧化活性研究[J]. 生物化学与生物物理学报(英文), 1995(6): 680-684.

(上接第 82 页)

- [10] 吴晓红, 华美玲, 石媛, 等. 响应面法优化脱脂松仁水溶性蛋白提取工艺[J]. 中国油脂, 2010, 35(8): 34-37.
- [11] 吴晓红, 王振宇, 郑月明, 等. 松仁中盐溶蛋白的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 259-261.
- [12] 饶国华, 陈锦屏, 张京芳, 等. 松仁深加工中提高蛋白质提取率工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(11): 46-47.
- [13] 王振宇, 李宏菊, 夏祥慧, 等. 红松仁分离蛋白乳化性和溶解性分析[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(5): 77-79.
- [14] 李莉. 松仁多肽的制备及其免疫活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [15] 蒋丽萍, 高吉喆. 松子仁蛋白提取工艺的研究[J]. 中国科技信息, 2005, 2(23): 98.
- [16] 李宏菊, 王振宇, 赵鑫, 等. 响应面法对磷酸化改性红松仁分离蛋白溶解性工艺参数的优化[J]. 食品研究与开发, 2010, 30(9): 28-33.
- [17] 李宏菊. 红松仁蛋白磷酸化及琥珀酰化改性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [18] 杨丽娜. 红松松仁分离蛋白的制备及降血脂功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [19] 赵玉红, 李莉, 张立钢. 松仁蛋白多肽的制备及组分分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(9): 86-88.
- [20] 李颖. 固定化蛋白酶的制备及松仁多肽加工工艺研究[D]. 哈尔滨: 东