

灵芝子实体中 18 种主要三萜成分的高效液相分析

曾凡清¹, 吕明亮¹, 薛振文¹, 冯娜^{2*}

1 丽水市农林科学研究院, 浙江 丽水 323000

2 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403

摘要: 以灵芝子实体中 18 种主要三萜化合物为对照品, 建立了灵芝三萜的高效液相定量检测方法。采用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(0.01%乙酸)为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm。该方法实现了 18 种三萜化合物的基线分离, 精密度、重复性、稳定性和加样回收率均符合方法学要求。将该方法应用于 2 个灵芝品种在不同栽培环境下的三萜含量评价中, 结果发现, 三萜的含量与品种、栽培环境都有很大的相关性, 品种是影响灵芝子实体三萜含量的主要因素, 但在不同环境下, 同一品种的灵芝三萜含量也会发生变化。

关键词: 灵芝子实体; 三萜; 定量分析; 种质评价

[引用本文]

曾凡清, 吕明亮, 薛振文, 冯娜, 2023. 灵芝子实体中 18 种主要三萜成分的高效液相分析. 菌物学报, 42(11): 2309-2319
Zeng FQ, Lü ML, Xue ZW, Feng N, 2023. Analysis of 18 main triterpenoids in basidiomata of *Ganoderma lingzhi* by HPLC. Mycosystema, 42(11): 2309-2319

Analysis of 18 main triterpenoids in basidiomata of *Ganoderma lingzhi* by HPLC

ZENG Fanqing¹, LÜ Mingliang¹, XUE Zhenwen¹, FENG Na^{2*}

1 Lishui Institute of Agricultural and Forestry Sciences, Lishui 323000, Zhejiang, China

2 National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

Abstract: Using 18 main triterpenoids as references, a high-performance liquid chromatography

资助项目: 丽水市重点研发计划(2012ZDYF11)

This work was supported by the Key Research and Development Plan in Lishui (2012ZDYF11).

*Corresponding author. E-mail: fengna006@163.com

Received: 2023-04-21; Accepted: 2023-05-25

(HPLC) method for quantitative determination of triterpenoids in basidiomata of *Ganoderma lingzhi* was established. HPLC was carried out by Agilent Eclipse Plus C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.01% acetic acid system as mobile phase. The column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL/min, and the detective wavelength was set at 254 nm. The HPLC method was applied to the evaluation of triterpenoid content in the two strains of *G. lingzhi* under different cultivation environments. It was found that triterpenoid content was significantly correlated with both the strains and the cultivation environment. Strains were the main factor affecting the triterpenoid content in basidiomata of *G. lingzhi*, but the triterpenoid content also changed under different environments.

Keywords: basidiomata of *Ganoderma lingzhi*; triterpenoids; quantitative analysis; variety evaluation

灵芝 *Ganoderma lingzhi* Sheng H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai 是担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、多孔菌目 Polyporales、灵芝科 Ganodermataceae、灵芝属 *Ganoderma* P. Karst 真菌(戴玉成等 2013, 2021), 其子实体是我国药典中“灵芝”药材的原料来源之一(国家药典委员会 2020)。三萜化合物被广泛认为是灵芝的主要化学成分之一, 也是评价灵芝品质的主要指标之一(陈若芸 2015)。

目前为止, 从灵芝子实体中已分离和鉴定出 200 多种三萜化合物(Lin & Yang 2019)。这些三萜化合物多数属于高度氧化的四环三萜, 在 C-3,7,11,15 等多个位点上由羟基、酮基或乙酰氧基取代, 其中, 根据支链末端上取代基的不同, 三萜化合物被命名为灵芝酸、灵芝烯酸、灵芝醇、灵芝醛及灵芝内酯等。由于化学法检测灵芝三萜含量存在很大的误差(程池露等 2022), 一直以来, 很多学者致力于更加精准的灵芝三萜检测方法的建立。但由于早期对灵芝子实体中三萜的研究主要集中在其传统药用模式下获得的水提取物成分, 或者在实验室采用酸碱萃取的方式获得的酸性组分, 其主要组成是灵芝酸和灵芝烯酸类化合物, 因此, 早期关于灵芝三萜的高效液相分析中多采用灵芝酸、灵芝烯酸做对照品。李保明等(2012)利用高效液相色谱系统建立了灵芝酸、灵芝烯酸和灵芝醇等在内共 9 种三萜酸的定量分

析方法。美国药典在 2014 年规定采用超高效液相色谱法对灵芝子实体中 10 种灵芝酸和灵芝烯酸的含量进行分析(The United States Pharmacopeial Convention 2015)。随着对灵芝三萜更加深入系统地研究, 发现灵芝子实体中灵芝酮三醇、灵芝醇 B 和灵芝醛 A 等中性三萜的含量也较高, 通过逆流色谱或传统制备方式均可以获得大量的化合物(Zhao *et al.* 2006; 刘松照等 2017; 岳亚文等 2020; 彭小芳等 2021)。此外, 灵芝酮三醇、灵芝醇 B 等已被证实具有优异的抗炎、抗肿瘤活性, 在动物的炎症模型中也得到验证(边子尧 2016; 郝萌萌等 2019), 灵芝中性三萜逐渐得到人们的重视。因此, 有必要建立更多结构种类的灵芝三萜分析方法, 为灵芝的全面利用和科学开发提供技术支撑。

本研究在总结前人对灵芝三萜分离鉴定和定量分析的基础上, 选择了 18 种在灵芝子实体中含量较高的代表性三萜化合物作为对照品, 其中包含了灵芝酸、灵芝醇和灵芝醛等多种结构类型, 在优选了色谱柱和反复优化洗脱条件的基础上, 使得所有三萜化合物都能够基线分离, 实现了更为精准全面的三萜定量分析。在此基础上, 研究对选育的品种和已有品种在不同栽培环境下的三萜含量进行定量测定, 为灵芝高三萜优良品种的选育提供了一种更加科学的评价手段。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 样品

供试菌株 1 为沪农灵芝 1 号灵芝 *Ganoderma lingzhi*, 保藏于上海市农业科学院食用菌研究所。供试菌株 2 为杂交选育灵芝 *Ganoderma lingzhi*, 保藏于丽水农林科学研究院; 2 个供试菌株于 2022 年 12 月接种, 2023 年 5 月栽培于不同环境中, 具体栽培环境见表 1。栽培基质均为段木, 于 2022 年 9 月孢子采收后取样。每份样本采集 5 朵子实体, 粉碎后过 20 目筛备用。

表 1 栽培环境

Table 1 Planting environment of *Ganoderma lingzhi*

地点	环境特征
Site	Environmental characteristics
A	海拔 319 m, 旱田 319 m above sea level, dry farmland
B	海拔 547 m, 水田 547 m above sea level, paddy field
C	海拔 346 m, 水田 346 m above sea level, paddy field
D	海拔 470 m, 毛竹林 470 m above sea level, moso bamboo forest
E	海拔 430 m, 水田 430 m above sea level, paddy field

1.1.2 主要试剂

灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C2、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝酸 G、灵芝酸 DM、灵芝酸 H、灵芝烯酸 A、灵芝烯酸 B、灵芝烯酸 C、灵芝烯酸 D、赤芝酸 A、灵芝醇 A、灵芝醇 B、灵芝醇 F、灵芝酮三醇、灵芝醛 A 对照品购自成都普思生物科技股份有限公司, 纯度≥98%; 乙腈, 色谱级, 为 TEDIA 公司产品(CAS:AS1122-801); 无水乙醇、乙酸、甲醇, 均为分析纯, 为国药集团药业股份有限公司产品; 水为超纯水。

1.1.3 仪器设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 色谱柱 Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX SB

C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Agilent Poroshell 120 C18 (4.6 mm×250 mm, 4 μm), 均为安捷伦科技有限公司产品; EX324ZH 电子天平, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; KQ-500DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; YF-1000 中药粉碎机, 浙江瑞安永历制药机械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件优化

流动相为乙腈-水, 水相中添加 0.01%乙酸。首先考察不同色谱柱的分离效果, 筛选出较为合适的色谱柱; 然后反复优化洗脱条件以获得最佳洗脱程序。其余色谱条件为高效液相常用参数: 进样量 5 μL, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, 根据三萜对照品的紫外吸收特征, 设定检测波长为 254 nm。

1.2.2 标准溶液配制

精密称取三萜对照品灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C2、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝酸 G、灵芝酸 DM、灵芝酸 H、灵芝烯酸 A、灵芝烯酸 B、灵芝烯酸 C、灵芝烯酸 D、赤芝酸 A、灵芝醇 A、灵芝醇 B、灵芝醇 F、灵芝酮三醇、灵芝醛 A, 分别用甲醇配制成 1 mg/mL 的标准溶液, 将各对照品按相应的比例配制、混匀后逐级稀释成 7 个系列浓度的混合标样, 备用。

1.2.3 样品处理

将灵芝子实体样品粉碎, 称取粉碎混匀后的灵芝子实体 0.5 g, 加入 10 mL 无水乙醇于超声仪(600W、40KH2)中超声提取 1 h, 吸取上清液 1 mL, 经有机滤膜(0.22 μm, PTFE)过滤后备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

乙腈-水系统是常用来做三萜检测分析的洗脱系统, 因此在本试验中直接采用该体系。考虑到酸性三萜在反相色谱柱上易发生拖尾的现象, 试验在水相中添加了 0.01%乙酸。由于三萜的极性特征, 采用反相 C-18 分析三萜是常规方法,

因此, 本研究中考察的色谱柱也限定在 C-18 反相色谱中。在考察了 3 种不同型号的色谱柱 Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 和 Agilent Poroshell 120 C18 (4.6 mm×250 mm, 4 μm) 的分离效果后, 发现灵芝酸 A (峰 7) 和灵芝酸 H (峰 8) 在 Agilent Poroshell 120 C18 (4.6 mm×250 mm, 4 μm) 色谱柱上较难以基线分离, 而灵芝酮三醇(峰 13)和灵芝酸 DM (峰 14) 在 Agilent ZORBAX SB C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱上无法区分(图 1)。因此选择 Agilent Eclipse plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 进行洗脱条件的优化。

在选择 Agilent Eclipse plus C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 的基础上, 反复进行洗

脱条件的优化(图 2), 得到最佳洗脱程序见表 2。在该洗脱程序下, 所有化合物的色谱峰均实现了基线分离(图 3)。

2.2 方法学验证结果

2.2.1 线性关系

取梯度稀释后的 7 个浓度对照品溶液, 按优化后的色谱条件进行分析并记录峰面积。以各对照品浓度为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 得到各三萜化合物对照品的回归方程及线性范围。结果表明各三萜对照品线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 (表 3)。

2.2.2 精密度试验

将同一浓度的混合标准溶液, 一日内连续进样 7 次, 根据定量的质量浓度分别计算各三萜色谱峰面积的相对标准偏差(relative standard

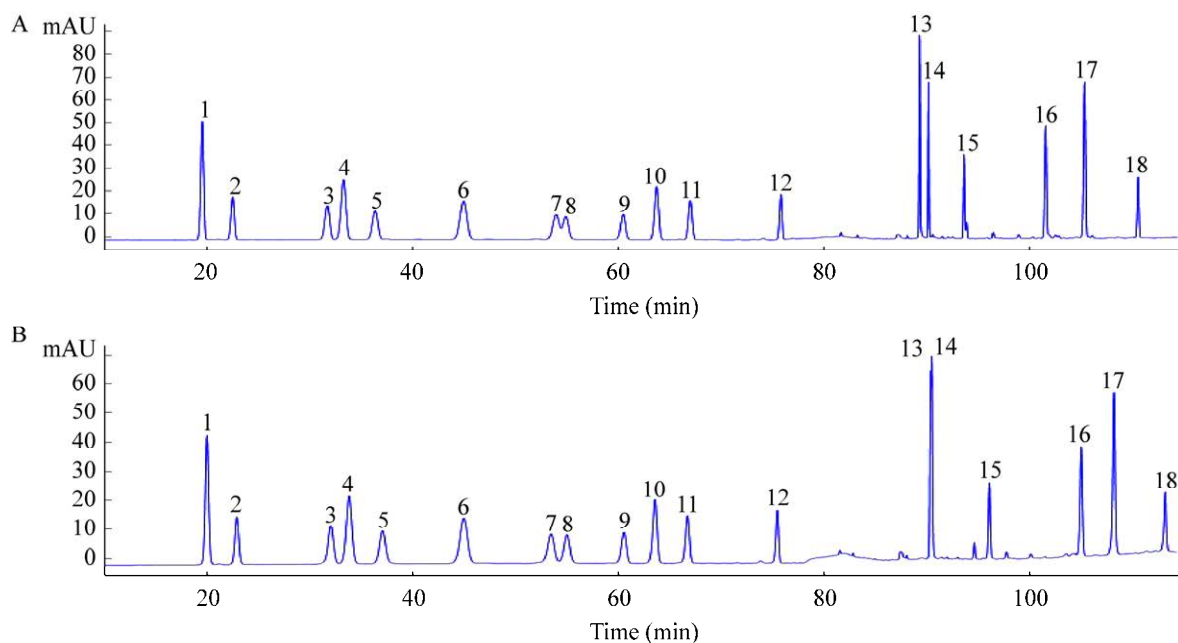


图 1 不同色谱柱的色谱图 A: Agilent Poroshell 120 C18. B: Agilent ZORBAX SB C18. 1: 灵芝烯酸 C; 2: 灵芝酸 C2; 3: 灵芝酸 G; 4: 灵芝烯酸 B; 5: 灵芝酸 B; 6: 灵芝烯酸 A; 7: 灵芝酸 A; 8: 灵芝酸 H; 9: 赤芝酸 A; 10: 灵芝烯酸 D; 11: 灵芝酸 D; 12: 灵芝酸 F; 13: 灵芝酮三醇; 14: 灵芝酸 DM; 15: 灵芝醇 F; 16: 灵芝醇 B; 17: 灵芝醇 A; 18: 灵芝醛 A. 下同

Fig. 1 Chromatograms of HPLC with different columns. A: Agilent Poroshell 120 C18. B: Agilent ZORBAX SB C18. 1: Ganoderenic acid C; 2: Ganoderic acid C2; 3: Ganoderic acid G; 4: Ganoderenic acid B; 5: Ganoderic acid B; 6: Ganoderenic acid A; 7: Ganoderic acid A; 8: Ganoderic acid H; 9: Lucidenic acid A; 10: Ganoderenic acid D; 11: Ganoderic acid D; 12: Ganoderic acid F; 13: Ganodermanontriol; 14: Ganoderic acid DM; 15: Ganoderiol F; 16: Ganoderiol B; 17: Ganoderiol A; 18: Ganoderal A. The same below.

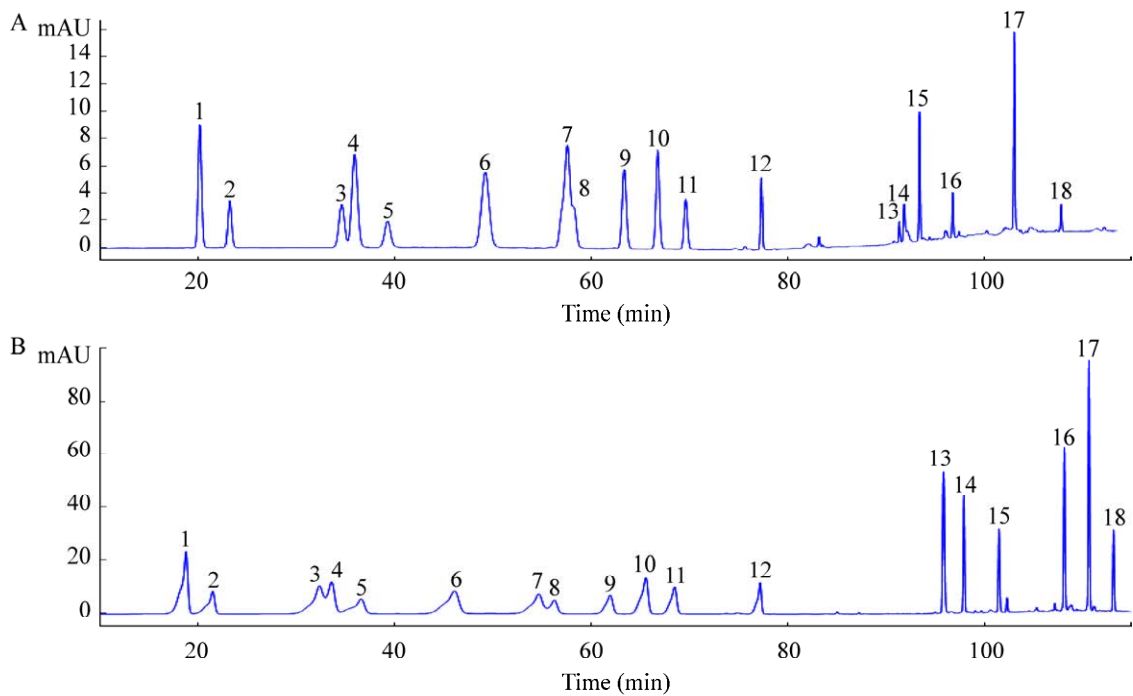


图 2 不同洗脱程序的色谱图 A：洗脱程序不合适时，化合物无法基线分离. B：洗脱程序不合适时，色谱峰对称性不符合要求

Fig. 2 Chromatograms of different elution procedures. A: When the elution program was not suitable, the compound couldn't be separated at the baseline. B: When the elution program was not suitable, the chromatographic peak symmetry didn't meet the requirements.

表 2 洗脱程序

Table 2 The gradient elution mode

时间 Time (min)	乙腈 CH ₃ CN (%)	水 Water (containing 0.01% acetic acid, %)
0	27.2	72.8
45	27.2	72.8
70	38.0	62.0
85	80.0	20.0
115	100	0
125	100	0

deviation, RSD), 考察仪器的精密度(表 3)。结果表明,18 个三萜化合物的峰面积 RSD 均在 0.5% 以内,说明仪器精密度符合要求。

2.2.3 重复性试验

取同一灵芝子实体样品 7 份,按本试验的样品方法处理后,测定各三萜含量,以测定得到的各化合物的 RSD 为参考,考察方法的重复性

(表 3)。结果表明,18 个三萜化合物的峰面积 RSD 均在 3%以内,重复性良好,符合方法学要求。

2.2.4 稳定性试验

取处理好的待测样品溶液,按优化的色谱条件,分别于 0、2、4、8、12、16 和 24 h 测定各三萜化合物色谱峰面积的 RSD,考察方法在 24 h 内的稳定性(表 3)。结果表明,样品中各三萜化合物峰面积的 RSD 均在 3%以内,说明样品在 24 h 内保持稳定。

2.2.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的灵芝样品 7 份,每份 0.5 g,按试验中的方法进行前处理,制备供试品溶液,分别添加相等浓度的三萜对照品,采用本实验方法进行测定,计算平均回收率,并求出 RSD (表 3)。结果表明,18 个三萜对照品的回收率在 98%–102%之间, RSD 均在 3%以内,符合方法学要求。

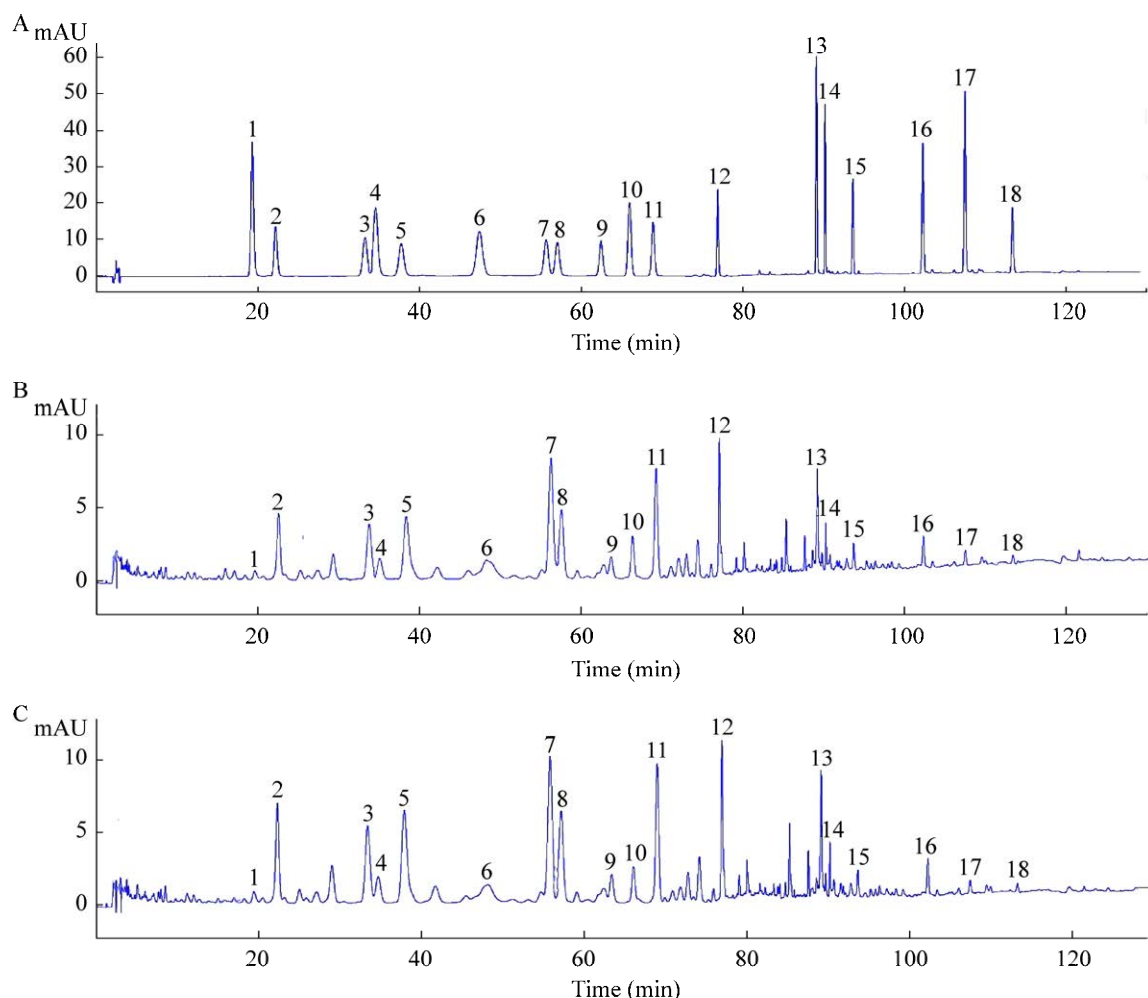


图3 三萜对照品和样品在 Agilent Eclipse plus C18 色谱柱上的 HPLC 图谱 A: 对照品. B: A1 样品. C: A2 样品

Fig. 3 Chromatograms of HPLC of triterpenoid standards and tested samples on Agilent Eclipse plus C18 column. A: Triterpenoid standards. B: A1 sample. C: A2 sample.

2.3 灵芝子实体中三萜含量的测定及分析

通过对 18 种主要三萜成分含量的测定 (表 4) 发现, 供试菌株 2 在 5 个不同的栽培环境下, 其子实体的三萜含量在 4 612–6 588 $\mu\text{g/g}$ 之间, 均高于相同栽培环境下的供试菌株 1。2 个品种的灵芝在不同栽培环境下, 三萜的总含量差异较大, 其中, D 环境下栽培获得的 2 个灵芝品种的三萜总含量均最高, 分别为 6 000 $\mu\text{g/g}$ 和 6 588 $\mu\text{g/g}$ 。其次为 A 环境, 2 个灵芝品种的三萜总含量分别为 5 057 $\mu\text{g/g}$ 和 5 427 $\mu\text{g/g}$ 。D 环境是在海拔 470 m 的毛竹林中, 灌溉系统不完

善, 灵芝子实体在整个生长过程中相对缺水。A 环境是海拔 319 m 的旱田, 由于基地地势较高, 土壤含水量低, 基地灌溉系统也较差。从这两地的情况来看, 在灵芝生长过程中, 干旱等恶劣环境的胁迫是否有助于三萜含量的提高, 还有待于进一步的试验验证。从单个三萜化合物的定量分析结果来看, 灵芝酸 C2、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝酸 A、灵芝酸 H、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 D、灵芝酸 F 和灵芝酮三醇的含量较高, 这些三萜化合物在所有的灵芝子实体样品中, 含量均超过了 100 $\mu\text{g/g}$ 。

表 3 不同三萜类成分方法学数据

Table 3 Data of methodology of different triterpenoids

标准溶液 Standards	回归方程 Regressive equations	相关系数 Correlative coefficient	线性范围 Linear bounds ($\mu\text{g/mL}$)	精密度 Precision (%)	重复性 Repeatability (%)	稳定性 Stability (%)	平均回 收率 Recovery (%)	加样回收 率相对标 准偏差 RSD (%)
灵芝烯酸 C Ganoderenic acid C	$y=21.643\ 2x-21.259\ 0$	0.999 3	2–200	0.47	2.56	1.13	99.54	1.21
灵芝酸 C2 Ganoderic acid C2	$y=5.909\ 1x-8.096\ 3$	0.999 5	3–300	0.31	1.78	0.53	99.23	1.33
灵芝酸 G Ganoderic acid G	$y=6.865\ 9x-14.820\ 1$	0.999 8	3–300	0.24	2.64	0.66	98.99	0.59
灵芝烯酸 B Ganoderenic acid B	$y=18.380\ 6x-35.970\ 7$	0.999 6	2–200	0.08	1.37	0.87	99.01	0.63
灵芝酸 B Ganoderic acid B	$y=6.419\ 4x-7.687\ 7$	0.999 6	3–300	0.25	0.89	0.25	99.66	1.58
灵芝烯酸 A Ganoderenic acid A	$y=16.152\ 7x-12.677\ 7$	0.999 1	2–200	0.01	1.41	0.36	99.93	1.33
灵芝酸 A Ganoderic acid A	$y=5.686\ 3x-7.393\ 4$	0.999 2	3–300	0.36	1.21	0.92	100.14	1.71
灵芝酸 H Ganoderic acid H	$y=4.993\ 8x-5.398\ 3$	0.999 3	3–300	0.21	2.55	1.05	100.23	1.62
赤芝酸 A Lucidenic acid A	$y=7.211\ 5x-9.839\ 8$	0.999 1	2–200	0.28	2.61	1.19	99.42	1.01
灵芝烯酸 D Ganoderenic acid D	$y=13.516\ 8x-13.153\ 3$	0.999 2	2–200	0.54	2.63	0.74	99.74	0.97
灵芝酸 D Ganoderic acid D	$y=6.166\ 3x-7.905\ 7$	0.999 2	3–300	0.10	1.55	0.81	100.91	1.36
灵芝酸 F Ganoderic acid F	$y=4.823\ 6x-7.155\ 4$	0.999 2	3–300	0.08	2.36	0.45	101.12	0.47
灵芝酮三醇 Ganodermanontriol	$y=9.038\ 4x-11.117\ 8$	0.999 2	3–300	0.06	0.96	0.48	99.74	1.03
灵芝酸 DM Ganoderic acid DM	$y=9.220\ 2x-11.325\ 6$	0.999 2	2–200	0.11	1.38	1.25	99.05	1.52
灵芝醇 F Ganoderol F	$y=7.051\ 1x-5.067\ 0$	0.999 2	2–200	0.19	2.01	2.01	100.11	2.01
灵芝醇 B Ganoderol B	$y=12.882\ 7x-12.595\ 8$	0.999 3	2–200	0.23	1.57	1.44	99.17	1.82
灵芝醇 A Ganoderol A	$y=11.931\ 6x-15.751\ 5$	0.999 2	3–300	0.08	2.95	1.68	99.98	0.79
灵芝醛 A Ganoderal A	$y=4.339\ 5x-5.958\ 4$	0.999 3	3–300	0.13	1.96	1.49	99.63	1.54

表 4 灵芝子实体中三萜类成分含量测定(n=3)

Table 4 Determination of triterpenoid content in *Ganoderma lingzhi* basidiomata (n=3)

标准溶液 Standards	含量 Content (μg/g)									
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
灵芝烯酸 C Ganoderenic acid C	15.32± 1.14	16.81± 0.83	16.51± 1.21	15.93± 0.11	33.16± 0.69	23.57± 0.71	39.21± 0.37	48.15± 1.13	39.74± 0.11	45.28± 0.39
灵芝酸 C2 Ganoderic acid C2	321.07± 0.69	350.83± 0.95	512.57± 0.11	567.85± 0.25	336.56± 0.48	410.27± 0.63	515.10± 0.52	567.40± 2.04	333.54± 0.69	358.42± 0.78
灵芝酸 G Ganoderic acid G	307.55± 0.42	465.29± 0.33	497.36± 0.54	547.58± 1.01	535.79± 0.66	398.21± 0.52	338.98± 0.67	387.62± 1.97	425.33± 0.52	338.29± 1.42
灵芝烯酸 B Ganoderenic acid B	141.87± 0.48	199.46± 0.37	128.06± 1.23	119.70± 0.62	160.63± 0.98	228.32± 0.42	131.76± 0.71	176.26± 0.28	203.54± 0.21	298.53± 1.59
灵芝酸 B Ganoderic acid B	358.64± 0.35	391.49± 0.97	215.30± 0.55	376.25± 0.95	427.24± 0.74	413.04± 0.37	487.75± 1.28	564.75± 1.58	331.19± 0.38	375.78± 0.97
灵芝烯酸 A Ganoderenic acid A	75.73± 0.08	86.21± 1.13	52.29± 0.62	67.72± 0.21	52.31± 0.11	72.64± 0.24	103.32± 0.38	97.17± 0.62	30.55± 0.67	54.67± 0.33
灵芝酸 A Ganoderic acid A	1 061.34± 0.36	1 100.31± 1.03	1 214.71± 1.22	1 323.43± 1.28	604.80± 1.02	668.70± 1.29	1 292.03± 1.29	1 305.82± 2.31	1 099.12± 1.57	1 142.97± 1.26
灵芝酸 H Ganoderic acid H	658.97± 1.17	568.81± 0.78	445.64± 0.79	522.59± 1.43	597.25± 0.67	596.81± 0.91	691.42± 1.75	767.13± 1.45	559.37± 1.33	641.99± 1.48
赤芝酸 A Lucidenic acid A	137.57± 1.07	144.27± 0.44	160.72± 0.16	149.68± 0.55	142.16± 0.18	153.30± 1.07	151.07± 0.95	163.25± 0.26	157.86± 0.66	161.42± 0.68
灵芝烯酸 D Ganoderenic acid D	103.45± 0.27	114.34± 0.75	116.65± 0.69	129.54± 0.33	109.57± 0.33	127.86± 0.58	138.25± 0.23	191.33± 1.54	163.38± 0.71	188.25± 0.89
灵芝酸 D Ganoderic acid D	683.57± 1.38	579.74± 0.52	419.97± 0.33	278.47± 0.52	530.17± 0.49	644.07± 0.82	755.28± 0.66	891.13± 1.46	403.98± 0.59	452.98± 0.21
灵芝酸 F Ganoderic acid F	765.24± 0.28	912.73± 0.41	614.34± 0.58	571.08± 0.56	590.93± 1.01	666.04± 0.69	771.24± 0.38	821.06± 1.32	531.48± 0.77	465.73± 0.84
灵芝酮三醇 Ganodermanontriol	153.33± 1.24	120.92± 1.07	141.84± 0.62	120.97± 0.11	118.63± 0.12	147.71± 0.17	157.94± 0.79	118.65± 0.33	135.99± 0.68	133.91± 0.21
灵芝酸 DM Ganoderic acid DM	32.05± 0.26	49.44± 1.21	54.23± 0.25	34.23± 0.15	47.39± 0.19	86.51± 0.23	112.43± 0.13	151.97± 0.78	113.08± 0.99	105.53± 0.68
灵芝醇 F Ganoderol F	62.73± 0.72	92.50± 1.28	65.86± 0.13	84.48± 0.39	115.60± 1.42	74.28± 0.39	79.96± 0.68	93.28± 0.92	97.74± 1.11	85.53± 0.71

(待续)

(续表 4)

标准溶液 Standards	含量 Content (μg/g)									
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
灵芝醇 B	52.51±	60.12±	55.13±	64.62±	79.61±	47.33±	65.51±	80.17±	87.49±	38.11±
Ganoderol B	0.09	0.94	0.21	0.14	0.91	0.11	0.55	0.53	1.55	0.69
灵芝醇 A	44.94±	70.47±	30.13±	45.32±	38.15±	70.34±	68.51±	57.78±	54.36±	52.93±
Ganoderol A	0.84	0.88	0.37	0.22	0.15	0.27	1.21	0.29	0.68	0.23
灵芝醛 A	81.64±	104.77±	91.24±	108.86±	92.52±	97.76±	101.20±	105.16±	93.66±	99.37±
Ganoderal A	1.22	0.77	0.49	0.39	1.22	0.39	1.46	1.37	1.37	0.43
总三萜	5 057.52±	5 427.91±	4 832.55±	5 128.20±	4 612.47±	4 926.76±	6 000.96±	6 588.08±	4 861.40±	5 039.69±
Total (μg/g)	0.71a	0.54b	0.37c	1.38a	2.07d	1.68ce	0.97f	1.09g	1.12ch	1.54aci

同列中字母相同代表差异不显著($P>0.05$); 不同字母代表差异显著($P<0.05$)
The same letters in the same lines represent the difference is not significant ($P>0.05$); Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

3 讨论

灵芝中三萜化合物种类繁多,在选取对照品时,应尽量选择含量高、有代表性的活性三萜化合物,才能尽可能全面精准地反映灵芝三萜的真实情况。随着仪器分析技术的进步,高效液相色谱乃至高效液相色谱-质谱联用设备被用于三萜的定性定量分析中(Yang *et al.* 2007; Biswal *et al.* 2022)。研究前期通过高效液相色谱-三重四级杆质谱的高分辨率、高灵敏性,对灵芝子实体中 37 个不同结构类型的三萜进行定性定量(冯娜等 2020, 2021),发现了灵芝子实体中的主要三萜化合物。但由于高效液相-质谱联用使用成本高,技术要求也高,目前很难在科研机构 and 从事灵芝生产的企业中进行普及,因此,将高效液相色谱-质谱联用的研究成果用于指导建立高效液相分析方法是必要的。本研究结合已有多个研究成果,把之前被忽视的灵芝酸 H、灵芝醛 A 等活性三萜化合物纳入定量范围,通过对色谱条件的反复优化,最终确定了 18 种三萜化合物的高效液相分析方法。在该方法下,所有化合物,尤其是灵芝酸 A 与灵芝酸 H、灵芝酸 G 与灵芝烯酸 B 均达到了基线分离。较以往方法,该方法的测定结果更加真实可靠。本研究中被检测的 18 种三萜化合物的峰面积占有液相色谱峰面

积的比值达 85%以上,说明该方法较为全面地表征了灵芝子实体中的三萜含量。

灵芝作为药品和保健食品开发的主要真菌资源,其活性三萜的含量是评价其品质的重要指标。一直以来,虽然有多篇有关灵芝不同品种、不同产地和不同生长期活性成分评价的报道(林绍瑜和胡晓文 2016; 金鑫等 2017; 魏巍等 2017),但由于检测仍采用化学法,试验结果并不准确可靠,影响了真正高品质的灵芝品种、栽培模式和地域环境的选择和挖掘。近年来,已有很多研究认识到化学法检测的弊端,开始通过高效液相色谱法或高效液相色谱-质谱联用技术对不同生长期的灵芝子实体进行三萜种类和含量的评价,并获得了较为真实可靠的数据用来指导生产(李晔 2020; 吴鸿雪等 2020; 马延梅等 2023)。高品质新品种的选育,是灵芝良种良法栽培的关键第一步。按照新品种选育的要求,需 2 年时间内在 3 个以上地点进行灵芝的栽培,并对其生物性状和活性成分进行考察对比。因此在本研究中,作者对灵芝杂交选育出的新菌株在 5 个不同地点进行了栽培应用。沪农灵芝 1 号由于抗病性强,孢子粉产量高,是国内灵芝栽培的一个主要品种(何建芬等 2011),在本研究中被用于与新品种进行活性成分的对比。通过高效液相色谱分析对灵芝新品种和沪农灵芝 1 号的子

实体三萜进行了比较分析,结果证实,新品种在不同栽培环境下均保持了高三萜含量的优势。该结果证明,品种是影响灵芝三萜含量的主要因素。但不同栽培方式和环境,也在很大程度上影响了子实体中三萜的含量。环境中湿度、温度胁迫是否影响灵芝子实体中三萜的含量,以往的研究尚未涉及,因此,今后有必要对这些要素进一步进行系统地验证。

本研究所建立的分析方法,不仅适用于灵芝子实体品质的评价,也适用于灵芝乙醇提取物及其相关产品的品质把控。

[REFERENCES]

- Bian ZR, 2016. Anti-inflammatory effect and preliminary molecular mechanisms of the triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum*. Master Thesis, Inner Mongolia University, Hohhot. 1-71 (in Chinese)
- Biswal RP, Dandamudi RB, Patnana DP, Pandey M, Vutukuri VNRK, 2022. Metabolic fingerprinting of *Ganoderma* spp. using UHPLC-ESI-OTOF-MS and its chemometric analysis. *Phytochemistry*, 199: 113-169
- Chen RY, 2015. Review of research on chemical constituents of *Ganoderma lucidum* and its quality control method. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 23(5): 270-275 (in Chinese)
- 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 (in Chinese)
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2020 edition. China Medical Science Press, Beijing. 195-196 (in Chinese)
- 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)
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40: 770-805 (in Chinese)
- Feng N, Zhang JS, Cheng CL, Wang CG, Tang QJ, Zhou S, Feng J, Wang JY, Zhou J, 2021. A method for detection of neutral triterpenoids in *Ganoderma* spp.: China, CN113917033A. 2021-01-11 (in Chinese)
- Feng N, Zhang JS, Tang QJ, Wang CG, Yue YW, Cheng CL, Zhou S, Wang JY, Zhou J, Fang Y, 2020. A method for simultaneous detection of 25 triterpenoids in basidiomata of *Ganoderma lingzhi*: China, CN112326853B. 2022-10-11 (in Chinese)
- Hao MM, Wang JY, Feng N, Zhang JS, Tang QJ, Han W, 2019. In vitro antitumor and anti-inflammatory activities of triterpenoids with different polarity in the fruiting bodies of *Ganoderma lingzhi*. *Mycosystema*, 38(6): 917-925 (in Chinese)
- He JF, Li CQ, Zhang LM, 2011. Characteristics and key cultivation techniques of 'Hunong lingzhi 1'. *Journal of Edible Fungi*, 36(5): 21-22 (in Chinese)
- Jin X, Li WZ, He WJ, Chen ZQ, Huang WL, 2017. Agronomic traits and bioactive compounds of different strains of *Ganoderma lucidum*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 44(4): 19-23 (in Chinese)
- 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 Material Medica*, 37(23): 3599-3603 (in Chinese)
- Li Y, 2020. Quantitative analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* extracts. *Strait Pharmaceutical Journal*, 32(6): 31-34 (in Chinese)
- Lin SY, Hu XW, 2016. Determination of triterpenoids and sterol content of glossy *Ganoderma* of different origin. *Traditional Chinese Medicine*, 6(4): 330-332 (in Chinese)
- Lin ZB, Yang BX, 2019. *Ganoderma* and health: biology, chemistry and industry. Springer Nature, 1181: 59-106
- Liu SZ, Wang GK, Peng C, Wu J, Wang JT, 2017. Studies on chemical constituents of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 31(4): 41-45 (in Chinese)
- Ma YM, Zhou S, Feng N, Liu YF, Wang JY, Tang QJ, Han W, Zhang JS, 2023. Directional harvest of *Ganoderma lucidum* 'Hunong lingzhi 1' for high triterpenoids and water soluble polysaccharides. *Acta Edulis Fungi*, 30(1): 113-122 (in Chinese)
- Peng XF, Tian Z, Han W, Wang CG, Feng N, Zhang JS, 2021. Preparation of ganodermenonol by high speed countercurrent chromatography. *Mycosystema*, 40(5): 1190-1199 (in Chinese)
- The United States Pharmacopeial Convention, 2015. U.S. Pharmacopeial/National formulary USP38-NF33. United States Pharmacopeia, Maryland, USA. 7285-7288
- Wei W, Han JY, Yu MY, Xu XY, Jiang N, He LM, Li F, Luo X, 2017. Effective components form regularity of *Ganoderma lucidum*. *Edible Fungi of China*, 36(3): 57-59, 64 (in Chinese)
- Wu HX, Tang QJ, Lü XC, Li J, Lin ZX, Feng N, Zhang JS, 2020. Effects of cultivation conditions on triterpenoids composition and activities of *Ganoderma lingzhi* fruiting

- bodies. *Mycosystema*, 39(1): 144-154 (in Chinese)
- Yang M, Wang XM, Guan SH, Xia JM, Sun JH, Guo H, Guo DA, 2007. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 18: 927-993
- Yu YW, Tian Z, Zhang JS, Wang CG, Han W, Tang QJ, Feng N, Zhou S, 2020. Preparative isolation of ganodermanontriol from *Ganoderma lucidum* by high-speed countercurrent chromatography. *Acta Edulis Fungi*, 27(2): 77-83 (in Chinese)
- Zhao J, Zhang XQ, Li SP, Yang FQ, Wang YT, Ye WC, 2006. Quality evaluation of *Ganoderma* through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 29(17): 2609-2615
- [附中文参考文献]
- 边子尧, 2016. 灵芝三萜化合物的抗炎作用及分子机制初探. 内蒙古大学硕士学位论文, 内蒙古. 1-71
- 陈若芸, 2015. 灵芝化学成分与质量控制方法的研究综述. *食药菌*, 23(5): 270-275
- 程池露, 汪岳, 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
- 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
- 戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. *菌物学报*, 40: 770-805
- 冯娜, 张劲松, 程池露, 王晨光, 唐庆九, 周帅, 冯杰, 王金艳, 周靖, 2021. 一种检测灵芝属真菌中性三萜的方法: 中国, CN113917033A. 2021-01-11
- 冯娜, 张劲松, 唐庆九, 王晨光, 岳亚文, 程池露, 周帅, 王金艳, 周靖 方英, 2020. 一种同时检测灵芝子实体中 25 个三萜化合物的方法: 中国, CN112326853B. 2022-10-11
- 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
- 郝萌萌, 王金艳, 冯娜, 张劲松, 唐庆九, 韩伟, 2019. 灵芝子实体中不同极性的三萜体外抗肿瘤及抗炎活性比较. *菌物学报*, 38(6): 917-925
- 何建芬, 李朝谦, 张良明, 2011. 沪农灵芝 1 号菌株特性及栽培关键技术. *食用菌*, 36(5): 21-22
- 金鑫, 李文治, 何文江, 陈祖琴, 黄文丽, 2017. 不同灵芝菌株的农艺性状和药效成分特异性研究. *广东农业科学*, 44(4): 19-23
- 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
- 李晔, 2020. 灵芝提取物中多种三萜的质量控制研究. *海峡药学*, 32(6): 31-34
- 林绍瑜, 胡晓文, 2016. 不同产地灵芝中三萜及甾醇的含量考察. *中医中药*, 6(4): 330-332
- 刘松照, 王国凯, 彭灿, 吴杰, 王举涛, 2017. 灵芝三萜类化学成分研究. *现代中药研究与实践*, 31(4): 41-45
- 马延梅, 周帅, 冯娜, 刘艳芳, 王金艳, 唐庆九, 韩伟, 张劲松, 2023. 定向采收“沪农灵芝 1 号”高三萜和水溶性多糖原料研究. *食用菌学报*, 30(1): 113-122
- 彭小芳, 田振, 韩伟, 王晨光, 冯娜, 张劲松, 2021. 高速逆流色谱法制备灵芝萜烯酮醇. *菌物学报*, 40(5): 1190-1199
- 巍巍, 韩嘉钰, 余梦瑶, 许晓燕, 江南, 贺黎铭, 李芳, 罗霞, 2017. 灵芝药效成分形成的规律研究. *中国食用菌*, 36(3): 57-59, 64
- 吴鸿雪, 唐庆九, 吕旭聪, 李晶, 林占熿, 冯娜, 张劲松, 2020. 栽培条件对灵芝子实体的三萜组成及其活性的影响. *菌物学报*, 39(1): 144-154
- 岳亚文, 田振, 张劲松, 王晨光, 韩伟, 唐庆九, 冯娜, 周帅, 2020. 利用高速逆流色谱技术制备灵芝酮三醇. *食用菌学报*, 27(2): 77-83