

灵芝三萜成分分析

马林, 吴丰, 陈若芸*

(中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体三萜成分的 HPLC 含量测定方法。**方法** 以赤芝孢子酸 A (ganosporeric acid A, 1), 赤芝酸 A (lucidenic acid A, 2), 灵芝酸 B (ganoderic acid B, 3) 和灵芝酸 C (ganoderic acid C, 4) 为对照品; 色谱柱: 反相 C₁₈; 流动相: 乙腈-水 (37:63); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: UV 254 nm。**结果** 进样量在 0.2~1 μg 有良好的线性关系, (1), (2), (3) 和 (4) 的加样回收率分别为 100.9%, 101.2%, 101.3% 和 101.7%。**结论** 本法快速、简便、灵敏和分离度好, 适用于灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体及相关制剂的三萜类物质检查和含量测定。

关键词: 灵芝; 子实体; 孢子粉; 发酵菌丝体; 三萜; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)01-0050-03

Analysis of triterpene constituents from *Ganoderma lucidum*

MA Lin, WU Feng, CHEN Ruo-yun

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Aim** To develop a method for analysis of triterpene constituents in *Ganoderma lucidum* by HPLC. **Methods** Ganosporeric acid A (1), lucidenic acid A (2), ganoderic acid B (3) and ganoderic acid C (4) were used as comparison substances. Chromatographic column was a RP-C₁₈; the mobile phase was acetonitrile-water (37:63); the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detecting wavelength was 254 nm. **Results** A linear range was obtained from 0.2 μg to 1.0 μg with a good linear correlation. The recovery of (1), (2), (3) and (4) were 100.9%, 101.2%, 101.3% and 101.7%, respectively. **Conclusion** This method was developed for the analysis of triterpenes by HPLC for the first time. The method is rapid, accurate and suitable for the analysis of the triterpene constituents in fruit bodies, spores, mycelium from *Ganoderma lucidum*.

Key words: *Ganoderma lucidum*; fruit bodies; spores; mycelium; triterpenoid; HPLC

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst. 为灵芝科灵芝属药用真菌, 始载于汉代《神农本草经》, 列为上品。灵芝属共有 80 多种灵芝, 中国药典 (2000 年版) 规定赤芝 *G. lucidum* 和紫芝 *G. japonica* 为药用正品。灵芝含有多种化学成分, 其中苦味三萜类化合物为灵芝主要有效成分, 具有多种生理活性, 如灵芝酸 (ganoderic acid) A, B, C 和 D 能抑制小鼠肌肉细胞组胺的释放, 灵芝酸 F (ganoderic acid F) 有很强的抑制血管紧张素酶的活性, 赤芝孢子酸 A

(ganosporeric acid A) 则对 CCl₄ 和半乳糖胺及丙酸杆菌造成的小鼠转氨酶升高有降低作用^[1-3]。由于现代栽培技术和发酵技术的发展使灵芝不再是稀有珍品, 灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体在临床上已有广泛的应用, 保健品众多, 但含量分析方法的研究和报道不多。关于三萜酸成分分析丁平等仅报道分析了灵芝酸 B^[4], 马礼金等^[5] 用 HPLC 和 TCL 法对灵芝子实体和菌实体进行比较。灵芝酸 C, 赤芝孢子酸 A 及赤芝酸 A 的含量测定尚未见报道。本文建立了用 HPLC 对不同产地的灵芝子实体、孢子粉、发酵菌丝体进行了 4 种三萜酸含量测定, 可作为评价灵芝质量的方法。

收稿日期: 2002-06-03.

基金项目: “863” 高通量药物筛选系统及多样性资助项目 (2001AA234021).

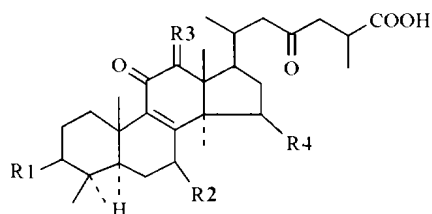
* 通讯作者 Tel: 86-10-63165325, Fax: 86-10-63017757.

E-mail: ruoyunchen@hotmail.com

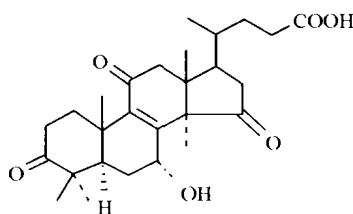
材料与方法

药品及试剂 对照品赤芝孢子酸 A (ganosporeric acid A, 1), 赤芝酸 A (lucidenic acid A, 2), 灵芝酸 B (ganoderic acid B, 3) 和灵芝酸 C (ganoderic acid C, 4) 为本实验室从浙江产赤芝孢子粉中分离制备并经光谱分析鉴定结构, 纯度分别为赤芝孢子酸 A 99.0%, 赤芝酸 A 97.0%、灵芝酸 B 98.0%、灵芝酸 C

98.0%。福建产灵芝子实体由林东星教授赠送, 福建产灵芝孢子粉由林树钱教授赠送, 其余均在产地购买, 由本所岳德超研究员鉴定。乙腈为色谱纯(江苏淮阴塑料制品厂精细化工研究所), 三氯甲烷、甲醇、95%乙醇为分析纯(北京化工厂), 蒸馏水(双蒸)。



Ganoderic acid B: $R_1-R_2-\beta-OH$, R_3-H, R_4-O
 Ganoderic acid C: $R_1=O, R_2=\beta-OH$, $R_3=H, R_4=O$
 Ganosporeric acid A: $R_1-R_2-R_3-R_4=O$



Lucidenic acid A

仪器 高效液相色谱仪 高压泵: 岛津 LC-6A, 进样器: 岛津 SIL-6A, 检测器: 岛津 SPD-6AV, 处理器: SP4600 积分仪。

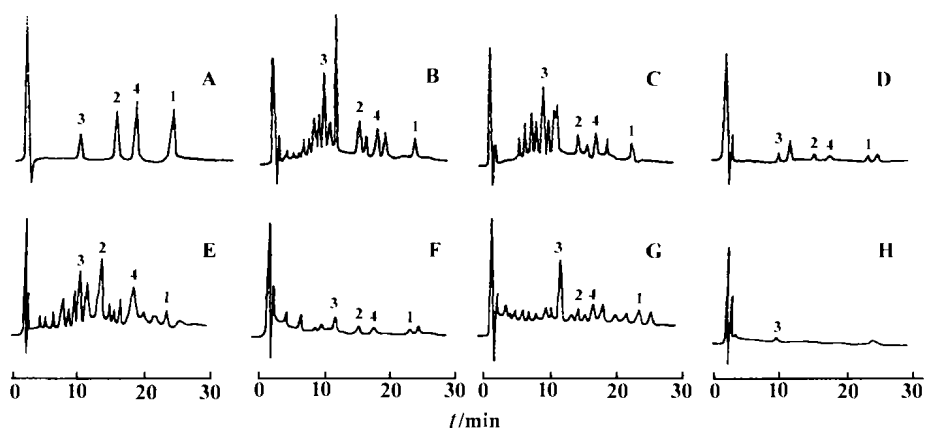
色谱条件 色谱柱: TSK gel ODS 80 TS C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-水 (37:63), 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长 UV: 254 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

结果与讨论

1 线性范围

精密称取上述 4 种标准品各 1 mg, 分别置于 1

mL 量瓶中, 用甲醇定容, 分别吸取 200 μ L 混合后定容于 1 mL 量瓶中, 制备成标准液, 依次吸取 1~5 μ L 进样, 作 HPLC 分析(图 1)。以峰面积对进样量回归处理, 4 种对照品的峰面积与进样量呈良好线性关系, 线性范围 0.2~1.0 μ g。将 4 种对照品进样量 X 与所得峰面积 Y 值进行线性回归, 回归方程分别为: 赤芝孢子酸 A: $Y = 6.5822X - 0.6423$ $r = 0.9999$ 赤芝酸 A: $Y = 1.6061X - 0.0703$ $r = 0.9999$ 灵芝酸 B: $Y = 1.2302X - 0.1269$ $r = 0.9999$ 灵芝酸 C: $Y = 1.8920X + 0.2155$ $r = 0.9999$



A: Standard sample; B: Fruiting bodies (Jiangsu); C: Fruiting bodies (Fujian); D: Spores (Jiangsu); E: Spores (Hebei); F: Spores (Fujian); G: Spores (Fujian break wall rate 85%); H: Mycelium (Shandong). Peak 1: Ganosporeric acid A ($t_R = 24.07$ min); Peak 2: Lucidenic acid A ($t_R = 15.48$ min); Peak 3: Ganoderic acid B ($t_R = 9.84$ min); Peak 4: Ganoderic acid C ($t_R = 18.26$ min)

Figure 1 HPLC chromatogram of samples of *Ganoderma lucidum*

2 提取方法比较

用甲醇、95%乙醇、三氯甲烷等 3 种提取溶剂,

分别冷浸 2, 4, 8, 16 和 24 h, 回流 1, 2 和 4 h 或超声提取 15, 30 和 60 min。结果表明生药以三氯甲烷回

流提取 1 h, 提取率最高, 且样品中杂质干扰较少, 故选用三氯甲烷为提取溶剂。

3 精密度和重复性

在上述色谱条件下将前述 4 种对照品溶液各连续进样 6 次, 每次 5 μ L, HPLC 分析测定峰面积的 RSD 分别为 ganosporeric acid A 1.89%, lucidenic acid A 3.45%, ganoderic acid B 3.20% 和 ganoderic acid C 2.61%。精密称取江苏灵芝子实体 250 mg 样品 6 份, 用三氯甲烷 100 mL 回流提取 1 h, 按上述色谱条件进样分析, 得 RSD 分别为 ganosporeric acid A 0.99%, lucidenic acid A 1.91%, ganoderic acid B 4.21% 和 ganoderic acid C 5.14%。

4 生药样品测定

精密称取生药样品粉末(40 目) 250 mg, 加入三氯甲烷 100 mL 回流提取 1 h, 冷却, 过滤减压回收至干, 加少许甲醇溶解, 定容于 2 mL 量瓶中, 按上述色谱条件进样分析。结果见表 1。

Table 1 Determination of triterpenes (%) from *Ganoderma lucidum*

Sample	Ganosporeric acid A	Lucidenic acid A	Ganoderic acid B	Ganoderic acid C
Fruiting bodies (Jiangsu)	0.06	0.08	0.16	0.09
Fruiting bodies (Fujian)	0.21	0.03	0.13	0.11
Spores (Jiangsu)	0.01	0.01	0.01	Trace
Spores (Hebei)	0.04	0.02	0.04	0.04
Spores (Fujian)	Trace	Trace	Trace	Trace
Spores (Fujian break wall rate 85%)	0.03	0.01	0.02	0.02
Mycelium (Shandong)	-	-	0.01	-

- : Undetected

山东产灵芝发酵菌丝体只检测出灵芝酸 B, 可能与发酵时间短(7 d)有关。

5 加样回收率

精密称取生药样品粉末(40 目筛) 250 mg 3 份, 分别加入一定量的 4 种对照品, 按样品提取方法处理和 HPLC 分析, 结果(1), (2), (3) 和(4) 的回收率分别为 100.9% (RSD 1.2%); 101.2% (RSD 2.4%);

101.3% (RSD 1.2%) 和 101.7% (RSD 4.1%) (表 2)。

Table 2 Recovery and RSD of four comparison samples (n = 3)

Sample	Added/ng	Found/ng	Recovery/%	RSD/%
Ganosporeric acid A	29.60	29.88	100.9	1.2
Lucidenic acid A	26.69	27.01	101.2	2.4
Ganoderic acid B	25.56	25.89	101.3	1.2
Ganoderic acid C	22.24	22.61	101.7	4.1

讨论

初步分析认为福建产灵芝子实体样品中赤芝孢子酸 A、灵芝酸 C 含量高于江苏产灵芝子实体, 赤芝酸 A、灵芝酸 B 含量低于江苏产灵芝子实体。但两地灵芝子实体的总三萜含量基本相同。

灵芝孢子粉 4 种三萜酸含量从高到低依次为河北、江苏、福建; 同为福建产灵芝孢子粉其破壁率为 85% 的孢子粉含量高于未破壁的孢子粉。

灵芝子实体中 4 种三萜酸含量均高于灵芝孢子粉。

References:

- [1] Kiyotata K, Tooru I, Michiko A, et al. Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum* [J]. *Planta Med*, 1997, **63**(3):224-227.
- [2] Kiroshi K, Wakako T, Kiyoe S, et al. The Biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst, histamine release-inhibitory triterpenes [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**(4):1367-1374.
- [3] Chen RY, Yu DQ. Progress in chemical studies on the triterpene constituents of *Ganoderma* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, **25**(12):940-953.
- [4] Ding P, Zhang DY, Xu HH. Determination of ganoderic acid B in different parts of *Ganoderma lucidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, **32**(4):310-312.
- [5] Ma LG, Yao RH. Comparison and Analysis of the acid components from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst by HPLC and TCL [J]. *Edib Fungi China* (中国食用菌), 1998, **17**(1):3-4.