

李福森,郝建宇,王 晶,等. 采用液质联用技术分析灵芝孢子粉提取物中的三萜类化合物[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):230-233.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.054

采用液质联用技术分析灵芝孢子粉 提取物中的三萜类化合物

李福森,郝建宇,王 晶,赵骥民

(长春师范大学生命科学学院,吉林长春 130032)

摘要:以灵芝孢子粉为研究对象,通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)考察不同溶剂对其三萜类化合物的提取效果。应用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)快速对灵芝孢子粉中的三萜类化合物进行初步鉴定。应用超声提取法,分别以甲醇、95%乙醇和异丙醇为提取溶剂对灵芝孢子粉中三萜类化合物进行提取,以 HPLC 分析提取物,考察不同溶剂对有效成分的影响。采用 LC-MS 技术对提取物进行分析,对三萜类化合物进行快速鉴定。结果表明,通过 HPLC 对 3 种不同溶剂提取物进行分析,确定异丙醇为灵芝孢子粉中活性成分最佳的提取溶剂。应用 LC-MS 技术对提取物进行分析,与相关文献进行比对,对其中 15 种三萜类化合物进行快速鉴定。结果表明,异丙醇适合于灵芝孢子粉中三萜类化合物的提取,提取物中含有多多种三萜类化合物,LC-MS 能够快速对提取物中的化合物进行快速的结构鉴定。

关键词:灵芝孢子粉;三萜;高效液相色谱;LC-ESI-MS

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)22-0230-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*)别称仙草,珍贵的药用真菌,属担子菌纲,多孔菌科,灵芝属。灵芝在我国有 2 000 多年的药用历史,根据《神农本草经》记载,灵芝具有补中益气、扶正固本、等功效^[1]。灵芝传统药用部位是子实体,但灵芝孢子是

灵芝生长成熟期从菌盖弹射出来的淡雾状的极其微小的孢子,具有灵芝的遗传活性物质^[2]。近年来,灵芝孢子粉作为灵芝的又一药用部位逐渐被认识和接收。经现代药理验证,灵芝孢子粉具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节、抗炎、保肝、降血脂、降血压、降血糖、抗缺氧能力、神经系统调节等功效^[3-4]。

国内外学者从上世纪 80 年代开始深入研究灵芝的化学成分,迄今为止,已分离出 200 多种化合物^[5]。灵芝孢子粉中的药效成分主要是灵芝多糖、肽类、三萜类、腺嘌呤核苷、硒元素等成分,其中,三萜类化合物是其中的主要药效成分之一。目前,三萜类化合物仍然未被充分利用,主要原因是天然存在的三萜类化合物含量较少,大多数不能被人工合成^[6]。因此,研究灵芝孢子粉三萜化合物具有重要的现实意义。

收稿日期:2018-10-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400453,31500279);吉林省科技厅项目(编号:20170520029JH);吉林省教育厅项目(编号:JJKH20170658KJ);长春师范大学自然基金(编号:2017013)。

作者简介:李福森(1986—),男,吉林通榆人,硕士研究生,研究方向为食用菌菌研究与应用。E-mail:515926363@qq.com。

通信作者:赵骥民,博士,教授,研究方向为繁殖生态学。E-mail:jmz@263.net。

关系分析[J]. 中国烟草科学,2011,32(4):14-18.

[7]王 涛,贺 帆,詹 军,等. 烘烤过程中不同部位烟叶颜色值和主要化学成分的变化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2012,38(2):125-130.

[8]张长云,周淑平,田晓霞,等. 初烤烟叶颜色与化学成分关系分析[J]. 广西农业科学,2007,38(6):621-624.

[9]梁洪波,李念胜,元 建,等. 烤烟烟叶颜色与内在品质的关系[J]. 中国烟草科学,2002,23(1):9-11.

[10]过伟民,魏春阳,张艳玲,等. 烤烟表面颜色的量化及其与胡萝卜素类物质的关系[J]. 烟草科技,2012(1):62-68.

[11]梁太波,张艳玲,尹启生,等. 山东烤烟烟叶颜色量化分析及与多酚和类胡萝卜素含量的关系[J]. 烟草科技,2012(4):67-71.

[12]张 峰,刘江生,刘泽春,等. 近红外透射光谱技术用于烟用香精的品质控制[J]. 中国烟草学报,2009,15(3):12-16.

[13]杜 文,易建华,谭新良,等. 基于近红外光谱的烟叶 SIMCA 模式识别[J]. 中国烟草学报,2009,15(5):1-5.

[14]Chao T, Xin Q, Li M L. Comparison of chemometric methods for

brand classification of cigarettes by near-infrared spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy,2009,51(2):276-282.

[15]魏春阳,李 锋,祁 萌,等. 基于分光光谱仪测量的不同产区烤烟表面颜色分析[J]. 烟草科技,2011(4):67-73.

[16]Zhang J, Sokhansanj S, Wu S, et al. A trainable grading system for tobacco leaves[J]. Computers and Electronics in Agriculture,1997,16(3):231-244.

[17]Ma J Y, Wu T J, Liu R J. Research on tobacco leaves grading based on image processing and fuzzy recognition[Z]. 2011:90-93.

[18]Garcia M, Barreiro P, Ruiz A M, et al. Development of a virtual expert for color classification of tobacco leaves[C]//Proceedings of From Sensors to Decision Support System in Agriculture,1998:105-117.

[19]董高峰,杨 威,张 强,等. 昭通烟区烤烟表面颜色特征分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):353-355.

[20]王改丽,于建军,郑宪滨,等. 烤烟 B2F 等级烟叶表面颜色区域性差异分析[J]. 山东农业科学,2017,49(4):15-20.

以灵芝孢子粉中三萜类化合物为研究对象,考察不同溶剂对有效成分提取效果的影响,并应用液相质谱联用技术对其中的成分进行快速的分析和鉴定,以期为灵芝孢子粉这一药用资源的研究开发提供试验依据。

1 试验方法

1.1 材料与仪器

灵芝孢子粉由吉林省宝源东北特产经销处提供,长春师范大学中心实验室鉴定为多孔菌科药用真菌灵芝(*Ganoderma lucidum*)所产生的孢子粉;甲醇、醋酸等用于色谱分析的试剂均为色谱纯(加拿大 Caledon Laboratories Ltd. 公司);乙醇、异丙醇等用于提取试剂均为分析纯(北京精细化学品有限公司)。

主要仪器有 0.45 μm 滤膜(美国安捷伦公司)、1100 Series HPLC 高效液相色谱(美国安捷伦公司);S180H 超声清洗器(德国 Elma 公司)、BS 124S 电子天平(德国 Sartorius AG)、Thermo LCQ Fleet 离子阱 LC-MS 联用仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 样品提取

精确称取 1.006 3 g 灵芝孢子粉,50 mL 甲醇浸泡 24 h,超声提取 90 min,过滤蒸干后加 2 mL 色谱甲醇溶解,提取物放入 4 ℃ 冰箱中保存,待检测。

精确称取 1.337 5 g 灵芝孢子粉,50 mL 95% 乙醇浸泡 24 h,超声提取 90 min,过滤蒸干后加 2 mL 色谱甲醇溶解,提取物放入 4 ℃ 冰箱中保存,待测。

精确称取 1.006 6 g 灵芝孢子粉,50 mL 异丙醇溶解,超声提取 90 min,蒸干后加 2 mL 色谱甲醇溶解,提取物放入 4 ℃ 冰箱中保存,待测。

1.3 HPLC 分析条件

高效液相色谱为 Agilent 1100,配备四元洗脱泵,脱气阀,自动进样器,二极管阵列检测器(diode-array detector,简称 DAD),柱温箱(Agilent 1200),色谱柱为 Agilent-extend C₁₈(250×4.6 mm,5 μm)。流动相为甲醇(A)和 0.5% 乙酸水溶液(B),所用溶剂经 0.45 μm 滤膜过滤;流速为 1.0 mL/min,运行时间为 30 min,进样量为 10 μL,检测波长 252 nm。HPCL 洗脱梯度如下表 1。

表 1 HPLC 洗脱梯度

时间 (min)	甲醇 (%)	0.5% 乙酸水溶液 (%)	流速 (mL/min)
0	20	80	1.0
10	60	40	1.0
25	80	20	1.0
30	20	80	1.0

1.4 LC-MS 分析条件

利用电喷雾离子阱质谱研究灵芝孢子粉粗提物的三萜类化合物,在负离子模式进行分析。液相色谱(liquid chromatography,简称 LC)分析条件:色谱柱为 Agilent-extend C₁₈(250×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)和 0.5% 乙酸水溶液(B),洗脱梯度如表 2 所示;进样量为 10 μL;检测波长 252 nm。MS 分析条件:负离子模式,鞘气(N₂)流速 40 arb(arbitrary unit),辅助气(N₂)流速 10 arb;毛细管电压为 3.5 kV;毛细管温度为 350 ℃;透镜电压为 110 V。

表 2 LC-MS 洗脱梯度

时间 (min)	乙腈 (%)	0.5% 乙酸水溶液 (%)	流速 (mL/min)
0	40	60	0.5
2	40	60	0.5
10	50	50	0.5
45	90	10	0.5
55	100	0	0.5
60	30	70	0.5

2 结果与讨论

2.1 通过 HPLC 确定最佳提取溶剂

采用甲醇、95% 乙醇、异丙醇等 3 种溶剂对灵芝孢子粉进行提取,将灵芝孢子粉的提取物应用 HPLC-DAD 进行分析,得到不同溶剂提取物的色谱(图 1),其中,95% 乙醇提取物与甲醇提取物的色谱图基本一致,因此,选择甲醇提取物的谱图为代表。

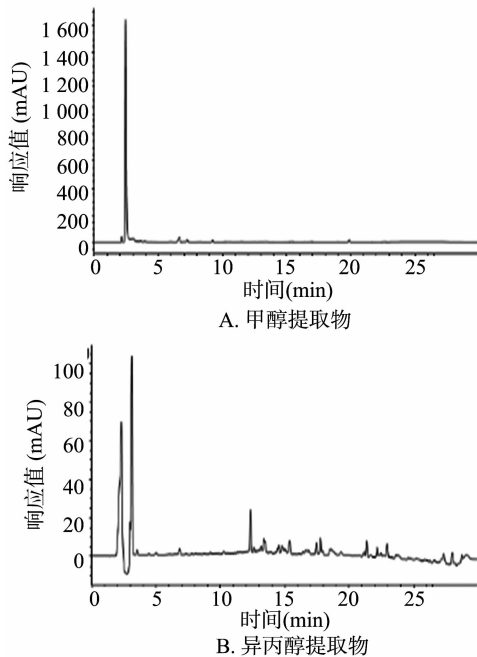


图1 灵芝孢子粉提取物 HPLC 色谱

由图 1 可知,以甲醇作为提取溶剂得到谱图的溶剂峰较高,说明提取物中极性大的杂质较多,而在之后的梯度洗脱过程中没有出现显著的色谱图,说明提取物中三萜类化合物含量较低;而以异丙醇作提取溶剂,得到的谱图中溶剂峰明显降低,说明提取物中的极性杂质含量减少,但在洗脱过程中也出现多个色谱峰,说明以异丙醇为溶剂,对灵芝孢子粉中的三萜类化合物提取效果较好。

2.2 应用 LC-MS 联用仪分析灵芝孢子粉中有效成分

以异丙醇溶液作为提取溶剂,提取灵芝孢子粉中有效成分,并应用 LC-MS 法对灵芝孢子粉中有效成分进行分析,得到 LC-MS 谱图(图 2)。

通过优化液相和色谱的分析条件,对灵芝孢子粉的提取物进行了分析,对数据进行整理,并与文献[6-19]进行对比,

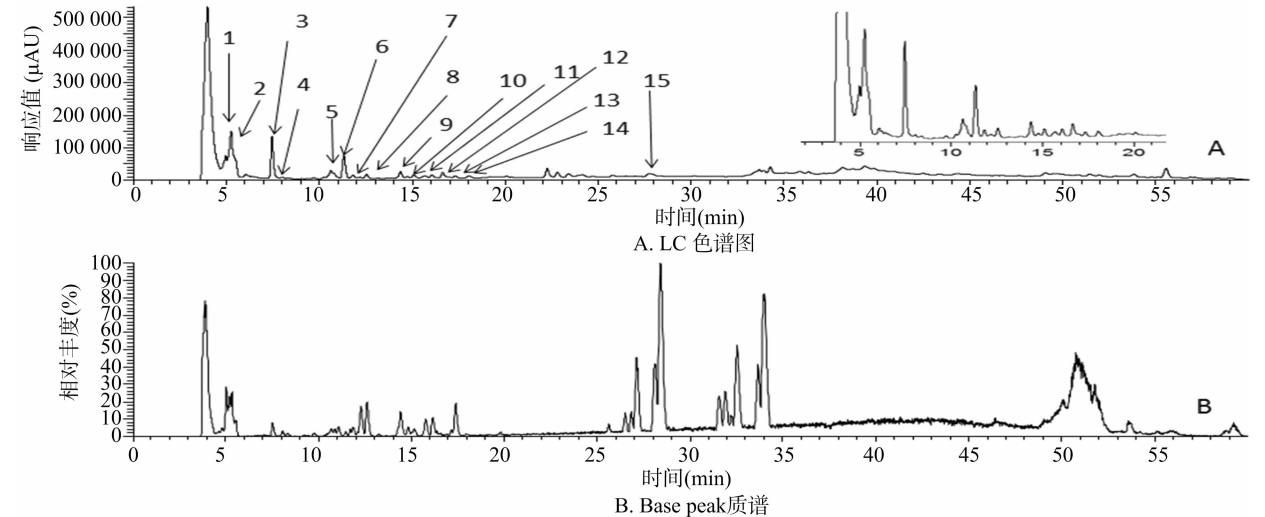


图2 灵芝孢子粉提取物 LC-MS 谱图

对其中 15 个主要的化合物进行了初步定性分析。在图 2 - B 中,主要的[M - H]⁻ 离子峰分别为 *m/z* 454,458,474,476、502,502,508,512,514,528,528,528,528,528,570 的化合物进行多级串联质谱研究,相应化合物的分子量分别为 455、

459,475,477,503,503,509,513,515,529,529,529,529,529、571 u。通过整理质谱所提供的数据,根据化合物的洗脱顺序、保留时间、分子量、质谱信息,得到可能的分子式以及初步鉴定结果见表 3。

表 3 LC-MS 初步分析鉴定灵芝孢子粉中的三萜类化合物

序号	保留时间 (min)	分子量 (u)	ESI-MS[M - H] ⁻ (<i>m/z</i>)	分子式	鉴定结果
1	5.03	503	502	C ₃₁ H ₅₀ O ₅	灵芝醇 I ^[6]
2	5.05	503	502	C ₂₆ H ₄₀ O ₈	赤芝酸 J 甲酯 ^[7]
3	7.67	515	514	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	灵芝酸 C ^[8]
4	7.75	459	458	C ₂₇ H ₃₈ O ₆	赤芝酸 C ^[9]
5	10.95	529	528	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	灵芝酸 V ^[10]
6	11.16	529	528	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	22β - aacetoxy - 2β, 15x - dihydrox - ylanosta - 7, 9 (11), 24 - trien - 26 - oic acid ^[11]
7	11.57	529	528	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	22β - aacetoxy - 2x, 15x - dihydr - oxylanosta - 7, 9 (11), 24 - trien - 26 - oic acid ^[11]
8	12.49	529	528	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	lanosta - 7, 9 (11), 24 - trien - 2β, 15x - dihydroxy - 26 - oic acid ^[12]
9	14.35	529	528	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	赤芝酸 D ^[13]
10	15.07	513	512	C ₃₂ H ₅₀ O ₇	灵芝酸 M ^[14]
11	16.09	475	474	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	赤芝酸 B ^[15]
12	16.60	509	508	C ₃₆ H ₅₀ O ₅	灵芝酸 T ^[16]
13	17.27	455	454	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	赤芝酸 F ^[17]
14	15.80	571	570	C ₃₀ H ₅₀ O ₇	灵芝酸 P ^[18]
15	28.06	477	476	C ₂₈ H ₄₄ O ₆	赤芝酸 M 甲酯 ^[19]

采用 LC-MS 技术分析得到数据,查阅文献对其进行分析,对主要的活性成分进行了初步鉴定,根据文献[9]报道,目前已知的灵芝孢子粉中三萜类化合物的母核可归类为 5 种(图 3)。LC-MS 的试验结果表明,从灵芝孢子粉的异丙醇提取物中初步鉴别了 15 种有效成分,其中的三萜类化合物的结构都属于高度氧化的羊毛甾烷衍生物,其中所含的碳原子分为 C30、C27 和 C24 等 3 大类,在三萜酸的结构中,环上的双键大多位于 Δ8(9)大部分在 C11 位和 C23 位有羧基,而且在 C3、C7、C15 位也有被羧基或羟基所取代。而在三萜醇、醛和过氧化物的结构中,环大多存在 2 个不饱和双键,其位置在 Δ7(8)Δ9(11)位,C11 位和 C23 位不存在羰基,而且环上取

代基明显减少。

3 结论

采用超声提取法,分别以甲醇、95%乙醇、异丙醇为溶剂对灵芝孢子粉中三萜类化合物进行提取,应用 HPLC 法对提取物进行分析,通过对色谱结果进行对比,甲醇和 95%乙醇提取物的色谱图相似,其中溶剂峰较高,极性杂质含量多,三萜类化合物含量较低;异丙醇的色谱图中溶剂峰明显降低,极性杂质少,确定最佳提取溶剂为异丙醇。应用 LC-MS 联用技术对灵芝孢子粉中有效成分进行分析,最后通过与相关文献对比,初步从提取物中确定了灵芝孢子粉中含有灵芝醇 I、

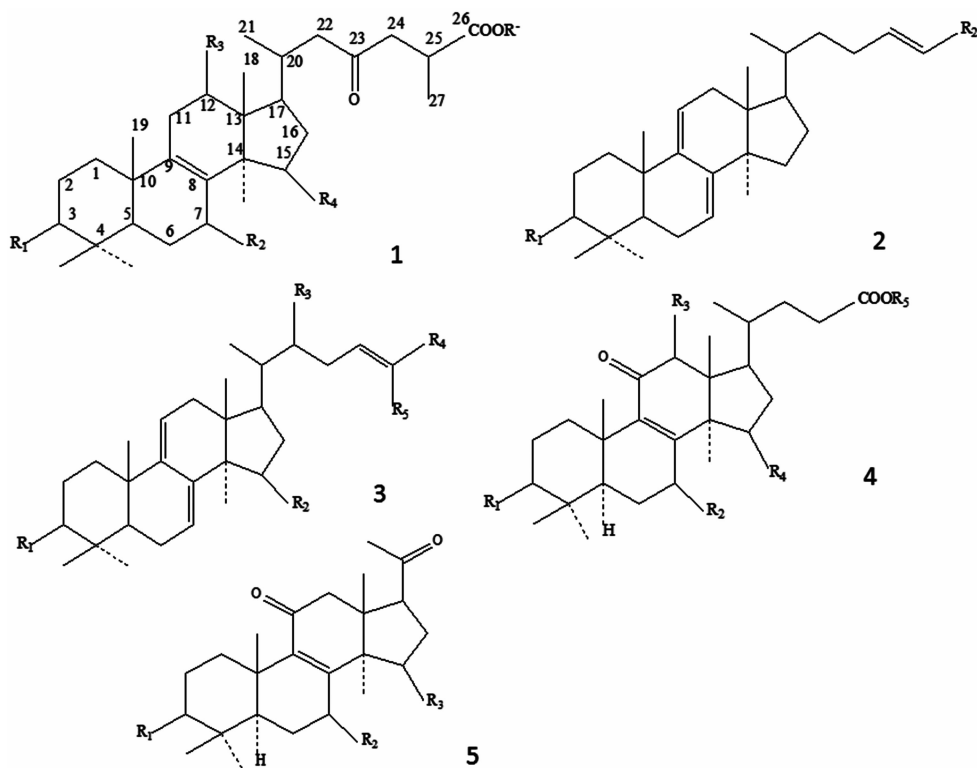


图3 灵芝孢子粉中三萜类化合物的羊毛甾烷母核

赤芝酸 J 甲基、灵芝酸 C、赤芝酸 C、灵芝酸 V、赤芝酸 D、灵芝酸 Mf 等 15 种三萜类化合物。

参考文献:

- [1] 张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用[J]. 国外医药(植物药分册), 2006, 21(4): 152-155.
- [2] 张伟, 曾园山. 灵芝孢子的研究进展[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6): 463-465.
- [3] 张劲松, 贾薇, 邢增涛, 等. 灵芝子实体和菌丝体的提取物及其各纯化组份生物活性的比较[J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 85-92.
- [4] 刘虹, 周甄鸿, 刘志宏. 灵芝孢子粉药理作用研究进展[J]. 天津中医学院学报, 2002, 21(4): 50-51.
- [5] 罗俊, 林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. 药学报, 2002, 37(7): 574-578.
- [6] 李晔, 朱忠敏, 姚渭溪, 等. 灵芝三萜类化合物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 165-171.
- [7] Ma J Y, Ye Q, Hua Y J, et al. New lanos-tanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(1): 72-75.
- [8] Nishitoba T. Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Phytochemistry, 1987, 26(6): 1777-1784.
- [9] 罗俊, 林志彬. 赤芝子实体新三萜化合物的结构鉴定[J]. 药学报, 2001, 36(8): 595-598.
- [10] Tokitomo Y, Ikegami M, Yamanishi T, et al. Effects of withering and mass-rolling processes on the formation of aroma components in Pouchong type semi-fermented tea[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, 48(1): 87-91.
- [11] Anisimov V I, Ivanovskii A L, Likhtenshtein A I, et al. Influence of

structural vacancies on electronic state of interstitial phases[J]. Journal of Structural Chemistry, 1988, 29(1): 1-8.

- [12] Lin L J, Shiao M S, Yeh S F. Seven new triterpenes from *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Natural Products, 1988, 51(5): 918-924.
- [13] Mizushima Y, Takahashi N, Hanashima L, et al. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7: 2047-2052.
- [14] Kikuchi T, Matsuda S, Murai Y, et al. Ganoderic acid G and I and ganolucidic acid A and B, new triterpenoids from *Ganoderma lucidum*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1985, 33(6): 2628-2631.
- [15] Sato H. Ganoderiol a and B, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (reishi) [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1986, 50(11): 2887-2890.
- [16] Nishitoba T, Sato H, Shirasu S, et al. Novel triterpenoids from the mycelial mat at the previous stage of fruiting of *Ganoderma lucidum* [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(2): 619-622.
- [17] Nishitoba T S H, Structure relationship of the triterpenoids from *Ganoderma lucidum* Reishi [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(7): 1791-1795.
- [18] Toshihiro A, Masaaki T, Motohiko U, et al. Oxy-generated lanostane-type triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of natural products, 2005, 68: 559-563.
- [19] Kleinwachter P, Anh N, Kiet T T, et al. Colossolactones, new triterpenoid metabolites from a Vietnamese mushroom *Ganoderma colossus*[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(2): 236-239.