

灵芝提取物3种中性三萜及麦角甾醇的定量分析

金凌云¹, 陈言枳¹, 洪丽玲¹, 郑德辉², 周岩飞¹, 吴长辉^{1*}, 李 晔¹

1. 福建仙芝楼生物科技有限公司 药用菌栽培与深加工国家地方联合工程研究中心 国家食用菌加工技术研发分中心, 福建 福州 350108

2. 福建中医药大学, 福建 福州 350122

摘要: 目的 建立灵芝提取物中中性三萜——灵芝醇A、灵芝醛A、灵芝酮三醇及麦角甾醇的超高效液相色谱(UPLC)定量分析方法及一测多评法。方法 甲醇超声提取法制备灵芝提取物;超高效液相色谱(UPLC)法采用Phenomenex Luna Omega PS C₁₈色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm),流动相为乙腈-0.04%甲酸溶液,梯度洗脱,检测波长254 nm,柱温30 °C;一测多评法应用灵芝醇A作为内参物,计算灵芝醛A、灵芝酮三醇及麦角甾醇的相对校正因子;精密吸取10批灵芝供试品溶液进样检测,比较建立的外标法与一测多评法结果是否一致。结果 4种成分在设定的质量范围内线性关系良好($r \geq 0.9988$),方法的精密度、重复性、稳定性的RSD均小于2.13%,加样回收率在92%~105%、RSD均小于1.99%,准确度良好;灵芝醛A、灵芝酮三醇及麦角甾醇的相对校正因子分别为1.02、0.99、1.80,一测多评法和外标法测定结果差异不大。结论 建立的测定灵芝中灵芝醇A、灵芝醛A、灵芝酮三醇和麦角甾醇UPLC外标法和一测多评法的专属性强,便捷高效,结果准确,适用于灵芝提取物中性三萜的定量分析。

关键词: 灵芝提取物;中性三萜;定量分析;一测多评;超高效液相色谱法;灵芝酮三醇;灵芝醇A;灵芝醛A;麦角甾醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)11-2380-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.11.013

Quantitative analysis of three neutral triterpenoids and ergosterol from *Ganoderma lucidum* extract

JIN Lingyun¹, CHEN Yanjian¹, HONG Liling¹, ZHENG Dehui², ZHOU Yanfei¹, WU Changhui¹, LI Ye¹

1. Fujian Xianzhilou Biological Science&Technology Co.Ltd, Research Center of Medicinal Mushroom Cultivation and Deep Processing of Local National United Engineering, National R&D Branch Center for Edible Fungi Processing, Fuzhou 350108, China

2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis method and QAMS by UPLC for ganoderol A, ganoderal A, ganodermanontriol and ergosterol from *Ganoderma Lucidum* extract. **Methods** The UPLC content determination was performed on a Phenomenex Luna Omega PS C₁₈ chromatographic column (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), with acetonitrile-0.04% formic acid as the mobile phase, the detection wave was set at 254 nm, the column temperature was 30 °C. QAMS used ganoderal A as the internal reference material to calculate the relative correction factors of ganoderal A, ganodermanontriol and ergosterol. Precisely aspirate 10 batches of *Ganoderma lucidum* test solution for injection testing, and compare the results of the established external standard method and QAMS for consistency. **Result** The results showed that the 4 components established a good linear relationship ($r \geq 0.9988$), and the relative standard deviations (RSD) of precision, stability, and repeatability were all less than 2.13%, and the recovery rate was 92%—105%, RSD was less than 1.99%, the accuracy of this method was good. The relative correction factors for ganoderal A, ganodermanontriol and ergosterol were 1.02, 0.99, and 1.80, respectively. There was no significant difference in the results between the one test multiple evaluation method and the external standard method. **Conclusion** The UPLC determination

收稿日期: 2023-06-16

基金项目: 福建省科技计划区域发展项目(2020N3002);福建省技术创新重点攻关及产业化项目(2022G028)

第一作者: 金凌云,女,硕士,工程师,研究方向为食用菌真菌活性成分研究及产品开发。E-mail:yanfa8@xianzhilou.com

*通信作者: 吴长辉,男,硕士,副主任药师,高级工程师,研究方向为灵芝等食用菌的研究。E-mail:qm1@xianzhilou.com

method and QAMS of neutral triterpenoids and ergosterol in this study is specific, simple, efficient and accurate, which is suitable for the quantitative analysis of *Ganoderma* neutral triterpenoids and ergosterol.

Key words: *Ganoderma lucidum* extract; neutral triterpenoids; quantitative analysis; QAMS; ultra-performance liquid chromatography (UPLC); ganodermanontriol; ganoderol A; ganoderal A; ergosterol

灵芝隶属担子菌纲灵芝科灵芝属真菌,是传统的名贵中药,在我国已有两千多年的食药用历史。灵芝始载于《神农本草经》,历代医学典籍中将其列为上品,具有补中益气、扶正固本、延年益寿等功效^[1-2],《中国药典》2020年版中也收录了灵芝(赤芝、紫芝)^[3]。灵芝在临床上可用于护肝镇痛、补气安神、止咳平喘、延缓衰老、提高机体免疫力,并且对恶性肿瘤、肝炎、心血管疾病、糖尿病等临床常见病症也具有良好的作用^[4]。

灵芝中的灵芝多糖、三萜类、核苷、生物碱、氨基酸多肽、微量元素等成分是其药效物质基础,灵芝三萜类化合物是其中比较重要的一类,现代研究也证实了其多种生物活性和药理功效,如调节机体免疫力、保护肝脏、抗肿瘤、抗I型艾滋病病毒(HIV-1)及HIV-1蛋白酶活性、抗组织胺释放、抑制血管紧张素、抗氧化等^[2,5-7]。灵芝三萜通过酸碱萃取的方式可分为酸性三萜(灵芝酸类)和中性三萜(灵芝醇、灵芝醛、灵芝酮类等)2大类^[8],近年来针对灵芝三萜的研究多集中于酸性三萜,中性三萜研究较少。而有研究发现与酸性三萜相比,中性三萜具有更高的药理和生物活性^[9-10],Dai等^[11]的研究发现灵芝中性三萜不仅能抑制增殖期的肿瘤细胞生长,而且能诱导休眠期肿瘤细胞的凋亡。唐庆九等^[10]研究发现灵芝中性三萜部分对多种肿瘤细胞的增殖均有抑制作用,并可诱导肠癌SW620细胞凋亡,体外实验表明灵芝醛A具有较强的抑瘤活性。中性三萜中的灵芝酮三醇也被证实具有抑制HIV-1蛋白酶活性、抑制HIV-1对MT-4细胞的侵袭、抗前列腺肿瘤、保肝等功效^[12-15]。Xu等^[16]和Jedinak等^[17]也发现灵芝酮三醇可抑制人肝癌相关基因的表达及HCT-116、HT-29结肠癌细胞的增殖。

目前灵芝三萜类物质多采用分光光度法进行分析,该方法的专属性较低,干扰物质多,且对照品为齐墩果酸,与灵芝三萜成分结构差异较大,因此测定结果误差较大^[18];也有国内外标准中采用HPLC法进行灵芝三萜类的分析,如《中国药典》《香港中药材标准》^[19]《美国药典》《美国草药典》等,但多集中于灵芝三萜酸类的分析,均未将中性三萜部分纳入。

鉴于目前缺乏较系统的中性三萜分析检测方法,因此建立灵芝中性三萜的分析方法,对其进行定量是十分必要的。本研究选取中性三萜中含量较高且生物活性比较强的几种物质——灵芝醇A、灵芝醛A、灵芝酮三醇进行定量分析,麦角甾醇与三萜类结构近似,《中国药典》2020年版中将“三萜及甾醇”作为灵芝中含量测定的成分进行质量控制,因此本方法中将麦角甾醇的含量也一并列入进行计算。本研究建立测定3种灵芝中性三萜成分及麦角甾醇的超高效液相色谱(UPLC)法;灵芝中性三萜对照品大多未实现高效分离和量产,价格昂贵,本研究同时建立3种灵芝中性三萜成分及麦角甾醇的一测多评法,为灵芝及其相关产品中灵芝中性三萜成分的分析及质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity II型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KQ-300VDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AUY120万分之一电子分析天平(日本岛津公司);SECURA125-1CN十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Direct-Q3UV纯水/超纯水系统[默克密理博实验室设备(上海)有限公司]。

1.2 材料

灵芝醇A(质量分数98.3%,Panphy Chemicals Corporation);灵芝酮三醇(质量分数98.2%,Planta Analytica公司);灵芝醛A(质量分数97.1%,上海诗丹德标准技术服务公司);麦角甾醇(质量分数96.6%,中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯,德国默克公司);甲醇、甲酸(分析纯,广东光华科技股份有限公司);水为超纯水(Direct-Q3UV纯水/超纯水系统制备)。

样品(批号200201、200501、201201、210101、210701、220102、210301、210801、211101、P202211058)为福建仙芝楼生物科技有限公司提供的灵芝醇提取物,所用灵芝经中国科学院微生物研究所庄文颖研究员鉴定为灵芝科真菌灵芝*Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Fr.) Karst.的子实体。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液制备 称取样品 0.5 g 于 50 mL 量瓶中,加入甲醇适量,超声提取 30 min,取出冷却后用甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,滤液为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液制备 灵芝醇 A 对照品溶液:准确称取灵芝醇 A 对照品 5 mg,用甲醇溶解定容至 100 mL,摇匀。该对照品储备液中灵芝醇 A 的质量浓度为 50 μg·mL⁻¹, -18 °C 保存,有效期 3 个月。

混合对照品溶液:分别精密称取灵芝酮三醇、灵芝醇 A、灵芝醛 A、麦角甾醇对照品置于同一量瓶中,甲醇定容制成灵芝酮三醇、灵芝醇 A、灵芝醛 A、麦角甾醇质量浓度均为 0.2 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 液相色谱条件

Phenomenex Luna Omega PS C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.04% 甲酸溶液(B),梯度洗脱,条件见表 1。柱温 30 °C,波长 254 nm,进样量为 10 μL。

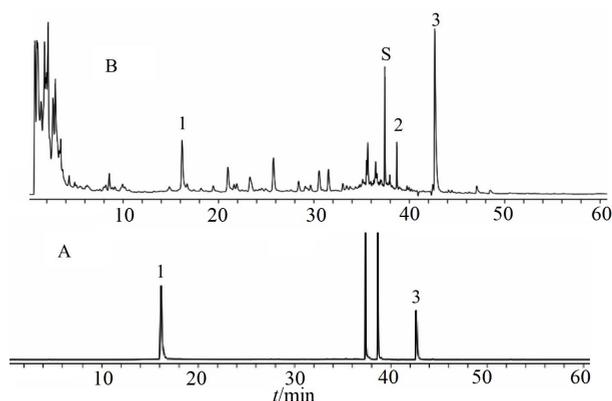
表 1 流动相梯度洗脱时间
Table 1 Gradient elution procedure

t/min	乙腈(A)/%	0.04% 甲酸溶液(B)/%	体积流量/(mL·min ⁻¹)
0	45	55	0.4
20	60	40	0.3
30	70	30	0.3
35	100	0	0.3
60	100	0	0.3
62	45	55	0.4
70	45	55	0.4

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验 取混合对照品(灵芝酮三醇、灵芝醇 A、灵芝醛 A、麦角甾醇)溶液、供试品溶液,按照“2.2”项下色谱条件进样测定,结果显示,4 种待测成分保留时间和峰面积稳定性高(RSD 分别为 0.00%、0.37%),拖尾因子小于 1.2,理论塔板数均大于 10 000。结果见图 1。

2.3.2 线性关系、相对保留时间、相对校正因子考察 将“2.1.2”项中混合对照品溶液进行适当稀释,配制成不同浓度,用 0.22 μm 的微孔膜滤过,照“2.2”项下色谱条件进样分析,进行线性回归。并以灵芝醇 A 为内标,计算灵芝酮三醇、灵芝醛 A 及麦角甾醇



1-灵芝酮三醇;S-灵芝醇 A;2-灵芝醛 A;3-麦角甾醇
1-ganodermanontriol;S-ganoderol A;2-ganoderal A;3-ergosterol
图 1 混合对照品(A)及灵芝提取物样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Ganoderma lucidum* extract (B)

的相对保留时间和相对校正因子。

结果表明 4 种成分在浓度范围内与峰面积均呈良好的线性关系。结果见表 2~4。

表 2 3 种灵芝中性三萜及麦角甾醇的线性关系
Table 2 Linear range investigation of *Ganoderma* neutral triterpenoids and ergosterol

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
灵芝酮三醇	$Y=32.53 X-8.04$	0.999 8	2.236~223.600
灵芝醇 A	$Y=30.07 X+50.14$	0.998 8	2.040~204.000
灵芝醛 A	$Y=29.34 X+47.63$	0.998 9	2.156~215.600
麦角甾醇	$Y=17.54 X+1.81$	0.999 8	2.036~203.600

表 3 灵芝中性三萜及麦角甾醇不同浓度下的相对保留时间
Table 3 Relative retention times of different concentration of *Ganoderma* neutral triterpenoids and ergosterol

灵芝醇 A/(g·mL ⁻¹)	相对保留时间		
	灵芝酮三醇	灵芝醛 A	麦角甾醇
2.04	0.47	1.03	1.15
5.10	0.47	1.03	1.15
10.20	0.47	1.03	1.15
20.40	0.47	1.03	1.15
51.00	0.47	1.03	1.15
102.00	0.47	1.03	1.15
153.00	0.47	1.03	1.15
204.00	0.47	1.03	1.15
平均	0.47	1.03	1.15
RSD/(n=8)	0.07	0.01	0.08

2.3.3 灵芝醇 A 检测限和定量限 采用空白标准偏差法评估检测限(LOD)和定量限(LOQ)。

表4 灵芝中性三萜及麦角甾醇不同浓度下的相对校正因子

灵芝醇 A/(g·mL ⁻¹)	相对校正因子		
	灵芝酮三醇	灵芝醛 A	麦角甾醇
2.04	0.99	1.02	1.79
5.10	0.98	1.03	1.79
10.20	0.99	1.02	1.81
20.40	0.99	1.02	1.78
51.00	0.98	1.03	1.80
102.00	0.99	1.02	1.82
153.00	0.98	1.03	1.79
204.00	0.98	1.02	1.80
平均	0.99	1.02	1.80
RSD/(n=8)	0.54	0.51	0.71

LOD=3 S_b·b⁻¹, LOQ=10 S_b·b⁻¹, 其中 S_b=20 次空白值标准偏差; b=标准曲线斜率。当灵芝提取物取样量为 0.5 g, 定容体积为 50 mL 时, 灵芝醇 A 的 LOD 为 2.27 μg·g⁻¹, LOQ 为 7.58 μg·g⁻¹; 灵芝酮三醇的 LOD 为 3.82 μg·g⁻¹, LOQ 为 12.73 μg·g⁻¹; 灵芝醛 A 的 LOD 为 3.55 μg·g⁻¹, LOQ 为 11.82 μg·g⁻¹; 麦角甾醇的 LOD 为 1.98 μg·g⁻¹, LOQ 为 6.59 μg·g⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取灵芝提取物(批号 P202211058), 按照“2.1.1”项下方法处理, 按照“2.2”项色谱条件, 将供试品溶液连续重复测定 6 次, 灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇各峰面积的 RSD 值均小于 2.01%, 一测多评法计算 3 种中性三萜及麦角甾醇含量的 RSD 为 1.34%, 精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取灵芝提取物(批号 P202211058), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、12、18、24 h 按照“2.2”项色谱条件进样检测, 记录色谱图, 计算灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇各峰面积的 RSD 值均小于 1.39%, 一测多评法计算 3 种中性三萜及麦角甾醇含

量的 RSD 为 1.82%, 24 h 内样品的稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取灵芝提取物(批号 P202211058), 同 1 d 内按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按照“2.2”项色谱条件测定, 计算灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇各峰面积的 RSD 值均小于 2.13%, 一测多评法计算 3 种中性三萜及麦角甾醇含量的 RSD 为 0.59%, 方法的重复性良好。

2.3.7 中间精密度试验 取灵芝提取物(批号 P202211058), 由不同人员按照“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 在不同日期用仪器 1290 Infinity II 高效液相色谱系统按照“2.2”项色谱条件测定, 灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇各峰面积的 RSD 值均小于 1.79%, 一测多评法计算 3 种中性三萜及麦角甾醇含量的 RSD 为 0.66%, 表明方法的中间精密度良好。

2.3.8 回收率试验 取已知灵芝醇 A 含量的灵芝提取物(批号 P202211058) 6 份, 分别加入一定量的灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇对照品溶液, 按照“2.1.1”项下方法处理并按照“2.2”项色谱条件检测。灵芝醇 A、灵芝酮三醇、灵芝醛 A、麦角甾醇的回收率为 92%~105%, RSD 小于 1.99%。

2.3.9 耐用性试验 取灵芝提取物(批号 P202211058), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液(6 份), 取“2.1.2”项的混合对照品溶液, 分别采用不同色谱柱按照“2.2”项色谱条件测定。

从上述结果可以看出, 采用不同的色谱柱, 各成分特征峰与灵芝醇 A 峰的相对保留时间差异不大; 对照品之间的相对校正因子变化也不大(表 5)。供试品的分离效果均良好, 3 种灵芝中性三萜及麦角甾醇质量分数稳定, RSD 为 1.49, 说明该方法的耐用性良好。

方法学验证结果表明, 灵芝提取物中 3 种灵芝中性三萜及麦角甾醇含量测定的 UPLC 法系统适应性、精密度、线性关系、准确度、耐用性等均符合要

表5 不同色谱柱测定的相对保留时间、相对校正因子

Table 5 Relative retention times and relative calibration factors of different columns

待测物	相对保留时间		相对校正因子	
	Luna®Omega 1.6 μm	CORTECS® UPLC® T3	Luna®Omega 1.6 μm	CORTECS® UPLC® T3
	PS C ₁₈	1.6 μm	PS C ₁₈	1.6 μm
灵芝酮三醇	0.47	0.43	0.99	1.00
灵芝醇 A	1.00	1.00	1.00	1.00
灵芝醛 A	1.03	1.03	1.02	1.01
麦角甾醇	1.15	1.14	1.80	1.85

求,该方法稳定、可靠、可行,可以作为灵芝提取物中3种灵芝中性三萜及麦角甾醇含量测定方法。

2.3.10 一测多评法和外标法测定结果比较 精密吸取10批供试品溶液10 μL ,按照“2.2”项色谱条件分别测定样品中灵芝醇A、灵芝酮三醇、灵芝醛A、麦角甾

醇;以灵芝醇A质量浓度为横坐标,相应峰面积为纵坐标,采用单点定量法计算样品中灵芝醇A的含量,再以样品中的灵芝醇A为内参物,采用一测多评法^[20]计算灵芝酮三醇、灵芝醛A和麦角甾醇含量,计算4种成分含量之和。按干燥品计,结果见表6。

表6 一测多评法与外标法测定结果比较

Table 6 Comparison between quantitative analysis of multi-components by singlemarker and external standard method

批次	方法	灵芝酮三醇/%	灵芝醇A/%	灵芝醛A/%	麦角甾醇/%	3种中性三萜及麦角甾醇总和/%
200201	外标法	0.27	0.12	0.06	1.69	2.14
	一测多评法	0.27	0.13	0.07	1.69	2.16
200501	外标法	0.48	0.26	0.07	1.44	2.24
	一测多评	0.49	0.26	0.08	1.43	2.26
201201	外标法	0.30	0.18	0.10	2.06	2.63
	一测多评法	0.30	0.19	0.11	2.05	2.65
210101	外标法	0.46	0.33	0.15	2.03	2.98
	一测多评法	0.46	0.33	0.15	2.03	2.98
210701	外标法	0.40	0.27	0.12	2.44	3.23
	一测多评法	0.40	0.28	0.13	2.43	3.24
220102	外标法	0.27	0.22	0.10	2.09	2.69
	一测多评法	0.28	0.23	0.11	2.09	2.70
210301	外标法	0.60	0.51	0.17	2.07	3.34
	一测多评法	0.61	0.50	0.17	2.07	3.34
210801	外标法	0.48	0.37	0.14	2.51	3.50
	一测多评法	0.49	0.36	0.15	2.50	3.50
211101	外标法	0.49	0.44	0.17	1.97	3.08
	一测多评法	0.50	0.43	0.18	1.97	3.08
P20221	外标法	0.43	0.40	0.14	2.21	3.18
1058	一测多评法	0.43	0.39	0.15	2.21	3.18

从测定结果可以看出一测多评法和外标法测定结果差异不大,用一测多评法测定3种灵芝中性三萜及麦角甾醇的含量是可行的。

3 讨论

按照“2.1.2”项下步骤用甲醇分别配制质量浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的灵芝酮三醇、灵芝醇A、灵芝醛A及麦角甾醇对照品溶液,并按照“2.2”项下条件考察各对照品在光电二极管阵列(PDA)检测器下的吸收波长,结果表明灵芝酮三醇、灵芝醇A、灵芝醛A最大吸收波长均在254 nm;麦角甾醇最大吸收波长在282 nm,254 nm处吸收波长略低,对比麦角甾醇在282 nm与254 nm的计算结果,差异在 $\pm 2\%$ 以内,因此综合考虑选择254 nm波长下的数据进行一测多评法分析计算。

本研究中考察了常用的流动相如水-甲醇体系、水-乙腈体系,在流动相为水-甲醇时,灵芝酮三醇、

灵芝醇A、灵芝醛A及麦角甾醇等几种物质的色谱峰未能达到基线分离,分离效果差,因此采用水-乙腈体系,并根据4种物质的极性差异调整水-乙腈的比例进行梯度洗脱,实现各化合物的色谱峰达到较好的分离效果。因此本研究中选择水-乙腈作为流动相体系进行梯度洗脱,并在流动相中加入0.04%的甲酸,有效改善了峰拖尾现象。

常用的灵芝三萜类提取溶剂有甲醇、乙醇、三氯甲烷等,为了选取最佳提取溶剂,本研究对几种常用溶剂进行了对比分析,灵芝中性三萜及麦角甾醇在甲醇、乙醇中的溶解性最好,提取率最高,因此选择以甲醇或者乙醇为溶剂制备供试品溶液。

本研究通过一测多评法建立了灵芝提取物中3种灵芝中性三萜和麦角甾醇的UPLC检测方法。灵芝酮三醇、灵芝醇A、灵芝醛A及麦角甾醇含量约为灵芝提取物中总三萜的30%,且具有较好药理功

效,开发前景广阔。但灵芝中性三萜的研究明显落后于灵芝酸性三萜,相应的对照品也大多未实现高效分离和量产,价格昂贵,其分析检测存在一定的困难。而采用易得、价廉、有效的一种成分作为内参物,通过一测多评的方法进行多种成分的含量测定,既降低检测成本,又解决了对照品不足的问题,不失为一种事半功倍的方法。本研究也证实了与单一对照品外标法测定结果进行比较无显著差异,用一测多评法测定灵芝中性三萜及麦角甾醇的含量是可行的。

麦角甾醇是广泛存在于真菌内的化合物,是真菌类的特征甾醇。是与三萜类结构近似的一类物质,《中国药典》2020年版中即将“三萜及甾醇”作为灵芝中含量测定的成分进行质量控制,因此本方法中将麦角甾醇的含量也一并列入进行计算。

灵芝三萜类化合物为灵芝发挥抗肿瘤作用的主要物质之一,而多项研究表明中性三萜的抗肿瘤活性优于酸性三萜,有可能是灵芝三萜中发挥抑瘤作用的主要物质。目前从赤芝中分离得到的中性三萜大概有50余种,而赤芝中已发现的酸性三萜已有100余种,中性三萜类还具有较大的研究和开发空间,本研究针对灵芝提取物3种中性三萜建立的UPLC检测方法具有重要的实际意义。方法前处理简便高效,精密稳定,重复性及稳定性好,结果准确度高,可应用于灵芝提取物中性三萜及甾醇类的定量分析,为灵芝提取物的质量评价提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 南婷婷. 灵芝中性三萜组分的制备、质量控制及抗肿瘤活性的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
Nan T T. Study on preparation, quality control and antitumor activity of neutral triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2015.
- [2] 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.
Li Y, Zhu Z M, Yao W X, et al. Study progress on triterpenoids from *Ganoderma lucidum* [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(2): 165-171.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [4] 王晔. 菌灵芝的药理作用和临床应用 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(1): 252-253.
Wang Y. Pharmacological action and clinical application of *Ganoderma lucidum* [J]. Guide China Med, 2013, 11(1): 252-253.
- [5] 刘维, 虎虓真, 朱莉, 等. 灵芝三萜的研究与应用进展 [J]. 食品科学, 2019, 40(5): 309-315.
Liu W, Hu X Z, Zhu L, et al. Recent progress in research and application of *Ganoderma lucidum* triterpenoids [J]. Food Sci, 2019, 40(5): 309-315.
- [6] 李国华, 李晔, 梅锡玲, 等. 灵芝三萜类化合物研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1858-1862.
Li G H, Li Y, Mei X L, et al. Study progress on triterpenoids in *Ganoderma lucidum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(12): 1858-1862.
- [7] Smina T P, Nitha B, Devasagayam T P, et al. *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals [J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2017, 813: 45-51.
- [8] 朱忠敏. 亚临界水提取灵芝酸性和中性三萜的工艺研究 [J]. 食药菌, 2021, 29(4): 334-339.
Zhu Z M. Study on acidic and neutral triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by subcritical water extraction [J]. Edible Med Mushrooms, 2021, 29(4): 334-339.
- [9] Li P, Liu L X, Huang S, et al. Anti-cancer effects of a neutral triterpene fraction from *Ganoderma lucidum* and its active constituents on SW620 human colorectal cancer cells [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(2): 237-244.
- [10] 唐庆九, 季哲, 郝瑞霞, 等. 灵芝中性三萜类成分的抗肿瘤作用 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 60-64.
Tang Q J, Ji Z, Hao R X, et al. Inhibition of tumor cell proliferation by a neutral triterpenoid fraction from *Ganoderma lucidum* [J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(1): 60-64.
- [11] Dai J, Miller M A, Everetts N J, et al. Elimination of quiescent slow-cycling cells via reducing quiescence depth by natural compounds purified from *Ganoderma lucidum* [J]. Oncotarget, 2017, 8(8): 13770-13781.
- [12] Lin C N, Tome W P, Won S J. Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum* [J]. J Nat Prod, 1991, 54(4): 998-1002.
- [13] 岳亚文, 田振, 张劲松, 等. 利用高速逆流色谱技术制备灵芝酮三醇 [J]. 食用菌学报, 2020, 27(2): 77-83.
Yue Y W, Tian Z, Zhang J S, et al. Preparative isolation of ganodermanontriol from *Ganoderma lucidum* by high-speed countercurrent chromatography [J]. Acta Edulis Fungi, 2020, 27(2): 77-83.
- [14] el-Mekkawy S, Meselhy M R, Nakamura N, et al. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(6): 2385-2390.

- 1651-1657.
- [15] 章慧, 张劲松, 冯娜, 等. 灵芝酮三醇对人前列腺癌细胞 LNCaP 生长的影响及其对 5 α -还原酶的抑制作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(10): 1416-1419.
- Zhang H, Zhang J S, Feng N, et al. Effect of ganodermanontriol on the LNCaP cell and 5 α -reductase [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(10): 1416-1419.
- [16] Xu C K, Guo H B, Kong D L, et al. Ganodermanontriol inhibits expression of special AT rich sequence binding protein 1 gene in human hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(Supplement): S964-S968.
- [17] Jedinak A, Thyagarajan-Sahu A, Jiang J H, et al. Ganodermanontriol, a lanostanoid triterpene from *Ganoderma lucidum*, suppresses growth of colon cancer cells through β -catenin signaling [J]. Int J Oncol, 2011, 38 (3): 761-767.
- [18] 张忠, 张劲松, 刘艳芳, 等. 分光光度法测定灵芝中总三萜含量方法探讨 [J]. 上海农业学报, 2016, 32 (1): 61-65.
- Zhang Z, Zhang J S, Liu Y F, et al. Discussion on the determination of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* by spectrophotometry [J]. Acta Agric Shanghai, 2016, 32(1): 61-65.
- [19] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准. 第九册 [S]. 2019: 99.
- Department of Health of the Hong Kong Special Administrative Region of the People's Republic of China Hong Kong. Traditional Chinese Medicine Standards Volume 9 [S]. 2019: 99.
- [20] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- Wang Z M, Qian Z Z, Zhang Q W, et al. Technical guide for the establishment of one test and multiple evaluation method [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(6): 657-658.

[责任编辑 兰新新]