

高效液相色谱 - 大气压化学电离质谱法分析 赤芝中的三萜类成分

陈军辉^{1,2}, 刘 劫³, 吴凤琪², 黎先春², 王小如^{2,3,*}

(1.中国海洋大学化学化工学院, 山东 青岛 266003;

2.国家海洋局第一海洋研究所, 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061;

3.厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘 要: 采用反相高效液相色谱-二极管阵列检测器(RP-HPLC-DAD)和大气压化学电离质谱(APCI-MS)联用技术, 分析赤芝中含有的三萜类化合物。使用反相 C₁₈ 色谱柱, 以乙腈和水(含 2% 冰醋酸)为流动相梯度洗脱, 流速为 0.8ml/min, 室温下, 色谱检测波长 253nm; 用 DAD 检测器记录各个色谱峰的紫外吸收光谱, 采用 APCI-MS 进行在线同步分析, 记录 TIC 总离子流色谱图和各个色谱峰的质谱图, 通过紫外光谱及质谱分析与文献对照初步鉴定了赤芝中的 32 个三萜类成分。

关键词: 赤芝; 三萜; 高效液相色谱; 大气压化学电离质谱

Primary Identification of Triterpene Compounds in Chizhi (*Ganoderma lucidum*) by HPLC-APCI-MS

CHEN Jun-hui^{1,2}, LIU Jie³, WU Feng-qi², LEE Frank Sen-Chun², WANG Xiao-ru^{2,3,*}

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China ;

2.Qingdao Key Laboratory on Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography, State Oceanic Administration of People's Republic of China, Qingdao 266061, China ; 3.Key Laboratory of

Analytical Science, Ministry of Education, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : High performance liquid chromatography (HPLC)-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) was applied to analyze the triterpenoids in extracts of *Ganoderma lucidum*. The extraction conditions are: Hypersil C₄ (4.6 mm × 150 mm) column with gradient elution with acetonitrile and water (2.0% acetic acid) as mobile phase, flow-rate 0.8 ml/min, and room temperature about 25 °C. The detection wavelength is 253 nm and the UV spectra of peaks are obtained

收稿日期: 2006-07-31

* 通讯作者

基金项目: 青岛“2004 将才计划”项目(04-3-JJ-11); 共建生物医药研发测试中心资助项目(LS-05-KJZX-76)

作者简介: 陈军辉(1978-), 男, 博士研究生, 主要从事天然产物质谱分析研究。

浓度为 1.0 μg/kg 的孔雀石绿-无色孔雀石绿混合标样溶液(含量以孔雀石绿计), 分别进行六次平行测定, 结果见表 1。

3 结 论

应用该方法对数十个样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿进行测定, 检出的所有阳性样品均经过液相色谱-质谱联用法验证, 结果准确无误。由此可见, 该方法以孔雀石绿的代谢物无色孔雀石绿为标记物检测孔雀石绿总量, 具有定性准确、灵敏度高的特点, 尤其在低

残留量样品的检测中, 优势明显。

参考文献:

- [1] GB/T19857 - 2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定[S].
- [2] SC/T3021 - 2004 水产品中孔雀石绿残留量的测定[S].
- [3] SN/T1479 - 2004 进出口水产品中孔雀石绿残留量的测定方法[S].
- [4] KAMILA MITROWSKA, ANDRZEJ POSYNIK, JAN ZMUDZKI. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1089: 187-192.

with a photodiode array detector (DAD). On-line APCI-MS in positive and negative mode was used to get the mass spectrum of the analyte. Thirty-two components of *Ganoderma lucidum* are primarily identified by comparison of the UV spectra and mass spectrum according to published literatures.

Key words: *Ganoderma lucidum*; triterpenoids; HPLC; APCI-MS

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0367-06

灵芝(*Ganoderma Lucidum*)是担子菌纲,多孔菌科,灵芝属(*Ganoderma karst*)真菌,常用其子实体,是一种药用真菌^[1]。我国现有灵芝菌科真菌100种,归属于灵芝属69种,假芝属29种,鸡冠孢子属1种和网孢子属1种,主要分布于云、贵、冀、吉、苏、浙、闽、琼、台湾等地^[1-2],主要有灵芝(又名赤芝、红芝)、紫灵芝、薄盖灵芝、树舌灵芝、云芝等,其中赤芝药理作用最强对其研究也最为广泛,而在《中华人民共和国药典》上收录的作为药材灵芝来源的是赤芝和紫芝的干燥子实体^[3]。三萜类化合物是灵芝的主要化学成分之一,到目前为止已先后从赤芝子实体、孢子粉、松杉等灵芝中分离得到了130多种三萜类化合物,其中最主要的三萜类成分是灵芝酸^[4-6]。由于三萜类化合物化学结构的多样性,使其具有较广泛的药理活性,罗俊等^[7]对灵芝三萜类化合物药理作用进行了总结,具有保肝、抗肿瘤、抗HIV-1及HIV-1蛋白酶活性、抑制组胺释放、抑制血管紧张素转化酶(ACE)、抑制胆固醇合成等作用。

目前,用于研究灵芝三萜类成分的方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)^[8-11]、薄层色谱法(TLC)^[12-13]、紫外比色法(UV)^[14]等。由于灵芝三萜类成分有100多种,标准品难以获得,所以对灵芝中三萜类成分的定性定量分析仍然存在着困难。近年来,液相色谱-质谱联用技术的成熟发展,为天然产物中化合物的定性定量分析提供了强有力的工具^[15-17]。本实验以HPLC-APCI-MS联用,对赤芝氯仿提取物中的三萜类成分进行了定性分析,通过紫外光谱分析以及质谱分析与文献对照,对赤芝中的部分三萜成分进行了初步鉴定,为建立灵芝药材的指纹图谱奠定了一定的实验基础。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器、原料与试剂

Agilent 1100 LC/MSD 液相色谱-质谱(单级四极杆)联用仪 美国 Agilent 公司; DAD 检测器、自动进样器; 超声波清洗器(As5150A)。

黄山产野生赤芝样品。乙腈、甲酸(色谱纯) 默克公司; 氯仿、乙醇、等均为分析纯; 实验中所用溶液均用 Milli-Q 超纯水配制。

1.2 HPLC 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 × 150mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈(A)和 2.0% 的乙酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱; 流速为 0.8ml/min; 检测波长为 253nm, 室温; 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 40min, 25% ~ 31% A; 40 ~ 60min, 31% ~ 50% A; 60 ~ 80min, 50% ~ 70% A; 80 ~ 110min, 70% ~ 100%; 110 ~ 140min, 100% A。

1.3 HPLC-APCI-MS 条件

高效液相色谱与大气压化学电离质谱联用的色谱条件与 1.2 所述的高效液相色谱分离条件一致。质谱条件如下: 大气压化学电离(APCI)源, 正、负离子模式检测, 喷雾气压 50psi, 干燥气(N₂)流速 5.0L/min, 干燥气体温度 330 °C, 气化室温度为 350 °C, 毛细管电压 +4000 和 -3000V, 电晕放电电流正离子模式为 4.0 μA, 负离子模式为 15 μA, 破碎电压(fragmentor)为 100V; 全扫描(scan)质荷比(m/z)范围为 150 ~ 1000。

1.4 供试品溶液的制备

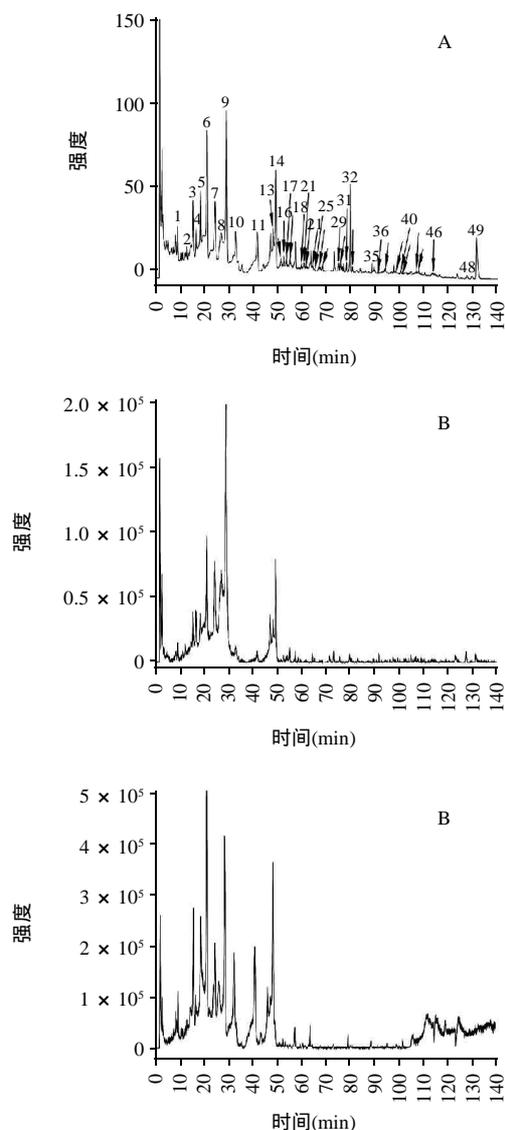
准确称取赤芝样品 0.50g, 置于 50ml 烧杯中, 加入 氯仿 30ml, 超声波辅助提取 30min, 过滤, 滤渣中加入 20ml 氯仿重复提取一次, 过滤, 合并两次所得滤液, 经旋转蒸发器真空浓缩至干, 用乙醇溶解定容至 3ml, 过 0.45 μm 滤膜后作为供试样品溶液。

2 结果与分析

2.1 赤芝中三萜类化合物的色谱分离

由于灵芝中的三萜类成分种类繁多, 依据结构、官能团不同可以分为灵芝酸(ganoderic acid)、灵芝酸甲酯(methyl ganoderate)、灵芝孢子酸(ganosporeric acid)等, 在反相 C₁₈ 柱上的保留作用差异较大, 所以采用等度洗脱不能得到满意的分离效果。经反复实验, 采用乙腈-水(含 2.0% 的乙酸)二元溶剂系统梯度洗脱可以达到较为理想的分离效果。据文献报道^[4,6,9], 灵芝三萜类化合物紫外光谱中的特征吸收主要在: 237、243、253、365nm 处, 故本实验采用 UV 253nm 进行在线检测。笔者对流动相中酸的影响进行了考察, 结果表明, 水中加入 2.0% 的乙酸可以提高三萜类化合物的分离度, 峰型也有所改善, 还可以提高 APCI-MS 分析三萜类成分所产生的质谱信号强度, 与文献^[9 ~ 10]的实验结果一致。由于灵芝中三萜类成分复杂, 所以实验所建立的梯度洗脱程序不可能使每个峰都达到基线分离, 本实验

所采用的流动相系统兼顾了液相色谱和液-质联用两者的分离要求,在运行 140min 的条件下,基本能使各组分分离,液相色谱图和大气压化学电离质谱正、负离子模式总离子流色谱图(TIC)见图 1。



A.赤芝中三萜类化合物的HPLC 色谱图;B.大气压化学电离质谱正离子模式总离子流图;C.大气压化学电离质谱负离子模式总离子流图。

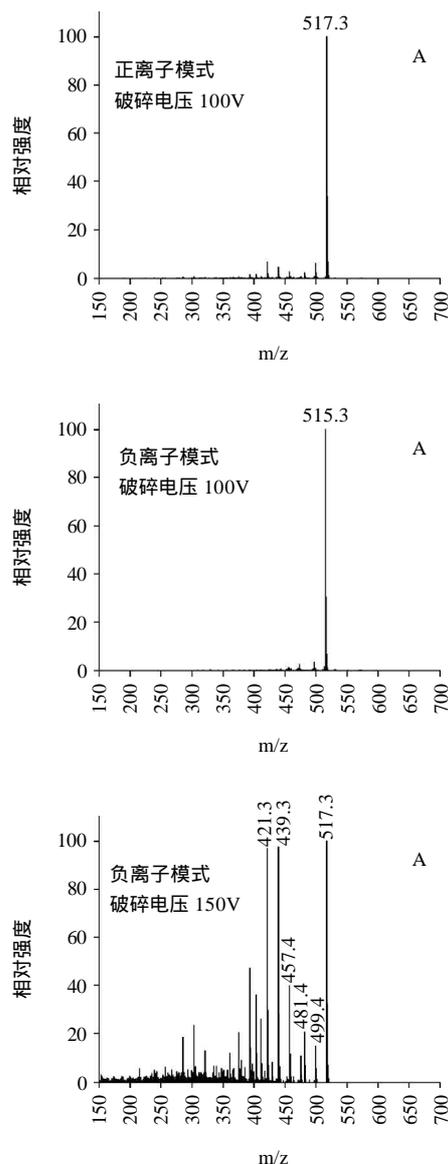
图1 赤芝中三萜类化合物的HPLC 色谱图和大气压化学电离质谱正负离子模式总离子流图

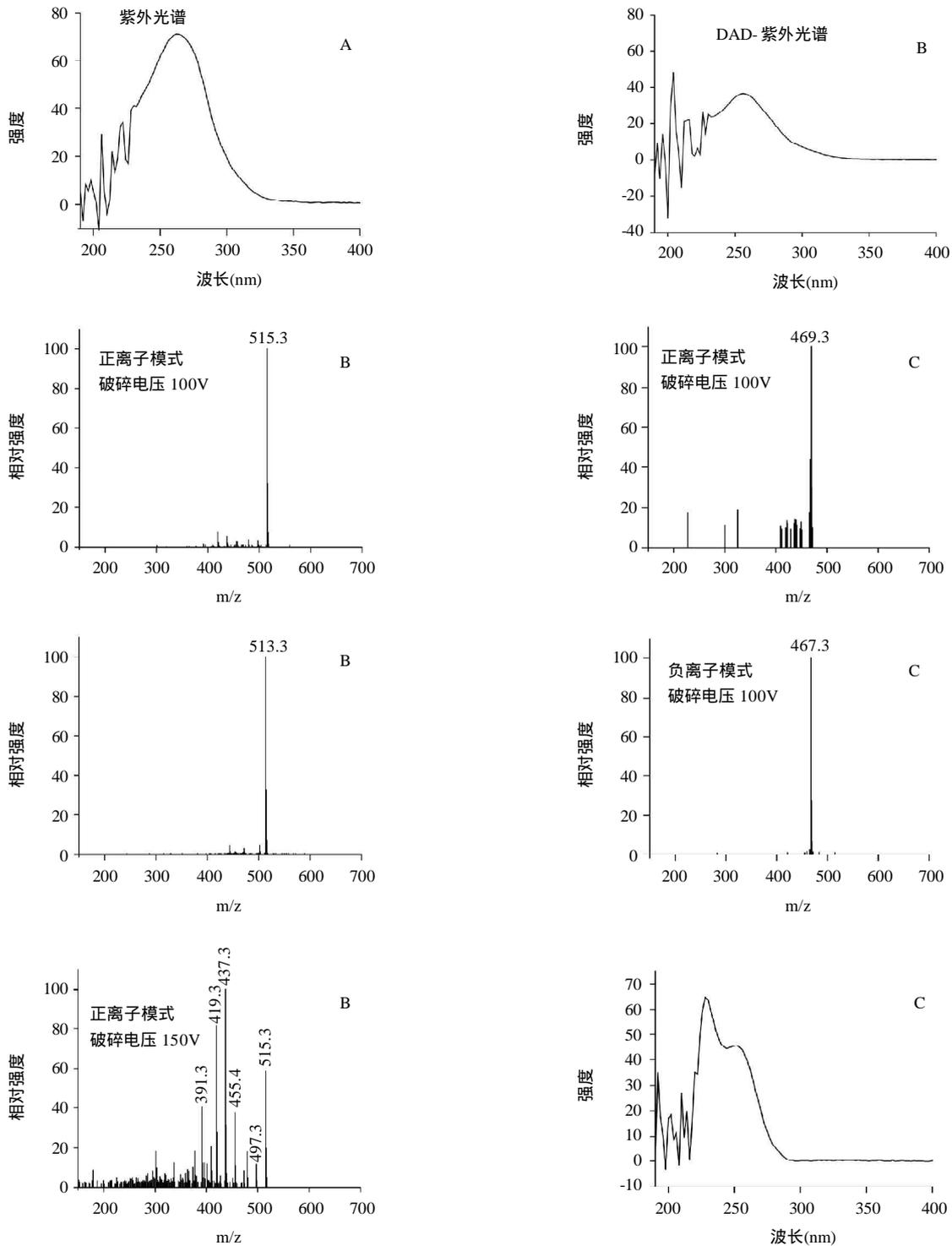
Fig.1 HPLC and mass spectrometric total ion chromatogram in positive or negative mode diagrams of triterpenes extract of *Ganoderma Lucidum*

2.2 赤芝提取物中三萜类成分的初步鉴定

在全扫描正、负离子电离模式下,赤芝样品提取物经液相色谱柱分离,对其进行了APCI-MS在线分析。结果表明:在APCI正离子模式和负离子模式下,大部分化合物均能产生良好的质谱信号,结果见图1B和C,

采用正离子模式和负离子模式分析,两种模式下产生的碎片离子不同,在确定化合物的分子量的过程中可以相互印证。在APCI正离子电离模式下,采用不同的破碎电压(fragmentor)进行了实验,结果表明,破碎电压的变化对大多数色谱峰的质谱分析结果影响较大,破碎电压在50~100V时,质谱图较为简单,当破碎电压增加到150V时,图谱中的碎片离子峰明显增多。从图1可以看出,图1A中峰9、14、32为赤芝三萜类化合物中含量较高的3个成分,且保留时间差异明显可以代表不同保留时间段内的化合物,所以以此3个化合物为例对质谱分析结果进行解释。从图2A(峰9的质谱和DAD扫描紫外光谱图)可以看出,在APCI正、负离子模式(破碎电压为100V)下分别产生了 m/z 517.3 $[M+H]^+$ 和515.3 $[M-H]^-$ 的准分子峰,推测其分子量为516.2,而在正离子模式下将破碎电压增加到150V时碎片离子明显增





A.峰9的APCI-MS质谱图与DAD扫描紫外光谱图; B.峰14的APCI-MS质谱图与DAD扫描紫外光谱图; C.峰32的APCI-MS质谱图与DAD扫描紫外光谱图。

图2 峰9、14和32的APCI-MS质谱图与DAD扫描紫外光谱图

Fig.2 APCI-MS and DAD spectra of peak 9 (A), peak 14 (B) and peak 32 (C)

多;从图2A中该化合物的DAD扫描紫外光谱图可以看出,最大吸收在255nm左右,可以进一步证明该化合物为三萜类化合物。图2B(峰14的质谱和DAD扫描紫外光谱图)和C(峰32的质谱和DAD扫描紫外光谱图)的结

果与图2A相似。

图1中49个主要成分的保留时间(R_t)、质谱分析主要碎片峰、初步推测所得的分子量、分子式及可能的化合物名称见表1,通过与文献对照,可以初步确定其

表1 赤芝三萜类化合物各色谱峰的质谱鉴定
Table 1 Results of triterpene compounds in Chizhi identified by APCI-MS

峰	保留时间(min)	正离子	负离子	分子量	分子式	化合物名称	文献
1	9.02	459.3	475.3	476.3	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	内酯	[4,6]
2	12.11	475.2, 533.3	473.2, 531.3	532.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	Ganoderic acid, Methyl lucidenates P	[6]
3	15.29	475.3, 445.3	473.3, 443.3	474.3	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	Lucidenic acid B	[4]
4	16.53	475.3	473.3	474.3	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	Lucidenic acid E1	[4]
5	18.32	459.2, 473.2, 517.2	459.3, 475.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderic acid A	[4]
6	20.94	443.3, 425.2, 517.2	459.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderic acid B	[4]
7	24.34	459.3, 517.3, 501.3	51.7.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderic acid	[6]
8	26.74	517.3, 473.3	515.3, 471.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderic acid	[6]
9	28.95	517.3	515.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderic acid	[6]
10	32.69	443.3, 517.3, 473.2	515.3, 473.3	516.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	Ganoderenic acid C	[4]
11	41.60	441.2, 459.3, 423.3	457.3	458.3	C ₂₇ H ₃₈ O ₆	Lucidenic acid A	[4]
12	47.08	515.2, 457.2	513.3, 455.3	514.3	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	Ganoderic acid C	[4]
13	48.15	515.2, 485.3, 467.3	513.3	514.3	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	Ganoderic acid LM2	[4]
14	49.20	515.2	513.3	514.3	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	Ganoderic acid	[4]
15	52.43	483.2, 541.3, 465.2	499.3, 557.3	558.3		Unknown	
16	53.49	541.3, 523.2, 499.3	557.3, 501.3	558.3		Unknown	
17	54.11	499.3, 557.2	555.3	556.3	C ₃₄ H ₅₂ O ₆	A	[4]
18	55.04	557.2, 445.3	555.3, 443.3	556.3	C ₃₄ H ₅₂ O ₆	Unknown	
19	57.33	487.3, 469.3	485.3	486.3	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	Methyl lucidenate K	[4]
20	59.68	475.3, 457.2, 431.3		474.3	C ₂₈ H ₄₂ O ₆	Methyl lucidenates Q	[6]
21	60.80		497.4	498.3	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	Ganolucidic acid E	[4]
22	61.43		553.4, 485.4	554.4	C ₃₄ H ₅₀ O ₆	Ganoderic acid Me, Ganoderic acid R	
23	63.69	485.3	483.3	484.3		Unknown	
24	64.19	344.3	483.4, 527.3	528.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	Ganoderic acid	[6]
25	65.21	346.3, 449.4	501.5, 529.3	530.3	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	Ganoderic acid	[6]
26	67.41	473.4, 453.4		472.3	C ₂₈ H ₄₀ O ₆	Methyl lucidenate A	[18]
27	68.29	485.3, 358.3	483.5, 515.5	516.4	C ₃₁ H ₄₈ O ₆	Methyl ganolucidate B	[4]
28	73.13	471.3, 453.3, 279.3	295.2, 525.3	526.3	C ₃₁ H ₄₂ O ₇	Methyl ganoderate E	[4]
29	74.95	439.3, 451.2, 471.3		470.3	C ₂₈ H ₃₈ O ₆	Methyl lucidenate F	[4]
30	75.79	457.4, 439.4		456.4	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Ganoderatriol, Ganodermanondiol	
						Epoxyganoderiol C	[4]
31	78.19	471.4, 277.3		470.4	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	Ganoderiol B	[4]
32	79.69	469.3	467.3	468.3	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	Ganoderic acid DM	[6]
33	80.62	393.3, 411.3, 546.3				Unknown	
34	83.85	455.3		454.3	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	Ganoderal B, Ganoderic acid Y	[4]
35	88.63		271.3, 509.5	510.5		Unknown	
36	91.80	377.3, 395.3, 425.2				Unknown	
37	93.90	459.2, 315.2				Unknown	
38	97.62	427.2, 443.3, 391.2				Unknown	
39	98.45	423.4, 405.2, 391.4				Unknown	
40	100.47	409.5, 443.5				Unknown	
41	101.20	409.4, 391.3	515.4	516.4	C ₃₁ H ₄₈ O ₆	Methyl ganolucidate B	[4]
42	104.65	284.3, 427.4, 407.4				Unknown	
43	106.83	441.4				Unknown	
44	107.10	411.5, 391.4				Unknown	
45	110.20	338.4, 601.5				Unknown	
46	113.66	603.6, 577.6			C ₃₆ H ₅₈ O ₇	Diacetate ganoderiol C	[4]
47	123.53	710.5				Unknown	
48	127.60	393.3, 601.4				Unknown	
49	131.51	379.3, 393.3, 601.5				Unknown	

注: A 为 3, 15 -Diacetylanosta-8, 24-dien-26-oic acid.

中的 32 个峰是已有文献报道的灵芝三萜类化合物。由于灵芝中三萜类化合物种类繁多,有很多化合物是同分异构体,所以在没有标准品的情况下,只通过紫外光谱和单级四极杆质谱分析并不能区分同分异构体。表 1 第 7 列中所列的化合物名称并不表示所对应的各峰的化合物实际名称,因为大部分化合物具有相同的分子量而实际上不是同一个化合物。例如峰 5 ~ 10 的分子式均为 $C_{30}H_{44}O_7$, 第 7 列的化合物名称只表示峰 5 ~ 10 可能为这几种化合物,而与这几个化合物名称列出的顺序无关。

采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱联用技术可以成功的分析鉴定灵芝中的三萜类化合物,采用 APCI-MS 分析灵芝中的三萜类化合物,质谱信号强度较高,所得的质谱图简单易解析,说明 APCI 离子源是灵芝中三萜类化合物质谱分析的强有力工具。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 2版. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [2] 赵继鼎. 中国灵芝科真菌资源与分布[J]. 真菌学报, 1992(1): 56-62.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 130.
- [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] 曾祥丽, 包海鹰. 灵芝三萜类成分与药理学研究进展[J]. 菌物研究, 2004, 2(1): 68-77.
- [6] 高建莉, 禹志领, 李绍平, 等. 灵芝三萜类成分研究进展[J]. 中国食用菌, 2005, 24(4): 6-11.
- [7] 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.
- [8] 丁平, 张丹雁, 徐鸿华. RP-HPLC 法测定不同部位灵芝中灵芝酸 B 的含量[J]. 中草药, 2001(4): 310-312.
- [9] CHEN Deng-hai, KUANG-DEE CHE W. Determination of ganoeric acids in triterpenoid constituents of ganoderma tsugae[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2003, 11(3): 195-201.
- [10] GAO Jiang-jiang, NAKAMURA N, MIN Byung-sun, et al. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma products*[J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(6): 688-695.
- [11] WANG Xiao-ming, YANG Min, GUAN Shu-hong, et al. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006.
- [12] 李平作, 夏结红, 章克昌. 灵芝深层发酵产物中四环三萜酸性分析[J]. 中草药, 1999, 30(8): 584-586.
- [13] 王江海, 袁建平, 徐世平, 等. 薄层色谱-光度法测定灵芝孢子油中的总三萜含量[J]. 中国食品学报, 2004, 4(3): 76-79.
- [14] 黄书铭, 杨新林, 黄健, 等. 紫外分光光度法快速测定灵芝样品中三萜类化合物的含量[J]. 北京理工大学学报, 2004, 24(6): 555-558.
- [15] MIAO Feng-ping, LU Da-yan, LI Ye-guang, et al. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2006.
- [16] 杨克迪, 陈钧, 欧阳臻, 等. 高效液相色谱/大气压化学电离质谱分析银杏中聚戊烯醇化合物[J]. 分析化学, 2003, 31(8): 937-940.
- [17] 金郁, 肖珊珊, 孙毓庆. 高效液相色谱/二极管阵列检测/质谱/质谱(HPLC/DAD/MS²)联用在板蓝根注射液成分鉴定中的应用[J]. 色谱, 2003, 21(6): 558-561.
- [18] 普琼惠, 陈虹, 陈若芸. 松杉灵芝的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(4): 502-504.

信息

在食物中添加叶酸将帮助治疗抑郁症

来自 York 大学和 Hull York 医学院的科学家们最近发现,在抑郁症和叶酸水平过低之间存在联系,叶酸是一种主要来自蔬菜的维生素。

发表于 7 月份《Journal of Epidemiology and Community Health》的文章中,由 Simon Gilbody 博士领导的 York 大学小组认为,结合之前的 11 项包含了 15315 名参与者的相关研究结果,他们确定在发生抑郁症和体内低叶酸浓度之间确实存在联系。

上个月,英国食品标准局曾建议英国健康部长采取强制措施在面包和面粉中加入叶酸,以起到防止神经管缺陷的作用。神经管缺陷将有可能造成流产、新生儿缺陷及很多终生残疾等。而现在, York 大学研究小组的结果则证实,这一措施同样将有可能帮助治疗抑郁症。

Gibody 博士表示:“我们的研究结果非常独特,因为它首次将这一有争议的领域的所有相关证据结合到了一起。尽管研究并不能直接证明低叶酸浓度将导致抑郁症,但我们确信这两者之间存在联系。有意思的是,同样存在一些实验证据证明补充叶酸有助于抑郁症患者的好转。因此我们建议进行大型的实验来证明这一观点是正确的。”

最近发表于刊物《American Journal of Epidemiology》上的来自同一个研究小组的文章中证实,患有抑郁症的人体内存在一种基因,该基因使得他们处理叶酸的效率变得低下。叶酸和大脑中某些使人感觉良好的物质产生有关,这一基因的发现为叶酸能有助于抑郁症患者康复带来了合理的解释。