

引用:王亚峰,朱丽君,陈美红,等.灵芝中23种成分一测多评法的建立[J].湖南中医杂志,2026,42(4):103-110.

灵芝中23种成分一测多评法的建立

王亚峰¹,朱丽君¹,陈美红¹,邵珊珊¹,刘 热²,胡凌娟³,王晓彤³,徐 靖¹

(1.浙江省寿仙谷医药股份有限公司,浙江 金华,321200;

2.金华市康寿制药有限公司,浙江 金华,321200;

3.全省食药菌生物育种与综合开发利用重点实验室,浙江 金华,321200)

[摘要] 目的:建立灵芝中23种成分含量的“一测多评”方法。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱为WATERS CORTECS C₁₈(90 Å,2.7 μm,4.6 mm×150 mm);流动相为乙腈-0.075%(v/v)磷酸水溶液,梯度洗脱;检测波长252 nm;流速1.0 mL/min;柱温35℃;进样量10 μL。以灵芝酸A为内参物,计算其余22种成分(灵芝酸L、灵芝酸I、灵芝烯酸C、灵芝酸C₂、赤芝酸C、赤芝酸N、灵芝酸C₆、灵芝酸G、灵芝烯酸B、灵芝酸B、赤芝酸B、灵芝酸H、灵芝酸C₁、赤芝酸D、灵芝酸F、灵芝酸J、灵芝马酮、灵芝酸DM、灵芝酸TR、灵芝醇F、灵芝醇B、灵芝醛A)的相对校正因子,并用其计算含量,与外标法测定结果进行比较。结果:23种成分在各自质量浓度范围内线性关系良好($R^2>0.998$),平均加样回收率为93.85%~110.91%。结论:所建立的以灵芝酸A为内参物的一测多评方法准确、重复性好,可用于灵芝中多指标成分的含量测定和质量控制。

[关键词] 灵芝;灵芝三萜酸;高效液相色谱法;一测多评;相对校正因子

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2026.04.018

A method of quantitative analysis of multi-components by single marker for 23 components in *Ganoderma*

WANG Yafeng¹, ZHU Lijun¹, CHEN Meihong¹, SHAO Shanshan¹, LIU Re², HU Lingjuan³, WANG Xiaotong³, XU Jing¹

(1. Zhejiang Shouxian Valley Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 321200, Zhejiang, China;

2. Jinhua Kangshou Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 321200, Zhejiang, China;

3. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biological Breeding and Comprehensive Utilization of Edible-Medicinal Fungi, Jinhua 321200, Zhejiang, China)

[Abstract] Objective: To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single marker for 23 components in *Ganoderma*. Methods: High-performance liquid chromatography was performed on a WATERS CORTECS C18 column (90 Å, 2.7 μm, 4.6 mm × 150 mm) with a mobile phase of acetonitrile-0.075% (v/v) phosphoric acid solution for gradient elution at a wavelength of 252 nm, a flow rate of 1.0 mL/min, a column temperature of 35 °C, and a sample size of 10 μL. With ganoderic acid A as the internal control, the relative correction factor was calculated for the other 22 components (ganoderic acid L, ganoderic acid I, ganoderenic acid C, ganoderic acid C2, lucidenic acid C, lucidenic acid N, ganoderic acid C6, ganoderic acid G, ganoderenic acid B, ganoderic acid B, lucidenic acid B, ganoderic acid H, ganoderic acid C1, lucidenic acid D, ganoderic acid F, ganoderic acid J, ganoderic acid DM, ganoderic acid TR, ganoderic alcohol F, ganoderic alcohol B, ganoderic aldehyde A). Results: 23 components showed a good linear relationship within their respective concentration ranges ($R^2 > 0.998$), and the average recovery rate was 93.85%~110.91%. Conclusion: The established method using ganoderic acid A as the internal control for one-measure multi-evaluation is accurate and repeatable, and can be used for the determination and quality control of multiple components in *Ganoderma*.

基金项目:中央引导地方科技发展资金项目(2024ZY01009)

第一作者:王亚峰,男,医药工程助理工程师,研究方向:中药研究与开发

通信作者:徐靖,男,医药工程研究员,研究方向:中药学研究, E-mail: xujing@sxg1909.com

ganoderic acid C1, lucidenic acid D, ganoderic acid F, ganoderic acid J, ganodermanontriol, ganoderic acid DM, ganoderic acid TR, ganoderiol F, ganoderiol B, and ganoderal A), and their content was also calculated. These results were compared with the results of the external standard method. Results: All 23 components showed a good linear relationship within their respective range of mass concentration ($R > 0.998$), with an average recovery of 93.85%–110.91%. Conclusion: The method of quantitative analysis of multi-components by single marker with ganoderic acid A as the internal control has good accuracy and reproducibility and can be used for the content determination and quality control of multi-target ingredients in *Ganoderma*.

[**Keywords**] *Ganoderma*; ganoderma triterpene acid; high-performance liquid chromatography; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor

灵芝 (*Ganoderma*) 是珍贵药用真菌, 具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化等多种生物活性, 灵芝三萜酸为其主要活性成分之一^[1]。灵芝三萜酸是一类结构复杂的化合物, 其结构与含量的差异直接影响灵芝产品的药理活性和质量。长期以来, 灵芝的质量控制多依赖于总三萜含量的比色法测定, 但该方法特异性差, 易受其他成分干扰, 难以准确反映各活性成分的真实含量。随着灵芝产业的快速发展和消费者对产品质量要求的提高, 建立一种能够全面、准确、高效检测灵芝中多种三萜酸成分的分析方法尤为重要。

低极性三萜酸生物活性强, 中极性三萜酸具有不同的生理功能和应用价值, 灵芝低极性三萜酸代表有灵芝马酮、灵芝醇 F、灵芝酸 DM、灵芝醇 B 等, 中极性三萜酸代表有灵芝酸 C₂、灵芝酸 B、灵芝酸 C₆、灵芝酸 A、灵芝酸 F 等。灵芝酸 A 作为灵芝中特征性的四环三萜酸, 其结构在制备、储存及分析中稳定性良好。

近年来, 一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS) 作为一种新兴的质量控制技术, 凭借其高效、经济、准确的特点, 在中药复方制剂的质量评价中展现出巨大潜力^[2-9]。该方法通过选择一个易于获取、性质稳定的成分作为内参物, 利用相对校正因子 (relative correction factor, RCF) 计算其他待测成分的含量, 从而实现一次进样同时测定多种成分的目的。

本研究应用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术, 结合 QAMS 法,

旨在建立以灵芝酸 A 为内参物, 同时测定灵芝及其中间产品内 23 种高含量的中、低极性三萜酸成分含量的分析方法。通过对色谱条件的优化, 并对方法的准确性、精密度和稳定性进行验证, 以期对灵芝产品的质量评价和成分研究提供可靠方法, 推动灵芝产业的标准化和现代化发展。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent 1260II 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); UC-30 超声波清洗器 (浙江浙科仪器设备有限公司); RE-5220 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); PX224ZH 电子天平 [奥豪斯仪器 (上海) 有限公司]。

1.2 试剂 乙腈 (色谱纯, 默克公司, 批号: JB127830); 甲醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20250120); 磷酸 (分析纯, Merck KGaA, UN 1805); 水为超纯水 (Milli-Q 系统制备)。

1.3 对照品 灵芝酸 L、灵芝烯酸 C、灵芝酸 C₆、灵芝烯酸 B、灵芝酸 C₁、灵芝酸 F、灵芝酸 J、灵芝酸 TR、灵芝醇 F、灵芝醇 B、灵芝醛 A (均购自 ChemFaces, 批号分别为 CFN95022、CFN92238、CFN92290、CFN92991、CFN92053、CFN92055、CFN95516、CFN92235、CFN99244、CFN99064、CFN90306, 纯度均 > 98%); 灵芝酸 I、灵芝酸 C₂、赤芝酸 C、赤芝酸 N、灵芝酸 G、灵芝酸 B、灵芝酸 A、赤芝酸 D、灵芝马酮、灵芝酸 DM (均购自成都曼思特生物科技有限公司, 批号分别为 MUST-23083002、MUST-23062711、MUST-22092204、MUST-22011106、MUST-22100611、

MUST-23062710、MUST-23060214、MUST-23082715、MUST-23090401、MUST-23083003, 纯度均 >97%); 灵芝酸 H、赤芝酸 B(均购自上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 P08NQS74594、J11HB17394, 纯度均 >97%)。所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法测定, 纯度均符合含量测定要求。

1.4 样品 实验所用6批灵芝原料样品信息见表1。

表1 灵芝原料样品信息

序号	种类	采集时间	批号	加工方式
1	安徽韩芝	2023年9月	AH20230901	阴干、粉碎过四号筛
2	陕西赤芝	2023年10月	SX20231002	阴干、粉碎过四号筛
3	浙江仙芝	2023年8月	ZJX20230803	阴干、粉碎过四号筛
4	浙江沪农	2023年9月	ZJH20230904	阴干、粉碎过四号筛
5	山东韩芝	2023年10月	SD20231005	阴干、粉碎过四号筛
6	吉林韩芝	2023年9月	JL20230906	阴干、粉碎过四号筛

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取灵芝粉末0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙酸乙酯25 mL, 称定重量, 800 W功率超声处理(频率40 kHz)25 min,

放冷, 用乙酸乙酯补足减失的重量, 摇匀, 离心(转速为10 000 r/min)5 min。精密量取上清液15 mL, 于40℃水浴中减压旋转蒸发至干, 残渣加甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱: Waters Cortecs C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm; 孔径90 Å)。A为0.075%(v/v)磷酸水溶液, B为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 25%B; 3~18 min, 25%~26%B; 18~30 min, 26%B; 30~35 min, 26%~35%B; 35~40 min, 35%~40%B; 40~50 min, 60%~65%B; 50~57 min, 65%~97%B; 57~63 min, 97%B); 流速1.0 mL/min, 柱温35℃, 进样量10 μL, 检测波长: 252 nm。在此色谱条件下, 23种成分可实现良好分离, 混合对照品溶液和灵芝样品溶液的典型色谱图见图1。

灵芝酸 A 的色谱峰无明显的共流出或干扰, 其保留时间位于图谱的中段, 能有效减少因保留时间漂移或进样体积微小差异对早期或晚期洗脱成分计算结果的累积误差, 提升了方法的稳定性。

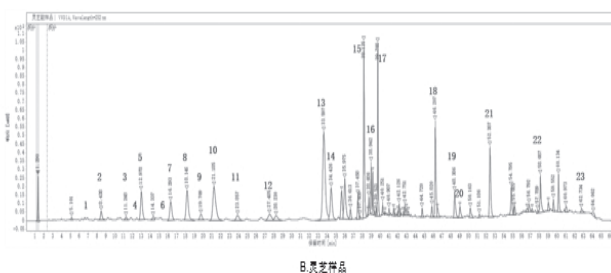
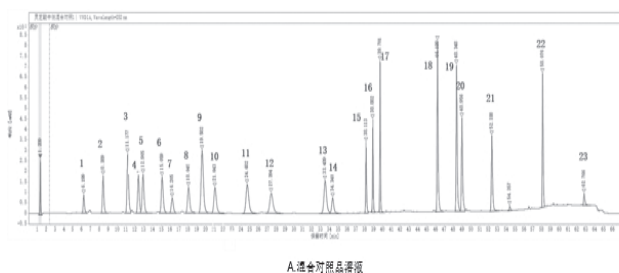


图1 混合对照品溶液(A)与灵芝样品溶液(B)的HPLC色谱图

注: 1—灵芝酸 L; 2—灵芝酸 I; 3—灵芝烯酸 C; 4—灵芝酸 C₂; 5—赤芝酸 C; 6—赤芝酸 N; 7—灵芝酸 C₆; 8—灵芝酸 G; 9—灵芝烯酸 B; 10—灵芝酸 B; 11—赤芝酸 B; 12—灵芝酸 A; 13—灵芝酸 H; 14—灵芝酸 C₁; 15—赤芝酸 D; 16—灵芝酸 F; 17—灵芝酸 J; 18—灵芝马酮; 19—灵芝酸 DM; 20—灵芝酸 TR; 21—灵芝醇 F; 22—灵芝醇 B; 23—灵芝醛 A。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系、检出限与定量限 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液适量, 逐级稀释, 制成一系列浓度的溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析。以各成分的质量浓度(x, μg/mL)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归。分别以信噪

比(S/N)约为3和10时对应的浓度作为检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果见表2。23种成分在各自浓度范围内线性关系良好($R^2 > 0.998$), LOD和LOQ值均较低, 表明该方法灵敏度良好。

表 2 各成分的线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限与定量限

组分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
灵芝酸L	$y=5\ 421.6x+2.448$	8.4 ~ 84.5	0.999 6	0.845	8.450
灵芝酸I	$y=6\ 846x+14.931$	8.8 ~ 88.0	0.998 4	0.880	1.760
灵芝烯酸C	$y=10\ 284x+23.101$	8.8 ~ 87.8	0.999 3	0.878	1.756
灵芝酸C ₂	$y=48\ 762x+17.577$	10.9 ~ 108.8	0.998 7	0.109	0.218
赤芝酸C	$y=9\ 024x+12.529$	10.3 ~ 103.2	0.999 0	1.032	2.064
赤芝酸N	$y=7\ 543x+22.465$	10.4 ~ 103.9	0.999 3	10.390	2.078
灵芝酸C ₆	$y=4\ 536.8x+5.717$	8.5 ~ 84.7	0.999 6	1.694	8.470
灵芝酸G	$y=5\ 806.4x+13.498$	10.3 ~ 103.2	0.998 8	2.063	10.316
灵芝烯酸B	$y=14\ 368x+52.610$	10.1 ~ 101.2	0.998 6	1.012	2.024
灵芝酸B	$y=7\ 892x+23.585$	10.4 ~ 103.7	0.998 6	1.037	2.074
赤芝酸B	$y=8\ 106x+24.356$	10.2 ~ 102.1	0.999 6	1.021	2.042
灵芝酸A	$y=9\ 716.5x+30.226$	13.6 ~ 135.9	0.999 8	1.359	2.718
灵芝酸H	$y=5\ 867x+11.548$	7.5 ~ 75.0	0.998 9	1.500	7.500
灵芝酸C ₁	$y=7\ 695x+14.601$	9.3 ~ 93.1	0.999 1	0.931	1.862
赤芝酸D	$y=8\ 468x+21.808$	10.5 ~ 105.3	0.999 7	1.053	2.107
灵芝酸F	$y=6\ 324x+17.977$	9.9 ~ 98.8	0.999 5	0.988	1.976
灵芝酸J	$y=5\ 549x+4.868$	9.3 ~ 92.6	0.999 2	0.926	1.852
灵芝马酮	$y=10\ 264x+4.795$	8.7 ~ 87.4	0.999 9	0.087	0.874
灵芝酸DM	$y=12\ 387x+12.388$	9.2 ~ 92.5	0.999 5	0.092	0.925
灵芝酸TR	$y=8\ 659x-2.076$	9.2 ~ 91.6	0.999 3	0.092	0.916
灵芝醇F	$y=8\ 768.5x+4.096$	8.0 ~ 80.4	0.999 2	0.080	0.804
灵芝醇B	$y=9\ 264.5x+4.784$	8.3 ~ 82.6	0.999 3	0.083	0.826
灵芝醛A	$y=4\ 536.9x-2.257$	7.7 ~ 76.6	0.999 7	0.077	0.766

2.3.2 混合对照品溶液制备 精密称取“1.3”项下 23 种灵芝酸对照品各约 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 得各单

一成分储备液。精密量取各储备液适量, 置于同一量瓶中, 加甲醇稀释制成含各成分浓度的混合对照品溶液。(见表 3)

表 3 23 种对照品在混合溶液中的浓度

编号	组分	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	编号	组分	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	编号	组分	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	灵芝酸L	84.5	9	灵芝烯酸B	101.2	17	灵芝酸J	92.6
2	灵芝酸I	88.0	10	灵芝酸B	103.7	18	灵芝马酮	87.4
3	灵芝烯酸C	87.8	11	赤芝酸B	102.1	19	灵芝酸DM	92.5
4	灵芝酸C ₂	108.8	12	灵芝酸A	135.9	20	灵芝酸TR	91.6
5	赤芝酸C	103.2	13	灵芝酸H	75.0	21	灵芝醇F	80.4
6	赤芝酸N	103.9	14	灵芝酸C ₁	93.1	22	灵芝醇B	82.6
7	灵芝酸C ₆	84.7	15	赤芝酸D	105.3	23	灵芝醛A	76.6
8	灵芝酸G	103.2	16	灵芝酸F	98.8			

2.3.3 精密度试验 日内精密度: 取“2.1”项下低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 于 1 日内连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算各

成分峰面积的相对标准差(relative standard deviation, RSD)值。日间精密度: 取上述 3 个浓度的混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 每日测定 2 次, 连续测

定3日,记录峰面积,计算各成分峰面积的RSD值,结果见表4,23种成分的日内和日间精密度RSD值均小于3.0%,表明仪器精密度良好。

表4 23种灵芝三萜酸的日内和日间精密度结果(n=6)

组分	日内RSD/%	日间RSD/%	组分	日内RSD/%	日间RSD/%	组分	日内RSD/%	日间RSD/%
灵芝酸L	1.06	1.32	灵芝烯酸B	0.88	0.95	灵芝酸J	0.86	0.95
	0.86	0.98		0.91	0.86		0.97	0.86
	0.92	0.85		1.02	0.86		0.88	0.53
灵芝酸I	0.95	1.06	灵芝酸B	0.97	0.85	灵芝马酮	0.69	1.03
	0.52	0.86		1.06	0.95		0.85	0.75
	0.68	0.75		1.15	0.95		0.79	0.92
灵芝烯酸C	0.43	0.89	赤芝酸B	0.98	1.03	灵芝酸DM	0.68	0.72
	1.05	0.93		1.06	0.87		0.96	0.87
	1.15	0.95		0.85	0.95		0.57	0.53
灵芝酸C ₂	1.06	0.98	灵芝酸A	1.16	0.86	灵芝酸TR	0.68	0.76
	0.86	0.92		0.86	0.75		0.85	0.82
	0.76	0.86		0.79	0.86		0.79	0.96
赤芝酸C	0.95	0.86	灵芝酸H	0.93	0.77	灵芝醇F	0.88	0.86
	0.68	0.95		0.87	1.02		0.69	0.72
	1.13	0.84		0.98	1.02		1.05	0.57
赤芝酸N	1.05	1.21	灵芝酸C ₁	1.02	0.86	灵芝醇B	1.24	1.04
	0.95	0.97		1.24	0.99		1.05	0.98
	0.79	0.82		0.95	0.88		1.05	0.69
灵芝酸C ₆	0.85	0.78	赤芝酸D	1.01	0.87	灵芝醛A	1.36	0.97
	0.69	0.72		0.96	0.85		1.28	0.86
	0.77	0.69		0.99	0.81		1.42	0.88
灵芝酸G	0.69	0.58	灵芝酸F	0.84	0.74			
	0.54	0.67		0.92	0.62			
	0.96	1.02		0.68	0.75			

2.3.4 重复性试验 取同一批灵芝6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行检测,计算23种成分的含量及其RSD值。结果样品中灵芝酸L、灵芝酸I、灵芝烯酸C、灵芝酸C₂、赤芝酸C、赤芝酸N、灵芝酸C₆、灵芝酸G、灵芝烯酸B、灵芝酸B、赤芝酸B、灵芝酸A、灵芝酸H、灵芝酸C₁、赤芝酸D、灵芝酸F、灵芝酸J、灵芝马酮、灵芝酸DM、灵芝酸TR、灵芝醇F、灵芝醇B、灵芝醛A平均含量分别为4.63 mg/mL、1.24 mg/mL、3.67 mg/mL、3.59 mg/mL、17.41 mg/mL、9.14 mg/mL、30.62 mg/mL、23.31 mg/mL、23.64 mg/mL、22.64 mg/mL、21.83 mg/mL、76.26 mg/mL、57.66 mg/mL、83.97 mg/mL、35.51 mg/mL、

78.73 mg/mL、5.91 mg/mL、19.71 mg/mL、9.80 mg/mL、10.36 mg/mL、18.35 mg/mL、10.71 mg/mL、7.99 mg/mL,23种成分含量的RSD值为0.19%~2.42%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取一份供试品溶液,于室温下密闭放置,分别在0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积,计算RSD值。结果样品中灵芝酸L、灵芝酸I、灵芝烯酸C、灵芝酸C₂、赤芝酸C、赤芝酸N、灵芝酸C₆、灵芝酸G、灵芝烯酸B、灵芝酸B、赤芝酸B、灵芝酸A、灵芝酸H、灵芝酸C₁、赤芝酸D、灵芝酸F、灵芝酸J、灵芝马酮、灵芝酸DM、灵芝酸TR、灵芝醇F、灵芝醇B、

灵芝醛 A 平均含量分别为 4.7 mg/mL、1.23 mg/mL、3.65 mg/mL、3.58 mg/mL、17.3 mg/mL、9.28 mg/mL、30.7 mg/mL、23.33 mg/mL、23.57 mg/mL、22.78 mg/mL、21.68 mg/mL、76.35 mg/mL、57.8 mg/mL、83.84 mg/mL、35.52 mg/mL、78.71 mg/mL、6.15 mg/mL、19.81 mg/mL、9.85 mg/mL、10.4 mg/mL、18.3 mg/mL、10.7 mg/mL、8.23 mg/mL，23 种成分峰面积的 RSD 值为 0.11% ~ 2.52%(n=7)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的灵芝样品约 0.25 g，精密称定，共 6 份，分别精密加入“2.1”项下混合对照品溶液适量(相当于各成分样品中含量的 100%)，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，计算各成分的加样回收率和 RSD 值，结果见表 5。23 种成分的平均加样回收率为 93.99% ~ 99.64%，RSD 值为 0.65% ~ 1.43%，表明该方法准确性良好。

表 5 加样回收率试验结果(n=6)

组分	回收率/%	RSD/%	组分	回收率/%	RSD/%
灵芝酸 L	94.82	1.05	灵芝酸 H	99.57	0.65
灵芝酸 I	99.06	0.98	灵芝酸 C ₁	94.41	0.75
灵芝烯酸 C	98.75	1.43	赤芝酸 D	97.72	0.84
灵芝酸 C ₂	96.85	0.98	灵芝酸 F	96.10	0.97
赤芝酸 C	99.01	0.75	灵芝酸 J	97.84	0.85
赤芝酸 N	99.47	1.15	灵芝马酮	93.99	0.79
灵芝酸 C ₆	97.87	0.97	灵芝酸 DM	99.57	0.92
灵芝酸 G	99.64	1.05	灵芝酸 TR	98.01	1.01
灵芝烯酸 B	99.60	0.97	灵芝醇 F	99.00	0.94
灵芝酸 B	99.40	1.06	灵芝醇 B	99.15	0.82
赤芝酸 B	99.31	1.02	灵芝醛 A	95.10	0.68
灵芝酸 A	99.25	0.85			

2.4 RCF 的计算与耐用性考察 以灵芝酸 A 为内参物(s)，按以下公式计算其他 22 种待测成分(i) 的 RCF。

$$RCF = K_s / K_i = (A_i / C_i) / (A_s / C_s) (1)$$

式中，“A”为峰面积，“C”为浓度，“K”为斜率。

取“2.3.1”项下线性考察所得斜率 K 值进行计算，结果见表 6。各成分的 RCF 值在不同实验条件下(不同仪器、不同色谱柱、不同流速微调)重现性良好(RSD < 3%)，表明建立的 RCF 值耐用性良好，可用于 QAMS 法。

灵芝酸 L 和灵芝酸 C₆：在 252 nm 检测波长下因含有额外的双键或共轭体系，相对于灵芝酸 A 紫外吸收强度高，使单位浓度的峰面积响应更高，从而导致 RCF 值 > 1。

灵芝醛 A：其结构中的醛基(-CHO)可能引入新的发色团或改变电子分布，影响紫外吸收行为，

导致响应因子偏高。

这些结构差异虽使 RCF 值偏离 1，但文档中验证表明 RCF 在不同条件下稳定性良好(RSD < 3%)，因此仍可用于准确定量。

2.5 QAMS 法与 ESM 法测定结果的比较 取 6 批不同产地的灵芝样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。分别采用外标法(ESM)和以灵芝酸 A 为内参物的 QAMS 法(利用表 6 的 RCF 值)计算样品中 23 种成分的含量，并对两种方法的结果进行比较(计算相对标准偏差，RSD%)。其中部分含量低于本方法的检出限未能被定量检测，RSD% 标记为“/”，结果见表 7。两种方法所得含量结果基本一致，除浙江仙芝灵芝酸 F 的 RSD 较高(样品中含量较低，导致 RSD 偏高)，其余成分的 RSD 均小于 10%，表明 QAMS 法可用于灵芝中多成分含量的同步测定，且结果可靠。

表 6 以灵芝酸 A 为内参物的相对校正因子(RCF)

组分	回归方程	R ²	RCF	组分	回归方程	R ²	RCF
灵芝酸 L	y=3 908.1x+2.448	0.999 6	2.196	灵芝酸 H	y=5 823.5x+11.548	0.995 9	1.514 0
灵芝酸 I	y=8 105x+14.931	0.997 4	1.059	灵芝酸 C ₁	y=8 156.1x+14.601	0.998 1	1.081 0
灵芝烯酸 C	y=14 800x+23.101	0.998 3	0.580	赤芝酸 D	y=7 851.1x+21.808	0.997 7	1.123 0
灵芝酸 C ₂	y=7 936.2x+17.577	0.997 7	1.081	灵芝酸 F	y=6 937x+17.977 0	0.997 5	1.271 0
赤芝酸 C	y=9 325x+12.529	0.999 0	0.920	灵芝酸 J	y=4 742.8x+4.867 9	0.998 2	1.813 0
赤芝酸 N	y=9 735.7x+22.465	0.997 3	0.881	灵芝马酮	y=13 450x+4.795 2	0.998 9	0.639 3
灵芝酸 C ₆	y=3 157.2x+5.7177	0.997 6	2.718	灵芝酸 DM	y=12 879x+12.388 0	0.998 5	0.667 7
灵芝酸 G	y=7 213.3x+13.498	0.997 8	1.190	灵芝酸 TR	y=9 248.9x-2.075 8	0.998 3	0.929 7
灵芝烯酸 B	y=19 756x+52.61	0.997 6	0.446	灵芝醇 F	y=8 537.3x+4.095 8	0.999 2	1.007 2
灵芝酸 B	y=8 754.2x+23.585	0.997 6	1.007	灵芝醇 B	y=9 777.1x+4.783 7	0.998 3	0.879 5
赤芝酸 B	y=8 795.6x+24.356	0.997 6	1.002	灵芝醛 A	y=4 536.9x-2.257 2	0.999 7	2.140 0
灵芝酸 A	y=8 814.4x+30.226	0.997 8	1.000				

表 7 ESM 法与 QAMS 法测定 6 批灵芝样品中 23 种三萜酸含量的结果比较

组分	安徽韩芝	陕西赤芝	浙江仙芝	浙江沪农	山东韩芝	吉林韩芝	组分	安徽韩芝	陕西赤芝	浙江仙芝	浙江沪农	山东韩芝	吉林韩芝
	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%		RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%
灵芝酸 L	4.71	2.24	2.05	0.65	1.13	10.25	灵芝酸 H	0.23	0.24	0.14	0.28	0.33	0.26
灵芝酸 I	0.93	1.72	0.35	1.76	0.59	4.35	灵芝酸 C ₁	0.63	0.38	/	/	0.34	0.09
灵芝烯酸 C	8.84	7.07	5.05	2.67	4.56	9.43	赤芝酸 D	0.18	0.29	0.34	0.73	0.30	0.67
灵芝酸 C ₂	4.56	6.15	9.43	7.44	7.07	7.71	灵芝酸 F	4.88	/	15.71	9.75	8.32	2.57
赤芝酸 C	0.70	0.64	2.03	0.77	0.93	1.01	灵芝酸 J	0.12	0.16	0.20	0.37	0.33	0.33
赤芝酸 N	7.29	1.05	3.11	2.05	6.29	1.89	灵芝马酮	4.22	2.02	0.66	0.61	2.48	1.11
灵芝酸 C ₆	1.42	0.68	0.37	0.33	0.37	0.26	灵芝酸 DM	0.15	0.13	0.20	2.50	0.22	0.42
灵芝酸 G	0.72	0.45	0.31	0.84	0.98	0.55	灵芝酸 TR	1.10	1.41	1.09	2.24	0.73	1.02
灵芝烯酸 B	4.04	9.12	1.77	9.75	4.66	0.25	灵芝醇 F	1.60	0.63	/	4.77	1.20	3.29
灵芝酸 B	0.80	0.50	0.22	0.24	0.18	1.04	灵芝醇 B	2.09	7.07	1.22	7.73	0.61	1.97
赤芝酸 B	9.43	6.73	8.32	7.86	4.56	2.82	灵芝醛 A	4.23	0.54	1.95	1.10	0.55	1.18

3 讨 论

3.1 研究结果分析 本研究基于 QAMS 方法学理念,成功建立并验证了同时测定灵芝中 23 种三萜酸成分的高效液相色谱方法。该方法以灵芝酸 A 为内参物,通过计算 RCF,实现了仅需一个对照品即可对多种活性成分进行准确定量,显著提升了分析效率,更适用于企业的日常质量控制和大量样品的快速筛查。

色谱条件的优化是本研究的关键。我们比较了不同酸添加剂(甲酸、磷酸)对分离效果的影响,最终确定采用 0.075% 磷酸水溶液-乙腈体系。该体系能有效抑制酸性化合物的峰拖尾,提供更稳定的基线,并显著改善了结构相似化合物(如灵芝烯酸 B 与灵芝酸 B、灵芝酸 H 与灵芝酸 C₁)的分离度,

解决了其在甲酸体系下可能共流出的问题,为准确定量奠定了基础。通过梯度洗脱程序的优化,在保证 23 个成分均获得良好分离的前提下,将分析时间控制在 63 min 之内,相比既往文献记载的方法分析效率显著提高^[10]。

内参物的选择对 QAMS 法成功至关重要。灵芝酸 A 在灵芝中含量较高、化学性质稳定、易于获取,且其色谱峰位于图谱中间位置,能有效减少因保留时间漂移或进样误差对计算结果的影响。本研究计算得到的各成分 RCF 值在不同实验条件下重现性良好。值得注意的是,部分成分(如灵芝酸 C₂ 和灵芝醛 A)的 RCF 值显著偏离 1,这可能与独特的紫外吸收特性或分子结构有关,但稳定

的 RCF 值证实了其在 QAMS 计算中的可靠性。全面的方法学验证结果表明,各成分线性关系良好 ($R^2 > 0.998$),精密度、重复性、稳定性及加样回收率结果均符合定量分析要求,证实该方法准确、可靠。

本研究采用建立的方法对 6 批不同产地灵芝样品进行分析,分别通过 ESM 和 QAMS 计算含量。结果表明,两种方法所得结果无显著差异(绝大多数成分的 $RSD < 5\%$,仅个别成分在低含量样品中 RSD 略高,可能与色谱峰积分或低浓度下信号波动有关),充分验证了所建立 RCF 值的耐用性及 QAMS 法的可靠性。此外,分析结果显示不同产地灵芝样品中三萜类成分的含量与比例存在明显差异,这不仅提示该方法可用于灵芝产品的质量控制和真实性鉴别,也为优质灵芝药材的产地筛选和品种选育提供了重要的化学依据。

综上,本研究建立的 HPLC-QAMS 方法可同时测定灵芝中 23 种三萜酸成分,相较于已报道的多数方法(通常检测约 10 种成分),显著提升了对灵芝复杂化学成分体系的覆盖范围和监控能力。该方法策略亦可为其他中药复杂体系(如茯苓、人参等)的多成分同步定量分析提供有益参考。

3.2 方法局限性及应用展望 尽管本研究建立的 HPLC-QAMS 方法在测定所选 6 批灵芝样品中展现出良好的准确性、精密度和可靠性,但其应用仍存在一定的局限性,在实际应用中需予以关注。本研究验证所用的灵芝样品涵盖了安徽韩芝、陕西赤芝、浙江仙芝等常见品种,结果表明方法在此范围内适用。但灵芝属物种繁多,不同品种(如紫芝、松杉灵芝等)或其野生与栽培品系间的化学成分谱存在显著差异。针对化学成分谱差异巨大的特殊品种,本方法所确定的 RCF 值及色谱分离条件的适用性需进一步验证。本方法的样品前处理采用乙酸乙酯超声提取法,该条件针对灵芝粉末优化。若应用于不同提取工艺(如水提、醇提、超临界 CO_2 萃取)制备的灵芝提取物、孢子粉或深加工产品(如胶囊、片剂),样品基质将更为复杂,基质成分可能干扰目标成分的色谱行为或检测响应,即存在基质效

应的风险。虽然方法学验证中加样回收率理想,但将其直接推广至所有类型产品时,建议进行针对性的方法适用性考察,必要时需调整提取溶剂或净化步骤。

综上所述,本研究建立的 QAMS 法为灵芝中 23 种三萜酸成分的同步测定提供了一种高效、经济的解决方案,其可靠性在既定条件下得到了充分验证。在将其应用于更广泛的灵芝品种、不同工艺产品或不同实验室环境时,充分认识上述局限性并进行必要的验证与调整,是保证其结果准确性的关键。未来研究可进一步拓展该方法的适用范围,并将其应用于灵芝药材产地鉴别、品种选育及产品质量综合评价等更深层次的研究中。

参考文献

- [1] 屈直,谢晴宜,马海霞.灵芝液体深层发酵技术研究进展[J].热带农业科学,2014,34(2):93-98.
- [2] 王赵,赵剑锋,管珂,等.一测多评法测定不同企业心脑健制剂中 9 个成分的含量[J].中国中药杂志,2022,47(22):6082-6089.
- [3] 张亭亭,胡浩宁,李平媛,等.一测多评法同时测定木瓜中 5 种五环三萜类成分的含量[J].中国药房,2022,33(20):2477-2480,2486.
- [4] 管珂,崔淦,过立农,等.一测多评法同时测定冬虫夏草中 5 个核苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2018,38(4):630-635.
- [5] 黄强燕,薛平,李莉.一测多评法测定灵杞益肝口服液液中 4 种灵芝酸类成分[J].中南药学,2019,17(10):1706-1710.
- [6] 于娟.一测多评法测定清热止咳颗粒及中间体中 7 种黄酮类成分的含量[J].中国中药杂志,2019,44(19):4185-4195.
- [7] 邵艳妮,翁艳鸿,张苏萍,等.一测多评法测定不同等级泽泻药材中 7 个萜类成分的含量[J].中国中药杂志,2019,44(11):2292-2307.
- [8] 李海亮,张雯洁,金红宇,等.一测多评法同时测定血塞通片中 5 种皂苷类成分的含量[J].中国药事,2021,35(4):397-405.
- [9] 赵剑锋,宋宗华,刘静.一测多评法同时测定菊花配方颗粒中 8 个成分的含量[J].中国现代中药,2023,25(9):1979-1984.
- [10] 江丽青,董了瑜,刘婧,等.高效液相色谱法测定荣保灵芝 1 号中灵芝酸 A 的含量[J].华西医学,2013,28(3):407-410.

(收稿日期:2025-12-03)

[编辑:徐琦]