

T/JAASS

江苏省农学会团体标准

T/JAASS XXXX—2025

灵芝孢子油中灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H 的测定 高效液相色谱法

The determination of ganoderic acid A, B, D and H in ganoderma lucidum spore oil - High performance liquid chromatography method

(征求意见稿)

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

江苏省农学会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 1

7 分析步骤 2

 7.1 试样制备 2

 7.2 空白试验 2

 7.3 测定 2

8 结果计算 2

9 灵敏度和精密度 3

 9.1 灵敏度 3

 9.2 精密度 3

附录 A（资料性） 标准品、灵芝孢子油高效液相色谱图 4

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省农学会提出并归口。

本文件起草单位：江苏蜂奥生物科技有限公司、极瑞灵芝（江苏）有限公司、江苏鸿祺生物科技有限公司、河北工程大学、南京天嘉检测服务有限公司、浙江龙泉山食品有限公司。

本文件主要起草人：张勇、夏宏、王海燕、王艳梅、乔江涛、高西贝、徐锦忠、叶敏平。

灵芝孢子油中灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了灵芝孢子油原料及灵芝孢子油相关产品中灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸D、灵芝酸H的液相色谱检测方法。

本文件适用于灵芝孢子油原料及灵芝孢子油相关产品中灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸D、灵芝酸H的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经40%乙醇超声提取，经冷冻、离心除杂、浓缩后，用甲醇复溶，高效液相色谱法测定，以保留时间进行定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.2 无水乙醇（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ）。

5.3 乙酸（ CH_3COOH ）：色谱纯。

5.4 灵芝酸 A（ $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$ ，CAS：81907-62-2）、灵芝酸 B（ $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$ ，CAS：81907-61-1）、灵芝酸 D（ $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$ ，CAS：108340-60-9）、灵芝酸 H（ $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_9$ ，CAS：98665-19-1）：含量 $\geq 98.0\%$ ，或采用标准物质/标准样品。

5.5 40%乙醇溶液：取无水乙醇 40mL，加入水 60mL，混匀。

5.6 标准储备液：准确称取适量的每种标准物质（5.2），分别用甲醇配制浓度为 2.00mg/mL 标准储备溶液，置于 -18°C 避光保存，有效期 3 个月。

5.7 混合标准储备溶液：分别准确移取适量的标准储备溶液（5.4.1），用甲醇配置成混合标准储备液，其中各被测物质的浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.8 混合标准工作溶液：准确移取适量的混合标准储备溶液（5.4.2），用甲醇稀释，配置质量为浓度 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液，现配现用。

5.9 微孔滤膜：0.22 μm ，有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

- 6.2 分析天平：感量 0.0001g 和 0.01g。
- 6.3 离心机：最大转速不低于 10000 r/min。
- 6.4 旋转式真空蒸发器。
- 6.5 超声波清洗器：功率大于 100W。

7 分析步骤

7.1 试样制备

称取 10.00±0.01g 灵芝孢子油样品于 200 mL 烧杯中，加入 100 mL 40% 的乙醇溶液，室温超声 50min（功率 100W），将超声后的溶液置于 -20℃ 冰箱中冷冻 2h，弃去冷冻油层，10000 r/min 离心 20min，离心后迅速将上清液转移至 50mL 旋蒸瓶中，于 60℃ 水浴旋转蒸发至干。加入 2mL 甲醇充分复溶，经 0.22 μm 滤膜过滤，即为试样溶液，供高效液相色谱仪测定。

7.2 空白试验

除不加样品外，按与 7.1 相同步骤操作，获得空白试样溶液，供高效液相色谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（150mm×4.6mm，粒径 5 μm），或相当者；
- b) 流动相：A 为水（含 0.2% 乙酸），B 为甲醇（含 0.2% 乙酸），梯度洗脱条件见表 1；
- c) 流速：0.7mL/min；
- d) 柱温：35℃；
- e) 检测波长：260nm；
- f) 进样量：20 μL。

表1 梯度洗脱条件（A 为水含 0.2% 乙酸，B 为甲醇含 0.2% 乙酸）

时间/min	A/%	B/%
0	82	18
7	76	24
10	69	31
25	66	34
35	62	38
52	52	48
70	49	51
80	48	52
95	25	75
150	5	95

7.3.2 标准曲线制作

在色谱参考条件(7.3.1)下，将系列混合标准工作液(5.8)过微孔滤膜，供高效液相色谱仪测定。以混合标准工作液的质量浓度为横坐标，以被测物质色谱峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线。

7.3.3 试样测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到样品中待测物质的色谱峰面积。试样溶液中待测物质的响应值应在线性范围内。根据标准工作曲线计算试样溶液中待测物质的浓度。标准品色谱图和灵芝孢子油样品色谱图参见附录 A。

8 结果计算

试样中灵芝萜类物质的含量按公式(1)计算：

$$X = \frac{\rho \times 2}{m} \times f \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
X——试样中萜类物质的含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；
ρ ——由标准曲线计算得到的试样溶液中萜类物质的质量浓度，单位为微克每毫升 (μ g/mL)；
2——试样复溶所用甲醇体积，单位为毫升 (mL)；
f——试液稀释倍数；
m——所称样品质量，单位为克 (g)；
1000——单位换算系数。
注：计算结果以两次平行测定的算术平均值表示，需扣除空白值，保留小数点后2位。

9 灵敏度和精密度

9.1 灵敏度

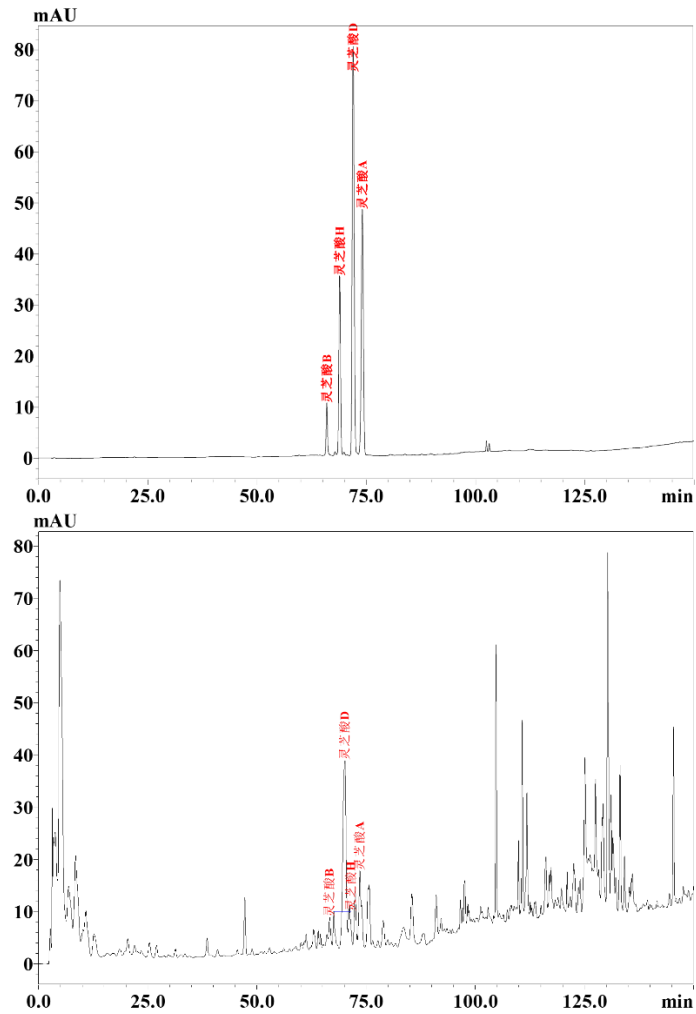
本方法灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸D和灵芝酸H的检出限分别为3.00、1.50、1.00和2.50 μ g/kg；灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸D和灵芝酸H的定量限分别为9.00、4.00、2.50和7.50 μ g/kg。

9.2 精密度

在重复性测试条件下2次平行测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的10%。

附 录 A
(资料性)
标准品、灵芝孢子油高效液相色谱图

灵芝孢子油的质量要求应符合图A. 1的规定。



图A. 1 标准品、灵芝孢子油高效液相色谱图