

《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》（征求意见稿）

编制说明

一、工作简况

本标准由江苏省农学会提出并负责组织制定。

本标准由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等单位参与起草。

本标准主要起草人为张勇、夏宏、王海燕、王艳梅、乔江涛、高西贝、徐锦忠、叶敏平。

二、制定（修订）标准的必要性和意义

灵芝孢子油作为一种保健食品，在市场上的应用范围广泛，建立标准化的检测方法有助于规范市场秩序和保护消费者权益。制定标准化的检测方法可以促进行业规范化和标准化发展，提高产品质量和安全性；可以保证在不同实验室或不同时间下获得的结果是可比的，从而更好地了解灵芝孢子油中萜类化合物的种类和含量，为灵芝孢子油的质量评价提供客观的数据支持；可以促进灵芝孢子油的进一步研发和应用，如优化提取工艺、探究活性成分的作用机制、制定产品质量标准等，有助于提高灵芝孢子油的经济价值和竞争力。

灵芝孢子油是市场应用广泛的保健食品，其主要活性成分为三萜类化合物，尤其以灵芝酸A、B、D、H为代表，具有显著的生理活性。由于灵芝孢子油的特殊结构性质，行业标准NY/T 2278-2012《灵芝产品中灵芝酸含量的测定 高效液相色谱法》，不适用于灵芝孢子油，且该方法只规定了灵芝酸A和B的测定。目前普遍采用的分光光度法仅能测定灵芝产品中总三萜含量，无法识别具体组分，难以判断掺假或质量波动。此外，多多项研究表明分光光度法测定总三萜的干扰性较强，作为控制灵芝孢子油质量缺乏专属性。

本标准建立基于高效液相色谱法（HPLC）的定性定量分析方法，精准测定灵芝酸A、B、D、H的含量，有助于确保产品质量的稳定性和一致性，保障灵芝孢子油的质量真实性，为行业监管与产品标准化提供技术支撑，具有重要的社会与经济意义。

目前暂无灵芝孢子油中灵芝酸A、B、D、H及其他萜类物质的高效液相法

的国家标准。

行业标准 NY/T 2278-2012 灵芝产品中灵芝酸含量的测定 高效液相色谱法不适用于灵芝孢子油，且该方法只规定了灵芝酸 A 和 B 的测定。

江苏省也无灵芝孢子油中萜类化合物的 HPLC 检测方法团体标准。

三、主要起草过程

主要叙述资料收集、分析调研、试验验证、综述报告、技术经济论证过程，草拟文本，征求意见等内容（应根据标准制定程序各阶段的进展不断补充，直到形成报批稿可发布为止）。

我单位2023年成立了《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》标准起草工作组，并制订了详细的工作计划，包括样品的采样计划，实验计划，数据的统计分析和汇总等。

1.制订过程：

（1）成立《标准》起草小组，由负责人张勇负责分配任务。

（2）查阅相关资料，调查研究。由张勇、乔江涛完成。

（3）采集大量样品并进行相关实验，实验分析，数据统计。自标准工作小组成立以来，由张红城、朱和权在全国范围内收集了 12 个不同批次的灵芝孢子油样品，并对其进行样品分析工作。

（4）编制《标准》草案征求意见稿。由乔江涛编制草案征求意见稿。

（5）完成《标准》草案征求意见稿。由张红城完成草案征求意见稿。

2.确定各项技术内容

2.1 灵芝孢子油中灵芝三萜提取工艺的优化

为确保 HPLC 检测方法具有良好的代表性和适用性，本标准前期对灵芝孢子油中三萜类成分的提取工艺进行了系统优化。研究采用超声辅助提取结合低温去除杂质的方法，分别考察了乙醇浓度、液料比、提取时间和冷冻时间等因素对三萜得率的影响。总三萜得率采用香草醛-冰醋酸-高氯酸法。

2.1.1 单因素实验结果

2.1.1.1 不同乙醇浓度对三萜得率的影响

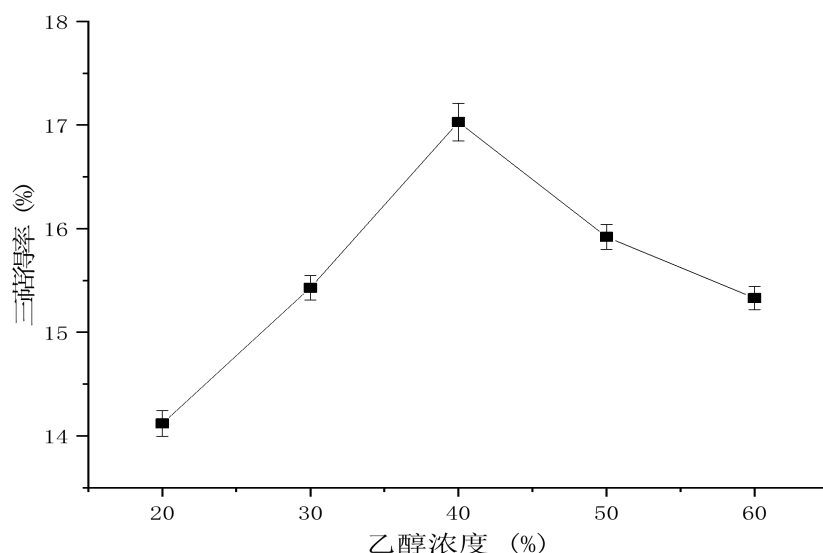


图1 乙醇浓度对三萜得率的影响

如图1所示,在保持其他实验条件不变的情况下,当乙醇浓度在20%~40%范围内时,灵芝三萜的得率随着乙醇浓度的升高而增加。当乙醇浓度达到40%时,三萜得率达到最高值,为17.03%;然而,当乙醇浓度进一步升高至40%~60%时,三萜得率显著下降。原因可能是当乙醇浓度过高时,提取液的极性有所下降,导致提取液中除脂溶性三萜类成分以外的杂质溶出,溶质增多溶剂不变,便会呈现灵芝三萜得率逐渐下降的趋势。

2.1.1.2 不同液料比对三萜得率的影响

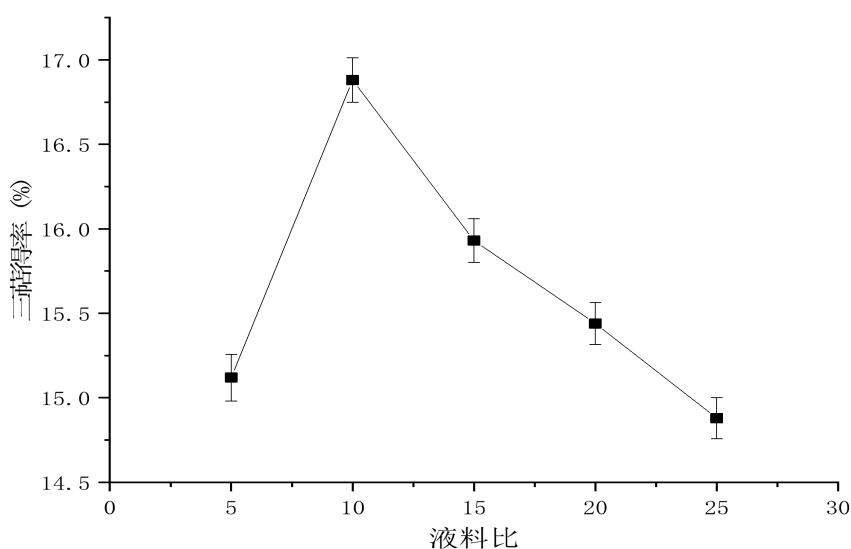


图2 液料比对三萜得率的影响

如图2所示,在保持其他实验条件不变的情况下,当液料比达到10时,三萜得率达到最高值16.88%,然而,随着提取溶剂用量的进一步增加,三萜得率

反而呈下降趋势。分析其可能原因：当溶剂量较少时（液料比 <10 ），超声空化效应及其能量在溶剂中的传递效率受限，降低提取效率。而当液料比继续增大，在固定超声功率下，较高的溶剂体积可能削弱超声作用，抑制三萜的释放，导致三萜得率下降。

2.1.1.3 不同提取时间对三萜得率的影响

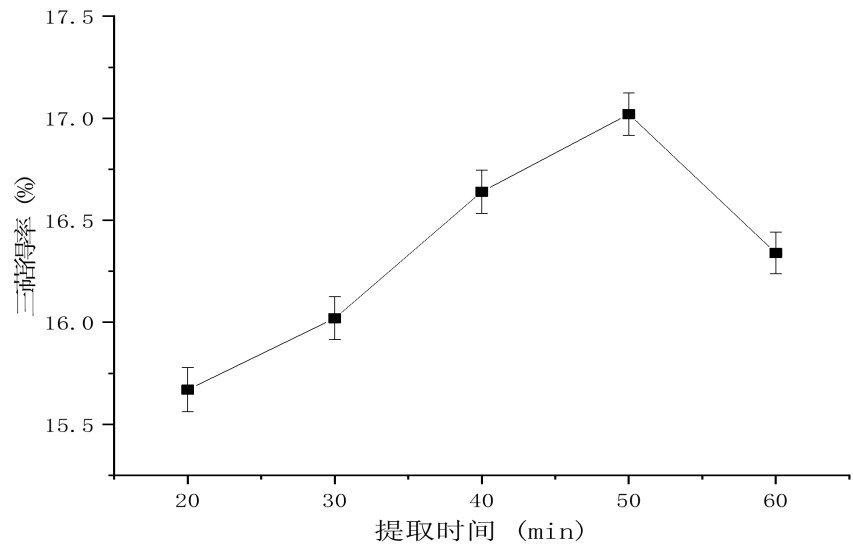


图 3 提取时间对三萜得率的影响

如图 3 所示，在保持其他实验条件不变的情况下，当提取时间小于 50 min 时，三萜得率呈现逐渐上升趋势，并在 50 min 时达到最大值 17.02%，50 min 之后，三萜得率随之下降。可能是因为超声波的机械效应和热效应在提取过程中促使传质达到平衡，从而使得三萜得率逐渐增加。但当提取时间过长时，三萜化合物可能会发生分解，溶出更多的无效成分和杂质，从而导致三萜得率下降。

2.1.1.4 不同冷冻时间对三萜得率的影响

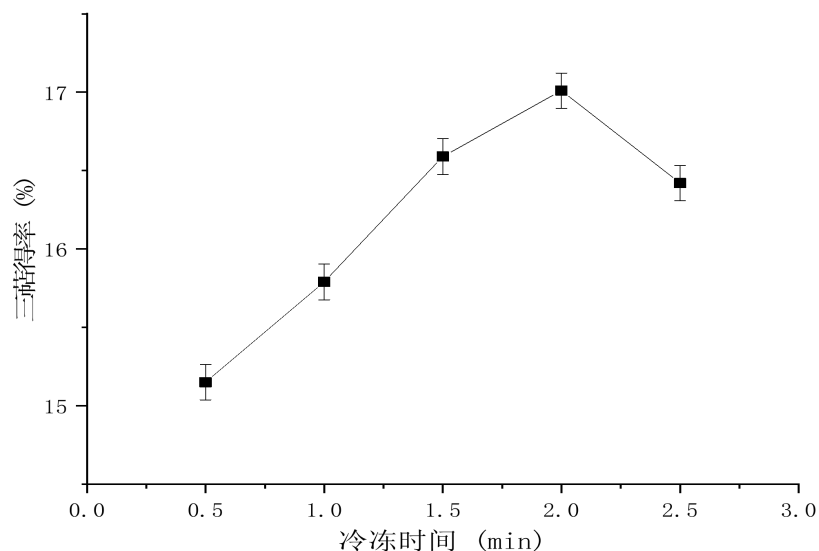


图 4 冷冻时间对三萜得率的影响

如图 4 所示,在保持其他实验条件不变的情况下,随着冷冻时间的不断增加,灵芝三萜的得率随着冷冻时间的延长而显著增加,在 2 h 时达到最大值 17.01%,然而,当冷冻时间进一步延长时,三萜得率开始下降。这是由于灵芝孢子油经超声提取后,其中的油脂状物质被提取出来,随着冷冻时间的增加,油脂状物质凝固,弃去后即可去除杂质,精细分离出目标产物,导致三萜得率逐渐增大;之后随着冷冻时间的增加,提取液中的目标产物凝固,产生絮状沉淀,溶剂不变溶质减少,便会呈现灵芝三萜得率逐渐下降的趋势。

2.1.2 响应面优化试验

在单因素试验的基础上,以灵芝三萜得率为响应值,筛选出影响三萜得率的三个关键因素,分别为冷冻时间(A)、液料比(B)和乙醇浓度(C),采用响应面分析优化提取工艺,结果如表 1 所示。经过二次回归拟合后,得到的三萜得率对三个因素的二次多项回归方程为:

$$Y=16.94+0.0625A-0.2712B+0.3863C+0.4050AB-0.3600AC+0.5275BC-0.6623A^2-0.9148B^2-0.6997C^2。$$

表 1 Box-Behnken 试验设计及结果

实验号	A	B	C	三萜得率 (%)
1	0	1	-1	14.13
2	-1	1	0	14.80

续表 1

实验号	A	B	C	三萜得率 (%)
3	1	1	0	15.53
4	-1	-1	0	16.01
5	0	0	0	16.89
6	1	-1	0	15.12
7	-1	0	-1	14.61
8	0	0	0	16.95
9	1	0	1	15.83
10	0	1	1	15.84
11	0	-1	1	15.47
12	0	0	0	16.89
13	0	0	0	16.97
14	0	-1	-1	15.87
15	1	0	-1	15.66
16	-1	0	1	16.22
17	0	0	0	17.01

2.1.3 响应面回归模型方差分析

采用 Design Expert 13 软件对模型进行了方差分析，结果如表 2 所示。分析结果显示，模型的 Prob > F 值 < 0.01，表明响应面回归模型达到了极显著水平，具有较高的精度，可用于进一步的优化设计。失拟项 (Lack of Fit) Prob > F 值 > 0.05，说明无显著性差异，表明回归方程无失拟现象，拟合效果良好。模型的相关系数 $R^2=0.9870$ ，进一步证实了拟合度的优越性。校正确定系数 Adj $R^2=0.9703$ ，则表明预测结果与实验数据高度一致，实验的变异系数 C.V=0.9620% < 10%，说明实验数据可靠。根据 P 值分析，模型中因素 B、C、AB、BC 以及 A^2 、 B^2 、 C^2 对灵芝三萜得率的影响极为显著。同时，通过 F 值的大小比较，可以推断出各因素对三萜得率的影响强度依次为：乙醇浓度 > 液料比 > 冷冻时间，其中乙醇浓度对三萜得率的影响最为显著。

表 2 回归模型方差分析

方差来源	平方和	df	均方	F 值	P 值	显著性
模型	12.38	9	1.38	59.02	<0.0001	**
A	0.0313	1	0.0313	1.34	0.2849	

续表 2

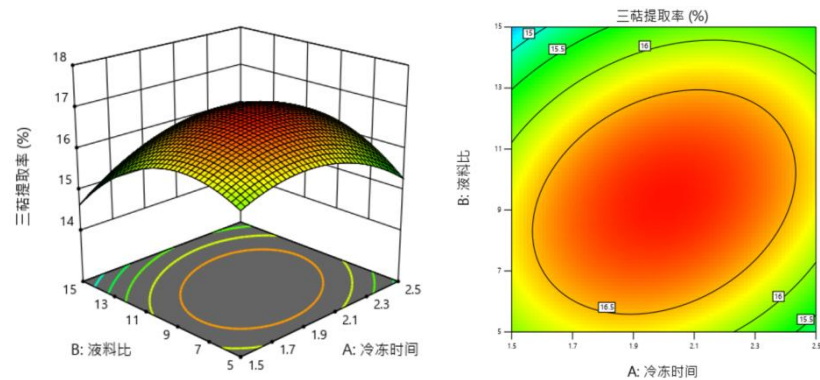
方差来源	平方和	df	均方	F 值	P 值	显著性
B	0.5886	1	0.5886	25.25	0.0015	**
C	1.19	1	1.19	51.21	0.0002	**
AB	0.6561	1	0.6561	28.15	0.0015	**
AC	0.5184	1	0.5184	22.24	0.0022	**
BC	1.11	1	1.11	47.75	0.0002	**
A ²	1.85	1	1.85	79.23	<0.0001	**
B ²	3.52	1	3.52	151.16	<0.0001	**
C ²	2.06	1	2.06	88.45	<0.0001	**
残差	0.1632	7	0.0233			
失拟度	0.1523	3	0.0508	18.66	0.0082	
纯误差	0.0109	4	0.0027			
总离差	12.54	16				
R ²	0.9870					

注: “**”代表差异极显著, $P < 0.01$ 。

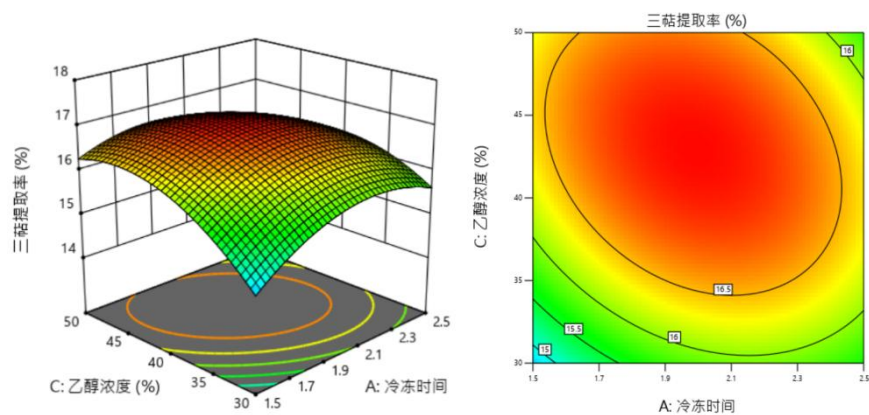
Note: “**” means the difference is highly significant, $P < 0.01$.

2.1.4 响应面分析

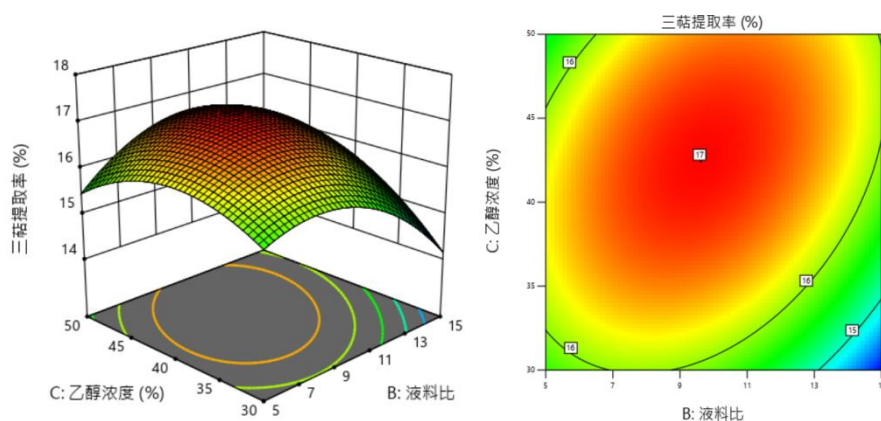
通过 Design Expert 13 软件, 生成了反映提取灵芝孢子油中灵芝三萜得率受各因素交互作用影响的等高线和响应曲面图, 具体信息见图 5。结果显示, 冷冻时间 (A)、液料比 (B) 和乙醇浓度 (C) 两两之间均存在显著的交互作用, 且这些交互作用共同影响灵芝三萜的最终得率。从图 5c 可以观察到, 液料比 (B) 和乙醇浓度 (C) 的响应曲面坡度最陡峭, 说明这两个因素之间的交互作用为极显著, 对灵芝三萜得率的影响最为突出。综合分析可得, 各因素的交互作用对灵芝三萜得率的影响强度依次为: 液料比 $\times$ 乙醇浓度 (BC) $>$ 冷冻时间 $\times$ 液料比 (AB) $>$ 冷冻时间 $\times$ 乙醇浓度 (AC)。此外, 响应面实验的结果与单因素实验的结果一致, 进一步验证了实验设计的可靠性和有效性。



a.AB 响应面图及等高线图



b.AC 响应面图及等高线图



c.BC 响应面图及等高线图

注：a. AB 响应面与等高线图；b. AC 响应面与等高线图；c. BC 响应面与等高线图。

图 5 三个因素之间交互作用对灵芝三萜得率影响的响应面图及等高线图

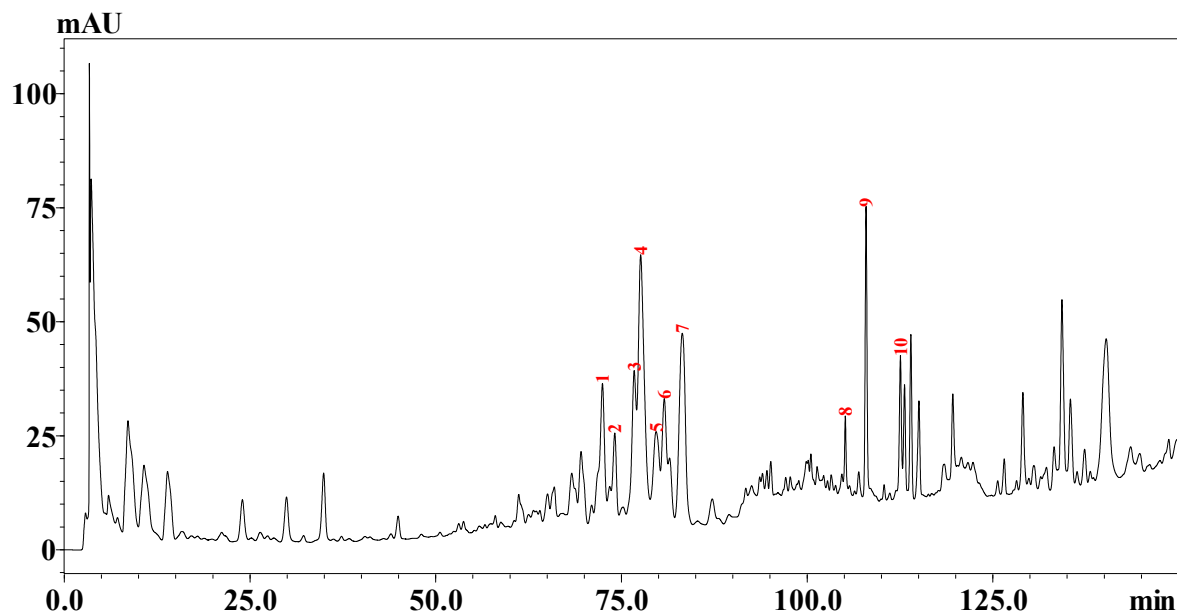
2.1.5 结论

通过单因素实验发现，40%乙醇浓度、液料比为 10:1、提取时间 50 分钟、冷冻时间 2 小时时，三萜得率最高。进一步采用 Box-Behnken 响应面设计，构建了三因素二次回归模型，确定最佳提取参数与三萜得率具有显著相关性。最终优化条件下三萜得率达 17.01%，模型预测结果与实际数据高度一致 ($R^2=0.9870$)，验证了提取工艺的可靠性和稳定性。

因此，本标准采用 40%乙醇、液料比 10:1、超声提取 50 分钟、冷冻 2 小时的前处理工艺，能够在保证提取效率的同时，去除部分脂质杂质，利于后续色谱检测的准确性和重复性。

2.2 灵芝孢子油中灵芝三萜类化合物的定性分析

灵芝孢子油的 HPLC 色谱图如图 6 所示。



注：(1) 灵芝酸 B (2) 灵芝烯酸 G (3) 灵芝酸 H (4) 灵芝烯酸 H (5) 灵芝酸 D (6) 灵芝酸 F (7) 灵芝酸 A

图 6 灵芝孢子油样品的 HPLC 图谱 (260nm)

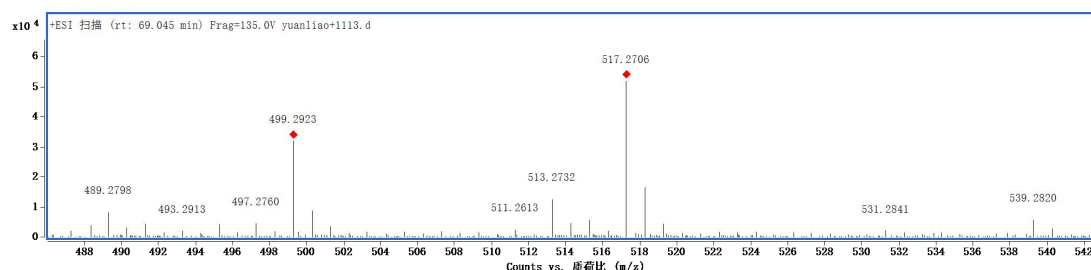
根据化合物的保留时间、最大紫外吸收波长、相对分子质量以及质谱碎片信息，并结合标准品验证及相关文献，确定了灵芝孢子油中的 7 个三萜类物质。表 3 展示了灵芝孢子油样品的特征性成分鉴定结果。

表 3 灵芝孢子油样品中化合物信息

成分	名称	保留时间/min	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	Mw	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$
1	灵芝酸 B	72.904	265	516	517.2706	515.2568
2	灵芝烯酸 G	74.428	265	512	513.2846	511.2611
3	灵芝酸 H	77.305	260	572	573.2878	571.2801
4	灵芝烯酸 H	78.061	265	512	513.2837	511.2602
5	灵芝酸 D	80.094	265	514	515.2588	513.2432
6	灵芝酸 F	81.233	265	570	571.2795	569.2641
7	灵芝酸 A	83.877	265	516	-	515.2908

灵芝孢子油中 7 种特征性成分的质谱信息如下：

化合物 1：灵芝酸 B



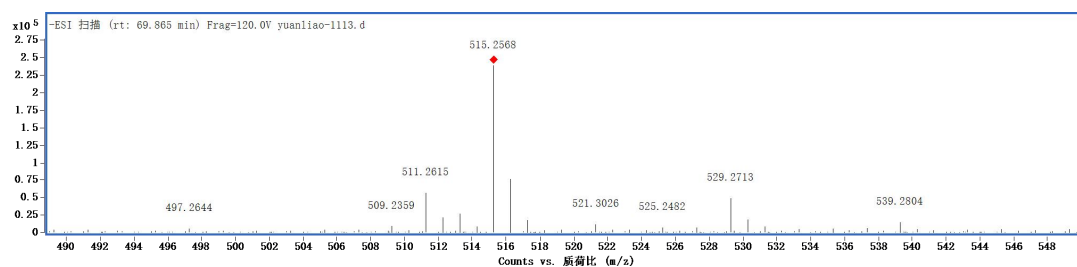


图 7 灵芝酸 B 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 2, -TOF MS² (50 - 1350) from 65.428 min
Precursor: 515.3 Da

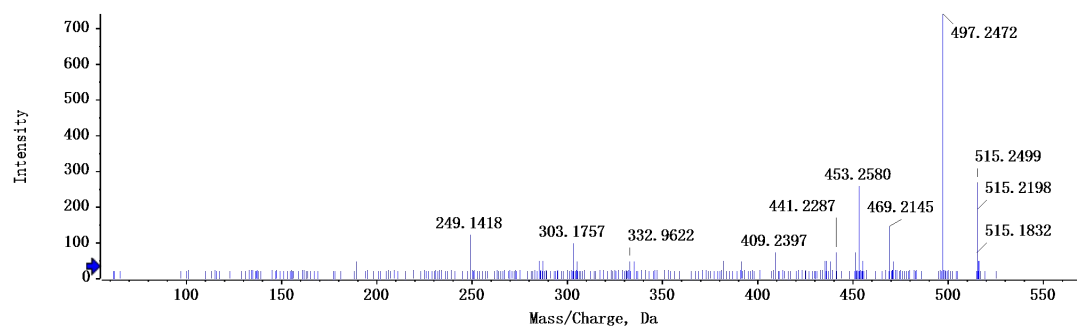


图 8 灵芝酸 B 的二级质谱图（负离子模式）

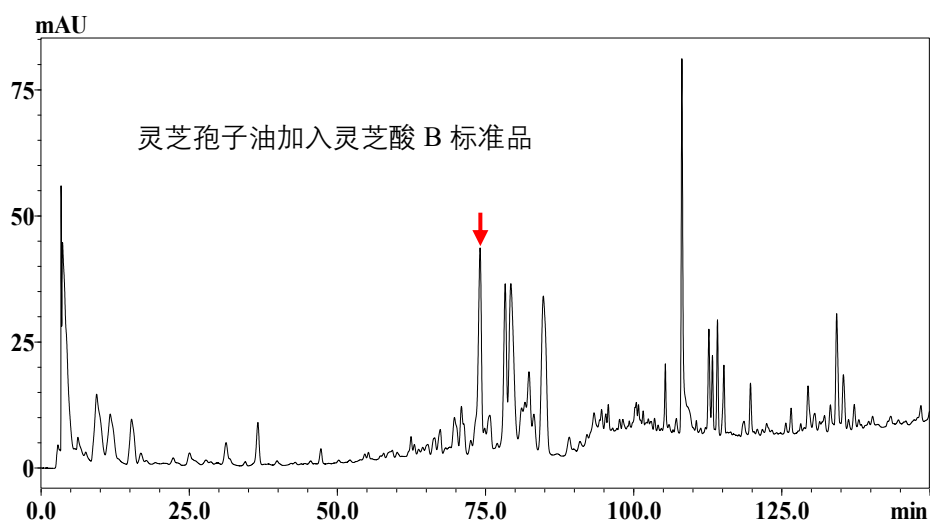
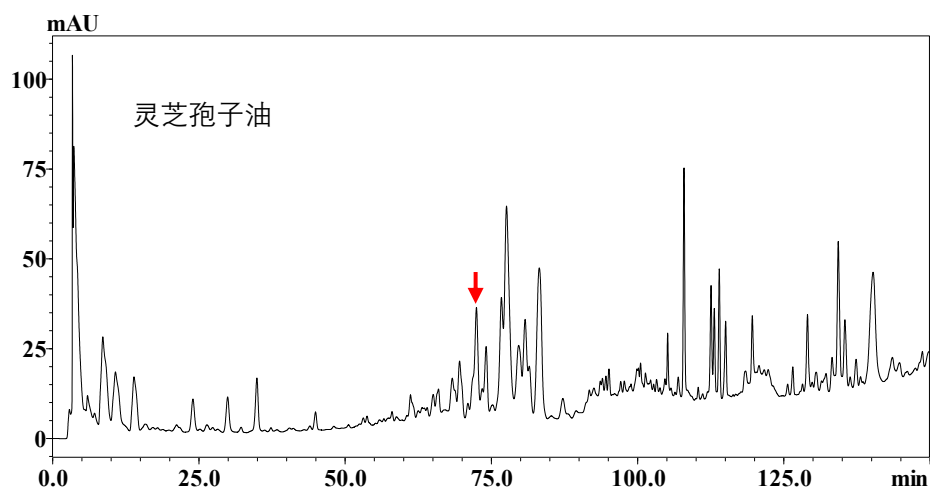
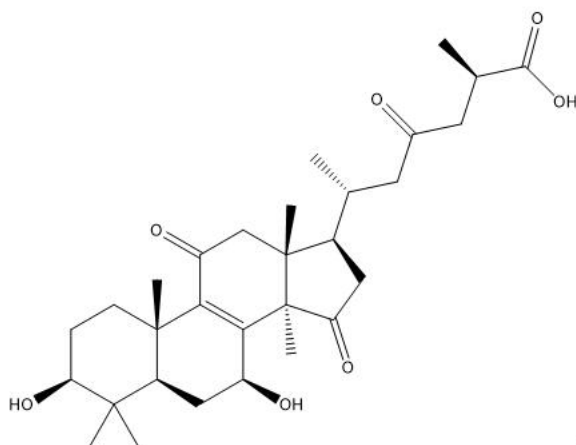


图 9 加入灵芝酸 B 标准品验证图

由图 7 所示，化合物 1 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 517.2706、 m/z 539.2820 和 m/z 515.2568，分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M-H]^-$ ，此外存在准分子离子脱水碎片 m/z 499.2923，确定化合物 1 的分子量为 516。由图 8 所示，化合物 1 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 497.2472、 m/z 453.2580 和 m/z 303.1757，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 和 $[M-H-C_{11}H_{16}O_4]^-$ ，确定化合物 1 的分子式为 $C_{30}H_{44}O_7$ 。结合化合物 1 的最大紫外吸收波长、相关文献及标准品验证（图 9），确定化合物 1 为灵芝酸 B，结构如下所示：



化合物 2：灵芝烯酸 G

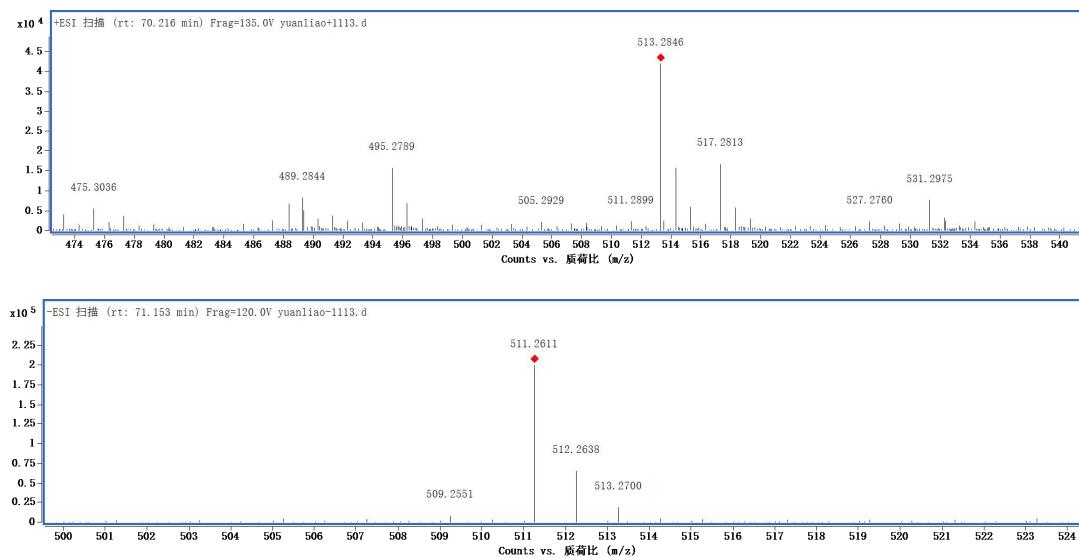


图 10 灵芝烯酸 G 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 2, -TOF MS² (50 - 1350) from 70.977 min
Precursor: 511.2 Da

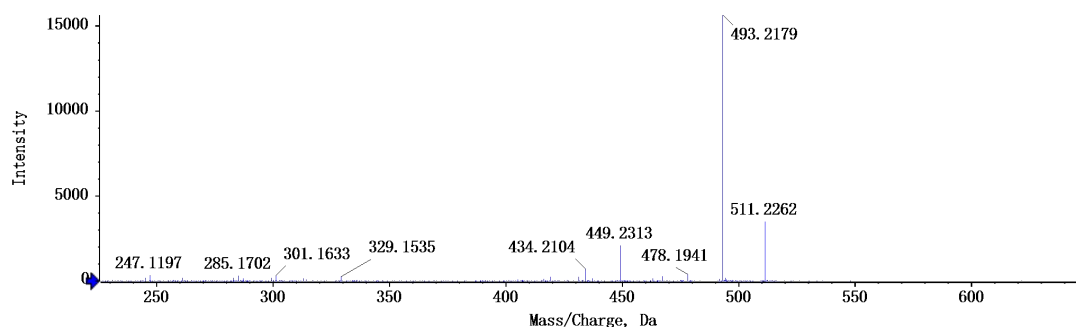
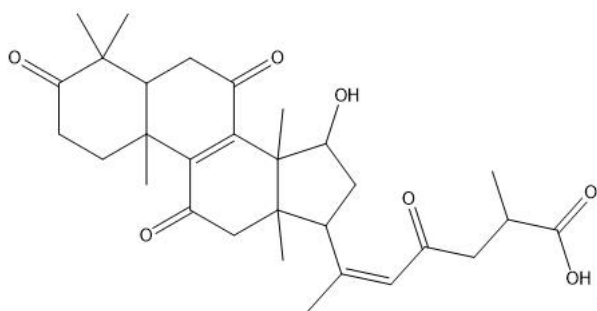
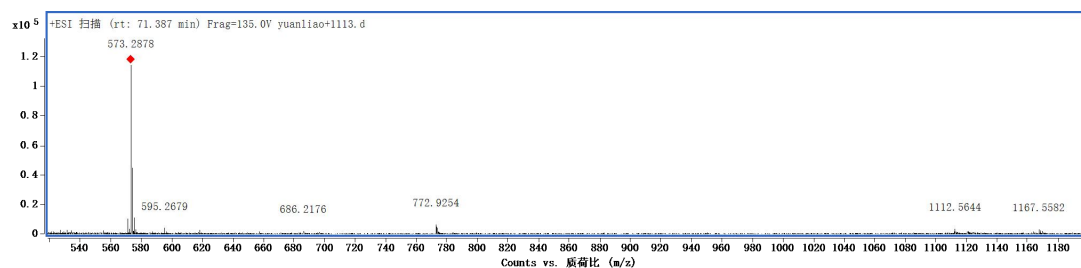


图 11 灵芝烯酸 G 的二级质谱图（负离子模式）

由图 10 所示, 化合物 2 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 513.2846 和 m/z 511.2611, 分别为 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$, 此外存在准分子离子脱水碎片 m/z 495.2724, 确定化合物 2 的分子量为 512。由图 11 可知, 化合物 2 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 493.2179、 m/z 449.2313、 m/z 434.2104、 m/z 301.1633 和 m/z 285.1702, 分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2-CH_3]^-$ 、 $[M-H-C_{11}H_{14}O_4]^-$ 和 $[M-H-C_{11}H_{14}O_4-CH_4]^-$, 确定化合物 2 的分子式为 $C_{30}H_{40}O_7$ 。结合化合物 2 的最大紫外吸收波长及相关文献, 确定化合物 2 为灵芝烯酸 G, 结构如下所示:



化合物 3: 灵芝酸 H



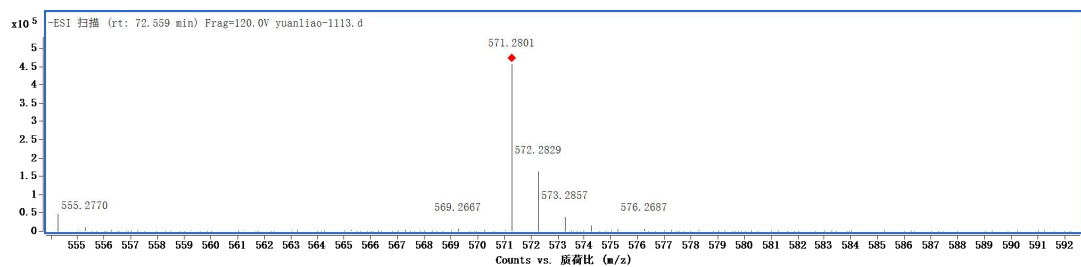


图 12 灵芝酸 H 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 2, -TOF MS² (50 - 1350) from 71.160 min
Precursor: 571.3 Da

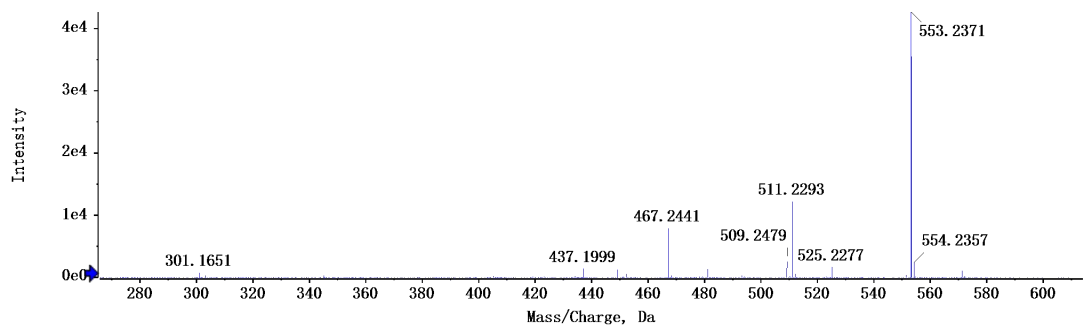
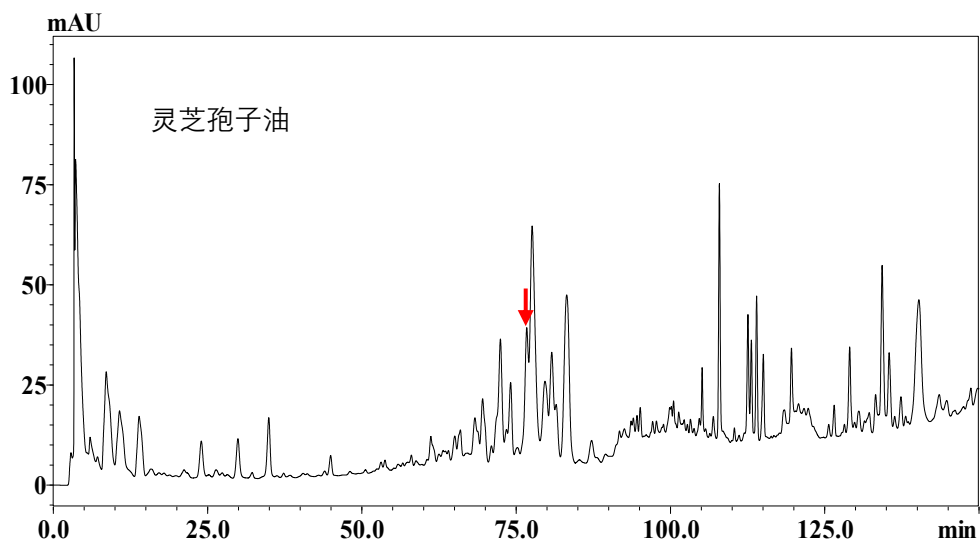


图 13 灵芝酸 H 的二级质谱图（负离子模式）



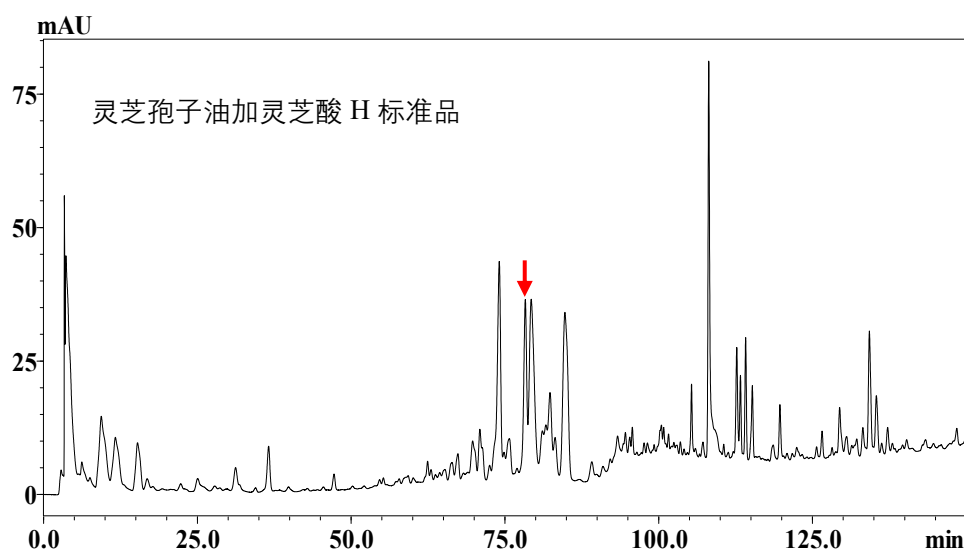
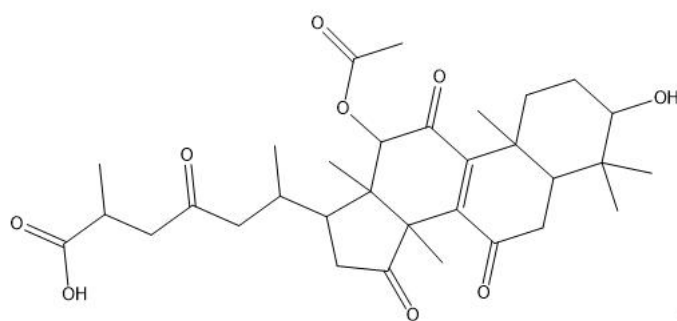


图 14 加入灵芝酸 H 标准品验证图

由图 12 所示，化合物 3 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 573.2878、 m/z 571.2801、 m/z 595.2679 和 m/z 1167.5582，分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ ，确定化合物 3 的分子量为 572。由图 13 可知，化合物 3 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 553.2371、 m/z 511.2293、 m/z 509.2479、 m/z 467.2441、 m/z 437.1999 和 m/z 301.1803，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2-C_2H_2O_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2-C_2H_2O_2-2CH_3]^-$ 和 $[M-H-C_{11}H_{14}O_4-C_2H_4O_2]^-$ ，确定化合物 3 的分子式为 $C_{32}H_{44}O_9$ 。结合化合物 3 的最大紫外吸收波长、相关文献及标准品验证（图 14），确定化合物 3 为灵芝酸 H，结构如下所示：



化合物 4：灵芝烯酸 H

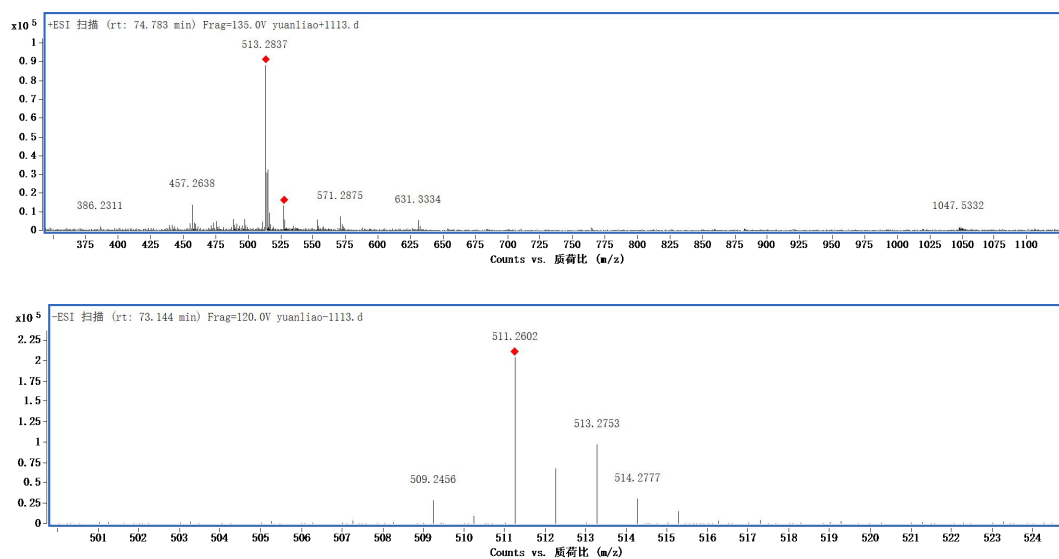


图 15 灵芝烯酸 H 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 5, -TOF MS² (50 - 1350) from 72.913 min
Precursor: 511.6 Da

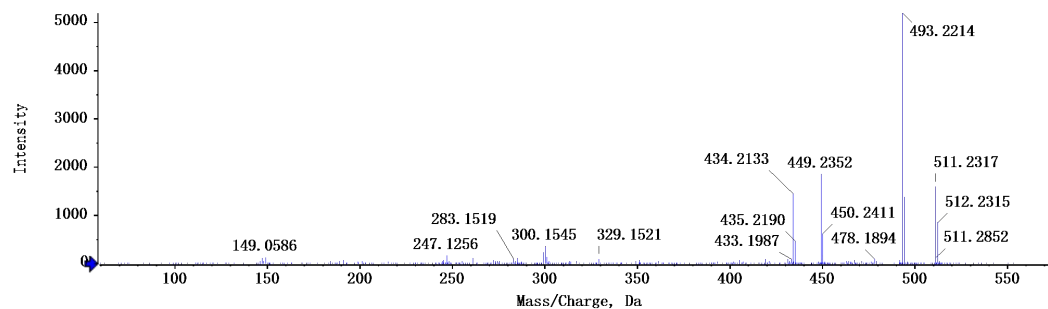
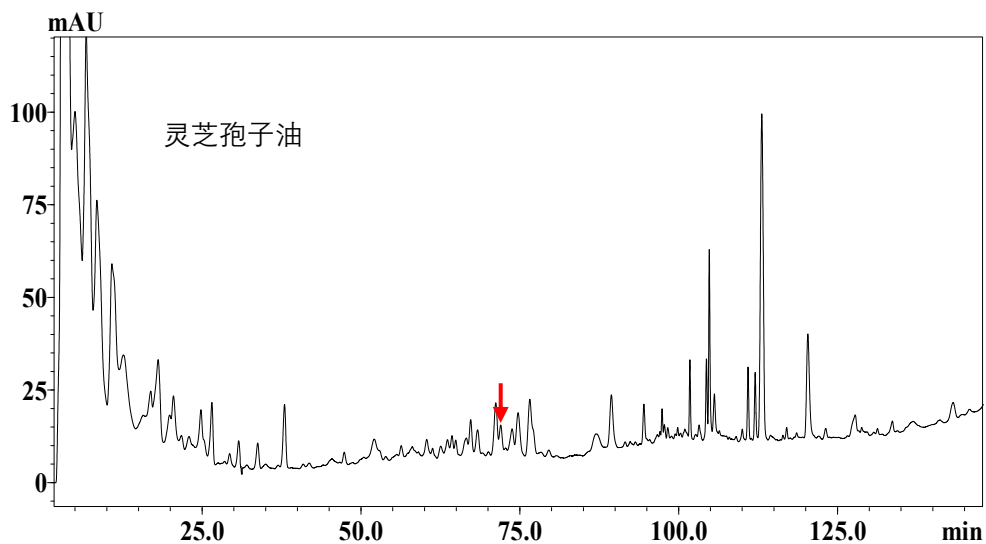


图 16 灵芝烯酸 H 的二级质谱图（负离子模式）



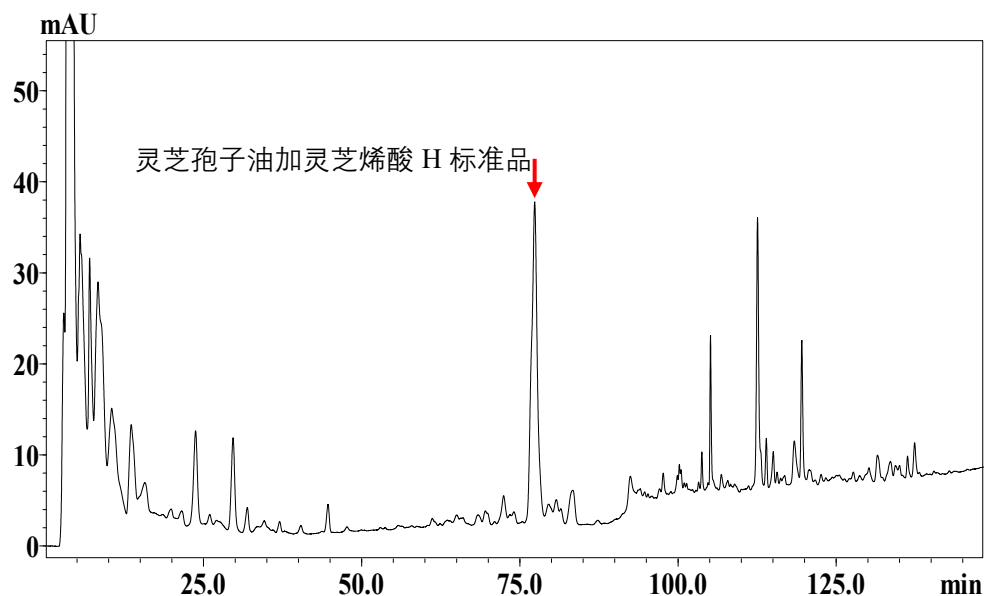
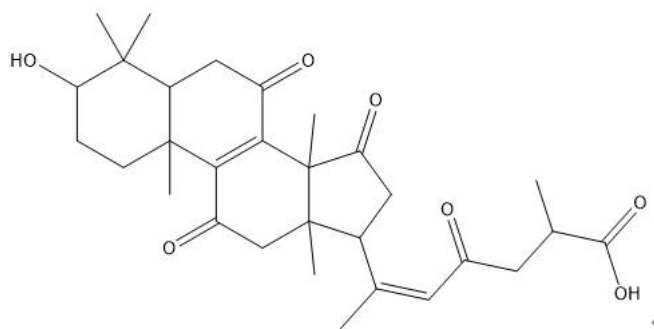
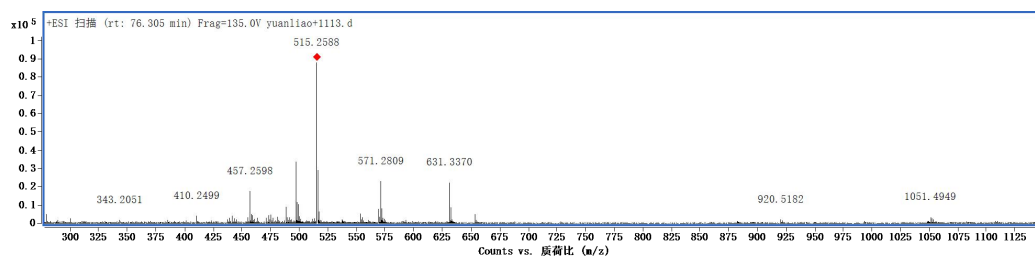


图 17 加入灵芝烯酸 H 标准品验证图

由图 15 所示，化合物 4 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 513.2837、 m/z 511.2602 和 m/z 1047.5332，分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 和 $[2M+Na]^+$ ，确定化合物 4 的分子量为 512。由图 16 所示，化合物 4 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 493.2214、 m/z 449.2352、 m/z 434.2133 和 m/z 149.0586，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2-CH_3]^-$ 和 $[M-H-H_2O-CO_2-C_{19}H_{24}O_3]^-$ ，确定化合物 4 的分子式为 $C_{30}H_{40}O_7$ 。结合化合物 4 的最大紫外吸收波长、相关文献及标准品验证（图 17），确定化合物 4 为灵芝烯酸 H，结构如下所示：



化合物 5：灵芝酸 D



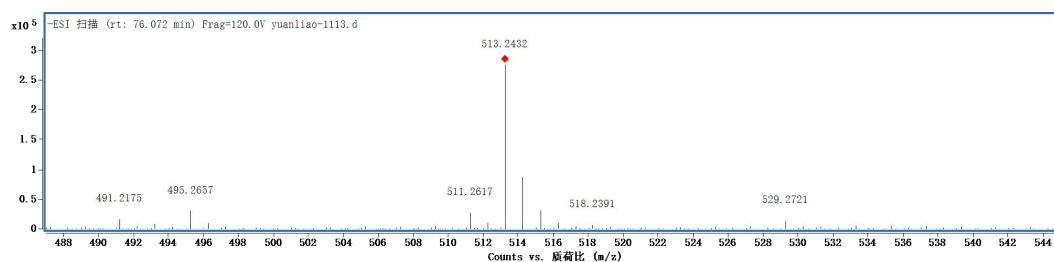


图 18 灵芝酸 D 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 2, -TOF MS² (50 - 1350) from 74.537 min
Precursor: 513.3 Da

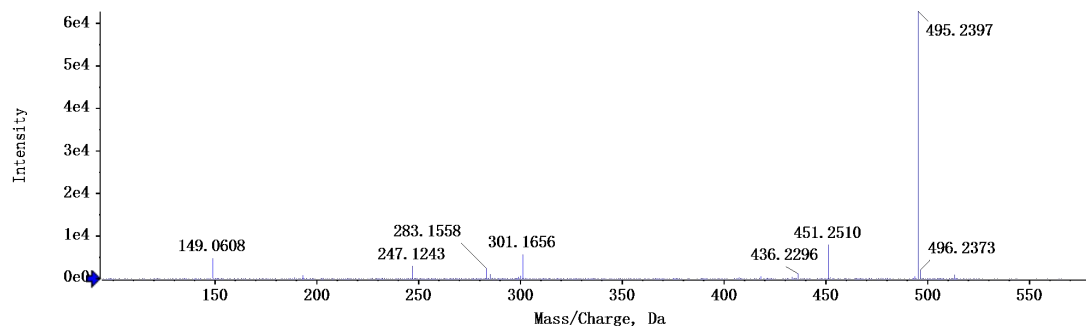
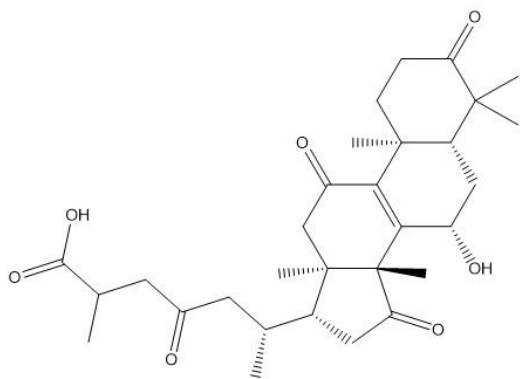


图 19 灵芝酸 D 的二级质谱图（负离子模式）

如图 18 所示，化合物 5 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 515.2588、 m/z 513.2432 和 m/z 1051.4949，分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 和 $[2M+Na]^+$ ，确定化合物 5 的分子量为 514。如图 19 所示，化合物 5 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 495.2765、 m/z 451.2510、 m/z 436.2296、 m/z 301.1656、 m/z 283.1558、 m/z 247.1243 和 m/z 149.0608，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2-CH_3]^-$ 、 $[M-H-C_{11}H_{16}O_4]^-$ 、 $[M-H-C_{11}H_{18}O_4-CH_4]^-$ 、 $[M-H-C_{15}H_{22}O_4]^-$ 和 $[M-H-C_{15}H_{22}O_4-C_6H_{19}O]^-$ ，确定化合物 5 的分子式为 $C_{30}H_{42}O_7$ 。结合化合物 5 的最大紫外吸收波长及相关文献确定化合物 5 为灵芝酸 D，结构如下所示：



化合物 6：灵芝酸 F

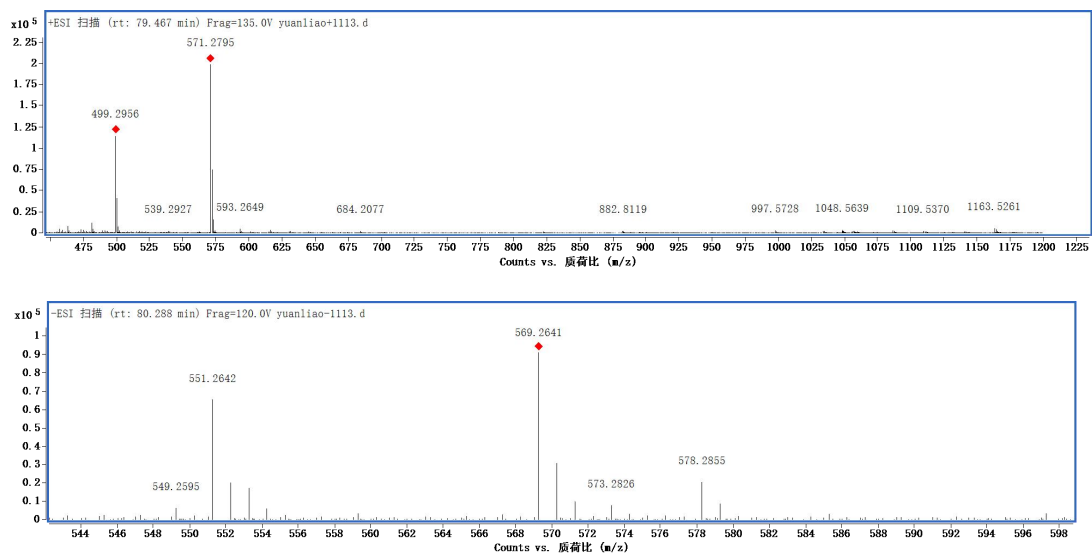


图 20 灵芝酸 F 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 2, -TOF MS² (50 - 1350) from 76.261 min
Precursor: 569.3 Da

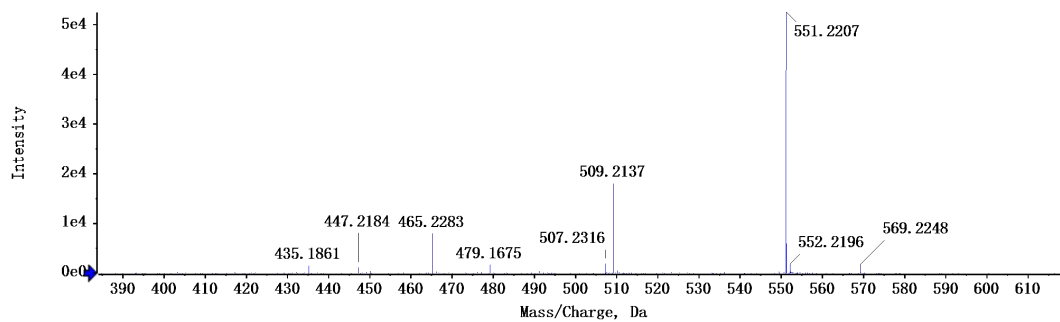
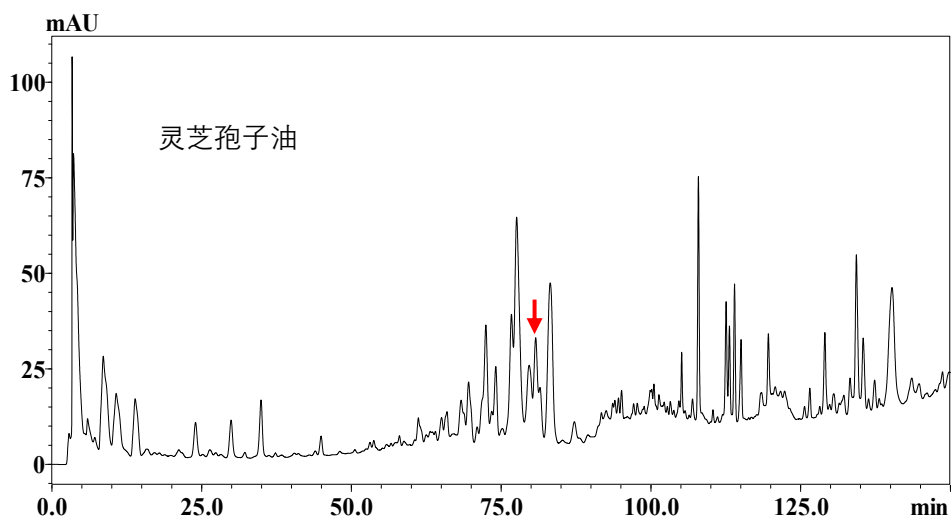


图 21 灵芝酸 F 的二级质谱图（负离子模式）



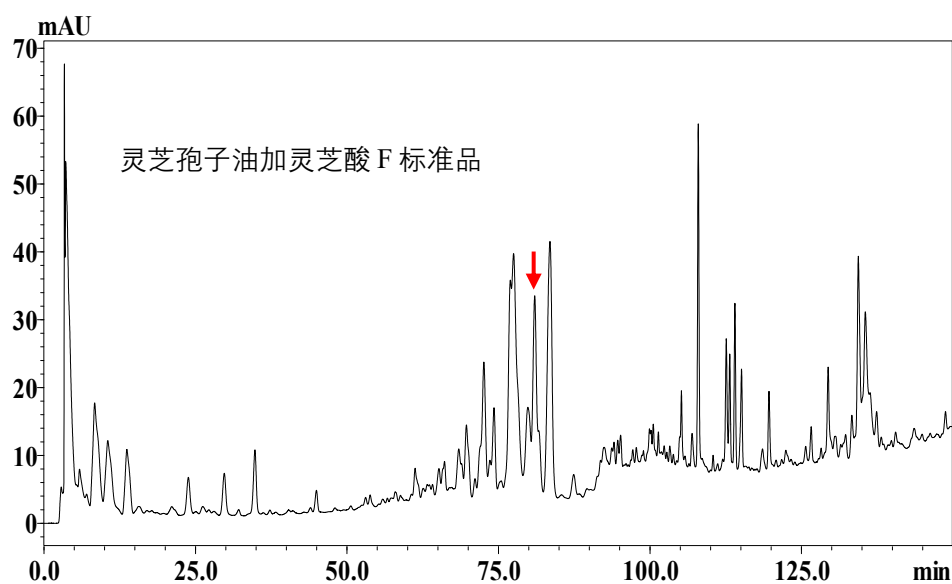
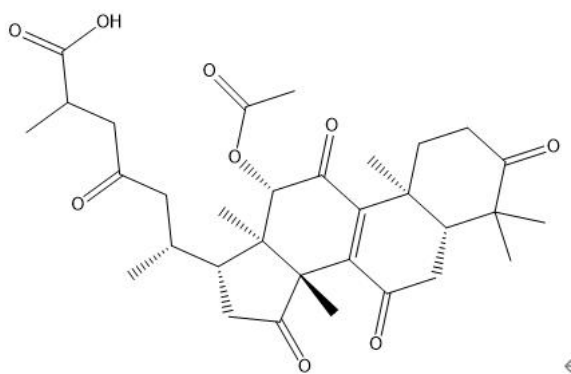


图 22 加入灵芝酸 F 标准品验证图

如图 20 所示，化合物 6 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 571.2795、 m/z 569.2641 和 m/z 1163.5261，分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 和 $[2M+Na]^+$ ，确定化合物 6 的分子量为 570。如图 21 所示，化合物 6 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 551.2207、 m/z 509.2137、 m/z 479.1675、 m/z 465.2658、 m/z 447.2184 和 m/z 435.1861，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ 、 $[M-H-C_2H_4O_2-2CH_3]^-$ 、 $[M-H-C_2H_4O_2-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-C_2H_4O_2-CO_2]^-$ 和 $[M-H-C_2H_4O_2-CO_2-2CH_3]^-$ ，确定化合物 6 的分子式为 $C_{32}H_{42}O_9$ 。结合化合物 6 的最大紫外吸收波长、相关文献和标准品验证（图 22），确定化合物 6 为灵芝酸 F，结构如下所示：



化合物 7：灵芝酸 A

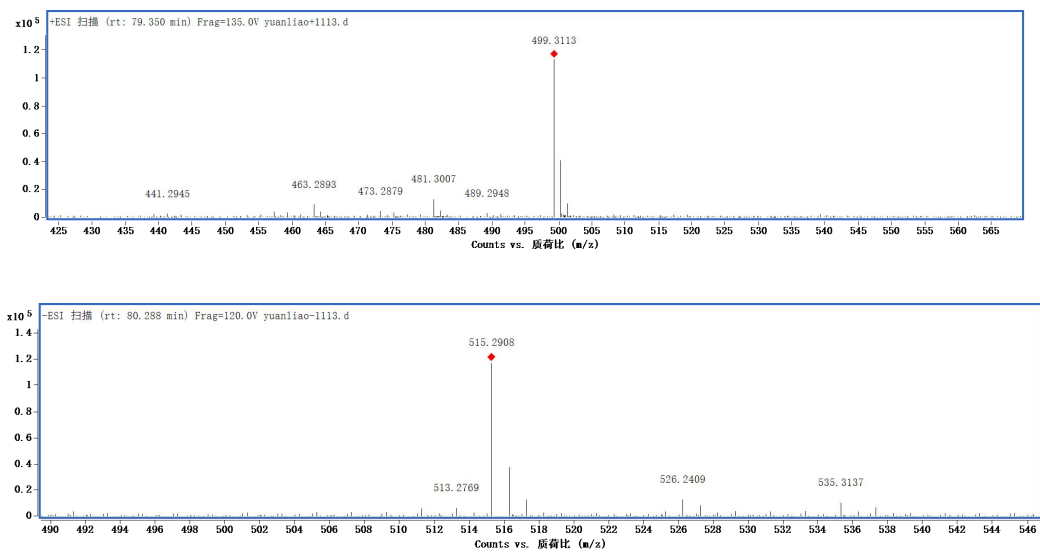


图 23 灵芝酸 A 的一级质谱图（正负离子模式）

Spectrum from lingzhi.wiff (sample 1) - lingzhi, Experiment 3, -TOF MS² (50 - 1350) from 75.681 min
Precursor: 515.3 Da

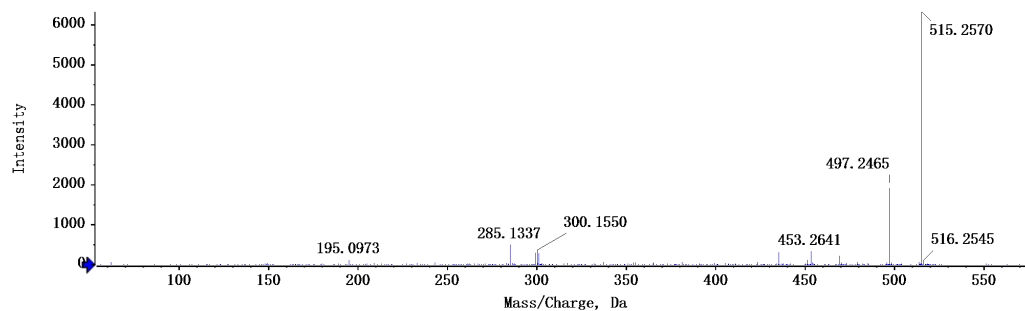
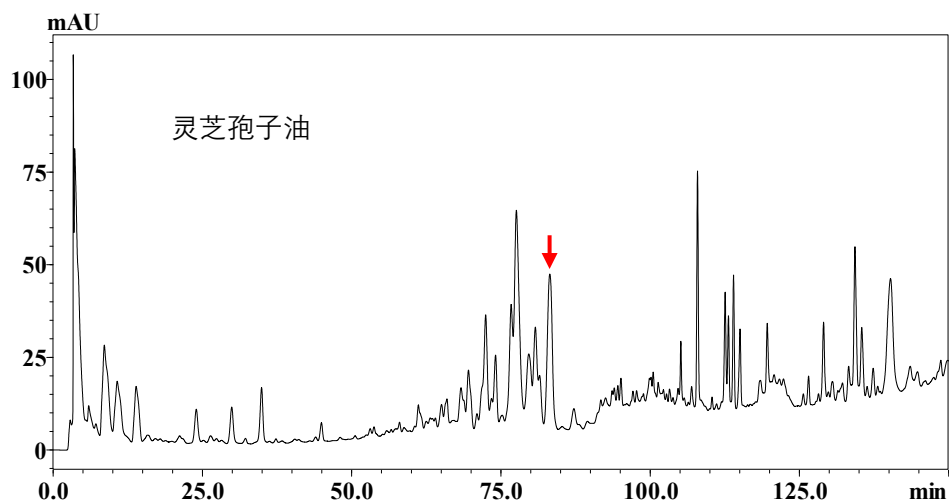


图 24 灵芝酸 A 的二级质谱图（负离子模式）



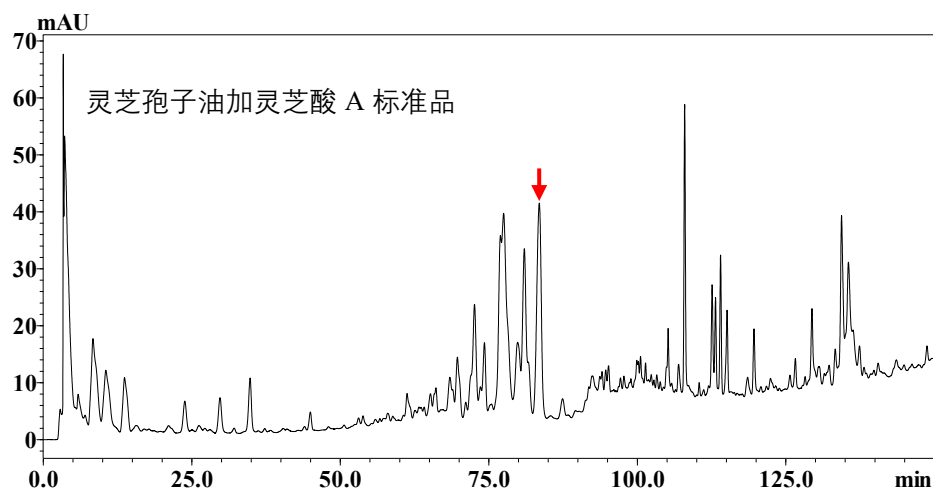
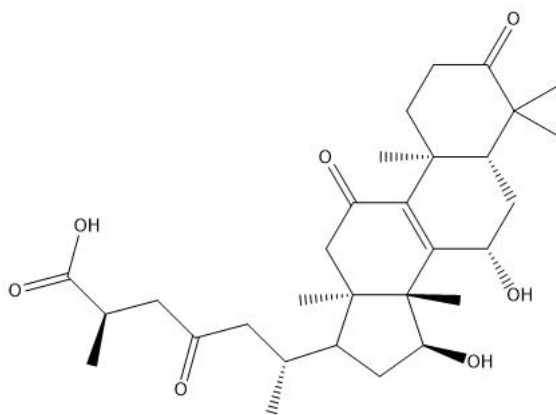


图 25 加入灵芝酸 A 标准品验证图

如图 23 所示，化合物 7 的一级质谱中存在准分子离子峰 m/z 515.2908，为 $[M-H]^-$ ，存在准分子离子脱水碎片 m/z 499.3113，确定化合物 7 的分子量为 516。如图 24 所示，化合物 7 的二级质谱中存在特征碎片离子峰 m/z 497.2923、 m/z 453.2641、 m/z 285.1496 和 m/z 195.0973，分别为 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 $[M-H-C_{11}H_{18}O_4-CH_4]^-$ 和 $[M-H-H_2O-C_{19}H_{30}O_3]^-$ ，确定化合物 7 的分子式为 $C_{30}H_{44}O_7$ 。结合化合物 7 的最大紫外吸收波长、相关文献和标准品验证（图 25），确定化合物 7 为灵芝酸 A，结构如下所示：



总结，从灵芝孢子油提取物中共鉴定出 7 种灵芝三萜类化合物，包括：灵芝酸 B、灵芝烯酸 G、灵芝酸 H、灵芝烯酸 H、灵芝酸 D、灵芝酸 F 和灵芝酸 A。其中灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H 四种存在于所有检测的样品中。因此本标准只规定了灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H 的高效液相色谱法。

2.3 灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H 检出限和定量限

将混合标准工作液按照梯度进样方法进行高效液相分析，以标准品浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线；最低检出限（LOD）按 3 倍信噪比计，最低定量限（LOQ）按 10 倍信噪比算，结果如表 4 所示。

表 4 标准品相关信息

标准物质	英文名称	线性回归方程	R ²	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
灵芝酸 B	Ganoderic acid B	y=2000x-109705	0.9998	1.18	3.92
灵芝酸 H	Ganoderic acid H	y=690.59x+3623	0.9998	2.11	7.02
灵芝酸 D	Ganoderic acid D	y=1389.2x-19415	0.9984	0.74	2.47
灵芝酸 A	Ganoderic acid A	y=1400x-71437	0.9997	2.56	8.55

2.4 精密度

日内精密度：将混合标准品工作液连续进样 6 次，测峰面积积分值。灵芝酸 B 峰面积 RSD 为 1.77%、灵芝酸 H 峰面积 RSD 为 1.36%、灵芝酸 D 峰面积 RSD 为 1.26%、灵芝酸 A 峰面积 RSD 为 1.09%，实验结果表明该方法日内精密度良好。

日间精密度：将混合标准品工作液分别在 5 天进样 5 次，测峰面积积分值。结果表明，这 4 个成分的峰面积 RSD 均在 1.03%-1.29%之间，表明该方法日间精密度良好。

2.5 稳定性实验

将混合标准品工作液在 0、2、4、6、8、10、12 h 各进样 20 μL 样品，记录各色谱峰面积的积分值，根据外标法，分别计算出灵芝酸 B、灵芝酸 H、灵芝酸 D 和灵芝酸 A、的浓度。灵芝酸 B 峰面积 RSD 为 1.29%、灵芝酸 H 峰面积 RSD 为 1.18%、灵芝酸 D 峰面积 RSD 为 1.39%、灵芝酸 A 峰面积 RSD 为 1.47%。实验结果表明，标准品溶液在 24h 内稳定。

2.6 加样回收率

精密称取 10.00 g 灵芝孢子油样品 6 份，分别加入适量对照标准品溶液，进行高效液相色谱分析。计算得到结果见表 5。灵芝酸 B、灵芝酸 H、灵芝酸 D、灵芝酸 A 的回收率均在 98.32-102.68 之间，RSD 值在 0.83%-1.92%之间，显示该方法准确度良好。

表 5 4 种成分加样回收率（n=6）

序号	化合物	添加量水平		平均回收率%	RSD%
1	灵芝酸 B	高	60	101.26	1.61
		中	30	100.33	1.23
		低	15	99.64	1.85
3	灵芝酸 H	高	60	102.68	1.92
		中	30	100.79	1.53

5	灵芝酸 D	低	15	99.23	1.66
		高	60	101.46	0.83
		中	30	100.28	1.64
		低	15	98.53	1.55
7	灵芝酸 A	高	60	100.29	1.33
		中	30	99.63	1.90
		低	15	98.32	0.91

四、主要条款的说明

本标准按照 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》的规定制定本标准。

五、重大分歧意见的处理和依据

关于标准文本的修改意见正在征求中。

六、采标情况

目前暂无灵芝孢子油中灵芝酸 A、B、D、H 的 HPLC 检测方法的国际标准。
国内相对应标准为：

- 《T/GDFDTAEC 06-2022 灵芝类保健食品中总三萜的测定-分光光度法》
- 《NY/T 2278-2012 灵芝产品中灵芝酸含量的测定 高效液相色谱法》

七、贯彻标准的措施和建议

尽快实施。

八、预期效益分析

本标准增加了对灵芝孢子油真实性要求和鉴别方法，对指导灵芝生产、提高产品质量、打击假冒伪劣、保护消费者权益有积极的促进作用。本标准规范了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，使用 HPLC 法定量检测灵芝孢子油中灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 H，对灵芝孢子油中多种萜类成分定性定量分析。符合我国灵芝孢子油产品加工的需要，对规范灵芝孢子油产品市场和促进贸易有积极推动作用。

九、其它应予说明的事项

无