

傅立叶变换离子回旋共振质谱法对赤灵芝的化学成分鉴定和指纹图谱研究

杨秋霞¹, 杨运云¹, 刘耀慧^{1,2}, 向章敏¹, 郭鹏然^{1*}

(1. 广东省测试分析研究所, 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东省原位电离质谱分析工程技术研究中心, 广东 广州 510070; 2. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要: 建立了基于傅立叶变换离子回旋共振超高分辨质谱(FTICR-MS)的赤灵芝化学成分鉴定和指纹图谱分析方法, 并应用于不同产地赤灵芝样品的来源区分。样品采用50%甲醇进行回流提取后, 以流动注射的进样方式进行直接质谱分析。以ESI离子源在负离子模式下进行检测, 质荷比扫描范围为100~1 000 Da。采用精确分子量测定和碰撞诱导解离实验进行化学成分鉴定, 通过与文献进行比对, 共鉴定出63种化学成分(1种萜烯醛、3种糖、4种三萜醇、6种有机酸和49种三萜酸类成分)。采用聚类分析和主成分分析(PCA)对所获得的质谱指纹图谱进行统计学分析, 在95%的置信区间下, 多个批次不同产地的赤灵芝样品得到了较好的来源区分。研究结果表明该方法可实现赤灵芝的直接、快速、高效分析和指纹图谱研究, 在中药分析领域有着广阔的应用前景。

关键词: 赤灵芝; 傅立叶变换离子回旋共振质谱; 化学成分鉴定; 指纹图谱研究; 来源区分

中图分类号: O657.63; Q512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)05-0525-07

Identification of Chemical Constituents in *Ganoderma lucidum* by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Its Fingerprinting Analysis

YANG Qiu-xia¹, YANG Yun-yun¹, LIU Yao-hui^{1,2}, XIANG Zhang-min¹, GUO Peng-ran^{1*}

(1. Guangdong Engineering and Technology Research Center for Ambient Mass Spectrometry, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou 510070, China; 2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry(FTICR-MS) with cluster analysis and principal components analysis(PCA) was developed for the identification of chemical constituents in *Ganoderma lucidum* and the analysis of its fingerprintings used for origin differentiation. The *Ganoderma lucidum* samples were extracted with a reflux using 50% methanol as solvent, then analyzed directly by FTICR-MS. The MS spectra were recorded at m/z 100-1 000 Da with ESI source under a negative ion detection mode. The chemical constituents in *Ganoderma lucidum* were identified by accurate mass determination in MS/MS experiments, and total of sixty-three active ingredients, including one terpene aldehyde, three sugars, four triterpene alcohols, six organic acids and forty-nine triterpene acids, were identified by comparing their mass spectrometric information with those of reference compounds and literatures. The *Ganoderma lucidum* samples derived from different origins were distinguished by cluster analysis and PCA, and a good origin differentiation was obtained under 95% confidence interval. Experimental results showed that the developed method could be applied in the rapid, direct and efficient analysis of *Ganoderma lucidum* and its fingerprintings, and was a promising approach for analysis of traditional Chinese medicine.

Key words: *Ganoderma lucidum*; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry(FTICR-MS); chemical constituent identification; fingerprint analysis; origin differentiation

收稿日期: 2019-03-04; 修回日期: 2019-03-30

基金项目: 广东省科学院属骨干科研机构创新能力建设专项(2017GDASCX-0104); 广东省科技计划项目(2017A070202017); 广州市科技计划项目(201804010298)

* 通讯作者: 郭鹏然, 研究员, 研究方向: 质谱分析新技术、新方法研究, E-mail: prguo@fenxi.com.cn

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属于担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌。《中华人民共和国药典》2015年版所收载的灵芝药用正品为赤灵芝 *Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *Ganoderma sinense* 的干燥子实体。作为灵芝中的一种,赤灵芝含有大量的生物活性成分^[1-2],主要包括多糖^[3-5]、三萜^[6-8]、核苷酸、类固醇、甾醇、脂肪酸、蛋白质、肽及微量元素^[9],具有抗肿瘤^[10-12]、抗糖尿病^[13]、免疫调节^[14-15]、抗菌、抗病毒(包括抗 HIV)^[16]等多种药理作用。

目前,主要采用薄层色谱(TLC)、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁谱(NMR)、质谱(MS)^[6,17]、高效液相色谱(HPLC)、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)等技术对赤灵芝进行质量控制^[18-19]。然而,这些技术均存在不足,如UV、IR、NMR的专属性较差;HPLC、HPLC-MS的分析时间长且需要标准品。因此,亟需建立一种快速的赤灵芝化学成分鉴定和指纹图谱分析新方法。傅立叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)技术具有灵敏度高、分辨率高、准确度好的特点,可直接进行质谱分析,大大缩短了分析时间,其超高的质量精度和分辨率有利于测定化学成分的精确分子量^[20-21];此外,FTICR-MS还提供了多种碎裂方式,可以获得非常丰富的离子碎片信息以进行化合物结构的鉴定^[22]。

本文建立了一种基于 FTICR-MS 的赤灵芝化学成分快速鉴定和指纹图谱分析方法,采用聚类分析和主成分分析等统计学手段对不同产地的赤灵芝进行来源区分和质量评价。该方法可实现赤灵芝药材的直接、快速、高效分析,在中药分析和质量控制领域有着良好的应用前景。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

SolariX XR 7.0 T FTICR-MS 质谱仪(德国 Bruker 公司,配有电喷雾离子源),BS 210S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司),XY-200 高速多功能粉碎机(浙江省永康市松青五金厂),1 mL 带针注射器(宣城市江南医疗器械有限公司),0.22 μm 微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司),HH-4 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司),DataAnalysis 4.4 数据处理软件(德国 Bruker 公司)。

1.2 材料与试剂

甲醇(色谱纯,德国默克股份两合公司);实验用水为纯化水,由 Milli-Q 超纯水系统制备;三氟乙酸钠校准溶液(NaTFA)、芥子酸(美国 Sigma-Aldrich 公司);标准品均购自中国药品生物制品鉴定所;原儿茶酸(批号:110809-201205)、柠檬酸(批号:W142449191102)、赤灵芝样品购自当地不同药店,具体信息见表 1。

表 1 不同来源赤灵芝样品的具体信息

Table 1 Detailed informations of different *Ganoderma lucidum* samples

No.	Origin	No.	Origin
AH-1	Anhui	JL-3	Jilin
AH-2	Anhui	JL-4	Jilin
AH-3	Anhui	JL-5	Jilin
AH-4	Anhui	JX-1	Jiangxi
AH-5	Anhui	JX-2	Jiangxi
AH-6	Anhui	JX-3	Jiangxi
JL-1	Jilin	SD-1	Shandong
JL-2	Jilin	SD-2	Shandong

1.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI 离子源),负离子扫描模式,扫描质荷比范围: m/z 100~1 000;喷雾气压力(Nebulizer pressure):40 kPa;干燥气体(Dry gas):氦气,流速:4.0 L/min;干燥气温度(Drying gas temperature):200 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压(Spray capillary voltage):4.0 kV;采样大小为 4 M(兆),累加次数 16 次;二级质谱采用碰撞诱导解离(Collision-induced dissociation, CID)方式进行母离子碎裂,碰撞能量范围为 10~30 eV。每个样品注入 ESI 源前,需对离子源进行清理,直至背景信号强度小于 10^5 的响应,以确保样品的信号强度大于背景信号的 3 倍信噪比(S/N)。数据采集及数据分析均采用仪器配套的专用软件进行处理。

1.4 样品制备

将赤灵芝样品粉碎后,过 24 目筛,准确称取赤灵芝样品 1.0 g,精确至 0.000 1 g,加入 40 mL 50% 甲醇,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流 1 h,将回流液冷却至室温,过滤后获取滤液。将滤液稀释(10 倍),过 0.22 μm 滤膜后质谱直接测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

以获取更多的样品质谱信息作为基础, 为建立快速分析鉴定赤灵芝化学成分的方法, 本实验分别对赤灵芝的提取溶剂和离子源进行了优化。分别考察了水、50% 甲醇、甲醇作为赤灵芝提取溶剂时, 样品的谱图情况(见图1)。结果显示, 以50% 甲醇作为提取溶剂时能获取更多的质谱信号。近年来, 基质辅助激光解吸电离源(MALDI)直接快速鉴定中药化学成分的方法取得了飞速发展。为开发快速检测中药化学成分的分析方法, 本实验考察了电离喷雾(ESI)与MALDI两种电离源对赤灵芝化学成分快速分析的情况, 其中, 采用MALDI对赤灵芝进行检测分析时, 利用芥子酸作为基质。两种电离源的检测结果见图2。由图可见, ESI离子源电离模式下获得的质谱数据除包含MALDI离子源电离模式的质谱数据之外, 还获得更多其它质谱数据, 因而ESI源电离效果更有利于赤灵芝成分的电离。由于赤灵芝中含有大量的有机酸类成分, 因此, 选择负离子检测模式进行赤灵芝样品的检测分析。最终确定利用50% 甲醇提取赤灵芝样品, 在ESI源负离子模式下对样品进行检测分析, 以获得更多的样品质谱信号。

2.2 ESI/FTICR-MS 成分分析方法的评价

2.2.1 精密度与重复性

对同一样品溶液重复注入6次进行质谱检测, 使用相对峰值强度的验证方法^[23]以确定仪器的精密度。经计算, m/z 133.014 35、195.051 34、515.300 99等质谱峰的相对峰值强度的RSD均小于3.6%, 说明ESI/FTICR-MS具有较好的仪器精密度。

对6个独立制备的样品进行质谱检测, 使用相对峰值强度的验证方法^[23], 分别计算 m/z 133.014 35、195.051 34、515.300 99等质谱峰的相对峰值强度的RSD, 结果均低于4.8%, 说明ESI/FTICR-MS成分分析方法具有较好的重复性。

2.2.2 稳定性与准确性 对同一样品在0、2、4、8、12、24、36、48 h采集的质谱数据进行相对峰值强度^[23]分析, 分别计算峰强度较高的质谱峰, 如 m/z 133.014 35、195.051 34、515.300 99等的相对峰值强度的RSD, 结果均小于4.2%。表明样本在48 h内保持稳定, 使用ESI/FTICR-MS成分分析方法可行, 且结果稳定可靠。

进一步通过ESI/FTICR-MS检测原儿茶酸、柠檬酸标准品, 获得的质谱数据与理论值的误差值均小于 3×10^{-6} , 这表明ESI/FTICR-MS的质量准确度可信。因此, 本实验建立的ESI/FTICR-MS方法有效可行。

2.3 赤灵芝主要成分的鉴定

为确保分析结果的准确性, 每次实验前均在ESI源正离子模式下用三氟乙酸钠校正液对质量轴进行校正。赤灵芝的主要质谱峰如图3所示, 表2为赤灵芝主要成分的鉴定结果。通过采用ESI/FTICR-MS法, 将母离子及其碎片离子与相

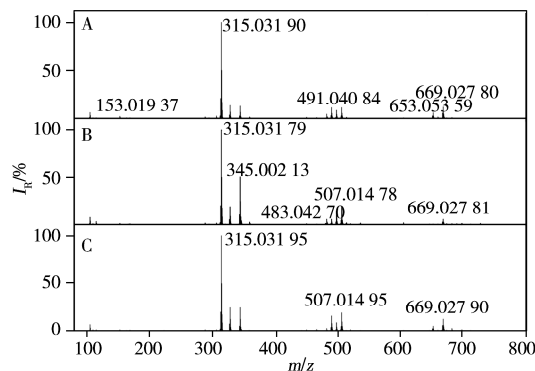


图1 不同提取溶剂的赤灵芝质谱图

Fig. 1 MS spectra of *Ganoderma lucidum* with different extract solvents

A. pure water; B. 50% methanol; C. methanol

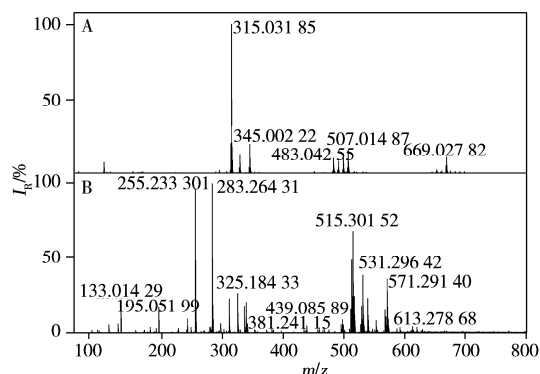


图2 不同离子源下赤灵芝的FTICR-MS质谱图

Fig. 2 MS spectra of *Ganoderma lucidum* with different ion sources

A: MALDI source, B: ESI source

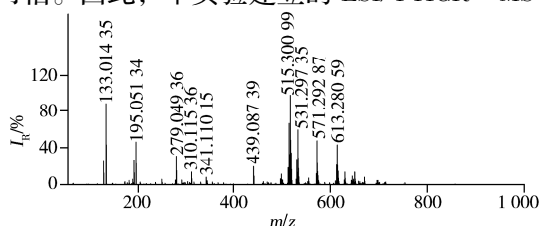


图3 赤灵芝的FTICR-MS指纹质谱图

Fig. 3 FTICR-MS fingerprint of *Ganoderma lucidum*

关文献进行比较, 比较的数据包括分子式、质荷比和碎片离子信息, 从而准确识别出主要成分 63 种, 包括 1 种萜烯醛, 3 种糖, 4 种三萜醇, 6 种有机酸和 49 种三萜酸类成分。这些数据由仪器系统工作站计算推导, 误差值均小于 3.0×10^{-6} 。

表 2 赤灵芝成分的鉴定结果
Table 2 Ingredient identification of *Ganoderma lucidum*

Peak No.	Molecular formula	Parent ion (m/z)	Error ($\times 10^{-6}$)	Daughter ions (m/z)	Identification
1	C ₄ H ₄ O ₄	115.003 86	-1.5	71.013 84	Maleic acid ^[24]
2	C ₄ H ₆ O ₅	133.014 35	-0.8	115.003 66	Malic acid ^[23]
3	C ₇ H ₆ O ₅	137.024 67	-1.8	93.034 56	Hydroxybenzoic acid ^[25-26]
4	C ₇ H ₆ O ₄	153.019 62	-1.9	109.029 46	Protocatechuic acid ^[25-26]
5a	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.056 553	-2.5	161.045 56, 71.000 84, 59.392 12	Glucose ^[27]
5b	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.056 553	-2.5	161.045 56, 89.309 83, 71.000 84	Fructose ^[27]
6	C ₆ H ₁₄ O ₆	181.072 187	-2.4	163.061 24, 101.024 40, 89.024 39, 71.013 83	Mannitol ^[27]
7	C ₆ H ₈ O ₇	191.020 08	-1.8	173.008 51, 129.019 34, 111.008 75, 87.008 75	Citric acid ^[23]
8	C ₆ H ₁₂ O ₇	195.0513 4	-1.6	177.051 00, 158.925 36, 129.019 31, 99.008 72	Gluconic acid ^[23]
9	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.234 5	-3.5	311.222 65, 301.180 73, 293.212 14, 255.232 88, 229.144 47, 211.133 95, 171.102 65	Tricin ^[25]
10	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.110 15	-3.5	179.056 12, 89.024 48	Sucrose ^[27]
11	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	451.323 05	-2.8	375.181 05, 354.072 43, 341.108 91, 329.233 31	Luciadehyde B ^[28]
12	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	453.339 00	-3.5	339.232 78, 271.227 77, 112.985 57	Ganoderiol F ^[19]
13	C ₂₇ H ₃₅ O ₆	455.244 74	-1.8	419.222 82, 411.254 36, 395.222 66, 247.133 93	Lucidenic acid F ^[18]
14a	C ₂₇ H ₃₈ O ₆	457.259 65	-1.9	439.248 84, 421.238 42, 287.165 19, 261.149 59	Lucideric acid A ^[18]
14b	C ₂₇ H ₃₈ O ₆	457.259 65	-1.9	439.248 84, 397.238 31, 395.258 97, 303.196 45	3 β -Hydroxy-4,4,14-trimethyl-7,11,15-trioxochol-8-en-24-oic acid ^[29]
15	C ₂₇ H ₄₀ O ₆	459.276 09	-1.9	441.264 48, 289.180 85, 249.149 64	Lucidenic acid N ^[18]
16	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	461.292 69	-3.9	443.280 12, 287.165 16, 181.071 77	3,7,15-Trihydroxy-4,4,14-trimethyl-11-oxo-chol-8-en-24-oic acid ^[30]
17	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	467.316 56	2.6	423.326 48	Ganoderic acid DM ^[28]
18	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.333 22	-1.9	425.342 15, 340.236 16, 163.112 82, 128.035 30	3-Hydroxy-7-oxolanost-8,24-dien-26-oic acid ^[19]
19	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.349 41	-3.0	453.228 37, 317.175 70, 299.165 22, 128.035 29	Lucidumol A ^[19]
20	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	475.270 88	-1.6	457.259 39, 439.250 25, 431.316 70	Lucidenic acid C ^[30]
21a	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	483.311 25	0.7	439.321 86, 255.232 88	15-Hydroxyganoderic acid DM ^[28]
21b	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	483.311 25	0.7	465.301 01, 421.311 07, 385.238 10, 345.206 97, 287.201 54	3,7-Oxo-12-hydroxy-ganoderic acid DM ^[29]
21c	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	483.311 25	0.7	439.321 57, 341.248 55, 325.217 22, 287.201 55	Ganolucidic acid E ^[19]
21d	C ₃₀ H ₄₃ O ₅	483.311 25	0.7	439.321 55, 385.238 10, 345.206 97	11-Hydroxy-3,7-dioxolanost-8,24-dien-26-oic acid ^[31]
22	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.328 83	-3.2	467.316 52, 441.337 11, 345.206 97, 423.326 84, 289.217 13, 271.170 36, 128.035 28	3,15-Dihydroxy-11-oxolanost-8,24-dien-26-oic acid ^[19]
23	C ₃₀ H ₄₀ O ₆	495.286 83	-0.04	477.285 22, 459.274 95, 451.285 14, 436.261 63, 301.180 78, 285.185 85, 247.133 92	3,11,15-Trioxochol-8-en-24-oic acid ^[29]
24	C ₃₀ H ₄₂ O ₆	497.290 89	-0.05	453.301 08, 435.289 50, 285.185 41	Ganoderic acid GS ^[28]
25	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	499.306 31	0.4	481.295 98, 437.305 94	Ganolucidic acid D ^[18]
26a	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501.323 01	-1.6	483.346 5, 439.404 5, 421.340 4, 289.190 8	Ganolucidic acid B ^[18]
26b	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501.323 01	-1.6	483.321 55, 411.290 37, 287.201 56	3,15-Dihydroxy-11,23-dioxolanost-8-en-26-oic acid ^[19]

(续表2)

Peak No.	Molecular formula	Parent ion (m/z)	Error ($\times 10^{-6}$)	Daughter ions(m/z)	Identification
27	C ₃₀ H ₃₈ O ₇	509.256 01	-3.0	491.243 40, 467.316 46, 461.196 74, 447.253 86, 432.230 43, 417.206 93, 299.165 17	Ganoderenic acid F ^[19]
28a	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	511.271 50	-2.7	478.235 03, 431.259 24, 301.180 92, 261.149 73, 247.133 98	Ganoderenic acid D ^[18]
28b	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	511.271 50	-2.7	493.259 32, 449.269 61	Ganoderic acid F ^[18]
29a	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	513.287 33	-3.0	451.286 05, 436.261 75	Ganoderic acid J ^[18]
29b	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	513.287 33	-3.0	495.275 09, 451.285 25, 436.261 180	Ganoderic acid AM1 ^[18]
29c	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	513.287 33	-3.0	495.275 09, 451.285 25	Ganoderic acid D ^[18]
29d	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	513.287 33	-3.0	495.275 09, 451.285 25, 329.175 70, 303.196 55, 287.201 61	Ganoderenic acid B ^[29]
30a	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	515.300 99	0.8	497.290 74, 479.280 22	Ganoderic acid A ^[18]
30b	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	515.300 99	0.8	497.290 74, 453.300 82, 435.291 18	Ganoderic acid δ ^[32]
30c	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	515.300 99	0.8	497.290 74, 453.300 82	3,7,15-Trihydroxy-11,23-dioxolanost-8,16-dien-26-oic acid ^[7]
30d	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	515.300 99	0.8	498.294 03, 454.304 21, 304.199 90, 287.165 24	Ganoderic acid B ^[18]
31a	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	517.315 91	2.3	499.306 62, 481.295 98, 455.316 51, 437.305 89	Ganoderic acid C2 ^[18]
31b	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	517.315 91	2.3	302.188 67	Ganolucidic acid C ^[28]
32a	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	527.263 82	2.3	509.254 30, 465.264 57, 317.175 73, 301.180 56	Elfvingic acid A ^[18]
32b	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	527.263 82	2.3	509.254 30, 465.264 57, 301.180 56	12-Hydroxy-3,7,11,15,23-pentaoxolanost-8-en-26-oic acid ^[18]
32c	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	527.263 82	2.3	509.254 30, 483.274 89, 465.264 57, 317.175 73	3,12-Dihydroxy-4,4,14-trimethyl-7,11,15-trioxo-lanost-8,9,20,22-en-26-oic acid ^[18]
33a	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	529.281 60	-1.7	511.269 85, 467.280 12	12-Hydroxyganoderic acid D ^[18]
33b	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	529.281 60	-1.7	511.269 93, 493.259 52, 301.180 83, 263.128 85	Ganoderic acid D2 ^[19]
33c	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	529.281 60	-1.7	511.269 93, 467.280 10, 437.233 19	Ganoderic acid C6 ^[18]
34	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	531.297 35	-1.9	513.285 56, 469.295 81, 454.272 41, 436.263 27, 301.180 89	Ganoderic acid G ^[32]
35a	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	533.311 84	-0.3	515.289 87, 485.291 03	12-Hydroxyganoderic C2 ^[19]
35b	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	533.311 84	-0.3	515.301 18, 497.290 73, 485.290 63, 467.280 07, 453.300 77, 423.290 23, 303.160 05, 287.165 17	3,7,12,15-Tetraphydroxy-11,23-dioxolanost-8-en-26-oic acid ^[19,26]
36	C ₃₀ H ₄₄ O ₉	547.292 77	-2.8	529.280 48, 511.269 89, 493.259 34, 485.290 60, 317.175 58	3,12,15,20-Tetraphydroxy-7,11,23-trioxolanost-8-en-26-oic acid ^[19]
37	C ₃₂ H ₄₃ O ₈	555.296 21	0.2	513.287 68, 495.274 47	Lucidenic acid GS-3 ^[33]
38	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	569.277 14	-2.7	551.264 70, 509.252 68	12-Acetoxyganoderic acid F ^[18-19]
39a	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	571.292 87	-2.8	553.280 51, 511.269 93, 481.222 01	Ganoderic acid H ^[18]
39b	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	571.292 87	-2.8	553.280 51, 538.264 16, 511.269 93, 467.280 16	Ganoderenic acid K ^[18]
39c	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	571.292 87	-2.8	551.264 82, 509.254 27, 465.264 46	12-Acetoxyganoderic acid D ^[18]
40	C ₃₂ H ₄₆ O ₉	573.306 50	0.7	555.297 07, 511.306 28, 496.281 91	Ganoderic acid K ^[18]
41a	C ₃₇ H ₄₁ O ₈	613.280 59	0.2	595.267 36, 553.281 18, 509.294 10	3-Acetylganoderic acid H ^[18]
41b	C ₃₇ H ₄₁ O ₈	613.280 59	0.2	595.267 36, 553.281 18	3-Acetylganoderenic acid K ^[18]

2.4 聚类分析

为了区分不同产地的赤灵芝, 实验采用统计学方法对16个样品进行分组。通过“距离”大小以获悉样品相似度情况, 具体结果如图4所示。在95%的置信区间下, 不同产地的样本均得到很好的区分, 通过数据点的分离情况可知16批赤灵芝来源于4个不同的产地。如SD-1和SD-2均来自山东省; JL-1、JL-2、JL-3、JL-4、JL-5来自吉林省。结果表明, 利用FTICR-MS检测赤灵芝的化学成分并通过聚类分析法有助于鉴别赤灵芝的来源, 为评价药材来源提供了依据。

2.5 主成分分析

为了评价赤灵芝样品的质量和来源, 采用化学计量主成分分析(PCA)方法, 根据FTICR-MS获得

的质谱数据对 16 批赤灵芝样品进行分类。在 95% 的置信区间下, 根据 PCA 得分图和荷载图对样品进行区分, 具体结果如图 5 所示。在图 5A 中, 4 个不同来源的数据点被清晰分离。结果表明, 安徽和江西的赤灵芝均落在负相关区域, 山东与吉林的赤灵芝处于正相关区域, 因此安徽和江西的赤灵芝样本相似, 且不同于山东与吉林的样品, 这可能是由地理区域、气候变化、生态环境的综合影响所致。具体影响得分结果的化学成分见图 5B, 影响得分的因素分别用 PC1 和 PC2 表示。由图 5B, 根据各个成分(质荷比)的偏离程度, 主要影响得分结果的质荷比分别有: m/z 133.01 (苹果酸)、128.05 (Unkonwn)、191.05 (柠檬酸)、515.35 (Ganoderic acid A、ganoderic acid δ 、3,7,15-trihydroxy-11,23-dioxolanost-8,16-dien-26-oic acid)、513.25 (Ganoderic acid J、ganoderic acid AM1、ganoderic acid D、ganoderenic acid B)、531.30 (Ganoderic acid G)、613.25 (3-Acetyl ganoderic acid H、3-acetyl ganoderenic acid K)。这些成分与赤灵芝的质量控制呈较强的正相关关系, 其中赤灵芝的小分子有机酸 m/z 133.01、128.05、191.05 与 PC1 密切相关; 同样, m/z 513.25、515.35、531.30 和 613.25 是与 PC2 密切相关的三萜化合物。该结果指出的小分子有机酸和三萜类化合物与现代医学治疗疾病的有效化合物相一致。这些化合物之间的相关性在 PCA 图中得到了明显的体现, 因此, 这些化合物是全面评估赤灵芝质量的潜在成分。

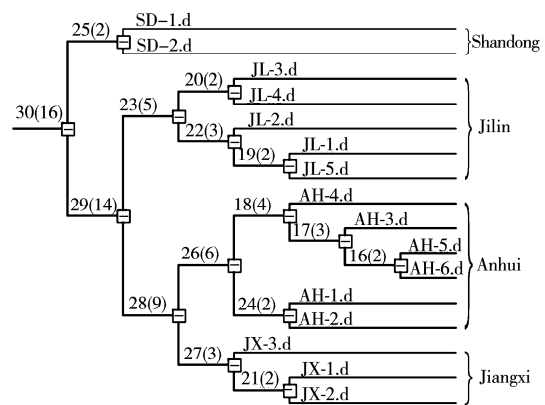


图 4 16 批赤灵芝样品的聚类分析结果
Fig. 4 Cluster analysis results of 16 *Ganoderma lucidum* samples

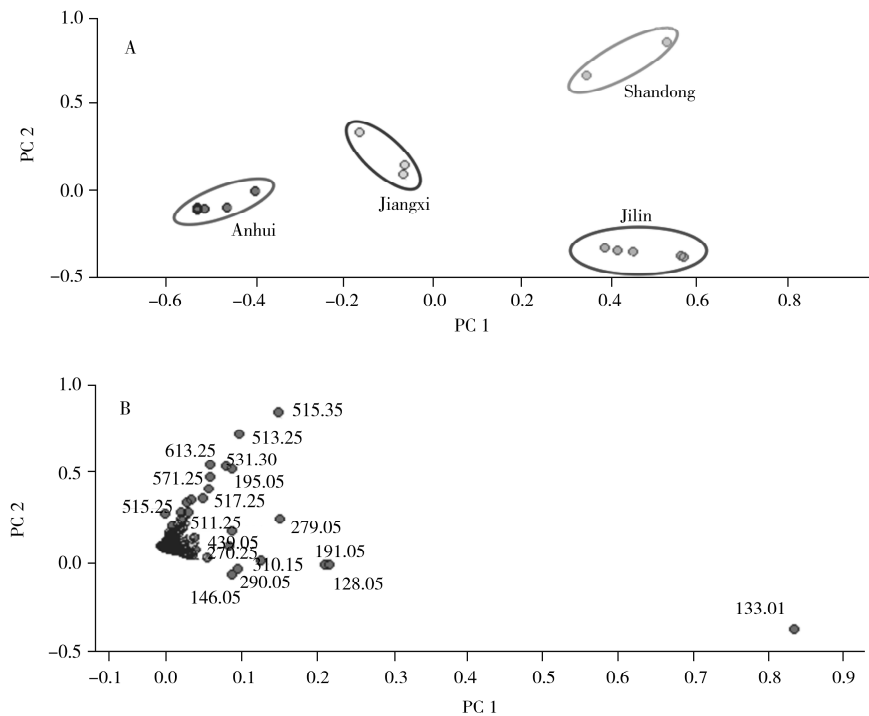


图 5 16 批赤灵芝样品的主成分分析结果
Fig. 5 Principal component analysis (PCA) of 16 *Ganoderma lucidum* samples
A. scores plot; B. loading plot

3 结论

本研究建立了一种基于 FTICR-MS 的赤灵芝化学成分快速鉴定和指纹图谱分析方法, 结合一级、二级质谱数据与相关文献的报道共鉴定出赤灵芝中 63 种化学成分, 包括 1 种萜烯醛、3 种糖、4 种三

萜醇、6种有机酸和49种三萜酸类成分。采用聚类分析、主成分分析等统计学方法对不同产地的赤灵芝样品进行来源分析,得到了较好的来源区分结果。PCA结果显示不同产地来源的赤灵芝存在一定的差异性,其差异与有机酸、三萜酸类化合物相关,这些化合物可作为评估赤灵芝质量稳定性和一致性的标记物。研究表明,FTICR-MS可直接、快速、高效地实现赤灵芝的化学成分鉴定和指纹图谱研究,在中药分析和质量控制领域有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Silva D, Dilani D, Rapior S, Fons F, Bahkali A H, Hyde K D. *Fungal Divers.*, **2012**, 55(1): 1-35.
- [2] Sanodiya B S, Thakr G S, Baghel R K, Prasad G B K S, Bisen P S. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2009**, 10(8): 717-742.
- [3] Xu S, Dou Y, Ye B, Wu Q, Wang Y, Hu M, Ma F, Rong X, Guo J. *J. Funct. Foods*, **2017**, 38: 545-552.
- [4] Habijan J, Berovic M, Boh B, Plankl M, Wraber B. *New Biotechnol.*, **2015**, 32(1): 85-95.
- [5] Kan Y J, Chen T Q, Wu Y B, Wu J G, Wu J Z. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, 72: 151-157.
- [6] Fatmawati S, Shimizu K, Kondo R. *Fitoterapia*, **2010**, 81(8): 1033-1036.
- [7] Hu L L, Ma Q Y, Huang S Z, Guo Z K, Ma H X, Guo J C, Dai H F, Zhao Y X. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2013**, 15(4): 357-362.
- [8] Chen D H, Shiou W Y, Wang K C, Huang S Y, Shie Y T, Tsai C M, Shie J F, Chen K D. *J. Chin. Chem. Soc.*, **1999**, 46(1): 47-51.
- [9] Bishop K S, Kao C H J, Xu Y, Glucina M P, Paterson R R M, Ferguson L R. *Phytochemistry*, **2015**, 114: 56-65.
- [10] Batra P, Sharma A K, Khajuria R. *Int. J. Med. Mushrooms*, **2013**, 15(2): 127-142.
- [11] Boh B, Berovic M, Zhang J S, Lin Z B. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2007**, 13: 265-301.
- [12] Wasser S P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, 89(5): 1323-1332.
- [13] Chang C J, Lin C S, Lu C C, Martel J, Ko Y F, Ojcius D M, Tseng S F, Wu T R, Chen Y Y, Young J D, Lai H C. *Nat. Commun.*, **2015**, 6: 7489-7506.
- [14] Cor D, Knez Z, Knez Hrnčić M. *Molecules*, **2018**, 23(3): 649-670.
- [15] Xu Z, Chen X, Zhong Z, Chen L, Wang Y. *Am. J. Chin. Med.*, **2011**, 39(1): 15-27.
- [16] El-Mekkawy S, Meselhy M R, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawahata T, Otake T. *Phytochemistry*, **1998**, 49(6): 1651-1657.
- [17] Liu D Z, Zhu Y Q, Li X F, Shan W G, Gao P F. *Chem. Biodivers.*, **2014**, 11(6): 982-986.
- [18] Yang M, Wang X M, Guan S H, Xia J M, Sun J H, Guo H, Guo D A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2007**, 18(5): 927-939.
- [19] Cheng C R, Yang M, Wu Z Y, Wang Y, Zeng F, Wu W Y, Guan S H, Guo D A. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25(9): 1323-1335.
- [20] Cao D, Lv J, Geng F, Rao Z, Niu H, Shi Y, Cai Y, Kang Y. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(24): 12210-12218.
- [21] Wu W, Chen Y, Wang B, Sun X, Guo P, Chen X. *J. Sep. Sci.*, **2017**, 40(16): 3188-3195.
- [22] Wang Y, Han F, Song A, Wang M, Zhao M, Zhao C. *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39(22): 4325-4334.
- [23] Deng J, Yang Y. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 785: 82-90.
- [24] Zhou H X, Zhang F, Xu W, Yang W Q, Liu H, Xu J Z. *J. Nanjing Xiaozhuang Univ.* (周红霞, 张凤, 许蔚, 杨雯莹, 柳菡, 徐锦忠. 南京晓庄学院学报), **2010**, 3: 57-62.
- [25] Chen Y, Yan Y, Xie M Y, Nie S P, Liu W, Gong X F, Wang Y X. *J. Pharm. Biomed.*, **2008**, 47(3): 469-477.
- [26] Taofiq O, Heleno S A, Calheta R C, Alves M J, Barros L, González-Paramás A M, Barreiro M F, Ferreira I C F R. *Food Chem. Toxicol.*, **2017**, 108: 139-147.
- [27] Wang H, Liu Y Q, Yang H M, Shi H L, Yan L B. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(6): 873-875.
- [28] Yan Z, Xia B, Qiu M H, Li S D, Xu H X. *Biomed. Chromatogr.*, **2013**, 27(11): 1560-1567.
- [29] Wu L, Liang W, Chen W, Li S, Cui Y, Qi Q, Zhang L. *Molecules*, **2017**, 22(4): 584-600.
- [30] Cui M L, Yang H Y, He G Q. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **2015**, 16(12): 998-1010.
- [31] Cheng C R, Yue Q X, Wu Z Y, Song X Y, Tao S J, Wu X H, Xu P P, Liu X, Guan S H, Guo D A. *Phytochemistry*, **2010**, 71(13): 1579-1585.
- [32] Qian Z, Zhao J, Li D, Hu D, Li S. *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35(20): 2725-2734.
- [33] Min B S, Gao J J, Nakamura N, Hattori M. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48(7): 1026-1033.

(责任编辑:龙秀芬)