

文章编号:1007-2861(2008)06-0652-04

灵芝药材质量的 HPLC 指纹图谱评价方法

顾中演, 翁新楚

(上海大学 生命科学学院, 上海 200444)

摘要: 以灵芝药材为研究对象, 应用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5-Micon), 乙腈-乙酸的水溶液二元梯度洗脱模式, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 242 nm, 建立了 10 批不同产地灵芝样品的 HPLC 指纹图谱. 同时对各产地药材指纹图谱进行分析, 应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对各产地药材进行了质量评价. 该方法简便、可靠, 可用于灵芝的质量评价.

关键词: 灵芝; 指纹图谱; 高效液相色谱; 质量控制

中图分类号: R 927.11 **文献标志码:** A

RP-HPLC Fingerprint for Quality Assessment of *Ganoderma lucidum*

GU Zhong-yan, WENG Xin-chu

(School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: To establish an RP-HPLC fingerprint analysis for quality control of *Ganoderma lucidum*, HPLC fingerprint analysis method of *Ganoderma lucidum* was developed. ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5-Micon) was used, with mixture of acetonitrile and water solution of acetic acid as mobile phase in a gradient mode. The flow rate was 0.8 mL/min. The wavelength used in the measurement was 242 nm. Ten batches of *Ganoderma lucidum* were determined. The HPLC fingerprint chromatograms of different producing area were analyzed. The samples' quality was assessed by Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM 2004. The method can be used to identify and evaluate the quality of *Ganoderma lucidum* conveniently.

Key words: *Ganoderma lucidum*; fingerprint; HPLC; quality control

灵芝(*Ganoderma*)为层菌纲非褶菌目类灵芝菌科灵芝属真菌的总称,习惯所称的灵芝是指灵芝属中赤芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.)的子实体部分^[1].灵芝味甘、性温、无毒,可补心、肝、脾、肺、肾五脏之气,具滋补强身、扶正固本之功效.大量药理研究表明,灵芝具有调节免疫、保肝、抗肿瘤、抗衰老、提高机体耐缺氧能力等活性^[2-4].中国、日本、韩国等国家将灵芝作为药物或补品食用.

在我国,灵芝的主要产地有安徽、山东、福建、江苏、吉林等地,由于生态环境、品种、采集期以及技术的不同,导致药材的品质差异较大,为了避免因质量差异影响到灵芝药材的进一步开发利用,有必要建立全面、系统的控制灵芝质量的方法^[5].本工作采用高效液相色谱法对部分不同产地灵芝药材的指纹图谱进行了研究,为灵芝药材的鉴别和质量控制提供实验依据.

1 仪器与材料

Agilent1100 高效液相色谱仪 (G 1379A DEGASSER, G 1310A IsoPump, AT-330 Column-Heater, G 1314A VWD, G 1328B Man. Inj.), KQ3200B 型超声波清洗器, RE-85Z 型旋转蒸发器, UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计。

灵芝酸 A、灵芝酸 B 对照品由本实验室提取精制,经 UV, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS 等鉴定结构,纯度均大于 98%。乙腈、甲醇为色谱纯,自制高纯水,乙酸及其他试剂均为分析纯。

灵芝药材(均为赤芝的子实体)分批从部分产地收集或购于医药公司,药材来源见表 1。

表 1 灵芝样品的来源

Table 1 Sources of *Ganoderma lucidum* samples collected

编号	产地
1	福建武夷山 01
2	福建武夷山 02
3	江苏南通
4	安徽大别山 01
5	安徽大别山 02
6	安徽大别山 03
7	山东
8	安徽黄山
9	浙江龙泉
10	福建福州

2 条件与制备

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5- μm), 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 检测器波长 242 nm, 进样量 20 μL 。用乙腈 (B) 和含有乙酸的水溶液 (A) 进行梯度洗脱, A 中水和乙酸的体积比为 100.0:0.1, 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution of mobile phase %

	时间/min					
	0	5	40	45	60	70
A	80	65	58	40	5	0
B	20	35	42	60	95	100

2.2 对照品溶液的制备

精密称取灵芝酸 A、灵芝酸 B 对照品适量,用甲醇溶解,摇匀,制成质量浓度分别为 1.00 mg/mL 的对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

将灵芝样品粉碎成粉末,精密称取 2 g,加氯仿 80 mL,超声提取 3 次,每次 20 min,滤过,药渣弃去;将滤液置旋转蒸发器减压回收溶剂至干,用甲醇溶解转移至 10 mL 容量瓶中,定容,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,备用。

3 方法学考察

3.1 精密度实验

精密吸取灵芝样品 (1 号) 溶液 20 μL , 重复进样 6 次, 记录色谱指纹图谱。结果表明, 各色谱峰 (单峰面积大于 2% 总峰面积) 与内参比峰 (6 号峰) 的相对保留时间的 RSD 均小于 0.7%, 相对峰面积比的 RSD 均小于 2.3%, 同时用中国药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A)”对所得色谱图进行处理, 以中位数建立对照指纹图谱, 各谱图相似度均大于等于 0.990。结果表明, 仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

3.2 稳定性试验

精密吸取灵芝样品 (1 号) 溶液 20 μL , 分别在 0, 4, 8, 16, 24 和 48 h 进样分析, 记录色谱指纹图谱。以 3.1 节项下选定的色谱峰为观测指标, 各色谱峰与内参比峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 相对峰面积比的 RSD 均小于 2.8%; 再利用 3.1 节项下的相似度评价方法, 得到各谱图的相似度均大于等于 0.983。结果表明, 灵芝样品溶液在 48 h 内稳定。

3.3 重复性试验

分别取灵芝样品 (1 号) 6 份, 按 2.3 节项下制备供试品溶液, 记录色谱指纹图谱。以 3.1 节项下选定的色谱峰为观测指标, 各色谱峰与内参比峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%, 相对峰面积比的 RSD 均小于 2.2%; 再利用 3.1 节项下的相似度评价方法, 得到各谱图的相似度均大于等于 0.990。结果表明, 重复性良好, 符合指纹图谱要求。

4 指纹图谱的建立

4.1 共有峰的确认

通过对 10 批灵芝药材指纹图谱的测定, 共获得了 20 个特征色谱峰, 其中通过反复比对, 指认了 2

个色谱峰,6号峰为灵芝酸 A,4号峰为灵芝酸 B.灵芝酸 A、灵芝酸 B 的色谱图分别如图 1 和图 2 所示,

典型样品色谱图如图 3 所示,结构式分别如图 4 和图 5 所示.

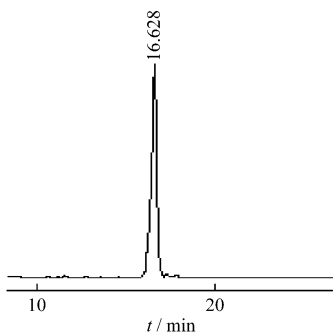


图 1 灵芝酸 B 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of ganoderic acid B

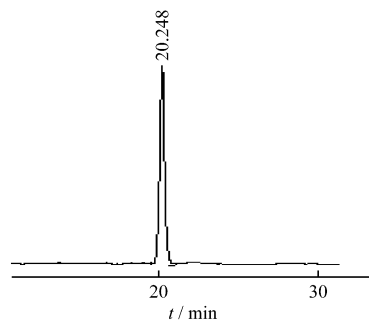


图 2 灵芝酸 A 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of ganoderic acid A

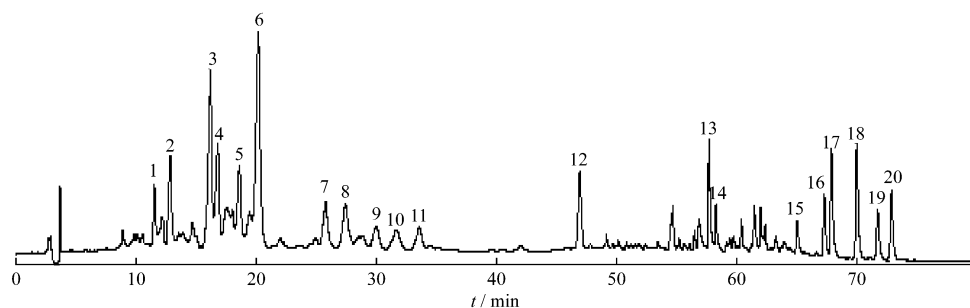


图 3 灵芝的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint chromatogram of *Ganoderma lucidum*

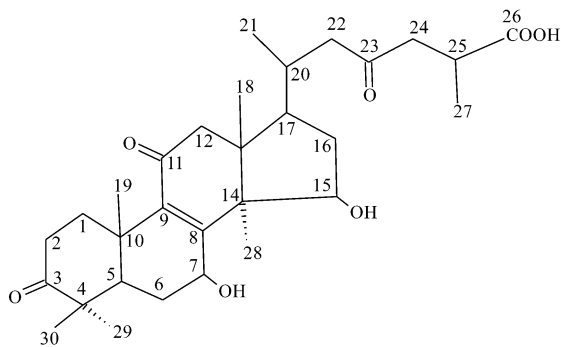


图 4 灵芝酸 A 化学结构

Fig. 4 Chemical structure of ganoderic acid A

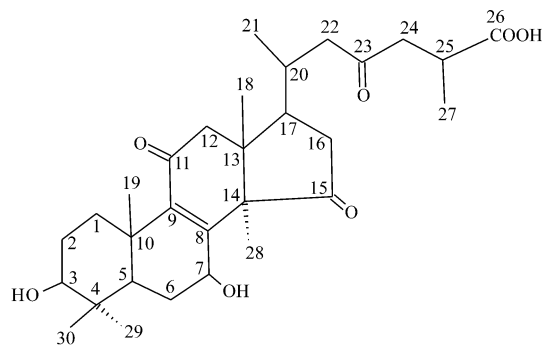


图 5 灵芝酸 B 化学结构

Fig. 5 Chemical structure of ganoderic acid B

4.2 指纹图谱的相似度计算

采用国家药典委员会研发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)”,按照 3.1 节项下的相似度计算方法,依据 10 批不同来源的灵芝指纹图谱(见图 6),图中取末指纹峰为参照物峰计算各峰统一化相对时间作横坐标,取积分最大峰为另一参照物峰计算各峰统一化相对积分为纵坐标.计算样品与共有模式之间的相似度,相似度计算结果见表 3.结果表明,不同产地灵芝药材指纹图谱的整体面貌

表 3 不同来源灵芝指纹图谱相似度计算结果

Table 3 Results of similarity evaluation of different *Ganoderma lucidum* samples

样品名	相似度	样品名	相似度
1	0.964	6	0.945
2	0.937	7	0.965
3	0.963	8	0.961
4	0.941	9	0.979
5	0.960	10	0.946

基本一致,指纹图谱相似度较高,10批样品的相似度都大于0.9,因此,采用此法可用于灵芝药材的质量评价。

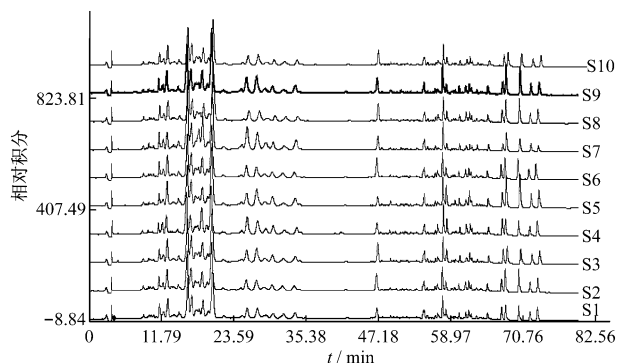


图6 10批灵芝药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC fingerprint chromatogram of *Ganoderma lucidum* for ten batches of samples

5 讨论

本工作考察了甲醇、无水乙醇、95%乙醇、乙酸乙酯、氯仿超声提取后所获得的谱图特征。结果表明,甲醇、无水乙醇、95%乙醇提取后所获得的指纹图谱,中极性的部分比较富集,灵芝中的主要活性成分三萜类化合物得不到很好的分离。另外再结合文献[6],马林等比较了甲醇、95%乙醇、氯仿的提取效果,发现用氯仿提取率最高。所以本实验确定氯仿为提取溶剂。

文献[7]目的是提取灵芝酸三萜酸组分,用等度洗脱的方法,分离得到8个主要色谱峰,将指纹图谱与药效成分结合起来,但不能反映灵芝药材的全貌特征。本工作直接得到灵芝氯仿提取部位,并进行指纹分析,经过反复比较,采用梯度洗脱的方法,考

察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-乙酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等几个溶剂系统。结果表明,以乙腈-乙酸水溶液(水的乙酸的体积比为100.0:0.1)为流动相进行梯度洗脱,得到的信息量相对于文献[7]要丰富,同时谱图也有较好的分离。

利用紫外可见分光光度计做全波长扫描,结果发现在242 nm时有最大吸收,色谱信息最为丰富,所以选择242 nm作为指纹图谱的检测波长。

本工作建立的指纹图谱分析方法简单,大部分化学成分能得到较好的分离。数据表明,该方法具有很好的稳定性、重复性和可行性,因此有利于评价灵芝药材的优劣,全面控制药材的质量。

参考文献:

- [1] 罗俊,林志斌. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. 药学学报,2002,37(7):574-578.
- [2] 冯道俊. 灵芝的化学成分、功效及药理作用[J]. 特种经济动植物,2006(8):39-40.
- [3] 张晓云,杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用[J]. 国外医药(植物药分册),2006,21(4):152-155.
- [4] HUIE C W, DI X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 812:241-243.
- [5] 石志红,何建涛,常文保. 中药指纹图谱技术[J]. 大学化学,2004,19(1):33-34.
- [6] 马林,吴丰,陈若芸. 灵芝三萜成分分析[J]. 药学学报,2003,38(1):50-52.
- [7] 黄书铭,杨新林,黄健,等. 灵芝三萜类化合物高效液相指纹图谱研究[J]. 北京理工大学学报,2004,24(5):458-461.

(编辑:刘志强)