赤芝 RP-HPLC色谱特征图谱研究

赵佳[1], 陈晓辉[2], 付春旺[1], 毕开顺[2*]

(1. 沈阳药科大学　中药学院, 沈阳　110016; 2 沈阳药科大学　药学院, 沈阳　110016)

摘要　目的: 建立赤芝 RP-HPL 色谱特征图谱, 为赤芝药材的质量控制提供依据。方法: 以灵芝酸 A为内参照物, 采用 Kro-masil $_{18}$ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈(A) - 0.03%磷酸水溶液(B)为流动相, 进行梯度洗脱(0~ 35 min, 32%→ 33% A; 35~ 38 min, 33%→ 37% A; 38~ 60 min, 37%→ 40% A; 60~ 70 min, 40% A), 流速 1.0 mL·min^{-1}, 检测波长 252 nm, 柱温 35℃。结果: 获得了较为理想的赤芝药材 HPL 特征图谱, 确定了 19个共有峰。根据聚类分析结果, 将赤芝药材分为 2类。结论: 该方法简便、准确、可靠, 可用于赤芝药材的质量控制。

关键词: 赤芝; RP-HPL ; 特征图谱

中图分类号: R917　　文献标识码: A　　文章编码: 0254-1793(2009)11-1854-04

Study on RP-HPLC specific chromatogram of *Ganoderma lucidum* Karst

ZHAO Jia[1], HEN Xiao-hui[2], FU hun-wang[1], BI Kai-shun[2*]

(1. School of Traditional hinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, hina;
2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, hina)

Abstract **Objective:** To establish the HPL specific chromatogram of *Ganoderma lucidum*. **Methods:** 16 samples of *G. lucidum* from different producing areas were determined by SHIMADZU L-10AD DAD-HPL under the chromatographic conditions: column by Kromasil $_{18}$ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile(A) - 0.03% phosphoric acid solution(B) with gradient elution(0-35 min, 32%→ 33% A; 35-38 min, 33%→ 37% A; 38-60 min, 37%→ 40% A; 60-70 min, 40% A) at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}, wavelength 252 nm, column temperature 35℃. **Results:** A satisfactory method for HPL specific chromatogram determination of G. *lucidum* was established, 19 characteristic peaks in the HPL specific chromatogram were indicated. The 16 batches of *G. lucidum* were recommended into two based on the results of cluster analysis. **Conclusion:** The method is simple and accuracy with good reproducibility and can be used as quality control method for *G. lucidum*.

Key words: *Ganoderma lucidum* Karst; RP-HPL ; chromatographic specific chromatogram

赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.)Karst 英文名为 reishi mushroom, 又称瑞草、灵芝草。为担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌, 主要分布于我国云、黔、冀、吉、苏、浙、闽等省。其味甘、性平, 归心、肺、肝、肾经, 传统中医视其为名贵滋补类药材, 有补气安神、止咳平喘之功效, 用于眩晕不眠、心悸气短、虚劳咳喘等症[1]。赤芝中主要含有三萜、多糖、核苷、生物碱等[2]成分。中国药典 2005年版一部采用紫外分光光度法以葡萄糖的含量来控制其质量[1]。文献多采用测定赤芝中主要药效成分灵芝酸 A、灵芝酸　等含量的方法来评价其质量优劣[3,4]。特征图谱质量控制模式可以综合反映药材中各主要成分及其相对含量, 能提供更加全面丰富的质量评价信息。为了更全面控制赤芝药材的质量, 本研究收集了 16批不同产地的赤芝药材, 采用 RP-HPL 法建立了赤芝药材的色谱特征图谱, 该方法准确, 重复性好, 操作简便, 为全面控制赤芝的质量提供了依据。

* 通讯作者　Tel.(024) 23986016, E-mail: bikaishun@yahoo.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1 仪器与材料

SHIMADZU LC-10AD型高效液相色谱仪, SPD-M10A二极管阵列检测器, SHIMADZU CLASS-VP色谱工作站。

对照品: 灵芝酸 $_2$、灵芝烯酸A、灵芝酸A和灵芝酸D为本实验室自制, 通过其IR、MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR图谱与标准图谱比较确证结构, 以峰面积归一化法计算其纯度均大于98.5%; 甲醇、乙腈和磷酸为色谱纯, 水为二次重蒸水, 其他试剂均为分析纯。赤芝药材共16批, 经沈阳药科大学药用植物教研室孙启时教授鉴定为正品, 药材来源见表1。

表1 赤芝样品的来源

Tab 1 Sources of *Ganoderma lucidum* samples collected

样品编号 (sample No.)	来源 (source)	样品编号 (sample No.)	来源 (source)
1	贵州贵阳 (Guiyang, Guizhou)	9	吉林长春 (Changchun, Jilin)
2	贵州遵义 (Zunyi, Guizhou)	10	陕西西安 (Xi'an, Shaanxi)
3	河南郑州 (Zhengzhou, Henan)	11	河北石家庄 (Shijiazhuang, Hebei)
4	山东泰安 (Tai'an, Shandong)	12	青海西宁 (Xining, Qinghai)
5	广东广州 (Guangzhou, Guangdong)	13	吉林四平 (Siping, Jilin)
6	云南昆明 (Kunming, Yunnan)	14	江西九江 (Jiujiang, Jiangxi)
7	江西抚州 (Fuzhou, Jiangxi)	15	吉林白城 (Baicheng, Jilin)
8	陕西宝鸡 (Baoji, Shaanxi)	16	吉林辽源 (Liaoyuan, Jilin)

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱: Kromasil $_{18}$柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.03%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序(0~35 min, 32%~33% A; 35~38 min, 33%~37% A; 38~60 min, 37%~40% A; 60~70 min, 40% A); 流速: 1.0 mL·min^{-1}; 检测波长: 252 nm; 柱温: 35 ℃; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, 以灵芝酸A的色谱峰(10号峰, 内参比峰)计算理论塔板数不低于20000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取对照品灵芝酸 $_2$、灵芝烯酸A、灵芝酸A和灵芝酸D适量, 用甲醇溶解并定容, 制成浓度依次为100, 144, 233.4, 106.4 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液, 用于确定峰位。

2.2.2 供试品溶液 取灵芝药材粉末约1.0 g精密称定, 置具塞三角瓶中, 加入氯仿30 mL, 超声提取(220 W, 50 kHz) 30 min。提取液过滤后减压回收溶剂, 残渣用少量甲醇溶解并定量转移至10 mL量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 经0.45 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取1号样品的供试品溶液, 按上述色谱条件, 连续进样6次, 记录色谱图。结果表明, 各色谱峰与灵芝酸A内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%, 符合特征图谱要求。

2.3.2 重复性试验 称取1号样品6份, 按"2.2.2"项下方法操作, 在上述色谱条件下进样分析, 计算各色谱峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积, 其RSD值均小于5.0%, 符合特征图谱要求。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于室温下放置, 分别在0, 2, 4, 8, 12, 24 h进样分析, 计算各色谱峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积, 其RSD均小于5.0%, 结果表明, 灵芝样品的溶液在24 h内稳定。

2.4 赤芝药材HPLC特征图谱中的特征峰 以经形态学鉴定的16批灵芝药材为研究对象, 进行特征图谱研究。获得包括灵芝酸A(10号峰)在内的19个色谱峰。通过比对保留时间和对照品加入法[5], 指认了其中4个色谱峰, 分别为灵芝酸 $_2$(3号峰)、灵芝烯酸A(8号峰)、灵芝酸A(10号峰)和灵芝酸D(13号峰), 1号样品色谱图见图1。

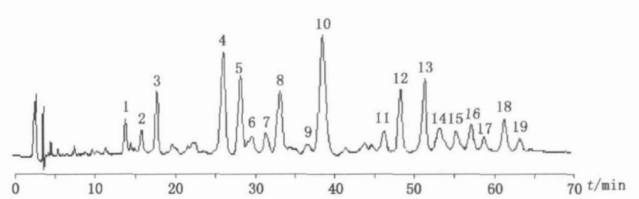

图1 1号赤芝样品色谱图

Fig 1 Chromatogram of sample No. 1

3. 灵芝酸 $_2$(ganoderic acid $_2$) 8. 灵芝烯酸A(ganoderenic acid A) 10. 灵芝酸A(ganoderic acid A) 13. 灵芝酸D(ganoderic acid D)

2.5 灵芝药材质量评价方法的确立

2.5.1 系统聚类分析 本研究使用SPSS软件, 采用类间平均链锁法(Between-groups linkage), 以夹

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

角余弦(osine)[6]作为样品相似性的测度, 16批样品可分为 2类(样品 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16为第Ⅰ类;样品 2, 8, 11, 12, 13为第Ⅱ类),结合形态学鉴定结果,判定第Ⅰ类为推荐品,第Ⅱ类为非推荐品。聚类谱系图见图 2。

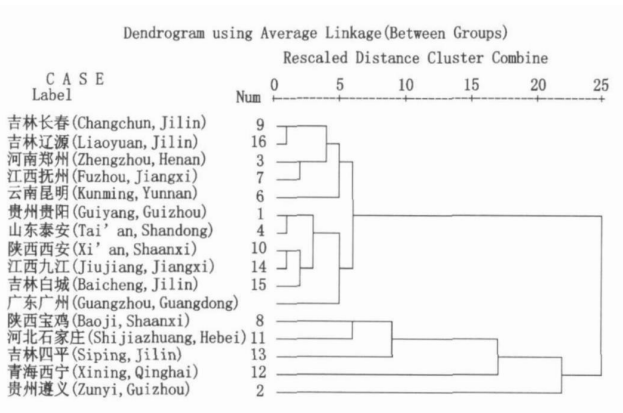

图 2　系统聚类分析图

Fig 2　Dendrogram of hierarchical clustering analysis

2.5.2　特征图谱相似度评价　结合聚类分析和专家鉴定结果,选取第Ⅰ类 11批优质样品(1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16号样品)建立共有模式。将此 11批样品色谱图导入国家药典委员会提供的"中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)"[7],选取"时间窗"宽度为 0.5 m in,经校准后,软件即可生成"对照谱图",见图 3。再将对照谱图和 16批样品色谱图全谱导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统检验版(2004B)",软件即可计算出样品与对照谱图的相似度数据,见表 2。试验分析结果表明,相

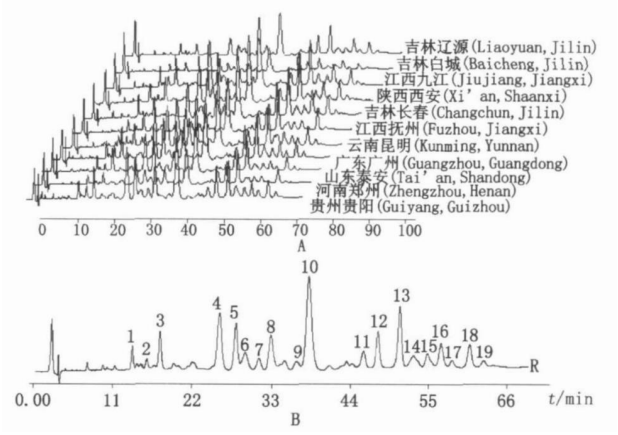

图 3　11批赤芝药材的叠加 HPL – UV特征图谱(A)和由"中药色谱指纹图谱相似度评价系统 研究版(2004A)"生成的对照谱图(B)

Fig 3　HPL specific chromatograms of 11 samples of *G. lucidum* (A) and their module plot done by' Similarity Evaluation System for hromatographic Fingerprint of T M 2004A' software(B)

3 灵芝酸 2(ganoderic acid 2)　8 灵芝烯酸 A(ganoderenic acid A)　10 灵芝酸 A(ganoderic acid A)　13. 灵芝酸 D(ganoderic acid D)

表 2　相似度分析结果

Tab 2　The results of similarity

样品(samples No.)	相似度(similarity)	样品(samples No.)	相似度(similarity)
10	0.993	6	0.968
3	0.992	5	0.959
14	0.992	15	0.946
4	0.985	11	0.895
9	0.985	8	0.857
7	0.983	13	0.811
1	0.979	2	0.782
16	0.976	12	0.744

似度分析结果与系统聚类结果一致, 2种方法得到了相互验证。根据相似度和聚类分析结果,确定相似度在 0.90以上的样品为推荐品, 0.90以下的为非推荐品。

3　讨论

3.1　提取溶剂与方法的考察　以色谱峰的多少和大小作为考察的指标[8],首先分别比较了乙醇、甲醇、氯仿、氯仿 – 甲醇等不同溶剂系统。结果表明,乙醇、甲醇、氯仿 – 甲醇提取后得到的特征图谱极性部分提取量较大,而三萜类部分提取量较小;氯仿提取后得到的特征图谱极性部分量较小,三萜类部分提取量较大色谱峰明显,结合传统的三萜类化合物提取溶剂和试验结果,最终确定提取溶剂为氯仿。然后比较了超声振荡提取和加热回流提取 2种方法,结果表明 2种方法得到的特征图谱全貌和各个峰强度均无明显差别,综合比较,超声提取法更为简便,且不易破坏有效成分,适合大量样品的快速提取,最终确定采用超声振荡提取法。在此基础上,设计正交实验 $L_9(3^4)$对氯仿溶液超声提取工艺条件进行优选,考察提取溶剂倍量、提取时间和提取次数 3因素的 3个水平。结果表明,最佳提取方法为加入 30倍量氯仿,超声提取 30 m in 1次。

3.2　色谱条件的优化　在色谱条件优化过程中,流动相分别比较了甲醇 – 磷酸水溶液、乙腈 – 醋酸水溶液、乙腈 – 磷酸水溶液等多种流动相系统,结果表明,采用乙腈 – 磷酸水溶液流动相系统梯度洗脱,在 70 m in内获得的赤芝药材特征图谱特征性强,各色谱峰的分离度也较好,且 140 m in图谱显示 70 m in后再无色谱峰出现,表明所选流动相的梯度较为合理。本研究采用二极管阵列检测器对赤芝的 HPL特征图谱做全波长扫描,考察不同吸收波长图谱,重点考察了 210, 252, 265, 280, 300 nm处的谱图特征。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

结果表明 252 nm 波长处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,基线平稳,故选用 252 nm 作为检测波长。

3.3 内参照物的选择 赤芝药材主要含三萜酸类成分,其中灵芝酸 A 是其药理活性的主要成分之一,且含量较高,峰面积稳定,出峰时间居中,分离度较好,故选定灵芝酸 A 作为内参比峰。

3.4 聚类分析和相似度评价结果分析 赤芝药材中化学成分复杂,显然仅以单一成分控制其质量不够全面,因此有必要建立其特征图谱。本研究以 19 个色谱峰为量化指标进行聚类分析,将 16批不同产地的赤芝样品分为推荐品和非推荐品 2类,相似度评价结果与聚类分析结果基本一致,2种检验方法之间得到了相互认证。不同产地的赤芝药材特征图谱有明显差别,19个共有峰的相对保留时间符合程度很好,但相对峰面积差别较大,说明不同产地药材质量差别较大,应用本文建立的方法控制赤芝药材的质量更为可靠。对于待测样品,只需测得该样品的色谱特征图谱,计算样品相似度,即可评价其质量。

参考文献

1 hP(中国药典). 2005 VolⅠ(一部): 130

2 BAO Ke-zhong(鲍克忠), ZHANG Wen-jun(张文俊). A survey of pharmacodynamic study on lucid Ganoderma(灵芝的研究进展). *China Health Care*(中国保健), 2007, 15(19): 8

3 AI Hui(蔡辉), WANG Fang-sheng(王芳生), WANG Li-feng(王丽凤), *et al*. Method for determination of content of biological activities constituents ganoderic acid in *Ganoderma lucidum* (赤芝中灵芝酸类生物活性成分含量的测定方法). *Chin J Vet Med*(中国兽医学报), 2001, 21(4): 381

4 XING Zeng-tao(邢增涛), YU Qiong-hua(郁琼花), ZHANG Jin-song(张劲松), *et al*. Comparative study on triterpenes in different Ganoderma species(不同品种灵芝中三萜类化合物的比较研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2004, 27(8): 575

5 TAN Xiao-jie(谭晓杰), JIA Ying(贾英), BI Kai-shun(毕开顺), *et al*. Establishment of chromatographic fingerprint and quality assessment of Flos Chrysanthemi Indici by RP-HPLC (野菊花 RP-HPLC 色谱指纹图谱的建立及其质量研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(1): 29

6 WANG Xi(王玺), WANG Wen-yu(王文宇), ZHANG Ke-rong(张克荣), *et al*. Determination of the related compounds of enalapril by HPLC (中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2003, 20(5): 360

7 WANG Ting-ting(王婷婷), CHEN Xiao-hui(陈晓辉), BI Kai-shun(毕开顺), *et al*. RP-HPLC fingerprint for quality assessment of Radix Angelicae Dahuricae(白芷质量的 HPLC 指纹图谱评价方法). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2006, 41(8): 747

8 SI Dan-dan(司丹丹), QI Dan-dan(齐丹丹), BI Kai-shun(毕开顺), *et al*. RP-HPLC fingerprint of Rhizoma Cimicifugae(升麻药材 RP-HPLC 指纹图谱研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(5): 745

(本文于 2008年 12月 14日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net