

应用色谱指纹图谱技术区别赤芝和紫芝

丁 平, 黄海波, 邱金英, 梁英娇, 王慧玲

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 以正品赤芝药材为基础, 建立灵芝三萜类化合物的高效薄层荧光色谱指纹图谱及 HPLC 指纹图谱, 并与紫芝进行比较分析。方法 应用硅胶 GF₂₅₄ 高效预制薄层板, 通过二次展开, 10% 硫酸乙醇溶液显色后获得薄层荧光色谱指纹图谱; 同时利用 HPLC 法建立赤芝药材的 HPLC 指纹图谱共有模式。结果 赤芝薄层荧光色谱指纹图谱由 9 个特征荧光条斑组成, 荧光色谱图像与轮廓扫描图谱结合分析比较, 可分为赤芝指纹图谱模式、紫芝指纹图谱模式; 赤芝的 HPLC 指纹图谱共有 18 个特征峰, 其中 6 个成分通过对照品得到指认。结论 通过色谱指纹图谱考察, 赤芝与紫芝在三萜类化合物方面区别较大, 建议区分应用。

关键词: 赤芝; 紫芝; 高效液相色谱法; 高效薄层莫光色谱法; 品种鉴定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2009) 04 - 0404 - 03

Study on the differences of *Ganodema lucidum* and *Ganodema sinense* by HPILC and HPLC fingerprint chromatogram

DING Ping, HUANG Hai - bo, QIU Jin - ying, LANG Ying - jiao, WANG Hui - ling

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510405 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish high - performance thin - layer chromatography (HPILC) and HPLC chromatographic fingerprint of triterpenoid from "Linshi" (the pileus of *Ganodema lucidum*) and analyze the fingerprints of *Ganodema sinense*. **METHODS** HPILC were carried out After two developing and 10% sulfuric acid alcoholic solution as derivatization reagent, the common patterns of HPILC fingerprint were obtained through 'Chromafinger' solution software. At the same time, HPLC system was used to obtain the chromatograms of *Ganodema lucidum*. **RESULTS** The common pattern of the pileus of *Ganodema lucidum* consists of 9 characteristic peaks. There were significant differences between *Ganodema lucidum* and *Ganodema sinense* by comparison of the HPILC images. There were 18 peaks in HPLC chromatograms of *Ganodema lucidum*, and among them, 6 peaks were identified by chemical reference substances. **CONCLUSION** The survey showed that the main commodities of 'Linshi' in the domestic market can be attributed to '*Ganodema lucidum* - pattern' and '*Ganodema sinense* - pattern'. They can be distinguished by comparison of the HPLC, HPILC images. There are significant differences in triterpenoid constituents. Thus, it is suggested that the two fungi should be used as two kinds of Chinese Medicine.

Key words: *Ganodema lucidum*; *Ganodema sinense*; HPLC; HPILC; Species identification

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2009) 04 - 0404 - 03

灵芝来源于多孔菌科真菌赤芝 *Ganodema lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst 或紫芝 *Ganodema sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体^[1]。赤芝和紫芝在临床上均以“灵芝”入药, 两者均含有三萜类化学成分, 具有广泛的药理作用和生物活性^[2]。已从赤芝中分离出来的三萜类化合物有 130 多种, 主要有灵芝酸、灵芝醇、灵芝内酯等^[3~7]; 而紫芝中也含有三萜类化合物, 如 ganodematriol, ganodefiol A, ganodermanotriol, polycapal 等。但两者在化学成分上是否完全相同, 是否可在临床上等同入药, 尚未进行过系统研究。为此, 以三萜类化合物为研究对象, 对赤芝和紫芝进行系统的 HPILC 和 HPLC 研究, 以资区别。

1 实验部分

1.1 试药与仪器

赤芝 *Ganodema lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst 和紫芝 *Ganodema sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体各 10 批, 凭证标本均存于广州中医药大学中药资源教研室; 试剂为分析纯; 灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C₂、赤芝酸 A、灵芝酸 G、灵芝酸 E 对照品 (自制, HPLC 纯度 > 98%); 灵芝总三萜酸对照品 (日本, 由广州中医药大学李杰芬教授提供)。ATS4 全自动薄层色谱点样仪 (瑞士 CAMAG); REPROSTAR3 薄层色谱摄影仪 (瑞士 CAMAG); SCANNER

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006B350605012)

作者简介: 丁平, 女, 教授, 从事中药资源有效成分和中药质量评价研究。Email: dingpinggz@126.com

薄层色谱扫描仪(瑞士 CAMAG);高效预制薄层板(美国 Merck, Na 74023375);P580 高效液相色谱仪(Dionex Summit)。

1.2 HPLC 指纹图谱的鉴别

1.2.1 溶液的制备 取约 2 g 药材粗粉(过 40 目筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,加 50 ml 石油醚(30 ~ 60),超声处理(220 W, 55 kHz) 15 min,过滤,滤渣置 60℃ 水浴上挥干,加 80 ml 三氯甲烷,超声处理(220 W, 55 kHz) 15 min,过滤,滤液置 60℃ 水浴上蒸干,残渣加 2 ml 甲醇溶解,作为 HPLC 指纹图谱的药材供试品溶液。取约 2 mg 灵芝总三萜酸对照品,精密称定,置 1 ml 量瓶中,用甲醇定容,得对照品溶液;精密称取灵芝酸 A 等 6 种对照品适量,用甲醇定容,制得含 1.3 mg·ml⁻¹灵芝酸 A、1.2 mg·ml⁻¹灵芝酸 B、1.3 mg·ml⁻¹灵芝酸 C、1.0 mg·ml⁻¹灵芝酸 G、1.0 mg·ml⁻¹灵芝酸 E、1.1 mg·ml⁻¹赤芝酸 A 的混合对照品溶液。

1.2.2 薄层色谱条件 取广东省龙门 GAP 规范化种植基地的赤芝与紫芝各 10 批,照《中国药典》(2005 年版)薄层色谱法测定。吸取供试品溶液和灵芝总三萜酸对照品溶液各 2 μl,灵芝酸混合对照品溶液 5 μl,在相对湿度 32% 的条件下,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(30:30:2:0.2)为展开剂展开,展至约 5 cm,取出,晾干,再用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(30:30:1:0.2)展开,展至约 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105℃ 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(366 nm)下检视(图 1)。

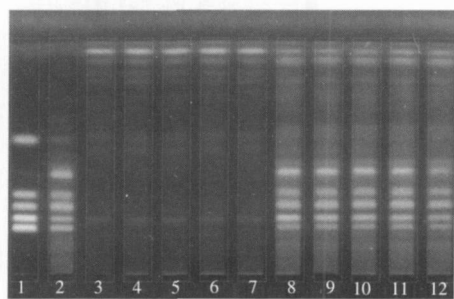


图 1 GAP 基地的赤芝与紫芝药材典型薄层色谱图谱(366 nm)

Fig 1 HPTLC chromatogram of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma sinense*(366 nm)

1. mixed control; 2. control; 3-7. 5 batches of *Ganoderma lucidum* from GAP base; 8-12. 5 batches of *Ganoderma sinense* from GAP base

1.2.3 实验结果 将所有样本显色后获得的荧光薄层色谱图导入 Chromafinger 2005 色谱指纹图谱系统解决方案软件,生成灰度扫描图并积分。将灵芝代表性样本(赤芝)数据采用中位数法确定特征峰,均数法计算特征值,共指认 9 个特征峰。其中,灵芝

酸 A 等 6 种化学成分得到指认,构成了赤芝药材薄层色谱指纹图谱共有模式,而紫芝与赤芝基本无共有的峰(图 2)。

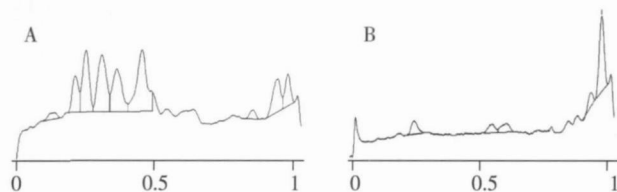


图 2 赤芝(A)与紫芝(B)代表性高效薄层色谱指纹图谱

Fig 2 HPTLC fingerprints chromatograms of *Ganoderma lucidum* (A) and *Ganoderma sinense*(B)

紫芝与标准赤芝药材薄层色谱指纹图谱共有模式相比,并经聚类分析表明,两者相似度小于 0.1。赤芝与紫芝三萜酸部位的 HPTLC 指纹图谱存在显著的差别,紫芝不含灵芝酸 A、B、C₂、G、E 和赤芝酸 A 等灵芝三萜酸类化学成分,而赤芝含有丰富的灵芝三萜酸类成分,薄层色谱图谱可较直观地区分两者(图 1)。

1.3 HPLC 指纹图谱的鉴别

1.3.1 溶液的制备 取约 0.5 g 药材粗粉(过 40 目筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,加 100 ml 三氯甲烷,超声处理(220 W, 55 kHz) 30 min,过滤,滤渣重复上述操作 1 次,合并滤液,置 60℃ 水浴上蒸干,残渣用 1 ml 甲醇溶解,即得 HPLC 指纹图谱的药材供试品溶液。取灵芝酸 A、B、C₂、E、G、赤芝酸 A 等 6 种对照品适量,精密称定,加甲醇定容,配成分别含 1.3、1.4、1.1、1.1、1.5、1.2 mg·ml⁻¹的混合对照品溶液。

1.3.2 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.8% 高氯酸水溶液,梯度洗脱,流速 0.9 ml·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 30℃。梯度程序为 0 ~ 10 min,从 30% A 线性梯度至 35% A; 10 ~ 58 min,线性梯度至 40% A; 58 ~ 60 min,线性梯度至 55% A; 60 ~ 115 min,线性梯度至 70% A; 115 ~ 140 min,线性梯度至 90% A。每次运行结束后以初始流动相平衡色谱柱 10 min。

1.3.3 赤芝共有模式的建立 选择 10 批广东河源 GAP 基地赤芝样品,采收时间和加工方法一致。按“1.3.2”项色谱条件测定,并将所得色谱峰导入“Chromafinger 2005 色谱扫描指纹图谱系统解决方案软件”进行数据分析,得到赤芝三萜类化学成分指纹图谱的共有模式(图 3),各样品的相似系数计算结果均大于 0.98。

从赤芝的 HPLC 指纹图谱中可分离出近 60 个色谱峰,经比较 10 批 GAP 基地样品的图谱,从中选

定 18 个色谱峰作为可构建灵芝三萜指纹图谱的稳定的特征峰 (图 3),测得其相似度。为辨别和分析,将 GAP 基地赤芝指纹图谱共有模式分为两个区。主峰区 (区):图谱 0 ~ 60 min 的区域,主要包括特征峰 1 ~ 14;对比灵芝总三萜酸对照品的指纹图谱可知该区主要为三萜酸类结构,用于辨别赤芝和紫芝。特征区 (区):图谱 60 ~ 140 min 的区域,主要为 15 ~ 18 峰,用于鉴别灵芝及其近缘属的区域。

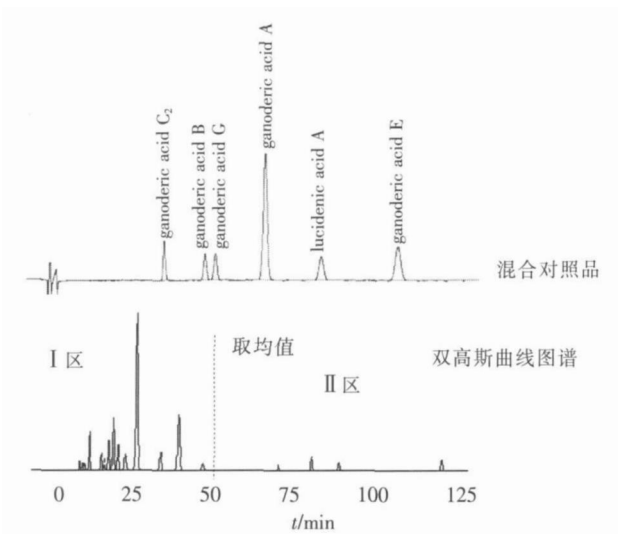


图 3 赤芝三萜类化学成分 HPLC 指纹图谱共有模式及特征峰
Fig 3 Common pattern of HPLC fingerprint of terpenoids in Ganoderma lucidum and its characteristic peaks

1.3.4 紫芝与赤芝共有模式的比较分析 将紫芝 HPLC 指纹图谱的原始数据导入 Chromafinger V0.9 beta 软件,计算得出紫芝与赤芝的 HPLC 指纹图谱的相似度为 0 (图 4)。紫芝与赤芝的指纹图谱共有模式存在很大的区别,尤其以主峰区 (区)的区别,紫芝在此范围内几乎不出现任何色谱峰。通过与灵芝总三萜酸对照品指纹图谱的对比可知,该区主要为三萜酸类成分,故紫芝几乎不含任何灵芝三

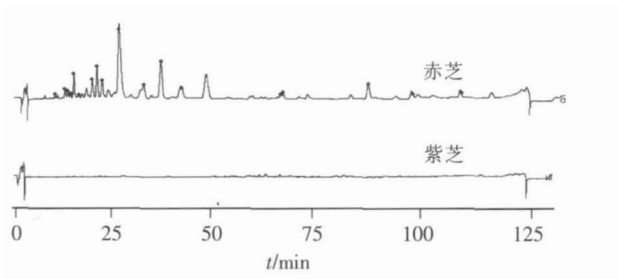


图 4 紫芝与赤芝共有模式的比较图
Fig 4 Different chromatograms between Ganoderma sinense and the common pattern of HPLC fingerprint of Ganoderma lucidum

萜酸类成分。紫芝在特征区 (区)所含的色谱峰也不能与赤芝匹配,赤芝与紫芝药材的指纹图谱在峰数与相对峰面积上相差较大,尤以主峰区显著,紫芝未检测出灵芝酸 A 等 6 种三萜酸类化学成分。

2 讨论

由文中建立的 HPTLC 指纹图谱发现,紫芝和赤芝在三萜酸类化合物方面相差较大。其中,紫芝不含灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C₂、赤芝酸 A、灵芝酸 G 和灵芝酸 E 等 6 种成分,其他成分相差也较大。通过 HPTLC 可较直观、准确、简单地区别两种真菌。对赤芝和紫芝 HPLC 指纹图谱的分析,表明赤芝有 18 个特征色谱峰,主要分布在 区和 区,和已有的化学对照品比较,赤芝在 区含有灵芝酸 C₂、灵芝酸 B、灵芝酸 G、灵芝酸 A、赤芝酸 A、灵芝酸 E,而紫芝均不含这些三萜酸类化合物;紫芝在 区虽含有一部分色谱峰,但与赤芝相差较大,无相匹配的峰。

历代医家认为紫芝不是灵芝,近年来将赤芝和紫芝均作为灵芝应用,可能是因两者应用较多的缘故。但从本草记载、外形和三萜类化学成分 HPTLC、HPLC 指纹图谱等方面研究表明,两者相差较大,建议两者分开应用。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 130.
[2] 罗俊,林志彬. 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.
[3] 陈若芸,于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展 [J]. 药 学 学 报, 1990, 25 (12): 940 - 953.
[4] Kubota T, Asaka Y, Mirual, et al Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from Ganoderma lucidum (Fr) Karst [J]. Helv Chim Acta, 1982, 65 (2): 611 - 619.
[5] Kikuchi TH, Kanomi ST, Murai Y, et al Constituents of the Fungus Ganoderma lucidum (Fr) Karst . Structures of ganoderic acid F, G, and H, lucidenic acids D2 and E2, and Related Compounds [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34 (10): 4018 - 4029.
[6] Nishitoba T, Sato H, Kasai T, et al New bitter C27 and C30 terpenoids from the fungus Ganoderma lucidum (Reishi) [J]. Agric Biol Chem, 1985, 49 (6): 1793 - 1798.
[7] 张宪民,乔英,邱明华,等. 紫芝中三萜化合物标准化提取方法研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19 (1): 109 - 111.

收稿日期: 2008 - 10