

HPLC 法测定灵芝子实体和孢子粉中灵芝酸 C₂、灵芝酸 G 和灵芝酸 A

董虹玲^{1,2}, 夏广萍¹, 赵娜夏¹, 白秀秀^{1,2}, 邵泽艳^{1,2}, 韩英梅^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 建立灵芝子实体和孢子粉中 3 种灵芝酸类成分的 HPLC 测定方法, 为全面评价灵芝药材和孢子粉的质量提供依据。**方法** 采用 HPLC 方法测定, Diamonsil (钻石) C₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.03%磷酸 (28:72), 体积流量 1.2 mL/min, 检测波长 250 nm; 柱温 35 °C。**结果** 灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 分别在 0.40~10.06 μg ($r=0.999\ 99$)、0.40~10.00 μg ($r=0.999\ 99$)、0.40~10.00 μg ($r=0.999\ 99$) 线性关系良好, 平均回收率分别为 101.04%、99.39%、101.22%, RSD 值分别为 1.64%、1.86%、2.20% ($n=6$); 灵芝子实体中 3 种灵芝酸的质量分数分别在 0.06~0.29 mg/g、0.12~0.37 mg/g、0.19~0.41 mg/g, 灵芝孢子粉供试品中 3 种灵芝酸的质量分数分别在 0~0.01 mg/g、0、0~0.03 mg/g。**结论** 本方法简便, 稳定, 可用于灵芝三萜类成分 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 的定量分析。

关键词: 灵芝子实体; 灵芝孢子粉; 三萜酸; 灵芝酸 C₂; 灵芝酸 G; 灵芝酸 A; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)01-0041-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.011

Quantitative analysis of ganoderic acid C₂, G, and A in sporophore and spore powder of *Ganoderma* by HPLC

DONG Hong-ling^{1,2}, XIA Guang-ping¹, ZHAO Na-xia¹, BAI Xiu-xiu^{1,2}, SHAO Ze-yan^{1,2}, HAN Ying-mei¹

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To provide the scientific evidence for overall quality evaluation of *Ganoderma*, a trial to develop HPLC method for quantitative analysis of three ganoderic acids in *Ganoderma* was carried out. **Methods** The HPLC method was performed on Diamonsil C₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.03% phosphoric acid (28:72) as the mobile phase; The flow rate was 1.2 mL/min; UV detection wavelength was 250 nm; The column temperature was 35 °C. **Results** The liner ranges of ganoderic acid C₂, ganoderic acid G and ganoderic acid A were 0.40—10.06 μg ($r=0.999\ 99$), 0.40—10.00 μg ($r=0.999\ 99$) and 0.40—10.00 μg ($r=0.999\ 99$); The average recoveries were 101.04%, 99.39% and 101.22%, with RSD values of 1.64%, 1.86%, and 2.20% ($n=6$), respectively. The content ranges of three ganoderic acids in sporophore were 0.06—0.29 mg/g, 0.12—0.37 mg/g, and 0.19—0.41 mg/g, respectively, and those in spore powder were 0—0.01 mg/g, 0, and 0—0.03 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is proved to be convenient and reliable, so it could be used for the quantitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma*.

Key words: sporophore of *Ganoderma*; spore powder of *Ganoderma*; triterpenoid acids; ganoderic acid C₂; ganoderic acid G; ganoderic acid A; HPLC

灵芝又称灵芝草、仙草、瑞草, 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌^[1]。在《中国药典》2010 年版一部中收入作为灵芝药材来源的是赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *G. sinense* Zhao,

Xu et Zhang 的干燥子实体^[2]。长期以来中国传统医学一直视其为滋补强壮、固本扶正的珍贵中药。研究表明, 灵芝的化学成分有多种, 主要包括三萜类、多糖类、核苷类、呋喃类衍生物、甾醇类、生物碱

收稿日期: 2012-12-13

基金项目: 国家重大新药创制科技专项 (2011ZX09401-009)

作者简介: 董虹玲 (1987—), 女, 中药学专业硕士研究生, 研究方向为天然产物的提取分离。

Tel: 15022078951 E-mail: 57198450@163.com

*通信作者 韩英梅, 研究员。Tel: (022) 23006959 E-mail: hanyingmei@163.com

究类、多肽氨基酸类等,其中三萜类化合物是灵芝子实体和孢子粉中的主要活性物质^[3]。灵芝三萜类化合物具有广泛的药理活性,如抗肿瘤、抗 HIV-1 型病毒、护肝、解毒和改善记忆力等^[4-6]。本实验以灵芝子实体和孢子粉中 3 个主要的三萜酸类成分灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 为指标,采用 RP-HPLC 法对不同产地灵芝子实体和孢子粉中灵芝酸进行测定,为建立灵芝的质量控制方法提供了科学的依据。

1 仪器和材料

美国 Waters 型高效液相色谱仪,包括 Waters 515 泵、Waters 717 自动进样器和 Waters UV-2487 检测器;TC—2 柱恒温箱控制器(泰普新技术公司);Ultrasonik 28H 超声波清洗器(NEY 公司);XS205 电子天平(十万分之一,梅特勒-托利多公司)。

6 种灵芝药材为市售常见品牌,购自河北省安国药材市场及天津市几所药店,产地分别为山东(1 号)、云南(2 号)、四川(3 号)、陕西(4 号)、湖南(5 号)和河北(6 号)。4 种灵芝孢子粉分别为上海市农业科学院菇宝牌灵芝孢子粉(7 号)、广东省微生物研究所粤微灵芝孢子粉(8 号)、山东中信生物科技灵芝孢子粉(9 号)和吉林长白山村品灵芝孢子粉(10 号)。灵芝酸 C₂、灵芝酸 G 和灵芝酸 A 对照品均为自制,经 MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定结构,HPLC 法检测,面积归一化法计算质量分数均大于 98%。乙腈(分析纯,天津市康科德科技有限公司),磷酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司),超纯水(Ultrapur water system 纯化)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

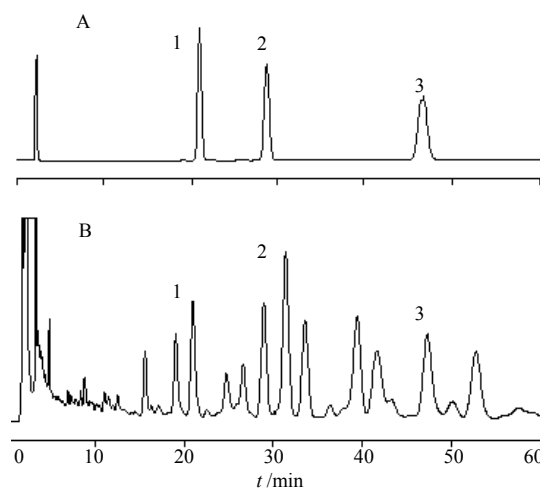
Diamonsil(钻石)C₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.03%磷酸(28:72);体积流量 1.2 mL/min;检测波长 250 nm;柱温 35 ℃。在此条件下样品中 3 种灵芝酸成分均能达到基线分离。结果见图 1。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取样品 5 g,置具塞锥形瓶中,加入 150 mL 甲醇,超声处理 30 min,取出放冷,滤过,滤液蒸干,残留物置 25 mL(灵芝药材粉末)或 5 mL(灵芝孢子粉)量瓶中,以甲醇溶解,并加至刻度,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称定灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 对照品适量,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释



1-灵芝酸 C₂ 2-灵芝酸 G 3-灵芝酸 A
1-ganoderic acid C₂ 2-ganoderic acid G 3-ganoderic acid A

图 1 混合对照品(A)和 6 号灵芝样品(B)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Ganoderma* sample No. 6 (B)

至刻度,制成质量浓度均为 0.20 mg/mL 的灵芝酸 C₂、灵芝酸 G 和灵芝酸 A 的混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2、5、10、20、50 μL,注入高效液相色谱仪中,按照以上色谱条件测定各成分的峰面积。以进样质量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 各成分的标准曲线方程

Table 1 Standard curve equations of each ganoderic acid

成 分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
灵芝酸 C ₂	$Y=658\ 061.8-9\ 382.7 X$	0.999 99	0.40~10.06
灵芝酸 G	$Y=648\ 892.1-9\ 436.8 X$	0.999 99	0.40~10.00
灵芝酸 A	$Y=666\ 872.4-10\ 967.0 X$	0.999 99	0.40~10.00

2.4.2 精密度试验 精密吸取 6 号样品制备的供试品溶液,重复进样 6 次,记录峰面积,计算得灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 峰面积积分值的 RSD 值分别为 0.85%、1.12%、0.37%。

2.4.3 重现性试验 精密称取 6 号样品平行 6 份,制备供试品溶液,进样测定,计算得样品中灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 质量分数的 RSD 值分别为 1.57%、0.78%、1.44%。

2.4.4 稳定性试验 取 6 号样品制备的供试品溶液,分别在制备后 0、4、8、12、18、24 h 进样测

定。结果灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 峰面积分值的 RSD 值分别为 1.32%、1.52%、0.16%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 分别精密称取灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 对照品适量，加甲醇溶解制成含灵芝酸 C₂ 0.80 mg/mL、灵芝酸 G 0.82 mg/mL、灵芝酸 A 0.96 mg/mL 的混合对照品溶液。取 6 号样品 2.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入上述对照品溶液 1 mL，制备供试品溶液，进行测定，计算回收率，结果灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 的平均回收率分别为 101.04%、99.39%、101.22%，RSD 值分别为 1.64%、1.86%、2.20% ($n=6$)。

2.5 样品测定

取各批号样品，分别制备供试品溶液，精密吸取 20 μ L 注入高效液相色谱仪，测定峰面积，采用标准曲线法计算灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 A 的质量分数，结果见表 2。

表 2 不同灵芝样品中灵芝酸的测定结果
Table 2 Determination of ganoderic acids in different *Ganoderma* samples

编 号	化合物/(mg·g ⁻¹)		
	灵芝酸 C ₂	灵芝酸 G	灵芝酸 A
1	0.14	0.16	0.19
2	0.18	0.18	0.21
3	0.06	0.12	0.26
4	0.16	0.18	0.21
5	0.06	0.13	0.28
6	0.29	0.37	0.41
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	0.01	—	0.03

本研究收集的 10 份样品购自 6 个省份，从测定结果分析，灵芝子实体之间 3 个成分含量差异多在 3 倍以内，有 2 批样品达到 5 倍。灵芝孢子粉样品中 3 个成分之间差异尤为明显。所有样品中所测成分平均含量依次为灵芝酸 A>灵芝酸 G>灵芝酸 C₂，而且三者间呈正相关。

所收集灵芝孢子粉样品中三萜酸类成分含量普遍较低，其中产自吉林长白山规范化种植基地的紫芝孢子粉末检测出三萜酸类成分，另外两批分别产自广东和上海的赤芝孢子粉样品含量低于定量下

限，故未列出含量值。由此看出，赤芝和紫芝孢子粉中三萜酸类化学成分含量相差较大，而两者长期以来均作为灵芝孢子粉的来源，它们在临床上是否可以等同入药，紫芝和灵芝子实体是否有差异，有待进一步深入研究。

3 讨论

已有文献报道 HPLC 法测定灵芝酸类成分多使用 C₁₈ 色谱柱和梯度洗脱方法，测定时间长，对设备的要求高。本研究发现 C₁₈ 色谱柱在等度洗脱条件下可以满足单一成分测定，但在多成分测定时对灵芝酸 G 达不到基线分离，更换色谱柱、调整流动相、调节体积流量等措施仍不能改善。经考察发现 C₈ 色谱柱在等度洗脱条件下对样品中三萜酸类成分尤其是灵芝酸 G 分离效果较好，保留时间适中，适用于简易液相色谱设备条件下灵芝酸类化合物的多成分分析。

根据灵芝酸类化合物的性质及常用的提取方法，考察了提取方法（超声、回流）、提取溶剂（甲醇、氯仿）。结果发现无论是加热回流还是超声提取，氯仿提取效率都很低，而甲醇作为提取溶剂，超声提取 30 min 即可完全提取所测成分。

灵芝酸类成分系药用灵芝来源植物中特有成分，本实验测定的 3 个成分此类成分在原药材中的主要存在形式，目前的药理研究结果提示其为灵芝药效物质基础之一。本研究结果表明灵芝子实体样品中三萜酸类含量明显高于孢子粉，市售灵芝孢子粉中灵芝酸类成分含量较低而且差异较大，这些差异与药效的相关性尚不明确，但应可以部分反映其质量。

参考文献

- [1] 邓叔群. 中国的真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1963: 445.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 174.
- [3] 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.
- [4] 罗 俊, 林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展 [J]. 药学报, 2002, 37(7): 574-578.
- [5] 张劲松, 贾 薇, 邢增涛, 等. 灵芝子实体和菌丝体的提取物及其各纯化组份生物活性的比较 [J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 85-92.
- [6] 林志彬. 灵芝的抗肿瘤作用机制 [J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 391-393.