

灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱分析及质控评价

何晋浙, 黄霄芸, 张安强, 孙培龙*

浙江工业大学生物与环境工程学院 食品系, 浙江 杭州 310032

摘要: 目的 采用 HPLC 法建立灵芝醇提生物活性物质指纹图谱的分析方法, 通过中药指纹图谱相似度软件, 对不同产地、不同种属、不同栽培方式的灵芝样品中所含生物活性物质的种类及数量进行综合评价。方法 采用 Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 反相柱, 以 1%醋酸水溶液-乙腈为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 在 250 nm 波长下, 进行二元梯度洗脱。结果 灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱可达 40 多个指纹峰和 15 个共有峰, 指纹图谱分离效果理想。结论 所建立的色谱法具有良好的精密度、重现性和稳定性, 并能有效地对灵芝品质进行质量评价。

关键词: 灵芝; HPLC; 指纹图谱; 质控评价; 生物活性物质

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)06-1125-05

Fingerprint analysis and quality control evaluation of ethanol extracting bioactive compositions from *Ganoderma*

HE Jin-zhe, KUI Xiao-yun, ZHANG An-qiang, SUN Pei-long

Department of Food, College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Key words: *Ganoderma*; HPLC; fingerprints; quality control evaluation; bioactive compositions

灵芝自古以来被誉为人类延年益寿的灵丹妙药, 滋补益气的仙草。大量药理研究表明, 灵芝具有调节免疫、保肝、抗肿瘤、抗 HIV 病毒、抗白血病病毒、抑制组胺释放、抗衰老、抗炎、提高机体耐缺氧能力、保护 *N*-甲基-*N*-亚硝脲对大鼠视网膜光感受器细胞的损伤等功效^[1-2]。灵芝成分复杂, 其中的醇提生物活性物质, 如三萜类、生物碱、核苷^[3]、腺苷是灵芝中重要的药效成分^[4-7]。

由于我国灵芝产地分布较广, 生态环境、品种、培育种植方式不同, 客观上可能导致灵芝原材料中的内在活性物质的品质差异。目前, 灵芝原材料质量评价以单一活性成分如三萜类为考察指标, 远不能从整体上反映灵芝的内在质量, 而指纹图谱具有整体性特点, 强调同一药材群体的相似性, 能较全面反映中药品质, 已日益成为国内外广泛接受的中药质量评价模式^[8-11]。为进一步对灵芝原材料中所含生物活性物质进行鉴定和质量评价, 本实验采用 HPLC 法建立了灵芝醇提生物活性物质的液相指纹

图谱, 并运用国家药典委推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价 (2004A)》软件, 对灵芝原材料及醇提生物活性物质进行了指纹图谱测定和相似度计算, 从而为灵芝的原材料质量资源评价和优选提供科学依据。

1 仪器和材料

Waters 1525 液相色谱仪、Waters 2487 双波长检测器 (美国 Waters 公司); 中药指纹图谱相似度软件由国家药典委员会推荐。灵芝三萜类活性组分灵芝酸 A、B 对照品 (质量分数均>98.6%, 上海融禾医药科技发展有限公司), 乙腈为进口色谱纯; 其余化学试剂为分析纯; 娃哈哈纯净水, 水为高纯水。

22 份灵芝样品均由浙江工业大学食品系食用菌专家孙培龙教授鉴定, 样品产地、种属或栽培方式以及鉴定结果见表 1。

2 方法与结果

2.1 分析溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品灵

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 浙江省科技厅项目 (2008C32030)

作者简介: 何晋浙 (1959—), 女, 副研究员, 主要从事食品资源开发及分析检测。

Tel: (0571)88320604 13958037590 E-mail: hjzgd@zjut.edu.cn

*通讯作者 孙培龙 E-mail: sun_pl@zjut.edu.cn

表1 灵芝样品
Table 1 *Ganoderma* samples

样品	产地、种属或栽培方式	鉴定结果
1	浙江金华寿仙赤芝	<i>Ganoderma lucidum</i>
2	山东赤芝	<i>G. lucidum</i>
3	安徽赤芝	<i>G. lucidum</i>
4	河南社旗县赤芝	<i>G. lucidum</i>
5	浙江常山县赤芝	<i>G. lucidum</i>
6	福建赤芝	<i>G. lucidum</i>
7	四川赤芝	<i>G. lucidum</i>
8	浙江龙泉赤芝	<i>G. lucidum</i>
9	浙江益圣菌赤芝	<i>G. lucidum</i>
10	河北赤芝	<i>G. lucidum</i>
11	安徽韩芝	<i>G. lucidum</i>
12	福建韩芝	<i>G. lucidum</i>
13	福建紫芝	<i>G. sinense</i>
14	四川黑芝	<i>G. atrum</i>
15	野生芝	<i>Coriolus versicolor</i>
16	椴木栽培赤芝(福建)	<i>G. lucidum</i>
17	平盖栽培赤芝(浙江益圣)	<i>G. lucidum</i>
18	平盖栽培赤芝(浙江寿仙)	<i>G. lucidum</i>
19	棉籽皮栽培赤芝(安徽)	<i>G. lucidum</i>
20	硬木栽培赤芝(福建)	<i>G. lucidum</i>
21	圆木栽培赤芝(浙江寿仙)	<i>G. lucidum</i>
22	菌种栽培赤芝(浙江益圣)	<i>G. lucidum</i>

芝酸 A 5.0 mg、灵芝酸 B 5.0 mg，甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中，制成灵芝酸 A、灵芝酸 B 均为 0.5 mg/mL 的混合对照品溶液，0.45 μ m 微孔滤膜滤过，备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 将各灵芝子实体切片、干燥、粉碎至 40 目左右，称取 5 g 干品，以料液比 1:33 加入 95%乙醇，微沸状态下，微波（功率 800 W）回流提取 17 min，滤过，得灵芝醇提液。取醇提液分别用氯仿-浓硫酸-香草醛和碘化铋钾试剂进行三萜和生物碱类物质的定性鉴别^[12-13]，结果分别显红棕色沉淀和显红色，说明灵芝醇提生物活性物质中存在三萜类和生物碱类。浓缩后的浸膏以甲醇定容至 100 mL，经粗滤及 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液，备用。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μ m），流动相为 1%醋酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱程序：0~8 min，10% A；8~10 min，15%

A；10~15 min，30% A；15~20 min，40% A；20~40 min，50% A；体积流量 1.0 mL/min，检测波长为 254 nm，进样量 10 μ L，洗脱时间 40 min，得到理想的灵芝醇提生物活性物质分离的指纹图谱。

2.3 指纹图谱的方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 1 号供试品溶液 10 μ L，连续进样 6 次。结果表明 15 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%，相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.3.2 稳定性试验 取 1 号供试品溶液，分别在 0、1、2、4、8、24、48 h 进行检测，结果表明 15 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%，相对峰面积的 RSD 均小于 3%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.3 重现性试验 取 1 号样品 6 份，平行制备供试品溶液，分别进样测定。结果表明 15 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%，相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.4 指纹图谱的建立

取 1 号样品，按“2.2”色谱条件建立对照品和 1 号样品的指纹图谱，1 号样品所有组分均在 40 min 内出峰，主要峰数在 15 个以上，对照品灵芝酸 A 和灵芝酸 B 分别为 10 号峰和 7 号峰，保留时间分别为 21.5、18.3 min。色谱图见图 1。

2.5 不同产地灵芝指纹图谱研究

以 10 种不同产地的赤芝样品，进行 HPLC 指纹图谱分析，结果见图 2。10 种不同产区赤芝样品醇提生物活性物质最多的指纹图谱峰数可达 42 种，

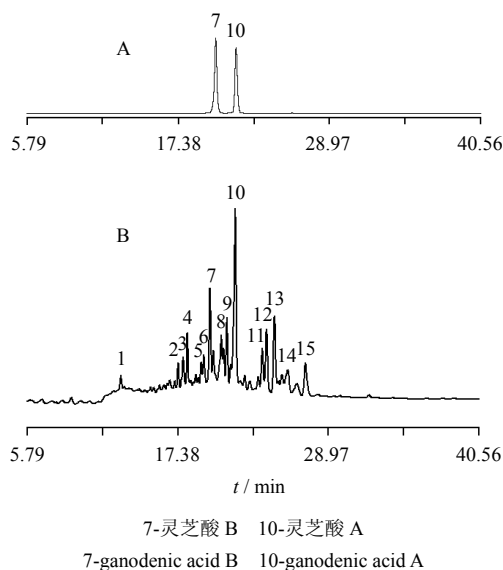


图1 对照品(A)和灵芝(B)的指纹色谱图
Fig. 1 Fingerprint of reference substances (A) and *Ganoderma* (B)

运用中药指纹图谱相似度软件对醇提生物活性物质指纹图谱峰数进行匹配及计算各部分的相似度，上述 10 个灵芝样品中，醇提生物活性物质共有峰数为 15 个（图 1）。以 1 号赤芝样品为参照标准，选择 10 号峰灵芝酸 A 为内参照峰，对应各峰序号，进行色谱指纹图谱的相对保留时间和相对峰面积计算，结果见表 2。

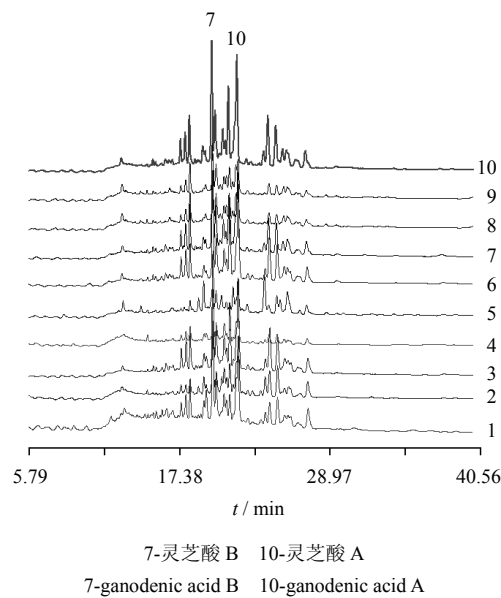


图 2 10 种赤芝醇提生物活性物质分离色谱图
Fig. 2 Fingerprint of 10 kinds of ethanol extracting bioactive compositions from *Ganoderma*

以 1 号样品灵芝药材为比较标准，再将其他不同产地的灵芝药材以灵芝酸 A 为内参照物（也可以灵芝酸 B 为内参照物），按表 2 峰序号进行相对应的保留时间计算，结果表明，不同产地的灵芝药材，与对照样品相对应的保留时间其差异均在 1% 内，说明灵芝醇提生物活性物质的共有指纹图谱特征峰数有 15 个，药材中至少有 15 个相同药效成分。同时利用灵芝醇提生物活性物质指纹图谱以参照物的峰总面积为参照基准，通过归一化面积积分法计算，进行各样品与参照标样间所含醇提生物活性物质量化比较，1、2、3、6、7、10 号各样品的系列归一化面积值相互接近，表明各成分在各自的药材中所占的比例比较接近，且出峰保留时间相近，其药材的相似性较大^[14-15]。

2.6 10 种不同产地赤芝样品相似度分析

运用国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A）版》对 10 种不同产地赤芝样品进行相似度分析（表 3），可见 1、2、3、6、

表 2 1 号灵芝参照样品色谱相对保留值指纹谱
Table 2 Relative retention fingerprint of *Ganoderma* No.1 reference sample

峰序号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.594	0.191
2	0.799	0.253
3	0.816	0.275
4	0.831	0.417
5	0.878	0.180
6	0.887	0.253
7	0.910	0.754
8	0.958	0.439
9	0.969	0.549
10 (S)	1.000	1.000
11	1.091	0.361
12	1.108	0.453
13	1.174	0.591
14	1.210	0.201
15	1.242	0.374

表 3 10 种灵芝指纹图谱的相似度
Table 3 Similarity of fingerprint from 10 kinds of *Ganoderma*

样品号	相似度	样品号	相似度
1	1.000	6	0.941
2	0.916	7	0.944
3	0.931	8	0.831
4	0.847	9	0.787
5	0.792	10	0.951

7、10 号灵芝样品与参照对照品有更多的相似性，其相似度达到 0.916 以上，4、8 号样品有一定的差异性，5、9 号样品差异性较大，说明不同产地赤芝样品其所含有效成分的量存在一定的差异，这与上述面积积分分析结果相一致，这进一步说明指纹图谱对灵芝样品原料的加工质量控制，真伪鉴别具有科学意义。

2.7 不同种属的灵芝样品的比较

采用不同种属赤芝、韩芝、紫芝、黑芝、野生灵芝进行醇提生物活性物质的初步分析，结果见图 3。可以明显地看出，野生灵芝某种醇提生物活性物质含量很高，而紫芝醇提生物活性物质相对较少。以 1 号样品提供的赤芝样品为参照标准，选择 10 号峰灵芝酸 A 为内参照峰，对应各峰序号，进行色谱指纹图谱的相对保留时间和归一化面积值计算，以及重叠率[重叠率=共有峰×2/（标准药材峰数+

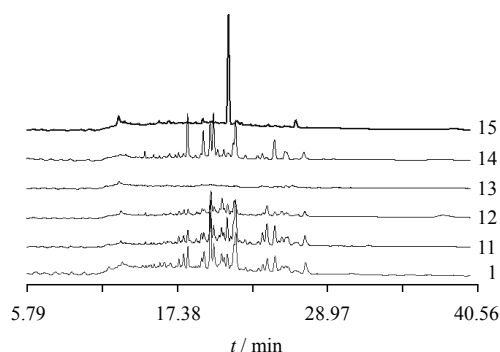


图 3 不同种属的灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of ethanol extracting bioactive compositions from different species of *Ganoderma*

待检药材峰数)]计算^[14], 结果表明, 野生芝的主要特征色谱峰的相对保留时间为 0.971, 与灵芝酸 A 相对保留时间相差 1%以上, 但与 1 号参照灵芝样品的 9 号峰的相对保留时间相差小于 1%, 为 9 号有效成分, 且其归一化面积值相对灵芝酸 A 面积比值高达 2.36 倍, 说明 9 号有效成分含量很高。另外, 通过共有峰的重叠率计算, 韩芝及黑芝与赤芝的重叠率分别为 85.6%和 81.3%、可判定其品种与赤芝相近, 而紫芝和野生芝与赤芝的重叠率小于 10%, 说明可能与赤芝品种有较大的差异。

2.8 不同栽培方式的灵芝样品的比较

以不同的栽培方式(园木、椴木、平盖、棉子皮、硬木、菌种栽培)生长的灵芝, 以 1 号灵芝样品为参照品, 进行醇提生物活性物质的初步分析, 结果见图 4, 通过相似度分析, 椴木、棉籽皮、硬木、园木栽培方式的相似度可达到 0.852 以上, 其各自的共有峰的归一化总面积与 1 号灵芝样品共有峰的归一化总面积比值大于 70%, 说明上述 4 种栽培方式所得醇提生物活性物质较高。由图 4 及相似度计算明显看出, 平盖培育与其他栽培方式差异性较大, 相似度仅为 0.513, 灵芝醇提生物活性物质总共有峰面积值相对较少, 其含量可能较少。而菌种培育方式差异性最大, 没有灵芝酸 A, 共有峰的重叠率为 5%以下, 可能菌种培育方式生产的灵芝其生物活性物质以其他组分居多, 如多糖类成分。

3 讨论

分别考察了以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-醋酸-高纯水及乙腈-磷酸-高纯水为流动相, 进行色谱条件优化试验, 结果表明甲醇-水流动相体系的溶剂强度较乙腈-水流动相体系溶剂强度强, 造成保留不

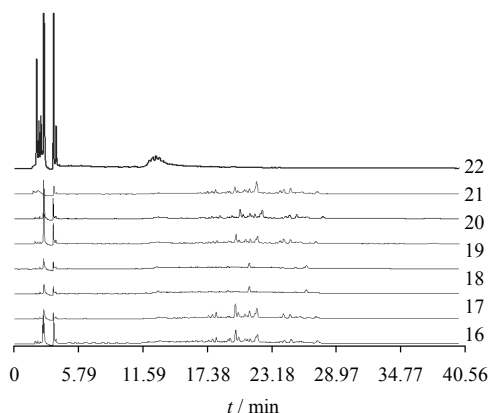


图 4 不同栽培方式的灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱

Fig. 4 Fingerprint of ethanol extracting bioactive compositions from *Ganoderma* by different cultivation

足, 分离度不如乙腈-水流动相体系理想, 同时等度洗脱和乙腈-磷酸-水为流动相, 峰分离效果不佳, 出峰数少, 基线不够稳定。以 1%醋酸水溶液-乙腈为流动相, 进行梯度洗脱, 能得到理想的灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱。

指纹图谱具有整体性和模糊性的特点, 当其用于中药鉴别时, 提供的信息较用任何单一化学对照品作为鉴定的依据要丰富得多^[16]。本实验基于整体色谱的分离辨认样品的真实性出发, 通过指纹图谱数据软件可清晰辨别醇提生物活性物质指纹图谱峰数多达 42 种以上, 并有效地鉴别醇提生物活性物质共有特征峰有 15 个, 清楚地表达了指纹图谱鉴别的专属性。

通过多组别灵芝生物活性类物质的指纹图谱的分析研究, 在目前灵芝醇提生物活性物质有效成分多数没有明确的情况下, 以灵芝酸 A 为对照品, 中药指纹图谱能够较全面地反映灵芝原料或其制剂所含生物活性物质的化学成分的种类与数量, 进而反映其品质以达到质量控制和科学评价灵芝原材料的目的。

参考文献

- [1] 黄鸣清, 谢友良, 蒋东旭, 等. 灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒的实验研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 423-426.
- [2] 邓新国, 林晓峰, 高 杨, 等. 灵芝孢子油对 N-甲基-N-亚硝脲诱导大鼠视网膜光感受器细胞损伤的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 415-420.
- [3] 徐 颖, 王 斌. 高效液相色谱法测定灵芝饮片中腺苷 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2003-2004.

- [4] 史先敏, 张劲松, 凌霞芬, 等. HPLC 指纹图谱技术在灵芝组织分离试验中的应用 [J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 277-283.
- [5] 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.
- [6] 黄艳娟, 肖桂林. 灵芝三萜药理学作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2008, 14(9): 87-88.
- [7] 杨晶晶, 于德泉. 灵芝生物碱甲和乙的合成 [J]. 药学学报, 1990, 25(7): 555-559.
- [8] 赵渤年, 于宗渊, 丁晓彦, 等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
- [9] 李春来, 李俊松, 刘 丹, 等. 赭石炮制品 X 射线衍射分析及指纹图谱的建立 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 701-703.
- [10] 崔 洋, 王 巧, 张兰桐, 等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301.
- [11] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, *et al*. Fingerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifoli Flos* by RP-HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156.
- [12] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [13] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1997.
- [14] 洪筱坤 王智华. 中药数字化色谱指纹谱 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2003.
- [15] 罗 文, 王 伟, 石任兵, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42.
- [16] 刘鄂湖, 蔡光明, 朱海升, 等. 小叶黑柴胡药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1560-1562.

《广东地产药材研究》出版发行

由广州中医药大学附属中山医院梅全喜教授主编的《广东地产药材研究》专著于2011年5月由广东科技出版社正式出版发行, 该书是我国近年出版的一部有关广东地产药材研究的重要专著, 全书130余万字, 由总论、各论和附录三部分组成, 总论部分主要介绍广东的地理生态特点及地产药材资源、广东地产中药发展历史沿革、广东地产药材应用的典范—广东凉茶、论广东地产药材的研究与开发及开展广东地产药材研究应重视品种考证工作等方面内容。各论部分收载广东地产药材170余种, 附有170余张药用植物图片, 按别名、来源、性味、功能主治、用法用量、药用历史、化学成分、药理作用、临床应用、附注、参考文献等11个栏目内容来描述。其中最为重点的栏目是药用历史、化学成分、药理作用和临床应用。书的附录部分列举了本书编写涉及到的参考书目、药物中文名称索引及药用植、动、矿物学名索引, 方便读者查考阅读。

该书由国医大师、广州中医药大学邓铁涛终身教授题写书名, 中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授题词, 中国中医科学院副院长兼中药研究所所长黄璐琦教授和中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林教授为本书写序。同时, 该书还获2010年度国家出版基金资助。

该书的出版也是梅全喜教授及其领导的团队致力于广东地产药材研究多年的成果结晶, 该团队先后开展了广东土牛膝、三角草、广昆布、三丫苦、蛇鳞草、布渣叶、蛇泡筋、黑面神等广东地产药材研究达10余项, 以广东地产药材为主药研制出医药新产品10余种, 获国家发明专利4项, 获广东省科技进步二、三等奖各一项, 中山市科技进步一、二、三等奖近10项。本书是在这些研究成果的基础上编写而成, 相信其出版对推动广东地产药材研究开发工作的广泛深入开展、更好发挥广东地产药材的特色和优势, 加快广东地产药材走向世界, 提高广东中医药地域文化的学术水平, 特别是深入研究挖掘广东地产药材在防治广东省地方常见多发病方面的独特疗效, 推动地方经济发展, 加快广东中医药强省建设都将产生积极、深远的影响。

(本刊讯)