

文章编号:1673-1689(2009)05-0589-09

灵芝氯仿提取物的 HPLC 指纹图谱的研究

鄢 嫣, 聂少平, 陈 奕, 谢明勇*

(食品科学与技术国家重点实验室,南昌大学,江西 南昌 330047)

摘 要:通过高效液相色谱法及现代色谱指纹图谱理论建立灵芝氯仿提取物的指纹图谱模型,为传统中药灵芝的质量评价提供参考标准。取 15 批不同种植地的灵芝样品提取所得的氯仿提取物经 HPLC 分析,选用 KromasilC₁₈柱;流动相为甲醇醋酸溶液,梯度洗脱,检测波长 254 nm,流量为 1 mL/min。建立了灵芝氯仿提取物的指纹图谱,并对 15 批样品的指纹图谱相似度进行了比较,获得较为一致的结果,说明其可作为灵芝内在质量控制的评价参考标准。比较不同省份灵芝氯仿提取物的异同,为今后的研究工作奠定了基础。

关键词:灵芝;氯仿提取物;高效液相色谱法;指纹图谱;相似度;质量评价

中图分类号:S 646

文献标识码:A

Study on HPLC Fingerprint of Chloroform Extract of *Ganoderma lucidum*

YAN Yan, NIE Shao-ping, CHEN Yi, XIE Ming-yong*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The objective of this study was to provide a reference standard for Chinese *Ganoderma lucidum* through constructing the fingerprint of chloroform extract of *Ganoderma lucidum* with HPLC(Kromasil C₁₈ column(5~10 mm, 4.6 mm×250 mm), mobile phase: methanol-2% ethanoic acid in 1 mL/min at 254 nm). Fifteen kinds of *Ganoderma lucidum* from different plant area were examined and used to construct this fingerprint and the similarity and difference of those 15 samples fingerprints and common model were compared and a consistent result was achieved. Based on those results, a reference fingerprint was built and used to evaluate the internal quality of *Ganoderma lucidum*. In conclusion, the result presented here strongly suggested that the method described in this manuscript is stabilization and credibility.

Key words: *Ganoderma lucidum*, triterpenoids, HPLC, fingerprint, resemble value, quality evaluation

现代医学证明:灵芝含有多种生理活性物质, 能够调节和增强人体免疫力。目前国际医药学界

收稿日期:2008-11-04

基金项目:国家 863 计划项目(2008AA10Z325);食品科学与技术国家重点实验室目标导向资助项目(SKLF-MB-200806);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540);江西省教育厅重大项目。

* 通讯作者:谢明勇(1957-)男,江西宜春人,教授,博士生导师,主要从事食品化学、食品营养与安全研究。

Email: myxie@ncu.edu.cn

也非常重视灵芝的研究与开发,2000年美国出版的《美国草药药典和治疗概要》收录了灵芝,该书仅收录10种中药或草药,灵芝为其中之一^[1-2]。

指纹图谱是指某种(或某产地)中药材或中成药中所共有的、具有特征性的某类或数类成分的色谱或光谱的图谱。通过指纹图谱的特征性,能有效鉴别样品的真伪或产地;通过指纹图谱主要特征峰的面积或比例的制定,能有效控制样品的质量。因此,制定中药材或中成药的指纹图谱,对于有效地控制中药材或中成药的质量,具有重要的意义^[3]。灵芝在长期的应用和栽培的过程中,种内产生变异,药材质量存在很大差异,造成目前药源不稳定和市售药材质量无法正确评估的混乱局面。高效液相色谱具有很高的检测精度,样品用量少^[4]。因此,作者首选高效液相色谱法进行指纹图谱分析。目前,对于灵芝高效液相指纹图谱方面的相关研究较少。黄书铭等人通过反相液相色谱法建立了灵芝三萜类组分的高效液相色谱指纹图谱^[5]。邓文红等人利用反相液相色谱法对灵芝原料、原料药、灵芝注射剂进行了分析,建立了上述药剂的的指纹图谱,作为其内在质量的参照标准^[6]。

作者采用中药指纹图谱法对灵芝原料进行分析,采用不同产地的灵芝为原料,用高效液相色谱法得到能够体现灵芝质量的氯仿提取物的指纹图谱,通过考察各指纹图谱与总指纹图谱的相似度得出灵芝内在质量评价方法,并且比较了各省份灵芝氯仿提取物指纹图谱的异同。

1 材料

1.1 样品

灵芝样品若干(见表1),干燥备用。

1.2 试剂

氯仿(分析纯),甲醇(色谱纯),醋酸(色谱纯),超纯水。

1.3 仪器

中草药粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司产品;Waters 515 高效液相色谱仪,系统包括515 HPLC 泵、Waters 2996 光电二极管阵列检测器、Waters 2410 Refractive Index 检测器,Kromasil C₁₈柱(5~10 mm;D 4.6 mm×250 mm)、柱温箱等,Waters 公司产品;质谱仪,ZQ 4000/2695,美国 Waters 公司产品。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件

色谱柱,Kromasil C₁₈柱;流动相,甲醇(A)-质量分数2%醋酸(B);梯度洗脱,0~18 min,40%~50%A;19~54 min,50%~70%A;53~54 min,70%~100%A;54~55 min,100%~40%A;检测波长:254 nm;柱温:35℃;流量,1 mL/min;进样量:20 μL;记录时间:55 min。

表1 灵芝样品来源

Tab. 1 Samples used in this work

编号	产地	采集时间
1	山东靖当铺 16	2006-07-26
2	山东靖当铺 23	2006-07-26
3	山东泰山 A	2006-07-26
4	山东泰山 6	2006-07-26
5	山东嘉祥县姚庄	2006-07-28
6	安徽黄山 9	2006-08-1
7	安徽黄山冬溪湖 5A	2006-08-1
8	安徽金寨太阳村韩芝 1	2006-07-30
9	安徽金寨太阳村赤芝 1	2006-07-30
10	安徽金寨太阳村韩芝	2006-07-30
11	浙江龙泉 9	2006-09-10
12	浙江龙泉 11	2006-09-10
13	浙江龙泉 8	2006-09-10
14	浙江龙泉 5	2006-09-10
15	浙江龙泉 1	2006-09-10

2.2 供试样品溶液的制备

取不同产地的灵芝各5个(安徽、山东、浙江共15个)分为3组,均匀粉碎后,精密称取样品2.000 0 g,加入40 mL 氯仿,61℃下回流提取3 h,取出抽滤,残渣再加入40 mL 氯仿同温度下回流提取2 h,抽滤后合并上清液,浓缩至干,加入色谱纯的甲醇溶解,转移至10 mL的容量瓶中,定容备用。分析前用0.45 μm 微孔滤膜滤过即可^[7]。

2.3 灵芝氯仿提取物 HPLC 指纹图谱的建立

取15批灵芝样品按2.2供试样品制备方法制成样品溶液,在上述色谱条件下,记录色谱峰,得到灵芝氯仿提取物的指纹图谱。比较各色谱峰从总结出灵芝氯仿提取物指纹图谱中典型的11个色谱峰(其中8号峰出峰时间居中,峰面积大小适宜,

且分离效果较好,故选其为参照峰)如图 1 所示。

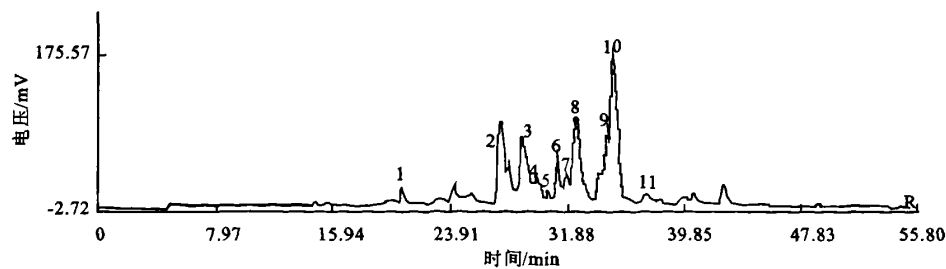


图 1 灵芝氯仿提取物的指纹图谱
Fig.1 Fingerprint of chloroform extract of *Ganoderma lucidum*

2.4 氯仿提取物特征峰的 HPLC-MS 鉴定

采用 HPLC-MS 法鉴定所得特征峰的化学组成。液相色谱条件同上,质谱条件为:ESI 源,正离子和负离子检测;脱溶剂气,流量 250 L/h;锥孔气(N₂),流量 50 L/h;源电压 3.0 kV;扫描范围 *m/z* 500~1 000;脱溶剂气温度 350 ℃;锥孔电压 30 V。

三萜类化合物按照它们的化学结构和质谱碎片图可以分为 5 类,其主要的裂解方式就是失去一分子 H₂O 和 CO₂,或者以裂解 C 环或 D 环,产生阴离子为其特有的特征^[8]。根据文献记载,20,22-不

饱和羰基在 240~255 nm 处有特征紫外峰。灵芝烯酸及灵芝酸分别在 240~250 nm 处和 250~256 nm 处有最大吸收峰^[9-12]。通过 LC-MS 检测,得到特征峰的质谱图以及相对分子质量,分别应用正负电离方式进行检测,结果发现负电离方式对三萜酸类物质更加灵敏。

上述结果再通过比较各物质的紫外光谱最大吸收波长以及 HPLC 保留时间,参考文献资料^[8]和质谱图库(NIST),暂时鉴别和推测处其中 5 个特征峰的可能的化学结构(见表 2、3)

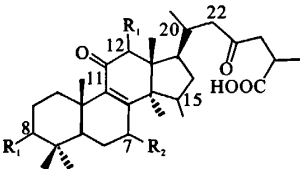
表 2 ESI-MS 数据及灵芝氯仿提取物特征峰组成的鉴定结果
Tab.2 ESI-MS data and identification result of the specific peak from chloroform extract of *Ganoderma lucidum*

峰编号	保留 时间/min	质谱数据	紫外扫描 峰值	鉴别物质
1	20.37	531[M-H] ⁻ , 513[M-H-CO] ⁻	256	未知物质
2	26.82	513[M-H] ⁻ , 495[M-H-H ₂ O] ⁻	250	未知物质
3	28.22	497[M-H] ⁻ , 515[M-H-H ₂ O] ⁻	256	灵芝酸 B(Ganoderic acid B)
4	29.03	555[M-H] ⁻	260	未知物质
5	29.85	569[M-H] ⁻	253	未知物质
6	30.45	571[M-H] ⁻ , 553[M-1-H ₂ O] ⁻ , 573[M+H] ⁺	258	灵芝酸 H(Ganoderic acid H)
7	31.05	511[M-H] ⁻ , 513[M+H] ⁺	253	灵芝烯酸 D(Ganoderenic acid D)
8	31.68	513[M-H] ⁻ , 495[M-H-H ₂ O] ⁻	256	灵芝酸 D(Ganoderic acid D)
9	33.403	—	250	未知物质
10	34.10	569[M-H] ⁻ , 551[M-H-H ₂ O] ⁻	256	12-乙酰灵芝酸 F (12-Acetoxyganoderic acid F)
11	37.08	501[M-H] ⁻	253	未知物质

表 3 灵芝氯仿提取物鉴别出的三萜类物质的化学结构

Tab. 3 Chemical structures of the triterpenoids identified from chloroform extract of *Ganoderma lucidum*

峰编号	物质名称	R1	R2	R3	R4	双键	相对分子质量
3	灵芝酸 B	β -OH	β -OH	=O	H	--	516
6	灵芝酸 H	β -OH	=O	=O	β -OAc	--	572
7	灵芝烯酸 D	=O	β -OH	=O	H	D20,22	512
8	灵芝酸 D	=O	β -OH	=O	H	--	514
10	12-乙酰灵芝酸 F	=O	=O	=O	β -OAc	--	570



由于未对标准品进行分析,因此,在此只能大致的对特征峰进行鉴别,如果需要确定特征峰物质的化学结构,需要加入内标进行分析,此有待进一步的研究。

2.5 样品指纹图谱的相似度评价

用中国药典委员会推荐的“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”进行数据处理,将 15 批灵

芝氯仿提取物的指纹图谱结果导入“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”系统中,采用平均数法导出 15 批指纹图谱的共有模式,再将 15 批灵芝氯仿提取物指纹图谱与导出的共有模式进行比较,得到各批次灵芝的相似度。所得相似度计算图谱及有关相似度结果见图 2,3 及表 4。

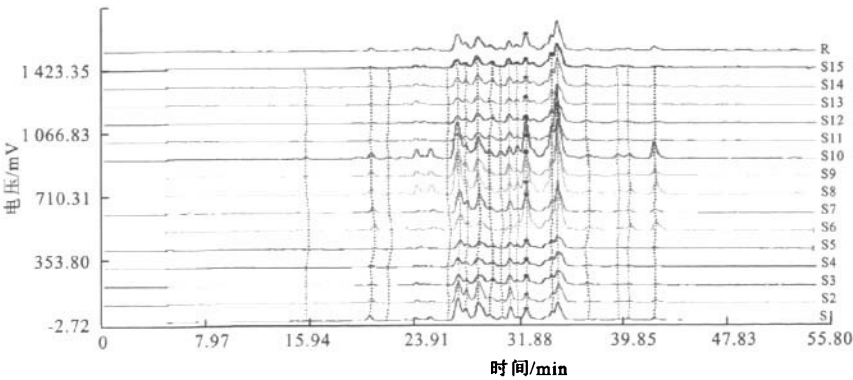


图 2 15 批灵芝相似度计算图谱

Fig. 2 Caculated atlas of 15 groups *Ganoderma lucidum*

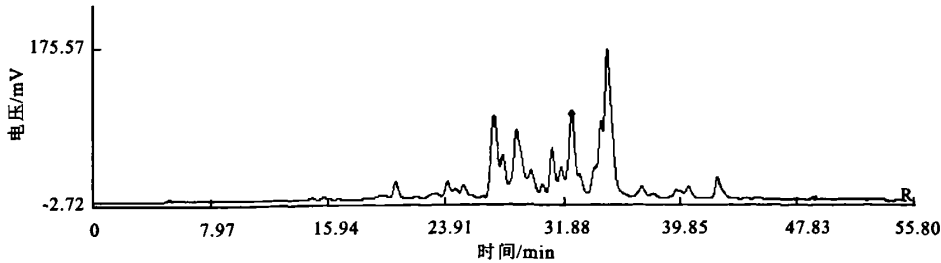


图 3 灵芝氯仿提取物指纹图谱共有模式

Fig. 3 Fingerprint's common mode of chloroform extract of *Ganoderma lucidum*

表 4 各指纹图谱与共有模式的相似度值
Tab. 4 Similarity between each fingerprint and common mode

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	1.000	0.990	0.878	0.913	0.933	0.753	0.973	0.868	0.954	0.868	0.805	0.845	0.837	0.842	0.837
S2	0.990	1.000	0.888	0.934	0.945	0.724	0.963	0.856	0.940	0.856	0.837	0.881	0.867	0.875	0.868
S3	0.878	0.888	1.000	0.965	0.953	0.835	0.901	0.909	0.924	0.910	0.921	0.948	0.926	0.949	0.930
S4	0.913	0.934	0.965	1.000	0.985	0.828	0.931	0.914	0.942	0.915	0.947	0.982	0.958	0.980	0.962
S5	0.933	0.945	0.953	0.985	1.000	0.851	0.961	0.931	0.962	0.931	0.932	0.962	0.953	0.962	0.955
S6	0.753	0.724	0.835	0.828	0.851	1.000	0.860	0.939	0.899	0.938	0.809	0.803	0.814	0.825	0.810
S7	0.973	0.963	0.901	0.931	0.961	0.860	1.000	0.931	0.982	0.931	0.849	0.878	0.876	0.881	0.875
S8	0.868	0.856	0.909	0.914	0.931	0.939	0.931	1.000	0.970	1.000	0.908	0.901	0.925	0.917	0.918
S9	0.954	0.940	0.924	0.942	0.962	0.899	0.982	0.970	1.000	0.969	0.883	0.898	0.906	0.908	0.901
S10	0.868	0.856	0.910	0.915	0.931	0.938	0.931	1.000	0.969	1.000	0.910	0.903	0.926	0.919	0.920
S11	0.805	0.837	0.921	0.947	0.932	0.809	0.849	0.908	0.883	0.910	1.000	0.974	0.972	0.979	0.970
S12	0.845	0.881	0.948	0.982	0.962	0.803	0.878	0.901	0.898	0.903	0.974	1.000	0.982	0.998	0.986
S13	0.837	0.867	0.926	0.958	0.953	0.814	0.876	0.925	0.906	0.926	0.972	0.982	1.000	0.987	0.997
S14	0.842	0.875	0.949	0.980	0.962	0.825	0.881	0.917	0.908	0.919	0.979	0.998	0.987	1.000	0.989
S15	0.837	0.868	0.930	0.962	0.955	0.810	0.875	0.918	0.901	0.920	0.970	0.986	0.997	0.989	1.000
对照图谱	0.918	0.919	0.953	0.970	0.979	0.911	0.962	0.982	0.984	0.983	0.941	0.953	0.958	0.961	0.956

注:图 2,表 4 中的 S1 至 S15 谱图的顺序与表 1 中灵芝产地的顺序一致

由表 4 可以看出,15 批样品指纹图谱与共有模式的相似度较高,分别为 0.918、0.919、0.953、0.970、0.979、0.911、0.962、0.982、0.984、0.983、0.941、0.953、0.958、0.961、0.956,而上述所有的相似度都高于 0.90,符合指纹图谱研究技术的要求^[13]。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度实验 取同一样品,按 2.2 方法处理后重复进样 5 次,得到液相色谱图,测得各特征峰的相对保留时间以及相对峰面积,以 11 个特征峰的相对保留时间与相对峰面积计算相对标准偏差,得峰 1~11 相对保留时间的 RSD 值分别为:0.43%、0.05%、0.09%、0.11%、0.10%、0.09%、0.05%、0%、0.06%、0.07%、0.10%、相对峰面积的 RSD 值分别为:2.12%、1.45%、2.79%、1.24%、1.76%、0.54%、2.62%、0%、2.33%、1.03%、2.74%。其 RSD 值均在 3% 以下,表明本方法的精密度较好。

2.6.2 稳定性实验 取同一样品,按 2.2 方法处理后分别在 0、12、24、36、48 h 进样测定,得到液相色谱图,测得 11 个特征峰的相对保留时间以及相对峰面积,以 11 个特征峰的相对保留时间与相对峰面积计算相对标准偏差,得峰 1~11 相对保留时

间的 RSD 值分别为:0.18%、0.15%、0.03%、0.07%、0.18%、0.19%、0.21%、0%、0.35%、0.06%、0.19%,相对峰面积的 RSD 值分别为:2.32%、2.47%、1.86%、2.17%、2.81%、1.91%、2.75%、0%、2.41%、1.94%、2.77%。其 RSD 值均在 3% 以下,表明本方法的稳定性较好。

2.6.3 重现性实验 取同一批样品按 2.2 方法处理后在 24 h 内重复进样 5 次,测得个特征峰的相对保留时间以及相对峰面积,以 11 个特征峰的相对保留时间与相对峰面积计算相对标准偏差,得峰 1~11 相对保留时间的 RSD 值分别为:0.14%、0.10%、0.05%、0.05%、0.01%、0.02%、0.01%、0%、0.03%、0.03%、0.05%,相对峰面积的 RSD 值分别为:2.64%、1.88%、1.13%、2.88%、2.29%、1.87%、0.83%、0%、2.04%、0.78%、2.79%,其 RSD 值均在 3% 以下,表明本方法的重现性较好。

2.7 特征指纹峰相对保留时间以及相对峰面积计算结果

根据 2.2 所述的方法进行 15 批样品分析,以 8 号峰作为参照峰,各指纹峰的相对峰面积及相对保留时间及相关性结果如表 5、表 6 所示。

表 5 15 批灵芝氯仿提取物 HPLC 指纹图谱特征峰相对保留时间

Tab. 5 Relative retention time of HPLC fingerprint's characteristic peak of chloroform extract of 15 group *Ganoderma lucidum*

灵芝产地	特征峰编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
山东靖当铺 16	0.633 3	0.842 5	0.888 1	0.913 9	0.941 7	0.961 4	0.978 4	1.000 0	1.062 0	1.075 6	1.151 4
山东靖当铺 23	0.636 8	0.843 8	0.888 5	0.914 6	0.941 6	0.960 5	0.978 2	1.000 0	1.064 5	1.078 3	1.154 0
山东泰山 A	0.639 7	0.844 2	0.888 4	0.921 6	0.939 8	0.959 6	0.977 1	1.000 0	1.061 3	1.076 2	1.149 6
山东泰山 6	0.636 1	0.842 4	0.886 8	0.921 0	0.939 7	0.960 1	0.977 1	1.000 0	1.061 0	1.075 7	1.146 0
山东嘉祥县姚庄	0.644 4	0.847 3	0.886 7	0.922 8	0.941 1	0.960 3	0.977 3	1.000 0	1.059 3	1.073 2	1.141 0
安徽黄山 9	0.641 7	0.845 5	0.890 3	0.916 6	0.944 0	0.962 6	0.981 0	1.000 0	1.063 4	1.077 3	1.152 4
安徽黄山冬溪湖 5A	0.638 6	0.844 7	0.891 4	0.914 1	0.941 7	0.960 6	0.978 6	1.000 0	1.062 4	1.075 5	1.153 3
安徽太阳村韩芝 1	0.637 8	0.842 8	0.887 7	0.913 6	0.940 5	0.960 3	0.978 9	1.000 0	1.062 1	1.074 7	1.152 3
安徽太阳村赤芝 1	0.637 2	0.843 7	0.887 9	0.913 0	0.940 2	0.959 4	0.977 0	1.000 0	1.061 6	1.075 4	1.152 8
安徽太阳村韩芝	0.637 4	0.842 4	0.888 9	0.914 9	0.940 6	0.960 0	0.978 0	1.000 0	1.063 1	1.075 2	1.154 4
浙江龙泉 9	0.636 5	0.841 6	0.887 8	0.913 1	0.940 0	0.960 1	0.978 0	1.000 0	1.062 5	1.076 8	1.146 4
浙江龙泉 11	0.637 7	0.842 7	0.887 7	0.921 6	0.939 2	0.959 6	0.977 7	1.000 0	1.061 8	1.075 8	1.145 3
浙江龙泉 8	0.637 9	0.842 7	0.887 5	0.914 1	0.939 7	0.959 3	0.977 3	1.000 0	1.061 6	1.075 8	1.144 7
浙江龙泉 5	0.637 8	0.842 3	0.887 8	0.921 8	0.940 3	0.960 2	0.978 1	1.000 0	1.062 4	1.076 4	1.146 4
浙江龙泉 1	0.635 0	0.841 6	0.886 7	0.921 0	0.939 3	0.959 0	0.977 5	1.000 0	1.062 2	1.076 3	1.145 6
RSD/%	0.411 9	0.184 9	0.145 4	0.422 5	0.132 5	0.092 9	0.103 4	0.000 0	0.109 9	0.107 7	0.364 8

表 6 15 批灵芝氯仿提取物 HPLC 指纹图谱特征峰相对峰面积

Tab. 6 Relative peak area of HPLC fingerprint's characteristic peak of chloroform extract of 15 group *Ganoderma lucidum*

灵芝产地	特征峰编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
山东靖当铺 16	0.382 9	1.757 0	1.900 1	0.468 5	0.244 7	0.883 2	0.187 6	1.000 0	0.517 6	1.601 6	0.085 3
山东靖当铺 23	0.458 3	2.178 4	2.844 3	0.789 3	0.254 1	1.350 3	0.280 8	1.000 0	0.847 0	2.507 2	0.177 1
山东泰山 A	0.168 4	1.068 2	0.890 3	0.741 9	0.174 5	0.870 6	0.435 0	1.000 0	0.787 2	2.232 6	0.256 0
山东泰山 6	0.207 2	1.053 9	1.635 0	0.772 3	0.162 0	0.914 2	0.509 0	1.000 0	0.945 3	2.733 1	0.301 0
山东嘉祥县姚庄	0.134 1	1.046 6	1.367 8	0.497 4	0.136 6	0.667 9	0.423 8	1.000 0	0.848 7	2.095 6	0.151 3
安徽黄山 9	0.115 4	0.314 2	0.246 4	0.037 8	0.030 1	0.082 4	0.118 5	1.000 0	0.242 0	0.966 4	0.073 3
安徽黄山冬溪湖 5A	0.225 3	1.150 1	1.231 2	0.259 2	0.088 0	0.455 9	0.156 3	1.000 0	0.416 8	1.415 3	0.103 5
安徽太阳村韩芝 1	0.107 5	0.826 1	0.584 9	0.151 3	0.121 1	0.186 4	0.199 0	1.000 0	0.558 5	1.662 8	0.081 6
安徽太阳村赤芝 1	0.179 8	1.002 1	0.932 4	0.219 2	0.097 1	0.369 7	0.204 8	1.000 0	0.462 9	1.449 6	0.055 9
安徽太阳村韩芝	0.106 1	0.828 8	0.590 2	0.156 3	0.127 5	0.195 2	0.202 8	1.000 0	0.556 7	1.640 8	0.091 4
浙江龙泉 9	0.310 2	1.310 3	1.579 3	0.117 6	0.093 6	1.429 3	0.691 0	1.000 0	2.009 1	5.174 6	0.428 8
浙江龙泉 11	0.162 4	1.025 5	1.907 3	1.138 3	0.175 4	1.158 8	0.649 2	1.000 0	1.588 7	4.267 0	0.486 7
浙江龙泉 8	0.159 1	1.031 4	1.564 7	0.760 3	0.162 8	0.681 0	0.610 0	1.000 0	1.852 6	3.601 2	0.325 0
浙江龙泉 5	0.169 3	0.927 7	1.539 5	0.929 6	0.161 4	0.895 4	0.573 6	1.000 0	1.394 2	3.772 5	0.354 4
浙江龙泉 1	0.152 1	0.968 9	1.572 0	0.876 7	0.136 3	0.832 9	0.603 4	1.000 0	1.831 8	3.539 7	0.362 3
RSD/%	51.02	38.28	47.73	66.88	40.12	56.42	52.68	0.00	59.49	47.82	65.24

特征峰的相对保留时间基本符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中关于药材部分的规定,RSD 值均低于 1%,由此可见,作者所建立的灵芝氯仿提取物指纹图谱,作为灵芝内在质量的参考评价方法具有一定的科学性。

指纹峰的相对峰面积相差较大(RSD 值大于 3%),由于 15 批样品产自 3 个省的不同产地,由此可见,不同产地的灵芝氯仿提取物中所含物质的含量有一定的差异。

2.8 不同产地灵芝氯仿提取物指纹图谱的建立与比较

为比较不同产地的灵芝氯仿提取物的异同,将来自于 3 个省的灵芝氯仿提取物液相色谱数据导入“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”系统中,分别建立各省灵芝氯仿提取物的指纹图谱,并将各指纹图谱进行比较,结果如图 4 及表 7 所示(其中 S1 产地为山东的指纹图谱,S2 为浙江,S3 为安徽)

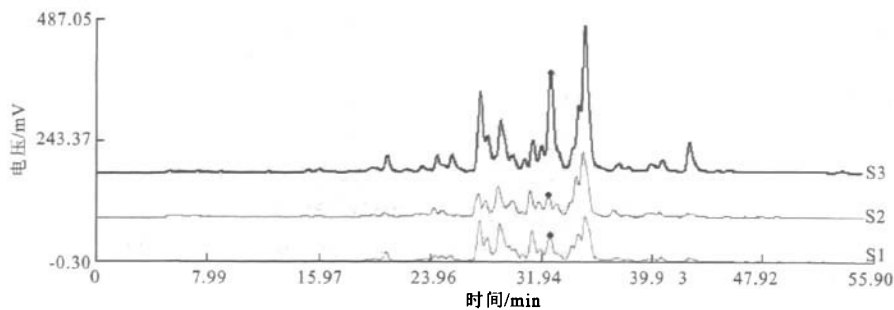


图 4 3 个产地指纹图谱比较

Fig. 4 Comparison of fingerprint from three different plant province

表 7 各省指纹图谱特征峰总面积的比较

Tab. 7 The comparison of fingerprint's characteristic peak from different province

特征峰 编号	山东			浙江			安徽		
	保留 时间/min	峰高	峰面积	保留 时间/min	峰高	峰面积	保留 时间/min	峰高	峰面积
1	20.709	17.163	448.151	20.590	8.344	222.072	20.793	34.098	879.298
2	27.416	81.257	2 313.45	27.233	44.875	1 271.651	27.473	161.504	4 969.881
3	28.860	75.078	2 756.699	28.700	59.186	2020.414	28.926	103.166	4 035.121
4	29.942	27.895	581.648	29.706	28.276	1 026.436	29.753	34.364	942.466
5	30.563	13.719	317.679	30.386	8.895	186.878	30.623	25.649	612.090
6	31.196	60.728	1 491.317	31.033	49.960	1 177.703	31.240	61.393	1 410.139
7	31.760	23.592	554.590	31.616	29.442	766.538	31.833	51.932	1 175.144
8	32.503	50.868	1 584.844	32.356	41.987	1 245.745	32.544	196.505	6 761.569
9	34.490	54.349	1 209.244	34.350	80.619	2 118.908	34.553	131.305	2 989.801
10	34.946	90.410	3 454.568	34.806	130.872	4 897.554	34.966	292.404	9 453.846
11	37.306	7.595	295.000	37.050	13.804	476.294	37.480	16.468	542.883
峰面积和			15 007.196			15 410.194			33 772.238
已知峰面积和			9 842.072			10 107.963			22 835.819

对3省份的灵芝氯仿提取物指纹图谱的比较可以看出,不同省份的灵芝氯仿提取物的特征指纹峰的相对含量有着明显的差异,安徽省所产的灵芝氯仿提取物指纹图谱中的各指纹峰相对含量显著比其余两省份大,由于三萜类物质是灵芝的主要活性成分之一,其含量与其特征峰的相对峰面积正相关,通过比较已鉴别的三萜类物质特征峰的峰面积大小,可以看出安徽产灵芝的三萜类物质的含量远高于其余两省,而浙江则稍高于山东。

3 讨论

1) 色谱条件的确定 综合文献考虑到由于氯仿提取物中物质的紫外吸收低,进样5、10 μL 峰面积太低,进样20 μL 基本可以满足要求。综合文献[14]以及所选柱的要求,最后选定柱温为35 $^{\circ}\text{C}$ 。结合文献[14]考察了流量0.8 mL/min、1.0 mL/min,发现流量1.0 mL/min为好。考察灵芝提取物的紫外最大吸收波长,结果在254 nm和280 nm在这两种检测波长下,图谱中均有多个色谱峰,检测波长为254 nm时色谱峰较多且峰形较好,综合考虑,选择254 nm为测定波长。文献[14]中研究过等度洗脱的可行性,结果分离度、峰形等均不如梯度洗脱理想,因此本研究选用梯度洗脱。作者考察

了10多个不同梯度洗脱,结果梯度最佳。在此梯度条件下考察了55、60、70、90 min图谱,结果表明,所有的指纹峰55 min内出现,故确定时间为55 min。

2) 所得结果的应用价值 色谱指纹图谱是通过对各样品色谱图进行比较,来反映样品化学成分的差异。在指纹图谱相似度计算中,一般将所选取的色谱峰同时作比较计算,反映了指纹图谱的整体相似性,可对中药产品质量作出较全面、准确的评价^[15-17]。本次试验结果表明,灵芝氯仿提取物的指纹图谱相似度高,具有唯一的特征性,且其中包含了已初步鉴定的5种三萜类物质的特征峰,三萜类物质是灵芝中的重要活性成分之一,其含量与灵芝的质量有一定相关性。因此利用色谱指纹图谱来控制灵芝的质量优劣是切实可行的,它比现行质量标准要更全面、客观。

灵芝氯仿提取物指纹图谱可为灵芝药材的质量评价提供可靠依据,也为其质量控制提供更全面的信息,同时通过比较3省灵芝的指纹图谱可为道地灵芝药材产地的确定提供依据。

作者初步研究了灵芝氯仿提取物的指纹图谱,要满足对灵芝的全面质量管理,需要建立能够反映灵芝内在质量的、全面的色谱指纹谱,有待进行大量样本分析和药效比较研究。

参考文献(References):

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] 蔡宝昌, 刘训红. 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 王超. 指纹图谱质量评价系统[D]. 成都: 四川大学, 2005.
- [4] 张梁, 陈蕴, 石贵阳, 等. HPLC 法测定玉米浓醇发酵酒精液中的纤维二糖和蜜二糖[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 89-92.
ZHANG Liang, CHEN Yun, SHI Gui-yang, et al. Determination of Cellobiose and Melibiose in the Distillate of High-Gravity Ethanol Broth from Corn by HPLC[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(2): 89-92. (in Chinese)
- [5] 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的研究[J]. 北京理工大学学报, 2004, 24(5): 458-461.
HUANG Shu-ming, YANG Xin-lin, HUANG Jian, et al. Study on the HPLC fingerprint of triterpenoid from *Ganoderma lucidum*[J]. *Journal of Beijing Ligong University*, 2004, 24(5): 458-461. (in Chinese)
- [6] 邓文红, 黄书铭, 邹祥旺, 等. 灵芝及其制剂的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 352-355.
DENG Weng-hong, HUANG Shu-ming, ZOU Xiang-wang, et al. Study on the HPLC fingerprint of *Ganoderma lucidum* and its praeeparatum[J]. *Journal of Pharmaceutical analysis*, 2005, 25(3): 352-355. (in Chinese)
- [7] 马林, 吴丰, 陈若芸. 灵芝三萜成分分析[J]. 药学报, 2003, 38(1): 50-52.
MA Lin, WU Feng, CHEN Ruo-yun. Component analysis of triterpenoid from *Ganoderma lucidum*[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 38(1): 50-52. (in Chinese)
- [8] M Yang, X M Wang, S H Guan, et al. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography

- coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Mass Spectrum*, 2007,(18):927-939.
- [9] T Kikuchi, S Kanomi, S Kadota, et al. Constituent of the fungus *Ganoderma lucidum* Krast. 1. structures of *Ganoderic acid-C₂*, *acid-E*, *acid-I* and *acid-K*, *Lucidenic acid-F* and related compounds[J]. *Chem Pharm Bull*, 1986,(34): 3695-3712.
- [10] T Nishitoba, H Sato, S Sakamura. Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*[J]. *Phytochemistry*, 1987,(26): 1777-1784.
- [11] T Nishitoba, S Goto, H Sato, et al. Bitter triterpenoids from fungus *Ganoderma applanatum*[J]. *Phytochemistry* 1989, (28): 193-197.
- [12] B Boh, D Hodzar, D Dolnicar, et al. Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* origin[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2000,(38):11-18.
- [13] 李玉娟, 王瑞, 车镇涛, 等. 中药材指纹图谱质量控制方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 193-198.
LI Yu-juan, WANG Rui, CHE Zhen-tao, et al. Study on the quality control method of Chinese crude drug fingerprint[J]. *New Drugs of the Traditional Chinese Medicine and Pharmacological*, 2001, 12(3): 193-198. (in Chinese)
- [14] 王少军, 段启, 曹君, 等. 茯苓皮中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的方法学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 55-59.
WANG Shao-jun, DUAN Qi, CAO Jun, et al. Methodology study on the HPLC fingerprint of triterpenic acid from *Cortex sclerotii* Poriae[J]. *New Drugs of the Traditional Chinese Medicine and Pharmacological*, 2005, 16(1): 55-59. (in Chinese)
- [15] 王晃, 李梦龙, 覃洁萍, 等. 建立中药指纹图谱保证中药产品质量[J]. 成都中医药大学学报, 2002, 25(3): 45-51.
WANG Huang, LI Meng-long, TAN Jie-ping, et al. Establishment of fingerprint for guarantee of the product quality of traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Chengdu Chinese medical science University*, 2002, 25(3): 45-51. (in Chinese)
- [16] 任德全. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J]. 中药材, 2001, 24(4): 236-240.
REN De-quan. Purpose and effect of quality control technology of traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Crude Drug*, 2001, 24(4): 236-240. (in Chinese)
- [17] 侯小平, 何新新, 苏薇薇. 中药指纹图谱质量控制技术[J]. 中药材, 2001, 24(5): 370-377.
HOU Xiao-ping, HE Xin-xin, SU Wei-wei. Technology of quality control of traditional Chinese medicine fingerprint[J]. *Chinese Crude Drug*, 2001, 24(5): 370-377. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)