

# 赤芝中三萜酸 HPLC 特征图谱的研究\*

李保明, 刘超, 王洪庆, 陈若芸\*\*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

**摘要** 目的:建立赤芝 HPLC 特征图谱分析方法。方法:采用 Alltech C<sub>18</sub> (150 mm ×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈 - 0.04% 甲酸为流动相梯度洗脱 (0 ~ 10 min 时,乙腈 0 ~ 20%; 10 ~ 20 min 时,乙腈 20% ~ 25%; 20 ~ 50 min 时,乙腈 25% ~ 30%; 50 ~ 65 min 时,乙腈 30% ~ 38%),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 15 ℃。结果:分析了 13 个批次的赤芝子实体,并建立了三萜酸特征图谱,确定了 19 个共有峰,其中包括灵芝酸、灵芝酸 C<sub>2</sub>、赤芝酸 LM<sub>1</sub>、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、12 - 乙酰基 - 3 - 羟基 - 7, 11, 15, 23 - 四羧基 - 羊毛甾 - 8 - 烯 - 26 - 酸、灵芝酸 D、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C、灵芝酸 E、灵芝孢子酸 A 共 15 个已知化合物峰以及 4 个未知化合物峰,有 13 批赤芝样品特征图谱与对照特征图谱相似度均在 0.9 以上。结论:本方法简单、准确、重复性好,为赤芝的质量控制标准提供了有效的方法。

**关键词:**赤芝;高效液相色谱法;特征图谱

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254 - 1793 (2009)09 - 1514 - 04

## Study on HPLC specific chromatogram analysis of triterpenoid acids from *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.\*

LI Bao - ming, LIU Chao, WANG Hong - qing, CHEN Ruo - yun\*\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; the Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method of specific chromatogram analysis on *Ganoderma lucidum*. **Methods:** Chromatography conditions were Alltech Alltima C<sub>18</sub> (150 mm ×4.6 mm, 5 μm) column, acetonitrile - 0.04% formic acid system as mobile phase, gradient elution (0 - 10 min, acetonitrile 0 ~ 20%; 10 - 20 min, acetonitrile 20% ~ 25%; 20 - 50 min, acetonitrile 25% ~ 30%; 50 - 65 min, acetonitrile 30% ~ 38%); detective wavelength at 254 nm, column temperature was 15 ℃. **Results:** Nineteen common peaks were found in the HPLC specific chromatogram of *Ganoderma lucidum*, including fifteen known peaks: ganoderic acid, ganoderic acid C<sub>2</sub>, lucideric acid LM<sub>1</sub>, ganoderic acid G, ganoderenic acid B, ganoderic acid B, ganoderenic acid A, ganoderic acid A, 12 - acetoxy - 3 - hydroxy - 7, 11, 15, 23 - tetraoxolanost - 8 - en - 26 - oic acid, ganoderic acid D, lucideric acid A, ganoderenic acid D, ganoderic acid C, ganoderic acid E, ganosporeric acid A and four unknown peaks. Good similarities with correlation coefficients higher than 0.9 were found in specific chromatograms between the herbs from different sources and standard specific chromatogram, which can be utilized for the identification of *Ganoderma lucidum*. **Conclusion:** The method is simple, accurate, and can be used as a quality control method for *Ganoderma lucidum*.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; HPLC; specific chromatogram

灵芝 (*Gandema*) 为多孔菌科真菌, 别名赤芝, 是我国传统的药用真菌, 《神农本草经》将灵芝按五色分为青芝、丹芝、黄芝、白芝、黑芝五类, 即五芝。中国药典 2005 年版将赤芝 *Ganoderma lucidum*

(Leyss. ex Fr.) Karst. 和紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体作为法定中药材。灵芝现在已被人工栽培, 栽培品种大多为赤芝, 并广泛用于国内外制药和保健品市场。紫芝、硬孔灵芝

\* 科技部基础性工作专项 [2007FY130100]

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 83161622; E - mail: rych@imm. ac. cn

和松杉灵芝在东北和福建等地作为灵芝广泛使用。灵芝中含有三萜、多糖、甾体、生物碱、核苷、氨基酸、蛋白质等多种成分,其中三萜是灵芝中一类具有明显生物活性的化合物,现已分离得到近 160 多种<sup>[1]</sup>。本文采用高效液相色谱法分析并建立了赤芝中三萜酸的特征图谱分析方法,为控制灵芝质量提供参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 系统高效液相色谱仪(美国);紫外检测器(DAD);超声波清洗器(北京天鹏电子新技术有限公司);15 种对照品均由本实验室提供,经 IR、UV、NMR、MS 等光谱鉴定, HPLC 分析纯度为 98% 以上;赤芝(*G. lucidum*)药材来源见表 1,分别由中国医学科学院药物研究所马林副研究员、广东省微生物分析检测中心于舒宁工程师、中国科学院微生物研究所张小青研究员鉴定;乙腈(美国 Fisher 公司),水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

表 1 样品来源

Tab 1 The sources of the sample

样品编号 (sample No.)	样品名称 (sample name)	来源 (sources)
1	野生灵芝( <i>G. lucidum</i> )	西藏八一(Bayi, Xizang)
2	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	广东广州(Guangzhou, Guangdong)
3	原木灵芝( <i>G. lucidum</i> )	福建福州(Fuzhou, Fujian)
4	草栽灵芝( <i>G. lucidum</i> )	福建福州(Fuzhou, Fujian)
5	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	江苏启东(Qidong, Jiangsu)
6	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	山东泰安(Tai'an, Shandong)
7	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	广东韶关(Shaoguan, Guangdong)
8	聚宝灵芝( <i>G. lucidum</i> )	江苏南通(Nantong, Jiangsu)
9	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	北京(Beijing)
10	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	北京(Beijing)
11	段木灵芝( <i>G. lucidum</i> )	福建福州(Fuzhou, Fujian)
12	赤芝( <i>G. lucidum</i> )	山东泰山(Taishan, Shandong)
13	野生灵芝( <i>G. lucidum</i> )	西藏林芝(Linzhi, Xizang)

### 2 色谱条件

色谱柱: Alltech Alltima C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.04% 甲酸, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min 时, 乙腈 0 ~ 20%; 10 ~ 20 min 时, 乙腈 20% ~ 25%; 20 ~ 50 min 时, 乙腈 25% ~ 30%; 50 ~ 65 min 时, 乙腈 30% ~ 38%); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 254 nm; 柱温: 15 °C; 进样体积: 20 μL; 记录色谱时间为 80 min。

### 3 溶液制备

3.1 供试品溶液 取上述 1 ~ 13 号样品粉末 (过 2 号筛) 各 2 g, 精密称定, 分别精密加入氯仿 40 mL,

超声波提取 (300 W, 28 kHz) 20 min, 滤过, 滤液用饱和碳酸氢钠溶液萃取 2 次 (2 × 20 mL), 合并碳酸氢钠溶液, 用 6 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸调节至 pH 2, 再用氯仿萃取 2 次 (2 × 20 mL), 合并氯仿液, 用水洗 2 次 (2 × 20 mL), 弃去水层, 氯仿液浓缩至干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 即得。

3.2 对照品溶液 精密称取灵芝酸、灵芝酸 C<sub>2</sub>、赤芝酸 LM<sub>1</sub>、灵芝酸 G、灵芝烯酸 B、灵芝酸 B、灵芝烯酸 A、灵芝酸 A、12 - 乙酰基 - 3 - 羟基 - 7, 11, 15, 23 - 四羧基 - 羊毛甾 - 8 - 烯 - 26 - 酸、灵芝酸 D、赤芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 C、灵芝酸 E、赤芝孢子酸 A 各 1 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

### 4 方法学考察

4.1 对照试验 取对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。

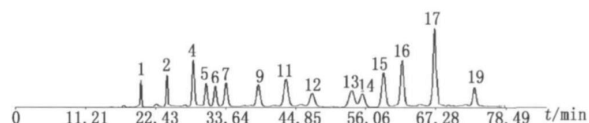


图 1 对照品的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference substances

- 灵芝酸 (ganoderic acid)
- 灵芝酸 C<sub>2</sub> (ganoderic acid C<sub>2</sub>)
- 赤芝酸 LM<sub>1</sub> (lucidric acid LM<sub>1</sub>)
- 灵芝酸 G (ganoderic acid G)
- 灵芝烯酸 B (ganoderenic acid B)
- 灵芝酸 B (ganoderic acid B)
- 灵芝烯酸 A (ganoderenic acid A)
- 灵芝酸 A (ganoderic acid A)
- 12 - 乙酰基 - 3 - 羟基 - 7, 11, 15, 23 - 四羧基 - 羊毛甾 - 8 - 烯 - 26 - 酸 (12 - acetoxy - 3 - hydroxy - 7, 11, 15, 23 - tetraoxolanost - 8 - en - 26 - oic acid)
- 灵芝酸 D (ganoderic acid D)
- 赤芝酸 A (lucidric acid A)
- 灵芝烯酸 D (ganoderenic acid D)
- 灵芝酸 C (ganoderic acid C)
- 灵芝酸 E (ganoderic acid E)
- 赤芝孢子酸 A (ganosporeric acid A)

4.2 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 在相同的条件下分别于 0, 5, 10, 20, 90 h 进样分析, 采用国家药典委员会指纹图谱评价软件计算出相似度均在 0.995 以上, 以灵芝酸 A 为参照物, 共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%。符合特征图谱要求。

4.3 精密度试验 取同一批供试品溶液, 在相同的条件下连续进样 6 次, 计算出相似度均在 0.998 以上, 以灵芝酸 A 为参照物, 共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%。符合特征图谱要求。

4.4 重复性试验 取同一批样品,在相同的条件下分别称取 5份,按照“3.1 项下方法制备供试品溶液,按“2 项下色谱条件进样,记录结果,计算出相似度均在 0.980 以上,以灵芝酸 A 为参照物,共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 值均小于 3.0%。符合特征图谱要求。

5 特征图谱的建立

精密吸取按“3.1 项下方法制备的供试品溶液 20 μL,进样,以灵芝酸 A 峰(11号峰)为参照标示出赤芝的 HPLC 特征图谱中各共有峰作为可以构成特征图谱稳定的特征峰。将得到的色谱图数据导入国家药典委员会指纹图谱评价系统,1号、5号、8号峰作为 marker 峰,进行色谱峰匹配,结果见图 2。共

有峰的相对保留时间列于表 2;共有峰的相对峰面积列于表 3;13批赤芝(*G. lucidum*)药材与对照特征图谱相似度计算结果分别为:0.909,0.943,0.930,0.918,0.956,0.908,0.948,0.927,0.943,0.918,0.904,0.930,0.773。

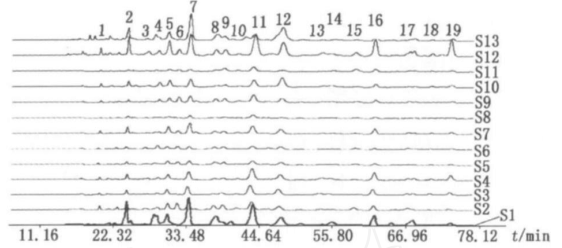


图 2 高效液相色谱特征图谱

Fig 2 HPLC specific chromatogram of samples

表 2 赤芝特征图谱相对保留时间比较

Tab 2 Comparison of relative retention time of common peaks in HPLC specific chromatogram of Ganoderma lucidum

样号 (No.)	峰号 (peak No.)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.464	0.561	0.626	0.668	0.704	0.738	0.778	0.867	0.898	0.947	1.000	1.096	1.241	1.272	1.357	1.426	1.546	1.620	1.689
2	0.466	0.562	0.635	0.671	0.706	0.740	0.779	0.870	0.900	0.952	1.000	1.099	1.244	1.276	1.363	1.431	1.573	1.632	1.702
3	0.464	0.560	0.632	0.669	0.704	0.739	0.778	0.868	0.899	0.949	1.000	1.098	1.243	1.274	1.359	1.427	1.543	1.625	1.693
4	0.457	0.558	0.624	0.667	0.702	0.738	0.778	0.868	0.899	0.947	1.000	1.098	1.243	1.276	1.358	1.426	1.544	1.623	1.692
5	0.458	0.556	0.624	0.666	0.700	0.738	0.778	0.867	0.898	0.949	1.000	1.098	1.243	1.276	1.359	1.427	1.542	1.622	1.694
6	0.464	0.560	0.633	0.670	0.704	0.739	0.778	0.868	0.899	0.947	1.000	1.098	1.243	1.279	1.358	1.426	1.545	1.625	1.694
7	0.464	0.560	0.625	0.669	0.704	0.739	0.779	0.869	0.899	0.948	1.000	1.099	1.243	1.279	1.359	1.427	1.542	1.625	1.695
8	0.462	0.560	0.627	0.670	0.704	0.739	0.778	0.868	0.899	0.949	1.000	1.099	1.244	1.273	1.359	1.426	1.543	1.624	1.694
9	0.464	0.560	0.632	0.670	0.705	0.739	0.778	0.869	0.899	0.950	1.000	1.098	1.242	1.269	1.357	1.425	1.541	1.620	1.689
10	0.464	0.560	0.625	0.658	0.705	0.739	0.778	0.869	0.899	0.947	1.000	1.101	1.243	1.281	1.359	1.426	1.541	1.623	1.692
11	0.460	0.558	0.628	0.666	0.699	0.734	0.774	0.864	0.896	0.947	1.000	1.096	1.234	1.263	1.349	1.416	1.537	1.614	1.678
12	0.461	0.557	0.624	0.654	0.701	0.739	0.776	0.871	0.896	0.972	1.000	1.098	1.240	1.280	1.354	1.422	1.543	1.621	1.689
13	0.460	0.557	0.630	0.654	0.700	0.735	0.775	0.871	0.896	0.975	1.000	1.099	1.240	1.278	1.352	1.422	1.557	1.622	1.687
RSD /%	0.59	0.32	0.62	0.92	0.32	0.23	0.19	0.32	0.15	1.0	0.0	0.12	0.22	0.39	0.27	0.25	0.60	0.25	0.33

表 3 赤芝特征图谱相对峰面积比较

Tab 3 Comparison of relative retention area of common peaks in HPLC specific chromatogram of Ganoderma lucidum

样号 (No.)	峰号 (peak No.)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.157	0.433	0.150	0.250	0.551	0.554	0.721	0.487	0.553	0.324	1.00	0.601	0.151	0.135	0.274	0.450	0.297	0.042	0.085
2	0.056	0.205	0.036	0.106	0.330	0.043	0.688	0.120	0.194	0.119	1.00	0.874	0.264	0.168	0.053	0.546	0.148	0.141	0.224
3	0.061	0.218	0.648	0.112	0.308	0.047	0.581	0.112	0.140	0.110	1.00	0.710	0.278	0.198	0.038	0.582	0.119	0.081	0.313
4	0.142	0.365	0.153	0.132	0.723	0.560	0.816	0.799	0.567	0.312	1.00	0.865	0.190	0.186	0.209	0.390	0.238	0.081	0.075
5	0.116	0.497	0.371	0.816	0.614	0.724	0.732	0.711	0.793	0.222	1.00	1.212	0.115	0.220	0.298	0.406	0.373	0.202	0.331
6	0.117	0.360	0.092	0.114	0.607	0.292	1.05	0.367	0.281	0.216	1.00	0.833	0.160	0.127	0.069	0.561	0.167	0.099	0.162
7	0.030	0.293	0.031	0.075	0.307	0.156	0.639	0.273	0.321	0.075	1.00	0.441	0.069	0.102	0.114	0.416	0.131	0.097	0.184
8	0.072	0.145	0.118	0.244	0.385	0.538	0.654	0.437	0.447	0.278	1.00	0.704	0.188	0.218	0.116	0.303	0.143	0.043	0.085
9	0.144	0.403	0.150	0.410	0.644	0.117	0.892	0.217	0.312	0.136	1.00	1.88	0.275	0.344	0.056	0.390	0.102	0.085	0.188
10	0.066	0.133	0.107	0.163	0.293	0.276	0.368	0.346	0.799	0.236	1.00	0.627	0.157	0.270	0.517	0.535	0.187	0.110	0.268
11	0.118	0.372	0.173	0.177	0.471	0.258	0.797	0.258	0.252	0.076	1.00	0.730	0.248	0.168	0.147	0.677	0.220	0.155	0.577
12	0.055	1.21	0.190	0.603	1.22	0.171	3.66	1.37	0.683	0.615	1.00	3.92	0.112	0.323	0.103	0.654	0.152	0.112	0.222
13	0.055	0.611	0.328	0.076	0.466	0.067	1.05	0.626	0.145	0.218	1.00	0.627	0.135	0.261	0.096	0.381	0.255	0.019	0.082

## 6 讨论

**6.1 流动相及检测波长的选择** 本文所用流动相是在参考文献 [2, 3] 的基础上经过多次优化确定的。在实验过程中,采用二极管阵列检测器对图谱进行了全波长扫描,筛选出 254 nm 作为检测波长。

**6.2 样品处理方法的选择** 本试验曾采用水、甲醇、乙醇、氯仿、甲醇-氯仿不同比例作为提取溶剂,分别采用热回流和超声波提取。结果表明用水为溶剂回流提取,杂质多,干扰大;用氯仿提取效果最好,热回流和超声波提取 2 种方法结果基本一致,故采用超声波法;同时考察不同提取时间及提取溶剂用量,最后确定样品处理方法为:取样 2 g,加氯仿 40 mL 超声 20 min,滤过,提取液经过碱化和酸化后得到三萜酸。

**6.3 小结** 本试验测定了野生和栽培的赤芝 (*G. lucidum*) 的特征图谱,赤芝(栽培)的特征图谱相似度大于 0.92,2 个赤芝(野生)分别为 0.909 和 0.773,其中灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C 和灵芝酸 G 含量较高。另外,曾对紫芝 (*G. sinense*)、硬孔灵芝 (*G. duropora*)、鹿角灵芝 (*G. amboinense*)、松杉灵芝 (*G. tsugae*) 等样品进行测定,结果显示:紫芝和硬孔

灵芝在本实验条件下,没有色谱峰出现;而 2 个鹿角灵芝与赤芝的共有峰相比较,其相似度分别为 0.840 和 0.942,松杉灵芝则为 0.856。从赤芝的特征图谱和相似度结果看出,它们的共有峰均为 19 个,相似度虽有差异,但所含成分基本一致。在灵芝分类学上,赤芝和松杉灵芝同为灵芝属灵芝组真菌,而紫芝和硬孔灵芝则属于紫芝组,从三萜化合物存在的情况看,二者也有明显的区别,也为灵芝的化学分类提供了参考。

## 参考文献

- 1 LN Zhi-bin (林志彬). Modern Research of *Ganoderma* (灵芝的现代研究). 3rd Ed (第三版). Beijing (北京): Peking University Medical Press (北京大学医学出版社), 2007. 149
- 2 MA Lin (马林), WU Feng (吴丰), CHEN Ruo-yun (陈若芸). Analysis of triterpene constituents from *Ganoderma lucidum* (灵芝三萜成分分析). *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38 (1): 50
- 3 LI Bao-ming (李保明), LIU Chao (刘超), WANG Hong-qing (王洪庆), et al Study on detection method of the total triterpene acid in *Ganoderma* (灵芝总三萜酸含量测定方法的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32 (12): 1234

(本文于 2009 年 7 月 17 日修改回)

## 李云龙所长会见泰国食品药品监督管理局局长一行

2009 年 8 月 24 日上午,中国药品生物制品检定所所长李云龙及常务副所长金少鸿会见了泰国食品药品监督管理局局长皮帕特·英瑟里先生一行 13 人。国家食品药品监督管理局国际合作司处长丁建华参加了此次会见。双方就中检所的职能、近红外 (NIR) 技术和 "药品检测车" 的工作方式等问题进行了会谈。金少鸿特别就泰方感兴趣的 "药品检测车" 的相关技术进行了介绍。会谈之后,泰方代表团一行参观了具有自主知识产权的 "药品检测车", 详细了解了 "药品检测车" 的技术装备和近红外检测方法,并与相关技术人员进行了交流。

详见: [www.nicbp.org.cn](http://www.nicbp.org.cn)