doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.18.019

灵芝超微粉高效液相色谱特征指纹图谱研究*

吴长辉

（药用菌栽培与深加工国家地方联合工程研发中心·福建仙芝楼生物科技有限公司，福建 福州 350001）

摘要：目的 建立灵芝超微粉的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱。**方法** 采用 HPLC 法，色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇 - 乙腈 - 0.04% 甲酸水溶液（梯度洗脱），流速为 1.0 mL / min，检测波长为 254 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 20 μL。以灵芝酸 A 峰为参照，建立 11 批样品的 HPLC 图谱，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）进行相似度评价，确定共有峰。**结果** 11 批样品的 HPLC 图谱有 11 个共有峰，相似度均大于 0.87；经验证，11 批样品 HPLC 图谱与对照指纹图谱的一致性较好。**结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱可为灵芝超微粉的真伪鉴别和质量评价提供参考。

关键词：灵芝超微粉；高效液相色谱法；指纹图谱；质量评价

中图分类号：R917；R284　　文献标志码：A　　文章编号：1006 - 4931（2022）18 - 0079 - 04

HPLC Characteristic Fingerprint of *Ganoderma Lucidum* Ultrafine Powder

WU Changhui

（National & Local Joint Engineering Research Center for Cultivation and Further Processing of Medicinal Fungi · Fujian Xianzhilou Biological Science and Technology Co., Ltd., Fuzhou, Fujian, China 350001）

Abstract: Objective To establish high - performance liquid chromatography (HPLC) characteristic fingerprints of *Ganoderma lucidum* ultrafine powder. **Methods** HPLC method was adopted, the chromatographic column was Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - acetonitrile - 0.04% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 20 μL. The HPLC characteristic fingerprints of 11 batches of samples were established with ganoderic acid A peak as the reference. The Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012.130723) was used to evaluate the similarity and determine the common peak. **Results** There were 11 common peaks in the HPLC characteristic fingerprints of 11 batches of samples, and the similarity was higher than 0.87. After verification, the HPLC characteristic fingerprints of 11 batches of samples were in good agreement with the control fingerprints. **Conclusion** The established HPLC fingerprints can provide a reference for the identification and quality evaluation of *Ganoderma lucidum* ultrafine powder.

Key words: *Ganoderma lucidum* ultrafine powder; HPLC; fingerprint; quality evaluation

灵芝为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum*（Leyss. ex Fr.）Karst. 或紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao. Xu et Zhang 的干燥子实体[1]。药理学研究表明，灵芝具有调节免疫、保肝、抗肿瘤、抗衰老、提高机体耐缺氧能力等活性[2]。灵芝传统用法为切厚片[3]，以水煎煮后服用，由于其纤维性强，水溶性浸出物仅约4%，有效成分利用率低。为提高灵芝的利用率，可将其制成300目的超微粉[4]，但灵芝经超微粉碎后，原有性状被破坏，建立有效的鉴别方法尤其重要。中药特征图谱为多指标质量控制模式，可较全面地反映化学成分的种类和数量，从而较全面、综合地体现中药质量[5]，其中以高效液相色谱（HPLC）法应用较广[6]。灵芝含丰富的三萜类成分，特征较明显[7-8]。故本研究中建立了灵芝超微粉的HPLC特征指纹图谱，以为其质量控制提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

R205 型旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司）；UV2450 型紫外 - 可见分光光度计、LC20A 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；TDL - 40B 型离心机（上海安亭科学仪器有限公司）；XS05 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为十万分之一）；SK1200 型超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）。

1.2　试药

灵芝超微粉（福建仙芝楼生物科技有限公司，批号见表1）；灵芝酸 A 对照品（中国食品药品检定研究院，批号为 F6MX - ZHS2，含量 ≥ 95.0%）；灵芝酸 C_2 对照品（批号为 160305，含量 ≥ 98.0%）、灵芝酸 F 对照品（批号为 160308，含量 ≥ 98.0%），均购自中国医学科学院药物研究所；乙腈、甲醇均为色谱纯，乙酸乙酯、甲酸均为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）- 乙腈（B）- 0.04% 甲

* **基金项目：**福建省科技计划项目［2020N3002］。

第一作者：吴长辉，男，硕士，副主任药师，高级工程师，研究方向为灵芝等食药用菌研发，（电子信箱）87974413@qq.com。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	编号	批号
S1	DB121006	S7	DB121031
S2	GC－L1－131114	S8	GL－L4－130718
S3	FYS121019	S9	GL－L2－131102
S4	DB131104	S10	GL－L2－131116
S5	SW－L1－131102	S11	GC－L6－130920
S6	DB121201－1		

表2 流动相梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution procedure of mobile phase

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)	时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	0	28	72	40	42	23	35
6	0	28	72	50	10	25	65
16	17	28	55	50.01	0	28	72
25	22	23	55	60	0	28	72

酸水溶液(C),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

取灵芝酸A,C_2,F对照品各5 mg,精密称定,分别加甲醇溶解并定容至10 mL;分别取1 mL,置10 mL容量瓶中,加用甲醇定容,摇匀,即得对照品溶液。取样品约1 g,精密称定,加乙酸乙酯50 mL,超声(功率50 W,频率53 Hz)提取30 min,滤过、蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至10 mL,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(编号为S11)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以灵芝酸A峰为参照峰,计算主成分峰的相对保留时间及相对峰面积。结果主成分峰相对保留时间的*RSD*均小于0.4%,相对峰面积的*RSD*均小于3.0%($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液(编号为S11)适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以灵芝酸A峰为参照峰,计算主成分峰的相对保留时间及相对峰面积。结果主成分峰相对保留时间的*RSD*均小于0.1%,主成分峰相对峰面积的*RSD*均小于3.0%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号为S11)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定。以灵芝酸A峰为参照峰,计算主成分峰的相对保留时间及相对峰面积。结果主成分峰相对保留时间的*RSD*均小于0.3%,主成分峰相对峰面积的*RSD*均小于3.0%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与相似度评价

指纹图谱建立:取11批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,将11批样品的HPLC数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版),得11批样品的HPLC叠加指纹图谱(图1),设S1样品图谱为参照,其他样品色谱峰与参照图谱进行自动匹配,即得样品共有模式的对照指纹图谱(图2),结果共确定11个共有峰。通过与对照品图谱(图3)的比对,确认2号峰为灵芝酸C_2,6号峰为灵芝酸A,9号峰为灵芝酸F。共有峰的相对保留时间及相对峰面积见表3、表4。

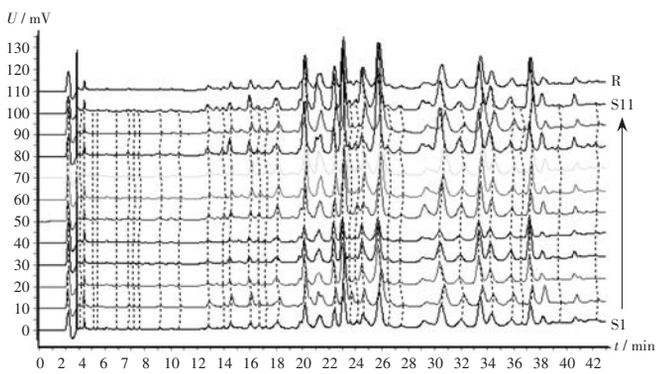


图1 11批样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprinst of 11 batches of samples

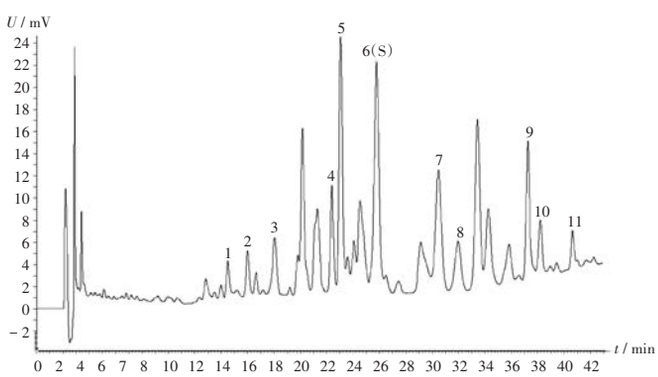
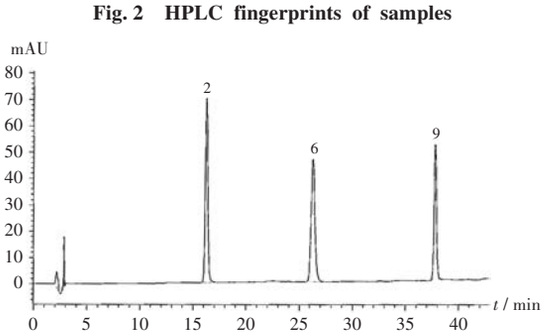


图2 样品高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of samples



2. 灵芝酸C_2 6. 灵芝酸A 9. 灵芝酸F

图3 对照品高效液相色谱图

2. Ganoderic acid C_2 6. Ganoderic acid A 9. Ganoderic acid F

Fig. 3 HPLC chromatograms of reference substances

表 3 11 批样品高效液相色谱图共有峰相对保留时间

Tab. 3 Relative retention time of HPLC common peaks of 11 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	*RSD*(%)
1	0.564	0.563	0.563	0.563	0.563	0.562	0.562	0.562	0.563	0.563	0.562	0.11
2	0.622	0.621	0.620	0.620	0.646	0.620	0.620	0.620	0.620	0.621	0.620	1.22
3	0.700	0.699	0.698	0.703	0.700	0.703	0.703	0.702	0.700	0.699	0.699	0.25
4	0.867	0.868	0.866	0.866	0.869	0.869	0.869	0.869	0.869	0.868	0.866	0.13
5	0.894	0.895	0.893	0.893	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.893	0.10
6(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
7	1.182	1.183	1.184	1.184	1.182	1.183	1.182	1.183	1.182	1.183	1.184	0.07
8	1.237	1.239	1.242	1.241	1.241	1.242	1.241	1.242	1.241	1.241	1.240	0.11
9	1.439	1.443	1.442	1.441	1.447	1.447	1.447	1.447	1.447	1.444	1.440	0.22
10	1.476	1.480	1.479	1.478	1.484	1.484	1.484	1.484	1.484	1.481	1.477	0.22
11	1.569	1.575	1.572	1.571	1.579	1.579	1.580	1.580	1.579	1.576	1.570	0.27

表 4 11 批样品高效液相色谱图共有峰的相对峰面积

Tab. 4 Relative peak areas of HPLC common peaks of 11 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	*RSD*(%)
1	0.076	0.092	0.095	0.197	0.059	0.076	0.066	0.117	0.088	0.107	0.062	41.13
2	0.117	0.082	0.137	0.203	0.048	0.095	0.109	0.092	0.149	0.091	0.127	35.86
3	0.210	0.226	0.171	0.207	0.188	0.158	0.216	0.120	0.204	0.157	0.204	17.16
4	0.308	0.250	0.258	0.296	0.374	0.397	0.545	0.206	0.369	0.323	0.480	29.23
5	0.593	1.054	0.873	0.968	0.754	0.717	0.728	0.765	0.723	0.826	0.782	16.00
6(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
7	0.548	0.846	0.684	0.633	0.649	0.604	0.537	0.651	0.573	0.741	0.609	13.97
8	0.217	0.347	0.208	0.303	0.190	0.216	0.234	0.224	0.164	0.238	0.239	21.58
9	0.504	0.379	0.344	0.349	0.497	0.731	0.683	0.345	0.554	0.402	0.754	31.32
10	0.125	0.181	0.194	0.399	0.121	0.164	0.152	0.257	0.132	0.156	0.143	44.15
11	0.112	0.105	0.103	0.154	0.102	0.113	0.126	0.194	0.106	0.091	0.130	24.32

相似度评价：以共有模式为对照图谱，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版本）软件计算 11 批样品的相似度。结果相似度均大于 0.94，详见表 5。

表 5 11 批样品相似度评价结果

Tab. 5 Similarity evaluation results of 11 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
S1	1.000	0.924	0.953	0.940	0.913	0.983	0.962	0.918	0.959	0.953	0.917	0.979
S2	0.924	1.000	0.933	0.906	0.889	0.910	0.914	0.958	0.921	0.912	0.899	0.955
S3	0.953	0.933	1.000	0.986	0.963	0.928	0.936	0.968	0.945	0.932	0.973	0.987
S4	0.940	0.906	0.986	1.000	0.964	0.908	0.932	0.941	0.931	0.940	0.974	0.978
S5	0.913	0.889	0.963	0.964	1.000	0.871	0.906	0.908	0.869	0.913	0.938	0.946
S6	0.983	0.910	0.928	0.908	0.871	1.000	0.921	0.902	0.954	0.913	0.899	0.960
S7	0.962	0.914	0.936	0.932	0.906	0.921	1.000	0.904	0.918	0.982	0.912	0.965
S8	0.918	0.958	0.968	0.941	0.908	0.902	0.904	1.000	0.931	0.895	0.945	0.967
S9	0.959	0.921	0.945	0.931	0.869	0.954	0.918	0.931	1.000	0.895	0.932	0.970
S10	0.953	0.912	0.932	0.940	0.913	0.913	0.982	0.895	0.895	1.000	0.904	0.959
S11	0.917	0.899	0.973	0.974	0.938	0.899	0.912	0.945	0.932	0.904	1.000	0.969
R	0.979	0.955	0.987	0.978	0.946	0.960	0.965	0.967	0.970	0.959	0.969	1.000

3 讨论

预试验中比较了甲醇、乙醇和乙酸乙酯做提取溶剂时对结果的影响。结果采用前两种溶剂提取时，供试品溶液色谱图中前 15 min 的杂峰较多，而用乙酸乙酯提取的效果较好。因柱温对分离效果影响较大[9-11]，预试验中对 35 ℃和 40 ℃柱温进行了对比研究，采用 35 ℃时，色谱图中 25～40 min 之间的色谱峰分离较差，而 40 ℃时，各个色谱峰分离效果相对较好。对供试品溶液进行 190～800 nm 全波长扫描[12-13]，多数成分在 254 nm 波长处有较大吸收，主要色谱峰分离较好，且基线平稳。

灵芝三萜酸类物质的检测分析，流动相主要为甲醇、乙腈、甲酸水溶液等[4,14-15]，预试验中考察了甲醇－0.04% 甲酸水溶液、乙腈－0.04% 甲酸水溶液、甲醇－乙腈－0.04% 甲酸水溶液作为流动相，分别按不同的洗脱程序进行洗脱。结果甲醇－乙腈－0.04% 甲酸水溶液三元梯度洗脱的效果较好。

本研究中收集了 11 个批次的灵芝超微粉，采用 HPLC 法进行了特征指纹图谱研究。由色谱图可见，各批次样品的色谱图整体具有一定的相似性，主成分峰特征基本一致，相对保留时间的 *RSD* 值均小于 2.0%。由相对峰面积计算结果可见，部分色谱峰的相对峰面积差异较大，表明所含成分含量差异较大。

综上所述，本研究中所建 HPLC 指纹图谱可为灵芝超微粉的真伪鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：195－196.
[2] 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.
[3] 福建省食品药品监督管理局. 福建省中药饮片炮制规范[M]. 福州：福建科学技术出版社，2013：108－109.
[4] 吴长辉. 超微粉碎对灵芝多糖、三萜的影响[J]. 中国执业药师，2015，12(8)：18－23.
[5] 秦红霖，李永申. 特征图谱技术在中药质量分析中的应用[J]. 中国实用医药，2014，9(7)：253－254.
[6] 吕东方. 中药特征图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. 临床医药文献电子杂志，2018，5(99)：198.
[7] 魏晓霞，李 鹏，孙 红，等. 灵芝三萜酸组分高效液相色谱指纹图谱初探[J]. 中国执业药师，2014，11(4)：20－24.
[8] 赵如诗，姜慧洁，张晓静，等. 灵芝三萜的高效液相色谱及薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志，2017，32(11)：5167－5170.
[9] 卢端萍，陈 硕，王 勇，等. HPLC 测定赤芝水提取物中灵芝酸 A 含量[J]. 中国现代中药，2013，15(6)：496－498.
[10] 周丹英，胡云莉，夏正燕，等. 一测多评法定量分析灵芝及灵芝孢子粉中单体三萜成分的应用[J]. 亚太传统医药，