

灵芝孢子油指纹图谱研究及其混淆品鉴别

赵维良¹, 程夏倩², 严爱娟³, 黄琴伟¹, 徐靖⁴, 张文婷^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江省儿童医院, 杭州 310052; 3.浙江中医药大学, 杭州 310053; 4.浙江省珍稀植物药工程技术研究中心, 浙江 武义 321200)

摘要: 目的 建立灵芝孢子油 HPLC 指纹图谱并鉴别其油类混淆品。方法 采用 HPLC, 色谱柱为 ACCHROM Unitary-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-异丙醇(51 : 49), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 以蒸发光散射检测。结果 建立了灵芝孢子油脂肪酸酯类成分 HPLC 指纹图谱, 确定了 8 个共有峰, 分别为三亚油酸甘油酯、1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,2-二亚油酸-3-棕榈酸甘油酯、1,2-二油酸-3-亚油酸甘油酯、1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯、1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯。灵芝孢子油混淆品的图谱与灵芝孢子油指纹图谱有明显区别。结论 建立的灵芝孢子油脂肪酸酯类成分指纹图谱能很好地区别灵芝孢子油和其混淆品。

关键词: 灵芝孢子油; 灵芝孢子油混淆品; 三油酸甘油酯; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-1011-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.017

引用本文: 赵维良, 程夏倩, 严爱娟, 等. 灵芝孢子油指纹图谱研究及其混淆品鉴别[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 1011-1014.

Studies on Fingerprint of Oil of *Ganoderma Lucidum* Spore and Identification for It's Confusion

ZHAO Weiliang¹, CHENG Xiaqian², YAN Aijuan³, HUANG Qinwei¹, XU Jing⁴, ZHANG Wenting^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China; 3.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 4.Zhejiang Province Rare Plant Medicine Engineering Technology Research Center, Wuyi 321200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a specific HPLC fingerprint of the oil of *Ganoderma lucidum* spore and apply for identifying for its confusion. **METHODS** The HPLC chromatography was performed on an ACCHROM Unitary-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-isopropanol(51 : 49). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ at 30 °C with the detection of ELSD. **RESULTS** The chromatographic fingerprint of aliphatic esters of oil of *Ganoderma lucidum* spore was established. The fingerprint contained 8 recognizable peaks of trilinolein, 1,2-linolein-3-olein, 1,2-linolein-3-palmitin, 1,2-olein-3-linolein, 1-palmitin-2-olein-3-linolein, triolein, 1,2-olein-3-palmitin and 1,2-olein-3-stearin. The fingerprint of oil of *Ganoderma lucidum* spore was different from its confusion obviously. **CONCLUSION** The established fingerprint can distinguish oil of *Ganoderma lucidum* spore from its confusion.

KEY WORDS: oil of *Ganoderma lucidum* spore; confusion of oil of *Ganoderma lucidum* spore; trilinolein; fingerprint; HPLC

灵芝孢子粉为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Franch.) Karst. 或紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥成熟孢子, 商品以赤芝孢子为主。灵芝孢子粉具补气安神、健脾益肺作用, 用于调节免疫、抗肿瘤、调节血脂、降低血糖、调节神经系统及心血管系统等^[1-5], 其质量控制的方法多有研究^[6-8]。灵芝孢子油是从破壁灵芝孢子中用超临界方法提取的脂肪油, 具有抗肿瘤、提高免疫、保肝护肝、抗氧化、抗衰老及治疗神经疾病等活性^[9-10], 一般认为灵芝孢子油的活性与其含有的不饱和脂肪酸特别

是油酸、亚油酸有密切的关系, 为灵芝孢子油重要有效成分, 且从孢子粉提得孢子油后体积减少, 有利于隔绝空气保存以防止氧化酸败, 故商品有将灵芝孢子粉提取油后制成的制剂。灵芝孢子粉提取脂肪酸酯油后失去了孢子粉形态鉴定的依据, 故市场见有其他植物油仿冒灵芝孢子油者。灵芝孢子油已有指纹图谱的研究^[11], 但仅指认 1 个成分, 更未见其用于混淆品鉴别的研究。为更好控制质量, 本实验特研究孢子油指纹图谱, 并指认了其中的 8 个主要特征成分峰, 得到了区别其混淆品的专属性方法。

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划(2014003)

作者简介: 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师 Tel: (0571)86452373
主任中药师 Tel: (0571)87180337 E-mail: leozhwt@163.com

E-mail: zwl@zjyj.org.cn *通信作者: 张文婷, 女, 博士, 主

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent, 配备 G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1329A 自动进样仪、G1316A 柱温箱, Chemstation 色谱工作站); AG285 电子天平(METTLER TOLEDO 公司); Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech 公司); KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈(MERCK 公司, 色谱纯); 异丙醇(MERCK 公司, 色谱纯); 重蒸水(自制)。

1.3 对照品和样品

对照品: 三亚油酸甘油酯(trilinolein, 批号: 33-1820)、1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯(1,2-linolein-3-olein, 批号: 34-1866)、1,2-二亚油酸-3-棕榈酸甘油酯(1,2-linolein-3-palmitin, 批号: 34-1862)、1,2-二油酸-3-亚油酸甘油酯(1,2-olein-3-linolein, 批号: 34-1827)、1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯(1-palmitin-2-olein-3-linolein, 批号: 34-3012)、三油酸甘油酯(triolein, 批号: 33-1810)、1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯(1,2-olein-3-palmitin, 批号: 34-1821)、1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯(1,2-olein-3-stearin, 批号: 34-1822), 纯度均>95.0%, 购自 LarodanAB 公司。

样品: 灵芝孢子油样品 12 批均由金华寿仙谷药业有限公司提供, 样品 1~10 均来源于赤芝, 批号分别为 SXG170418-1、SXG170418-2、SXG170418-3、SXG170418-4、SXG170418-5、SXG170418-6、SXG170418-7、SXG121028、SXG121029 和 SXG121030, 样品 11~12 均来源于紫芝, 批号分别为 Z160925-1 和 Z160925-2, 混淆品 13~22 均购于市场, 分别为薏苡仁油、鸦胆子油、山茶油、米糠油、花生油、葵花籽油、芝麻油、大豆油、菜籽油和橄榄油。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱: ACCHROM Unitary-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-异丙醇(51:49)等度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度 105 °C, 雾化氮气流速 2.0 L·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 取三油酸甘油酯对照品适量, 精密称定, 加流动相乙腈-异丙醇(51:49)混合溶液, 制成浓度为 335.8 μg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取孢子油 0.15 g, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈-异丙醇(51:49)溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 方法学验证

2.2.1 精密度 精密称取灵芝孢子油 1 份, 按“2.1”项下方法制备并进样测定 6 次, 记录色谱图, 并按国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版对其相似度进行评价, 以 Mark 峰模式进行相似度计算, 结果 6 次测定结果的相似度均为 1.000, 表明本法精密度良好。

2.2.2 重复性 精密称取灵芝孢子油 6 份, 按“2.1”项下方法制备并进样测定 6 次, 记录色谱图, 并按国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版对其相似度进行评价, 以 Mark 峰模式进行相似度计算, 结果 6 次测定结果的相似度均为 1.000, 表明本法重复性良好。

2.2.3 稳定性 制备灵芝孢子油供试品溶液 1 份, 按“2.1”项下方法分别在 0, 1, 10, 20, 33 h 时注入液相色谱仪, 记录色谱图, 并按国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版对其相似度进行评价, 与生成的对照色谱图比较, 结果 33 h 内的相似度均为 1.000, 表明供试品溶液在 33 h 内稳定。

2.3 结果

2.3.1 对照指纹图谱的建立和色谱峰的指认 按“2.1”项下方法制备 12 批灵芝孢子油样品的供试品溶液并进样, 测定由武义寿仙谷中药饮片有限公司提供的孢子油, 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版评价建立对照指纹图谱, 并与对照品保留时间比较, 对其中的 8 个色谱峰进行了指认, 见图 1。

2.3.2 样品测定 取样品 12 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液并进样测定, 记录色谱图, 运用上述生成的灵芝孢子油对照指纹图谱作对照, 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版, 以甘油三油酸酯峰为参照峰, 对 12 批样品进行指纹图谱相似度的测定, 12 批样品的相似度分别为 0.974, 0.999, 0.999, 0.995, 0.997, 0.998, 0.993, 1.000, 1.000, 1.000, 0.979, 0.959, 色谱结果见图 2。

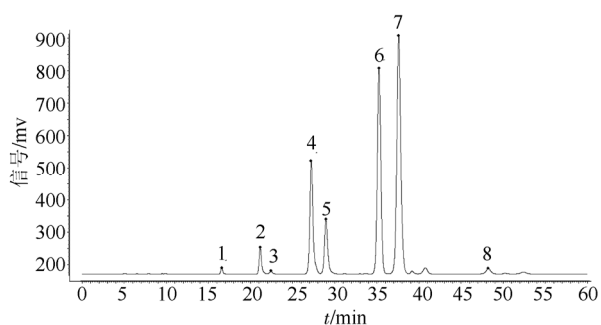


图1 灵芝孢子油对照指纹图谱

1-三亚油酸甘油酯; 2-1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯; 3-1,2-二亚油酸-3-棕榈酸甘油酯; 4-1,2-二油酸-3-亚油酸甘油酯; 5-1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯; 6-三油酸甘油酯; 7-1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯; 8-1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯。

Fig. 1 The fingerprint of oil of *Ganoderma lucidum* spore
1-trilinolein; 2-1,2-linolein-3-olein; 3-1,2-linolein-3-palmitin;
4-1,2-olein-3-linolein; 5-1-palmitin-2-olein-3-linolein; 6-triolein;
7-1,2-olein-3-palmitin; 8-1,2-olein-3-stearin.

2.3.3 混淆品的鉴别 对市场常见的灵芝孢子粉混淆品的多个品种植物提取油,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行HPLC-ELSD色谱检测,各图谱见图3,与灵芝孢子油指纹图谱可以明显区别。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 色谱柱的选择 实验考察了Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil -C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ACCHROM Unitary- C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种色谱柱,结果以ACCHROM Unitary-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)

色谱柱分离效果最佳,峰形良好,故选择该色谱柱。

3.1.2 流动相的选择 经比较乙腈-二氯甲烷溶液、甲醇-异丙醇溶液、乙腈-异丙醇溶液为流动相及不同洗脱条件,考察被测组分与杂质峰的分离情况,结果以乙腈-异丙醇(51:49)恒比例洗脱的色谱峰峰形较好,各色谱峰的分离理想。故以此为最终流动相。

3.1.3 检测器的选择 曾采用紫外检测器(用205 nm作为检测波长)与蒸发光散射检测器串联进行检测,结果紫外检测器所测得的信号响应值太小,基线噪音大、峰形拖尾严重,而蒸发光散射检测器所得信号较理想,故选择蒸发光散射检测器。

3.2 对照品与参照峰的选择

灵芝孢子油成分中,中国食品药品检定研究院等单位能提供并且纯度较高者,当属三油酸甘油酯,因其含量相对较高,对于不同实验室、不同仪器、不同实验环境等造成的保留时间差异可以得到有效的修正,故选择三油酸甘油酯作为灵芝孢子油指纹图谱的对照品,所得色谱峰作为参照峰。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

本样品为油脂类成分,通过试验,直接加溶剂溶解稀释就可以很好地检测孢子油中的成分,因此采用直接稀释法制备供试品溶液。但一般溶剂较难完全溶解,经试验,采用流动相乙腈-异丙醇(51:49)混合溶液对样品的溶解性较好,故以此为稀释溶剂。

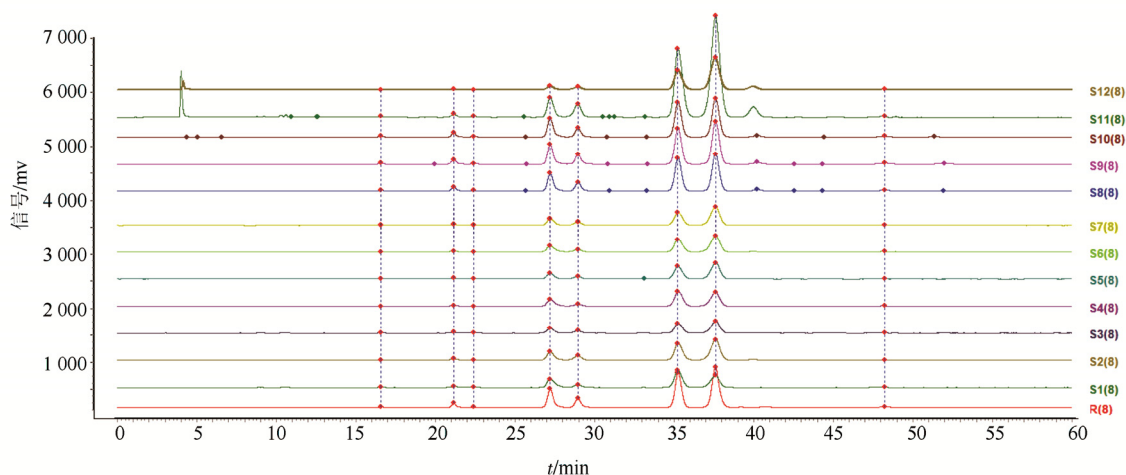


图2 灵芝孢子油相似度测定结果

R-对照指纹图谱; S1-S10-赤芝; S11-S12-紫芝。

Fig. 2 The similarities results of oil of *Ganoderma lucidum* spore
R-reference fingerprint; S1-S10-*Ganoderma lucidum*; S11-S12-*Ganoderma sinense*.

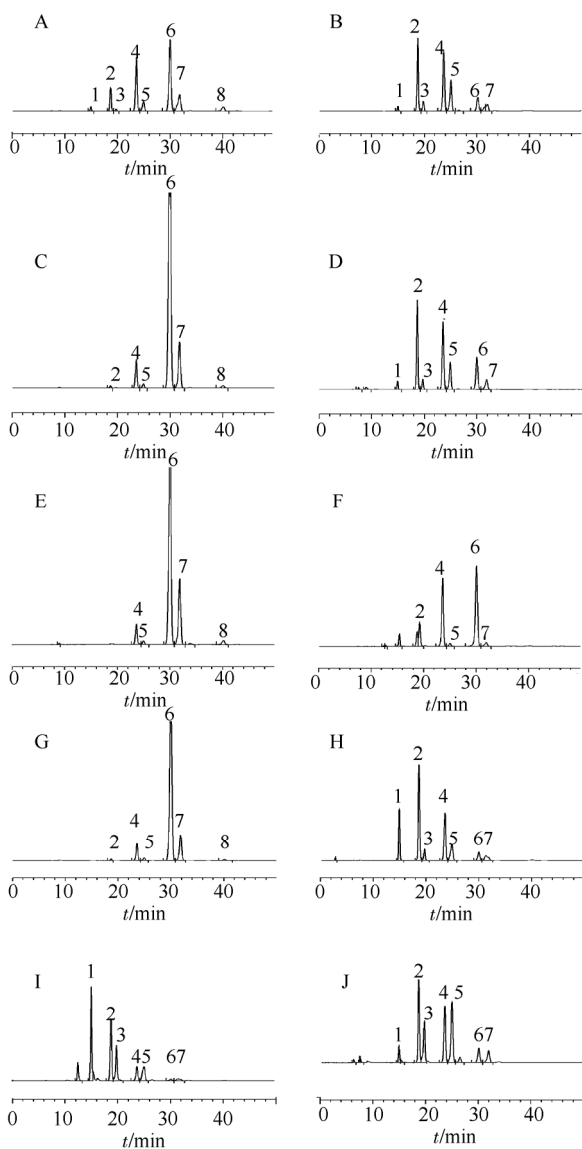


图3 混淆品 HPLC-ELSD 色谱图

A-鸦胆子油; B-花生油; C-山茶油; D-薏苡仁油; E-橄榄油; F-菜籽油; G-葵花籽油; H-芝麻油; I-大豆油; J-米糠油。

Fig. 3 The HPLC-ELSD chromatograms of confusion of *Ganoderma lucidum* spore

A-brucea javanica oil; B-peanut oil; C-camellia oil; D-coicis oil; E-olive oil; F-rapeseed oil; G-sunflower oil; H-gingili oil; I-soybean oil; J-rice bran oil.

4 结论

本实验方法得到的指纹图谱分离度好, 结果

稳定且能够有效区别灵芝孢子油和其他混淆品植物油, 而中国药典 2015 年版灵芝的 2 个原植物来源赤芝和紫芝提取的 2 种灵芝孢子油的指纹图谱相似度高度吻合, 数值>0.95, 证明两者的脂肪油成分基本一致。本研究所得的指纹图谱技术能够作为灵芝孢子油质量控制的方法之一。

REFERENCES

- [1] TANG L, ZHANG Z J, WEI X S, et al. Research progress of pharmacological action about spore powder of *Lucidum* [J]. Tianjin Agri Sci(天津农业科学), 2011, 17(13): 25-28.
- [2] TONG G H, MA L, WANG H M. Studies of *G. lucidum* spores powder on the immunoregulation and antiradiation [J]. Chin J Food Hygi(中国食品卫生杂志), 2004, 16(2): 132-134.
- [3] ZHANG X, CUI W M, LIU Z Q, et al. Study on antimutagenic and antineoplastic effect of *Ganoderma lucidum* spore powder [J]. China Public Health(中国公共卫生), 2003, 19(2): 173-174.
- [4] ZHANG W M, SUN X M, WU S L, et al. Studies on the regulation of the blood fat function of *Ganoderma lucidum* spores powder [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2001, 20(2): 14-16.
- [5] ZHU W W, LIU Z L, XU H W, et al. Effect of the oil from *Ganoderma lucidum* spores on pathological changes in the substantia nigra and behaviors of MPTP-treated mice [J]. J First Mil Med Univ, 2005, 25(6): 667-671.
- [6] CHENG X Q, ZHOU J L, GAO X B, et al. Determination of eight lipin components in *Ganoderma lucidum* spore powder by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(3): 407-413.
- [7] ZHANG W T, XU J, CHENG X Q, et al. Studies on improving quality standard *Ganoderma lucidum* spore [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 799-803.
- [8] ZHANG W T, CHENG X Q, XU J, et al. Composition characteristics analysis of *Ganoderma lucidum* spore oil triglycerides by HPLC-ELSD [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 719-722.
- [9] YU S, WANG Y. The research progress of *Ganoderma lucidum* spores oil [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2013, 25(12): 20-22.
- [10] FUKUZAWA M, YAMAGUCHI R, HIDE I, et al. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum*(Reishi Houshi) to its anti-tumor activity [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(10): 1933-1937.
- [11] 李菁, 李吉来, 宁德山, 等. 灵芝孢子油 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2011, 34(9): 1453-1455.

收稿日期: 2017-03-03

(本文责编: 李艳芳)