

## · 基础研究 ·

不同产地赤芝药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析<sup>△</sup>段晓颖<sup>1\*</sup>, 陈霄<sup>2</sup>, 马秋莹<sup>3</sup>, 牛晓静<sup>4</sup>, 翟海容<sup>5</sup>

1. 河南中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 河南 郑州 450000;

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450000; 3. 商丘市中医院, 河南 商丘 476000;

4. 河南中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 河南 郑州 450000;

5. 江苏正大天晴药业集团股份有限公司, 江苏 南京 210000

**[摘要]** 目的: 建立赤芝药材的高效液相指纹图谱并进行聚类分析。方法: 收集不同产地、不同批号的 10 批赤芝药材, 以灵芝酸 A、灵芝酸 G 为参照物, 采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸水, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A”建立指纹图谱, 评价图谱的相似性, 并进行聚类分析。结果: 建立了 10 批赤芝药材的 HPLC 指纹图谱, 共标定 31 个共有色谱峰, 方法学考察结果符合指纹图谱的技术要求, 相同产地的药材基本可以聚为一类。结论: 该方法稳定、可靠、重复性好, 为灵芝药材的质量评价提供了新的方法。

**[关键词]** 赤芝药材; 指纹图谱; 聚类分析**[中图分类号]** R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0609-07**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20180823002HPLC Fingerprint of *Ganoderma lucidum* from Differents Origins and Establishment of Clustering AnalysisDUAN Xiao-ying<sup>1\*</sup>, CHEN Xiao<sup>2</sup>, MA Qiu-ying<sup>3</sup>, NIU Xiao-jing<sup>4</sup>, ZHAI Hai-rong<sup>5</sup>

1. First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,

Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Pharmacy College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

3. Shang qiu hospital of Chinese Medicine, Shang Qiu 476000, China;

4. First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,

Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

5. Jiangsu Zhengda Tianqing Pharmaceutical Group Co. Ltd, Nanjing 210000, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of *Ganoderma lucidum*. **Method:** 10 batches of *G. lucidum* from different origins and batches were collected, ganoderic acid A and ganoderic acid were used as reference materials, the HPLC method was used in the study with ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column and mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid water, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and detection wavelength was 254 nm. The similarity of the obtained fingerprints were evaluated by the Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System 2004A. **Results:** The 10 batch of *G. lucidum* HPLC fingerprints were established, a total of 31 common peaks were calibrated, the method was validated. The medicinal materials of the same origin could be basically grouped into one class. **Conclusion:** The method is stable, reliable, reproducible, and provides a new method to evaluate the quality of *G. lucidum*.

**[Keywords]** *Ganoderma lucidum*; fingerprinting; cluster analysis

中药现代化研究的重要任务之一就是建立一套客观的质量控制方法用以规范、指导中药材的炮制

加工和中成药的生产。建立中药指纹图谱的目的就在于将中药质量控制模式与化学药品区别开来, 充

<sup>△</sup> **[基金项目]** 河南省基础与前沿项目(152300410105)\* **[通信作者]** 段晓颖, 主任药师, 研究方向: 中药新技术及新药研究; Tel: (0371)66251204, E-mail: dxy1378@163.com

分体现中药的整体效应。中药指纹图谱是中药材经适当处理后,采用一定的分析手段和仪器测得的、能够标识该中药材各种组分群体特性的共有峰的图谱,是借用DNA指纹图谱发展而来的概念<sup>[1]</sup>。该技术是中药质量控制的有效解决方案,其中相似度的计算被认为是能够客观、全面地反映中药色谱指纹图谱之间相似情况的一种有效评价手段,计算相似度可以定量地衡量两指纹图谱之间的相似程度。本实验通过建立指纹图谱结合聚类分析法对10个产地的赤芝药材的不同指标变量进行分析,从而比较各个变量之间的相关性,将相似的变量提取出来,减少了分析变量的个数,使其更适用于各个变量间的相关分析<sup>[2-5]</sup>。

灵芝含有多种化学成分,如三萜类化合物、灵芝多糖、生物碱、核苷等有效成分,其中三萜类化合物为灵芝主要的有效成分,具有多种生理活性<sup>[6-7]</sup>。《中华人民共和国药典》2015版一部收载灵芝药材项下包括赤芝和紫芝两个品种,灵芝大部分为栽培品种且多为赤芝,该品种为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体。据报道,紫芝与赤芝的指纹图谱共有模式存在很大区别,在紫芝中未检测到灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C<sub>2</sub>、赤芝酸A、灵芝酸G、灵芝酸E 6种成分<sup>[8]</sup>。有报道称紫芝中含三萜酸的量明显比赤芝少<sup>[9]</sup>,笔者在研究中也发现,赤芝中总三萜成分高于紫芝,因此确定赤芝这一品种作为研究对象。本文采用高效液相色谱法对不同产地赤芝药材进行分析,利用中药色谱指纹图谱相似度评价软件得到能够体现赤芝药材质量的指纹图谱,并进行聚类分析,为不同产地赤芝药材的鉴别和质量控制提供依据<sup>[10-12]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Aglient 1260 高效液相色谱仪; AEL-200 电子天平(日本岛津公司); Sartorius CP225D 电子天平; HK250 科导台式超声波清洗器(上海汉克科学仪器有限公司)。

### 1.2 试药

灵芝酸A(140324)、灵芝酸G(140504)(成都普菲德生物技术有限公司); 乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

赤芝药材经河南中医药大学第一附属医院陈天

朝主任药师鉴定为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体。

## 2 方法与结果

### 2.1 10批赤芝药材来源及含量测定

按照2015版《中华人民共和国药典》一部灵芝项下方法测定10批不同来源赤芝中三萜及甾醇含量,见表1。

表1 10批赤芝药材批号、产地与三萜及甾醇含量

| 编号 | 批号       | 产地 | 三萜及甾醇质量分数/% |
|----|----------|----|-------------|
| 1  | 140217-1 | 山东 | 2.86        |
| 2  | 140217-2 | 山东 | 2.61        |
| 3  | 140304-1 | 安徽 | 3.07        |
| 4  | 140304-2 | 安徽 | 2.46        |
| 5  | 130807   | 安徽 | 3.89        |
| 6  | 130704   | 安徽 | 3.27        |
| 7  | 140604-2 | 安徽 | 3.90        |
| 8  | 140604-3 | 湖南 | 2.32        |
| 9  | 140203   | 安徽 | 2.86        |
| 10 | 140312   | 山东 | 2.63        |

结果表明,三萜及甾醇含量符合《中华人民共和国药典》2015版规定(不得少于0.5%)。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: A 乙腈-B 0.2% 磷酸水, 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 信号采集时间: 90 min, 梯度洗脱程序: 0~30 min, 33%~34% A; 30~60 min, 34%~80% A; 60~70 min, 80%~100% A; 70~75 min, 100%~33% A; 75~90 min, 33% A<sup>[10]</sup>。

### 2.3 对照品溶液的制备

精密称取灵芝酸A、灵芝酸G对照品适量,加甲醇制成每1 mL含灵芝酸A 80.48 μg、灵芝酸G 86.40 μg的对照品溶液。

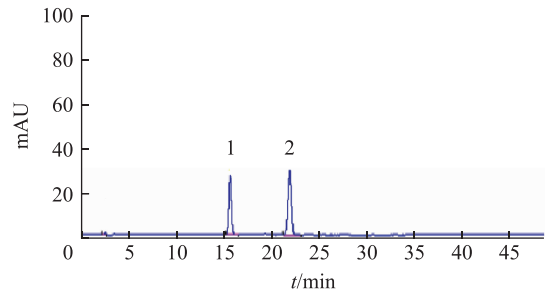
### 2.4 供试品溶液的制备

称取赤芝药材粉末约1 g,精密称定,精密加入无水乙醇50 mL,称定质量,回流60 min,放冷,称质量,用无水乙醇补足质量。滤过,取续滤液,用0.22 μm微孔滤膜滤过,备用<sup>[11]</sup>。

### 2.5 测定法

以灵芝酸A、灵芝酸G为参照物,照上述色谱

条件测定并记录色谱图,利用“中药色谱指纹图谱相似性评价系统(2004A版)”软件构建10批样品色谱图,见图1~2。



注: 1. 灵芝酸 G 对照品; 2. 灵芝酸 A 对照品。

图1 混合对照品 HPLC 图

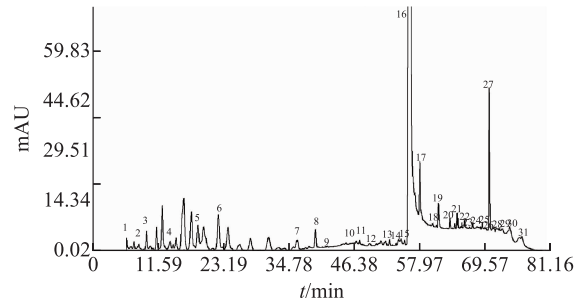


图2 赤芝 HPLC 指纹图谱

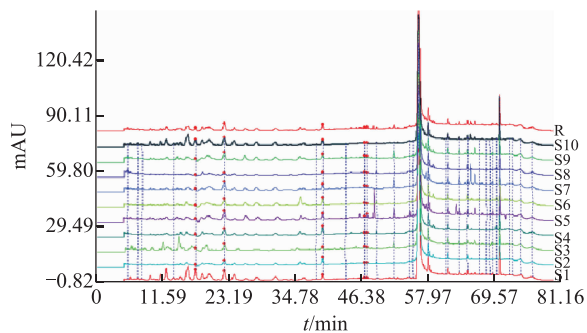


图3 10批赤芝药材 HPLC 图

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取批号为140304-1赤芝药材制备的供试品溶液,连续进样5次,记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD分别为0.01%~0.28%和0.06%~2.74%,说明精密度良好<sup>[12]</sup>。

2.6.2 重复性试验 取批号为140304-1赤芝药材5份,分别制备成供试品溶液,进样测定,记录各共有峰的保留时间和峰面积,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD分别为0.01%~0.45%和0.14%~2.86%,结果表明重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取上述赤芝药材制备的供试品溶液,分别在0、6、12、18、24、30 h进样,记录各共有峰的保留时间和峰面积,结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD分别为0.01%~0.19%和0.35%~5.31%,结果表明稳定性良好。

2.7 不同产地赤芝药材指纹图谱的构建和相关技术参数

在上述条件下,共测定了10批赤芝药材,标定出31个共有峰,见图1~2。其中10批样品共有峰面积占总峰面积比值平均值为71.77%,非共有峰面积占28.23%,对比混合对照品的各色谱峰保留时间,确定2个主成分色谱峰<sup>[13]</sup>。在31个共有峰中,5号峰为灵芝酸 G,6号峰为灵芝酸 A。其中6号峰在10批样品中的峰面积和保留时间均较稳定,且分离较好,故选择6号峰为参照峰S,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积<sup>[14]</sup>,见表2~3。

表2 10批赤芝药材指纹图谱共有峰相对保留时间

| 峰号 | 样品号     |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|    | S1      | S2      | S3      | S4      | S5      | S6      | S7      | S8      | S9      | S10     |
| 1  | 0.254 0 | 0.245 3 | 0.216 6 | 0.245 4 | 0.242 4 | 0.252 4 | 0.254 2 | 0.253 2 | 0.254 5 | 0.255 0 |
| 2  | 0.330 7 | 0.312 8 | 0.264 6 | 0.354 8 | 0.329 2 | 0.328 2 | 0.332 4 | 0.330 4 | 0.333 0 | 0.330 8 |
| 3  | 0.366 4 | 0.368 7 | 0.281 4 | 0.368 7 | 0.365 3 | 0.367 3 | 0.368 8 | 0.367 4 | 0.369 6 | 0.367 2 |
| 4  | 0.616 3 | 0.616 8 | 0.512 7 | 0.557 3 | 0.556 2 | 0.614 7 | 0.611 7 | 0.617 2 | 0.617 5 | 0.617 8 |
| 5  | 0.785 8 | 0.786 4 | 0.683 6 | 0.710 5 | 0.785 1 | 0.781 8 | 0.725 6 | 0.837 9 | 0.785 9 | 0.786 6 |
| 6  | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 7  | 1.721 3 | 1.722 2 | 1.571 3 | 1.721 9 | 1.698 5 | 1.715 7 | 1.725 8 | 1.724 3 | 1.727 7 | 1.724 9 |
| 8  | 1.772 7 | 1.773 8 | 1.632 1 | 1.773 6 | 1.746 6 | 1.765 7 | 1.777 5 | 1.775 8 | 1.779 6 | 1.777 3 |

续表 2

| 峰号 | 样品号     |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|    | S1      | S2      | S3      | S4      | S5      | S6      | S7      | S8      | S9      | S10     |
| 9  | 1.951 7 | 1.953 5 | 1.803 4 | 1.954 3 | 1.919 1 | 1.942 0 | 1.959 5 | 1.954 9 | 1.961 1 | 1.957 9 |
| 10 | 2.096 1 | 2.102 5 | 1.915 4 | 2.103 5 | 2.060 5 | 2.086 9 | 2.110 7 | 2.106 0 | 2.112 2 | 2.108 5 |
| 11 | 2.122 2 | 2.124 3 | 1.938 3 | 2.125 0 | 2.078 1 | 2.110 4 | 2.131 9 | 2.127 6 | 2.133 7 | 2.129 5 |
| 12 | 2.212 3 | 2.207 2 | 2.019 1 | 2.208 3 | 2.166 4 | 2.192 9 | 2.216 5 | 2.182 4 | 2.217 4 | 2.213 2 |
| 13 | 2.341 5 | 2.344 8 | 2.105 3 | 2.347 4 | 2.293 6 | 2.329 9 | 2.351 7 | 2.349 7 | 2.352 9 | 2.350 3 |
| 14 | 2.464 2 | 2.466 6 | 2.261 1 | 2.468 7 | 2.415 7 | 2.450 5 | 2.477 3 | 2.471 8 | 2.478 4 | 2.474 3 |
| 15 | 2.489 7 | 2.487 4 | 2.277 5 | 2.488 5 | 2.440 0 | 2.470 4 | 2.501 8 | 2.491 8 | 2.502 5 | 2.499 7 |
| 16 | 2.531 9 | 2.533 5 | 2.316 8 | 2.535 8 | 2.481 5 | 2.517 6 | 2.544 6 | 2.538 7 | 2.545 4 | 2.541 8 |
| 17 | 2.612 1 | 2.614 4 | 2.379 7 | 2.616 4 | 2.559 9 | 2.597 2 | 2.625 4 | 2.619 8 | 2.626 3 | 2.622 3 |
| 18 | 2.742 3 | 2.744 4 | 2.483 5 | 2.746 6 | 2.686 8 | 2.726 6 | 2.756 1 | 2.750 5 | 2.757 1 | 2.752 6 |
| 19 | 2.761 2 | 2.762 7 | 2.544 3 | 2.764 9 | 2.704 9 | 2.833 3 | 2.774 1 | 2.768 8 | 2.775 2 | 2.771 3 |
| 20 | 2.850 6 | 2.851 3 | 2.595 1 | 2.853 6 | 2.792 3 | 2.891 4 | 2.863 6 | 2.916 9 | 2.864 9 | 2.860 4 |
| 21 | 2.909 2 | 2.910 2 | 2.694 7 | 2.911 9 | 2.849 3 | 2.988 2 | 2.922 9 | 2.952 3 | 2.923 7 | 2.919 6 |
| 22 | 3.005 7 | 3.007 4 | 2.766 4 | 3.008 9 | 2.943 8 | 3.043 9 | 3.019 8 | 3.014 0 | 3.020 8 | 3.016 9 |
| 23 | 3.063 0 | 3.064 6 | 2.847 4 | 3.066 3 | 3.001 9 | 3.073 7 | 3.078 8 | 3.071 1 | 3.078 8 | 3.0741  |
| 24 | 3.092 2 | 3.093 7 | 2.878 2 | 3.094 2 | 3.029 6 | 3.089 7 | 3.106 9 | 3.099 9 | 3.107 5 | 3.102 5 |
| 25 | 3.107 7 | 3.109 9 | 2.888 9 | 3.111 1 | 3.044 3 | 3.117 2 | 3.122 3 | 3.116 3 | 3.123 5 | 3.118 7 |
| 26 | 3.135 6 | 3.137 1 | 2.900 6 | 3.138 4 | 3.071 6 | 3.144 7 | 3.149 7 | 3.143 6 | 3.150 9 | 3.146 0 |
| 27 | 3.161 6 | 3.164 2 | 2.920 3 | 3.165 4 | 3.097 9 | 3.224 5 | 3.177 5 | 3.171 1 | 3.177 8 | 3.172 3 |
| 28 | 3.242 9 | 3.245 0 | 3.010 2 | 3.245 8 | 3.177 4 | 3.245 4 | 3.259 6 | 3.251 7 | 3.259 4 | 3.254 4 |
| 29 | 3.266 6 | 3.267 9 | 3.024 9 | 3.267 7 | 3.199 2 | 3.306 2 | 3.281 6 | 3.275 7 | 3.281 7 | 3.279 6 |
| 30 | 3.324 7 | 3.325 2 | 3.048 9 | 3.327 6 | 3.256 9 | 3.385 2 | 3.339 9 | 3.332 1 | 3.340 8 | 3.334 9 |
| 31 | 3.420 8 | 3.418 6 | 3.124 8 | 3.420 2 | 3.346 7 | 3.399 8 | 3.433 0 | 3.425 7 | 3.433 4 | 3.429 4 |

表 3 10 批赤芝药材指纹图谱共有峰相对峰面积

| 峰号 | 样品号     |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|    | S1      | S2      | S3      | S4      | S5      | S6      | S7      | S8      | S9      | S10     |
| 1  | 0.009 3 | 0.013 5 | 0.071 2 | 0.014 0 | 0.020 7 | 0.024 9 | 0.046 6 | 0.408 5 | 0.078 8 | 0.023 2 |
| 2  | 0.065 5 | 0.011 8 | 0.145 5 | 0.110 6 | 0.082 0 | 0.108 1 | 0.068 2 | 0.099 9 | 0.083 5 | 0.022 0 |
| 3  | 0.057 1 | 0.046 6 | 0.094 1 | 0.080 5 | 0.062 3 | 0.074 7 | 0.043 6 | 0.207 9 | 0.087 5 | 0.041 0 |
| 4  | 0.254 5 | 0.081 6 | 0.515 3 | 0.201 1 | 0.261 0 | 0.180 3 | 0.081 2 | 0.308 4 | 0.080 8 | 0.039 6 |
| 5  | 0.986 0 | 0.174 6 | 0.399 3 | 0.850 8 | 0.274 7 | 0.536 9 | 0.301 1 | 1.452 7 | 0.225 5 | 0.173 5 |
| 6  | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 7  | 0.079 7 | 0.089 6 | 0.043 3 | 0.031 3 | 0.036 7 | 0.049 5 | 0.039 5 | 0.104 0 | 0.042 6 | 0.069 0 |
| 8  | 0.782 9 | 0.969 6 | 0.015 9 | 0.283 6 | 0.367 9 | 0.377 0 | 0.351 5 | 0.531 3 | 0.472 7 | 0.713 8 |
| 9  | 0.024 2 | 0.015 1 | 0.090 9 | 0.009 4 | 0.106 8 | 0.018 5 | 0.037 4 | 0.036 7 | 0.073 6 | 0.009 8 |
| 10 | 0.042 0 | 0.078 6 | 0.118 7 | 0.054 1 | 0.125 8 | 0.061 7 | 0.107 7 | 0.195 3 | 0.184 1 | 0.071 8 |
| 11 | 0.063 7 | 0.076 8 | 0.048 1 | 0.050 3 | 0.199 8 | 0.039 3 | 0.087 2 | 0.300 3 | 0.145 7 | 0.054 7 |
| 12 | 0.154 9 | 0.210 8 | 0.013 5 | 0.043 0 | 0.018 5 | 0.084 9 | 0.014 8 | 0.054 7 | 0.083 7 | 0.196 8 |

| 续表 3 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 峰号   | 样品号      |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|      | S1       | S2       | S3       | S4       | S5       | S6       | S7       | S8       | S9       | S10      |
| 13   | 0.063 0  | 0.089 6  | 0.008 1  | 0.069 4  | 0.409 4  | 0.089 4  | 0.445 3  | 0.131 4  | 0.512 7  | 0.074 6  |
| 14   | 0.210 1  | 0.284 9  | 0.020 0  | 0.100 0  | 0.335 5  | 0.165 4  | 0.085 7  | 0.588 1  | 0.157 5  | 0.215 3  |
| 15   | 0.041 7  | 0.053 7  | 0.019 2  | 0.050 4  | 0.056 9  | 0.039 0  | 0.052 2  | 0.082 6  | 0.076 0  | 0.046 0  |
| 16   | 25.730 9 | 36.015 3 | 20.760 9 | 17.731 5 | 14.941 5 | 18.250 9 | 16.973 5 | 71.319 3 | 20.617 1 | 25.727 2 |
| 17   | 1.924 6  | 2.660 6  | 1.674 6  | 1.843 5  | 1.293 1  | 1.033 2  | 1.449 9  | 5.280 2  | 1.745 6  | 1.915 6  |
| 18   | 0.033 2  | 0.042 5  | 0.072 3  | 0.022 9  | 0.024 8  | 0.028 7  | 0.026 8  | 0.105 2  | 0.031 7  | 0.030 8  |
| 19   | 0.393 3  | 0.534 6  | 0.071 7  | 0.288 1  | 0.304 8  | 0.310 8  | 0.347 3  | 1.100 5  | 0.395 9  | 0.014 8  |
| 20   | 0.014 4  | 0.017 0  | 0.335 0  | 0.111 9  | 0.218 2  | 0.131 7  | 0.318 2  | 0.959 1  | 0.260 6  | 0.338 0  |
| 21   | 0.328 8  | 0.420 6  | 0.010 9  | 0.131 7  | 0.131 5  | 0.174 9  | 0.146 2  | 0.293 2  | 0.237 9  | 0.027 5  |
| 22   | 0.033 5  | 0.029 6  | 0.097 1  | 0.019 5  | 0.009 5  | 0.021 4  | 0.009 2  | 0.079 6  | 0.011 6  | 0.014 5  |
| 23   | 0.012 8  | 0.023 2  | 0.062 7  | 0.073 4  | 0.069 2  | 0.055 1  | 0.026 4  | 0.031 1  | 0.014 6  | 0.018 7  |
| 24   | 0.028 4  | 0.020 1  | 0.029 3  | 0.021 8  | 0.108 4  | 0.028 2  | 0.013 2  | 0.056 8  | 0.022 1  | 0.081 2  |
| 25   | 0.047 0  | 0.103 8  | 0.063 1  | 0.062 0  | 0.393 6  | 0.112 2  | 0.149 9  | 0.320 2  | 0.162 5  | 0.124 2  |
| 26   | 0.184 5  | 0.152 2  | 0.097 3  | 0.017 6  | 0.214 3  | 0.084 6  | 0.021 4  | 0.378 0  | 0.064 7  | 1.150 3  |
| 27   | 1.463 2  | 1.587 1  | 1.849 7  | 1.277 5  | 1.306 1  | 1.755 4  | 1.360 8  | 3.577 4  | 1.331 5  | 1.923 4  |
| 28   | 0.041 6  | 0.239 0  | 0.018 4  | 0.018 0  | 0.242 9  | 0.165 6  | 0.156 5  | 0.103 9  | 0.122 0  | 0.287 5  |
| 29   | 0.087 0  | 0.212 3  | 0.168 2  | 0.048 7  | 0.228 7  | 0.202 8  | 0.599 7  | 0.448 8  | 0.135 5  | 0.401 2  |
| 30   | 0.618 6  | 0.845 4  | 0.085 5  | 0.392 1  | 0.433 4  | 0.460 8  | 0.754 6  | 1.890 3  | 0.580 1  | 0.256 3  |
| 31   | 0.563 1  | 0.896 3  | 0.740 0  | 0.227 0  | 0.406 6  | 0.303 8  | 0.402 9  | 1.535 0  | 0.531 8  | 0.412 6  |

2.8 数据处理

2.8.1 不同产地赤芝药材相似度分析 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”软件,将实验数据导入,以相关系数(中位数和平均数)代表其相似度,10 批赤芝药材的相似度结果见表 4。

表 4 10 批赤芝药材指纹图谱相似度结果

| 编号  | 相似度   |       |
|-----|-------|-------|
|     | 平均数   | 中位数   |
| S1  | 0.993 | 0.988 |
| S2  | 0.998 | 0.999 |
| S3  | 0.993 | 0.993 |
| S4  | 0.998 | 0.998 |
| S5  | 0.991 | 0.987 |
| S6  | 0.996 | 0.997 |
| S7  | 0.996 | 0.994 |
| S8  | 0.998 | 0.998 |
| S9  | 0.998 | 0.996 |
| S10 | 0.995 | 0.991 |

由表 3 可知,不同方法所得相似度结果趋于一致,10 批样品之间相似度均在 0.9 以上,符合中药色谱指纹图谱相似度技术要求。

2.8.2 不同产地赤芝药材聚类分析 对 10 批不同产地、不同批号的赤芝做指纹图谱分析,获得了包括灵芝酸 G(5 号峰)、灵芝酸 A(6 号峰)在内的 31 个共有色谱峰<sup>[15]</sup>,将各共有色谱峰相对于参比峰的峰面积进行量化,得到 10×31 阶原始数据矩阵,代入 SPASS20.0 统计软件,采用系统聚类法,以欧式距离为测度<sup>[16]</sup>,对 10 批赤芝药材各共有峰的峰面积进行分析,生成平均联接组间树状图,见图 4,聚类分析将 10 批药材分成 4 类,其中 3、4、5、6、7、9 号样品聚为第一类,该类样品均为安徽产赤芝药材<sup>[17]</sup>;1 号和 10 号样品聚为第二类,2 号样品单独聚为第三类,1、2、10 号样品均为山东产赤芝药材,但聚类分析并未聚为一类,可能因为 2 号样品的 16 号、17 号峰的相对峰面积与 1、10 号样品有一定差距;8 号样品为湖南产赤芝药材,聚为第四类,从相对峰面积可以看出 8 号样品的 5、16、17、19、27、30、31 号峰均与其他批号的产品峰面积相差较

大,因此将其单独聚为一类<sup>[18]</sup>。该聚类分析说明不同产地灵芝药材中所含三萜类成分相差较大,产地之间有显著性差异。

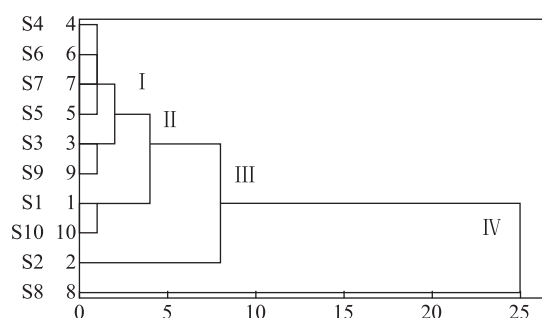


图4 10批灵芝药材聚类分析树状图

### 3 讨论

#### 3.1 提取方式和提取溶剂的选择

本文首先考察了超声和回流两种提取方法,结果发现,回流提取检测出的色谱峰较多,故选择回流提取方法;选用三氯甲烷、甲醇、乙醇3种溶剂进行提取,发现三氯甲烷提取时,仅有少量峰被检测出来,甲醇回流提取时杂质峰较多,灵芝酸A未能和其他峰达到较好分离,而无水乙醇提取时灵芝酸A能得到较好分离,因此选择无水乙醇回流提取。

#### 3.2 流动相的确定

本实验分别采用了5个流动相系统:乙腈-0.2%磷酸水;乙腈-0.03%磷酸水;乙腈-0.04%甲酸水;乙腈-0.1%甲酸水;乙腈-0.1%醋酸水。结果表明,乙腈-0.2%磷酸水系统为流动相,洗脱出色谱峰较多,且各色谱峰分离效果较好,因此选择乙腈-0.2%磷酸水系统为流动相。

#### 3.3 柱温的选择

柱温的选择是影响指纹图谱的重要因素之一。本实验首先在20℃柱温下进行洗脱,结果发现,该条件下基线漂移非常严重,而选择30℃柱温进行洗脱,基线基本平稳,各色谱峰也能较好地洗脱出来。

#### 3.4 检测波长的选择

采用Agilent 1260 DAD检测器对样品进行全波长扫描,综合考虑参照峰(3、4)和其他成分的吸收,根据3D-plot图谱,在254 nm处检测的图谱信息量较多,峰形较好,mAU值较大,溶剂干扰少,基线平稳,因此选择检测波长为254 nm。

#### 3.5 洗脱程序的优化

赤芝药材成分复杂,报道分离出的三萜类成分

就有150余种,且含量较低,等度洗脱很难在保证较好分离度的情况下完全洗脱出来,故采用梯度进行洗脱分离。分离时,初始乙腈比例为25%时,各成分峰的 $R_t$ 较大,前45 min内几乎无峰,扩大有机相比比例为33%时,各成分峰的 $R_t$ 大大缩小,对照品灵芝酸G在15 min左右出峰,灵芝酸A在22 min左右出峰,洗脱90 min将绝大部分三萜类成分洗脱出来,因此以初始有机相33%的比例进行洗脱,筛选出最佳梯度:0~30 min,33%~34%乙腈;30~60 min,34%~80%乙腈;60~70 min,80%~100%乙腈;70~75 min,100%~33%乙腈;75~90 min,33%乙腈。

### 4 总结

本文分别用中位数和平均数计算了10批赤芝样品的相似度,结果显示,3个产地10批样品之间相似度均较高,未将质量区别开,但通过聚类分析发现,赤芝质量与产地具有较高相关性,基本上同一产地可以聚为一类,不同产地之间质量还是有差别的。聚类分析与相似度分析结果并不完全相同,说明仅靠相似度分析并不能作为赤芝药材质量鉴别的精细与科学的方法。本文利用相似度结合聚类分析,为赤芝药材的质量评价提供了可靠依据,也为其质量控制提供了更全面的信息。检索多篇关于赤芝药材指纹图谱文献,发现将指纹图谱与聚类分析相结合对其产地进行分析和归属的报道较少,因此本文对赤芝不同产地的质量研究具有一定的指导意义。

### 参考文献

- [1] 江丽青.川北灵芝质量标准及其指纹图谱研究[D].四川:成都理工大学,2013.
- [2] 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.
- [3] 张晓冬,陈龙,白玉,等.近红外光谱结合主成分分析和聚类分析鉴别炉甘石生品、伪品和炮制品[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):1-8.
- [4] 张华锋,刘炯,张杰,等.基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J].中草药,2013,44(19):2696-2702.
- [5] 孟令文,田淋淋,李志成,等.长白山林下仿野生栽培紫芝主要活性成分研究[J].中国现代中药,2016,18(2):137-142.
- [6] 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.
- [7] WU W W, YE Z J, XU Y M, et al. Ergosta-7,22-diene-2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (EGDT) from *Ganoderma lucidum* inhibits nasopharyngeal carcinoma cells by blocking EGFR signaling pathway[J]. CHM, 2018, 10(1): 27-33.
- [8] 丁平, 黄海波, 邱金英, 等. 应用色谱技术区别赤芝和紫芝[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 404-406
- [9] 黄生权, 魏刚, 姚松君, 等. 赤芝、紫芝三萜类成分指纹图谱的优化与比较[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 121-124
- [10] 郭晓蕾, 翟旭峰, 王怀豫, 等. 不同产地灵芝(赤芝)的HPLC指纹图谱评价[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(12): 2782-2784.
- [11] 何春龙, 张屏, 鞠爱华, 等. 灵芝超微粉、普通粉和灵芝提取物高效液相色谱指纹图谱的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 575-578.
- [12] LIANG J Y, ZHOU J H, ZHOU J P, et al. The Impact on Extraction Effect of Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* by Different Pretreatment[J]. Medicinal Plant, 2018, 9(3): 14-16, 20.
- [13] 徐雪峰, 闫浩, 张玉. 不同产地赤芝多糖和三萜含量的比较[J]. 海峡药学, 2016, 28(12): 39-41.
- [14] 孙小梅. 灵芝子实体多糖色谱指纹分析方法的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [15] 黄必奎, 陆兴毅, 农凤鸣, 等. 广西百色地产灵芝 FTIR 特征图谱的系统聚类分析与主成分分析[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(5): 24-26.
- [16] CHAO W Z, TANG C H, ZHANG J S, et al. Development of a stable SCAR marker for rapid identification of *Ganoderma lucidum* Hunong 5 cultivar using DNA pooling method and inter-simple sequence repeat markers[J]. J INTEGR AGR, 2018, 17(1): 130-138.
- [17] 冯柏康, 李其凤, 李卫民, 等. HPLC 指纹图谱结合系统聚类分析法对灵芝孢子油质量的研究[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3326-3328.
- [18] 贾红岩, 王亚涛, 张芝华, 等. 高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 238-244.

(收稿日期: 2018-08-23 编辑: 王笑辉)

(上接第 602 页)

- [13] 杨玉红, 郝慧敏. 药用植物多糖的生物学功能及应用研究进展[J]. 生物学教学, 2013, 38(1): 6-8.
- [14] 邢娜, 舒尊鹏, 徐炳清, 等. 枳壳多糖 CALB-1 的提取、分离纯化及免疫调节活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 639-644.
- [15] 舒尊鹏, 杨燕妮, 王毅, 等. 枳壳多糖对辐射损伤小鼠的防护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(5): 670-674.
- [16] 吴建华, 吴志瑰, 裴建国, 等. 多酚类化合物的研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(6): 630-636.
- [17] KHALIFA I, ZHU W, LI K K, et al. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability-A structural review[J]. J Funct Foods, 2018, 40(1): 28-43.
- [18] 符晨星. 植物活性成分的功能性研究: 代谢酶活性抑制及抗炎症效果的评价[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [19] 王林元, 张建军, 王淳, 等. 对中药类保健食品的认识及研究开发策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3927-3930.
- [20] 郭增喜, 李文庭, 李兆奎. 不同产地枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的测定[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1347-1348.
- [21] 施学骄, 张杰红, 刘友平, 等. 星点设计-效应面法优化枳实总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(3): 24-27.
- [22] 谢倩, 王威, 陈清西. 橄榄多酚含量测定方法的比较[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 204-207.
- [23] 田庆国, 丁霄霖. 测定橘核中柠檬苦素类似物的分光光度法[J]. 分析测试学报, 1999, 18(5): 45-47.
- [24] 唐韵熙, 邓放明. 桉桉核中柠檬苦素类似物提取条件优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 162-165.
- [25] 张媛媛, 张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 158-163.
- [26] 贾成友, 李微, 张传辉, 等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J]. 中草药, 2016, 47(6): 917-922.
- [27] 黄潇, 刘婧, 付小梅, 等. 基于 CRITIC 法计算权重系数的 Box-Behnken 响应面法优化栀子炭微波炮制工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1133-1138.
- [28] 陈翔, 郭海波, 陈才军, 等. 基于 CRITIC 法计算权重系数的正交设计法优化三叶青干燥工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2174-2176.

(收稿日期: 2018-11-04 编辑: 王笑辉)