

- 的活性成分研究进展[J]. 中国实用医药, 2008, 3(10): 191.
- [5] 陈屏, 徐东铭, 雷军. 麦冬化学成分及药理作用的研究现状[J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(1): 35-36.
- [6] 林以宁, 志田保夫, 袁博, 等. 不同产地麦冬的指纹图谱比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(6): 538-542.
- [7] 陈有根, 鄂国庆, 戴俊东, 等. 麦冬指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4): 56-58.
- [8] 白晶, 于治国. 麦冬的 HPLC 指纹图谱分析方法研究[J]. 中成药, 2007, 29(1): 12-13.
- [9] LIN Y N, ZHU D N, QI J, et al. Characterization of homoisoflavonoids in different cultivation regions of *Ophiopogon japonicus* and related antioxidant activity [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(5): 757-762.
- [10] TRAN M H, CAO VAN T, NGUYEN T D, et al. Homoisoflavonoid from the roots of *Ophiopogon japonicus* and their *in vitro* anti-inflammation activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 8(20): 2412-2416.
- [11] DE MEY E, DE MAERE H, DEWULF L, et al. Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine contained in spices used as meat product additives [J]. Eur Food Res Tech, 2014, 238(3): 477-484.
- [12] YI F Z, JIN Q I, ZHU D N, et al. Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* and its oxygen free radicals (OFRs) scavenging effects [J]. Chin J Nat Med, 2008, 6(3): 201-204.
- [13] 朱海花, 祝明, 蒋慧莲, 等. 浙麦冬黄酮类成分指纹图谱及 2 种黄酮类化合物的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 85-88.
- [14] 俞建平, 马月光, 邵建峰, 等. ELSD-HPLC 法测定浙麦冬、川麦冬中麦冬皂苷 D 含量的方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(4): 253-255.
- [15] 简美玲, 李荷, 毛润乾. 麦冬种质资源的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(5): 549-551.

收稿日期: 2016-04-01

灵芝孢子粉质量标准提高研究

张文婷¹, 徐靖², 程夏倩³, 李明焱⁴, 黄琴伟¹, 郭增喜¹, 赵维良^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江省珍稀植物药工程技术研究中心, 浙江 武义 321200; 3.浙江省儿童医院, 杭州 310052; 4.武义寿仙谷中药饮片有限公司, 浙江 武义 321200)

摘要: 目的 建立灵芝孢子粉的 HPLC 特征图谱及三油酸甘油酯的含量测定方法。方法 采用 ACCHROM Unitary-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-异丙醇(51 : 49), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测器为蒸发光散射检测器。结果 建立了灵芝孢子粉 HPLC 特征图谱, 确定了 10 个共有峰, 指认了其中 8 个共有峰的成分分别为三亚油酸甘油酯、二亚油酸甘油酯、二亚油酸棕榈酸甘油酯、二油酸亚油酸甘油酯、棕榈酸油酸亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、二油酸棕榈酸甘油酯和二油酸硬脂酸甘油酯。三油酸甘油酯进样量在 0.613 2~18.40 μg(r=0.998 9) 内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率为 104.1%(RSD=1.8%)。结论 特征图谱结合三油酸甘油酯的含量测定, 能更好地控制灵芝孢子粉的质量。

关键词: 灵芝孢子粉; 三油酸甘油酯; 特征图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)06-0799-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.06.031

Studies on Improving Quality Standard of *Ganoderma Lucidum* Spore

ZHANG Wenting¹, XU Jing², CHENG Xiaqian³, LI Mingyan⁴, HUANG Qinwei¹, GUO Zengxi¹, ZHAO Weiliang^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Province Rare Plant Medicine Engineering Technology Research Center, Wuyi 321200, China; 3.The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China; 4.Wuyi Shouxiangu Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Co., Ltd., Wuyi 321200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a specific HPLC chromatogram of *Ganoderma lucidum* spore and a method for determination of triolein. **METHODS** The chromatographic separation 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

作者简介: 张文婷, 女, 主任中药师 Tel: (0571)87180337 E-mail: leozhw@163.com *通信作者: 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.org.cn

30 °C with the detection by ELSD. **RESULTS** The results showed that the chromatographic fingerprint was completed with 10 recognizable peaks, of which 8 peaks kaempferol-3-O- β -D (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) were determined. The linear range of triolein was 0.613 2–18.40 μg ($r=0.998\ 9$), the average recovery was 104.1%(RSD=1.8%). **CONCLUSION** The combination of specific chromatograms and determination of triolein is suitable for use in the quality control of *Ganoderma lucidum* spore.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum* spore; triolein; fingerprint; HPLC

灵芝孢子粉为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Franch.) Karst.的干燥成熟孢子,灵芝弹射孢子时采收,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]。新修订的灵芝孢子粉质量标准新增了杂质、水分、总灰分、重金属有害元素、破比率、过氧化值、微生物限度、指纹图谱等检查项目以及三油酸甘油酯和多糖含量测定等项目,对灵芝孢子粉的真伪、品质、安全性等方面进行了全面的控制。一般认为灵芝孢子油的临床作用与其含有丰富的不饱和脂肪酸特别是油酸、亚油酸有密切的关系^[6]。油脂类成分具有抗肿瘤活性且含量高,可作为灵芝孢子粉质量控制的指标性成分^[7-8]。周晓宏等^[8]采用高效液相色谱蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定了灵芝孢子油中三油酸甘油酯的含量,秦臻等^[9]采用气相色谱法建立了破壁灵芝孢子粉中油酸和亚油酸的含量测定方法,但缺乏对灵芝孢子粉进行真伪鉴别的手段,且对灵芝孢子粉的指纹图谱研究鲜有报道。本实验在分析灵芝孢子粉油脂类成分的基础上,采用 HPLC-ELSD 对该类成分进行指纹图谱研究,对其中的特征峰进行指认,同时控制指纹图谱中三油酸甘油酯的含量。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,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(瑞士 METTLER TOLEDO); 2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech); 数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)。

乙腈(MERCK 公司,色谱纯); 异丙醇(MERCK 公司,色谱纯); 试验用水为 Milli-Q 系统制备(电阻率 18.2 M Ω .cm@25 °C)。

对照品: 三亚油酸甘油酯[Trilinolein(9c,12c), 批号: K 259:1]、1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯[1,2-

linolein-3-olein(rac), 批号: J 239:5]、1,2-二亚油酸-3-棕榈酸甘油酯[1,2-linolein-3-palmitin(rac), 批号: O 115:1]、1,2-二油酸-3-亚油酸甘油酯[1,2-olein-3-linolein(rac), 批号: M 283:9]、1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯 [1-palmitin-2-olein-3-linolein(rac), 批号: L 356:11]、三油酸甘油酯[Triolein(9c), 批号: K 079:2]、1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯[1,2-olein-3-palmitin, 批号: N 256:8]和 1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯 [1,2-olein-3-stearin(rac), 批号: J 139:5]均购于 LarodanAB 公司。

样品: 灵芝孢子粉样品共 20 批, 7 批破壁灵芝孢子粉由金华某中药饮片有限公司提供, 批号分别为 20120401、20120402、20120403、20150404、20120405、12121301、12121303, 对应表 1 中样品编号 S1~S7。其余 13 批购于市面上各种品牌灵芝孢子粉饮片。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

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

2.2 混合对照品溶液制备

精密称取各对照品, 加乙腈-异丙醇(51:49)溶液制成含三亚油酸甘油酯、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-硬脂酸甘油酯浓度分别为 28.70, 146.8, 50.75, 279.6, 242.1, 613.2, 341.6, 69.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取灵芝孢子粉 0.4 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙腈-异丙醇(51:49)溶液 25 mL, 称定重

量, 水浴回流提取 60 min, 放冷, 用乙腈-异丙醇 (51:49) 溶液补足减失的重量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 定量分析

2.4.1 标准曲线 分别精密吸取三油酸甘油酯对照品溶液($613.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1, 5, 10, 20, 25, 30 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以进样量(mg)的对数(X)为横坐标, 峰面积的对数(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 并以最小二乘法计算得回归方程, 结果显示, 三油酸甘油酯在 0.613 2~18.40 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2 仪器精密度试验 取对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 $\text{RSD}<2.0\%$ 。表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号灵芝孢子粉样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备并测定峰面积, 结果三油酸甘油酯平均含量为 $57.03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 4.6%。

2.4.4 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的样品 6 份, 精密加入对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别测定供试品中三油酸甘油酯的含量, 计算回收率, 结果平均回收率为 104.1%, RSD 为 1.8%, 说明本法的回收率良好。

2.4.5 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0, 5.5, 9, 12.5, 49 h 时注入液相色谱仪, 记录峰面积, 结果显示三油酸甘油酯峰面积 RSD 为 4.0%, 表明供试品溶液室温放置 49 h 稳定。

2.4.6 样品测定结果 用本实验建立的 HPLC, 测定不同生产企业灵芝孢子粉中三油酸甘油酯的含量, 结果见表 1。

2.5 指纹图谱分析

灵芝孢子粉三油酸甘油酯含量测定和特征图谱采用相同的前处理条件和色谱系统。

2.5.1 精密度试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份, 连续进样 5 次, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 选取 10 个峰作为 Mark 峰, 以 Mark 峰模式进行相似度计算, 结果相似度均为 1.000, 说明该方法精密度良好。

表 1 20 批样品测定结果

Tab. 1 The results of 20 samples

样品编号	甘油三油酸酯/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	相似度	样品编号	甘油三油酸酯/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	相似度
S1	65.6	1.000	S11	30.9	0.948
S2	66.2	1.000	S12	56.5	0.999
S3	66.7	1.000	S13	63.6	0.999
S4	67.7	1.000	S14	60.6	0.999
S5	67.8	1.000	S15	79.0	1.000
S6	66.1	0.999	S16	74.0	0.995
S7	67.2	0.999	S17	76.8	0.999
S8	61.7	0.996	S18	71.7	0.998
S9	42.0	0.999	S19	63.0	0.999
S10	52.0	0.997	S20	71.8	0.999

2.5.2 重复性试验 精密称取灵芝孢子粉 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 以 Mark 峰模式进行相似度计算, 相似度均为 1.000, 结果表明本法具有较好的重复性。

2.5.3 稳定性试验 制备灵芝孢子粉供试品溶液 1 份, 分别在 0, 5.5, 9, 12.5, 49 h 时注入液相色谱仪, 记录色谱图, 并按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 与生成的对照色谱图比较, 结果表明供试品溶液在 49 h 内稳定。

2.5.4 共有峰的确定和色谱峰的指认 20 批样品色谱图见图 1, 分析比较各批样品的色谱峰, 10 个峰为各样品所共有。采用对照品对照法对色谱峰进行指认, 其中 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 号峰分别是三亚油酸甘油酯、二亚油酸油酸甘油酯、二亚油酸棕榈酸甘油酯、二油酸亚油酸甘油酯、棕榈酸油酸亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、二油酸棕榈酸甘油酯、二油酸硬脂酸甘油酯, 见图 2。

2.5.5 相似度测定 以 10 批灵芝孢子粉样品的色谱特征图谱为基础, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件建立共有模式, 计算 20 批样品与共有模式间的相似度, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

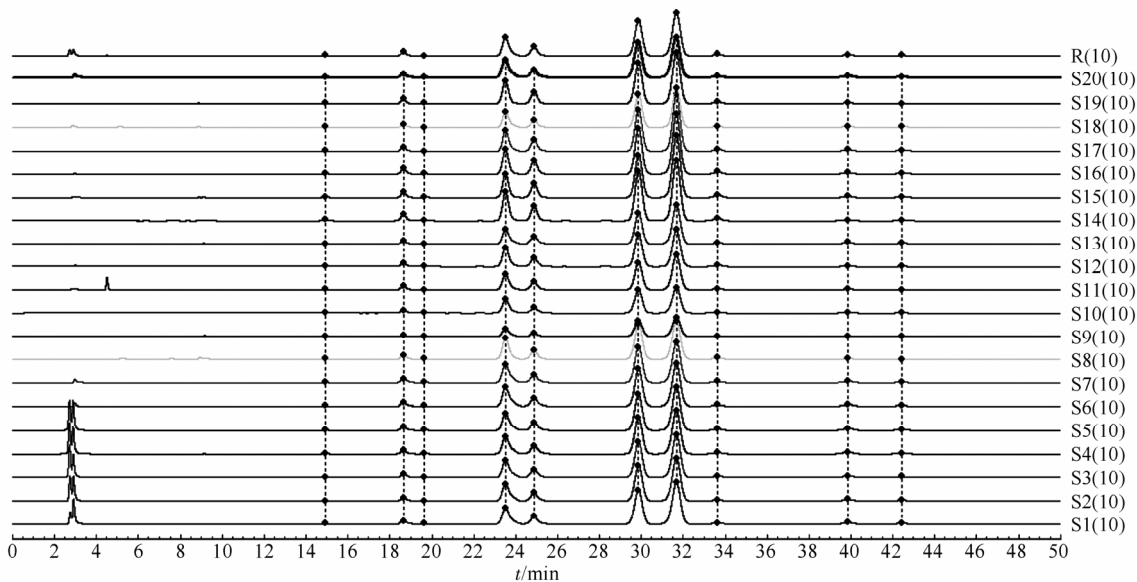


图1 灵芝孢子粉样品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Ganoderma lucidum* spore powder samples

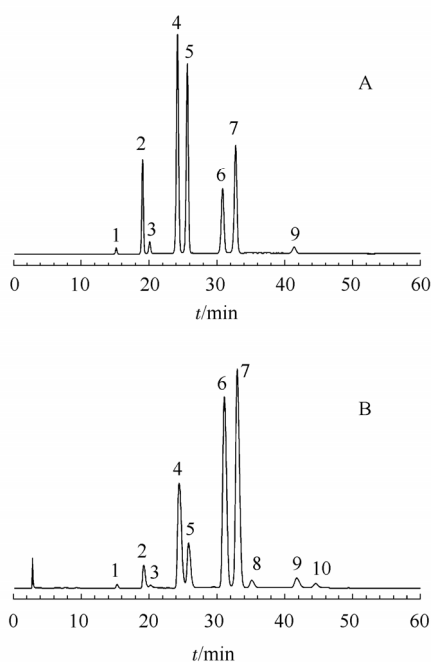


图2 对照品和供试品的 HPLC-ELSD 色谱图

A-对照品溶液; B-灵芝孢子粉样品; 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; 9-1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯。

Fig. 2 Representative HPLC-ELSD chromatograms of reference substance and samples

A-reference substance; B-sample of *Ganoderma lucidum* spore powder; 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; 9-1,2-olein-3-stearin.

3 讨论

本研究比较了石油醚(60~90 °C)、乙腈-异丙醇(51 : 49)不同提取溶剂以及不同提取时间对含量的影响,结果显示采用乙腈-异丙醇(51 : 49)溶液回流提取 6 min 含量最高。

比较了不同柱温(25, 30 和 35 °C)、不同色谱柱 (Agilent Zorbax SB-C₁₈、Kromasil C₁₈ 和 ACCHROM Unitary-C₁₈)、不同色谱仪(Agilent 和 Shimadzu)对含量和指纹图谱的影响,结果显示实验条件对色谱峰的分离和油脂类成分的含量影响较小,表明本方法耐用性良好。

对所收集的 20 批灵芝孢子粉中三油酸甘油酯含量测定结果显示,大部分批次含量在 60~80 mg·g⁻¹ 之间,4 批次含量稍低,推测与破壁工艺中孢子油的损失或孢子质量相关。

样品相似度检测结果显示,除 1 批相似度为 0.95 外,其他不同生产企业产品间的相似度可达 0.99,说明灵芝孢子粉成分一致性较好。本实验建立的特征图谱具专属性,联合三油酸甘油酯含量测定,可用于灵芝孢子粉的真伪鉴别及质量控制。

REFERENCES

- [1] 唐柳, 张志军, 魏雪生, 等. 灵芝孢子粉药理作用研究进展 [J]. 天津农业科学, 2011, 17(3): 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 Hygiene, 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] 浙江省新修订《灵芝孢子粉炮制规范》颁布实施[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(2): 237.
- [7] WANG Y J, ZHANG L, DING A W. Quantification of five kinds of organic acids in *Ganoderma Lucidum* spores oil by GC-MS [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2009, 3(25): 136-139.
- [8] 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.
- [9] ZHOU X H, CHEN L L, GAO Y H, et al. Determination of glycerol trioleate in *Ganoderma lucidum* spore oil by HPLC-ELSD [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2012, 28(1): 54-56.
- [10] QIN Z, HU J M, PENG S Z, et al. Determination of oleic acid and linoleic acid in sporoderm-broken *Ganoderma lucidum* spore by gas chromatography [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2010, 17(9): 41-43.
- 收稿日期: 2016-03-30

产地及生长年限对土茯苓中落新妇苷含量的影响

严爱娟¹, 郭增喜², 张文婷², 黄琴伟², 戚雁飞², 赵维良^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 考察产地和生长年限对土茯苓中落新妇苷含量的影响, 了解近年来土茯苓商品的来源和各地产土茯苓落新妇苷含量的分布情况。方法 实地调查、采集并采用 HPLC 测定落新妇苷的含量。结果 目前市场上土茯苓商品主要来自国内南方各省, 此外还有部分来自越南。国产土茯苓有约 70% 的样品落新妇苷含量不符合中国药典 2015 版规定, 而越南产土茯苓含量全部符合规定, 且远高于限度要求。结论 不同产地土茯苓落新妇苷含量差别较大, 生长年限对土茯苓中落新妇苷含量影响较小, 越南产土茯苓能否供药用尚需做进一步研究。

关键词: 土茯苓; 光叶菝葜; 落新妇苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)06-0803-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.06.032

Influence of Origin and Growth Years to the Content of Astilbin in *Smilacis Glabrae Rhizoma*

YAN Aijuan¹, GUO Zengxi², ZHANG Wenting², HUANG Qinwei², QI Yanfei², ZHAO Weiliang^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of growing places and years to the content of astilbin in *Smilacis Glabrae Rhizoma*. To know the source of *Smilacis Glabrae Rhizoma* in markets recently and research the distribution of astilbin in *Smilacis Glabrae Rhizoma*. **METHODS** Field survey and collect sample, determine the content of astilbin by HPLC. **RESULTS** The main goods of *Smilacis Glabrae Rhizoma* in market now were most produced in the southern provinces of China, others were from Viet Nam. About 70% native *Smilacis Glabrae Rhizoma* were failing to conform the limit of Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition, but all the specimen produced in Viet Nam were qualified. **CONCLUSION** The quantity of astilbin among the different places have great distance, but the growth years have less influence. Whether the *Smilacis Glabrae Rhizoma* produced in Viet Nam can be used as a medicine still needs further research.

KEY WORDS: *Smilacis Glabrae Rhizoma*; *Smilax glabra* Roxb.; astilbin

作者简介: 严爱娟, 女, 硕士生 Tel: 18767167708
 硕导 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.cn

E-mail: 1179861289@qq.com *通信作者: 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师,