

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.21.009

高效液相色谱法同时测定灵芝糖浆中4种成分*

薛平, 黄强燕, 李莉, 承晨, 张佳莉, 王倬恒, 姚晓, 顾峥嵘[△]

(江苏省常州市食品药品监督管理局检验中心, 江苏 常州 213000)

摘要:目的 建立测定灵芝糖浆中4种灵芝酸类成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱采用 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢铵水溶液(27:73, V/V), 等度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 15℃, 检测波长为 254 nm。结果 灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B、灵芝酸 A 进样质量浓度分别在 0.982 9~78.630 6 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.996 0~79.678 3 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.985 4~78.834 1 μg/mL($r=0.999\ 9$)和 0.984 6~78.765 2 μg/mL($r=0.999\ 8$)范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率分别为 96.08%, 101.75%, 98.68%, 97.58%, RSD 分别为 0.94%, 2.89%, 1.55%, 2.64% ($n=6$);精密度和重复性均良好。结论 该方法简便、准确,可用于灵芝糖浆中灵芝酸类成分的质量控制。

关键词:灵芝糖浆;三萜类;灵芝酸;高效液相色谱法;质量控制

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)21-0032-04

Simultaneous Determination of Four Components in Lingzhi Syrups by HPLC

XUE Ping, HUANG Qiangyan, LI Li, CHENG Chen, ZHANG Jiali, WANG Zhuoxuan, YAO Xiao, GU Zhengrong

(Changzhou Institute for Food and Drug Control, Changzhou, Jiangsu, China 213000)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of the triterpenes ganoderic acids in Lingzhi Syrups. **Methods** The chromatographic column was Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L ammonium dihydrogen phosphate solution(27:73, V:V) with isocratic elution, the flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 15℃ and the detection wavelength was 254 nm. **Results** Ganoderic acids C₂, G, B, A showed good linear relationship within the ranges of 0.982 9-78.630 6 μg/mL($r=0.999\ 9$), 0.996 0-79.678 3 μg/mL($r=0.999\ 9$), 0.985 4-78.834 1 μg/mL($r=0.999\ 9$) and 0.984 6-78.765 2 μg/mL($r=0.999\ 8$), the average recoveries were 96.08%, 101.75%, 98.68% and 97.58%, RSDs were 0.94%, 2.89%, 1.55% and 2.64% ($n=6$), respectively. The precision and repeatability were good. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the quality control of triterpenes ganoderic acids in Lingzhi Syrups.

Key words: Lingzhi Syrups; triterpenes; ganoderic acids; HPLC; quality control

*基金项目:江苏省食品药品监督管理局科研项目[20170218]。

第一作者:薛平,男,硕士研究生,主管中药师,主要从事中药检验工作,(电话)0519-86629692(电子邮箱)xuepinggo@163.com。

[△]通信作者:顾峥嵘,女,大学本科,主任中药师,主要从事中药检验工作,(电话)0519-86629890(电子邮箱)707195740@qq.com。

具体用量及浓度标准规定,有可能存在使用蜂蜜用量过度等情况,导致被轻度污染的微生物受到高糖浓度蜂蜜抑制,使药品微生物检验中出现假阴性结果,从而对药品质量的判定带来影响。

2015年版《中国药典》对辅料蜂蜜的标准未明确规定,建议研究制订辅料蜂蜜及相关技术领域的标准,以更好地规范制药行业的生产行为,确保药品质量安全。

参考文献:

- [1] 闫玲玲,杨秀芬.蜂蜜的化学组成及其药理作用[J].特种经济动植物,2005,8(2):40.
- [2] GAVANJI S, LARKI Z. Comparative Effect of Propolis of Honey Bee and Some Herbal Extracts on Candida Albicans[J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(3): 201-207.
- [3] 刘友谊.蜂蜜——饮料的甜味剂和防腐剂[J].食品与发酵科技,1994(1):46-47.
- [4] AYERS GS. Honey quality from a unifloral source[J]. American Bee Journal, 2002, 142(9): 657-660.

- [5] VIUDA-MARTOS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁN J, et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly[J]. Journal of Food Science, 2010, 73(9): R117-R124.
- [6] 黄娟,欧小群,韩丽.蜂蜜的现代临床应用综述[J].中国当代医药,2012,19(21):20-22.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:附录140-附录151.
- [8] 杨晓莉,李辉,马英英,等.中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J].药物分析杂志,2016,36(6):1101-1107.
- [9] 杜学慧,高艾英,张昊,等.高效液相色谱法测定蜂蜜中的果糖、葡萄糖和蔗糖[J].中国计量,2013(7):84-86.
- [10] 冯立彬,武生,张晓冬.蜂蜜中糖类成分的分离及含量测定[J].中医药学报,2004,32(3):26-27.
- [11] 朱威,胡福良.蜂蜜抗菌特性在医药上的应用[J].蜜蜂杂志,2003(8):23-24.
- [12] 黄东萍,蒋贵发,周文誉,等.几种蜂蜜对幽门螺旋杆菌体外抗菌作用[J].时珍国医国药,2006,17(10):1989-1990.

(收稿日期:2019-03-22)

灵芝糖浆是由灵芝制成的单方制剂,功能养心安神、健脾和胃,用于心悸、失眠、食欲不振及神经衰弱。其制备工艺主要是将灵芝粉碎成粗粉,照流浸膏剂与浸膏剂项下的渗漉法,用80%乙醇作溶剂,浸渍1周后,缓慢渗漉至无色,收集渗漉液,回收乙醇;药渣加水煎煮2次,每次2h,合并煎液,滤过,滤液与渗漉液合并,浓缩至相对密度为1.16~1.18(60℃),加入蔗糖600g及苯甲酸钠适量溶解后,滤过,加水调整总量至1000mL,搅匀,即得^[1-3]。灵芝含有多糖类、氨基酸、多肽、三萜类、生物碱等多种化学成分,具有镇静安神、降血糖、保肝解毒、抗肿瘤、免疫调节等作用,其中三萜类和多糖类化学物质被认为是主要有效成分,常作为衡量灵芝质量的依据^[3-5]。目前灵芝糖浆质量控制仍执行《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十七册)》,无指标性成分控制。本研究中从三萜中的灵芝酸类成分角度出发,采用高效液相色谱(HPLC)法测定了市场上常见厂家不同批次的产品,为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo U3000 型高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),包括 LPG-3400SDN 泵, WPS-3000 型 TLSL Analytical 自动进样器, TTC-3000RS 型柱温箱, DAD-3000 型二极管阵列检测器; XP105DR 型电子天平(十万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

灵芝酸 C₂(批号为 180517,含量为 98.19%),灵芝酸 G(批号为 18032609,含量为 99.30%),灵芝酸 A(批号为 18032603,含量为 98.26%)均购于成都普菲德生物科技有限公司;灵芝酸 B(北京世纪奥科生物技术有限公司,批号为 171030,含量为 98.15%)。水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

灵芝糖浆分别来自 5 个不同厂家,即江苏新先制药有限公司、江西省芙蓉堂药业股份有限公司、大理白族自治州中药制药有限公司、株洲千金药业股份有限公司

和江西杏林白马药业有限公司,编号分别为 A,B,C,D,E。详见表 1。

表 1 样品信息

编号	批号	厂家	编号	批号	厂家	编号	批号	厂家
X-1	1804 小样	A	X-9	170502	A	DL-2	170302	C
X-2	161204	A	X-10	170605	A	DL-3	170403	C
X-3	170201	A	X-11	170701	A	DL-4	170404	C
X-4	170207	A	F-1	170101	B	Q-1	20170602	D
X-5	170301	A	F-2	170601	B	Q-2	20170604	D
X-6	170304	A	F-3	180401	B	XL-1	170702	E
X-7	170404	A	F-4	180526	B	XL-2	171123	E
X-8	170405	A	DL-1	170301	C	XL-3	180202	E

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-13]与系统适用性试验

色谱柱:安捷伦 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速:0.8 mL/min;流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢铵水溶液(27:73, V/V),等度洗脱;柱温:15℃;检测波长:254 nm;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。取线性关系考察项下同一浓度的混合对照品溶液,按拟订色谱条件进样,记录色谱图,灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B、灵芝酸 A 峰的理论板数均不得低于 3 500,分离度均大于 1.5。

2.2 溶液制备

分别取灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B、灵芝酸 A 对照品适量,精密称定,置 100 mL 容量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 含灵芝酸 C₂ 100.1 μg、灵芝酸 G 100.3 μg、灵芝酸 B 100.4 μg、灵芝酸 A 100.2 μg 的混合对照品贮备液。精密量取 25 mL 样品溶液,用乙酸乙酯振摇提取 5 次,每次 25 mL,合并乙酸乙酯提取液,乙酸乙酯提取液回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。取空白试剂(水),按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

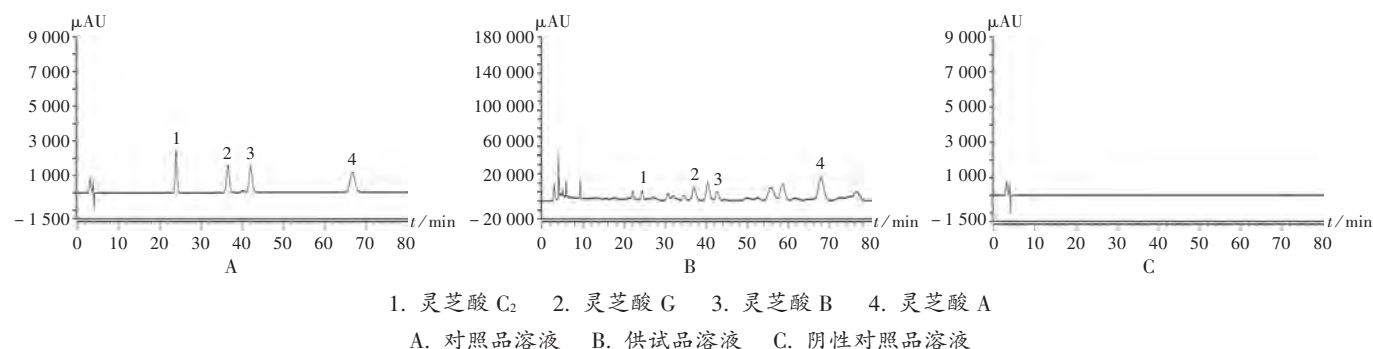


图 1 高效液相色谱图

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下3种溶液,进样10 μL 测定。阴性对照品溶液色谱中,在与对照品溶液及供试品溶液色谱峰相应处无4种被测组分的峰出现,阴性对照无干扰,专属性良好(图1)。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下混合对照品贮备液,精密吸取1,2,5 mL,分别置100 mL容量瓶;量取5 mL,置50 mL容量瓶,量取5 mL和8 mL分别置10 mL容量瓶。加入甲醇稀释至刻度,制成6个不同质量浓度的对照品溶液,按拟订色谱条件进行测定,进样10 μL ,以峰面积值(Y)为纵坐标、质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归。结果见表2。

表2 4种成分的线性回归方程和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
灵芝酸 C ₂	$Y = 7445.9X + 2698.0$	0.9999	0.9829 ~ 78.6306
灵芝酸 G	$Y = 6681.7X + 4317.3$	0.9999	0.9960 ~ 79.6783
灵芝酸 B	$Y = 7909.1X + 1698.1$	0.9999	0.9854 ~ 78.8341
灵芝酸 A	$Y = 9429.0X + 1990.8$	0.9998	0.9846 ~ 78.7652

精密密度试验:精密吸取线性关系考察项下同一浓度的混合对照品溶液,按拟订色谱条件重复进测定6次。结果灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B 和灵芝酸 A 的峰面积 RSD 分别为0.48%,0.80%,0.78%和0.42% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:精密量取样品(编号X-1)25 mL,依法制备6份供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B 和灵芝酸 A 峰面积的 RSD 分别为1.70%,1.35%,0.73%,1.29% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:精密量取样品(编号X-1)25 mL,依法制备供试品溶液,分别在0,4,8,12,16,24 h时测定。结果灵芝酸 C₂、灵芝酸 G、灵芝酸 B 和灵芝酸 A 峰面积的 RSD 分别为1.59%,0.57%,0.73%,0.50% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:精密量取样品15 mL(编号X-1),分别加入灵芝酸 C₂(45.20 $\mu\text{g/mL}$)1 mL,灵芝酸 G(102.7 $\mu\text{g/mL}$)1 mL、灵芝酸 B(40.50 $\mu\text{g/mL}$)0.5 mL和灵芝酸 A(81.10 $\mu\text{g/mL}$)1 mL,并稀释至25 mL,依法制备供试品溶液,并测定含量,计算回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

精密量取不同厂家各批次灵芝糖浆样品,依法制备供试品溶液,并测定含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

前期试验参考文献[6],使用流动相为乙腈-0.04%

表3 加样回收试验结果($n=6$)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
灵芝酸 C ₂	40.5879	44.3819	82.7603	95.02	96.08	0.94
	40.5879	44.3819	83.8858	97.56		
	40.5879	44.3819	83.8858	96.23		
	40.5879	44.3819	83.0081	95.58		
	40.5879	44.3819	83.4453	96.56		
灵芝酸 G	40.5879	44.3819	82.9940	95.55	101.75	2.89
	98.9420	101.9811	200.4351	99.52		
	98.9420	101.9811	208.1360	107.07		
	98.9420	101.9811	204.4079	103.42		
	98.9420	101.9811	200.8459	99.92		
灵芝酸 B	98.9420	101.9811	201.2171	100.29	98.68	1.55
	98.9420	101.9811	201.4191	100.49		
	20.7509	19.8754	40.0100	96.90		
	20.7509	19.8754	40.0384	97.04		
	20.7509	19.8754	40.4266	99.00		
灵芝酸 A	20.7509	19.8754	40.5075	99.40	97.58	2.64
	20.7509	19.8754	40.8211	100.98		
	20.7509	19.8754	40.3748	98.73		
	88.1535	79.6889	169.6285	102.24		
	88.1535	79.6889	165.0304	96.47		
灵芝酸 A	88.1535	79.6889	166.5115	98.33	97.58	2.64
	88.1535	79.6889	163.7456	94.86		
	88.1535	79.6889	164.7505	96.12		
	88.1535	79.6889	165.8057	97.44		
	88.1535	79.6889	165.8057	97.44		

甲酸溶液梯度洗脱相同的色谱柱,经过调整后未能使目标峰达到较好地分离,曾考察流动相乙腈与0.05 mol/L磷酸二氢铵水溶液^[9]或各种酸(0.1%磷酸、0.1%甲酸和0.1%冰醋酸)^[6-13]、流动相流速(0.8 mL/min和1.0 mL/min)、柱温(15,25,35,40 $^{\circ}\text{C}$)^[9-12],发现流速为0.8 mL/min、流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢铵水溶液(27:73, V/V)、柱温为15 $^{\circ}\text{C}$ 时,目标峰峰形较好,且分离效果较好,纯度较高。检测波长参考相关文献并结合实际情况,发现在254 nm波长处目标峰有较大吸收^[6-13],适宜作为含量测定的检测波长。曾考察不同品牌色谱柱[250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm 的色谱柱(安捷伦 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱、安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱、岛津 Inertsil ODS-3 液相色谱柱和沃特世 Waters X Bridge 色谱柱)]均能使目标峰达到较好的分离效果和纯度。

3.2 提取条件优化

前期试验发现,4种灵芝酸含量相对较高,故选取为测定指标性成分。由于样品中4种灵芝酸含量普遍较低,且含有大量的蔗糖等水溶性物质,所以测定前需要提取纯化,并浓缩样品。供试品溶液制备过程前期,考察

表4 24批样品含量测定结果($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

编号	灵芝酸 C ₂	灵芝酸 G	灵芝酸 B	灵芝酸 A
X-1	2.708 6	6.616 0	1.388 9	5.888 6
X-2	4.396 7	14.384 2	3.147 9	11.884 1
X-3	7.608 3	21.007 0	6.052 4	19.489 2
X-4	7.331 7	21.188 1	6.012 0	19.976 8
X-5	7.156 1	19.865 6	5.923 6	17.451 6
X-6	5.295 7	17.293 9	4.465 0	14.196 8
X-7	6.470 9	19.541 9	4.656 5	18.695 6
X-8	6.819 8	19.996 1	4.972 6	11.884 1
X-9	3.884 7	14.413 9	3.207 4	11.902 6
X-10	4.047 1	13.787 7	3.249 5	12.465 7
X-11	4.262 1	9.857 2	2.194 7	9.713 9
F-1*	33.716 7	59.010 0	37.956 9	123.572 2
F-2*	22.273 0	48.147 6	28.249 1	122.590 3
F-3*	21.853 8	55.345 9	27.495 5	115.991 6
F-4*	18.189 7	48.333 0	24.243 9	96.457 9
DL-1*	133.256 4	41.938 6	77.199 4	136.666 9
DL-2*	103.363 0	33.543 1	61.565 5	108.242 1
DL-3*	99.712 8	32.085 5	59.388 0	106.804 8
DL-4*	121.587 2	40.216 6	72.900 6	124.232 1
Q-1	9.862 7	19.956 1	9.710 4	33.691 0
Q-2	2.037 7	4.538 0	1.775 2	4.635 6
XL-1	5.278 5	8.927 9	3.820 6	12.866 0
XL-2	6.745 5	12.059 3	5.377 8	20.129 3
XL-3	5.301 6	11.272 6	5.025 9	18.984 2

注: * 批次样品均稀释1倍后,进样10 μL 。

了不同的提取溶剂^[13-16](石油醚 30~60℃、石油醚 60~90℃、乙醚、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯和甲酸乙酯)、提取过程加不加酸(甲酸)、最佳溶剂的提取次数(2,3,4,5,6次)。根据试验结果、提取效率和使用便利性,发现无需加酸,采用乙酸乙酯萃取5次,就可达到较满意的提取效果。

3.3 结果分析

试验过程中发现,不同厂家的样品含量具有显著差异,生产厂家B(灵芝酸A)和生产厂家C(灵芝酸C₂、灵芝酸A)2家的样品部分灵芝酸已超出曲线范围,推测可能由于原料和制剂工艺的差异性导致不同品牌之间含量差异显著。测定了生产厂家A一批灵芝原料、样品中间体,与厂家面对面交流后发现,在生产灵芝糖浆过程中,醇提渗漉液回收乙醇后,会出现大量的沉淀,为了后期样品处理方便和得到最终完

美清澈的溶液型样品,弃去了大部分沉淀(脂溶性成分),对此部分沉淀的处理工艺控制不严,导致大量的灵芝酸类成分被弃去。这可能是同一品牌不同批次产品不稳定,不同品牌灵芝糖浆灵芝酸类含量差异较大的主要原因。

目前,该制剂标准仅检测了相对密度,缺乏专属性检查,导致市面上缺乏对该制剂品质的衡量标尺,4种灵芝酸含量相对较高,具有代表意义,方法相对简便,结果可靠,可为厂家灵芝糖浆质量控制与品质评价提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十七册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:122.
- [2] 王振勇,刘天舒,左之文,等. 灵芝糖浆治疗心脾两虚型神经衰弱160例[J]. 湖南中医杂志,2007(2):54-55.
- [3] 曹国荣. 灵芝糖浆口服液治验二则[J]. 湖南中医杂志,1999(3):68.
- [4] 李国华,李 晔,梅锡玲,等. 灵芝三萜类化合物研究进展[J]. 中草药,2015,46(12):1858-1862.
- [5] 路 娟,秦加长,陈 苹,等. 六种不同来源灵芝的质量差异性研究[J]. 中医药信息,2012,29(2):17-20.
- [6] 李保明,古海峰,李 晔,等. HPLC测定不同产地灵芝中9种三萜酸[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3599-3603.
- [7] 董虹玲,夏广萍,赵娜夏,等. HPLC法测定灵芝子实体和孢子粉中灵芝酸C₂、灵芝酸G和灵芝酸A[J]. 现代药物与临床,2013,28(1):41-43.
- [8] 黄文康,黄琴伟,郭增喜,等. HPLC法测定赤芝不同生长期不同部位灵芝酸A的含量[J]. 中国食用菌,2017,36(1):56-58.
- [9] 王文正,李 腾,李 霞. 泰山赤灵芝中灵芝酸和灵芝酸A的测定[J]. 安徽农业科学,2017,45(33):123-125.
- [10] 乐 巍,吴玉兰,朱苗花,等. “芝”类药材HPLC图谱及化学分类学研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(2):374-376.
- [11] 范 蕾,陈琴鸣,陈张金,等. 灵芝一测多评质量控制方法的研究[J]. 中国药师,2018,21(5):828-832.
- [12] 王 勇,陈 硕,卢端萍,等. HPLC-ESI-MS和HPLC法分析测定灵芝醇提取物中3种灵芝酸[J]. 药物分析杂志,2013,33(2):292-298.
- [13] 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.
- [14] 钟文雨,于士龙,汪 宇. 芪桑口服液质量标准提高研究[J]. 中国药业,2019,28(4):22-24.
- [15] 赵 准,季玉林,吴建明,等. 高效液相色谱法测定逍遥分散片中甘草苷含量[J]. 中国药业,2019,28(3):31-33.
- [16] 郭 姪,王文婷,袁 林. 高效液相色谱法同时测定舒筋活血片中5种成分[J]. 中国药业,2019,28(3):39-41.

(收稿日期:2019-03-25)

本栏目由

重庆药友制药有限责任公司

协办