

HPLC 测定灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 的含量

蒋婷婷¹, 卢端萍², 黄旭慧^{1*} (1.福建省立金山医院(福建省立医院南院), 福州 350028; 2.福建省食品药品质量检验研究院, 福州 350001)

摘要: 目的 建立灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 的含量测定方法。方法 采用 Agilent Zorbax-SB C₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 以乙腈-0.1%醋酸(25:75)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 256 nm, 柱温 22 °C。结果 灵芝酸 C₁ 在 1.002~25.04 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 97.47%。不同来源的灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 含量有一定差别且含量均较低, 部分样品中不含有灵芝酸 C₁。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可为灵芝孢子油的质量控制提供参考。

关键词: 灵芝孢子油; 高效液相色谱; 灵芝酸 C₁; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)05-0726-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.021

引用本文: 蒋婷婷, 卢端萍, 黄旭慧. HPLC 测定灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 726-728.

Determination of Ganoderic Acid C₁ in *Ganoderma Lucidum* Spore Oil by HPLC

JIANG Tingting¹, LU Duanping², HUANG Xuhui^{1*} (1.Fujian Provincial Hospital Jinshan Branch(Fujian Provincial Hospital South Branch), Fuzhou 350028, China; 2.Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the content determination of ganoderic acid C₁ in *Ganoderma lucidum* spore oil. **METHODS** The determination was performed on an Agilent Zorbax-SB C₈ column(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid(25:75) as a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 256 nm and the column temperature was 22 °C. **RESULTS** The ganoderic acid C₁ showed a good linearity in the range of 1.002–25.04 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and the average recovery was 97.47%. The contents of ganoderic acid C₁ in *Ganoderma lucidum* spore oil from different origins had a certain difference. The contents of ganoderic acid C₁ in samples were low and some samples didn't contain ganoderma lucidum acid C₁. **CONCLUSION** The established method is simple, accurate and repeatable, which can provide reference for the quality control of *Ganoderma lucidum* spore oil.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum* spore oil; HPLC; ganoderic acid C₁; content determination

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], 是我国传统中药, 具有补气安神, 止咳平喘之功效, 已有上千年的药用历史^[2]。灵芝孢子是灵芝的种子, 其内壁含有淡黄色到淡黄褐色的油滴, 而灵芝孢子油是从灵芝孢子中萃取出的油脂类物质^[3], 集中了灵芝孢子中诸多有效成分, 如三萜类灵芝酸、不饱和脂肪酸和微量元素等^[4], 研究表明具有抗肿瘤^[5]、免疫调节^[6]、保肝护肝^[7]等作用, 被广泛应用于医药行业。灵芝孢子油由于没有统一的国家标准, 大部分企业对灵芝孢子油功效性成分的测定都采用 UV 测定总三萜含量。但笔者前期研究发现, UV 测定总三萜的方法专属性不强, 香草醛-冰乙酸-高氯酸体系对油类产品中的油脂成分

均会显色, 市售的大豆油、植物油等食用油总三萜的含量均高于灵芝孢子油, 与李菁等^[8]报道一致。因此以 UV 测定总三萜含量作为灵芝孢子油产品质量控制方法并不适宜。另外, 有些学者通过 HPLC 测定了灵芝孢子油中的麦角甾醇^[9]、甘油三酯类^[10-11]的含量。而灵芝酸作为灵芝产品的特异性成分, 目前国内外尚未有灵芝孢子油中某种灵芝酸含量测定的报道。笔者前期研究发现灵芝孢子油中含有三萜类成分灵芝酸 C₁, 鉴于此, 本研究建立了灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 含量测定方法, 并测定不同来源的灵芝孢子油中灵芝酸 C₁ 的含量, 以期对灵芝孢子油质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ-300TED 台式高频数控超声波清洗器(昆

作者简介: 蒋婷婷, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0591)88618576
(0591)88618972 E-mail: huangys1024@163.com

E-mail: jtt3088@163.com *通信作者: 黄旭慧, 女, 主任药师 Tel:

山市超声仪器有限公司); Sartorius arium 611DI 超纯水器(德国赛多利斯)。

灵芝酸 C₁ 对照品(中国医学科学院药物研究所提供,批号:G-029,纯度≥98%);灵芝孢子油(福建省仙芝楼,批号:P II-1, P II-2, P II-3, P II-4-1, P II-4-2, P II-5-1, P II-5-2, P II-11, P II-9, P II-10, QII-13-1, QII-13-2); 甲醇(分析纯,杭州试剂公司); 乙腈(色谱纯,德国默克公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax-SB C₈(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%醋酸水溶液(25:75); 检测波长为 256 nm; 柱温为 22 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取减压干燥至恒重的灵芝酸 C₁ 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 12 μg 灵芝酸 C₁ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取灵芝孢子油 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 5 mL,密塞,称重,超声 25 min,静置冷却,称重,加甲醇补足失重,摇匀,放入冰箱冰冻,待孢子油凝固于锥形瓶底层时,吸取上清液,放至室温,滤过。

2.2.3 测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪测定,即得。对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 1。

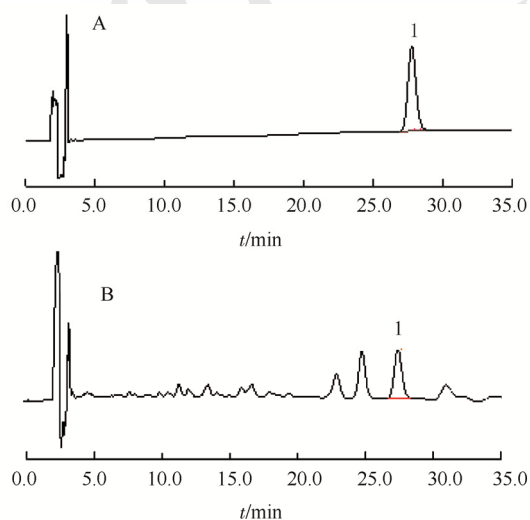


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-灵芝酸 C₁。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; 1-ganoderic acid C₁.

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密称取灵芝酸 C₁ 对照品适量,加甲醇分别制成 1.002, 1.252, 3.756, 6.260, 12.52, 25.04 μg·mL⁻¹ 的灵芝酸 C₁ 对照品溶液,按“2.1”项色谱条件测定。以浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标,相应峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线。得灵芝酸 C₁ 的线性回归方程为 $y=15366x-1113.8$, $r=0.9999$ 。试验表明灵芝酸 C₁ 在 1.002~25.04 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系。

2.3.2 加样回收率试验 精密称取已知含量的灵芝孢子油(批号: P II-5-1)样品 6 份,精密加入一定量灵芝酸 C₁ 对照品,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,计算平均回收率为 97.47%,RSD 为 0.62%,结果见表 1。

表 1 灵芝酸 C₁ 加样回收率结果

Tab. 1 Recovery results of ganoderma acid C₁

编号	样品中含 量/mg	对照品加 入量/mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1	0.030 2	0.030 9	0.060 2	97.22	97.47	0.62
2	0.028 8	0.030 9	0.058 7	96.72		
3	0.029 2	0.030 9	0.059 1	97.20		
4	0.029 0	0.030 9	0.059 2	97.89		
5	0.029 5	0.030 9	0.059 9	98.45		
6	0.029 3	0.030 9	0.059 3	97.36		

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批灵芝孢子油样品(批号: P II-5-1)6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件测定,计算灵芝酸 C₁ 含量,结果 RSD 为 0.86%,说明该法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一灵芝孢子油样品分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样,按“2.1”项下色谱条件测定,计算灵芝酸 C₁ 含量,结果 RSD 为 0.64%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 样品的测定

各灵芝孢子油样品按“2.2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,计算含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验中考察了 4 个流动相系统: ①乙腈-水; ②乙腈-0.1%醋酸水溶液; ③乙腈-0.5%醋酸水溶液; ④乙腈-2%醋酸水溶液。结果发现醋酸浓度对分离结果影响较大,醋酸浓度为 0.1%和 0.5%时,灵芝酸 C₁ 与杂质峰均能较好分离,为减少对色谱柱的损害,本实验选择乙腈-0.1%醋酸水溶液作为

灵芝酸 C₁ 测定的流动相。

表 2 样品含量测定结果(n=12)

Tab. 2 Results of sample determination(n=12)

来源	批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
沈阳	P II-1	5.10
上海	P II-2	12.57
吉林蛟河市	P II-3	6.88
山东	P II-4-1	8.12
山东	P II-4-2	6.83
山东冠县	P II-5-1	57.76
山东冠县	P II-5-2	72.92
福建福州	p II-11	24.01
福建宁德	P II-9	未检出
江苏东台	P II-10	未检出
龙岩武平	Q II-13-1	未检出
龙岩武平	Q II-13-2	未检出

3.2 柱温选择

考察了不同柱温(20, 22, 25, 30 °C)对分离效果的影响, 结果发现柱温可能通过影响流动相中 pH 值而影响色谱峰的保留时间和分离度, 柱温为 22 °C 时灵芝酸 C₁ 色谱峰分离的较好, 故灵芝酸 C₁ 的测定柱温选择 22 °C。

3.3 提取溶剂的考察

实验中样品取样量为 1 g, 对不同溶剂体积进行考察(5, 10, 15 mL), 结果发现提取溶剂体积为 5 mL 时灵芝酸 C₁ 已提取完全。

3.4 提取时间的考察

对提取时间进行了考察(10, 15, 20, 25 min), 结果超声提取 25 min, 样品中灵芝酸 C₁ 才提取完全, 故选择 25 min 作为提取时间。

3.5 样品的测定

通过对 12 批不同来源的灵芝孢子油中的灵芝酸 C₁ 含量进行测定, 结果发现灵芝孢子油中的灵芝酸 C₁ 含量较低, 部分灵芝孢子油不含有灵芝酸 C₁。不同批号的灵芝孢子油中的灵芝酸 C₁ 含量差异较大, 可能与灵芝不同产地、灵芝孢子粉不同采收时间及灵芝孢子油的制备工艺有关。

4 结论

灵芝酸是灵芝产品的特异性成分, 已鉴定出的灵芝酸种类较多, 笔者前期研究发现, 灵芝药材中含量较多的灵芝酸 A、灵芝酸 B 等极性较大的灵芝酸在孢子油中并不存在, 灵芝孢子油中含有灵芝酸 C₁, 可能与其制备工艺有关。灵芝孢子油是采用超临界 CO₂ 萃取得到的脂溶性物质, CO₂ 极性较弱, 对于极性较强物质的萃取不理想, 而灵芝酸 C₁ 相对于其他灵芝酸的极性较低, 因此较容易被萃取出来。本实验通过对 12 批灵芝孢子油中

灵芝酸 C₁ 的含量进行测定, 结果发现灵芝酸 C₁ 含量均较低, 部分样品不含有灵芝酸 C₁, 而文献^[12-13]报道采用 UV 测定灵芝孢子油中的总三萜含量均较高, 实际上是由于方法专属性差造成的含量虚高现象, 与实际不符, 容易误导读者和消费者。本实验方法的建立可为灵芝孢子油的质量控制提供参考依据。

REFERENCES

- [1] FAN L, YU L, YU H L, et al. Determination of three triterpenoid acid in ganoderma and its characteristic chromatograms [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(8): 1041-1045.
- [2] WANG Y, JIN J, JIN Z H, et al. Study on immune-enhancing effects of *Ganoderma lucidum* spore powder [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(5): 544-546.
- [3] 王青青, 吴水生. 灵芝孢子油的氧化稳定性[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(1): 50-51.
- [4] LI S Z, XIE Y Z, ZHOU J W, et al. Analysis on bioactive ingredients in *Ganoderma lucidum* spore oil and its effects on reducing serum lipid *in vivo* [J]. Edib Fungi China(中国食用菌), 2006, 25(5): 40-42.
- [5] ZHAO G F, GUO W, ZHAO X Y, et al. Glossy *Ganoderma spore* oil promotes apoptosis of human lung adenocarcinoma SPC-A1 through downregulation of miR-21 [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(9): 1231-1234.
- [6] YI Y J, HU S, XIONG X Y, et al. Immunoregulatory function of *Ganoderma* spore oil in immunocompromised mice [J]. J Zhejiang Univ(Agric & Life Sci)(浙江大学学报 农业与生命科学版), 2013, 39(2): 161-166.
- [7] HUANG J K, WANG F Y, HUANG Q, et al. Experimental study on the enhancement of immune function by the oil from spores of *Ganoderma lucidum* and its protective effects against liver injury in mice [J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2007, 34(7): 1272-1274.
- [8] 李菁, 曾荣华, 陈文俊, 等. 灵芝孢子油的总三萜测定研究及 HPLC 鉴别[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1621-1623.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] WAN M Z, WANG T H, ZHANG L Y, et al. Determination of 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl glycerol in *Ganoderma lucidum* spore oil by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2014, 25(2): 218-221.
- [12] 梁静, 何威之, 李琴韵. 灵芝孢子油中三萜类成分的定量研究[J]. 中成药, 2007, 29(10): 1529-1531.
- [13] LI X M, XIE Y Z, PAN H H, et al. The relationship of *Ganoderma lucidum* Spore Oil quality testing indicators and its anti-tumor cell activity [J]. Edible Fungi China(中国食用菌), 2010, 29(2): 45-47.

收稿日期: 2016-09-08

(本文责编: 李艳芳)