

表 2 血复生片中芍药苷的含量测定结果(n=6)
Table 2 The Assay Results of Paeoniflorin in the Tables of Xue-FuSheng

批号	芍药苷的含量 / %	每片含芍药苷量 / μg
20120401	0.0374	112.2
20120402	0.0386	115.8
20120403	0.0357	107.1
20120404	0.0370	111.0
20120405	0.0391	117.3
平均值	0.0376	112.8

针对君药黄芪的定性和定量分析。血复生片的药味较多，因此，本文通过检测芍药苷的含量对制剂中的白芍和牡丹皮进行定量分析，是对血复生片质量研究的必要补充。流动相的选择^[3-5]，因目标成分芍药苷在酸性环境下稳定（pH=2~6），在碱性环境下不稳定。分别考查了乙腈-水、乙腈-酸水、乙腈-盐水、甲醇-水、甲醇-酸水、甲醇-盐水等不同流动相及不同比例，最后确定甲醇-0.1%磷酸溶液

(21:79)为流动相，分析图谱的分离度、拖尾因子及对称性等条件均达到《中华人民共和国药典》(2005版)中的要求。经方法学验证，该方法专属性强，空白对照无干扰，可以作为血复生片中含量测定指标，能够达到控制血复生片质量的目的。

参考文献:

[1] 芦美霞, 王璐, 袁浩, 等. HPLC-ELSD 测定血复生片中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(5): 9-11.
[2] 闫便杰, 牛安琦, 李彤晖, 等. 血复生片质量标准的研究[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4): 155-156.
[3] 刘浩. 反相高效液相色谱法测定白芍提取物中芍药苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2392-2393.
[4] 李越峰, 杨武亮, 沈菲, 等. 高效液相色谱测定白芍中芍药苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 438-439.
[5] 任建生, 马海泉, 蔡大伟. 芍药苷在复方中的定量分析研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 746-749.

(编辑: 宋威)

HPLC 法测定灵芝孢子油中 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯含量

万明珠, 王腾华, 张丽媛, 任灵芝, 谭 敏, 高幼衡(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定灵芝孢子油中 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯含量的方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱, 流动相: 乙腈-异丙醇(体积比为 51:49), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, ELSD 漂移管温度: 40 ℃, 载气流速: 2.4 L·min⁻¹。结果 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯在 2.7~27.0 μg 范围内线性关系良好(r=0.9996), 平均回收率为 99.3 %, RSD 值为 2.3 %。结论 该方法简便、准确、分离度好, 可用于灵芝孢子油中 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯的含量测定。

关键词: 灵芝孢子油; 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯; 含量测定; 高效液相色谱法
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0218-04
doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.027

Determination of 1, 2-Dioleoyl-3-palmitoyl glycerol in *Ganoderma lucidum* Spore Oil by HPLC
WAN Mingzhu, WANG Tenghua, ZHANG Liyuan, REN Lingzhi, TAN min, GAO Youheng(School of Chinese Meteria Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Gangzhou 510006 Guangdong, China)
Abstract: Objective To establish a method for the content determination of 1, 2-dioleoyl-3-palmitoyl glycerol in

收稿日期: 2013-09-29
作者简介: 万明珠, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分及质量标准研究。Email: wanmingzhuabc@126.com。通信作者: 高幼衡, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药及天然药物活性成分的研究。Email: gaoyouheng@gzucm.edu.cn。

Ganoderma lucidum spore oil by HPLC. **Methods** HPLC was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile–isopropanol (51 : 49) as the mobile phase and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of drift tube was 40 °C, and the flow rate of gas was 2.4 L·min⁻¹. **Results** The calibration curves of 1, 2–dioleoyl–3–palmitoyl glycerol were in good linearity in the range of 2.7~27.0 μg($r=0.9996$). The average recovery was 99.3 %, RSD being 2.3 %. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable with a good resolution, and can be used for the quantitative determination of 1, 2–dioleoyl–3–palmitoyl glycerol in *Ganoderma lucidum* spore oil.

Keywords: *Ganoderma lucidum* spore oil; 1, 2–Dioleoyl–3–palmitoyl glycerol; Content determination; HPLC

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是多孔菌科灵芝属(*Ganoderma*)真菌赤芝和紫芝的总称,是我国历史悠久的传统珍贵的中药材,具有很高的药用价值^[1]。灵芝孢子粉(*Ganoderma lucidum* spore)是在灵芝生长成熟期从菌盖弹射出来非常细小的孢子,具有灵芝的全部遗传活性物质。灵芝孢子油是灵芝孢子粉经超临界 CO₂ 萃取而得到的脂溶性物质,具有抗肿瘤、增强免疫调节、降血脂、降血糖、保肝护肝等作用^[2-4]。灵芝孢子油含有甘油三酯类、三萜类、氨基酸、有机锗、多糖等多种化学成分^[5-6]。周晓宏等^[7]已采用 HPLC 法测定灵芝孢子油中三油酸甘油酯的含量,但尚未见关于 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯含量测定的报道。本课题组对灵芝孢子油进行了系统的化学成分研究,首次分离并鉴定出 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯^[5,8],本实验采用 HPLC 法测定 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯的含量,为补充和完善灵芝孢子油的质量标准,合理利用灵芝孢子油资源以及开发新药提供了科学论据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC–高效液相色谱仪 (Sedex75 检测器、LC-20AT 泵、进样器 Prominence SIL-20A), N2000 色谱工作站, LIBROR AEG220 电子天平, 日本岛津公司; SB25-12DT 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 试药 灵芝孢子油原料药, 广州汉方现代中药研究开发有限公司, 批号: 110280, 110290, 110215, 110321, 110220, 110111, 120615, 121025, 120714, 130110, 130510; 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯对照品为实验室自制(经波谱解析鉴定结构, HPLC 归一化法计算其质量分数 > 98 %)。乙腈、异丙醇为色

谱纯, 天津致远化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

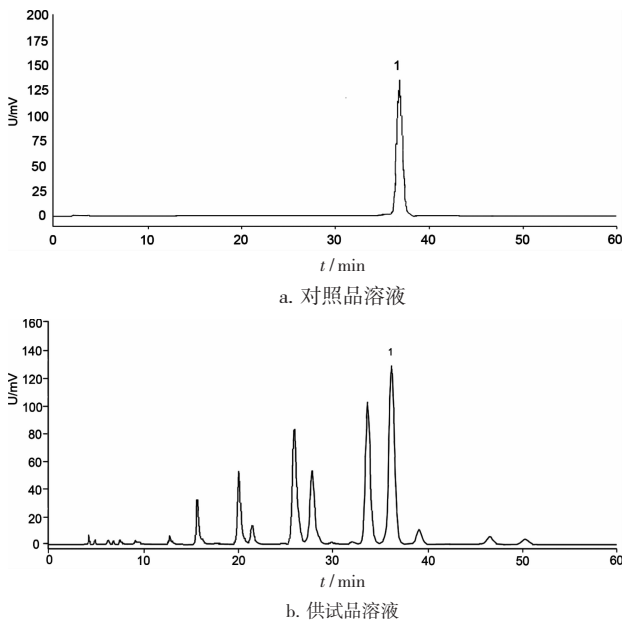
2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈–异丙醇 (体积比 51 : 49), 流速: 1 mL·min⁻¹, ELSD 漂移管温度: 40 °C, 载气流速: 2.4 L·min⁻¹, 进样量: 20 μL。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯适量, 用流动相稀释, 制成 1 mL 含有 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯 1.35 mg, 摇匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取灵芝孢子油 80 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加入流动相溶解并稀释到刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 系统适用性考察 分别取对照品溶液 20 μL, 供试品溶液 20 μL 注入色谱仪, 记录色谱图见图 1, 结果 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯的拖尾因子为 1.05; 灵芝孢子油中的 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯与其他组分的色谱峰分离度良好, 以 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯计算色谱柱的理论塔板数高于 3000。

2.5 线性关系的考察 分别取 2.2 项下的对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置于 5 mL 容量瓶中, 加入乙腈–异丙醇 (体积比 51 : 49) 定容, 摇匀, 即得系列质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取不同质量浓度的对照品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯进样量的常用对数 (X) 为横坐标, 峰面积的常用对数 (Y) 为纵坐标, 得回归方程为: $Y=1.4689X+4.6006$, $r=0.9996$, 1, 2–二油酸–3–棕榈酸甘油酯



1 为 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯
图 1 对照品(a)、供试品(b)溶液的 HPLC-ELSD 图
Figure 1 HPLC-ELSD chromatograms of reference(a) and sample (b) solution

在 2.7 ~ 27.0 μg 范围内线性关系良好。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积。结果 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯峰面积 RSD 为 2.1 %，表明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 吸取 2.3 项下供试品溶液，进样时间为 0, 2, 4, 8, 10, 12 h，各进样 20 μL ，记录峰面积。结果峰面积 RSD 为 2.7%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 精密称取同一批灵芝孢子油 6 份，分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液，各进样 20 μL ，记录峰面积。计算灵芝孢子油中 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯含量，RSD 为 2.5 %，表明该方法重复性良好。

2.6.4 加样回收率试验 精密称取已知 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯质量分数的样品 6 份，分别精密加入 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯对照品储备液 2 mL，定容到 5 mL 的容量瓶中，摇匀，滤过，取续滤液，进样。测得平均回收率为 99.3 %，RSD 为 2.3 %，见表 1。

2.7 样品含量测定 精密取 11 批样品，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

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 Results of sample-added recovery test							
序号	样品量/mg	样品中的量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	10.7	2.86	2.7	5.51	99.1	99.3	2.3
2	10.2	2.72	2.7	5.32	98.2		
3	9.9	2.64	2.7	5.49	102.8		
4	11.3	3.02	2.7	5.54	96.8		
5	9.7	2.59	2.7	5.35	101.1		
6	10.3	2.75	2.7	5.33	97.8		

录峰面积，按标准曲线计算 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯的含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

Table 2 Results of sample content determination		
样品	含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	平均含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
130510	257.2	268.2
130110	243.6	
120714	249.4	
121025	265.7	
120615	260.7	
110111	273.3	
110220	268.5	
110215	285.6	
110321	283.4	
110290	282.5	
110280	280.6	

3 讨论

据研究和文献报道灵芝孢子油主要含有甘油三酯类成分^[9]，具有抗肿瘤、增强人体免疫力、护肝等多种药理作用，而 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯在灵芝孢子油中所占含量最大，质量分数高达 26 %，可能为具有抗肿瘤功效的活性成分之一，可以用于评价灵芝孢子油的质量。

本研究选取了不同年份不同批次的灵芝孢子油原料药作为研究对象，结果表明随着灵芝孢子油存储时间的增加，1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯在灵芝孢子油中所占的质量分数有增大的趋势，分析其原因可能是由于灵芝孢子油中其他的甘油三酯类成分分解或被氧化的结果，将在以后的实验工作中进一步深入研究。

本研究建立高效液相色谱法检测灵芝孢子油中 1, 2- 二油酸 -3- 棕榈酸甘油酯的含量，经过系统的方法学考察，证实该方法具有简便、准确、专属性强、可重复的特点，为完善灵芝孢子油质量标准提

供参考依据。

参考文献:

- [1] LI Y, ZHU ZM, YAO WX, et al. Research status and progress of the triterpenoids in *Ganoderma lucidum* [J]. *Medicinal Plant* 2012, 3 (12): 75-81.
- [2] 胡舜, 易有金, 熊兴耀, 等. 灵芝孢子油的研究进展[J]. 安徽农业科技大学, 2010, 38(17): 9214-9215.
- [3] 曾荣华, 李菁. HPLC 法测定灵芝孢子油中甘油三油酸酯含量[J]. 中国执业药师, 2012, 9(8): 17-19.
- [4] 李向敏, 谢意珍, 潘鸿辉, 等. 灵芝孢子油检测标准与其抗肿瘤活

- 性的关系[J]. 中国食用菌, 2010, 29(2): 45-47.
- [5] 卢锦熙, 曾荣华, 王腾华, 等. 灵芝孢子油化学成分研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(4): 553-557.
- [6] 朱坚, 李晔, 邓优锦. 超临界 CO₂ 萃取灵芝孢子油的工艺研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(6): 50-52.
- [7] 周晓宏, 陈路林, 高幼衡, 等. HPLC-ELSD 法测定灵芝孢子油中三油酸甘油酯的含量[J]. 广东药学院学报, 2012, 12(1): 54-56.
- [8] 周晓宏. 灵芝孢子油的化学成分研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [9] 王杉, 周科勤, 范青生, 等. 超临界 CO₂ 萃取菌草灵芝孢子油中三萜类物质和脂肪酸的测定[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 74-76.

(编辑: 修春)

(上接第 191 页)

品保留时间及二级质谱一致, M5 鉴定为齐墩果酸。

3 讨论

吴丽花等^[9]研究表明, 口服药物在小肠被吸收后, 可能在代谢酶丰富的肠道进行代谢反应, 从而造成药物的生物利用度降低。本文通过 LC-LITMS/MS 技术对灌胃 B7 大鼠的粪便中的代谢产物进行了鉴定, 并对其在质谱中的峰面积分析发现, 在代谢产物中, 齐墩果酸、去甲基化及葡萄糖醛酸化代谢产物的相对峰面积较大, 二者峰面积相加超过了原型的 B7 的峰面积, 说明 B7 以肠道上的脱糖代谢及体内的葡萄糖醛酸化产物为主, 这有可能是 B7 体内生物利用度较低的原因, 具体 B7 在体内如何发生作用, 可能还需要进一步的组织分布研究来确定。

本文采用的 LC-LITMS/MS 对样品进行检测, 相比传统离子阱, 具有扫描方式多样化, 灵敏度高的特点, 一次扫描完成代谢产物的发现及识别。同时采用 EMS(增强母离子扫描)和 pMRM(预测离子对扫描)两种扫描模式进行扫描, EMS 能对样品的质谱信息进行全面的反馈, pMRM 扫描模式是根据分子结构对裂解可能产生的碎片离子对进行预测, 并对这些预测的离子对进行针对性的扫描。该方法能快速准确的对化合物进行检测, 避免了样品中的干扰离子

信息对数据分析造成的影响。虽然 LITMS/MS 还不能完全确证代谢产物的结构, 但是, 本文的结果可为我们了解 B7 的体内代谢过程提供可靠的参考。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1990: 704-705.
- [2] 韩进庭. 白头翁的药理活性及临床应用[J]. 现代医学卫生, 2007, 23(14): 2123-2124.
- [3] 俞洁. 白头翁药理作用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(7): 51-54.
- [4] Zheng YT, Zhou F, Wu XL, et al. 23-Hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin in vitro and in vivo[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 615-622.
- [5] 吴振洁, 丁林生, 赵守训, 等. 中药白头翁的苷类成分[J]. 中国药科大学学报, 1991, 2(5): 739-745.
- [6] 丁秀娟. 中药白头翁化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [7] Xu QM, Shu Z, He WJ, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7240 cells in vitro and vivo[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19: 293-300.
- [8] 曾苏. 药物代谢学(2)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 89-90.
- [9] 吴丽花, 马萌. CYP3A 和 P-糖蛋白与口服药物生物利用度[J]. 中国药房, 2003, 14(7): 437-439.

(编辑: 修春)