

HPLC-ELSD测定灵芝孢子油中8个甘油三酯类成分的含量

郭 原¹,朱米群²,钱一帆¹,温明皓²,陆宇婷²,宋 敏²,杭太俊^{2*}¹南京中科药业有限公司,南京 211102;²中国药科大学 药物分析系,南京 210009

摘 要 目的:建立灵芝孢子油中甘油三酯类成分含量的高效液相色谱-蒸发光散射检测测定法。方法:采用ODS(100 mm×4.6 mm,2.7 μm)色谱柱,以有机混合溶剂乙腈-无水乙醇-甲基叔丁基醚(45:45:10)为流动相等度洗脱,采用蒸发光散射检测法,分离了灵芝孢子油中8个主要甘油三酯类成分,以峰面积对数(lgA)为Y,质量浓度对数(lgC)为X进行线性回归并测定含量。结果:方法验证结果表明,各组分峰间的分离度符合要求,它们的蒸发光散射响应均在4.0~200 μg·mL⁻¹浓度范围呈现良好的线性关系($r > 0.999$),平均加样回收率为96.63%~107.53%(RSD < 5.0%)。结论:该方法专属性好,分析洗脱时间适宜,定量准确,满足灵芝孢子油中甘油三酯类成分质量控制的要求。

关键词 灵芝孢子油;甘油三酯;含量测定;高效液相色谱-蒸发光散射检测法

中图分类号 R927.2 **文献标志码** A **文章编号** 1673-7806(2023)05-430-04

DOI:10.13664/j.cnki.pcr.2023.05.008

灵芝孢子粉由多孔菌科真菌赤芝[*Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Fr.)Karst.]的干燥成熟孢子制得^[1]。灵芝孢子油(ganoderma lucidum spore oil, GLSO)是灵芝孢子破壁后,经超临界CO₂流体萃取得到的脂肪油,GLSO主要以甘油三酯(triglycerides, TGs)形式存在,同时还含有少量游离脂肪酸和类固醇酯^[2,3],具有抗炎、抗氧化、增强免疫力、抗癌等功效^[4-7]。其中, TGs 主要包括 1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯(1,2-linolein-3-olein, LLO)、1,2-二亚油酸-3-棕榈酸甘油酯(1,2-linolein-3-palmitin, LLP)、1,2-二油酸-3-亚油酸甘油酯(1,2-dioleoyl-3-linolein, OOL)、三油酸甘油酯(triolein, OOO)、1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯(1,2-olein-3-palmitin, OOP)、1,2-二油酸-3-硬脂酸甘油酯(1,2-olein-3-stearin, OOS)、1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯(1-palmitin-2-olein-3-linolein, POL)、1-棕榈酸-2-油酸-3-硬脂酸甘油酯(1-palmitin-2-olein-3-stearin, POS)等^[8],脂肪酸主要有油酸、亚油酸、棕榈酸^[9]等。

灵芝孢子油质量标准暂未收录于各国药品标准中。《浙江省灵芝孢子粉炮制规范》^[11]以乙腈-异丙醇(51:49)为流动相,蒸发光散射检测测定灵芝孢子粉中TGs的液相指纹图谱;有研究^[10-12]以乙腈-异丙醇为流动相(不同比例)等度洗脱,分离灵芝孢子油

中的各类TGs成分。但这些方法所需分析时间均较长(约60 min),样品分离效能低。本研究利用超高效液相色谱法(UPLC),以乙腈-无水乙醇-甲基叔丁基醚为流动相等度洗脱,显著提高了HPLC-ELSD检测灵芝孢子油中甘油三酯类成分含量的效率。

1 材 料

1.1 药品与试剂

灵芝孢子油软胶囊(南京中科药业股份有限公司,批号:20220418、20220802、20220902、20220928、20221008、20221018、20221125);对照品:LLO(批号:V067:12)、LLP(批号:X867:12)、OOL(批号:Y094:2)、OOO(批号:Y479:7)、OOP(批号:Y103:2)、OOS(批号:X510:9)、POL(批号:Y595:9)、POS(批号:Y578:9)均购自瑞典Larodan AB公司(纯度>99%);乙腈、无水乙醇、甲基叔丁基醚均为HPLC级(德国Merck公司)。

1.2 仪器

Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)色谱柱、1260 Infinity型高效液相仪、1260 Infinity型蒸发光散射检测器(美国Agilent公司)、BT25S分析天平(德国Sartorius公司)等。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

取各甘油三酯对照品适量,精密称定,分别用

作者简介 郭原,男,总经理 E-mail: 252962719@qq.com

***通信作者** 杭太俊,男,教授 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

收稿日期 2023-03-31 **修回日期** 2023-05-22

流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 2.5 mg 的溶液,作为各对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量,分别用流动相定量稀释制成每 1 mL 含 LLO、LLP、OOS、POS 约 20 μg 、OOL、POL 约 50 μg 、OOO、OOP 约 100 μg 的各对照品溶液。

分别精密量取各对照品储备液适量置同一量瓶中,加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含 LLP、POS、LLO、OOS 约 50 μg 、OOL、POL 约 120 μg 、OOO、OOP 约 250 μg 的混合溶液,作为混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液适量,加流动相定量稀释制成每 1 mL 含 LLP、POS、LLO、OOS 约 20 μg 、OOL、POL 约 50 μg 、OOO、OOP 约 100 μg 的混合对照品溶液。

取本品内容物适量,精密称定,加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 600 μg 的溶液,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 高效液相色谱条件

以 Agilent Poroshell 120 EC- C_{18} (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm) 为色谱柱;以乙腈-无水乙醇-甲基叔丁基醚(45:45:10)为流动相,流速为 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$,柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL ;蒸发光散射检测器参数为雾化器/漂移管温度 70 $^{\circ}\text{C}$,氮气流速 1.20 L $\cdot$ min $^{-1}$ 。

2.3 专属性与色谱系统适用性试验

精密量取“2.1”项下各对照品溶液、混合对照品溶液及供试品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果(图 1)表明以 OOO 为对照,LLO、LLP、OOL、POL、OOO、OOP、OOS、POS 的相对保留时间(relative retention time, RRT) 分别约为 0.61、0.64、0.78、0.81、1.00、1.04、1.34、1.40,峰形对称性和分离度良好,空白溶剂对各甘油三酯测定无干扰,且各甘油三酯分离度大于 1.5,理论塔板数按 OOO 计算不低于 3000,该方法专属性和系统适用性良好。

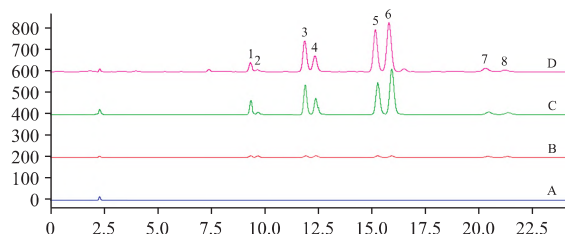


图 1 空白溶剂(A)、定量限溶液(B)、混合对照品溶液(C)及供试品溶液(D)中甘油三酯的 HPLC-ELSD 色谱图
1. LLO; 2. LLP; 3. OOL; 4. POL; 5. OOO; 6. OOP; 7. OOS; 8. POS

2.4 线性和范围

分别精密量取各对照品储备液适量置同一量瓶中,加流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含各甘油三酯 4、10、20、50、100、200 μg 的系列混合对照溶液。精

密量取上述溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以各甘油三酯的峰面积对数($\lg A$)为 Y ,对其质量浓度对数($\lg C, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为 X 进行线性回归。结果(表 1)表明,其蒸发光散射响应均在约 4.0~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围呈现良好的线性关系($r>0.999$)。不同组分色谱响应线性回归分析的斜率均约为 1.5,因此,在建立的色谱条件下,各组分的响应因子相当。在对照品不齐全的情况下,可以采用主成分为对照,外标峰面积法直接估算各组分的含量。

表 1 8 种甘油三酯的校正曲线

成分	线性方程	相关系数(r)	线性范围($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
LLO	$Y = 1.4977X + 0.4380$	0.9995	3.79 ~ 189.5
LLP	$Y = 1.4949X + 0.3804$	0.9994	4.24 ~ 212.0
OOL	$Y = 1.4972X + 0.3252$	0.9994	4.27 ~ 213.7
POL	$Y = 1.5132X + 0.2836$	0.9998	4.59 ~ 229.7
OOO	$Y = 1.4704X + 0.3396$	0.9996	4.09 ~ 204.5
OOP	$Y = 1.4665X + 0.3275$	0.9991	4.36 ~ 218.0
OOS	$Y = 1.4417X + 0.3153$	0.9991	4.34 ~ 217.3
POS	$Y = 1.4640X + 0.2926$	0.9996	3.73 ~ 186.5

2.5 定量限

以各成分标准曲线的浓度下限(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为其定量限,实验测得 LLO、LLP、OOL、POL、OOO、OOP、OOS、POS 的浓度分别在约为 3.79、4.24、4.27、4.59、4.09、4.36、4.34、3.73 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的情况下,各组分的色谱响应信噪比均大于 10(图 1)。

2.6 溶液稳定性

取供试品溶液和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度水平混合对照溶液,在室温下分别放置约 30 h,于放置不同时间点精密量取上述溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以“2.4”项下各曲线标准计算各甘油三酯浓度。结果不同时间点测得溶液中各甘油三酯的浓度结果一致(RSD 均小于 2.0%),表明该供试品和对照品溶液在室温放置 30 h 内均稳定(表 2~3)。

表 2 甘油三酯混合对照品溶液稳定性($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

放置时间	LLO	LLP	OOL	POL	OOO	OOP	OOS	POS
0 h	46.2	51.4	51.4	56.1	47.1	52.5	50.8	43.4
8 h	46.2	52.5	51.7	55.9	47.5	51.9	52.0	44.3
18 h	46.1	52.6	52.2	57.0	47.9	52.5	52.5	44.7
31 h	47.2	53.9	52.4	57.4	48.2	53.1	52.8	45.2
平均值	46.4	52.6	51.9	56.6	47.7	52.5	52.0	44.4
RSD(%)	1.07	1.94	0.93	1.29	1.01	0.96	1.68	1.78

2.7 加样回收率试验

本底溶液:取本品适量,精密称定,加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 300 μg 的溶液,过滤,取续滤液。

表 3 灵芝孢子油供试品溶液稳定性 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

放置时间	LLO	LLP	OOL	POL	OOO	OOP	OOS	POS
0 h	23.7	10.1	73.7	50.1	102.8	126.7	25.2	17.9
6 h	23.9	10.0	74.7	49.4	103.3	127.6	25.4	18.3
14 h	24.1	10.3	74.7	51.0	103.0	128.9	25.3	18.0
27 h	24.4	10.3	75.8	50.9	105.0	128.1	25.4	18.6
平均值	24.0	10.2	74.7	50.4	103.5	127.8	25.3	18.2
RSD(%)	1.27	1.63	1.14	1.45	0.96	0.73	0.35	1.78

加样回收率试验溶液:取本品适量,精密称定,加流动相溶解并定量稀释成储备液,精密量取适量,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入“2.1”项下混合对照品储备液 1.0、2.0 或 3.0 mL,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为低(50%)、中(100%)、高(150%)浓度的溶液。低、高浓度各 3 份,中浓度 6 份。

精密量取上述溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按标准曲线法计算各甘油三酯的浓度,扣除样品中的本底浓度,即得各甘油三酯对照品浓度,与加入浓度相比分别计算加样回收率。结果表明,LLO、LLP、OOL、POL、OOO、OOP、OOS、POS 的平均加样回收率均在 96.63%~107.53%,RSD 均小于 5.0%。根据《中华人民共和国药典》(2020 年版)通则 9101^[13]中回收率限度的规定,本品属于基质复杂及多成分范畴,同时采用了检测响应灵敏度相对较低的蒸发光散射检测器,回收率限度可适当放宽,故本法准确度良好。

2.8 进样精密度

取“2.1”项下混合对照品溶液,照“2.2”项下条件连续进样 6 次,记录色谱图。结果表明,各成分保留时间的 RSD 均小于 1.0%;浓度的 RSD 分别为 0.55%、1.71%、0.52%、0.33%、0.48%、0.25%、0.55%和 1.09%,均小于 2.0%,表明仪器精密度良好。

2.9 重复性

取“2.7”项下中浓度(100%)试验溶液 6 份,照“2.2”项下方法进行测定。按标准曲线法计算各甘油三酯的浓度,扣除样品中的本底浓度,即得各甘油三酯对照品浓度,与加入浓度相比分别计算加样回收率。

结果表明,各甘油三酯的平均加样回收率为 96.32%~106.01%(RSD<2.0%)范围。根据《中华人民共和国药典》(2020 年版)通则 9101^[13]中精密度可接受范围的规定,本品属于基质复杂及多成分范畴,同时采用了检测响应灵敏度相对较低的 ELSD 检测器,重复性 RSD 范围可适当放宽。故本法重复性良好(表 4)。

表 4 灵芝孢子油中甘油三酯重复性试验结果

序号	LLO	LLP	OOL	POL	OOO	OOP	OOS	POS
1	96.74	101.72	104.01	107.44	104.64	105.66	94.41	96.75
2	99.65	101.51	103.13	105.92	102.14	106.27	94.21	98.67
3	95.58	101.01	101.20	104.11	102.25	106.00	96.74	99.96
4	97.15	101.08	105.22	105.11	105.20	105.78	97.42	99.00
5	96.35	100.21	104.55	106.44	103.39	105.27	97.12	100.59
6	98.53	98.68	105.29	107.02	104.86	105.15	98.03	97.39
平均值	97.33	100.70	103.90	106.01	103.75	105.69	96.32	98.73
RSD(%)	1.54	1.11	1.49	1.17	1.30	0.40	1.68	1.49

2.10 样品测定

精密量取“2.1”项下供试品溶液及“2.5”项下系列混合对照溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以各甘油三酯的峰面积对数($\lg A$)为 Y ,对其质量浓度对数($\lg C, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为 X 进行线性回归,按标准曲线法计算各甘油三酯的含量。

结果(表 5)表明,不同批次的灵芝孢子油中的甘油三酯总量相对均一,但各甘油三酯成分的含量,由于受药材的产地或采收时期等因素影响而有所差异,其中相对含量较低的 OOS(RSD 8.23%)和 LLP(RSD 9.95%)含量波动略显著。

表 5 灵芝孢子油中甘油三酯含量测定结果 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

批号	LLO	LLP	OOL	POL	OOO	OOP	OOS	POS	总计
20220418	44.3	21.7	126.1	87.9	170.4	209.3	47.3	34.0	741.0
20220802	42.7	20.0	130.4	89.8	180.1	219.4	49.8	35.0	767.2
20220902	40.1	18.2	123.4	84.2	173.8	207.9	44.8	31.5	723.9
20220928	40.4	18.1	128.4	81.0	180.2	202.7	54.7	35.7	741.2
20221008	41.3	18.1	129.0	81.3	181.6	204.2	55.9	36.6	748.0
20221018	44.8	22.4	126.8	88.6	174.1	209.7	48.1	33.5	748.1
20221125	44.2	22.3	125.4	87.3	169.0	203.1	47.6	33.0	731.9
平均值	42.6	20.1	127.1	85.7	175.6	208.0	49.8	34.2	743.0
RSD(%)	4.59	9.95	1.87	4.16	2.88	2.78	8.23	5.03	1.85

3 讨论

本研究在非水反相色谱(nonaqueous reverse phase chromatography, NARP)流动相体系中加入甲基叔丁基醚,利用其强洗脱性,显著加快样品洗脱速度,同时以 Agilent Poroshell 120 EC- C_{18} (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm)为色谱柱,相比于常规 ODS 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)填料粒径更小,有利于降低涡流扩散及改变传质路径,提高柱效,并有效地缩短分析时间和减少溶剂消耗,更加绿色环保^[14,15]。

本研究建立了一种灵芝孢子油中 8 个甘油三酯类成分含量的 HPLC-ELSD 法,具有专属性好、分析洗脱时间适宜、定量准确等优点,满足了灵芝孢

子油中甘油三酯类成分质量控制的要求,也可适用于其他植物油脂中甘油三酯的测定。

在建立的 ELSD 为检测器的色谱条件下,不同甘油三酯类成分的响应因子相当。在对照品不齐全的情况下,可以采用主成分为对照的外标峰面积法直接估算各组分的含量。

参考文献

- [1] 药品注册处. 浙江省食品药品监督管理局关于修订灵芝孢子粉炮制规范的通知[EB/OL]. (2014-11-18)[2023-3-20]. http://mpa.zj.gov.cn/art/2014/11/18/art_1228989285_41327571.html.
- [2] 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]. 食品安全与检测, 2006, 22(1): 74-6.
- [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): 17-9.
- [4] HEO Y, KIM M, SUMINDA GGD, et al. Inhibitory effects of Ganoderma lucidum spore oil on rheumatoid arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 114067.
- [5] ZHANG Y, CAI H, TAO Z, et al. Ganoderma lucidum spore oil (GLSO), a novel antioxidant, extends the average life span in *Drosophila melanogaster* [J]. *Food Sci Hum Well*, 2021, 10(1): 38-44.
- [6] WU X, CAO J, LI M, et al. An integrated microbiome and metabolomic analysis identifies immunoenhancing features of Ganoderma lucidum spores oil in mice[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104937.
- [7] JIAO C, CHEN W, TAN X, et al. Ganoderma lucidum spore oil induces apoptosis of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* by activating caspase-3 and caspase-9 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112256.
- [8] 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): 1011-14.
- [9] 陈体强, 吴建国, 毛方华, 等. 硬孔灵芝和赤芝孢子油的脂肪酸、角鲨烯及麦角甾醇类的比较[J]. 食用菌学报, 2018, 25(1): 47-52.
- [10] 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, 28(1): 54-6.
- [11] 万明珠, 王腾华, 张丽媛, 等. HPLC 法测定灵芝孢子油中 1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油酯含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(2): 218-21.
- [12] 董 昕. 灵芝孢子油软胶囊的质量研究[D]. 广州中医药大学, 2016.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 482.
- [14] WELCH CJ, WU N, BIBA M. Greening analytical chromatography [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2010, 29(7): 667-80.
- [15] 洪小棚, 石 莹, 宋雪洁, 等. 液相色谱柱进展及其在药品标准中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 191-201.

Assay of 8 Triglycerides in Ganoderma Lucidum Spore Oil by HPLC-ELSD

GUO Yuan¹, ZHU Miqun², QIAN Yifan¹, WEN Minghao², LU Yuting², SONG Min², HANG Taijun^{2*}

¹Nanjing Zhongke Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211102, China; ²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 21009, China

ABSTRACT **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for the assay of triglycerides contained in Ganoderma lucidum spore oil. **Methods:** Separation of 8 main triglycerides in Ganoderma lucidum spore oil was performed on an ODS (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) column by isocratic elution using acetonitrile-anhydrous alcohol-methyl tertbutyl ether with the volume ratio of 45:45:10 as the mobile phase and evaporative light-scattering detection. They were quantified by a calibration curve method using linear regression algorithm of the log peak areas (lgA) as Y to log mass concentrations (lgC) as X. **Results:** The results of method validation showed that the resolution between the peaks of each component met the requirements, and all their evaporative light scattering responses showed good linear relationship in the mass concentration range of 4.0 - 200 μg · mL⁻¹ (*r* > 0.999). The average recoveries were between 96.63% and 107.53% (RSD < 5.0%). **Conclusion:** This method has good specificity, suitable elution time and quantification accuracy, which can be applied for quality control of triglycerides contents in Ganoderma lucidum spore oil.

KEY WORDS Ganoderma lucidum spore oil; Triglycerides; Assay; HPLC-ELSD