

成前期,抑制了癌细胞的增殖而导致其发生凋亡。结果见表 2。

表 1 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞 (MCF-7)生长的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	OD 值	抑制率 (%)
阴性对照	20%	0.34±0.02	
顺铂	0.5 mg·ml ⁻¹	0.08±0.01*	77.88
含药血清	20%	0.15±0.04**	54.75
	15%	0.21±0.04*	38.05
	10%	0.21±0.02*	39.23
	5%	0.32±0.06	4.42
	2.5%	0.33±0.64	2.05

与阴性对照组比较,* P<0.05,** P<0.01

表 2 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞 (MCF-7)细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间 t/h	G ₀ /1	G ₂ M	S
阴性对照	24	50.3±2.8	8.9±0.9	30.9±1.1
	48	58.7±1.5	6.3±0.6	33.9±1.0
15%血清	24	54.5±3.1	5.9±0.8*	40.8±1.2
	48	73.2±3.4*	6.6±0.5	19.5±0.9
20%血清	24	55.2±2.9*	4.1±0.6*	39.5±2.3*
	48	75.3±4.1*	8.0±1.0	22.1±2.4*

与阴性对照组比较,* P<0.05,n=5

3 讨论

现代药理学研究表明,西黄丸具有抗肿瘤、增强免疫功能、抗菌及抗炎等活性,临床上主要用于多种恶性肿瘤(如肝癌、白血病、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等),尤其适用于晚期恶性肿瘤和乳腺增生等良性疾病的治疗^[4,5]。近些年对其抗肿瘤的实验研究有所增加,如应用血清药理学的方法对西黄丸体外抗肝癌 Bel-7402 细胞系进行了作用及作用机制的系统研究^[6~8]。本研究结果显

示,与阴性对照组比较,西黄丸能够明显抑制乳腺癌 (MCF-7)细胞的增殖,其血清浓度与抑制率呈现正相关。流式细胞仪细胞周期分析结果显示,西黄丸含血清组处理 24 h 与阴性对照组比较,G₂M 期细胞减少、S 期细胞增加;处理 48 h S 期细胞减少,G₀/1 期细胞增多。说明西黄丸含药血清早期主要影响细胞进入 G₂M 期,后期主要使细胞停滞于 G₀/1 期。由于大部分细胞停滞在 DNA 合成前期,抑制了癌细胞的增殖而导致其发生凋亡,因此,可以推断干扰细胞周期可能是其抗癌作用的重要机制。

参考文献:

[1] 《中医辞典》编辑委员会·简明中医辞典[M].北京:人民卫生出版社,1979:900.
[2] 唐曦,胡娅,胡国清·西黄丸与氟尿嘧啶联合应用的抗肿瘤作用[J].医药导报,2005,24(9):757.
[3] 李莉芳,陈如山,刘新民,等·犀黄丸诱导人肝癌细胞凋亡及其机制的研究[J].中医学刊,2004,22(1):125.
[4] 卢雯平·晚期乳腺癌的综合治疗[J].中国肿瘤,1999,8(10):445.
[5] 杨宇飞·晚期非小细胞肺癌中西医结合治疗[J].中国临床医生,2001,29(12):9.
[6] 李莉芳,陈如山,刘新民,等·犀黄丸诱导 Bel-7402 细胞凋亡及其细胞内钙离子浓度的变化[J].临床肝胆病杂志,2003,19(6):362.
[7] 熊鹰,孔小云,陈如山,等·犀黄丸(含药血清)对人肝癌细胞凋亡的形态学研究[J].临床消化病杂志,2001,13(2):82.
[8] 熊鹰,孔小云,陈如山·复方犀黄丸含药血清对人肝癌细胞生长及周期影响的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(4):217.

高效液相色谱法测定灵芝孢子粉软胶囊中多糖含量的研究

陈亮¹,彭雅娟¹,钱一帆^{1*},张磊²

(1.南京中科集团股份有限公司,江苏南京 210008; 2.南京中山制药有限公司,江苏南京 210012)

摘要:目的 建立灵芝孢子粉软胶囊中多糖含量的 HPLC 测定方法。方法 采用 ShodexSH1011(苯乙烯-二乙烯苯共聚物键合磺酸基)糖柱,流动相 0.6%硫酸溶液,检测波长 200 nm。结果 灵芝多糖在 0.266~8.51 mg/ml 范围内线性关系良好,r=0.999 8,平均加样回收率为 100.4%(n=9),RSD=1.57%。结论 该方法简便快捷,无干扰,重复性好,可用于灵芝孢子粉软胶囊的质量控制。

关键词:灵芝孢子粉软胶囊; 灵芝多糖; 高效液相色谱

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2007)06-1372-03

Content Determination of Polysaccharides of Ganoderma lucidum in Spore Powder Capsule by HPLC

CHEN Liang¹, PENG Ya-juan¹, QIAN Yi-fan¹, ZHANG Lei²

(1. Nanjing Zhongke Biochemical Technological Co. Ltd. Nanjing 210008, China; 2. Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Factory, Nanjing 210012, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of Ganoderma lucidum Polysaccharide in spore powder capsule. Methods A Shodex SH1011 column was used with 0.6% sulphuric acid solution. The detection wavelength was set at 200nm. Results The linear relationship of the concentrations and peak areas was good in range of 0.266~8.51 mg/ml (r=0.999 8). The average recovery was 100.4% (n=9), RSD=1.57%. Conclusion The method is simple, rapid and accurate and can be used for quality control of the capsule.

Key words: Spore powder of Ganoderma lucidum; ganoderma capsule; Polysaccharides; HPLC

收稿日期:2006-11-28; 修订日期:2007-02-27

作者简介:陈亮(1981-),男(汉族),江苏南京人,现为南京中科集团股份有限公司工程师,主要从事中药质量标准和保健品开发工作。

***通讯作者简介:**钱一帆(1974-),男(汉族),浙江宁波人,现为南京中科集团股份有限公司工程师,学士学位,主要从事中药质量标准和保健品开发研究工作。

灵芝孢子粉软胶囊是由灵芝孢子粉胶囊 [W S-5026 (B-0026)-2004] 改剂型而成,具有健脾益气,养心安神功效。用于心脾两虚,病后体弱以及肿瘤患者的辅助治疗。其有效成分有灵芝多糖类、三萜类化合物等,其多糖的含量约为 0.75%^[1]。测定多糖含量常用硫酸-蒽酮^[2]和硫酸-苯酚分光光度法^[3,4]。上述方

法误差较大、操作比较繁琐。运用高效液相法测定多糖含量^[5,6]亦有报道,灵芝孢子粉制剂中运用高效液相色谱法测定多糖含量未见报道。本文选用高效液相色谱法为灵芝孢子粉软胶囊中灵芝多糖的含量测定建立了一种分离效率高、稳定性好、分析速度快的方法,为控制制剂质量提供了可靠的方法。经方法学考察,符合含量测定要求。

1 仪器与试药

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10Avp 紫外-可见检测器, N2000 色谱数据工作站, KQ-500DB 型数控超声波清洗器, 7725 六通进样阀。

D 无水葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110833-200302, 供含量测定用); 灵芝孢子粉软胶囊 (南京中科药业有限公司, 批号 20050301, 20050302, 20050303) 硫酸分析纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ShodexSH1011 (苯乙烯-乙烯苯共聚物键合磺酸基) (8.0 mm×300 mm, 6 μm), 流动相: 硫酸水 (6:1000), 检测波长 200 nm, 流速 0.6 ml/min, 进样量 20 μl 柱温 30℃。在上述色谱条件下, D 无水葡萄糖的保留时间为 4.987 min。

2.2 供试品溶液与对照品溶液的制备 取本品 10 粒内容物混合均匀, 取约 3.0 g 精密称定, 置于 10 ml 玻璃离心管中, 加正己烷 8 ml 震荡 2 min 后, 离心 (3000 r/min) 10 min, 弃去正己烷层, 再重复上述步骤一次, 水浴挥去残留正己烷后, 将其转移至 10 ml 容量瓶中, 加适量水, 100℃ 水浴 1 h 不足水分, 混匀, 滤过, 取滤液 2.0 ml 加入无水乙醇 8.0 ml 摇匀并放置 2 min 后, 离心 (3000 r/min) 10 min, 弃去上清液, 沉淀物用 2.0 ml 流动相溶解后 100℃ 水浴 1 h 即得。分别进行了水解时间的考察。结果见表 1。

表 1 水解时间的考察			
序号	溶剂	时间 t/min	峰面积
1	0.6% 硫酸	15	55787
2	0.6% 硫酸	30	68967
3	0.6% 硫酸	60	77913
4	0.6% 硫酸	90	78725
5	0.6% 硫酸	120	78136

结果 1h 以上即可完全水解, 故选择 1h 作为水解时间点。精密称定减压干燥 48 h 的 D 无水葡萄糖对照品 21.28 mg 置 10 ml 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每毫升含 D 无水葡萄糖 2.128 mg 的溶液, 滤过, 即得。对系统适应性进行了实验考察。结果见表 2。

表 2 系统适应性考察实验结果		
条件	保留 t/min	峰面积
柱温 15℃	4.990	191 949
30℃	4.987	206 042
45℃	4.768	233 536
流速 0.4 ml·min	7.373	309 889
0.6 ml·min	4.987	208 358
0.9 ml·min	3.278	141 383

2.3 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 5 ml 于 10 ml 容量瓶中稀释定容, 依次用二倍稀释法配制的对照品溶液, 照上述色谱条件, 精密吸取 20 μl 注入液相色谱仪, 连续进样 2 次, 测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 以样品浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。得回归方程 Y=321 56X+4 999.2, 相关系数 r=0.999 8, 线性范围为 0.25~8.00 mg/ml, 结果见表 3。

2.4 精密度实验 精密吸取对照品溶液取, 连续进样 6 次, 测得 RSD 值为 0.6% (n=6), 符合实验要求。结果见表 5。

2.5 稳定性实验 取同一样品 (批号 20050401), 按 2.2 项方法制备, 照上述色谱条件, 精密吸取 20 μl 注入液相色谱仪, 每隔 2.5h 进样 1 次, 测定供试液 12.5 h 的稳定性。其 RSD 值为

0.2%, 符合实验要求。结果见表 4。

表 3 标准曲线绘制实验结果			
序号	浓度 C/mg·ml ⁻¹	峰面积	平均峰面积
1-1	0.266	5 521	5 596
1-2		5 670	
2-1	0.532	11 902	12 233
2-2		12 563	
3-1	1.064	24 649	28 557
3-2		32 465	
4-1	2.128	61 504	62 958
4-2		64 411	
5-1	4.255	128 875	129 490
5-2		130 105	
6-1	8.510	275 383	269 943
6-2		264 502	

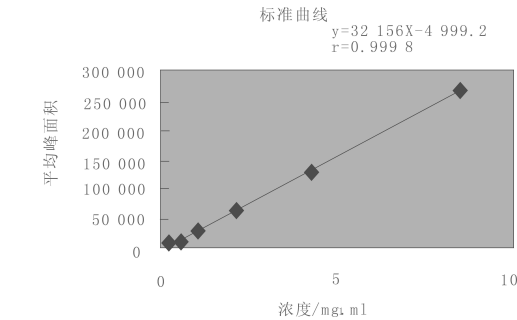


图 1 葡萄糖的标准曲线

表 5 精密度实验结果			
实验次数	峰面积	平均峰面积	RSD (%)
1	64 814		
2	64 491		
3	64 029		
4	64 901	64 400	0.6
5	63 816		
6	64 549		

表 4 稳定性实验结果		
时间 t/h	峰面积	RSD (%)
0.0	151 738	
2.5	150 381	
5.0	149 382	
7.5	148 100	0.2
10.0	145 139	
12.5	148 954	

2.6 重复性实验 取同一样品 (批号 20050401) 6 份, 按 2.2 项方法制备, 分别精密吸取 20 μl 连续进样 2 次, 测得 RSD 值为 1.5%, 符合实验要求。结果见表 6。

表 6 重复性实验结果				
序号	称样量 m/g	峰面积	平均峰面积	RSD (%)
1	1.023 2	154 485	153 406	
		152 327		
2	1.040 2	153 981	154 168	
		154 355		
3	0.992 2	151 156	151 518	1.5
		151 880		
4	0.985 1	151 171	150 952	
		150 732		
5	1.098 8	163 715	163 627	
		163 539		
6	1.052 6	159 520	161 173	
		162 825		

2.7 加样回收率实验 取同一样品 (批号 20050401) 9 份, 加入一定量的对照品, 按 2.2 项方法制备, 即得。分别精密吸取 20 μl 注入高效液相色谱仪, 连续进样 3 次, 测定。计算平均加样回收

率为 100.4%，其 RSD 值为 1.57%，符合实验要求。结果见表 7。

3.2 在制备供试品溶液中发现，样品加入流动相 1h 与 1.5h 吸收峰面积接近，考虑省时，故选择 1h 为最适水解时间。

表 7 加样回收率实验结果							
序 号	称样量 m/g	相当于所含 D 无 水葡萄糖 m/mg	加入量 m/mg	实际测 得量 m/mg	加样回收 率 (%)	平均加样回 收率 (%)	RSD (%)
1	0.508 3	24.86	20.00	44.48	98.1		
2	0.810 4	24.96	20.00	44.65	96.5		
3	0.523 0	25.57	20.00	45.05	97.4		
3	0.523 0	25.57	20.00	45.05	97.4		
4	0.502 5	24.57	25.00	49.99	101.7		
5	0.503 2	24.61	25.00	49.96	101.4	100.4	1.57
6	0.510 8	24.98	25.00	50.47	101.9		
7	0.523 5	25.59	30.00	56.31	102.4		
8	0.546 6	26.73	30.00	56.90	100.6		
9	0.516 7	25.27	30.00	55.65	101.3		

2.8 药材含量测定 取不同批号灵芝孢子粉药材约 1.0 g 精密称定，按 2.2 项方法依法制备，每次进样 20 μl 测定。结果见表 8。

表 8 药材含量测定结果					
药材 批号	称样量 m/g	峰面 积	平均 峰面积	D—无水葡萄糖 含量 C/mg·g ⁻¹	D—无水葡萄糖 平均含量 C/mg·g ⁻¹
1号	1.080 1	76 822	75 946	95.99	95.01
1号	1.080 1	75 070		93.80	
1号	1.080 1	75 070		93.80	
1号	1.090 2	79 812	76 839	98.81	
1号	1.090 2	73 865		91.43	
2号	0.924 1	141 519	139 583	206.98	197.50
2号	0.924 1	137 646		201.30	
2号	0.943 4	135 500	133 240	194.10	
2号	0.943 4	130 979		187.62	
3号	1.004 1	21 239	21 397	28.32	27.65
3号	1.004 1	21 555		28.74	
3号	0.980 2	19 150	19 619	26.12	
3号	0.980 2	20 088		27.42	
4号	1.080 1	109 476	110 171	136.92	137.43
4号	1.080 1	110 865		138.66	
4号	1.020 2	104 164	103 527	137.91	
4号	1.020 2	102 890		136.22	

4种不同批号的灵芝孢子粉药材因来源不同其含量有一定的差别，由于对灵芝孢子粉药材多糖含量没有现行的法定标准，生产中应制定内控标准，进行严格控制，其平均含量为 114.40 mg/g 下浮 20% 作为内控标准 91.52 mg/g。

2.9 样品含量测定 分别取 10 批 (批号 20050401, 20050402, 20050403, 20050501, 20050502, 20050503, 20050504, 20060301, 20060302, 20060303) 的样品 10 粒内容物，取约 3.0 g 精密称定，按 2.2 项方法制备，即得。精密吸取供试品溶液 20 μl 注入，连续进样 2 次，测定，即得。结果见表 9。

由以上实验结果可见，该方法准确度较高，可用于样品的含量测定。10 批样品平均含量为 40.18 mg/g 且转移率为 74.72%。根据平均含量 20.54 mg/粒，考虑药材及工艺可能引起含量的浮动，因此将样品平均含量下浮 20%，作为每粒含量限度。成品含量限度确定为：本品每粒含灵芝多糖以 D—无水葡萄糖 (C₆H₁₂O₆) 计，不得少于 16 mg。

3 讨论

3.1 在流动相的选择上，曾考虑使用磷酸溶液，但水解多糖时有一定困难，因此选用硫酸作为流动相。

表 9 10 批样品含量测定结果						
序 号	称样量 m/g	峰 面积	D—无水葡萄糖含 量 C/mg·g ⁻¹	平均值 C/mg·g ⁻¹	每粒中 D—无水葡萄 糖含量 C/mg·g ⁻¹	
20050401	0.992 3	149 506	48.77	49.33	24.67	
		153 375	50.03			
		149 720	49.04			
		151 127	49.49			
20050402	0.968 2	126 625	42.33	43.53	21.76	
		123 987	41.45			
		1.053 4	147 504	45.32		
		146 649	45.05			
20050403	1.032 1	136 840	42.91	41.71	20.86	
		126 848	39.78			
		1.040 2	133 451	42.61		
		136 960	40.15			
20050501	1.072 6	117 714	35.52	36.69	18.35	
		119 655	36.11			
		0.923 8	105 609	37.00		
		108 838	38.14			
20050502	1.094 2	140 080	41.44	41.46	20.73	
		137 112	40.56			
		0.965 1	123 612	41.46		
		126 371	42.38			
20050503	0.921 1	106 840	37.54	38.86	19.43	
		1.053 9	128 555	39.48		
		129 762	39.85			
		182 076	53.95	52.47	26.24	
20050504	1.092 3	1.085 8	176 815	52.71		
		176 260	52.24			
		112 943	33.53	34.70	17.35	
		114 371	33.95			
20060301	1.010 3	1.006 8	108 491	34.87		
		113 407	36.46			
		111 285	36.37	36.10	18.05	
		109 975	35.93			
20060302	0.990 5	0.986 7	109 606	35.96		
		110 116	36.12			
		117 664	36.17	35.97	17.99	
		120 876	37.16			
20060303	1.052 8	0.988 6	107 169	35.09		
		108 309	35.46			

3.3 制剂所用辅料对硫酸一萘酮和硫酸一苯酚分光光度法测定灵芝多糖的含量存在一定的干扰，本方法结果表明辅料对测定无明显影响。

参考文献：

[1] 毛泉明,叶福媛,吴倩,等.栽培灵芝与灵芝孢子粉有效成分比较[J].药学实践杂志,1997,15(3):172.

[2] 白在贤,周雪梅,韩塔娜,等.破壁灵芝孢子粉中多糖的含量测定[J].中国民族医药杂志,2006,2(4):36.

[3] 刘敏,高岚.紫外分光光度法测定灵芝孢子粉胶囊中灵芝多糖含量[J].现代中药研究与实践,2005,19(4):34.

[4] 董群.改良的苯酚—硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药杂志,1996,31(9):550.

[5] 鲁萍,任莉,许爱华,等.HPLC测定银杏外种皮多糖的分子质量及含量[J].中国中药杂志,2005,30(22):1749.

[6] 陈芸芸,王伟,丁怡,等.SE—HPLC测定太子神悦胶囊中多糖相对分子质量分布及含量[J].中国药杂志,2005,40(7):540.