

灵硒康口服液中灵芝的鉴别及其灵芝多糖中单糖组成的测定

张连龙, 刁春霞*, 周华生, 毛兆祥, 成恒嵩, 任会娜

(无锡健特药业有限公司, 无锡 214091)

摘要: **目的** 鉴别灵硒康口服液中的灵芝成分及测定灵芝多糖中单糖的组成。**方法** 样品经沉淀、离心、固相萃取(solid-phase extraction, SPE)小柱分离、富集和纯化处理。使用福林酚试剂法、薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)鉴别和测定灵硒康口服液中灵芝及灵芝多糖中单糖的组成。**结果** 福林酚试剂法鉴别了灵芝中水溶性蛋白质。样品及对照药材显蓝色, 阴性不显色。薄层色谱法鉴别了灵芝中水溶性糖。样品及对照药材在相同的位置上有2个斑点, 1个橘黄色, 1个蓝紫色, 阴性不显色。以1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)试剂柱前衍生化、LichrospherC₁₈柱, 紫外检测, 等度或梯度洗脱的高效液相色谱法测定灵芝多糖中4种单糖。其中等度洗脱含量(mg/100 mL)分别为: 甘露糖 1.78, 葡萄糖 124.45, 半乳糖 3.86, 木糖 2.68。梯度洗脱分别为: 甘露糖 1.63, 葡萄糖 128.65, 半乳糖 3.52, 木糖 2.53。两者测定结果基本相同。**结论** 上述鉴别和含量测定方法专属性强、重现性好、灵敏度高, 可管控产品质量。

关键词: 灵硒康口服液; 灵芝; 鉴别; 单糖组成; 高效液相色谱法

Identification of *Ganoderma Lucidum* and determination of monosaccharide composition from *Ganoderma Lucidum* polysaccharide in Lingxikang oral solution

ZHANG Lian-Long, DIAO Chun-Xia*, ZHOU Hua-Sheng, MAO Zhao-Xiang,
CHENG Heng-Song, REN Hui-Na

(Wuxi Giant Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214091, China)

ABSTRACT: Objective To identify the *Ganoderma Lucidum* in Lingxikang oral solution and determine the monosaccharide composition in *Ganoderma Lucidum* polysaccharide. **Methods** The samples were treated by precipitation, centrifugation, solid phase extraction column separation, enrichment and purification. The *Ganoderma Lucidum* ingredient and monosaccharide composition of *Ganoderma Lucidum* polysaccharide in Lingxikang oral solution were identified and determined by folin-phenol reagent method, thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Folin-phenol reagent method effectively identified the water soluble protein of *Ganoderma Lucidum*. The sample and the control medicinal material showed blue color, while negative sample did not show color. TLC method effectively identified water soluble sugar. The sample and the control medicinal material showed 2 spots at the same position, one orange and one blue-purple, while the negative

*通讯作者: 刁春霞, 执业药师, 主要研究方向为药品、保健食品的研制与产品质量分析方法的研究。E-mail: 381983679@qq.com

*Corresponding author: DIAO Chun-Xia, Licensed Pharmacist, Wuxi Giant Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214091, China, E-mail: 381983679@qq.com

sample did not show color. The content of 4 monosaccharide from *Ganoderma Lucidum* polysaccharide was determined by HPLC with pre-column derivatization (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP), Lichrospher C₁₈ column, UV detection, isocratic or gradient elution methods. The content (mg/100 mL) of mannose, glucose, galactose and xylose was 1.77, 124.45, 3.67 and 2.66 respectively by isocratic elution, while the content was 1.63, 128.65, 3.62 and 2.53 respectively by gradient elution. The results of the 2 tests were basically the same.

Conclusion The above methods have strong specificity, good reproducibility, and high sensitivity, which can be used to ensure the quality of the products.

KEY WORDS: Lingxikang oral solution; *Ganoderma Lucidum*; identification; monosaccharide composition; high performance liquid chromatography

1 引言

灵硒康口服液是由国家批准的保健食品(国食健字G20070121),其主要配方组成是灵芝的水溶性提取物,添加硒化卡拉胶,辅以相关的食品添加剂和纯化水等,经混合、匀浆、过滤、灌装和灭菌等主要工艺制成的口服液,具有增强免疫力的保健功能。它的主要功效成分是灵芝的水溶性蛋白质、糖类物质及硒化卡拉胶中微量元素硒。

国家市场监督管理总局《关于印发保健食品注册审评审批工作细则的通知》^[1]的文件指出:根据产品配方及相关研究结果等可以确定产品鉴别方法的,应予以全面、准确的阐述。目前对灵芝单味药材鉴别和含量测定报道颇多,如《中国药典》2015版一部^[2],用薄层色谱法鉴别灵芝三萜类脂溶性荧光物质和蒽酮硫酸比色法测定多糖含量。刘艳芳等^[3]用酶法试剂盒和苯胺蓝荧光法测定灵芝提取物多糖中 β -葡聚糖含量及用高效凝胶色谱-示差检测法测定多糖成分。还有用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定灵芝提取物中多糖中单糖的组成^[4]。罗虹建等^[5]用高效液相色谱法测定野生灵芝中多糖肽和灵芝酸含量。国外大部分文献是介绍灵芝药理作用和临床应用,如灵芝多糖的免疫调节^[6]、降低血糖、血脂^[7]及抗肿瘤作用^[8]等。Chen等^[9]通过毛细管气相色谱分析灵芝中纯化多糖的单糖组成。Qian等^[10]利用液相色谱分析灵芝中多种化学成分,而非指灵芝多糖的单糖组成。这些都是针对灵芝单味药材,成分相对比较单一,而灵硒康口服液除灵芝外,还有其他多种食品添加剂,是复配产品,成分比较复杂,干扰因素多。本文研究了福林酚试剂法鉴别灵芝水溶性蛋白质,薄层色谱法鉴别灵芝水溶性糖,以及高效液相色谱法定量测定灵芝多糖中单糖组成,拟为规范市场上灵芝类产品混乱的局面和该产品的延续注册提供研究资料。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

2695 高效液相色谱仪(配备示差(RI)和紫外(UV)检测

器,美国 Waters 公司); AE-240 分析天平(瑞士 Mettler 公司); TGL-10B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 固相萃取柱(solid-phase extraction, SPE)[OASIS MAX(60 mg/3 mL)、HCX(500 mg/6 mL)、HLB(500 mg/6 mL)等,美国 Tegment 公司]; 高效硅胶 G 薄层板(10 cm×20 cm×0.25 cm, 青岛海洋化工厂); 甲醇、乙腈(色谱纯,上海霍尼韦尔试剂有限公司); 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)、对氨基苯甲酸、三氟乙酸[分析纯,国药集团(上海)化学试剂有限公司]; 水为纯化水。

灵硒康口服液(批号 180823、180824、180825,无锡健特药业有限公司); 甘露糖(纯度 98.5%, 美国 Sigma 公司); 葡萄糖(纯度 100%, 美国 Sigma 公司); 半乳糖(纯度 98.7%, 美国 Sigma 公司); 木糖(纯度 97.5%, 美国 Sigma 公司); 灵芝对照药材(中国食品药品检定研究院)。

2.2 实验方法

2.2.1 福林酚试剂法鉴别灵芝水溶性蛋白质

样品制备:取口服液 5 mL 于离心管中,加无水乙醇 20 mL,边加边摇动,放入冰箱冷藏室过夜,6000 r/min,离心 30 min,沉淀加 3 mL 水溶解。

灵芝对照药材制备:取 1 g 灵芝对照药材,加 50 mL 水,60 °C 超声 30 min,过滤,滤液 80 °C 水浴蒸干,残渣用水转移至 25 mL 容量瓶中,定容至刻度,取 5 mL,制备方法同样品。

阴性对照品制备:阴性对照品按产品配方比例及工艺制成不含灵芝的口服液,其前处理步骤同样品。

2.2.2 薄层色谱法鉴别灵芝水溶性糖

样品制备:取口服液 10 mL 于离心管中,加无水乙醇 50 mL,边加边摇动,放入冰箱冷藏室过夜,6000 r/min,离心 10 min,沉淀分别用 10 mL 无水乙醇、10 mL 丙酮、10 mL 乙醚各洗涤一次,洗涤后依次同法离心,后沉淀物加 3 mL 70%乙醇,60 °C 超声溶解。

灵芝对照药材制备:取 1 g 灵芝对照药材,加 50 mL 水,加热回流 1 h,趁热过滤,滤液水浴蒸干,残渣用 10 mL 水转移至离心管中,制备方法同样品。

阴性对照品的制备:取不含灵芝的口服液 10 mL,其

前处理步骤同样品。

吸取上述 3 种溶液 3~5 μL 点于同一块高效硅胶 G 薄层板上, 晾干, 以正丁醇-乙酸乙酯-吡啶-水(6:1:5:4, $V:V:V:V$)为展开剂, 当展开高度约 9 cm 时, 取出, 晾干, 喷以糖的特效显色剂-对氨基苯甲酸溶液(取对氨基苯甲酸 0.5 g, 溶于冰醋酸 9 mL, 加水 10 mL 和 85%磷酸 0.5 mL, 混匀), 吹干, 放 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中约 10 min。再将此薄板用同样的展开剂进行 2 次展开, 当展开高度约 11 cm 时, 取出, 晾干, 在日光灯下检视。

2.2.3 高效液相色谱法测定灵芝多糖中单糖的组成

样品制备: 取口服液 10 mL 于离心管中, 加 50 mL 无水乙醇沉淀, 放入冰箱冷藏室沉淀过夜, 6000 r/min, 离心 10 min, 将沉淀用 5 mL 水分次溶解转移至蒸发皿中, OASIS MAX 小柱纯化处理。步骤如下, 小柱活化与平衡: 先用 3 mL 甲醇过柱活化, 再用 5 mL 水过柱平衡; 上柱: 将蒸发皿中 5 mL 溶解液上柱; 收集与洗脱: 收集流出液, 再用 5 mL 水洗脱, 合并流出液和洗脱液于蒸发皿中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干。加 4 mol/L 三氟乙酸 3 mL 转移至 10 mL 顶空瓶中, 封口, 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内水解 3 h, 水解液 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。

样品衍生化: 将真空干燥的样品加 10 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液溶解, 取该溶液 500 μL 与 300 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液混合, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 放至室温, 加入 500 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和, 混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 残渣用 2 mL 水及 2 mL 三氯甲烷溶解, 放入小型分液漏斗中, 振荡萃取, 除去下层有机相, 上层水相再用 2 mL 三氯甲烷萃取 2 次, 保留水相, 用水稀释至 5 mL。用 0.22 μm 滤膜过滤, 冰箱中保存备用。

混合对照品制备及衍生化: 精确称取甘露糖、葡萄糖、半乳糖各 20 mg, 木糖 15 mg 至 10 mL 具塞试管中, 加 10 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液溶解, 以下衍生化步骤同样品。同时制备上述 4 种单糖对照品, 以确定各单糖的出峰时间。

色谱条件 1, 等度洗脱: 色谱柱 Lichrospher C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相醋酸盐缓冲液(100 mmol/L 醋酸铵, 用稀醋酸调至 pH5.5)-乙腈(78:22, $V:V$); 流速 1 mL/min, 等度洗脱; 检测波长 245 nm; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 外标法定量。

色谱条件 2, 梯度洗脱: 其他同条件 1, 只是流动相配制与洗脱方式不同。流动相 A 磷酸盐缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钾, 用稀氢氧化钠溶液调至 pH6.9)-乙腈(85:15, $V:V$); 流动相 B 磷酸盐缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钾, 用稀氢氧化钠溶液调至 pH6.9)-乙腈(60:40, $V:V$)。梯度模式: 时间梯度为 0~9~25 min, 相应浓度梯度, 流动相 A 为 100%~90%~45%, 流动相 B 为 0%~10%~55%。

2.2.4 方法学验证

方法学验证中, 线性回归方程、相关系数、线性范围、方法检测限、精密性、回收率等要求, 参照《中国药典》2015

版四部《药品质量标准分析方法指导原则》^[11]进行设计和计算。

3 结果与分析

3.1 福林酚试剂法鉴别灵芝中水溶性蛋白质

将福林酚试剂方法中预处理的样品、对照药材及阴性对照品 3 种溶液各吸取 1 mL 至 10 mL 具塞试管中, 加福林酚 A 试液^[11]5 mL, 摇匀后放置 10 min, 加福林酚 B 试液 0.5 mL^[11], 混匀后放置 30 min。样品及对照药材显蓝色, 阴性对照不显色(图 1)。

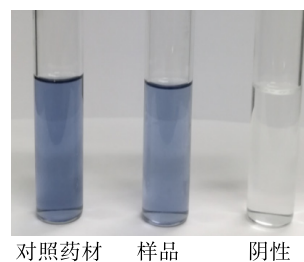


图 1 灵芝水溶性蛋白质的显色图

Fig.1 Color chart of *Ganoderma Lucidum* water soluble protein

在鉴别水溶性蛋白质时, 试验还选用了双缩脲和考马斯亮蓝 2 种蛋白质显色剂, 但这 2 种显色剂灵敏度较低、抗干扰性差, 色差不一, 伴有浑浊, 效果不理想。而福林酚试剂法灵敏度高、干扰小, 颜色透明清晰。这可能与双缩脲灵敏度为 5~160 mg/mL, 考马斯亮蓝灵敏度为 10~100 $\mu\text{g/mL}$, 福林酚试剂灵敏度为 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 有关^[12]。

鉴别灵芝单味药材《中国药典》^[2]采用脂溶性提取物的薄层荧光法, 而该产品加入的原料是灵芝的水溶性提取物, 不含有三萜类荧光物质, 故研究选用福林酚鉴别水溶性蛋白质。

3.2 薄层色谱法鉴别灵芝中水溶性糖

按照薄层色谱法的 3 种处理方法和薄层条件, 经 2 次展开后, 在日光灯下检视。样品与对照药材有 2 个斑点, 其中一个橘黄色, 一个蓝紫色, 清晰可见, 阴性对照不显色(图 2)。2 次展开可以提高分离效果, 第一次展开时, 只有 1 个斑点, 与显色剂结合后再次展开可有 2 个斑点。

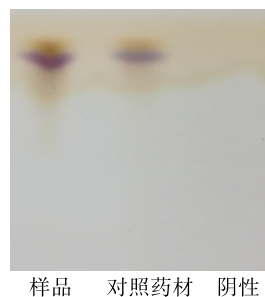


图 2 灵芝水溶性糖的薄层色谱图

Fig.2 Thin layer chromatogram of *Ganoderma Lucidum* water soluble sugar

试验中虽然试图用一些糖类标准物质对这 2 个斑点进行确认,但由于成分复杂和条件所限,最终未能如愿,有待进一步研究。但样品与对照药材斑点一致,也能证明样品中真实存在灵芝水溶性糖类物质^[2]。

3.3 高效液相色谱法测定口服液中灵芝多糖中单糖的组成

3.3.1 色谱条件 1

按照高效液相色谱法样品和对照品的处理方法及仪器条件进行分离测定。混合对照品和样品可分离甘露糖、葡萄糖、半乳糖及木糖等 4 种单糖,均达到基线分离,没有重叠峰,样品与对照品出峰顺序和保留时间一致(图 3, 图 4),在 4 种单糖定性基础上,可进行定量测定。

要做到这一点,对于样品的纯化方法与仪器测定条件优化至关重要。本研究样品纯化选择 SPE 小柱,在 OASIS MAX、MCX、HLB 等几种同类型的小柱中进行筛

选,其中 MAX 小柱能有效吸附样品中干扰的蛋白质和色素等。仪器的优化主要是调节流动相的离子浓度、pH 值、组成及体积比例,以现在的测定条件为佳。

3.3.2 方法学验证

(1) 线性回归方程、相关系数、线性范围及方法检出限
将 4 种单糖的混合对照品配制成 5 种不同浓度梯度后进行测定,其浓度与峰面积成直线回归,相关性好,线性范围宽、检测限低、灵敏度高(表 1)。

(2) 对照品精密度试验

选定混合对照品某一最适浓度,重复测定 6 次,其浓度与峰面积重现性好,精密度高, RSD 为 3.22%~7.18% (表 2)。

(3) 样品精密度试验

选定样品某一最适浓度,重复测定 6 次,其浓度与峰面积重现性好,精密度高, RSD 为 3.33%~6.14%(表 3)。

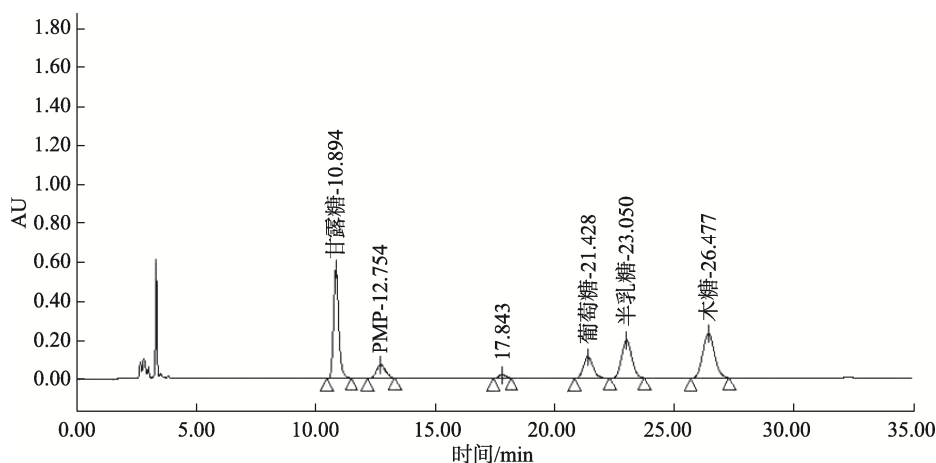


图 3 等度洗脱的混合对照品色谱图

Fig.3 Isocratic elution mixed reference chromatogram

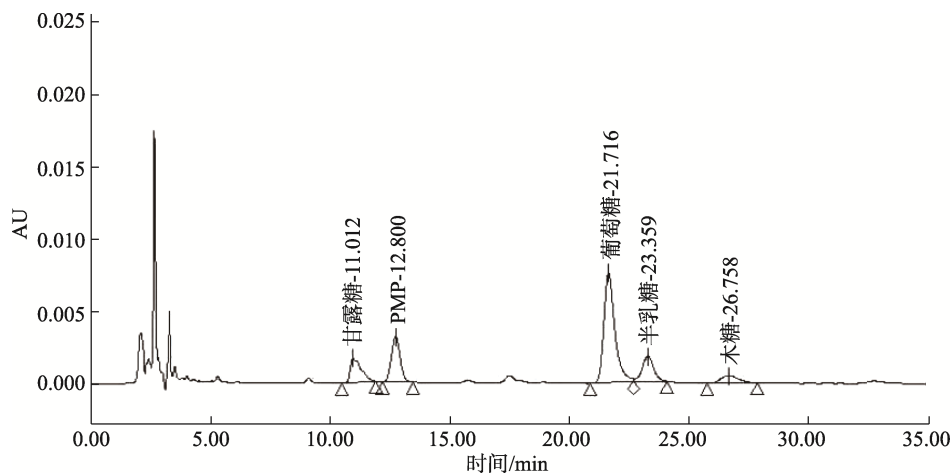


图 4 等度洗脱的样品色谱图

Fig.4 Isocratic sample chromatogram

表 1 4 种单糖的线性回归方程、相关系数、线性范围及方法检出限($n=6$)				
Table 1 Linear regression equation, correlation coefficient, linear range and method detection limit of 4 kinds monosaccharides($n=6$)				
名称	线性方程	相关系数(r)	线性范围/(mg/mL)	方法检出限/(μ g/mL)
甘露糖	$Y=4.2703X+27.0484$	0.9991	0.5~10	0.58
葡萄糖	$Y=1.5033X+19.3017$	0.9998	0.5~10	1.61
半乳糖	$Y=35.6815X+2.8417$	0.9998	0.5~10	1.16
木糖	$Y=3.8489X+15.2845$	0.9987	0.5~8	0.44

表 2 对照品的精密度试验($n=6$)							
Table 2 Precision test of reference substance($n=6$)							
名称	峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
甘露糖	53017	52945	54117	51229	53025	55864	3.87
葡萄糖	241537	250124	253016	240932	230889	241537	3.22
半乳糖	59548	57126	61967	56112	60123	57997	5.57
木糖	26127	30295	24997	25206	23113	25916	7.18

表 3 样品的精密度试验($n=6$)							
Table 3 Precision test of sample ($n=6$)							
名称	峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
甘露糖	88697	87245	88496	89205	81546	82564	3.89
葡萄糖	290452	285413	297754	289457	301243	312478	3.33
半乳糖	37624	37229	39216	38245	36415	34569	4.31
木糖	19132	16523	19614	18223	17459	18165	6.14

(4) 回收率试验

在线性范围内采用加标回收的方法进行测定。选定已知浓度样品作为本底, 以其浓度为 1, 按低、中、高, 即 0.5:1、1:1、1.5:1 左右浓度的对照品加入本底中, 每个浓度重复 3 次, 共 9 个样品。通过供试品中含量值、对照品加入量和测定值计算回收率和 RSD, 回收率好, 为 94.1%~99.3%, 精确度高, RSD 为 3.98%~6.08%(表 4)。

3.3.3 色谱条件 2

按照色谱条件 2 的条件进行分离测定, 混合对照品和样品同样可分离甘露糖、葡萄糖、半乳糖和木糖 4 种单糖, 并达到基线分离, 样品与对照品出峰顺序与保留时间一致(图 5、图 6)。

3.3.4 方法学验证

(1) 线性回归方程、相关性、线性范围及方法检出限

将 4 种单糖的混合对照品配制 5 种不同浓度梯度后进行测定, 其浓度与峰面积成直线回归, 相关性好, 线性范围宽、检测限低、灵敏度高(表 5)。

(2) 对照品精密度试验

方法同条件 1, 其浓度与峰面积重现性好, 精确度高, RSD 为 3.62%~6.12%(表 6)。

(3) 样品精密度试验

方法同条件 1, 其浓度与峰面积重现性好, 精确度高, RSD 为 2.45%~5.36%(表 7)。

(4) 回收率试验

方法同条件 1, 回收率好, 为 94.3%~99.6, 精确度高, RSD 为 3.99%~6.68%(表 8)。

试验中, 首选糖类物质传统的 HPLC 国标法^[13], 样品直接进样, 氨基柱分离, 示差检测器检测, 毋需用衍生化处理。但甘露糖、葡萄糖、半乳糖系六碳糖, 分子量均为 180, 木糖为五碳糖, 分子量为 150, 它们之间分子量及极性差异很小, 无法分离。这是因为氨基柱以氨基为取代基比硅胶 C₁₈ 柱的羟基取代基分离效果要差。同时示差检测器比紫外检测器灵敏度低(2 个数量级), 不适合痕量分析, 且不能用于梯度洗脱^[14]。

糖类物质没有紫外吸收, 必须借助 PMP 试剂与糖类物质进行衍生化反应, 使生成物具有紫外吸收^[15]。其原理是, PMP 在碱性和加温条件下, 与单糖发生缩合反应, 产生了紫外吸收基团, 其反应过程如图 7。同时这 4 种单糖经衍生化处理后, 使它们之间极性差异变大, 增加分离效果。

表 4 4 种单糖的回收率试验
Table 4 Recovery of 4 kinds monosaccharides

名称	回收率%									平均回收率/%	RSD/%
	低中高										
甘露糖	93.7	98.2	96.3	108.8	94.5	97.2	99.7	94.5	103.2	98.5	4.97
葡萄糖	98.5	96.3	102.8	97.3	103.6	95.4	95.2	105.5	105.1	99.3	3.98
半乳糖	100.4	91.5	96.6	94.7	98.5	96.8	93.2	108.1	96.1	96.7	5.34
木糖	99.5	103.2	92.7	91.6	97.5	94.2	104.8	94.8	91.1	94.1	6.08

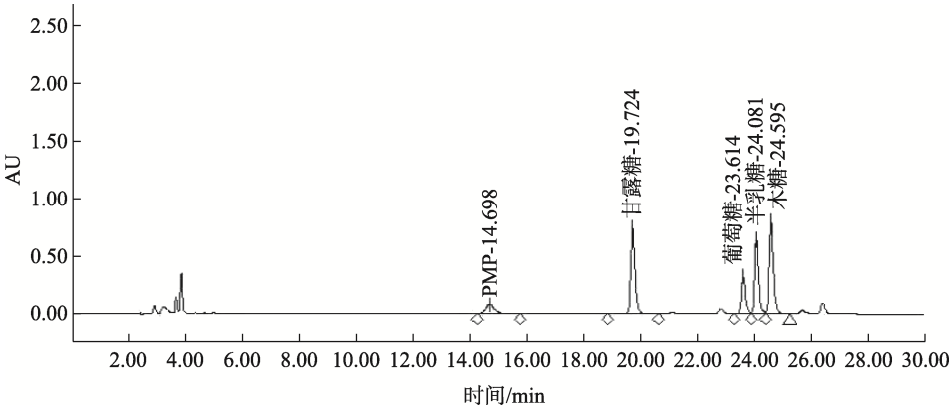


图 5 梯度洗脱的对照品色谱图
Fig.5 Gradient elution of the reference substance chromatogram

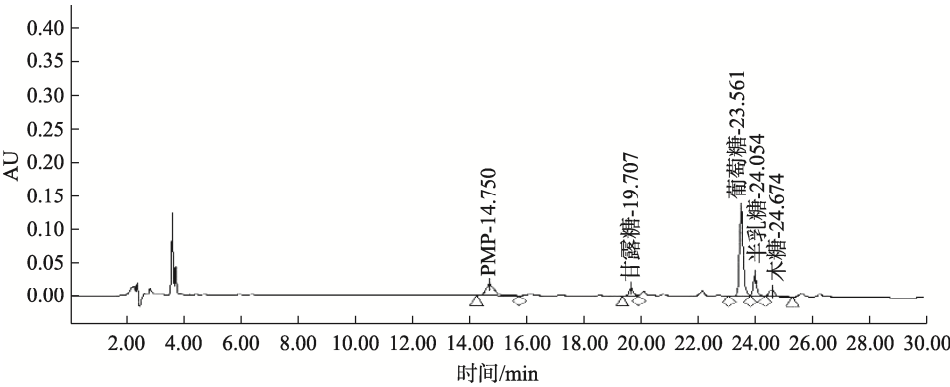


图 6 梯度洗脱的样品色谱图
Fig.6 Gradient elution of the sample chromatogram

表 5 4 种单糖的线性回归方程、相关系数、线性范围及方法检出限($n=6$)
Table 5 Linear regression equations, correlation coefficients, linear ranges and limits of detection of 4 kinds monosaccharides($n=6$)

名称	线性方程	相关系数(r)	线性范围/(mg/mL)	方法检出限/($\mu\text{g/mL}$)
甘露糖	$Y=4.6031X-1.6729$	0.9985	0.5~10	0.52
葡萄糖	$Y=1.6605X+26.0265$	0.9993	0.5~10	1.75
半乳糖	$Y=3.1825X+14.7544$	0.9989	0.5~10	0.95
木糖	$Y=4.3439X+12.3482$	0.9991	0.5~8	0.61

表 6 对照品精密度试验($n=6$)
Table 6 Precision test of reference substance($n=6$)

名称	峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
甘露糖	28456	24169	26960	27563	26587	24916	6.12
葡萄糖	250475	241312	251029	269056	249259	251567	3.62
半乳糖	61154	57137	64216	58073	63021	60273	4.53
木糖	29256	28761	31541	27954	30145	26698	5.81

表 7 样品的精密度试验($n=6$)
Table 7 Precision test of sample($n=6$)

名称	峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
甘露糖	56458	54213	58929	58998	59123	56789	3.42
葡萄糖	302169	326427	321726	331461	329752	342156	4.10
半乳糖	55603	54989	55421	58694	56012	55223	2.45
木糖	16589	16938	18597	17437	18026	16106	5.36

表 8 4 种单糖的回收率试验
Table 8 Recoveries of 4 kinds of monosaccharides

名称	回收率/%									平均回收率/%	RSD/%
	低中高										
甘露糖	99.7	94.8	103.5	108.5	95.4	96.7	92.8	98.1	96.0	98.4	4.98
葡萄糖	93.5	104.6	103.4	98.6	102.6	95.8	99.7	95.7	102.8	99.6	3.99
半乳糖	93.2	108.1	95.6	94.7	98.5	92.6	100.4	91.5	96.6	96.8	5.27
木糖	91.4	104.8	94.3	89.6	92.5	92.6	105.2	89.2	89.2	94.3	6.68

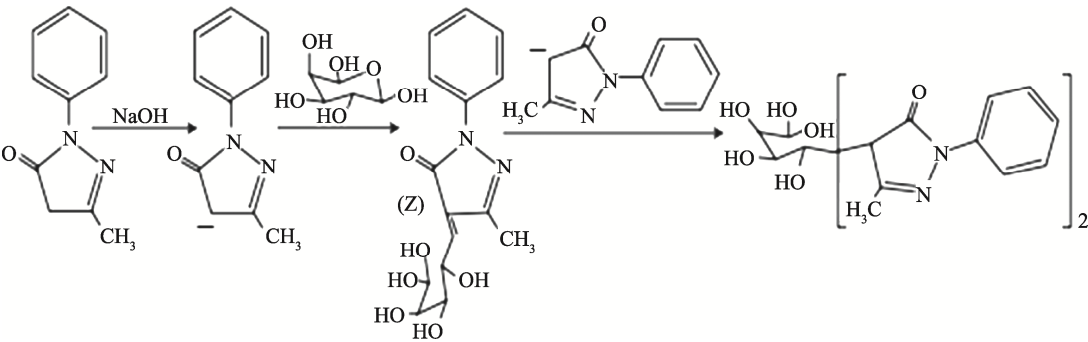


图 7 单糖的 PMP 衍生化过程
Fig.7 PMP derivatization process of monosaccharide

3.4 灵硒康口服液中灵芝多糖的单糖组成的测定

应用上述所研究等度和梯度洗脱方法, 在配方、原料和制备工艺稳定的条件下, 对连续 3 批灵硒康口服液中灵芝多糖的单糖组成进行定量测定, 产品各批含量基本一致(表 9)。等度洗脱是流动相极性不变, 流动相配制、仪器配置及操作

宽。而梯度洗脱是按照样品分析需要不断改变流动相极性, 流动相配制、仪器配置及操作相对复杂, 每分析 1 个样品运行时间相对较短, 峰形较窄, 对称性好(见图 3、图 4、图 5、图 6)。对本研究而言, 这两种方法都可进行定性定量测定, 效果相等, 可供选择应用, 从而丰富了灵芝多糖中单糖组成的测定方法, 也为不同方法的测定结果进行相互验证提供可能。

表 9 3 批次灵硒康口服液灵芝多糖的单糖组成测定结果
Table 9 Determination results of monosaccharide composition of *Ganoderma* polysaccharide in 3 groups Lingxikang oral solution

名称	等度/(mg/100 mL)				梯度/(mg/100 mL)				相对误差/%
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	
甘露糖	1.68	1.90	1.74	1.775	1.84	1.79	1.88	1.63	8.32
葡萄糖	133.92	130.68	108.76	124.45	138.12	115.24	132.61	128.65	3.32
半乳糖	3.60	4.12	3.85	3.86	3.67	3.19	3.65	3.52	8.96
木糖	2.33	2.91	2.76	2.68	2.18	2.84	2.58	2.53	5.76

4 讨论与结论

灵硒康口服液主要是由灵芝水溶性提取物和添加硒化卡拉胶等多种食品添加剂制成。主要功效成分是水溶性蛋白质、糖类物质和微量元素硒。水溶性蛋白质鉴别用灵敏度高的福林酚试剂法，水溶性糖的鉴别用薄层色谱法，为提高鉴别的效果，采用展开剂 2 次展开，使样品与对照药材出现两个位置和颜色完全相同的斑点，证明口服液中灵芝的真实存在。对于灵芝多糖的测定，药典及很多发表文章采用蒽酮硫酸比色法，该法是以葡萄糖为对照品测定多糖总量，专属性较差。本研究采取乙醇沉淀，三氟乙酸水解，改用 SPE 小柱纯化，比溶剂萃取简便有效，PMP 试剂的柱前衍生化，高效液相色谱法，Lichrospher C₁₈ 柱，等度和梯度洗脱，紫外检测，可定性定量测定灵芝口服液中灵芝多糖中的甘露糖、葡萄糖、半乳糖和木糖等 4 种主要单糖组成和含量，可进一步证明灵芝真实存在，与不用柱前衍生化处理的文献^[3,4]报道结果基本一致，但比高效凝胶色谱和高效阴离子交换色谱法测定要简便实用。同时本文对样品纯化、仪器条件、流动相的选择、配比、pH 等均作了较大的改进。从而为此类产品真伪鉴别和含量测定提供借鉴，也为提高这类产品质量，保障食用安全提供有力保障。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局关于印发保健食品注册审评审批工作细则的通知(食药监食监三(2016)139 号)[S]. 2016-11-17.
Circular of the State Administration of Food and Drug Administration on the issuance of detailed rules for the examination, examination and approval of the registration of health food (food, drug and food supervision No. 3 (2016) 139) [S]. 2016-11-17.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia part one [M]. Beijing: Chinese medical science and technology press, 2015.

[3] 刘艳芳, 唐庆九, 张劲松, 等. 灵芝提取物 β -1,3-葡聚糖含量测定及多糖成分分析[J]. 菌物学报, 2018, 37(11): 1525-1531.

Liu YF, Tang QJ, Zhang JS, *et al.* Determination of β -1,3- glucan content and analysis of polysaccharide composition from *Ganoderma Lucidum* extract [J]. Mycosystema, 2018, 37(11): 1525-1531.

[4] 刘艳芳, 唐庆九, 张劲松, 等. 粉碎细度对灵芝子实体水提物中多糖组成和体外免疫活性的影响[J]. 食用菌学报, 2018, 25(3): 56-62.
Liu YF, Tang QJ, Zhang JS, *et al.* Effect of particle size on the extraction, molecular character and *in vitro* immunological activity of polysaccharides from *Ganoderma Lucidum* fruit bodies [J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(3): 56-62.

[5] 罗虹建, 林才伟, 钱友安, 等. HPLC 法测定仿野生栽培灵芝中多糖肽和灵芝酸含量[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4729-4732.
Luo HJ, Lin CW, Qian YA, *et al.* Determination of polysaccharide peptides and *Ganoderic* acid contents in *Ganoderma Lucidum* by HPLC Method [J]. Genomics Appl Biol, 2017, 36(11): 4729-4732.

[6] Zhao RL, Chen QL, He YM. The effect of *Ganoderma Lucidum* extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 118: 2001-2005.

[7] Wu SJ. Hypolipidaemic and anti-lipidperoxidant activities of *Ganoderma Lucidum* polysaccharide [J]. Phytochemistry, 2015, 114: 109-113.

[8] Darija C, Zeljko K, Masa KH. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review [J]. Molecules, 2018, 23(3).

[9] Chen YX, Ming Y, Wang YX, *et al.* Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography [J]. Phytochem Analysis, 2009, 20(6): 503-510.

[10] Qian Z, Zhao J, Li D. Analysis of global components in *Ganoderma* using liquid chromatography system with multiple columns and detectors [J]. J Sep Sci, 2012, 35(20): 2725-2734.

[11] 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.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia part four [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015.

[12] 王学标, 何云侠, 刘强. 福林酚试剂法与缩二脲试剂法测定饲用蛋白酶活力的比较分析[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(3): 23-28.
Wang XB, He YX, Liu Q. Comparison of the folinphenol reagent method and the biuret reagent method for determination of feed protease activity [J]. Anim Husb Vet Med, 2019, 51(3): 23-28.

[13] GB 5009.8-2016 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S].

GB 5009.8-2016 Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in food [S].

- [14] 高向阳. 新编仪器分析(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2013.

Gao XY. New instruments analysis (second edition) [M]. Beijing: Science Press, 2013.

- [15] 符梦凡, 赵一帆, 阎卫东. 柱前衍生化 HPLC 法分析枸杞多糖中单糖组成[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 186-191.

Fu MF, Zhao YF, Yan WD. Analysis of monosaccharide composition of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. by HPLC with precolumn derivatization [J]. Food Sci, 2018, 39(18): 186-191.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



张连龙, 硕士, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为药品、保健食品的研制与产品质量分析方法的研究。

E-mail: 924137657@qq.com



刁春霞, 执业药师, 主要研究方向为药品、保健食品的研制与产品质量分析方法的研究。

E-mail: 381983679@qq.com