

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2278—2012

**灵芝产品中灵芝酸含量的测定
高效液相色谱法**

Determination of ganoderic acid in ganoderma products by HPLC

2012-12-24 发布

2013-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海)、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所。

本标准主要起草人：饶钦雄、邢增涛、周苏、赵晓燕、白冰、刘海燕。

灵芝产品中灵芝酸含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了灵芝及其制品中灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于灵芝及其制品灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的测定。

本标准灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的定量测定范围均为 30 mg/kg~500 mg/kg。

本标准灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的检测限均为 10 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中灵芝酸 A 和灵芝酸 B 用甲醇超声提取,提取液经氮气吹干后甲醇溶解,高效液相色谱法测定,以保留时间进行定性,外标法定量。

4 试剂

除非另有规定,仅使用色谱纯试剂和符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 甲醇(CH₃OH)。

4.2 甲酸(CH₂O₂)。

4.3 乙腈(CH₃CN)。

4.4 0.1%甲酸水溶液:取 1 mL 甲酸(4.2)定容至 1 L。

4.5 灵芝酸 A(CAS 号 81907-62-2)和灵芝酸 B(CAS 号 81907-61-1):纯度≥96%。

4.6 标准溶液:准确称取灵芝酸 A(4.5)和灵芝酸 B(4.5)标准品各 10 mg(精确至 0.1 mg),用甲醇定容至 10 mL。该混合标准液中灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的质量浓度均为 1 000 μg/mL, -18℃冰箱保存,有效期 3 个月。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪,配紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2 超声波清洗器,功率大于 450 W,频率 50 Hz~100 Hz。

5.3 分析天平,感量 0.01 g 和感量 0.000 1 g。

5.4 有机系滤膜,0.45 μm。

5.5 样品粉碎机。

5.6 氮气吹干仪。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取不少于 200 g 具代表性灵芝子实体,用样品粉碎机(5.5)粉碎(超细粉等无需粉碎),将样品装于密封容器中,制成待测样,0℃~20℃保存备用。

6.2 试样提取

称取粉碎均匀的试样 0.5 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加甲醇(4.1)25 mL 摇匀,置于超声波清洗器(5.2)中超声提取 30 min,提取液经滤纸过滤,取滤液 5 mL 置于 10 mL 刻度试管中,于 50℃ 左右氮气吹干,残留物用 1.0 mL 甲醇(4.1)溶解,过滤膜(5.4),供高效液相色谱仪分析。

6.3 测定

6.3.1 色谱参考条件

色谱柱:C18 柱,250 mm×4.6 mm(i. d.),5 μm,或相当规格色谱柱。

流动相:乙腈(4.3)+0.1%甲酸水溶液(4.4)=30+70。

流速:1.0 mL/min。

柱温:40℃。

波长:258 nm。

进样量:20 μL。

6.3.2 标准曲线

准确吸取适量混合标准溶液(4.6)用甲醇稀释,配制质量浓度为 1.00 μg/mL、2.00 μg/mL、5.00 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL 和 50.0 μg/mL 的标准工作液,按参考色谱条件测定,以灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线或计算线性回归方程。标准品色谱图参见图 A.1。

6.3.3 测定

按照保留时间进行定性,样品与标准品保留时间的相对偏差不大于 2%,单点或多点校正外标法定量。待测样液中灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的响应值应在标准曲线范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分析。同时做空白试验。

7 结果计算

试样中灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的量以质量分数 ω 计,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算。

$$\omega = \frac{A \times \rho \times V}{A_s \times m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A —— 试样中灵芝酸 A 或灵芝酸 B 的峰面积;

A_s —— 标准工作液中灵芝酸 A 或灵芝酸 B 的峰面积;

ρ —— 标准工作液中灵芝酸 A 或灵芝酸 B 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V —— 试样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m —— 试样的质量,单位为克(g);

f —— 样品稀释倍数。

以两次平行测定值得算数平均值作为测定结果,计算结果保留三位有效数字。

8 精密度

8.1 重复性

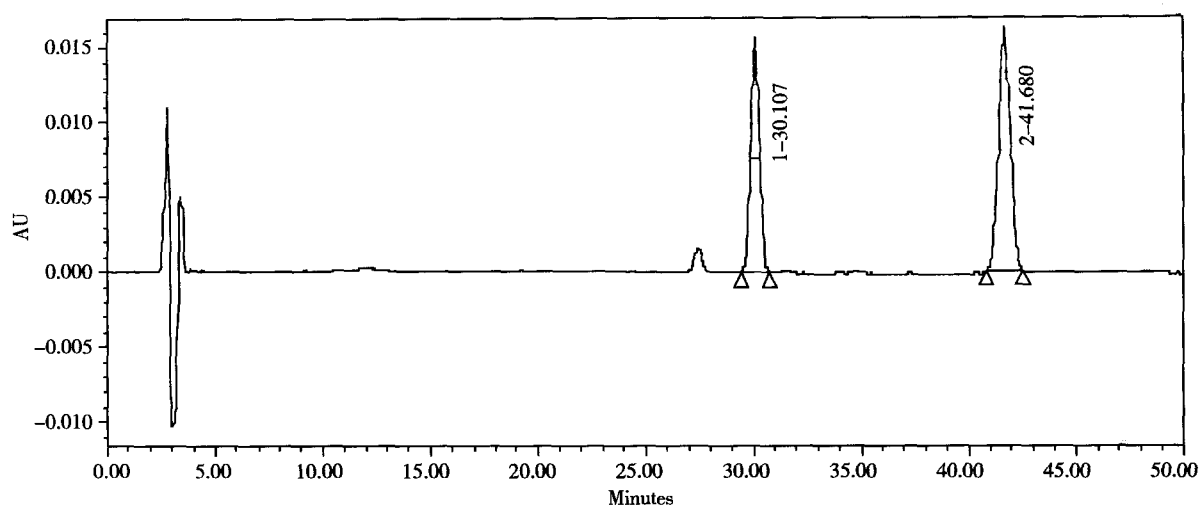
在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5%。

8.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立性测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的10%。

附录 A
(资料性附录)
参考色谱图

灵芝酸 A 和灵芝酸 B 标准品色谱图见图 A. 1。



说明:

1——灵芝酸 B;

2——灵芝酸 A。

图 A. 1 灵芝酸 A 和灵芝酸 B 标准品色谱图