

分析测试新成果 (360 ~ 365)

高效液相色谱法测定六神曲中乳酸对映异构体的含量

李 运^{1,2}, 杜锐洵¹, 张晓萍¹, 韩晓霞¹, 王月玲¹, 许晓辉¹, 戚鹏飞¹

(1. 兰州市食品药品检验检测研究院, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州大学 药学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 建立高效液相色谱法测定六神曲中乳酸对映异构体的含量, 并对样品提取方法进行优化。样品经粉碎后, 用纯化水超声提取, 10 000 r/min 离心 5 min。上清液经滤膜过滤后, 以 2 mmol/L CuSO₄ 溶液 (5% 的异丙醇溶液为溶剂) 为流动相, 设定流速为 0.60 mL/min 洗脱, 经 Chirex 3126 (D)-penicillami (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱进行手性拆分, 二极管阵列检测器测定, 外标法定量。结果表明, L-乳酸、D-乳酸在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 7$), 平均加样回收率分别为 98.5%、97.1%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.8% 和 2.4%。方法简便可行, 稳定可靠, 可为六神曲的品质提升提供参考。

关键词: 六神曲; L-乳酸; D-乳酸; 手性分离; 高效液相色谱法

中图分类号: O657. 7⁺2

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2024)06-0360-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2024.06.002

CSTR: 32263.14.j.1006-3757.2024.06.002

Determination of Lactic Acid Enantiomers in *Massa Medicata Fermentata* by High Performance Liquid Chromatography

LI Yun^{1,2}, DU Ruihu¹, ZHANG Xiaoping¹, HAN Xiaoxia¹, WANG Yueling¹, XU Xiaohui¹, QI Pengfei¹

(1. Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China; 2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The method for the determination of lactic acid enantiomers in *Massa Medicata Fermentata* by high performance liquid chromatography (HPLC) was established, and the sample extraction method was optimized. The sample was crushed and extracted using ultrasonic extraction with purified water, centrifuged at 10 000 r/min for 5 min. The supernatant was filtered using a filter membrane, eluted with 2 mmol/L CuSO₄ solution (5% isopropyl alcohol as solvent) as mobile phase at a flow rate of 0.60 mL/min, separated chirally on a Chirex 3126 (D)-penicillami (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, and detected using a diode array detector, quantified by external standard method. The results showed that L-lactic acid and D-lactic acid had good linearities in their ranges ($r \geq 0.999\ 7$), and the average recoveries were 98.5% and 97.1%, respectively. The relative standard deviations (RSD) were 1.8% and 2.4%, respectively. The method is simple, feasible, stable, and reliable, and can provide a reference for the quality improvement of *Massa Medicata Fermentata*.

Key words: *Massa Medicata Fermentata*; L-lactic acid; D-lactic acid; chiral separation; HPLC

收稿日期: 2024-08-08; 修订日期: 2024-10-11.

基金项目: 陇原青年创新创业人才项目 (2023LQGR49), 甘肃省药品科研项目 (2022GSMPA0037), 兰州市青年科技人才创新项目 (2023-QN-144) [Innovation and Entrepreneurship Talent Program of Longyuan Youth (2023LQGR49), Drug Research Program of Gansu Medical Products Administration (2022GSMPA0037), Youth Science and Technology Talent Innovation Program of Lanzhou (2023-QN-144)]

作者简介: 李运 (1985-), 男, 高级工程师, 从事中药质量控制研究, Tel: 0931-5180326, E-mail: lyun04@163.com.

六神曲为辣蓼、青蒿、杏仁等药加入面粉混合均匀后,在一定温度、湿度条件下发酵而成的曲剂,广泛应用于临床,被誉为“中华第一曲”。临床疗效确切,具有健脾和胃,消食调中之功效,多用于脾胃虚弱、饮食停滞、小儿食积等的治疗^[1-2]。现代研究主要侧重于六神曲发酵过程中微生物的分离及鉴定研究^[3-5],由于生产过程受多种微生物的作用,因此可产生次级代谢产物乳酸。乳酸分子内含有一个不对称碳原子,故分为 L-乳酸及 D-乳酸两种旋光异构体^[6]。目前,分离和测定 L-乳酸与 D-乳酸手性对映体的方法主要包括酶法、气相色谱(GC)、气相色谱质谱联用(GC-MS)、毛细管电泳(CE)、液相色谱质谱联用(LC-MS)、手性高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)等^[7-10]。已有多种方法用于乳酸对映异构体的分析,其中手性衍生化试剂标记具有高灵敏度、高选择性的特点^[11],但仍存在一定的局限性。本研究基于手性拆分柱中青霉胺与二价铜离子配位体,以及乳酸的两种对映体络合能力的差异^[12],优化了分析方法,建立了六神曲中乳酸对映体的拆分及定量方法^[13],并利用该法对主流厂家生产的六神曲及其炮

制品(麸炒六神曲、焦六神曲)中 L-乳酸和 D-乳酸的含量进行比较研究,以期为六神曲的质量提升提供参考。

1 试验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo SCIENTIFIC UltiMate3000 高效液相色谱仪,配备 DAD 检测器(Thermo 公司);采用 Chirex 3126 (D)-penicillami(4.6 mm×250 mm, 5 μm)手性拆分柱(Phenomenex 公司);SBL-10DT 超声波恒温清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);XSE205DU 型十万分之一分析天平(梅特勒托利多公司);Milli-Q IQ 7000 超纯水制备系统(默克密理博公司);艾本德高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

L-乳酸(批号: STC1640120,纯度: 98.0%), D-乳酸(批号: STC6650320,纯度: 90.0%)购自上海诗丹德生物技术有限公司。异丙醇为色谱纯(默克产品),水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。试验所用六神曲样品 30 份,样品来源信息如表 1 所列。

1.2 标准溶液的制备

分别精密称取 L-乳酸、D-乳酸对照品适量,加

表 1 六神曲样品信息
Table 1 Sample informations of *Massa Medicata Fermentata*

编号	批号	类型	来源	编号	批号	类型	来源
S1 ^a	202006215	生品	成都市	S16 ^a	19100242	炒焦	成都市
S2 ^a	202007173	生品	成都市	S17 ^a	202105147	炒焦	成都市
S3 ^a	202009130	生品	成都市	S18 ^a	202007119	炒焦	成都市
S4 ^a	202010004	生品	成都市	S19 ^b	210520	生品	杭州市
S5 ^a	202011231	生品	成都市	S20 ^b	210531	生品	杭州市
S6 ^a	202101244	生品	成都市	S21 ^b	210604	生品	杭州市
S7 ^a	202102014	生品	成都市	S22 ^b	210308	炒焦	杭州市
S8 ^a	202102109	生品	成都市	S23 ^b	210311	炒焦	杭州市
S9 ^a	202103021	生品	成都市	S24 ^b	210312	炒焦	杭州市
S10 ^a	202103057	生品	成都市	S25 ^c	22012301	生品	发酵0 h
S11 ^a	202103088	生品	成都市	S26 ^c	22012302	生品	发酵24 h
S12 ^a	202103167	生品	成都市	S27 ^c	22012303	生品	发酵39 h
S13 ^a	202103099	麸炒	成都市	S28 ^c	22012304	生品	发酵48 h
S14 ^a	202007147	麸炒	成都市	S29 ^c	22012305	生品	发酵63 h
S15 ^a	202012126	麸炒	成都市	S30 ^c	22012306	生品	发酵72 h

注: a表示同一厂家按《卫生部药品标准·中药成方制剂》所收载六神曲制法生产; b表示同一厂家按《浙江省中药炮制规范》所收载六神曲制法生产; c表示实验室按《卫生部药品标准·中药成方制剂》所收载六神曲制法自制不同发酵阶段样品

2 mmol/L CuSO_4 溶液(以 5% 的异丙醇溶液为溶剂配制)溶解并定容至 10 mL, 得到质量浓度分别为 1 096.62、1 526.40 $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品溶液。分别精密移取以上 L-乳酸、D-乳酸单一对照品溶液适量, 加流动相配制成每 1 mL 分别含 219.32 和 305.28 μg 的混合对照品溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存、备用。

1.3 样品前处理

精密称定六神曲样品粉末约 0.3 g 于 50 mL 离心管中, 加入纯化水 30.0 mL, 称重并记录, 超声提取(功率: 300 W, 频率: 40 kHz)10 min 后取出, 冷却至室温, 再次称重, 用原溶液补足减失的质量, 摇匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

1.4 空白对照溶液的制备

按照《卫生部药品标准·中药成方制剂》记载六神曲的处方组成及制法^[2], 完成样品的制备, 但不进行发酵处理。按照 1.3 项下方法处理, 即得空白对照溶液。

1.5 色谱条件

选用 Chirex 3126 (D)-penicillami(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)手性分离柱, 流动相为 2 mmol/L CuSO_4 溶液(以 5% 的异丙醇溶液为溶剂配制), 设定流速为 0.60 mL/min, 检测波长选择 234 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL 。

2 结果与讨论

2.1 系统适用性试验

精密吸取 1.2 项下混合对照品溶液、1.4 项下空白对照溶液、表 1 中 S6 号样品按 1.3 项下方法制备供试品溶液适量, 分别按 1.5 项下色谱条件进样分析, 并记录各样品的色谱峰。L-乳酸、D-乳酸的色谱峰与相邻色谱峰的分度度 >1.5 , 理论塔板数以 L-乳酸计不低于 8 000 N/m, 混合对照品、供试品及空白对照溶液的色谱峰如图 1 所示。

2.2 提取条件的优化

本试验分别考察了超声提取与热回流提取下六神曲中乳酸对映异构体的提取效果, 结果表明, 超声提取优于热回流提取[图 2(a)], 故选择以超声提取为样品提取方式。同时, 比较了不同提取溶剂[图 2(b)]、不同提取时间[图 2(c)]及不同提取溶剂用量[图 2(d)]下样品中 L-乳酸及 D-乳酸的提取效果。结果可知, 水的提取效果优于不同比例的乙醇溶液。超声提取时间以 10 min 较佳, 伴随超声

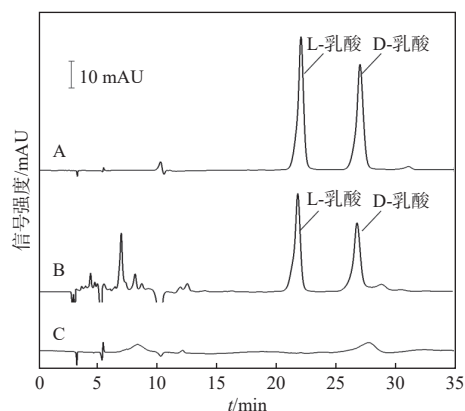


图 1 (A)对照品、(B)供试品及(C)空白对照溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of (A) reference substance, (B) sample, (C) blank control

提取时间的延长, D-乳酸的含量变化不显著, L-乳酸的含量呈下降趋势, 可能受到超声过程产热的影响。提取溶剂为 30 mL, 即可满足提取。因此, 最终选择提取溶剂为 30 mL 水, 超声提取时间为 10 min。

2.3 线性关系、检测限及定量限

取单一对照品溶液母液, 精密吸取 0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 按 1.2 项下方法配制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按 1.5 项下色谱条件进样, 记录色谱峰面积。以对照品溶液的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标 x , 峰面积为纵坐标 y , 绘制标准曲线。再将质量浓度分别为 13.71、19.08 $\mu\text{g/mL}$ 的 L-乳酸和 D-乳酸对照品溶液逐步稀释后进样分析, 以信噪比约为 3 和 10 时作为各被测成分的检出限和定量限, 结果如表 2 所列。

2.4 精密度试验

取 1.2 项下的 L-乳酸、D-乳酸标准品溶液, 连续进样 6 次, 测得 L-乳酸和 D-乳酸峰面积的相对标准偏差(RSD)值分别为 0.70%、1.11%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取编号为 S6 的样品, 按 1.3 项下方法制备样品溶液, 在 1.5 项色谱条件下, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 记录色谱图。测得 L-乳酸和 D-乳酸峰面积的 RSD 值分别为 0.59%、0.85%, 表明供试品溶液于 24 h 内测定结果稳定。

2.6 重复性试验

分别取编号为 S6 的样品 6 份, 精密称定, 按

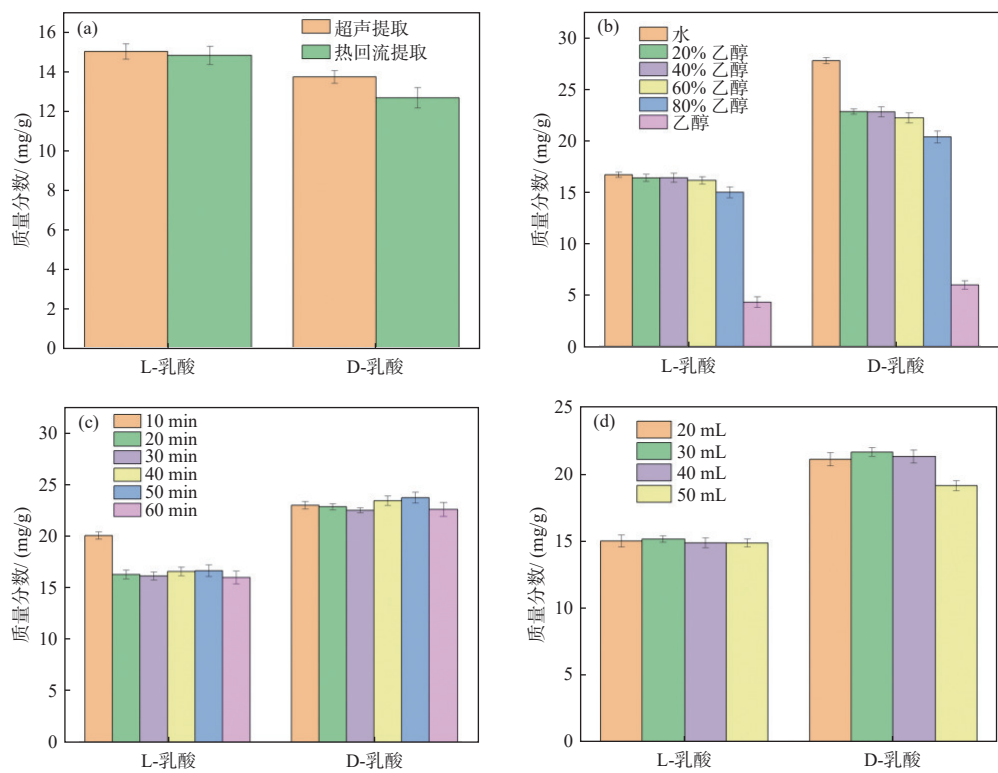


图 2 不同 (a) 提取方式、(b) 提取溶剂、(c) 提取时间、(d) 提取溶剂量对乳酸对映异构体提取效果的影响

Fig. 2 Effect of different (a) extraction methods, (b) extraction solvents, (c) extraction times, (d) extraction solvent amounts on extraction effects of lactic acid enantiomers

表 2 六神曲中乳酸对映异构体的线性关系

Table 2 Linear relationships of lactic acid enantiomers in *Massa Medicata Fermentata*

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	r	检出限/(mg/g)	定量限/(mg/g)
L-乳酸	$y=0.232\ 3x-0.413\ 1$	13.71~438.65	0.999\ 7	0.06	0.09
D-乳酸	$y=0.150\ 9x-0.348\ 2$	19.08~610.56	0.999\ 9	0.07	0.09

1.3 项下方法制备供试品溶液,在 1.5 项下色谱条件进样测定,记录色谱图.测得 L-乳酸和 D-乳酸峰面积的 RSD 值分别为 2.01%、2.18%,表明该方法重复性良好.

2.7 加样回收率试验

精密称取编号为 S6 的六神曲样品各 6 份,每份 0.15 g,精密加入与样品中成分含量接近的 L-乳酸、D-乳酸对照品.按照 1.3 项下操作制备供试品溶液,在 1.5 项色谱条件下进样测定,其进样体积为 10 μL ,记录色谱峰,并计算回收率,结果如表 3 所列.测得 L-乳酸、D-乳酸的平均回收率($n=6$)分别为 98.5%、97.1%,RSD 值分别为 1.8%、2.4%.

2.8 样品测定

精密称取编号为 S1~S30 的六神曲样品各

3 份,每份 0.3 g,按照 1.3 项下操作制备供试品溶液,在 1.5 项色谱条件下进样测定,记录色谱峰,分别计算 L-乳酸、D-乳酸的含量,结果如表 4 所列.

3 结论

本研究优化了样品提取条件,利用手性柱进行样品中乳酸异构体的拆分,建立了测定六神曲中乳酸对映异构体含量的方法.30 份六神曲样本测定结果表明,按部颁标准四川成都产六神曲中,不同批次样本的生品中 L-乳酸和 D-乳酸的含量存在一定的差异.由于该发酵过程为自然发酵,故易受生产期间环境温度及相对湿度等的影响,进而导致样品中可以代谢产生乳酸微生物(如米根霉、戊糖片球菌等)丰度的差异^[5],且受微生物代谢酶的影响,使

表 3 六神曲中乳酸对映异构体加样回收率试验结果 ($n=6$)
Table 3 Recoveries of lactic acid enantiomers in *Massa Medicata Fermentata* ($n=6$)

成分	样品质量/mg	加入质量/mg	测得质量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
L-乳酸	3.90	3.86	7.78	100.52	98.5	1.8
	3.87	3.86	7.65	97.93		
	3.88	3.86	7.70	98.96		
	3.89	3.86	7.61	96.37		
	3.87	3.86	7.75	100.52		
	3.89	3.86	7.63	96.89		
D-乳酸	1.68	1.67	3.25	94.01	97.1	2.4
	1.67	1.67	3.29	97.01		
	1.68	1.67	3.36	100.60		
	1.68	1.67	3.31	97.60		
	1.67	1.67	3.26	95.21		
	1.68	1.67	3.32	98.20		

表 4 六神曲样品含量测定结果
Table 4 Content results of *Massa Medicata Fermentata* samples

/(mg/g, $n=3$)					
编号	L-乳酸	D-乳酸	编号	L-乳酸	D-乳酸
S1	20.66	21.13	S16	26.40	15.79
S2	20.57	24.25	S17	24.81	21.27
S3	15.10	21.05	S18	18.26	22.98
S4	18.19	18.26	S19	—	—
S5	21.35	25.91	S20	—	—
S6	25.74	11.11	S21	—	—
S7	27.66	8.54	S22	—	—
S8	28.46	8.57	S23	—	—
S9	26.02	8.49	S24	—	—
S10	24.79	8.34	S25	—	—
S11	24.69	11.68	S26	—	—
S12	26.59	8.45	S27	—	—
S13	24.92	9.91	S28	0.58	0.91
S14	19.94	24.41	S29	0.56	0.94
S15	20.82	12.72	S30	0.81	1.23

注：“—”表示未检出

得乳酸异构体的表达量不同. 此外, L-乳酸在人体内的代谢速率比 D-乳酸快, 这与人体中含有 L-乳酸脱氢酶有关, 过量摄入 D-乳酸可能会引起代谢紊乱或中毒, 因此 L-乳酸广泛应用于食品、医药等行业. 生品、麸炒品及炒焦品中 L-乳酸和 D-乳酸的总和分别介于 33.13~47.26、33.54~44.35、41.24~46.08 mg/g 之间. 实验室按部颁标准自制了不同发酵阶段

的六神曲样本, 测定结果显示发酵 0 ~ 39 h, 未检出乳酸, 随着发酵的持续, 在发酵 48 ~ 72 h, 乳酸对映异构体的含量均呈现上升趋势. 同时, 按《浙江省中药炮制规范》收载六神曲制备方法所生产的样本中, 均未检出乳酸, 主要原因是其生产工艺中加入了一定量的米曲霉孢子粉, 使得米曲霉作为优势菌大量生长, 限制了其他产乳酸微生物的生长. 由此可见,

传统的自然发酵,受不同地域发酵环境的影响较大。为了提高产品质量的稳定性及安全性,控制条件的设施发酵及纯种发酵将是今后研究的重点。

对于D-乳酸摄入安全方面,采用国际通用标准,按成人体重55.9 kg、儿童32.7 kg,每日推荐六神曲的用量均暂定为12 g^[2],六神曲中D-乳酸的含量按测定最大值25.91 mg/g计算,成人及儿童每日D-乳酸摄入量为311 mg,远远低于其每天摄入安全限量值100 mg/kg以下,初步认为由摄入六神曲引发的实际安全风险非常小。

本文建立的六神曲中乳酸对映异构体含量的测定方法,可为六神曲的品质提升,质量控制方法的完善,提供技术参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 553. [Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 (IV) [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 553.]
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂: 第19册[S]. 1994: 36. [Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China. Ministry of Health of the People's Republic of China Drug Standards·Traditional Chinese medicine preparation: book 19[S]. 1994: 36.]
- [3] 张丽霞, 高文远, 王海洋. 六神曲中酵母菌的鉴定[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1928-1931. [ZHANG Lixia, GAO Wenyuan, WANG Haiyang. Identification of microorganism from traditional Chinese medicine *Massa Medicata Fermentata*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(13): 1928-1931.]
- [4] 陈娟, 焦晓林, 杨春勇, 等. 分离培养方法结合PCR-SSCP技术分析六神曲中的真菌类群[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4169-4173. [CHEN Juan, JIAO Xiaolin, YANG Chunyong, et al. Fungal composition in *Massa Medicata Fermentata* based on culture dependent method and independent PCR-SSCP technique[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(21): 4169-4173.]
- [5] 陈彦琳, 王云庭, 关凯乐, 等. 六神曲发酵过程中微生物群落结构研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5219-5225. [CHEN Yanlin, WANG Yunting, GUAN Kaile, et al. Investigation of microbial community involved in fermentation of *Massa Medicata Fermentata*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(21): 5219-5225.]
- [6] 梅芊, 刘英. HPLC法测定醋酸奥曲肽注射剂中乳酸对映异构体含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(11): 2019-2024. [MEI Qian, LIU Ying. HPLC determination of lactic acid enantiomeric content in octreotide acetate injection[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2017, 37(11): 2019-2024.]
- [7] 汪雪莲, 於钊庆, 朱莉, 等. 毛细管电泳法同时测定发酵制品中D-和L-乳酸含量[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(9): 64-66, 70. [WANG Xuelian, YU Zhaoqing, ZHU Li, et al. Simultaneous determination of D- and L-lactic acids by capillary electrophoresis[J]. Chemistry & Bioengineering, 2017, 34(9): 64-66, 70.]
- [8] 陈希, 段和祥, 鄢雷娜, 等. 高效液相色谱手性固定相法拆分和测定乳酸左氧氟沙星中乳酸对映体[J]. 分析科学学报, 2023, 39(1): 93-97. [CHEN Xi, DUAN Hexiang, YAN Leina, et al. Separation and determination of lactic acid enantiomers in levofloxacin lactate by HPLC chiral stationary phase method[J]. Journal of Analytical Science, 2023, 39(1): 93-97.]
- [9] 江锋, 赵振宇, 聂叶, 等. 高效液相色谱法对白酒中的L-乳酸和D-乳酸的手性分离和测定[J]. 酿酒科技, 2019(9): 93-97. [JIANG Feng, ZHAO Zhenyu, NIE Ye, et al. Chiral separation and determination of L- and D-lactic acid in Baijiu by high-performance liquid chromatography[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2019(9): 93-97.]
- [10] 王跃飞, 江振作, 张蕾, 等. 中药神曲中乳酸的含量测定方法: CN 201410712756.9[P]. 2015-03-25. [WANG Yuefei, JIANG Zhenzuo, ZHANG Lei, et al. The determination method of lactic acid content in Chinese medicine of Shenqu: CN 201410712756.9[P]. 2015-03-25.]
- [11] Jin Y Y, Zhang M H, Li X L, et al. A dried sweat spot paper (DSSP) method based on novel mass spectrometry probe labeling for detection and resolution of DL-lactate enantiomers as potential biomarkers for diabetes mellitus[J]. Analytica Chimica Acta, 2024, 1317: 342914.
- [12] Omole O O, Brocks D R, Nappert G, et al. High-performance liquid chromatographic assay of (±)-lactic acid and its enantiomers in calf serum[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999, 727(1-2): 23-29.
- [13] Jánovová L, Hroboňová K. Stationary phase type and temperature effect on HPLC separation of lactic acid enantiomers[J]. Acta Chimica Slovaca, 2021, 14(1): 60-65.