

这些差异成分及其对药效的影响,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1977

[3] 陆仲毅, 毛德, 何孟如, 等. 芒果叶化学成分研究 [J]. 中草药, 1982, 13(3): 3

[4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980

[5] 谢部山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655

[6] 邓家刚, 冯旭, 王勤, 等. 不同产地及不同品种芒果叶中芒果苷的含量对比研究 [J]. 中成药, 2006, 28(12): 1755-1756

[7] 覃洁萍, 刘进, 叶勇, 等. 复方扶芳藤合剂 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及其在制剂质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 1422-1425

[8] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 等. 不同产地巴戟天中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1644-1643

[9] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42

[10] 崔洋, 王巧, 张兰桐, 等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301

## 阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定

吴霞<sup>1</sup>, 徐硕<sup>2</sup>, 罗容<sup>1</sup>, 于萍<sup>1</sup>, 毕赢<sup>1\*</sup>

(1 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2 北京大学药学院, 北京 100083)

**摘要:**目的 建立新疆维吾尔民间常用药阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定方法。方法 采用香草醛-冰醋酸、高氯酸比色法,以药材中指标成分去氢硫色多孔菌酸为对照品,检测波长为 554 nm,测定总三萜酸的量。采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.4% 磷酸水溶液(61:39)为流动相,242 nm 为检测波长,柱温 25 ℃,体积流量 1.0 mL/min,高效液相色谱法测定去氢硫色多孔菌酸的量。结果 阿里红中总三萜酸在 0.040 4~0.242 4 mg/mL 呈良好的线性关系( $r=0.998\ 9$ ),加样回收率均值为 98.56%。HPLC 法测定去氢硫色多孔菌酸在 0.022 3~0.133 7 mg/mL 线性关系良好( $r=0.999\ 7$ ),加样回收率均值为 100.68%。结论 两种方法均操作简便,重现性好,结果可靠,适用于阿里红药材中三萜成分的质量控制。

**关键词:**阿里红; 三萜酸; 去氢硫色多孔菌酸; 比色法; 高效液相色谱法

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)09-1546-03

阿里红 *Fomes officinalis* (Vill. ex. Fr.) Ames 是多孔菌科层孔菌属的真菌子实体,收载于中华人民共和国卫生部药品标准《维吾尔药分册》,为维吾尔药复方阿里红片的主要成分之一,主要用于祛痰平喘<sup>[1]</sup>,广泛分布于新疆天山东部和阿尔泰山区,新疆维吾尔医常用其治疗慢性支气管炎、腹痛、感冒、肺结核和各种癌症<sup>[2,3]</sup>。阿里红中主要含有三萜酸、脂肪酸等<sup>[4-7]</sup>。三萜类成分是很多药用真菌的有效成分之一,在提高人体免疫功能、抗衰老及其他许多保健功能方面已受到高度重视。研究表明阿里红中主要的羊毛甾烷型三萜酸类化合物对凝血酶具有一定的抑制活性<sup>[7]</sup>,但其测定方法国内外未见报道。为了更好地开发利用阿里红资源,本实验首次建立了阿里红中去氢硫色多孔菌酸的 RP-HPLC 测定方法及比色法测定总三萜酸成分的方法,为其质量控制提供了科学依据。

### 1 材料

1.1 样品来源:阿里红 2007 年 7 月至 2009 年 2 月购

于维吾尔医院及维吾尔药材市场,经新疆药物研究所刘庆华研究员鉴定为多孔菌科层孔菌属阿里红 *Fomes officinalis* (Vill. ex. Fr.) Ames 的子实体。

1.2 仪器与试剂:Agilent 1100 型高效液相色谱仪,UV762 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),T460 型超声波清洗器(35 kHz,德国),AR1140 分析天平(OHAUS 公司,美国),ME235S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),乙腈(色谱纯),水(娃哈哈纯净水),其余试剂均为分析纯。去氢硫色多孔菌酸对照品,自制,经 IR、MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 鉴定为去氢硫色多孔菌酸<sup>[7]</sup>,质量分数 98.9%。

### 2 方法与结果

#### 2.1 总三萜酸的测定

2.1.1 对照品溶液的制备:精密称取干燥恒重的去氢硫色多孔菌酸对照品适量,加甲醇制成 0.202 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备:取阿里红药材粗粉约 2

\* 收稿日期:2009-11-19  
 基金项目:北京市属高等学校人才强教计划资助项目(PHR200907113,PHR201008402)  
 作者简介:吴霞(1967-),女,博士,副教授,主要从事中药化学成分研究。 Tel:(010)83911635 E-mail:wuxia6710@163.com

g, 精密称定, 置于索式提取器中, 加入二氯甲烷 70 mL, 索氏提取 2.5 h, 提取液减压蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.1.3 标准曲线的制备: 精密吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各精密加入 5% 香草醛-冰醋酸 0.5 mL, 高氯酸 1.0 mL, 混匀, 密塞, 置 60 °C 水浴中恒温加热 25 min, 取出, 立即置冰水浴中冷却, 加入冰醋酸稀释至刻度, 摇匀。以相应试剂为空白, 在 554 nm 波长处测吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线。标准曲线方程为  $A = 23.84C + 0.0297$ ,  $r = 0.9989$ , 在 0.0404~0.2424 mg/mL 浓度内线性关系良好。

2.1.4 精密度试验: 精密吸取供试品溶液 5 份, 分别按标准曲线制备项下操作, 于 554 nm 处, 以相应试剂为空白, 测定吸光度, RSD 为 1.53%。

2.1.5 稳定性试验: 取对照品和供试品溶液, 分别按标准曲线制备项下操作, 以相应试剂为空白, 分别在 0、10、20、30、60、90、120、150 min, 波长 554 nm 处测吸光度, 结果表明阿里红中总三萜酸成分经显色后 60 min 内, 吸光度变化较小, RSD 为 2.59%, 90 min 时 RSD 上升至 3.32%, 随着时间延长, 吸光度不断下降, 所以测定应在显色后 60 min 内完成。

2.1.6 重现性试验: 取同一批(2007092801)阿里红药材粗粉约 2 g, 精密称定, 按 2.1.2 项下的方法操作, 精密吸取 0.1 mL 置于 25 mL 量瓶中, 再从中精密吸取 0.5 mL, 分置 10 mL 具塞试管中。制备 5 份样品, 分别按标准曲线的制备项下操作, 在波长 554 nm 处测吸光度, 计算总三萜酸的量, RSD 为 2.8%。

2.1.7 加样回收率试验: 精密称取阿里红粗粉约 4 mg, 制备供试品溶液 6 份, 按照样品中对照品的量, 对照品加入量约 1:1 的浓度加入去氢硫色多孔菌酸对照品(1.0708 mg), 再分别按标准曲线制备项下操作, 以相应试剂为空白, 在波长 554 nm 处测吸光度, 计算加样回收率为 98.56% (RSD 为 1.9%)。

2.1.8 样品测定: 精密称取 7 个不同来源、不同时期的阿里红样品粗粉约 4 mg, 制备供试品溶液, 按标准曲线制备项下操作, 以相应试剂为空白, 在波长 554 nm 处测吸光度, 计算总三萜酸的量。结果见表 1。

2.2 去氢硫色多孔菌酸的测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液(61:39), 检测波长 242 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量

10 μL, 样品中去氢硫色多孔菌酸( $t_R = 9.833$  min)与相邻峰分离度大于 1.5。色谱图见图 1。

表 1 不同来源阿里红样品中总三萜酸和去氢硫色多孔菌酸的测定(n=3)

Table 1 Determination of total triterpenic acids and dehydrosulphurenic acid from different samples of *F. officinalis* (n=3)

来源	批号	总三萜酸/%	去氢硫色多孔菌酸/%
乌鲁木齐维药市场	2007092801	24.96	3.91
	2007112602	26.06	3.98
	2008102203	22.57	3.14
新疆维吾尔医院药房	2009021604	42.15	5.81
	2007071205	32.69	4.10
	2008092606	21.67	3.76
	2009011307	63.96	6.37

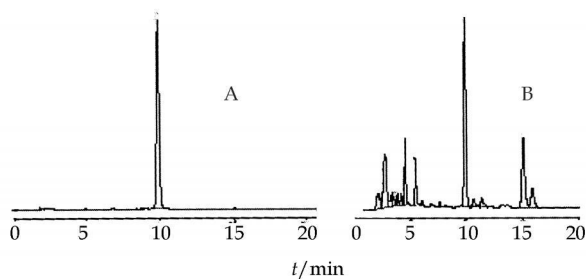


图 1 去氢硫色多孔菌酸对照品(A)及阿里红样品(B) HPLC-UV 图

Fig.1 HPLC-UV Chromatograms of dehydrosulphurenic acid reference substance (A) and *F. officinalis* sample (B)

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥恒重的去氢硫色多孔菌酸对照品适量, 加甲醇制成 0.557 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备: 精密称取阿里红药材粗粉(过 20 目筛)2.0 g, 置于 100 mL 具塞三角瓶中加 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声(35 kHz)处理 60 min。从中精密吸取 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 再将其稀释两倍, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 检测波长的选择: 取一定量已知浓度的去氢硫色多孔菌酸甲醇溶液, 利用检测器的全波长扫描, 从 200~400 nm 波长内, 分别选择 205、212、235、242、254 nm 波长显示图谱, 结果 242 nm 波长下基线平稳, 色谱峰峰型较好, 故选择 242 nm 作为检测波长。

2.2.5 线性关系考察: 分别精密量取去氢硫色多孔菌酸对照品溶液(0.557 mg/mL) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件测定, 以质量浓度(X)为

横坐标,峰面积值( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 6\,450.95 X + 5.489\,72$ ,  $r = 0.999\,7$ ,表明去氢硫色多孔菌酸在  $0.022\,3 \sim 0.133\,7$  mg/mL 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验:精密吸取对照品溶液的稀释液,按上述色谱条件连续进样 5 次,去氢硫色多孔菌酸峰面积 RSD 为 0.4%。

2.2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进行测定,去氢硫色多孔菌酸峰面积 RSD 为 1.8%。

2.2.8 重现性试验:精密称取同一批样品(批号 2007092801),按上述供试品溶液的制备方法制备 5 份样品,测定,以外标法计算,阿里红中去氢硫色多孔菌酸的量, RSD 为 1.2%。

2.2.9 加样回收率试验:精密称取已知去氢硫色多孔菌酸量的阿里红药材粗粉 6 份,每份约 0.025 g,分别精密加入去氢硫色多孔菌酸对照品(平均约 0.9249 mg),按照上述供试品溶液的制备方法分别配成 1:1 浓度的供试品溶液,并按上述色谱条件测定,计算回收率为 100.7%(RSD=2.0%)。

2.2.10 样品测定:按上述测定方法对 7 个不同来源同时期的阿里红样品进行去氢硫色多孔菌酸的测定,以外标法计算。结果见表 1。

### 3 讨论

#### 3.1 阿里红中总三萜酸测定方法条件的确定

3.1.1 提取方法的选择:阿里红中主要含有三萜酸类成分,根据目标化合物的理化性质,选用二氯甲烷为提取溶剂,其沸点低,溶解能力强,并采用索氏提取,提取效率高,所需溶剂及提取杂质少,操作简便。

3.1.2 检测波长的选择:取阿里红供试品溶液和对照品溶液,按上述总三萜酸测定方法操作,以相应的空白溶液为对照,分别在 400~800 nm 波长内扫描,发现供试品溶液与对照品溶液均在 554 nm 波长处有最大吸收,且空白对照无干扰,故最终选择 554 nm 作为总三萜酸成分测定的检测波长。

3.1.3 显色条件的选择:精密量取阿里红供试品溶液 0.1 mL 置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。再精密吸取 0.5 mL,共 6 份,分别按标准曲线制备项下操作,以相应溶剂为空白对照,在 554 nm 波长处测定吸光度,对不同用量的 5% 香草醛-冰醋酸、不同用量的高氯酸、不同的水浴温度及不同的显色时间进行了考察,确定了最佳的显色条件为:加入 5% 香草醛-冰醋酸 0.5 mL,高氯酸 1.0 mL,混匀,密塞,置 60 °C 水浴中恒温加热 25 min。

#### 3.2 阿里红中去氢硫色多孔菌酸测定方法条件的确定

3.2.1 提取条件的选择:分别考察了提取溶媒(甲醇、70% 甲醇、无水乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇、水)、不同提取方法(超声法、回流法、索氏提取法)及不同提取时间(20、40、60 min)对量的影响,确定最佳提取条件为:甲醇超声提取 60 min。此法对阿里红药材中去氢硫色多孔菌酸的提取率较高,且操作简单易行。

3.2.2 色谱条件选择:比较了 2 种不同的色谱柱:Shimadzu VP-ODS 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相考察:比较了乙腈(B)-0.4% 磷酸水溶液(A) 梯度洗脱(50% B-90% B 0~70 min),乙腈-0.4% 磷酸水溶液不同比例的等度洗脱(62:38、61:39、60:40),对照品去氢硫色多孔菌酸保留时间从 17.819 min 缩短到 9.833 min,且基线平稳。进行系统适应性试验,结果表明在色谱条件:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液(61:39),检测波长 242 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 25 °C,进样量 10 μL,样品中去氢硫色多孔菌酸( $t_{R} = 9.833$  min)保留时间适宜,与相邻峰分离度大于 1.5。

阿里红作为新疆维吾尔民间用药,国内外对其化学成分进行了系统研究,但是药理活性和质量控制的研究还很缺乏。鉴于文献报道<sup>[8,9]</sup>与其同科的茯苓、灵芝中三萜酸类成分有较好的药理活性,暂将总三萜酸和去氢硫色多孔菌酸的量作为该药材质量评价指标,为阿里红药材的质量控制提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册[S]. 1999
- [2] 王颖,吕巡贤,余佳琳,等. 新疆药用层孔菌祛痰作用的药效研究[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(1): 77-79
- [3] 王颖,吕巡贤,米克热木·沙衣布扎提,等. 新疆药用层孔菌平喘作用研究[J]. 新疆农业科学, 1998, 4: 183-185
- [4] Anderson C G, Epstein W W, Van Lear G. Minor triterpenoid of *Fomes officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1972, 11: 2847-2852
- [5] Epstein W W, Sweat F W, Van Lear G, et al. Structure and stereochemistry of officinalic acid, a novel triterpene from *Fomes officinalis* [J]. *J Amer Chem Soc*, 1979, 101(10): 2748-2750
- [6] Wu X, Yang J S, Zhou L, et al. New lanostane-type triterpenes from *Fomes officinalis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(11): 1375-1377
- [7] 吴霞,杨峻山,董悦生. 阿里红化学成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(6): 811-814
- [8] 徐榕,许津. 紫外分光光度法测定茯苓中三萜成分[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 449-451
- [9] 李保明,刘超,王洪庆,等. 灵芝总三萜酸含量测定方法的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1234-1236