

阿里红中齿孔酸和总三萜酸的含量测定

任佳伟¹, 马月梅², 陈新晶³, 李梦薇³, 王豪³, 刘洋^{3*} (1.华北电力大学医院, 北京 102206; 2.亚宝药业集团股份有限公司北京药物研究院, 北京 101111; 3.北京中医药大学, 北京 102488)

摘要: 目的 建立阿里红中齿孔酸及其总三萜酸的含量测定方法。方法 采用紫外-可见分光光度法测定总三萜酸含量; 采用 HPLC 测定齿孔酸含量。色谱柱为 RP-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸(68 : 32), 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果 3 批阿里红药材中齿孔酸含量分别为 2.3%, 2.6%, 3.1%; 总三萜酸含量分别为 27.2%, 32.1%, 35.9%。结论 所建立的分析方法准确、简便, 可为定量评价阿里红药材的质量提供依据。

关键词: 阿里红; 总三萜酸; 含量测定; 齿孔酸

中图分类号: R284.1; R917.103 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)10-1478-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.10.010

引用本文: 任佳伟, 马月梅, 陈新晶, 等. 阿里红中齿孔酸和总三萜酸的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1478-1481.

Determination of Eburicoic Acid and Total Triterpenoidic from *Fomes Officinalis* Ames

REN Jiawei¹, MA Yuemei², CHEN Xinjing³, LI Mengwei³, WANG Hao³, LIU Yang^{3*} (1.North China Electric Power University, Beijing 102206, China; 2.Beijing Institute of Drug Research, Yabao Pharmaceutical Group Co., Ltd., Beijing 101111, China; 3.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of total triterpenoidic and eburicoic acid from *Fomes officinalis* Ames. **METHODS** The content of total triterpenoidic was determined by ultraviolet spectrophotometry. The content of eburicoic acid was determined by HPLC. The analysis was performed on a RP-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.4% phosphoric acid (68 : 32) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and temperature was 30 °C. The detection of wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** The contents of eburicoic acid in 3 batches of *Fomes officinalis* Ames were 2.6%, 2.3%, 3.1%, and the contents of total triterpenoidic were 32.1%, 27.2%, 35.9%, respectively. **CONCLUSION** The method is suitable for the determination of triterpenoidic components from *Fomes officinalis* Ames.

KEY WORDS: *Fomes officinalis* Ames; total triterpenoidic; content determination; eburicoic acid

阿里红为多孔菌科真菌药用层孔菌 *Fomes officinalis* (Vill.ex Fr.) Ames. 的干燥菌体, 是新疆维吾尔医常用的民族药, 分布于河北、山西、四川、吉林、黑龙江、内蒙古、甘肃、新疆、福建等地。药理实验表明其具有温肺化痰、降气、活血消肿和利尿作用^[1-2]。新疆维吾尔医常用其于治疗慢性支气管炎、腹痛、感冒、肺结核和各种癌症^[2]。阿里红含有三萜类、甾醇类、多糖类及脂肪酸等化学成分, 其主要成分为羊毛甾烷型三萜酸类成分^[3-8], 齿孔酸是其主要的三萜类成分^[8], 三萜酸类成分往往是药用真菌的有效成分之一, 具有提高人体免疫功能、抗衰老等多种保健功效^[9-11]。已有研究表明阿里红中三萜酸类成分具有多种活性, 如对凝血酶具有一定的抑制活性; 可显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞产生 NO 作用^[8,12]。为了更好地

控制阿里红的质量, 本实验采用紫外-可见分光光度法和 HPLC 分别对阿里红中总三萜酸和齿孔酸含量进行测定, 并对药材提取与显色过程中的影响因素进行考察。

1 仪器与试剂

LC-10AT 高效液相色谱仪、SPD-10AT 紫外检测器、UV-2501PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司); BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); KQ-250DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, 康科德有限公司, 批号: 143660); 乙腈(色谱纯, Dikma 公司, 批号: 154450); 水为重蒸水; 其他试剂均为分析纯; 齿孔酸对照品(自制, 批号: FFO-02-0301; 纯度: 98.19%); 阿里红(新疆, 批号: 061001, 061002 和 061003),

作者简介: 任佳伟, 男, 硕士, 主任医师 Tel: 18501256515
13810283092 Email: netug@126.com

E-mail: rjw@ncepu.edu.cn *通讯作者: 刘洋, 男, 博士, 教授 Tel:

所有批次样品经中国中医科学院中药研究所郝近大教授鉴定均为菌科真菌药用层孔菌 *Fomes officinalis* (Vill.ex Fr.) Ames.的干燥菌体。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定阿里红中齿孔酸的含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 RP-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸(68:32), 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。

2.1.2 溶液制备 ①齿孔酸对照品溶液制备: 精密称取齿孔酸对照品 25.68 mg, 加入甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中, 摇匀, 即得浓度为 1.008 6 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 备用。②供试品溶液制备: 称取阿里红药材粗粉(过 40 目筛)约 0.5 g, 精密称定, 用甲醇加热回流提取 2 次, 每次 20 mL, 提取 1 h, 过滤, 合并滤液至 50 mL 量瓶中, 使用甲醇定容, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。③空白样品溶液: 甲醇用 0.22 μm 滤膜过滤, 续滤液作为空白样品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 5.00 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀。分别吸取上述各浓度对照品线性溶液各 10 μL 依次注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 以对照品浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=5\ 195\ 734.157\ 5X-4\ 885.01$, $r=0.999\ 9$, 结果表明在 0.050~0.504 mg·mL⁻¹ 内, 浓度和峰面积的线性关系良好。高效液相色谱图见图 1。

2.1.4 仪器精密度试验 制备同一份阿里红药材对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 连续进样 6 次, RSD 为 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 测定峰面积, 结果显示 RSD 为 1.4%, 表明本品在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批(批号: 061001)阿里红药材 6 份, 按供试品溶液制备方法制成样品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 测定的平均含量为 2.3%, RSD 为 1.3%, 表明本法重复性良好。

2.1.7 回收率试验 称取 6 份同一样品粉末约 0.25 g, 精密称定, 并加入一定量的对照品, 按供试品溶液制备方法制成样品溶液, 精密吸取 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算回收率。结

果显示, 平均回收率为 100.85%, RSD 为 1.5% ($n=6$), 表明回收率良好。结果见表 1。

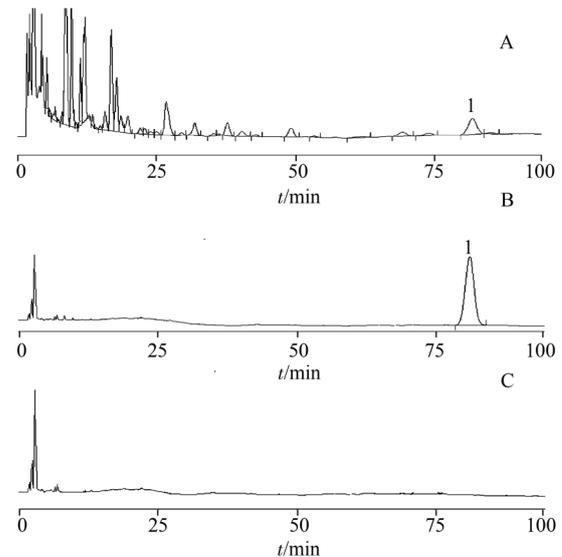


图 1 高效液相色谱图

A-供试品溶液; B-齿孔酸对照品溶液; C-空白样品溶液; 1-齿孔酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; C-blank; 1-eburicoic acid.

表 1 齿孔酸加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Result of sample recovery of eburicoic acid($n=6$)

称样量/ mg	理论含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
253.23	5.75	5.39	11.23	101.73	100.85	1.5
252.96	5.74	5.21	11.13	103.34		
249.31	5.66	5.39	11.02	99.50		
248.99	5.65	5.49	11.10	99.26		
251.30	5.70	5.61	11.35	100.61		
250.63	5.69	5.73	11.46	100.68		

2.1.8 阿里红中齿孔酸含量测定 取 3 批阿里红药材, 每一批样品平行制备 3 份, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算样品中齿孔酸的含量。3 批样品中齿孔酸含量分别为 2.3%, 2.6%, 3.1%。

2.2 紫外-可见分光光度法测定阿里红中总三萜酸含量

2.2.1 溶液制备 ①齿孔酸对照品溶液制备: 按“2.1.2”项下方法制备。②供试品溶液制备: 称取阿里红药材约 0.5 g, 精密称定, 加入 20 mL 甲醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 提取液过滤, 合并滤液至 50 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀后使用 0.22 μm 滤膜过滤, 精密量取续滤液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 线性关系考察 分别精密吸取齿孔酸对照品溶液(浓度: 0.491 9 mg·mL⁻¹)0.10, 0.30, 0.50,

0.60, 0.70, 1.00 mL 置 10 mL 具塞试管中, 水浴蒸干, 依次分别加入 5%香草醛-冰醋酸 0.40 mL, 高氯酸 0.80 mL, 摇匀, 于 60 °C 水浴中加热 20 min, 取出置冰水浴中冷却 5 min, 加冰醋酸 10 mL, 摇匀, 放至室温后, 在 400~800 nm 内扫描, 根据扫描结果, 确定在 553 nm 处测定吸收度值。

以对照品质量(mg)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到的曲线回归方程为 $Y=2.5373X-0.0405$, $r=0.9978$, 表明在 0.049~0.492 mg 内, 齿孔酸质量与其吸光度之间线性关系良好。

2.2.3 仪器精密性试验 取同一份阿里红药材供试品溶液, 在 553 nm 处直接紫外测其吸光度。RSD 为 0.30%, 表明仪器精密性良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 h, 于 553 nm 处测定其吸光度, RSD 为 0.80%, 表明本品 4 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批次(批号: 061001)的阿里红药材 6 份, 按供试品溶液制备方法操作, 得到 6 份药材供试品溶液, 在 553 nm 处测定供试品溶液的吸光度, 计算其含量。测得的平均含量为 25.3%, RSD 为 2.8%, 表明本法重复性良好。

2.2.6 回收率试验 称取 6 份阿里红药材粗粉, 每份约 0.25 g, 精密称定, 再精密加入对照品, 按供试品溶液制备方法操作, 得到药材供试品溶液。在 553 nm 处测定齿孔酸对照品溶液和供试品溶液的吸光度, 计算方法的回收率, 测得的平均加样回收率为 100.64%, RSD 为 2.4%, 表明总三萜酸回收率良好, 见表 2。

表 2 总三萜酸加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 2 Results of sample recovery of total triterpenoidic (n=6)

称样量/ mg	理论含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
248.61	63.01	62.31	124.81	99.24	100.64	2.4
249.32	63.19	62.92	124.44	97.43		
251.11	63.64	63.02	128.11	102.29		
250.59	63.51	62.91	127.01	100.93		
253.21	64.17	63.53	130.31	104.10		
248.49	62.98	63.29	126.27	100.00		

2.2.7 阿里红中总三萜酸含量测定 取 3 批阿里红药材, 每一批样品平行制备 3 份测定, 计算样品中总三萜酸的含量。结果 3 批样品中总三萜酸含量分别为 32.1%, 27.2%, 35.9%。

3 讨论

阿里红属于极少见含有高含量三萜酸类成分的药材, 对阿里红药材深入研究可以分离得到 20 多个三萜酸类成分, 其中 5 个单体三萜酸类化合物(硫色多孔菌酸、齿孔酸、阿里红酸 A、3-酮基-去氢硫色多孔菌酸和 Versisponic acid D)百分含量总和达到 12.6%, 因此阿里红药材中总三萜酸的含量在 30%左右是极有可能的。本研究选择阿里红中含量较高的齿孔酸作为其三萜酸类成分的指标成分, 建立了测其单体含量的 HPLC 方法, 并以其作为对照, 通过紫外-可见光分光光度法测定总三萜酸的含量, 所建立的含量测定方法通过方法学验证, 均证明可靠可行, 说明可以用来有效控制阿里红药材的质量。

3.1 阿里红中齿孔酸测定方法的确定

3.1.1 提取方法的选择 本实验采用甲醇加热回流提取, 通过对齿孔酸提取中各个影响因素(提取溶剂种类、提取方式、提取次数)进行了系统的研究。结果显示, 提取溶剂采用水、50%乙醇、乙醇、50%甲醇、甲醇、乙酸乙酯时齿孔酸的含量分别为 0, 0.33%, 1.61%, 0.16%, 1.87%, 1.49%; 采用超声、回流、索氏提取时齿孔酸的含量分别为 1.73%, 2.19%, 1.81%; 提取 1, 2, 3 次时齿孔酸的含量分别为 1.86%, 2.33%, 2.32%。最终确定了可将齿孔酸提取完全的供试品制备方法为甲醇加热回流提取 2 次, 每次 20 mL, 每次提取 1 h。

3.1.2 色谱条件选择 本实验采用 HPLC 测定阿里红中齿孔酸的含量。实验过程中对流动相中添加剂种类和用量进行了考察, 通过比较发现: 当流动相添加剂为 0.4%磷酸时, 基线噪音较小, 且指标成分齿孔酸和其他三萜酸类成分的峰形较理想; 齿孔酸在紫外光区的末端吸收较强, 但为了避免末端波长处的基线噪音对目标峰测定的干扰, 特选择 210 nm 作为 HPLC 的测定波长, 既保证了该检测方法的准确性和灵敏度, 又有效避免了基线噪音对结果的影响。

3.2 阿里红中总三萜酸测定方法确定

3.2.1 显色条件选择 本实验采用紫外-可见分光光度法测定总三萜酸的含量。5%香草醛-冰醋酸、高氯酸比色法是测定三萜类化合物最常用的显色方法, 但其影响因素较多, 因此首先对显色的影响因素进行筛选。结果表明, 5%香草醛和高氯酸的加入量分别为 0.4 mL 与 0.8 mL 时, 可以得到最

大吸收值，并以此确定两者的最佳用量。

3.2.2 显色对照品选择 很多文献测定总三萜酸时均采用熊果酸作为对照品，但阿里红药材中并不含有熊果酸类成分，并且阿里红药材中三萜酸类成分与熊果酸成分母核结构相差较大，因此选择熊果酸作为对照测定阿里红总三萜酸含量并不可行。阿里红药材中三萜酸类成分较多，选择不同的成分作为对照品会对阿里红药材总三萜酸的测定产生不同的结果。本实验分别以阿里红中 5 个典型的三萜酸类成分(齿孔酸、阿里红酸 A、3-酮基去氢硫色多孔菌酸、Versisponic 酸和硫色多孔菌酸)为对照品，考查阿里红药材中总三萜酸的测定方法，结果表明以齿孔酸或者阿里红酸 A 为对照品时，测定方法最为准确、可信，见图 2。

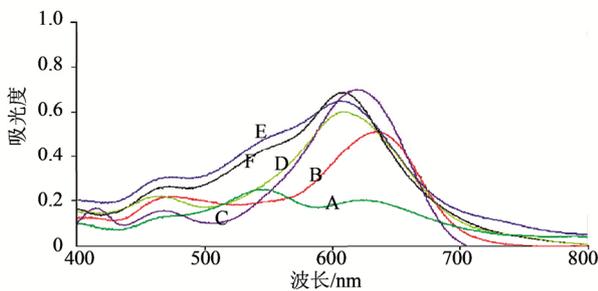


图 2 5 个对照品及样品溶液的紫外-可见光吸收光谱图
A-样品溶液；B-硫色多孔菌酸；C-Versisponic 酸；D-3-酮基去氢硫色多孔菌酸；E-齿孔酸；F-阿里红酸 A。

Fig. 2 UV-Vis absorption spectrum of 5 standards and sample solution

A-sample solution; B-sulfurenic acid; C-versisponic acid; D-3-keto-dehydrosulfurenic; E-eburicoic acid; F-officinalic acid A.

REFERENCES

[1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.

[2] ZHANG H F, GUO S Y, SHEN L, et al. Research status of Uygur medicine *Fomes officinalis* sporophore [J]. J Jilin Med Coll(吉林医药学院学报), 2014, 35(5): 354-357.

[3] YANG F, MENG L, WANG P. Study on extraction of total triterpenoidic acid from *Fomes officinalis* Ames based on central composite design [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2015, 22(12): 86-89.

[4] TURAHUN Y, IBRAHIM M, MUHAMMAD T. Optimization of ultrasonic extraction technology and content determination of total triterpenoidic acid from *Fomes officinalis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(17): 24-27.

[5] WU X, YANG J S, YAN M. Four new triterpenes from fungus of *Fomes officinalis* [J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 2009, 57(2): 195-197.

[6] GRIENKE U, ZOLL M, PEINTNER U, et al. European medicinal polypores-a modern view on traditional uses [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 564-583.

[7] ZHANG H F, GUO S Y, SHEN L, et al. Extraction total triterpenes from *Fomes officinalis* Ames with response surface methodology [J]. J Jilin Med Coll(吉林医药学院学报), 2014, 35(6): 401-406.

[8] WU X, YANG J S, DONG Y S. Chemical constituents of *Fomes officinalis* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(6): 811-814.

[9] P ABULIZI, R TUOHENIYAZI, CONG Y Y, et al. Study on the anti-aging effect of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(2): 340-342.

[10] W YIMING, P ABULIZI, BAI L, et al. The immune-potential effect of *Fomes officinalis* [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2003, 26(6): 563-565.

[11] CONG Y Y, A ABULIZI, P ABULIZI, et al. Studies on extraction and the immunity activity of polysaccharide from *Fomes officinalis* Ames [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(7): 569-571.

[12] ZHOU Y. The effects of antioxidant and anti-tumor and immunoregulation activity of polysaccharides from *Fomes officinalis* Ames *in vivo* and *in vitro* [D]. Xinjiang Medical University, 2016.

收稿日期: 2018-02-28
(本文责编: 李艳芳)