

的7-羟基被甲氧基所取代。¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 165.1(C-2), 103.7(C-3), 182.0(C-4), 157.3(C-5), 98.0(C-6), 163.9(C-7), 92.8(C-8), 161.1(C-9), 120.2(C-10), 140.0(C-1'), 104.7(C-2'), 165.1(C-3'), 148.2(C-4'), 165.1(C-5'), 104.5(C-6'), 56.4(OCH₃-3', 5'), 56.1(OCH₃-7)。上述数据再与文献[9]报道的小麦黄素7-甲醚(tricin 7-methyl ether)相比较一致,故推定为小麦黄素7-甲醚。

[致谢] 核磁共振波谱由中国医学科学院药物研究所药物分析测试中心贺文义老师代测。

[参考文献]

- [1] 刘勇民. 维吾尔药志[M]. 下册. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999:541.
[2] Zhang Z Z, Hala N E, Li X C, et al. Phenolic compounds from

Nymphaea odorata[J]. J Nat Prod, 2003, 66(4):548.

- [3] 赵军,常军民,堵年生. 枝穗大黄化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4):281.
[4] 谭成玉,胡建恩,王焕弟,等. 植物雅龙果的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(24):1861.
[5] 尚明英,蔡少青,韩健,等. 中药胡芦巴的黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10):614.
[6] 许婧,李锐,张鹏,等. 金刚藤的黄酮类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(6):424.
[7] 施蛟,陈博,孙智华,等. 中间锦鸡儿黄酮类成分的研究[J]. 药学报, 2003, 8(8):599.
[8] 邱林刚,陈金瑞,蒋思平,等. 喜马红景天的化学成分[J]. 云南植物研究, 1989, 11(2):219.
[9] A Ya Kobzar', G K Nikonov. Flavonoids of the epigeal part of *Betonica officinalis*[J]. Chem Natural Comp, 1987, 22(5):600.

[责任编辑 戴畅]

灵芝总三萜酸含量测定方法的研究

李保明, 刘超, 王洪庆, 陈若芸*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

我国灵芝科灵芝属药用真菌有80余种,常用的有赤芝、紫芝、松杉灵芝、树舌等。2005年版《中国药典》收载赤芝和紫芝为灵芝入药品种。灵芝作为传统中药已有几千年的历史,灵芝含有多种化学成分,近年来,随着人们对灵芝的广泛深入研究,已分离、纯化并阐明结构的三萜化合物112种^[1],药理研究表明其具有护肝排毒、抗氧化、抗菌降糖、抗HIV病毒和疱疹病毒、抑制肿瘤细胞等^[2]作用。关于灵芝三萜酸的含量测定仅有马林等^[3]用HPLC法分离测定了灵芝酸B等4个成分,本研究选用灵芝酸B为对照品,建立了定量测定灵芝总三萜酸含量的方法,采用比色法测定了灵芝属3个种赤芝 *Ganoderma lucidum*, 紫芝 *G. sinense*, 松杉灵芝 *G. tsugae* 等8个样本的总三萜酸的含量。

1 仪器、试剂与样品

[收稿日期] 2006-02-09

[通讯作者] *陈若芸, Tel: (010)63165325, E-mail: ruoyunchen

@hotmail.com

LAB Tech UV-2000 紫外-可见分光光度计;电子天平(日本A&D公司,分度值为0.01 mg);氯仿、无水乙醇、碳酸氢钠、无水硫酸钠、盐酸、硫酸均为分析纯(北京化工厂);灵芝酸B对照品由本实验室从松杉灵芝中分离制得,其结构经TLC, IR, NMR, MS确证,纯度经HPLC分析达98%以上;灵芝样品分别来自江苏、广东和福建(过25目筛),由中国科学院微生物所张小青研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取灵芝酸B对照品约5 mg,置5 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,即得含灵芝酸B约1 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末1 g,加无水乙醇50 mL热回流提取2 h,过滤,残渣再加无水乙醇50 mL回流2 h,共重复提取3次,滤液合并,减压蒸干后加氯仿15 mL溶解,移至分液漏斗中,再用氯仿洗涤残渣2次,合并氯仿液;用饱和碳

酸氢钠萃取氯仿4次(15 mL×4),合并碳酸氢钠液,用6 mol·mL⁻¹盐酸调节pH 2~3,用氯仿萃取4次(15 mL×4),合并氯仿液,用水洗涤氯仿液,弃去水层,氯仿液用无水硫酸钠干燥,过滤,用氯仿洗涤无水硫酸钠3次(15 mL×3),洗涤液与滤液合并,减压蒸干,残渣用无水乙醇溶解并定容至5 mL,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 最大吸收波长的测定 精密吸取对照品溶液1 mL及供试品溶液2 mL,加无水乙醇至2 mL,摇匀,加入50%硫酸无水乙醇溶液2 mL,摇匀,随行空白,其余同标准曲线项下操作,在200~600 nm扫描。结果表明,对照品和样品溶液在526 nm处有最大吸收,故选择测定波长为526 nm。

2.4 标准曲线的绘制^[4] 精密吸取对照溶液0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mL分别置10 mL具塞试管中,各加无水乙醇至2 mL,摇匀,分别加入50%硫酸无水乙醇溶液2 mL,摇匀,随行空白,于100℃水浴中加热5 min,立即冷却至室温,于30 min内在526 nm处测定吸光值。用吸光度为纵坐标,对照品量为横坐标,求得回归方程为: $Y = 0.4996X + 0.0091$, $r = 0.9995$,灵芝酸B线性范围为0.273~1.365 mg。

2.5 显色加热时间的比较 取野生灵芝子实体提取液2 mL共3份,分别加入50%硫酸无水乙醇溶液2 mL,摇匀,随行空白,于100℃水浴中分别加热3, 5, 10 min,在526 nm处测定吸光值,计算其吸收值的RSD,结果表明,加热5 min最好。

2.6 稳定性测定 精密吸取对照品溶液1 mL及供试品溶液2 mL,分别按标准曲线的绘制项下操作,在0~90 min内每隔10 min测定吸光度值,在90 min内对照品和供试品吸收值的RSD分别为5.6%和0.82%,而对照品在0~30 min内的RSD为1.4%,表明对照品应在30 min内测定,而样品则较稳定,故选择在显色后30 min之内测定其吸收值。

2.7 精密度测定 精密吸取供试液2 mL共5份,按标准曲线的绘制项下操作,测定吸光度值,RSD为1.1%。

2.8 样品提取溶剂比较 精密称取灵芝子实体1 g共2份,分别加入氯仿和无水乙醇,回流提取2 h,按供试品溶液制备项下操作,制备供试液,再按标准曲线的绘制项下操作,测得氯仿和无水乙醇提取液的吸收值分别为0.411 9和0.644 9,故选择用无水乙醇作提取溶剂。

2.9 提取时间的比较 精密称取灵芝子实体1 g

共4份,分别加入无水乙醇,回流提取时间为1 h, 4 h; 2 h 2次; 2 h 3次,按供试品溶液制备项下操作,制备供试液,再按标准曲线的绘制项下操作,测得吸收值分别为0.573 5, 0.736 3, 0.855 4, 0.891 2,故选择提取3次,每次2 h。

2.10 样品提取液碱化研究 样品提取液分别用4%氢氧化钾,饱和碳酸氢钠^[5]和4%氢氧化钠溶液碱化,按供试品溶液制备项下操作,得到3份供试品溶液,分别用TLC和比色法检查,TLC结果显示,饱和碳酸氢钠溶液碱化后红色斑点多且干扰小;比色结果显示,饱和碳酸氢钠溶液碱化后显色为红色,与对照品颜色一致,而其余为淡黄色和棕黄色,因此,选择用饱和碳酸氢钠溶液碱化提取液。

2.11 重复性测定 精密称取段木灵芝子实体粉末1 g共5份,按供试品溶液制备项下及标准曲线的绘制项下操作,测得样品质量分数为0.135%,其RSD为3.2%。

2.12 样品加样回收率测定 精密称取段木栽培赤芝子实体粉末0.5 g共3份,分别加入灵芝酸B对照品溶液(0.967 mg·mL⁻¹)0.8, 1.2, 1.4 mL,按供试品溶液制备项下及标准曲线的绘制项下操作,平均回收率为104.8%,RSD为6.6%。

2.13 样品含量测定 精密称取不同孢子粉样品及灵芝子实体粉末各1 g,供试品溶液制备项下及标准曲线的绘制项下操作,测定结果见表1。

表1 样品中总三萜酸含量(n=2)

样品	质量分数/%
野生赤芝(江苏南通)	0.343
段木栽培赤芝(广东)	0.258
段木栽培赤芝(福建)	0.135
段木栽培松杉灵芝(福建)	0.237
草粉栽培灵芝(福建农林大学)	0.144
段木栽培紫芝(广东)	-
破壁赤芝孢子粉(福建)	-
未破壁赤芝孢子粉(福建)	-

3 讨论

用该方法未测到紫芝、破壁赤芝孢子粉及未破壁赤芝孢子粉中的三萜酸,采用马林等报道的HPLC条件对产于广东和福建的紫芝和孢子粉样品进行检测,结果显示,赤芝孢子粉中三萜酸含量极低。

用氯仿分别溶解赤芝酸C甲酯和赤芝酮,再用本试验中供试液制备方法制备,经TLC分离显色后表示,它们均未在碱化层,而是存在于碱化后的氯仿

层,说明,用饱和碳酸氢钠碱化后,萃取得到的为总三萜酸。

不同种的灵芝中总三萜酸的含量不同,其中野生赤芝中三萜酸含量最高。赤芝孢子粉三萜酸含量极低。

[参考文献]

[1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2001:158.

- [2] 蒯丽,方能虎,吴旦. 灵芝有效成分的研究概况[J]. 中成药, 2002, 24(10):793.
- [3] 马林,吴丰,陈若芸. 灵芝三萜成分分析[J]. 药学学报, 2003, 38(1):50.
- [4] 黄书铭,杨新林,王帮武,等. 灵芝醇溶性组分的制备工艺与检测方法研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4):332.
- [5] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996:121.

[责任编辑 戴畅]

RP-HPLC-ELSD 测定芦笋皂苷中菝葜皂苷元的含量

季宇彬*, 岳磊, 汲晨锋

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

芦笋 *Asporagus officinalis* linn, 学名石刁柏, 又名龙须菜, 文山竹, 细百叶部, 是百合科天门冬属多年生草本植物, 在我国南北地区广泛种植。现代科学研究证明: 芦笋具有防止癌细胞扩散的功能, 对淋巴瘤、膀胱癌、肺癌、皮肤癌等多种类型的癌症都有疗效^[1], 皂苷是其主要活性成分之一^[2]。本研究采用乙醇提取-正丁醇萃取的方法提取芦笋皂苷^[3]。目前国内尚无芦笋皂苷成分的法定对照品, 由于菝葜皂苷元(sarsasapogenin)为几种主要甾体皂苷的母核皂苷元^[4], 所以作者将芦笋中提取出的皂苷水解得到菝葜皂苷元, 通过测定皂苷元的含量来间接反应其皂苷的含量。测定菝葜皂苷元的方法很多, 常用的是比色法^[5], 由于菝葜皂苷元无紫外吸收, 因此该方法需要使用显色剂, 在可见光范围内检测, 方法灵敏度低, 稳定性差。高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)是一种通用型质量检测器, 无需显色, 雾化温度低, 检测不受外部环境的干扰, 是一种检测皂苷及皂苷元的有效方法。

1 仪器与样品

Waters 高效液相色谱仪(2695 输液泵, 2450 蒸发光检测器、自动进样器, Empower 化学工作站);

KQ-250 型超声波清洗器; Milli-QA 超纯水机(美国密里博公司); 菝葜皂苷元对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号 744-9904), 所用试剂均为色谱纯。

芦笋鲜品购于哈尔滨道里区透笼市场, 经哈尔滨商业大学中药鉴定实验室张德连教授鉴定, 样品储存于哈尔滨商业大学药物研究所。

2 方法与结果

2.1 芦笋粗皂苷的提取

取新鲜芦笋 1 kg, 打碎后乙醚脱脂, 弃去乙醚液, 挥干药渣, 然后加入 6 倍体积 95% 乙醇, 在 90℃ 水浴中加热回流提取 4 h, 冷却后过滤, 滤液回收乙醇并浓缩成浸膏; 将所得的浸膏用一定量蒸馏水溶解, 水液用等体积水饱和正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇液, 减压浓缩, 真空干燥后得芦笋粗皂苷 1.7 g, 得率为 0.25%。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水 (90:10), 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为室温; 漂移管温度 75℃; 雾化温度 45℃; 气体压力 138 kPa。

2.2.2 对照品溶液配制 精密称取菝葜皂苷元对照品 18.0 mg 于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得。

2.2.3 样品溶液配制 精密称取总皂苷部分粉末

[收稿日期] 2006-09-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30400592)

[通讯作者] * 季宇彬, Tel.: (0451) 84800206, E-mail: jichenfeng

@hrbcu.edu.cn