

HPLC 法测定灵芝孢子油中麦角甾醇的含量

张丽 王瑜杰 丁安伟

(南京中医药大学, 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏南京 210046)

摘要 目的:建立灵芝孢子油中麦角甾醇含量的测定方法。方法:采用高效液相色谱方法,选用汉邦 Kromasil C₁₈ 色谱柱(200mm×4.6mm, 5μm),流动相为 100%纯甲醇,流速 1.0mL/min,检测波长为 282nm,柱温 30℃。结果:麦角甾醇进样量在 0.0500~1.60μg 之间与峰面积呈良好的线性关系, $r=0.9997$;平均回收率为 98.67%, RSD 为 2.53% ($n=9$)。结论:该方法简单准确,为灵芝孢子油质量评价提供了可靠依据。

关键词 灵芝孢子油 麦角甾醇 高效液相色谱法

中图分类号 R282.71

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2009)06-0052-02

灵芝孢子油为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.)Karst. 或紫芝 (*Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang)的孢子粉经超临界提取所得的油,其中主要含长链脂肪酸类、甾醇类以及少量灵芝三萜类成分^[1],具有提高免疫力等生理活性,有较好的应用前景。但 2005 版《中国药典》一部仅对灵芝多糖进行了含量测定^[2],尚缺乏对灵芝孢子油的质量控制方法。因麦角甾醇具有抗肿瘤等作用^[3],且在灵芝孢子油中含量较高,可作为灵芝孢子油的质量控制指标。故本实验建立了 HPLC 测定灵芝孢子油中麦角甾醇含量的方法,以期对灵芝孢子油的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 515 型高效液相色谱仪(配 Waters 2487 紫外-可见检测器、Waters717 自动进样器与 Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司),BP211D 型电子天平(塞多利斯公

司,精确度为十万分之一)。

1.2 试药 麦角甾醇(阿法埃莎化学有限公司,纯度 98%,批号 10118113),灵芝孢子油(由南京中科药业有限公司提供,批号 20060123、20060504、20060730、20060807、20060808、20071106、20071108),色谱分析用甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为汉邦 Kromasil C₁₈ 色谱柱(200mm×4.6mm, 5μm),流动相为 100%纯甲醇,流速为 1.0mL/min,检测波长为 282nm,柱温为 30℃,进样量为 10μL,理论塔板数以麦角甾醇峰计不得少于 3000,色谱图见图 1。

2.2 对照品储备溶液的制备 取麦角甾醇对照品 10mg,精密称定,置 50mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1mL 中含麦角甾醇 0.2000mg)。

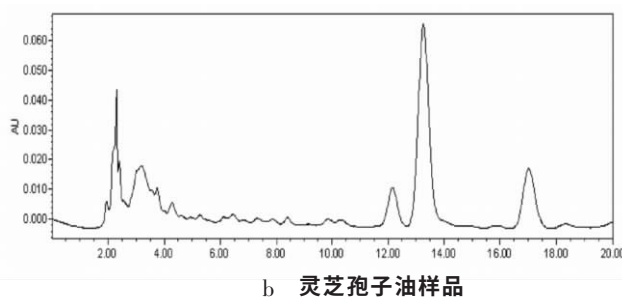
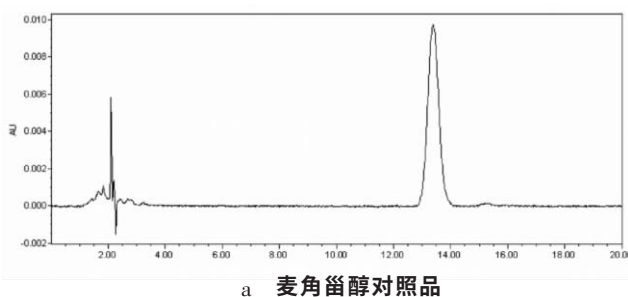


图 1 麦角甾醇高效液相色谱图

麋鹿角作为动物角类药材含有大量的无机成分,利用 X 射线衍射可以得到较为尖锐的 X 衍射峰,结合其 X 射线衍射 Fourier 图谱中几何拓扑图形及特征标记峰值可实现对麋鹿角的分析鉴别,从而为麋鹿角药材的品质评价提供了分析方法。

4 参考文献

- [1] 杨光.中华麋鹿角、茸应恢复药用.中药研究与信息,2000,2(3):45
- [2] 杨光.麋鹿角、茸、脂药用的历史考证.北京中医,2006,25(1):39
- [3] 汪银银,彭蕴茹,方泰惠.麋鹿角的传统功效与现代研究.现代中

药研究与实践,2007,22(2):30

- [4] 李时珍.本草纲目(校订本).北京:华夏出版社,2002:1872

第一作者:宋建平(1958-),本科学历,副教授,从事中药品质评价研究。

通讯作者:刘训红,liuxunh1959@sohu.com。

收稿日期:2008-11-12

编辑:乔婧 吴宁

2.3 供试品溶液的制备 取灵芝孢子油 1g,精密称定,置 10mL 量瓶中,加含 50%三氯甲烷的甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品储备溶液 8mL 置 10mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,得浓度为 0.1600mg/mL 的对照品溶液,再采用逐级稀释法分别制成含麦角甾醇 0.08000、0.04000、0.02000、0.01000、0.005000mg/mL 的系列对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件,分别精密吸取上述溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪,测定对照品的峰面积。以峰面积为纵坐标,麦角甾醇浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程

为: $A=14473374c-26305$ ($r=0.9997, n=2$)。表明麦角甾醇进样量在 0.0500~1.60 μ g 范围内具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 在上述色谱条件下,以浓度为 0.04000mg/mL 的对照品溶液为考察对象,依法连续测定 6 次,得麦角甾醇峰面积的 RSD 为 0.53%,表明本法精密度良好。

2.6 重复性试验 取批号为 20060808 的灵芝孢子油,依法处理 6 份,依法测定,重复性试验结果表明供试品中麦角甾醇的平均含量为 0.2692mg/g, RSD 为 1.14%。

2.7 稳定性试验 取批号为 20060808 的同一份灵芝孢子油供试品溶液,在 10h 内每隔 2h 测定 1 次,共测定 6 次,得麦角甾醇峰面积的 RSD 为 1.11%,表明供试品溶液中麦角甾醇在 10h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取批号为 20060808 的灵芝孢子油 9 份,每份约 0.5g,精密称定,分别加入浓度为 0.2000mg/mL 麦角甾醇对照品储备液 0.5mL、0.6mL 和 0.8mL,依法测定,计算,得麦角甾醇加样平均回收率为 98.67%, RSD 为 2.53%,表明该测定方法测定结果准确。结果见表 1。

2.9 样品含量测定 对 7 批灵芝孢子油进行含量测定,测定结果见表 2。

3 讨论

甾醇是一类广泛存在于自然界的甾体化合物,主要存在于动植物的脂肪中,或以较高级脂肪酸酯的形式存在于动植物体内,或以苷的形式存在于植物组织中。甾醇类物质是灵芝的主要化学成分之一,已知从灵芝中分离出的甾醇有近 20 种^[1],其中麦角甾醇(24 β -甲基胆固醇-5,7 烯-3 β -羟基)含量较高。麦角甾醇是一种重要的植物甾醇,可以增强人体抵抗疾病的能力,具有较好的抗肿瘤促进作用。它本身是微生物细胞膜的重要组成部分,对细胞膜的完整性、膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力以及细胞物质运输等起着重要作用^[4]。

有文献报道用比色法测定灵芝制品中的麦角甾醇含量^[5],但该方法所测为总甾醇量而非单体含量,作为质量控制方法尚有待提高。因麦角甾醇具有较强的紫外吸收,故本研究应用反

表 1 灵芝孢子油中麦角甾醇加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加标量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.50092	0.1356	0.1000	0.2329	97.35		
0.50795	0.1375	0.1000	0.2339	96.41		
0.50300	0.1361	0.1000	0.2366	100.5		
0.50041	0.1354	0.1200	0.2502	95.67		
0.50300	0.1361	0.1200	0.2537	97.98	98.67	2.53
0.50373	0.1363	0.1200	0.2553	99.13		
0.50598	0.1369	0.1600	0.3036	104.2		
0.50562	0.1368	0.1600	0.2940	98.25		
0.50201	0.1359	0.1600	0.2937	98.63		

表 2 灵芝孢子油中麦角甾醇含量测定结果($n=2$)

批号	平均含量(mg/g)
20060123	0.04532
20060504	0.1400
20060730	0.2162
20060807	0.1041
20060808	0.2692
20071106	1.268
20071108	1.286

相高效液相色谱检测分析灵芝孢子油中麦角甾醇。本研究所建方法样品不需要衍生化处理,方法快速简单,结果可靠,可作为灵芝孢子油稳定的质量控制方法。

灵芝孢子油在甲醇中溶解性较差,在三氯甲烷等亲脂性溶剂中溶解性较好,但因三氯甲烷有紫外吸收,综合考虑,因此本实验选择 50%三氯甲烷的甲醇溶液为溶剂。

4 参考文献

- [1] 冯敏.东方神奇仙草:现代科学论灵芝.北京:科学出版社,2005:118
- [2] 中华人民共和国药典.北京:化学工业出版社,2005:130
- [3] Yasuharu Yazawa, Masami Yokota, Kiyoshi Sugiyama. Antitumor Promoting Effect of an Active Component of Polyporus Ergosterol and Related Compounds on Rat Urinary Bladder Carcinogenesis in a Short-Term Test with Concanavalin A. Biol. Pharm. Bull., 2000, 23(11): 1298
- [4] 邓玉清,王纪,虞龙.微生物麦角甾醇的研究进展.微生物学杂志, 2001, 21(3): 45
- [5] 张方英,方保梅,张静.灵芝制品中麦角甾醇的检测方法.江苏农学院学报, 1997(19): 22

第一作者:张丽(1971-),博士,副教授,研究方向为中药炮制与质量控制。

收稿日期:2009-02-16

编辑:吴宁

中医药学——中华文明的结晶,世界文化的瑰宝!