

冬虫夏草药材的质量研究及存在问题

王钢力¹, 金红宇¹, 韩小萍², 石 岩¹, 田金改¹, 林瑞超^{1*}

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 青海省药品检验所, 青海 西宁 810000)

摘要: 目的 考察冬虫夏草药材的质量。方法 采用高效液相色谱法测定14批不同产地冬虫夏草药材中腺苷和尿苷的量; 采用原子吸收分光光度法测定砷、汞、铜、铅和镉的残留量。结果 各批药材的腺苷和尿苷的量变化范围较大, 其中尿苷为37~632 $\mu\text{g/g}$, 腺苷为53~284 $\mu\text{g/g}$; 重金属检测结果显示: 被测的14批药材中, 汞、铜、镉及铅的残留量均较低, 但13批药材的砷残留量超过药用植物及制剂绿色行业标准。结论 有必要确定合理的冬虫夏草药材质量控制指标, 并加强对出口冬虫夏草药材重金属残留的检测。

关键词: 冬虫夏草; 质量; 腺苷; 尿苷; 重金属残留

中图分类号: R 282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0115-04

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是我国珍稀、名贵的药材, 为上等补药, 对心血管、呼吸系统、肝脏、肾脏及肿瘤等方面具有多种药理活性。冬虫夏草为青藏高原特产, 分布地域局限在海拔3 800 m以上的高原草甸地区。冬虫夏草在我国分布北起祁连山, 南至滇西北高山, 东自川西高原山地, 西达喜马拉雅山的大部分地区, 主要产地在我国的青海、西藏、四川、甘肃等省区。

《中国药典》2005年(一部)收载冬虫夏草的测定方法为高效液相色谱法测定腺苷的量^[1], 《韩国草药典》收载冬虫夏草项下仅有性状鉴别项^[2]。为全面评价冬虫夏草的药材质量, 收集了不同产地和采收期的冬虫夏草药材, 对药材中量较高的腺苷类成分进行比较研究; 同时对17批产自主产区青海和西藏的药材进行了重金属残留量测定, 并对药材产地的

土壤进行了相应的研究。

1 冬虫夏草主要核苷类成分量的考察

根据冬虫夏草核苷类成分HPLC指纹图谱的研究结果, 发现在选定色谱条件下, 尿苷的色谱峰通常与腺苷的积分面积相当, 且在各色谱峰中的积分面积最大。因此建立了HPLC同时测定了14批不同产地和不同采收期的冬虫夏草药材中腺苷和尿苷的量的方法。

1.1 仪器与试剂: 高效液相色谱仪为Waters 2695—2487, Empower 工作站, METTLER AE240电子天平。腺苷对照品(中国药品生物制品检定所), 尿苷对照品(中国药品生物制品检定所), 乙睛(色谱纯), 超纯水。

冬虫夏草药材来源见表1, 经青海省药品检验所王慧春主任药师鉴定。其中头草的采集期为当年的4月底到5月初, 二茬草的采集期为当年的6月底。

表1 冬虫夏草药材来源及测定结果

Table 1 Sources of *Cordyceps* and their testing results

编号	产地	生长情况	尿苷/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	腺苷/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
1	四川云盘山	头草	127	80
2	甘肃碌曲尕海	头草	266	284
3	青海果洛甘德县	头草	37	57
4	四川松潘县	头草	39	61
5	海南州贵南县塔秀乡贡卡沟	头草	40	53
6	海南州贵南县塔秀乡贡卡沟	二茬草	134	167
7	海南州兴海县河卡乡	头草	64	64
8	海南州兴海县河卡乡	二茬草	150	199
9	西藏那曲二号	头草	632	152
10	青海玉树杂多苏鲁乡(方法学)	头草	252	198
11	青海玉树称多珍泰	头草	61	66
12	果洛雪山乡	头草	148	117
13	云南迪庆	头草	232	179
14	黄南州多福屯	头草	92	86

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件: 检测波长: 260 nm; 柱温: 30 °C; 色谱柱: Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 0~7 min (B: 0→3%, 体积流量 0.5 mL/min); 7~12 min (B: 3%, 体积流量 0.5 mL/min); 12~22 min (B: 3%→6%, 体积流量 0.5→0.7 mL/min); 22~40 min (B: 6%, 体积流量 0.7→0.8 mL/min); 40~41 min (B: 6%→0%, 体积流量 0.8→0.5 mL/min)。进样量: 10 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取腺苷及尿苷对照品适量, 分别加水制成质量浓度为 2 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备: 取本品粉末 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称质量, 超声提取 45 min, 取出, 放冷至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 25 mL, 置于蒸发皿中, 蒸干, 残渣用水溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。供试品对照品色谱图见图 1。

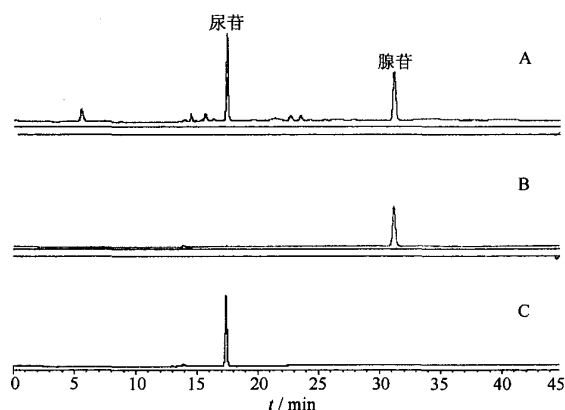


图1 供试品(A, 样品5[#])及对照品腺苷(B)和尿苷(C)的色谱图

Fig 1 Chromatogram of tested sample (A, No 5), adenosine reference substance (B), and guanosine reference substance (C)

1.2.4 线性关系考察: 分别精密称取尿苷、腺苷对照品各适量, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成高质量浓度的对照品溶液, 再分别精密量取对照品溶液 2 mL 分别置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品溶液(含尿苷 2.432 μg/mL、腺苷 1.828 μg/mL)。精密吸取不同体积的尿苷对照品溶液 1、2、4、8、12、16、20、24、28 μL, 腺苷对照品溶液 1、4、8、12、20、24 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标进

行线性回归, 得回归方程分别为: $Y = 4\,000\,000 X - 2\,968.9$, $r = 0.999\,99$; $Y = 4\,000\,000 X + 2\,270$, $r = 0.999$ 。结果表明: 尿苷在 0.002 432~0.068 096 μg、腺苷 0.001 828~0.043 872 μg 线性关系良好。

1.2.5 稳定性试验: 取 5[#] 冬虫夏草药材样品溶液在 0、2、4、6、8、10、12、14、16 h 分别进样分析, 记录峰面积值, 结果尿苷和腺苷的 RSD 值分别为 0.89%、0.96%, 说明供试品溶液在 16 h 内稳定。

1.2.6 精密度试验: 取 5[#] 冬虫夏草药材样品溶液重复进样 5 次, 记录峰面积值, 结果尿苷和腺苷的 RSD 值分别为 0.3%、0.7%, 说明仪器精密度良好。

1.2.7 重现性试验: 取 5[#] 冬虫夏草药材样品, 称取 5 份, 按上述供试品溶液的制备方法制备, 样品溶液在上述色谱条件下分析, 结果尿苷为 0.025 3%, RSD 为 0.56%; 腺苷为 0.019 8%, RSD 为 0.51%, ($n = 5$), 表明本方法重现性较好。

1.2.8 回收率试验: 采用加样回收法, 取 5[#] 样品加入一定量对照品, 按样品制备项下方法操作, 在上述色谱条件下, 进样测定, 测得平均回收率尿苷为 100.3%, RSD = 0.5%; 腺苷为 99.1%, RSD = 1.8%。

1.2.9 样品测定结果: 取 14 批药材按 1.2.1 项下色谱条件测定, 结果见表 1。

1.3 讨论: 从 14 批样品的测定结果可以看出: 各批药材的腺苷和尿苷的量变化范围较大, 其中尿苷在 37~632 μg/g, 腺苷为 53~284 μg/g。这种差异可能与药材的产地、生长环境以及采收期有关。

冬虫夏草的采收期通常是在每年的 5~6 月, 5 月采集的药材叫头草, 6 月采集的为二茬草; 传统认为头草的质量要好于二茬草。为考察采收期对药材核苷类成分量的影响, 课题组选择两个产地的样品分别采集头草和二茬草, 即 5 和 7 号样品为头草, 6 和 8 号样品为二茬草。从 5、6、7、8 号样品的测定结果来看, 二茬草的腺苷和尿苷的量均远远高于头草。现行冬虫夏草质量标准采用腺苷作为药材的指标性成分, 由于核苷类成分为生物代谢产物, 而非药效指标。测定结果显示头草的核苷类成分的量远远低于二茬草的量。该数据提示: 头草在变成二茬草的期间内, 由于菌丝体的不断萌发, 产生了大量代谢产物, 其中包括核苷类成分。核苷类成分的量过高, 表明大量的虫体组织已经转变成菌丝体。且随着放置时间的延长, 核苷类成分的量会进一步升高。氨基酸测定结果显示: 头草与二茬草中总氨基酸和主要氨基酸的量无明显差异^[3]。因此, 笔者认为针对现行药材质量标准要求, 应适当推迟冬虫夏草头草的采收期; 同

时有必要针对不同采收期的药材进行药效学对比研究,根据药效学比较的结果确定药材的最佳采收期;根据药效学比较结果,选取合理的化学成分作为冬虫夏草药材的指标性成分。

2 冬虫夏草重金属残留量考察

微量元素由于其存在状态和浓度不同,可能产生有害作用。当摄入量超过一定范围时,则可产生一系列毒副作用。中药材在生长过程中从土壤空气中吸收,或传统制作工艺中会不可避免地带入某些有害元素(如重金属)。为保证用药安全有效,采用科学技术,检测控制有害微量元素很有必要。采用原子吸收分光光度法对17批青海和西藏产冬虫夏草药材中的铅、镉、砷、汞、铜等重金属及有害元素进行了检测。

2.1 仪器和试剂:美国热电M—6原子吸收分光光度计,MARS 5微波消解炉。硝酸为BV-III级,其余均为分析纯。

2.2 方法:照《中国药典》2005年版(一部)附录操作^[4],采用原子吸收分光光度法测定铅、砷、汞、铜、镉的量。

2.3 重金属残留测定结果:对17批来自冬虫夏草主产地的青海和西藏的样品进行了测定,结果见表2。

2.4 讨论:参照《中国药典》2005年版(一部)对药材及其制剂的要求(重金属残留限量为 $Pb \leq 5.0\text{ mg/kg}$, $Cd \leq 0.3\text{ mg/kg}$, $As \leq 2.0\text{ mg/kg}$, $Hg \leq 0.2\text{ mg/kg}$, $Cu \leq 20\text{ mg/kg}$),从上述结果看出,冬虫夏草药材中铅、镉、汞和铜等重金属元素残留量均大大低于该标准,但是几乎所有被测药材样品中砷元素的残留量超标,且平均残留量也较高。由于砷元素对人体

的危害很大,认为有必要对冬虫夏草产区的土壤和水中的砷元素的量进行检测,防止因为土壤污染而对冬虫夏草药材造成的影响。在对14个青海冬虫夏草采集地的土壤样品进行的初步重金属检查后发现,多数青海冬虫夏草产地的土壤砷残留量较高(表3),这可能与青藏高原地区的土质有关。其中50%以上的药材采集地土壤样品达不到中华人民共和国国家标准GB 15618-1995土壤环境质量标准中关于三级土壤的要求($< 30 \times 10^{-6}$,而GAP基地的土壤应达到二级以上要求),可能是由于冬虫夏草在生长与产生过程中间接或直接地积蓄了土壤中的砷,造成了药材中砷量较高。此外笔者认为有必要将重金属的考察对象范围扩大到采集地的周边植物,对于冬虫夏草中砷量过高的原因有必要进一步深入研究以找出原因所在。

表2 冬虫夏草药材中重金属残留测定结果

Table 2 Determination of heavy metal residues in Cordyceps

产地	编号	重金属残留量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)				
		铅	镉	砷	汞	铜
青海	1	0.58	0.04	9.97	0.02	13.08
	2	0.87	0.04	5.44	0.06	15.64
	3	0.68	0.05	7.50	0.05	13.52
	4	0.94	0.04	5.78	0.02	13.47
	5	0.50	0.04	3.78	0.00	12.15
	6	1.63	0.05	8.80	0.04	15.79
	7	1.25	0.06	4.70	0.03	12.86
	8	0.53	0.05	5.44	0.04	9.30
	9	0.70	0.03	7.95	0.03	13.28
	10	0.64	0.03	3.68	0.02	11.22
西藏	11	0.40	0.03	4.16	0.04	15.12
	12	1.08	0.16	2.65	0.08	10.70
	13	0.60	0.04	2.10	0.16	9.39
	14	0.78	0.03	3.76	0.03	11.92
	15	1.14	0.09	3.46	0.02	12.22
	16	0.74	0.05	4.40	0.07	13.98
	17	1.35	0.07	1.16	0.01	14.79

表3 青海部分冬虫夏草产区土壤重金属残留量测定结果

Table 3 Determination of heavy metals residues in soil samples from growing region of Cordyceps in Qinghai Province

编号	采集点地理位置			土壤中重金属/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)				
	海拔/m	纬度(N)	经度(E)	砷	汞	铜	镉	铅
1	3 370	35°25'	102°14'	47.86	0.063	20 621.8	0.171 2	31.308
2	3 660	35°11'	101°47'	34.3	0.032 8	23 564.8	0.189 5	23 304.7
3	3 800	34°17'	102°20'	4.014	0.033 9	21 858.1	0.073 9	16 972.6
4	4 100	34°00'	102°01'	30.053	0.048 5	23.23	0.208 8	27 129.4
5	4 300			51.439	0.095 2	23 596	0.271 6	35 733.2
6	3 740	33°23'	101°31'	55.006	0.077 9	18 962.1	0.176 6	24 190.4
7	4 300	33°06'	97°22'	27.002	0.202 4	23 140.5	0.036 7	25.756
8	4 030	33°01'	100°45'	63.508	0.155 2	19 351.3	0.212 6	33 432.4
9	4 230	33°45'	99°39'	10.685	0.074 2	21 860.4	0.171 9	17 776.2
10	4 240	34°09'	100°11'	1.234	0.075 5	17 836.3	0.079 4	21 217.5
11	4 100	34°27'	99°4'	13.127	0.159 6	20 147.9	0.138 4	21 795.5
12	4 250	33°16'	97°22'	11.136	0.057 3	19 511.4	0.144 1	27 100.1
13	4 150	32°39'	96°36'	12.561	0.075 5	16.721		39 566.8
14	3 900	35°27'	100°35'	71.444	0.077	15 967.4	0.114 8	34 515.7

由于冬虫夏草为我国高原特产, 每年出口量极大。据报道, 2006 年上半年, 中药材和饮片累计出口 1.80 亿美元, 其中冬虫夏草占中国大陆出口总值的 90%。故在冬虫夏草药材出口前, 应考察进口国对药材的重金属残留的限度要求。在对药材的砷元素的限度规定中, WHO、FDA、香港是以每日(周)最大摄入量(含来源于其他食品或药品的摄入)计算的, 而加拿大、新加坡、泰国和韩国的标准均不同程度地低于我国药用植物及制剂绿色行业标准的要求, 但欧盟的标准最为严格。即使采用限度最为宽松的加拿大标准, 仍有 7 批来自青海的药材不符合规定。

鉴于本实验中多数天然冬虫夏草的砷量超过《中国药典》和欧盟的标准规定, 笔者认为: (1) 有必要对

出口的天然冬虫夏草药材加强砷元素量的检查(尤其是出口到欧洲国家)以避免由于砷元素量过高影响出口而造成的不良影响和经济损失。在天然冬虫夏草的使用中也应注意避免砷量超标对人体所造成的不良影响。(2) 有必要开展对冬虫夏草产区土壤和植被的重金属研究, 以确定冬虫夏草药材含砷量高的机制。(3) 有必要探讨冬虫夏草中微量砷元素的实际存在状态(有机与无机), 及对体内代谢的作用与影响。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 韩国草药典[S]. (四). 2002.
- [3] 石岩, 王钢力, 林瑞超. 近红外技术测定冬虫夏草中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2007(1): 90.
- [4] 《中国药典》[S]. 二部. 附录 IX B. 2005.

HPLC 法测定云南红豆杉细胞悬浮培养中 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ

郭玉婷¹, 张臻², 张经硕¹, 王剑文^{1*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 测定经寡聚半乳糖醛酸(oligogalacturonic acid, OGA) 诱导的云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 细胞悬浮培养物中 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-deacetyl baccatin III, 10-DAB III) 的量。方法 采用不同质量浓度的 OGA 处理云南红豆杉细胞悬浮培养细胞, 通过 RP-HPLC 法测定细胞和培养液中的 10-DAB III 的量, 甲醇-乙腈-水(2:3:8) 为流动相, 检测波长为 232 nm。结果 10-DAB III 在 0.05~2.06 μg 与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 89.146X + 27.067$ ($R^2 = 0.9996$), 细胞内、外样品平均回收率分别为 94.96%、100.72%, RSD 分别为 0.44%、0.81%。OGA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可显著提高云南红豆杉细胞中 10-DAB III 的量。结论 10-DAB III 的 RP-HPLC 方法可靠简便, 重现性好, 灵敏度高, 具有较高的实用价值, 可用于对红豆杉细胞诱导培养研究中的分析, OGA 是 10-DAB III 细胞生产的有效诱导子。

关键词: 云南红豆杉; 细胞培养; 寡聚半乳糖醛酸; 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ; HPLC

中图分类号: R282.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)01-0118-03

云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 株数或蓄积量都占云南 3 种红豆杉的 99.6% 以上^[1], 其中紫杉醇和 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ的量高于同属其他植物^[2]。10-DAB III 是红豆杉中的紫杉烷萜类化合物之一, 不仅自身有抗癌活性, 且可作为紫杉醇及其类似物的合成前体, 其天然储量比紫杉醇高数十倍, 利用 10-DAB III 可合成比紫杉醇抗癌活性更高的 taxotere^[3], 因此对 10-DAB III 的开发利用具有更广泛的前景。近年来, 细胞培养技术已成为红豆杉研究的重要手段, 通过细胞培养^[4]、诱导技术^[5]、前体饲喂^[6]、生物反应器^[7]等各种生物技术来

生产紫杉醇, 已取得了许多进展。本实验利用 RP-HPLC 法测定 OGA 诱导云南红豆杉细胞悬浮培养物中 10-DAB III 的量, 为通过云南红豆杉细胞培养生产 10-DAB III 提供调控手段和依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC—10A T 型高效液相色谱系统, 自动液相色谱分离色谱仪(上海琪特分析仪器有限公司), Sk3300H 型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司), 电子分析天平(Sartorius), 冷冻干燥机(上海市离心机械研究所), 单层摇床(太仓市实验设备厂)。

10-DAB III 对照品(上海同田生化技术有限公

* 收稿日期: 2007-03-20

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(05KJB360120); 苏州大学医学发展基金项目(EE132514)

作者简介: 郭玉婷(1982—), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。

* 通讯作者 王剑文 Tel: (0512)65880025 E-mail: jwwang@suda.edu.cn