

高于千万分之三, Cu 不得高于百万分之二十) 为参考, 按此要求, 本实验测定的 20 个样品中, Pb 的合格率为 85%, Cd 的合格率为 55%, Cu 的合格率为 100%, 在雅安石棉、康定折多山、阿坝卧龙、西昌会东、雅安宝兴、雅安汉源生长的重楼重金属及有害元素的量在限定范围内, 因此在这些地区建设重楼药材的驯化栽培基地有利于其药材的质量控制。

参考文献:

[1] 李恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.

- [2] 边洪荣, 李小娜, 王会敏. 重楼的研究及应用进展 [J]. 中药材, 2002, 25(3): 218-220.
- [3] Robert EB, Henry KJ H, James F S. Newer aspects of the roles of Zn, Mn, Cu in human nutrition [J]. *Clin Chem*, 1975, 21(4): 501-520.
- [4] 祁俊生, 徐辉碧, 周井炎, 等. 植物类中药中微量元素的因子分析和聚类分析 [J]. 分析化学, 1998, 26(11): 1309-1314.
- [5] 袁晓, 袁萍, 严海燕, 等. 野生珍稀药用植物七叶一枝花的成分含量分析 [J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 575-577.

猪苓药材的质量评价标准研究

王弘¹, 晁建平², 陈文举¹, 杨玥¹, 陈世忠^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 北京石油化工学院, 北京 102617)

摘要:目的 进行猪苓质量标准研究, 解决猪苓药材评价标准不规范、质量差异大、栽培猪苓得不到合理应用和野生资源濒危问题。方法 采用高效液相色谱法进行麦角甾醇、麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮定量测定, 结合多糖的紫外分光光度法的测定, 建立以猪苓 3 种化学成分为指标的质量评价标准。结果 采用猪苓 3 种化学成分为指标的质量评价方法, 考察了不同地区猪苓商品药材、栽培和野生猪苓的质量, 提出了猪苓资源合理应用的建议。结论 采用麦角甾醇、麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮和多糖 3 种成分为指标的质量评价方法, 可以系统、全面地对不同来源的猪苓进行质量控制, 为规范猪苓药材质量评价标准, 提高栽培猪苓药材质量, 保护野生资源提供科学方法。

关键词:猪苓; 麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮; 麦角甾醇; 多糖

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)03-0971-04

猪苓为多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的干燥菌核。性味甘、淡、平, 具有利水渗湿功效。主产于陕西、河北、四川、云南, 生长环境独特^[1]。近年来随着其药用价值不断被人们认识, 需求量日益提高, 过度采挖导致了野生猪苓资源濒临枯竭^[2]。目前人工半野生栽培技术已获成功, 但栽培猪苓质量未被确定, 商品药材主要来源于野生猪苓。《中国药典》2005 年版猪苓项下仅有显微鉴别和试管试验两项, 无定量测定内容^[3], 各地商品药材质量评价标准不规范, 造成了猪苓药材质量不稳定。有报道以猪苓多糖的量为质量控制标准^[4], 也有报道用凯氏定氮法测定猪苓粗蛋白和氨基酸的量^[5]。但猪苓作为传统的利尿药, 这些成分不能全面反映其内在质量。因此, 为合理应用资源, 提高猪苓药材质量, 保护野生猪苓资源, 建立科学、可行的猪苓质量评价体系是急需解决的问题。

麦角甾醇是真菌类植物广泛含有的成分, 在猪苓

中的量较高; 麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮具有抗肿瘤、利尿、抗氧化等作用, 是猪苓药材中的有效成分^[6]。本实验结合猪苓多糖的紫外分光光度法的测定, 通过麦角甾醇、麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮 HPLC 定量测定方法的研究, 建立了以猪苓 3 种化学成分为指标的质量评价方法。并首次采用该方法考察了全国不同地区商品猪苓药材、野生和栽培猪苓的麦角甾醇、麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮和多糖 3 种成分的量, 进行了质量分析评价, 提出了猪苓资源合理应用的建议。该方法可系统、全面地对不同来源的猪苓药材进行质量评价, 并为修订《中国药典》规范猪苓药材质量标准提供了科学参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱系统; LC-10ATVP 泵, SPD-M10AV 型二极管阵列紫外可见检测器; CLASS-VP5.0 色谱工作站; 紫外光谱仪: Varian Cary-300 型。

* 收稿日期: 2009-04-10

* 通讯作者 陈世忠 Tel: (010) 82802723 E-mail: hw9505@bjmu.edu.cn

麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、麦角甾醇对照品由本实验室制备,质量分数>98%;D-无水葡萄糖对照品购于中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,其余为分析纯试剂,北京化学试剂厂产品;超纯水由北京大学医学部分析中心提供。

猪苓试验样品:猪苓商品药材为从全国不同地区收集的商品药材饮片;野生猪苓为湖北神农架和陕西秦岭太白山采集;栽培猪苓为陕西省留坝县猪苓栽培基地栽培的三年生、四年生猪苓。以上猪苓试验样品经北京大学药学院陈世忠博士鉴定。试验样品处理为60℃烘干后,粉碎过40目筛。

2 方法与结果

2.1 麦角甾醇的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件:色谱柱为 Alltima-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(96:4);检测波长 281 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温:室温。色谱图见图 1。

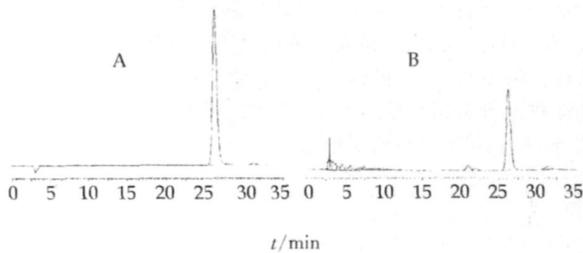


图 1 麦角甾醇对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of ergosterol reference substance (A) and sample (B)

2.1.2 对照品溶液制备:取麦角甾醇对照品 12.5 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中用无水乙醇溶解并定容(含麦角甾醇 0.5 mg/mL)。

2.1.3 供试品溶液制备:取猪苓药材样品 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 具塞三角瓶中,加入无水乙醇 20 mL,称质量,超声 60 min,放至室温,加溶剂补足质量,混匀,滤过,量取续滤液 8 mL,蒸干,残渣用无水乙醇溶解,于 2 mL 量瓶中定容,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.1.4 标准曲线和线性范围:精密吸取麦角甾醇对照品溶液 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以麦角甾醇量为纵坐标,峰面积积分为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 7.2276e^{-07}X + 2.4521e^{-02}$, $r = 0.9999$ 。表明麦角甾醇在 2.0~10.0 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验:精密吸取麦角甾醇对照品溶液 15 μL,重复进样 6 次,按上述色谱条件测定峰面积,

计算 RSD 为 0.68%,说明精密度良好。

2.1.6 稳定性试验:取猪苓药材样品 1.0 g,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD 为 1.78%,说明供试品溶液中麦角甾醇在 8 h 内稳定性良好。

2.1.7 重现性试验:取猪苓药材样品 1.0 g 共 6 份,精密称定,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,各精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积,计算其质量分数的 RSD 为 1.36%,说明重现性良好。

2.1.8 回收率测定:取 6 份已测定的猪苓药材样品各 0.5 g,精密称定,分别精密添加 0.8、1.0、1.2 倍量麦角甾醇对照品,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,进样,按上述色谱条件测定峰面积,根据回归方程计算出麦角甾醇的量,结果平均回收率为 97.18%,RSD 为 1.42%。

2.1.9 样品测定:取不同来源猪苓样品各 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,各精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积。并计算出各猪苓样品的麦角甾醇的量。结果见表 1~3。

2.2 麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件:色谱柱为 Alltima-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(96:4);检测波长 343 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温:室温。色谱图见图 2。

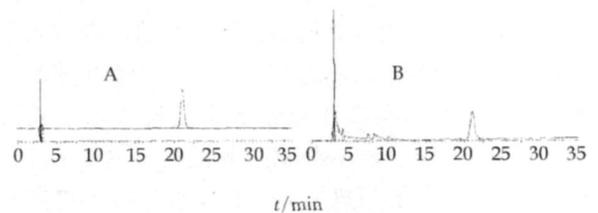


图 2 麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC Chromatogram of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one reference substance (A) and sample (B)

2.2.2 对照品溶液制备:取麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品 5.0 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用无水乙醇溶解并定容,精密吸取 1 mL 量 25 mL 量瓶中,用无水乙醇溶解并定容[含麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 0.008 mg/mL]。

2.2.3 供试品溶液制备:取猪苓药材样品 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 具塞三角瓶中,加入无水乙醇

20 mL,称质量,超声 60 min,放至室温,加溶剂补足质量,混匀,滤过,精密量取续滤液 8 mL,蒸干,残渣用无水乙醇溶解,定量转移至 2 mL 量瓶中,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.2.4 标准曲线和线性范围:精密吸取麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品溶液 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮量为纵坐标,以峰面积积分值为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 2.2087e - 07X + 3.6105e - 04$, $r = 0.9998$,结果表明麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮在 0.032~0.160 μg 与峰面积值呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验:精密吸取麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品溶液 15 μL,重复进样 6 次,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD 为 0.27%,说明精密度良好。

2.2.6 稳定性试验:取猪苓药材样品 1.0 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10 h 精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD 为 1.69%,说明供试品溶液中麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮在 10 h 内稳定性良好。

2.2.7 重现性试验:取猪苓药材样品 1.0 g 共 6 份,精密称定,分别按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,各精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积,计算其质量分数的 RSD 为 1.35%,说明重现性良好。

2.2.8 回收率试验:取 6 份已测定的猪苓药材各 0.5 g,精密称定,分别精密添加 0.8、1.0、1.2 倍量麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,进样,按上述色谱条件测定峰面积,根据回归方程计算出麦角甾醇的量,计算回收率,结果平均回收率为 97.89%,RSD = 1.74%。

2.2.9 样品测定:取不同来源猪苓样品各 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,各精密吸取 15 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积。精密吸取麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮对照品溶液 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μL,注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件测定峰面积,并计算出各猪苓药材样品的麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮的量,结果见表 1~3。

2.3 猪苓多糖的定量测定^[4,7]

2.3.1 测定条件:显色剂:蒽酮 20 mg,加入 10 mL 水,再缓缓加入浓硫酸 30 mL,搅拌使溶解;仪器:

721 分光光度计;最大吸收波长:630 nm。

2.3.2 对照品溶液制备和标准曲线的绘制:取 D-无水葡萄糖对照品 5.0 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加水溶解并定容,精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置 10 mL 量瓶中定容,精密吸取 1 mL 于试管中,于冰水浴中加入蒽酮显色剂 4 mL,置沸水浴中加热 10 min,再置冷水浴降至室温,于分光光度计 630 nm 波长下测定吸光度。以质量分数为纵坐标,吸光度值为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程: $Y = 3.4728e - 02X - 0.001776$, $r = 0.9997$ 。

2.3.3 供试品溶液制备方法:取猪苓样品 1.0 g,精密称定,加水 50 mL,称质量,热提 1 h,补足损失质量,混匀,滤过,取续滤液 20 mL,减压浓缩至 5 mL,用乙醇调含醇量至 80%,摇匀,静置 30 min 后离心,沉淀用 80%乙醇洗涤 3 次。沉淀物用水溶解,定量转移至 25 mL 量瓶中,加水至刻度混匀备用。

2.3.4 样品测定:取不同来源猪苓样品 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,各精密吸取 1 mL 置试管中,于冰水浴中加入蒽酮显色剂 4 mL,置沸水浴中加热 10 min,再置水浴降至室温,于 721 分光光度计 630 nm 波长处测定吸光度,根据回归方程计算出各猪苓样品中多糖的量,结果见表 1~3。

表 1 不同产地猪苓商品药材的 3 种成分的量(n=3)

Table 1 Determination of three components in *P. umbellatus* from of different regions (n=3)

产地	麦角甾醇 (mg·g ⁻¹)	麦角甾-4,6,8(14),22- 四烯-3-酮/(mg·g ⁻¹)	多糖/ (mg·g ⁻¹)
河北安国市购	0.963	0.023	11.837
北京市购	0.721	0.017	4.110
辽宁丹东市购	0.871	0.107	2.992
新疆乌鲁木齐市购	0.517	0.021	3.150
西藏拉萨市购	0.481	0.020	6.096
陕西西安市购	0.439	0.012	3.263
陕西西安市购	0.769	0.017	5.249
陕西西安市购	0.507	0.023	3.133
陕西汉中市购	0.459	0.031	4.008
山西毫州购	0.503	0.011	3.101
山西灵丘购	0.500	0.014	3.795
山西陵川购	0.657	0.011	5.597
山西万荣购	0.742	0.012	4.989
山西永济购	0.625	0.039	3.046
河南郑州市购	0.576	0.009	3.448
山东济南市购	0.587	0.027	3.828
四川汝州中医院购	0.539	0.009	6.118
云南陆良人民医院购	0.655	0.007	3.187
浙江无锡市购	0.337	0.012	2.762
广西桂林市购	0.091	0.005	12.034
广西南宁市购	0.449	0.011	7.040
广东深圳市购	0.272	0.071	4.935
海南三亚市购	0.138	0.006	11.707

表 2 野生猪苓的 3 种成分的量 (n=3)

Table 2 Determination of three components in wild

P. umbellatus (n=3)

产地	麦角甾醇 (mg·g ⁻¹)	麦角甾-4,6,8(14),22- 四烯-3-酮 (mg·g ⁻¹)	多糖/ (mg·g ⁻¹)
湖北神农架	0.703	0.021	4.739
陕西太白山	0.461	0.024	3.965

表 3 栽培猪苓不同生长年限的 3 种成分的量 (n=3)

Table 3 Determination of three components in cultivation

P. umbellatus in different growth years (n=3)

年限	麦角甾醇 (mg·g ⁻¹)	麦角甾-4,6,8(14),22- 四烯-3-酮 (mg·g ⁻¹)	多糖/ (mg·g ⁻¹)
三年生	0.708	0.021	4.750
四年生	0.589	0.019	4.338

3 结论

3.1 本实验 HPLC 定量测定的方法学研究过程中分别使用了甲醇-0.50% H₃PO₄ 水溶液 (92:8)、甲醇-水溶液 (96:4)、乙腈-水 (60:40) 等条件进行色谱分离试验,经综合考虑试验结果,选择的流动相为甲醇-水溶液 (96:4)。其中麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮在 343 nm 检测波长下与其他组分能达到基线分离;麦角甾醇在 281 nm 检测波长下与其他组分能达到基线分离。同时对猪苓有效成分不同提取方法进行了对比试验,结果表明用 20 倍量无水乙醇超声 60 min 的提取方法效果最好。在建立的灵敏、可靠的 HPLC 定量测定方法的基础上,结合多糖的紫外分光光度法的测定,制定了猪苓麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、麦角甾醇和多糖 3 种化学成分为指标的质量评价方法。本方法可系统、全面地对不同来源的猪苓药材进行质量评价,并为规范猪苓药材标准提供了科学依据。

3.2 首次采用 3 种成分为指标的方法考察了不同地区猪苓商品药材、野生和栽培品的麦角甾醇、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮和多糖的量。其中麦角甾醇最低量为 0.091 mg/g,最高量为 0.963 mg/g;麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮最低量为 0.005 mg/g,最高为 0.107 mg/g;多糖量最低为 2.992 mg/g,最高为 12.034 mg/g;部分药材多糖量高达 11.707、12.034 mg/g,而另两种成分的量却很低。以上结果表明,不同地区猪苓商品药材 3 种成分的量差异很大,反映了猪苓药材存在的质量问题。因此应及时采用科学的质量评价方法,制定出猪苓各成分限度标准,进行质量控制。本方法的应用和实施可解决目前猪苓药材市场质量控制标准不规范、质量差异大的问题;另外建议对于多糖量高而另两种成分量很低的猪苓药材可作为提取猪苓多糖的原料使用,由此可使猪苓资源合理应用。

3.3 研究表明,野生、栽培猪苓的 3 种成分的量与不同地区猪苓商品药材 3 种成分的量平均值相近似,但由于试验样品来源数量有限,缺乏一定的代表性,还需充分收集试验样品和进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985.
- [2] 许广波,傅伟杰,赵旭奎. 我国猪苓的研究进展[J]. 菌物研究, 2003,1(1):38-61.
- [3] 中国药典[S]. 一部, 2005.
- [4] 郭顺星,许锦堂. 不同年龄的野生与家种猪苓菌核等成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,1992,17(2):77-79.
- [5] 陈文强,邓百万,彭浩,等. 猪苓营养菌丝与野生菌核蛋白质成分分析[J]. 食用菌学报,2004,11(2):16-19.
- [6] 袁丹. 猪苓菌核中的抗醛固酮(醛甾酮)利尿成分[J]. 生物药学报,2001,27(6):867-870.
- [7] 黄驰,朱蓉贞. 猪苓多糖及其注射剂的含量测定研究[J]. 中成药, 1093,15(1):13-14.

柱前衍生化 RP-HPLC 法测定地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖

刘有平,张佳蕊,邵华,李小童,刘永利,邱欣*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立同时测定地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖的 RP-HPLC 方法,为地黄药材的质量控制提供新的依据。方法 地黄药材以水超声提取,再用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化后,采用 Diamonsil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)分离,流动相为乙腈和 100 mmol/L 醋酸铵水溶液(pH 5.5)进行梯度洗脱,体积流量 1.0 mL/min,检测波长为 245 nm,柱温为 23.5℃,以内标法定量。结果 葡萄糖、半乳糖和蜜二糖分别在 90~900 μg/mL

* 收稿日期:2008-08-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20445003)

作者简介:刘有平(1970—),男,山西长治人,博士,研究方向为药物代谢与药物动力学研究。

Tel:(024)23986342 E-mail:ypriu@163.com

*通讯作者 邱欣 E-mail:dixin63@hotmail.com