

HPLC 法测定不同产地不同品种马勃药材中麦角甾醇

相聪坤¹, 宿树兰², 关胜江¹, 黄怀鹏³, 王巧⁴, 安福丽¹, 陈迎春¹, 吴海燕⁴, 朱珊⁵

1. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011
2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023
3. 河北国金药业有限责任公司, 河北 石家庄 050011
4. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017
5. 河北美威中药材有限公司, 河北 安国 071200

摘要: 目的 以麦角甾醇为测定指标, 建立马勃 *Lasiosphaera seu Calvatia* 质量评价的 HPLC 方法, 对 42 批不同商品马勃中麦角甾醇的量进行比较研究。方法 运用 HPLC 对多个不同产地和品种的马勃中麦角甾醇进行测定, 色谱条件为 BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 282 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 以乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱: 0~15 min, 95% A, 15~50 min, 100% A。结果 建立了马勃中麦角甾醇的提取方法和 HPLC 测定方法。不同品种和产地的马勃中麦角甾醇范围为 0.009 9%~0.150 3%。结论 不同商品马勃中麦角甾醇量差异明显, 说明目前市售马勃药材品质不均一。因此, 对于马勃药材的质量控制尚需进一步规范化和标准化。

关键词: 马勃; 麦角甾醇; HPLC; 质量评价; 药材品质

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1397-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.025

Determination of ergosterol in *Lasiosphaera Seu Calvatia* in various species from different habitats by HPLC

XIANG Cong-kun¹, SU Shu-lan², GUAN Sheng-jiang¹, HUANG Huai-peng³, WANG Qiao⁴, AN Fu-li¹, CHEN Ying-chun¹, WU Hai-yan⁴, ZHU Shan⁵

1. TCM Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, China
2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
3. Hebei Guogin Pharmaceutical Company Limited, Shijiazhuang 050011, China
4. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China
5. Hebei Meiwei TCM Material Company Limited, Anguo 071200, China

Abstract: Objective The HPLC method was established for assessment of quality of *Lasiosphaera seu Calvatia* (LSC) based on the determined indicator of ergosterol. The contents of ergosterol in 42 batches of LSC were comparatively analyzed. **Methods** The contents of ergosterol in LSC from different origins were determined by HPLC. The conditions were as follows: BDS Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 282 nm; column temperature: 30 °C; injection volume: 20 μL; mobile phase: acetonitrile (A): 0.1% formic acid (B) as the mobile phase gradient elution: 0—15 min, 95% A, 15—50 min, 100% A. **Results** The HPLC method to determine the ergosterol content of puffball was established. The ranges of ergosterol contents among different samples was 0.009 9%—0.150 3%. **Conclusion** The contents of ergosterol in different LSC are obviously different, and the quality of commercial LSC is not coincident. So the quality control of LSC *a* needs further normalization and standardization. The data in this paper would provide a reasonable reference for the quality control of LSC.

Key words: *Lasiosphaera seu Calvatia*; ergosterol; HPLC; quality evaluation; quality edicicinal materials

马勃 *Lasiosphaera seu Calvatia* (LSC), 俗称牛屎菇或马蹄包, 有的地方叫药包子、马屁泡, 属担子菌类马勃科。药用马勃为灰包科脱皮马勃

Lasiosphaera fenzlii Reich、大马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd 或紫色马勃 *C. lilacina* (Mont. et Berk.) Lloyd 的干燥子实体^[1]。马勃性平、味辛,

收稿日期: 2016-02-15

基金项目: 河北省科技计划项目 (12277794)

作者简介: 相聪坤, 女, 副主任中药师。Tel: (0311)69095313 E-mail: xiang_congkon@163.com

具有清肺利咽、止血的功效，是一种用于解毒、消肺的药用真菌，更是一种止血良药^[2]。马勃中所含化学成分主要为萜类化合物、甾体化合物、马勃多糖、小分子的含氮化合物等^[3]，经过调查和文献研究，近年来对马勃中甾体类成分的测定研究还不够深入，而甾体类成分具有较强的生理活性。马勃中的主要成分之一麦角甾醇(ergosterol)是真菌类的特征甾醇，其主要存在于绝大多数的真菌细胞膜中，据报道麦角甾醇的量与真菌的生物量存在着相关关系，是真菌生物量的重要标志物之一^[4-5]。麦角甾醇是甾醇化合物的一种，为脂溶性维生素 D₂ 的前体^[6]，其具有抗癌、防衰老、减毒等功能^[7]。麦角甾醇作为真菌类的特征甾醇，在马勃的研究中却很少受到关注。本实验旨在以麦角甾醇为测定指标，建立马勃质量评价的 HPLC 测定方法；并对不同品种和不同产地的马勃样品中的麦角甾醇进行了测定和质量比较研究，为马勃的进一步研究和开发利用提供参考。

1 仪器与材料

美国 Water 2695 高效液相色谱系统，Water 2996

UV 检测器；Empower 数据管理系统；Lab Teach UV-2000 紫外可见分光光度计（菲勒仪器）；BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；DHG-9023A 型电热恒温鼓风式干燥箱（上海精宏实验设备厂）；KH-500 型超声波清洗仪器（昆山禾创仪器公司）；HH-数显恒温水浴锅（金坛市医疗仪器公司）；EPED 超纯水系统（南京 EPED 科技有限公司）。

样品经笔者鉴定为灰包科脱皮马勃 *Lasiosphoera fenzlii* Reich、大马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd、栓皮马勃 *Mycenastrum corium* (Guers.) Dcsev.或紫色马勃 *C. lilacina* (Mont. et Berk.) Lloyd 的干燥子实体；伪品经鉴定为大口静灰球 *Bovistella sinensis* Lloyd、长根静灰球 *Bovistella radicata*(Mont.) Pat 的干燥子实体，样品信息见表 1。麦角甾醇对照品（批号为 111845-201403），质量分数为 95.50%，购自中国食品药品检定研究院。乙腈（色谱纯，德国默克公司）；醋酸乙酯（分析纯，上海试四赫维化工）；甲醇（分析纯，南京化学试剂公司）；水为实验室自制超纯水。

表 1 样品信息

Table 1 Information of LSC samples

编号	种名及产地	编号	种名及产地	编号	种名及产地	编号	种名及产地
1	大马勃（安国）	12	大马勃（亳州）	23	长根静灰球（河北）	33	大马勃（河北）
2	大马勃（安国）	13	栓皮马勃（河北）	24	长根静灰球（河北）	34	大马勃（河北）
3	大马勃（安国）	14	大马勃（河北）	25	大马勃（河北）	35	大马勃（河北）
4	大马勃（安国）	15	大马勃（河北）	26	大马勃（河北）	36	大马勃（河北）
5	大马勃（安国）	16	脱皮马勃（河北）	27	大马勃（河北）	37	大马勃（河北）
6	大马勃（安国）	17	大口静灰球（河北）	28	大马勃（河北）	38	大马勃（河北）
7	大马勃（安国）	18	大马勃（河北）	29	大马勃（河北）	39	大马勃（河北）
8	大马勃（安国）	19	大马勃（河北）	30	大马勃（河北）	40	大马勃（吉林）
9	大马勃（安国）	20	大马勃（河北）	31	大马勃（河北）	41	紫色马勃（吉林）
10	大马勃（安国）	21	大马勃（河北）	32	大马勃（河北）	42	大马勃（内蒙古）
11	大马勃（安国）	22	大口静灰球（河北）				

2 方法与结果

2.1 马勃中麦角甾醇的测定

2.1.1 色谱条件 BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 282 nm；柱温 30 °C；进样量 20 μL；以乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B）为流动相进行梯度洗脱：0~15 min，95% A，15~50 min，100% A。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取麦角甾醇对照品 2.06 mg，4 mL 甲醇溶解并定容，其质量浓度为

0.515 mg/mL，作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 将干燥的马勃药材粉碎，过 20 目筛。精密称取 1.000 g 样品，置 50 mL 具塞锥形瓶中，加醋酸乙酯 30 mL 溶解，45 °C 恒温水浴 30 min，超声 30 min，抽滤，取滤液，置蒸发皿中蒸干，加 2 mL 甲醇溶解，0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，进行 HPLC 分析。

2.1.4 测定方法 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液，按“2.1.1 色谱条件”项下的测定方法进行测定。其 HPLC 色谱图见图 1。

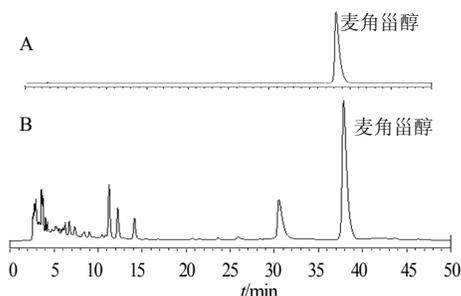


图1 麦角甾醇对照品 (A) 和马勃供试品 (B) 溶液的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of ergosterol reference substance (A) and LSC (B)

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线和线性范围的考察 取 0.515 mg/mL 对照品溶液, 分别进样 2、5、10、15、18、20、25 μ L, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。计算得回归方程 $Y=1.6 \times 10^6 X+72\ 996$ 。结果表明, 马勃中麦角甾醇的量在 1.030~12.875 μ g 呈现良好的线性关系。

2.2.2 精密度考察 精密吸取 0.515 mg/mL 对照品溶液 20 μ L, 连续进样 6 次, 分别测定和记录其峰

面积值, 计算 RSD 值为 0.33%。

2.2.3 稳定性考察 精密吸取 16 号样品供试品溶液 20 μ L, 分别测定其在 0、2、4、6、12、18 h 内的峰面积值, 计算在 18 h 内麦角甾醇的 RSD 值为 0.91%。表明样品溶液在室温下稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 精密称取 16 号样品的供试品 6 份, 按“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 测定其麦角甾醇的峰面积值, 计算质量分数 RSD 值为 0.48%。

2.2.5 加样回收率试验 精密量取 6 份已测定的马勃供试品溶液, 分别精密加入一定量的麦角甾醇对照品溶液, 按“2.1.1”项下方法测定加样回收率, 经计算其回收率在 99.6%~100.4%, RSD 值为 0.96%, 满足定量分析的要求。

2.3 样品的测定

取不同产地不同品种的马勃粉末 1.000 g, 精密称定, 按“2.1.3”项供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件的方法测定其中麦角甾醇的量, 以外标一点法计算样品中麦角甾醇的量, 见表 2。

表 2 不同产地马勃中麦角甾醇的量

Table 2 Contents of ergosterol in LSC samples in various species from different producing areas

编号	麦角甾醇/%	编号	麦角甾醇/%	编号	麦角甾醇/%	编号	麦角甾醇/%
1	0.059 4	12	0.012 1	23	0.039 9	34	0.028 7
2	0.024 4	13	0.116 3	24	0.025 6	35	0.022 8
3	0.056 9	14	0.111 9	25	0.025 1	36	0.038 2
4	0.040 4	15	0.028 0	26	0.012 4	37	0.017 7
5	0.012 3	16	0.009 9	27	0.034 2	38	0.030 6
6	0.017 2	17	0.032 5	28	0.013 0	39	0.020 3
7	0.038 6	18	0.150 3	29	0.018 7	40	0.064 6
8	0.022 6	19	0.077 6	30	0.033 1	41	0.050 2
9	0.061 8	20	0.097 0	31	0.028 2	42	0.023 5
10	0.030 6	21	0.015 6	32	0.027 0		
11	0.020 1	22	0.048 0	33	0.038 3		

2.4 聚类分析结果

采用“SPSS 15.0 for Windows”软件进行系统聚类分析, 以不同产地的 42 个马勃样品中麦角甾醇量为研究对象。原始数据经标准化变换后, 选用组间距离法 (between groups linkage) 进行聚类, 系统聚类结果见图 2, 散点图分析 42 批马勃样品见图 3。由图 2 分析结果表明, 同一个产地且相同品种的马勃样品距离最近, 聚为一类; 不同产地的同一品种马勃样品距离较近; 不同产地且不同品种样品距离则较远。因此可得出产地对麦角甾醇量的影响并不显著, 但是不同品种的马勃中麦角甾醇量差异比

较明显。由散点图可看出, 来自河北某中医院的马勃样品为 13、14、18、20 的品种, 其量相对较高, 其中 13、14 号经鉴定为栓皮马勃和大马勃; 而其他品种的马勃中麦角甾醇的量相对较接近。

3 讨论

3.1 提取时间的选择

精密称取马勃样品 1 g 加醋酸乙酯 30 mL, 恒温水浴 15 min, 超声 15 min, 或水浴 30 min 和超声 30 min, 抽滤, 取滤液蒸干, 2 mL 甲醇复溶, 过 0.45 μ m 滤膜, 进样分析。实验结果表明, 加长水浴和超声时间可提高麦角甾醇的提取量。

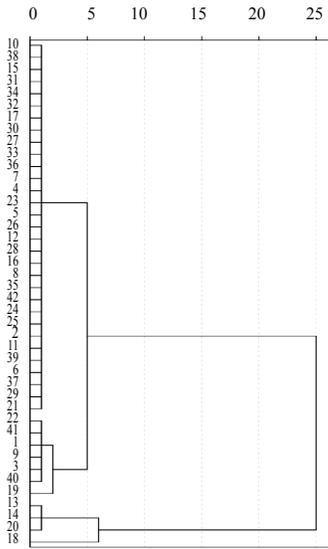


图 2 不同品种和产地马勃样品麦角甾醇量聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis of contents of ergosterol in LSC samples from different habitats areas and species

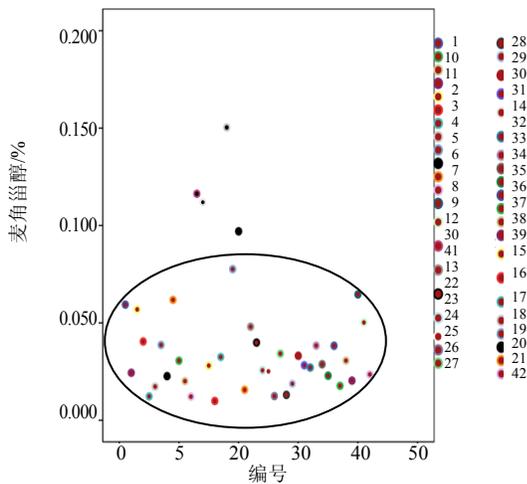


图 3 不同品种和产地马勃样品麦角甾醇量散点图
Fig. 3 Scatter plot of contents of ergosterol in LSC samples from different habitats areas and species

3.2 提取溶剂的选择

同时采用石油醚、醋酸乙酯、甲醇、乙醇 4 种溶剂处理同一种的马勃样品, 结果表明采用醋酸乙酯为提取溶剂时的麦角甾醇提取效率最高, 乙醇提取次之, 故选择醋酸乙酯为提取溶剂。

3.3 流动相的选择

考察了采用不同比例 (100 : 0、95 : 5) 乙腈-水为流动相, 100%乙腈为流动相时, 麦角甾醇与其他成分完全分离, 但峰拖尾较严重, 且麦角甾醇的保留时间较靠后。因此将水改成 0.1%的甲酸水, 这样可有效防止拖尾。综合各种因素, 最终确定乙腈

和 0.1%甲酸水为适宜的流动相。

3.4 洗脱方式的选择

分别考察了 (100 : 0、95 : 5) 乙腈-0.1%甲酸水等度洗脱的图谱, 最后选用以乙腈 (A) -0.1%甲酸水 (B) 为流动相进行梯度洗脱: 0~15 min, 95% A; 15~50 min, 100% A。结果表明梯度洗脱效果较好。

马勃属于真菌类, 而麦角甾醇又是真菌类的特征甾醇, 因此有必要建立马勃中麦角甾醇的质量评价方法。据文献报道真菌中含有游离麦角甾醇及麦角甾醇酯^[8]。本实验观察到, 溶液中的麦角甾醇易发生降解, 这与 Mille-Lindblom 等^[9]研究结果一致。因此, 麦角甾醇标准品及其供试品溶液均应避光、低温保存, 且样品制备后需立即测定, 保存时间不宜过长, 但是 Mille-Lindblom 等^[9]研究同时也表明, 生物体中麦角甾醇量稳定, 可以麦角甾醇为生物指标对真菌进行测定^[10]。麦角甾醇的生物学作用研究较少, 是今后值得研究的方向。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 郭 晶. 马勃化学成分及药理作用研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2013(3): 386-389.
- [3] 邓志鹏, 孙隆儒. 中药马勃的研究进展 [J]. 中药材, 2006, 28(9): 996.
- [4] Reeslev M, Miller M, Nielsen K F. Quantifying mold biomass on gypsum board: comparison of ergosterol and beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 3996-4003.
- [5] Martha BA, Mainul H, Raunel T, et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass [J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 50 (12): 227-236.
- [6] Mattila P, Lampi A, Ronkainen R, et al. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms [J]. *Food Chem*, 2002, 76(13): 293-298.
- [7] 韦会平, 肖 波, 胡开治. 蛹虫草药用价值考 [J]. 中药材, 2004, 27(3): 215-217.
- [8] Yuan J P, Wang J H, Liu X, et al. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC [J]. *Food Chem*, 2007, 105(4): 1755-1759.
- [9] Mille-Lindblom C, Von Wachenfeldt E, Tranvik L J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death [J]. *J Micro Methods*, 2004, 59(2): 253-262.
- [10] 刘京晶, 黄文华, 吕明亮. HPLC 法测定不同品种及段木栽培灵芝子实体中麦角甾醇量 [J]. 中药材, 2011, 34(2): 187-190.