

RP-HPLC法测定猪苓中麦角甾醇的含量^{*}

赵英永¹, 赵晔¹, 林瑞超^{1, 2*}, 孙文基^{1*}

(1. 西北大学 陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立猪苓药材中麦角甾醇的 RP-HPLC 含量测定方法。方法: 猪苓经甲醇超声提取后, 用 HPLC 测定。采用 Diamosil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 283 nm; 柱温 30 ℃。结果: 麦角甾醇进样量在 1.64~16.4 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9997$); 麦角甾醇的平均回收率 ($n = 5$) 为 98.9%, RSD 为 1.2%。结论: 采用 RP-HPLC 测定猪苓药材中麦角甾醇的含量, 该方法灵敏、快速、准确, 可作为 2010 年版中国药典一部增订猪苓含量测定项。

关键词: 猪苓; 麦角甾醇; RP-HPLC; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0898-03

RP-HPLC determination of ergosterol in *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries^{*}

ZHAO Ying-yong¹, ZHAO Ye¹, LIN Rui-chao^{1, 2*}, SUN Wen-jie^{1*}

(1. Biomedicine Key Laboratory of Shaanxi Province Northwest University, Xi'an 710069, China)

2. National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products Beijing 100050, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of ergosterol content in *Polyporus umbellatus* by RP-HPLC. **Method** *Polyporus umbellatus* was extracted with methanol by ultrasound extraction and the chromatographic procedure was carried out with Diamosil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was 100% methanol at a flow of 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 283 nm. The temperature of column was 30 ℃. **Results** The linear range of ergosterol was 1.64–16.4 μg ($r = 0.9997$). The average recovery ($n = 5$) of ergosterol was 98.9% and RSD was 1.2%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible can offer references for the quality control of *Polyporus umbellatus*.

Key words *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries; ergosterol; RP-HPLC; assay

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries] 始载于《神农本草经》, 在我国药用已有 2500 年历史, 主要用于小便不利、水肿、泄泻、淋浊、带下^[1]。陕西、云南产量大, 陕西产的质最佳^[2]。长期以来国内外学者对猪苓药材进行了大量研究, 主要集中于多糖、甾体类化学成分提取分离与结构鉴定, 以及它们的利尿、抗肿瘤、抗癌、抗菌、抗炎、促进头发生长等药理药效学研究^[3~7]。除多糖用于抗肿瘤抗癌以外, 麦角甾醇^[6]、猪苓甾醇^[5, 7, 8]、麦角甾醇过氧化物^[9]等是猪苓的主要活性成分, 这些成分是麦角甾醇的次生代谢产物^[10]。这些活性成分的含量多少和麦角甾醇在药材中的含量多少有关系。

中国药典中猪苓药材缺少含量测定项, 药材内在质量难以评定。根据麦角甾醇 (ergosterol) 与存在的活性成分的关系, 本文从猪苓中分离出主要成分麦角甾醇作为指标性成分, 建立了高效液相色谱法测定麦角甾醇的含量, 为增加中国药典中猪苓含量测定项进行了研究。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695–2487 高效液相色谱仪, 包括 Waters 2695 分离模式, Waters 2487 紫外双波长检测器, Empower 工作站; METTLER TOLEDO AL104 型电子天平; YCQ2300 超声波清洗器 (上海

* 国家药典委员会《中国药典》项目 (YZ-199~200)

** 通讯作者 林瑞超 Tel: (010) 67095307 E-mail: linrch307@sina.com

孙文基 Tel: (029) 88304569 E-mail: cxhm@nwyu.edu.cn

凯波超声设备有限公司); 甲醇(色谱纯); 麦角甾醇对照品为自制(经 TLC 与 HPLC 鉴定纯度为 98.5% 以上, 并经中国药品生物制品检定所认定); 猪苓样品从各药店、药材市场及产地购买, 由西北大学王亚洲副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取麦角甾醇对照品适量, 用甲醇配制成 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 冷藏 4°C 备用。

2.1.2 供试品溶液 精密称取样品 1.00 g 置于具塞三角瓶中, 加甲醇 20 mL , 称定重量, 超声 (400 W , 40 kHz) 1 h 放置室温, 称重, 加甲醇至原重量, 取上清液过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 即得供试品溶液, 冷藏 4°C 备用。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Diamosil C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 100% 甲醇; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 283 nm ; 柱温 30°C 。

2.3 系统适用性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液各 $20 \mu\text{L}$, 在“2.2”项色谱条件下, 注入液相色谱仪测定, 记录色谱图, 见图 1。从图 1 中可见, 本实验条件下, 麦角甾醇与其他化学成分能达到基线分离, 理论塔板数以麦角甾醇峰计算为 6500 。

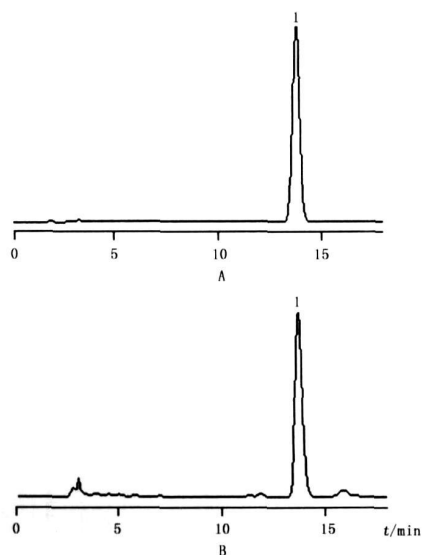


图 1 对照品(A)和猪苓样品 HPLC 色谱图(B)

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and *Polyporus umbellatus*(Pers.) Fries sample(B)

1. 麦角甾醇(ergosterol)

2.4 标准曲线制备和线性范围 精密量取对照品储备液 0.2 0.4 1.0 1.5 2.0 mL , 分别置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。取上述溶液各 $20 \mu\text{L}$, 在“2.2”项色谱条件下, 进样测定, 记录峰面

积, 以峰面积积分值 Y 为纵坐标, 对照品的进样量 X (μg) 为横坐标, 进行回归分析, 得麦角甾醇线性回归方程为:

$$Y = 5.687 \times 10^5 X - 1.126 \times 10^5 \quad r = 0.9997$$

结果表明麦角甾醇进样量在 $1.64 \sim 16.4 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密量取同一对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 在“2.2”项色谱条件下, 重复进样测定 5 次, 根据测定的麦角甾醇峰面积的结果计算 RSD 为 0.5% , 说明精密度良好。

2.6 重复性试验 按“2.1.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 进样 $20 \mu\text{L}$, 测定含量。结果样品中麦角甾醇含量平均值 ($n = 5$) 为 0.13% , RSD 为 0.9% , 说明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液 $20 \mu\text{L}$, 分别于 0 2 4 8 12 24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 根据测定的麦角甾醇峰面积的结果计算 RSD 为 1.5% 。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的 2 号样品 0.50 g 共 5 份, 每份分别加入麦角甾醇对照品 0.6 mg 按“2.1.2”项下方法制溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 进样 $20 \mu\text{L}$, 测定, 计算麦角甾醇回收率 ($n = 5$) 为 98.9% , RSD 为 1.2% 。

2.9 样品的测定 取供试品溶液 $20 \mu\text{L}$, 在“2.2”项色谱条件下, 进行色谱测定, 记录麦角甾醇的峰面积, 本品按干燥品以外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 各批次猪苓样品中麦角甾醇含量的测定结果(%, $n = 2$)

Tab 1 Results of contents determination of ergosterol in different source *Polyporus* samples

样品编号 (sample No.)	来源 (sources)	含量 (content) %
1	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	0.05
2	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	0.13
3	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	0.07
4	陕西柞水 (Zhashui Shaanxi)	0.07
5	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	0.07
6	河南南阳 (Nanyang Henan)	0.04
7	吉林通化 (Tonghua Jilin)	0.08
8	陕西西安 (Xi'an Shaanxi)	0.05
9	甘肃天水 (Tianshui Gansu)	0.07
10	陕西宝鸡 (Baoji Shaanxi)	0.09
11	陕西宝鸡 (Baoji Shaanxi)	0.05
12	陕西宁强 (Ningqiang Shaanxi)	0.27
13	四川绵阳 (Mianyang Sichuan)	0.16
14	甘肃陇南 (Gansu Longnan)	0.08
15	甘肃天水 (Tianshui Gansu)	0.12
16	陕西周至 (Zhouzhi Shaanxi)	0.06
17	陕西宝鸡 (Baoji Shaanxi)	0.08
18	山西太原 (Taiyuan Shanxi)	0.03
19	云南昆明 (Kunming Yunnan)	0.09
20	河北安国 (Anguo Hebei)	0.08
21	安徽亳州 (Bozhou Anhui)	0.04

3 讨论

3.1 检测波长的考察 本实验采用紫外可见分光光度计对麦角甾醇的甲醇溶液在波长范围 190~600 nm 处进行扫描, 结果 $\lambda_{\max}$ 为 281.5 nm, 根据 Woodward-Fieser 规则计算 $\lambda_{\max} = 283$ nm。鉴于上述的微小差别, 本实验配制一定浓度的对照品溶液, 分别在 281, 282, 283, 284, 285 nm 处测定峰面积, 发现 283 nm 处峰的面积最大, 281, 282, 284, 285 nm 的峰面积分别为 283 nm 峰面积的 74%, 94%, 96%, 84%, 故确定 283 nm 作为本实验的检测波长。

3.2 流动相的选择 本实验考察了甲醇与水不同比例 (100:0, 98:2, 95:5, 90:10) 条件下的对照品麦角甾醇峰形及样品中麦角甾醇与其他成分的分离情况。在甲醇与水不同配比条件下发现随着水比例的增加麦角甾醇峰形变宽、变低、保留时间变长, 在 100% 甲醇的比例条件下, 麦角甾醇峰形窄、对称, 能够与样品中其他成分分开, 而且实验操作简单、方便。故确定 100% 甲醇作为本实验的流动相。

3.3 样品提取方法的研究 本实验考察了甲醇冷浸 (12, 24 h) 和超声辅助提取 (10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 min) 的提取率。结果冷浸 12 h 和 24 h 没有超声提取的提取率高, 超声提取 10~120 min 的结果见图 2 与图 3。图 2 是其他超声提取时间麦角甾醇峰面积相对于 60 min 提取时间的麦角甾醇峰面积的比值, 从图 2 可知 10 min 到 60 min 提取量增加, 60 min 到 120 min 提取量仅仅有微小的增加。再增加时间没有大的意义, 另外, 从图 3 可知, 在 60 min 时麦角甾醇峰面积占总峰面积最大。

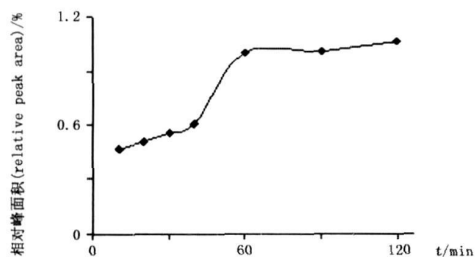


图 2 不同超声辅助提取时间麦角甾醇相对峰面积的变化图

Fig 2 Different ultrasound-assisted extraction time and relative peak areas of ergosterol

3.4 结果分析 本文测定了 21 批猪苓药材中麦角甾醇的含量。由表 1 的测定结果可知, 不同猪苓药材, 麦角甾醇的含量差异较大, 在 21 个样品中麦角甾醇的百分含量范围为 0.03%~0.27%, 平均值为 0.08%, 其中陕西宁强的含量最高, 18 号山西太原的含量最低。2 号陕西汉中、13 号四川绵阳和 15 号

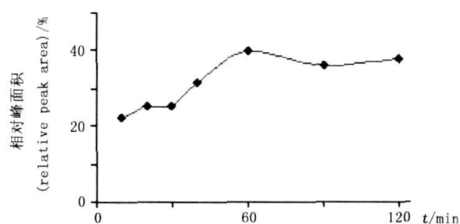


图 3 不同超声辅助提取时间麦角甾醇峰面积占总峰面积的变化图

Fig 3 Proportion of ergosterol peak areas in total peak areas in different time

甘肃天水的含量普遍较高。以上的数据可为增加中国药典中猪苓含量限度提供参考依据。

3.5 小结 采用 HPLC 法测定猪苓中麦角甾醇含量, 经过精密性、重复性、稳定性、回收率试验考察, 均符合要求, 该方法灵敏、快速、准确, 适用猪苓中麦角甾醇的含量测定, 建议作为中国药典中新增猪苓药材含量测定项。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 222
- 2 ZHOU Wen-pu (周文璞). Pharmacognosy research of traditional Chinese medicine *Polyponus umbellatus* (Pers.) Fries (中药猪苓的生药学研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990 15(8): 458
- 3 Miyazaki T, Okawa N. Studies on fungal polysaccharide XII Water-soluble polysaccharide of *Grifora umbellata* (Fr.). *Chem Pharm Bull*, 1973 21(11): 2545
- 4 Lu W, Adachi I, Kano K, et al. Platelet aggregation potentiators from *Cho-Rei* *Chem Pharm Bull*, 1985 33(11): 5083
- 5 Oh sawa T, Yukawa M, Takao C, et al. Studies on constituents of fruit Body of *Polyponus umbellatus* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(1): 143
- 6 Yuan D, Mori J, Komatsu K J et al. An anti-aldosterone diuretic component (dramin) in *Polyponus sclerotium*. *Biol Pharm Bull*, 2004 27(6): 867
- 7 Sun Y, Yasukawa K. New anti-inflammatory ergostane-type ecdysteroids from the sclerotium of *Polyponus umbellatus*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 3417
- 8 Inaoka Y, Shakuya A, Fukazawa H, et al. Studies on active substances in herbs used for hair treatment I Effects of herb extracts on hair growth and isolation of an active substance from *Polyponus umbellatus* F. *Chem Pharm Bull*, 1994 42(3): 530
- 9 Krzyzszakowski W, Malinowska E, Suchocki P, et al. Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chem*, 2009, 113: 351
- 10 Price M J, Worth G K. The occurrence of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one in several Fungi. *Aust J Chem*, 1974 27: 2505

(本文于 2008 年 6 月 4 日收到)