

## ★标准研讨★

## HPLC法测定猪苓中麦角甾酮的含量\*

赵英永<sup>1</sup>, 程显隆<sup>2</sup>, 张萍<sup>2</sup>, 张文斌<sup>3</sup>, 周家明<sup>3</sup>, 崔秀明<sup>3</sup>, 孙文基<sup>1</sup>, 林瑞超<sup>1, 2\*</sup>

(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

3 文山三七研究院, 文山 663000)

**摘要** 目的: 建立猪苓药材中麦角甾酮的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用甲醇超声提取方法; 色谱条件: Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为甲醇-水 (96:4), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 350 nm, 柱温 30 ℃。结果: 麦角甾酮在 2.5~35 μg·mL<sup>-1</sup> (r=0.9997) 范围内与峰面积呈良好的线性关系; 麦角甾酮的平均回收率 (n=5) 为 100.5%, RSD 为 2.5%。

**结论:** 建立的方法灵敏、快速、准确, 适合作为猪苓药材中麦角甾酮的含量测定, 可为猪苓药材质量评价提供可靠的方法。

**关键词:** 猪苓; 麦角甾酮; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1579-03

## HPLC determination of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one in *Polyporus umbellatus*\*

ZHAO Ying-yong<sup>1</sup>, CHENG Xian-long<sup>2</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, ZHANG Wen-bin<sup>3</sup>,  
ZHOU Jia-ming<sup>3</sup>, CUI Xiu-ming<sup>3</sup>, SUN Wen-ji<sup>1</sup>, LIN Rui-chao<sup>1, 2\*</sup>

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

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

3 Wenshan Notoginseng Research Institute Wenshan 663000, China)

**Abstract Objective** To establish an HPLC method for determination of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one in *Polyporus umbellatus*. **Methods** *P. umbellatus* was extracted with methanol by ultrasound-assisted extraction and the chromatographic procedure was performed with an Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phase was methanol-water (96:4) at a flow of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the UV detection was set at 350 nm. The temperature of column was 30 ℃. **Results** The linear range of ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one was 2.5-35 μg·mL<sup>-1</sup> (r=0.9997), and the average recovery (n=5) was 100.5% and RSD was 2.5%. **Conclusion** The developed method is simple, accurate and reproducible, which can offer references for the quality control of *P. umbellatus*.

**Key words** *Polyporus umbellatus*; ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one; HPLC; determination

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries] 是多孔菌科真菌, 是常用中药, 在亚洲、欧洲及北美洲均有分布, 在中国具有 2500 多年的药用历史<sup>[1]</sup>, 始载于《神农本草经》, 为中国药典所记载<sup>[2]</sup>, 具有利尿、抗癌和抗菌的作用<sup>[3]</sup>。利水渗湿是猪苓的主要功能。许多利水复方制剂含有猪苓, 例如猪苓汤、猪苓丸、猪苓散、五苓散、分消汤、茵陈五苓散等<sup>[3]</sup>, 这些复方在临床应用中显示了很好的疗效。

猪苓的化学成分主要为多糖类和甾体类化合物<sup>[4-8]</sup>。长期以来国内外学者对猪苓的研究主要集中在多糖的化学成分、药理、药效及应用研究<sup>[4, 9, 10]</sup>。而传统医学和现代医学对于猪苓的应用主要集中在利尿和治疗肾疾病方面, 而起利尿作用的化学成分一直不明确。

作者在对猪苓化学成分进行了系统分离和结构鉴定的基础上, 发现麦角甾醇是猪苓的主要化学成

\* 国家药典委员会《中国药典》项目 (YZ-199-200)

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

分,因此,把麦角甾醇作为猪苓中的指标性成分,测定了其在猪苓中的含量<sup>[11]</sup>。所建立的方法将用于2010年版中国药典中“猪苓”的质量控制和评价。由于中药的疗效是多种化学成分协同作用的结果<sup>[12-13]</sup>,因此,对猪苓中的其他化学成分进行质量控制,也是有意义的。作者对分离得到的甾体成分进行了药效研究,研究结果显示麦角甾酮[ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one]是一个主要利尿成分,与文献报道的结果<sup>[14]</sup>一致。因此,建立一个简单、快速的方法测定猪苓药材中的麦角甾酮含量是必要的。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪,包括 G1312A 泵, G1321A 紫外检测器, Agilent Chem station 工作站; YCQ2300 超声波清洗器(上海凯波超声设备有限公司); Millipore SAS 67120 MOLSHEM (France)超纯水系统; 色谱级甲醇(Fisher公司,美国); 麦角甾酮对照品是从猪苓分离而得,经<sup>1</sup>H NMR(500 MHz CDCl<sub>3</sub>), <sup>13</sup>C NMR, DEPT 谱(125 MHz CDCl<sub>3</sub>)及质谱数据分析,并与文献[15]比较确定其结构(HPLC 归一化纯度为99%以上); 不同来源猪苓样品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** 精密称取麦角甾酮对照品适量,用甲醇配制成 1 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,4℃冷藏,备用。

**2.1.2 供试品溶液<sup>[11]</sup>** 取样品粉末约 1 g(过4号筛),精密称定,置于具塞三角瓶中,加甲醇 20 mL,称定重量,超声处理(400 W, 40 kHz) 1 h,放置至室温,称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,静置,取上清液,滤过,即得。

**2.2 色谱条件** 色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(96:4),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,紫外检测波长 350 nm,柱温 30℃;进样量 20 μL。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 系统适用性试验** 分别取对照品溶液、供试品溶液各 20 μL,按“2.2”项下色谱条件测定,记录色谱图(图1)。从图1中可见,在本实验条件下,麦角甾酮与其他成分能达到基线分离,理论塔板数以麦角甾酮峰计算为 6200。

**2.3.2 线性关系考察** 分别精密量取对照品储备液适量,以甲醇配制浓度为 2.5 5 7.5 10 12.5 15 35

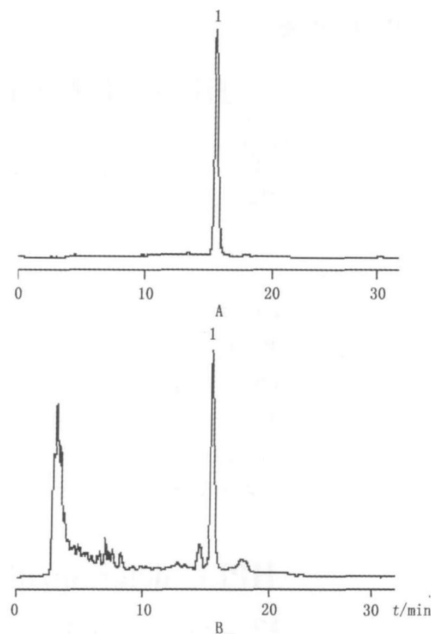


图1 对照品(A)和猪苓样品(5号)(B)HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one(A) and *Polyporus umbellatus* sample (No 5)(B)

1. 麦角甾酮 [ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one]

μg·mL<sup>-1</sup>的系列对照品溶液。精密吸取以上对照品溶液各 20 μL,进行 HPLC 分析,以对照品的进样浓度  $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$  为横坐标,峰面积积分值  $Y$  为纵坐标,进行回归分析,得麦角甾酮线性回归方程为:

$$Y = 55.19X - 1.036 \quad r = 0.9997$$

结果表明:麦角甾酮进样浓度在 2.5~35 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积具有良好的线性关系,该标准曲线可用于样品中麦角甾酮的含量计算。

**2.3.3 日内和日间精密度试验** 取对照品溶液分别进行日内精密度( $n=6$ )和日间精密度( $n=3$ )测定,日间精密度连续测定 3 d 以计算峰面积的 RSD 来评价日内和日间精密度。结果日内和日间 RSD 分别为 2.0% 和 2.4%,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取药材粉末 5 份(1号),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,依“2.2”项下色谱条件测定含量,结果含量平均值为 7.55 μg·g<sup>-1</sup>,RSD 为 2.1%,说明该方法重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液 20 μL,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在上述色谱条件下进样分析。结果麦角甾酮峰面积的 RSD 为 2.2%,表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已知含量的 9

号样品 5份, 每份 0.50 g 每份分别加入 0.4013  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  麦角甾酮对照品溶液 20 mL, 按“2.1.2”项下方法制备溶液, 依“2.2”项下色谱条件测定, 计算麦角甾酮回收率 ( $n=5$ ) 为 100.5%, RSD 为 2.5%。

**2.4 样品的测定** 取不同来源的猪苓样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进行 HPLC 分析测定 ( $n=3$ ), 根据峰面积值从麦角甾酮标准曲线方程计算猪苓药材中麦角甾酮的含量, 结果见表 1。

表 1 不同来源猪苓样品中麦角甾酮含量的测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n=3$ )

Tab 1 Determination of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one in *Polyporus umbellatus* from different sources

样品编号 (sample)	来源 (source)	平均值 (mean) $\pm$ SD
1	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	7.54 $\pm$ 0.04
2	陕西汉中 (Hanzhong Shaanxi)	2.71 $\pm$ 0.04
3	陕西宁强 (Ningqiang Shaanxi)	3.25 $\pm$ 0.03
4	四川绵阳 (Mianyang Sichuan)	9.49 $\pm$ 0.06
5	甘肃天水 (Tianshui Gansu)	10.23 $\pm$ 0.05
6	甘肃天水 (Tianshui Gansu)	8.97 $\pm$ 0.04
7	陕西西安 (Xi'an Shaanxi)	48.23 $\pm$ 0.02
8	河南南阳 (Nanyang Henan)	13.58 $\pm$ 0.05
9	四川绵阳 (Mianyang Sichuan)	15.02 $\pm$ 0.07
10	陕西西安 (Xi'an Shaanxi)	4.98 $\pm$ 0.05

### 3 讨论

实验选用 Inertsil ODS-3 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Diamosil C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 3 个色谱柱进行考察, 结果 Kromasil C<sub>18</sub> 与 Diamosil C<sub>18</sub> 色谱柱的分离效果均不如 Inertsil ODS-3 柱。考察了流动相 (甲醇-水、甲醇-丙酮、甲醇-四氢呋喃、乙腈-水及乙腈-四氢呋喃等)、柱温 (20 30 35 40  $^{\circ}\text{C}$ ) 以及流动相的流速 (0.8 1.0 1.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) 对分离效果的影响。在乙腈系统中, 麦角甾酮保留时间较长, 峰形不对称, 拖尾, 不能与样品中其他的成分达到基线分离。最后, 通过综合地比较不同参数的色谱图的分离度、基线、保留时间, 得到最佳的色谱条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇-水 (94:4); 流速为 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长为 350 nm; 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 结果显示, 10 批药材的含量范围约在 2~50  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明在不同来源的样品中麦角甾酮的含量变化较大, 这可能是遗传变异、植物基源、干燥过程以及储存条件等对麦角甾酮含量变化有影响。该活性成分的变化, 可能会影响生药猪苓的利尿药

效。因此, 本文建立的 HPLC 法具有良好的灵敏度、精密度和准确性, 适合于测定猪苓中麦角甾酮的含量, 可有效评价生药猪苓的质量。

### 参考文献

- XU Jin-tang (徐锦堂). Chinese Medicinal Fungus (中国药用真菌). Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press (北京医科大学·中国协和医科大学联合出版), 1997: 150
- ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 222
- Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Dictionary of Traditional China Drug (中草药大辞典). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publishers (上海科学技术出版社), 1985: 2191
- Miyazaki T, Okawa N. Studies on fungal polysaccharide XII. Water-soluble polysaccharide of *Grifora umbellata* (Fr.). *Chem Pharm Bull*, 1973; 21 (11): 2545
- Ohsawa T, Yukawa M, Takao C, et al. Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull*, 1992; 40 (1): 143
- Zheng SZ, Yang HP, Ma XM, et al. Two new polyposterones from *Polyporus umbellatus*. *Nat Prod Res*, 2004; 18: 403
- Zhou WW, Lin WH, Guo SX. Two new polyposterones isolated from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Chem Pharm Bull*, 2007; 55: 1148
- Sun Y, Yasukawa K. New anti-inflammatory ergosterol-type ecdysteroids from the sclerotium of *Polyporus umbellatus*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008; 18: 3417
- Wei Q, Wu GL, Nie JC, et al. Effects of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on liver carbohydrate metabolism and adrenocortical function of mice bearing hepatoma H22. *Acta Pharmacol Sin*, 1983; 4: 52
- Lin YF, Wu GL. Protective effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharide on toxic hepatitis in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 1988; 4: 345
- ZHAO Ying-yong (赵英永), ZHAO Ye (赵晔), LIN Rui-chao (林瑞超), et al. RP-HPLC determination of ergosterol in *Polyporus umbellatus* (RP-HPLC 法测定猪苓中麦角甾醇的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29 (6): 898
- Nomik D. Asian medicine: The new face of traditional Chinese medicine. *Science*, 2003; 299: 188
- Jiang WY. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol Sci*, 2005; 26: 558
- Yuan D, Mori JK, Matsuki K, et al. An anti-alkalosteric diuretic component (dian dampness) in *Polyporus sclerotium*. *Biol Pharm Bull*, 2004; 27: 867
- Lee WY, Park Y, Ahn JK, et al. Cytotoxic activity of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull Korean Chem Soc*, 2005; 26: 1464

(本文于 2009 年 6 月 1 日修改回)