

猪苓质量标准的研究

鲁文静, 梁宗锁

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以收集自全国部分省市的 20 批猪苓药材为试材, 参照 2010 版《中国药典》, 通过常规检查、薄层色谱鉴别及有效成分含量的测定, 分析优化了猪苓饮片的质量标准, 以为猪苓药材的质量标准制订提供依据。结果表明: 20 批猪苓药材的有效成分含量及水分、灰分、浸出物含量均存在一定差异; 为了更全面地衡量药材质量, 建议规定酸不溶性灰分的含量不得超过 3.5%, 水溶性浸出物含量不低于 11.0%, 猪苓多糖含量不低于 0.50%。

关键词:猪苓饮片; 质量标准; 含量测定

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0189-04

猪苓为多孔菌科植物猪苓(*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries.) 的干燥菌核, 始载于《神农本草经》, 是世界上著名的药用真菌之一, 也是一种常用的中药材, 又名野猪苓、猪屎苓、猪灵芝、猪茯苓等。菌核入药在我国已有 2 000 多年的历史, 具有利尿渗湿之功效, 主治小便不利、水肿、淋浊等症^[1]。猪苓属好气性真菌, 喜阴凉湿润、疏松透气、排水良好、富含腐殖质的微酸性山地黑沙壤土或沙质黄棕壤土, 在我国猪苓主要分布在河北、陕西、四川、云南^[2]等地。

近年来, 猪苓的药用价值越来越受到人们的重视, 其有效成分猪苓多糖具有保护肝脏细胞、抗肿瘤、增强机体免疫力、抗辐射、抗诱变、抗化疗毒性、抗衰老等药理作用^[3-5]; 猪苓中的甾体类化学成分具有显著利尿作用, 同时还具有抗菌消炎的药理活性^[6-8]。为了更好的开发和利用该资源, 该试验从猪苓饮片的有效成分含量及水分、灰分、浸出物等有关检查项目入手, 以期制定合理的猪苓药材质量评价标准, 为猪苓药材更广泛、安全的使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试猪苓药材 20 批, 经鉴定均为药典规定猪苓药材, 分别来自陕西宝鸡、勉县、留坝、略阳, 黑龙江哈尔滨, 内蒙古呼和浩特、包头, 新疆阿拉尔, 河南灵宝, 云南大

理、昭通、文山, 宁夏银川, 甘肃天水, 河北衡水, 山西大同、临汾, 山东临沂, 广东深圳、广州。

试验试剂: 葡萄糖、麦角甾醇对照品由中国食品药品检定研究院提供(编号: 110833-201105, 111845-201108, 纯度 $\geq 98\%$); 测定用甲醇为色谱纯(美国 Tedia), 水为自制超纯水, 其它试剂均为分析纯(四川西陇化工有限公司)。试验仪器: Waters 高效液相色谱仪(1252 Binary Pump, 2707 自动进样器, 2487 紫外检测器, 柱温箱, Breeze 2 色谱工作站); 三用紫外线分析仪(ZF-6, 上海嘉鹏科技有限公司); 紫外-可见分光光度计(UV-1700, SHIMADZU); 高速冷冻离心机(KDC-140HR, 安徽中科中佳科学仪器有限公司); 电子天平(AUW120, SHIMADZU); 超声波清洗器(KQ-250B, 昆山市超声仪器有限公司); 马弗炉(SX2 型, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司); 烘箱(XMTD-8222, 上海精宏实验设备有限公司); 多功能粉碎机(LX-04, 上海江信科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 粉末显微鉴别 含 2 种颜色的菌丝, 棕色菌丝不易分离; 无色菌丝直径 2~10 μm , 弯曲, 有的可见横隔, 有分枝或呈结节状膨大。菌丝间有众多草酸钙方晶, 大多呈正方八面体形、规则的双锥八面体形或不规则多面体, 直径 3~60 μm , 长至 68 μm , 有时数个结晶集合。

1.2.2 理化鉴别 稀盐酸鉴别: 猪苓粉末 1 g, 加稀盐酸 15 mL, 煮沸 15 min, 放置 24 h, 呈胶冻状。浓盐酸鉴别: 猪苓粉末 1 g, 加浓盐酸 15 mL, 煮沸 15 min, 放置 24 h, 不呈胶冻状。稀碘酸鉴别: 猪苓粉末少许, 加稀碘酸适量, 溶液不得出现蓝紫色或紫黑色。NaOH 鉴别: 猪苓粉末少量, 加 2% 氢氧化钠溶液适量, 搅拌, 呈悬浮状。

1.2.3 薄层鉴别 取猪苓样品粉末 1 g, 加甲醇 15 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。取麦角

第一作者简介:鲁文静(1988-), 女, 硕士研究生, 现主要从事药用植物质量标准等研究工作。E-mail: lwjcici@hotmail.com。

责任作者:梁宗锁(1965-), 男, 博士, 教授, 现主要从事中草药规范化栽培的理论与技术研究工作。

基金项目:陕西省“13115”重大科技专项资助项目(2010ZDKG-109)。

收稿日期:2013-04-08

甾醇对照品,加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液、对照品溶液,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚:丙酮(3:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以 2%香草醛硫酸溶液,105℃加热至斑点显色清晰。

1.3 项目测定

1.3.1 水分 参照水分测定法(中国药典 2010 年版一部附录 IX H 第一法)测定。

1.3.2 总灰分和酸不溶性灰分 参照灰分测定法(中国药典 2010 年版一部附录 IX K)测定饮片的总灰分和酸不溶性灰分含量。

1.3.3 浸出物 参照浸出物测定法项下水溶性浸出物测定法的热浸法(中国药典 2010 年版一部附录 X A)测定浸出含量。

1.3.4 麦角甾醇含量的测定 色谱条件:Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为纯甲醇;检测波长 283 nm;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL。理论板数按麦角甾醇色谱峰计算应不低于 3 000。对照品溶液的制备:取麦角甾醇对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含麦角甾醇 0.08 mg 的溶液,即得对照品溶液。供试品溶液的制备:取样品粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 220 W,频率 50 kHz)1 h,放冷,再称重量,加甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液即得。线性关系考察:将对照品溶液分别进样 2、4、6、8、10、15 μL,按上述色谱条件测定^[1],以浓度(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,并计算得回归方程为 $Y=2 \times 10^6 X - 18\,208$, $R^2=0.999$,结果表明,麦角甾醇进样量在 0.08~1.20 mg/mL 时与峰面积呈良好的线性关系。精密度试验:取麦角甾醇对照品溶液,在该色谱条件下连续进样 6 次,测得麦角甾醇色谱峰面积的 RSD 为 0.11%,表明系统精密度良好。重现性试验:取同一猪苓样品(20111227)粉末 6 份,精密称定,按供试品溶液制备方法制备样品,依色谱条件进样测定,计算麦角甾醇的质量分数,其 RSD 为 0.51%,表明重现性良好。稳定性试验:取猪苓样品(20120221)粉末 1 份,精密称定,按供试品溶液制备方法制备样品,依该色谱条件,分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样,测得麦角甾醇色谱峰面积的 RSD 为 1.37%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。加样回收率试验:取已知质量分数的猪苓样品(20110830)粉末 5 份,约 0.5 g,精密称定,分别按已知质量分数的 50%加入麦角甾醇对照品,按供试品溶液制备方法制备样品,依色谱条件进样测定麦角甾醇质量分数,计算平均回收率为 100.0% (RSD 为 1.18%)。样品含量的测定:取猪苓饮片样品,平行 3 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,依色谱条件进样,进行含量测定^[1]。

1.3.5 猪苓多糖的含量测定 水溶性多糖的提取:称取粉碎的猪苓 5.0 g,放入 250 mL 圆底烧瓶中,加纯化水 100 mL,沸水回流提取 1.5 h,共提取 4 次,合并提取液,减压浓缩至 50 mL,加 150 mL 乙醇沉淀,静置过夜,抽滤,残留物分别用 10 mL 无水乙醇洗 3 次,再用 10 mL 丙酮洗 3 次,10 mL 丙酮洗 1 次,干燥得棕色猪苓多糖。标准曲线的制备:精密称取 105℃干燥至恒重的葡萄糖对照品 25.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,加水溶解至刻度,精密吸取对照品溶液,分别稀释至 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.08、0.10 mg/mL 的对照品系列溶液,以纯化水作空白对照,各精密吸取 2.0 mL 置 25 mL 具塞比色管中,加入 5%苯酚 2.0 mL 混匀,再加入浓硫酸溶液 10.0 mL,立即摇匀,放冷至室温,沸水浴 15 min 后冷却。在 490 nm 波长处采用紫外分光光度法测吸光度(A)值。以吸光度为 Y 为纵坐标,对照品溶液浓度 X 为横坐标,得到葡萄糖标准曲线方程为 $Y=0.123X-0.002$, $R^2=0.997$,结果表明,葡萄糖含量在 0.01~0.10 mg/mL 范围内与吸光度呈良好的线性关系。供试品溶液的制备:精密称取提取物 50.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,加纯化水溶解至刻度,精密吸取 5.0 mL 于另外 1 个 100 mL 容量瓶中,加纯化水定容,作为待测水溶性猪苓多糖含量用。精密度试验:精密吸取葡萄糖对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 具塞比色管中,依 1.2.6 项下方法显色,重复测定 6 次,以 A 值计算,RSD 值为 0.79%,表明仪器精密度良好。重现性试验:取同一猪苓样品(20111221)粉末 6 份,精密称定,按 1.2.6 项下方法制备样品,依苯酚-硫酸法进行测定,计算猪苓多糖的质量分数,其 RSD 为 1.44%,表明重现性良好。稳定性试验:供试品完成显色后,于 0、10、20、40、60、80、100、120 min 连续测定,以 A 值计算,RSD 值为 0.94%,表明 2 h 内仪器及样品的稳定性良好。加样回收率试验:取已知质量分数的猪苓样品(20111221)粉末 5 份,约 2.5 g,精密称定,分别按已知质量分数的 50%加入葡萄糖对照品,按 1.2.6 项下制备样品,依苯酚-硫酸法测定猪苓多糖含量,计算平均回收率为 101.4% (RSD 为 3.1%)。多糖含量的测定:精密吸取 2.0 mL 待测猪苓多糖样品溶液置于 25 mL 具塞比色管中,依苯酚-硫酸法测定猪苓多糖含量。

2 结果与分析

2.1 样品的鉴别

粉末显微鉴别及理化鉴别的结果初步表明,该试验所收集的样品都符合 2010 版《中国药典》标准,草酸钙方晶是猪苓显微鉴别的特征成分,常见猪苓伪品常采用人为掺重、食用菌菌脚切片仿制等。故采用显微及理化鉴别方法可以有效地对猪苓真伪进行初步鉴别。

2.2 指标项目的测定结果

由表 1 可知,16 批样品含水量符合《中国药典》的标

准(水分含量不得超过 13.0%),陕西留坝、云南昭通、山西大同、广东深圳的样品含水量略高,这可能与药材储藏时间及储藏条件有关。《中国药典》规定猪苓总灰分不得过 10.0%,由表 1 可以看出,陕西略阳、黑龙江哈尔滨、山西大同的样品总灰分含量略高,其余 17 批样品都符合标准。陕西宝鸡、云南文山、山西大同的样品酸不溶性灰分含量较高,由于《中国药典》中未对该指标进行规定,该试验将对酸不溶性灰分含量限度进行讨论。《中国药典》中未对猪苓的水溶性浸出物含量进行规定,结果表明,不同地区猪苓的水溶性浸出物含量差异较大,因此有必要制定含量限度,有效控制猪苓药材品质。

表 1 猪苓的水分和灰分及浸出物含量测定(n=3)

Table 1 Determination of content of water, ash and water-soluble extract in *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries. (n=3)

编号	采样地	含水量 /%	总灰分含量 /%	酸不溶性灰 分含量/%	水溶性浸出 物含量/%
20110913	陕西宝鸡	12.42	9.24	4.89	19.29
20111220	陕西勉县	11.62	9.35	2.71	29.60
20110830	陕西留坝	13.44	9.22	4.48	5.23
20111221	陕西略阳	12.11	11.91	3.60	2.00
20111115	黑龙江哈尔滨	9.61	10.30	4.34	4.11
20120220	内蒙古呼和浩特	12.20	9.38	4.65	13.83
20120301	内蒙古包头	10.66	9.53	3.87	4.29
20120304	新疆阿拉尔	9.23	8.63	2.11	29.87
20120315	河南灵宝	10.39	4.64	2.03	34.76
20120112	云南大理	12.89	4.03	2.15	5.44
20120111	云南昭通	15.07	1.50	2.17	1.99
20111123	云南文山	12.11	5.70	4.96	2.41
20120313	宁夏银川	7.18	3.31	1.89	33.73
20120221	甘肃天水	10.08	4.40	0.37	33.69
20120224	河北衡水	11.43	8.51	2.20	3.94
20120314	山西大同	16.14	10.28	5.15	24.19
20120310	山西临汾	10.82	4.80	0.74	4.14
20120228	山东临沂	12.10	9.35	3.24	16.45
20111215	广东深圳	13.09	7.28	1.33	4.92
20111227	广东广州	11.56	8.45	3.71	4.05

由表 2 可知,20 批猪苓样品的有效成分含量之间存在一定的差异,根据《中国药典》的规定,麦角甾醇含量不得少于 0.050%,陕西宝鸡、山西大同及广东广州的样品含量偏低,不符合药典标准,而陕西留坝、黑龙江哈尔滨、河北衡水等地的猪苓样品麦角甾醇含量较高,约在 0.1%左右,品质较好。猪苓多糖作为猪苓的有效成分之一,《中国药典》却未规定其含量限度,多糖含量测定的结果表明,不同地区的猪苓样品多糖含量具有一定的差异,因此该试验也对猪苓多糖的含量限度进行了讨论。

2.3 薄层色谱条件优化

考虑到猪苓中所含有效成分的化学性质,比较了不同的展开系统,如石油醚:丙酮(3:1)、石油醚:乙酸乙酯(3:1)、氯仿:甲醇(10:1)等,从分离度、展开时间等综合考虑,以石油醚:丙酮(3:1)作为展开剂斑点相对位置和重现性较好。由图 1 可知,在紫外 254 nm 下可观察到麦角甾醇斑点,365 nm 下可观察到猪苓中的酮类成

表 2 猪苓中麦角甾醇和猪苓多糖含量测定(n=3)

Table 2 Determination of content of ergosterol and polysaccharide in *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries. (n=3)

编号	采样地	麦角甾醇含量/%	猪苓多糖含量/%
20110913	陕西宝鸡	0.03334	0.1853
20111220	陕西勉县	0.06061	1.3831
20110830	陕西留坝	0.11940	0.5625
20111221	陕西略阳	0.05690	0.6170
20111115	黑龙江哈尔滨	0.10410	0.3238
20120220	内蒙古呼和浩特	0.06254	0.7258
20120301	内蒙古包头	0.06677	0.3930
20120304	新疆阿拉尔	0.06678	2.0711
20120315	河南灵宝	0.09290	1.3264
20120112	云南大理	0.06599	0.4976
20120111	云南昭通	0.09189	0.0792
20111123	云南文山	0.08273	0.5756
20120313	宁夏银川	0.07051	0.8749
20120221	甘肃天水	0.09245	0.9585
20120224	河北衡水	0.09395	0.2396
20120314	山西大同	0.01194	0.7350
20120310	山西临汾	0.05472	0.5563
20120228	山东临沂	0.05704	0.7334
20111215	广东深圳	0.05605	0.6277
20111227	广东广州	0.04167	0.5210

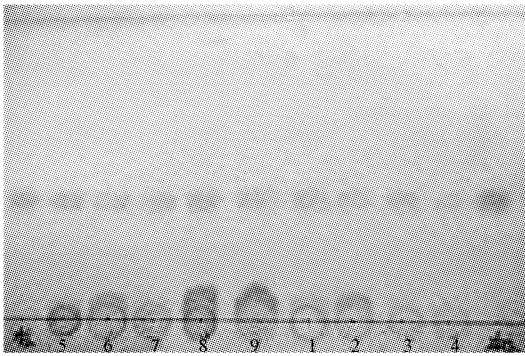


图 1 猪苓 TLC 图(标样:麦角甾醇;1~9:猪苓样品)

Fig. 1 TLC chromatograms(Reference substance:Ergosterol; 1~9:Polyporus umbellatus (Pers.) Fries.)

分斑点,但显色后只有麦角甾醇斑点明显,因此在薄层色谱鉴定中也可采用荧光检视以保证药材质量。

2.4 猪苓多糖提取方法考察

目前猪苓多糖的提取方法多采用热水超声提取、热水回流提取和索氏提取法^[9-13],该试验前期对其提取方法进行了考察,方法及结果见表 3。由表 3 可知,10 倍水回流提取 1.5 h,提取 4 次的效果最佳,少量多次提取可使提取效率最大,故在该试验测定猪苓多糖含量的方法中,可采用上述方法进行测定。

表 3 猪苓多糖提取方法考察

Table 3 Investigate of the extracting methods of Polyporus polysaccharide

提取方法	称样量/g	吸光度 Abs
10 倍水回流提取 1.5 h×4 次	5.0004	0.118
8 倍水索氏提取 8 h	5.0010	0.109
20 倍水浸提 1 h,再 30 min	5.0012	0.036
10 倍水 2 h,8 倍水 2 h,6 倍水 1.5 h 回流提取	5.0008	0.076
14 倍水超声 20 min×3 次	5.0007	0.064

3 讨论与结论

猪苓多糖的含量测定多采用热水提取,苯酚-硫酸法^[14]、硫酸-蒽酮法显色或高效液相法^[15]检测,有文献中直接将热水回流后的猪苓提取液进行显色处理,这样得出的结果包含了猪苓中所含有的单糖和多糖成分,使所测值比实际值偏大。实际测定过程中,应将提取液浓缩后进行醇沉处理,使大分子多糖沉淀下来,再进行测定,以保证结果的准确性。

依据不同产地猪苓饮片的测定结果,参考2010版《中国药典》标准,发现该试验所收集的20批药材的含水量及总灰分含量基本符合标准规定;另外,17批猪苓样品的麦角甾醇含量符合药典标准,说明市售猪苓基本上能够符合药典对麦角甾醇的限度要求。总灰分及酸不溶性灰分说明了猪苓中无机质的含量,水溶性浸出物说明药材中水溶性成分如糖类、蛋白质等营养成分含量。猪苓多糖则是猪苓中重要的有效成分之一,目前临床应用十分广泛,因此,为了更全面地衡量药材质量,建议在猪苓的质量标准中增加酸不溶性灰分、水溶性浸出物、猪苓多糖含量3项指标。按平均值的±20%浮动的指导意见,并考虑样本数问题,建议规定酸不溶性灰分的含量不得超过3.5%,水溶性浸出物含量不低于11.0%,猪苓多糖含量不低于0.50%。通过增加衡量药材质量的指标,有助于猪苓药材标准的改进和提升,对药材质量会有更好的实际监控和保障作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 中国医药科技出版社, 2010: 299.
- [2] 刘汉卿, 郭勇全, 肖萍, 等. 猪苓的研究与应用[J]. 广州化工, 2010, 38

(10): 40-42.

- [3] Zhang M, Cui S W, Cheung P C K, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity[J]. Trends in Food Science and Technology, 2006, 18: 4-19.
- [4] Ohsawa T, Yukawa M, Takao C, et al. Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity[J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40(1): 143-147.
- [5] 刘洪超, 杨小龙, 王淑英. 猪苓药理作用研究进展[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2011, 29(2): 159-160.
- [6] Yi Sun, Ken Yasukawa. New anti-inflammatory ergostane-type ecdysteroids from the sclerotium of *Polyporus umbellatus* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008, 18: 3417-3420.
- [7] Zhao Y Y, Xie R M. Bioactivity-directed isolation, identification of diuretic compounds from *Polyporus umbellatus* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 126: 184-187.
- [8] Yuan D, Mori I, Komatsu K, et al. An anti-aldosterone diuretic component in *Polyporus Sclerotium* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(6): 867-870.
- [9] 苏德龙, 史红波, 裴福成, 等. 正交试验法研究猪苓多糖提取工艺[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(1): 27-28.
- [10] 曲小姝, 李蕊, 王亚红, 等. 索式提取法提取猪苓总多糖工艺研究[J]. 吉林化工学院学报, 2009, 26(3): 15-18.
- [11] 雷萍, 孙悦迎, 张鑫, 等. 猪苓发酵菌丝多糖分离提取工艺研究[J]. 中国食用菌, 2006, 25(5): 45-47.
- [12] 何思煌. 超声法提取猪苓总多糖的工艺研究[J]. 中国医药导报, 2008, 5(11): 51-52.
- [13] 陈文强, 邓百万, 刘开辉, 等. 猪苓多糖超声提取工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 53-57.
- [14] 雷萍, 孙悦迎, 张文隽, 等. 两种不同标准品测定猪苓粗多糖含量[J]. 食用菌, 2006(5): 64-66.
- [15] 张国伟, 李彩霞, 王艳峰, 等. 高效液相法与硫酸-蒽酮法测定猪苓多糖含量比较[J]. 天然产物研究与开发, 2011(23): 1099-1102.

Study on the Quality Standard of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries.

LU Wen-jing, LIANG Zong-suo

(College of Life Sciences, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking 20 batches of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries, collected from some provinces and cities nationwide as materials, using the 2010 version of 'Chinese Pharmacopoeia' as a reference, the routine check, TLC and active ingredient contents were determined, and the quality standard of *P. umbellatus* (Pers.) Fries. was optimized in order to provide a reference for it. The results showed that the contents of active ingredient contents, moisture, ash and water-soluble extract were different between these 20 batches of samples; for a more comprehensive measurement of the *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries. quality, it was proposed that the content of acid-insoluble ash shall not exceed 3.5%, water-soluble extract not less than 11.0%, *Polyporus* polysaccharide not less than 0.50%.

Key words: *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries.; quality standards; contents determination