

不同来源、不同等级猪苓饮片中总多糖的含量测定

郭宁¹, 乐智勇², 王弯弯¹, 贾玮娟¹, 白宗利², 孙建华², 王弘^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300)

[摘要] **目的:**建立猪苓饮片总多糖的含量测定方法,分析不同来源、不同等级猪苓饮片中的总多糖含量,为制定猪苓饮片含量限度及饮片商品等级划分标准提供参考依据。**方法:**采用高效凝胶色谱法-示差折光-多角度激光检测器联用技术测定猪苓多糖的相对分子质量及其分布情况,选择与总多糖相对分子质量相近的葡聚糖为对照品,采用正交试验和单因素试验优化猪苓总多糖含量测定的前处理条件,采用蒽酮-硫酸显色法,在630 nm处测定13批不同产地猪苓饮片和39批不同等级猪苓饮片中总多糖的含量。**结果:**含量测定方法学考察的线性关系、稳定性、精密度、重复性及加样回收率结果均符合要求。不同产地猪苓饮片中总多糖的质量分数在0.87%~1.39%。不同等级猪苓饮片中总多糖质量分数为一等饮片1.40%,二等饮片1.21%,三等饮片1.03%。**结论:**建立的含量测定方法灵敏度高、重复性好,可用于猪苓饮片的总多糖含量测定。不同来源的猪苓饮片总多糖含量有一定差异。不同等级猪苓饮片总多糖含量呈现一定的规律性,一等饮片中总多糖含量最高,二等饮片总多糖含量次之,三等饮片总多糖含量最低,对于制定猪苓饮片含量限度及饮片商品等级划分标准具有重要参考价值。

[关键词] 猪苓; 总多糖; 葡聚糖; 蒽酮-硫酸显色法; 相对分子质量; 高效凝胶色谱法; 商品等级

[中图分类号] R22;R283;R282;R931;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0156-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182112

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180823.0840.001.html>

[网络出版时间] 2018-08-25 13:40

Determination of Total Polysaccharides in Decoction Pieces of Polyporus with Different Sources and Different Grades

GUO Ning¹, LE Zhi-yong², WANG Wan-wan¹, JIA Wei-juan¹, BAI Zong-li², SUN Jian-hua², WANG Hong^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

2. Kangmei Pharmaceutical Co. Ltd., Puning 515300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining the content of total polysaccharides in decoction pieces of Polyporus, analyze the content of total polysaccharides in samples with different sources and grades. **Method:** The relative molecular weight and the polydispersity index of polysaccharides in decoction pieces of Polyporus were measured by a high performance gel chromatography coupled with a multi-angle laser light scattering and refractive index system. Dextran with similar molecular weight as polysaccharides was selected as the reference substance. Orthogonal experiment and single factor tests were used to optimize the pretreatment conditions for the determination of total polysaccharides in Polyporus. Polysaccharides in Polyporus with different areas and grades were determined by anthrone-sulfuric acid colorimetric method at 630 nm. **Result:** The linearity, stability, precision, repeatability and recovery rate of the established method all reached the standards, respectively. The content of total polysaccharides in samples from different areas ranged from 0.87% to 1.39%. The content of total polysaccharides in samples with different grades was 1.40% for first-grade pieces, 1.21% for second-grade pieces, and 1.03% for third-grade pieces. **Conclusion:** The established method is simple, accurate

[收稿日期] 20180511(003)

[基金项目] 国家中药标准化项目[ZYBZH-GD-13(ZYY-2017-159)]

[第一作者] 郭宁, 硕士, 从事中药质量标准评价研究, E-mail: 18811331279@163.com

[通信作者] *王弘, 副教授, 从事中药复杂体系的药效物质与质量评价研究, Tel: 010-82801559, E-mail: hw9505@bjmu.edu.cn

and reproducible, and it can be used for the determination of polysaccharides in decoction pieces of Polyporus. The content of polysaccharides in samples from different origins varies greatly. The content of polysaccharides in samples with different grades shows a certain regularity. The content of polysaccharides is the highest in the first-grade pieces, followed by the content in the second-grade, and the lowest in the third-grade. The results can provide a reference for formulating limits for the content of total polysaccharides and the grade standard of decoction pieces of Polyporus.

[Key words] Polyporus; total polysaccharides; dextran; anthrone-sulfuric acid colorimetry; relative molecular weight; high performance gel chromatography; commercial grade

猪苓始载于《神农本草经》,在我国有 2 500 多年的药用历史,为传统的利水渗湿药,并收载于 2015 年版《中国药典》^[1]。猪苓在我国分布较广,主要产区有云南、四川、陕西、甘肃、吉林及黑龙江等地。多糖为猪苓主要成分之一,此类成分主要有免疫调节^[2-3]、抗肿瘤^[4-5]、保肝^[6-7]、抗辐射^[8]、抗诱变^[9]等作用。在猪苓的质量评价方面,传统方法是以药材个大、外皮黑色、断面色白者为佳,2015 年版《中国药典》^[1]也仅收录了麦角甾醇的含量测定,质量评价标准并不是很完善。各地猪苓饮片的生产工艺不规范、商品饮片缺乏等级分类标准、产品质量参差不齐,这些都会影响该饮片的质量。

目前,有关猪苓总多糖的含量测定方法^[10-13]主要有蒽酮-硫酸法和苯酚-硫酸法,但前者在稳定性、显色效果等方面要优于后者;多选择葡萄糖为对照品来标定猪苓总多糖的含量^[10-12],但猪苓总多糖是大分子化合物,葡萄糖作对照品会导致多糖含量测定的误差。文献^[14-16]采用葡聚糖标定总多糖含量,该方法具有重复性好、准确率高等优点。本实验采用高效凝胶色谱法-示差折光-多角度激光检测器联用技术测定猪苓总多糖的相对分子质量及其分布情况,选择与多糖相对分子质量相近的葡聚糖(重均相对分子质量 100 kDa)为对照品,采用正交试验优化多糖含量测定的前处理条件,建立了蒽酮-硫酸显色、检测波长 630 nm 的猪苓多糖分光光度含量测定方法。方法学研究表明所建立的含量测定方法灵敏度高、重复性好且简捷实用,可用于猪苓饮片中总多糖的含量测定。同时,应用该方法对不同来源、不同等级的猪苓饮片中总多糖含量进行了测定,以期制定该饮片的含量限度及商品等级划分标准提供参考。

1 材料

TU-1800 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RV 10 basic V 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司),TGL16 型台式高速冷冻离心机

(长沙英泰仪器公司),AUW120D 型电子分析天平(日本岛津公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Wyatt-DAWN HELEOS 型十八角度激光光散射仪(美国怀雅特公司)。

葡聚糖对照品[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号 BCBS5740V,纯度 99%,重均相对分子质量 100 kDa],水为超纯水,其他试剂均为分析纯。猪苓饮片由本实验室和康美药业股份有限公司自全国不同地区收集,不同等级猪苓饮片由康美药业股份有限公司将统货猪苓饮片按工艺要求筛分为 3 个等级,以上样品经北京大学药学院王弘副教授鉴定为多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* 的干燥菌核。

2 方法与结果

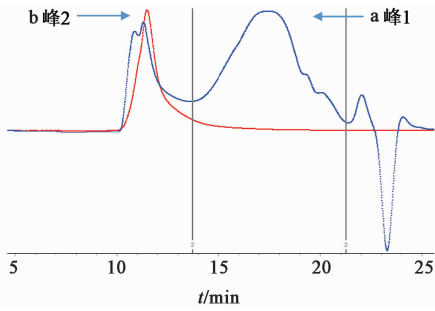
2.1 猪苓总多糖相对分子质量的测定

2.1.1 色谱条件 TSK-GEL G4000SWXL 色谱柱(7.5 mm × 30 cm, 5 μm),流动相 0.05 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液(pH 6.7,含 0.05% 叠氮化钠),流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温设定 30 ℃,进样量 20 μL,采集时间 30 min。

2.1.2 猪苓多糖的相对分子质量 取猪苓总多糖粉末(实验室自制)^[17-19]适量,加流动相配成质量浓度为 3.0 g·L⁻¹的溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样分析,多角度激光与示差折光检测器所得到的信号见图 1。采用 Astra 5.3.4 软件对所得样品的检测结果进行数据处理,得猪苓多糖的重均相对分子质量(M_w)92.95 kDa,按公式多分散系数 = M_w /数均相对分子质量(M_n)计算,结果多分散系数 1.12,属于窄分布样品。

2.2 对照品的选择及其溶液的制备 选用与猪苓总多糖相对分子质量相近的葡聚糖(重均相对分子质量 100 kDa)为对照品。取葡聚糖对照品适量,精密称定,加水制成 0.22 g·L⁻¹的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取猪苓粉末 1.0 g,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,加水 100 mL,称定质



峰 1. 猪苓总多糖; 峰 2. 猪苓总多糖聚合物

图 1 多角度激光检测器 (a) 与示差检测器 (b) 测定的色谱

Fig. 1 Chromatograms determined by multi-angle laser detector (a) and differential refractive index detector (b)

量, 100 °C 回流提取 60 min, 放至室温, 加水补足减少的质量, 滤过, 精密移取 20 mL 于 50 mL 圆底烧瓶中, 减压浓缩至 5 mL, 加无水乙醇至乙醇体积分数为 80%, 摇匀, 置 4 °C 冰箱静置 12 h, 离心 (转速设定 8 000 r·min⁻¹, 10 min, 下同), 取沉淀加 80% 乙醇 5 mL 洗涤 1 次, 离心, 取沉淀物加水使溶解, 置于 25 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.4 前处理方法的优化

2.4.1 正交试验优选水提取工艺^[17-19] 以猪苓总多糖提取率为指标, 选取提取温度、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 猪苓总多糖提取工艺优化的正交试验分析

Table 1 Orthogonal experimental analysis of extraction process of total polysaccharides in Polyporus

No.	A 提取温度 / °C	B 料液比 / g·mL ⁻¹	C 提取时间 / min	D 提取次数 / 次	总多糖提取率 / %
1	100	1:75	30	1	0.68
2	100	1:100	60	2	0.91
3	100	1:125	90	3	0.82
4	90	1:75	60	3	0.81
5	90	1:100	90	1	0.82
6	90	1:125	30	2	0.76
7	80	1:75	90	2	0.65
8	80	1:100	30	3	0.79
9	80	1:125	60	1	0.76

由直观分析可知, 各因素对猪苓总多糖提取率的影响顺序为 C > A > B > D。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 A, C 对猪苓总多糖的提取有显著影响, 因素 B 则无显著性影

表 2 猪苓总多糖提取率的方差分析

Table 2 Variance analysis for extracting rate of total polysaccharides in Polyporus

变异来源	SS	MS	F	P
A	0.020	0.010	20.0	<0.05
B	0.014	0.007	14.0	>0.05
C	0.020	0.010	20.0	<0.05
D(误差)	0.001	0.000 5		

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.0。

响。综合分析, 确定猪苓总多糖最佳提取工艺为 A₁B₂C₂D₁, 即提取温度 100 °C, 料液比 1:100, 提取时间 60 min, 提取数 1 次。

2.4.2 醇沉浓度的选择 取猪苓粉末 1.0 g, 共 3 份, 按 2.3 项下方法操作至“减压浓缩至 5 mL”, 加无水乙醇至乙醇体积分数分别为 70%, 80% 和 90%, 其他操作同 2.3 项, 得供试品溶液, 采用蒽酮-硫酸法测定各样品中总多糖含量, 结果确定醇沉浓度 80% 为最佳。

2.4.3 醇沉时间的选择 取猪苓粉末 1.0 g, 共 3 份, 按 2.3 项下方法操作至“加无水乙醇至乙醇体积分数为 80%, 摇匀”, 分别于 4 °C 冰箱静置 6, 12, 18 h, 其他操作同 2.3 项, 得供试品溶液。结果表明随着醇沉时间增加, 猪苓总多糖含量逐渐增加, 醇沉时间为 12 h 时, 总多糖含量最高。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取葡聚糖对照品适量, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水使溶解并定容, 摇匀, 制成 0.22 g·L⁻¹ 对照品溶液。精密吸取该溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水定容。精密吸取 1 mL 置入具塞试管中, 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 630 nm 处测定吸光度 A。以葡聚糖的质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为 Y = 0.159 2X - 0.005 3 (R² = 0.999 5), 线性范围 22.0 ~ 220 mg·L⁻¹。

2.5.2 显色稳定性试验 取猪苓样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别在显色 0, 15, 30, 45, 60 min 后测定 A, 计算 RSD 1.8%, 表明供试品溶液显色后在 60 min 内稳定。

2.5.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 在所确定的测定条件下重复测定 6 次, 计算 A 的 RSD 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批样品 6 份,在所确定的测定条件下进行测定,计算猪苓总多糖平均质量分数 0.88%,RSD 1.1%,说明该方法重复性良好。

2.5.5 回收率试验 取已知指标成分含量的猪苓饮片样品约 1.0 g,共 9 份,精密称定,分别精密加入 0.8,1.0,1.2 倍量葡聚糖对照品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,于 630 nm 处测定 A。计算平均加样回收率 97.15%,RSD 1.5%,表明该实验方法准确可靠。见表 3。

表 3 猪苓总多糖含量测定的加样回收试验

Table 3 Recovery test of total polysaccharides in Polyporus with dextran as index ingredient

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.009	8.88	12.60	20.86	95.08		
1.061	9.34	12.00	20.77	95.25		
1.061	9.34	12.00	21.17	98.58		
1.007	8.86	10.70	19.29	97.48		
1.056	9.29	10.10	19.05	96.63	97.15	1.5
1.056	9.29	10.10	19.23	98.42		
1.013	8.91	7.30	16.13	98.90		
1.013	8.91	7.30	15.91	95.89		
1.059	9.32	8.00	17.17	98.13		

2.6 样品测定 精密量取供试品溶液 1 mL 于具塞试管中,于冰水浴中加蒽酮显色剂 4 mL,置沸水浴中加热 10 min,再置冷水浴降温至室温,扣除空白对照后,于 630 nm 下测定 A,见表 4,5。结果发现不同产地猪苓饮片中总多糖含量有一定差异,各地样品中总多糖质量分数在 0.87% ~ 1.39%。不同等级的猪苓饮片中总多糖含量呈现一定的规律性。所有产地的猪苓饮片一等饮片中总多糖含量最高,二等饮片中总多糖含量次之,三等饮片中总多糖含量的最低。一级、二级、三级猪苓饮片中平均总多糖质量分数分别为 1.40%,1.21%,1.03%。参照含量限度的有关规定^[1],结合收集的样本量,制定猪苓饮片中总多糖含量限度为一等猪苓饮片不得少于 1.12%,二等猪苓饮片不得少于 0.97%,三等猪苓饮片不得少于 0.82%。

3 讨论

本研究采用高效凝胶色谱法-示差折光-多角度激光检测器联用技术测定猪苓总多糖的相对分子质量及其分布,选择与多糖相对分子质量相近的葡聚

表 4 不同产地猪苓饮片中总多糖的质量分数

Table 4 Content of total polysaccharides in decoction pieces of Polyporus from different regions

No.	来源	总多糖	No.	来源	总多糖
1	陕西汉中	0.97	8	河南三门峡	1.05
2	陕西略阳	1.39	9	吉林	1.16
3	陕西宝鸡	0.99	10	云南丽江	0.87
4	山西汾西	1.06	11	四川九寨沟	1.21
5	甘肃陇西	1.01	12	云南昭通	1.35
6	河北临城	1.34	13	山西吕梁	1.16
7	云南泸西	1.28			

表 5 不同等级猪苓饮片中总多糖的质量分数

Table 5 Content of total polysaccharides in decoction pieces of Polyporus with different grades

No.	来源	等级	总多糖	No.	来源	等级	总多糖
S1	陕西略阳	一等	1.13	S21	云南泸西	三等	1.16
S2	陕西略阳	二等	0.91	S22	陕西宝鸡	一等	1.50
S3	陕西略阳	三等	0.87	S23	陕西宝鸡	二等	1.38
S4	陕西略阳	一等	1.55	S24	陕西宝鸡	三等	1.08
S5	陕西略阳	二等	1.41	S25	陕西平利	一等	1.45
S6	陕西略阳	三等	1.20	S26	陕西平利	二等	1.42
S7	陕西汉中	一等	1.11	S27	陕西平利	三等	1.11
S8	陕西汉中	二等	1.07	S28	陕西汉中	一等	1.68
S9	陕西汉中	三等	0.73	S29	陕西汉中	二等	1.58
S10	山西汾西	一等	1.46	S30	陕西汉中	三等	1.21
S11	山西汾西	二等	0.89	S31	陕西留坝	一等	0.99
S12	山西汾西	三等	0.82	S32	陕西留坝	二等	0.79
S13	甘肃陇西	一等	1.14	S33	陕西留坝	三等	0.65
S14	甘肃陇西	二等	0.96	S34	河北临城	一等	1.71
S15	甘肃陇西	三等	0.90	S35	河北临城	二等	1.29
S16	河北临城	一等	1.52	S36	河北临城	三等	1.23
S17	河北临城	二等	1.42	S37	陕西宝鸡	一等	1.51
S18	河北临城	三等	1.07	S38	陕西宝鸡	二等	1.47
S19	云南泸西	一等	1.50	S39	陕西宝鸡	三等	1.30
S20	云南泸西	二等	1.17				

糖为对照品,采用正交试验优化猪苓总多糖含量测定的前处理条件,建立了蒽酮-硫酸显色,检测波长 630 nm 的猪苓总多糖分光光度含量测定方法,具有灵敏度高、重复性好的特点,适用于猪苓饮片中总多糖的含量测定。通过正交试验和单因素试验对猪苓饮片中总多糖水提醇沉前处理方法进行优化,确定了猪苓总多糖含量测定的前处理方法。

13批不同产地的猪苓饮片中总多糖含量有一定差异,可能与当地海拔、气候、土壤、栽培方法和生态环境等因素有关^[20]。选择适宜的猪苓药材栽培地对于多糖有效成分的积累和猪苓饮片质量的提高具有重要意义。不同等级的猪苓饮片中总多糖含量呈现一定的规律性。一等饮片总多糖含量最高,二等饮片总多糖含量次之,三等饮片总多糖含量最低。本实验的不同等级饮片是经过筛分大小得到,1.5目筛以上为一等饮片,1.5~2目筛为二等饮片,2~6目筛为三等饮片。结果表明猪苓饮片片型越大,皮部的比例越小,心部的比例越大,总多糖的含量越高,为猪苓饮片的商品等级标准划分提供了参考依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:318.

[2] 聂红,马安伦,沈佰华,等. 复方猪苓多糖对小鼠免疫功能的调节[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2000,16(5):384-386.

[3] 江泽波,李思明,赵晋,等. 猪苓多糖对LPS诱导的J774炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):156-159.

[4] 邵玉英,刘培民. 猪苓汤含药血清对体外培养k562及PG细胞nm23基因表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2009,4(9):627-629.

[5] BI Y P, MIAO Y, HAN Y, et al. Biological and physicochemical properties of two polysaccharides from the mycelia of *Grifola umbellata* [J]. Carbohydr Polym, 2013,95(2):740-745.

[6] 王林丽,吴寒寅,罗桂芳. 猪苓的药理作用及临床应用[J]. 中国药业,2000,9(10):58-59.

[7] 李佩文,刘韶辉,罗劲华,等. 口服猪苓多糖联合或序贯拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的疗效[J]. 广东医学,2005,26(9):1278-1280.

[8] 吕宝璋,吴忠忱,单京瑞,等. 柴胡和猪苓多糖的生化作用及抗辐射损伤原理的研究[J]. 解放军医学杂志,1984,9(1):9-12.

[9] 张辉,王统康,陈红. 猪苓多糖抗诱变性的研究[J]. 中成药,1993,15(3):29-29.

[10] 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(6):1099-1102.

[11] 王瑞海,叶迎,许京,等. 甘肃红芪和黄芪总多糖含量测定对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):77-83.

[12] 夏琴,李敏,周进,等. 不同产地、商品规格及生长年限猪苓麦角甾醇及多糖的含量分析[J]. 中草药,2015,38(1):45-48.

[13] 苏靖. 猪苓药用多糖的含量测定[J]. 内蒙古中医药,2012,31(16):43.

[14] 匡扶,朱照静,马俐丽,等. 葡聚糖 T20 作为白芨多糖含量测定标准品可行性研究[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(5):570-574.

[15] 杨莉,王志华,陶健生,等. 黄芪中黄芪多糖含量测定方法的比较[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(9):562-563.

[16] 罗爱勤,陈亮,李菁. 灵芝孢子多糖含量不同方法测定的比较[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(19):132-134.

[17] 李志洲. 回归正交试验设计优化猪苓多糖的提取工艺[J]. 光谱实验室,2012,29(5):3047-3050.

[18] 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]. 现代中药研究与实践,2002,16(1):27-28.

[19] 冯航,王虹. 猪苓多糖的提取及含量测定[J]. 陕西农业科学,2014,60(8):8-10.

[20] 鲁文静,周密,梁宗锁. 猪苓药材质量影响因素及质量评价的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):366-370.

[责任编辑 刘德文]