

· 中药工业 ·

天麻蜜环菌质量标准的建立[△]贺敬霞^{1,2}, 党艳妮^{1,2}, 张笑笑^{1,2}, 黄壮壮^{1,2}, 王益民², 张鑫^{1,2}, 陈衍斌^{1,2*}

1. 陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712042;

2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075

[摘要] 目的: 建立天麻蜜环菌的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)建立天麻蜜环菌鉴别方法, 按照《中华人民共和国药典》2020年版(四部)通则2331测定天麻蜜环菌中二氧化硫的残留量, 并建立天麻蜜环菌中染料木素、麦角甾醇高效液相色谱法(HPLC)测定方法。结果: 建立的TLC色谱图中, 天麻蜜环菌样品与天麻蜜环菌对照药材在相同位置上显示相同颜色的斑点。3批天麻蜜环菌样品中二氧化硫残留量为9.477~15.905 mg·kg⁻¹, 均低于《日本药局方》第17版与《美国药典》43版要求。建立的天麻蜜环菌HPLC测定方法, 染料木素、麦角甾醇线性关系良好(r 分别为0.999 5、0.999 8), 平均加样回收率分别为102.90%、101.29%, RSD均小于2%。结论: 建立的天麻蜜环菌测定法具有方法简单、稳定性好、专属性强的优点, 能够用于天麻蜜环菌质量评价。

[关键词] 天麻蜜环菌; 薄层色谱法; 二氧化硫; 染料木素; 麦角甾醇; 质量标准

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)02-0327-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20210421001

Establishment of Quality Standard for *Armillariella mellea*HE Jing-xia^{1,2}, DANG Yan-ni^{1,2}, ZHANG Xiao-xiao^{1,2}, HUANG Zhuang-zhuang^{1,2}, WANG Yi-min², ZHANG Xin^{1,2}, CHEN Yan-bin^{1,2*}

1. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712042, China;

2. Shaanxi Buchang Pharmaceuticals Limited Company, Xi'an 710075, China

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard for *Armillariella mellea*. **Methods:** Thin-layer chromatography (TLC) was used to establish the identification method for *A. mellea*. According to the general rule 2331 of *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition), the sulfur dioxide in *A. mellea* was measured, and the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of genistein and ergosterol was established. **Results:** In the TLC profile, *A. mellea* sample and the reference crude drug showed the same color spots at the same positions. The sulfur dioxide residue in three batches of *A. mellea* was 9.477-15.905 mg·kg⁻¹, which was lower than the requirements in *Japanese Pharmacopoeia* 17th edition and *United States Pharmacopoeia* 43th edition. The established HPLC method for the determination of genistein and ergosterol in *A. mellea* showed a good linear relationship ($r=0.999\ 5, 0.999\ 8$). The average recoveries were 102.90% and 101.29%, respectively, with RSDs<2%. **Conclusion:** The established method is simple, stable, and specific, which can be used for quality evaluation of *A. mellea*.

[Keywords] *Armillariella mellea*; TLC; sulfur dioxide; genistein; ergosterol; quality standard

天麻 *Gastrodia elata* Bl. 为兰科植物天麻的干燥块茎, 具有息风止痉、祛风通络等作用, 临床用于治疗癫痫、高血压、小儿惊风等病症, 蜜环菌为天麻蜜环菌属的寄生真菌, 具有祛风通络、强筋骨等作用, 用于治疗癫痫、佝偻等病症^[1-2]。蜜环菌与天麻两者

是共生且相互不可或缺的一部分, 天麻通过蜜环菌中菌丝体获取营养, 蜜环菌则寄生于天麻。据文献报道, 目前天麻蜜环菌已分离鉴定出近百种化合物, 包括嘌呤类、半萜类、有机酸、总黄酮、氨基酸等, 具有调血脂、抗肿瘤、抗炎、抗惊厥等生理活

[△] [基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2017ZDXM-SF-003)

* [通信作者] 陈衍斌, 副主任药师, 研究方向: 中药新药研究与开发; Tel: 029-88318318, E-mail: 50713751@qq.com

性^[3-4]。天麻蜜环菌作为天麻蜜环菌片、复方天麻蜜环菌片中中药制剂的主要原料,具有治疗眩晕、头痛、惊风癫痫、腰膝酸痛等作用。随着天麻蜜环菌用药广泛与常态化,其药品质量、药物疗效与用药安全等是需要关注的,故天麻蜜环菌质量标准的建立是非常必要的。目前已颁布天麻蜜环菌片的质量标准^[5],而天麻蜜环菌药材相关质量标准尚未建立,也未有测定蜜环菌中染料木素及麦角甾醇方法的相关报道,故本实验建立天麻蜜环菌薄层色谱鉴别方法,染料木素、麦角甾醇高效液相色谱法(HPLC)并测定其二氧化硫残留量,为天麻蜜环菌质量标准建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);DHG-9140B型恒温鼓风干燥箱(上海琅环实验设备有限公司);SQP型电子天平[德国赛多利斯(北京)有限公司];薄层色谱定量点样毛细管(天津市思利达科技有限公司);KQ-800KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JT108-1RW型中药二氧化硫检测仪(菏泽市牡丹区俊藤电子仪器有限公司);UPT-I-10T型优普系列反渗透超纯水机(成都超纯科技有限公司)。

1.2 试药

30%过氧化氢溶液(天津欧博凯化工有限公司);0.1%氢氧化钠滴定液(上海安谱实验科技股份有限公司);盐酸(北京化工厂,分析纯);硫酸(洛阳昊华化学试剂有限公司,分析纯);甲酸(天津市河东区红岩试剂厂,分析纯);G-硅胶薄层板(青岛海洋化工有限公司、青岛海浪化工有限公司);甲基红、乙酸乙酯、石油醚(60~90℃)、香草醛(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);甲醇[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];对照品麦角甾醇(中国食品药品检定研究院,纯度≥96.2%,批号:111845-201604);对照品染料木素(上海源叶生物科技有限公司,纯度≥98%,批号:20130412)。

蜜环菌对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121244-201202);天麻蜜环菌(神华药业公司,批号分别为20180918、20200921、20200922)。

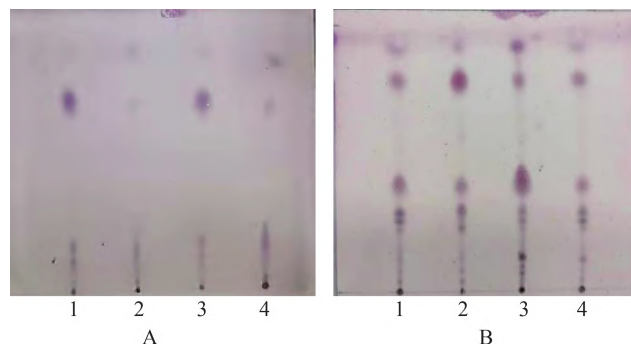
2 方法与结果

2.1 天麻蜜环菌的薄层色谱鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取批号分别为20180918、20200921、20200922的天麻蜜环菌样品各1g,分别置具塞锥形瓶中,精密加入石油醚(60~90℃)10mL,超声40min(100Hz,260W),取出,滤过,滤液浓缩至约1mL,作为供试品溶液。另取天麻蜜环菌对照药材1g,同法制成对照药材溶液,照薄层色谱法(通则0502)试验。

2.1.2 对照药材溶液的制备 同2.1.1项下方法。

2.1.3 薄层色谱条件 参照《中华人民共和国卫生部颁药品标准》天麻蜜环菌片薄层色谱鉴别法^[9],吸取上述2种溶液各5μL,分别点于同一羧甲基硅胶钠为黏合剂的G硅胶薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,饱和30min,展开,取出,晾干,喷以1%香草醛硫酸溶液,在110℃加热至斑点显色清晰,日光下检视,供试品色谱中,在对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,见图1。



注: A. 未优化薄层色谱图; B. 优化后薄层色谱图; 1. 批号为20200921; 2. 批号为20180918; 3. 对照药材; 4. 批号为20200922。

图1 天麻蜜环菌薄层鉴别图

2.1.4 优化后薄层色谱条件 照薄层色谱法,吸取以上各溶液5μL,分别点于同一羧甲基硅胶钠为黏合剂的G硅胶薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(36.0:8.0:0.5)为展开剂,饱和30min后,展开,取出,晾干,喷以1%香草醛硫酸显示剂溶液,在105℃烘约5min,见图1。

由图1可知,改进后薄层色谱相对应点分离度较好,且与前期对比有3个较明显的点出现。

2.2 二氧化硫残留量测定

2.2.1 3%过氧化氢配制 精密量取30%过氧化氢20mL置具塞瓶中,后加入180mL水,摇匀备用。

2.2.2 指示剂配制 精密称取甲基红 12.5 mg 置于具塞瓶中, 加入无水乙醇 5 mL, 超声助溶, 配制质量浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲基红乙醇溶液, 备用。

2.2.3 氢氧化钠溶液配制 精密吸取 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠滴定液 10 mL 置于具塞瓶中, 加水 90 mL 稀释, 摇匀, 配制成浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 备用。

2.2.4 盐酸溶液配制 精密吸取浓盐酸 24.8 mL 置于具塞瓶中, 加水 25.2 mL 稀释, 摇匀, 配制成浓度为 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 备用。

2.2.5 二氧化硫测定 参考《中华人民共和国药典》2020年版^[6], 分别称定3批蜜环菌样品各 10 g, 置三颈圆底烧瓶中, 加水 400 mL。打开回流冷凝管开关, 将冷凝管上端口处连接橡胶导气管, 置于 100 mL 锥形瓶底部。锥形瓶内加入 3% 过氧化氢溶液 50 mL 作为吸收液, 使用前加入 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲基红乙醇溶液指示剂 3 滴, 并用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠滴定液滴定至黄色。开通氮气, 调节气流约至 $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 打开封液漏斗使 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 10 mL 流入蒸馏瓶, 立即加热使三颈烧瓶内的溶液至沸 (沸点设置为 102°C , 保持 2 min), 并保持微沸 (99°C) 90 min 后停止加热。吸收液放冷后, 置于磁力搅拌器上不断搅拌, 用氢氧化钠滴定液滴定至黄色, 持续时间 20 s 不褪, 并将滴定结果用空白验证。空白为未加样品的水溶剂。按公式 (1) 计算供试品中二氧化硫残留量, 不同批次二氧化硫测定结果见表 1。

$$\text{二氧化硫残留量} = \frac{(A-B) \times C \times 0.032 \times 10^6}{W} \quad (1)$$

式中 A 为供试品溶液消耗氢氧化钠滴定液的体积 (mL); B 为空白消耗氢氧化钠滴定液体积 (mL); C 为 NaOH 滴定液浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 0.032 为 1 mL 氢氧化钠滴定液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相当于二氧化硫的量 (g); W 为供试品的质量 (g)。

表 1 不同批次蜜环菌二氧化硫残留量测定结果

批号	NaOH 消耗量/mL	二氧化硫残留量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
20180918	0.5	15.640
20200921	0.5	15.905
20200922	0.3	9.477

注: 空白滴定量均为 0 mL。

2.3 染料木素、麦角甾醇含量测定

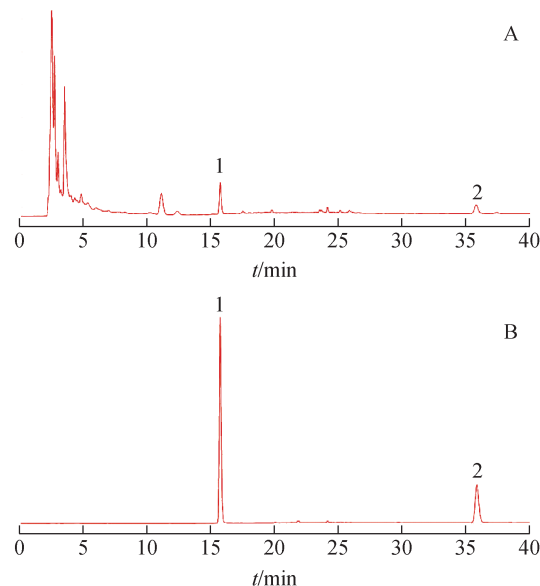
2.3.1 溶液的制备

2.3.1.1 对照品溶液的制备 精密称定麦角甾醇、

染料木素对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度线, 配制为质量浓度分别为 368 、 $490 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混合对照品储备液。

2.3.1.2 供试品溶液 称取天麻蜜环菌样品 1 g, 置具塞瓶中, 加 10 倍量 80% 乙醇, 超声处理 30 min (250 W , 100 kHz), 取出, 滤过, 备用。

2.3.2 色谱条件 参考文献[7], 通过试验确定最佳色谱条件, 色谱柱: Agilent Eclipse XDB- C_{18} ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇 (A) - 水 (B); 梯度洗脱 ($0 \sim 10 \text{ min}$, 50%A; $10 \sim 20 \text{ min}$, 50%~100%A; $20 \sim 40 \text{ min}$, 100%A); 检测波长: 染料木素 260 nm, 麦角甾醇 280 nm; 体积流量: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30°C ; 进样量: $10 \text{ } \mu\text{L}$, 得供试品及对照品色谱图, 见图 2。



注: A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; 1. 染料木素; 2. 麦角甾醇。

图 2 天麻蜜环菌色谱图

2.3.3 方法学考察

2.3.3.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量, 逐倍稀释, 并加甲醇定容至刻度线, 摇匀, 得系列浓度对照品, 按 2.3.2 项下色谱条件测定, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 染料木素回归方程: $Y = 80\,262X - 345\,092$ ($r = 0.999\,5$), 表明在 $3.829 \sim 245.000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好。麦角甾醇回归方程: $Y = 16\,027X + 39\,452$ ($r = 0.999\,8$), 表明在 $1.893 \sim 368.440 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好。

2.3.3.2 精密度考察 精密吸取混合对照品溶液,

按2.3.2项下色谱条件连续测定6次,得染料木素、麦角甾醇对照品峰面积RSD分别为0.58%、0.93%,均小于2.0%。表明仪器精密度良好。

2.3.3.3 重复性试验 按2.3.1.2项下方法,取同一批天麻蜜环菌样品(批号:20180918)平行制备6份供试品溶液,按2.3.2项下色谱条件测定,计算染料木素、麦角甾醇含量,并得其RSD分别为2.80%、2.92%,均小于3%,该方法重复性良好。

2.3.3.4 稳定性试验 取供试品溶液,按2.3.2项下色谱条件,分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样,得染料木素、麦角甾醇峰面积的RSD分别为1.30%、2.66%,均小于3%,表明样品及对照品溶液在24 h内较稳定。

2.3.3.5 加样回收率试验 称定天麻蜜环菌样品0.5 g,置于具塞瓶中,按当前样品含量100%比例加入染料木素、麦角甾醇对照品,按2.3.1.2项下方法平行制备6份样品溶液,在2.3.2项下方法测定峰面积,计算加样回收率及RSD,得染料木素、麦角甾醇平均加样回收率分别为102.90%、101.29%,RSD分别为0.93%、1.62%,说明该操作方法良好。

2.3.4 不同批次天麻蜜环菌含量测定 称定3批天麻蜜环菌样品各1 g,精密称定,按照2.3.1.2项下制备样品溶液,在2.3.2项下色谱条件下测定,结果见表2。

表2 不同批次蜜环菌质量分数

批号	染料木素	麦角甾醇
20180918	1.63	0.99
20200921	3.15	2.73
20200922	3.37	2.66

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别分析

本实验分别对展开剂(石油醚-乙酸乙酯-甲酸)、显示剂(1%硫酸乙醇、0.5%香草醛冰乙酸、1%香草醛硫酸)、温湿度(温度5~40℃,湿度15%~75%)进行考察,结果显示,采用石油醚-乙酸乙酯-甲酸(36.0:8.0:0.5)为展开剂、1%香草醛硫酸为显示剂,供试品色谱中,与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,斑点显示清晰,且该方法适用性较好,可用于天麻蜜环菌药材的鉴别。

3.2 二氧化硫残留量

传统中医药中,通常采用硫黄熏蒸中药材,以延长贮存时间,避免药材发霉腐败,而过量二氧化硫残留破坏人体正常的氧化作用与代谢,引起呼吸系统类疾病及产生不良反应,严重会产生急性中毒症状^[8]。因此,各国对中药材的二氧化硫残留量制定了相关标准,《韩国药典》第10版要求残留量低于30 mg·mL⁻¹,《日本药局方》第17版与《美国药典》第43版要求残留量低于50 mg·mL⁻¹,《中华人民共和国药典》2020年版也对中药材二氧化硫的残留量进行限定,如山药低于10 mg·kg⁻¹、牛膝不超过400 mg·mL⁻¹^[9]。目前,未有天麻蜜环菌二氧化硫残留量的相关标准。

通过本实验对各批次的天麻蜜环菌测定,得其二氧化硫残留量低于20 mg·mL⁻¹,与传统硫黄熏蒸中药材不同,天麻蜜环菌通过培养基培养获得而未进行硫黄熏蒸。参考相关研究资料,探究天麻蜜环菌二氧化硫残留原因:1)药材自身含有的硫苷及硫衍生物在加热后降解而生成二氧化硫;2)在培养过程中,通过吸收培养液中的硫酸根,之后代谢而形成结合与流离态的亚硫酸根;3)植物通过气孔吸收大气中的二氧化硫,以及水中、土壤中的硫化物被植物吸收后,使其含有一定流离态和结合态的含硫成分^[10-12]。结合天麻蜜环菌目前已知的化合物,如氨基酸类、有机酸类、多糖类,其中均未含硫元素及其硫衍生物。同时,其培养过程密闭,二氧化硫来源于空气几率较小,故猜测可能来源于内源性硫酸根,因在培养过程培养液中加入硫酸镁溶液后逐渐代谢产生亚硫酸根^[13]。

3.3 染料木素、麦角甾醇含量测定

前期对不同提取溶剂:水、20%~80%乙醇、20%~100%甲醇进行考察,测定结果显示,当提取溶剂为水、20%乙醇、20%甲醇时,染料木素、麦角甾醇均未出峰,当提取溶剂为40%乙醇、40%甲醇、60%甲醇时未测出染料木素,当溶剂为80%乙醇时染料木素、麦角甾醇含量均达到最佳,故选用80%乙醇作为提取溶剂。同时,实验方法验证表明,采用HPLC测定天麻蜜环菌中染料木素、麦角甾醇的方法操作简单、稳定性好、灵敏度高,可用于其质量标准的建立。

参考文献

- [1] 黄莹,徐娇,周涛,等. 高温胁迫对蜜环菌生长特性的影

- 响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19): 17-22.
- [2] 刘天睿, 王忠巧, 陈向东, 等. 4株蜜环菌菌株鉴定及其对彝良乌天麻产质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5352-5357.
- [3] 王锐, 张诗悦, 穆青. 蜜环菌的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1992-1999.
- [4] 刘长姣, 毛北星, 郭镛, 等. 蜜环菌有效成分和活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(23): 142-145.
- [5] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂: 第19册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 40.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 238.
- [7] 孙志双, 姜小天, 施瀚筠. HPLC法同时测定蛹虫草中虫草素、腺苷和麦角甾醇的含量[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 173-176.
- [8] 高颖, 房德敏, 马逾英, 等. 中药材硫黄熏蒸干燥加工方法的现状、问题及对策[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(6): 506-509.
- [9] 康传志, 杨婉珍, 莫歌, 等. 中药材二氧化硫限量标准及残留现状探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 242-247.
- [10] 陈建茹, 董伟伟, 焦晓林, 等. 种子类药材中二氧化硫残留量的滴定法检测对比[J]. 中国现代中药, 2018, 20(12): 1533-1537.
- [11] 杨智海, 宋莉, 乔蓉霞, 等. 中药外源性有害残留物二氧化硫的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2246-2250.
- [12] 徐丽红, 吴应森, 郑蔚然, 等. 香菇二氧化硫含量超标原因研究[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(6): 986-990.
- [13] 陈伟, 冯欢, 欧江, 等. 蜜环菌液体培养基碳氮源的筛选和优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(9): 128-136.

(收稿日期: 2021-04-21 编辑: 王笑辉)