

UPLC-MS/MS 法测定茯苓、茯苓皮和茯神中茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸

吕倩¹, 焦明娜^{2*}, 武琴园¹, 支力强², 董梅¹, 赵丽¹

1. 渭南市检验检测研究院, 陕西 渭南 714000

2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法同时测定茯苓、茯苓皮和茯神中茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸。**方法** 采用 Shim-pack GIST C₁₈ AQ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。质谱采用离子源: ESI, 负离子模式采集, 采集模式: 多反应监测 (MRM), 离子源温度 150 °C, 毛细管电压 2.5 kV, 锥孔电压 40 V, 去溶剂气流量 900 L/h, 去溶剂气温度 500 °C。**结果** 茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸在各自的线性范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 97.80%、99.65%、97.32%、102.82%、99.57%, RSD 值分别为 3.46%、1.29%、3.01%、3.11%、1.89%。茯苓皮中 5 种三萜类成分含量均高于茯苓和茯神。**结论** 本法具有分析速度快、准确度高的优点, 可为茯苓、茯苓皮和茯神的质量标准提高和开发利用提供依据。

关键词: 茯苓; 茯苓皮; 茯神; 茯苓新酸 B; 去氢土莫酸; 猪苓酸 C; 去氢茯苓酸; 茯苓酸; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)03-0566-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.011

Determination of poricoic acid B, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid in *Poria*, *Poria* peel, and *Poria* with hostwood by UPLC-MS/MS

LÜ Qian¹, JIAO Ming-na², WU Qin-yuan¹, ZHI Li-qiang², DONG Mei¹, ZHAO Li¹

1. Weinan Testing Institute, Weinan 714000, China

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To establish an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of poricoic acid B, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid in *Poria*, *Poria* peel, and *Poria* with hostwood. **Methods** Shim-pack GIST C₁₈ AQ column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm) was used with acetonitrile - 0.1% formic acid as the mobile phase by gradient elution. The flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. Mass spectrometry adopted the following conditions: ion source: ESI, negative ion mode collection, collection mode: multi-reaction monitoring (MRM), ion source temperature 150 °C, capillary voltage 2.5 kV, cone voltage 40 V, desolvent gas flow 900 L/h, and desolvent gas temperature 500 °C. **Results** Poricoic acid B, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid showed good linear relationship within their linear range. The average recoveries were 97.80%, 99.65%, 97.32%, 102.82%, and 99.57% with RSD values of 3.46%, 1.29%, 3.01%, 3.11%, and 1.89%. The content of five triterpenoids in *Poria* peel was higher than those in *Poria* and *Poria* with hostwood. **Conclusion** This method has the advantages of fast analysis speed and high accuracy, and can provide a basis for the improvement of the quality standard and the development and utilization of *Poria*, *Poria* peel, and *Poria* with hostwood. **Key words:** *Poria*; *Poria* peel; *Poria* with hostwood; poricoic acid B; dehydrotumulosic acid; polyporenic acid C; dehydropachymic acid; pachymic acid; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2022-11-17

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2020SF-090)

作者简介: 吕倩 (1987—), 女, 陕西三原人, 主管药师, 硕士, 研究方向为中药制剂分析。E-mail: sijidou0523@163.com

*通信作者: 焦明娜, 女, 主治医师, 硕士, 研究方向为中药制剂及临床应用。E-mail: mingnaji@126.com

茯苓为多孔菌科植物茯苓 *Poria cocos* (Schw). Wolf 的干燥菌核^[1], 是常用的大宗药材, 属于药食同源中药, 茯苓皮为茯苓菌核黑色的外皮部分, 含有松根的白色部分称为茯神, 三者主要是药用部位不同。茯苓长于健脾止泻, 茯苓皮优于利水消肿^[2], 茯神则主用于安神宁心^[3]。茯苓主产于云南、安徽、湖北等地, 含有多糖类、三萜类、氨基酸、脂肪酸、无机元素等多种化学成分^[4-6], 其中含量较多的主要是三萜类和多糖类成分。茯苓中三萜类成分具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、利尿和调节免疫力作用^[7-8], 是其主要的药效成分。三萜类成分有些是紫外末端吸收, 在常规高效液相色谱分析测定中灵敏度较低, 基线干扰较大, 需要变换波长或采用蒸发光检测器进行测定。茯苓、茯苓皮药材在《中国药典》2020 年版一部中仅有检查、鉴别项, 无含量测定项, 茯神药材还未收录。目前有文献报道高效液相色谱和液-质联用对茯苓、茯苓皮药材中几个或多个成分的测定、指纹图谱的研究^[9-12]。超高效液相色谱串联质谱是目前用于多成分测定的常用方法, 具有分析速度快、选择性好、准确度高的优点, 同时可以应对不同中药的复杂基质。故本实验建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定茯苓、茯苓皮和茯神中茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸, 为茯苓、茯苓皮和茯神药材的质量控制和资源开发利用、临床药用提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters H class Xevo TQS 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪 (美国 Waters 公司), Masslynx 4.0 工作站, ML204 十万分之一电子天平 (梅特勒仪器公司), BT124S 万分之一电子天平 (北京赛多利斯仪器有限公司), Millipore-Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

茯苓新酸 B 对照品 (批号 200602, 质量分数以 99.0%计) 购自四川维克奇生物科技有限公司; 去氢土莫酸 (批号 CHB190212, 质量分数以 98.0%计)、茯苓酸 (批号 CHB210506, 质量分数以 98.0%计) 对照品均购自成都克洛玛生物科技有限公司, 猪苓酸 C (批号 DST2110-021, 质量分数以 98.0%计)、去氢茯苓酸 (批号 DST201115-06, 质量分数以 98.0%计) 对照品均购自成都德思特生物技术有限公司; 乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 甲酸为质

谱级 (美国 Merck 试剂公司), 水为超纯水 (Millipore 超纯水机自制), 其他试剂均为分析纯。

茯苓、茯苓皮和茯神药材分别购自西安市各大中药材批发市场, 经渭南市检验检测研究院刘玲珠主任药师鉴定为多孔菌科植物茯苓 *Poria cocos* (Schw). Wolf 的干燥菌核, 菌核黑色的外皮部称为茯苓皮, 含有松根的白色部分称为茯神。

表 1 样品的来源信息

Table 1 Information sources of samples

序号	名称	批号	来源
S1	茯苓	201001	湖南靖州县
S2	茯苓	21050205	湖南靖州县
S3	茯苓	21060301	安徽安庆
S4	茯苓	210703	云南大理
S5	茯苓	211005	云南永胜县
S6	茯苓皮	200902	云南普洱市
S7	茯苓皮	211106	安徽金寨县
S8	茯苓皮	211201	湖北罗田县
S9	茯苓皮	210303	湖北恩施
S10	茯神	200605	湖南靖州县
S11	茯神	200801	云南大理
S12	茯神	210209	云南腾冲县

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Shim-pack GIST C₁₈ AQ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3 μm), 以乙腈 (A) - 0.1%甲酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~1 min, 43%→72% A; 1~4 min, 72%→85% A; 4~7 min, 85%→88% A; 7~8 min, 88%→90% A), 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。色谱图见图 1。

2.2 质谱条件

离子源: ESI, 负离子模式采集, 采集模式: 多反应监测 (MRM), 离子源温度 150 °C, 毛细管电压 2.5 kV, 锥孔电压 40 V, 去溶剂气流量 900 L/h, 去溶剂气温度 500 °C。各成分的质谱参数见表 2。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取茯苓新酸 B 6.13 mg, 去氢土莫酸 12.51 mg, 置同一 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备溶液 I; 另精密称取猪苓酸 C 6.35 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备溶液 II; 再精密称取去氢茯苓酸 10.33 mg, 置 20 mL

量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品储备溶液 III;取茯苓酸 10.18 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品储备溶液 IV。分别精密对照品储备溶液 I、III、IV 各 100 μ L、对照品储备溶液 II 200 μ L 置同一个 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液(分别含茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、茯苓酸 3.065、6.255、5.080、5.165、10.18 μ g/mL)。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取茯苓、茯苓皮和茯神粉末(过 3 号筛)各 0.5 g,置具塞锥形瓶中,

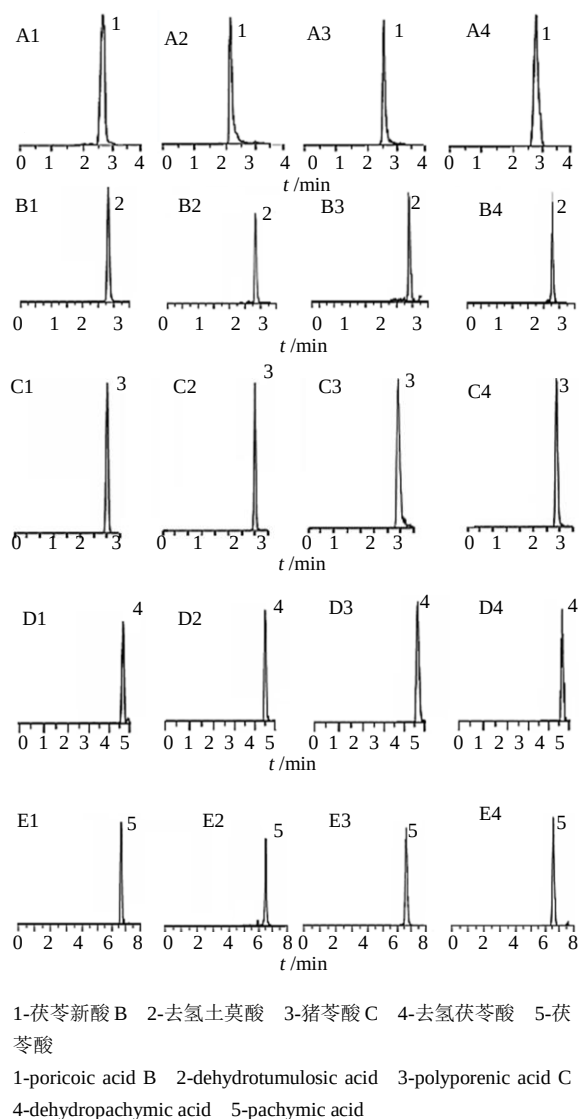


图 1 对照品 (A1~E1)、茯苓 (A2~E2)、茯苓皮 (A3~E3) 和茯神 (A4~E4) 的多反应监测色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of reference substance (A1—E1), *Poria* (A2—E2), *Poria peel* (A3—E3), and *Poria with hostwood* (A4—E4)

表 2 质谱参数

Table 2 MS parameters

名称	t_R/min	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压/V
茯苓新酸 B	2.62	483.3	409.1*, 367.3	20、28
去氢土莫酸	2.81	483.2	421.1*, 337.3	20、30
猪苓酸 C	3.54	481.3	421.3*, 311.2	25、32
去氢茯苓酸	4.63	525.1	465.2*, 219.2	22、30
茯苓酸	6.65	527.4	465.4*, 405.3	20、25

*-指定量离子

*-specified quantity ion

分别精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声 30 min,取出,冷却,用甲醇补足减失的质量,滤过,滤液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

分别取 5 种对照品储备溶液各 500 μ L,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,作为 6 号对照品溶液,然后分别精密吸取 50、200、500、1 000、3 000 μ L,分别置 5 个 10 mL 量瓶中,作为线性的不同质量浓度的系列溶液,记做 1~5 号对照品溶液,进行测定。以进样质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,结果见表 3。

2.5 精密度试验

取 3 号对照品混合溶液(分别含茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、茯苓酸 0.766 2、1.563 8、0.635 0、1.291 2、2.545 0 μ g/mL),连续测定 6 次,结果茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸峰面积的 RSD 值分别为 2.19%、1.85%、2.33%、3.15%、1.68%。

2.6 重复性试验

取批号 201001 茯苓样品 0.5 g,精密称定,平行制备 6 份,制备供试品溶液,进样测定,结果茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸质量分数的 RSD 值分别为 3.22%、1.56%、1.39%、1.11%、1.67%。

2.7 稳定性试验

取批号 201001 茯苓样品制备供试品溶液,分别在 0、1、2、4、8、12、16、24 h 进行测定,结果茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸峰面积 RSD 值分别为 4.51%、2.96%、2.88%、2.37%、2.55%,表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.8 回收率试验

分别精密吸取对照品储备溶液 I 800 μ L,对照

表 3 线性方程、相关系数和线性范围

Table 3 Linear equation, correlation coefficient, and linear range

名称	方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
茯苓新酸 B	$Y=54.054\ 0\ X-4.561\ 3$	0.999 7	0.077~15.325
去氢土莫酸	$Y=47.459\ 0\ X+0.136\ 1$	0.999 9	0.156~31.275
猪苓酸 C	$Y=124.680\ 0\ X+4.066\ 7$	0.999 8	0.064~12.700
去氢茯苓酸	$Y=70.307\ 0\ X+4.589\ 4$	0.998 9	0.129~25.825
茯苓酸	$Y=113.780\ 0\ X-17.060\ 0$	0.999 9	0.254~50.900

品储备溶液 II 和 III 各 2 mL, 对照品储备溶液 IV 1.8 mL, 置同一个 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为待加对照品混合溶液(分别含茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、茯苓酸 24.5、50.04、50.8、103.3、183.24 $\mu\text{g/mL}$)。取批号 201001 茯苓样品约 0.25 g, 精密称定, 共 9 份, 每 3 份为 1 组, 每组分别精密加入待加对照品混合溶液 0.5、1.0、1.5 mL, 制备供试品溶液, 进行测定, 结果茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和

茯苓酸的平均回收率分别为 97.80%、99.65%、97.32%、102.82%、99.57%, RSD 值分别为 3.46%、1.29%、3.01%、3.11%、1.89%。

2.9 样品测定

取不同产地、批次的茯苓、茯苓皮和茯神药材样品, 制备供试品溶液, 每个样品平行制备两份, 进行测定, 外标法计算茯苓、茯苓皮和茯神中茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的质量分数, 结果见表 4。

表 4 茯苓、茯苓皮和茯神中茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的测定结果 ($n=2$)

Table 4 Results of poricoic acid B, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid in *Poria*, *Poria* peel, and *Poria* with hostwood ($n=2$)

序号	名称	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		茯苓新酸 B	去氢土莫酸	猪苓酸 C	去氢茯苓酸	茯苓酸
S1	茯苓	0.093 6	0.223 1	0.200 5	0.356 8	0.710 2
S2	茯苓	0.082 5	0.215 6	0.213 7	0.368 9	0.724 3
S3	茯苓	0.152 1	0.412 6	0.512 6	0.453 2	0.901 2
S4	茯苓	0.182 4	0.667 1	0.489 3	0.501 3	0.962 6
S5	茯苓	0.179 6	0.638 5	0.501 5	0.522 8	0.983 8
S6	茯苓皮	0.321 6	1.453 5	1.435 8	0.919 2	1.750 8
S7	茯苓皮	0.296 5	1.210 6	1.406 2	0.951 5	1.693 5
S8	茯苓皮	0.259 8	1.335 9	1.396 1	0.976 8	1.662 7
S9	茯苓皮	0.286 6	1.365 7	1.377 9	0.953 1	1.673 8
S10	茯神	0.121 8	1.182 1	1.321 5	0.402 5	0.723 5
S11	茯神	0.132 6	1.201 5	1.301 9	0.413 2	0.761 9
S12	茯神	0.116 2	1.073 6	1.372 6	0.486 3	0.892 2

可以看出茯苓皮中 5 种三萜类成分含量均高于茯苓和茯神, 茯苓和茯神中茯苓新酸 B、去氢茯苓酸、茯苓酸含量相近, 低于茯苓皮, 茯苓皮和茯神中去氢土莫酸、猪苓酸 C 含量相近, 均高于茯苓。茯神、茯苓皮是茯苓的不同部分, 其药性、功能各不相同, 茯苓侧重健脾, 茯苓皮主要用于利尿消肿,

茯神则主要用于安神宁心, 常和朱砂共用, 由于茯苓不同部位具有不同的功效, 其药理作用可能与上述 5 种成分的含量具有某种关系, 有待进一步研究。

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备方法选择

本实验以茯苓为研究对象, 首先采用单因素对

料液比(1:25、1:50、1:100)进行考察,结果发现料液比 1:50 可以完全提取茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸,然后采用正交试验对其提取溶剂(甲醇、70%甲醇和 25%甲醇)、提取方法(回流、超声和索氏提取)、超声时间(20、30、40 min)进行考察,最后确定本实验中所采取的提取方法,即甲醇作为溶剂,超声提取 30 min 作为供试品溶液制备的最优提取方法。

3.2 色谱条件优化

本实验对甲醇、乙腈与水、0.1%甲酸作为流动相进行考察,结果发现乙腈与 0.1%甲酸作为流动相时,茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的色谱峰形较尖锐,无拖尾现象,且各成分的响应值较高,因此选择 0.1%甲酸与乙腈作为流动相进行梯度洗脱。然后对不同的色谱柱温(20、30、40 ℃)考察,结果发现柱温高,色谱出峰快,峰形较窄,但柱温对各成分的测定影响不大,综合考虑选择 30 ℃,最后对不同进样量(2、5、10 μL)考察,结果三者峰形差异不大,当进样体积为 10 μL 时,色谱峰形稍微拖尾,且峰不对称,综合考虑 5 μL 作为该实验的进样体积。

3.3 质谱条件的优化

三萜类成分多为酸性,酸性化合物宜采用负离子进行扫描,响应值会更高,信号更稳定,且流动相加酸可以改善拖尾峰形,利于准确定量,因此质谱的条件在负离子下进行优化,采用液相结合质谱的方法,首先对上述 5 种三萜类化合物进行母离子扫描,同时优化毛细管电压和锥孔电压,保证离子的响应值最高,然后分别对每个化合物逐个优化其子离子,通过调整不同的碰撞电压来选取响应值最高的离子作为定量离子,另一个响应强度次之的作为定性离子,从而确定每个化合物测定的质谱参数,然后编辑 MRM 方式,采用上述的色谱条件作为分离条件,从而对每个化合物进行定量分析。

本实验采用 UPLC-MS/MS 法对茯苓、茯苓皮和茯神中 5 种三萜类成分茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸进行测定,并对比

其含量进行分析比较,结果发现茯苓皮中 5 种成分的含量均高于茯苓和茯神,且不同产地的样品中 5 种成分具有一定的差异。由于本实验采集样本量较少,不能全面反映 3 种药材中 5 种成分的准确高低,后续仍需扩大样品量进行深入研究,但本文建立的方法可以在 8 min 内对 5 种成分完成定量分析,具有分析速度快、准确度高的优点,可为茯苓、茯苓皮和茯神的质量标准提高和开发利用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 251-252.
- [2] 冯亚龙, 赵英永, 丁凡, 等. 茯苓皮的化学成分及药理研究进展(I) [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1098-1102.
- [3] 张雪, 向瑞平, 刘长河. 茯神的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2009, 29(4): 19-21.
- [4] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [5] 张洁, 谢文婧, 吕志刚, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展 [J]. 医药前沿, 2022, 12(22): 40-42.
- [6] 崔鹤蓉, 王睿林, 郭文博, 等. 茯苓的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 694-700.
- [7] 倪文娟, 俞松林, 张莉华, 等. 茯苓三萜类成分利水作用的虚拟筛选 [J]. 中国药业, 2019, 28(11): 40-43.
- [8] 咎俊峰. 茯苓三萜类成分抗肿瘤活性研究与茯苓药材质量分析 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [9] 万鸣, 杨玉莹, 罗心遥, 等. 不同产地茯苓中 7 种三萜类成分含量的测定及聚类分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2101-2106.
- [10] 车爽, 李清, 霍艳双, 等. 波长转换 RP-HPLC 法同时测定茯苓不同部位中 5 种三萜酸含量 [J]. 药学学报, 2010, 45(4): 494-497.
- [11] 陈素娥, 孙红, 朱琳, 等. 茯苓药材高效液相色谱指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(9): 1507-1512.
- [12] 田双双, 赵晓梅, 刘勇, 等. 茯苓药材和饮片质量标准研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1734-1744.

【责任编辑 解学星】