HPLC 法测定威喜丸中猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸

赵 丹[1]，魏谭军[1*]，晏明英[1]，唐启荣[1]，何人大[1]，岳剑东[1]，刘岩庭[2]

1. 达州市中西医结合医院，四川 达州 635000

2. 福建省食品药品质量检验研究院，福建 福州 350001

摘 要：目的 建立 HPLC 波长切换法同时测定威喜丸中猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的方法。**方法** 采用 Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈－0.05%磷酸溶液，梯度洗脱；0～24.0 min 在 248 nm 波长下检测猪苓酮 B 和猪苓酮 A，24.0～50.0 min 在 210 nm 波长下检测去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 10 μL。**结果** 猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸分别在 5.79～115.80、1.66～33.20、3.28～65.60、7.07～141.40、1.46～29.20、0.88～17.60 μg/mL 与峰面积线性关系良好；平均加样回收率分别为 98.75%、97.60%、98.23%、99.49%、97.10%、96.81%，RSD 值分别为 0.75%、1.66%、1.44%、0.90%、1.15%、1.38%。**结论** 本方法简便、准确、重复性好，为威喜丸的质量控制提供了实验依据。

关键词：威喜丸；猪苓酮 B；猪苓酮 A；去氢土莫酸；猪苓酸 C；去氢茯苓酸；茯苓酸；高效液相色谱

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2019)01 - 0027 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.01.006

Determination of polyporusterone B, polyporusterone A, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid and pachymic acid in Weixi Pills by HPLC

ZHAO Dan[1], WEI Tan-jun[1], YAN Ming-ying[1], TANG Qi-rong[1], HE Ren-da[1], YUE Jian-dong[1], LIU Yan-ting[2]

1. Dazhou Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Dazhou 635000, China

2. Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC with wavelength switching method for determination of polyporusterone B, polyporusterone A, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid in Weixi Pills. **Methods** The separation was carried out on Agilent Eclipse XDB-C_{18} chromatography column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.05% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 248 nm in 0 — 24.0 min (determination of polyporusterone B and polyporusterone A) and 210 nm in 24.0 — 50.0 min (determination of dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid and pachymic acid). The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 10 μL. **Results** The linear ranges of polyporusterone B, polyporusterone A, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid were 5.79 — 115.80, 1.66 — 33.20, 3.28 — 65.60, 7.07 — 141.40, 1.46 — 29.20, and 0.88 — 17.60 μg/mL, respectively. The average recoveries were 98.75%, 97.60%, 98.23%, 99.49%, 97.10%, and 96.81%, with RSD 0.75%, 1.66%, 1.44%, 0.90%, 1.15%, and 1.38%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, and provides an experimental basis for the quality control of Weixi Pills.

Key words: Weixi Pills; polyporusterone B; polyporusterone A; dehydrotumulosic acid; polyporenic acid C; dehydropachymic acid; pachymic acid; HPLC

威喜丸来源于中药成方制剂第十三册[1]，由茯苓、猪苓两味中药加工而成的中成药复方制剂，具有利湿、补肾固下的功效，临床上用于肾虚遗精、妇女白带等疾病的治疗。现代研究表明威喜丸对乳

收稿日期：2018-10-31

作者简介：赵 丹（1985—），女，本科，主要从事药品质量控制、中药调剂和中药临床合理用药等医院药学相关研究工作。

***通信作者** 魏谭军（1984—），男，硕士，主要从事医院制剂的研究与开发。E-mail: weitanjun635000@163.com

糜尿、白带等治疗效果明显[2-3]。方中猪苓为多孔菌科真菌猪苓的干燥菌核，性平，味甘淡，具有利水渗湿的功效，临床上主要用于治疗泌尿系统疾病，主要含有多糖、甾体、蒽醌类等化学成分，其中猪苓酮 B、猪苓酮 A 为其甾酮类主要成分[4]。茯苓为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核，性平，味甘淡，具有利水渗湿、健脾宁心的功效，主要含有多糖类、三萜类、甾体类、挥发性成分、脂肪酸等成分，其中去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸等三萜类化合物为其主要药效组分[4]。现行质量标准中未对方中两味中药中的任一成分进行定量检测。为全面控制和提高本品的内在质量，本研究拟采用 HPLC 波长切换技术对威喜丸中猪苓所含主要成分猪苓酮 B 和猪苓酮 A、茯苓所含主要成分去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸进行同时测定，以期通过多指标成分定量控制的方法，提高和完善威喜丸的质量标准。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；BT25S 型电子分析天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；KQ5200DA 型超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂

去氢土莫酸（批号 6754-16-1，质量分数 98.0%）、猪苓酸 C（批号 465-18-9，质量分数 98.0%）对照品均购自南京森贝伽生物科技有限公司；去氢茯苓酸对照品（批号 77012-31-8，质量分数 99.0%）购自成都普瑞法科技开发有限公司；茯苓酸对照品（批号 29070-92-6，质量分数 98.0%）购自上海纯优生物科技有限公司；猪苓酮 B（批号 141360-89-6，质量分数 99.0%）、猪苓酮 A（批号 141360-88-5，质量分数 99.0%）对照品均购自上海江莱生物科技有限公司。乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯；威喜丸（上海雷允上药业有限公司生产，每 50 粒质量约 3 g，批号分别为 170204、170504、170505）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.05%磷酸溶液（B），梯度洗脱（0～11.0 min，25.0% A；11.0～24.0 min，25.0% A→57.0% A；24.0～43.0 min，57.0% A→90.0% A；43.0～50.0 min，90.0% A→25.0% A）；0～24.0 min 在 248 nm[5]波长下检测猪苓酮 B 和猪苓酮 A，24.0～50.0 min 在 210 nm[6-7]波长下检测去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸对照品各适量，分别用甲醇溶解，制成 6 个单成分对照品储备液（猪苓酮 B 1.158 mg/mL、猪苓酮 A 0.332 mg/mL、去氢土莫酸 0.656 mg/mL、猪苓酸 C 1.414 mg/mL、去氢茯苓酸 0.292 mg/mL、茯苓酸 0.176 mg/mL）；分别精密吸取 6 个单成分对照品储备液各适量，用甲醇制成含猪苓酮 B 57.9 μg/mL、猪苓酮 A 16.6 μg/mL、去氢土莫酸 32.8 μg/mL、猪苓酸 C 70.7 μg/mL、去氢茯苓酸 14.6 μg/mL、茯苓酸 8.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取威喜丸适量，研细，称取 3.0 g，精密称定，精密加入甲醇 25 mL，密塞，称定质量，采用 KQ 5200DA 型超声波清洗机（功率 200 W，频率 40 kHz）超声提取 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

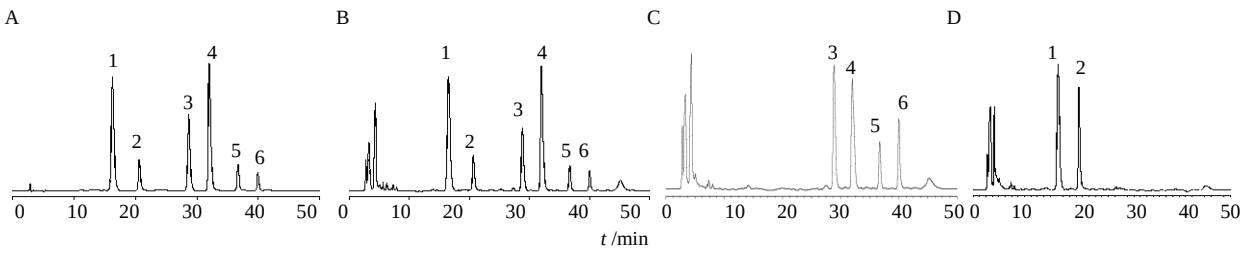
2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照威喜丸质量标准项下的处方和制法，分别制备缺猪苓、缺茯苓的阴性样品，再按照供试品溶液的制备项下方法操作制成对应的 2 种阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各适量，按上述色谱条件进样测定，见图 1。结果表明阴性样品溶液对威喜丸中猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸测定无干扰，理论塔板数按所测各色谱峰计均大于 3 500，所测各成分均能达到有效分离，分离度均大于 1.5。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取 6 个单成分对照品储备液各适量，用甲醇定容制成 25 倍浓度差的 6 个混合对照品溶液，依法进样检测。以猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，计算回归方程，见表 1。



1-猪苓酮 B 2-猪苓酮 A 3-去氢土莫酸 4-猪苓酸 C 5-去氢茯苓酸 6-茯苓酸

1-polyporusterone B 2-polyporusterone A 3-dehydrotumulosic acid 4-polyporenic acid C 5-dehydropachymic acid 6-pachymic acid

图 1 混合对照品（A）、威喜丸（B）、缺猪苓阴性样品（C）、缺茯苓阴性样品（D）的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Weixi Pills (B), negative sample without *Polyporus* (C), and negative sample without *Poria* (D)

表 1 各成分的线性关系和线性范围

Table 1 Linear relationship and range of major components

成分	回归方程	*r*	线性范围/(μg·mL^{-1})
猪苓酮 B	Y=1.9 826×10^6 X+466.3	0.999 8	5.79～115.80
猪苓酮 A	Y=1.1 208×10^6 X−316.7	0.999 1	1.66～33.20
去氢土莫酸	Y=1.3 619×10^6 X−429.8	0.999 3	3.28～65.60
猪苓酸 C	Y=2.1 407×10^5 X+200.2	0.999 6	7.07～141.40
去氢茯苓酸	Y=7.9 143×10^5 X−380.4	0.999 8	1.46～29.20
茯苓酸	Y=9.1 308×10^5 X−359.9	0.999 5	0.88～17.60

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液，依法连续 6 次进样测定，记录猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的峰面积。结果所测猪苓酮 B、猪苓酮 A、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 1.11%、0.35%、0.28%、1.04%、1.71%、1.42%。

2.6 重复性试验

取威喜丸样品（批号 170204）适量，制备 6 份供试品溶液，依法进样测定，记录猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的峰面积，计算各成分的质量分数。结果所测各成分质量分数的 RSD 值分别为 1.69%、0.81%、1.77%、0.58%、0.93%、1.16%。

2.7 稳定性试验

取批号 170204 威喜丸样品，制备供试品溶液，室温放置，分别在 0、2、4、8、16、24 h 取样依法测定，记录猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的峰面积。结果威喜丸供试品溶液在室温下 24 h 内稳定，猪苓酮 B、猪苓酮 A、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 1.09%、0.33%、1.21%、1.07%、0.58%、1.45%。

2.8 加样回收率试验

取威喜丸样品（批号 170204）6 份，研细，每份 1.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入另行制备的对照品溶液（猪苓酮 B 0.739 mg/mL、猪苓酮 A 0.236 mg/mL、去氢土莫酸 0.472 mg/mL、猪苓酸 C 0.947 mg/mL、去氢茯苓酸 0.199 mg/mL 和茯苓酸 0.103 mg/mL）各 1.0 mL，制备供试品溶液，依法进样测定，计算所测各成分的回收率，结果猪苓酮 B、猪苓酮 A、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 98.75%、97.60%、98.23%、99.49%、97.10%、96.81%，RSD 值分别为 0.75%、1.66%、1.44%、0.90%、1.15%、1.38%。

2.9 样品测定

取 3 批的威喜丸样品（批号 170204、170504、170505），各 3 份，制备供试品溶液，依法进样测定，记录猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的峰面积，计算所测各成分质量分数，结果见表 2。

表 2 威喜丸中猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的测定结果（n = 3）

Table 2 Result of polyporusterone B, polyporusterone A, dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, dehydropachymic acid, and pachymic acid in Weixi Pills (n = 3)

批号	质量分数/(mg g^{-1})					
	猪苓酮 B	猪苓酮 A	去氢土莫酸	猪苓酸 C	去氢茯苓酸	茯苓酸
170204	0.491	0.157	0.314	0.629	0.135	0.068
170504	0.445	0.134	0.359	0.716	0.148	0.059
170505	0.510	0.171	0.284	0.599	0.117	0.076

3 讨论

3.1 色谱条件的确定

3.1.1 体积流量和柱温的选择 实验过程中，对比考察了不同体积流量[5, 7-8, 10]（0.9、1.0、1.1 mL/min）和不同柱温[5-8]（25、30、35 ℃）对所测各成分猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸色谱峰峰形、分离效果和色谱峰出峰时间的影响，最终选择 1.0 mL/min 作为本实验的体积流量，30 ℃作为本实验的柱温。

3.1.2 流动相的选择 分别比较了甲醇－水[10]、乙腈－水[5]、乙腈－0.05%磷酸溶液[6-7, 9]、乙腈－0.05%冰醋酸溶液流动相体系，以所测定成分猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的分离效果为指标，最后选定以乙腈－0.05%磷酸溶液为流动相。

3.2 提取条件的选择

3.2.1 提取溶剂的选择 实验过程中，对比考察甲醇[6-9]、50%甲醇、乙醇[5, 10]对所测定成分猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸提取效果的影响，结果表明以甲醇为提取溶剂时，所测各成分提取率最佳，故选定甲醇为提取溶剂。

3.2.2 提取方式的选择 以甲醇为提取溶剂，对比考察超声提取[5-8, 10]和加热回流提取对所测定成分猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸提取效果的影响，结果两种提取方式所测各成分猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸提取率无明显差异，考虑到检测操作过程的便捷性，故选择超声提取作为供试品溶液的提取方式。

本实验所建立的 HPLC 波长切换法，经方法学验证该方法操作便捷、结果准确，重复性好，实现了对威喜丸中猪苓酮 B、猪苓酮 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸和茯苓酸的同时测定，为威喜丸的质量控制提供了实验依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第十三册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 126.

[2] 乔铁锤. 威喜丸治白带 [J]. 四川中医, 1990(3): 388-390.

[3] 方厚贤, 杨 容. 威喜丸治疗乳糜尿一名医张羹梅临床经验介绍 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 1990, 7(6): 260-260.

[4] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 240-241, 318-319.

[5] 陈晓梅, 周微微, 王春兰, 等. 猪苓甾酮类化合物的 HPLC 含量测定及指纹图谱研究 [J]. 菌物学报, 2017, 36(1): 83-97.

[6] 张靓琦, 贾 英, 罗 洁, 等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(13): 1080-1083.

[7] 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.

[8] 谭庆龙, 李楚坚, 金 苗, 等. HPLC 法同时测定猪苓中 6 个甾体类成分的含量 [J]. 中药材, 2017, 40(8): 1892-1894.

[9] 沈玉萍, 杨 欢, 陈 斌, 等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(5): 388-390.

[10] 王 弘, 晁建平, 陈文举, 等. 猪苓药材的质量评价标准研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 971-974.