

双标多测法同时测定茯苓中13种三萜类成分的含量

丁 婵^{1,2}, 熊文惠^{1,2}, 厉 晓^{1,2}, 彭思源^{1,2}, 龚 婕^{1,2}, 浦子牛^{1,2}, 肖作为^{1,3*}, 崔培梧^{1,2,3*}

(1. 湖南中医药大学药学院菌物药研究室, 湖南长沙 410208; 2. 国家中医药管理局中药药性与药效三级科研实验室, 湖南长沙 410208; 3. 湖南省健康产品与生命科技工程技术研究中心, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 建立双标多测法同时测定茯苓中 6α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸的含量。

方法 分析采用Agilent XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相水(含0.3%磷酸)-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 柱温25 °C; 检测波长242、203 nm。以 6α -羟基猪苓酸C和茯苓酸为双标, 双标线性校正法预测其他成分保留时间; 以茯苓酸为内标, 计算其他成分相对校正因子, 计算其含量。结果 13种成分在各自范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.9993$), 平均加样回收率99.77%~104.60%, RSD 0.16%~2.88%。双标线性校正法更准确, 偏差更小。双标多测法与常规外标法所得结果无显著差异。结论 该方法可实现茯苓中主要三萜类成分的快速分析, 是该药材切实可行的整体质量评价方法。

关键词: 茯苓; 三萜; 含量测定; 双标多测法; 双标线性校正法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)01-0129-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.019

Simultaneous content determination of thirteen triterpenoids in *Wolfiporia hoelen* by two reference substances for determination of multiple components method

DING Chan^{1,2}, XIONG Wen-hui^{1,2}, LI Xiao^{1,2}, PENG Si-yuan^{1,2}, GONG Jie^{1,2}, PU Zi-niu^{1,2}, XIAO Zuo-wei^{1,3*}, CUI Pei-wu^{1,2,3*}

(1. Mycomedicine Research Laboratory, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. National Administration of Traditional Chinese Medicine Tertiary Research Laboratory for Traditional Chinese Medicine Property & Efficacy, Changsha 410208, China; 3. Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Health Products and Life Technology, Changsha 410208, China)

KEY WORDS: *Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y. C. Dai & V. Papp; triterpenoids; content determination; two reference substances for determination of multiple components method; two reference substances for linear correction method

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y. C. Dai & V. Papp 的干燥菌核^[1-2], 其味甘、性平, 具有利水渗湿、健脾、宁心等功效^[3], 在中药复方中使用频率很高^[4]。茯苓菌核因入药部位不同, 可分为白茯苓、赤茯苓、茯苓皮、茯神等, 活性成分存在差异, 药效和临床应用也各有侧

重^[5-6]。三萜是茯苓主要活性成分之一^[7], 具有安神^[8-9]、抗肿瘤^[10-11]、抗炎^[12-13]、抗癫痫^[14]、抗氧化^[15]、免疫调节^[16-17]等活性, 常被视为评价该药材质量的重要指标。

随着中医药产业发展, 茯苓野生资源已无法满足市场需求, 而栽培品质量受品种来源、生长环

收稿日期: 2025-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(81973211/C0033375); 湖南省自然科学基金(2024JJ8168); 长沙市自然科学基金(kq2402180); 湖南中医药大学研究生创新课题(校行研字[2023]21号-2023CX139); 湖南中医药大学“十四五”重点学科群——生物工程学科(校行发规字[2023]2号)

作者简介: 丁 婵, 硕士生, 研究方向为菌物药活性物质挖掘及其生物合成。E-mail: 1779536770@qq.com

* 通信作者: 肖作为, 副教授, 硕士生导师, 从事中药资源综合开发研究。E-mail: xiaozw2009@163.com

崔培梧, 副教授, 硕士生导师, 从事中药和菌物药药效物质挖掘、质量控制研究。E-mail: cuipeiwu@126.com

境、加工方式等因素影响^[18]。目前, 茯苓质量标准滞后于行业需求, 2020年版《中国药典》仅记载其鉴别项, 未见有效成分含量测定项^[3], 难以进行整体质量评价。随着中药质量评价方法由单一成分向多指标成分转变^[19], 对照品供需矛盾逐渐突出, 双标多测法^[20-21]作为中药标准物质替代技术可有效解决这一问题, 即先采用1个对照品, 以相对校正因子法定量, 再增加1个对照品, 采用双标线性校正法定性, 既降低了成本, 又使定性结果更准确, 适用性更广。

本实验在课题组前期研究^[6,18,22]基础上, 建立双标多测法同时测定11批不同产地和种类茯苓中13种三萜的含量, 旨在为该药材质量控制与评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪及 XDB-C₁₈、Zorbax-SB-C₁₈、Zorbax-Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm) (美国 Agilent 公司); Wyeal 3100 高效液相色谱仪 (安徽皖仪科技股份

有限公司); Waters 1525 高效液相色谱仪及 Symmetry-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)、WAT054725 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 (美国 Waters 公司); EX224ZH 电子分析天平 (美国 OHAUS 公司); JS-40 超声波清洗仪 (常州鸿泽实验科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 茯苓新酸 B、茯苓新酸 A、去氢茯苓酸、松苓新酸、茯苓酸对照品 (纯度 ≥ 98%, 批号 140723、140314、140903、140902、140212, 成都克洛玛生物科技有限公司); 去氢土莫酸对照品 (纯度 ≥ 98%, 批号 AF21032, 成都埃法生物科技有限公司); 6α-羟基猪苓酸 C、土莫酸、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸 C、3-表去氢土莫酸、齿孔酸、去氢齿孔酸对照品 (纯度 ≥ 98%, 货号 CRN0225、CRN0325、CRN0245、CRN0251、CRN0307、CRN0398、CRN0486, 湖北萃园生物科技股份有限公司)。茯苓经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为正品, 具体见表1。乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为纯净水。

表1 茯苓信息

Tab. 1 Information of *W. hoelen*

编号	药用部位	生产企业	产地	批号
S1	茯苓皮	安徽三义堂中药饮片有限公司	云南	2103009
S2	茯苓皮	四川藏曦堂生物科技有限公司	四川	20211109
S3	茯苓皮	亳州市泽信堂药业有限公司	云南	20211103
S4	赤茯苓	深圳市龙岗区杞仙堂食品商行	安徽	20220213
S5	赤茯苓	北京同仁堂国药有限公司	安徽	20220928
S6	白茯苓	康美药业股份有限公司	湖南	210315011
S7	白茯苓	云南国鹤药业有限公司	云南	2107008
S8	白茯苓	岳阳天香中药饮片有限公司	云南	202111107
S9	茯神	康美药业股份有限公司	湖南	220101541
S10	茯神	四川藏曦堂生物科技有限公司	云南	20220318
S11	茯神	安徽三义堂中药饮片有限公司	安徽	22070101

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相水 (含 0.3% 磷酸) (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 50% ~ 53% B; 20 ~ 39 min, 53% B; 39 ~ 43 min, 53% ~ 62% B; 43 ~ 47 min, 62% B; 47 ~ 70 min, 62% ~ 92% B; 70 ~ 80 min, 92% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 242 nm (0 ~ 35、42 ~ 65、67 ~ 76、78 ~ 80 min)、203 nm (35 ~ 42、65 ~ 67、76 ~ 78 min); 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 甲醇溶解, 制成分别含 6α-羟基猪苓酸 C 0.036 mg/mL、茯苓新酸 B 0.052 mg/mL、去氢土莫酸 0.031 7

mg/mL、土莫酸 0.114 mg/mL、茯苓新酸 A 0.07 mg/mL、3-表去氢茯苓酸 0.058 mg/mL、猪苓酸 C 0.018 mg/mL、3-表去氢土莫酸 0.13 mg/mL、去氢茯苓酸 0.045 mg/mL、茯苓酸 0.19 mg/mL、松苓新酸 0.146 2 mg/mL、去氢齿孔酸 0.126 mg/mL、齿孔酸 0.07 mg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取药品粉末 2.0 g (过 60 目筛), 置于 100 mL 干燥具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声 (240 W, 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 过滤, 茯苓皮、赤茯苓滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得; 白茯苓、茯神滤液先蒸干, 载用甲醇定容至 2.0 mL, 过 0.22 μm 微孔

滤膜, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2”项下对照品溶液适量, 在“2.1”项色谱条件下分别进样1、10、20、30、40、50 μL 测定。以对照品进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归, 结果见表2, 可知各三萜在各自范围内线性关系良好。

表2 各三萜线性关系

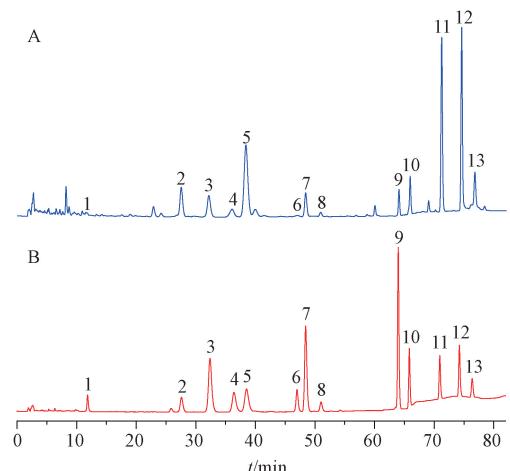
Tab. 2 Linear relationships of various triterpenoids

成分	回归方程	R^2	线性范围/ μg
6 α -羟基猪苓酸 C	$Y=228.74X+3.843$ 9	0.999 3	0.036~1.8
茯苓新酸 B	$Y=718.39X-4.201$ 6	0.999 7	0.052~2.6
去氢土莫酸	$Y=2.025.7X+3.004$ 1	1.000 0	0.031 7~1.583
土莫酸	$Y=480.32X+12.706$	0.999 2	0.114 0~5.7
茯苓新酸 A	$Y=1.349.7X-5.381$ 1	0.999 7	0.07~3.5
3-表去氢茯苓酸	$Y=471.52X-3.368$ 7	0.999 8	0.058~2.9
猪苓酸 C	$Y=2.102.9X-5.705$ 8	0.999 9	0.018~0.9
3-表去氢土莫酸	$Y=203.08X-6.035$ 4	0.999 8	0.13~6.5
去氢茯苓酸	$Y=1.394.5X-10.035$	0.999 9	0.045~2.25
茯苓酸	$Y=521.79X-8.236$ 8	1.000 0	0.19~9.5
松苓新酸	$Y=783.64X-10.245$	1.000 0	0.146 2~7.311 5
去氢齿孔酸	$Y=747.05X-6.387$ 5	1.000 0	0.126 0~6.3
齿孔酸	$Y=321.27X+1.055$ 1	0.999 5	0.07~3.5

2.4.2 专属性考察 取对照品、供试品溶液及甲醇适量, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图1。由此可知, 各成分色谱峰保留时间基本一致, 紫外吸收光谱高度吻合, 分离度均大于1.5, 表明该方法专属性良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(S1), 在“2.1”项色谱条件下进样测定6次, 测得6 α -羟基猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸 C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸峰面积 RSD 分别为1.16%、1.96%、0.66%、2.76%、0.50%、0.76%、1.62%、2.14%、1.24%、2.43%、0.60%、0.72%、2.27%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一批样品(S1), 按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以茯苓酸为参照, 测得6 α -羟基猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸 C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸峰面积 RSD 分别为1.89%、2.34%、2.51%、2.42%、2.36%、2.41%、1.37%、2.68%、1.07%、1.60%、1.83%、1.29%, 表明该方法重复性良好。



1. 6 α -羟基猪苓酸 C
 2. 茯苓新酸 B
 3. 去氢土莫酸
 4. 土莫酸
 5. 茯苓新酸 A
 6. 3-表去氢茯苓酸
 7. 猪苓酸 C
 8. 3-表去氢土莫酸
 9. 去氢茯苓酸
 10. 茯苓酸
 11. 松苓新酸
 12. 去氢齿孔酸
 13. 齿孔酸
1. 6 α -hydroxyporoic acid C
 2. poricoic acid B
 3. dehydrotumulosic acid
 4. tumulosic acid
 5. poricoic acid A
 6. 3-epidehydropachymic acid
 7. polyporenic acid C
 8. 3-epidehydrotumulosic acid
 9. dehydropachymic acid
 10. pachymic acid
 11. dehydrotramentenolic acid
 12. dehydroeburicoic acid
 13. eburicoic acid

图1 茯苓皮(A)、对照品(B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Wolfiporia Cutis* peel (A) and reference substances (B)

2.4.5 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液(S1), 于0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得6 α -羟基猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 A、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸峰面积 RSD 分别为2.06%、2.45%、2.24%、2.96%、1.92%、1.97%、1.06%、0.65%、2.44%、1.07%、1.93%、1.57%、1.79%, 表明溶液在24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取各三萜含量已知的药材(S1)适量, 以1:1比例加入对照品溶液, 按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 6 α -羟基猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸 C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸平均加样回收率分别为99.77%、102.98%、104.22%、101.23%、104.43%、101.02%、103.99%、101.35%、102.59%、102.46%、104.20%、104.60%、104.40%, RSD 分别为2.84%、0.77%、0.47%、1.31%、0.22%、2.27%、

0.38%、1.03%、1.12%、2.88%、0.16%、0.20%、0.27%。

2.5 双标线性校正法

2.5.1 相对校正因子计算 取对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下分别进样1、5、10、20、

25、30、40、50 μL测定，以茯苓酸为内标计算相对校正因子 f ，公式为 $f = f_i/f_s = (A_i/W_i) / (A_s/W_s)$ ，其中 A_i 为待测成分峰面积， W_i 为待测成分含量， A_s 为内标峰面积， W_s 为内标含量。由表3可知，各三萜相对校正因子RSD均小于3%。

表3 各三萜相对校正因子

Tab. 3 Relative correlation factors of various triterpenoids

进样量/μL	$f_{6\alpha\text{-羟基猪苓酸C/茯苓酸}}$	$f_{\text{茯苓新酸B/茯苓酸}}$	$f_{\text{去氢土莫酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{土莫酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{茯苓新酸A/茯苓酸}}$	$f_{3\text{-表去氢茯苓酸/茯苓酸}}$
1	0.436 2	1.369 0	3.875 3	0.911 2	2.571 6	0.899 9
5	0.451 8	1.376 8	3.907 8	0.945 8	2.618 0	0.911 6
10	0.448 6	1.388 7	3.921 6	0.933 9	2.565 2	0.891 2
20	0.459 2	1.400 4	3.916 0	0.956 3	2.640 2	0.913 4
25	0.469 8	1.308 6	3.917 1	0.927 4	2.543 9	0.887 9
30	0.432 3	1.365 8	4.030 3	0.941 6	2.489 6	0.888 9
40	0.455 0	1.316 2	3.926 0	0.918 3	2.465 7	0.885 9
50	0.456 1	1.388 1	3.929 2	0.914 9	2.539 7	0.871 1
平均值	0.451 1	1.364 2	3.927 9	0.931 2	2.554 3	0.893 7
RSD/%	2.7	2.49	1.14	1.73	2.3	1.57
进样量/μL	$f_{\text{猪苓酸C/茯苓酸}}$	$f_{3\text{-表去氢土莫酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{去氢茯苓酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{松苓新酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{去氢齿孔酸/茯苓酸}}$	$f_{\text{齿孔酸/茯苓酸}}$
1	4.025 5	0.386 0	2.671 6	1.500 9	1.431 8	0.610 5
5	4.036 9	0.390 3	2.668 6	1.502 8	1.432 9	0.621 8
10	3.994 5	0.388 3	2.652 7	1.501 6	1.432 3	0.633 5
20	4.022 9	0.389 5	2.668 3	1.502 1	1.433 1	0.613 4
25	3.969 7	0.370 2	2.638 8	1.496 1	1.431 8	0.619 7
30	4.147 3	0.366 7	2.642 0	1.510 3	1.462 5	0.589 6
40	3.956 4	0.376 6	2.626 1	1.582 0	1.476 0	0.618 3
50	3.929 4	0.363 4	2.655 3	1.501 2	1.434 9	0.621 4
平均值	4.010 3	0.378 9	2.652 9	1.512 1	1.441 9	0.616
RSD/%	1.67	2.91	0.62	1.89	1.2	2.05

2.5.2 不同体积流量对相对校正因子的影响 取“2.2”项下对照品溶液适量，考察不同体积流量(0.8、1、1.2 mL/min)。结果， 6α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸相对校正因子分别为0.468 7、1.339 8、3.918 7、0.934 1、2.462 8、0.855 9、3.999 1、0.349 9、2.666 9、1.502 3、1.436 9、0.626 1，RSD分别为0.83%、1.62%、0.83%、0.63%、0.93%、2.42%、1.4%、1.19%、2.16%、0.54%、0.38%、1.18%，表明体积流量对其无明显影响。

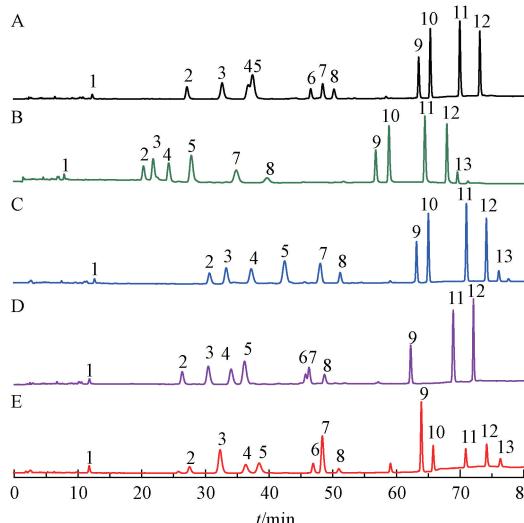
2.5.3 不同柱温对相对校正因子的影响 取“2.2”项下对照品溶液适量，考察不同柱温(20、25、30 °C)。结果， 6α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸相对校正因子分别为0.460 9、1.331 4、3.934 4、0.942 9、2.499 6、0.893 1、4.016 1、0.345 9、2.636 5、1.500 5、1.443 2、0.626 8，RSD分别为1.42%、1.2%、

1.4%、1.27%、2.02%、1.41%、0.31%、0.47%、1.19%、0.5%、0.51%、1.33%，表明柱温对其无明显影响。

2.5.4 不同仪器对相对校正因子的影响 取“2.2”项下对照品溶液适量，考察2台高效液相色谱仪(Agilent 1200、Wayeal 3100)。结果， 6α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸相对校正因子分别为0.481 3、1.326 5、3.877 8、0.931 7、2.473 5、0.875 6、4.014 2、0.351 7、2.652 9、1.543 4、1.473 7、0.639 7，RSD分别为3.89%、1.20%、0.11%、0.76%、1.72%、0.62%、0.42%、2.28%、2.80%、4.38%、3.70%、1.52%，表明仪器对其无明显影响。

2.5.5 不同色谱柱对相对校正因子的影响 取“2.2”项下对照品溶液适量，考察5种色谱柱(Agilent XDB-C₁₈、Agilent-Zorbax-SB-C₁₈、Waters Symmetry-C₁₈、Waters WAT054725、Agilent-Zorbax-Eclipse Plus-C₁₈)。由图2可知，Agilent-Zorbax-SB-C₁₈不能将土莫酸和茯苓新酸A完全分离，Waters

Symmetry-C₁₈、Waters WAT054725、Agilent-Zorbax-Eclipse Plus-C₁₈色谱柱不能将3-表去氢茯苓酸和猪苓酸C完全分离,而Agilent XDB-C₁₈色谱柱固定相极性适中,柱填料粒径合理,能更好地分离三萜,因此选择其进行分析。



注: A ~ E 分别为 Agilent-Zorbax-SB-C₁₈、Waters Symmetry-C₁₈、Waters WAT054725、Agilent-Zorbax-Eclipse Plus-C₁₈、Agilent XDB-C₁₈色谱柱。

1. 6 α -羟基猪苓酸 C
2. 茯苓新酸 B
3. 去氢土莫酸
4. 土莫酸
5. 茯苓新酸 A
6. 3-表去氢茯苓酸
7. 猪苓酸 C
8. 3-表去氢土莫酸
9. 去氢茯苓酸
10. 茯苓酸
11. 松苓新酸
12. 去氢齿孔酸
13. 齿孔酸
1. 6 α -hydroxyporoic acid C
2. poricoic acid B
3. dehydrotumulosic acid
4. tumulosic acid
5. poricoic acid A
6. 3-epidehydropachymic acid
7. polyporenic acid C
8. 3-epidehydrotumulosic acid
9. dehydropachymic acid
10. pachymic acid
11. dehydrotrametenolic acid
12. dehydroeburicoic acid
13. eburicoic acid

图2 不同色谱柱上HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms on different chromatographic columns

2.6 双标线性校正法

2.6.1 不同体积流量、柱温下线性关系 取“2.2”项下对照品溶液适量,采用不同体积流量及柱温,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品保留时间平均值(即标准保留时间^[23])为横坐标(X),实测保留时间为纵坐标(Y)进行回归。结果,不同条件下6 α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸均能很好地分离,标准保留时间分别为11.990、27.867、32.695、36.733、38.658、47.019、48.584、50.986、63.989、65.864、71.017、74.418、76.617 min,表

明其线性关系良好,见表4。

表4 各三萜在不同条件下保留时间线性关系

Tab. 4 Retention time linear relationships of various triterpenoids under different conditions

条件	线性方程	R ²
1 mL/min	$Y = 1.0034X - 0.4431$	1.0000
1.2 mL/min	$Y = 1.0257X - 4.9899$	0.9967
0.8 mL/min	$Y = 0.9665X + 5.9667$	0.9949
30 ℃	$Y = 0.9893X - 0.5374$	0.9998
20 ℃	$Y = 1.0152X + 0.004$	0.9999

2.6.2 保留时间预测 以6 α -羟基猪苓酸C、茯苓酸为双标,采用Waters 1525高效液相色谱仪分析对照品溶液,获得实测保留时间。以6 α -羟基猪苓酸C、茯苓酸标准保留时间为横坐标(X),实测保留时间为纵坐标(Y)进行拟合,将其余11种三萜的标准保留时间代入线性方程,得到预测保留时间,并与实测保留时间进行比较。结果,6 α -羟基猪苓酸C、茯苓酸标准保留时间分别为11.993、65.864 min,实测保留时间分别为12.598、65.321 min,线性方程为 $Y = 0.9787X + 0.8611$,茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸预测保留时间分别为28.134、32.860、36.812、38.695、46.879、48.410、50.761、63.487、70.365、73.694、75.846 min,与实测保留时间的相对偏差均小于5%,表明该方法可行。

2.6.3 与相对保留时间法比较 以茯苓酸色谱峰为参照,计算各三萜相对保留时间,并与双标线性校正法所得预测保留时间进行对比。由表5可知,双标线性校正法所得预测保留时间绝对偏差较低,波动较小,表明该方法预测精度更高,适用性更强。

表5 双标线性校正法与相对保留时间法比较

Tab. 5 Comparison of linear calibration with two reference substances method and relative retention time method

方法	最大相对偏差/min	最大绝对偏差/%
双标线性校正法	4.680	1.723
相对保留时间法	6.203	5.613

2.7 双标多测法与外标法比较 取对照品、供试品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,分别采用双标多测法、外标法计算含量。双标多测法计算公式为 $W_i = W_s \times A_i / f \times A_s$,其中 W_i 为待测成分含量, A_i 为待测成分峰面积, W_s 为内标含量, A_s 为内标峰面积, f 为待测成分与参照物,发现2种方法所得结果无显著差异($P > 0.05$),表明双标多测法准确可靠,见表6。

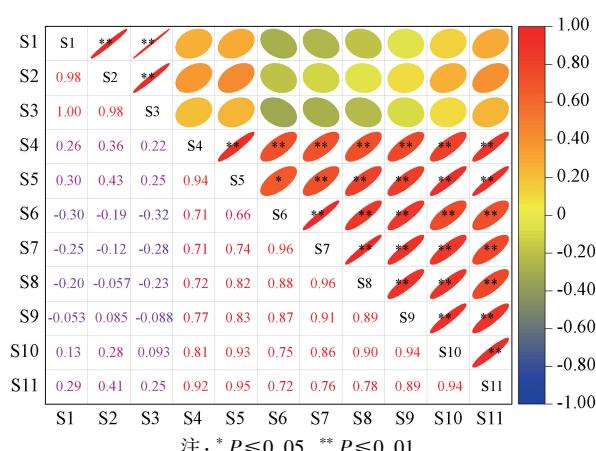
表6 各三萜含量测定结果 (mg/g)

Tab. 6 Content determination results of various triterpenoids (mg/g)

编号	药用部位	6 α -羟基猪苓酸 C		茯苓新酸 B		去氢土莫酸		土莫酸		茯苓酸
		外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法
S1	茯苓皮	1.057 9	1.078 6	5.868 1	5.919 2	1.392 9	1.393 1	2.928 4	2.987 5	4.332 6
S2	茯苓皮	0.898 6	0.923 1	3.351 4	3.401 3	0.864 4	0.866 6	1.779 6	1.842 9	3.978 3
S3	茯苓皮	1.151 4	1.223 2	6.117 1	6.260 5	1.476 4	1.494 3	2.914 3	3.068 8	4.241 1
S4	赤茯苓	0.153 4	0.158 1	0.999 8	1.011 2	0.325 3	0.323 9	1.515 7	1.519 1	1.573 1
S5	赤茯苓	0.126 1	0.137 0	0.850 5	0.859 0	0.220 5	0.220 6	1.100 5	1.117 0	2.020 6
S6	白茯苓	0.117 5	0.116 1	0.063 6	0.063 7	0.140 9	0.139 7	0.561 2	0.558 8	0.609 3
S7	白茯苓	0.153 4	0.151 0	0.087 7	0.088 1	0.114 7	0.113 8	0.420 9	0.419 6	0.762 6
S8	白茯苓	0.136 3	0.134 3	0.197 0	0.198 6	0.089 3	0.088 6	0.370 9	0.369 9	0.910 4
S9	茯神	0.112 6	0.112 9	0.091 6	0.0914	0.277 4	0.275 0	0.892 7	0.889 6	1.530 2
S10	茯神	0.215 9	0.215 4	0.213 6	0.214 4	0.196 0	0.194 7	0.596 8	0.599 6	1.665 1
S11	茯神	0.151 9	0.153 0	0.252 6	0.254 0	0.237 2	0.235 6	1.015 4	1.014 9	1.463 5
<i>t</i>		-1.747		-1.841		-0.573		-1.793		—
编号	药用部位	茯苓新酸 A		3-表去氢茯苓酸		猪苓酸 C		3-表去氢土莫酸		
		外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	
S1	茯苓皮	8.411 1	8.586 0	0.408 1	0.398 2	1.066 0	1.074 2	2.067 8	2.066 5	
S2	茯苓皮	5.293 0	5.403 7	0.240 5	0.227 4	0.808 0	0.813 3	1.486 9	1.465 5	
S3	茯苓皮	9.904 0	10.199 3	0.459 0	0.436 1	1.161 9	1.175 9	2.106 4	2.049 2	
S4	赤茯苓	0.251 2	0.253 6	0.213 1	0.212 9	0.242 3	0.243 4	1.232 7	1.257 2	
S5	赤茯苓	0.347 0	0.350 3	0.451 3	0.453 3	0.197 2	0.197 2	0.986 5	0.994 3	
S6	白茯苓	0.015 5	0.015 3	0.067 4	0.067 6	0.073 9	0.074 2	0.522 1	0.534 6	
S7	白茯苓	0.018 0	0.017 9	0.074 6	0.074 8	0.077 7	0.077 9	0.532 0	0.544 5	
S8	白茯苓	0.033 4	0.033 5	0.250 5	0.253 0	0.070 9	0.071 1	0.546 7	0.559 4	
S9	茯神	0.023 2	0.022 8	0.042 9	0.042 0	0.098 8	0.098 9	0.464 9	0.472 4	
S10	茯神	0.091 9	0.092 1	0.129 8	0.129 5	0.099 5	0.099 5	0.645 0	0.655 2	
S11	茯神	0.144 3	0.145 4	0.149 8	0.149 8	0.151 4	0.151 8	0.664 1	0.675 2	
<i>t</i>		-1.782		1.598		-1.952		-0.251		
编号	药用部位	去氢茯苓酸		松苓新酸		去氢齿孔酸		齿孔酸		
		外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	外标法	双标多测法	
S1	茯苓皮	1.042 7	1.041 7	14.855 8	14.857 7	14.750 5	14.759 4	7.984 1	8.061 6	
S2	茯苓皮	0.682 3	0.675 9	8.545 2	8.539 3	7.476 4	7.476 5	3.925 2	3.970 2	
S3	茯苓皮	0.964 2	0.952 8	15.039 3	15.154 1	15.836 4	15.968 9	8.344 0	8.513 3	
S4	赤茯苓	0.289 7	0.289 7	1.706 0	1.696 4	0.324 8	0.319 2	0.430 0	0.433 5	
S5	赤茯苓	0.355 6	0.354 5	1.717 4	1.706 0	0.393 5	0.385 1	0.350 4	0.355 1	
S6	白茯苓	0.143 5	0.144 2	0.117 3	0.115 5	0.017 1	0.016 0	0.034 0	0.034 4	
S7	白茯苓	0.182 8	0.183 8	0.165 3	0.163 2	0.022 3	0.021 2	0.031 6	0.032 0	
S8	白茯苓	0.208 3	0.209 5	0.268 5	0.265 8	0.029 3	0.028 2	0.047 7	0.048 1	
S9	茯神	0.293 7	0.295 0	0.524 4	0.519 3	0.073 2	0.070 9	0.137 5	0.138 3	
S10	茯神	0.326 6	0.327 8	0.935 7	0.928 1	0.182 5	0.178 8	0.239 0	0.240 5	
S11	茯神	0.265 8	0.266 5	1.284 0	1.275 5	0.343 9	0.339 5	0.307 5	0.309 3	
<i>t</i>		1.031		-0.513		-0.842		-1.731		

2.8 相似度评价 以各三萜含量为变量, 导入 Origin Pro 2021 软件进行相关性分析。图 3 中红色、蓝色分别表示正相关、负相关, 圆圈的朝向与颜色表示相关性, 圆圈越扁, 数值越大, 相关性越接近^[24-25], 可知 11 批样品分为茯苓皮 (S1~S3) 和其余样品 (S4~S11) 2 类; 同一药用部位均有较高的相似度, 茯苓皮为 0.98~1.00, 赤茯苓为 0.94, 白茯苓为 0.88~0.96, 茯神为 0.89~0.94, 表明药材产地差异较小。

2.9 聚类分析 以各三萜含量为变量, 导入 SPSS 26.0 软件, 以组间连接法、欧式距离为度量标准进行分析, 结果见图 4。由此可知, 聚类距离为 20 时 11 批样品聚为 2 类, 即茯苓皮 (S1~S3) 与其他样品, 与相似度分析一致; 其他样品又细分为赤茯苓 (S4~S5)、白茯苓 (S6~S8)、茯神 (S11) 3 类,



注: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

图3 茯苓相关系数图

Fig. 3 Correlation coefficient diagram for *W. hoelen*

表明不同部位中三萜含量存在较大差异, 而聚类距离为 5 时, 产自四川的 S2 与产自云南的 S1、S3 被

归为2类,表明药材质量具有一定地域差异。

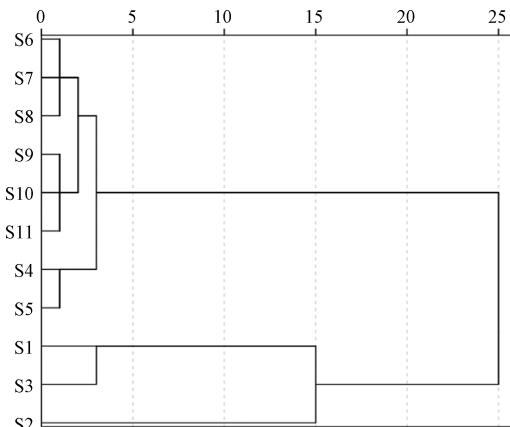


图4 茯苓聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis plot for *W. hoelen*

3 讨论与结论

本实验建立HPLC法测定13种茯苓三萜(6α -羟基猪苓酸C、茯苓新酸B、去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸A、3-表去氢茯苓酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸、齿孔酸)的含量,并在此基础上选择易得、稳定的 6α -羟基猪苓酸C和茯苓酸作为双标。由于多个色谱柱无法将目标成分对应的色谱峰完全分离,故本实验根据不同体积流量、柱温下的数据进行定位。目标成分的准确定位是含量测定的前提,双标线性校正法能较好地预测色谱峰保留时间,相比于相对保留时间法更准确,偏差更小,适用范围更广泛,而且与常规外标法所得结果无明显差异。另外,本实验考察的三萜较多,因此外标法所需对照品数量多,成本高,而双标多测法完美解决了这一问题,先用1个对照品进行定量,再用1个对照品进行定性,大大降低了检测成本,减少了操作步骤,定性结果更准确,适用性更广,可为茯苓全面质量控制提供新思路。

参考文献:

- [1] 董晓旭,刘艺,蔡梦如,等.经典名方中茯苓的本草考证[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(12):176-181.
- [2] 厉晓,龚婕,丁婵,等.茯苓多糖的结构、活性及其构效关系研究进展[J].中草药,2025,56(1):305-317.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:251.
- [4] 赵佳琛,王艺涵,金艳,等.经典名方中茯苓的本草考证[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(10):327-336.
- [5] 张建逵,窦德强,王冰,等.茯苓类药材的本草考证[J].时珍国医国药,2014,25(5):1181-1183.
- [6] 占慧慧,邓丹,刘媛,等.基于指纹图谱和网络药理学的茯苓4个药用部位饮片质量标志物预测分析[J].中国药学杂志,2023,58(10):891-907.
- [7] 浦雪梅,李雪,何旭东,等.药食同源大品种茯苓中多糖与三萜研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(7):2561-2573.
- [8] He B W, Chen Y Y, Yu S S, et al. Food plant extracts for sleep-related skin health: Mechanisms and prospects[J]. *Food Biosci*, 2022, 49: 101951.
- [9] Kumar V S, Shik S N, Soo M C, et al. *Poria cocos* ethanol extract and its active constituent, pachymic acid, modulate sleep architectures via activation of GABA_A-ergic transmission in rats[J]. *J Biomed Res*, 2015, 16(3): 84-92.
- [10] Jiang Y, Fan L P. Evaluation of anticancer activities of *Poria cocos* ethanol extract in breast cancer: *In vivo* and *in vitro*, identification and mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112851.
- [11] Leslie G, Zaisen W, Jan G, et al. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(4): 1153-1161.
- [12] Lee Y H, Lee N H, Bhattacharjee G, et al. Anti-inflammatory effect of pachymic acid promotes odontoblastic differentiation via HO-1 in dental pulp cells[J]. *Oral Dis*, 2013, 19(2): 193-199.
- [13] 吕婷婷,王妍妍,张越,等.茯苓皮总三萜大孔树脂纯化工艺及体外抗炎活性研究[J].安徽中医药大学学报,2023,42(6):86-92.
- [14] Gao Y Q, Yan H, Jin R R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from *Poria cocos* is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(11): 2528-2535.
- [15] Gao C Q, Chen M F, Wei X, et al. The effects of different processing treatments to active ingredients, nutrients, volatile components and antioxidant activity in *Poria cocos* Wolf[J]. *Nat Prod Res*, 2024, 12: 1-9.
- [16] 林嘉.茯苓总三萜免疫抑制及诱导人结肠癌RKO细胞凋亡的研究[D].广州:南方医科大学,2016.
- [17] Chao C L, Huang H W, Su M H, et al. The lanostane triterpenoids in *Poria cocos* play beneficial roles in immunoregulatory activity[J]. *Life*, 2021, 11(2): 111.
- [18] 占慧慧,丁婵,彭思源,等.茯苓皮与白茯苓中三萜类成分的HPLC指纹图谱与化学模式识别研究[J].天然产物研究与开发,2023,35(9):1469-1479.
- [19] 孟宪生,罗曦,贾梦楠,等.中药质量评价研究现状及“质-量”双标评价方法探讨[J].中草药,2023,54(22):7281-7286.
- [20] 果佳慧,高乐,甄亚钦,等.双标多测法同时测定地胆草中11种成分的含量[J].中成药,2024,46(11):3557-3564.
- [21] 陈晶,陈有根,王京辉,等.双标多测法同时测定参苏感冒片中8个成分[J].中国新药杂志,2023,32(1):86-92.
- [22] 占慧慧,黄丹,邓丹,等.基于一测多评策略的茯苓不同部位三萜酸分析研究[J].药物分析杂志,2023,43(6):1061-1074.
- [23] 刘欣桐,于现花,刘军玲,等.绿梅花中4种成分双标多测法的建立[J].中国现代应用药学,2023,40(5):613-618.
- [24] 万林春,赵雯,许妍,等.双标多测法在柏子养心丸5个成分含量测定中的应用[J].药物分析杂志,2021,41(1):138-146.
- [25] 孟俊华,丁婵,彭思源,等.一测多评法同时测定锁阳中7种成分含量[J].药学学报,2023,58(9):2763-2770.