

基于“体外-体内”多维化学物质组关联网络的茯苓质量标志物发现及质量评价研究

孙宇飞¹, 甄晓宇^{1,2}, 刘天舒³, 刘舒¹, 刘忠英³, 宋凤瑞¹, 刘志强^{1*}

1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150000

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130012

摘要:目的 以“体外-体内”多维化学物质组关联网络为基础, 结合体内药动学研究, 明确茯苓药效质量标志物, 并建立质量标志物的高效液相色谱-串联质谱定量方法, 进行茯苓药材质量评价。方法 以薯蓣皂苷为内标, 建立茯苓三萜类成分的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UHPLC-MS/MS)定量分析方法, 绘制体内药效成分的药动学曲线, 以此为依据明确茯苓药效质量标志物主要包括去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 B 等 7 种成分。检测 10 批茯苓药材中含量较高的成分和质量标志物的质量分数, 并分别以质量分数较高成分、质量分数较高或药效质量标志物为变量进行 10 批茯苓药材的聚类分析。结果 以不同指标为变量进行聚类分析评价茯苓药材质量时, 结果存在差异。结论 仅以质量分数较高的成分进行茯苓质量控制的方法在一定程度上存在片面性。为了全面精准的控制茯苓质量, 需要充分考虑茯苓体内外成分变化和体内动力学过程, 选取真正与药效相关的药效质量标志物用于其质量控制。

关键词: 茯苓; 化学物质组; “体外-体内”关联网络; 质量标志物; 质量评价; 去氢土莫酸; 土莫酸; 茯苓新酸 B

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4562-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.006

Discovery of quality markers and quality evaluation of *Poria cocos* based on “*in vitro-in vivo*” multidimensional chemical group associated network

SUN Yu-fei¹, ZHEN Xiao-yu^{1,2}, LIU Tian-shu³, LIU Shu¹, LIU Zhong-ying³, SONG Feng-rui¹, LIU Zhi-qiang¹

1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

2. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China

Abstract: Objective The quality markers of *Poria cocos* were identified based on the “*in vitro-in vivo*” multidimensional chemical group associated network and *in vivo* pharmacokinetics, and the mass spectrometry method for quantitative detection of quality markers was established to evaluate the quality of *P. cocos*. **Methods** A quantitative analysis method of triterpenoids in *P. cocos* was established by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadruple tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) while dioscin was chosen as internal reference substance. The pharmacokinetic curves of active ingredients *in vivo* were drawn. Seven quality markers of *P. cocos* including dehydrotumulosic acid, tumulosic acid, and poricoic acid B were identified based on the results of pharmacokinetics. The content of high content components and quality markers in 10 batches of *P. cocos* were detected and used as variables for cluster analysis of 10 batches of *P. cocos*. **Results** There were differences in the results of clustering analysis with different indexes as variables in evaluating the quality of *P. cocos*. **Conclusion** To a certain extent, the method of quality control of *P. cocos* with high content components is one-sided. In order to comprehensively and accurately control the quality of *P. cocos*, it is necessary to take into full account the *in vivo* and *in vitro* changes and the *in vivo* dynamic process of *P. cocos* composition, and select the effective quality markers related to its pharmacodynamics for its quality control.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; chemomics; “*in vitro-in vivo*” associated network; quality marker; quality evaluation; dehydrotumulosic acid; tumulosic acid; poricoic acid B

收稿日期: 2019-09-15

基金项目: 国家自然科学基金重点基金资助项目(81530094)

作者简介: 孙宇飞, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: (0431)85262237 E-mail: mslab19@ciac.ac.cn

*通信作者 刘志强, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础、作用机制及中药质量控制研究。Tel: (0431)85262236 E-mail: liuzq@ciac.ac.cn

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,味甘、淡,性平。始载于《神农本草经》,具有利水渗湿、健脾、宁心之功效。用于水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠等症的治疗。作为传统的补益类中药,茯苓既是一种传统的中药材,也是我国珍贵的营养保健益寿食品,因此具有广泛的学术研究价值。

现代药理学和药理学研究表明,茯苓主要活性成分为多糖和三萜类化合物,两者均具有抗肿瘤、抗衰老、抗炎等多方面的药理作用,被广泛应用于临床治疗中^[1-3]。但迄今为止,茯苓的质控标准尚不完善,《中国药典》2015 年版收载的其质量标准无一般质量分数测定指标,缺乏切实可行的质量控制方法^[4]。因此,茯苓质量标准及质量控制方法的研究成为众多学者的关注焦点。为了有效控制茯苓的内在质量,一些以 HPLC、UPLC 或 LC-MS 为核心技术的方法已被报道,它们多侧重于 10 个以内质量分数较高的三萜酸的质量分数测定或特征图谱研究^[5-8]。但这些研究中所选取的质量指标成分仅以其质量分数高低作为依据,尚未与茯苓的有效性 & 体内过程相关联,难以客观反映茯苓质量与疗效的关系。

刘昌孝院士^[9]针对中药生物属性、制造过程及配伍理论等自身医药体系的特点,于 2016 年率先提出了中药质量标志物(Q-marker)的概念,近几年,基于这一重要概念,学者们陆续开展了中药质量标志物的相关研究^[10-12],在完善中药质量控制体系方面起到了巨大的推动作用。

本研究拟在课题组前期关于茯苓“体外-体内”多维化学物质组关联网络关联分析的基础上,结合体内药效成分的药动力学研究,确定茯苓的质量标志物。并建立基于超高效液相色谱-串联质谱技术的茯苓质量控制方法,以期为茯苓的质量评价探索新途径。

1 仪器与材料

超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(UHPLC-MS/MS) LCMS-8050(日本 Shimadzu 公司); Waters BEH C₁₈ 超高效液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Allegra X-30R 台式高速冷冻离心机(贝克曼库尔特实验系统,苏州公司产品); HSC-24A 水浴氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

对照品茯苓酸(质量分数>98.0%,批号 PS0545-0025MG)、松苓新酸(质量分数>98.0%,

批号 PS0533-0020MG)、16α-羟基松苓新酸(质量分数>99.0%,批号 PS1069-0025MG)、猪苓酸 C(质量分数>95.0%,批号 PS1087-0025MG)、茯苓新酸 B(质量分数>95.0%,批号 B25590-10MG)、去氢土莫酸(质量分数>98.0%,批号 PS1095-0025MG)、薯蓣皂苷(质量分数>98.0%,批号 PS0922-0025MG)均购于成都克洛玛生物科技有限公司,供含量测定用。乙腈、甲醇均为色谱纯(Fisher 公司),水为超纯水。

茯苓样品购自安徽亳州药材市场、河北安国药材市场。共收集 10 批次样品,样品 1~5 来自安徽,6~10 来自湖北,经吉林省中医药科学院黄青教授鉴定为茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,符合《中国药典》2015 年版各项规定。

雄性 SD 大鼠,体质量(300±20)g,大连医科大学供应,动物许可证号 SCXK(辽)2015-0001。

2 方法

2.1 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 超高效液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以 0.1%甲酸(A)和乙腈(B)为流动相。梯度洗脱:0~5 min,40%~56% B;5~11 min,56% B;11~16 min,56%~70% B;16~22 min,70%~90% B;22~23 min,90%~100% B。体积流量为 0.3 mL/min;柱温 40℃;进样体积 10 μL。在该色谱条件下,各成分基本可以达到良好分离,满足定量要求,质谱提取离子流图见图 1。

2.2 质谱条件

雾化气(空气)体积流量 3.0 L/min、干燥气(氮气)体积流量 10.0 L/min、加热气(氮气)体积流量 10.0 L/min、ESI 接口电压 3.0 kV、接口温度 300℃、脱溶剂管(DL)温度 250℃、离子规(IG)真空度 4.4×10⁻⁴ Pa、皮拉尼真空规(PG)真空度 150 Pa。停顿和暂停时间都设置为 5 ms。每个化合物的三重四极杆质谱多反应检测(MRM)条件见表 1。

2.3 对照品溶液的制备

精确称量一定量的茯苓酸、松苓新酸、16α-羟基松苓新酸、猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸对照品,置于 2 mL 量瓶中,用甲醇溶解,得到 1 mg/mL 的储备液。分别用甲醇稀释得到质量浓度为 2.5、5、10、25、50、100、250、500、1 000、5 000、10 000、20 000 ng/mL 工作溶液,用于标准曲线制作。制备了 10、100、1 000 ng/mL 3 种质量浓度的质控(QC)样品。薯蓣皂苷内标溶液按照相同的方法制备。

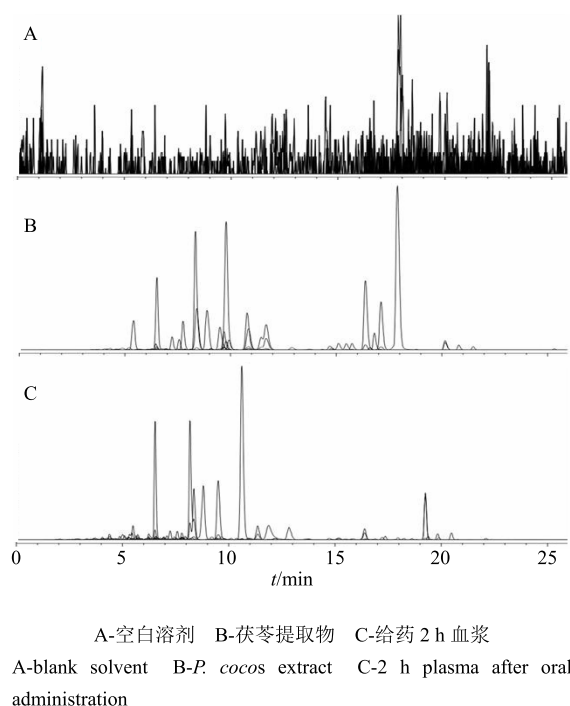


图 1 各组分的质谱提取离子流图

Fig. 1 Extraction ion chromatograms of analytes

2.4 茯苓供试品溶液的制备

精密称定茯苓粉末 1 g (过 40 目筛), 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 95%乙醇, 称定质量, 室温超声提取 30 min, 补足减失质量, 摇匀、滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.5 血浆供试品溶液的制备

药动学研究所需茯苓冻干粉按照“2.4”项下方法提取, 浓缩后冷冻干燥得到茯苓提取物冻干粉。将茯苓提取物冻干粉用双蒸水复溶并 ig 给予大鼠 (7.5 g/kg)。SD 大鼠于标准实验室条件 [温度 (25±2) °C; 湿度 (50±5) %] 饲养 1 周, 给予充足的食物和水。实验前禁食 12 h, 仅提供水。所有实验程序均按照《实验室动物护理和使用指南》执行。给药 0、0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24、48 h 后眼眶静脉丛取血。血浆样品以 5 000 r/min 离心 10 min 后, 置于-20 °C 保存。

所有样品 (-20 °C) 在室温下解冻。10 μL 薯蓣皂苷对照品 (2.5 μg/mL) 添加到 100 μL 血浆样品中涡旋混合均匀。用 0.8 mL 正丁醇 (-20 °C) 萃

表 1 茯苓三萜酸类成分三重四极杆定量分析质谱条件

Table 1 Mass spectrometry parameters for quantitative analysis of triterpenic acid components in *P. cocos* by triple quadrupole mass spectrometry

化合物名称	MRM 通道 (<i>m/z</i>)	第一个四级杆电压/V	碰撞电压/V	第三个四级杆电压/V
	前体离子>产物离子			
去氢土莫酸	529.20>483.30	34	21	34
茯苓酸	527.30>465.25	32	38	34
土莫酸	485.20>423.25	34	38	34
猪苓酸 C	481.30>311.20	30	34	32
茯苓新酸 B	483.50>409.25	34	29	28
氢化松苓酸	455.20>339.40	17	35	24
3-表-(3'-羟基-3'-甲基戊二氧基)-去氢土莫酸	627.20>483.30	24	30	30
16α-羟基松苓新酸	469.30>407.40	28	42	13
松苓新酸	453.30>337.20	22	35	17
25-羟基茯苓新酸 C	497.10>467.20	30	30	24
6-羟基猪苓酸	497.30>423.20	28	32	13
茯苓新酸 A	497.30>419.15	20	36	25
29-羟基去氢茯苓酸	541.30>75.00	31	39	16
16α-羟基氢化松苓酸	471.20>407.35	34	37	28
3β- <i>p</i> -羟基苯甲酰去氢土莫酸	603.20>559.40	24	38	26
3-乙酰基-羟基松苓新酸	511.20>451.35	30	36	20
6α-羟基去氢茯苓酸	541.30>59.20	30	44	24
去氢茯苓酸	525.30>59.05	32	43	24
薯蓣皂苷	867.40>721.20	15	32	18

取 10 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机溶剂氮吹蒸干。复溶于 100 μ L 甲醇, 14 000 r/min 离心 10 min, 即得药动力学测定样品。

2.6 标准曲线

分别精密吸收“2.3”项下的混合对照品溶液 20 μ L, 注入 UHPLC-MS/MS, 按上述色谱、质谱条件测定, 记录峰面积, 以进样质量浓度为横坐标 (X),

对照品和内标峰面积比值为纵坐标 (Y), 用最小二乘法进行线性回归, 得到各成分的回归方程及线性范围。按信噪比 3:1 和 10:1 分别计算各成分的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果见表 2, 6 种茯苓三萜酸成分在线性范围内线性良好, 灵敏度高。无对照品的成分利用相同结构类型的对照品标准曲线计算相对浓度。

表 2 茯苓三萜酸类成分的线性关系和检测灵敏度

Table 2 Linear regression equation and detection sensitivity of triterpenic acid components in *P. cocos*

化合物名称	回归方程	r^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
去氢土莫酸	$Y=0.408\ 0\ X+1.730$	0.992	10~20 000	0.20	10.0
茯苓酸	$Y=0.575\ 0\ X+0.399$	0.995	5~20 000	0.20	5.0
猪苓酸 C	$Y=0.344\ 0\ X+0.229$	0.995	5~10 000	1.00	5.0
茯苓新酸 B	$Y=1.669\ 0\ X+3.352$	0.998	5~20 000	0.05	1.0
16 α -羟基松苓新酸	$Y=0.308\ 0\ X+0.451$	0.995	2~10 000	0.01	0.1
松苓新酸	$Y=0.083\ 2\ X+0.251$	0.996	2~20 000	0.01	0.1

2.7 精密度和准确度试验

通过对 3 个不同水平的 QC 样品进行分析, 评价日内、日间的准确度和精密度。1 d 内测定 QC 样品的回收率和变异系数 (CV) ($n=6$) 分别表示日内准确度和精密度。连续 3 d 测定其日间准确度和精密度 ($n=18$)。日内精密度 (RSD) 在 0.5%~12.9%, 日内准确度 (RE) 在 -2.72%~12.66%, 日间精密度 (RSD) 在 0.55%~14.18%, 日间准确度 (RE) 在 -13.06%~13.20%。结果表明, 该方法的精密度和准确度符合标准可用于定量分析。

2.8 稳定性试验

通过对 3 个不同水平的 QC 样品在室温下每 8 h 分析 1 次, 分析 48 h 以上, 评价自动采样器的贮存稳定性, 即短期贮存稳定性。此外, 还用 QC 样品 ($n=6$) 考察了 3 次反复冻融的稳定性和长期贮存 (-20 $^{\circ}$ C, 30 d) 稳定性。结果表明, 不同贮存条件下的所有分析物在血浆样品中均保持稳定, 未发生明显降解。

2.9 加样回收率和基质效应试验

空白血浆样品 ($n=6$) 按样品制备部分所述处理, 有机层氮吹制备血浆基质。然后将标准工作液加入上述干燥的血浆基质中, 得到与 QC 样品浓度相同的基质 QC 样品。将基质 QC 样品的平均峰面积与 QC 样品 (溶于甲醇) 的平均峰面积进行比较, 得到基质效应。QC 样品 (溶解于空白血浆中, $n=6$) 按照样品制备部分的描述进行处理, 以评价萃取

效率。它可以描述为 QC 样品 (溶解于空白血浆中) / 基质 QC 样品的平均峰面积。在 10、100、1 000 ng/mL 质量浓度下, 分析物的萃取回收率分别为 83.60%~95.86%、86.88%~103.76% 和 84.32%~108.35%。3 个水平的 RSD 均低于 15%, 说明样品制备效果良好。在 LC-MS 中, 基质中共洗脱组分的存在可以增强或抑制分析物的电离, 即基质效应。基质对分析物的干扰低于 15%, 说明基质效应在当前方法可以忽略。

3 结果

3.1 茯苓体内外多维化学物质组辨识

针对茯苓三萜类成分质量分数低、结构相似、同分异构体多、对照品缺乏等问题, 本课题组提出了一种超高效液相色谱-离子淌度-质谱结合 UNIFI 软件数据后处理技术的靶向数据分析策略, 用于茯苓三萜类成分的快速定性分析, 从茯苓中共鉴定出 121 种茯苓三萜类成分^[13]。其次, 选取特征性茯苓三萜类成分单体作为研究对象, 利用体外大鼠肠内菌代谢和大鼠肝微粒体代谢模型, 研究了茯苓三萜类成分的肠内菌及肝微粒代谢规律, 发现茯苓三萜类成分在肠内菌作用下基本不发生代谢反应, 而是直接通过小肠上皮细胞吸收进入体内; 而茯苓三萜类成分在肝微粒体作用下主要发生氧化反应, 包括单加氧和双加氧的代谢反应, 以此规律为指导, 推测其他茯苓三萜类成分在体内可能产生的代谢产物, 将其信息加入到本地化学成分数据库。以此数

据库为依托,对吸收入体内的茯苓三萜类成分进行筛选和鉴定,共鉴定出 62 种原型成分及其与之对应的 59 种代谢物。最后,以入血成分为指导,通过靶向网络药理学分析方法,筛选出治疗阿尔茨海默病的药效成分 18 种,包括茯苓酸、苓新酸、16 α -羟基松苓新酸、猪苓酸 C、茯苓新酸 B、去氢土莫酸等^[14]。

3.2 主要药效成分的药动力学研究结果

真正进入体内且具有适宜的动力学特征的成分,才是药物发挥疗效的主要药效成分。因此,药动力学研究是药效物质基础及质量标志物发现及确定

的重要依据。本研究以“3.1”项中可以进入体内的药效成分为研究对象,采用 UHPLC-MS/MS 同时对给药茯苓提取物后不同时间点大鼠血浆中的目标成分进行定量。采用 LabSolution LCMS ver. 5.6 以及 PK solver 软件进行数据处理得到药动力学参数。结果见表 3,共得到 12 种茯苓活性成分的药动力学参数。分别对半衰期($t_{1/2}$)、达峰时间(t_{max})、达峰浓度(C_{max})以及曲线下面积(AUC)进行考察。去氢土莫酸、土莫酸、茯苓新酸 B、3-表-(3'-羟基-3'-甲基戊二氧基)-去氢土莫酸、松苓新酸、25-羟基茯苓新酸 C 和茯苓新酸 A 的 C_{max} 和 AUC 较大,生物利用

表 3 茯苓三萜酸类成分的主要药动力学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of triterpenic acid components in *P. cocos*

化合物名称	$t_{1/2}/h$	t_{max}/h	$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim t}/(\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h)$	$AUC_{0 \sim \infty}/(\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h)$
去氢土莫酸	15.66 $\pm$ 1.46	2.000	0.306 $\pm$ 0.031	3.077 $\pm$ 0.373	3.366 $\pm$ 0.385
茯苓酸	18.00 $\pm$ 1.68	4.000	0.010 $\pm$ 0.001	0.137 $\pm$ 0.017	0.176 $\pm$ 0.020
土莫酸	15.02 $\pm$ 1.40	1.500	0.386 $\pm$ 0.038	5.315 $\pm$ 0.644	5.895 $\pm$ 0.674
猪苓酸 C	5.28 $\pm$ 0.49	1.500	0.016 $\pm$ 0.043	0.090 $\pm$ 0.011	0.097 $\pm$ 0.011
茯苓新酸 B	20.79 $\pm$ 1.94	2.000	0.278 $\pm$ 0.003	1.697 $\pm$ 0.206	2.175 $\pm$ 0.249
16 α -羟基松苓新酸	11.89 $\pm$ 1.11	2.000	0.027 $\pm$ 0.005	0.365 $\pm$ 0.044	0.387 $\pm$ 0.044
氢化松苓酸	12.77 $\pm$ 1.19	2.000	0.036 $\pm$ 0.004	0.499 $\pm$ 0.061	0.533 $\pm$ 0.061
3-表-(3'-羟基-3'-甲基戊二氧基)-去氢土莫酸	20.71 $\pm$ 1.93	2.000	1.142 $\pm$ 0.112	8.990 $\pm$ 1.090	11.770 $\pm$ 1.346
松苓新酸	22.15 $\pm$ 2.06	2.000	0.288 $\pm$ 0.020	3.900 $\pm$ 0.473	4.760 $\pm$ 0.544
25-羟基茯苓新酸 C	25.05 $\pm$ 2.33	1.500	0.204 $\pm$ 0.026	3.201 $\pm$ 0.388	4.110 $\pm$ 0.470
茯苓新酸 A	9.49 $\pm$ 0.43	0.500	0.280 $\pm$ 0.031	1.114 $\pm$ 0.135	1.248 $\pm$ 0.143
6-羟基猪苓酸	9.18 $\pm$ 0.86	0.083	0.084 $\pm$ 0.017	0.164 $\pm$ 0.020	0.165 $\pm$ 0.019

度较高,可以作为茯苓的药效质量标志物。

3.3 定量测定结果

分别以文献报道的质量分数较高的成分^[7,9]、质量分数较高和药效质量标志物为定量测定指标,对 10 批茯苓药材中对应成分进行了测定,结果见表 4、5。并分别以质量分数较高的成分、质量分数较高和药效质量标志物的质量分数对 10 批茯苓药材进行聚类分析,树状图见图 2。发现以不同指标为变量进行聚类分析评价药材质量时,结果存在一定的差异。

4 讨论

茯苓作为药食两用的补益类中药,在现今临床、保健和食品领域应用广泛。但迄今为止,尚缺乏切实可行的茯苓质量控制方法。茯苓三萜酸作为茯苓中的一类主要药理活性物质,近年来逐渐被应用于茯苓质量评价中。但是,由于茯苓三萜酸对照品缺

乏供应,目前常用的方法是通过定量检测茯苓中少量几种质量分数较高的三萜酸成分进行茯苓质量控制。这种用一种或几种质量分数较高的成分作为含量测定指标进行药材质量控制的方法是现行《中国药典》中的通用方法,也是目前行业内比较认可的方法。但是,由于药物发挥药效的成分是能够被人体吸收利用且在体内有一定暴露量的成分,这些成分在药材中并不一定都是质量分数较高的成分,因此,脱离体内过程去确定药材含量测定指标,即质量标志物,尚存在一定的局限性,并不能全面精确地反映药材内在质量。

基于现有茯苓质量控制方法存在的问题,本研究基于所有口服药物都可以从肠道、肝脏和血液循环渐进地转移到目标器官这一核心认知,并借助中药复杂体系成分精准辨识方法、体外代谢研究模型

表 4 UHPLC-MS/MS 法测定 10 批茯苓样品中 5 种质量分数较高的茯苓三萜酸类成分质量分数

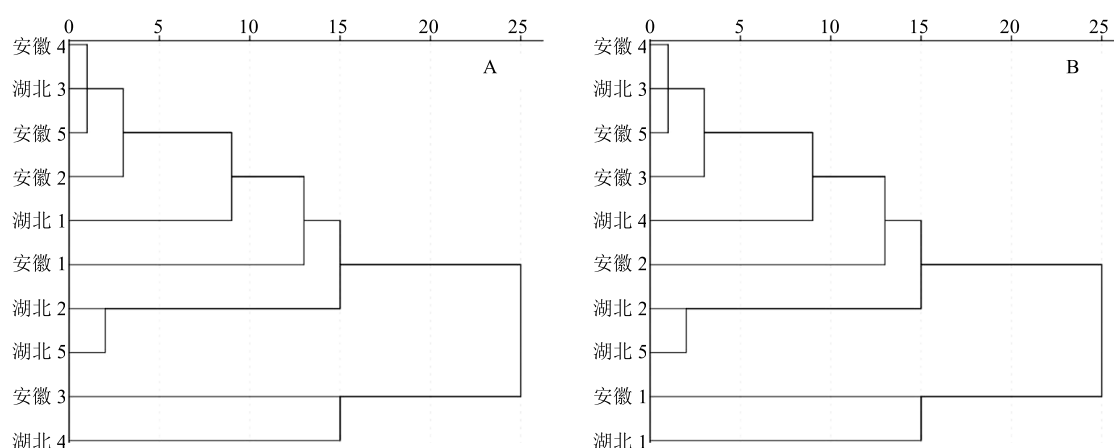
Table 4 Content of five triterpenoid acids in 10 batches of *P. cocos* samples by UHPLC-MS/MS

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	去氢土莫酸	茯苓酸	猪苓酸 C	松苓新酸	去氢茯苓酸
安徽 1	0.26	0.70	0.23	0.17	0.18
安徽 2	0.16	0.71	0.22	0.28	0.19
安徽 3	0.19	0.80	0.28	0.27	0.22
安徽 4	0.17	0.73	0.24	0.25	0.20
安徽 5	0.18	0.76	0.25	0.32	0.20
湖北 1	0.18	0.68	0.23	0.07	0.22
湖北 2	0.13	0.69	0.20	0.21	0.17
湖北 3	0.16	0.73	0.24	0.23	0.19
湖北 4	0.23	0.76	0.24	0.73	0.22
湖北 5	0.16	0.65	0.20	0.30	0.17

表 5 UHPLC-MS/MS 法测定 10 批茯苓样品中 10 种质量分数较高或生物利用度较高的茯苓三萜酸类成分质量分数

Table 5 Content of 10 triterpenoid acids with high content or bioavailability in 10 batches of *P. cocos* samples by UHPLC-MS/MS

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	去氢土莫酸	茯苓酸	土莫酸	猪苓酸 C	茯苓新酸 B	3-表-(3'-羟基-3'-甲基戊二氧基)-去氢土莫酸	松苓新酸	25-羟基茯苓新酸 C	去氢茯苓酸	茯苓新酸 A
安徽 1	0.26	0.70	0.32	0.23	0.22	0.27	0.17	0.11	0.18	0.28
安徽 2	0.16	0.71	0.21	0.22	0.15	0.10	0.28	0.10	0.19	0.13
安徽 3	0.19	0.80	0.23	0.28	0.16	0.15	0.27	0.11	0.22	0.23
安徽 4	0.17	0.73	0.18	0.24	0.17	0.13	0.25	0.11	0.20	0.22
安徽 5	0.18	0.76	0.20	0.25	0.23	0.15	0.32	0.11	0.20	0.23
湖北 1	0.18	0.68	0.27	0.23	0.02	0.07	0.07	0.03	0.22	0.13
湖北 2	0.13	0.69	0.20	0.20	0.11	0.11	0.21	0.12	0.17	0.11
湖北 3	0.16	0.73	0.19	0.24	0.17	0.14	0.23	0.10	0.19	0.23
湖北 4	0.23	0.76	0.21	0.24	0.32	0.24	0.73	0.11	0.22	0.24
湖北 5	0.16	0.65	0.18	0.20	0.21	0.14	0.30	0.08	0.17	0.23



A-以 5 个质量分数较高的成分为变量进行分析 B-以质量分数较高和药效质量标志物为变量进行分析

A-five components with high content were used as variables for cluster analysis B-high content and drug efficacy quality markers were used as variables for cluster analysis

图 2 不同产地茯苓药材的聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis of *P. cocos* from different habitats

和靶向网络药理学技术,对茯苓“体外化学物质组-体外代谢物质组-体内代谢物质组-体内药效物质组”进行了系统的阐释;在体内药效物质明确的基础上,对药效成分的体内动力学过程进行了研究,明确了在体内可以发挥主要药效的成分;最终通过这种“体外-体内”关联网络结合体内药动学过程研究,明确了与药效相关的茯苓质量标志物。

分别以质量分数较高的成分和药效质量标志物为变量,对 10 批茯苓药材进行聚类分析,发现以不同指标为变量进行聚类分析评价茯苓药材质量时,结果确实存在差异,这也进一步证实了仅仅以质量分数较高的成分进行茯苓质量控制的方法在一定程度上存在片面性。为了全面精准地控制茯苓质量,需要充分考虑茯苓体内成分变化和体内动力学过程,选取真正与药效相关的药效质量标志物用于其质量控制。为了进一步验证这一结论的科学性,后续将进一步开展茯苓质量与药效的一致性评价研究。

参考文献

- [1] Li X L, He Y L, Zeng P J, *et al.* Molecular basis for *Poria cocos* mushroom polysaccharide used as an antitumour drug in China [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 4-20.
- [2] Lee S R, Lee S, Moon E, *et al.* Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory triterpenoids from the sclerotia of *Poria cocos* using LPS-stimulated Raw264. 7 cells [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 70: 94-99.
- [3] Rios J L, Andujar I, Recio M C, *et al.* Lanostanoids from fungi: A group of potential anticancer compounds [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(11): 2016-2044.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 咎俊峰, 徐 斌, 刘军锋, 等. 茯苓三萜成分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 895-900.
- [6] 彭 灿, 余生兰, 张 静, 等. HPLC 同时测定茯苓中 4 种三萜酸的含量 [J]. 中药材, 2017, 40(7): 1643-1646.
- [7] 王妍妍, 施晓艳, 张 越, 等. 一测多评法测定不同产地茯苓中 4 种三萜类成分的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4899-4904.
- [8] 田双双, 刘晓谦, 冯伟红, 等. 基于特征图谱和多成分含量测定的茯苓质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 47(9): 1371-1380.
- [9] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1443-1457.
- [10] Zhang T J, Bai G, Han Y Q, *et al.* The method of quality marker research and quality evaluation of traditional Chinese medicine based on drug properties and effect characteristics [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44(15): 204-211.
- [11] Hou J J, Cao C M, Xu Y W, *et al.* Exploring lipid markers of the quality of *Coix* seeds with different geographical origins using supercritical fluid chromatography mass spectrometry and chemometrics [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45(1): 1-7.
- [12] Zhang A H, Yu J B, Sun H, *et al.* Identifying quality-markers from Shengmai San protects against transgenic mouse model of Alzheimer's disease using chinmedomics approach [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45(1): 84-92.
- [13] Feng G F, Zheng Y, Sun Y F, *et al.* A targeted strategy for analyzing untargeted mass spectral data to identify lanostane-type triterpene acids in *Poria cocos* by integrating a scientific information system and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion mobility spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1033: 87-99.
- [14] Feng G F, Li S Z, Liu S, *et al.* Targeted screening approach to systematically identify the absorbed effect substances of *Poria cocos* *in vivo* using ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(31): 8319-8327.