

茯苓传统汤剂与配方颗粒汤剂化学成分的对比研究

岳佑淞¹, 张璐², 谢梦迪¹, 王柯涵², 张璞¹, 张慧杰¹, 王艳丽², 桂新景^{2,3,4}, 施钧瀚^{2,3,4}, 姚静^{2,3,4}, 刘瑞新^{2,3,4*}, 李学林^{2,3,4*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

2. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000

3. 河南省中药饮片临床应用现代化工程研究中心, 河南 郑州 450000

4. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450000

摘要:目的 以茯苓为研究对象, 进行其饮片传统汤剂与配方颗粒汤剂化学成分上的对比研究, 为茯苓配方颗粒的临床合理应用提供依据。方法 选择 15 批不同产地或批次的茯苓饮片及 5 个厂家各 3 批配方颗粒, 基于 HPLC 法建立二者汤剂指纹图谱, 从三萜类化学成分种类、三萜类指标性成分含量、所有峰峰面积总和和 3 个方面进行评价, 并使用主成分分析 (PCA) 法对数据进行统计分析。结果 三萜类化学成分种类: 茯苓饮片传统汤剂中未检测到三萜类指标性成分, 而多数厂家配方颗粒汤剂中有 3 个以上的三萜类指标性成分; 1 个厂家与传统汤剂类似, 未检测到上述成分; 三萜类指标性成分含量: 各厂家茯苓配方颗粒汤剂在三萜类指标性成分含量方面差异较大; A、C、D、E 4 个含有指标性成分的配方颗粒厂家产品中, D 厂和 E 厂的多数成分相对较高, A 厂各成分相对均衡, 而 C 厂部分指标性成分缺失; 所有峰峰面积总和: 将 D 厂配方颗粒汤剂中所有峰峰面积总和定为 100%, 相较于 D 厂, 传统汤剂为 3.90%、A 厂 12.38%、B 厂 1.97%、C 厂 10.47%、E 厂 8.57%; 主成分分析结果表明, 同一厂家不同批次间质量不一, C 厂最为集中, A 厂相对集中, D、E 厂 3 个批次间分布最分散。结论 茯苓饮片传统汤剂与配方颗粒汤剂在三萜类成分种类上具有非常明显的差异, 各厂家茯苓配方颗粒汤剂中三萜类成分的种类、含量和批次间稳定性也不尽一致, 提示各厂家配方颗粒制备工艺不尽相同, 应进一步深入探讨茯苓配方颗粒的制备工艺及其合理应用, 同时对茯苓饮片的合理使用也应进一步深入研究。

关键词: 茯苓; 传统汤剂; 配方颗粒; HPLC; 三萜; 主成分分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)13-3852-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.009

Comparative study on chemical constituents of *Poria cocos* traditional decoction and formula granule decoction

YUE You-song¹, ZHANG Lu², XIE Meng-di¹, WANG Ke-han², ZHANG Pu¹, ZHANG Hui-jie¹, WANG Yan-li², GUI Xin-jing^{2,3,4}, SHI Jun-han^{2,3,4}, YAO Jing^{2,3,4}, LIU Rui-xin^{2,3,4}, LI Xue-lin^{2,3,4}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

3. Henan Engineering Research Center for Modernization of Clinical Application of Chinese Herbal Pieces, Zhengzhou 450000, China

4. Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases with Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773892); 河南省首批自然科学基金面上项目 (162300410187); 河南省高等学校重点科研项目 (16A360021); 河南省中医药科学研究专项课题 (2016ZY2055); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研专项 (2018JZDX039); 河南省中医药拔尖人才培养项目资助 (2019ZYBJ07); 河南省卫生健康中青年学科带头人专项 (HNSWJW-2020014)

作者简介: 岳佑淞 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药饮片临床应用现代化关键技术研究。

Tel: (0371)66245142 E-mail: xuelinli450000@163.com

***通信作者:** 李学林 (1960—), 男, 教授, 博士生导师, 主任药师, 主要从事中药应用形式研究。

Tel: (0371)66245142 E-mail: xuelinli450000@163.com

刘瑞新 (1980—), 男, 博士, 硕士研究生导师, 主任药师, 从事中药饮片临床应用现代化关键技术研究。

Tel: (0371)66233562 E-mail: liuruixin7@163.com

Abstract: Objective Taking *Poria cocos* as the research object and to performs a comparative study on the chemical constituents in its traditional decoction and dispensing granule, so as to provide references for rational clinical application of *P. cocos* dispensing granule. **Methods** Fifteen batches of *P. cocos* decoction pieces from different producing areas or batches and three batches of dispensing granule from five manufacturers were selected. Then the HPLC fingerprints of decoction pieces and dispensing granule were established, which was used to be evaluated from three aspects: the kinds of chemical components of triterpenoid, the content of index components of triterpenoid and the sum of all peak areas. Moreover, the data was statistically analyzed by principal component analysis. **Results** The kinds of chemical components of triterpenoid: index components of triterpenoid were not detected in traditional decoction of *P. cocos* decoction pieces while more than three kinds of index components of triterpenoids were found in the decoction of dispensing granule provided by most manufacturers. The above components were not detected in only one manufacturer which has the same situation like the traditional decoction of *P. cocos* decoction pieces. The content of index components of triterpenoid: in terms of the content of index components of triterpenoid, there are great differences in *P. cocos* dispensing granule from the four manufacturers, namely, manufacture A, C, D, and E. Among them, manufacturer D and E have higher content in most components; Manufacturer A had relatively balanced content of each ingredient; While some index components were absent in manufacturer C. Sum of all peak areas: The sum of all peak areas of dispensing granule decoction in manufacturer D was set as 100%, compared with it, all the peak areas in traditional decoction were 3.90%, manufacturer A 12.38%, manufacturer B 1.97%, manufacturer C 10.47%, and manufacturer E 8.57%. The results of principal component analysis showed that the quality of different batches in the same manufacturer was different. The extent of quality in the three batches of plant C was mostly concentrated, plant A was relatively concentrated, and plant D and E were the most dispersed. **Conclusion** There are obvious differences in the types of triterpenoids between the traditional decoction and dispensing granule decoction of *P. cocos* decoction pieces. The kinds, content and batches stability of triterpenoids are also different among every manufacturer's *P. cocos* dispensing granule decoction, which suggests that the preparation process of dispensing granule is not identical in each manufacturer and the researchers should further discuss the preparation process and rational application of *P. cocos* dispensing granule and *P. cocos* pieces.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; traditional decoction; dispensing granule; HPLC; triterpenes; principal components analysis

中药传统汤剂 (traditional decoction, TD) 具有随证加减的优势, 是我国应用最早、最广泛的剂型^[1]。中药配方颗粒 (dispensing granule of Chinese medicine, DGCM) 是应用现代制药技术将传统中药饮片经过提取、浓缩、干燥、制粒、包装而成的颗粒状物质, 临方调配成汤剂后即成中药配方颗粒汤剂 (dispensing granule decoction, DGD)^[2]。它在保证了传统汤剂随证加减的基础上, 规避了传统汤剂携带不便、服用量大等缺点, 一定程度上推动了剂型改革创新的进程, 促进了中医药事业的发展。自 1987 年提出改革和研究, 到 2019 年《关于中药配方颗粒品种试点统一标准的公示》(以下简称《公示》) 的发布, 涉及生产配方颗粒的药企几十家, 历经 30 余年发展, 足以彰显其重要程度^[3]。2021 年国家卫生健康委员会国家医保局发布了关于结束中药配方颗粒试点工作的公告, 该公告自 2021 年 11 月 1 日起施行, 预示着配方颗粒的生产应用将得到进一步发展。

但目前因中药成分复杂, 大多数中药仍缺乏科学、统一的质量标准, 生产企业各自为政, 按照自己制定的标准执行, 其成分及药效是否稳定, 是否与传统汤剂药效保持一致, 依然是亟待深入研究的

重点方向。国家食品药品监督管理局在综合了生产单位、临床使用单位、医生、患者的意见反馈后先后于 2015 年 12 月 30 日、2020 年 1 月 4 日下发了《中药配方颗粒管理办法 (征求意见稿)》^[4]。而本课题组前期也对黄连、黄柏单味饮片, 当归补血汤等^[5-7]经典药对及复方的传统汤剂及其配方颗粒汤剂进行了基于 HPLC 指纹图谱的对比研究, 获取了单味饮片及复方的传统汤剂及其配方颗粒汤剂间的差异规律, 指导临床合理用药并初见成效, 但对菌类、矿物、动物、毒物、贵重等特殊类别的单味中药配方颗粒的研究还涉及较少, 且就整体研究领域而言较少检索到有关于上述特殊类别的单味中药配方颗粒的研究内容, 国家药典委员会下发的《公示》中, 160 个中药品种仅涉及一种菌类中药灵芝, 因此本实验先从菌类中药着手, 以茯苓为研究对象, 开展配方颗粒汤剂与传统汤剂间的对比研究。

茯苓被称为“四时神药”^[8], 在《神农本草经》上被列为上品, 为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 是临床应用最为广泛的中药之一, 有“十方九苓”之说^[9], 具有利水渗湿、健脾、宁心的功效, 可用于水肿尿少、脾虚食少、心神不安等^[10]。现代药理学研究表明, 茯苓具有利

尿、抗炎、抗癌、肿瘤抑制及增强免疫的作用^[11-13]。茯苓中的三萜类及多糖是其主要活性物质^[14-15]，其中茯苓三萜类具有较强的利尿、抗癌和调节免疫作用^[16-17]。为深入对菌类中药传统汤剂与配方颗粒汤剂间的对比研究，研究组将收集到的各 15 批次的茯苓饮片及茯苓配方颗粒，采用 HPLC 法建立指纹图谱，对比茯苓传统汤剂与配方颗粒汤剂的异同。旨在为特殊类别中药配方颗粒的一致性评价以及临床合理用药，提供更科学、合理的数据参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

FA2004B 万分之一电子天平，上海精科天美科学仪器有限公司；CP225D 十万分之一电子天平，德国 Sartorius 公司；Agilent1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Agilent G4212-60008 外检测 ChemstationA.01.04 色谱数据处理系统；TDL-5-A 离心机，上海安亭科技仪器厂）；KQ5200DE 数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；MP-201 隔膜真空泵，郑州长城科工贸有限公司。

1.2 试剂

对照品茯苓新酸 A（批号 CHB190211）、茯苓新酸 B（批号 CHB180731）、去氢茯苓酸（批号 CHB180109）、松苓新酸（批号 CHB190216）均来源于成都克洛玛生物科技有限公司，质量分数均≥98%；对照品去氢土莫酸，批号 Z25J10S93909，质量分数≥95%，上海源叶生物科技有限公司；对照品猪苓酸 C，批号 ST20170205，质量分数≥95%，上海诗丹德标准技术服务有限公司。甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯，德国默克股份两合公司；娃哈哈纯净水。

1.3 样品

15 批茯苓饮片分别购自于郑州 5 家中医院和 3 家药店，经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定均为 *P. cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核的炮制品。茯苓配方颗粒分别购自于四川新绿色药业科技发展有限公司、华润三九医药股份有限公司、江阴天江药业有限公司、北京康仁堂药业有限公司、广东一方制药有限公司 5 个生产企业，以下用 A、B、C、D、E 厂代表，茯苓饮片及配方颗粒信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 茯苓饮片与茯苓配方颗粒指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5 HC-C₁₈ 柱

表 1 茯苓饮片及配方颗粒样品信息

Table 1 Sample information of *P. cocos* decoction pieces and formula granules

茯苓饮片	产地	批号	配方颗粒	厂家（浓缩比）	批号
f1	安徽	190301	A1	A 厂（1:17）	19060057
f2	安徽	190101	A2		19010027
f3	安徽	1901211	A3		19030102
f4	云南	1902181	B1	B 厂（1:10）	1901002W
f5	安徽	190401	B2		1902001W
f6	安徽	190302	B3		1901006C
f7	安徽	190305	C1	C 厂（1:10）	19040131
f8	安徽	190303	C2		19046244
f9	安徽	190304	C3		19041601
f10	安徽	190101	D1	D 厂（1:1.67）	19009541
f11	安徽	190201	D2		19013651
f12	云南	18060101	D3		19014021
f13	云南	19040102	E1	E 厂（1:20）	9051722
f14	安徽	190403	E2		9020712
f15	安徽	190302	E3		9011702

（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~20 min，45%~52%乙腈；20~40 min，52%~55%乙腈；40~60 min，55%~70%乙腈；60~70 min，70%~100%乙腈；70~80 min，100%乙腈；80.01~90 min，45%乙腈；体积流量 0.8 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 242 nm；进样量 20 μL；理论塔板数以去氢茯苓酸的峰面积计算≥6 000。

2.1.2 对照品溶液的制备

（1）去氢茯苓酸对照品溶液：精密称取去氢茯苓酸对照品适量，用甲醇溶解，分别制得含去氢茯苓酸 0.354、0.177 mg/mL 的对照品溶液，备用。

（2）混合对照品溶液：分别精密称量茯苓酸 A、茯苓酸 B、去氢茯苓酸、去氢土莫酸、猪苓酸 C、松苓新酸对照品，加甲醇溶解，配制成含有茯苓酸 A 0.112 mg/mL、茯苓酸 B 0.109 mg/mL、去氢茯苓酸 0.101 mg/mL、去氢土莫酸 0.105 mg/mL、猪苓酸 C 0.108 mg/mL、松苓新酸 0.110 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

（1）茯苓饮片醇提供试品溶液：分别精密称量 f1~f15 茯苓饮片粉末（过四号筛）各 5 g，加 25 mL 95%乙醇至锥形瓶中，精密称定，超声 45 min，后放置至室温并补足减失的质量，混匀，滤过，量取

滤液 15 mL 并蒸干,用 95%乙醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得茯苓饮片醇提供试品溶液,分别标记为 S1~S15。

(2) 茯苓配方颗粒醇提供试品溶液:依次称量各厂家配方颗粒 294.1、500.0、500.0、2 994.0、250.0 mg (均相当于茯苓饮片 5 g),按照上述方法制备茯苓配方颗粒醇提供试品溶液,分别标记为 DGCM1~DGCM15。

2.1.4 方法学验证

(1) 精密度试验:精密吸取 S1 样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,结果各共有特征峰的相对保留时间 RSD 值在 0.05%~0.20%,相对峰面积 RSD 在 0.85%~2.15%;去氢茯苓酸保留时间的 RSD 为 0.07%,峰面积 RSD 为 0.91%,结果表明仪器精密度良好。

(2) 稳定性试验:精密吸取 S1 供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、48 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样。结果各共有特征峰的相对保留时间 RSD 值在 0.06%~0.21%,相对峰面积 RSD 在 0.86%~1.95%;去氢茯苓酸保留时间的 RSD 为 0.07%,峰面积 RSD 为 0.86%,结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

(3) 重复性试验:取同一批样品(f1),按照按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。结果各共有特征峰的相对保留时间 RSD 在 0.06%~0.21%,相对峰面积 RSD 在 1.10%~1.70%;去氢茯苓酸保留时间的 RSD 为 0.07%,质量分数的 RSD 为 0.86%,表明该方法重复性良好。

(4) 加样回收率试验:精密量取已测定指标成分含量的 S1 样品 6 份,每份 2.5 g,精密加入去氢茯苓酸 0.632 mg/mL 对照品溶液 1 mL,按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果去氢茯苓酸的平均回收率为 102.94%,RSD 为 0.13%。

(5) 线性关系考察:精密吸取去氢茯苓酸对照品溶液,制得质量浓度分别为 354、177、44、11、2.8、0.17 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。取上述系列对照品溶液,依次进样 20 μL ,以对照品溶液的质量浓度为横坐标(X),色谱峰峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程为 $Y=31\ 979\ X+6.310\ 5$, $r=0.999\ 9$,结果表明去氢茯苓酸在 0.17~354 $\mu\text{g/mL}$ 与其峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 茯苓饮片与配方颗粒 HPLC 指纹图谱建立

(1) 对照品 HPLC 色谱图:吸取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,混合对照品的 HPLC 色谱图见图 1-a。

(2) 茯苓饮片 HPLC 指纹图谱:取“2.1.3”项下 15 批茯苓饮片醇提供试品,按“2.1.2”项下色谱条件测定,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱。共有 19 个共有峰,结果见图 1-b。

(3) 茯苓配方颗粒 HPLC 指纹图谱:取“2.1.3”项下 15 批茯苓配方颗粒醇提供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件检测,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱。因产自 B 厂的编号为 4~6 批次的配方颗粒醇提供试品未检出特征峰,因此构建指纹图谱时将该 3 个批次剔除,其他 13 个批次色谱图构建指纹图谱,共有 4 个共有峰,结果见图 1-c。

2.2 茯苓饮片 TD 与茯苓 DGD 指纹图谱的建立

2.2.1 茯苓饮片 TD 与茯苓 DGD 的制备

(1) 茯苓饮片 TD 的制备:为反映真实世界中传统汤剂与配方颗粒的差距所在,经小组对传统汤剂的制备指导原则的调研结果,特将本实验中传统汤剂的制备方法确定为由 3 位不同的实验人员进行传统汤剂的制备。分别取约 200 g 的茯苓饮片按照传统的煎药方法进行样品的制备,合并两次煎药液,滤布滤过,放冷,定容至 1000 mL,混匀,即得,备用。

(2) 茯苓 DGD 的制备:依次精密称量各厂家配方颗粒 294.1、500.0、500.0、299.4、250.0 mg (均相当于茯苓饮片 5 g),加 20 mL 热水使溶解,放至冷却,用水定容至 25 mL,搅拌混匀使其全部溶解,放冷,即得,备用。

2.2.2 茯苓 TD 供试品溶液与茯苓 DGD 供试品溶液的制备

(1) 茯苓 TD 供试品溶液的制备:精密量取 10 mL “2.2.1”项下茯苓 TD 溶液至 25 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至 25 mL,混匀,静置,取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得,标记为 TD1~TD15。

(2) 茯苓 DGD 供试品溶液的制备:精密量取 10 mL “2.2.1”项下制备所得茯苓 DGD 溶液至 25 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至 25 mL,混匀,静置,取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得,标记为 DGD1~DGD15。

2.2.3 方法学验证

(1) 精密度试验:精密量取 DGD9 供试品溶液,

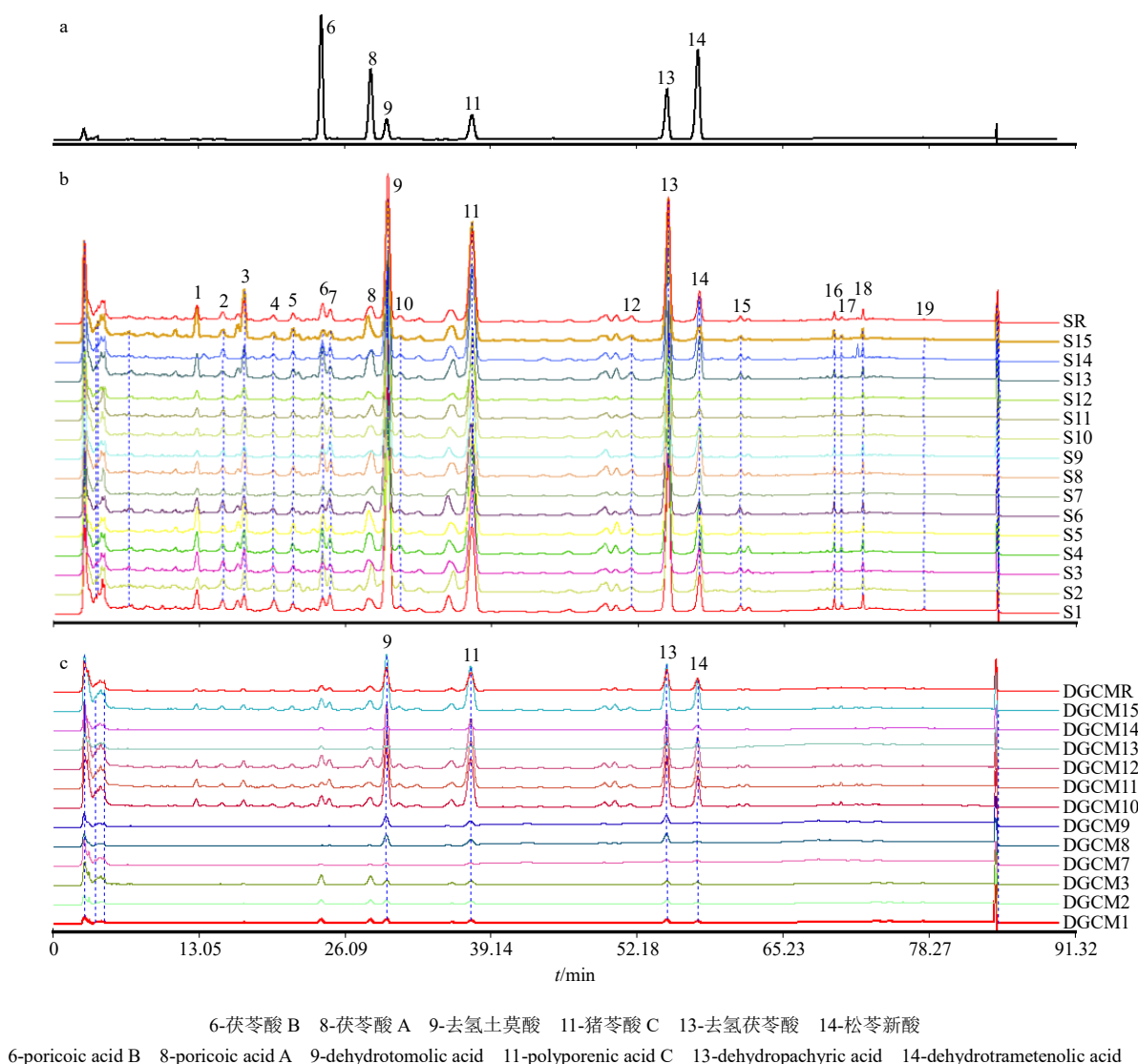


图 1 混合对照品的 HPLC 图 (a) 和茯苓饮片 (b) 及配方颗粒 (c) 醇提供试品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (a), and HPLC fingerprints of samples provided by alcohol of *P. cocos* decoction pieces (b) and *P. cocos* formula granule (c)

按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定。结果，各共有特征峰的相对保留时间无明显变化，RSD 集中在 0.11%~0.32%；相对峰面积 RSD 集中在 1.66%~3.88%；去氢伏苓酸保留时间的 RSD 值为 0.11%，峰面积的 RSD 为 2.72%，结果表明方法精密密度良好。

(2) 稳定性试验：精密量取 DGD9 供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样。结果，各共有特征峰的相对保留时间无明显变化，RSD 集中在 0.11%~0.32%；相对峰面积 RSD 集中在 1.66%~3.88%；去氢伏苓酸保留时间的 RSD 值为 0.11%，峰面积的 RSD 为 2.72%，结果表明供试品溶液至少于 24 h 以内稳定

性良好。

(3) 重复性试验：精密量取 DGD9 茯苓配方颗粒粉末，按“2.2.2”项下方法制备 6 份，按“2.1.1”项下色谱条件进样。结果，各共有特征峰的相对保留时间无明显变化，RSD 集中在 0.11%~0.24%；相对峰面积 RSD 集中在 1.22%~4.93%；去氢伏苓酸保留时间的 RSD 值为 0.11%，峰面积 RSD 为 1.22%，结果表明方法重复性良好。

(4) 加样回收率试验：精密量取已知含量的 DGD9 茯苓配方颗粒粉末 6 份，每份相当于茯苓饮片 2.5 g，精密加入去氢伏苓酸 0.032 mg/mL 对照品溶液 1 mL，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，并计算

回收率。去氢茯苓酸对照品的平均加样回收率为 91.93%, RSD 为 2.57%。经《中国药典》2020 年版四部^[11]可查,当样品中待测成分含量低于 0.01%时,回收率限度可适当放宽至 85%~110%,因此该加样回收率符合标准。

2.2.4 茯苓饮片 TD 与茯苓 DGD 指纹图谱建立

(1) 茯苓饮片 TD 指纹图谱的建立:取“2.2.2”项下茯苓饮片 TD 供试品溶液共 15 批,按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱(图 2)。结果显示 15 批茯苓饮片 TD 供试品中除溶剂峰以外均未检测出特征峰。

(2) 茯苓 DGD 指纹图谱的建立:按照“2.2.2”项下 15 批茯苓 DGD 供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱。

因产自 B 厂的编号为 4~6 批次的 DGD 供试品中未检测出特征峰,因此构建指纹图谱时将该 3 个批次剔除,其他 13 个批次色谱图构建指纹图谱,共有 3 个共有峰,结果见图 3。

2.3 茯苓饮片与配方颗粒的比较

2.3.1 已知峰含量测定及比较 采用外标法分别计算 15 批饮片及 15 批配方颗粒醇提供试品中去氢茯苓酸的含量,以去氢茯苓酸为内参物,计算茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、松苓新酸的相对校正因子($f_{i/s}$),相对校正因子结果为 $f_{\text{茯苓酸 B/去氢茯苓酸}}=0.552$, $f_{\text{茯苓酸 A/去氢茯苓酸}}=0.852$, $f_{\text{去氢土莫酸/去氢茯苓酸}}=2.604$, $f_{\text{猪苓酸 C/去氢茯苓酸}}=1.822$, $f_{\text{松苓新酸/去氢茯苓酸}}=0.643$,采用一测多评法^[18]计算 15 批配方颗粒及 15 批饮片醇提供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土

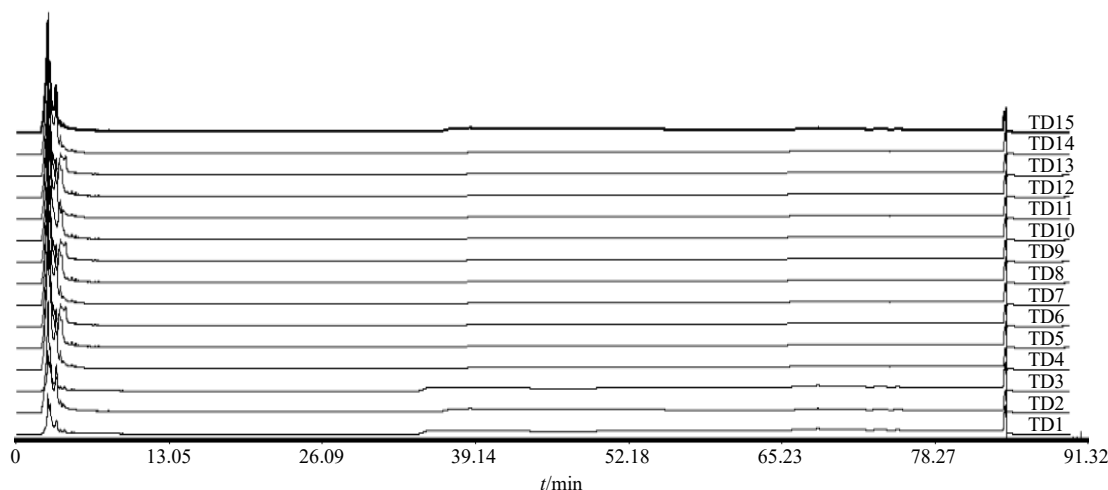


图 2 茯苓 TD1 供试品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of *P. cocos* TD1 test product

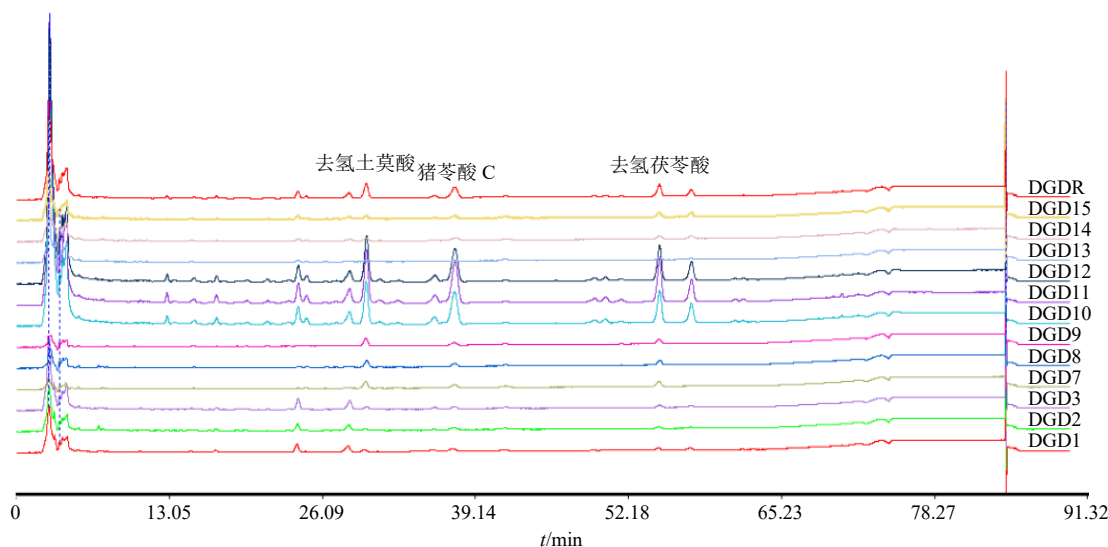


图 3 茯苓 DGD 供试品指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of *P. cocos* DGD test products

莫酸、猪苓酸 C、松苓新酸的含量,运用 t 检验评价茯苓配方颗粒不同供试品中已知峰含量与茯苓饮片的差异,其中 B 厂未检测出三萜类指标性成分,

结果见表 2。结果表明,茯苓饮片中已知成分含量较 5 个厂家配方颗粒的高,各厂家间已知成分含量间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

表 2 茯苓饮片与配方颗粒醇提供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、松苓新酸含量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of contents of poricoic acid B, poricoic acid A, dehydrotomolic acid, polyporenic acid C, dehydropachyric acid, and dehydrotrametenolic acid in samples provided by *P. cocos* decoction pieces and formula granular alcohol ($\bar{x} \pm s$)

样品	n	指标性成分质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)					
		茯苓酸 B	茯苓酸 A	去氢土莫酸	猪苓酸 C	去氢茯苓酸	松苓新酸
饮片	15	0.080 $\pm$ 0.045	0.174 $\pm$ 0.086	3.612 $\pm$ 1.197	2.101 $\pm$ 0.583	1.067 $\pm$ 0.280	0.171 $\pm$ 0.101
A	3	0.028 $\pm$ 0.014	0.051 $\pm$ 0.021**	0.111 $\pm$ 0.005**	0.079 $\pm$ 0.012**	0.038 $\pm$ 0.002**	0.012 $\pm$ 0.003**
B	3	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000
C	3	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.284 $\pm$ 0.017**	0.111 $\pm$ 0.015**	0.078 $\pm$ 0.006**	0.004 $\pm$ 0.004**
D	3	0.051 $\pm$ 0.020	0.085 $\pm$ 0.024**	1.525 $\pm$ 0.081**	1.190 $\pm$ 0.037**	0.469 $\pm$ 0.018**	0.181 $\pm$ 0.007
E	3	0.010 $\pm$ 0.005**	0.015 $\pm$ 0.013**	0.086 $\pm$ 0.024**	0.067 $\pm$ 0.032**	0.041 $\pm$ 0.016**	0.022 $\pm$ 0.011**

与饮片比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs decoction pieces

2.3.2 所有峰及已知峰总峰面积比较 将 15 批饮片醇提供试品色谱图中所有峰及已知峰总峰面积的均值定为 1 (100%), 采用归一化法求得 5 个厂家配方颗粒醇提供试品所有峰及已知峰总峰面积的相对值。结果显示, A、B、C、D、E 厂配方颗粒醇提供试品中总成分含量的相对总和比值分别为 4.71%、0.49%、4.52%、49.58%、3.41%, 已知成分含量的相对总和比值分别为 5.99%、0.00%、6.03%、51.69%、4.31%, 说明 A、B、C、D、E 厂配方颗粒醇提供试品中总成分含量及已知成分含量均低于饮片醇提供试品。

2.3.3 校正分析 以茯苓饮片醇提供试品信息为标准, 以指标成分及所有成分分别采用峰面积加和法^[5]计算 5 个厂家配方颗粒临床推荐当量的校正系数 (当量即为使用剂量)。

采用峰面积加和法, 以 4 个指标成分 (去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、松苓新酸) 进行校正系数的计算。首先计算得各厂家 4 个指标成分峰面积之和的平均值, 后求得其与饮片醇提供试品中 4 个指标成分峰面积之和均值的比值, 即校正系数, 后依次计算各厂实际当量, 结果见表 3。

采用峰面积加和法, 以所有成分进行校正系数的计算。首先计算得各厂家所有峰峰面积之和的平均值, 后求得其与饮片醇提供试品中所有峰峰面积均值的比值, 即校正系数, 各厂校正系数依次为 A 厂 0.047, B 厂 0.005, C 厂 0.045, D 厂 0.496, E

表 3 配方颗粒中 4 个指标成分校正系数 (峰面积加和法)

Table 3 Correction coefficients of four index components in formula particles (summation of peak areas)

厂家	厂家标示推荐当量	校正系数	本实验计算当量
A	1 : 17	0.037	1 : 0.6
B	1 : 10	—	—
C	1 : 10	0.066	1 : 0.7
D	1 : 1.67	0.514	1 : 0.9
E	1 : 20	0.038	1 : 0.8

厂 0.034, 本实验计算当量依次为: A 厂 1 : 0.8, B 厂 1 : 0.05, C 厂 1 : 0.5, D 厂 1 : 0.8, E 厂 1 : 0.7, 建议在临床推荐当量上做相应调整。

2.4 茯苓 TD 与茯苓 DGD 比较

2.4.1 已知峰含量测定及比较 采用外标法分别计算 15 批配方颗粒 DGD 供试品中去氢茯苓酸的含量, 以去氢茯苓酸为内参物同“2.3.1”项下一测多评法计算 15 批配方颗粒 DGD 供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、松苓新酸的含量, 运用 t 检验评价茯苓配方颗粒不同供试品中已知峰含量与茯苓饮片的差异, 如表 4 所示, TD 和 B 厂中未检测出三萜类指标性成分, 各厂家茯苓 DGD 供试品中三萜类指标性成分含量具有较大差异: 含有指标性成分的 A、C、D、E 4 个配方颗粒厂家中, D 厂、E 厂的多数成分相对较高, A 厂各成分相对均衡, 而 C 厂部分指标性成分缺失。说明 B 厂配方颗粒制备工艺与传统汤剂制备工艺相近, 不同厂家

表 4 茯苓 TD 与 DGD 供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、松苓新酸含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of contents of pachyric acid B, pachyric acid A, dehydrotomolic acid, polyporic acid C, dehydropachynic acid, and succinic acid in test products of *P. cocos* TD and DGD ($\bar{x} \pm s$)

样品	n	指标性成分质量分数/(mg·g ⁻¹)					
		茯苓酸 B	茯苓酸 A	去氢土莫酸	猪苓酸 C	去氢茯苓酸	松苓新酸
TD	15	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
DGD-A	3	0.050±0.013*	0.086±0.021*	0.076±0.017*	0.074±0.013*	0.032±0.004**	0.017±0.005*
DGD-B	3	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
DGD-C	3	0.000±0.000	0.000±0.000	0.267±0.020**	0.113±0.010**	0.074±0.004**	0.000±0.000
DGD-D	3	0.113±0.012**	0.148±0.028*	1.748±0.167**	1.390±0.254*	0.536±0.087**	0.193±0.019**
DGD-E	3	0.015±0.007	0.020±0.019	0.099±0.039	0.074±0.065	0.051±0.023	0.030±0.015

与 TD 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs TD

配方颗粒质量参差不齐,可能与不同厂家所用饮片质量不一致有关,如药材原产地、药材采集时间、饮片炮制工艺以及饮片贮存方式的不同。茯苓 DGD 组与配方颗粒醇提组相比,说明两种不同的供试品制备方法对三萜类成分的转化率影响不大。

2.4.2 所有峰及已知峰总峰面积比较 将 D 厂 3 批 DGD 色谱图中所有峰及已知峰总峰面积的均值分别定为 1 (100%),采用归一化法求得 TD 及其他 4 个厂家 DGD 供试品中所有峰及已知峰总峰面积的相对值。结果显示 TD、A、B、C、E 厂 DGD 中总成分含量的相对总和比值分别为 3.90%、12.38%、1.97%、10.47%、8.57%,已知成分含量的相对总和比值分别为 0.00%、12.08%、0.00%、9.00%、8.54%,说明 TD、A、B、C、E 厂 DGD 中总成分及已知成分含量总和均低于 D 厂。

2.4.3 各厂家配方颗粒质量比较 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 可对复杂信息中的多变量进行快速提取、降维分析,通过降维可排除众多化学信息中相互重叠的信息,生成新的综合变量即主成分,经投影处理后,样本最终落在主成分组成平面上的位置,即可表征不同样本的总体信息^[19-21]。本研究以 15 批茯苓配方颗粒 DGD 供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸及松苓新酸的含量为变量,采用多元变量统计软件 SIMCA 14.1 进行 PCA。以 15 批茯苓配方颗粒 DGD 供试品中茯苓酸 B、茯苓酸 A、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸及松苓新酸的含量为坐标轴构建主成分平面,将样本的多元变量通过降维的方式投影在二维平面上,以观察样本的整体分布情况和各变量对样本分布的贡献大小,结果见

图 4。由图 4 可看出,不同厂家样品出现明显的分类, D、E 厂的 3 个批次间分布最分散,表明 2 厂不同批次配方颗粒原料药材质量不一致或生产工艺不稳定, A 厂相对集中,表明 2 个厂家的配方颗粒质量相对比较稳定,而 C 厂最为集中,说明该厂配方颗粒质量最稳定。

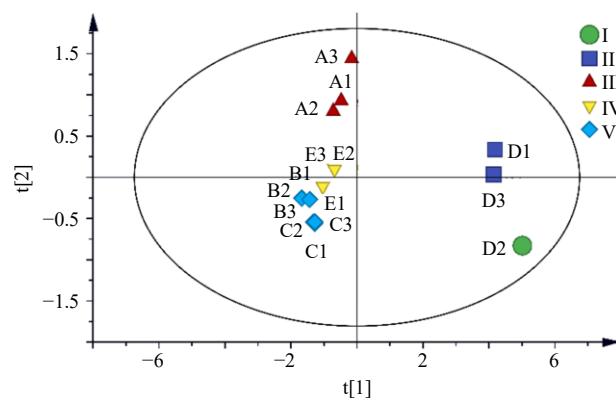


图 4 配方颗粒 PCA 分析散点图

Fig. 4 PCA analysis scatter diagram of formula particles

3 讨论

3.1 传统汤剂与配方颗粒汤剂对比时原料来源一致性探讨

实验所用载体为临床处方用量较大、频率较高的茯苓,旨在研究单味中药茯苓传统汤剂与配方颗粒汤剂二者之间的差异规律,包括二者成分上的异同或含量多少的差异。理论上,实验所用饮片应与市售配方颗粒原材料保持一致;但本实验设计初衷是基于对“真实世界”临床用药的考量,故选择不做过多主观人为干预,不刻意保持批号的对应和统一。原因在于:一方面,不同厂家所用饮片与在医院、药店所购得饮片其质量档次上相差很大;另一

方面,若选用自购饮片制备自制颗粒,则存在实验室的制备过程与成型化的工业大生产间存在较大差距,得出的结论并不足以指导临床。因此,本实验选择不同批次饮片和配方颗粒,目的是为了所得出的结论更能反应临床实际。

3.2 茯苓 TD 与茯苓 DGD 的制备工艺比较

因三萜类成分本不溶于水^[22],15 批 TD 供试品中未检测到三萜类指标性成分,而 12 批 DGD 供试品中有 3 个三萜类指标性成分,DGD、配方颗粒醇提供试品中均检测出含有三萜类成分,表明除 B 厂以外的 4 个配方颗粒生产企业采用了不同于传统汤剂的提取工艺,以保证配方颗粒的质量,经现有茯苓配方颗粒专利查询^[23-27]可以预测这 4 个厂家在制备配方颗粒过程中,D 厂各指标成分含量均较高,可能采用了区别于传统汤剂制备所用的溶媒提取茯苓饮片得到了浸膏,并将浸膏与饮片原粉混合后制备得到配方颗粒;A 厂及 E 厂指标成分含量相对均衡,可能是这两厂在制备过程中采用饮片超微粉代替辅料与水提所得浸膏混合制粒;而 C 厂某些指标成分缺失,考虑其制备工艺与其他厂家存在差异,而 B 厂可能是在“遵古”的指导思想下,以水提物制粒,因此未检测出三萜类指标性成分。PCA 结果显示 C 厂最为集中,A 厂相对集中,D、E 厂 3 个批次间分布最分散,表明同一厂家不同批次间配方颗粒质量不一,这可能与原药材饮片质量不一致,配方颗粒生产厂家制备工艺不稳定有关。以上分析表明现代配方颗粒在制备工艺上并未完全遵古,不同配方颗粒生产厂家的制备工艺存在差异,这些对于保证临床一致性是不利的,因此有关配方颗粒的制备工艺仍待进一步探讨。

3.3 茯苓饮片及其配方颗粒用法刍议

《圣济总录》中茯苓散以温酒调服治疗男子小便余沥不尽,《普济方》中以桑螵蛸、龙骨、茯苓为未制得的锁阳丹经米饮调服治疗膀胱疾;《伤寒论》及《金匮要略》中含茯苓的方剂经统计归纳,共 36 首^[28],入汤剂 22 首,散剂 7 首,丸剂 7 首,其中散剂、丸剂多米饮、酒送服,取茯苓利水之功,汤剂水煎后去滓服用则多奏健脾、安神之效,表明茯苓的传统用法与功效间存在一定的规律性,制法和用法不同,疗效也不尽相同。另外,当茯苓与桂枝、干姜、泽泻配伍时,多主利水,如五苓散;与白术、半夏配伍主健脾,如理中丸;与人参配伍主健脾安神,如茯苓四逆汤,表明在不同的用药配伍中茯苓所主功

效也有不同。

细野史郎等^[29]汇总了近些年茯苓利尿作用的药理实验结果,发现家兔口服茯苓水性颗粒剂后无利尿作用,健康志愿者服用茯苓后利尿效果也不尽如人意,表明茯苓单煎的利水作用不强。现代临床试验结果表明,茯苓贴敷神阙穴可显著降低内痔术后尿潴留发生率^[30]。现代有实验人员将茯苓打粉后加水回流提取、滤布过滤、浓缩得浸膏后,所得茯苓水提物粉末经甲醇超声得供试品溶液,后采用 UPLC 法检测到三萜类成分并建立了指纹图谱^[31],但该供试品制备是将茯苓饮片打粉后制备,该操作可能会使茯苓粉末随滤液通过滤布一同滤出,而本实验目的是进行茯苓配方颗粒汤剂与茯苓传统汤剂的对比研究,在最大程度上与传统汤剂的制备保持一致,因此茯苓传统汤剂以茯苓饮片直接加水进行煎煮,实验结果茯苓传统汤剂中未检测到三萜类成分,而饮片醇提供试品中检测到该类成分,实验人员随后对传统汤剂煎煮后的药渣进行处理,最终在药渣醇提供试品中检测到了三萜类成分,再次佐证了水提不能使茯苓中的三萜类成分溶出。结合传统用法可推测:一方面,现代临床使用茯苓饮片及配方颗粒时应依据病证,选择合理剂型或能达到最佳用药目的,例如将茯苓制散剂以水、米饮、温酒送服或能使其利尿功效达到最佳;另一方面,茯苓单煎其三萜类成分不易溶出,但与其他药物合煎,可能会使其溶出,此方面内容有待实验进一步确认。

3.4 指标性成分种类的选择探讨

茯苓为利水渗湿药,三萜类及多糖是其主要活性物质,其中茯苓三萜类具有较强的利水作用,针对其利水这一主要功效,研究其与利水功效相关的代表成分,更具针对性和研究意义,因此本实验以三萜类化学成分为指标性成分进行茯苓配方颗粒汤剂和传统汤剂间的比较。但茯苓所含多糖也是其主要活性物质^[14-15]之一,具有调节机体免疫力、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保肝等药理活性^[32],目前对于茯苓多糖的含量测定方法已十分成熟^[33-35],但对于茯苓传统汤剂及配方颗粒汤剂的多糖测定涉及较少,如何消除配方颗粒中多糖类辅料对茯苓多糖测定的影响是开展茯苓传统汤剂及配方颗粒汤剂多糖类化学成分对比研究需要重点关注的问题,本课题组后期将对这一问题进行深入的研究,旨在进一步为茯苓配方颗粒乃至茯苓饮片的合理应用提供更为系统和科学的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物 and 传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建 议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.
- [2] 何军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发 展新思路 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [3] 毛明强, 翟艳敏, 封亮, 等. 基于汤剂煎煮特征的中药 配方颗粒制备技术发展与应用 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2228-2233.
- [4] 赵丽敏, 刘杰, 梁颖. 中药配方颗粒的临床应用与前景 探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(6): 142-143.
- [5] 李学林, 王柯涵, 康欢, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄 柏配方颗粒汤剂与标准汤剂、传统汤剂对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 91-100.
- [6] 刘瑞新, 施钧瀚, 张璐, 等. 基于 HPLC, PCA 与相似度 评价的芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异规 律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 1-5.
- [7] 姚静, 施钧瀚, 桂新景, 等. 基于 HPLC 指纹图谱评价 的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分 析 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2567-2574.
- [8] 肖雄. 四时神药 茯苓 [J]. 中医健康养生, 2016, 2(5): 30-31.
- [9] 李慧敏, 贺凯, 郑慧, 等. 中医药健脾的保健作用机制 及药食资源 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 780-787.
- [10] 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.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 251.
- [12] 李森, 谢人明, 孙文基. 茯苓、猪苓、黄芪利尿作用的 比较 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 264-267.
- [13] 宁康健, 杨靖松, 石萍萍. 茯苓对家兔利尿作用的观察 [J]. 安徽科技学院学报, 2012, 26(4): 1-3.
- [14] Liu J, Zhou J, Zhang Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 406-411.
- [15] Zou Y T, Long F, Wu C Y, et al. A dereplication strategy for identifying triterpene acid analogues in *Poria cocos* by comparing predicted and acquired UPLC-ESI-QTOF-MS/MS data [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30(3): 292-310.
- [16] 倪文娟, 俞松林, 张莉华, 等. 茯苓三萜类成分利尿作 用的虚拟筛选 [J]. 中国药业, 2019, 28(11): 40-43.
- [17] 田婷, 陈华, 殷璐, 等. 茯苓和茯苓皮水和乙醇提取物 的利尿作用及其活性成分的分离鉴定 [J]. 中国药理学 与毒理学杂志, 2014, 28(1): 57-62.
- [18] 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.
- [19] 高文远, 李志亮. 主成分分析法评价中药贝母的内在 质量 [J]. 中草药, 1992, 23(11): 602-604.
- [20] 孔浩, 郭庆梅, 王慧慧, 等. 主成分分析法在中药质量 评价中的应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 890-892.
- [21] 梁寒峭, 田婧, 冯瑞章, 等. 主成分分析和聚类分析用 于中药大黄药材和提取物的质量评价 [J]. 时珍国医国 药, 2019, 30(5): 1036-1040.
- [22] 李晔, 朱忠敏, 姚渭溪, 等. 灵芝三萜类化合物的研究 进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 165-171.
- [23] 丁建亚, 孙娜, 康伟. 一种茯苓配方颗粒的制备方法: 中国, CN104523765A [P]. 2015-04-22.
- [24] 丁建亚, 孙娜, 康伟. 一种茯苓配方颗粒的制备方法: 中国, CN104958326A [P]. 2015-04-22.
- [25] 丁建亚, 孙娜, 康伟. 一种茯苓配方颗粒的制备方法: 中国, CN111419886A [P]. 2015-04-22.
- [26] 李洋. 一种茯苓配方颗粒的制备方法和应用: 中国, CN105687257A [P]. 2016-06-22.
- [27] 谭登平, 刘法锦, 魏梅, 等. 一种用超微粉代替部分辅 料的茯苓配方颗粒的制备方法: 中国, CN102526129A [P]. 2012-07-04.
- [28] 王世友, 段富津. 经方中茯苓配伍刍议 [J]. 中医药信 息, 2012, 29(3): 61-63.
- [29] 细野史郎, 郑为堯. 关于茯苓的利尿作用 [J]. 南京中 医学院学报, 1991, 7(3): 187-188.
- [30] 赵术云. 茯苓神阙穴贴敷预防 PPH 术后尿潴留效果观 察 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(5): 89.
- [31] 王天合, 李慧君, 张丹丹, 等. 茯苓水提物 UPLC 指纹 图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究 [J]. 中 国药房, 2021, 32(5): 564-570.
- [32] 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.
- [33] 陈庆. 茯苓质量控制及药理学研究进展 [J]. 亚太传统 医药, 2020, 16(8): 154-157.
- [34] 杜方平, 陈卫东, 朱月健, 等. 大别山区仿野生栽培茯 苓中茯苓多糖和茯苓酸含量研究 [J]. 安徽医药, 2015, 19(9): 1681-1683.
- [35] 张越. 茯苓多糖提取纯化及对脾虚大鼠免疫功能和肠 道菌群调节作用研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.

[责任编辑 郑礼胜]