

茯神指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量研究

王 娜¹, 程 璐^{2,3}, 王 浩^{2,3}, 彭华胜^{1,4}, 张亚中^{2,3}, 刘军玲^{2,3*}, 金传山^{1*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051

3. 国家药监局中药质量研究与评价重点实验室, 安徽 合肥 230051

4. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700

摘要:目的 建立茯神 HPLC 指纹图谱及 10 个三萜类成分(16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸)的含量测定方法。方法 通过 HPLC 建立茯神指纹图谱, 对 37 批茯神 10 个成分的含量进行测定。并结合相似度评价、聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对茯神质量进行综合评价。结果 37 批茯神 HPLC 特征图谱共匹配 10 个共有峰成分, 除 S23、S37 外, 其余样品间相似度为 0.791~1.000; CA 将 37 批样品分为 3 类, PCA 提取了 2 个主成分, OPLS-DA 确定去氢茯苓酸、16 α -羟基松苓新酸、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸 4 个质量差异标志物。结论 建立的指纹图谱及含量测定方法操作简便、专属性强、重复性好, 可为茯神的质量控制提供参考。

关键词: 茯神; 16 α -羟基松苓新酸; 茯苓酸 B; 去氢土莫酸; 茯苓酸 A; 多孔菌酸 C; 3-表去氢土莫酸; 3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸; 去氢茯苓酸; 松苓新酸; 去氢齿孔酸; 高效液相色谱; 特征图谱; 含量测定; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0279-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.028

Study on fingerprint of *Poria cum Pini Radix* (Fushen) combined with chemical pattern recognition and quantitative analysis of multiple indicator components

WANG Na¹, CHENG Lu^{2,3}, WANG Hao^{2,3}, PENG Huasheng^{1,4}, ZHANG Yazhong^{2,3}, LIU Junling^{2,3}, JIN Chuanshan¹

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China

3. Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicines of the State Food and Drug Administration, Hefei 230051, China

4. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Utilization of Authentic Medicinal Materials, Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish a HPLC characteristic chromatogram of Fushen (*Poria cum Pini Radix*) and a method for determining the content of 10 triterpenoid components (16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid, poricoic acid B, dehydrotumulosic acid, poricoic acid A, polyporenic acid C, 3-epidehydrotumulosic acid, 3-O-acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid, dehydropachymic acid, 3 β -hydroxy-5 α -lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid, dehydroeburicoic acid). **Methods** The content of 10 components in 37 batches of *Poria cum Pini Radix* was determined by establishing HPLC characteristic chromatogram. And similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to comprehensively evaluate the quality of *Poria cum Pini Radix*. **Results** The HPLC characteristic

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 安徽省药品监督管理局监管科学研究重点项目: 茯神产业化关键技术及质量标准研究 (AHYJ-KJ-202310)

作者简介: 王 娜, 女, 硕士在读, 主要从事中药质量标准规范化研究。E-mail: 1774706528@qq.com

*通信作者: 刘军玲, 女, 硕士生导师, 安徽省食品药品检验研究院中药室主任, 主要研究方向为中药质量研究与成分分析。

E-mail: 2043270722@qq.com

金传山, 男, 硕士生导师, 教授, 主要从事中药炮制及中药药效物质基础研究。E-mail: jcs4@sohu.com

chromatogram were matched with 10 common peaks in 37 batches of *Poria cum Pini Radix*. Except for S23 and S37, the similarity between the other samples was 0.791–1.000; CA divided 37 batches of samples into three categories, PCA extracted two principal components, and OPLS-DA determined four quality difference markers named dehydropachymic acid, 16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid, polyporenic acid C, 3-epidehydrotumulosic acid. **Conclusion** The established characteristic chromatogram and content determination method are easy to operate, have strong specificity and good repeatability, which can provide reference for the quality control of *Poria cum Pini Radix*.

Key words: *Poria cum Pini Radix*; 16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid; poricoic acid B; dehydrotumulosic acid; poricoic acid A; polyporenic acid C; 3-epidehydrotumulosic acid; 3-*O*-Acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid; dehydropachymic acid; 3 β -hydroxy-5 α -lanosta-7,9(11), 24-trien-21-oic acid; dehydroeuburicoic acid; triterpenoids; high performance liquid chromatography; characteristic chromatogram; content determination; chemometrics; quality evaluation

茯神 *Poria cum Pini Radix* 为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 菌核中间天然抱有松根的白色部分, 始载于《名医别录》^[1], 甘、淡, 平, 入心、脾经, 具有宁心、安神、利水功效。茯神在临床上仍是常用的大宗品种, 《中国药典》1963 年版^[2]曾收录“茯神”, 然而, 后来历版药典均未再收录^[3]。全国多个省已制定中药材地方质量标准, 但大多是基原、性状、功效上的描述, 内容较少且不全面^[4]。此外, 通过查阅文献资料, 发现茯神相关文献资料也较少。基于此, 本研究采用高效液相色谱法^[5-8]建立茯神的指纹图谱^[9-10], 结合相似度评价同时进行化学模式识别^[11-17], 并测定其中 10 个三萜成分的含量。从定性和定量 2 个方面为该药材质量标准的提升奠定基础, 保证茯神的临床疗效与用药安全。

1 仪器与材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪及所配备的二极管阵列检测器 (Dionex 公司); ML 型 204 万分之一电子天平 (Mettler 公司); XP26 型百万分之一电子分析天平 (Mettler 公司); A11 型分析研磨机 (IKA 公司); KQ-100 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); XMTD205 水浴锅 (常州国宇仪器制造有限公司); Simplicity-185 型超纯水仪 (Millipore 公司); HALO 90 A C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)

对照品 16 α -羟基松苓新酸 (批号 J12HB184946, 质量分数 $\geq$ 99%)、茯苓酸 B (批号 J13HB172712, 质量分数 $\geq$ 95%)、去氢土莫酸 (批号 A19GB158345, 质量分数 $\geq$ 95%)、茯苓酸 A (批号 J28HB186446, 质量分数 $\geq$ 96%)、多孔菌酸 C (批号 P08J11L107514, 质量分数 $\geq$ 95%)、3-表去氢土莫酸 (批号 A26IB212331, 质量分数 $\geq$ 95%)、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸 (批号 P08J11S107846, 质量分数 $\geq$ 95%)、去氢茯苓酸 (批号 A19IB212921,

质量分数 $\geq$ 98%)、松苓新酸 (批号 P24J10S80630, 质量分数 $\geq$ 98%)、去氢齿孔酸 (批号 A18IB212947, 质量分数 $\geq$ 95%) 均购于上海源叶生物科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为超纯水。

37 批茯神 (S1~S17 批来自安徽, S18~S27 批来自云南, S28~S37 批来自湖北), 经安徽省食品药品检验研究院刘军玲主任中药师鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *P. cocos* (Schw.) Wolf 菌核中间抱有松根的白色部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 HALO 90A, C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以乙腈 (A)-0.05% 磷酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~9 min, 62% A; 9~28 min, 62%~78% A; 28~32 min, 78%~90% A; 32~38 min, 90% A; 38~40 min, 90%~62% A), 检测波长 242 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸对照品适量, 加甲醇溶解, 配制质量浓度依次为 0.038 3、0.049 0、0.048 5、0.033 7、0.047 0、0.043 0、0.038 4、0.054 7、0.089 6、0.040 9 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣用甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 取甲醇, 作为阴性对照品溶液。

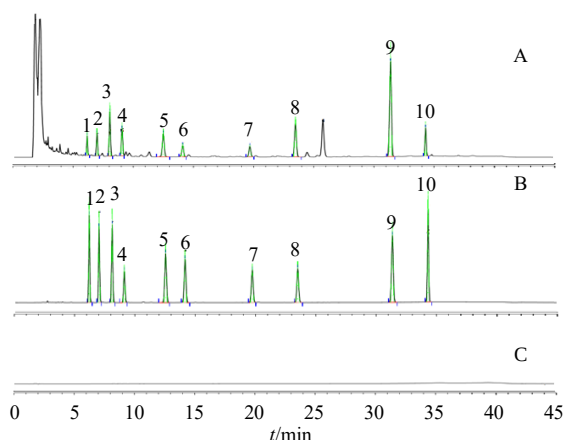
2.3 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.3.1 专属性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液 (S2) 和阴性对照溶液 (甲醇溶液) 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示, 在色谱图中各待测成分峰分离度良好, 溶剂对色谱峰无影响, 见图 1。

2.3.2 精密度试验 取茯神样品 (S2), 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件重复进样 6 次, 计算得到各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 1.5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取茯神样品 (S2), 按照“2.2.2”项方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.1”项色谱条件进样分析, 计算得到各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 1.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取茯神样品 (S2), 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件于制备后的 0、2、4、6、12、24 h 进样, 计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均 < 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。



1-16 α -羟基松苓新酸, 2-茯苓酸 B, 3-去氢土莫酸, 4-茯苓酸 A, 5-多孔菌酸 C, 6-3-表去氢土莫酸, 7-3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸, 8-去氢茯苓酸, 9-松苓新酸, 10-去氢齿孔酸。
1-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid, 2-poricoic acid B, 3-dehydrotumulolic acid, 4-poricoic acid A, 5-polyporenic acid C, 6-3-epidehydrotumulolic acid, 7-3-O-acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid, 8-dehydropachymic acid, 9-3 β -hydroxy-5 α -lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid, 10-dehydroeburicoic acid.

图 1 茯神供试品 (A)、混合对照品 (B) 和阴性对照品 (C) 溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of *Poria cum Pini Radix* test substance (A), mixed control substance (B), and negative control substance (C)

2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 指纹图谱的建立 将所得的 37 批茯神指纹图谱依次导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)”。以样品 S1 作为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1, 采用中位数法, 利用多点校正法进行峰匹配, 生成对照图谱, 37 批茯神色谱图与对照图谱的叠加图谱见图 2。

2.4.2 指纹图谱的分析 37 批茯神指纹图谱标定 10 个共有峰, 通过与对照品比对, 指出 1 号峰为 16 α -羟基松苓新酸、2 号峰为茯苓酸 B、3 号峰为去氢土莫酸、4 号峰为茯苓酸 A、5 号峰为多孔菌酸 C、6 号峰为 3-表去氢土莫酸、7 号峰为 3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、8 号峰为去氢茯苓酸、9 号峰为松苓新酸、10 号峰为去氢齿孔酸。计算 37 批不同产地茯神之间的相似度, 见表 1, 结果显示, 除 S23、S37 外, 其余 35 批茯神样品的相似度在 0.791~1.000, S23、S37 可能由个体差异导致, 其余样品相似度较高。

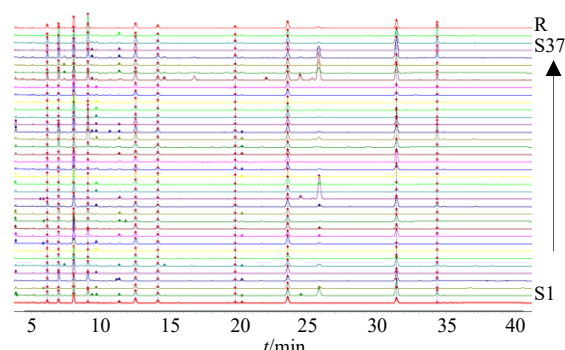


图 2 37 批茯神 HPLC 叠加图谱 (S1~S37) 及对照图谱 (R) of 37 batches of *Poria cum Pini Radix*

表 1 37 批茯神相似度评价结果

Table 1 Similarity evaluation results of 37 batches of *Poria cum Pini Radix*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S11	0.985	S21	0.983	S31	0.913
S2	0.853	S12	0.967	S22	0.932	S32	0.973
S3	0.884	S13	0.924	S23	0.623	S33	0.942
S4	0.791	S14	0.958	S24	0.995	S34	0.847
S5	0.991	S15	0.961	S25	0.998	S35	0.913
S6	0.957	S16	0.978	S26	0.899	S36	0.900
S7	0.966	S17	0.934	S27	0.931	S37	0.538
S8	0.967	S18	0.969	S28	0.983		
S9	0.868	S19	0.980	S29	0.969		
S10	0.914	S20	0.955	S30	0.979		

2.5 多指标成分定量

2.5.1 线性关系考察 精密称定 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸的对照品适量，以甲醇配制成 6 个不同质量浓度的系列混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积。以对照品浓度为横坐标（*X*），对照品峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归分析，结果显示各组分在相应浓度范围内线性关系良好。线性回归方程、线性范围及相关系数见表 2。

表 2 茯神中 10 种成分的线性回归结果

Table 2 Linear regression results of 10 components in *Poria cum Pini Radix*

成分	线性回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
16 α -羟基松苓新酸	$Y=0.233\,4\,X$	0.999 5	0.032 0~0.184 7
茯苓酸 B	$Y=0.175\,0\,X$	0.999 6	0.045 7~0.928 8
去氢土莫酸	$Y=0.222\,4\,X$	0.999 9	0.345 3~0.705 3
茯苓酸 A	$Y=0.140\,3\,X$	0.999 6	0.086 2~2.805 2
多孔菌酸 C	$Y=0.201\,4\,X$	0.999 9	0.157 2~0.471 5
3-表去氢土莫酸	$Y=0.224\,8\,X$	0.999 9	0.105 6~0.345 5
3- <i>O</i> -乙酰基-16 α -羟基松苓新酸	$Y=0.161\,4\,X$	0.999 9	0.018 1~0.324 1
去氢茯苓酸	$Y=0.118\,7\,X$	0.999 9	0.436 6~0.914 5
松苓新酸	$Y=0.228\,2\,X$	0.999 9	0.027 8~2.071 7
去氢齿孔酸	$Y=0.213\,9\,X$	0.999 9	0.004 3~0.698 4

2.5.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，结果 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸峰面积的 RSD 分别为 0.001 6%、0.001 1%、0.001 9%、0.002 6%、0.003 9%、0.002 0%、0.001 7%、0.001 6%、0.002 4%、0.002 4%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 精密称取茯神样品粉末 6 份（S2），按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下平行进样分析，结果 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸质量分数的 RSD 分别为 0.002 8%、0.001 1%、0.001 4%、0.001 7%、0.013 4%、0.001 4%、0.001 5%、0.001 3%、0.001 1%、0.002 7%，符合实验要求。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液（S2），

在“2.1”项色谱条件下，分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样，计算出含量，结果 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸质量分数的 RSD 分别为 0.002 3%、0.000 8%、0.000 6%、0.001 1%、0.017 2%、0.000 9%、0.001 5%、0.003 0%、0.000 7%、0.001 6%，样品稳定性良好，符合实验要求。

2.5.5 加样回收试验 精密称取已知成分含量的茯神样品（S2）0.5 g 置锥形瓶中，平行 6 份，按 1：1 比例加入各对照品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样分析，计算得到 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸的平均加样回收率分别为 90.27%、109.22%、97.90%、85.57%、107.41%、86.25%、88.45%、108.60%、96.22%、85.22%，RSD 分别为 0.033 4%、0.016 1%、0.026 4%、0.024 6%、0.032 7%、0.029 7%、0.026 1%、0.030 3%、0.049 8%、0.036 8%，表明本方法的加样回收率良好。

2.5.6 样品含量测定 取 37 批茯神药材粉末各约 1.0 g，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，计算 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-*O*-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸 10 个成分的含量。结果见表 3。

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 聚类分析 以 37 批茯神中 10 种化学成分的含量为变量，以平方欧氏距离为测距，运用 IBM SPSS Statistics 23 软件，采用系统聚类法，对 37 批茯神进行聚类分析，结果见图 3。当平方欧氏距离为 5 时可分为 3 类，S23 聚为一类，S37 聚为一类，其余样品聚为一类，S23、S37 可能由个体含量差异导致，其余样品间质量差异不大，与相似度结果相符。

2.6.2 主成分分析（principal component analysis, PCA）为进一步比较不同批次茯神间的质量差异，将 37 批茯神 10 个有效成分含量导入 IBM SPSS Statistics 23 和 Simca 软件，进行 PCA，共有峰特征值见表 4。前 2 个主成分的初始特征值依次为 6.098、2.248，累积方差贡献率达到 83.460%，表明以上 2

表 3 样品含量测定结果
Table 3 Results of content determination of samples

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	16α-羟基松苓新酸	茯苓酸 B	去氢土莫酸	茯苓酸 A	多孔菌酸 C	3-表去氢土莫酸	3-O-乙酰基-16α-羟基松苓新酸	去氢茯苓酸	松苓新酸	去氢齿孔酸	总和
S1	0.026 0	0.096 8	0.179 3	0.051 5	0.124 6	0.114 0	0.040 3	0.302 2	0.121 1	0.007 5	1.063 2
S2	0.055 5	0.132 3	0.179 9	0.219 2	0.151 2	0.112 5	0.090 5	0.382 7	0.523 2	0.101 2	1.948 1
S3	0.022 0	0.034 3	0.286 0	0.013 7	0.096 9	0.073 8	0.015 6	0.305 3	0.025 7	0.003 7	0.876 9
S4	0.035 5	0.243 3	0.098 3	0.391 8	0.105 1	0.113 4	0.062 4	0.275 6	0.273 5	0.066 6	1.665 3
S5	0.047 0	0.080 1	0.256 0	0.046 2	0.141 2	0.107 8	0.060 4	0.403 7	0.140 1	0.021 2	1.303 8
S6	0.044 3	0.104 0	0.224 9	0.197 7	0.132 8	0.128 3	0.066 9	0.367 2	0.274 7	0.080 4	1.621 1
S7	0.031 6	0.112 4	0.235 1	0.061 5	0.099 3	0.073 2	0.032 8	0.256 8	0.084 6	0.008 0	0.995 4
S8	0.038 3	0.051 0	0.228 7	0.050 6	0.089 8	0.055 7	0.041 6	0.246 3	0.128 7	0.026 8	0.957 5
S9	0.015 9	0.022 7	0.230 6	0.009 3	0.083 8	0.052 5	0.009 0	0.216 9	0.013 8	0.002 1	0.656 6
S10	0.023 2	0.128 7	0.129 2	0.237 7	0.119 8	0.101 0	0.038 6	0.310 1	0.185 0	0.048 7	1.321 9
S11	0.035 8	0.055 4	0.243 7	0.027 4	0.128 1	0.107 2	0.039 0	0.330 2	0.120 6	0.011 1	1.098 6
S12	0.022 6	0.099 9	0.140 1	0.117 5	0.111 2	0.101 3	0.037 7	0.294 7	0.178 3	0.027 0	1.130 2
S13	0.018 9	0.160 2	0.108 3	0.197 9	0.121 9	0.121 3	0.040 1	0.284 0	0.146 6	0.037 5	1.236 7
S14	0.060 0	0.079 4	0.272 8	0.107 6	0.126 1	0.081 7	0.076 7	0.399 4	0.248 8	0.056 2	1.508 7
S15	0.020 2	0.091 5	0.127 9	0.070 5	0.077 6	0.085 4	0.030 7	0.303 5	0.058 3	0.004 4	0.870 0
S16	0.023 0	0.051 7	0.193 2	0.022 7	0.097 6	0.096 9	0.029 1	0.286 7	0.064 5	0.010 8	0.876 0
S17	0.031 6	0.074 9	0.351 5	0.037 3	0.138 8	0.125 3	0.035 9	0.424 2	0.078 2	0.009 8	1.307 7
S18	0.054 9	0.099 9	0.211 9	0.106 8	0.150 1	0.127 0	0.080 7	0.393 8	0.288 9	0.046 5	1.560 4
S19	0.054 2	0.063 4	0.245 7	0.044 0	0.106 3	0.084 7	0.068 8	0.357 0	0.166 8	0.030 1	1.220 9
S20	0.050 5	0.141 5	0.211 2	0.107 8	0.194 8	0.152 4	0.082 9	0.441 8	0.265 5	0.046 4	1.694 9
S21	0.018 7	0.078 5	0.123 7	0.066 0	0.109 7	0.110 1	0.032 6	0.266 0	0.147 1	0.016 9	0.969 3
S22	0.035 2	0.173 5	0.148 2	0.164 1	0.142 8	0.120 0	0.048 8	0.300 7	0.237 4	0.045 8	1.416 5
S23	0.064 5	0.421 0	0.203 8	1.399 5	0.200 4	0.140 3	0.110 8	0.398 8	0.811 0	0.348 4	4.098 5
S24	0.048 9	0.174 4	0.248 3	0.085 3	0.217 7	0.172 1	0.073 4	0.455 6	0.235 8	0.016 4	1.728 0
S25	0.040 5	0.110 1	0.243 4	0.058 4	0.184 9	0.130 6	0.051 1	0.396 6	0.173 7	0.012 6	1.401 9
S26	0.024 4	0.039 6	0.298 8	0.014 7	0.096 1	0.078 7	0.025 5	0.370 8	0.042 2	0.005 9	0.996 6
S27	0.023 7	0.043 7	0.282 7	0.018 5	0.103 6	0.089 3	0.031 8	0.367 0	0.046 2	0.008 4	1.015 0
S28	0.030 8	0.063 7	0.221 7	0.062 1	0.134 2	0.118 5	0.033 5	0.310 9	0.092 9	0.015 8	1.084 0
S29	0.026 7	0.047 2	0.219 4	0.040 5	0.125 5	0.096 4	0.026 5	0.274 3	0.078 9	0.011 5	0.946 9
S30	0.032 9	0.063 4	0.224 9	0.060 7	0.138 0	0.108 9	0.036 2	0.298 8	0.115 3	0.019 7	1.098 7
S31	0.091 8	0.257 7	0.309 1	0.358 4	0.234 4	0.159 2	0.114 5	0.452 8	0.484 3	0.097 1	2.559 3
S32	0.045 9	0.138 9	0.174 8	0.138 0	0.149 7	0.122 0	0.068 0	0.349 5	0.258 9	0.035 8	1.481 6
S33	0.065 4	0.073 8	0.229 7	0.079 7	0.201 7	0.143 1	0.078 0	0.348 0	0.354 2	0.076 4	1.649 9
S34	0.078 0	0.233 8	0.233 1	0.336 0	0.209 7	0.163 2	0.110 0	0.424 8	0.543 8	0.101 5	2.433 8
S35	0.066 3	0.192 3	0.243 1	0.296 7	0.191 3	0.126 1	0.090 3	0.398 1	0.395 0	0.085 9	2.085 1
S36	0.079 3	0.204 3	0.301 5	0.423 9	0.199 4	0.117 2	0.096 4	0.393 5	0.497 4	0.124 9	2.437 9
S37	0.020 4	0.223 1	0.085 8	0.839 7	0.085 5	0.084 8	0.046 1	0.288 5	0.204 0	0.244 5	2.122 2

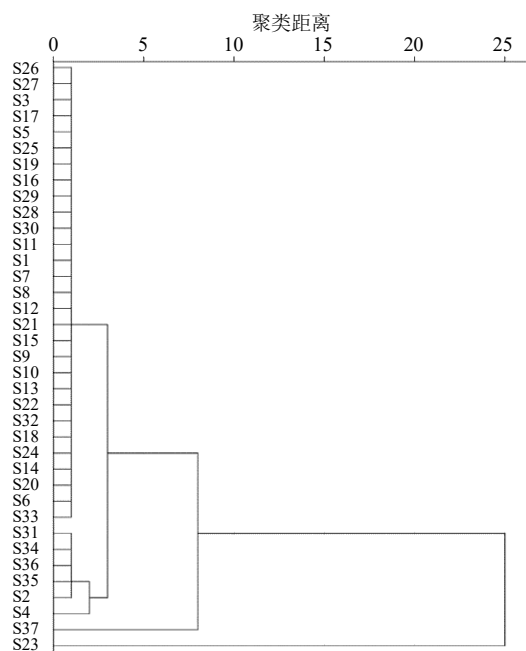


图 3 37 批茯神样品的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of 37 batches of *Poria cum Pini* Radix samples

个主成分能够较好的代表指纹图谱中的大部分信息。PCA 得分图显示 37 批样品可大致划分为 3 类，与 CA 结果一致，见图 4。

2.6.3 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 将 37 批茯神有效成分含量数据导入到 Simca 软件进行 OPLS-DA，以变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值 >1.0 为标准进行筛选，结果见图 5，表明共有 4 个特征峰的 VIP 值 >1.0 ，分别为峰 8 去氢茯苓酸 (VIP=1.775 9)、峰 1 为 16 α -羟基松苓新酸 (VIP=1.333 9)、峰 5 为多孔菌酸 C (VIP=1.125 1)、峰 6 为 3-表去氢土莫酸 (VIP=1.107)，表明这 4 个成分是茯神不同批次样品间质量差异贡献较大的标志物，可以用来区分不同产地、批次间茯神的质量差异。OPLS-DA 分析的结果与 CA、PCA 的结果一致。

3 讨论

3.1 色谱条件及处理方法的选择

本实验在实验操作过程中选用高效液相色谱法

表 4 主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalues and variance contribution rate

成分	初始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积/%	总计	方差百分比	累积/%	总计	方差百分比	累积/%
1	6.098	60.982	60.982	6.098	60.982	60.982	4.487	44.869	44.869
2	2.248	22.478	83.460	2.248	22.478	83.460	3.859	38.591	83.460
3	0.812	8.120	91.580						
4	0.405	4.045	95.625						
5	0.216	2.165	97.790						
6	0.119	1.193	98.983						
7	0.051	0.506	99.489						
8	0.041	0.406	99.895						
9	0.006	0.059	99.954						
10	0.005	0.046	100.000						

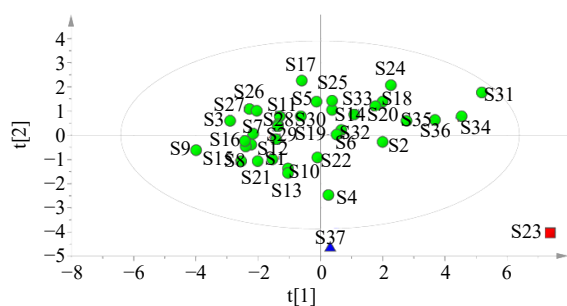


图 4 37 批茯神 PCA 得分图

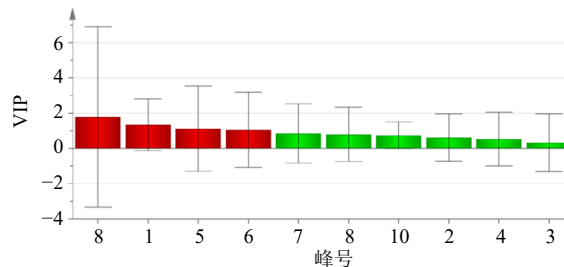
Fig. 4 PCA score chart of 37 batches of *Poria cum Pini* Radix

图 5 37 批茯神 OPLS-DA 模型 VIP 值图

Fig. 5 VIP value chart of 37 Batch of *Poria cum Pini* Radix

测定茯神三萜类成分,所用提取溶剂有乙醇、甲醇,提取方法有超声与加热回流,提取时间有 20、30、40 min,发现甲醇超声 30 min 后提取的样品溶液色谱峰信息较准确完整、操作简单且高效节约,适用于茯神的定性及定量研究。在波长的选择上,本文根据 10 种待测成分的吸收波长特点,分别考察了在 210、242 nm 波长下的检测效果。结果发现,在 210 nm 波长下 10 种三萜类成分均无吸收,在 242 nm 波长下有最大吸收,故最终选择 242 nm 为测定波长。另外对流动相亦进行了考察,有乙腈-0.05%磷酸、乙腈-0.1%磷酸等。结果表明,以乙腈-0.05%磷酸进行梯度洗脱获得的图谱峰形良好,基线分布稳定,可分别满足对 10 种三萜类化合物图谱的分离要求。

3.2 指纹图谱的建立

本实验通过对 37 批茯神药材在相同的提取方法和色谱条件下所得 HPLC 图谱及数据进行分析,结合中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版)分析结果,确定了茯神中共有 15 个共有色谱峰,比对对照品色谱峰指认了 16 α -羟基松苓新酸、茯苓酸 B、去氢土莫酸、茯苓酸 A、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 α -羟基松苓新酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢齿孔酸,且在 37 批样品中均检出这 10 个成分。此外,部分样品在 26 min 左右检出 1 个未知峰,这可能与茯神木的成分有关,有待进一步研究。除 S23、S37 外,其余 35 批茯神样品的相似度在 0.791~1.000, S23、S37 两批样品相似度存在较大差异,可能由个体差异导致,其余样品相似度较高,表明茯神多批次产地的质量相对稳定,能很好地反应样品的指纹图谱。

3.3 含量测定及化学计量学分析

本实验通过 CA、PCA 及 OPLS-DA 分析对茯神含量进行综合分析。通过 CA 发现,37 批茯神样品可聚为 3 类, S23 聚为一类, S37 聚为一类,其余样品聚为一类,与相似度结果相符。对比表 3 含量结果图发现, S23 中大多成分含量较高,而 S37 中大多成分的含量均较低,表明茯神中某些成分含量的高低可能是这两批样品各单独聚为一类的原因,产地来源并不是决定聚类结果的唯一因素;PCA 得分图与 CA 结果一致,利用主成分分析得到 2 个主成分,可代表样品中的大部分信息;此外, OPLS-DA 筛选出去氢茯苓酸、16 α -羟基松苓新酸、多孔菌酸 C、3-表去氢土莫酸这 4 个质量差异标志

物,表示这 4 个色谱峰所代表的成分对区分不同产地、批次茯神的贡献较大,可以用来区分不同批次间茯神的质量差异。

4 结语与展望

茯神是卫生部颁布的第一批药食同源两用品^[18],仅收载于地方标准,而且标准过于简单,无法有效控制茯神质量,本研究建立的指纹图谱及含量测定方法重复性良好,准确度高,可为茯神的质量控制提供新方法,弥补了现有质量标准的不足,可用于茯神的质量评价。此外,筛选出影响茯神质量的 4 个潜在差异标志物,可为进一步完善该药材的质量控制标准提供参考。

中药材作为中医用药的源头,其质量控制对后续中药饮片和中成药的安全性、有效性起到关键性作用,进而影响其临床疗效。通过市场调研,了解到目前市场流通的茯神有部分为后期在茯苓中人为插入松根而成,只为满足茯神外观性状要求,而非真正的抱木而生,不具备茯神的功效;另外,以松根为中心,靠近松根多远的范围,算作真正意义上的茯神,暂无统一的标准,有待进一步研究,以确定其规格等级。因此,需进一步完善茯神质量标准体系,建立科学、管用的质量标准,服务于监管,同时解决茯神质量掺伪问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋·唐慎微.重修政和经史证类备用本草(三十卷)[M].影印本.北京:人民卫生出版社,1957:296-297.
- [2] 中国药典[S].一部.1963:192.
- [3] 彭华胜,关雪玲,金艳,等.清宫茯神与茯神木药材文物性状鉴定及史料分析[J].中华医史杂志,2022,52(2):95-99.
- [4] 胡云飞,王玺,刘晴,等.中药茯神相关研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(1):115-121.
- [5] 梁雨彤,戴临风,郭瑞怡,等.高效液相色谱法在中药成分定量分析中的研究进展[J].化学与粘合,2022,44(4):341-344.
- [6] 周鹏妹.高效液相色谱在药物分析中的应用研究进展[J].化学工程与装备,2022(8):249-250.
- [7] 王茜.高效液相色谱的应用与展望[J].食品安全导刊,2018(27):186.
- [8] 郑勤琴,项勋,段纲,等.高效液相色谱和超高效液相色谱在药物分析中的应用研究[J].上海畜牧兽医通讯,2017(2):57-59.
- [9] 鄢海燕,邹纯才.《中国药典》(2010年版~2020年版)中药指纹(特征)图谱应用进展与展望[J].南方医科大

- 学学报, 2022, 42(1): 150-155.
- [10] 姚令文, 刘燕, 郑笑为, 等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 934-939.
- [11] 冯冰薇, 陈淑娜, 成秋香, 等. 化学模式识别结合指纹特征图谱与三萜酸含量测定探讨茯苓质量与产地的关系 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1506-1512.
- [12] 肖琳婧, 秦学玲, 龙琴, 等. 高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学评价上清丸的质量 [J]. 中南药学, 2023, 21(8): 2163-2169.
- [13] 马启凤, 高红梅, 王炳然, 等. 基于相似度评价大青龙汤遵古煎煮工艺研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2023, 39(6): 625-631.
- [14] 张秀如, 于明, 崔雅晴, 等. 基于 UPLC 指纹图谱的菟丝子酒炙前后化学模式识别及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2733-2740.
- [15] 高铭遥, 李翔宇, 陈欢, 等. 基于香精香料指纹图谱的相似度评价进展 [J]. 质量安全与检验检测, 2023, 33(2): 32-41.
- [16] 周雯雯, 史银基, 何江, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果质量 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2235-2242.
- [17] 姜慧洁, 杜昕, 章越, 等. 指纹图谱结合化学模式识别研究铁皮石斛质量差异 [J]. 海峡药学, 2022, 34(5): 27-32.
- [18] 江苏新医学院. 中药大辞典: 附编 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 23.

[责任编辑 时圣明]