

## 成分分析

基于波长转换 RP-HPLC 法的茯苓皮多成分  
含量测定及特征图谱方法研究\*徐凡<sup>1</sup>, 袁杰<sup>2,3</sup>, 蒲婧哲<sup>2,3</sup>, 胡冲<sup>2,3</sup>, 张亚中<sup>2,3,4\*\*</sup>, 刘守金<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051; 3. 国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室, 合肥 230051; 4. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**摘要** 目的: 本文通过建立茯苓皮的双波长切换 HPLC 特征图谱方法, 同时建立茯苓皮中 11 个三萜类成分含量的测定方法, 旨在为茯苓皮全面的质量评价提供定性和定量方法。方法: 采用 Agilent 5 HC-C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(含 3% 四氢呋喃)(A)和 0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 进样体积 20 μL, 检测波长 210、243 nm。结果: 所建立的特征图谱能有效的识别 18 个共有峰, 精密度、重复性、稳定性(48 h) 试验的 RSD 均 < 3.7% (n = 6); 11 个待测化学成分能够达到良好分离, 在考察质量范围内线性关系良好(r 均 ≥ 0.999 6), 平均回收率 95.4% ~ 105.5%, RSD 1.0% ~ 3.1%, 精密度、重复性、稳定性(48 h) 试验的 RSD 均 ≤ 3.0% (n = 6); 相似度分析结果显示, 大部分产地的茯苓皮药材的相似度很高; 含量测定结果表明, 11 个三萜类成分中茯苓酸 A 在所有批次茯苓皮中占比最高, 另外茯苓酸 A、松苓新酸、茯苓酸 B、去氢齿孔酸、栓菌酸 5 个成分的含量波动相对较大, 其他成分波动较平缓; 不同产地茯苓皮样品无明显地域上的差异。结论: 建立了茯苓皮特征图谱和多成分含量测定方法, 为茯苓皮的质量控制奠定了基础。

**关键词:** 茯苓皮; 三萜; 特征图谱; 含量测定; 波长转换

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)02-0214-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.02.03

Determination and characterization of *Poriae Cutis* multi-component  
content based on wavelength conversion RP-HPLC method\*XU Fan<sup>1</sup>, YUAN Jie<sup>2,3</sup>, PU Jing-zhe<sup>2,3</sup>, HU Chong<sup>2,3</sup>,  
ZHANG Ya-zhong<sup>2,3,4\*\*</sup>, LIU Shou-jin<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 3. State Drug Administration Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Chinese Medicine, Hefei 230051, China; 4. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China)

**Abstract Objective:** To comprehensively evaluate the quality of *Poriae Cutis*, and to establish a dual wavelength switching HPLC method for comparing the characteristic spectra of *Poriae Cutis* and studying the content of 11 triterpenoid components, to provide reference for the qualitative and quantitative research of *Poriae Cutis*.

\* 国家重点研发计划项目-中药材净切制关键技术与智能设备研究及应用(2019YFC1711500)

\*\* 通信作者 Tel: 15055638554; E-mail: 282483507@qq.com

第一作者 Tel: 15055638554; E-mail: 1572297968@qq.com

**Methods:** Agilent 5 HC - C<sub>18</sub>(2) column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted. Acetonitrile solution (contain 3% tetrahydrofuran) (A) and 0.1% formic acid aqueous solution (B) were used as the mobile phase with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 °C and the injection volume was 20 μL. The detection wavelengths were 210 and 243 nm. **Results:** The feature profiles developed were effective in identifying the 18 shared peaks. RSD for precision, repeatability and stability (48 h) tests were all less than 3.72% (n = 6). The 11 chemical components to be measured were well separated, with good linearity in the mass range examined (all  $r \geq 0.9996$ ). The average recovery rate was 95.4% - 105.5%, and the RSD was 1.0% - 3.1%. The RSDs of precision, repeatability, and stability (48 h) tests were all less than or equal to 3.0% (n = 6). The results of similarity analysis showed that most of the origins of *Poriae Cutis* were very similar to each other. The results of content determination showed that among the 11 triterpenoid constituents, poricoic acid A accounted for the highest percentage in all batches of *Poriae Cutis*. In addition, the content of five components, poricoic acid A, dehydrotrametenolic acid, poricoic acid B, dehydroeburicoic acid and trametenolic acid, fluctuated relatively more, while the other components fluctuated more gently. No significant geographic variation in samples from different origins. **Conclusion:** A method for the determination of *Poriae Cutis* characteristics and multi-component content was established, which laid the foundation for quality control of *Poriae Cutis*.

**Keywords:** *Poriae Cutis*; triterpenoids; specific chromatograms; content determination; wavelength conversion

茯苓皮为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 菌核的干燥外皮,具有利尿消肿的功效,用于水肿,小便不利<sup>[1]</sup>。在东汉之前,茯苓一直是以整体入药,在东汉时期才有了茯苓和茯苓皮之分,茯苓皮开始单独入药,东汉的《中藏经》卷六<sup>[2]</sup>首次记载了以茯苓皮入药的“五皮散”。而茯苓皮作为独立药材的记载最早见于明代《本草纲目》<sup>[3]</sup>,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中茯苓皮也已经单独记载。目前市场流通茯苓皮主要来源于安徽、湖北地区,但报道显示以云南产质量最佳<sup>[4]</sup>。

茯苓皮中主要含有多糖类和三萜类化学成分,其中三萜类成分已被证实具有利尿、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血脂、抗癫痫、美白等药理作用<sup>[5-11]</sup>。目前学者对茯苓中三萜类成分的研究已经较为深入,对茯苓皮中三萜类成分的研究较少,近10年来多见对茯苓皮中总三萜或1~5个三萜类成分的测定<sup>[12-14]</sup>,且2020年版《中国药典》中未对茯苓皮进行含量测定的规定,特异性不足,课题组前期已完成茯苓皮基础检查项如水分、总灰分等的测定,有一定实验基础。因此,本研究通过建立茯苓皮特征图谱,以及多成分含量测定的方法,为后期实验提供帮助,为茯苓皮的鉴别及质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司];ML204 型万分之一电子天平、XP26 型十万分之一电子天平(托利多仪器上海有限公司);Elmasonic S 30(H)超声波清洗器(德祥科技有限公司);116B 摇摆式六两装高速中药粉碎机(永历制药机械有限公司);5HC - C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(Agilent 公司)。

### 1.2 试药

对照品茯苓酸 B(批号 D28GB172711,纯度以 95% 计)、去氢土莫酸(批号 A19GB158345,纯度以 95% 计)、茯苓酸 A(批号 J08GB154007,纯度以 96% 计)、多孔菌酸 C(批号 P08J11L107514,纯度以 95% 计)、3-表去氢土莫酸(批号 A13HB180294,纯度以 95% 计)、3-O-乙酰-16α-羟基松苓新酸(批号 P08J11S107846,纯度以 95% 计)、去氢茯苓酸(批号 A17GB144422,纯度以 98% 计)、茯苓酸(批号 J02GB150406,纯度以 97% 计)、松苓新酸(批号 P24J10S80630,纯度以 98% 计)、栓菌酸(批号 A14HB180295,纯度以 95% 计)、去氢齿孔酸(批号 A14HB180296,纯度以 95% 计)均购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],磷酸为分析醇(国

药集团化学试剂有限公司),水为纯净水。

### 1.3 药材

21批茯苓皮药材于安徽、云南、广西、贵州及湖北产地收集,经安徽省食品药品检验研究院张亚中主任中药师鉴定多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 菌核的干燥外皮,产地及编号分别为安徽省六安市金寨县(P-1~P-4)、安庆市宿松县(P-5)、岳西县(P-6、P-7),云南省楚雄彝族自治州双柏县(P-8)、保山市腾冲县(P-9、P-10),广西壮族自治区玉林市(P-11~P-13),贵州省黔东南苗族侗族自治州黎平县(P-14~P-16),湖北省宜昌市夷陵区(P-17)、黄冈市罗田县(P-18~P-21)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Agilent 5 HC-C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(含3%四氢呋喃)(A)和0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 45%A;10~15 min, 45%A→52%A;15~40 min, 52%A;40~50 min, 52%A→70%A;50~65 min, 70%A→75%A;65~71 min, 75%A;71~74 min, 75%A→80%A;74~95 min, 80%A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35℃,进样体积 20 μL,检测波长 243 nm 和 210 nm (62~64.5 min、67~68.8 min、80~83 min),理论塔板数按茯苓酸 B 计算应≥8 000。

### 2.2 对照品溶液的制备

取各对照品适量,精密称量,加甲醇制成每 1 mL 含茯苓酸 B 0.184 7 mg、去氢土莫酸 0.077 9 mg、茯苓酸 A 0.772 7 mg、多孔菌酸 C 0.098 8 mg、3-表去氢土莫酸 0.040 0 mg、3-O-乙酰-16α-羟基松苓新酸 0.028 5 mg、去氢茯苓酸 0.071 7 mg、茯苓酸 0.103 1 mg、松苓新酸 0.453 7 mg、栓菌酸 0.172 6 mg、去氢齿孔酸 0.356 7 mg 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取茯苓皮粉末(过4号筛)约 1 g,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,密塞,称量,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz)30 min,取出,冷却,称量,用甲醇补足失去的量,摇匀,静置,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 茯苓皮 HPLC 特征图谱

通过 21 批茯苓皮药材的 HPLC 色谱图,建立茯苓皮的特征图谱,对茯苓皮中化学成分进行表征,为茯苓皮的鉴别和质量控制提供支持。

**2.4.1 特征图谱的建立** 取茯苓皮粉末(过4号筛)约 1 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进样,记录 HPLC 色谱图。采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012.1版)进行评价,设定 P-1 样品图谱为参照图谱,并将其余样品的色谱峰与 P-1 样品的色谱峰进行自动匹配,生成对照特征图谱,对 21 批茯苓皮药材特征图谱中出峰时间基本一致、峰面积较大的 18 个共有特征峰进行相似度分析。生成的茯苓皮药材对照特征图谱见图 1,21 批茯苓皮药材 HPLC 叠加图见图 2。

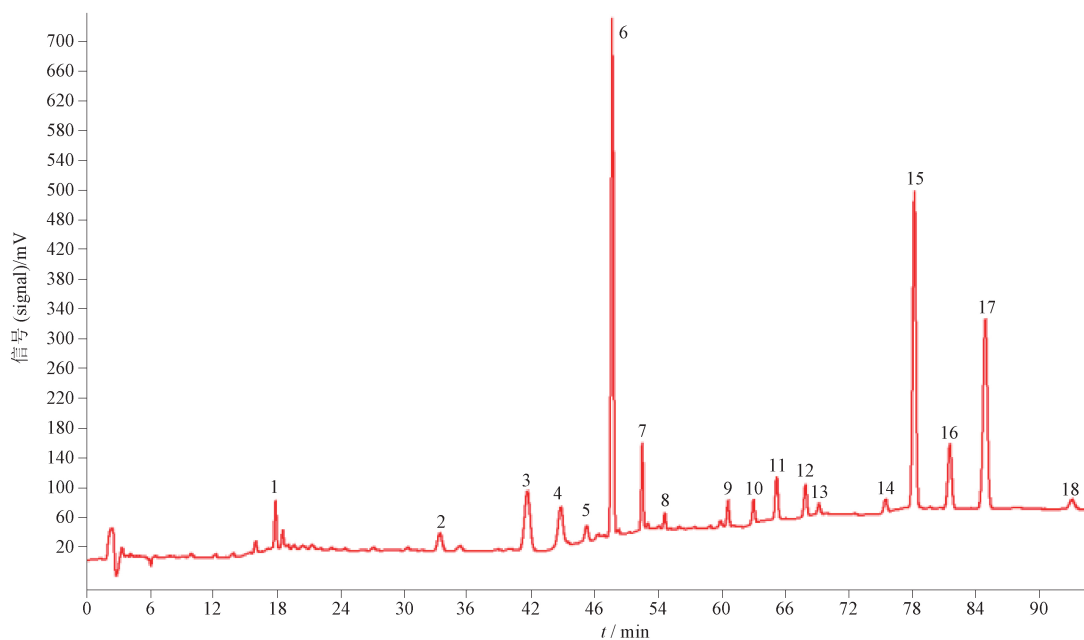
**2.4.2 相似度评价** 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对 21 批茯苓皮相似度进行评估,结果的数值越大,相似度越高。结果显示,除 P-8 样品外,其余 20 批样品与对照特征图谱的相似度均 > 0.9,说明大部分产地的茯苓皮中三萜类成分具有较高的相似度。

**2.4.3 特征峰的确定** 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件对 21 批茯苓皮进行共有峰标识,根据各峰的峰面积、峰形和分离度,选择 18 个共有峰作为特征峰,并与参照物图谱进行比对,最终确定 3 号峰为茯苓酸 B,4 号峰为去氢土莫酸,6 号峰为茯苓酸 A,7 号峰为多孔菌酸 C,8 号峰为 3-表去氢土莫酸,9 号峰为 3-O-乙酰-16α-羟基松苓新酸,11 号峰为去氢茯苓酸,12 号峰为茯苓酸,15 号峰为松苓新酸,16 号峰为栓菌酸,17 号峰为去氢齿孔酸。

**2.4.4 特征图谱精密度试验** 精密吸取供试品溶液 20 μL,按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,记录色谱图。以峰面积较大的茯苓酸 A 峰作为参照峰,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积。共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积 RSD 均 < 2.4%,结果表明仪器精密度良好。

**2.4.5 特征图谱稳定性试验** 精密吸取同一茯苓皮(P-8)供试品溶液 20 μL,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。以茯苓酸 A 峰为参照峰,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积。共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.4%,结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.4.6 特征图谱重复性试验** 取同一批茯苓皮供试品(P-8)6 份,精密称定,按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 20 μL,分别



3. 茯苓酸 B (poricoic acid B) 4. 去氢土莫酸 (dehydrotumulosic acid) 6. 茯苓酸 A (poricoic acid A) 7. 多孔菌酸 C (polyporenic acid C) 8. 3-表去氢土莫酸 (3-epidehydrotumulosic acid) 9. 3-O-乙酰-16 $\alpha$ -羟基松苓新酸 (3-O-acetyl-16 $\alpha$ -hydroxydehydrotrametenolic acid) 11. 去氢茯苓酸 (dehydropachymic acid) 12. 茯苓酸 (pachymic acid) 15. 松苓新酸 (dehydrotrametenolic acid) 16. 栓菌酸 (trametenolic acid) 17. 去氢齿孔酸 (dehydroeburicoic acid)

图 1 茯苓皮药材 HPLC 特征图谱

Fig. 1 HPLC specific chromatogram of Poriae Cutis

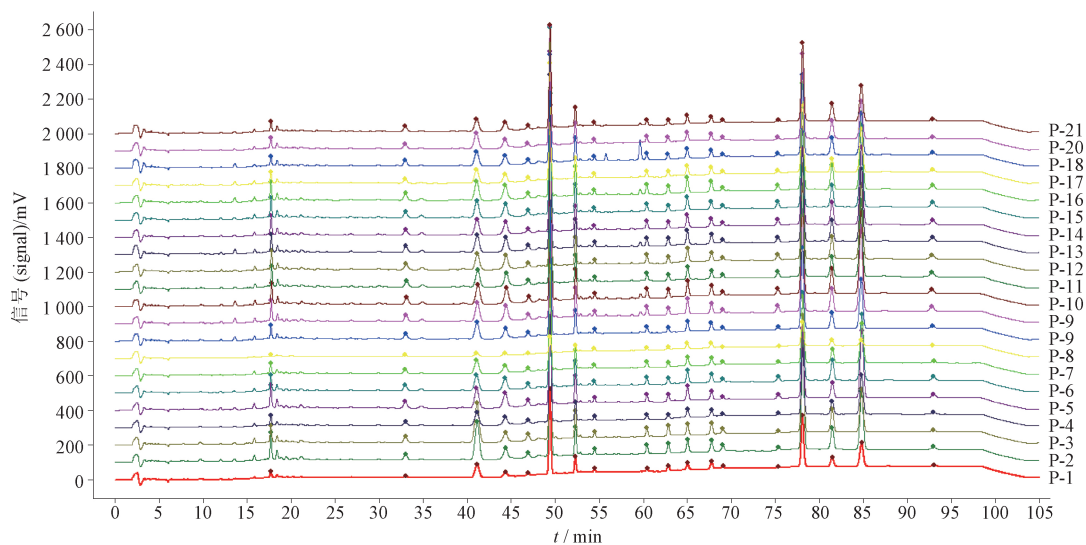


图 2 茯苓皮药材 HPLC 叠加图

Fig. 2 HPLC overlay chart of Poriae Cutis

进样测定,记录色谱图。以茯苓酸 A 峰为参照峰,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积。共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.7%, 结果表明该方法重复性好。

### 2.5 茯苓皮多成分含量测定

在特征图谱研究的基础上,通过特征图谱色谱条件、供试品溶液的和对照品溶液的制备,测定其中 11 个化学成分的含量,从定量的角度对茯苓皮的质量进行控

制,和特征图谱形成全面控制茯苓皮的质量控制体系。

**2.5.1 专属性试验** 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及纯溶剂溶液(甲醇,阴性对照),在相同的

色谱条件下,测定并记录色谱图,结果表明阴性对照无干扰,专属性强。茯苓皮样品与混合对照品的色谱图见图3。

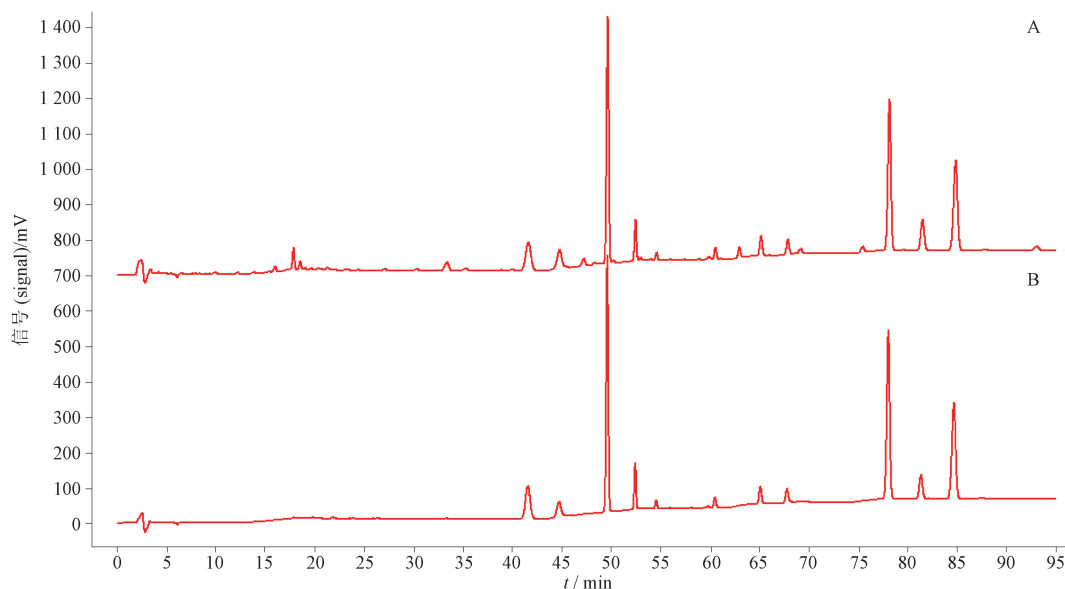


图3 茯苓皮样品(A)与混合对照品(B)HPLC图

Fig. 3 HPLC chromatograms of Poriae Cutis(A) and mixed reference substances(B)

**2.5.2 线性关系考察** 取混合对照品溶液适量,以进样量1、5、10、15、20、30  $\mu\text{L}$  进样,按“2.1”项下色谱条件进行测定。以待测成分的进样质量

( $X$ )为横坐标,待测成分峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数,结果见表1。

表1 11个成分的回归方程、线性范围

Tab. 1 Regression equation and linear range of 11 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range)/ $\mu\text{g}$	$r$
茯苓酸 B(poricoic acid B)	$Y = 1\ 681.9X + 15.1$	0.184 7 ~ 5.541 0	1.000
去氢土莫酸(dehydrotumulosic acid)	$Y = 1\ 716.3X - 14.8$	0.077 9 ~ 2.337 0	0.999 7
茯苓酸 A(poricoic acid A)	$Y = 1\ 349.3X + 165.5$	0.772 7 ~ 23.179 5	0.999 9
多孔菌酸 C(polyporenic acid C)	$Y = 1\ 692.0X + 0.9$	0.098 8 ~ 2.964 0	1.000
3-表去氢土莫酸(3-epidehydrotumulosic acid)	$Y = 827.1X + 2.4$	0.040 0 ~ 1.200 8	0.999 9
3-O-乙酰-16 $\alpha$ -羟基松苓新酸(3-O-acetyl-16 $\alpha$ -hydroxydehydrotrametenolic acid)	$Y = 1\ 549.1X + 3.5$	0.028 5 ~ 0.855 8	1.000
去氢茯苓酸(dehydropachymic acid)	$Y = 1\ 214.6X + 5.4$	0.071 7 ~ 2.149 5	1.000
茯苓酸(pachymic acid)	$Y = 680.51X + 51.8$	0.103 1 ~ 3.091 5	0.999 6
松苓新酸(dehydrotrametenolic acid)	$Y = 2\ 166.3X + 63.8$	0.453 7 ~ 13.609 5	1.000
栓菌酸(trametenolic acid)	$Y = 901.3X - 25.0$	0.172 6 ~ 5.176 5	0.999 8
去氢齿孔酸(dehydroeburicoic acid)	$Y = 2\ 017.1X + 39.8$	0.3567 ~ 10.701 0	1.000

**2.5.3 精密度试验** 取混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,连续进样6次,记录待测成

分峰面积,计算RSD。11个成分峰面积的RSD均 $< 2.0\%$ ,结果表明仪器精密度良好。

**2.5.4 稳定性试验** 取同一份供试品(P-8)溶液, 分别于0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 进行分析, 记录待测成分峰面积, 计算含量及相应 RSD。11 个成分含量的 RSD 均 < 2.5%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

**2.5.5 重复性试验** 取同一批茯苓皮供试品(P-8)6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算含量及相应 RSD。11 个成分含量为 0.214 8%、0.132 3%、1.155 8%、0.129 4%、0.048 3%、0.037 8%、

0.082 5%、0.121 5%、0.578 9%、0.197 3%、0.490 0%, RSD 为 2.6%、1.4%、2.9%、2.1%、1.7%、2.3%、1.2%、3.0%、2.2%、2.1%、2.8%, RSD 均 ≤ 3.0%, 说明本方法的重复性良好。

**2.5.6 加样回收率试验** 取已知含量的茯苓皮粉末(过 4 号筛)约 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别加入一定量混合对照品溶液, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进行分析, 计算各待测成分的平均回收率及 RSD, 见表 2。11 个待测成分的平均回收率在 95.4%~105.5%, RSD 均 ≤ 3.1%, 表明本方法的准确度良好。

表 2 11 个成分加样回收率试验 (n=6)

Tab. 2 The recoveries of 11 components

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
茯苓酸 B(poricoic acid B)	1.076 1	1.108 2	2.200 7	101.5	103.5	1.7
	1.075 2	1.108 2	2.251 8	106.4		
	1.075 2	1.108 2	2.233 2	104.6		
	1.076 1	1.108 2	2.211 5	102.5		
	1.075 7	1.108 2	2.212 9	102.7		
	1.076 1	1.108 2	2.221 7	103.5		
去氢土莫酸(dehydrotumulosic acid)	0.704 8	0.467 4	1.198 8	103.8	105.5	1.6
	0.704 2	0.467 4	1.227 0	107.9		
	0.704 2	0.467 4	1.203 0	104.5		
	0.704 8	0.467 4	1.204 5	104.6		
	0.704 5	0.467 4	1.223 4	107.3		
	0.704 8	0.467 4	1.207 4	105.0		
茯苓酸 A(poricoic acid A)	5.790 8	4.635 9	10.570 8	102.5	102.0	1.8
	5.786 2	4.635 9	10.666 1	104.2		
	5.786 2	4.635 9	10.619 0	103.4		
	5.790 8	4.635 9	10.514 0	101.5		
	5.7885	4.635 9	10.364 9	99.0		
	5.790 8	4.635 9	10.521 2	101.6		
多孔菌酸 C(polyporenic acid C)	0.630 8	0.592 8	1.239 1	102.5	102.7	1.0
	0.630 3	0.592 8	1.245 7	103.6		
	0.630 3	0.592 8	1.247 3	103.8		
	0.630 8	0.592 8	1.231 9	101.3		
	0.630 6	0.592 8	1.235 2	101.9		
	0.630 8	0.592 8	1.244 7	103.3		
3-表去氢土莫酸(3-epidehydrotumulosic acid)	0.242 0	0.240 2	0.475 9	97.4	99.6	2.3
	0.241 8	0.240 2	0.488 9	102.9		
	0.241 8	0.240 2	0.484 8	101.2		
	0.242 0	0.240 2	0.474 2	96.7		
	0.241 9	0.240 2	0.482 4	100.1		
	0.242 0	0.240 2	0.481 1	99.5		

表 2(续)

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
3-O-乙酰-16 $\alpha$ -羟基松苓新酸(3-O-acetyl-16 alpha-hydroxydehydrotrametenolic acid)	0.187 1	0.171 2	0.351 6	96.4	97.5	2.9
	0.187 0	0.171 2	0.350 5	95.9		
	0.187 0	0.171 2	0.355 3	98.5		
	0.187 1	0.171 2	0.349 5	95.3		
	0.187 1	0.171 2	0.350 5	95.9		
去氢茯苓酸(dehydropachymic acid)	0.187 1	0.171 2	0.350 5	95.9	95.4	1.9
	0.187 1	0.171 2	0.363 3	102.7		
	0.413 3	0.429 9	0.837 5	98.6		
	0.413 0	0.429 9	0.825 6	95.8		
	0.413 0	0.429 9	0.823 6	95.3		
	0.413 3	0.429 9	0.815 1	93.2		
茯苓酸(pachymic acid)	0.413 2	0.429 9	0.818 7	94.1	95.7	2.7
	0.413 3	0.429 9	0.823 3	95.2		
	0.564 2	0.618 3	1.154 2	95.0		
	0.563 8	0.618 3	1.140 2	92.6		
	0.563 8	0.618 3	1.158 2	95.8		
	0.564 2	0.618 3	1.146 2	93.6		
松苓新酸(dehydrotrametenolic acid)	0.564 0	0.618 3	1.169 8	97.8	98.6	3.1
	0.564 2	0.618 3	1.179 4	99.4		
	2.887 9	2.721 9	5.659 5	101.7		
	2.885 6	2.721 9	5.523 3	97.1		
	2.885 6	2.721 9	5.545 9	97.9		
	2.887 9	2.721 9	5.482 0	95.6		
栓菌酸(trametenolic acid)	2.886 7	2.721 9	5.497 4	96.2	103.8	2.3
	2.887 9	2.721 9	5.695 0	103.0		
	1.049 5	1.035 3	2.161 8	107.3		
	1.048 7	1.035 3	2.107 2	102.2		
	1.048 7	1.035 3	2.134 0	104.8		
	1.049 5	1.035 3	2.104 2	101.9		
去氢齿孔酸(dehydroeburicoic acid)	1.049 1	1.035 3	2.099 3	101.4	96.2	1.8
	1.049 5	1.035 3	2.141 5	105.4		
	2.455 1	2.140 2	4.526 8	97.2		
	2.453 1	2.140 2	4.534 7	97.6		
	2.453 1	2.140 2	4.529 2	97.4		
	2.455 1	2.140 2	4.451 1	94.1		
	2.454 1	2.140 2	4.439 5	93.7	97.0	
	2.455 1	2.140 2	4.522 4	97.0		

**2.5.7 样品含量测定** 分别取 21 批茯苓皮样品 (P1 ~ P21), 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进行测定, 用外标法计算样品含量, 结果见表 3。

**2.5.8 聚类分析及主成分分析** 将 21 批茯苓样品中 11 个三萜类成分的含量测定结果导入 SPSS 21.0

软件中, 采用聚类分析法结合平方欧氏距离(d)进行分析, 生成 21 批不同产地茯苓中三萜类成分含量的聚类分析树状图, 详见图 4。同时将数据导入 SIMCA-P 14.0 软件进行主成分分析(PCA), 以 21 批样品中 11 个三萜类成分的含量为变量, 建立 PCA 模型, 结果见图 5。

表3 茯苓皮样品中11个三萜类成分的含量  
Tab. 3 Contents of 11 triterpenoid components in Poriae Cutis

编号 (No.)	含量(content)/%											
	茯苓酸 B (poricoic acid B)	去氢 土莫酸 (dehydro- tumulosic acid)	茯苓酸 A (poricoic acid A)	多孔 菌酸 C (polypo- renic acid C)	3-表去 氢土莫酸 (3-epideh- ydrotumu- losic acid)	3-O-乙酰-16 $\alpha$ - 羟基松苓新酸 (3-O-acetyl-16 alpha-hydroxydehydro- trametenolic acid)	去氢茯 苓酸 (dehydropa- chymic acid)	茯苓酸 (pach- ymic acid)	松苓新酸 (dehydrotra- metenolic acid)	栓菌酸 (tramete- nolic acid)	去氢齿 孔酸 (dehydro- eburicoic acid)	总和 (sum)
P-1	0.216	0.102	0.774	0.099	0.056	0.027	0.079	0.169	0.396	0.208	0.258	2.384
P-2	0.621	0.187	2.351	0.173	0.073	0.063	0.144	0.241	0.841	0.439	0.611	5.745
P-3	0.624	0.174	1.516	0.159	0.067	0.060	0.122	0.249	0.876	0.494	0.417	4.759
P-4	0.221	0.138	1.014	0.118	0.046	0.043	0.100	0.161	0.526	0.297	0.439	3.103
P-5	0.330	0.248	1.489	0.176	0.066	0.063	0.178	0.222	0.587	0.381	0.773	4.513
P-6	0.255	0.204	1.412	0.150	0.054	0.055	0.144	0.191	0.656	0.436	0.690	4.245
P-7	0.225	0.135	0.961	0.113	0.045	0.045	0.102	0.159	0.516	0.307	0.422	3.029
P-8	0.198	0.133	1.075	0.128	0.041	0.034	0.077	0.143	0.542	0.304	0.459	3.133
P-9	0.242	0.199	1.366	0.144	0.054	0.053	0.141	0.216	0.606	0.419	0.658	4.096
P-10	0.187	0.124	0.881	0.102	0.043	0.035	0.092	0.140	0.428	0.257	0.379	2.668
P-11	0.269	0.216	1.505	0.153	0.057	0.059	0.152	0.218	0.692	0.465	0.735	4.520
P-12	0.249	0.205	1.459	0.144	0.048	0.056	0.143	0.166	0.651	0.406	0.716	4.244
P-13	0.272	0.199	1.482	0.141	0.056	0.049	0.149	0.187	0.643	0.428	0.698	4.304
P-14	0.257	0.210	1.516	0.147	0.055	0.054	0.150	0.201	0.659	0.427	0.759	4.435
P-15	0.248	0.199	1.501	0.144	0.057	0.057	0.151	0.181	0.680	0.445	0.749	4.411
P-16	0.256	0.195	1.496	0.135	0.048	0.050	0.147	0.195	0.647	0.396	0.737	4.301
P-17	0.205	0.215	1.353	0.158	0.062	0.050	0.149	0.183	0.550	0.357	0.646	3.927
P-18	0.262	0.204	1.332	0.146	0.054	0.060	0.146	0.185	0.677	0.440	0.670	4.177
P-19	0.221	0.135	0.922	0.113	0.041	0.036	0.084	0.140	0.500	0.305	0.353	2.850
P-20	0.253	0.135	1.078	0.120	0.046	0.045	0.094	0.146	0.621	0.370	0.375	3.283
P-21	0.187	0.131	0.904	0.108	0.044	0.038	0.089	0.128	0.514	0.336	0.340	2.818

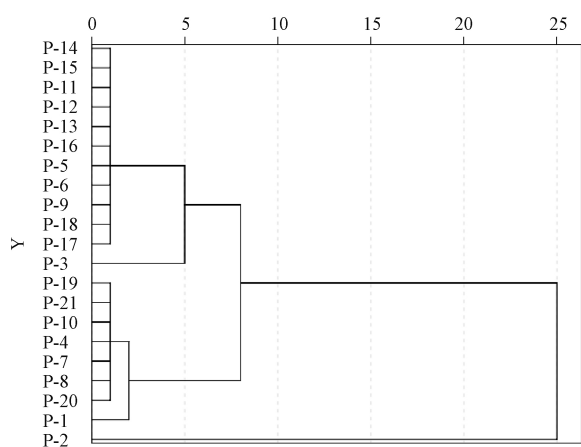


图4 21批茯苓皮样品中11个成分含量的聚类分析  
Fig. 4 Cluster analysis of the content of 11 components in 21 batches of Poriae Cutis

2.5.9 不同产地茯苓皮11个成分含量变化 建立的茯苓皮特征图谱精密性、稳定性、重复性均符合2020年版《中国药典》规定,所建立的特征图谱标定大部分共有峰,11个三萜类成分分离度好。建立的含量测定方法专属性强,准确可靠。相似度分析结果显示,大部分产地的茯苓皮药材中11个三萜类成分的相似度很高。从表3中11个三萜类成分的含量测定结果可以看到,茯苓酸A在所有批次茯苓皮中占比最高,平均含量>1%。除个别样品外,茯苓皮中11个成分的含量变化呈现正相关趋势,猜测与其结构相似,在植物体内的积累规律一致有关。11个成分中茯苓酸A、松苓新酸、茯苓酸B、去氢齿孔酸、栓菌酸的含量波动变化较大,表明不同生态环境可能对以上5个成分的积累影响更大。

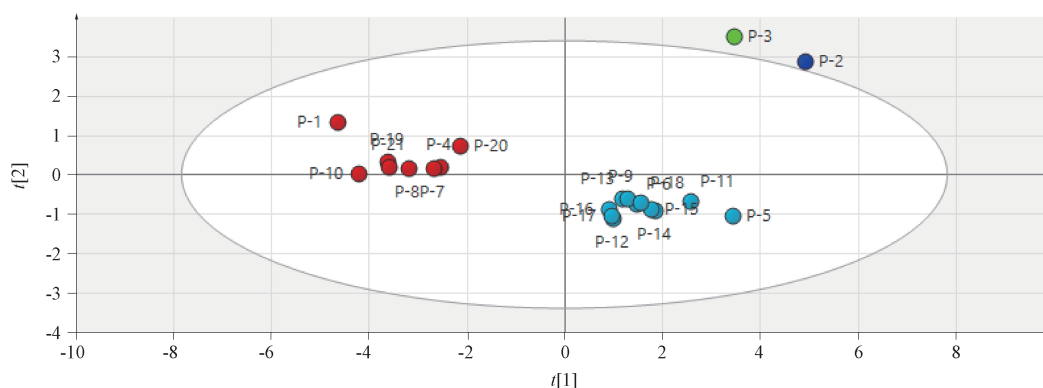


图5 21批茯苓皮样品主成分分析图

Fig. 5 Principal component analysis of 21 batches of Poriae Cutis samples

聚类分析结果表明,21批样品按  $d=4$  可分为4类:样品 P-5、P-6、P-9、P-11~P-18 聚为 I 类,特征为 11 个成分整体含量中上,总含量在 3.927%~4.520%;样品 P-3 单独聚为 II 类,特征为 11 个成分总含量较高,其中茯苓酸 B 含量  $> 0.624\%$ ;样品 P-1、P-4、P-7、P-8、P-10、P-19~P-21 聚为 III 类,特征为 11 个成分整体含量中等偏低,总含量在 2.384%~3.283%;样品 P-2 单独聚为 IV 类,特征为 11 个成分整体含量偏高,总含量达到 5.745%。由含量测定结果可见,21 批茯苓皮样品中 11 个成分的总含量整体差异较大,以不同省份划分产地区域,同一聚类中样品所属区域较分散,同一区域内不同产地样品分布在不同聚类中,未体现出显著的区域性特征。主成分分析建立的模型拟合优度  $R^2$  为 0.949,预测优度  $Q^2$  为 0.833,均  $> 0.5$ ,模型良好可靠,为可用模型,且主成分分析结果与聚类分析结果一致。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的优化

**3.1.1 吸收波长的确定** 采用 DAD 检测器进行全波长扫描,峰 10、12、16 在 201 nm 有最大吸收,其余共有峰在 243 nm 有最大吸收,观察色谱图发现在 201 nm 有较明显的端吸收,影响茯苓酸、栓菌酸色谱峰峰型对称性。比较不同检测波长(201、205、210 nm)色谱图,发现选取 210 nm 作为检测波长时,峰 10、12、16 峰形较好,基线较平稳,与 201 nm 峰面积无较大差异,故选择 210、243 nm 进行双波长检测。

**3.1.2 流动相的考察** 本研究考察了乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.5%磷酸水溶液,观察色谱图发现乙腈-0.1%磷酸水

液与乙腈-0.5%磷酸水溶液的分流效果差别不大,考虑 pH 对色谱柱柱效的影响,故选择乙腈-0.1%磷酸水溶液。个别色谱峰有肩峰较难分离,查阅文献发现在乙腈中加入 3% 的四氢呋喃<sup>[15]</sup>可以使分离效果更好,通过比较色谱峰分离度及峰形,最终确定以乙腈(3% 的四氢呋喃)-0.1%磷酸水溶液为流动相。

**3.1.3 色谱柱的考察** 考察了 Welch Ultimate Plus  $C_{18}$  色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Agilent Eclipse XDB- $C_{18}$  色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Agilent 5HC- $C_{18}$ (2) 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)对茯苓皮中 11 个成分分离度的影响。3-O-乙酰-16 $\alpha$ -羟基松苓新酸与旁边的干扰峰较难分离,采用 Agilent 5HC- $C_{18}$ (2) 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)可以达到很好的分离效果。

#### 3.2 供试品前处理方法考察

分别取茯苓皮样品(P-8)粉末约 1 g,置具塞锥形瓶中,考察不同提取方式(超声提取、热回流提取)、不同提取时间(15、30、60、90 min)、不同提取溶剂(50% 甲醇、甲醇、无水乙醇、95% 乙醇)以及不同溶剂用量(15、25、50 mL),最终选择 25 mL 甲醇超声处理 30 min 为前处理方法。

### 4 小结

茯苓皮利尿作用较茯苓更强,研究发现茯苓皮中总三萜的含量明显高于茯苓,且已证实四环三萜类化合物是茯苓皮利尿作用的主要活性成分<sup>[5,14]</sup>,故茯苓皮中三萜类成分的高低影响着茯苓皮利尿效果,制定一种可以准确定量茯苓皮中三萜类成分的方法很有必要。本文建立的茯苓皮特征图谱共得到 18 个共有峰,其中 11 个峰得到对照品标定。各特征

峰分离度较好,较为全面的反映了茯苓皮药材的特异性和整体性信息,可以用于茯苓皮的定性鉴别。

建立的茯苓皮含量测定方法专属性强,准确可靠,分析含量测定结果发现,茯苓皮中 11 个三萜类成分的含量变化呈现正相关趋势,猜测与其结构相似,在植物体内的积累规律一致有关,其中茯苓酸 A、松苓新酸、茯苓酸 B、去氢齿孔酸、栓菌酸 5 个成分的含量波动相对较大,其他成分波动较平缓,猜测外界生态因子可能主要对以上 5 个成分的积累影响更大;对不同产地 21 批茯苓皮药材中 11 个三萜类成分含量测定结果的分析显示,茯苓皮样品无明显地域上的差异。

综上所述,本研究建立的特征图谱可以在对照品缺乏的情况下,用于茯苓皮的定性鉴别。建立的含量测定方法可以同时用于茯苓皮中多个三萜类成分的含量测定,为茯苓皮全面的质量控制提供帮助。后期有必要扩大不同产地样品量,进一步分析产地是否对茯苓皮三萜类成分积累有影响,为全面掌握茯苓皮药材的品质提供帮助。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 252  
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 252
- [2] 汉·华佗. 中藏经[M]. 北京: 学苑出版社, 2007: 81  
Han Dynasty · HUA T. Zhongzang Jing [M]. Beijing: Xueyuan Publishing House, 2007: 81
- [3] 李时珍. 本草纲目. 下册[M]. 北京: 华夏出版社, 2008: 1437  
LI SZ. Compendium of Materia Medica. Vol II [M]. Beijing: Huaxia Publishing House, 2008: 1437
- [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  
ZHAO JC, WANG YH, JIN Y, et al. Herbal textual research on *Poria cocos* in famous classical formulas [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(10): 327
- [5] 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  
TIAN T, CHEN H, YIN L, et al. Diuretic activity of aqueous and ethanol extracts from *Poria cocos* and Cortex *Poriae* and active component identification [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2014, 28(1): 57
- [6] 陈红梅. 茯苓皮多糖和三萜类物质提取及其抗氧化活性研究[J]. 生物学杂志, 2015, 32(2): 48  
CHEN HM. Study on extraction technology and antioxidative activity of polysaccharides and triterpenoids from peel of *Poria cocos* [J]. J Bio, 2015, 32(2): 48
- [7] 沈思. 茯苓皮中三萜的提取、分离纯化及其活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008  
SHEN S. Extraction, Separation, Identification and Permentry Studies on Whitening Skin Activity of Triterpenes from Surface Layer of *Poria cocos* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008
- [8] 王宏侠. 茯苓不同药用部位化学成分分析及赤茯苓质量标准研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2016  
WANG HX. Qualitative and Quantitative Analysis of Components in Different Medicinal Parts of *Poria* and Study on Quality Standard of *Rubra Poria* [D]. Hebei: Hebei Medical University, 2016
- [9] 毛跟年, 张诗韵, 付超, 等. 茯苓皮总三萜的降血脂活性研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2015, 33(3): 130  
MAO GN, ZHANG SY, FU C, et al. The hypolipidemic study of total triterpenic compounds from sclerotia of *Poria Cocos* [J]. J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed), 2015, 33(3): 130
- [10] 吁诚铭, 李金平, 胡先明. 茯苓皮提取物抑制癫痫活性作用[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1288  
XU CM, LI JP, HU XM. Inhibitory effect of *Poriae* Cutis extract on epileptic activity [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(6): 1288
- [11] 程水明, 雷霄宇, 刘冰洁, 等. 茯苓皮三萜抑制酪氨酸酶机理研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(9): 18  
CHENG SM, LEI XY, LIU BJ, et al. Analysis of the whitening active of triterpenoids from *Poria cocos* peel and mechanism of tyrosinase inhibition [J]. Food Res Dev, 2016, 37(9): 18
- [12] 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  
CHE S, LI Q, HUO YS, et al. RP-HPLC simultaneous determination of five triterpenoid acids in different parts of *Poria cocos* by UV wavelengths switch [J]. Acta Pharm Sin, 2010, 45(4): 494
- [13] 郭芬, 马巾媛, 李维峰, 等. 普洱市栽培茯苓与茯苓皮中茯苓酸的含量测定[J]. 生物技术世界, 2014(11): 4  
GUO F, MA JY, LI WF, et al. Determination of porinic acid in cultivated *Poria cocos* and *Poriae* Cutis in Pu'er City [J]. Biotech World, 2014(11): 4
- [14] 崔仙红, 张鹏, 朱笛, 等. 不同产地茯苓及茯苓皮中总三萜含量比较[J]. 河南中医, 2020, 40(12): 1926  
CUI XH, ZHANG P, ZHU D, et al. Comparison of total triterpenoids content in fuling and fulingpi from different habitats [J]. Henan Tradit Chin Med, 2020, 40(12): 1926
- [15] 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, 44(7): 1371  
TIAN SS, LIU XQ, FENG WH, et al. Quality evaluation of *Poria* based on specific chromatogram and quantitative analysis of multi-components [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(7): 1371

(本文于 2023 年 11 月 22 日修改回)