

超临界流体色谱法分析茯苓不同药用部位中三萜酸类成分

李娜^{1,2}, 杨远贵¹, 陈玥¹, 徐芮¹, 谷丽华¹, 谢元彪³, 李淞明³,
詹常森³, 王峥涛¹, 杨莉^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 3. 上海和黄药业有限公司, 上海 201401)

摘要: 首次采用超高效合相色谱-光电二级阵列管-四级飞行时间质谱联用技术 (UPC²-PDA-Q-TOF/MS^E) 建立定性和定量方法, 对茯苓不同药用部位 (茯苓皮、赤茯苓、茯苓、茯神) 进行质量评价。利用 UPC²-PDA 从茯苓类药材中共检测到 18 个色谱峰, 结合主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 对 4 个药用部位进行比较, 结果表明不同药用部位成分差异较大, 并筛选出茯苓新酸 A、茯苓新酸 B、去氢齿孔酸、松苓新酸为主要三萜酸类差异化合物。进一步结合茯苓类药材中的共有活性成分猪苓酸 C, 采用 UPC²-PDA 法建立了茯苓类药材中上述 5 种三萜酸类化合物的含量测定方法。该方法可使 5 个三萜酸成分在 15 min 内达到基线分离, 有机试剂甲醇的用量仅为 HPLC 方法的 3.63%。以 5 种三萜酸成分为指标, 茯苓不同药用部位中三萜酸含量由高到低依次为茯苓皮、赤茯苓、茯神和茯苓。本实验所建立的方法具有简便、快速、节省溶剂等优点, 采用环境友好型气体二氧化碳为流动相, 在减少环境污染方面具有独特优势, 可为茯苓药材及其相关产品开发和标准制定提供参考。

关键词: 茯苓; 不同部位; 三萜酸; 超临界流体色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1120-07

Analysis of triterpenoic acids in different medicinal parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf using supercritical fluid chromatography

LI Na^{1,2}, YANG Yuan-gui¹, CHEN Yue¹, XU Rui¹, GU Li-hua¹, XIE Yuan-biao³, LI Song-ming³,
ZHAN Chang-sen³, WANG Zheng-tao¹, YANG Li^{1,2*}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Hutchison Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

Abstract: Qualitative and quantitative methods were used to establish the quality of different medicinal parts of *Poria cocos* (*Poriae Cutis*, *rubra Poria*, *white Poria*, *Poria cum Radix Pini*) by using ultra-performance convergence chromatography coupled with photo-diode array and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPC²-PDA-Q-TOF/MS^E). A total of 18 chromatographic peaks were detected from *Poria cocos* by UPC²-PDA. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to compare the four medicinal parts. The results showed that there were significant differences in the components of different medicinal parts, and the main triterpenoic acids were poricoic acid A, poricoic acid B, dehydroeburicoic acid, and dehydro-

收稿日期: 2021-01-08; 修回日期: 2021-02-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81920108033, 82074011).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, E-mail: yl7@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0045

trametenolic acid. When combined with the common active component polyporenic acid C, a method for determination of five triterpenoic acids in different parts of *Poria cocos* was established. These components could be separated within 15 min, and the amount of methanol was 3.63% of that of HPLC method. Taking the five triterpenoid acids as an index, the content of triterpenoid acids in different parts of *Poria cocos* from high to low were *Poriae Cutis*, *rubra Poria*, white *Poria* and *Poria cum Radix Pini*. The method is simple, rapid, and uses minimal solvent. The mobile phase of environment-friendly gas carbon dioxide has unique advantages in reducing environmental pollution, which can provide a basis for the development and standard formulation of *Poria cocos* and its related products.

Key words: *Poria cocos*; different medicinal part; triterpenoid acid; ultra-performance convergence chromatography; assay determination

茯苓来源于多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核^[1], 含有多糖类、三萜类、甾醇类、氨基酸、脂肪酸等化学成分^[2-4]。三萜类化合物是该药的主要药效组分之一, 具有抗肿瘤、降血糖、利尿等药理作用^[5-7]。东汉以前茯苓常以整体入药, 东汉时期始载有茯苓皮 (*Poriae Cutis*) 入药的方剂, 东晋时期开始有茯苓 (white *Poria*)、茯神 (*Poria cum Radix Pini*) 的区别, 南北朝时期开始有茯苓、赤茯苓 (*rubra Poria*) 的记载^[8]。根据入药部位和功效不同, 茯苓类药材常分为茯苓皮、赤茯苓、茯苓、茯神四种。茯苓皮是茯苓菌核的外皮部分, 有利水消肿之功效; 赤茯苓为茯苓菌核近外皮部的淡红色部分, 有行水利湿热、益心肺之功效; 茯苓为菌核中间的白色部分, 有利水渗湿、益脾和胃之功效; 茯神为菌核中间抱有松根部分, 有宁心、安神、利尿之功效。随着茯苓皮、赤茯苓、茯苓、茯神入药部位由表及里, 行水利尿作用逐渐减弱而宁心安神作用增强。近年来, 茯苓各方面研究逐渐增多, 其化学成分与药理作用及其应用开发备受关注, 但关于不同药用部位化学成分的差异至今仍不够明确。为了临床用药的准确安全, 有必要对不同部位茯苓进行区分。因此, 茯苓中三萜酸类活性成分的定性定量评价对其临床用药和质量控制具有重要意义。

目前, 高效液相色谱法常用于茯苓中三萜类成分的含量测定, 但它存在分离时间过长, 有机试剂用量大, 溶剂效应高等缺点^[9,10]。近年来, 液质联用技术因具有分析速度快, 灵敏度高, 准确性强的特点, 被广泛应用于中药材的分析中^[11,12]。已有利用液质联用技术对茯苓中三萜酸类成分进行含量测定^[13,14], Zhao等^[15]利用 UPLC-QTRAP-MS 测定茯苓中 8 个三萜酸类成分, 与本研究所测指标不尽相同, 分析茯苓药用部位也有区别, 同时由于质谱设备价格昂贵, 普及性较低, 不适用于中药材的质量控制。2020年版《中国药典》中茯苓和茯苓皮均无 [含量测定] 项, 缺少切实可行的质量控制方法。

超临界色谱法是以清洁气体 CO₂ 为流动相, 超临界状态下, 具有黏度低、扩散率高的特点, 使得超临界流体色谱法比 HPLC 具有更快速和更高分辨率的分离优势^[16]。当用于大量样品的分离分析时既能节省时间、提高效率又不需要使用大量的有机溶剂, 在节约成本和保护环境方面具有独特的优势^[17]。本实验采用超临界流体色谱技术, 分别对色谱柱类型、改性剂类型、柱温和背压进行系统优化。优化后的方法, 从整体对茯苓类药材进行定性评价, 筛选出差异较大的特征性三萜酸类成分, 包括茯苓新酸 A、茯苓新酸 B、去氢齿孔酸和松苓新酸。进一步结合茯苓类药材中的共有活性成分猪苓酸 C, 采用 UPC²-PDA 对上述 5 种三萜酸类化合物进行含量测定。本研究所建立的方法具有简便快捷、绿色、能耗成本较低等优点, 可为茯苓类药材及其相关产品提供实验依据。

材料与方法

仪器与试剂 ACQUITY UPLCTM-QTOF Synapt G2 HDMS 液质联用仪 (沃特世科技有限公司, 美国), MassLynx 4.1 工作站; Waters Acquity UPC²-PDA (沃特世科技上海有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司, 美国); BT 25 S 型电子分析天平 (精密密度为 0.01 mg) 和 BSA124S-CW (精密密度为 0.1 mg) 型电子分析天平 (北京赛多利斯公司); KQ-250DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ZP15D1 型超声纯水仪 (上海泽权仪器设备有限公司)。对照品猪苓酸 C (批号: 19051522, 纯度 98%, 上海同田生物技术股份有限公司); 去氢齿孔酸 (批号: PRF10031923, 纯度 98%, 成都普瑞法科技开发有限公司)。茯苓新酸 A (批号: 200413, 纯度 98%)、茯苓新酸 B (批号: 200605, 纯度 98%)、松苓新酸 (批号: 200807, 纯度 98%) 均由成都植标化纯生物技术有限公司提供; 高纯二氧化碳 (纯度 99.995%, 液化空气昆山气体科技有限公司); 甲醇、乙腈、异丙醇 (HPLC 级, Fisher Chemical, 美国); 甲

酸 (HPLC 级, CNW Technologies, 德国); 水为超纯水。

实验材料 此次供研究用的 22 批茯苓药材 (表 1) 主要产地包括湖北、安徽、云南省, 其中 20 批由 3 个饮片生产企业提供, 2 批购自药店, 经上海中药标准化研究中心吴立宏研究员收集并鉴定, 标本保存于上海中药标准化研究中心。

Table 1 The origin information of *Poria cocos* (Schw.) Wolf

No.	Dissected part	Locality	Collecting time
S1	Poriae Cutis	Yingshan, Hubei	2018.11
S2	Poriae Cutis	Yingshan, Hubei	2018.11
S3	Poriae Cutis	Yingshan, Hubei	2018.12
S4	Poriae Cutis	Yingshan, Hubei	2018.12
S5	Poriae Cutis	Yingshan, Hubei	2018.11
S6	Poriae Cutis	Bozhou, Anhui	2020.08
S7	Poriae Cutis	Bozhou, Anhui	2020.09
S8	Rubra Poria	Anqing, Anhui	2019.03
S9	Rubra Poria	Anqing, Anhui	2019.05
S10	Rubra Poria	Anqing, Anhui	2019.07
S11	Rubra Poria	Anqing, Anhui	2019.08
S12	Rubra Poria	Anqing, Anhui	2019.09
S13	White Poria	Yuexi, Anhui	2018.10
S14	White Poria	Jingdong, Yunnan	2018.11
S15	White Poria	Jinggu, Yunnan	2018.11
S16	White Poria	Luotian, Hubei	2018.12
S17	White Poria	Luotian, Hubei	2018.11
S18	<i>Poria cum Radix Pini</i>	Yingshan, Hubei	2018.11
S19	<i>Poria cum Radix Pini</i>	Yingshan, Hubei	2018.12
S20	<i>Poria cum Radix Pini</i>	Yingshan, Hubei	2018.11
S21	<i>Poria cum Radix Pini</i>	Yingshan, Hubei	2018.11
S22	<i>Poria cum Radix Pini</i>	Yingshan, Hubei	2018.12

超高效合相色谱条件 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm); 流动相为二氧化碳 (A)–[0.1% 甲酸–甲醇溶液 (B)], 梯度洗脱 (0~10 min, 94% A→90% A; 10~15 min, 90% A→87% A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 242 nm; 柱温: 45 °C; 背压: 1 800 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 进样量: 1.0 μL。

质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子监测 MS^E 模式, 质量扫描范围 m/z 100~1 500, 毛细管电压 2.8 kV, 锥孔电压 55 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度 350 °C, 脱溶剂气 (N₂) 流速 600 L·h⁻¹, 锥孔气 (N₂) 流速 50 L·h⁻¹, 低能量扫描时能量为 4 eV, 高能量扫描时能量为 25~50 eV。

混合对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 用甲醇制成每 1 mL 中含 0.1 mg 的猪苓酸 C、0.8 mg 的茯苓新酸 A、0.3 mg 的茯苓新酸 B、0.3 mg 的去氢齿孔酸和 0.7 mg 的松苓新酸混合溶液, 作为茯苓对照品溶液。

供试品溶液制备 精密称取茯苓皮粉末 (过四号筛) 0.5 g, 置 25 mL 锥形瓶中, 加甲醇 10 mL 超声 45 min,

放冷, 补足失重, 取上清液, 0.22 μm 滤过即得供试品溶液。精密称取赤茯苓、茯苓和茯神粉末 (过四号筛) 0.5 g, 置 25 mL 锥形瓶中, 加甲醇 10 mL 超声 45 min, 放冷, 补足失重, 滤过, 取续滤液 5 mL, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 1 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜即得供试品溶液。

专属性 取混合对照品溶液、茯苓皮供试品溶液、赤茯苓供试品溶液、茯苓供试品溶液和茯神供试品溶液, 进样测定, 比较色谱图。

线性范围、检测限和定量限 分别精密称取猪苓酸 C、茯苓新酸 A、茯苓新酸 B、去氢齿孔酸和松苓新酸对照品, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.12、0.80、0.31、0.34 和 0.73 mg·mL⁻¹ 的混合溶液, 稀释得到不同浓度对照品溶液。浓度由低到高依次进样测定。分别以各对照品浓度 (x) 为横坐标, 峰面积 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算分析物回归方程, 相关系数 (r)。当信噪比等于 3 和 10 时, 计算猪苓酸 C、茯苓新酸 A、茯苓新酸 B、去氢齿孔酸和松苓新酸的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

精密性 精密吸取同一供试品溶液 (S5) 1 μL, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算各待测物浓度的 RSD 值。

重复性 取 S5 样品 6 份, 按“供试品溶液制备”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各待测物浓度的 RSD 值。

稳定性 精密吸取同一供试品溶液 (S5) 1 μL, 分别于配制后 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样测定。

准确度 取含有量已知的 S5 样品 9 份, 分别按已知含量的 50%、100% 和 150% 浓度水平加入混合对照品溶液, 按“供试品溶液制备”项下方法制备低、中、高 3 个不同浓度的供试品溶液, 每一种浓度平行制备 3 份, 进样测定。

数据分析 利用 SIMCA-P⁺ 13.0 (Umetrics AB, 瑞典) 软件对采集到的所有茯苓样品在 0~15 min 内的 UPC²-PDA 指纹图谱进行 PCA 和 PLS-DA 分析, 得到不同得分图以便直观地了解茯苓不同药用部位样本间的差异情况。

结果与讨论

1 三萜酸类成分定性分析

1.1 三萜酸类成分鉴定 本实验对 22 批茯苓 4 个不同药用部位中三萜酸类成分进行定性分析。茯苓皮、赤茯苓、茯苓和茯神的 UPC²-PDA 色谱图见图 1, 在 0~15 min 内, 共检测到 18 个三萜酸类成分。通过正负离子模式比较, 选择了信息更为丰富的负离子模式。根

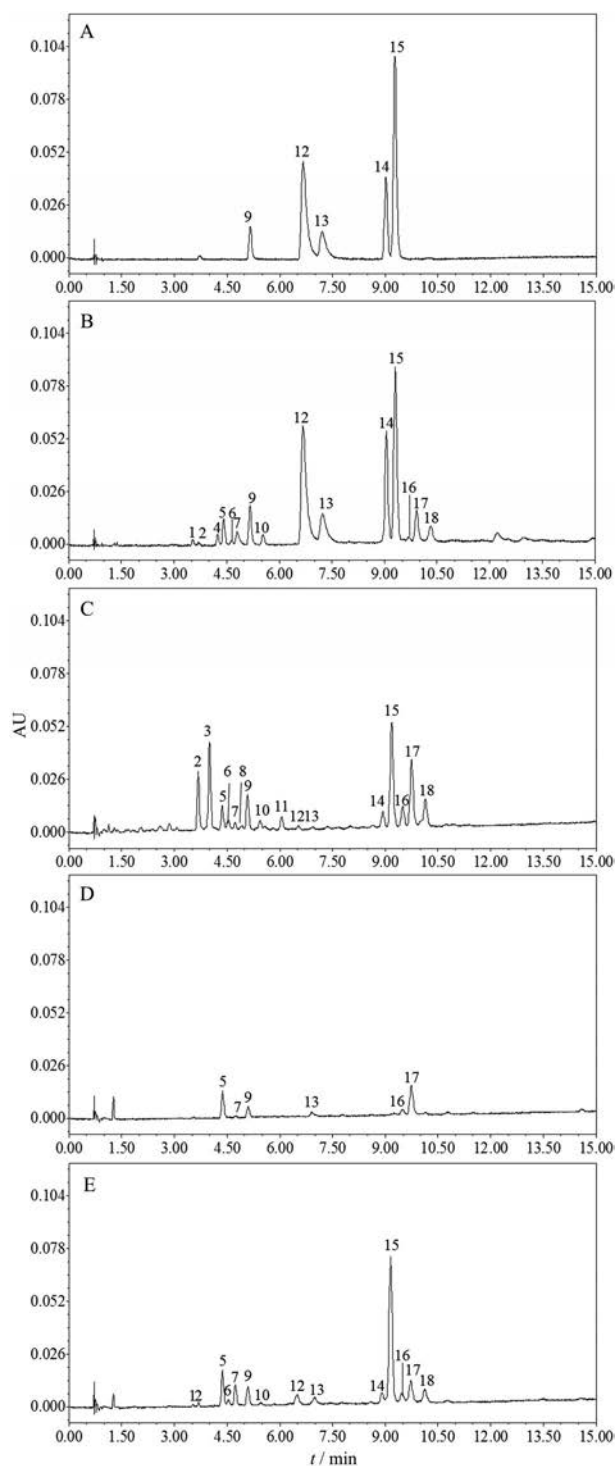


Figure 1 UPC²-PDA chromatograms of five triterpenic acids in different parts of *Poria cocos* (A: Mix standard; B: *Poriae Cutis*; C: *Rubra Poria*; D: *White Poria*; E: *Poria cum Radix Pini*; 9: Polyporenic acid C; 12: Poricoic acid A; 13: Poricoic acid B; 14: Dehydroeburic acid; 15: Dehydrotrametenolic acid)

据一级、二级质谱的裂解特征以及部分对照品比对, 利用Q-TOF/MS^E鉴定了10个三萜酸类成分, 见表2^[18,19]。

1.2 PCA分析 PCA分析是通过降维的方法将原来的变量重新组合成几个新的相互无关的变量, 以达到

尽可能多地反映原来变量的信息。为判别茯苓不同药用部位样品间的差异, 利用SIMCA-P对22批茯苓药材的UPC²-PDA结果进行PCA分析。由图2A可见, 22批茯苓样本沿着PC1轴方向具有明显的区分趋势, 不同药用部位的茯苓样本可以有效区分。茯苓皮为一类(S1~S7); 赤茯苓为一类(S8~S12); 茯苓为一类(S13~S17); 茯神归为一类(S18~S22)。茯苓和茯神具有相似的化学成分, 这与其饮片加工过程选取的部位一致有关。由于PCA分析是一种无监督的模型验证方法, 不能消除组内噪音。有必要采用有监督的PLS-DA分析寻找隐藏的损坏模型稳健性的特征变量, 突出组间差异。

1.3 PLS-DA分析 PLS-DA可将分类贡献较大的特征变量提取出来。由图2B可知, 与PCA结果类似, 茯苓皮、赤茯苓、茯苓和茯神被分为四类。根据PLS-DA模型, 绘制Loading Plot图, 见图2C, 进行差异三萜酸类成分的筛选, 共筛选出茯苓新酸A(峰12)、茯苓新酸B(峰13)、去氢齿孔酸(峰14)和松苓新酸(峰15)4个差异三萜酸类成分。

为了更全面地评价茯苓类药材的质量, 猪苓酸C为4个药用部位的共有成分, 其具有抗肿瘤、降血糖、利尿等药理作用。有必要对以上4种差异三萜酸类成分以及共有成分猪苓酸C进行定量分析。

2 多指标含量测定方法学考察

2.1 专属性 测得样品色谱图如图1所示。待测成分与相邻色谱峰均能有效分离, 其中猪苓酸C与其相邻峰分离度大于2.0, 茯苓新酸A和茯苓新酸B两峰之间分离度大于1.8, 去氢齿孔酸和松苓新酸两峰之间分离度大于1.6。理论板数按猪苓酸C、茯苓新酸A、茯苓新酸B、去氢齿孔酸和松苓新酸峰计算, 应分别不小于12 000、8 000、7 000、40 000和40 000。

2.2 线性范围、检测限和定量限 5个成分的线性回归方程、相关系数、检测限(LOD)和定量限(LOQ)结果见表3, 均显示出良好的线性关系。

2.3 精密度 测得猪苓酸C、茯苓新酸A、茯苓新酸B、去氢齿孔酸和松苓新酸峰面积的RSD分别为1.59%、1.57%、2.35%、1.08%和0.49%, 表明精密度良好。

2.4 重复性 猪苓酸C、茯苓新酸A、茯苓新酸B、去氢齿孔酸和松苓新酸的平均含量($n=6$)分别为0.91、7.03、2.42、2.63和5.79 mg·g⁻¹, RSD分别为0.86%、0.59%、1.87%、1.08%和1.59%, 说明方法重复性良好。

2.5 稳定性 猪苓酸C、茯苓新酸A、茯苓新酸B、去氢齿孔酸和松苓新酸峰面积的RSD分别为1.70%、1.13%、1.11%、1.15%和0.63%, 表明分析物在48 h内

Table 2 Identification of chemical constituents in different parts of *Poria cocos* by UPC²-PDA-Q-TOF/MS^E. ^aIdentification of reference substance; ^{*}Significant difference component

Peak No.	<i>t_R</i> /min	Measured mass	Calculated mass	Error /×10 ⁻⁶	Formula	Fragmentation	Identification	Ref.
1	3.54	509.361 9	509.363 1	-2.4	C ₃₃ H ₅₀ O ₄	463.356 9, 379.259 4, 413.262 5	Poricoic acid CE	18
2	3.71	495.347 3	495.347 4	-0.2	C ₃₂ H ₄₈ O ₄	449.344 8, 435.337 1	3β-Acetoxytanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	18
5	4.42	527.373 2	527.373 7	-0.9	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	467.351 3, 465.337 2	Pachymic acid	18
7	4.80	513.357 2	513.358 0	-1.6	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	451.317 8, 465.336 4	3- <i>O</i> -Acetyl-16α-hydroxytrametenolic acid	19
9	5.19	481.331 6	481.331 8	-0.4	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	435.325 7, 421.309 9, 403.299 3, 387.268 0	Polyporenic acid C ^a	18
10	5.58	467.315 7	467.316 1	-0.9	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	423.322 2, 407.292 5	16-Deoxyporicoic acid B	19
12	6.73	497.326 8	497.327 2	0.2	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	423.289 9, 381.314 7, 363.267 6, 409.273 4	Poricoic acid A ^{*,a}	19
13	7.28	483.310 8	483.311 0	-0.4	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	409.273 6, 349.251 6	Poricoic acid B ^{*,a}	18
14	9.17	467.351 6	467.352 5	-1.9	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	371.258 9, 455.347 5, 337.252 0	Dehydroeburic acid ^{*,a}	19
15	9.44	453.336 2	453.336 9	-1.5	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	337.252 6, 371.257 3, 435.327 4	Dehydrotrametenolic acid ^{*,a}	18

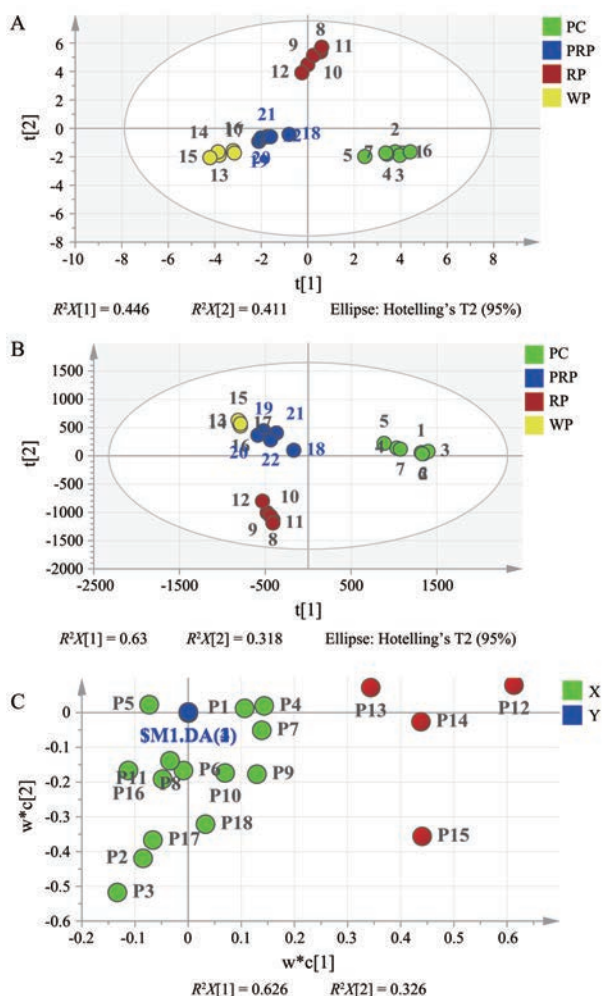


Figure 2 PCA/scores plot (A), PLS-DA/scores plot (B), and PLS-DA/loading plot (C) based on the holistic chemical profiling of four parts (PC: Poriae Cutis; RP: Rubra Poria; WP: White Poria; PRP: Poria cum Radix Pini) from 22 *Poria cocos* samples

稳定。

2.6 回收率 猪苓酸C、茯苓新酸A、茯苓新酸B、去氢齿孔酸和松苓新酸的平均回收率分别为99.78%、

98.94%、101.3%、99.41% 和 97.76%，其RSD为2.21%、2.54%、2.07%、2.58% 和 1.24%。结果表明，方法的准确度良好。

3 样品含量测定

采用上述方法测定22批茯苓类药材中5个三萜酸类成分的含量，以5种三萜酸含量的总和为指标，茯苓皮的含量范围为18.78~24.28 mg·g⁻¹，平均含量为22.65 mg·g⁻¹；赤茯苓的含量范围为1.06~1.45 mg·g⁻¹，平均含量为1.31 mg·g⁻¹；茯苓的含量范围为0.10~0.14 mg·g⁻¹，平均含量为0.11 mg·g⁻¹；茯神的含量范围为0.63~1.62 mg·g⁻¹，平均含量为1.03 mg·g⁻¹。结果表明，茯苓不同药用部位中5种三萜酸成分的含量依次为：茯苓皮 > 赤茯苓 > 茯神 > 茯苓，结果见表4。

讨论

本研究对不同提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、乙醇、乙酸乙酯)、不同料液比(1:20、1:30、1:50)、不同提取时间(15、30和45 min)进行考察。最终优选出以甲醇作为提取溶剂，料液比1:20，超声提取45 min作为样品的提取方法；比较四种不同的UPC²填料(UPC² HSS C₁₈ SB、UPC²torus DIOL、UPC²BEH 2-EP、UPC²CSH Fluoro Phenyl)，发现UPC² HSS C₁₈ SB是一种未封顶的、低覆盖率的C₁₈键合相，增加了待测成分的亲硅作用力，被测成分可以实现较好的分离；考察了改性剂[甲醇-0.1% 甲酸-甲醇、甲醇-乙腈(1:1)、异丙醇]、柱温(25、35、45、55 °C)和背压(11 032、12 411、13 790、15 169 kPa)对分离效果的影响，当0.1% 甲酸-甲醇作为改性剂，柱温45 °C，背压12 411 kPa时，5个三萜酸类成分的分离效果最好。

基于本课题组的前期研究，采用HPLC法测定茯苓类药材中的三萜酸类成分，以十八烷基键合硅胶为

Table 3 The calibration curve, linear range, regression, LOD, LOQ of five triterpenic acids

Analyte	Calibration curve	<i>r</i>	Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Polyporenic acid C	$y = 1\,607.9x + 5\,579.3$	0.999 6	7.30–116.80	3.65	7.30
Poricoic acid A	$y = 1\,349.6x + 14\,713.8$	0.999 9	50.13–802.10	6.27	12.54
Poricoic acid B	$y = 1\,196.6x + 10\,335.1$	0.999 9	19.38–310.00	9.69	14.54
Dehydroeburic acid	$y = 1\,481.4x + 5\,569.5$	0.999 7	10.56–338.00	5.28	10.56
Dehydrotrametenolic acid	$y = 1\,776.6x + 17\,733.3$	0.999 8	22.84–731.00	4.57	11.42

Table 4 The content of five triterpenic acids in different parts of *Poria cocos* ($n = 3$). -: Under the detection limit

No.	Dissected part	Polyporenic acid C /mg·g ⁻¹	Poricoic acid A /mg·g ⁻¹	Poricoic acid B /mg·g ⁻¹	Dehydroeburic acid/mg·g ⁻¹	Dehydrotrametenolic acid/mg·g ⁻¹
S1	Poriae Cutis	1.189	8.478	3.230	3.654	7.162
S2	Poriae Cutis	1.034	8.789	2.792	3.370	7.742
S3	Poriae Cutis	1.000	9.230	3.285	3.762	7.001
S4	Poriae Cutis	1.011	8.065	3.153	3.204	6.698
S5	Poriae Cutis	0.905	7.027	2.425	2.630	5.788
S6	Poriae Cutis	1.196	8.776	3.325	3.565	6.818
S7	Poriae Cutis	0.994	7.946	3.168	3.517	6.647
S8	Rubra Poria	0.235	–	–	0.121	1.096
S9	Rubra Poria	0.183	–	–	0.116	0.983
S10	Rubra Poria	0.208	–	–	0.148	0.977
S11	Rubra Poria	0.214	–	–	0.140	1.082
S12	Rubra Poria	0.190	–	–	0.103	0.764
S13	White Poria	0.095	–	–	–	–
S14	White Poria	0.116	–	–	–	–
S15	White Poria	0.115	–	–	–	–
S16	White Poria	0.098	–	–	–	–
S17	White Poria	0.077	–	0.061	–	–
S18	Poria cum Radix Pini	0.114	0.118	0.105	0.079	1.205
S19	Poria cum Radix Pini	0.089	0.114	0.165	–	0.443
S20	Poria cum Radix Pini	0.095	0.056	0.081	0.106	0.294
S21	Poria cum Radix Pini	0.107	0.194	0.219	0.126	0.477
S22	Poria cum Radix Pini	0.064	0.061	0.081	0.081	0.662

填充剂; 以乙腈–0.1% 磷酸溶液 (75:25) 作为流动相, 检测波长为 242 nm, 等度洗脱, 分析时间长达 40 min, 且产生大量的废液。而本文采用的超临界流体色谱方法, 在 15 min 内被测指标达到基线分离, 有机试液用量仅是 HPLC 的 3.63%。同时, 对 S1 样品进行 HPLC 进样测定, 测定结果表明, 两种分析方法 5 种三萜酸类成分含有量测定结果之间的相对平均偏差小于 4.0%, 因此, 超临界流体色谱法可用于茯苓类药材的快速测定。

本文首次采用超临界流体色谱法分析茯苓类药材中的三萜酸类化合物。所建立的方法可使 5 个三萜酸类成分 15 min 内达到基线分离, 有机试剂甲醇的用量仅为 HPLC 方法的 3.63%, 样品分析时长为 HPLC 的 1/3, 当用于大量样本的分析时, 既能节省时间、提高效率, 又不需要使用大量的有机溶剂, 在节约成本和保护环境方面具有独特的优势。该方法可同时快速测定茯苓不同部位中 5 种三萜酸类成分的含量。结果表明, 茯苓皮中 5 种成分含量明显高于赤茯苓、茯苓、茯神。现代研究已证实茯苓不同部位, 其药性、功用有区别, 应根据不用证候特点正确选用茯苓不同的入药部位,

以充分发挥其药性和功用。本实验可为茯苓药材及其相关产品开发和标准制定提供参考。

作者贡献: 李娜、王峥涛和杨莉设计实验; 李娜、杨远贵、陈玥、徐芮进行实验数据采集; 谷丽华、谢元彪、李淞明、詹常森进行药材收集; 李娜、杨远贵、王峥涛和杨莉撰写、修改论文。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 251.
- [2] Zhu LX, Wang X, Li SC, et al. Qualitative and quantitative characterization of carbohydrate profiles in three different parts of *Poria cocos* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 113009.
- [3] Liu J, Zhou J, Zhang QQ, 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: 406–411.
- [4] Deng TM, Peng DY, Yu NJ, et al. Research progress on chemical

- composition and pharmacological effects of *Poria cocos* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 2703-2717.
- [5] Jiang Y, Fan LP. 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.
- [6] Hu GS, Huang CG, Zhang Y, et al. Accumulation of biomass and four triterpenoids in two-stage cultured *Poria cocos* mycelia and diuretic activity in rats [J]. Chin J Nat Med, 2017, 15: 265-270.
- [7] Zou YT, Zhou J, Wu CY, et al. Protective effects of *Poria cocos* and its components against cisplatin-induced intestinal injury [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113722.
- [8] Chen WD, Peng H, Wang YY, et al. Historical evolution and changes of *Poria cocos* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 5032-5038.
- [9] Tian SS, Liu XQ, Feng WH, et al. Quality evaluation of *Poria* based on specific chromatogram and quantitative analysis of multicomponents [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 1371-1380.
- [10] Tian SS, Zhao XM, Liu Y, et al. Studies on quality standards of *Poria* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1734-1744.
- [11] Sang QN, Jia QQ, Zhang HY, et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113771.
- [12] Yan P, Jia SL, Li S, et al. Strategy for the identification and quantitative analysis of the phytochemicals of traditional Chinese medicine by LC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1494-1503.
- [13] Zhang GH, Wang HX, Xie WY, et al. Comparison of triterpene compounds of four botanical parts from *Poria cocos* (Schw.) Wolf using simultaneous qualitative and quantitative method and metabolomics approach [J]. Food Res Int, 2019, 211: 666.
- [14] Zhu LX, Xu J, Wang RJ, et al. Correlation between quality and geographical origins of *Poria cocos* revealed by qualitative fingerprint profiling and quantitative determination of triterpenoid acids [J]. Molecules, 2018, 23: 2200.
- [15] Zhao QL, Zhang L, Bian XK, et al. Analysis of 8 triterpene acids in *Poria* from different habitats based on UPLC-QTRAP-MS [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析), 2020, 40: 1169-1177.
- [16] Yutaka K, Yoshihiro I, Takeshi B. Development of a novel method for polar metabolite profiling by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2020, 1632: 461587.
- [17] Onay S, Hofer S, Ganzera M. Rapid analysis of nine lignans in *Schisandra chinensis* by supercritical fluid chromatography using diode array and mass spectrometric detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 185: 113254.
- [18] Feng GF, Zheng Y, Sun YF, 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.
- [19] Zhu LX, Xu J, Zhang SJ, et al. Qualitatively and quantitatively comparing secondary metabolites in three medicinal parts derived from *Poria cocos* (Schw.) Wolf using UHPLC-QTOF-MS/MS-based chemical profiling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 150: 278-286.