

特征图谱结合化学模式识别筛选不同产地茯苓药材差异质量标志物

李鹏辉¹, 龙慧玲², 蔡媛¹, 龚年春¹, 章泽恒², 廖鑫¹, 彭艳梅¹

(1 湖南省中医药研究院, 长沙 410006; 2 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410209)

[摘要] **目的:** 利用化学模式识别技术, 对茯苓药材 HPLC 特征图谱数据进行分析, 筛选差异质量标志物并建立定量分析策略, 为茯苓质量标准研究提供科学依据。 **方法:** 采用 Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (含 0.2% 四氢呋喃)-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长 222 nm, 体积流量 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 建立茯苓药材特征图谱。运用相似度分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、聚类分析 (cluster analysis, CA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等模式识别方法, 筛选不同产地茯苓的差异质量标志物, 并按照《中华人民共和国药典》中“分析方法验证指导原则”的要求, 进行定量研究。 **结果:** 15 批茯苓药材的相似度在 0.935 ~ 0.998, 共标定 8 个共有峰, 指出 6 个色谱峰; PCA 结果显示样品按产地呈现聚类趋势, CA 结果与 PCA 一致, 通过 OPLS-DA 筛选茯苓酸作为差异质量标志物; 建立的茯苓酸含量测定方法稳定、可靠且耐用性良好, 符合药典要求。 **结论:** 通过特征图谱结合化学模式识别技术的分析策略, 可快速有效地筛选不同产地茯苓药材的差异质量标志物, 为茯苓药材质量标准的建立提供参考。

[关键词] 茯苓; 特征图谱; 化学模式识别; 差异质量标志物; 茯苓酸**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)21-2184-07

Screening of differential quality markers of Poria from different regions by characteristic fingerprints and chemical pattern recognition

LI Peng-hui¹, LONG Hui-ling², CAI Yuan¹, GONG Nian-chun¹, ZHANG Ze-heng², LIAO Xin¹, PENG Yan-mei¹

(1 Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China; 2 Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring, Changsha 410209, China)

[Abstract] **Objective:** The chemical pattern recognition technology was used to analyze the HPLC characteristic fingerprints data of Poria, screen the differential quality markers and perform quantitative analysis, so as to provide scientific basis for quality evaluation of Poria. **Methods:** Welch Ultimate Plus C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile (containing 0.2% tetrahydrofuran)-0.1% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution was used as mobile phase. The fingerprint of Poria was established with detection wavelength set at 222 nm, flow rate at 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃, injection volume at 10 μL. The differential quality markers were identified by similarity analysis, principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). The quantitative research was carried out in accordance with the requirements of “Guidelines for Validation of Analytical Methods” in Chinese Pharmacopoeia. **Results:** The similarity of 15 batches of Poria was between 0.935 ~ 0.998. Eight common peaks were calibrated

[基金项目] 湖南省重点研发计划(2021SK2007); 湖南省中医药科研计划项目(2021098, A2023005, C2023011); 湖南省自然科学基金科药联合基金资助项目(2021JJ80050, 2021JJ80048, 2022JJ80075); 长沙市自然科学基金(kq2202359)

[作者简介] 李鹏辉, 男, 助理研究员, 主要从事中药制剂和中药质量控制研究。E-mail: 784113726@qq.com。共同第一作者: 龙慧玲, 女, 高级工程师, 主要从事药品医疗器械化妆品技术审评。E-mail: 25352830@qq.com。

[通讯作者] 彭艳梅, 女, 研究员, 主要从事中药新药开发研究。E-mail: 271853145@qq.com。

and 6 were identified; The samples were classified according to the origins from PAC results, which is consistent with CA result. Pachymic acid was screened as the differential quality marker of *Poria* by OPLS-DA. The established method for the determination of pachymic acid was stable, reliable, durable, which meets the requirements of the Pharmacopoeia. **Conclusion:** The methods of characteristic fingerprint combined with chemical pattern recognition technology can effectively screen the differential quality marker of *Poria* from different regions, providing a reference for the establishment of quality standards for *Poria*.

[Key words] *Poria cocos*; characteristic fingerprint; chemical pattern recognition; differential quality marker; pachymic acid

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核, 别名伏灵、茯灵、云茯等。始载于《神农本草经》, 被列为上品, 具有利水渗湿、健脾、宁心等功效^[1]。同时, 茯苓也是我国传统的药食同源中药材, 在药品、食品及保健品等方面均有广泛的应用^[2]。目前市场上流通的茯苓多为人工栽培, 其质量受产地的生长环境、加工方式等多种因素影响^[3-4]。《中华人民共和国药典》2020年版采用显微鉴别、薄层鉴别、浸出物等指标控制茯苓药材质量, 无含量测定项。近年来有关茯苓质量评价研究主要集中在化学成分定性分析^[5-6]、指标成分含量测定^[7-9]、指纹图谱/特征图谱分析^[10-13], 但多数是从检测的方法学角度考察色谱条件, 而定量指标的筛选依据未充分说明, 如何筛选出不同产地茯苓药材的差异质量标志物, 作为茯苓指标成分含量的质量评价方法显得尤为重要。

本研究以湖北、云南、安徽 3 个传统道地产区^[14]收集的 15 批次茯苓药材为研究对象, 通过 HPLC 建立茯苓药材的特征图谱检测方法, 获得共有峰的峰面积数据。首先采用无监督分析中的主成分分析 (principal component analysis, PCA)、聚类分析 (cluster analysis, CA) 对整体数据进行概览, 确定 15 批次茯苓样品随“产地”因素呈聚类趋势, 再采用有监督分析中的正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA), 筛选出不同产地茯苓的差异质量标志物, 并按照《中华人民共和国药典》2020年版四部“9101 分析方法验证指导原则”^[15]的要求, 进行定量研究。以期通过本研究, 为茯苓药材质量标准的建立提供科学依据。

材 料

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公

司); LC-20 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); XPE-105 十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多公司); Quintix224-1CN 万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司); YP-B5002 百分之一电子天平 (上海光正医疗仪器设备有限公司); SB-5200D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技有限公司); GY-FS-06 粉碎机 (江西赣云食品机械有限公司)。

茯苓酸 (批号: HP193531198)、松苓新酸 (批号: HD193028198)、去氢茯苓酸 (批号: HP193840198)、茯苓新酸 B (批号: HA060510198)、去氢土莫酸 (批号: HD193002198)、猪苓酸 C (批号: HP193841198), 质量分数均 > 98%, 均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司。甲醇、乙腈 (美国 Sigma 公司, 色谱纯); 四氢呋喃、磷酸 (上海麦克林生化科技有限公司, 色谱纯); 水为怡宝水; 其他试剂均为分析纯。

2 样品

本研究所用茯苓药材来源于湖北、云南、安徽 3 个产地, 经湖南省中医药研究院刘浩副研究员鉴定为茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核。15 批样品信息见表 1。

表 1 15 批次茯苓样品信息

样品编号	批号	产地
S1 ~ S5	FL-01 ~ FL-05	湖北黄冈
S6 ~ S10	FL-06 ~ FL-10	云南丽江
S11 ~ S15	FL-11 ~ FL-15	安徽安庆

方法与结果

1 茯苓特征图谱的建立

1.1 色谱条件

Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (含 0.2% 四氢呋喃) (A)-0.1%

磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0~20 min,50%~53% A; 20~42 min,53%~54% A;42~58 min,54%~55% A; 58~82 min,55%~70% A;82~120 min,70% A。体积流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$;检测波长 222 nm 。

1.2 对照品溶液的制备

取茯苓新酸 B、去氢土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 $0.17, 0.12, 0.15, 0.30, 0.21, 0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

1.3 供试品溶液的制备

取茯苓药材样品粉末(过 60 目筛)约 3.0 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL ,称定重量,超声处理($300 \text{ W}, 40 \text{ kHz}$) 30 min ,取出放冷后用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.4 参照峰选择

本实验所建立的特征图谱中,去氢茯苓酸色谱峰的分离度、拖尾因子良好,具有较大的峰面积,且为所有样品共有,因此,选择去氢茯苓酸为参照峰。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度实验 取茯苓药材(S1)1份,按“1.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录 HPLC 图,以去氢茯苓酸为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果,计算得到各共有峰相对保留时

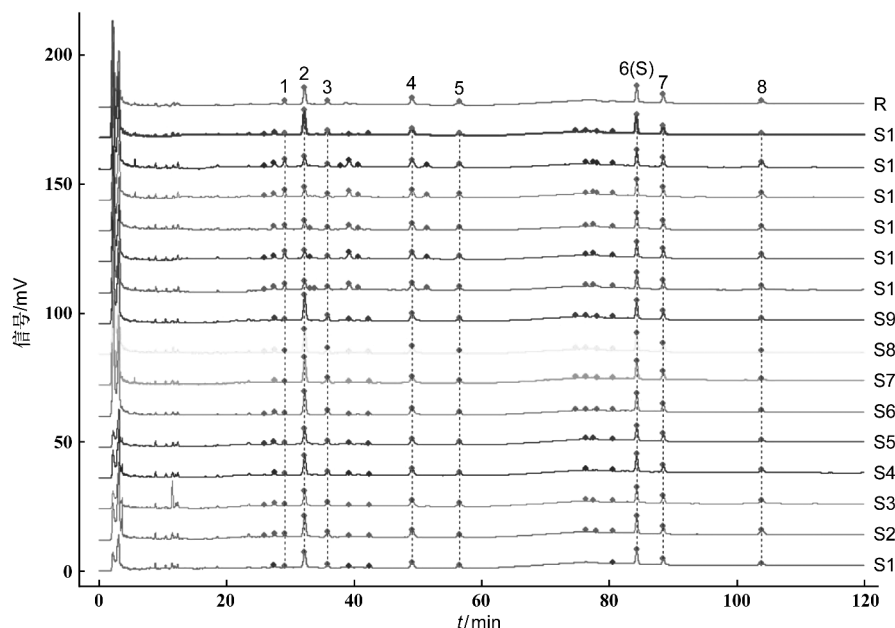
间的 RSD 值 $< 0.39\%$,相对峰面积的 RSD 值 $< 1.60\%$ [16],表明仪器精密度良好。

1.5.2 重复性实验 取茯苓药材(S1)6份,按“1.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.1”项下色谱条件进样检测,记录 HPLC 图,以去氢茯苓酸为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果,计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 值 $< 0.42\%$,相对峰面积的 RSD 值 $< 1.71\%$ [16],表明本方法重复性良好。

1.5.3 稳定性实验 取茯苓药材(S1)1份,按“1.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.1”项下色谱条件,分别在 0, 5, 10, 20, 30, 40, 48 h 进样,记录 HPLC 图,以去氢茯苓酸为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果,计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 值 $< 0.59\%$,相对峰面积的 RSD 值 $< 1.30\%$ [16],表明供试品溶液在 48 h 稳定性良好。

1.6 特征峰的指认及相似度分析

将 15 批茯苓药材按“1.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.1”项下条件进样,获得各批次样品的特征图谱。采用“中药色谱特征图谱相似度评价系统(2012 年版)软件”,以 S1 图谱为参照图谱,时间宽度设定为 0.10 min ,采用中位数法和多点校正法,以 Mark 峰进行峰匹配,得 15 批茯苓药材 HPLC 特征图谱(S1~S15)及对照特征图谱(R),见图 1。



1: 茯苓新酸 B; 2: 去氢土莫酸; 4: 猪苓酸 C; 6: 去氢茯苓酸; 7: 茯苓酸; 8: 松苓新酸

图 1 15 批茯苓药材 HPLC 特征图谱及对照图谱

经 Mark 峰(6 号峰)匹配后标定了 8 个共有峰,通过与对照品保留时间比对,指认出 6 个共有峰,即 1 号峰为茯苓新酸 B、2 号峰为去氢土莫酸、4 号峰为猪苓酸 C、6 号峰为去氢茯苓酸、7 号峰为茯苓酸、8 号峰为松苓新酸。以 Mark 峰计算 15 批茯苓特征图谱共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.09%,表明 15 批样品中 8 个共有峰保留时间较稳定;但共有峰相对峰面积 RSD 为 12.49% ~ 72.89%,相差较大,表明各批次间这 8 个共有峰,代表的化合物含量存在较大差异。以对照特征图谱为对照,计算各批次样品相似度,结果见表 2,15 批茯苓药材的相似度在 0.935 ~ 0.998,相似度良好。

表 2 15 批茯苓特征图谱相似度评价结果

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.994	S9	0.978
S2	0.995	S10	0.941
S3	0.998	S11	0.935
S4	0.994	S12	0.954
S5	0.997	S13	0.947
S6	0.982	S14	0.937
S7	0.968	S15	0.983
S8	0.982		

2 化学模式识别分析

2.1 无监督分析

本研究采用变量统计分析软件 SIMAC14.1,进行无监督分析中的 PCA 和 CA。以 15 批茯苓样品特征图谱中所得的共有峰峰面积为变量,构建 15 × 8 的原始数据矩阵,数据预处理方式采用 Pareto Scaling,得到 PCA 得分图见图 2、特征值及方差贡献率表见表 3,然后将特征值 > 1 提取的主成分,采用 Ward 聚类法进行 CA,得到茯苓药材的分类结果,见图 3。由表 3 可知,PC1,PC2 的特征值 > 1,其累积方差贡献率为 93.1%,能较好地表征原始数据信息,因此该 PCA 分析模型较准确^[17]。从 PCA 得分图看,所有样品点均在 95% 的置信区间内,说明无异常样品点,图中显示茯苓样品可按产地不同分成 3 类,Ⅰ类:S11 ~ S15(产地为安徽安庆);Ⅱ类:S1 ~ S5(产地为湖北黄冈);Ⅲ类:S6 ~ S10(产地为云南丽江),但湖北黄冈的 S2 和 S4 样品与云南丽江样品较为接近。聚类分析结果显示 15 批样品可分为 3 类,S11 ~ S15 为一类,S1, S3, S5 为一类,S2, S4 和

S6 ~ S10 为一类,但是 S2, S4 与 S6 ~ S10 又呈现区分,该结果与 PCA 一致,因此可认为 15 批次茯苓样品随“产地”这一因素呈较好的聚类趋势。

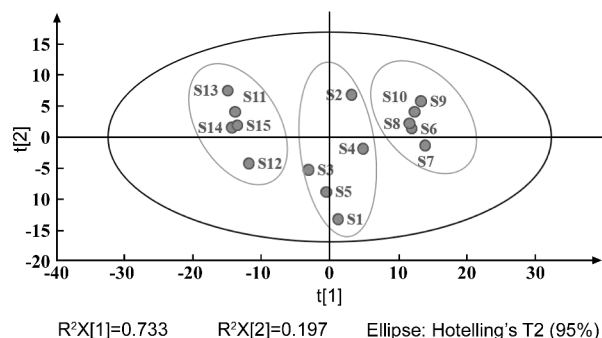


图 2 茯苓药材主成分得分图

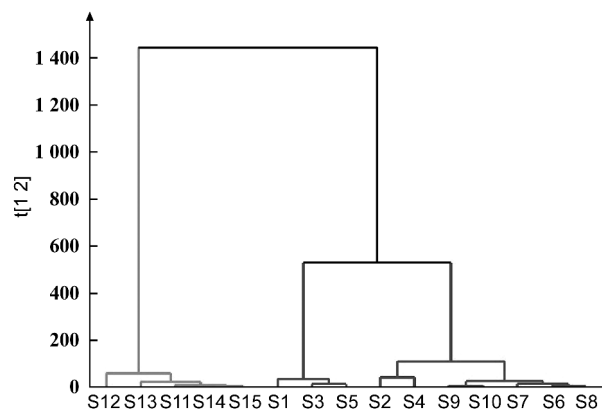


图 3 茯苓药材聚类分析图

表 3 PAC 特征值及方差贡献率

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.87	0.733	0.733
2	1.58	0.197	0.931
3	0.283	0.035 3	0.966
4	0.142	0.017 8	0.984
5	0.055	0.006 87	0.991
6	0.047 7	0.005 96	0.997
7	0.024	0.002 99	1
8	0.003 1	0.000 388	1

2.2 有监督分析

为进一步筛选出不同产地茯苓的差异因子(即差异质量标志物),本研究选择有监督分析中的 OPLS-DA 对特征图谱数据进一步分析。根据 PCA 与 CA 结果,按“产地”这一因素将 S1 ~ S5 样品点设置为第 1 组,S6 ~ S10 样品点设置为第 2 组,S11 ~ S15 样品点设置为第 3 组,建立 OPLS-DA 模型,模

型得分见图4。图中各组样品点分别聚为一类,表明15批茯苓样品因产地不同被较好地区分开,且模型分析验证参数中的矩阵结实率参数 $R^2x(\text{cum})$ 为0.946,模型区分参数 $R^2y(\text{cum})$ 为0.88,模型预测参数 $Q^2(\text{cum})$ 为0.794,数值均 >0.5 ,说明建立的OPLS-DA模型稳定且预测能力良好^[18]。为防止该模型过拟合而出现假阳性结果,将已知测定数据变量 X 对预测变量 Y 进行200次迭代分析,得到置换检验(permutation test)图5, R^2 、 Q^2 拟合直线在 Y 轴上的截距分别为0.195(<0.2)、 -0.715 (<0.05),说明所建立模型可靠且未出现过拟合现象^[19]。为判别分析15批茯苓样品的差异因子,绘制变量重要性投影值(variable importance for the projection, VIP)得分图,见图6。从图中可知, VIP 值的排序为7号峰(茯苓酸) $>$ 6号峰(去氢茯苓酸) $>$ 2号峰(去氢土莫酸) $>$ 1号峰(茯苓新酸B) $>$ 3号峰 $>$ 5号峰 $>$ 8号峰(松苓新酸) $>$ 4号峰(猪苓酸C),其中前2个变量的VIP值 >1 ,说明这2个变量对不同产地茯苓的分类起到最重要的作用,其对应化学成分在各批次间存在较大差异。

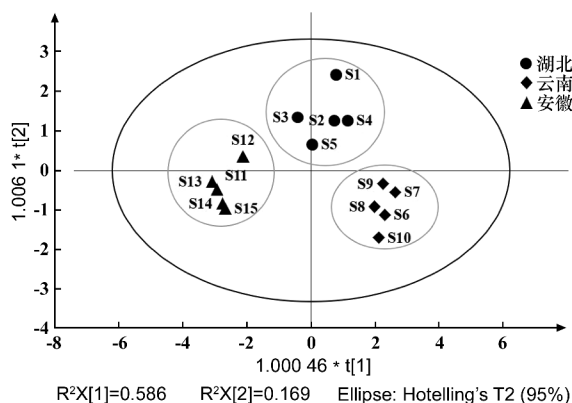


图4 茯苓药材 OPLS-DA 得分图

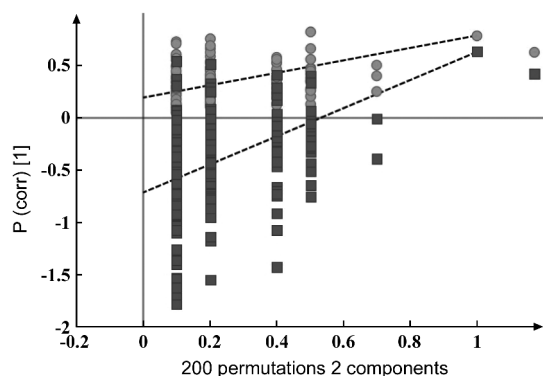


图5 茯苓药材置换检验图

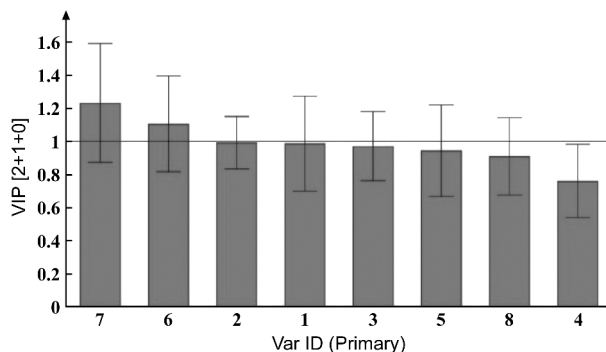


图6 15批茯苓药材 OPLS-DA 的VIP图

3 茯苓差异质量标志物的含量测定

上述特征图谱结合化学模式识别技术,筛选出15批茯苓样品的组间差异标志物为7号峰(茯苓酸)、6号峰(去氢茯苓酸)。近年来对茯苓化学成分研究表明,三萜类和多糖类化合物为茯苓的主要活性成分^[20]。茯苓酸是茯苓三萜类成分的重要代表,现代药理研究表明其具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、镇静催眠等多种药理活性^[21-22],是茯苓的主要活性成分之一,含量也相对较高^[23-24],且本研究中茯苓酸的VIP值最大,因此选择茯苓酸为不同产地茯苓药材的差异质量标志物,进行定量研究。

3.1 色谱条件

Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),以乙腈:0.1%磷酸水溶液=76:24为流动相,体积流量为1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为210 nm,进样量为20 μL ,谱图记录时间32 min。

3.2 对照品溶液的制备

取茯苓酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.4978 mg的对照品储备液,精密量取1 mL对照品储备液,稀释得到浓度为49.78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

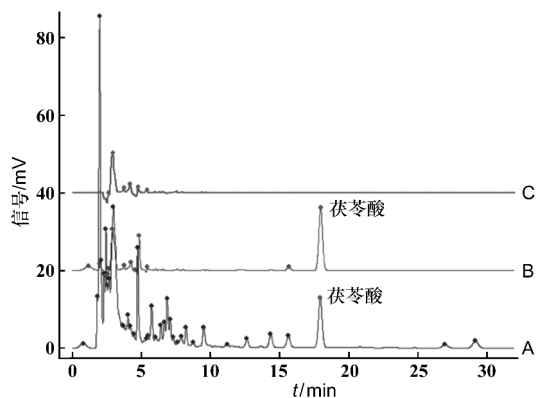
3.3 供试品溶液的制备

取茯苓样品粉末(过60目筛)约1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇45 mL,称定重量,超声处理(300 W,40 kHz)45 min,取出放冷,再称定重量,用甲醇补足减失重量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

3.4 方法学考察

3.4.1 专属性考察 取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶剂(溶剂甲醇),按“3.1”项下色谱条件进样检测,得到茯苓酸专属性考察结果,见图7。结果显示,茯苓酸色谱峰分离度 >1.5 ,拖尾因子在

0.95 ~ 1.05 之间,且阴性无干扰,说明本检测方法专属性良好。



茯苓样品(A);茯苓酸对照品(B);阴性样品(C)

图7 专属性考察结果

3.4.2 线性关系考察 精密吸取“3.2”项下对照品储备液适量,用甲醇分别稀释5,6.67,10,20,40,100,200倍,得到系列浓度的对照品溶液,依次检测,记录各对照品溶液峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 X ,峰面积为纵坐标 Y ,进行线性回归,得回归方程: $Y = 12.651X + 4.2267$, $r = 0.9997$,说明茯苓酸在 $2.49 \sim 99.57 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性相关性良好。

3.4.3 精密度实验 取茯苓样品(S1)1份,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,记录峰面积。结果茯苓酸峰面积的RSD为0.38%,表明仪器精密度良好。

3.4.4 重复性实验 取茯苓样品(S1)6份,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,依次检测,结果6份样品茯苓酸质量分数的RSD为0.43%,表明该方法重复性良好。

3.4.5 中间精密度实验 取茯苓样品(S1)6份,由不同分析人员、在不同日期、使用不同仪器,按重复性方法进行含量测定,结果6份样品茯苓酸质量分数的RSD为0.56%。与重复性测定结果比对,12份样品茯苓酸质量分数的RSD为1.93%,表明该方法中间精密度良好。

3.4.6 准确度(加样回收率)实验 取茯苓样品(S1)9份,随机均分成3组,按样品已知含量的1:0.5,1:1,1:1.5比例加入0.5,1.0,1.5 mL对照品溶液(浓度为 $0.9643 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),按“3.3”项下方法制备供试品溶液并进样检测。结果茯苓酸加样回

收率为93.02%,RSD为2.50%,表明该方法检测准确度良好。

3.4.7 稳定性实验 取茯苓样品(S1)1份,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12,24,48,72 h进样,记录峰面积。结果茯苓酸峰面积的RSD值为0.64%,表明供试品溶液在72 h内稳定性良好。

3.4.8 耐用性考察 在已确定含量测定方法基础上,考察不同柱温($25 \text{ }^\circ\text{C}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$)、不同流速(0.9 , $1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、不同色谱柱[Spax Amethyst C_{18} -H($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$),Agilent ZORBAX SB- C_{18} ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)]、不同厂家仪器(美国安捷伦公司、日本岛津公司)等测定条件发生变动情况下,是否满足系统适用性实验要求。结果上述条件变动情况下检测的茯苓酸含量RSD为0.66%,表明该方法耐用性良好,能符合系统适用性实验要求。

3.5 样品测定

取15批次茯苓样品,每批检测平行双样,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,依次检测,记录峰面积,计算茯苓酸含量。结果FL-01 ~ FL-05批样品茯苓酸含量依次为0.0478%,0.0604%,0.0577%,0.0547%,0.0532%,均值为0.0548%,RSD为8.73%;FL-06 ~ FL-10批样品茯苓酸含量依次为0.0628%,0.0600%,0.0632%,0.0633%,0.0673%,均值为0.0633%,RSD为4.11%;FL-11 ~ FL-15批样品茯苓酸含量依次为0.0655%,0.0604%,0.0660%,0.0640%,0.0623%,均值为0.0636%,RSD为3.64%,各批次双样含量结果相对平均偏差均 $<2.0\%$ 。15批样品检测结果显示,云南丽江、安徽安庆2个产地茯苓药材中茯苓酸含量相对均一稳定,而湖北黄冈样品相对分散,该结果与PCA吻合,说明茯苓酸对不同产地茯苓的分类起到重要作用。

讨 论

为建立茯苓药材特征图谱,本研究共考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.2%乙酸、乙腈(含3.0%,1.0%,0.5%,0.2%,0.1%四氢呋喃)-0.1%磷酸等9种流动相体系。综合色谱峰数目、出峰时间、峰分离度及拖尾因子、基线平稳情况等因素,确定流动相为乙腈(含0.2%四氢呋喃)-0.1%磷酸水。另外对210,222,225,242 nm这4种波长进行考察,根据色谱峰数目、峰响应值、峰型等因素,确定222 nm为茯苓特征图谱检测波长。

同时本研究考察了不同提取溶剂(甲醇、无水乙醇、95%甲醇、70%甲醇、水)、不同提取方式(超声提取、加热回流)、不同提取时间(15,30,45,60 min)、不同提取溶剂用量(20,30,40,60 mL)对茯苓药材特征图谱的影响,结果发现:甲醇提取效果最佳,超声提取与加热回流无明显差异,不同提取时间和不同提取溶剂用量也无显著差异,故选择甲醇 30 mL 超声提取 30 min 为最佳提取方法。

近年来,利用中药指纹图谱/特征图谱结合化学模式识别技术分析中药样品的差异,在中药质量评价中有广泛应用^[25-29]。本研究运用相似度分析,PCA,CA 和 OPLS-DA 等化学模式识别方法对不同产地茯苓药材质量进行研究。建立的 15 批茯苓药材 HPLC 特征图谱相似度 >0.935,说明所建立的特征图谱方法稳定,各产地茯苓药材所含有的化学物质种类基本一致。但 8 个共有峰相对峰面积 RSD 为 12.49%~72.89%,表明各批次茯苓药材中化学成分含量存在明显差异,相似度分析无法直观反映出不同批次药材的差异质量标志物。在 PCA 分析中,3 个产地茯苓样品聚为 3 类,其中安徽安庆为一类,云南丽江为一类,湖北黄冈虽聚为一类,但样本较分散,S2 和 S4 与云南丽江接近,CA 分析验证了 PCA 的结果,表明不同产地茯苓所含化学成分含量存在差异,造成差异的原因可能与产地、气候、环境等因素有关。因此 OPLS-DA 分析中,以“产地”这一因素将 15 个样本分为 3 组,并通过置换检验验证模型未出现过拟合,由 VIP 值筛选茯苓酸作为茯苓药材的差异质量标志物。经方法学考察,证明建立的茯苓酸含量测定方法稳定可靠,且经详细的耐用性考察,证明该方法系统适用性良好,具备作为茯苓质量控制指标的条件。

综上,本研究采用化学模式识别技术分析茯苓 HPLC 特征图谱数据,筛选茯苓酸作为不同产地茯苓药材的差异质量标志物,并验证所建立方法符合《中华人民共和国药典》分析方法验证指导原则的要求,可为茯苓药材质量标准的建立提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 251.
- [2] 马帅, 周蓬. 茯苓的研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(3): 219-223.
- [3] 张越, 程玥, 刘洁, 等. 不同生长环境下茯苓总三萜和水溶性总多糖含量比较[J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(4): 81-84.
- [4] 田玉桥, 尹火青, 陈三春, 等. 不同生长期采收的茯苓品质

- 比较研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 12-16.
- [5] 陈兴龙, 张敏, 杨琪瑶, 等. 茯苓 95% 乙醇提取物三萜类化学成分的上 LC-IT-TOF/MS 分析[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(11): 1-8.
- [6] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [7] 徐雷, 刘常丽, 张群, 等. 不同初加工方法对茯苓多糖和三萜类成分的影响[J]. 北方园艺, 2014(10): 148-151.
- [8] 李健康, 张敏, 刘校妃, 等. UPLC-MS/MS 快速测定茯苓中去氢土莫酸和茯苓酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 85-88.
- [9] 王维皓, 杨滨. UPLC 柱前衍生测定白茯苓中游离氨基酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(5): 372-376.
- [10] 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): 1371-1380.
- [11] 贺丹彤, 陈少波, 汪景, 等. 基于多成分含量测定及主成分分析的茯苓质量控制[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(3): 447-450.
- [12] 宋潇, 谢昭明, 黄丹, 等. 茯苓 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 36-39.
- [13] 陈素娥, 孙红, 朱琳, 等. 茯苓药材高效液相色谱指纹图谱及多指标成分定量研究[J]. 中南药学, 2020, 18(9): 1507-1512.
- [14] 王克勤, 傅杰, 苏玮, 等. 道地药材茯苓疏[J]. 中药研究与信息, 2002, 4(6): 16-17.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480.
- [16] 国家药品监督管理局! 北京. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 23-29.
- [17] 石岩, 魏锋, 马双成. 关于主成分分析在中药和天然药物分析研究中的应用的探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3031-3035.
- [18] 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.
- [19] 阿基业, 何骏, 孙桐彬. 代谢组学数据处理: 主成分分析十个要点问题[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937.
- [20] 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.
- [21] 徐德宏, 谭朝阳, 郑慧, 等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 273-280.
- [22] 黄斯, 潘雨薇, 蓝海, 等. 茯苓酸药理学研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2719-2721.
- [23] 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): 1371-1380.
- [24] 李健康, 张敏, 刘校妃, 等. UPLC-MS/MS 快速测定茯苓中去氢土莫酸和茯苓酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 85-88.
- [25] 戚华文, 徐鑫, 温柔, 等. 基于化学模式识别技术的枳实 HPLC 定量指纹图谱研究[J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 72-78.
- [26] 林丽, 李欢欢, 谢辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的旋覆花药材质量评价研究[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1751-1758.
- [27] MENG Z, HUANG Y, WANG LJ, et al. Quality evaluation of *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with chemical pattern recognition[J]. *Sep Sci Plus*, 2020, 3(6): 200-206.
- [28] 于密密, 范妙璇, 李铮, 等. 高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的小金制剂质量研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(18): 2565-2570.
- [29] 高艳艳, 陈晓鹤, 苏磊, 等. 高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的地骨皮饮片质量研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(5): 593-599.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2023-12-08