

茯苓皮与白茯苓中三萜类成分的 HPLC 指纹图谱与化学模式识别研究

占慧慧^{1,2,3}, 丁婵^{1,2,3}, 彭思源^{1,2,3},
刘媛^{1,2,3}, 孟俊华^{1,2,3}, 肖作为^{1*}, 崔培梧^{1,2,3*}

¹湖南中医药大学药学院;²国家中医药管理局中药药性与药效三级科重点实验室;

³湖南中医药大学菌物药研究室,长沙 410208

摘要:建立茯苓皮与白茯苓中三萜类成分的 HPLC 指纹图谱,并对其进行化学模式识别研究,为菌物药茯苓的质量控制及标准制定提供依据。采用 HPLC 法,Agilent 5 TC-C₁₈(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.3% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 25 °C,变波长方式检测,采集波长为 242、203 nm,进样量 10 μL。建立了茯苓皮与白茯苓中三萜类成分指纹图谱,应用聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)手段结合相似度评价对实验数据进行识别,以分析不同茯苓样品的相似性和差异性,找出可反映茯苓皮与白茯苓三萜成分特征的关键色谱峰。茯苓皮与白茯苓三萜成分指纹图谱的共有模式下确认了 6 个共有峰,分别为 2 号峰(茯苓新酸 B)、3 号峰(去氢土莫酸)、4 号峰(茯苓新酸 A)、9 号峰(去氢茯苓酸)、10 号峰(茯苓酸)、12 号峰(松苓新酸);不同来源的茯苓样品相同药用部位间相似度均在 0.90 以上;依据 CA 和 PCA 分析结果将茯苓样品药用部位分为两大类。PCA 分析结果显示包括代表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸成分在内的 7 个共有色谱峰(3、5 和 6、8~11 号峰)在评价茯苓皮及白茯苓质量时必不可少,其余包括代表茯苓新酸 B、茯苓新酸 A、松苓新酸成分在内的 8 个色谱峰(1 和 2、4、7、12~15 号峰)可作为评价茯苓皮质量的特征鉴别峰;白茯苓中 15 个共有色谱峰间的差异比茯苓皮小。本研究建立的茯苓三萜 HPLC 指纹图谱和化学模式识别可为不同茯苓药材质量控制与评价提供参考。

关键词:茯苓;三萜;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;质量控制

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)9-1469-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.9.001

Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of triterpenoids in *Poriae Cutis* and White *Poria*

ZHAN Hui-hui^{1,2,3}, DING Chan^{1,2,3}, PENG Si-yuan^{1,2,3},
LIU Yuan^{1,2,3}, MENG Jun-hua^{1,2,3}, XIAO Zuo-wei^{1*}, CUI Pei-wu^{1,2,3*}

¹College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine;

²Research Lab of TCM Property & Efficacy, Tier 3, National Administration of TCM;

³Mycomedicine Research Lab, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: In this study, HPLC analysis combined with chemical pattern recognition was employed to establish the HPLC fingerprint related to triterpenoids in *Poriae Cutis* and White *Poria*, which can provide a reference for quality control and standard establishment of decoction pieces derived from mycomedicine *Poria cocos*. HPLC method was adopted and performed on an Agilent 5 TC-C₁₈(2) column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile and 0.3% phosphoric acid solution, and gradient elution procedure was employed with the flow rate setting at 1.0 mL/min. The column temperature was set at 25 °C, the detection wavelength was set at 242 and 203 nm, and the injection volume was 10 μL, respectively. To establish the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Poriae Cutis* and White *Poria*, cluster analysis

收稿日期:2023-02-20 接受日期:2023-07-05

基金项目:国家自然科学基金(81973211/C0033375);湖南省中医药科研计划(D2022139/A2022005-17);湖南省大学生创新创业训练计划(湘教通[2022]174号-2918);湖南中医药大学“十四五”重点学科-生物工程学科(校行发规字[2023]2号)

*通信作者 E-mail: xiaozw2009@163.com, cuipeiwu@126.com

(CA), principal component analysis (PCA) and similarity evaluation were adopted to process the experimental data, the similarity and difference of *Poriae Cutis* and White *Poria* samples were analyzed subsequently. Finally, the key chromatographic peaks representing triterpenoids were pointed out from the established HPLC fingerprint. Among the common chemical components showed in the chromatograms, six peaks related to poricoic acid B (peak 2), dehydrotumulosic acid (peak 3), poricoic acid A (peak 4), dehydropachymic acid (peak 9), pachymic acid (peak 10), and dehydrotrametenolic acid (peak 10) were indentified, respectively. The similarity of tested decoction pieces from the same part of *P. cocos* sclerotium were all above 0.90. According to CA and PCA data, all the decoction pieces analyzed in this study can be divided into two groups representing different medicinal parts of *P. cocos* sclerotium. Seven common chromatographic peaks including peak 3 (dehydrotumulosic acid), peak 5, peak 6, peak 8, peak 9 (dehydropachymic acid), peak 10 (pachymic acid) and peak 11 were essential for the quality evaluation of *Poriae Cutis* and White *Poria*, the other eight chromatographic peaks including peak 1, peak 2 (poricoic acid B), peak 4 (poricoic acid A), peak 7, peak 12 (dehydrotrametenolic acid) and peaks 13 to 15 could be used as the characteristic identification peaks for evaluating the quality of *Poriae Cutis* according to the loading scatter analysis of PCA data. The characteristic difference deduced from the 15 common chromatographic peaks of White *Poria* samples was smaller than that of *Poriae Cutis* samples. The established HPLC fingerprint of *Poriae Cutis* and White *Poria* combined with chemical pattern recognition can provide a scientific reference for the quality control and evaluation of samples or products derived from *P. cocos*.

Key words: *Poria cocos*; triterpenoids; fingerprint; cluster analysis; PCA; quality control

茯苓又名茯菟、茯灵、松腴等,系多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,味甘、淡,性平,归心、肺、脾、肾经,有利水渗湿、健脾宁心的功效^[1]。茯苓收载于《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020年版一部,是中药四君八珍之一,有“十方九苓”之称^[2]。茯苓的主要药效物质是茯苓多糖和茯苓三萜^[3],现代药理学研究表明,茯苓三萜具有利尿^[4]、抗肿瘤^[5]、免疫调节^[6]、抗炎^[7]、抗衰老^[8]、降血糖和调血脂^[9]等作用,是当前用于表征茯苓质量和效应的重要指标^[10-12]。目前市场流通的茯苓主要为栽培品种,不同的产地、加工方式、饮片规格等都可能影响茯苓药材和饮片的质量^[11,13]。2020年版《中国药典》仅采用薄层色谱法鉴别控制茯苓和茯苓皮药材的质量,难以全面反映其质量的优劣。指纹图谱研究是现代中药领域内普遍被认可、应用较广泛的中药质量控制方法之一,具有整体性高、特征性强等优势,符合中药多成分综合作用的特点,有进一步鉴别、鉴定和分类的潜力^[14,15]。化学模式识别可对指纹图谱的多维信息进行分析,准确反映药材的质量差异,从而达到整体描述和合理评价药材质量的目的^[13]。本研究建立茯苓皮(源于茯苓菌核表皮)与白茯苓(源于茯苓菌核去皮后的部位)的HPLC指纹图谱,并结合模式识别手段分析各共有峰对指纹图谱的作用,找出其中的主要峰和特征峰,从整体上评价茯苓皮和白茯苓中各化学物质的差异,为茯苓药材的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);JS-40 型超声波清洗仪(常州鸿泽实验科技有限公司)。

1.2 试剂

对照品茯苓新酸 B(批号 140723,质量分数 ≥ 98%)、茯苓新酸 A(批号 140314,质量分数 ≥ 98%)、去氢茯苓酸(批号 140903,质量分数 ≥ 98%)、松苓新酸(批号 140902,质量分数 ≥ 98%)、茯苓酸(批号 140212,质量分数 ≥ 98%)购自成都克洛玛生物科技有限公司;去氢土莫酸(批号 AF21032,质量分数 ≥ 98%)购自成都埃法生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为怡宝纯净水,其余试剂为分析纯。

茯苓药材样品来源见表 1,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的不同药用部位,符合《中国药典》2020年版各项规定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 5 TC-C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为 0.3% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0 ~ 18 min, 50% → 60% B; 18 ~ 28 min, 60% B; 28 ~ 58 min, 60% → 92% B; 58 ~ 68 min, 92% B;检测波长为 242 nm 和 203 nm;进样量 10 μL;柱温 25 °C;体积流量 1.0 mL/min。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号 No.	药用部位 Medicinal part	生产企业 Manufacturer	产地 Origin	批号 Lot No.
S1	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	安徽三义堂中药饮片有限公司	云南	2103009
S2	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	亳州市中药饮片厂	安徽	20211025
S3	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	云南鸿翔中药科技有限公司	云南	20211023
S4	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	湖南振兴中药有限公司	湖南	21073109
S5	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	康美药业股份有限公司	湖南	200801781
S6	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	四川藏曦堂生物科技有限公司	四川	20211109
S7	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	亳州市泽信堂药业有限公司	云南	20211103
S8	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	河北纽恩堂电子商务有限公司	云南	20211112
S9	茯苓皮 <i>Poriae Cutis</i>	湖南聚仁中药饮片有限公司	云南	21011301
S10	白茯苓 <i>White Poria</i>	湖南聚仁中药饮片有限公司	湖南	21083101
S11	白茯苓 <i>White Poria</i>	康美药业股份有限公司	湖南	210315011
S12	白茯苓 <i>White Poria</i>	亳州市泽信堂药业有限公司	云南	202110315
S13	白茯苓 <i>White Poria</i>	云南国鹤药业有限公司	云南	2107008
S14	白茯苓 <i>White Poria</i>	岳阳天香中药饮片有限公司	云南	202111107

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取各茯苓三萜酸对照品适量,加甲醇溶解制成茯苓新酸 B、去氢土莫酸、茯苓新酸 A、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸对照品质量浓度分别为 0.020 7、0.071 4、0.006 4、0.038 6、0.037 1、0.017 1 mg/mL 的混合对照品溶液。放于 4 °C 冰箱保存,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

取茯苓样品粉末 2.0 g(过 60 目筛),精密称定,置 100 mL 干燥具塞锥形瓶中,加甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,用甲醇补足减失质量,滤过,茯苓皮样品滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得;白茯苓样品滤液先旋转蒸干后定容至 2.0 mL,再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验

取云南茯苓皮样品(S8),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依据“2.1”项下的色谱条件,连续进样测定 6 次,以茯苓酸(10 号峰)为参照峰,计算得各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.04% ~ 0.86% 和 0.22% ~ 1.69% 之间,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性实验

取云南茯苓皮样品(S8),按“2.2.2”项下方法

制备供试品溶液,依据“2.1”项下的色谱条件,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定,测得各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积并计算得 RSD 值分别在 0.01% ~ 0.27% 和 0.32% ~ 1.19% 之间,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性实验

取云南茯苓皮样品(S8)6 份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依据“2.1”项下的色谱条件进样测定,测得各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积并计算得 RSD 值分别在 0.02% ~ 0.29% 和 0.81% ~ 4.53% 之间,表明方法重复性好。

2.3.4 溶剂峰和滞后峰的考察

取空白对照(甲醇)和云南茯苓皮样品(S8)溶液,检测时间延长至 2 h,考察结果如图 1 所示,测试结果表明空白溶剂无干扰且未见滞后峰出现。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱共有模式的建立

将 14 批不同产地不同药用部位茯苓样品的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件分别生成茯苓样品的叠加图谱和对照指纹图谱。14 批茯苓皮和白茯苓样品的叠加图谱和对照指纹图谱见图 2,茯苓皮和白茯苓各自的对照指纹图谱及混合对照品 HPLC 色谱图见图 3。由图 2 和 3 可知,茯苓皮与白茯苓样品共有的典型色谱峰有 15 个;经与混合对照品溶液色谱图比对,

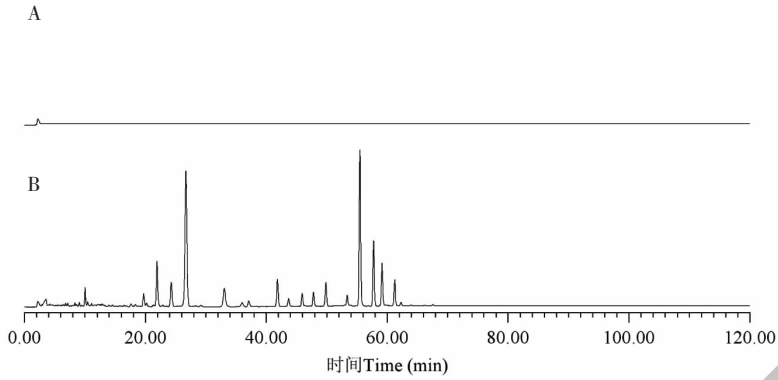


图1 溶剂峰(A)和滞后峰(B)的考察色谱图

Fig. 1 Investigation chromatograms of solvent peaks (A) and hysteresis peaks (B)

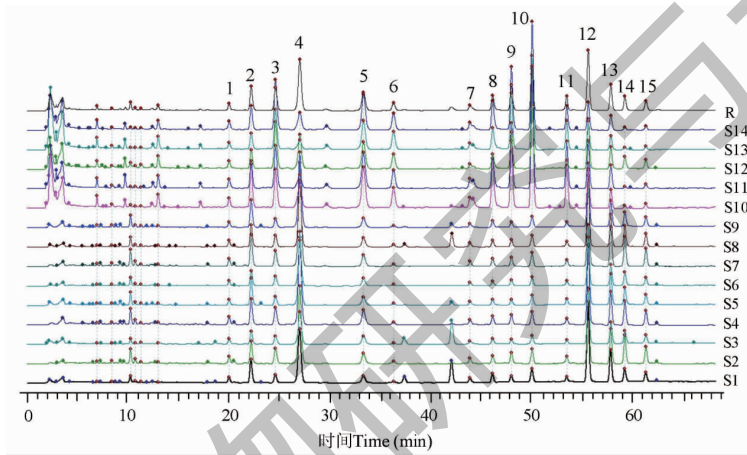


图2 14批茯苓皮与白茯苓饮片的指纹图谱叠加图和对照指纹图谱

Fig. 2 Superimposed fingerprints and control fingerprint of 14 batches of Poriae Cutis and White Poria decoction pieces

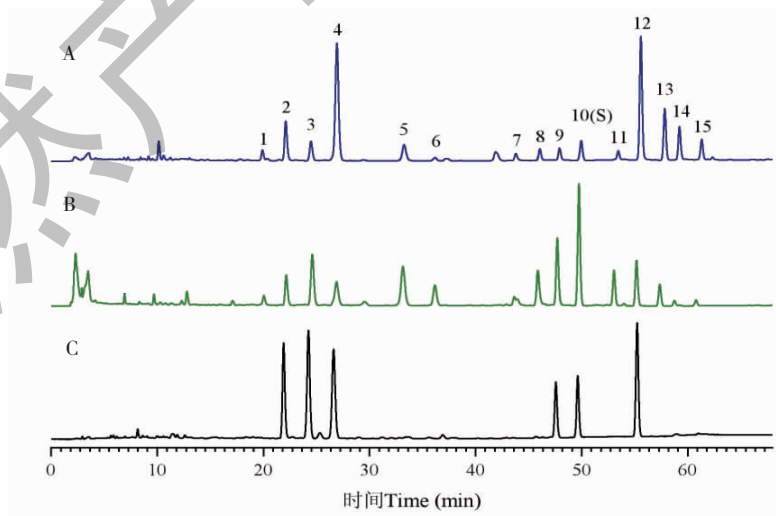


图3 不同产地茯苓皮(A)和白茯苓(B)饮片对照指纹图谱与混合对照品HPLC图(C)

Fig. 3 Control fingerprints of Poriae Cutis (A) and White Poria (B) decoction pieces from different regions and HPLC chromatogram of mixed standards (C)

注:2:茯苓新酸B;3:去氢土莫酸;4:茯苓新酸A;9:去氢茯苓酸;10:茯苓酸;12:松苓新酸。Note:2:Poricoic acid B;3:Dehydrotumulosic acid;4:Poricoic acid A;9:Dehydropachymic acid;10:Pachymic acid;12:Dehydrotametonic acid.

指认了其中 6 个共有峰,分别为茯苓新酸 B(2 号峰)、去氢土莫酸(3 号峰)、茯苓新酸 A(4 号峰)、去氢茯苓酸(9 号峰)、茯苓酸(10 号峰)、松苓新酸(12 号峰);其中 10 号峰茯苓酸成分是茯苓中具有代表性的活性三萜酸类成分,性质稳定,峰面积所占比例较大,分离度好,因此确定其为参照峰(S)。

2.4.2 茯苓皮与白茯苓共有峰的相对保留时间与相对峰面积

以不同产地茯苓皮和白茯苓样品 HPLC 色谱图

中的 10 号峰(茯苓酸)为参照峰(S),计算各个批次样品中其他共有峰与 S 峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 2 和表 3。由表 2 和表 3 可知,茯苓皮与白茯苓样品共有峰相对保留时间的波动较小(RSD 值在 0.02%~0.64%),而相对峰面积波动较大,表明茯苓皮与白茯苓 HPLC 指纹图谱中主要峰群的整体面貌基本一致,但同一批次样品各成分之间含有量及不同药用部位样品各成分含有量差别较大。

表 2 14 批茯苓皮与白茯苓饮片指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Common peaks relative retention time of the fingerprints of 14 batches of Poriae Cutis and White Poria decoction pieces

样品 Sample	共有峰相对保留时间 Relative retention time common peaks														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	0.400	0.445	0.492	0.542	0.668	0.726	0.877	0.922	0.959	1.000	1.070	1.112	1.158	1.185	1.227
S2	0.399	0.444	0.492	0.542	0.669	0.727	0.878	0.922	0.959	1.000	1.069	1.112	1.156	1.184	1.226
S3	0.399	0.442	0.490	0.538	0.664	0.724	0.877	0.922	0.959	1.000	1.069	1.112	1.157	1.185	1.227
S4	0.398	0.442	0.489	0.538	0.664	0.723	0.876	0.921	0.958	1.000	1.070	1.113	1.158	1.187	1.230
S5	0.398	0.442	0.489	0.538	0.665	0.723	0.877	0.922	0.959	1.000	1.070	1.113	1.158	1.186	1.228
S6	0.398	0.442	0.489	0.538	0.665	0.724	0.877	0.922	0.959	1.000	1.070	1.112	1.158	1.185	1.227
S7	0.398	0.442	0.489	0.538	0.665	0.724	0.877	0.922	0.959	1.000	1.070	1.113	1.158	1.185	1.227
S8	0.395	0.439	0.487	0.536	0.663	0.722	0.876	0.921	0.959	1.000	1.070	1.113	1.158	1.186	1.228
S9	0.402	0.446	0.494	0.544	0.670	0.728	0.878	0.922	0.959	1.000	1.070	1.112	1.157	1.184	1.226
S10	0.404	0.446	0.496	0.542	0.667	0.728	0.878	0.922	0.959	1.000	1.066	1.108	1.153	1.180	1.221
S11	0.403	0.445	0.495	0.541	0.666	0.727	0.877	0.922	0.959	1.000	1.066	1.108	1.153	1.180	1.221
S12	0.402	0.444	0.494	0.540	0.666	0.726	0.877	0.922	0.959	1.000	1.068	1.110	1.155	1.182	1.224
S13	0.403	0.446	0.495	0.541	0.667	0.727	0.878	0.922	0.959	1.000	1.066	1.109	1.153	1.180	1.222
S14	0.403	0.445	0.495	0.541	0.667	0.727	0.878	0.922	0.959	1.000	1.067	1.109	1.153	1.181	1.222
平均值 Mean	0.400	0.444	0.492	0.540	0.666	0.725	0.877	0.922	0.959	1.000	1.069	1.111	1.156	1.184	1.225

表 3 14 批茯苓皮与白茯苓饮片指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Common peaks relative peak area of the fingerprints of 14 batches of Poriae Cutis and White Poria decoction pieces

样品 Sample	共有峰相对峰面积 Relative peak area of common peaks														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	0.367	1.672	0.683	5.300	0.829	0.150	0.402	0.644	0.437	1.000	0.341	5.809	2.264	1.005	0.677
S2	0.427	1.495	1.161	7.030	1.062	0.212	0.375	0.521	0.686	1.000	0.515	5.001	2.271	1.823	1.044
S3	0.561	1.519	1.087	5.301	1.511	0.230	0.477	0.616	0.566	1.000	0.343	6.243	2.416	1.438	0.946
S4	0.536	1.905	1.427	8.699	1.692	0.264	0.400	0.620	0.692	1.000	0.458	6.019	2.489	1.750	1.057
S5	0.471	2.548	0.978	9.447	1.277	0.240	0.400	0.527	0.523	1.000	0.446	7.749	2.893	1.625	0.928
S6	0.484	1.719	1.233	6.972	1.304	0.223	0.379	0.477	0.640	1.000	0.475	5.514	2.277	1.406	0.846

续表 3 (Continued Tab. 3)

样品 Sample	共有峰相对峰面积 Relative peak area of common peaks														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S7	0.488	2.125	1.207	9.523	1.244	0.207	0.372	0.530	0.580	1.000	0.457	6.304	2.646	2.007	1.164
S8	0.487	1.786	1.105	7.302	1.197	0.243	0.348	0.523	0.557	1.000	0.371	6.329	2.586	1.668	1.031
S9	0.420	2.448	0.869	9.203	1.289	0.209	0.394	0.570	0.476	1.000	0.326	5.725	2.266	1.237	0.779
平均值 Mean	0.471	1.913	1.083	7.642	1.267	0.220	0.394	0.559	0.573	1.000	0.415	6.077	2.456	1.551	0.941
S10	0.079	0.328	0.331	0.310	0.490	0.199	0.077	0.422	0.493	1.000	0.302	0.288	0.137	0.022	0.031
S11	0.083	0.256	0.451	0.196	0.521	0.227	0.090	0.319	0.580	1.000	0.403	0.421	0.204	0.017	0.036
S12	0.115	0.315	0.890	0.786	0.692	0.325	0.049	0.258	0.586	1.000	0.126	0.807	0.350	0.190	0.141
S13	0.060	0.180	0.513	0.163	0.512	0.266	0.065	0.251	0.610	1.000	0.303	0.311	0.154	0.023	0.038
S14	0.089	0.230	0.564	0.260	0.538	0.217	0.039	0.291	0.609	1.000	0.210	0.260	0.137	0.025	0.038
平均值 Mean	0.085	0.262	0.550	0.343	0.550	0.247	0.064	0.308	0.575	1.000	0.269	0.418	0.196	0.055	0.057

2.4.3 相似度分析

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”软件计算 14 批茯苓样品 HPLC 指纹图谱的相似度(见表 4),由结果可知,茯苓皮样品相似

度在 0.951~0.998,白茯苓样品相似度在 0.894~0.993,表明不同产地同一药用部位茯苓样品相似度较好;茯苓皮与白茯苓之间相似度在 0.389~0.765,说明不同药用部位的茯苓指纹图谱有明显区别。

表 4 14 批茯苓皮与白茯苓饮片的相似度

Table 4 Similarities of 14 batches of *Poriae Cutis* and White *Poria* decoction pieces

样品 Sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
S1	1.000	0.975	0.994	0.974	0.988	0.986	0.970	0.992	0.964	0.508	0.506	0.733	0.439	0.457
S2	0.975	1.000	0.972	0.998	0.991	0.997	0.997	0.995	0.989	0.507	0.491	0.744	0.438	0.467
S3	0.994	0.972	1.000	0.970	0.979	0.982	0.962	0.988	0.951	0.527	0.534	0.765	0.472	0.488
S4	0.974	0.998	0.970	1.000	0.993	0.998	0.998	0.994	0.994	0.502	0.482	0.741	0.429	0.462
S5	0.988	0.991	0.979	0.993	1.000	0.996	0.994	0.997	0.992	0.467	0.451	0.705	0.390	0.417
S6	0.986	0.997	0.982	0.998	0.996	1.000	0.995	0.998	0.990	0.515	0.503	0.753	0.447	0.476
S7	0.970	0.997	0.962	0.998	0.994	0.995	1.000	0.992	0.996	0.471	0.448	0.710	0.393	0.427
S8	0.992	0.995	0.988	0.994	0.997	0.998	0.992	1.000	0.985	0.493	0.484	0.735	0.425	0.450
S9	0.964	0.989	0.951	0.994	0.992	0.990	0.996	0.985	1.000	0.477	0.445	0.701	0.389	0.426
S10	0.508	0.507	0.527	0.502	0.467	0.515	0.471	0.493	0.477	1.000	0.983	0.894	0.972	0.976
S11	0.506	0.491	0.534	0.482	0.451	0.503	0.448	0.484	0.445	0.983	1.000	0.907	0.991	0.982
S12	0.733	0.744	0.765	0.741	0.705	0.753	0.710	0.735	0.701	0.894	0.907	1.000	0.902	0.920
S13	0.439	0.438	0.472	0.429	0.390	0.447	0.393	0.425	0.389	0.972	0.991	0.902	1.000	0.993
S14	0.457	0.467	0.488	0.462	0.417	0.476	0.427	0.450	0.426	0.976	0.982	0.920	0.993	1.000

2.5 各产地茯苓皮与白茯苓样品的聚类分析

聚类分析(CA)是一种按“物以类聚”原则通过将观察对象依据某些特征分类的多元统计分析手段,从而建立样本与样本之间的相似关系或亲疏关系,目前在中药方面的应用较广泛,如真伪鉴别、品

种分类及质量评价等^[16]。采用 SPSS 26.0 软件,以 14 批不同产地不同药用部位茯苓样品的 15 个共有峰峰面积为变量,用组间连接法、欧式距离为度量标准进行聚类,聚类结果见图 4。由图 4 可知,14 份茯苓样品被分成了 2 大类:第一大类为茯苓皮(S1~

S9); 第二大类为白茯苓(S10~S14), 这与样品的性状鉴别结果吻合, 表明不同药用部位间茯苓样品的差异较大, 观察“2.4.2”项下各共有峰的相对峰面积均值可发现, 茯苓皮中除峰6和峰9外其他共有

色谱峰均高于白茯苓, 提示各成分含量的高低可能是造成不同药用部位药材差异的主要原因。此外白茯苓样品按产地分为两类: I类样品为S10和S11, 产自湖南; II类样品为S13和S14, 产自云南。

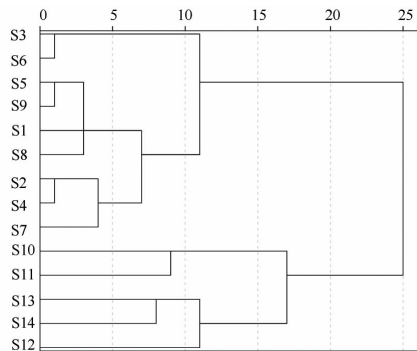


图4 14批不同产地茯苓皮和白茯苓样品聚类分析树状图

Fig. 4 Cluster analysis of 14 batches of Poriae Cutis and White Poria samples from different regions

2.6 各产地茯苓皮与白茯苓样品的主成分分析

将不同产地茯苓皮与白茯苓样品各共有峰峰号对峰面积作折线图(见图5), 从图可知在本实验条

下茯苓样品峰面积数据拟合度较小, 样本组间差异较大, 故采用无监督的主成分分析(PCA)方法, 使用的分析软件为SPSS 26.0和SIMCA 14.1。

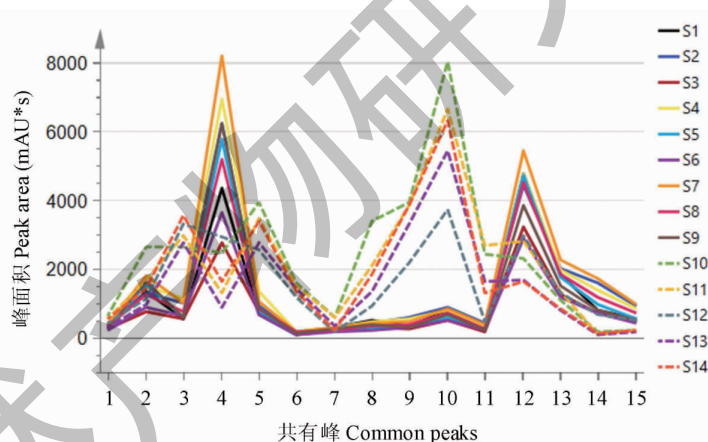


图5 14批不同产地茯苓皮和白茯苓样品峰面积折线图

Fig. 5 Peak area line chart of 14 batches of Poriae Cutis and White Poria samples from different regions

2.6.1 主成分结果

以标准化后的各共有峰峰面积为变量进行PCA分析。表5为主成分结果, 前2个主成分解释了全部方差的90.387%, 能够反映茯苓皮与白茯苓指纹图谱中共有峰的大部分信息, 结合碎石图(见图6)可知, 前2个主成分特征值相对较大, 而其他主成分之间比较平缓, 因此提取前两个主成分并标记为 Y_1 和 Y_2 。图7为14批茯苓样品的PCA散点得分图, 结果表明, 14批样品可分为2类, I类样品为S1-S9, II类样品为S10-S14, 该现象与CA分析结果基本一致。

2.6.2 主成分表达式

根据标准化后的各个共有峰变量 X_{1-15} 占主成分的权重(见表6), 得到 Y_1 、 Y_2 的线性组合: $Y_1 = 0.229X_1 + 0.111X_2 + 0.268X_3 - 0.251X_4 + 0.295X_5 + 0.295X_6 + 0.189X_7 + 0.282X_8 + 0.299X_9 + 0.300X_{10} + 0.279X_{11} - 0.257X_{12} - 0.233X_{13} - 0.265X_{14} - 0.251X_{15}$, $Y_2 = 0.331X_1 + 0.504X_2 - 0.091X_3 - 0.304X_4 + 0.094X_5 + 0.015X_6 + 0.360X_7 + 0.191X_8 + 0.041X_9 + 0.077X_{10} + 0.157X_{11} + 0.290X_{12} + 0.360X_{13} + 0.231X_{14} + 0.265X_{15}$ 。

表5 茯苓饮片样品的主成分结果

Table 5 Principal component results of decoction pieces samples made from *P. cocos* sclerotium

成分 Component	初始特征值 Initial eigenvalues			提取载荷平方和 Extract the sum of squared loads		
	合计 Total	方差百分比 Variance percentage	累积百分比 Cumulative percentage	合计 Total	方差百分比 Variance percentage	累积百分比 Cumulative percentage
1	10.823	72.153	72.153	10.823	72.153	72.153
2	2.735	18.234	90.387	2.735	18.234	90.387
3	0.772	5.149	95.536	-	-	-
4	0.350	2.330	97.866	-	-	-

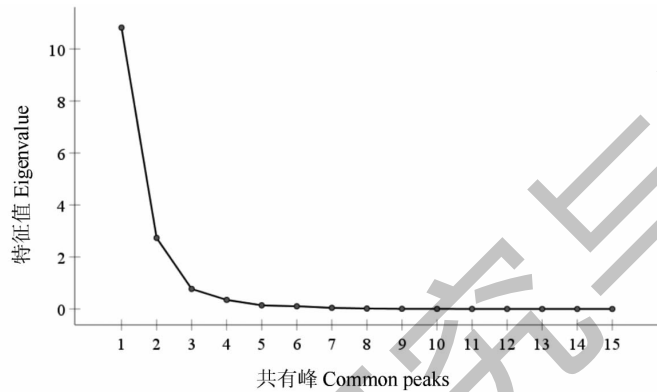


图6 茯苓饮片样品 PCA 碎石图

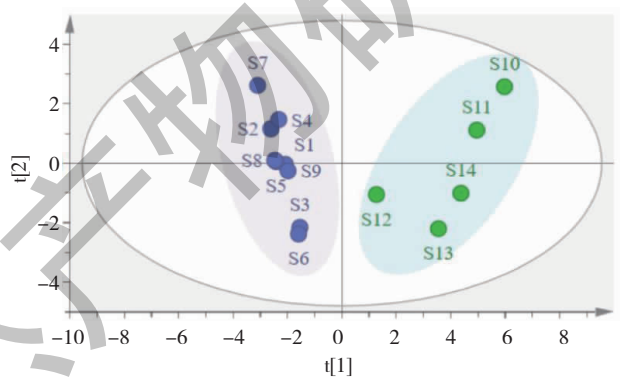
Fig. 6 PCA scree plot of decoction pieces samples made from *P. cocos* sclerotium

图7 14批茯苓饮片样品的PCA散点得分图

Fig. 7 PCA score scatter plot of 14 batches of decoction pieces samples made from *P. cocos* sclerotium

由上式可知,在 Y_1 中,3、5 和 6、8 ~ 11 号峰 (X_3 、 $X_{5,6}$ 、 $X_{8,11}$) 的系数绝对值大于其他共有峰变量的系数绝对值,所以主成分 Y_1 是 7 个共有峰的综合反应,观察“2.4.2”项下各共有峰的相对峰面积可发现,茯苓皮样品 3、5 和 6、8 ~ 11 号峰的相对峰面积均值与白茯苓 3、5 和 6、8 ~ 11 号峰的相对峰面积均值较接近,而其他共有峰的相对峰面积均值都相差很大,说明这 7 个共有峰及所代表的成分(包括已指认的共有峰代表成分:去氢土莫酸、去氢茯苓

酸、茯苓酸)在评价茯苓皮和白茯苓质量优劣时是必不可少的。在 Y_2 中,1 和 2、4、7、12 ~ 15 号峰 ($X_{1,2}$ 、 X_4 、 X_7 、 $X_{12,15}$) 的系数大于其他共有峰变量的系数,所以主成分 Y_2 是由这 8 个共有峰来综合反应,根据各共有峰的相对峰面积可知,茯苓皮样品这 8 个共有峰的相对峰面积均值远大于白茯苓样品,提示这 8 个共有峰(包括已指认的共有峰,2 号峰-茯苓新酸 B、4 号峰-茯苓新酸 A、12 号峰-松苓新酸)可以作为茯苓皮与白茯苓指纹图谱(见图 2)中茯苓

皮的特征鉴别分。

表 6 茯苓饮片样品 PCA 的成分得分系数矩阵

Table 6 Component score coefficient matrix of PCA of decoction pieces samples made from *P. cocos sclerotium*

共有峰 Common peak	Y_1	Y_2
1	0.229	0.331
2	0.111	0.504
3	0.268	-0.091
4	-0.251	0.304
5	0.295	0.094
6	0.295	0.015
7	0.189	0.360
8	0.282	0.191
9	0.299	0.041
10	0.300	0.077
11	0.279	0.157
12	-0.257	0.290
13	-0.233	0.360
14	-0.265	0.231
15	-0.251	0.265

2.6.3 主成分得分和综合得分

表 7 是根据主成分表达式计算的各样本主成分得分和以各个主成分方差贡献率占两个主成分总方差贡献率的比率为权重计算的综合得分^[17],主成分 Y_1 得分比较高的是 S10、S11、S13、S14,主成分 Y_2 得分比较高的是 S2、S4、S7、S10,综合得分比较高的是 S10 ~ S14,结合茯苓皮和白茯苓各自的对照指纹图谱(见图 3A 和图 3B)或共有峰峰面积信息,可知在本研究的茯苓皮与白茯苓 HPLC 指纹图谱条件下,白茯苓样品(S10 ~ S14)的 3(去氢土莫酸)、5 和 6、8、9(去氢茯苓酸)、10(茯苓酸)、11 号峰成分含量高于茯苓皮;而 S2、S4、S7、S10 样品的 1 和 2、4、7、12 ~ 15 号峰成分含量高于其他样品,其中 S2、S4、S7 都是茯苓皮样品,提示在本实验条件下测得的茯苓皮的 1、2(茯苓新酸 B)、4(茯苓新酸 A)、7、12(松苓新酸)、13-15 号峰成分含量普遍高于白茯苓;综合得分较高的都是白茯苓样品,说明白茯苓样品 15 个共有峰成分含量间差异普遍比茯苓皮小。此外,载荷图表明 1、2(茯苓新酸 B)、7 号色谱峰对茯苓皮及白茯苓药材的整体质量起主要影响作用,如图 8 所示。

表 7 主成分得分和综合得分

Table 7 Principal component score and composite score

编号 No.	主成分 Y_1 得分 Principal component Y_1 score	主成分 Y_2 得分 Principal component Y_2 score	综合得分 Comprehensive score	排名 Ranking
S1	-2.07	0.05	-1.49	8
S2	-2.59	1.21	-1.65	11
S3	-1.56	-2.07	-1.5	9
S4	-2.33	1.49	-1.41	6
S5	-2.42	0.11	-1.73	12
S6	-1.61	-2.30	-1.58	10
S7	-3.12	2.67	-1.76	14
S8	-2.44	0.15	-1.73	13
S9	-1.98	-0.18	-1.46	7
S10	6.00	2.49	4.78	1
S11	4.98	1.00	3.77	2
S12	1.26	-1.18	0.69	5
S13	3.53	-2.30	2.13	4
S14	4.36	-1.15	2.94	3

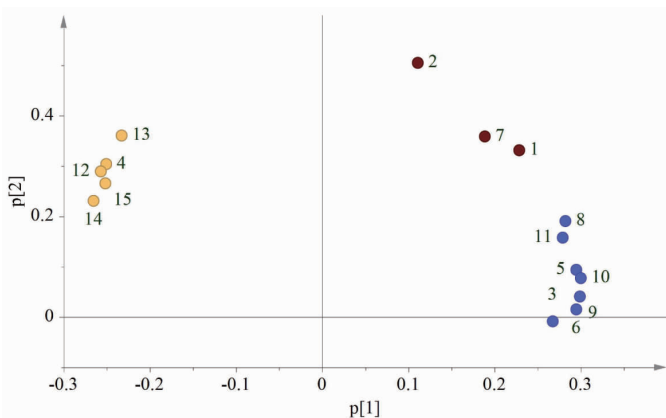


图8 14批茯苓饮片样品的主成分载荷图

Fig. 8 Loading scatter plot of PCA of 14 batches of decoction pieces samples made from *P. cocos sclerotium*

3 讨论与结论

本研究采用甲醇为提取溶剂、超声处理 30 min 的样品提取方法^[18],考察了不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水、乙腈-0.3%磷酸水),不同色谱柱[Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Welch Ultimate XB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse Plus C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)],不同体积流量(1.0、1.1、1.2 mL/min),不同色谱柱温度(22、25、28 °C),不同采集波长(203、210、242 nm)对指纹图谱的影响,最终确定色谱条件为流动相为乙腈-0.3%磷酸水,Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,体积流量为 1.0 mL/min,色谱柱温度 25 °C,变波长方式采集,此条件下基线平稳,色谱峰峰形较好,分离效果较佳。

在此基础上采用 HPLC 法建立了 14 批来自不同产地的茯苓皮与白茯苓指纹图谱,在茯苓皮与白茯苓指纹图谱的共有模式下共标定了 15 个共有峰,并通过化学对照品指认了其中 6 个化学成分:茯苓新酸 B、去氢土莫酸、茯苓新酸 A、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸。通过 14 批不同产地茯苓皮和白茯苓样品聚类分析树状图和峰面积折线图结合相似度数据可知不同药用部位的茯苓样品组间差异较大,组内差异较小,白茯苓样品与产地的关联性较强。因此模式识别采用无监督的 PCA 方法,PCA 结果将 15 个共有峰变量分成 2 个主成分 Y₁ 和 Y₂,Y₁ 是包括去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸成分在内的 7 个共有色谱峰的综合反应,表明 7 个共有色谱峰在进行茯苓皮与白茯苓指纹图谱研究时必不可少;Y₂ 是包括茯苓新酸 B、茯苓新酸 A、松苓新酸成分在内的 8

个色谱峰的综合反应,提示这 8 个色谱峰可作为在同时评价茯苓皮与白茯苓质量时茯苓皮的特征鉴别峰。对指纹图谱影响较大的共有峰变量参数为 1、2(茯苓新酸 B)、7 号色谱峰。白茯苓这 15 个共有峰成分间含量差异比茯苓皮小。实际上白茯苓这 15 个共有峰成分含量都远低于茯苓皮,为了使茯苓皮与白茯苓指纹图谱的共有模式更完整和可测故而在制备白茯苓时加了一步浓缩步骤。

研究表明本文建立的方法简便、可靠、准确,可以为茯苓皮及白茯苓的质量评价、标准的制定及药材的合理利用提供参考依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science and Technology Press,2020:251-252.
- 2 Li HM, He K, Zheng H, et al. Health-care mechanism and medicine and food resources of invigorating spleen in traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2020,51:780-787.
- 3 Shen YP, Li J, Jia XB. Research progress on chemical constituents of *Poria*[J]. J Nanjing Univ Chin Med(南京中医药大学学报),2012,28:297-300.
- 4 Feng YL, Zhao YY, Ding F, et al. Chemical constituents of surface layer of *Poria cocos* and their pharmacological properties(I)[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2013,38:1098-1102.
- 5 Sun MJ, Wang YY, Yao L, et al. Mechanism of anti-breast cancer action of *Poria cocos*(Schw.) Wolf based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. Nat Prod Res

- Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1764-1773.
- 6 Ni, FY, Xie X, Wen JH, et al. Non-polysaccharide chemical constituents of *Poria cocos* and their anti-complementary activity[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 2529-2533.
 - 7 Lee SR, Lee S, Moon E, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory triterpenoids from the sclerotia of *Poria cocos* using LPS-stimulated RAW 264. 7 cells [J]. Bioorg Chem, 2017, 70: 94-99.
 - 8 Lee SG, Kim MM. Pachymic acid promotes induction of autophagy related to IGF-1 signaling pathway in WI-38 cells[J]. Phytomedicine, 2017, 36: 82-87.
 - 9 Chen BS, Zhang JJ, Han JJ, et al. Lanostane triterpenoids with glucose-uptake-stimulatory activity from peels of the cultivated edible mushroom *Wolfiporia cocos* [J]. J Agr Food Chem, 2019, 67: 7348-7364.
 - 10 Duan Q, Yao LM, Zhuang YX. Comparison of contents of pachymic acid in *Poria* and *Cortex Sclerotii Poriae* by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2010, 21: 654-655.
 - 11 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(中国中药杂志), 2019, 44: 1371-1380.
 - 12 Wang YY, Shi XY, Zhang Y, et al. Simultaneous quantitative analysis of four triterpenes in *Poria cocos* from different habitats by QAMS[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 4899-4904.
 - 13 Feng BW, Chen SN, Cheng QX, et al. Exploring the relationship between quality of *Poria* and geographical origins by chemical pattern recognition combined with characteristic fingerprint and content of triterpene acids[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2021, 32: 1506-1512.
 - 14 Wu HN, Tan SH, Wang YQ, et al. Establishment and application of chemical fingerprint and pattern recognition for *Panacis Japonici Rhizoma* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 217-224.
 - 15 Hakimzadeh N, Parastar H, Fattahi M. Combination of multivariate curve resolution and multivariate classification techniques for comprehensive high-performance liquid chromatography-diode array absorbance detection fingerprints analysis of *Salvia reuterana* extracts[J]. J Chromatogr A, 2014, 1326: 63-72.
 - 16 Fu XM, Sun H, Liu J, et al. HPLC fingerprint of fruits of *Gardenia Fructus* based on cluster analysis and principal component analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 4653-4661.
 - 17 Cao XJ. Analysis of business performance of Chinese listed banks-based on principal component analysis, factor analysis and cluster analysis [J]. J Suzhou Coll (宿州学院学报), 2016, 31: 25-29.
 - 18 Xu WW, Xie T, Lv DF, et al. Simultaneous determination of 11 saponins components in red ginseng by QAMS method [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2099-2105.