

# 不同产地茯苓中7种三萜类成分含量的测定及聚类分析<sup>△</sup>

万鸣<sup>1\*</sup>, 黄超<sup>1,2</sup>, 杨玉莹<sup>2</sup>, 罗心遥<sup>2</sup>, 叶晓川<sup>2</sup>, 丁影<sup>1</sup>, 董琼<sup>1</sup>, 陈树和<sup>1#</sup> (1.湖北省中医院/湖北省中医药研究院药事部, 武汉 430061; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2101-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.10

**摘要** 目的:建立同时测定茯苓药材中7种三萜类成分含量的方法,并比较不同产地茯苓药材中上述成分的差异性,为茯苓药材的质量控制提供参考。方法:以不同产地的36批茯苓药材为样品,采用高效液相色谱法测定去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氯化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸的含量。色谱柱为Thermo Acclaim 120 C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-磷酸水(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为30 ℃,进样量为20  $\mu$ L。采用SPSS 21.0统计学软件对36批不同产地茯苓药材进行聚类分析。结果:7种三萜类成分在各自质量浓度范围内线性关系均良好( $r$ 均不低于0.999 0),平均加样回收率为96.74%~104.04%(RSD为0.54%~1.55%, $n=6$ );精密度、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD均小于3.0%( $n=6$ );耐用性试验的RSD均小于5.0%( $n=2$ )。不同产地样品之间7个指标成分的单一含量均存在一定差异,但总体差异不明显(多数样品总含量分布在1.3~1.9 mg/g之间)。经聚类分析,36批样品共聚为5类,即S27单独聚为第I类,S30、S34聚为第II类,S2、S8、S9聚为第III类,S10、S11、S12、S14聚为第IV类,其余26批样品聚为第V类。结论:该方法操作简单,精密度、重复性、耐用性均良好,可用于同时测定茯苓药材中上述7种三萜类成分的含量。各产地茯苓药材的质量总体差异不显著,大部分产区的茯苓含量均一、质量稳定,仅少部分存在差异。

**关键词** 茯苓;三萜类成分;高效液相色谱法;含量测定;聚类分析

## Content Determination and Cluster Analysis of 7 Kinds of Triterpenes in *Poria cocos* from Different Habitats

WAN Ming<sup>1</sup>, HUANG Chao<sup>1,2</sup>, YANG Yuying<sup>2</sup>, LUO Xinyao<sup>2</sup>, YE Xiaochuan<sup>2</sup>, DING Ying<sup>1</sup>, DONG Qiong<sup>1</sup>, CHEN Shuhe<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmaceutical Affairs, Hubei Province Hospital of TCM/Hubei Academy of TCM, Wuhan 430061, China; 2. College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 7 kinds of triterpenoids in *Poria cocos*, and to compare the differences of the above components in *P. cocos* from different habitats, so as to provide reference for the quality control of *P. cocos*. METHODS: Using 36 batches of *P. cocos* from different habitats as samples, HPLC method was used for content determination of dehydrotomorphonic acid, polyporphinic acid C, 3-epidehydrotomorphonic acid, 3-O-acetyl-16 $\alpha$ -hydroxy-hydrogenolysaccharic acid, dehydrotomorphonic acid, pachymic acid and dehydrotrametenolic acid. The column was performed on Thermo Acclaim 120 C<sub>18</sub> with mobile phase consisted of acetonitrile-phosphoric acid water (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm. The column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20  $\mu$ L. SPSS 21.0 statistical software was used for cluster analysis of 36 batches of *P. cocos* from different habitats. RESULTS: The linearity of 7 triterpenoids was good in the range of their mass concentration (all  $r \geq 0.999 0$ ); average recoveries were 96.74%-104.04% (RSD=0.54%-1.55%,  $n=6$ ). RSDs of precision, and reproducibility stability (24 h) tests were all lower than 3.0% ( $n=6$ ). RSD of durability test was lower than 5.0% ( $n=2$ ). There were some differences in the single content of 7 indicator components among samples from different habitats, but the total content difference was not obvious (the total content of most samples was in the range of 1.3-1.9 mg/g). After cluster analysis, 36 batches of sample were clustered into 5 categories, i.e. S27 was clustered into class I; S30 and S34 were clustered into class II; S2, S8 and S9 were clustered into class III; S10, S11, S12 and S14 were clustered into class IV; and the remaining 26 batches of samples were clustered into class V. CONCLUSIONS: The method is simple, and has good precision, repeatability and durability. It can be used for the simultaneous determination of above 7 components in *P. cocos*. There has no significant difference in the quality of *P. cocos* from different habitats. The content of *P. cocos* in most producing areas is uniform in content and stable in quality, only a few of them are different.

<sup>△</sup> 基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1703000);湖北省技术创新专项(No.2019ACA121)

\* 副研究员。研究方向:中药制剂及质量控制。E-mail: 15827273808@139.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:中药制剂及其物质基础。E-mail: chenshuhe606@163.com

**KEYWORDS** *Poria cocos*; Triterpenoids; HPLC; Content determination; Cluster analysis

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos* (Schw.) Wolf] 的干燥菌核,始载于《神农本草经》,列为上品,其

味甘、淡,性平,具有健脾补中、养心安神、利水渗湿的功效,主要用于水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠等症<sup>[1-2]</sup>。茯苓中主要有效成分为多糖类和三萜类<sup>[3]</sup>。在三萜类化合物中,去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸含量较高,且具有抗癌、利尿、神经伸展促进、免疫抑制、抗炎等药理活性<sup>[4-6]</sup>。

目前,茯苓中三萜类成分的含量测定方法有比色法和高效液相色谱(HPLC)法,但由于比色法的自身局限性,所以更多的是采用HPLC法进行测定。以往采用HPLC法进行多成分测定的研究中,一般是考虑茯苓中含量较高或易得的三萜类成分,最多的测了6种三萜类成分<sup>[7-11]</sup>。近期,田双双等<sup>[12]</sup>同时测定了茯苓中10种三萜类成分的含量,其中平均含量大于万分之一的仅有5种。本研究以不同产地(湖北、安徽、云南、贵州等)的茯苓为样品,采用HPLC法同时测定其中含量大于万分之一且具有显著药理活性的7种三萜类化学成分(去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸)的含量,并比较不同产地茯苓药材中上述成分的差异性,为茯苓药材的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

U3000型HPLC仪[戴安(上海)分析仪器有限公司];Chromleon色谱工作站、FA604C型万分之一分析天平(美国OHAUS公司);DV215CD型十万分之一分析天平(瑞士Pricisa公司);JP-04OST型超声提取机(昆山市超声仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

36批茯苓药材分别采自湖北、云南、安徽、贵州等地,经湖北省中医院/湖北省中医药研究院药事部陈树和主任药师鉴定均为多孔菌科真菌茯苓[*P. cocos* (Schw.) Wolf]的干燥菌核;去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸对照品均为本实验室自制(批号均为20191021),经峰面积归一化法计算得上述对照品的质量分数均大于98%;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。36批茯苓样品信息详见表1(注:表中“打引巴”为茯苓在覆土下窖栽培时加一块鲜菌核于段木上,起到了菌丝诱引生长作用,也称肉引栽培)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Acclaim 120 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水(B),梯度洗脱(0~7 min, 65% A; 7~25 min, 68% A; 25~27 min, 70% A; 27~45 min, 76% A; 45~56 min, 80% A; 56~62 min,

100% A);流速:1 mL/min,柱温:30  $^{\circ}$ C;检测波长:210 nm;进样量:20  $\mu$ L。

表1 36批茯苓样品信息

Tab 1 Information of 36 batches of *P. cocos*

编号	产地	批号
S1	云南永仁县猛虎乡I	201711
S2	云南永仁县猛虎乡II	201811
S3	湖北罗田县九资河镇	201711
S4	湖北恩施州利川市	201803
S5	云南保山市腾冲县团田乡	201711
S6	云南普洱市宁洱镇I	201807
S7	云南普洱市宁洱镇II(阴干)	201807
S8	贵州凯里市碧浪镇I	201807
S9	贵州凯里市碧浪镇II(阴干)	201807
S10	云南永仁县猛虎乡III(阴干)	201811
S11	贵州铜仁市德江县I	201808
S12	贵州铜仁市德江县II	201808
S13	湖北黄冈市麻城市	201709
S14	安徽安庆市岳西县	201711
S15	云南楚雄市大地基乡	201804
S16	云南大理永平县	201711
S17	云南丽江永胜镇	201804
S18	云南景谷傣族自治县	201804
S19	云南保山市腾冲市	201804
S20	广西玉林市岑溪镇	201807
S21	湖北罗田县九资河镇I(打引巴)	201811
S22	湖北英山县石头咀镇	201811
S23	湖北英山县雷店镇I(打引巴)	201811
S24	湖北罗田县九资河镇II(未打引巴)	201811
S25	湖北麻城市木子店镇	201811
S26	湖北英山县雷店镇II(未打引巴)	201811
S27	湖北英山县石头咀元量村	201811
S28	湖北麻城市木子店镇双冲村	201811
S29	湖北罗田县九资河罗家畈村	201811
S30	湖北英山县石头咀镇(代料栽培品)	201810
S31	湖北英山县吉利公司种植基地	201811
S32	安徽岳西白辐镇	201812
S33	云南楚雄双柏县	201812
S34	云南普洱孟连县	201812
S35	云南保山市腾冲县(未打引巴)	201812
S36	云南保山市腾冲县(打引巴)	201812

### 2.2 溶液的制备

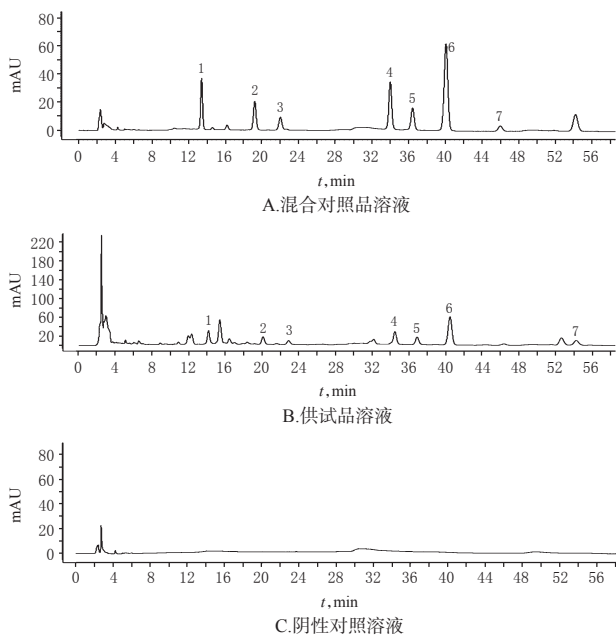
2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取一定量的去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸对照品,分别置于不同25 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,制备各单一对照品母液。分别取一定量的各对照品母液置于同一10 mL量瓶中,加甲醇稀释制成去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸质量浓度分别为0.040 4、0.040 6、0.029 7、0.014 6、0.020 4、0.126 8、0.019 4 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取茯苓细粉(过80目,下同)2 g,置于50 mL锥形瓶中,加入甲醇10 mL,称定质量,摇匀,超声(频率:40 kHz,功率:500 W)提取30 min,静置15 min后再次称定质量,用甲醇补足减失的质

量,摇匀,以0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 取阴性对照溶液(即甲醇溶液)、混合对照品溶液、供试品溶液(样品编号:S26),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,7种待测成分与各自相邻峰间的分离度均大于1.5,理论板数均大于10 000,色谱峰对称因子在0.95~1.05之间,且阴性对照无干扰,结果见图1。



注:1.去氢土莫酸;2.猪苓酸C;3.3-表去氢土莫酸;4.3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸;5.去氢茯苓酸;6.茯苓酸;7.松苓新酸

Note: 1. dehydrotomorphiac acid; 2. polyporhinic acid C; 3. 3-epidehydrotomorphiac acid; 4. 3-O-acetyl-16α-hydroxy-hydrogenolysaccharic acid; 5. dehydrotomorphiac acid; 6. pachymic acid; 7. dehydrotrametenolic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液10、18、20、25、30、50 μL,分别按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、进样量为横坐标(x, μg)进行线性回归。结果表明,各成分在各自进样量范围内与其峰面积均呈良好的线性关系(r均不低于0.999 0)。7种三萜酸类成分的回归方程与线性范围测定结果见表2。

2.3.3 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,以甲醇倍比稀释后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸的定量限分别为0.282 8、0.284 2、0.237 6、0.102 2、0.142 8、0.152 2、0.116 4 μg,检测限分别为0.080 8、0.081 2、0.089 1、0.029 2、0.040 8、0.050 7、0.038 8 μg。

表2 7种三萜类成分的回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range of 7 kinds of triterpenoids

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
去氢土莫酸	$y=6.567 4x+1.030 5$	0.999 3	0.40~2.01
猪苓酸C	$y=6.896 5x+0.691 7$	0.999 2	0.40~2.03
3-表去氢土莫酸	$y=5.474 5x+0.330 8$	0.999 3	0.29~1.48
3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸	$y=12.54 9x+0.424 5$	0.999 3	0.14~0.72
去氢茯苓酸	$y=3.328 8x+0.224 4$	0.999 0	0.20~1.02
茯苓酸	$y=9.310 1x+3.040 8$	0.999 2	1.20~6.34
松苓新酸	$y=8.421 7x+0.368 4$	0.999 1	0.19~0.97

2.3.4 精密性试验 取供试品溶液(样品编号:S26)适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,连续测定6次,记录峰面积。结果显示,去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸峰面积的RSD分别为1.60%、1.72%、0.42%、1.70%、1.64%、1.61%、1.52%(n=6),表明仪器精密性良好。

2.3.5 重复性试验 称取茯苓细粉(样品编号:S26)2 g,平行6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并以外标法计算各成分的含量。结果显示,去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸含量的RSD分别为0.72%、0.72%、1.29%、1.31%、0.97%、0.64%、0.56%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(样品编号:S26),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,去氢土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、松苓新酸峰面积的RSD分别为1.81%、1.97%、1.93%、1.35%、2.03%、0.64%、0.62%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的茯苓细粉(样品编号:S26)1 g,平行6份,按与已知成分含量1:1(m/m)的比例精密加入相应对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算各成分的含量并计算加样回收率。结果显示,茯苓中7种待测成分的平均加样回收率为96.74%~104.04%,RSD为0.54%~1.55%(n=6),表明本方法准确度较好。加样回收率试验结果见表3。

2.3.8 耐用性考察 在固定其他色谱条件不变的情况下,分别考察不同型号色谱柱[Thermo Acclaim 120 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Sepax GP-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agela Innoval C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]和不同柱温(30、35℃)对7种成分含量测定的影响。试验重复2次,取平均值。结果显示,在不同色谱柱或不同温度下测得的7种成分含量无明显差异,RSD均小于

5.0% ( $n=2$ ),表明本方法的耐用性较好。耐用性试验结果见表4。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )  
Tab 3 Results of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	称样量, g	样品中含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
去氢土莫酸	1.000 2	0.274 0	0.282 5	0.565 7	103.26	104.04	0.56
	1.000 5	0.274 0	0.282 5	0.566 4	103.50		
	1.000 4	0.274 0	0.282 5	0.568 1	104.11		
	1.000 5	0.274 0	0.282 5	0.568 4	104.21		
	1.000 3	0.274 0	0.282 5	0.570 2	104.85		
	1.000 4	0.274 0	0.282 5	0.568 7	104.32		
猪苓酸C	1.000 2	0.176 6	0.162 4	0.338 6	99.75	96.74	1.55
	1.000 5	0.176 6	0.162 4	0.332 6	96.06		
	1.000 4	0.176 6	0.162 4	0.333 4	96.55		
	1.000 5	0.176 6	0.162 4	0.332 4	95.94		
	1.000 3	0.176 6	0.162 4	0.332 8	96.18		
	1.000 4	0.176 6	0.162 4	0.332 4	95.94		
3-表去氢土莫酸	1.000 2	0.126 5	0.118 7	0.248 1	102.44	102.71	0.75
	1.000 5	0.126 5	0.118 7	0.247 4	101.85		
	1.000 4	0.126 5	0.118 7	0.250 1	104.13		
	1.000 5	0.126 5	0.118 7	0.248 5	102.78		
	1.000 3	0.126 5	0.118 7	0.248 0	102.36		
	1.000 4	0.126 5	0.118 7	0.248 4	102.70		
3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基- 氢化松苓酸	1.000 2	0.199 0	0.204 1	0.401 7	99.31	99.93	0.54
	1.000 5	0.199 0	0.204 1	0.401 6	99.27		
	1.000 4	0.199 0	0.204 1	0.403 2	100.05		
	1.000 5	0.199 0	0.204 1	0.403 4	100.15		
	1.000 3	0.199 0	0.204 1	0.404 5	100.69		
	1.000 4	0.199 0	0.204 1	0.403 3	100.10		
去氢茯苓酸	1.000 2	0.221 0	0.245 0	0.469 9	101.59	102.39	0.57
	1.000 5	0.221 0	0.245 0	0.470 7	101.92		
	1.000 4	0.221 0	0.245 0	0.472 1	102.49		
	1.000 5	0.221 0	0.245 0	0.471 8	102.37		
	1.000 3	0.221 0	0.245 0	0.473 9	103.22		
	1.000 4	0.221 0	0.245 0	0.472 8	102.78		
茯苓酸	1.000 2	0.643 5	0.676 5	1.332 3	101.82	102.10	1.31
	1.000 5	0.643 5	0.676 5	1.334 9	102.20		
	1.000 4	0.643 5	0.676 5	1.338 6	102.75		
	1.000 5	0.643 5	0.676 5	1.339 8	102.93		
	1.000 3	0.643 5	0.676 5	1.342 5	103.33		
	1.000 4	0.643 5	0.676 5	1.317 3	99.60		
松苓新酸	1.000 2	0.122 3	0.116 4	0.241 0	101.98	102.86	1.26
	1.000 5	0.122 3	0.116 4	0.240 6	101.63		
	1.000 4	0.122 3	0.116 4	0.244 7	105.15		
	1.000 5	0.122 3	0.116 4	0.242 5	103.26		
	1.000 3	0.122 3	0.116 4	0.241 1	102.06		
	1.000 4	0.122 3	0.116 4	0.242 3	103.09		

## 2.4 样品含量测定

取36批不同产地茯苓药材粉末,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以外标法计算样品中7种成分的含量,结果见表5。

结果显示,36批茯苓样品中7种三萜类成分的总含量在0.887 7~2.519 0 mg/g之间,多数样品中总含量分布在1.3~1.9 mg/g范围内。若以7个成分总含量的平均值(1.740 1 mg/g)下浮20%计,含量为1.392 1 mg/g,共

表4 耐用性试验结果( $n=2$ , mg/g)

Tab 4 Results of durability tests( $n=2$ , mg/g)

考察项目	去氢土 莫酸	猪苓酸C	3-表去氢 土莫酸	3-O-乙酰基-16 $\alpha$ - 羟基-氢化松苓酸	去氢茯 苓酸	茯苓酸	松苓 新酸
色谱柱							
Thermo Acclaim 120 C <sub>18</sub>	0.274 0	0.176 6	0.126 5	0.199 0	0.221 0	0.643 5	0.122 3
Speax GP-C <sub>18</sub>	0.279 4	0.179 3	0.119 3	0.206 1	0.225 4	0.642 5	0.124 0
Agela Venusil C <sub>18</sub>	0.280 0	0.177 2	0.118 2	0.203 6	0.223 2	0.639 3	0.123 2
RSD, %	1.19	0.78	3.70	1.77	0.98	0.34	0.68
柱温							
30 °C	0.274 0	0.176 6	0.126 5	0.199 0	0.221 0	0.643 5	0.122 3
35 °C	0.275 4	0.174 5	0.121 8	0.201 1	0.222 3	0.644 5	0.122 3
RSD, %	0.37	0.85	2.71	0.73	0.42	0.11	0.01

有31批样品满足要求,占样品量的86.1%;若以样品数的90%合格计,则总含量为1.304 3 mg/g,共有32个样品满足要求。以上结果说明,各产区茯苓中7种成分含量测定值相对集中,比较稳定,总体差异不明显。

## 2.5 聚类分析

将36批茯苓样品中7种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均欧氏距离( $d$ )进行分析,生成36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2。以 $d=14$ 划分,36批样品共聚为5类:样品S27单独聚为第I类,来自湖北英山;样品S30、S34聚为第II类,分别来自湖北英山(代料栽培品)和云南普洱;样品S2、S8、S9聚为第III类,分别来自云南永仁县孟虎乡(S2)、贵州凯里市碧浪镇(S8、S9);样品S10、S11、S12、S14聚为第IV类,分别来自云南永仁县孟虎乡(S10)、贵州铜仁市德江县(S11、S12)、安徽安庆市岳西县(S14);其余26批样品聚为第V类,均来自湖北、云南广西等多个产地。其中,第I类样品中各个成分的含量均相对较高,第I~III类样品中7种成分总含量均大于2.00 mg/g,第IV类样品中各成分含量均较低,第V类样品中总含量在1.47~2.18 mg/g之间。由此可知,仅湖北、云南、贵州地区部分茯苓药材中7种成分含量相对较高,且26批来自湖北、云南、广西、安徽等地的样品均聚为一大类,表明大部分产区产出的茯苓药材含量均一、质量稳定,仅少量存在差异。

## 3 讨论

### 3.1 供试品提取时间和色谱条件的筛选

在前期研究中,本课题组考察了供试品超声提取时间(15、20、30、40 min)对提取效果的影响。结果显示,以甲醇为提取溶剂超声提取30 min后,样品中7种三萜类成分的含量最高。在波长的选择上,本课题组根据7种待测成分的吸收波长特点<sup>[13-14]</sup>,分别考察了在210、240 nm波长下的检测效果。结果发现,在210 nm波长下7种三萜类成分均有最大吸收,在240 nm波长下茯苓酸无吸收,故最终选择210 nm为测定波长。在流动相选择上,本课题组分别考察了乙腈-磷酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液的分选效果。结果发现,以乙腈-0.05%磷酸水溶液

为流动相时,各待测成分与相邻峰之间分离度好,峰形尖锐、对称性好,理论板数均大于10 000,符合含量测定的分离要求。

表5 36批不同产地茯苓药材中7种三萜类成分的含量测定结果(mg/g,以干燥品计)

Tab 5 Results of content determination of 7 kinds of triterpenoids in 36 batches of *P. cocos* from different habitats (mg/g, calculated by dried products)

样品编号	去氢土莫酸	猪苓酸C	3-表去氢土莫酸	3-O-乙酰基-16 $\alpha$ -羟基-氢化松苓酸	去氢茯苓酸	茯苓酸	松苓新酸	总含量
S1	0.210 8	0.144 3	0.139 4	0.078 0	0.212 3	0.602 8	0.083 8	1.471 4
S2	0.494 4	0.093 2	0.089 5	0.185 2	0.273 1	0.838 8	0.068 2	2.042 4
S3	0.357 0	0.132 7	0.132 9	0.104 8	0.187 5	0.494 6	0.067 1	1.476 6
S4	0.160 4	0.111 6	0.135 3	0.123 9	0.226 9	0.665 4	0.048 3	1.471 8
S5	0.276 0	0.178 7	0.204 7	0.216 8	0.277 9	0.767 8	0.063 5	1.985 4
S6	0.204 8	0.126 0	0.155 1	0.120 0	0.214 6	0.620 8	0.058 3	1.499 6
S7	0.179 7	0.117 7	0.130 4	0.119 5	0.215 9	0.619 7	0.119 8	1.502 7
S8	0.455 5	0.103 5	0.089 8	0.219 6	0.256 6	0.835 2	0.073 4	2.033 6
S9	0.719 0	0.149 0	0.098 5	0.302 6	0.290 4	1.031 5	0.101 0	2.692 0
S10	0.139 9	0.105 3	0.087 6	0.037 6	0.137 0	0.353 6	0.026 7	0.887 7
S11	0.184 2	0.073 0	0.086 3	0.058 9	0.240 5	0.509 4	0.080 0	1.232 3
S12	0.184 0	0.073 1	0.086 8	0.058 8	0.240 7	0.509 6	0.080 4	1.233 4
S13	0.183 4	0.157 6	0.135 1	0.187 7	0.218 4	0.776 9	0.105 2	1.764 3
S14	0.370 6	0.112 2	0.092 9	0.067 0	0.232 3	0.507 7	0.023 9	1.406 6
S15	0.201 5	0.140 9	0.145 8	0.137 5	0.245 5	0.634 8	0.050 4	1.556 4
S16	0.155 8	0.127 7	0.134 2	0.190 7	0.248 4	0.710 1	0.063 9	1.630 8
S17	0.181 1	0.139 7	0.149 3	0.214 5	0.264 7	0.770 4	0.061 0	1.780 7
S18	0.197 7	0.118 1	0.125 7	0.089 1	0.178 1	0.519 2	0.076 4	1.304 3
S19	0.184 9	0.157 5	0.158 0	0.112 2	0.291 6	0.792 4	0.018 1	1.714 7
S20	0.246 8	0.130 5	0.133 0	0.108 2	0.204 8	0.583 4	0.106 0	1.512 7
S21	0.297 0	0.158 9	0.145 8	0.248 8	0.228 6	0.588 6	0.119 8	1.787 5
S22	0.338 7	0.218 3	0.156 4	0.246 0	0.273 1	0.795 4	0.151 2	2.179 1
S23	0.247 2	0.139 8	0.127 5	0.148 6	0.205 4	0.593 0	0.077 9	1.539 4
S24	0.264 5	0.148 9	0.142 4	0.118 7	0.218 3	0.596 2	0.075 5	1.564 5
S25	0.194 4	0.117 9	0.125 9	0.113 1	0.180 6	0.526 6	0.038 5	1.297 0
S26	0.273 4	0.175 3	0.125 5	0.198 8	0.222 3	0.643 6	0.122 0	1.638 7
S27	0.272 1	0.264 1	0.218 3	0.304 6	0.292 5	0.946 1	0.105 4	2.403 1
S28	0.215 1	0.135 1	0.174 5	0.218 2	0.337 2	0.915 8	0.063 1	2.059 0
S29	0.531 6	0.167 5	0.126 8	0.109 1	0.263 0	0.582 7	0.055 6	1.836 3
S30	0.561 6	0.167 3	0.180 8	0.184 3	0.432 9	0.862 5	0.055 8	2.445 2
S31	0.214 5	0.232 8	0.185 2	0.241 7	0.241 4	0.749 4	0.142 7	2.007 7
S32	0.429 5	0.189 5	0.151 4	0.139 2	0.273 2	0.709 9	0.056 7	1.949 4
S33	0.213 5	0.106 5	0.133 2	0.135 5	0.216 3	0.549 3	0.107 1	1.461 4
S34	0.293 3	0.155 1	0.163 1	0.314 0	0.427 7	1.072 4	0.093 4	2.519 0
S35	0.377 9	0.148 3	0.145 0	0.182 3	0.279 7	0.709 5	0.137 7	1.980 4
S36	0.283 7	0.149 5	0.183 0	0.152 1	0.268 4	0.693 9	0.049 1	1.779 7
平均值	0.285 9	0.143 1	0.139 1	0.159 1	0.249 9	0.683 2	0.079 6	1.740 1

### 3.2 不同产地茯苓中7种三萜类成分含量的差异分析

不同产地36批茯苓药材中7种三萜类成分含量测定的直观分析结果显示,大多数茯苓样品含量较均一,无明显地域上的差异,这可能是由于茯苓作为菌类药材不同于植物药材,其对不同土壤、气候等自然条件有着较强的耐受性。聚类分析结果显示,除少数湖北、云南及贵州产样品中7种成分总含量较高之外,其余有26批样品均聚为一大类,以湖北、安徽大别山、云南等地为主要

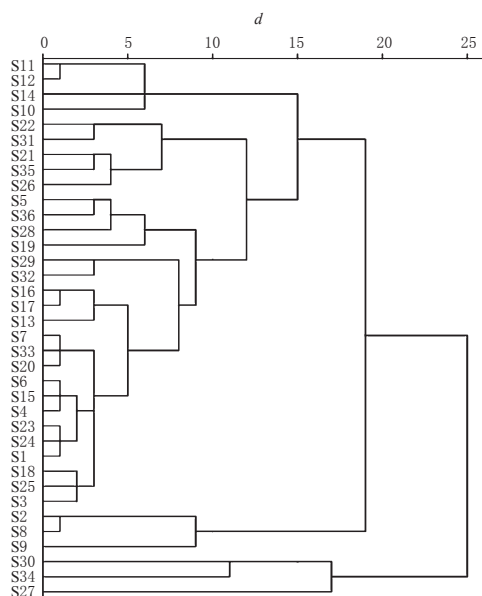


图2 36批不同产地茯苓药材的聚类分析树状图

Fig 2 Cluster analysis diagram of 36 batches of *P. cocos* from different habitats

类别,产区之间的差异亦不明显。根据调查及现有的报道,目前茯苓栽培产区分布比较广,虽各产区的土壤、海拔、气候、种植加工方式等有一定差异,但茯苓作为菌类药材体现了其良好的生长适应性,质量相对稳定<sup>[15-19]</sup>。本研究结果亦表明,主产区茯苓药材样品间7种三萜类成分含量差异不明显,品质均一,提示在一定程度上可扩大临床使用茯苓的供应产区范围,这为解决药材供需矛盾起到了积极作用。

综上所述,本研究建立了HPLC法同时测定茯苓药材中7种三萜类成分的含量,该方法操作简单,精密度、重复性和耐用性均良好,适用于茯苓药材的多成分定量分析。本次对36批不同产地样品进行含量测定及分析发现,以湖北、云南、贵州地区产部分茯苓的含量相对较高,但不同产地间样品差异不显著、质量较稳定。后期有必要继续扩大样本量,以全面掌握茯苓药材的品质。

### 参考文献

- [1] 张年,李兆星,李娟,等.茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J].世界科学技术:中医药现代化,2019,21(2):220-233.
- [2] 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.
- [3] 文跃强,彭腾,贾波,等.茯苓有效成分的药理学研究概况[J].新疆中医药,2007,25(增刊):173-175.
- [4] 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.
- [5] 李桂芹,吴晓锋,唐万侠,等.茯苓化学成分及生理活性研究[J].齐齐哈尔大学学报,2015,31(4):50-54.

# 复方小儿退热栓的质量标准提高研究<sup>Δ</sup>

谢思敏<sup>1\*</sup>, 陈家仪<sup>1</sup>, 汤迎湛<sup>2</sup>, 顾利红<sup>1#</sup>, 栗建明<sup>1</sup>, 侯惠婵<sup>1</sup>(1.广州市药品检验所/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广州 510160; 2.广州白云山敬修堂药业股份有限公司, 广州 510130)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2106-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.11

**摘要** 目的:提高复方小儿退热栓的药品质量标准。方法:在原质量标准的基础上,建立处方中人工牛黄和南板蓝根的薄层色谱(TLC)鉴定方法;建立胆酸、猪去氧胆酸、对乙酰氨基酚含量测定的高效液相色谱(HPLC)法。结果:复方小儿退热栓中人工牛黄和南板蓝根 TLC 图谱均与相应的对照品或对照药材在相同位置上显现相同颜色的斑点,且相应的阴性样品无干扰。HPLC 法采用色谱柱分别为 Welch Xtimate C<sub>18</sub>柱(胆酸、猪去氧胆酸)、Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(对乙酰氨基酚);流动相分别为乙腈-0.5%甲酸溶液(梯度洗脱,胆酸、猪去氧胆酸)、甲醇-水溶液(20:80, V/V, 对乙酰氨基酚);流速为 1.0 mL/min;蒸发光散射检测器的漂移管温度为 105 ℃,载气流速为 2.0 L/min(胆酸、猪去氧胆酸);紫外检测波长为 244 nm(对乙酰氨基酚)。胆酸、猪去氧胆酸、对乙酰氨基酚进样量分别在 0.150 0~4.500 0、0.212 5~6.375 0、0.081 9~1.638 5 μg 范围内线性关系良好( $r$ 均大于 0.999 2);精密性、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3% ( $n=6$  或  $n=7$ );平均加样回收率分别为 100.35%、101.39%、98.81%, RSD 均小于 3% ( $n=6$ )。结论:本研究在复方小儿退热栓原质量标准的基础上,增加了人工牛黄和南板蓝根的 TLC 鉴别方法,并采用 HPLC 法测定胆酸、猪去氧胆酸、对乙酰氨基酚的含量,能有效地提高该制剂的质量控制标准。

**关键词** 复方小儿退热栓;薄层色谱;高效液相色谱法;鉴别;含量测定;质量标准

## Study on Quality Standard Improvement for Compound Child Antifebrile Suppository

XIE Simin<sup>1</sup>, CHEN Jiayi<sup>1</sup>, TANG Yingzhan<sup>2</sup>, GU Lihong<sup>1</sup>, LI Jianming<sup>1</sup>, HOU Huichan<sup>1</sup>(1. Guangzhou Institute for Drug Control/Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine, National Medical Products Administration, Guangzhou 510160, China; 2. Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510130, China)

- [6] XU H, WANG Y, JURUTKA PW, et al. 16 $\alpha$ -hydroxy-trametenolic acid from *Poria cocos* improves intestinal barrier function through the glucocorticoid receptor mediated PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(39):10871-10879.
- [7] 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):494-497.
- [8] 沈玉萍, 杨欢, 陈斌, 等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(5):388-390.
- [9] 张靓琦, 贾英, 罗洁, 等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(13):1081-1083.
- [10] 董远文. 茯苓中三萜的分离纯化及含量测定研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2014.
- [11] 彭灿, 余生兰, 张静, 等. HPLC 同时测定茯苓中 4 种三萜酸的含量[J]. *中药材*, 2017, 40(7):1643-1646.
- [12] 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, 47(9):1371-1380.
- [13] 韩小娟, 罗建光, 陆园园, 等. HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>法鉴定茯苓中的三萜成分[J]. *药学与临床研究*, 2009, 17(4):290-293.
- [14] 刘校妃, 李健康, 唐怡, 等. 茯苓中去氢土莫酸和茯苓酸含量的高效液相色谱波长切换法同时测定[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(3):516-518.
- [15] 王坤凤. 茯苓化学成分及质量控制方法研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [16] 咎俊峰. 茯苓三萜类成分抗肿瘤活性研究与茯苓药材质量分析[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2012.
- [17] 於小波, 咎俊峰, 王金波, 等. 我国茯苓药材主要产区资源调查[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(3):714-716.
- [18] 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.
- [19] 蔡丹凤, 陈丹红. 松茸栽培茯苓主要营养成分的累积特性[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1):373-375.

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题(No.2019Z028)

\* 主管中药师, 硕士。研究方向:药品质量检验。电话:020-26282338。E-mail:798447372@qq.com

# 通信作者:主任中药师, 硕士。研究方向:中药质量标准。电话:020-26283696。E-mail:scjgj-Gulh@gz.gov.cn

(收稿日期:2020-03-12 修回日期:2020-06-16)

(编辑:林 静)