

20 个产地茯苓三萜成分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱

咎俊峰¹,徐斌¹,刘军锋¹,苏玮²,王克勤²,刘焱文^{1*}

(1. 湖北中医药大学中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室,武汉 430061;
2. 湖北省中医药研究院,武汉 430073)

[摘要] 目的:利用 RP-HPLC-ELSD 技术建立不同产地茯苓三萜的指纹图谱,为评价不同产地的茯苓药材的质量品质提供理论依据。方法:色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.2% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),采用梯度洗脱法,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,蒸发光检测条件:雾化温度 40 ℃,压力 350 kPa, gain 值为 7;进样量 20 μL。结果:建立的指纹图谱中有 18 个共有峰,方法学考查表明,各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 均 < 3%,峰面积占总峰面积 > 10% 的共有峰其相对峰面积差值均在 ±25% 以内,符合指数图谱的技术要求,仪器的精密度良好,且供试品溶液至少 12 h 内稳定。结论:该方法简便快速、准确可靠,可作为评价不同产地茯苓药材质量的有效手段。

[关键词] 产地;茯苓;三萜;RP-HPLC-ELSD 色谱;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0065-04

[doi] 10.11653/syfy201321065

ELSD-HPLC Fingerprint of Triterpenes in Different Origin Place of *Poria cocos*

ZAN Jun-feng¹, XU Bin¹, LIU Jun-feng¹, SU Wei², WANG Ke-qin², LIU Yan-wen^{1*}

(1. Provincial and the Ministry of Education Key Laboratory of Resource Science and Chinese Herbal Compound in Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;
2. Hubei Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430073, China)

[Abstract] **Objective:** Investigation on RP-HPLC-ELSD fingerprint of triterpenes in *Poria cocos* from different origin place, in order to provide a theory evidence to evaluate the quality of *P. cocos* from different origin place, and improve the quality of *P. cocos*. **Method:** The chromatographic conditions were Kromasil 100-5 C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 0.2% methanoic acid (A) and acetonitrile (B) as gradient mobile phases, flow rate being 1.0 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃, evaporative light-detection conditions: atomization temperature at 40 ℃, pressure of 350 kPa, gain value of 7, and 20 μL sample injection. **Result:** Fingerprint was established with 18 common peaks and methodology reached the required standard. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate, and can be used as an effective means of *P. cocos* quality evaluation of different origin place.

[Key words] origin place; *Poria cocos*; triterpenes; ELSD-RP-HPLC; fingerprint

茯苓是多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,收载于 神的功效,主要用于治疗小便不利、水肿、脾胃气虚、
历版《中国药典》,具有渗湿利尿、和胃健脾、宁心安 食少便溏、体倦乏力及心神不宁、惊悸、失眠等

[收稿日期] 20130322(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30970295);湖北省教育厅青年基金项目(鄂教 Q20091606)

[第一作者] 咎俊峰,博士,讲师,从事中药及复方的物质基础研究,Tel:18986095641,E-mail:junfengzan@163.com

[通讯作者] *刘焱文,学士,教授/博导,从事中药及复方的物质基础研究,Tel:15327285560,E-mail:ywliu2008@163.com

症^[1]。现代药理研究表明,茯苓具有抗肿瘤、调节免疫功能、抗炎、抗过敏等方面的生物活性^[2]。我国茯苓资源分布广泛,主要来源于湖北、安徽、云南、四川、广西、福建、贵州等省区,浙江、陕西、河南、广东等省区亦有栽培资源^[3-4]。茯苓是药食两用的传统中药大品种,是诸多中药方剂和中成药配伍组方的重要中药,有“十药九茯苓”之说,并大量出口国外^[5]。因此,有效控制茯苓药材的质量对于防治疾病和保健作用具有重要意义。

茯苓中多糖和三萜类成分是其活性物质^[6],茯苓三萜具有较强的抗癌和调节免疫作用。本实验室前期研究表明,茯苓药材的 95% 乙醇溶液提取物通过乙酸乙酯萃取,其具有调节免疫功能的物质即为茯苓三萜类成分。因此,本研究采用 RP-ELSD-HPLC,对全国各地收集的 20 个产地茯苓药材中茯苓三萜类成分的指纹图谱进行了比较研究,旨在为不同产地茯苓药材的质量评价提供依据。

1 材料

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1322A 排气阀、G1311A 泵、G1316A 柱温箱、G1314A 紫外检测器、35900E 转换器、Sedex75 蒸发光散射检测器(法国 Sedere 公司)、Agilent 色谱工作站;SZ-93A 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司),甲酸为分析纯,制样所用试剂均为分析纯。

共有峰归属所用对照品均为本实验室自制,经波谱学鉴定和色谱法检测其质量分数均 >98%。试验用不同产地茯苓药材由湖北省中医药研究院从全国各地采集,经湖北省中医药研究院王克勤教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 45% B; 10~30 min, 45%~50% B; 30~45 min, 50%~60% B; 45~55 min, 60%~75% B; 55~65 min, 75%~82% B; 65~90 min, 82% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃。蒸发光检测条件:雾化温度 40℃,压力 350 kPa, gain 值为 7,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取土莫酸、猪苓酸 C、去氢茯苓酸、3-氢化去氢松苓酸、茯苓酸、3β-羟基-羊毛甾-7, 9(11), 24-三烯-21-酸,去氢依布利酸对照品粉末各 1.0 mg,置 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释

至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取各个产地茯苓粉末 5 g,置具塞锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇,室温放置 30 min,超声提取 2 次,每次超声 60 min;滤过,合并 2 次滤液,减压回收溶剂,残渣加水 20 mL 分散(超声),分别加入乙酸乙酯 20 mL 萃取 3 次,合并上层溶液,减压回收溶剂;残留物加甲醇溶解,转移至 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度和样品稳定性试验 取供试品溶液按上述色谱条件,连续进样 6 次,考察色谱峰保留时间和峰面积的一致性,各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 均 <3%,峰面积占总峰面积 >10% 的共有峰,其相对峰面积的差值均 ≤25%,符合指纹图谱的技术要求,表明仪器的精密度良好。由于样品每 1 次测定需要运行 90 min 以上,稳定性可以和精密度同时考察,结果表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.4.2 重复性试验 取茯苓 18 号样品 6 份,精密称定,分别按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样测定。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD 均 <3%,峰面积占总峰面积 10% 以上的共有峰,其相对峰面积的差值均在 ±25% 以内,符合指纹图谱的技术要求。表明方法的重复性好,结果见图 1。

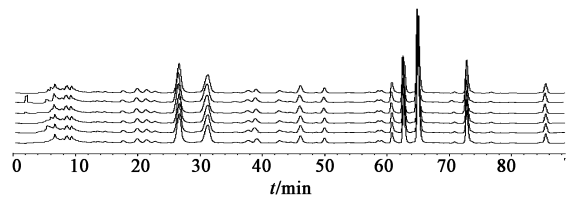


图 1 茯苓 18 号样品重复性试验

2.5 指纹图谱的建立及共有峰的标定 根据 20 个产地茯苓药材供试品溶液 HPLC 图提供的相关参数,建立茯苓药材三萜类成分的指纹图谱(图 2)。比较 20 批茯苓样品的色谱图,确定了 18 个共有峰。其中 13 号峰峰面积较大,经对照品比对归属为去氢茯苓酸,且不同批次样品中稳定存在,故选其为参照峰,其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均通过 13 号峰比对获得。结果显示,各个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 <3.0%;各个共有峰的相对峰面积的 RSD 有很大差异,以峰 3, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 18 所代表成分最为明显,说明这 8 个色谱峰所代表的成分在各药材样品中的量存在很大差异。

2.6 共有峰的归属 分别吸取各对照品溶液 10 μL ,在上述色谱条件下分别进样,对比样品中各峰相对保留时间,对样品中的共有峰进行归属;同时结合文献资料^[7-10]对共有峰进行归属,结果见图 2,表 1。

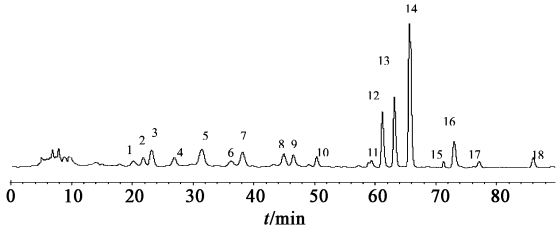


图 2 茯苓代表性 ELSD-HPLC 指纹

表 1 对照品保留时间与峰的归属

对照品	t_R/min	峰号
去氢土莫酸	26.62	4
土莫酸	31.04	5
猪苓酸 C	46.57	9
3-表-去氢土莫酸	50.63	10
3 β -乙酰氧基-16 α -羟基-3-氯化松苓酸	61.22	12
去氢茯苓酸	63.11	13
茯苓酸	65.86	14
3-氯化去氢松苓酸	71.09	15
3 β -羟基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸	73.55	16
去氢依布利酸	86.12	18

2.7 非共有峰面积的比值 计算各样品中非共有峰占总峰面积的比值,结果见表 2。其比值在 3.57% ~ 7.92%,均 < 10%,符合指纹图谱的技术要求。

2.8 相似度评价 采用《中国药典》委员会制定的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,计算 20 批不同产地茯苓的指纹图谱的相似度,结果分别为 0.987, 0.967, 0.975, 0.983, 0.981, 0.863, 0.894, 0.962, 0.905, 0.901, 0.965, 0.985, 0.968, 0.975, 0.920, 0.922, 0.916, 0.939, 0.935, 0.931。结果显示相似度存在一定差异,说明药材质量并不一致。其中广西龙胜、广西凭祥、贵州黎平所产茯苓与其他地区茯苓药材质量差异较大。根据各样品图谱两两之间相似度比较,可将不同样品归类处理。分析不同产地茯苓样品的指纹图谱相似度值,其中 S1, S2, S3, S4, S5, S8, S11, S12, S13, S14 号样品(相似度 > 0.950),即河南周始、浙江景宁、四川西昌、福建永泰、广东新丰、湖南靖州、贵州黄平、及云南样品可归为一类;S6, S7, S10 号样品,即广西和贵州黎平产茯

表 2 不同产地茯苓非共有峰面积比值

No.	样品来源	共有峰面积	总峰面积	非共有峰面积	比例 /%
1	河南固始	38 439.7	40 054.2	1 614.5	4.03
2	浙江景宁	38 456.7	40 418.0	1 961.3	4.85
3	四川西昌	71 226.7	77 352.2	6 125.5	7.92
4	福建永泰	33 185.1	35 010.3	1 825.2	5.21
5	广东新丰	43 534.4	46 668.9	3 134.5	6.72
6	广西龙胜	44 695.2	47 466.3	2 771.1	5.84
7	广西凭祥	48 574.6	52 023.4	3 448.8	6.63
8	湖南靖州	53 968.2	56 612.6	2 644.4	4.67
9	湖南绥宁	36 257.7	38 324.4	2 066.7	5.39
10	贵州黎平	27 904.1	28 936.6	1 032.5	3.57
11	贵州黄平	30 466.6	31 807.1	1 340.5	4.21
12	云南丽江	22 935.4	24 288.6	1 353.2	5.57
13	云南思茅	29 631.0	31 438.5	1 807.5	5.75
14	云南楚雄	27 607.7	28 960.4	1 352.8	4.67
15	安徽岳西	43 741.9	47 285.0	3 543.1	7.49
16	安徽霍山	44 314.6	46 884.8	2 570.2	5.48
17	安徽金寨	41 263.3	43 862.9	2 599.6	5.93
18	湖北罗田	54 388.0	58 684.7	4 296.7	7.32
19	湖北英山	44 420.2	47 351.9	2 931.7	6.19
20	湖北麻城	36 831.5	39 483.4	2 651.9	6.72

苓为一类(相似度低于 0.905); S9, S15, S16, S17, S18, S19, S20 号样品(相似度在 0.906 ~ 0.950),即贵州黄平、安徽和湖北产茯苓为另一类。该结果与药材产地分布呈现一定规律,第一类为我国东南部地区以及西部横断山脉地区,第二类为我国南部云贵高原与南岭部分山区,第三类主要分布在华中地区的大别山区,大致区域分布与纬度存在密切联系。各样品叠加图见图 3。

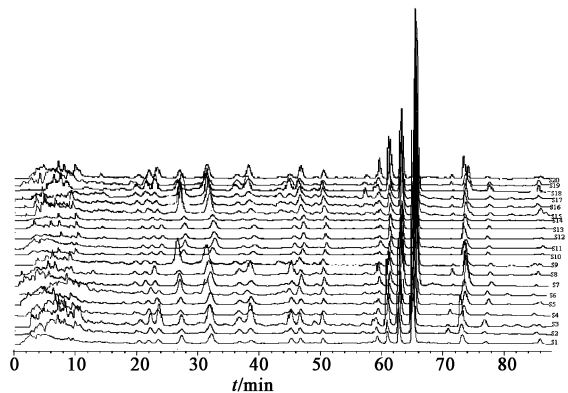


图 3 20 批不同产地茯苓指纹图谱叠加

2.9 各产地茯苓的聚类分析 将不同产地茯苓 HPLC-ELSD 图谱中 18 个共有峰的峰面积值标准化组成 20×18 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 19.0 软件对其进行系统聚类分析,采用组间连接法,利用欧式平方距离(Squared Euclidean)作为样品的测度。根据 20 个样品之间相关系数由大到小的顺序合并,样品中 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S18 可以聚为 I 类, S9, S15, S16, S17, S19, S20 聚为 II 类,该结果与指纹图谱相似度分析结果相近(图 4)。来源相近的样品 S18, S19, S20 (均为湖北大别山地区),相似度评价和聚类分析并不接近,表明除了地域因素外,茯苓受环境、菌株影响导致个体差异。S8 湖南靖州也可以单独的聚为一类,湖南靖州是茯苓生产、加工的主要集散地,不排除当地茯苓菌种比较杂乱。

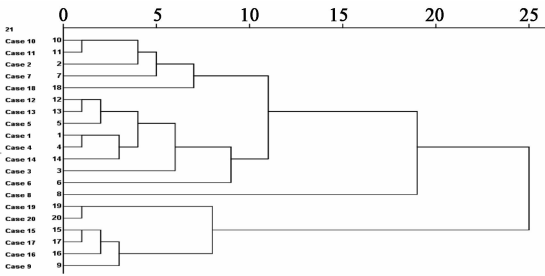


图 4 20 个产地茯苓三萜成分指纹图谱聚类分析

3 讨论

蒸发光散射检测器(ELSD)为质量型检测器,对三萜类成分有很好的专属性,图谱总峰面积可代表总三萜的量。表 2 表明,四川西昌、湖北罗田、湖南靖州和广西凭祥等地所产茯苓,含三萜类成分较高;福建、贵州和云南产茯苓三萜类成分含量较低。该结果与部分文献所报道的云苓品质较优相悖。

本课题组前期研究不同产地茯苓酸的含量表明四川及广西产茯苓中茯苓酸含量较高,其次为安徽和湖北地区^[11],其含量达到 0.25%;而河南、福建、贵州及云南地区产茯苓中含茯苓酸较低,含量 0.2% 左右^[11]。该结果显示茯苓酸的量和总三萜的量具有一致性,因此通过快速测定茯苓酸的量可初步判断药材产地的优劣。该分布存在一定区域性,含量较高的药材主要分布在我国西部横断山脉及中

部大别山区,而南部及东部地区含量较低。

云南产茯苓,在其质量和临床应用等各方面均享有盛誉。分析云南 3 个主产区所产茯苓药材的各项评价指标^[11],未能发现其优势,文献所指“云苓”特指野生茯苓。湖北为茯苓道地药材主产区,年产量超过全国产量的 1/3,种植历史悠久,驰名国内外。本研究结果表明,湖北罗田和英山所产茯苓质量优良。

[参考文献]

[1] 杨树东,包海鹰. 茯苓中三萜类及多糖类成分的研究进展[J]. 菌类研究,2005,3(3):55.
 [2] 胡斌,杨益平,叶阳. 茯苓化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(5):655.
 [3] 傅杰,王克勤,方红,等. 茯苓药源及生栽培现状[J]. 中药研究与信息,2002,4(2):24.
 [4] 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.
 [5] 李俊,韩向晖,李仲洪,等. 茯苓多糖的提取及含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志,2000,17(1):49.
 [6] 张敏,高晓红,孙晓萌,等. 茯苓的药理作用及研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2008,9(1):63.
 [7] 仲兆金,许先栋. 茯苓三萜成分的结构及其衍生物的生物活性[J]. 中国药物化学杂志,1998,8(4):239.
 [8] Nobuyasu Sekiya, Hirozo Goto, Yutaka Shimada, et al. Inhibitory effects of triterpenes isolated from Hoelen on free radical-induced lysis of red blood cells [J]. Phytotherapy Res, 2003, 17(2):160.
 [9] 沈芊,许先栋,顾慧儿. 茯苓三萜成分及其衍生物的结构关系研究[J]. 中国药物化学杂志,1999,9(4):271.
 [10] 于能江,郭继芬,赵毅民,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测-质谱法鉴定茯苓中的三萜成分[J]. 分析化学研究报告,2004,32(7):866.
 [11] 咎俊峰,徐斌,於小波,等. 全国 20 个主要产地茯苓质量分析比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(8):24.

[责任编辑 邹晓翠]