

UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定的天麻饮片质量研究

李 平¹, 郝 敏¹, 苏联麟¹, 季 德¹, 宋 嫵², 秦思睿³, 陆兔林^{1*}, 毛春芹^{1*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 上海华宇药业有限公司, 上海 200002

3. 武汉大学, 湖北 武汉 430000

摘要: **目的** 建立天麻饮片 UPLC 指纹图谱和同时测定天麻饮片中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的超高效液相色谱分析方法。**方法** 采用 Waters Acquity 超高效液相系统, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%甲酸水, 梯度洗脱, 检测波长 270 nm (指纹图谱)、220 nm (含量测定), 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温 35 °C。通过相似度评价、主成分分析、偏最小二乘判别分析对 28 批天麻饮片指纹图谱进行分析, 通过对照品比对对主要共有峰进行指认和含量测定。**结果** 建立了不同产地天麻的指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 并指认了其中 6 个共有峰: 天麻素 (1 号峰)、对羟基苯甲醇 (3 号峰)、对羟基苯甲醛 (7 号峰)、巴利森苷 B (14 号峰)、巴利森苷 C (15 号峰)、巴利森苷 A (18 号峰)。28 批样品相似度均在 0.90 以上, 主成分分析将不同产地天麻分为 5 组, 并发现对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 A 等 6 个差异成分。同一成分在各产地天麻饮片中的含量差异明显, 不同成分的波动范围不同, 各产地 5 种成分总量贵州 (2.52%) > 云南 (2.49%) > 陕西 (2.33%) > 湖北 (2.10%) > 浙江 (1.90%) > 安徽 (1.65%)。**结论** 建立不同产地天麻 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定方法为完善天麻饮片的质量控制提供了参考。

关键词: 天麻; UPLC 指纹图谱; 主成分分析; 天麻素; 对羟基苯甲醇; 对羟基苯甲醛; 巴利森苷 B; 巴利森苷 C; 巴利森苷 A

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5665-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.028

Quality research of *Gastrodiae Rhizoma* with UPLC fingerprint and content determination of multicomponent

LI Ping¹, HAO Min¹, SU Lian-lin¹, JI De¹, SONG Yan², QIN Si-rui³, LU Tu-lin¹, MAO Chun-qin¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Shanghai Huayu Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 200002, China

3. Wuhan University, Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To establish the analysis method of UPLC fingerprint and simultaneous determination of five active components (gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, parishin B, parishin C, and parishin A). **Methods** The analysis was performed on a Waters Acquity with a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column. The gradient mobile phase was acetonitrile and 0.1% formic acid-water solution, flow rate was set at 0.3 mL/min, the injection volume was 0.2 μL and the temperature of column was 35 °C. The detection wavelengths were set at 270 nm (fingerprint), 220 nm (content determination). The 28 batches of samples fingerprint were analyzed by similarity evaluation, principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The identification and content determination of the main common peaks were carried out by comparison with reference. **Results** We set up the common mode of the fingerprint with 20 common peaks, and six of them were identified, which were gastrodin (1), 4-hydroxybenzyl alcohol (3), p-hydroxybenzaldehyde (7), parishin B (14), parishin C (15), and parishin A (18). The similarities among 28 samples were all above 0.90. PCA was used to divide the samples into five groups, and six different substances were found. The content of the same component and the fluctuation range among different components were all different. The content of the five components of each origin was Guizhou 2.52% > Yunnan 2.49% > Shaanxi 2.33% > Hubei 2.10% > Zhejiang 1.90% > Anhui 1.65%.

收稿日期: 2018-06-02

基金项目: 国家中药标准化项目“天麻等 6 种中药饮片标准化建设”(ZYY-2017-137)

作者简介: 李 平, 女, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 18305172703 E-mail: lilian199311@outlook.com

*通信作者 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: (025)85811835 E-mail: lutuling2005@126.com
毛春芹, 高级实验师, 主要从事新药研发及药物制剂研究。E-mail: mcq63@163.com

Conclusion The establishment of UPLC fingerprint and simultaneous determination of five active components provide a reference for quality control of *Gastrodia Rhizoma*.

Key words: *Gastrodia Rhizoma*; UPLC fingerprint; principal component analysis; astrodin; 4-hydroxybenzyl alcohol; *p*-hydroxybenzaldehyde; parishin B; parishin C; parishin A

天麻 *Gastrodiae Rhizoma* 为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 又名赤箭、定风草、独摇芝,《神农本草经》将其列为上品, 有平肝息风、通络止痛的功效; 主治头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症^[1]。天麻产地调研主产区有陕西汉中、贵州毕节、安徽、云南、四川等地^[2]。目前, 天麻的质量控制多以外观性状及天麻素和对羟基苯甲醇量为指标^[1], 从传统的中医药观点来看, 检测任何一种指标成分均不能真正控制中药的质量, 反映其整体疗效。近年来, 指纹图谱技术被广泛应用于中药质量控制研究, 能比较全面地反映中药所含化学成分的种类与数量^[3-4]。文献研究发现天麻中巴利森苷类成分具有较强的生理活性^[5-8]。本实验建立 UPLC 指纹图谱并结合多成分含量测定, 通过相似度评价、主成分分析 (PCA) 综合评价天麻饮片的质量, 为天麻饮片的分级研究提供方法学依据。

1 仪器与试药

Waters Acquity 超高效液相色谱仪, PDA 检测器和 Empower 工作站(美国 Waters 公司); MS-105D 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-500E 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

天麻素(批号 Y02M6K1)、对羟基苯甲醇(批号 H21D6Q7813)、对羟基苯甲醛(Y02J7C15574)、巴利森苷 B(批号 P11J7F17626)、巴利森苷 C(批号 P11J7F17625)、巴利森苷 A(批号 P1007F22270), 质量分数均大于 98%均购自上海源叶生物技术有限公司。乙腈(HPLC 级, 德国 Merck 公司), 甲酸(HPLC 级, 美国 ACS 恩科公司); 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯(山东禹王实业有限公司化工分公司)。28 批不同产地的天麻饮片均由上海华宇药业有限公司提供, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 饮片来源信息见表 1。

表 1 天麻样品的批号与相似度

Table 1 Information of *Gastrodiae Rhizoma* samples

编号	批号	药材来源	相似度	编号	批号	药材来源	相似度
S1	TM2017101101AH	安徽	0.906	S15	TM2017101102SX	陕西	0.979
S2	TM2017101102AH	安徽	0.904	S16	TM2017102102SX	陕西	0.973
S3	TM2017101101GZ	贵州	0.973	S17	TM2017103102SX	陕西	0.987
S4	TM2017102101GZ	贵州	0.973	S18	TM2017104102SX	陕西	0.971
S5	TM2017103101GZ	贵州	0.975	S19	TM2017101101YN	云南	0.944
S6	TM2017101102GZ	贵州	0.977	S20	TM2017102101YN	云南	0.939
S7	TM2017102102GZ	贵州	0.971	S21	TM2017103101YN	云南	0.936
S8	TM2017103102GZ	贵州	0.971	S22	TM2017104101YN	云南	0.935
S9	TM2017101101HB	湖北	0.969	S23	TM2017101102YN	云南	0.962
S10	TM2017101102HB	湖北	0.969	S24	TM2017102102YN	云南	0.927
S11	TM2017101101SX	陕西	0.97	S25	TM2017103102YN	云南	0.928
S12	TM2017102101SX	陕西	0.97	S26	TM2017104102ZJ	浙江	0.959
S13	TM2017103101SX	陕西	0.968	S27	TM2017101101ZJ	浙江	0.967
S14	TM2017104101SX	陕西	0.975	S28	TM2017101102ZJ	浙江	0.964

2 方法与结果

2.1 指纹图谱色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1%甲酸水(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱: 0~4 min, 99%~98% A; 4~11 min, 98%~92% A; 11~15 min, 92%~80% A;

15~20 min, 80%~0 A; 20~21 min, 100% B; 21~22 min, 0~99% A; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL。

2.2 含量测定色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1%甲酸水(A) -

乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 98%~92% A; 2~4 min, 92%~91.5% A; 4~8 min, 91.5%~84% A; 8~9 min, 84%~98% A; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 220 nm; 柱温 35 °C; 进样量 2 μ L。

2.3 对照品溶液的制备

取各对照品适量, 加 10% 甲醇水配制成含天麻素 0.121 56 mg/mL、对羟基苯甲醇 0.020 30 mg/mL、对羟基苯甲醛 2.048 μ g/mL、巴利森苷 B 0.081 76 mg/mL、巴利森苷 C 0.040 80 mg/mL、巴利森苷 A 0.202 80 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取本品粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 120 W, 频率 40 kHz) 30 min,

放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 浓缩至近干无醇味, 残渣加 10% 甲醇溶解并定容 10 mL 量瓶中, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系 精密称取对照品天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 适量, 配制成的质量浓度分别为 0.303 9、0.050 75、0.204 4、0.102 0、0.507 0 mg/mL 的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液。用倍比稀释的方法以 10% 甲醇制成系列对照品溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 分别进样 2 μ L 各 2 针, 记录各峰面积的值, 以峰面积平均值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 计算回归方程, 结果见表 2。

表 2 5 个有效成分的回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Linear equation, linear ranges, and correlation coefficient of five effective components

化合物	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	r^2
天麻素	$Y=1 \times 10^7 X+54\ 647$	0.015 200~0.303 900	0.999 3
对羟基苯甲醇	$Y=2 \times 10^7 X-13\ 765$	0.002 538~0.050 750	0.999 2
巴利森苷 B	$Y=1 \times 10^7 X+6\ 427.8$	0.010 220~0.204 400	0.999 7
巴利森苷 C	$Y=1 \times 10^7 X-4\ 274.9$	0.005 100~0.102 000	0.999 3
巴利森苷 A	$Y=1 \times 10^7 X+20\ 510$	0.025 350~0.507 000	0.999 7

2.5.2 精密度试验 取天麻样品 (S11) 1 g, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录指纹图谱, 以天麻素作为参比峰, 结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD<3%, 相对峰面积的 RSD<3%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (S11), 分别在 0、2、4、8、12、24、36 h, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录其指纹图谱, 结果表明共有峰的相对保留时间的 RSD<3%、相对峰面积的 RSD<3%, 表明在该条件下样品在 36 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取天麻样品 (S11) 1 g 各 6 份, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录其指纹图谱, 以天麻素作为参比峰, 结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD<3%, 相对峰面积的 RSD<3%, 表明该方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已测定含量的天麻粉末 9 份, 每份 0.5 g, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密添加含天麻素 2.145 mg/mL、对羟基苯甲

醇 0.521 0 mg/mL、巴利森苷 B 2.512 0 mg/mL、巴利森苷 C 0.553 2 mg/mL、巴利森苷 A 5.212 0 mg/mL 的混合对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下进样测定, 计算平均回收率和 RSD。结果表明, 天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 平均回收率分别为 98.83%、96.56%、103.70%、99.30%、97.81%, RSD 分别为 2.38%、2.16%、1.73%、1.15%、1.97%。

2.6 天麻指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.6.1 天麻指纹图谱的建立 取 28 批天麻样品, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件依次进样测定, 记录色谱图, 将 28 批天麻 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 软件, 以 S11 号样品的指纹图谱作为参照谱, 采用平均数法, 进行多点校正和色谱峰匹配, 确定了 20 个共有峰, 得到天麻饮片指纹图谱叠加图, 见图 1。

2.6.2 指纹图谱共有峰的标定和相似度评价 采用

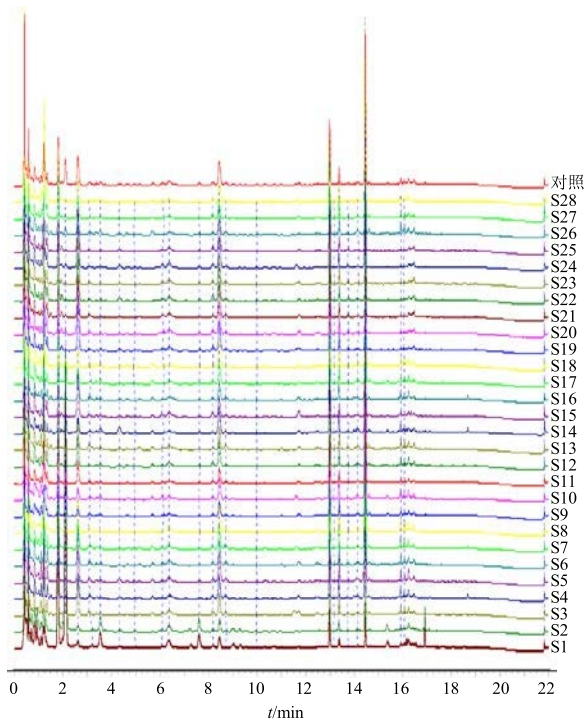


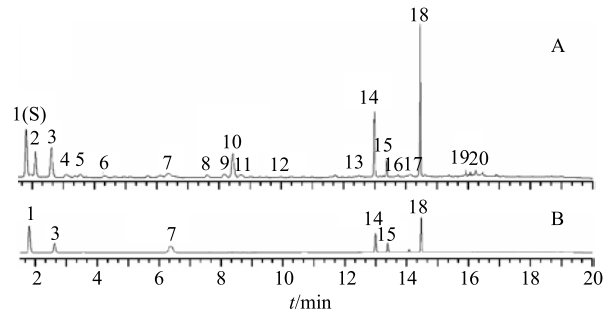
图 1 28 批天麻饮片指纹图谱及对照指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 28 batches of *Gastrodiae Rhizoma* and reference fingerprint chromatogram

对照品比对的方式, 指认了其中 6 个共有峰, 分别为天麻素 (1 号峰)、对羟基苯甲醇 (3 号峰)、对羟基苯甲醛 (7 号峰)、巴利森苷 B (14 号峰)、巴利森苷 C (15 号峰)、巴利森苷 A (18 号峰)。天麻指纹图谱共有模式及混合对照品 UPLC 色谱图见图 2。中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 软件对 28 批样品指纹图谱相似度计算, 各产地天麻指纹图谱相似度大于 0.90, 贵州、陕西、湖北、浙江产地天麻相似度大于 0.96, 云南产地天麻相似度 0.92 以上, 安徽天麻相似度 0.90 以上, 见表 1。

2.7 PCA

将 28 批次的天麻样品的各个共有峰相对于参照峰天麻素 (1 号峰) 的峰面积量化, 得到 20×28 阶数据矩阵 (表 3), 导入 SIMCA-P+13.0 软件, 选取 20 个共有色谱峰的相对峰面积值作为变量, 采用非监督模式识别方法 PCA 来观察样品的自然聚集。28 批次样品的得分矩阵见图 3, 可直观显示样品间的差异, 安徽产天麻偏离 4 个象限在外, 云南、贵州、浙江分布在第一象限, 湖北产天麻分别在第 2、3 象限线。陕西产天麻集中分散在第 3 象限。可以看出道地产区天麻与几大主产区有一定的差别。



1-天麻素 (S) 3-对羟基苯甲醇 7-对羟基苯甲醛 14-巴利森苷 B
15-巴利森苷 C 18-巴利森苷 A
1-gastrodin (S) 3-4-hydroxybenzyl alcohol
7-p-hydroxybenzaldehyde 14-parishin B 15-parishin C
18-parishin A

图 2 天麻指纹图谱共有模式 (A) 及混合对照品 (B) UPLC 图
Fig. 2 UPLC of fingerprint of *Gastrodiae Rhizoma* (A) and hybrid reference substances (B)

2.8 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)

为了更好地观察组间差异, 本实验在此基础上进行了各两组间的 PLS-DA, PLS-DA 载荷分析见图 4。为了明确引起组间差异的物质, 采用独立样本 t 检验结合各变量的 VIP 值正态分布图 (图 5), 每个变量离 X 轴越远代表该成分的变化对分类的贡献越大, 筛选出贡献较大的 6 个变量 ($P < 0.05$, $VIP > 1$), 分别为 2、3 (对羟基苯甲醇)、7 (对羟基苯甲醛)、10、13、18 号峰 (巴利森苷 A)。该成分在区分不同产地天麻间起到重要作用, 是其主要差异性成分。提取主产地指纹图谱 (图 6), 云南、陕西、贵州各产地指纹峰峰形一致, 特征峰数目相同, 云贵产地与陕西相比峰高较高, 表明云南、贵州、陕西产区天麻品质质量相近。

2.9 天麻主要有效成分方差分析

取 28 批天麻饮片, 平行 3 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下条件测定, 色谱图见图 7。利用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行 LSD 方差分析 ($P < 0.05$ 表示显著性差异), 借助 OriginPro 8 数据绘图工具做差异分析图。由图 8 结果显示, 各产地天麻样品中巴利森苷类成分的质量分数最高 (1.60 ± 0.35)%; 其次为天麻素量 (0.50 ± 0.28)%。天麻素安徽产地质量分数最高, 达到 (1.04 ± 0.02)%, 与其他各产地间存在显著性差异, 湖北、贵州产地间无显著性差异, 但两者均与陕西、云南、浙江产地间存在显著性差异; 对羟基苯甲醇贵州产地含量最高为 (0.11 ± 0.02)%, 与陕西产地质量分数无显著性差异, 但两者均与云

表 3 28 批样品共有峰相对峰面积
Table 3 Relative peak areas of 20 common chromatographic peaks of 28 samples

编号	相对峰面积																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	1.00	1.93	0.08	0.03	0.17	0.03	0.13	0.14	0.03	0.11	0.01	0.01	0.18	0.01	0.06	0.01	0.02	0.14	0.03	0.04
S2	1.00	2.37	0.08	0.04	0.19	0.03	0.10	0.14	0.03	0.13	0.01	0.01	0.21	0.01	0.07	0.02	0.03	0.18	0.04	0.04
S3	1.00	0.07	1.03	0.15	0.08	0.07	0.39	0.04	0.15	0.69	0.15	0.02	0.97	0.03	0.26	0.07	0.12	2.08	0.12	0.11
S4	1.00	0.08	0.74	0.19	0.07	0.10	0.33	0.04	0.13	0.78	0.18	0.02	1.19	0.02	0.35	0.04	0.13	2.46	0.14	0.13
S5	1.00	0.09	0.85	0.15	0.10	0.14	0.31	0.04	0.12	0.84	0.16	0.02	1.13	0.03	0.30	0.11	0.21	2.54	0.13	0.13
S6	1.00	0.08	1.01	0.18	0.12	0.05	0.41	0.04	0.14	0.77	0.16	0.03	1.10	0.05	0.30	0.12	0.17	2.37	0.14	0.13
S7	1.00	0.08	0.68	0.17	0.07	0.05	0.26	0.04	0.10	0.70	0.17	0.02	1.03	0.02	0.30	0.04	0.13	2.20	0.14	0.13
S8	1.00	0.08	0.88	0.21	0.10	0.12	0.36	0.05	0.07	0.87	0.20	0.03	1.18	0.04	0.31	0.15	0.23	2.72	0.18	0.18
S9	1.00	0.71	0.25	0.11	0.07	0.04	0.09	0.03	0.08	0.55	0.08	0.03	0.80	0.02	0.25	0.04	0.12	2.11	0.12	0.09
S10	1.00	0.67	0.25	0.12	0.10	0.04	0.10	0.03	0.09	0.52	0.08	0.02	0.74	0.06	0.27	0.05	0.14	2.00	0.16	0.10
S11	1.00	0.11	1.20	0.15	0.09	0.05	0.43	0.06	0.20	0.88	0.15	0.03	1.21	0.03	0.26	0.07	0.14	2.97	0.14	0.09
S12	1.00	0.14	1.22	0.12	0.14	0.10	0.41	0.07	0.22	1.11	0.11	0.04	1.31	0.03	0.31	0.08	0.17	3.20	0.16	0.12
S13	1.00	0.13	1.14	0.40	0.14	0.11	0.53	0.06	0.11	0.98	0.31	0.04	1.40	0.04	0.35	0.13	0.22	3.29	0.20	0.17
S14	1.00	0.44	0.49	0.09	0.19	0.27	0.23	0.06	0.06	0.85	0.09	0.02	1.21	0.04	0.31	0.06	0.21	2.60	0.22	0.11
S15	1.00	0.12	2.41	0.20	0.09	0.08	0.66	0.07	0.29	1.08	0.15	0.04	1.24	0.05	0.30	0.17	0.27	2.82	0.29	0.16
S16	1.00	0.11	0.88	0.23	0.08	0.09	0.46	0.05	0.11	0.82	0.20	0.03	1.16	0.03	0.29	0.06	0.14	2.70	0.19	0.10
S17	1.00	0.13	1.41	0.19	0.13	0.08	0.89	0.07	0.22	0.99	0.15	0.03	1.34	0.06	0.33	0.10	0.14	3.11	0.17	0.08
S18	1.00	0.19	0.53	0.11	0.16	0.07	0.26	0.06	0.12	0.87	0.12	0.05	1.07	0.04	0.25	0.09	0.25	2.50	0.20	0.16
S19	1.00	0.05	2.09	0.09	0.08	0.11	0.39	0.08	0.25	1.31	0.13	0.02	1.49	0.02	0.32	0.11	0.11	2.77	0.11	0.07
S20	1.00	0.18	2.27	0.18	0.08	0.07	0.56	0.09	0.24	1.55	0.19	0.04	1.48	0.03	0.34	0.11	0.11	2.71	0.10	0.06
S21	1.00	0.12	1.91	0.30	0.10	0.10	0.54	0.08	0.16	1.83	0.26	0.04	1.56	0.03	0.30	0.14	0.12	2.50	0.12	0.07
S22	1.00	0.08	1.80	0.12	0.10	0.26	0.42	0.08	0.29	1.70	0.16	0.06	1.42	0.02	0.28	0.11	0.13	2.28	0.07	0.06
S23	1.00	0.06	1.60	0.12	0.06	0.07	0.41	0.07	0.14	1.09	0.17	0.02	1.31	0.02	0.27	0.08	0.08	2.65	0.07	0.04
S24	1.00	0.14	2.13	0.14	0.09	0.18	0.53	0.08	0.25	1.37	0.15	0.02	1.32	0.02	0.29	0.10	0.09	2.24	0.08	0.05
S25	1.00	0.09	2.14	0.12	0.09	0.18	0.48	0.09	0.30	1.75	0.15	0.05	1.61	0.04	0.31	0.18	0.16	2.48	0.08	0.06
S26	1.00	0.16	0.47	0.16	0.15	0.07	0.26	0.06	0.09	0.87	0.15	0.04	1.06	0.03	0.23	0.05	0.18	2.51	0.17	0.15
S27	1.00	0.08	0.68	0.08	0.08	0.04	0.27	0.04	0.16	0.65	0.10	0.02	1.16	0.02	0.33	0.05	0.07	2.49	0.10	0.07
S28	1.00	0.09	0.69	0.09	0.08	0.05	0.16	0.03	0.16	0.58	0.09	0.02	1.09	0.03	0.32	0.06	0.09	2.57	0.09	0.08

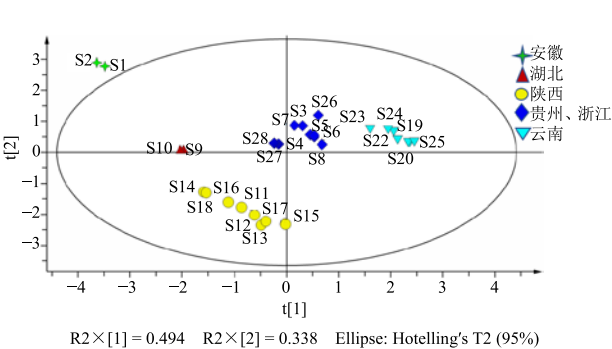


图 3 28 批天麻样品的 PCA 得分图
Fig. 3 PCA of score plot for 28 *Gastrodiae Rhizoma* samples

南、湖北、安徽、浙江产地间存在显著性差异；巴利森苷 B 贵州产地含量最高为 $(0.57 \pm 0.05) \%$ ，与其他各产地间存在显著性差异，安徽产地量最低仅为 $(0.29 \pm 0.02) \%$ ；巴利森苷 C 贵州、湖北、浙江产地量最高为 $(0.16 \pm 0.01) \%$ ，且 3 者间无显

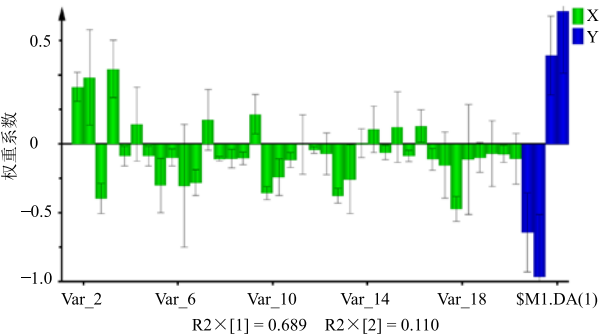


图 4 各共有峰的 PLS-DA 载荷柱状图
Fig. 4 PLS-DA column loading plots of the common peaks

著性差异，但 3 者与其他产地间存在显著性差异，其中安徽产地量最低为 $(0.05 \pm 0.01) \%$ ；巴利森苷 A 陕西、贵州、湖北、浙江产地量最高为 $(1.29 \pm 0.06) \%$ ，且 4 者间无显著性差异，但 4 者与云南、安徽产地间存在显著性差异，安徽产地量最低，仅

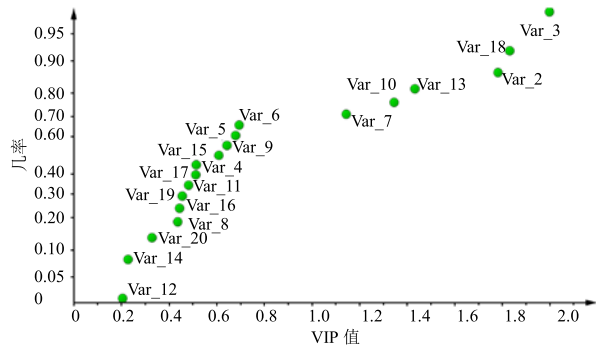


图 5 重要性变量投影图

Fig. 5 VIP plot of PLS-DA

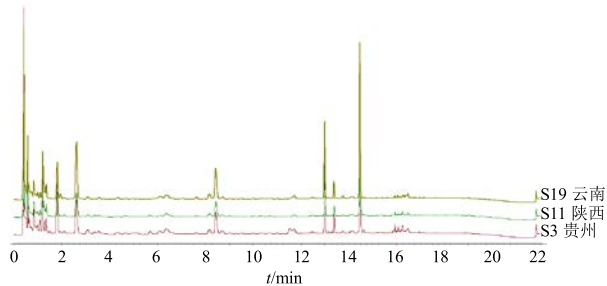
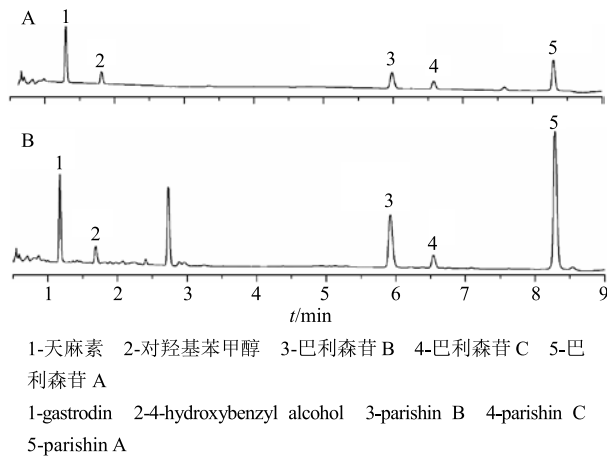


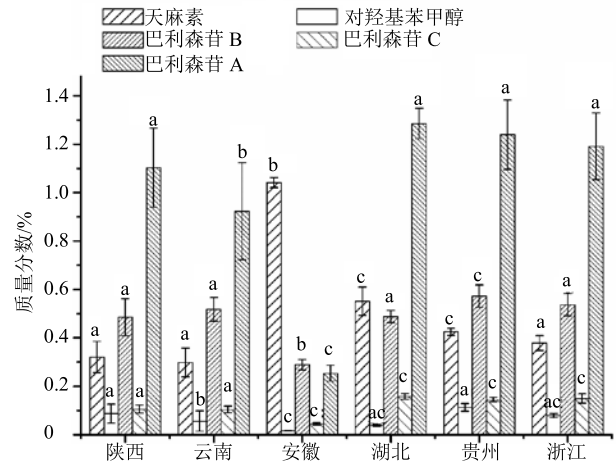
图 6 云南、陕西、贵州指纹图谱叠加图

Fig. 6 overlay chart of fingerprint of Yunnan, Shaanxi, and Guizhou

图 7 混合对照品和天麻饮片(B) UPLC 图 (A) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 7 UPLC of reference substance of *Gastrodiae Rhizoma* (A) and *Gastrodiae Rhizoma* samples (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

为 $(0.25 \pm 0.03)\%$ 。

综上所述, 安徽产地天麻除天麻素含量明显高于其他产地外, 巴利森苷类含量远低于平均值, 安徽产地天麻与其他主产区天麻存在显著差异, 与指纹图谱相似度评价结果和 PCA 结果一致。从化学结构上, 巴利森苷类为天麻素、对羟基苯甲醇及其



不同小写字母表示同一成分质量分数间的水平差异 ($P < 0.05$)

Lowercase letters indicate the horizontal differences between the same component ($P < 0.05$)

图 8 不同产地天麻样品中各指标成分的量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 8 Average content of *Gastrodiae Rhizoma* produced in different habitats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

衍生物与柠檬酸结合形成的酯类^[9-10]。各产地 5 种成分总量贵州 (2.52%) > 云南 (2.49%) > 陕西 (2.33%) > 湖北 (2.10%) > 浙江 (1.90%) > 安徽 (1.65%)。不同产地天麻多成分含量测定结果表明, 贵州、云南、陕西等产区天麻质量稳定且优质。

3 讨论

3.1 实验条件的优化

本实验考察了回流提取法、超声提取法 2 种提取方法, 同时比较了甲醇、乙醇以及不同浓度的提取溶剂, 发现 50% 乙醇超声提取效果最佳; 天麻指纹图谱方法的建立应尽量使得多数色谱峰分离, 体现指纹图谱的整体性和模糊性, 在进行全波长扫描下, 280 nm 检测条件下, 色谱峰较多, 各峰吸收均匀; 同时对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、甲醇-0.1% 甲酸水 4 个流动相进行了考察, 发现乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相进行梯度洗脱各色谱峰分离度较好, 分析时间 22 min 后无特征峰出现, 建立了不同产地天麻 UPLC 指纹图谱, 方法简便、稳定可靠、重复性好; 多成分含量测定要求检测波长是其最大吸收波长, 故选择在 220 nm 检测条件下, 可实现 9 min 内 5 种成分的分离测定, 方法简便高效、稳定可靠。

3.2 天麻饮片质量标准研究

指纹图谱结合多成分测定相对于单一成分的含测可以从整体上控制天麻饮片的质量。由于相似度评价只能确认样品间相似性, 不能确定差异性,

因此在此基础上进行了 PCA 和 PLS-DA 分析,明确不同产地天麻聚类情况的同时,找出了在分类中贡献较大的 6 种成分,并指认了其中 3 种成分,分别为对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 A。但是天麻的药效作用是来自一种成分还是多种成分目前还未有明确定论,所以仅靠某些化学成分高低的方法难以全面反映中药饮片的品质。该研究工作检测天麻 5 种有效成分的量也是为控制天麻饮片的内在质量作多成分解析,同一成分在各产地天麻饮片中的含量差异明显,不同成分的变化或波动范围也明显不同。为此,要全面科学的评价天麻饮片质量,还需结合饮片外观性状特征,开展外观性状特征与内在成分间科学联系研究,完善中药饮片质量评价标准。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈思颖. 天基于多元指纹图谱技术的天麻药材质量控制研究 [D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2011.
- [3] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3102.
- [4] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3106.
- [5] Liu Z, Wang W, Feng N, *et al.* Parishin C's prevention of Abeta1-42-induced inhibition of long-term potentiation is related to NMDA receptors [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(3): 189-197.
- [6] Shin E J, Whang W K, Kim S, *et al.* Parishin C attenuates phencyclidine-induced schizophrenia-like psychosis in mice: involvements of 5-HT1A receptor [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 113(4): 404-408.
- [7] Jang Y W, Lee J Y, Kim C J. Anti-asthmatic activity of phenolic compounds from the roots of *Gastrodia elata* Bl [J]. *Intern Immunopharmacol*, 2010, 10(2): 147-154.
- [8] 郑秀艳, 陈华国, 周 欣, 等. 基于入血成分的天麻药材质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1355-1357.
- [9] 王 莉. 天麻化学物质基础及质量控制方法研究 [D]. 大连: 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所), 2007.
- [10] 谢 淼, 邵明莎, 翟庆超, 等. 天麻中巴利森苷类成分研究进展 [J]. 广东化工, 2016, 43(22): 93-95.