

基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定结合化学计量学的不同商品规格山慈菇质量差异分析

郝壮壮¹, 曹宇欣^{1#}, 刘朦朦¹, 薛静文¹, 张 鸽¹, 芦艺凡¹, 范文昕¹, 周 莹³, 冯 靓⁴, 王春国^{2*}, 石晋丽^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488
2. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 102488
3. 北京市朝阳区高碑店社区卫生服务中心, 北京 100124
4. 北京市朝阳区望京社区卫生服务中心, 北京 100102

摘要: **目的** 建立山慈菇的 HPLC 指纹图谱, 对其特征成分进行含量测定并结合化学计量学分析方法分析不同商品规格山慈菇(冰球子、毛慈菇)化学成分的差异, 为山慈菇药材的质量控制提供参考。**方法** 优化山慈菇药材的提取方法, 应用 HPLC 法分别建立冰球子和毛慈菇指纹图谱, 并对特征成分进行含量测定。采用相似度评价、聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)、Fisher 线性判别分析(fisher linear discrimination analysis, FLDA)对特征成分进行数据分析。**结果** 建立了冰球子和毛慈菇 HPLC 指纹图谱, 分别匹配了 46 个和 43 个共有峰, 共标示出 17 个色谱峰, 指认出天麻素、loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰萼 8 个色谱峰并同时建立了上述除天麻素以外 7 个成分的 HPLC 含量测定方法。CA 与 PCA 结果可将 2 种不同商品规格山慈菇样品明显区分。OPLS-DA 分析结合含量测定 Fisher 判别分析结果表明, 2 种不同商品规格的山慈菇样品间存在显著性差异的 5 种成分是 loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、白芨联菲 B、卷瓣兰萼($P < 0.001$)。**结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱结合 CA、PCA、OPLS-DA 分析及多成分含量测定能客观、全面、有效地确定不同商品规格山慈菇中主要成分的差异, 可为山慈菇质量评价体系的完善提供依据。

关键词: 山慈菇; HPLC 指纹图谱; 天麻素; loroglossin; dactylorhin A; 白芨苷; 山药素 III; 白芨联菲 A; 白芨联菲 B; 卷瓣兰萼; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1935-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.026

Quality differences of different commercial specifications of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* based on HPLC fingerprint, multi-index component determination and chemometrics

HAO Zhuang-zhuang¹, CAO Yu-xin¹, LIU Meng-meng¹, XUE Jing-wen¹, ZHANG Ge¹, LU Yi-fan¹, FAN Wen-xin¹, ZHOU ying³, FENG Liang⁴, WANG Chun-guo², SHI Jin-li¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
2. Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
3. Gaobeidian Community Health Service Center, Chaoyang District, Beijing 100124, China
4. Wangjing Community Health Service Center, Chaoyang District, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* (Shancigu), determine the content of its characteristic components, and analyze the difference of the chemical components of the different

收稿日期: 2022-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82073971)

作者简介: 郝壮壮, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: bucmhzz@126.com

*通信作者: 王春国, 实验师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: wangcg1119@126.com

石晋丽, 博士生导师, 教授, 从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: shijl@vip.sina.com

#共同第一作者: 曹宇欣, 女, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制。E-mail: 18835196398@163.com

commercial specifications (Bingqiuzi and Maocigu) of Shancigu combined with a variety of chemometrics analyses to provide a reference for its quality control. **Methods** The extraction method of Shancigu was optimized. HPLC was used to establish the fingerprint of Bingqiuzi and Maocigu respectively, and the content of characteristic components was determined. The data of characteristic components were analyzed by similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and Fisher linear discriminant analysis (FLDA). **Results** HPLC fingerprints of Bingqiuzi and Maocigu were established, and a total of 46 and 43 common peaks were matched in Bingqiuzi and Maocigu respectively, 17 chromatographic peaks were calibrated, and eight chromatographic peaks were identified, including gastrodin, loroglossin, dactylorhin A, militarine, batatasin III, blestriarene A, blestriarene B, monbarbatain A, and HPLC method for the determination of the above seven components except gastrodin was established simultaneously. The results of CA and PCA can distinguish two kinds of samples of different commercial specifications. The results of OPLS-DA analysis combined with content determination Fisher discriminant analysis showed that loroglossin, dactylorhin A, militarine, blestriarene B, and monbarbatain A ($P < 0.001$) were the components with significant differences between the samples of two different commodity specifications. **Conclusion** The HPLC fingerprint of Shancigu combined with CA, PCA, OPLS-DA analysis and multi-component content determination, can determine the differences of the main components in different commercial specifications of Shancigu objectively, comprehensively and effectively, and provide a basis for the improvement of the quality evaluation system of Shancigu.

Key words: *Cremastra Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* (shancigu); HPLC fingerprint; gastrodin; loroglossin; dactylorhin A; militarine; batatasin III; blestriarene A; blestriarene B; monbarbatain A; chemometrics; quality evaluation

山慈菇来源于兰科植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 或云南独蒜兰 *Pleione yunnanensis* Rolfe 的干燥假鳞茎,前者习称“毛慈菇”,后者习称“冰球子”^[1]。具有清热解毒、消痈散结^[2]的功效。现代研究表明,山慈菇主要含有糖苷类、菲类、联苕类、多糖类及其他种类化学成分^[3-10],具有抗肿瘤^[11]、抗菌^[12]、抑制血管生成^[13]和抗氧化^[14]等药理活性,常用于治疗肝癌^[15]、肺癌^[16]和乳腺癌^[17]等恶性肿瘤。其中糖苷类成分如天麻素^[18]、白芨苷^[19]等,菲类和联苕类成分如山药素 III^[20]、白芨联菲 A^[21]等均具有良好的生物活性。

目前市场上山慈菇药材质量参差不齐,价格差异悬殊,分为“冰球子”和“毛慈菇”2种商品规格,二者分别来源于独蒜兰属和杜鹃兰属,形态差异明显,可能存在内在成分差异。“冰球子”的价格常在 1400~2800 元/kg,而“毛慈菇”则在 400~1600 元/kg。《中国药典》2020 年版只包含性状鉴别、显微鉴别及检查项,至今未见特征图谱和含量测定项。近年来,有学者对山慈菇进行了指纹图谱研究并结合含量测定评价药材质量^[22-27],如采用 HPLC 法建立了山慈菇药材指纹图谱,对 dactylorhin A、白芨苷和秋水仙碱进行了含量测定。但目前已建立的山慈菇指纹图谱仅针对单一商品规格或药材基原不明确,对不同商品规格山慈菇之间的内在成分差异研究未见报道;分离峰的数目较少,指认出的特

征峰不够全面。且仅以少数成分作为山慈菇含量测定指标,较难客观全面地评价其质量,山慈菇质量评价研究总体不够深入。

本研究以冰球子和毛慈菇 2 种商品规格的山慈菇样品为研究对象,收集了多个主要产地的多批冰球子和毛慈菇样本,拟建立不同商品规格山慈菇药材的 HPLC 指纹图谱。基于前期质谱研究锁定了多类化学成分(糖苷类、2-异丁基苹果酸酯类、2-异丁基酒石酸酯类、联苕类、菲类)中的代表成分,拟同时对多种成分进行定量分析,并结合聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等化学计量学分析方法,筛选不同商品规格山慈菇药材的差异成分,从化学成分的角度阐明两者的质量特征,以期如山慈菇药材质量控制体系的完善提供依据,为挖掘潜在的山慈菇质量标志物提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

对照品天麻素(批号 A0138)、dactylorhin A(批号 A1379)、白芨苷(批号 A1378)、山药素 III(批号 A1260)、白芨联菲 A(批号 A1267)、白芨联菲 B(批号 A1299)、卷瓣兰蕙(批号 A1301)均购自成都曼思特生物科技有限公司;loroglossin(批号 PCS55129)购自成都植标化纯生物技术有限公司。

所用对照品质量分数均 $\geq 98\%$ ；乙腈（色谱纯，美国飞世尔试剂公司），娃哈哈纯净水，其余均为分析纯。

26 批山慈菇样品分别取自于贵州、云南、四川、广西各地，详细信息见表 1，经北京中医药大学中药鉴定学科石晋丽教授鉴定为兰科植物杜鹃兰 *C. appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *P. bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 和云南独蒜兰 *P. yunnanensis* Rolfe 的干燥假鳞茎。

表 1 26 批山慈菇样品来源信息

Table 1 Detailed information of 26 batches of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* samples

编号	商品规格	产地	基原
BQZ-1	冰球子	云南曲靖	独蒜兰
BQZ-2	冰球子	云南曲靖	独蒜兰
BQZ-3	冰球子	云南曲靖	独蒜兰
BQZ-4	冰球子	贵州毕节	独蒜兰
BQZ-5	冰球子	四川乐山	独蒜兰
BQZ-6	冰球子	四川乐山	独蒜兰
BQZ-7	冰球子	四川乐山	独蒜兰
BQZ-8	冰球子	云南丽江	独蒜兰
BQZ-9	冰球子	云南丽江	独蒜兰
BQZ-10	冰球子	云南丽江	独蒜兰
BQZ-11	冰球子	贵州黔西	云南独蒜兰
BQZ-12	冰球子	贵州黔西	云南独蒜兰
BQZ-13	冰球子	贵州黔西	云南独蒜兰
BQZ-14	冰球子	贵州黔西	云南独蒜兰
MCG-1	毛慈菇	贵州遵义	杜鹃兰
MCG-2	毛慈菇	贵州遵义	杜鹃兰
MCG-3	毛慈菇	贵州遵义	杜鹃兰
MCG-4	毛慈菇	广西玉林	杜鹃兰
MCG-5	毛慈菇	广西玉林	杜鹃兰
MCG-6	毛慈菇	广西玉林	杜鹃兰
MCG-7	毛慈菇	云南曲靖	杜鹃兰
MCG-8	毛慈菇	云南曲靖	杜鹃兰
MCG-9	毛慈菇	云南曲靖	杜鹃兰
MCG-10	毛慈菇	四川马边山	杜鹃兰
MCG-11	毛慈菇	四川马边山	杜鹃兰
MCG-12	毛慈菇	四川马边山	杜鹃兰

1.2 仪器

岛津 LC-20A 型高效液相（日本岛津公司）；Zorbax SB-C18（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μ m）色谱柱（美国安捷伦公司）；ME155DU 型精密电子天平（十万分之一，美国梅特勒-托利多公司）；KQ-500DV 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；600Y 型高速多功能粉碎机（浙江西厨有限公司）；HH-8 型数显恒温水浴锅（常州越新仪器制造有限公司）；FD-1A-50 型冷冻干燥

机（北京博医康仪器有限公司），RE-52AA 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化厂）。

2 方法与结果

2.1 提取方法考察

2.1.1 超声提取 精密称取山慈菇样品 MCG-1 粉末（60 目筛）2 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，加入 10 倍量 70%乙醇，超声（功率 1000 W、频率 40 Hz）处理 60 min，连续超声 2 次，静置，滤过，合并滤液。减压浓缩后，于冷冻干燥机中干燥至恒定质量，得山慈菇 70%乙醇超声提取物干膏（C1~C3）。

2.1.2 回流提取 精密称取山慈菇样品 MCG-1 粉末（60 目筛）2 g，精密称定，置于圆底烧瓶中，加入 10 倍量 70%乙醇加热回流提取，每次 60 min，连续提取 2 次，静置，滤过，合并滤液。减压浓缩后，于冷冻干燥机中干燥至恒定质量，得山慈菇 70%乙醇回流提取物干膏（H1~H3）。

2.1.3 超声联合回流提取 精密称取山慈菇样品 MCG-1 粉末（60 目筛）2 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，加入 10 倍量 70%乙醇，超声（功率 1 000 W、频率 40 Hz）处理 60 min，静置，滤过，残渣再用 10 倍量 70%乙醇加热回流提取 60 min，静置，滤过，合并滤液。减压浓缩后，于冷冻干燥机中干燥至恒定质量，得山慈菇 70%乙醇超声联合回流提取物干膏（CH1~CH3）。

参考杨红燕等^[24]在 HPLC 指纹图谱中应用的提取方法，考察不同提取方式对山慈菇药材提取率的影响。单因素方差分析结果表明回流提取和超声结合回流提取明显优于超声提取（ $P < 0.05$ ），但回流提取和超声结合回流提取没有统计学差异（ $P > 0.05$ ），故选择回流提取为山慈菇提取方式，结果见表 2。

表 2 样品不同提取方式下提取率比较

Table 2 Comparison of extraction rates of sample under different extraction methods

编号	样品质量/g	干膏质量/g	提取率/%
C1	2.001 6	0.308 5	15.41
C2	2.002 5	0.282 1	14.09
C3	2.001 9	0.315 1	15.74
H1	2.002 9	0.332 9	16.62
H2	2.002 6	0.340 0	16.98
H3	2.004 4	0.347 3	17.33
CH1	2.003 2	0.333 2	16.63
CH2	2.003 2	0.345 4	17.24
CH3	2.002 2	0.354 1	17.69

2.2 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B); 梯度洗脱条件: 0~4 min, 5% A; 4~5 min, 5%~20% A; 5~35 min, 20%~33% A; 35~70 min, 33%~52% A; 70~72 min, 52%~95% A; 72~80 min, 95% A; 进样体积 10 μL; 检测波长 200 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。

2.3 提取条件优化

取山慈菇样品 MCG-1 9 份, 每份 2 g, 设定乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C) 及提取次数 (D) 为试验因素, 每个因素设计 3 个水平, 如表 3 所示。采用 L⁹(3⁴) 正交表进行试验, 提取方法同“2.1.3”项下内容。

表 3 正交试验因素与水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal test

水平	A/%	B/(g·mL ⁻¹)	C/min	D/次
1	60	1:10	45	1
2	70	1:20	60	2
3	80	1:30	90	3

取各试验所得干膏适量, 精密称定, 配制成 20 mg/mL 溶液按“2.2”项进行 HPLC 测定, 以样品提取率、HPLC 色谱图总峰面积为评价指标, 通过极差分析得出对 2 个评价指标的影响因素排序分别为 A>B>D>C、A>D>B>C, 最佳设计分别为 A₁B₃C₂D₃、A₃B₁C₃D₁, 结合双指标综合平衡法得到最佳提取条件为 70%乙醇回流提取 2 次, 每次 90 min, 料液比为 1:20, 结果如表 4、5。

表 4 L⁹(3⁴) 正交试验结果 (提取率)

Table 4 Results of L⁹(3⁴) orthogonally experiment (extraction ratio)

试验	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	18.46
2	1	2	2	2	24.80
3	1	3	3	3	26.09
4	2	1	2	3	19.23
5	2	2	3	1	17.90
6	2	3	1	2	20.62
7	3	1	3	2	14.26
8	3	2	1	3	16.88
9	3	3	2	1	15.71
k ₁	23.11	17.32	18.65	17.35	19.33
k ₂	19.25	19.86	19.91	19.89	
k ₃	15.62	20.81	19.42	20.73	
R	7.50	3.49	1.26	3.38	

表 5 L⁹(3⁴) 正交试验结果 (总峰面积)

Table 5 Results of L⁹(3⁴) orthogonally experiment (total peak area)

试验	A	B	C	D	总峰面积
1	1	1	1	1	18 142 985
2	1	2	2	2	15 603 509
3	1	3	3	3	14 620 316
4	2	1	2	3	18 966 439
5	2	2	3	1	20 169 246
6	2	3	1	2	19 464 395
7	3	1	3	2	23 376 375
8	3	2	1	3	20 449 509
9	3	3	2	1	21 997 845
k ₁	16 122 270	20 161 933	19 352 296	20 103 359	19 198 958
k ₂	19 533 360	18 740 755	18 855 931	19 481 426	
k ₃	21 941 243	18 694 185	19 388 645	18 012 088	
R	5 818 973	1 467 748	532 715	2 091 271	

2.4 溶液的制备

2.4.1 混合对照品溶液的制备 取对照品天麻素、loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰蒽适量, 加入 60% 乙腈配制成质量浓度分别 12.40、3.13、8.00、55.56、1.10、16.67、16.67、16.67 μg/mL 的混合对照品溶液, 保存于 4 ℃ 冰箱备用。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密称取山慈菇各样品粉末 (60 目筛) 适量, 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 加入 20 倍量 70% 乙醇加热回流提取 90 min, 连续提取 2 次, 静置, 滤过, 合并滤液, 于 10 mL 量瓶中定容, 配成 160 mg/mL (以生药量计) 溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 备用。

2.5 毛慈菇与冰球子样品 HPLC 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.2”项分析, 连续进样 6 次, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积。结果表明各共有峰保留时间的 RSD<0.8%, 各共有峰峰面积的 RSD<1.9%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.2”项分析, 平行进样 6 次, 分别计算各共有峰的保留时间与峰面积, 结果表明各共有峰保留时间的 RSD<0.35%, 各共有峰峰面积的 RSD<1.93%, 表明本方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品,按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,按“2.2”项分析,计算各共有峰的保留时间及峰面积。结果各共有峰的保留时间的 RSD<0.36%,各共有峰的峰面积的 RSD<1.9%。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.5.4 指纹图谱的建立及相似度评价 分别称取 26 批山慈菇样品适量,按“2.4.2”项下条件制备成山慈菇供试品溶液,按“2.2”项分析。将所得的样品数据全谱按不同商品规格分别导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件中,采用中位数法,时间窗口设定为 0.1 min,分别选取 BQZ-1 和 MCG-1 作为参照图谱,建立各个商品规格山慈菇的指纹图谱,得到冰球子 14 批样品指纹图谱叠加图、毛慈菇 12 批样品指纹图谱叠加图及对照图谱,见图 1、2。其中冰球子匹配了 46 个共有峰,毛慈菇匹配了 43 个共有峰,经与混合对照品的 HPLC 图进行比较,共指认出天麻素、loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰蒽 8 个色谱峰,通过与前期质谱研究和文献数据^[25-26]比对可确定苹果酸、手参苷、手参苷 II、1,4-di(4-β-D-glucopyranosyloxybenzyl)-2-benzylmalate diester、shancigusin H、手参苷 V、手参苷 VI、手参苷 IV、手参苷 V 异构体共 9 个色谱峰。

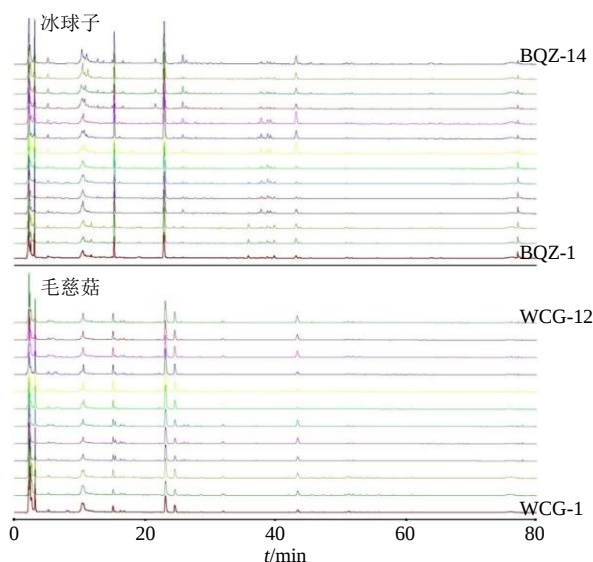
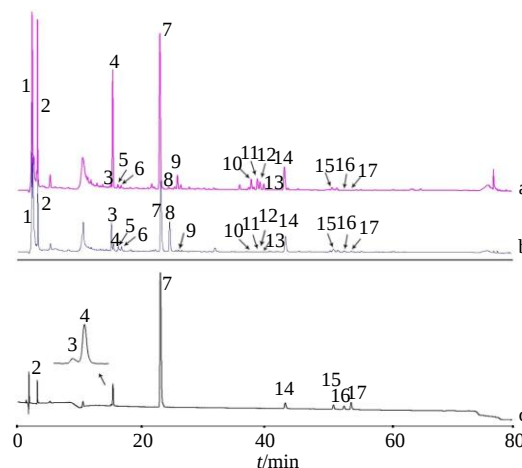


图 1 14 批次冰球子和 12 批次毛慈菇 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of 14 batches of bingqiuzi and 12 batches of maocigu



1-苹果酸 2-天麻素 3-loroglossin 4-dactylorhin A 5-手参苷
6-手参苷 II 7-白芨苷 8-1,4-di(4-β-D-glucopyranosyloxybenzyl)-2-benzylmalate diester 9-shancigusin H 10-手参苷 V
11-手参苷 VI 12-手参苷 IV 13-手参苷 V 异构体 14-山药素 III 15-白芨联菲 A 16-白芨联菲 B 17-卷瓣兰蒽
1-malic acid 2-gastrodin 3-loroglossin 4-dactylorhin A 5-gymnoside 6-gymnoside II 7-militarine 8-1,4-di(4-β-D-glucopyranosyloxybenzyl)-2-benzylmalate diester 9-shancigusin H 10-gymnoside V 11-gymnoside VI 12-gymnoside IV 13-gymnoside V isomer 14-batatasin III 15-blestriarene A 16-blestriarene B 17-monbarbatain A

图 2 冰球子 (a)、毛慈菇 (b) 及混合对照品 (c) 对照 HPLC 指纹图谱(中位数法)示例

Fig. 2 Reference HPLC fingerprint of bingqiuzi (a), maocigu (b) and mixed reference substance (c) (median method)

利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,以各商品规格山慈菇对照指纹图谱作为参照图谱,设其相似度为 1.000,计算各个商品规格山慈菇的相似度,见表 6。14 批冰球子指纹图谱相似度为 0.986~0.997,12 批毛慈菇指纹图谱相似度为 0.974~0.997。其中“毛慈菇”只有杜鹃兰一种基原,表明该基原所含化学成分一致性较好,而“冰球子”规格下包括独蒜兰和云南独蒜兰 2 种基原,但其化学一致性仍然较好,可能是因为独蒜兰和云南独蒜兰属于同属植物,表明独蒜兰属内化学成分差异较小。

2.6 冰球子和毛慈菇的化学模式识别

2.6.1 聚类分析(cluster analysis, CA) 将 2 种不同商品规格的 26 批山慈菇样品中 16 个特征峰(峰 2~17)的峰面积为变量(缺失色谱峰峰面积以 0 计),导入 SPSS 21.0 软件,采用组间联接和平方 Euclidean 距离作为分类依据进行系统聚类分析,探讨不同商品规格山慈菇样品成分含量的一致性,结果见图 3。当刻度距离为 25 时,26 批山慈菇样品聚

表 6 山慈菇样品 HPLC 指纹图谱相似度结果

Table 6 HPLC fingerprint similarity results of shancigu samples

编号	相似度	编号	相似度
BQZ-1	0.991	BQZ-14	0.992
BQZ-2	0.991	MCG-1	0.981
BQZ-3	0.991	MCG-2	0.978
BQZ-4	0.997	MCG-3	0.997
BQZ-5	0.990	MCG-4	0.984
BQZ-6	0.988	MCG-5	0.974
BQZ-7	0.987	MCG-6	0.974
BQZ-8	0.986	MCG-7	0.982
BQZ-9	0.997	MCG-8	0.988
BQZ-10	0.990	MCG-9	0.990
BQZ-11	0.991	MCG-10	0.988
BQZ-12	0.994	MCG-11	0.993
BQZ-13	0.992	MCG-12	0.988

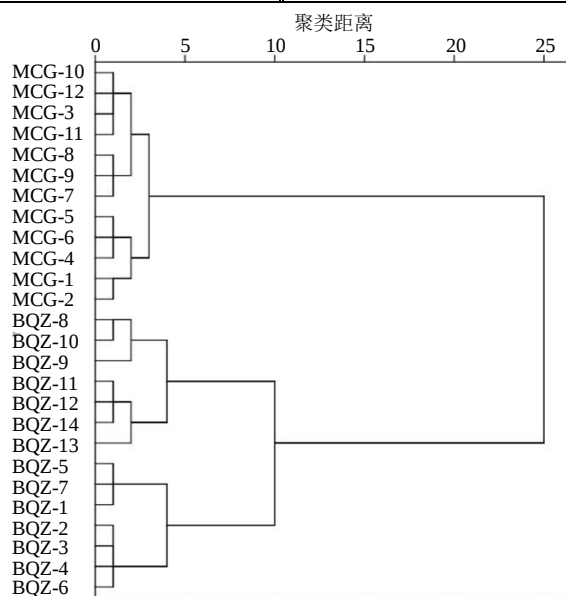


图 3 不同商品规格山慈菇 CA 分析树状图

Fig. 3 CA dendrogram of two commercial specifications of shancigu

为 2 类: MCG-1~MCG-12 号样品聚为第 1 类, BQZ-1~BQZ-14 号样品聚为第 2 类, 表明毛慈菇和冰球子化学成分的含量有明显差异, HPLC 指纹图谱结合聚类分析可以初步区分这 2 种商品规格的山慈菇样品, 但不同产地间区分不明显。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 得分散点图可以直观显示出不同样品之间的整体差异性, 反映数据的原始状态, 观察到试验样品的自然分布和组别关系。采用 SIMCA 14.1

软件, 对山慈菇样品中 16 个特征峰峰面积进行 PCA 分析, 通过得分图上样品的聚散程度观察不同商品规格样品间的差异性趋势。山慈菇样品的 Scores 图和 Loading 图如图 4 所示。建立的模型累计模型解释率 R^2_{Xcum} 为 0.986, 累计模型预测能力为 0.796, 表明建立的模型可以解释 98.6% 的原始信息, 且 R^2_{Xcum} 和 Q^2_{Xcum} 均大于 0.5, 表明建立的模型良好, 稳定可靠。由 Scores 图可知, 2 种商品规格药材分别聚集在 2 个不同的区域, 说明两者化学成分存在较大差异, 可以得到较好地区分, 与聚类结果基本一致。Loading 图中成分点距离原点越远表明该成分对样品的差异性贡献越大, 通过 Loading 图可知, 对 $p[1]$ (X 轴) 的影响顺序由大到小依次为峰 4、11、8; 对 $p[2]$ (Y 轴) 的影响顺序由大到小依次为峰 14、15、5。

2.6.3 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 不同于 PCA, OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法, 该方法基于 OPLS, 使分类信息主要集中在主成分上, 建立样品类别之间的关系模型, 并且使模型易于解释, 其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显。为进一步筛选对不同商品规格山慈菇药材质量影响较大的成分, 在 PCA 基础上将其分为 2 组, 以冰球子和毛慈菇指纹图谱的 16 个特征峰峰面积为变量, 利用 SIMCA14.1 软件建立 OPLS-DA 模型。在 OPLS-DA 得分图 (R^2_{Xcum} 为 0.69, R^2_{Ycum} 为 0.973, Q^2_{cum} 为 0.966) 中, 14 批冰球子及 12 批毛慈菇可很好地区分为 2 类, 且相较于 PCA 区分度更大, 如图 5-a 所示, 其中 BQZ-8、9、10 略微离群, 可能是产地因素导致。生成的 VIP 图如图 5-b 所示。以变量重要性投影值 (VIP) > 1.0 为标准, 共筛选出 10 个差异性标志物, 为峰 4、8、3、11、7、10、12、17、13、16, 分别为 dactylorhin A、1,4-di(4- β -D-glucopyranosyl-oxybenzyl)-2-benzyl-malate diester、loroglossin、手参苷 VI、白芨苷、手参苷 V、手参苷 IV、卷瓣兰萜、手参苷 V 异构体、白芨联菲 B, 其中 dactylorhin A 的 VIP 值最大, 说明毛慈菇和冰球子中 dactylorhin A 的含量差异最显著。为防止模型出现过拟合, 通过置换检验 200 次对模型内部进行验证, 结果如图 5-c, R^2 、 Q^2 回归线的截距分别为 0.114、-0.51, 均小于原始值, 证明模型稳定可靠, 可用于 2 种商品规格山慈菇样品的分析。

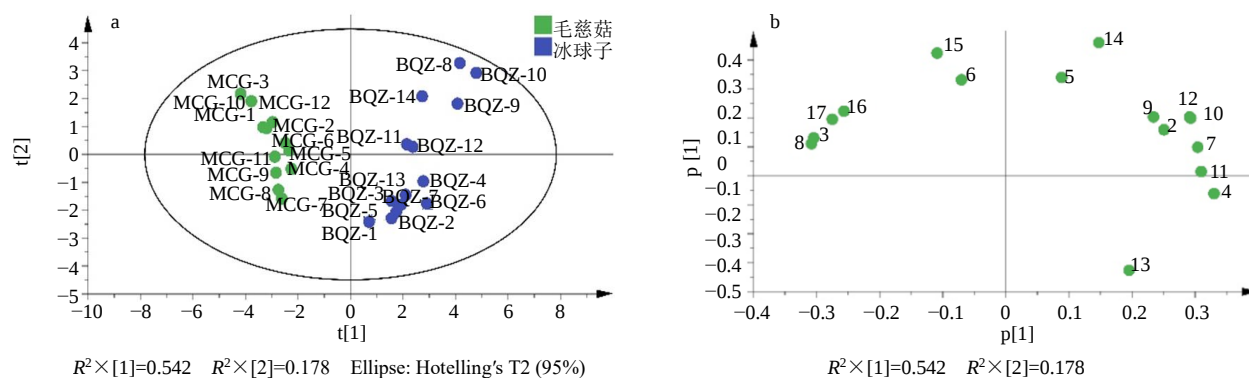


图 4 26 批山慈菇 PCA (a) 及 16 种成分 PCA 载荷图 (b)

Fig. 4 PCA of 26 batches of shancigu (a) and PCA loading plot of 16 components (b)

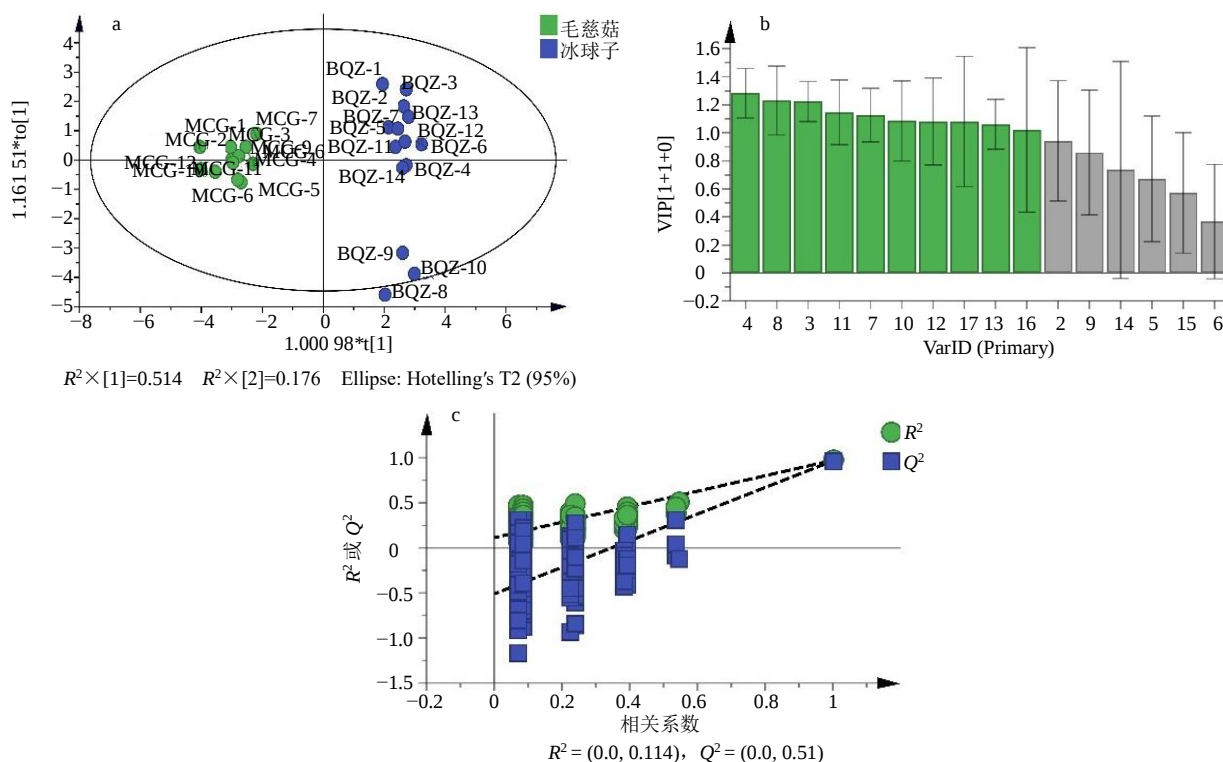


图 5 26 批山慈菇 OPLS-DA 得分图 (a)、16 个成分 VIP 图 (b) 及 OPLS-DA 模型置换检验结果 (c)

Fig. 5 OPLS-DA score plot of 26 batches of shancigu (a), VIP value of 16 components (b) and OPLS-DA model permutation test results (c)

2.7 山慈菇中 7 种特征成分的 HPLC 含量测定

山慈菇的化学成分研究较少，目前认为其有效成分主要为菲类、联苳类以及 2-异丁基苹果酸酯类成分。根据前期质谱研究结合文献报道^[25-26]分析，发现其含量较高的成分主要是 2-异丁基苹果酸酯类成分如 dactylorhin A、白芨苷、gymnoside 等，2-异丁基酒石酸酯类成分如 loroglossin、2-苳基苹果酸酯类成分如 1,4-di(4-β-D-glucopyranosyloxybenzyl) 2-benzylmalate diester 等，以及菲类成分

如白芨联苳 A、白芨联苳 B、卷瓣兰萼等，联苳类成分如山药素 III 等，且冰球子与毛慈菇上述成分含量差异较为明显。本研究为比较山慈菇 2 种商品规格的化学成分差异，完善山慈菇药材质量评价体系，根据其指纹图谱中的化学成分特征以及可行性，选取 loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联苳 A、白芨联苳 B、卷瓣兰萼 7 个代表性成分建立含量测定方法。

2.7.1 线性关系考察 精密吸取 loroglossin、

dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰葱对照品储备液适量, 按倍比稀释的方法稀释成不同质量浓度的对照品溶液。按照“2.2”项下色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐

标(Y), 质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数(R^2), 同时进行检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)的测定, 结果见表 7, 各成分在质量浓度范围内线性关系良好。

表 7 标准曲线回归方程

Table 7 Regression equation of standard curve

对照品	标准曲线	R^2	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
			线性范围	检测限	定量限
loroglossin	$Y=12\ 032.63 X+929.35$	0.999 9	0.78~50.00	0.070	0.210
dactylorhin A	$Y=30\ 407.53 X+89\ 318.98$	0.999 5	2.34~300.00	0.040	0.110
白芨苷	$Y=18\ 697.3 X+159\ 719.76$	0.999 9	62.50~2 000.0	0.100	0.310
山药素 III	$Y=7\ 279.75 X+4\ 244.39$	0.999 4	2.50~240.0	0.140	0.450
白芨联菲 A	$Y=10\ 560.63 X-2\ 008.10$	0.999 9	0.26~33.34	0.080	0.260
白芨联菲 B	$Y=6\ 445.91 X-802.32$	0.999 5	0.26~16.67	0.007	0.021
卷瓣兰葱	$Y=269\ 712.81 X-11\ 700.24$	0.999 6	0.01~20.00	0.003	0.007

2.7.2 精密度试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.2”项分析, 连续进样 6 次, 分别计算各待测峰的保留时间与峰面积。结果表明各待测峰保留时间的 $RSD<0.05\%$, 峰面积的 $RSD<2.5\%$, 表明仪器精密度良好。

2.7.3 重复性试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.2”项分析, 分别计算各待测峰的保留时间与峰面积, 结果表明各待测峰保留时间的 $RSD<0.1\%$, 峰面积的 $RSD<2.43\%$, 表明本方法重复性良好。

2.7.4 稳定性试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样, 按“2.2”项分析, 计算各待测峰的保留时间及峰面积。结果各待测峰的保留时间的 $RSD<0.3\%$, 峰面积的 $RSD<3.0\%$ 。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.7.5 加样回收率试验 取编号为 BQZ-1 和 MCG-1 的山慈菇样品各 6 份, 每份 0.4 g, 以近 1:1 的比例加入相应化学成分的对照品, 于 5 mL 量瓶中用 60%乙腈定容, 配制成 80 mg/g (以生药量计) 的溶液, 按“2.2”项分析, 分别记录各成分峰的保留时间与峰面积, 计算各成分的加标回收率和 RSD 值。冰球子和毛慈菇的各待测成分平均加样回收率分别为 99.20%~103.15% 和 98.43%~102.25%, RSD 分别为 0.57%~1.64% 和 0.52%~1.73%, 表明方法的准确度良好。

2.7.6 样品测定 取 14 批冰球子样品和 12 批毛慈菇样品, 按“2.4.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.2”项分析, 根据各成分最适宜检测波长, 分别在 230 nm (loroglossin)、220 nm (dactylorhin A)、224 nm (白芨苷)、270 nm (山药素 III、白芨联菲 A)、320 nm (白芨联菲 B、卷瓣兰葱) 下进行检测, 得到待测成分峰面积, 计算样品含量, 见表 8。根据各指标成分含量测定结果柱形图可以明确不同商品规格山慈菇中差异性指标成分, 见图 6。

2.7.7 Fisher 线性判别 (fisher linear discrimination analysis, FLDA) 利用 SPSS 21.0 统计软件的 Fisher 线性判别分析验证 OPLS-DA 中 VIP 大于 1.0 的 5 个指标成分作为不同商品规格山慈菇识别的适用性, 将 BQZ-1、5、8、11 及 MCG-1、4、7、10 号样品设为验证集, 其余样品均为训练集。将训练集样本按照商品规格进行分组建模, 以 loroglossin (a)、dactylorhin A (b)、白芨苷 (c)、白芨联菲 B (f)、卷瓣兰葱 (g) 作为判别变量, 建立判别函数 (discriminant function, DF), $DF_{BQZ} = -43.839 + 0.030a + 0.029b + 0.003c + 0.758f - 2.545g$, $DF_{MCG} = -53.319 + 0.153a + 0.007b + 1.959f - 6.595g$, 组质心处的函数分别为 -5.268、5.926, 且判别函数的 Lambda 检验显著性 P 均小于 0.05。由训练集样本自身验证及验证集验证, 样本总正确判别率均为 100%。表明 loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、白芨联菲 B、卷瓣兰葱可以作为山慈菇商品规格区分的指标成分。

表 8 26 批山慈菇样品含量测定
Table 8 Content of components in 26 batches of shancigu samples

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	loroglossin	dactylorhin A	白芨苷	山药素 III	白芨联菲 A	白芨联菲 B	卷瓣兰蒽
BQZ-1	83.90	161 2.02	456 4.40	118.52	25.03	13.46	2.80
BQZ-2	23.55	223 3.77	590 0.48	207.00	4.12	2.41	0.64
BQZ-3	115.87	242 2.16	641 5.54	197.03	35.06	20.56	4.19
BQZ-4	24.00	223 8.67	652 0.67	185.02	4.58	4.35	0.78
BQZ-5	51.85	179 7.02	464 3.99	67.27	4.55	2.53	0.63
BQZ-6	19.44	251 2.55	614 3.12	79.94	3.42	2.28	0.57
BQZ-7	46.95	206 8.97	466 5.47	118.28	6.76	3.69	1.12
BQZ-8	150.46	205 6.99	789 4.79	528.04	4.98	3.30	0.77
BQZ-9	88.72	255 5.63	813 0.09	361.73	4.80	4.34	0.88
BQZ-10	83.96	255 5.49	821 5.18	560.28	5.86	4.54	1.10
BQZ-11	195.45	182 8.35	690 6.71	234.08	9.18	6.99	1.43
BQZ-12	199.62	206 2.23	721 3.11	266.83	8.62	7.16	1.30
BQZ-13	17.87	195 4.83	787 9.66	265.19	4.10	4.41	0.78
BQZ-14	239.13	231 4.92	722 0.92	384.90	11.31	6.92	1.60
MCG-1	533.65	15.54	246 3.33	151.24	85.29	70.68	19.31
MCG-2	482.44	16.66	188 0.45	216.07	86.50	58.24	16.54
MCG-3	722.65	21.47	310 1.21	282.06	106.52	100.29	28.42
MCG-4	481.51	179.08	234 9.33	172.13	27.38	34.29	8.96
MCG-5	541.63	114.97	234 4.79	257.54	29.60	40.34	9.06
MCG-6	591.90	189.41	250 4.53	269.17	36.08	45.15	11.50
MCG-7	742.03	50.47	400 8.95	56.89	16.30	23.10	8.22
MCG-8	941.22	72.75	455 8.53	127.74	14.32	23.58	9.21
MCG-9	823.60	61.57	440 0.66	111.94	24.47	33.91	12.47
MCG-10	752.86	42.58	353 2.50	277.76	29.04	33.75	10.89
MCG-11	687.34	32.89	301 4.84	220.11	21.39	25.94	8.04
MCG-12	765.22	13.54	342 9.02	293.91	37.82	34.49	10.77

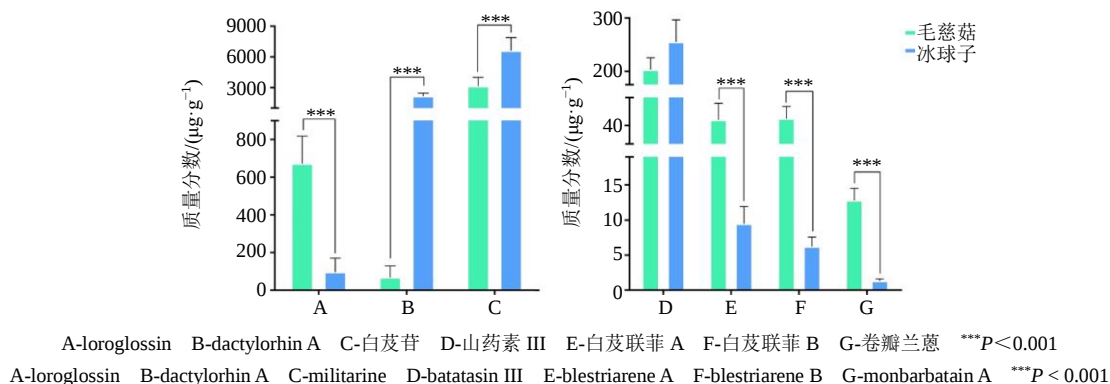


图 6 HPLC 指纹图谱各指标成分含量测定柱形图

Fig. 6 Determination results of marker components of HPLC fingerprint from shancigu

3 讨论

3.1 提取方法考察及提取条件优化

本实验考察了提取方法（超声提取、回流提取、超声结合回流提取）对山慈菇药材提取率的影响，并基于正交实验优化了提取条件（乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数）。文献中山慈菇药材的提取常采用甲醇超声法^[25]。本研究前期比较相同比例的甲醇-水、乙醇-水超声提取，发现二者并无明显差异，考虑到山慈菇药材主要的有效成分类型

为菲类、联苄类及异丁基苹果酸酯类成分等，而乙醇的极性较甲醇小，对有效成分的提取可能更为完全，且乙醇较甲醇毒性小，故选择乙醇-水作为提取溶剂进行下一步的考察。

本研究通过正交试验双指标综合平衡法，基于提取率和总峰面积 2 个指标进行极差分析。以提取率为指标评价时，乙醇体积分数对指标的差异贡献最高，其次是料液比、回流次数、回流时间，其中在 60%乙醇、1:30、60 min、3 次条件下提取率最

高。以总峰面积为评价指标时,乙醇体积分数对指标的差异贡献最高,其次是回流次数、料液比、回流时间,其中在 80%乙醇、1:10、90 min、1 次条件下总峰面积最大。综合各因素各水平对两个指标的差异贡献,最终确定最佳提取条件为:70%乙醇为提取溶剂,料液比为 1:20、回流提取 2 次,每次 90 min。

3.2 色谱条件的优化

本研究前期基于杨红燕等^[24]研究对 HPLC 洗脱梯度、柱温、流速进行优化,实验中通过 HPLC 指认出天麻素、loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、山药素 III、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰萼等山慈菇中含量较高的代表性成分,并采用 PDA 检测器对山慈菇供试品溶液进行 190~400 nm 全波长扫描,各类成分在 190~210 nm 吸收均较高,综合基线、峰形及分离度等因素,选取 200 nm 作为 HPLC 指纹图谱的检测波长,并选择 230 nm (loroglossin)、220 nm (dactylorhin A)、224 nm (白芨苷)、270 nm (山药素 III、卷瓣兰萼)、320 nm (白芨联菲 A、白芨联菲 B) 作为含量测定的专属检测波长,最大程度地减少对成分含量测定的影响。

3.3 指纹图谱及化学计量学分析

本研究采用相似度评价、CA、PCA 和 OPLS-DA 等方法对多批次不同商品规格山慈菇药材指纹图谱进行全面、客观的评价,成功区分了冰球子和毛慈菇并挖掘出二者的差异性成分;利用 Fisher 线性判别分析验证所选的特征成分作为不同商品规格山慈菇识别指标的适用性,为山慈菇药材的质量评价指标的选择提供了依据。2 个商品规格内部指纹图谱的相似度均大于 0.9,但不同商品规格间相似度有所区别,表明不同商品规格药材间化学成分存在一定的差异。化学计量学分析结果也可将两者明显区分,其中 BQZ-8、BQZ-9、BQZ-10 在 PCA 和 OPLS-DA 中略有离群,可能是由于这 3 个产于云南丽江的样品中白芨苷、山药素 III 含量较其他产地更高,这种含量差异可能与药材生长环境、采收时间等有关。最后从标示出的 16 个特征峰中以 OPLS-DA 模型的 VIP 值大于 1 进行 2 种商品规格的差异成分筛选,得到了 dactylorhin A、1,4-di(4-β-D-glucopyranosyloxybenzyl)-2-benzylmalate diester、loroglossin、手参苷 VI、白芨苷、手参苷 V、手参苷 IV、卷瓣兰萼、手参苷 V 异构体、白芨联菲 B 10 个成分。该结果与 PCA 载荷图基本一致,说明这些成分可能

是不同商品规格山慈菇药材中的差异性指标成分。

3.4 多成分含量测定

迄今为止,山慈菇的质量控制指标性成分暂不明确,质量评价体系尚未完善。因此寻找山慈菇药材中差异性成分并建立相应的含量测定方法对山慈菇质量控制具有非常重要的意义。

本研究收集了山慈菇 4 个主要产地的 26 批样品,以不同商品规格分类,选取 7 个特征性成分同时进行含量测定。经正态分布检验和方差齐性检验,发现白芨苷含量符合正态分布,方差齐,故采用独立样本 *t* 检验,具有极显著性差异 ($P < 0.001$); loroglossin、山药素 III 含量符合正态分布,方差不齐,采用单样本 *t'* 检验,loroglossin 具有极显著性差异 ($P < 0.001$),山药素 III 有差异趋势,但无显著性 ($P > 0.05$); dactylorhin A、白芨联菲 A、白芨联菲 B、卷瓣兰萼不符合正态分布,采用非参数检验 (Mann-Whitney *U*),结果其均具有极显著性差异 ($P < 0.001$)。通过 Fisher 线性判别分析,分别构建了冰球子和毛慈菇的判别函数,由训练集样本自身验证及验证集验证,样本总正确判别率为 100%。说明所选的 5 种有效成分可作为指标成分用于鉴别两种不同商品规格山慈菇样品,为山慈菇真伪鉴别提供了参考。

另外,峰 1-苹果酸和峰 2-天麻素作为山慈菇中异丁基苹果酸酯类成分的结构单元,也具有一定的研究价值,但是二者极性较大,出峰过早,容易受到溶剂效应的影响,较难在 C_{18} 柱中对其他小极性特征成分定量的同时兼顾,更好的定量方法有待研究。本研究建立了不同商品规格山慈菇药材的 HPLC 指纹图谱,指认出山慈菇中 17 种特征成分峰,并基于除苹果酸以外的 16 种特征成分的峰面积通过化学计量学分析成功区分了 2 种不同商品规格的山慈菇样品,通过 OPLS-DA 模型 VIP 值筛选出了 10 个差异性标志物;建立了同时测定 7 种特征成分的含量测定方法,并结合 VIP 值最终筛选出 5 种含量具有极显著差异的差异性标志物 (loroglossin、dactylorhin A、白芨苷、白芨联菲 B、卷瓣兰萼),对冰球子与毛慈菇的化学成分差异做出了较为全面的分析。结果表明两者在成分的种类和含量上存在明显的差异。该研究可为不同商品规格山慈菇药材的质量评价提供参考,为山慈菇药材整体质量控制体系的完善提供数据支撑。然而,本研究还存在一些不足:第一,主要探究了不同商品规格药材间的

差异性,但从化学计量学分析结果可以看出,不同产地样品间也存在一定差异,但本实验各产地样品批次较少,接下来可收集更多批次不同产地的样品,考察产地因素对其化学成分的影响。第二,手参苷类成分在山慈菇中含量较高,是山慈菇中比较重要的一类化学成分,但由于其对照品不易获得,无法对此类化学成分进行定量分析,后期可通过分离纯化制备此类成分单体,进行深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 34.
- [2] 宋·掌禹锡等撰,尚志钧辑复. 嘉祐本草辑复本 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009: 73.
- [3] 司函瑞, 陈小玲, 付东兴, 等. 山慈菇的化学成分研究 [J]. 特产研究, 2021, 43(6): 136-140.
- [4] 原文珂, 覃彬华, 李小平, 等. 山慈菇的化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 639-641.
- [5] 李小平. 杜鹃兰化学成分研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2016.
- [6] 董海玲, 郭顺星, 王春兰, 等. 山慈菇的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1734-1738.
- [7] 王超. 独蒜兰乙酸乙酯部位的化学成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [8] Wu X Q, Li W, Chen J X, et al. Chemical constituents and biological activity profiles on *Pleione* (Orchidaceae) [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3195.
- [9] Liu X Q, Yuan Q Y, Guo Y Q. Two new stilbenoids from *Pleione bulbocodioides* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(2): 116-121.
- [10] Xue Z, Li S, Wang S J, et al. Mono-, Bi-, and triphenanthrenes from the tubers of *Cremastra appendiculata* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(6): 907-913.
- [11] 张楠, 曹晓东, 刘颖, 等. 山慈菇酯提物对 4T1 乳腺癌免疫微环境的影响 [J]. 科学技术与工程, 2021, 21(10): 3940-3949.
- [12] 余怡欣, 陈龙惠, 曹丹, 等. 山慈菇活性成分微波提取工艺优化、指纹图谱与抗植物病菌活性分析 [J/OL]. 食品工业科技. 2023, 44(5): 204-212.
- [13] 李雪莲, 李智, 黄芊, 等. 山慈菇介导 VEGF-A 血管生成抑制乳腺癌细胞上皮-间质转化的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2019, 21(11): 1658-1662.
- [14] 房宇坤, 宁安红, 刘磊, 等. 山慈菇多糖的提取及其抗氧化作用的研究 [J]. 大连医科大学学报, 2017, 39(6): 527-531.
- [15] 孙玉莉, 王伟芹, 孙建光, 等. 尹常健教授治疗原发性肝癌临证用药特点 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(5): 448-449.
- [16] 李杨枝, 章程, 徐超, 等. 基于文献探讨国医大师辨治肺癌的经验总结 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2022, 4(2): 69-73.
- [17] 宋敬茹, 孙明瑜. 国医大师刘嘉湘扶正法辨治乳腺癌术后经验 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2020-2024.
- [18] Liu S B, Yang S T. Cardiovascular protective properties of gastrodin [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2022, 12(4): 141.
- [19] Tian S X, Cheng W, Lu J J, et al. Role of militarine in PM_{2.5}-induced BV-2 cell damage [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1423-1434.
- [20] Hasriadi, Wasana P W D, Sritularak B, et al. Batatasin III, a constituent of *Dendrobium scabrilingue*, improves murine pain-like behaviors with a favorable CNS safety profile [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(7): 1816-1825.
- [21] Yan X M, Tang B X, Liu M F. Phenanthrenes from *Arundina graminifolia* and in vitro evaluation of their antibacterial and anti-haemolytic properties [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(6): 707-710.
- [22] 崔保松, 宋杰, 李帅, 等. RP-HPLC 同时测定山慈菇药材中 dactylorhin A 和 militarine 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4347-4350.
- [23] 吕林锋, 蒋永海, 朱希, 等. 山慈菇 HPLC 指纹图谱质量评价 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(10): 1276-1280.
- [24] 杨红燕, 项微微, 李玲燕. HPLC 法指纹图谱在山慈菇真伪鉴别中的应用 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(1): 72-73.
- [25] 王静, 肖秋肖, 周祖英, 等. 基原为云南独蒜兰的山慈菇的化学成分鉴定与分析 [J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1165-1171.
- [26] 司函瑞. 山慈菇的化学成分及抗肝癌作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [27] 谢典, 朱聪, 潘红波, 等. HPLC 法同时测定山慈菇中 3 种成分 [J]. 中成药, 2022, 44(6): 2050-2053.

[责任编辑 时圣明]