

基于 HPLC 指纹图谱及化学模式识别的山慈菇（冰球子）及其潜在代用品的鉴定研究

张超¹, 高一军², 孙启慧¹, 郭衍珩³, 刘延娟³, 容蓉^{1*}, 赵丹彤^{1,4*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 菏泽市立医院药学部, 山东 菏泽 274031

3. 菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东 菏泽 274000

4. 菏泽医学专科学校, 山东 菏泽 274000

摘要: 目的 建立山慈菇 *Pleiones Pseudobulbus* (冰球子) 及其潜在代用品的 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别寻找山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的差异性成分, 筛选山慈菇 (冰球子) 最佳代用品。方法 使用乙腈-0.1%磷酸水溶液作流动相进行梯度洗脱, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 224 nm, 进样量 25 μL, 柱温为 30 °C, 体积流量为 0.8 mL/min, 建立 40 批样品 HPLC 指纹图谱, 结合相似度评价、特征图谱、聚类热图分析、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) 对特征成分进行数据分析。结果 40 批样品共有 5 个共有峰, 经对照品比对指认出了 5 个成分, 分别为天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin A、militarine、山药素 III。聚类热图和 PCA 分析结果可将山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品进行区分, 并结合相似度评价, 初步判断带唇兰 *Tainia dunnii* 为山慈菇 (冰球子) 最佳代用品。不同基原样品的 HPLC 典型特征图谱结合 OPLS-DA 分析与 PCA 分析, 筛选出山慈菇 (冰球子) 正品基原与其潜在代用品的主要差异性指标成分为 loroglossin、dactylorhin A 和 militarine。结论 建立的指纹图谱结合化学模式识别方法可用于山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的区分及山慈菇 (冰球子) 最佳代用品的筛选。**关键词:** 山慈菇 (冰球子); 指纹图谱; 相似度; 化学模式识别; 代用品; 天麻素; 对羟基苯甲醇; dactylorhin A; militarine; 山药素 III

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4419-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.024

Identification of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition

ZHANG Chao¹, GAO Yijun², SUN Qihui¹, GUO Yanheng³, LIU Yanjuan³, RONG Rong¹, ZHAO Dantong^{1,4}

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Department of Medicine, Heze Municipal Hospital, Heze 274031, China

3. Heze Institute for Food and Drug Control, Heze 274000, China

4. Heze Medical College, Heze 274000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes, and combine with chemical pattern recognition to identify the differential components of Bing qiu zi and potential substitutes, so as to screen for the best substitutes of Bing qiu zi. **Methods** Gradient elution was performed using acetonitrile-0.1% phosphate acid water as the mobile phase, HPLC was used with Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the detection wavelength was 224 nm, the injection volume was 25 μL, the column temperature was 30 °C, and the flow rate was 0.8 mL/min. HPLC fingerprint of 40 batches of samples was established, and the data of characteristic components was analyzed by combining similarity evaluation, HPLC specific chromatogram, cluster heatmap analysis, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** There were a

收稿日期: 2025-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8227439); 国家中医药综合改革示范区科技共建项目 (GZY-KJS-SD-2024-059); 山东省中药标准物质研究项目 (2022-SDY0022); 郗文起全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2024] 255 号); 全国名老中医药专家蒋立昶传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2022] 75 号)

作者简介: 张超 (1998—), 男, 在读硕士研究生, 专业方向为中药质量控制。E-mail: 13256508295@163.com

*通信作者: 容蓉, 女, 教授, 博士生导师, 博士, 从事中药及复方活性成分与质量控制。E-mail: rosierong@163.com

赵丹彤, 女, 主任药师, 硕士生导师, 博士, 从事中药质量控制与研究。E-mail: dantongzhao2020@163.com

total of five common peaks in 40 batches of samples. After comparison with the reference substances, five components were identified, namely, gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, dactylorhin A, militarine and batatasin III. The cluster heatmap analysis and PCA analysis results can distinguish between Bing qiu zi and potential substitutes, and combined with similarity evaluation, it was preliminarily determined that *Tainia dunnii* Rolfe was the best substitute for Bing qiu zi. OPLS-DA analysis combined with HPLC specific chromatogram and PCA analysis identified the differential components of Bing qiu zi and potential substitutes as loroglossin, dactylorhin A and militarine. **Conclusion** The fingerprint established in this study, combined with chemical pattern recognition methods, can be used to distinguish between Bing qiu zi and potential substitutes, as well as to screen for the best substitute of Bing qiu zi.

Key words: *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi); fingerprint; similarity; chemical pattern analysis; substitutes; gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol; dactylorhin A; militarine; batatasin III

山慈菇作为我国常用的传统中药,始载于唐代著作《本草拾遗》:“山慈菇根,有小毒”,根据谢宗万先生的考证,在《本草拾遗》中记载的山慈菇基原为兰科植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino^[1]。自1990年版起,《中国药典》规定山慈菇基原有3种,分别为兰科植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 和云南独蒜兰 *P. yunnanensis* Rolfe 的干燥假鳞茎,前者习称“毛慈菇”,后者习称“冰球子”。山慈菇主要功效为化痰散结、清热解毒,主要用于治疗瘰疬痰核、痈肿疔毒、癭瘤痞块等疾病^[2]。现代药理学的研究证明,山慈菇含有多种活性成分,这些成分具有抗肿瘤^[3-5]、保护神经^[6]、调脂降糖^[7-8]及抗氧化^[8-9]等多种药理学作用。

近年来,由于生态环境恶化、栽培条件苛刻、产地稀缺以及临床需求量的快速增长等原因,山慈菇的市场需求和价格不断攀升,现均价已达2500~4000元/kg^[10],仅靠现有的资源难以满足临床需求,市场长期存在以筒瓣兰 *Anthogonium gracile* Lindl.、秋花独蒜兰 *Pleione maculate* (Lindl.) Lindl.、带唇兰 *Tainia dunnii* Rolfe 等混淆品代替冰球子使用的情况。同时兰科独蒜兰属所有物种及杜鹃兰属杜鹃兰均被列入《国家重点保护野生植物名录》,部分品种也被《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》列为“濒危”(EN)和“易危”(VU)级别,该品种药用资源亟须扩大和深入研究^[11]。

肖培根院士在1978年提出了“亲缘关系相近的植物具有类似的化学成分”的亲缘关系理论,并借助这个理论发现了如云南马钱、白木香等接近进口药的国产资源^[12-13]。借助亲缘关系理论,兰科独蒜兰属植物以及筒瓣兰属和带唇兰属植物均具有成为山慈菇代用品的潜力。基于此,本研究拟对山慈菇(冰球子)及其潜在代用品进行指纹图谱的研究,结合化学模式识别分析,对所收集的样品成为

山慈菇(冰球子)代用品的可能性进行评估。

中药指纹图谱具有2个特点——模糊性和整体性。这两个特点使其能够对中药内在质量进行综合性地评估,同时对中药整体质量进行全面的控制,是一种国际上认可度较高的控制天然药材或中药质量的技术方法^[14-16]。本研究拟建立山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的HPLC指纹图谱,并结合聚类热图分析、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 discrimination analysis, OPLS-DA)等化学计量学分析方法^[17-18],寻找山慈菇(冰球子)的潜在代用品,并筛选山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的差异性指标成分,从化学成分的角度阐明两者的质量特征,为挖掘潜在的山慈菇(冰球子)质量标志物提供参考,以期如山慈菇(冰球子)药材质量控制体系的完善提供依据^[19]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);色谱柱Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国Agilent公司);KQ-500DE型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D型十万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);YF-116B型中药材粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司)。

1.2 材料

对照品 militarine(批号112061-202102,质量分数≥98%)、对羟基苯甲醇(批号111970-201702,质量分数≥98%)、天麻素(批号110807-202010,质量分数≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;对照品 dactylorhin A(批号DSTDD023301,质量分数≥98%)、山药素 III(批号DST220923-357,质量分数≥98%)、3,4-二甲氧基-2,7-菲二醇(批号DST231020-096,质量分数≥98%)、手参苷IX(批

号 DST230922-447, 质量分数 $\geq 96\%$)均购自德斯特生物科技有限公司; 对照品 loroglossin(批号 120300-202309, 质量分数 $\geq 97\%$)购自上海鸿永生物科技有限公司; 对照品 4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲对照品(批号 MUST-23092927, 质量分数 $\geq 98.13\%$)、monbarbatain A(批号 MUST-23082104, 质量分数 $\geq 99.20\%$)、手参苷VII(批号 MUST-23092925, 质量分数 $\geq 96.03\%$)、白及联菲 A(批号 MUST-23042514, 质量分数 $\geq 99.45\%$)均购自成都曼斯特生物科技有限公司。乙腈(Thermo Fisher Scientific, 美国)、磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)均为色谱纯,

水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

共收集 40 批样品。经菏泽医学专科学校赵丹彤教授鉴定, 批次 S1~S13 为兰科植物独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 的干燥假鳞茎, S14~S19 为兰科植物云南独蒜兰 *P. yunnanensis* (Rolfe) Rolfe 的干燥假鳞茎, S20~S24 为兰科植物秋花独蒜兰 *P. maculata* (Lindl.) Lindl 的干燥假鳞茎, S25~S35 为兰科植物筒瓣兰 *Anthogonium gracile* Lindl 的干燥假鳞茎, S36~S40 为兰科植物带唇兰 *Tainia dunnii* Rolfe 的干燥假鳞茎, 具体样品来源信息见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

| 样品编号 | 品种 | 植物分类 | 批号或采收期 | 来源地 |
|------|------------|--------|----------|-----------|
| S1 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G2106022 | 山东一方有限公司 |
| S2 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G2107045 | 山东一方有限公司 |
| S3 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 240803 | 山东百味堂有限公司 |
| S4 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S5 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G1806028 | 山东一方有限公司 |
| S6 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G1904018 | 山东一方有限公司 |
| S7 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G1908144 | 山东一方有限公司 |
| S8 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S9 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S10 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S11 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G2307041 | 山东一方有限公司 |
| S12 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2307006 | 安国聚药堂有限公司 |
| S13 | 独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-07 | 亳州市场 |
| S14 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2023-08 | 云南大理 |
| S15 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2023-08 | 云南丽江 |
| S16 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2023-08 | 亳州市场 |
| S17 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | G2406008 | 山东一方有限公司 |
| S18 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S19 | 云南独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S20 | 秋花独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2023-08 | 亳州市场 |
| S21 | 秋花独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2023-08 | 成都荷花池市场 |
| S22 | 秋花独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 云南保山 |
| S23 | 秋花独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S24 | 秋花独蒜兰 | 兰科独蒜兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S25 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2022-07 | 云南文山 |
| S26 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S27 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S28 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S29 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2023-04 | 成都荷花池市场 |
| S30 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2023-08 | 安国市场 |
| S31 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2023-08 | 安国市场 |
| S32 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S33 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S34 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S35 | 筒瓣兰 | 兰科筒瓣兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S36 | 带唇兰-母球(干瘪) | 兰科带唇兰属 | 2022-07 | 亳州市场 |
| S37 | 带唇兰 | 兰科带唇兰属 | 2023-08 | 舜王城市场 |
| S38 | 带唇兰 | 兰科带唇兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S39 | 带唇兰 | 兰科带唇兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |
| S40 | 带唇兰 | 兰科带唇兰属 | 2024-05 | 亳州市场 |

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 称取“1.2”项下 40 批样品药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密移取 50%乙醇 25 mL, 称定质量后超声处理(功率 300 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 再次称定质量, 并用 50%乙醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取适量天麻素、对羟基苯甲醇、loroglossin、dactylorhin A、militarine、3,4-甲氧基-2,7-菲二醇、4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲、手参苷IX、手参苷VII、白及联菲 A、山药素 III 和 monbarbatin A, 加入 50%乙醇制成上述 12 个成分质量浓度分别为 4.83、5.13、4.66、5.04、4.98、4.48、4.91、6.12、5.71、4.95、5.49、4.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

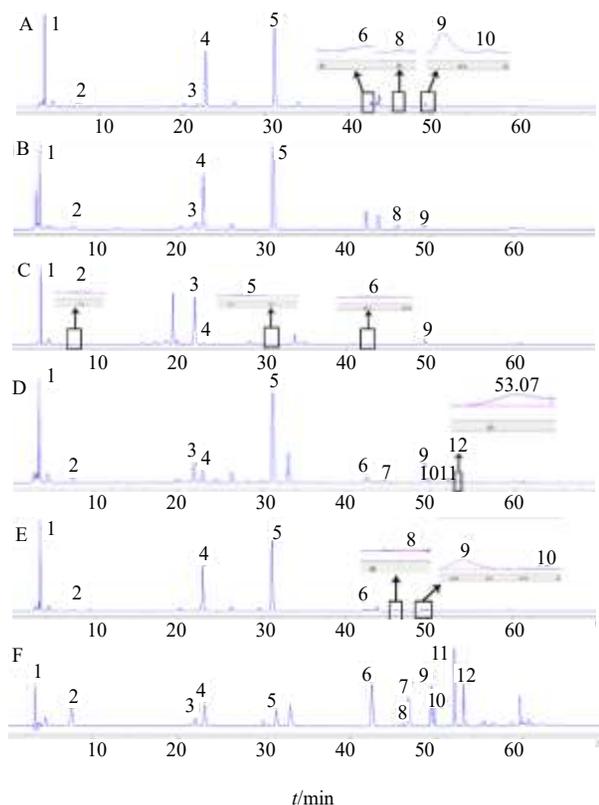
色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 10%~15%A; 10~15 min, 15%~20%A; 15~35 min, 20%~30%A; 35~45 min, 30%~42%A; 45~55 min, 42%~60%A; 55~56 min, 60%~90%A; 56~70 min, 90%A), 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 25 μL , 在 224 nm 的波长下进行样品测定。5 种不同基原样品及混合对照品的 HPLC 典型特征图谱见图 1。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 参照峰的选择 5 号峰对称性好、保留时间位于所有色谱峰中间位置, 并且该峰与相邻色谱峰的分度良好、出峰稳定, 符合参照峰的选择标准, 故选择 5 号峰作为参照峰。

2.3.2 精密度试验 取独蒜兰 S1 样品药材 1 份, 精密称定, 按“2.1.1”项下的制备方法制备, 按“2.2”项下的色谱条件重复进样 6 次, 测定各特征色谱图, 以 5 号峰作为参照峰, 计算出各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.11%~0.26%、相对峰面积的 RSD 在 0.53%~2.00%。

2.3.3 重复性试验 取独蒜兰 S1 样品药材同一批次 6 份, 精密称定, 按“2.1.1”项下的制备方法制备, 按“2.2”项下的色谱条件测定, 以 5 号峰作为参照峰, 计算出各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.09%~0.86%、相对峰面积的 RSD 在 1.33%~1.94%。



1-天麻素; 2-对羟基苯甲醇; 3-loroglossin; 4-dactylorhin A; 5-militarine; 6-4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲; 7-3,4-二甲氧基-2,7-菲二醇; 8-手参苷IX; 9-山药素 III; 10-手参苷VII; 11-白及联菲 A; 12- monbarbatin A。
1-gastrodin; 2-4-hydroxyphenylethyl alcohol; 3-loroglossin; 4-dactylorhin A; 5-militarine; 6-7-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5-diol; 7-3,4-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol; 8-gymnoside IX; 9-batatasin III; 10-gymnoside VII; 11-blestriarene A; 12-monbarbatin A.

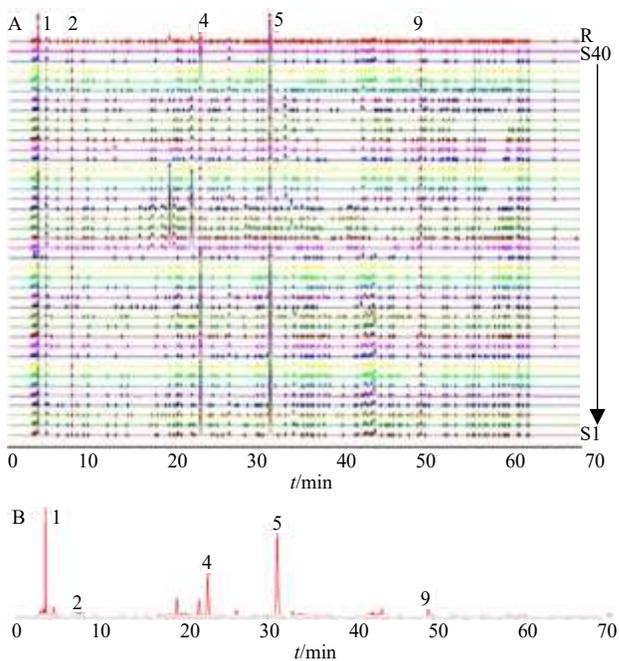
图 1 独蒜兰 (A)、云南独蒜兰 (B)、秋花独蒜兰 (C)、筒瓣兰 (D)、带唇兰 (E) 和混合对照品 (F) 的 HPLC 典型特征图谱

Fig. 1 HPLC specific chromatogram of *Pleione bulbocodioides* (A), *P. yunnanensis* (B), *P. maculata* (C), *Anthogonium gracile* (D), *Tainia dunnii* (E) and mixed reference substance (F)

2.3.4 稳定性试验 取独蒜兰 S1 样品药材末 1 份, 精密称定, 按“2.1.1”项下的方法制备, 按“2.2”项下的色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 检测, 测定各特征色谱图, 以 5 号峰作为参照峰, 计算出各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.14%~0.26%, 相对峰面积的 RSD 在 0.58%~1.40%。

2.3.5 HPLC 的指纹图谱生成 将 40 批样品, 按“2.1.1”项下的方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下的色谱条件检测, 得到的图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012)软件进行分析处理, 以 S1 号独蒜兰样品的色谱图做为参照图谱,

采用平均数法,时间窗宽度为0.5,多点校正后采用全谱峰匹配,生成对照图谱和样品叠加指纹图谱,如图2所示。将软件生成的匹配结果与空白溶剂进行比对筛选,40批样品共有5个共有峰,与混合对照品进行比对,指认了5个共有峰,分别为天麻素(1号峰)、对羟基苯甲醇(2号峰)、dactylorhin A(4号峰)、militarine(5号峰)、山药素III(9号峰),指纹图谱与对照指纹图谱见图2。



1-天麻素; 2-对羟基苯甲醇; 4-dactylorhin A; 5-militarine; 9-山药素 III。

1-gastrodin; 2-4-hydroxyphenylethyl alcohol; 4-dactylorhin A; 5-militarine; 9-batatasin III.

图2 山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的HPLC指纹图谱(A)和对照指纹图谱(B)

Fig. 2 HPLC fingerprints of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes (A) and mixes and contrast (B)

表2 山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的HPLC指纹图谱相似度结果

Table 2 HPLC fingerprint similarity results of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes

| 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.971 | S11 | 0.962 | S21 | 0.306 | S31 | 0.843 |
| S2 | 0.974 | S12 | 0.951 | S22 | 0.297 | S32 | 0.905 |
| S3 | 0.963 | S13 | 0.943 | S23 | 0.298 | S33 | 0.887 |
| S4 | 0.966 | S14 | 0.933 | S24 | 0.292 | S34 | 0.904 |
| S5 | 0.958 | S15 | 0.973 | S25 | 0.896 | S35 | 0.910 |
| S6 | 0.953 | S16 | 0.965 | S26 | 0.865 | S36 | 0.829 |
| S7 | 0.962 | S17 | 0.924 | S27 | 0.935 | S37 | 0.969 |
| S8 | 0.950 | S18 | 0.881 | S28 | 0.903 | S38 | 0.971 |
| S9 | 0.963 | S19 | 0.937 | S29 | 0.917 | S39 | 0.966 |
| S10 | 0.969 | S20 | 0.344 | S30 | 0.883 | S40 | 0.965 |

2.3.6 相似度评价 40批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度为0.292~0.974,其中独蒜兰(S1~S14)和云南独蒜兰(S15~S19)作为冰球子的2个基原,相似度相对较高,为0.881~0.974,秋花独蒜兰(S20~S24)的相似度较低,为0.292~0.344,筒瓣兰(S25~S35)的相似度略低,为0.843~0.935,带唇兰(S36~S40)相似度为0.829~0.971,见表2。

2.4 山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的化学模式识别

2.4.1 聚类热图分析 将40批样品的12种成分的峰面积测定结果数据导入Originpro 2022,选择“平均”法,设置距离度量为“Euclidean”,绘制聚类热图(图中,颜色由红到蓝代表峰面积由小到大)。结果显示,40批样品可聚为4类:其中S1~S13(独蒜兰)、S14~S19(云南独蒜兰)、S37~S40(带唇兰)可聚为一类,这19批样品的dactylorhin A(4号峰)和militarine(5号峰)峰面积均较高;S25~S35(筒瓣兰)可聚为一类,这11批样品仅Militarine(5号峰)峰面积较高,其余成分峰面积均较低;S36(带唇兰-母球)单独聚为一类,这批样品的天麻素(1号峰)和Militarine(5号峰)的峰面积均较高;S20~24(秋花独蒜兰)聚为一类,这5批样品的天麻素(1号峰)和Loroglossin(3号峰)峰面积均较高。结果见图3。表明山慈菇(冰球子)及其部分潜在代用品之间的化学成分含量有明显差异,HPLC指纹图谱结合聚类热图分析可以初步区分山慈菇(冰球子)及其潜在代用品,并从中寻找合适的潜在代用品。

2.4.2 PCA 通过SIMCA 14.1软件,对山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的12个特征成分(含5个共有峰)进行PCA分析。可以通过分析得分图中不

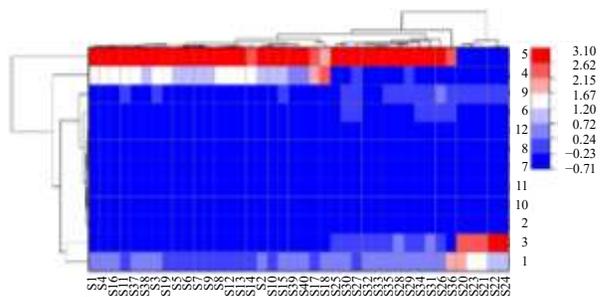


图3 山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的聚类热图
Fig. 3 Cluster heatmap of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes

同样品的离散程度看出各样品之间的区别。40批山慈菇(冰球子)样品及其潜在代用品的得分图和载荷图见图4。所建模型的 R^2X_{cum} 为0.997, Q^2 为0.613, 且 R^2X_{cum} 和 Q^2 均大于0.5, 表明该模型可信度良好。

PCA分析结果显示, 5种基原样本分布在不同象限区域, 独蒜兰、云南独蒜兰以及部分带唇兰聚成一类, 秋花独蒜兰和筒瓣兰聚类良好, 结果见图4-A。载荷图中成分点与原点之间的距离越大, 说明此成分在对样品的差异性影响中占比越大, 载荷图分析结果显示: 色谱峰11、6、4、8应的成分对

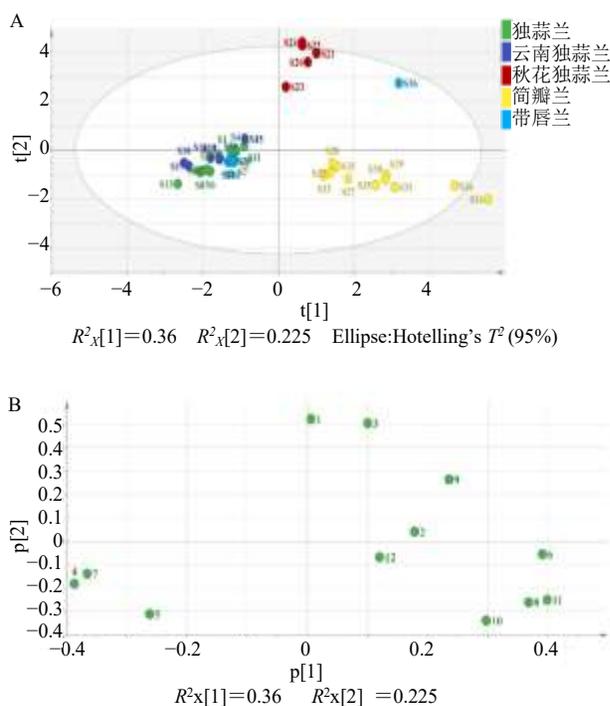


图4 40批山慈菇(冰球子)PCA(A)和12个特征成分的PCA载荷图(B)

Fig. 4 PCA of 40 batches of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes (A) and PCA loading plot of 12 characteristic components (B)

p[1]的影响较大; 色谱峰1、3、5、10对p[2]影响较大, 结果见图4-B。

2.4.3 OPLS-DA OPLS-DA是一种有监督的判别分析方法。 R^2X_{cum} 、 R^2Y_{cum} 分别表示对模型中X、Y变量的解释度, Q^2 表征模型的预测能力, 三者的值代表模型的拟合程度。在PCA分析的基础上进一步进行OPLS-DA分析, 建模结果显示, R^2X_{cum} 为0.846, R^2Y_{cum} 为0.728, Q^2_{cum} 为0.600。OPLS-DA得分图中山慈菇(冰球子)及其潜在代用品可很好的区分, 其中带唇兰与独蒜兰及云南独蒜兰分布接近, 结合PCA得分图, 初步推断带唇兰可能是山慈菇(冰球子)的潜在代用品, 结果见图5-A。

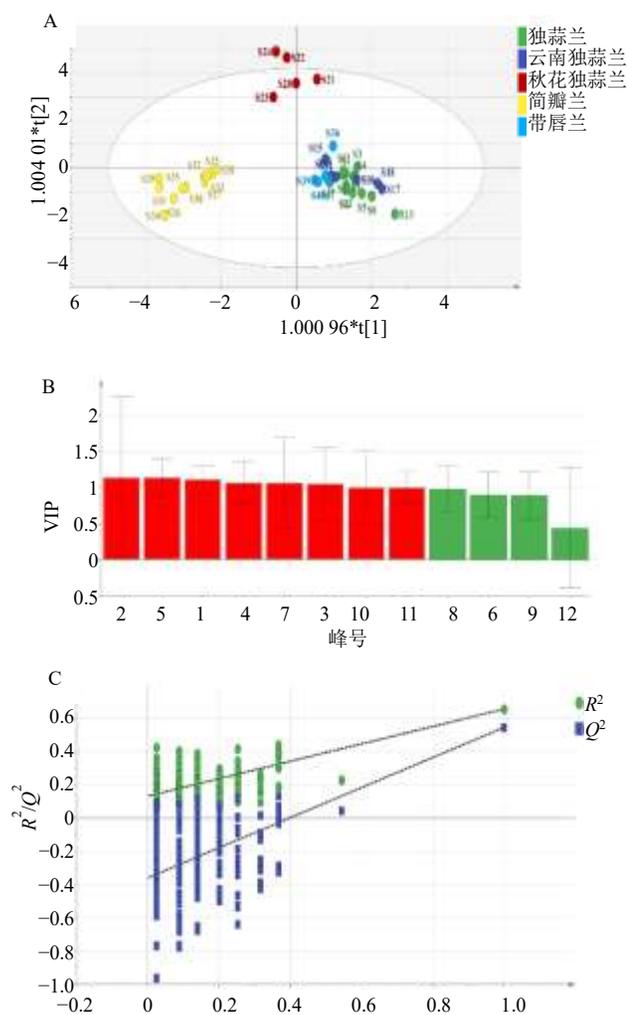


图5 40批山慈菇(冰球子)OPLS-DA得分图(A)、12个特征成分VIP图(B)及OPLS-DA模型置换检验结果(C)

Fig. 5 OPLS-DA score plot of 40 batches of *Pleiones Pseudobulbus* (Bing qiu zi) and potential substitutes (A), VIP value of 12 characteristic components (B) and OPLS-DA model permutation test results (C)

变量投影重要度 (variable importance for the projection, VIP) 表示投影变量的重要性, 即色谱峰对应的成分在建模中的重要程度^[20], 将 $VIP > 1.00$ 作为参照, 筛选出了 8 个成分, 分别是峰 2、5、1、4、7、3、10、11, 对应成分为对羟基苯甲醇、militarine、天麻素、dactylorhin A、3,4-二甲氧基-2,7-菲二醇、loroglossin、手参苷 VII 和白及联菲 A, 表明这 8 个成分对山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的贡献较大, 可能是山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的差异性指标成分, 结果见图 5-B。

为了防止 OPLS-DA 建模过程中出现过度拟合现象, 因此对模型内部进行 200 次置换检验分析, 结果显示 R^2 、 Q^2 回归线的截距均小于原始值, 分别是 0.061 6、-0.418, 表明模型科学稳定, 结果见图 5-C。

3 讨论

3.1 色谱条件筛选

中药指纹图谱现广泛应用于中药材鉴定和中药制剂质量控制, 是一种多指标的质量控制模式^[21]。本研究前期考察了 4 种不同检测波长条件下的指纹图谱情况, 结果表明在 224 nm 波长下检测的 40 批山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品色谱图中色谱峰较多且峰型对称性较好, 确定检测波长为 224 nm 作为后续实验的测定条件。另外又对 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Zafex ZY-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 2 种色谱柱的分离效果进行了评估, 结果显示 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对于各成分的分离效果较好, 故本实验选择 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱。

3.2 典型特征峰识别与指纹图谱相似度评价

对 40 批山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品进行典型特征图谱的测定, 结果如图 1 所示, 不同基原样本间的特征图谱存在着显著差异, 可作为区分鉴别山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的主要依据。对结果进行分析, 发现 loroglossin (3 号峰) 仅在秋花独蒜兰 (图 1-C) 中的占比较高, 在带唇兰中 (图 1-E) 未检测到该成分, 在其余样品中占比较低; dactylorhin A (4 号峰) 在独蒜兰 (图 1-A)、云南独蒜兰 (图 1-B) 和带唇兰 (图 1-E) 中占比较高, 在秋花独蒜兰 (C) 与筒瓣兰 (图 1-D) 中的占比较低; militarine (5 号峰) 仅在秋花独蒜兰 (图 1-C) 中占比较低, 在其余样品中均占比较高; 3,4-二甲氧

基-2,7-菲二醇 (7 号峰) 仅在筒瓣兰 (图 1-D) 中能检测到。该结果提示 loroglossin、dactylorhin A 和 militarine 3 个成分可作为山慈菇 (冰球子) 正品与其余 3 种基原混用品之间差异性成分, 是区分山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的重要依据。同时, 进一步分析可知 5 种基原间特征图谱中主要特征差异峰为 3、4、5、7 号, 可作为山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品鉴别的指标。

指纹图谱相似度评价结果显示, 40 批样品共有 5 个共有峰, 与对照指纹图谱的相似度为 0.292~0.974, 说明相似度差异较大, 其中秋花独蒜兰 (S20~S24) 与对照指纹图谱和其他 35 批药材的相似度均为最低, 说明秋花独蒜兰与山慈菇 (冰球子) 药材化学成分存在较大差异。独蒜兰 (S1~S13) 和云南独蒜兰 (S15~S19) 2 个基原药材相似度为 0.881~0.974, 说明山慈菇 (冰球子) 2 个正品基原间的差异相对较小, 质量较稳定。秋花独蒜兰 (S20~S24) 相似度较低, 其植物学特征 (秋天开花) 也跟其余 4 种春花兰科基原样本差异较大。筒瓣兰 (S25~S35) 与对照指纹图谱的相似度为 0.843~0.935; 除带唇兰-母球 (S36) 外, 其余带唇兰 (S37~S40) 样品与对照指纹图谱的相似度均大于 0.96。根据上述相似度评价结果, 初步推测筒瓣兰和带唇兰具有成为山慈菇 (冰球子) 潜在代用品的潜力。

3.3 化学计量学分析

本研究采用聚类热图分析、PCA、OPLS-DA 等方法对山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品, 从化学成分的角度进行分析和评价, 成功挖掘出能够良好区分山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的差异性成分并初步推测出可作为山慈菇 (冰球子) 的最佳代用品, 为山慈菇 (冰球子) 及其近缘植物的质量评价以及潜在代用品的挖掘提供了一定的依据。

聚类热图分析结果显示, 40 批样品可聚为 4 类: 其中 S1~S13 (独蒜兰)、S14~S19 (云南独蒜兰)、S37~S40 (带唇兰) 可聚为一类; S25~S35 (筒瓣兰) 可聚为一类; S36 (带唇兰) 聚为一类; S20~24 (秋花独蒜兰) 聚为一类。其聚类趋势与相似度计算结果基本一致, 这为山慈菇 (冰球子) 的质量评价和潜在代用品的发现提供了一定的技术保障。

结合山慈菇 (冰球子) 及其潜在代用品的特征图谱以及 PCA 载荷图与 OPLS-DA 模型的 VIP 图分析, loroglossin (3 号峰)、dactylorhin A (4 号峰)

和 *militarine* (5号峰) 3个成分可能是山慈菇(冰球子)及其潜在代用品中的差异性指标成分。PCA和OPLS-DA结果也可以将山慈菇(冰球子)及其潜在代用品明显区分,其中PCA分析中,S36偏离带唇兰群,分析原因可能是其中的天麻素(峰1)、山药素III(峰9)等特征成分含量大于其他带唇兰样品,而 *dactylorhin A* 的含量明显小于其他带唇兰。经鉴定,S36为带唇兰衰老后的母球样本(在生长过程中,母球将营养物质传递给子球,供子球开花而后衰老),进一步提示应对中药材采收时期及商品规格进行规范,以确保样品批次间均一性。OPLS-DA分析结果表明,所有带唇兰与独蒜兰及云南独蒜兰样本分布接近,S36未偏离带唇兰群。通过PCA和OPLS-DA分析,进一步结合指纹图谱相似度评价结果,推断带唇兰可作为山慈菇(冰球子)的潜在代用品。

综上,本研究首次建立了兰科不同属的40批山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的HPLC指纹图谱,标定了5个共有峰,并采用对照品指认了其中5个色谱峰,分别为天麻素、对羟基苯甲醇、*dactylorhin A*、*militarine*、山药素III。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对40批样品进行相似度评价,初步推测本研究所收集的筒瓣兰和带唇兰具有成为山慈菇(冰球子)代用品的潜力。将40批山慈菇(冰球子)及其潜在代用品的12个特征成分的峰面积为变量,进行化学模式识别分析,结合特征图谱分析结果,loroglossin(3号峰)、*dactylorhin A*(4号峰)和 *militarine*(5号峰) 3个成分可能是山慈菇(冰球子)及其潜在代用品中的差异性指标成分;并将化学模式识别结果结合指纹图谱相似度分析,推断带唇兰可作为山慈菇(冰球子)的潜在代用品。本研究所建立的山慈菇(冰球子)及其潜在代用品HPLC指纹图谱和化学模式识别,科学地筛选出了可能成为山慈菇(冰球子)代用品的中药品种以及潜在的质量标志物,可用于山慈菇(冰球子)及其近缘植物的质量控制,为山慈菇(冰球子)的资源开发与利用提供了参考和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊兴军. 山慈菇源流考 [J]. 中药材, 2009, 32(1): 146-147.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 34.

- [3] 程清波, 杨艳萍, 王滢, 等. 山慈菇对肝癌细胞凋亡和上皮间质转化的影响 [J]. 中医学报, 2021, 36(10): 2202-2207.
- [4] 刘婷婷, 于栋华, 刘村民. 山慈菇的本草考证及现代研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(24): 3055-3059.
- [5] 刘颖, 马丽杰, 董欣敏, 等. 山慈菇正丁醇提取物对NR8383细胞分泌的IL-1 β 和TNF- α 水平的影响 [J]. 科学技术与工程, 2019, 19(24): 93-97.
- [6] 王洋, 唐娟, 孙鹏, 等. 山慈菇提取物对人结直肠癌SW480细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(11): 1754-1758.
- [7] 林松, 高欢, 张帅, 等. 杜鹃兰化学成分及神经保护活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3779-3786.
- [8] 孟海波. 山慈菇多糖的抗氧化及降脂作用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [9] 张冉, 刘泉, 申竹芳, 等. 应用 α -葡萄糖苷酶抑制剂高通量筛选模型筛选降血糖中药 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(10): 740-743.
- [10] 郝壮壮, 曹宇欣, 刘朦朦, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1935-1945.
- [11] Zhang W, Zhang L F, Deng Y, et al. Chemical constituents of species in the genus *Pleione* (Orchidaceae) and the implications from molecular phylogeny [J]. *Chem Biodivers*, 2021, 18(1): e2000870.
- [12] 肖培根. 植物亲缘关系、化学成分和疗效间的联系性 [J]. 中国药学杂志, 1978, 13(1): 1-5.
- [13] 陈四保, 彭勇, 陈士林, 等. 药用植物亲缘学 [J]. 世界科学技术, 2005, 7(6): 97-103.
- [14] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [15] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, et al. Comparison on HPLC fingerprints between *fraxini cortex* and its eye drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [16] 付鹏, 李江, 李娇, 等. 七龙天胶囊 HPLC 指纹图谱研究及4种成分的含量测定 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1594-1597.
- [17] 何子骥, 伍斌玺, 李雨昕, 等. 基于指纹图谱和化学模式识别分析的车前子与炒车前子质量评价 [J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1700-1705.
- [18] 王艺洁, 蒋佳丽, 陈彦洁, 等. 基于HPLC指纹图谱和多组分含量测定结合化学模式识别研究的龙眼核质量评价 [J]. 中南药学, 2024, 22(4): 1059-1064.
- [19] 胡孔兴, 何鹏, 张萍, 等. 基于UPLC指纹图谱及含量测定结合化学模式识别法比较不同产地枇杷花的差异 [J]. 中南药学, 2024, 22(4): 1053-1058.
- [20] 陈琳, 唐志书, 刘妍如, 等. UPLC指纹图谱结合化学模式识别评价白芷药材质量 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1697-1703.
- [21] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.

[责任编辑 时圣明]