

天麻中 9 种成分的含量测定及野生与栽培品的差异成分分析

裴文菡¹, 李思雨², 宋欢洁², 虞小静², 张慧^{2*} (1.澳门科技大学中医药学院, 中国澳门 999078; 2.辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

摘要: 目的 采用 HPLC 建立同时测定天麻中 9 种成分含量的方法, 并结合化学模式识别技术, 分析可区分野生和栽培天麻的差异成分。方法 采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 以 270 nm 为检测波长, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 对 20 批野生和栽培天麻中的天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、原儿茶酸、香兰素共 9 种成分进行含量测定, 并采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)筛选可区分野生和栽培天麻的差异成分。结果 9 种成分在各自的浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数 $r \geq 0.999 0$, 平均加样回收率在 97.65%~99.49%, RSD 在 1.01%~2.19%; 不同批次天麻中 9 种成分含量差异较大, 其中野生品中天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、香兰素、对羟基苯甲醛含量均明显高于栽培品; 构建的 PCA 模型可将野生和栽培天麻分为两大类, PLS-DA 分析筛选出可区分野生和栽培天麻的 3 个差异成分, 分别为对羟基苯甲醛、原儿茶酸和香兰素。结论 建立的测定方法重复性好, 专属性强, 稳定可行, 同时确定了可区分野生与栽培天麻的 3 个差异成分, 为天麻的质量控制提供依据。

关键词: 天麻; 成分; 含量测定; 野生品; 栽培品; 差异成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)18-2347-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.008

引用本文: 裴文菡, 李思雨, 宋欢洁, 等. 天麻中 9 种成分的含量测定及野生与栽培品的差异成分分析[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2347-2353.

Content Determination of Nine Components in Gastrodiae Rhizoma and Analysis of Different Components Between Wild and Cultivated Species

PEI Wenhan¹, LI Siyu², SONG Huanjie², YU Xiaojing², ZHANG Hui^{2*} (1.Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; 2.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of nine components in Gastrodiae Rhizoma by HPLC, and to analyze the different components between wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma by chemical pattern recognition technology. **METHODS** Gradient elution was carried out on Phenomenex C₁₈ column using acetonitrile-0.1% formic acid water as mobile phase. The detection wavelength was set at 270 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The contents of gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde, parisin A, parisin B, parisin C, parisin E, protocatechuic acid and vanillic aldehyde in 20 batches of wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma were determined. Principal component analysis(PCA) and partial least squares-discriminant analysis(PLS-DA) were used to screen the difference components between wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma. **RESULTS** The linearity of the nine components in the concentration range was good, the correlation coefficient $r \geq 0.999 0$. The average recoveries were 97.65%~99.49% and RSD was 1.01%~2.19%. The contents of 9 components in different batches of Gastrodiae Rhizoma were significantly different, among which the contents of gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, protocatechuic acid, vanillic aldehyde and *p*-hydroxybenzaldehyde in wild varieties were significantly higher than those in cultivated varieties. PCA model was established to classify wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma into two categories. PLS-DA analysis screened out 3 different components that could distinguish wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma, namely, *p*-hydroxybenzaldehyde, protocatechuic acid and vanillic aldehyde. **CONCLUSION** The established method has good repeatability, specificity, stability and feasibility, and 3 components which can distinguish wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma are confirmed, providing basis for quality control of Gastrodiae Rhizoma.

KEYWORDS: Gastrodiae Rhizoma; component; assay; wild species; cultivated species; different component

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* BL.的干燥块茎, 具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的

功效, 临床上用于治疗小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕、手足不遂、肢体麻木、风湿痹

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0431); 内蒙古自治区科技重大专项(2021SZD0030)

作者简介: 裴文菡, 女, 硕士生 E-mail: 1090947407@qq.com *通信作者: 张慧, 女, 博士, 教授 E-mail: syyycs@163.com

痛等症^[1],天麻主含酚及其苷类、多糖、有机酸、甾醇类等成分,主产于四川、云南、贵州、陕西等省,云南为其主要产区^[2]。

天麻为中国传统的名贵药材,临床应用广泛,因其野生资源匮乏,目前临床用药多以栽培品为主,但千年用药历史证实野生天麻质量优于栽培天麻,为此野生天麻价格昂贵,导致药材市场以栽培天麻冒充野生天麻的现象时有发生,现今区分天麻的野生品与栽培品的方法多以性状鉴定为主^[3-4],因该方法为感官评价,主观性强,且二者性状相似,有效区分野生和栽培天麻存在难度,为此亟须建立一种可客观、准确鉴别野生和栽培天麻的有效方法。近年来有关天麻的不同产地、加工方法等质量研究较多^[5-8],针对天麻野生品和栽培品的质量研究报道少见。

基于上述调查,本研究以多批次野生和栽培天麻为研究对象,采用 HPLC 建立同时测定天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、原儿茶酸、香兰素共 9 种成分的含量测定方法,并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 2 种化学模式识别技术,筛选可区分野生和栽培天麻的差异成分,以期为天麻的质量控制奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(四元泵, DAD 检测器,柱温箱,工作站,美国 Agilent); AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司); ME204E 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司); KQ-250D 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲酸(色谱纯,美国 Sigma 公司);水(纯净水,娃哈哈有限公司);对照品天麻素(批号:Y02M6K1)、对羟基苯甲醇(批号:A11A6L1)、对羟基苯甲醛(批号:Y02J7C15574)、巴利森苷 A(批号:P10O7F17625)、巴利森苷 B(批号:P11J7F17626)、巴利森苷 C(批号:P11J7F17625)、巴利森苷 E(批号:P10J8F28472)、原儿茶酸(批号:Z30M6L1)、香兰素(批号:J24A6R2696),均为含量测定用,购自上海源叶生物科技有限公司。

天麻药材样品 20 批,包括 14 批栽培品和 6 批野生品,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定均为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* BL.的干燥块茎,并参考《中药材商品规格等级标准汇编》将栽培品划分为不同等级,其中每公斤 ≤ 16 支为一等品,每公斤 ≤ 25 支为二等品,每公斤 ≤ 50 支为三等品,每公斤 > 50 支为四等品^[9],样品来源信息见表 1。

表 1 野生与栽培天麻样品来源信息

Tab. 1 Information of wild and cultivated *Gastrodiae* Rhizoma samples

编号	商品规格	品种	产地	采购地	收集时间
S1	一等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S2	一等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S3	一等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S4	一等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S5	二等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S6	三等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S7	四等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S8	一等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S9	二等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S10	三等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S11	四等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S12	一等品	栽培品	云南	安国	2017-09
S13	一等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S14	一等品	栽培品	云南	亳州	2017-03
S15	/	野生品	云南	亳州	2017-03
S16	/	野生品	云南	亳州	2017-03
S17	/	野生品	云南	亳州	2017-03
S18	/	野生品	云南	安国	2017-09
S19	/	野生品	西藏自治区	安国	2017-09
S20	/	野生品	四川	安国	2017-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Kinetex C₁₈ 100Å 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱条件为 0~5 min, 100%→97%B; 5~10 min, 97%B; 10~20 min, 97%→91%B; 20~28 min, 91%→90%B; 28~40 min, 90%→75%B; 40~50 min, 75%→10%B; 50~65 min, 10%B; 65~75 min, 10%→100%B;流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 25 °C,进样体积为 20 μL,检测波长为 270 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取 9 种对照品适量,分别加 50%乙醇制成 0.850 0 mg·mL⁻¹天麻素、0.055 40 mg·mL⁻¹对羟基苯甲醇、0.014 00 mg·mL⁻¹

原儿茶酸、 $0.4590\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 巴利森苷 E、 $0.005000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对羟基苯甲醛、 $0.005000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 香兰素、 $0.4900\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 巴利森苷 B、 $0.2840\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 巴利森苷 C、 $0.9240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 巴利森苷 A 的对照品储备液，精密量取各储备液 12.5 mL ，置 50 mL 量瓶中，加 50% 乙醇至刻度，摇匀， $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取天麻粉末(过 3 号筛)约 1 g ，精密称定，置 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇溶液 25 mL ，称定质量，超声处理(40 kHz ， 200 W) 30 min ，放冷，再称定质量，用 50% 乙醇补足减失的质量，滤过， $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，即得。

2.2.3 阴性空白溶液制备 取 50% 乙醇溶液作为阴性空白溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别精密量取“2.2”项下的对照品混合溶液、供试品溶液及 50% 乙醇的阴性空白溶液各 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，按“2.1”项下的色谱条件注入液相色谱仪，记录色谱图。结果显示，供试品溶液色谱图中可见与对照品混合溶液相同保留时间的 9 种成分的色谱峰，各成分分离度均 >1.5 ，阴性空白无干扰，理论板数以天麻素峰计 ≥ 3000 ，结果见图 1。

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2”项下对照品储备液，加 50% 乙醇制成稀释 1，2，4，8，16 倍的不同浓度的对照品混合溶液，再分别注入液相色谱仪进行分析，记录峰面积，分别以 9 种对照品的浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标(x)，峰面积为纵坐标(y)，绘制标准曲线，得到回归方程。结果显示，天麻中 9 种成分在测定的范围内相关系数 r 均 ≥ 0.999 ，在相应的浓度范围内线性关系良好，结果见表 2。

2.3.3 中间精密度考察 由 3 名不同实验人员，分别在 3 d，每人精密称定同一批次天麻粉末(S1)约 1 g 各 2 份，按“2.2”项下供试品溶液制备方法制备，按“2.1”项下色谱条件测定 9 种成分峰面积，计算含量及 6 份样品含量的 RSD。结果显示，天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、巴利森苷 E、对羟基苯甲醛、香兰素、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的 RSD 分别为 1.38% 、 1.83% 、 2.02% 、 1.59% 、 2.48% 、 1.87% 、 1.51% 、 1.57% 、 1.57% ，均 $<3\%$ ，表明精密度良好。

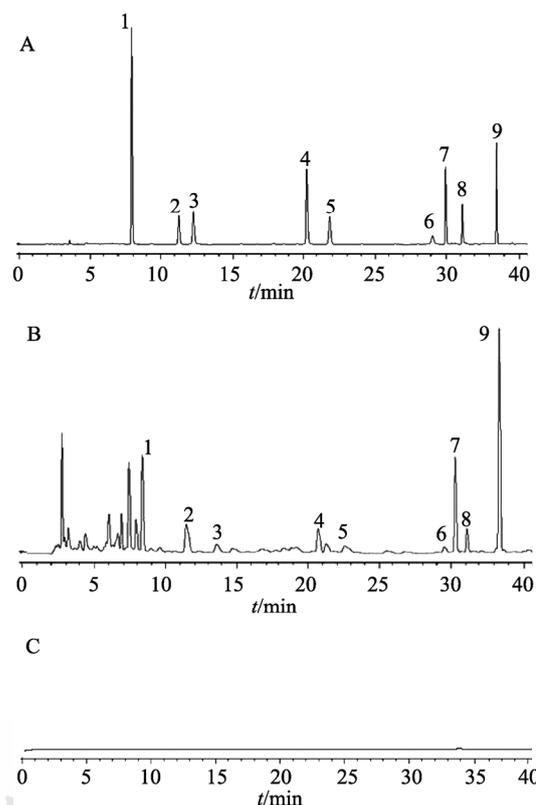


图 1 含量测定高效液相色谱图

A-对照品溶液；B-供试品溶液；C-阴性空白溶液；1-天麻素；2-对羟基苯甲醇；3-原儿茶酸；4-巴利森苷 E；5-对羟基苯甲醛；6-香兰素；7-巴利森苷 B；8-巴利森苷 C；9-巴利森苷 A。

Fig. 1 HPLC chromatograms of content determination

A-reference solution; B-samples solution; C-negative blank solution; 1-gastrodin; 2-*p*-hydroxybenzyl alcohol; 3-protocatechuic acid; 4-parishin E; 5-*p*-hydroxybenzaldehyde; 6-vanillic aldehyde; 7-parishin B; 8-parishin C; 9-parishin A.

表 2 9 种成分线性关系考察结果

Tab. 2 Investigation results of linear relationship of 9 components

测定成分	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性回归方程	相关系数 r
天麻素	0.053 1~0.850 0	$y=2\ 333.1x+12.267\ 0$	0.999 8
对羟基苯甲醇	0.003 5~0.055 4	$y=10\ 131.0x-21.580\ 0$	0.999 0
原儿茶酸	0.000 9~0.014 0	$y=44\ 417.0x-2.379\ 2$	0.999 8
巴利森苷 E	0.028 7~0.459 0	$y=2\ 167.9x+4.108\ 3$	0.999 8
对羟基苯甲醛	0.000 3~0.005 0	$y=92\ 947.0x+2.795\ 8$	0.999 7
香兰素	0.000 3~0.005 0	$y=44\ 407.0x-0.079\ 2$	0.999 0
巴利森苷 B	0.030 6~0.490 0	$y=1\ 637.9x+18.875\ 0$	0.999 6
巴利森苷 C	0.017 8~0.284 0	$y=1\ 316.7x+5.537\ 5$	0.999 3
巴利森苷 A	0.057 8~0.924 0	$y=1\ 725.56x-0.678\ 7$	0.999 4

2.3.4 稳定性考察 取同一批次天麻药材(S1)，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后 0，2，4，6，8，10 h，按“2.1”项下色谱条件分别注入色谱仪，记录 9 种成分峰面积，并计算含量和 RSD。结果显示，天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、巴利森苷 E、对羟基苯甲醛、香兰素、

巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的 RSD 为 1.04%, 1.15%, 1.52%, 1.06%, 2.36%, 2.83%, 1.71%, 2.05%, 2.89%, 结果显示在 10 h 内化学成分含量未发生明显变化, 表明 10 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.3.5 重复性考察 取同一批次天麻药材(S1)6 份, 每份 1.0 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别注入色谱仪, 计算 9 种成分含量及 RSD。结果显示, 天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、巴利森苷 E、对羟基苯甲醛、香兰素、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的 RSD 分别为 0.94%, 1.92%, 2.04%, 1.81%, 2.34%, 1.87%, 1.90%, 1.87%, 1.39%, 说明方法重复性良好。

2.3.6 准确度考察 取同一批次天麻药材(S1)6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入相当于天麻药材 0.5 g 中 9 种成分含量的对照品溶液, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 并计算 9 种成分的含量、回收率及 RSD, 测定结果见表 3。结果显示, 天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、巴利森苷 E、对羟基苯甲醛、香兰素、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的平均回收率分别是 98.68%, 99.49%, 97.65%, 99.32%, 98.96%, 98.63%, 98.71%, 98.16%, 98.20%, RSD 分别为 1.24%, 1.09%, 1.48%, 1.01%, 1.80%, 2.19%, 1.26%, 1.34%, 1.42%, 9 种成分的回收率均在 95%~105%, RSD 均<3%, 符合规定。

2.4 样品中 9 种成分含量测定

取 20 批次野生和栽培天麻各 2 份约 1 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定 9 种成分的峰面积, 采用外标一点法计算各成分含量, 测定结果见表 4。结果显示, 不同批次野生天麻和栽培天麻中 9 种成分含量差异较大, 其含量从大到小的排列顺序依次为巴利森苷 A>巴利森苷 B>天麻素>巴利森苷 E>巴利森苷 C>对羟基苯甲醇>原儿茶酸>香兰素>对羟基苯甲醛, 含量均值依次为 13.739, 6.063, 5.669, 4.206, 2.033, 0.795, 0.041, 0.033, 0.031 mg·g⁻¹, 各成分含量差异显著, 野生天麻中天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、香兰素、对羟基苯甲醛含量均明显高于栽培天麻, 说明栽培天麻和野生天麻在成分含量上有一定区别。

表 3 准确度考察结果

Tab. 3 Results of the accuracy test

成分	编号	称样量/ g	样品中 含量/ mg	加入对 照品量/ mg	样品测 得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/ %	RSD/ %
天麻素	1	0.502 2	2.963 0	2.971 0	5.921 2	99.57	98.68	1.24
	2	0.503 1	2.968 3	2.971 0	5.898 8	98.64		
	3	0.501 8	2.960 6	2.971 0	5.929 8	99.94		
	4	0.493 5	2.911 7	2.971 0	5.791 5	96.93		
	5	0.503 3	2.969 5	2.971 0	5.866 4	97.51		
	6	0.498 8	2.942 9	2.971 0	5.899 1	99.50		
对羟基苯甲醇	1	0.502 2	0.753 3	0.814 0	1.549 7	97.84	99.49	1.09
	2	0.503 1	0.754 7	0.814 0	1.561 4	99.11		
	3	0.501 8	0.752 7	0.814 0	1.560 1	99.19		
	4	0.493 5	0.740 3	0.814 0	1.556 1	100.23		
	5	0.503 3	0.755 0	0.814 0	1.577 2	101.01		
	6	0.498 8	0.748 2	0.814 0	1.558 8	99.58		
原儿茶酸	1	0.502 2	0.024 6	0.025 0	0.049 1	97.97	97.65	1.48
	2	0.503 1	0.024 7	0.025 0	0.048 7	96.19		
	3	0.501 8	0.024 6	0.025 0	0.048 9	97.25		
	4	0.493 5	0.024 2	0.025 0	0.048 3	96.47		
	5	0.503 3	0.024 7	0.025 0	0.049 1	97.75		
	6	0.498 8	0.024 4	0.025 0	0.049 5	100.24		
巴利森苷 E	1	0.502 2	1.704 5	1.822 0	3.521 1	99.71	99.32	1.01
	2	0.503 1	1.707 5	1.822 0	3.480 2	97.29		
	3	0.501 8	1.703 1	1.822 2	3.522 1	99.82		
	4	0.493 5	1.674 9	1.822 0	3.490 3	99.64		
	5	0.503 3	1.708 2	1.822 0	3.521 8	99.54		
	6	0.498 8	1.692 9	1.822 0	3.513 9	99.94		
对羟基苯甲醛	1	0.502 2	0.030 1	0.038 0	0.067 9	99.39	98.96	1.80
	2	0.503 1	0.030 2	0.038 0	0.067 7	98.72		
	3	0.501 8	0.030 1	0.038 0	0.066 9	96.82		
	4	0.493 5	0.029 6	0.038 0	0.067 5	99.71		
	5	0.503 3	0.030 2	0.038 0	0.067 2	97.37		
	6	0.498 8	0.029 9	0.038 0	0.068 6	101.77		
香兰素	1	0.502 2	0.028 6	0.031 0	0.058 8	97.34	98.63	2.19
	2	0.503 1	0.028 7	0.031 0	0.060 0	101.04		
	3	0.501 8	0.028 6	0.031 0	0.060 1	101.60		
	4	0.493 5	0.028 1	0.031 0	0.058 5	97.97		
	5	0.503 3	0.028 7	0.031 0	0.058 9	97.46		
	6	0.498 8	0.028 4	0.031 0	0.058 3	96.35		
巴利森苷 B	1	0.502 2	2.944 4	2.954 0	5.791 1	96.37	98.71	1.26
	2	0.503 1	2.949 7	2.954 0	5.892 4	99.62		
	3	0.501 8	2.942 1	2.954 0	5.878 4	99.40		
	4	0.493 5	2.893 4	2.954 0	5.796 6	98.28		
	5	0.503 3	2.950 8	2.954 0	5.877 9	99.09		
	6	0.498 8	2.924 5	2.954 0	5.863 9	99.51		
巴利森苷 C	1	0.502 2	0.719 2	0.743 0	1.439 9	97.01	98.16	1.34
	2	0.503 1	0.720 4	0.743 0	1.442 3	97.15		
	3	0.501 8	0.718 6	0.743 0	1.455 7	99.21		
	4	0.493 5	0.706 7	0.743 0	1.447 1	99.65		
	5	0.503 3	0.720 7	0.743 0	1.439 6	96.75		
	6	0.498 8	0.714 3	0.743 0	1.451 1	99.17		
巴利森苷 A	1	0.502 2	7.004 2	7.118 0	13.866 7	96.41	98.20	1.42
	2	0.503 1	7.016 7	7.118 0	13.997 8	98.08		
	3	0.501 8	6.998 6	7.118 0	14.009 9	98.50		
	4	0.493 5	6.882 8	7.118 0	13.776 5	96.85		
	5	0.503 3	7.019 5	7.118 0	14.100 2	99.48		
	6	0.498 8	6.956 8	7.118 0	14.068 8	99.92		

表 4 天麻药材中 9 种成分含量测定结果

编号	天麻素	对羟基苯甲醇	原儿茶酸	巴利森苷 E	对羟基苯甲醛	香兰素	巴利森苷 B	巴利森苷 C	巴利森苷 A	总含量
S1	9.030	0.609	0.040	3.047	0.020	0.039	6.801	4.494	15.131	39.211
S2	2.667	0.131	0.014	4.496	0.009	0.003	2.971	0.792	5.311	16.394
S3	8.370	0.369	0.044	3.407	0.020	0.016	6.721	2.824	17.925	39.696
S4	3.156	0.205	0.017	5.362	0.014	0.004	3.083	0.762	4.588	17.191
S5	3.859	0.956	0.030	4.286	0.028	0.030	4.398	1.084	6.739	21.410
S6	4.561	1.141	0.020	4.975	0.030	0.038	5.147	1.271	7.971	25.154
S7	4.965	0.826	0.028	5.611	0.035	0.045	4.951	1.298	7.827	25.586
S8	3.601	0.546	0.026	4.333	0.014	0.011	7.223	2.257	17.815	35.826
S9	5.130	0.340	0.024	4.441	0.018	0.015	7.129	2.674	17.462	37.233
S10	3.572	1.313	0.018	4.247	0.020	0.020	7.547	1.735	21.204	39.676
S11	5.209	0.936	0.037	5.246	0.010	0.014	9.087	2.417	27.426	50.382
S12	5.793	0.889	0.034	4.731	0.038	0.025	6.374	1.612	10.864	30.36
S13	6.117	0.438	0.034	4.290	0.021	0.034	6.695	3.096	14.830	35.555
S14	8.185	0.600	0.042	2.957	0.022	0.061	7.129	4.128	14.724	37.848
S15	4.359	1.037	0.051	3.036	0.060	0.088	4.819	1.829	9.696	24.975
S16	5.963	1.464	0.038	3.428	0.059	0.050	5.893	1.425	14.201	32.521
S17	5.091	1.136	0.050	4.644	0.052	0.040	5.988	1.446	14.213	32.660
S18	4.813	1.056	0.057	3.444	0.042	0.031	6.829	1.612	12.827	30.711
S19	8.139	1.636	0.073	3.848	0.055	0.041	7.845	1.820	20.329	43.786
S20	10.794	0.269	0.135	4.294	0.056	0.047	4.625	2.079	13.698	35.997

2.5 野生与栽培天麻差异成分分析

2.5.1 PCA 将测得的 20 批天麻中 9 种成分的含量导入至 SPSS 26.0 软件进行 PCA, 计算所得变量的特征值及方差贡献率, 并以特征值>1 为条件设定因子抽取, 结果 9 种成分的含量信息经降维处理为 3 个主成分, 累积方差贡献率可达 81.389%, 结果见表 5。结果表明前 3 个主成分可较完整代表原有变量所包含的信息。基于此, 采用 SIMCAP 14.1 软件得到主成分得分图, 结果见图 2, 其累积 $R^2=0.814$, $Q^2=0.452$, 说明所建立的模型的预测准确率较高。结果显示, 20 批样品分为 2 大类, 其中

表 5 特征值的总方差和贡献率

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.395	37.725	37.725
2	2.367	26.296	64.021
3	1.563	17.368	81.389
4	0.974	10.821	92.210
5	0.361	4.006	96.216
6	0.198	2.205	98.421
7	0.070	0.782	99.203
8	0.053	0.585	99.787
9	0.019	0.213	100.000

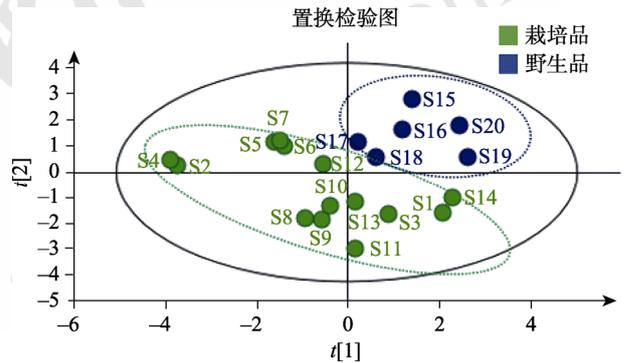


图 2 野生和栽培天麻 PCA 得分图

Fig. 2 Score plot of PCA of the wild and cultivated Gastrodiae Rhizoma

一类包括 14 批天麻栽培品, 另一类为 6 批野生品, 所有样品均出现在置信区间内, 且栽培品与野生品组间分散明显, 组内聚集中, 说明栽培品与野生品天麻中 9 种化合物含量差异具有统计学意义。

2.5.2 PLS-DA 为筛选出野生与栽培天麻中差异性成分, 在上述 PCA 分析的基础上, 采用 SIMCA-P 14.1 软件进行有监管的 PLS-DA, 通过分析建立了主成分得分图, 结果见图 3。结果显示, 栽培天麻与野生天麻各组分分散明显, 累积 $R^2X=0.722$, $R^2Y=0.869$, $Q^2=0.779$, 说明所建立的模型具有良好的稳定性及预测能力。变量重要性

投影值(variable importance in the projection, VIP)可直观反映变量对结果的影响率, VIP>1 的成分对分类结果具有统计学意义, 即>1 的成分是区分天麻野生品与栽培品的差异性成分。对 PLS-DA 所建立的模型进行 200 次的置换检验, 得到回归直线与 Y 轴的截距值 R^2 及 Q^2 , Q^2 在 Y 轴的截距<0, 说明所建立的模型有效且不存在过度拟合现象; 在 PLS-DA 模型中, 将 VIP>1 作为判定标准, 筛选出可区分野生天麻和栽培天麻的差异性成分, 结果见表 6。VIP 值>1 的成分分别是对羟基苯甲醛、原儿茶酸、香兰素, VIP 值分别为 1.799, 1.360, 1.163, 提示上述 3 种成分为区分野生天麻和栽培天麻的差异性成分。

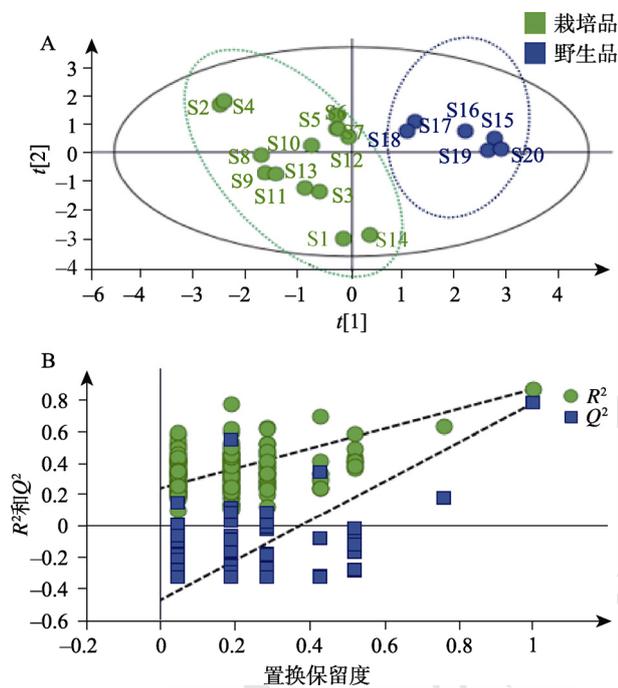


图 3 栽培和野生天麻 PLS-DA 得分图(A)及置换检验(B) ($n=200$)
Fig. 3 Score plot of PLS-DA(A) and permutation test(B) of wild and cultivated *Gastrodiae Rhizoma* ($n=200$)

表 6 9 种成分的 VIP 值

Tab. 6 VIP values of 9 components

序号	测定成分	VIP 值
1	对羟基苯甲醛	1.799
2	原儿茶酸	1.360
3	香兰素	1.163
4	对羟基苯甲醇	0.953
5	香兰素	0.739
6	巴利森苷 E	0.736
7	巴利森苷 C	0.711
8	天麻素	0.224
9	巴利森苷 A	0.104

3 讨论

3.1 天麻中 9 种成分的含量测定

本课题组前期对检测波长进行了筛选, 结果显示检测波长为 270 nm 时, 均能检测到 9 种成分, 且各峰分离度良好, 为此确定 270 nm 为检测波长。在流动相条件的筛选中, 尝试采用乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液等流动相进行梯度洗脱, 结果流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液时, 各峰分离度良好, 阴性无干扰; 分别采用水、甲醇、50%乙醇、乙醇对供试品制备方法进行考察, 结果 50%乙醇提取时, 9 种成分提取完全, 为此确定采用 50%乙醇提取。

天麻主产于四川、云南、贵州、陕西等省, 其中云南、四川为其主要产区, 本研究固定主产地云南收集栽培天麻, 以排除因产地不同导致天麻的野生品与栽培品的数据偏差。20 批次商品天麻中 9 种成分含量测定结果显示, 不同商品规格的野生和栽培天麻中 9 种成分含量存在差异, 成分含量与不同商品规格的等级尚未发现存在规律性, 但野生品与栽培品的含量却呈现一定规律性, 即野生天麻中天麻素、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、香兰素、对羟基苯甲醛含量均明显高于栽培天麻, 说明栽培天麻和野生天麻在成分含量上有一定区别。

3.2 野生与栽培天麻的差异成分分析

本研究以天麻中主要的 9 种化学成分含量为变量, 结合 PCA 和 PLS-DA 2 种化学模式识别技术筛选野生与栽培天麻的差异性成分, 所选取的化学成分涵盖了酚及其苷类、有机酸类等, 2 类成分均为天麻关键药效成分^[2,10], 本研究筛选差异成分在成分含量准确量的基础上确定, 是以含量作为变量进行的分析, 与近年来文献多见以指纹图谱峰面积作为变量进行的分析有所不同^[11-14], 指纹图谱的峰面积定量不够准确, 数据具有模糊性, 因此分析结果常出现偏差。

综上, 本研究采用 HPLC 建立了在同一色谱条件下同时测定天麻中 9 种成分的含量测定方法。该方法精密度、准确度符合规定, 方法稳定可行, 9 种成分可以作为指标成分控制天麻的质量; 同时采用 PCA 和 PLS-DA 2 种化学模式识别技术确定了可有效区分野生与栽培天麻的 3 个主要差异成分, 分别是对羟基苯甲醛、原儿茶酸、香兰素, 通过三者成分的含量可以区分野生和栽培天麻, 控制天麻的质量。本研究可客观、有效、准确地区分天麻的

野生品与栽培品,为药材市场以栽培天麻冒充野生天麻的混乱现象提供了新的鉴别方法。

REFERENCES

- [1] WEI F Q, HUANG R, HE H Y, et al. Research progress on pharmacological action and application of *Gastrodia elata* BL.[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2021, 30(11): 72-76.
- [2] LIU Y, HUANG G L. The chemical composition, pharmacological effects, clinical applications and market analysis of *Gastrodia elata*[J]. Pharm Chem J, 2017, 51(3): 211-215.
- [3] 刘明海. 野生天麻与种植天麻的主要性状鉴别与质量比较[J]. 中国药业, 2012, 21(6): 70-71.
- [4] HAN X J, CHENG M E, YUAN Y, et al. Evolution of commercial specification and experimental identification terms of *Gastrodiae Rhizoma*[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(11): 2702-2707.
- [5] CHU R, LI N, CHEN Y L, et al. HPLC fingerprint and chemical composition analysis of *Gastrodia elata* produced in Chongqing by different processing method[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2021, 41(9): 1621-1633.
- [6] WANG M X, LIU J, CHEN L M, et al. Simultaneous determination of five components in *Gastrodia Rhizoma* from different habitats by HPLC-FLD[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2019, 39(3): 502-509.
- [7] FU W, LIAO P C, HUANG T C, et al. Quality evaluation of lyophilized and traditional *Gastrodiae Rhizoma* decoction pieces based on cluster analysis and principal component[J]. J Chin Med Mat(中药材), 2021, 44(5): 1102-1107.
- [8] ZUO Y M, DENG X H, WU Q. Discrimination of *Gastrodia elata* from different geographical origin for quality evaluation using newly-build near infrared spectrum coupled with multivariate analysis[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1088.
- [9] 黄璐琦, 詹志来, 郭兰萍. 中药材商品规格等级标准汇编[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- [10] LIU W, DENG L H, QI D L, et al. Overview of the pharmacological effects of *Gastrodia* and its active ingredients[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2021, 37(4): 240-244, 12.
- [11] YU X J, ZHANG D Y, LI S Y, et al. Establishment of HPLC fingerprints and identification of aqueous extract from *Gastrodia elata*[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40(12): 2698-2702.
- [12] YUE C, ZHANG W P, ZHAO W L, et al. Quality evaluation for different original plant species of *Aurantii Fructus* based on HPLC fingerprint with chemical pattern analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(23): 3002-3008.
- [13] LI Z Q, WANG H L, GUI S Q, et al. HPLC fingerprint establishment and chemistry pattern recognition of *Xiaoer Ganmaoshu Granules*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(22): 2820-2825.
- [14] ZHAO Z F, ZOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription *Huanglian Decoction* and determination of the contents of 6 components[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.

收稿日期: 2022-01-08
(本文责编: 李艳芳)