

不同产区天麻 HPLC 指纹图谱研究

林昕^{1,2,3}, 王丽¹, 邵金良¹, 刘祥义³, 刘宏程^{1,2*} (1.云南省农业科学研究院质量标准与检测技术研究所, 昆明 650223; 2.农业农村部农产品质量安全风险评估实验室, 昆明 650223; 3.西南林业大学天麻研究院, 昆明 650224)

摘要: 目的 通过构建天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的化学成分 HPLC 指纹图谱, 结合多元统计方法等对不同产区天麻进行比对, 为天麻产地鉴别和道地性提供科学依据。方法 采用 HPLC 测定不同产区天麻的化学成分指纹图谱, Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 柱温 30 ℃, 以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 分析时间 35 min, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 220 nm。共计检测 79 份不同产地的天麻样品。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)进行指纹图谱信息统计内含成分峰面积, 利用 SPSS 23.0 统计软件进行主成分分析和聚类分析。结果 不同产地的天麻样品具有良好的一致性, 通过构建天麻 HPLC 指纹图谱, 采用主成分分析和聚类分析可以将天麻样品分别划分为云南产天麻和非云南产天麻。结论 可利用指纹图谱技术对天麻产地进行鉴别, 为天麻的道地性研究提供科学依据。

关键词: 天麻; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R965.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)13-1543-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.002

引用本文: 林昕, 王丽, 邵金良, 等. 不同产区天麻 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1543-1549.

Study on HPLC Fingerprint of *Gastrodia Elata* Bl. from Different Origins

LIN Xin^{1,2,3}, WANG Li¹, SHAO Jinliang¹, LIU Xiangyi³, LIU Hongcheng^{1,2*} [1. Institute of Quality Standards and Testing Technology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products(Kunming), Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China; 3. Research Institute of *Gastrodia elata*, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide a scientific basis for the identification and authenticity of *Gastrodia elata* Bl., by constructing a HPLC fingerprint of the chemical components of *Gastrodia elata* Bl., combining with multivariate statistical methods to compare *Gastrodia elata* Bl. from different origins. **METHODS** HPLC was developed for the determination of chemical fingerprint of *Gastrodia elata* in different regions. Shiseido CAPCELL PAK II MG C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) was used with column temperature 30 ℃, methanol-0.05% phosphoric acid aqueous solution as mobile phase, gradient elution and analysis time 35 min, velocity 1.00 mL·min⁻¹, sample quantity 10 μL, detection wavelength 220 nm. The 79 *Gastrodia elata* samples from different origins were tested. Similarity evaluation system software(2012 edition) was used for fingerprint information statistics of contained component peak area, and SPSS 23.0 statistical software was used for principal component analysis and cluster analysis. **RESULTS** *Gastrodia elata* samples from different producing areas had good consistency. By constructing the HPLC fingerprint of *Gastrodia elata*, principal component analysis and cluster analysis, the samples of *Gastrodia elata* could be divided into Yunnan and non-Yunnan *Gastrodia elata*. **CONCLUSION** The results showed that the fingerprint technique could provide scientific basis for the identification of *Gastrodia elata* origin and the authenticity of *Gastrodia elata*.

KEYWORDS: *Gastrodia elata* Bl.; HPLC; fingerprint; principal component analysis; cluster analysis

天麻是我国传统名贵中药材, 在《中国地道药材》^[1]中关于天麻记载为“主产于我国西南诸省, 而以云南昭通产者最为驰名”。随着近年来天麻种植技术的突破, 天麻产区包括了云南、贵州、四川、陕西、湖北、安徽和东北等地区^[2]。现代药理学研究表明^[3], 天麻具有镇痛、镇静、抗惊厥、抗炎、抗衰老、改善记忆力和增强免疫力作用。2018 年国家卫生健康委员会增补天麻为食药两用物质

管理, 天麻作为保健食品原料和日常滋补食品被广大群众所需求。如何准确和高效评价天麻质量已成为天麻产业发展的难题。目前天麻质量评价主要依据个体大小、成色等经验进行判断, 缺乏科学依据。依靠检测内含化学成分难以进行有效判定, 因为中国药典 2015 年版一部^[4]中仅仅规定“天麻素和对羟基苯甲醇的含有量不得低于 0.25%”, 相比较于天麻富含的百余种化学成分^[5],

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0201806)

作者简介: 林昕, 男, 博士生, 助理研究员 Tel: (0871)65667732
研究员 Tel: (0871)65140430 E-mail: liuorg@163.com.

E-mail: 674019542@qq.com

*通信作者: 刘宏程, 男, 博士, 研

只凭借 2 个指标难以全面反映天麻质量。天麻 HPLC 指纹图谱研究已多有报道, 研究内容覆盖了特征性标志成分测定^[6]、产地鉴别^[7]、加工影响^[8]、采收期影响^[9]和品种比较^[10]等多方面, 但是上述研究都存在样品容量小、代表性差, 图谱中天麻的特征成分或共有峰重叠太多, 可推广性差等多种问题。本实验综合运用相似度评价、系统聚类 and 主成分分析等模式识别技术, 以公认的优良天麻主产区云南昭通天麻为基准, 进行不同产地天麻 HPLC 指纹图谱研究, 以期为天麻道地性鉴别和质量评价标准的制定提供更全面的参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); JJ200-电子分析天平(江苏省常熟市双杰测试仪器厂); KH-250DB 型超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

天麻素(批号: ZL20110720A; 纯度: 98%)、对羟基苯甲醇(批号: ZL131022AN; 纯度: 98%)均购自南京泽朗医药科技有限公司; 巴利森苷 A(批号: PRF9061141; 纯度: 95%)、巴利森苷 B(批号: PRF9061142; 纯度: 97%)、巴利森苷 C(批号: PRF9061143; 纯度: 97%)、巴利森苷 E(批号: PRF9010943; 纯度: 98%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司。甲醇(色谱纯, 德国 Merck); 甲醇、磷酸均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 水为纯净水。

1.2 样品

天麻样品均采于 2017 年冬季, 供试天麻样品共计 79 份, 编号为云南昭通(ZT1~ZT42)、云南丽江(YN43~YN46)、云南普洱(YN47~YN48)、云南保山(YN49)、云南楚雄(YN50)、陕西(SX51~SX54)、贵州(GZ55~GZ62)、四川(SC63~SC75)、安徽(AH76)、辽宁(LN77)、湖北(HB78)和西藏(XZ79), 上述样品均由西南林业大学刘祥义教授鉴定为天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为甲醇(A)-0.05%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~3 min, 5%(A),

3~25 min, 5%→65%(A), 25~35 min, 65%→5%(A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。

表 1 样品产地信息

Tab. 1 Origin of samples

样品号	产地	样品号	产地
ZT1	云南省昭通市彝良县	ZT41	云南省昭通市昭阳区
ZT2	云南省昭通市彝良县	ZT42	云南省昭通市绥江县
ZT3	云南省昭通市彝良县	YN43	云南省丽江市
ZT4	云南省昭通市彝良县	YN44	云南省丽江市
ZT5	云南省昭通市彝良县	YN45	云南省丽江市
ZT6	云南省昭通市彝良县	YN46	云南省丽江市
ZT7	云南省昭通市彝良县	YN47	云南省普洱市镇沅县
ZT8	云南省昭通市彝良县	YN48	云南省普洱市文庙山
ZT9	云南省昭通市彝良县	YN49	云南省保山市昌宁县
ZT10	云南省昭通市彝良县	YN50	云南省楚雄州姚安县
ZT11	云南省昭通市彝良县	SX51	陕西省
ZT12	云南省昭通市彝良县	SX52	陕西省汉中市勉县
ZT13	云南省昭通市彝良县	SX53	陕西省汉中市勉县
ZT14	云南省昭通市彝良县	SX54	陕西省汉中市
ZT15	云南省昭通市彝良县	GZ55	贵州省毕节市赫章县
ZT16	云南省昭通市彝良县	GZ56	贵州省毕节市赫章县
ZT17	云南省昭通市彝良县	GZ57	贵州省毕节市大方县
ZT18	云南省昭通市彝良县	GZ58	贵州省毕节市大方县
ZT19	云南省昭通市永善县	GZ59	贵州省毕节市黔西县
ZT20	云南省昭通市永善县	GZ60	贵州省威宁县
ZT21	云南省昭通市永善县	GZ61	贵州省黔东南州三穗县
ZT22	云南省昭通市镇雄县	GZ62	贵州省黔南州瓮安县
ZT23	云南省昭通市镇雄县	SC63	四川省峨眉山市
ZT24	云南省昭通市镇雄县	SC64	四川省宜宾市
ZT25	云南省昭通市镇雄县	SC65	四川省广元市
ZT26	云南省昭通市大关县	SC66	四川省广元市青川县
ZT27	云南省昭通市大关县	SC67	四川省绵阳市
ZT28	云南省昭通市大关县	SC68	四川省绵阳市
ZT29	云南省昭通市大关县	SC69	四川省绵阳市平武县
ZT30	云南省昭通市威信县	SC70	四川省乐山市金河口区
ZT31	云南省昭通市威信县	SC71	四川省乐山市金河口区
ZT32	云南省昭通市威信县	SC72	四川省泸州市叙永县
ZT33	云南省昭通市威信县	SC73	四川省泸州市叙永县
ZT34	云南省昭通市盐津县	SC74	四川省泸州市叙永县
ZT35	云南省昭通市盐津县	SC75	四川省雅安市荥经县
ZT36	云南省昭通市盐津县	AH76	安徽省安庆市岳西县
ZT37	云南省昭通市盐津县	LN77	辽宁省
ZT38	云南省昭通市盐津县	HB78	湖北省恩施市鹤峰县
ZT39	云南省昭通市盐津县	XZ79	西藏自治区米林县
ZT40	云南省昭通市盐津县		

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液的制备 参考中国药典 2015 年版一部方法:采集新鲜天麻样品后,立即洗净,蒸制透心,敞开低温干燥。精密称取天麻粉末(过 60 目筛)2.0 g,加入稀乙醇 50 mL,称重,超声处理(功率 120 W,频率 40 kHz) 30 min,冷却,称重,用稀乙醇补足减少的重量,摇匀;用 0.22 μm 过滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得到混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度试验 取 2 号昭通天麻样品(ZT2)的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,比较天麻素的色谱峰的相对保留时间和峰面积的一致性,其相对保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<3\%$ 。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)对 6 次进样的色谱图进行相似度计算,结果均 >0.999 ,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 称取 2 号昭通天麻粉(ZT2)6 份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,其中天麻素色谱峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<3\%$ 。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)对 6 个色谱图进行相似度计算,结果均 >0.999 ,说明样品前处理及检测方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一份 2 号昭通天麻样品(ZT2)溶液,于制样后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 分别按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,其中天麻素色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均 $<3\%$ 。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)对 6 个时间段分别测定的色谱图进行相似度计算,结果均 >0.999 ,表明天麻样品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.4 天麻样品色谱指纹图谱建立及技术参数标定

本研究中共收集了全国不同产区的 79 份天麻样品,其中云南昭通 42 份,云南其他产区 8 份,陕西 4 份,贵州 7 份,四川 13 份,安徽 1 份,辽宁 1 份,湖北 1 份和西藏 1 份。由于云南昭通天

麻被公认为天麻优良品,因此以云南昭通天麻为例。将昭通天麻样品按照要求进行制备和检测,记录其色谱图。利用 Waters Empower3 色谱工作站,将不同产区天麻样品的色谱数据以*.cdf 格式文件导出,并将导出数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)进行共有成分数据匹配。同时进行相似度计算与天麻化学成分 HPLC 指纹图谱的合成。为了排除溶剂峰的干扰,加之在 22 min 后没有出现新的色谱峰,在本研究中所有色谱图均截取 5~22 min 时间段的谱图,“时间窗宽度”设定为 0.5 min,对照图谱的生产选择“中位数”。

建立天麻指纹图谱 42 个昭通天麻样品叠加图谱,建立昭通天麻的对照指纹图谱,见图 1~2,计算其相似度,见表 2。结果显示 42 个昭通天麻样品与对照指纹图谱的相似度分布在 0.904~0.999,均 >0.9 ,说明昭通地区天麻样品品质均一性良好,而且可以利用该地区天麻样品构建指纹图谱对天麻品质进行质量评价。在合成的昭通天麻对照指纹图谱中,共有 14 个共有峰,按出峰时间顺序标注为 1~14 号峰,9.90, 13.02, 13.35, 14.55, 14.84, 15.61, 16.04, 16.47, 18.12, 18.53, 19.09, 19.75, 20.16, 20.89 min。通过与对照品的 HPLC 图谱比对,明确保留时间为 9.90, 13.02, 18.12, 18.52, 19.09, 20.162 min 的色谱峰分别对应天麻素(1 号峰)、对羟基苯甲醇(2 号峰)、巴利森苷 B(9 号峰)、巴利森苷 C(11 号峰)和巴利森苷 A(13 号峰)。1 号峰(天麻素)是天麻的代表成分,其在图谱分离度好和不容易被干扰,确定为参照峰(S);将昭通样品色谱图与对照图谱和参照峰(S),进行自动匹配,记录匹配结果。

匹配数据中包括昭通天麻样品各个共有峰的相对保留时间和相对峰积分面积数据,经计算结果表明,各个昭通天麻样品色谱峰的保留时间匹配良好, RSD 均 $<3\%$,符合要求;并且昭通天麻样品的色谱峰面积比值均 $<3\%$,表明指纹图谱重现性良好。计算其共有峰总面积和非共有峰面积,求出非共有峰面积占总峰面积的比例结果见表 3。统计结果表明,共有峰面积占总峰面积的 90%以上,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》对中药材的技术要求。

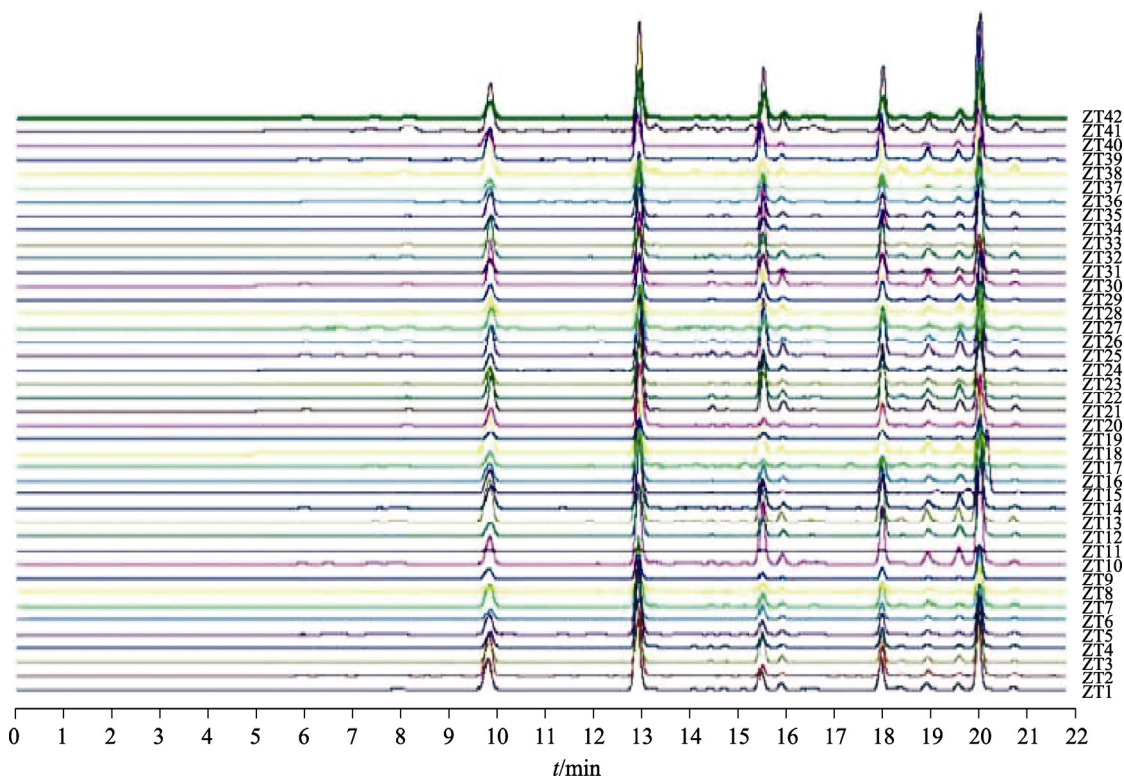


图1 42个昭通天麻样品色谱图叠加图

Fig. 1 Matched chromatograms of 42 batches of *Gastrodia elata* Bl. in Zhaotong

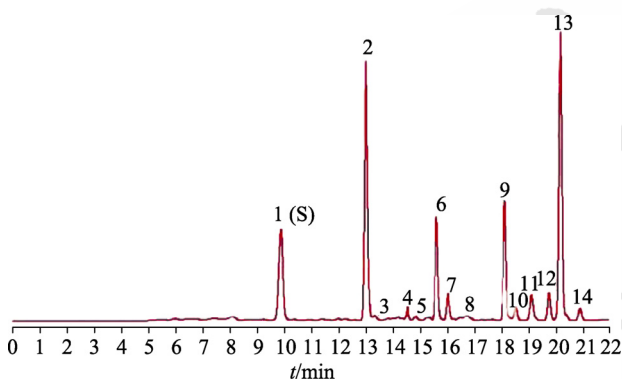


图2 昭通天麻对照指纹图谱

1-天麻素; 2-对羟基苯甲醇; 9-巴利森苷 B; 11-巴利森苷 C; 13-巴利森苷 A。

Fig. 2 Fingerprint chromatograms of *Gastrodia elata* Bl. in Zhaotong

1-gastrodin; 2-*p*-hydroxybenzyl alcohol; 9-parishin B; 11-parishin C; 13-parishin A.

2.5 不同产地天麻样品色谱指纹图谱比较

按照“2.2.1”项下方法制备天麻供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录其色谱图。以昭通天麻建立的对照图谱为参照图谱,将不同产地的天麻色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行峰匹配及相似度计算。与基于昭通天麻建立的对照图谱进行相似度比较,绝大多数不同产地的样品相似度均>0.9,说明不同产地

的天麻样品品质均一,可以利用指纹图谱对其进行分析。贵州天麻样品中2个和四川天麻样品中1个的相似度<0.9,则反映了不同产地的环境对于天麻化学成分的影响,进而造成了不同产地天麻药材品质的差异性。结果见表4。

表2 昭通天麻的指纹图谱相似度

Tab. 2 Similarity of the fingerprint of *Gastrodia elata* Bl. in Zhaotong

样品号	对照指纹图谱相似度	样品号	对照指纹图谱相似度
ZT1	0.980	ZT22	0.975
ZT2	0.966	ZT23	0.993
ZT3	0.984	ZT24	0.904
ZT4	0.953	ZT25	0.969
ZT5	0.939	ZT26	0.985
ZT6	0.994	ZT27	0.984
ZT7	0.986	ZT28	0.984
ZT8	0.940	ZT29	0.999
ZT9	0.989	ZT30	0.929
ZT10	0.978	ZT31	0.992
ZT11	0.967	ZT32	0.991
ZT12	0.985	ZT33	0.956
ZT13	0.997	ZT34	0.996
ZT14	0.996	ZT35	0.993
ZT15	0.984	ZT36	0.978
ZT16	0.996	ZT37	0.987
ZT17	0.981	ZT38	0.951
ZT18	0.981	ZT39	0.974
ZT19	0.997	ZT40	0.985
ZT20	0.977	ZT41	0.987
ZT21	0.961	ZT42	0.996

表 3 昭通天麻成分峰面积统计结果

Tab. 3 Area value of the ingredient peaks of *Gastrodia elata* Bl. in Zhaotong

样品号	总面积	共有峰面积	非共有峰面积	非共有峰面积占比/%
ZT1	34 934.27	33 401.61	1 532.66	4.39
ZT2	39 328.06	38 602.34	725.71	1.85
ZT3	25 026.6	23 554.24	1 472.36	5.88
ZT4	25 214.77	24 070.59	1 144.18	4.54
ZT5	27 078.72	25 841.61	1 237.11	4.57
ZT6	17 342.46	16 363.84	978.62	5.64
ZT7	26 893.11	25 917.88	975.23	3.63
ZT8	13 813.38	12 973.11	840.27	6.08
ZT9	11 513.65	11 206.12	307.53	2.67
ZT10	53 343.89	50 612.56	2 731.33	5.12
ZT11	1 434.69	1 408.62	26.07	1.82
ZT12	28 391.02	26 974.52	1 416.49	4.99
ZT13	60 975.51	58 329.42	2 646.09	4.34
ZT14	34 694.72	33 447.86	1 246.86	3.59
ZT15	29 986.66	28 694.48	1 292.18	4.31
ZT16	25 081.32	24 081.53	999.79	3.99
ZT17	18 755.32	16 515.54	1 859.78	9.92
ZT18	42 382.11	40 222.24	2 159.87	5.1
ZT19	8 975.072	8 485.59	489.48	5.45
ZT20	21 920.2	20 916.85	1 003.35	4.58
ZT21	57 922.23	55 379.7	2 542.53	4.39
ZT22	39 072.42	37 385.69	1 686.73	4.32
ZT23	20 402.93	19 521.99	880.94	4.32
ZT24	20 961.54	19 984.5	977.04	4.66
ZT25	46 800.77	43 964.93	2 835.85	6.06
ZT26	28 869.37	27 455.51	1 413.86	4.9
ZT27	17 208.42	16 605.53	602.89	3.5
ZT28	34 364.83	32 693.29	1 671.54	4.86
ZT29	19 399.01	18 717.03	681.99	3.52
ZT30	62 025.29	58 788.03	3 237.26	5.22
ZT31	18 111.63	17 171.77	939.86	5.19
ZT32	43 793.83	42 027.44	1766.4	4.03
ZT33	4 463.32	4 142.97	320.35	7.18
ZT34	20 077.31	19 189.27	888.04	4.42
ZT35	25 962.58	24 673.62	1 288.96	4.96
ZT36	20 890.78	19 437.17	1 453.61	6.96
ZT37	12 263.03	11 666.16	596.87	4.87
ZT38	46 127.23	42 642.9	3 484.33	7.55
ZT39	44 702.42	42 783.6	1 918.82	4.29
ZT40	17 540.52	16 624.87	915.65	5.22
ZT41	65 773.1	59 526.14	6 246.95	9.5
ZT42	23 566.21	22 534.32	1 031.89	4.38

表 4 不同产地天麻的相似度

Tab. 4 Similarity of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

产地	编号	对照指纹图谱相似度	产地	编号	对照指纹图谱相似度
昭通		1.000	四川	SC63	0.998
丽江	YN43	0.954		SC64	0.947
	YN44	0.953		SC65	0.941
	YN45	0.958		SC66	0.952
	YN46	0.952		SC67	0.963
普洱	YN47	0.958		SC68	0.993
	YN48	0.971		SC69	0.987
保山	YN49	0.993		SC70	0.988
楚雄	YN50	0.985		SC71	0.947
陕西	SX51	0.957		SC72	0.903
	SX52	0.934		SC73	0.889
	SX53	0.948		SC74	0.949
	SX54	0.942		SC75	0.946
贵州	GZ55	0.912	安徽	AH76	0.918
	GZ56	0.932	辽宁	LN77	0.981
	GZ57	0.98	湖北	HB78	0.819
	GZ58	0.897	西藏	XZ79	0.933
	GZ59	0.987			
	GZ60	0.976			
	GZ61	0.976			
	GZ62	0.843			

不同产地天麻的指纹图谱，保留时间在 5~22 min 的色谱峰相对保留时间、峰形和分离度均相一致，均反映除了天麻内含化学成分的特征。观察不同产地的指纹图谱发现：不同产地天麻指纹图谱图中色谱峰统计数量各不相同，昭通和云南其他产地(A、B、C、D)的天麻样品色谱峰在 11~14 个峰；贵州天麻(E)色谱峰 13 个，四川天麻(F)色谱峰有 9 个，西藏天麻(G)色谱峰 11 个，辽宁天麻(H)色谱峰 13 个，陕西天麻(N)色谱峰 13 个，安徽天麻(L)色谱峰 16 个，湖北天麻(M)色谱峰 16 个，其色谱峰产生差异主要集中在保留时间 13~18 min 内，各产地天麻指纹图谱的色谱峰存在差异性，这些色谱峰的变化，直观反映了不同产地天麻的差异性，也表明了不同产地对天麻内含化学成分的积累产生了影响。结果见图 3。

2.6 不同产地天麻样品的主成分分析和聚类分析

为了更好地研究产地环境与天麻素、天麻苷元和巴利森苷类等天麻代表性成分的关联性，利用 SPSS 23.0 对上述不同产地样品的共有峰面积进行主成分分析和聚类分析。经过标准化处理的数据，提取其前 3 个主成分，其特征值为 11.813，1.16，0.863，方差贡献率为 78.756%，7.73%，5.751%，累积贡献率为 92.237%，表明前 3 个主成

分涵盖了大部分天麻指纹图谱信息,将3个主成分作三维图,发现天麻样品聚集为1个中心,即昭通天麻和云南其他产区天麻聚集在圈内,其他产地的天麻则分散于该圈外,见图4。说明主成分分析可以将不同产地天麻化学特征成分差异性通过指纹图谱的差异性来反映。同时,将该前3个主成

分进行Ward分析法对上述不同产地天麻样品进行聚类分析,见图5。当距离取为5,天麻样品被基本分为3组,昭通和云南其他产地天麻为一组,贵州、四川、陕西和安徽为一组,湖北、西藏和辽宁为一组。当距离取为10,天麻样品被基本分为2组,即云南天麻样品被分为一组,其他产区天麻被分为

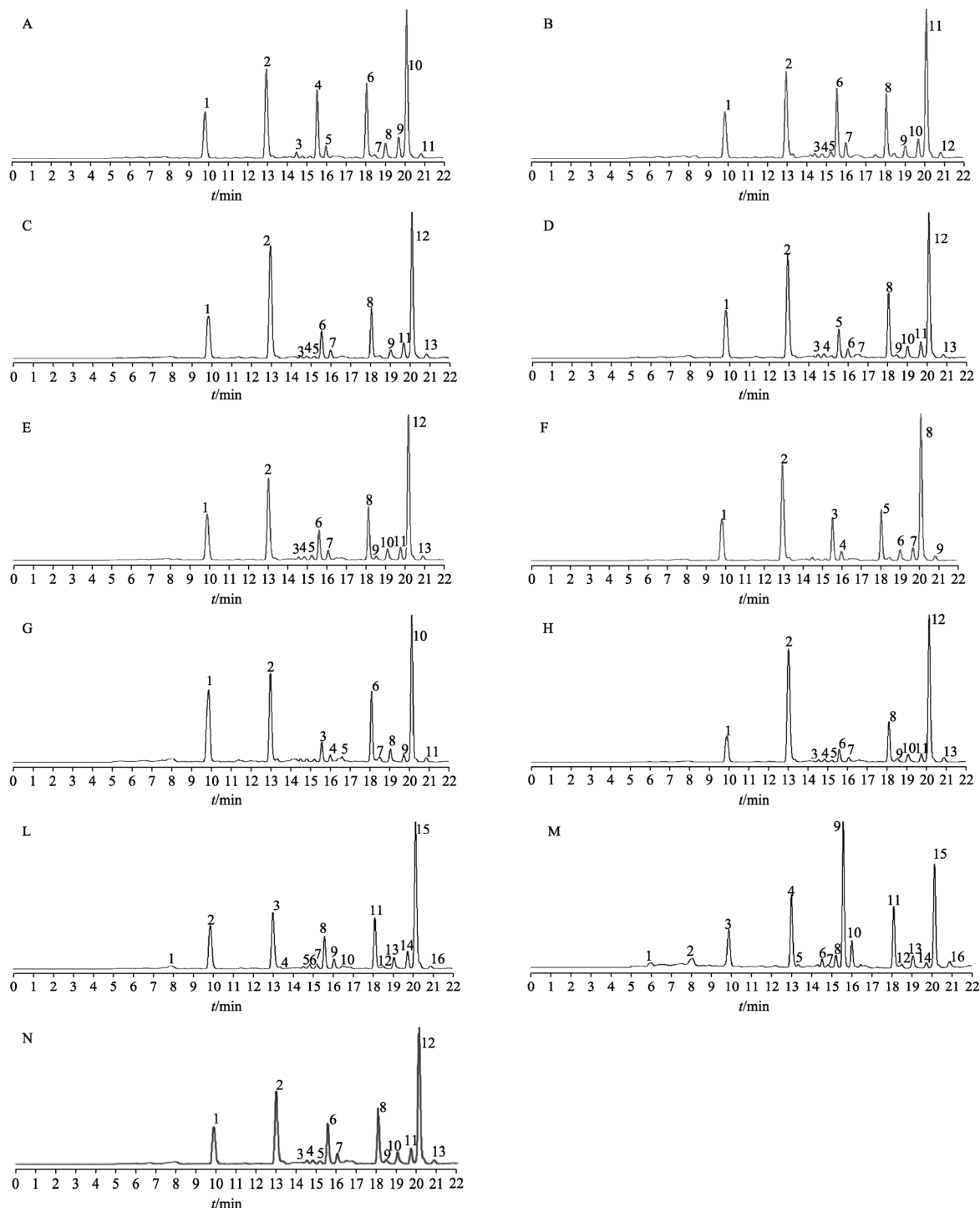


图3 不同产地天麻指纹图谱

A-丽江; B-普洱; C-保山; D-楚雄; E-贵州; F-四川; G-西藏; H-辽宁; L-安徽; M-湖北; N-陕西。

Fig. 3 Fingerprint of different origins of *Gastrodia elata* B1.

A-Lijiang; B-Pu'er; C-Baoshan; D-Chuxiong; E-Guizhou; F-Sichuan; G-Xizang; H-Liaoning; L-Anhui; M-Hubei; N-Shanxi.

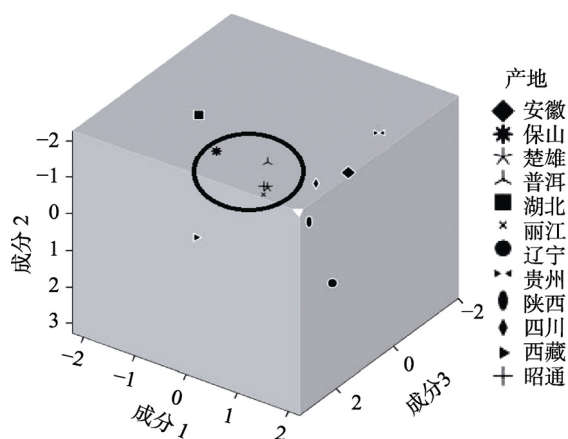


图4 不同产地天麻主成分三维图

Fig. 4 Score scatter 3D lot of PCA from different origins of *Gastrodia elata* Bl.

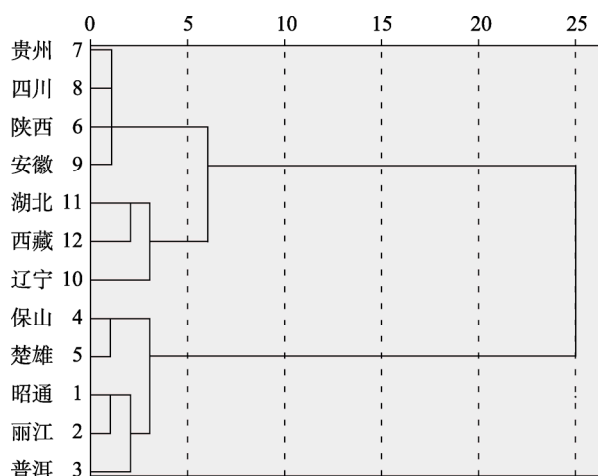


图5 不同产地天麻聚类分析图

Fig. 5 Result of cluster analysis from different origins of *Gastrodia elata* Bl.

一组,该结果与主成分分析的相关相一致,即云南产区的天麻为一组,其他产区天麻可被视为另一组。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在选择流动相时,分别以甲醇-水、甲醇-磷酸水、乙腈-水和乙腈-磷酸水等不同体系进行梯度洗脱,最佳结果为甲醇-0.05%磷酸水体系,通过色谱图可以看出,色谱峰峰形尖锐,分离度良好,并且稳定,有利于指纹图谱的分析。

3.2 分析方法评价

通过建立 79 个来源不同产区天麻的指纹图谱,将天麻代表性化学成分——天麻素作为参照峰(S)。天麻素在本研究的试验条件下,实现了较好的吸收度和较好的分离度。

在研究中,利用国家药典委员会的软件中药

色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版),以优质天麻产区的昭通天麻为评价基准,进行了不同产地样品的相似度评价。结合图 2 和图 3,不同产地天麻样品在某些色谱峰上存在差异性,但都是很小的次要峰,相似度计算结果,除了个别地区样品相似度<0.9 以外,其他天麻样品均>0.9,说明大部分天麻样品内在化学成分均一性良好,从 HPLC 指纹图谱上看,所建天麻指纹图谱具有良好的代表性。经过主成分分析,提取前 3 个主成分(累积贡献率>90%),选取 Ward 分析法对不同产地天麻样品进行聚类分析,结果表明可以将天麻产地分为 2 类,一类是云南产区的天麻样品,其相似度均>0.95,另一类是其他产地的天麻样品,其相似度在 0.81~0.99,说明基于指纹图谱技术可以为天麻的产地识别追溯提供支持。

REFERENCES

- [1] 胡世林. 中国道地药材[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [2] MA X D, FAN Y X, JIN C C, et al. Specific targeted quantification combined with non-targeted metabolite profiling for quality evaluation of *Gastrodia elata* tubers from different geographical origins and cultivars [J]. J Chromatogr A, 2016(1450): 53-63.
- [3] LI Y, XIE M, SHAO M S, et al. Research progress on pharmacological activities and chemical constituents of last ten years on *Gastrodia elata* blume [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(12): 2987-2993.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 58.
- [5] ZHAN H D, ZHOU H Y, SUI Y P, et al. The rhizome of *Gastrodia elata* Blume-An ethnopharmacological review [J]. J Ethnopharmacol, 2016(189): 361-385.
- [6] CHEN X L, CHEN H J. Simultaneous determination of gasterodin, imperatorin, ferulic acid, pulegone and acetyl-11-keto- β -boswellic acid in Tianma Toutong tablets by wavelength conversion HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 331-335.
- [7] LAI C J S, YUAN Y, LIU D H, et al. Untargeted metabolite analysis-based UHPLC-Q-TOF-MS reveals significant enrichment of p-hydroxybenzyl dimers of citric acids in fresh beige-scape *Gastrodia elata* (Wutianma) [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 287-294.
- [8] 蒋然. 乌天麻不同炮制品的质量评价及药理活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [9] XIAO J J, HUANG H, LEI Y C, et al. Development of Tianma HPLC fingerprint and discriminant analysis [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(13): 2524-2531.
- [10] 邓晶晶, 王传华. 天麻生态型及“杂交品种”的生物学和化学特征研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(11): 2726-2729.

收稿日期: 2019-07-26

(本文责编: 沈倩)