

不同产地天麻药材薄层色谱指纹图谱分析

朱迪¹, 谭丹¹, 谢玉敏², 王爱民¹, 陈思颖², 兰燕宇^{1*}

(1. 贵阳医学院 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;
2. 贵阳医学院 药学院, 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:建立天麻药材 TLC 指纹图谱的鉴别方法,比较不同产地天麻药材的指纹图谱。方法:利用 TLC 建立天麻药材的鉴别方法,硅胶 GF₂₅₄ 薄层板,加甲醇预展开,挥干甲醇,110 ℃ 活化 30 min,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2.5:1:1:0.1)为展开剂,展开环境为温度 20~25 ℃,相对湿度 60%~70%,喷以 10% 硫酸乙醇溶液于 105 ℃ 显色,置紫外光灯(366 nm)下检视并成像,利用指纹图谱系统解决方案软件生成共有模式。通过聚类分析和主成分分析 30 批天麻药材的差异性。结果:建立的天麻 TLC 斑点显色清晰。30 批天麻药材聚类分析可分为 5 类,主成分分析分为 6 类,可区分不同产地的天麻药材。结论:不同地理居群、环境气候的天麻样品可能会因地理、空间距离和温度、湿度差异造成多样性分化,在化学成分含量方面呈现出一定差异。建立的 TLC 指纹图谱可用于控制不同来源天麻药材的质量。

[关键词] 天麻;薄层色谱;指纹图谱;聚类分析;主成分分析
[中图分类号] R282.5;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0075-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050075
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1450.004.html>
[网络出版时间] 2015-01-12 14:50

Fingerprint Analysis for TLC of Gastrodiae Rhizoma from Different Habitats ZHU Di¹, TAN Dan¹, XIE Yu-min², WANG Ai-min¹, CHEN Si-ying², LAN Yan-yu^{1*} (1. *Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China*; 2. *Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish a TLC fingerprint for identifying Gastrodiae Rhizoma and compare fingerprint of Gastrodiae Rhizoma from different habitats. **Method:** A TLC method for identification of Gastrodiae Rhizoma was established with silica gel GF₂₅₄ TLC plate and adding methanol for pre-deployment, methanol was evaporated to dryness, activation for 30 min at 110 ℃, with chloroform-ethyl acetate-methanol-water (2.5:1:1:0.1) as developing agent, deployment temperature was 20-25 ℃, relative humidity was 60%-70%, sprayed with 10% sulfuric acid in ethanol at 105 ℃, viewing and imaging under UV light (366 nm), fingerprint software generated a total system solution model. Differences of 30 batches of Gastrodiae Rhizoma were investigated through cluster analysis and principal component analysis. **Result:** This established TLC had a clear spot color. Cluster analysis of thirty batches of Gastrodiae Rhizoma was divided into five categories, principal component analysis was divided into six categories, it could distinguish Gastrodiae Rhizoma from different habitats. **Conclusion:** Diversity differentiation of Gastrodiae Rhizoma may be due to geography, spatial distance, temperature and humidity, in terms of chemical compositions shows some differences. This established TLC fingerprint can be used to control quality of Gastrodiae Rhizoma from different sources.

[Key words] Gastrodiae Rhizoma; TLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

[收稿日期] 20140624(002)
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2013BAI11B01);贵州省中药现代化研究开发专项(黔科合重 G 字[2013]4001);贵州省中药现代化研究开发专项(黔科合重 G 字[2013] 5062);贵州省重大专项(黔科合重大专项字[2011]6005)
[第一作者] 朱迪,在读硕士,从事药物新剂型、新技术、新工艺研究,Tel:15285136051,E-mail:412928703@qq.com
[通讯作者] * 兰燕宇,教授,硕士生导师,从事中药新药研究与开发,Tel:0851-6908899,E-mail:yanyu626@126.com

天麻具有平肝息风、通络止痛的功效,主治头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症^[1],活性成分为天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛等酚类化合物^[2-5]。中医理论强调整体效应,重视诸化学成分在药效上的协同作用。仅以药材中几个有效成分或指标成分作为质量控制指标,不能从整体上反映中药的内在质量。从化学角度考虑,中药的疗效实质上是各种化学成分协同作用的结果。指纹图谱能整体反映中药质量差异的特征,通过计算机模式识别技术进行辨识,可实现对中药质量的综合评价。

目前,天麻的指纹图谱研究常采用 HPLC^[6-8],而本实验运用 TLC,该方法具有操作简单、展开剂组成灵活、直观易辨等优点,可使天麻的化学组成更加直观易辨,是对 HPLC 的良好补充。2010 年版《中国药典》中天麻的鉴别仅对天麻素进行检识^[1],不能完全反映药材的质量,而本实验采用多指标成分进行检识,能更加全面地反映天麻的整体情况。运用指纹图谱系统解决方案软件,结合主成分分析与聚类分析比较不同产地天麻的质量,为该药材的质量控制提供技术支持。

1 材料

AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),CQ-250A-ST 型超声机(上海跃进医用光学器材厂),SC082767 型实验室专用超纯水机(四川沃特水处理设备有限公司),TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),G2X-942-0MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),Linomat V 型薄层色谱半自动点样仪和 Reprostar 3 型薄层数码成像系统(瑞士 Camag 公司),Chromap 1.5 色谱指纹图谱系统解决方案软件(珠海科曼中药研究有限公司)。天麻素、腺苷对照品和天麻对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110807-200205, 944-9201, 130709-201305),对羟基苯甲醇对照品(比利时 Acros Organics 公司,批号 A015225301),对羟基苯甲醛对照品(北京百灵威化学技术有限公司,批号 LU10I05),柱层分析硅胶(100~200 目,青岛海洋化工厂),薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司)。天麻样品经贵阳医学院药学院生药教研室龙庆德副教授鉴定兰科植物天麻 *Gastrodia lata* 的干燥块茎,药材来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品和对照药材溶液的制备 取天麻粉末(过 50 目筛)和对照药材各 2 g,加甲醇 20 mL,超声处

表 1 天麻样品的批号与来源

Table 1 Informations of Gastrodiae Rhizoma samples

No.	批号	药材来源	No.	批号	药材来源
1	20121206	贵州大方	16	20120720-3	河北安国
2	20121107	贵州大方	17	20120802-4	西藏八一
3	201201101	贵州大方	18	20120802-1	西藏林芝
4	201211-1	贵州大方	19	20120802-2	西藏林芝
5	201111-2	贵州大方	20	20120731-1	西藏林芝
6	20121108	贵州大方	21	20120802-3	西藏林芝
7	201304	贵州雷山	22	20120731-2	西藏林芝
8	201211-2	贵州雷山	23	20120130-1	云南威信
9	20130201	河北安国	24	20120130-2	云南昭通
10	20130612	河北安国	25	20120130-3	云南威信
11	20110302-1	河北安国	26	20121018-1	云南昭通
12	20110302-2	河北安国	27	20121018-2	云南昭通
13	20110302-3	河北安国	28	20121018-3	云南昭通
14	20120720-1	河北安国	29	201111-1	云南昭通
15	20120720-2	河北安国	30	201111-2	云南昭通

理 30 min,滤过,滤液浓缩至约 1 mL,加硅胶 0.2 g 拌样,挥干溶剂,转移至玻璃小柱(直径 3 mm,长 10 cm)中,加乙酸乙酯-甲醇-水(9:1:0.2)20 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,即得。

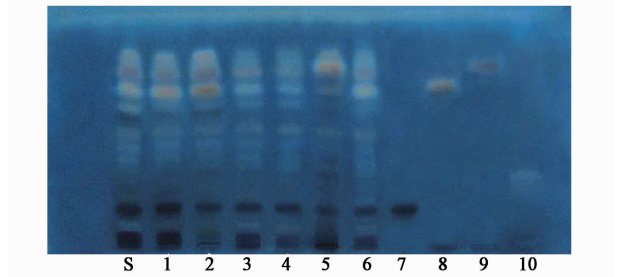
2.2 对照品溶液的制备 取天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛和腺苷对照品适量,分别加甲醇制成 1 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 薄层色谱条件 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板,加甲醇预展开,挥干甲醇,110 ℃活化 30 min。取供试品和对照药材溶液各 10 μL,对照品溶液各 5 μL,用半自动点样仪点于距薄层板底边 8 mm 处,使成条带状,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2.5:1:1:0.1)为展开剂预饱和 1 h,展开环境为温度 20~25 ℃,相对湿度 60%~70%,展开 8 cm,取出,挥去溶剂,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 ℃加热 30 min 至斑点显色清晰,置紫外光灯(366 nm)下检识并成像,结果斑点分离较好且显色清晰,见图 1。

2.4 样品测定 取天麻样品 2.0 g,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,照 2.3 项下方法点样、展开、显色,置紫外光灯(366 nm)下检识并成像,见图 1~4。将成像后的图像文件导入 Chromap 1.5 色谱指纹图谱系统解决方案软件,共检出 10 个色谱峰。按比移值由小到大的顺序对共有峰进行编号并生成共有模式,见图 5。

2.5 化学计量学分析

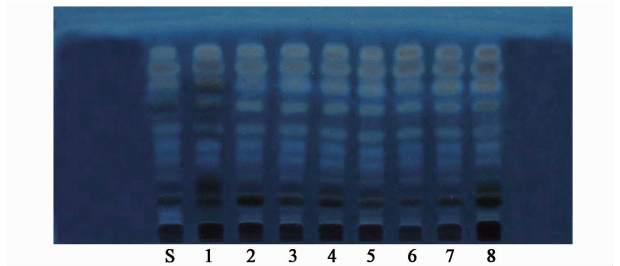
2.5.1 聚类分析 TLC 无法区别差异较小的类别,聚类分析属于无监督的模式识别法,选择 1 组尚无明确分类的样本,根据样本表现的变量特征,按相似



S. 对照药材;1~6. 样品 1~6;7. 天麻素;8. 对羟基苯甲醇;9. 对羟基苯甲醛;10. 腺苷

图 1 贵州大方天麻 TLC

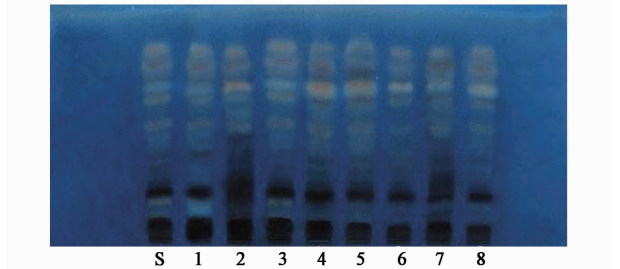
Fig.1 TLC of Gastrodiae Rhizoma from Dafang in Guizhou



S. 对照药材;1~8. 样品 9~16

图 2 河北安国天麻药材 TLC

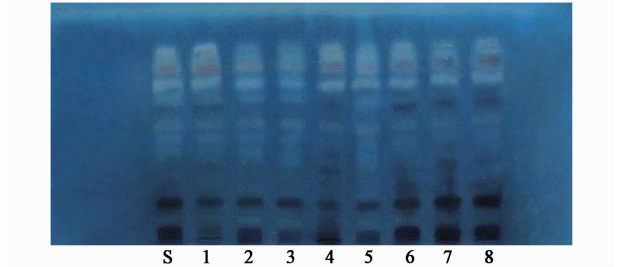
Fig.2 TLC of Gastrodiae Rhizoma from Anguo in Hebei



S. 对照药材;1. 样品 7;2. 样品 8;3~8. 样品 17~22

图 3 贵州雷山和西藏天麻 TLC

Fig. 3 TLC of Gastrodiae Rhizoma from Leishan in Guizhou and Xizang



S. 对照药材;1~8. 样品 23~30

图 4 云南天麻 TLC

Fig.4 TLC of Gastrodiae Rhizoma from Yunnan

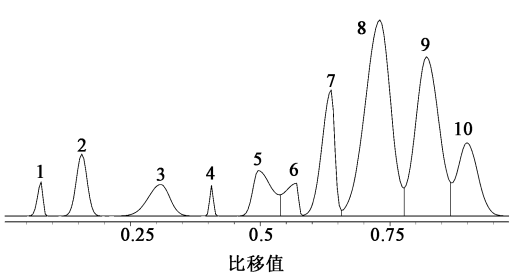


图 5 不同批次天麻指纹图谱共有模式

Fig. 5 The common model of fingerprint of different batch of Gastrodiae Rhizoma

批天麻药材的指纹图谱进行聚类分析,绘出树状图,见图 6。结果显示当欧式距离约 3.8 时,将 30 批天麻样品分为 5 类,第 I 类为第 1,3,4,5,6,11,12,14,15,16,18,19 号天麻,较集中了贵州产地的天麻,还有 5 个来源于河北药材市场的未知产地样品,根据聚类分析的结果推测药材产地来源于贵州;第 II 类为 13,17 号,分别来源于西藏和河北药材市场;第 III 类为 2,20,23,25 号,源自西藏、贵州及河北药材市场;第 IV 类为 9 号样品,来源于河北安国药材市场,其不与已知产地的天麻聚类,推测产地与已知样品产地均不同;第 V 类为 7,8,10,21,22,24,26,27,28,29,30 号样品,较为集中于云南产地。说明河北药材市场购买的天麻样品分布较散乱,而产地为贵州、云南、西藏的天麻聚类情况与地理居群的空间距离有一定关联性,在聚类分析的分类中存在交叉现象。总体而言,天麻可能由于地理位置格局的不同,化学成分比例呈现了多样化。

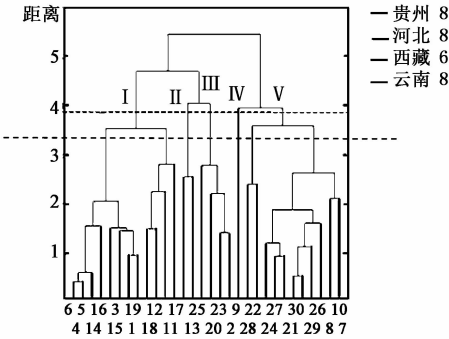


图 6 不同批次天麻聚类分析

Fig.6 Cluster analysis of different batch of Gastrodiae Rhizoma

2.5.2 主成分分析 主成分分析是将分散在 1 组变量上的信息集中到某几个综合指标(主成分)上的探索性统计分析,具有变差最优、信息损失最小、相关性最优等特点^[10-11]。将经标准化的色谱数据矩阵(30×10)导入纹图谱解决方案软件,对所有样

程度的大小加以归类,在模式空间中找到客观存在的类别^[9]。选取欧氏距离平方作为样品测度,对 30

本经标准化后的数据进行主成分分析,由 PC1-PC2 构成的投影图见图 7,结果显示 30 批天麻样品约分为 6 类,第Ⅰ类为第 1,3,4,5,6,14,15,16 号样品,较集中为贵州产天麻,还包括 3 个来源于河北安国药材市场的天麻样品,推测其药材产地为贵州;第Ⅱ类为 2,17,23,25 号天麻,即 2 个产地为云南,贵州、西藏产天麻各 1 个;第Ⅲ类为 9 号样品,来源于河北安国药材市场;第Ⅳ类为 7,8,10,18,20,21,22,26,27,28,29,30 号样品,较集中了产地为云南的天麻;第Ⅴ类为 11,12,13,19 号样品,主要包含河北药材市场的天麻;第Ⅵ类为 20 号西藏天麻。分类情况与聚类分析结果相似,其中 20 号西藏天麻在主成分分析结果中单独为 1 类,但在聚类分析中却落在第Ⅳ类,原因可能是由于 20 号西藏天麻所有峰的峰面积均小于其他样本,所以在主成分分析中单独聚为一类。提示不同地理居群、环境气候的天麻样本可能会因地理空间距离、温度湿度差异造成多样性分化,在各化学成分含量比例方面呈现出一定差异。

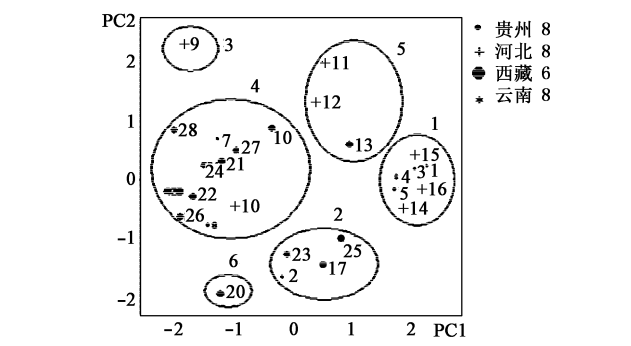


图 7 不同批次天麻主成分分析
Fig. 7 Principal component analysis of different batch of Gastrodiae Rhizoma

3 讨论

天麻样品按 2010 年版《中国药典》“天麻”项下用 70% 甲醇超声提取后直接点样,结果斑点显色不清晰,拖尾严重。故考察了不同体积分数甲醇超声处理天麻样品,浓缩后直接点样,展开,结果显示按 2.3 项下方法处理后,斑点清晰,分离较好。展开剂考察了乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:0.2)、三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)、三氯甲烷-甲醇(5:1)及三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2.5:1:1:0.1),结果发现以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2.5:1:1:0.1)为展开剂时,斑点的分离度及清晰度均比其他展开剂好,且信息量丰富。

预试验考察了不同薄层色谱板的耐用性,包括

硅胶 G,硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂),硅胶 GF₂₅₄ (黄海牌烟台江友硅胶有限公司)和硅胶 H。结果发现硅胶 GF₂₅₄ (黄海牌烟台江友硅胶有限公司)与硅胶 G 的斑点较多,分离度较好,但前者的斑点在荧光 254 nm 和 366 nm 下更加清晰明显。

显色剂考察了 10% 磷钼酸乙醇试液(105 ℃加热)、香草醛浓硫酸溶液、碘熏及 10% 硫酸乙醇试液(105 ℃加热),结果显示前两者虽斑点清晰明显,但斑点较少;碘熏虽斑点较多,但褪色较快,导致某些斑点较快消失,难以进行指纹图谱研究;而采用 10% 硫酸乙醇试液为显色剂时,斑点清晰且稳定。展开环境考察发现,温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 60% ~ 70% 时重复性、稳定性均较好。

[致谢]:珠海科曼公司田润涛先生惠赠 CHROMAP1.5 色谱指纹图谱系统解决方案软件。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:54.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国中药材薄层色谱彩色图集. 第 1 册[S]. 北京:人民卫生出版社,2010:96.
[3] Ha J H, Shin S M, Lee S K, et al. *In vitro* effects of hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* and their analogues on GABAergic neurotransmission and a structure-activity correlation[J]. *Planta Med*, 2001, 67 (9):877-880.
[4] Hayashi J, Sekine T, Deguchi S, et al. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59 (5):513-519.
[5] 王亚男,林生,陈明华,等. 天麻水提取物的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (12):1775-1781.
[6] 刘智,王爱民,迟明艳,等. 采用多指标成分评价全天麻胶囊品质的研究[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47 (5):380-383.
[7] 闫宝庆,张晖芬,逢楠楠,等. RP-HPLC 同时测定天麻中四种成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (22):2903-2906.
[8] 刘智,王爱民,许祖超,等. 全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (15):86-88.
[9] 苏星,李相坤,吴毅,等. 北沙参药材的薄层色谱指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2012, 35 (2):210-213.
[10] 袁亚洲. 纹图谱结合化学计量学在中药质量控制中的研究[D]. 南昌:南昌大学,2008.
[11] 高晓霞,严寒静,梁从庆. 不同采集地制何首乌薄层色谱指纹图谱研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13 (5):4-7.

[责任编辑 刘德文]