

应用 HPLC-DAD/MS 技术评价中药天麻的质量

张 炜¹, 盛或欣¹, 张金兰^{1*}, 徐锦堂², 孙素琴³

(1. 中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050;

2. 中国医学科学院·中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094; 3. 清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 分析比较不同产地及不同炮制方法的天麻药材质量。天麻药材指纹图谱 HPLC-DAD 分析条件如下: Zorbax XDB C₁₈ 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 醋酸水梯度洗脱, 检测波长为 270 nm。MS 分析条件: 采用 ESI 电离源, 负离子检测模式。天麻药材含量测定 HPLC 条件: 流动相为乙腈-0.1% 醋酸水等度洗脱, 其余均同天麻药材指纹图谱的液相分析条件。结果表明, 不同产地天麻药材具有相似的指纹图谱, 原药材直接冻干的炮制方法较其他方法具有较高的相似度; 指认了天麻药材指纹图谱中 8 个主要的色谱峰; 指纹图谱相似度的分析结果与主要成分定量分析的结果基本一致。本文所建立的 HPLC-DAD/MS 分析方法能够对天麻药材进行全面的综合评价。

关键词: 天麻; 指纹图谱; 天麻素; 天麻苷元; HPLC-DAD/MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)04 - 0418 - 06

Evaluation of the quality of *Gastrodia elata* Bl. by HPLC-DAD/MS

ZHANG Wei¹, SHENG Yu-xin¹, ZHANG Jin-lan^{1*}, XU Jin-tang², SUN Su-qin³

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The chromatographic fingerprint of *Gastrodia elata* Bl. (Tianma) was developed to compare the quality of Tianma samples from different habitats and processing methods. The above analysis method was established by HPLC-DAD technique. And an HPLC method was used to analysis the contents of gastrodin (GAS) and *p*-hydroxybenzyl alcohol (HBA) in Tianma from different habitats and processed methods. Experiments of chromatographic fingerprint analysis were carried out with a Zorbax XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% aqueous acetic acid in gradient elution mode. The column was maintained at 25 °C. Detection was set at 270 nm. The mass spectra were recorded using as ESI source in the negative mode with ion spray voltage at 3 500 V, source temperature at 335 °C, gas spray at 8.3 kPa and gas flow rate at 9 L·min⁻¹. The HPLC methods of quantitative analysis were the same as those of chromatographic fingerprint analysis except the mobile phase, which consisted of acetonitrile and 0.1% aqueous acetic acid in isocratic elution mode with the ratio of 4.5 to 95.5 (v/v). Data of chromatographic fingerprint were analyzed by the "similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004 A)" software to compare the quality of Tianma. Samples from different habitats with the same processing method were of high similarity, though a few samples showed evident difference in fingerprint graphics. For Tianma samples with different processing methods, the contents of common peaks were different and the processing method of freezing to dry was better than others. With HPLC-MS technique, 8 major common peaks in the fingerprint of Tianma were identified by their MS spectra and comparison with the reference standards. The results of similarity analysis for chromatographic fingerprint were basically consistent with those of quantitative analysis. The

收稿日期: 2006-09-29.

基金项目: 科技部新技术新方法研究资助项目 [科 (2004-05)].

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 83154880, Fax: 86 - 10 - 63017757, E-mail: zhjl@imm.ac.cn

established HPLC-DAD/MS methods can be used to evaluate the quality of Tianma.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; fingerprint; gastrodin; *p*-hydroxybenzyl alcohol; HPLC-DAD/MS

天麻是兰科植物天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 的干燥根茎,又名赤箭,定风草,独摇兰。天麻是传统名贵中药,药用历史达 1 000 多年。现代药理学研究证明天麻具有抗惊厥、镇静、镇痛及抗炎等作用,并对大脑的学习和保护功能也有不同的作用^[1]。文献^[2-5]报道天麻化学成分多为酚类化合物,其中包括天麻素 (Gastrodin, GAS) 即对羟基苯甲醇-β-D 葡萄糖苷,天麻苷元 (*p*-hydroxybenzyl alcohol, HBA), 对羟基苯甲醛,琥珀酸,对羟基苯甲酸等化合物。

天麻作为名贵中药,在市场中广泛应用,但是有关天麻的质量控制方法仍然不够健全和完善,时常有伪品(马铃薯、芋头、紫茉莉)充斥天麻市场,扰乱正常经营秩序。因此建立综合有效且快速的天麻药材质量评价方法对天麻药材的应用具有重大意义。目前《中国药典》2005 版中采用 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定,指标成分均为天麻素^[6],也有一些文献建立了天麻药材或天麻注射液中天麻素及天麻苷元的含量测定方法^[7-11],但尚未见天麻药材色谱指纹图研究的文献报道。此外,不断发展的中药炮制学也促进了名贵中药天麻炮制方法的发展。传统炮制的方法一般为蒸煮后烘干入药^[12],现代炮制技术的进步使得冻干法得以发展,但是现代炮制方法与传统炮制方法的优劣需要对天麻全面质量研究进行评价。

本文运用先进的分析技术 HPLC-DAD 和 LC-MS 建立天麻药材指纹图谱的分析方法,通过相似度软件处理,得到共有峰并对其进行指认,同时结合主要有效成分天麻素和天麻苷元的含量测定来综合评价不同产地天麻药材的质量和不同炮制方法天麻药材的优劣,为天麻的质量控制提供有效方法。

材料与方 法

试剂与仪器 Agilent 1100 HPLC 配有在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器; Agilent LC/MSD XCT Trap 液质联用仪。乙腈、甲醇购于 TEDIA 公司,色谱级;去离子水经过 Milli-Q 系统纯化制备;冰醋酸购自北京化工厂,分析纯。

天麻药材的不同产地和不同炮制方法详见表 1。4 种炮制方法分别为:天麻药材直接烘干 (A)、天麻药材直接冻干 (B)、天麻药材煮后冻干 (C) 和

天麻药材煮后烘干 (D)。天麻素对照品购于中国药品生物制品检定所,天麻苷元即对羟基苯甲醇购于 Fluka 试剂公司,结构式见图 1。

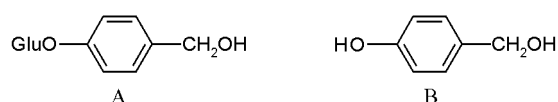


Figure 1 Chemical structures of gastrodin (A) and *p*-hydroxybenzyl alcohol (B)

天麻素和天麻苷元对照品溶液的制备 精密称取天麻素、天麻苷元对照品各 4 mg,分别置于 2 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得 2 mg·mL⁻¹对照品储备液。

指纹图谱的分析条件 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: A(乙腈)-B(0.1% 醋酸水)梯度洗脱, 0~15 min, A: 2%~8%, B: 98%~92%; 15~35 min, A: 50%, B: 50%; 35~45 min, A: 2%, B: 98%。检测波长为 270 nm;进样量为 15 μL;柱温为 25 °C;流速为 1 mL·min⁻¹。理论塔板数以天麻素峰计不应低于 5 000。

含量测定的分析条件 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相

Table 1 Summary of the tested samples

Sample No.	Habitat	Processing method
1	Dafang Guizhou province	A B C D
2	Dafang Dashan Guizhou province	A B C D
3	Dafang Lvgan Guizhou province	A B C D
4	Pengzhou Baima Sichuan province	A B C D
5	Pengzhou Jianma Sichuan province	A B C D
6	Zhaotong Yunnan province	A B C D
7	Jinzhai Anhui province	A B C D
8	Lueyang Qingnihe Shaanxi province	A B C D
9	Mianxian Jinhua Shaanxi province	A B C D
10	Mianxian Tangjiazhuang Shaanxi province	A B C D
11	Lueyang Hejiayan Shaanxi province	A B C D
12	Lueyang Xihuaiba Shaanxi province	A B C D
13	Lueyang Jiuchongjin Shaanxi province	A B C D
14	Honggan Gansu province	A B C D
15	Lvgan Gansu province	A B C D
16	Honggan Shouguang Shandong province	A B C D
17	Shimen Hunan province	A B C D
18	Xixia Henan province	A B C D

A: Baking to dry; B: Freezing to dry; C: Freezing to dry after boiling; D: Baking to dry after boiling

为乙腈-0.1%醋酸水(4.5:95.5)等度洗脱;检测波长为270 nm;进样量为15 μL;柱温为25 ℃;流速为1 mL·min⁻¹。理论塔板数以天麻素峰计不应低于5 000。

MS分析条件 ESI离子源,负离子检出模式,离子源喷雾电压为3.5 kV,离子源温度为335 ℃,雾化气压力和干燥气流速分别为8.3 kPa和9 L·min⁻¹。

数据处理 应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”(国家药典委员会编)软件进行数据处理,将多个色谱图进行比较,得到全面反映多个色谱图特征的共有模式色谱图对照指纹图谱。以此对照指纹图谱为基准,计算每个色谱图与之相比较的相似度。

天麻药材供试品溶液的制备 天麻药材粉碎,过60目筛,精密称取粉末0.1 g置具塞玻璃试管中,加入水10 mL,充分浸润过夜,称重,次日超声30 min,称重,补足减失溶剂,静置,取上清液于35 ℃减压蒸干,加入甲醇1 mL溶解并定容,过0.45 μm微孔滤膜后,即得。

结果与讨论

1 指纹图谱 HPLC 条件优化

1.1 检测波长考察

采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察,分别提取并观察在220, 254, 270, 360和400 nm波长处的色谱图,结果在270 nm处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富。因此,选择该波长作为检测波长。

1.2 流动相的选择

天麻药材所含成分复杂且极性范围跨度很大,等度洗脱很难分离,故采用梯度洗脱方式。酚类成分呈弱酸性,酸性缓冲系统比纯水系统分离更优。分别比较了0.1%醋酸水系统和0.02%磷酸水系统,结果发现两者的分离效果相近,由于磷酸对色谱柱及液相系统有一定的损害,故选择醋酸系统,最终确定乙腈-0.1%醋酸水溶液为流动相。

2 天麻药材提取优化

天麻药材的提取主要考察以下几个方面:提取溶剂、提取方式、提取时间和提取体积。在提取溶剂考察中,比较了水、无水乙醇、异丙醇(1:1)、甲醇对天麻药材的提取效果,结果表明水和甲醇对天麻药材提取效果相似,但根据民间中药传统服用方法为水煎,最终选择提取溶剂为水;《中国药典》2005年版中天麻药材提取方法为热回流^[6],本实验中比较

了超声和热回流两种方法,结果发现热回流提取时,天麻素峰面积比超声提取时低而苷元峰面积增高,可能是天麻素受热分解,因此确定用超声提取方法;对于超声时间分别考察了15, 30, 40和60 min,结果表明30, 40和60 min提取效果差不多,因此选择较短时间30 min作为药材提取时间;最后考察了不同超声体积,分别为2, 5, 10和20 mL,经过对指纹图谱主要峰的峰面积、提取体积的考察,结果表明10 mL提取效果最好,确定提取体积为10 mL。

3 天麻药材指纹图谱分析结果

3.1 稳定性、精密度和重现性实验

配制天麻药材供试品溶液分别在0, 2, 4, 8, 12和24 h进行指纹图谱分析。再取此溶液连续进样6次,进行指纹图谱分析。另取天麻样品粉末6份,精密称量,按供试品溶液制备方法制备供试品,进行指纹图谱分析。以上结果表明各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致,相似度均大于0.95,通过方法学考察结果表明该方法稳定性、精密度、重复性均较好,能够满足要求。

3.2 不同产地不同炮制方法天麻药材指纹图谱分析

对18个不同产地且每个产地均有4种不同炮制方法,共72个天麻药材样品进行HPLC分析,得到指纹图谱,通过相似度软件处理,得相似度结果见表2,陕西略阳清泥河产地4种炮制方法制备的天

Table 2 The similarity results of the analyzed samples

Sample No. ^a	Value of similarity			
	A	B	C	D
1	0.98	0.99	0.70	0.79
2	0.97	0.99	0.93	0.60
3	0.98	0.95	0.96	0.83
4	0.96	0.99	0.82	0.87
5	0.97	0.94	0.96	0.88
6	0.95	0.95	0.95	0.84
7	0.85	0.98	0.94	0.76
8	0.92	0.99	0.97	0.92
9	0.98	0.99	0.98	0.97
10	0.99	0.99	0.97	0.97
11	0.96	0.99	0.96	0.88
12	0.88	0.92	0.96	0.95
13	0.81	0.87	0.88	0.80
14	0.98	0.99	0.94	0.94
15	0.98	0.99	0.95	0.94
16	0.98	0.99	0.93	0.95
17	0.97	0.99	0.90	0.86
18	0.99	0.99	0.92	0.93

^a Sample No.: Represented the habitat of Tianma listed in Table 1

麻药材指纹图谱见图 2,不同产地天麻药材指纹图谱见图 3。表 2 结果表明除个别产地如陕西略阳九重金外,大多数产地天麻药材质量的相似度较好。通过对比 18 个不同产地 4 种炮制方法制备的天麻药材的相似度结果,可以看出药材直接冻干的炮制方法普遍好于其他炮制方法。

3.3 天麻药材指纹图谱中共有峰的指认

通过相似度软件对天麻药材指纹图谱的处理后,得到 10 个共有峰(图 4),采用 LC-MS 技术对共有峰进行指认分析。通过质谱指认及对对照品对照并参考相关文献,鉴定了 8 个共有峰,结果见表 3,其中峰 3 和 4 分别是天麻素和天麻苷元。

4 天麻主要成分定量分析

4.1 方法确证

4.1.1 色谱图 根据建立的 HPLC 条件分析,得到天麻素和天麻苷元对照品溶液和天麻药材供试液的色谱图见图 5。

4.1.2 最低检测限测定 取天麻素和天麻苷元储备液用甲醇稀释一系列浓度,按 HPLC 条件分析,记录样品每次测定得到的药物信号强度与噪音的比值,信噪比 $S/N \geq 3$ 时的最低量即为最低检测限。天麻素和天麻苷元的最低检测限分别为 14.4 ng 和 12.1 ng。

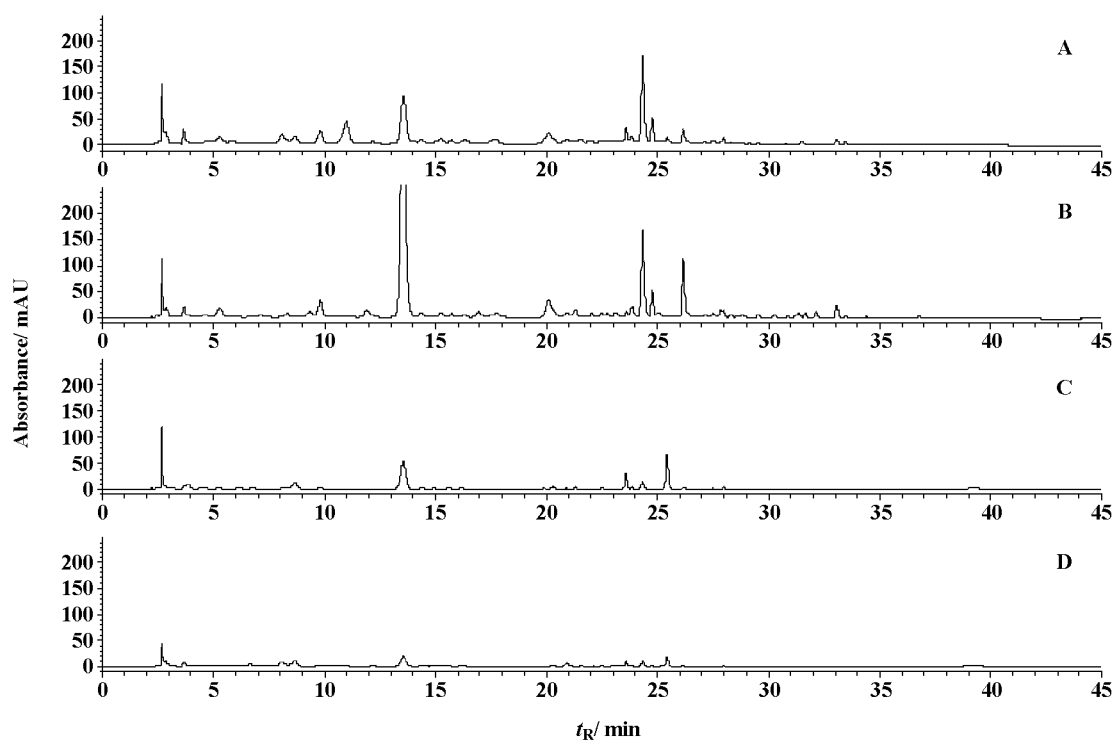


Figure 2 The chromatographic fingerprints of Tianma from Lueyang Qingnihe Shanxi Province with 4 different processing methods A - D see Table 1

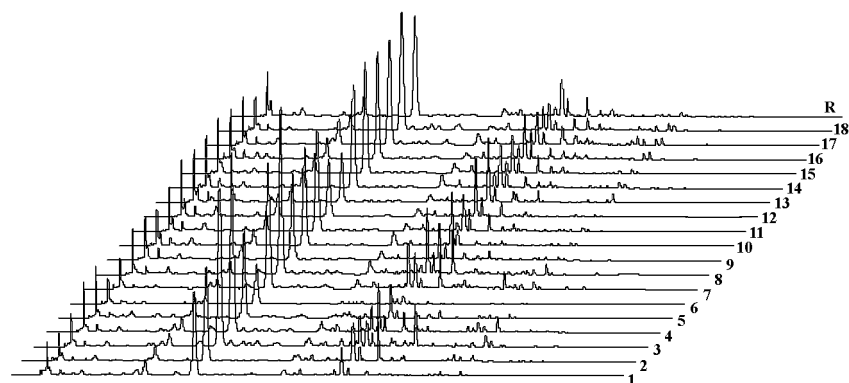


Figure 3 HPLC fingerprints of Tianma from 18 different habitats with processing method of freezing to dry. The meanings of No. 1 - 18 see Table 1. The R means the reference chromatographic fingerprint

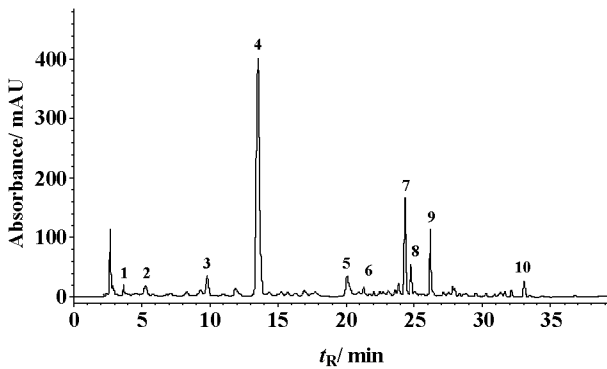


Figure 4 HPLC fingerprints of Tianma from Lueyang Qingnihe Shaanxi province with processing method B. The meanings of No. 1 - 10 are the common peaks (see Table 3)

Table 3 HPLC-MS data and identification for Tianma

Comm on peak No.	t_R /m in	[M - H] ⁻	MS ² fragmentation	Possible compound
1	3.9	191	139	Citric acid
2	5.8	341	249	Unknown compound
3	9.7	285	123	Gastrodin
		345		
		571		
4	14.0	123	90	<i>p</i> -Hydroxybenzyl alcohol
5	21.3	412	301	Unknown compound
6	22.5	199	145	4, 4'-Dihydroxydiphenyl methane
7	24.7	121	88	<i>p</i> -Hydroxybenz aldehyde
8	25.6	995	826	tri[4-β-D-Glucopyranosyloxybenzyl]-citrate
9	27.5	391	185	Gastrodioside
10	28.8	229	167	4, 4'-Dihydroxydiphenyl ether

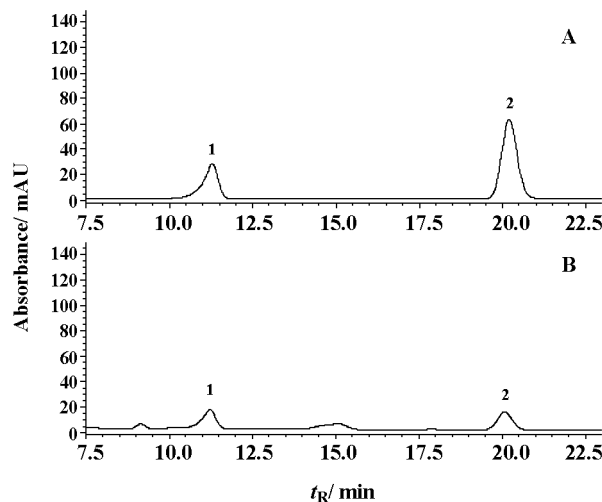


Figure 5 HPLC chromatograph of Tianma. Peak 1: Gastrodin; Peak 2: *p*-Hydroxybenzyl alcohol; A: Reference standard solution; B: Sample of Shimen Hunan province

4.1.3 标准曲线和线性范围 分别精密吸取“对照品储备溶液”项下 2 种对照品储备液 5, 10, 50, 75, 100, 150 和 250 μL 于 1 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 配制成系列浓度的对照品混合溶液。分别以天麻素和天麻苷元的峰面积 (Y) 对浓度 (X) 作图, 求得 r 值及线性回归方程 $Y = aX + b$, 结果见表 4。

Table 4 Calibration curves of Gastrodin (GAS) and *p*-hydroxybenzyl alcohol (HBA)

Analyte	Calibration curve	r	Test range /μg• mL ⁻¹
GAS	$Y = 0.005X - 0.019$	0.999 9	0.98 - 392
HBA	$Y = 0.015X + 0.003$	0.999 9	1.21 - 484

4.1.4 精密度 配制 3 个浓度的对照品混合溶液 (天麻素: 15.17, 151.75 和 305.25 μg• mL⁻¹; 天麻苷元: 10.02, 160.32 和 300.60 μg• mL⁻¹) 进行日内和日间精密度考察。对于日内精密度, 连续进样 6 次; 对于日间精密度, 连续 6 d 同法测定, 每天各浓度重复进样 2 次。天麻素和天麻苷元日内和日间测定 RSD 值分别小于 2.2% 和 5.1%。

4.1.5 稳定性 将上述低、中、高的对照品混合溶液 (天麻素: 15.17, 151.75 和 305.25 μg• mL⁻¹; 天麻苷元: 10.02, 160.32 和 300.60 μg• mL⁻¹), 分别于 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h 测定, 考察室温放置稳定性。将上述样品放置冰箱内, 连续测定 6 d, 考察低温保存稳定性。天麻素和天麻苷元在 6 d 内测得浓度的 RSD 分别小于 2.2% 和 5.1%。

4.1.6 回收率 精密称取天麻药材样品 6 份, 其中 1 份进行天麻素和天麻药材的含量测定, 另 5 份分别加入天麻素和天麻药材标准储备液 50 μL, 按“天麻药材供试品溶液的制备”项下方法配制。按照建立的 HPLC 色谱条件进行测定, 计算回收率。天麻素低、中、高浓度平均回收率分别为: 101.54%, 98.57% 和 100.16%; 天麻苷元回收率分别为: 103.57%, 99.20% 和 101.23%。

4.2 天麻药材测定

取表 1 中 72 个天麻样本, 按已建立的提取与分析方法操作, 代入标准曲线方程, 计算天麻素和天麻苷元的含量, 结果见表 5。可以看出药材直接冻干的炮制方法天麻素和天麻苷元的含量较高, 这与指纹图谱分析的结果相一致。

Table 5 The contents of GAS and HBA in Tianma

Sample No. ^a	Contents / %							
	A		B		C		D	
	GAS	HBA	GAS	HBA	GAS	HBA	GAS	HBA
1	0.20	0.33	0.24	0.38	0.14	0.20	0.16	0.01
2	0.17	0.32	0.04	0.39	0.07	0.06	0.10	0.31
3	0.28	0.59	0.32	1.29	0.14	0.17	0.19	0.07
4	0.41	0.98	0.36	0.87	0.25	0.02	0.02	0.45
5	0.21	0.38	0.29	0.64	0.22	0.14	0.20	0.14
6	0.26	0.21	0.25	0.54	0.11	0.27	0.09	0.11
7	0.31	0.18	0.21	0.54	0.17	0.86	0.14	0.28
8	0.40	0.08	0.28	0.35	0.12	0.63	0.19	0.31
9	0.67	0.21	0.22	0.51	0.17	0.32	0.12	0.30
10	0.23	0.79	0.21	0.55	0.20	0.24	0.08	0.17
11	0.12	0.47	0.13	0.52	0.13	0.12	0.17	0.19
12	0.41	0.27	0.33	0.57	0.20	0.55	0.12	0.14
13	0.11	0.20	0.15	0.47	0.15	0.10	0.18	0.06
14	0.13	0.68	0.19	0.60	0.17	0.25	0.18	0.17
15	0.19	0.63	0.24	0.64	0.20	0.37	0.17	0.43
16	0.26	0.64	0.33	0.81	0.14	0.30	0.11	0.38
17	0.33	0.49	0.33	0.81	0.21	0.15	0.14	0.15
18	0.28	0.65	0.20	0.68	0.05	0.14	0.19	0.36

^a Sample No.: Represented the habitat of Tianma listed in Table 1

结论

本实验结果表明大多数产地天麻药材质量的相似度较好,天麻素的含量符合药典要求;只有个别产地如陕西略阳九重金的质量相似度较差,天麻素的含量也较低。通过对比 18 个不同产地中 4 种炮制方法制备的天麻药材的相似度及定量分析结果,可以看出药材直接冻干的方法对天麻主要成分保留更多,煮后烘干的则最少,由此可以推断现代炮制方法优于传统炮制方法。指纹图谱反映了天麻的化学组成及其相对比例,天麻素和天麻苷元的同时测定反映了天麻药材主要活性成分的含量,二者相结合可对天麻药材的栽培、生产加工、贮藏运输、临床使用等各个环节进行全面可靠的质量监控。

本文建立了快速简便的 HPLC 方法,用于天麻药材指纹图谱研究及两个主要活性成分天麻素和天麻苷元的同时测定。虽已有文献^[8-10]报道对天麻药材或天麻注射液中天麻素及其苷元的含量测定的研究,但本文含量测定方法与前人的相比分析时间缩短近一倍,且灵敏度提高,流动相选用 0.1% 醋酸

水系统对色谱柱及色谱系统损害更小,配制简单且有利于与 MS 串接,这些更适用于天麻药材的常规质量控制。

References

- [1] Tang W, Eisenbrand G. Chinese Drugs of Plant Origin [M]. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992: 545 - 548.
- [2] Song ZY, Zhou TH, Fang QC, et al. Modern Research of Chinese Herbs (中草药现代研究) [M]. Beijing: Peking Medical University & Peking Union Medical College Press, 1995, 1: 120 - 144.
- [3] Zhou J, Yang YB, Yang TR. The chemistry of *Gastrodia elata* Bl. 1. The isolation and identification of chemical constituents of *Tianma elata* Bl (Chinese) [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1979, 37: 183 - 189.
- [4] Taguchi H, Yoshioka I, Yamasaki K, et al. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 55 - 62.
- [5] Feng HC. Studies on the constituents of *Gastrodia elata*. [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1979, 37: 175.
- [6] State Pharmacopoeia Committee of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005, 39 - 40.
- [7] Cheng SZ, Liang CZ, Ran MX, et al. The determinations of Gastrodin in Rhizoma *Gastrodiae* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1984, 4: 344 - 347.
- [8] Sha ZF, Sun WJ. The determinations of Gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in Rhizoma *Gastrodiae* by HPLC method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1985, 5: 218 - 220.
- [9] Cheng SZ, Liang CZ, Ye CZ. The determinations of Gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in Rhizoma *Gastrodiae* by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1985, 5: 336 - 338.
- [10] Tong CY. HPLC analysis of Gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in Tianma injection [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1989, 9: 182 - 183.
- [11] Wang MZ. HPLC Analysis of Common TCM (常用中草药的 HPLC 分析) [M]. Beijing: Science Press, 1999: 51 - 54.
- [12] He RL. Collecting processing storing technique of *Gastrodia elata* Bl. [J]. Edibl Fungi China (中国食用菌), 2000, 19: 14.