

白及薄层色谱鉴别方法的改进和高效液相指纹图谱研究*

杨顺利, 杨枝中, 李 龙, 彭晓丽, 梅双喜[△]

(云南白药集团创新研发中心 / 云南省药物研究所 / 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: **目的** 改进白及薄层鉴别方法和建立白及的高效液相指纹图谱, 为其质量控制提供方法。 **方法** 采用甲醇超声提取制备供试品溶液, 以三氯甲烷-甲醇-水(6:0.5:0.05)为展开剂, 1%香草醛硫酸乙醇液为显色剂; 采用 HPLC 法, 以 Thermo Acclaim 120 C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm)为色谱柱, 乙腈和水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0mL/min, 检测波长为 270nm, 柱温为 25℃; 采用中药色谱指纹图谱评价系统进行相似度分析。 **结果** 采用改进后的方法进行白及薄层鉴别, 色谱分离效果理想, 斑点清晰; 建立了白及药材 HPLC 指纹图谱, 确定 11 个共有峰, 不同批次白及特征图谱相似度均在 0.95 以上。 **结论** 该方法简单、可靠, 可用于白及药材的鉴别和质量控制。

关键词: 白及; 薄层色谱; HPLC 指纹图谱; 相似度分析; 质量控制

中图分类号: R280.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0041-05

中药白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. 的干燥块茎^[1], 为《中国药典》2010 年版一部收载品种。其味苦、甘、涩, 微寒, 归肺、肝、胃经, 具有收敛止血, 消肿生肌的功效, 用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂; 肺结核咳血, 溃疡病出血^[2]。临床上白及被应用于治疗口腔溃疡、烧烫伤和皮肤病外, 还拓展到前列腺手术、肛肠病、妇科肌瘤以及肿瘤栓塞治疗^[3-4]。近几年国内外研究表明白及块茎中分离得联苕类、菲类、联菲类、联菲醚类、菲并吡喃类、联苕葡萄糖苷类、菲并螺甾内酯类以及甾体、三萜和花色素苷类等化合物^[5-10]。白及是云南省药物研究所研制的肿痛气雾剂等产品的重要原料之一, 笔者对原料药质量控制研究中发现, 2010 年版《中国药典》对白及的质量控制仅有薄层色谱鉴别, 且方法繁琐、效果不理想。笔者优化了白及薄层鉴别条件, 改进了薄层鉴别方法, 获得了较好的结果, 使白及药材的薄层色谱鉴别简便、快速; 同时建立了白及药材 HPLC 指纹图谱鉴别方法, 为进一步完善白及药材质量标准、加强白及质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

LC-2010 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SK8200HP 型超声波振荡器 (上海科导超声仪器有

限公司); Mettler Toledo AG 285 电子分析天平 (十万分之一); Heidolph Laborata 4000-efficient 型旋转蒸发仪; 可调式封闭电炉 (FL-北京光明医疗仪器有限公司), Milli-Q[®] Advantage A10[®] system 超纯水机 (美国 Millipore 公司), 乙腈为色谱纯 (Merck KGaA); 水为自制超纯水; 甲醇、环己烷、乙酸乙酯、三氯甲烷、硫酸等试剂均为分析纯。

白及对照药材 (批号: 121262-201104), 购自中国食品药品检定研究院; 1,4-二 [4-(葡萄糖氧) 苕基]-2-异丁基苹果酸酯对照品 (militarine, 批号: 14040233, 含量: 98.0%), 购自上海同田生物技术股份有限公司。

白及药材 (批号: BJ-002, BJ-003, BJ-003, BJ-004, BJ-005, BJ-006, BJ-007, BJ-008, BJ-009, BJ-010, BJ-011), 采自云南省蒙自县冷泉镇, 经云南省药物研究所邱斌高级工程师鉴定为兰科植物白及 *Bletilla Striata* (Thunb.) Reichb.f. 的干燥块茎, 标本保存于云南省药物研究所标本室。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别改进

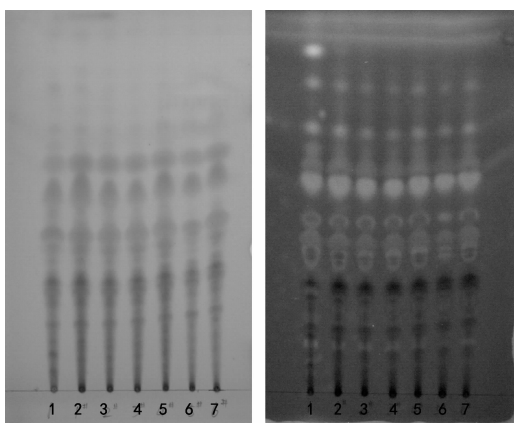
按照 2010 版《中国药典》白及鉴别项下方法^[1], 对白及药材进行薄层鉴别, 该方法耗时长, 薄层色谱清晰差, 如图 1 所示。

* 基金项目: 云南省科技领军人才培养计划项目(2014HA001)

收稿日期: 2015-08-24

作者简介: 杨顺利(1976-), 女, 云南大理人, 高级工程师, 研究方向: 中药、天然药物研究开发及质量标准研究。

[△]通信作者: 梅双喜, E-mail: 13211783158@163.com.



1. 白及对照药材; 2~7. 白及样品

图 1 白及薄层色谱图(药典方法)

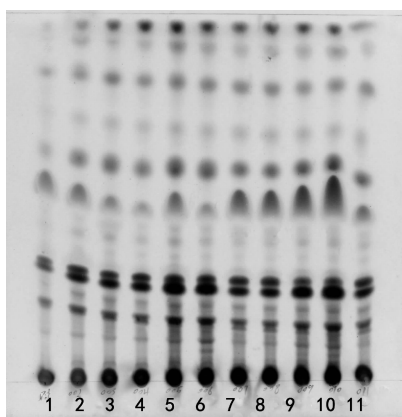
2.1.1 溶液制备

供试品溶液的制备: 取白及粉末 1g, 加甲醇 20mL, 超声处理(功率 350W, 频率 53Hz)30min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1mL 溶解, 作为供试品溶液。

对照药材溶液的制备: 取白及对照药材 1g, 按“供试品溶液的制备”方法制成对照药材溶液。

2.1.2 鉴别

吸取供试品溶液与对照药材溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (6:0.5:0.05) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 香草醛硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果表明, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的斑点, 如图 2 所示。



1. 白及对照药材; 2~11. 10 批白及样品

图 2 白及薄层色谱图(改进方法)

2.2 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim 120 C₁₈ (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-水(B)梯度洗脱

(0~15min, 18%~30% A; 15~60min, 30%~50% A; 60~65min, 50%~18% A); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 270nm。

2.2.2 对照品溶液的制备

取 militarine 对照品适量, 加甲醇溶解制备成浓度为 1mg/mL 的溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取白及粉末(过三号筛)1.0g, 置具塞锥形瓶中, 精密称定, 加入 70% 甲醇溶液 25mL, 称重, 超声处理(功率 350W, 频率 53Hz)30min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 精密度试验

取同一份供试品 (BJ-002) 溶液, 连续进样 6 次, 测定指纹图谱, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间 $\leq 0.32\%$, 相对峰面积 RSD $\leq 0.91\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 稳定性试验

取同一份供试品 (BJ-002) 溶液, 分别于 0.3、6、9、12、24h 进样, 测定指纹图谱, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD $\leq 0.53\%$, 相对峰面积 RSD $\leq 2.43\%$, 表明供试品溶液在 24h 内基本稳定。

2.2.4.3 重复性试验

取同一批白及药材 (BJ-002) 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 并测定指纹图谱, 各共有峰的相对保留时间 RSD $\leq 0.45\%$, 相对峰面积 RSD $\leq 1.80\%$, 表明方法的重复性良好。

2.2.5 白及药材 HPLC 指纹图谱的建立

10 批白及药材样品按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定指纹图谱, 见图 3, 通过图谱比较, 确定 11 个色谱峰为共有峰。Militarine 为白及药材的活性成分之一^[11], 且含量较高, 以它为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 (见表 1, 表 2), militarine 对照品 HPLC 色谱图见图 4。

2.2.6 白及药材指纹图谱相似度评价

将 10 批白及药材的指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版), 自动匹配后生成对照图谱 (见图 5), 进行相似度评价, 不同批次白及药材指纹图谱相似度均大于 0.95, 说明不同批次白及药材中化学成分相似度较高, 结果见表 3。

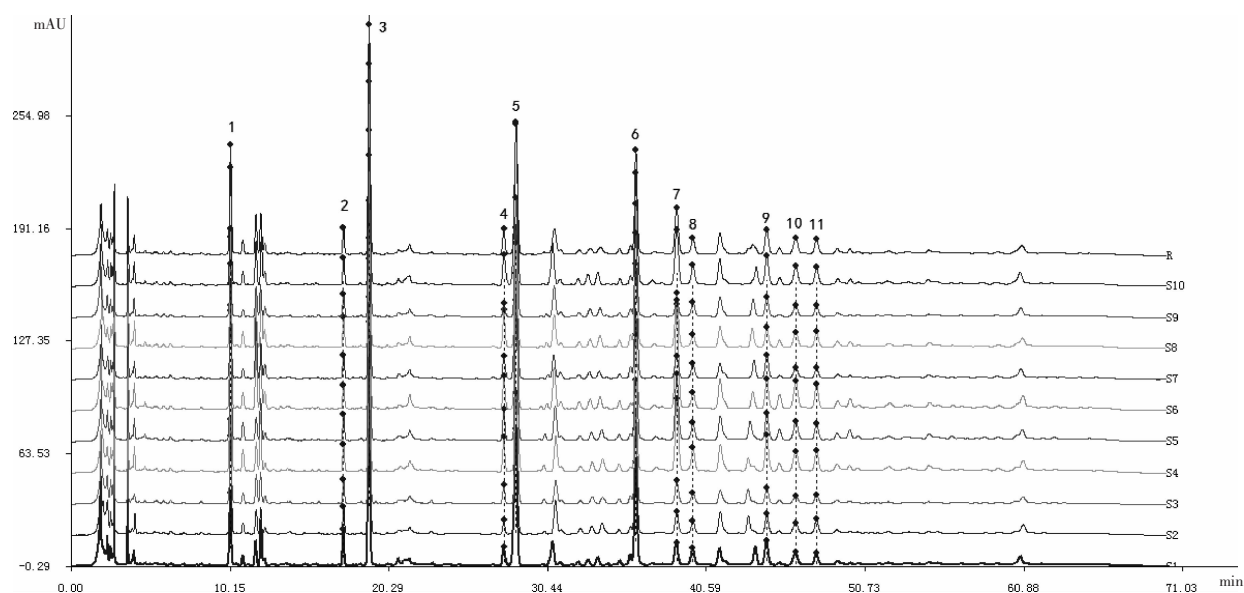


图3 不同批次白及药材 HPLC 指纹图谱

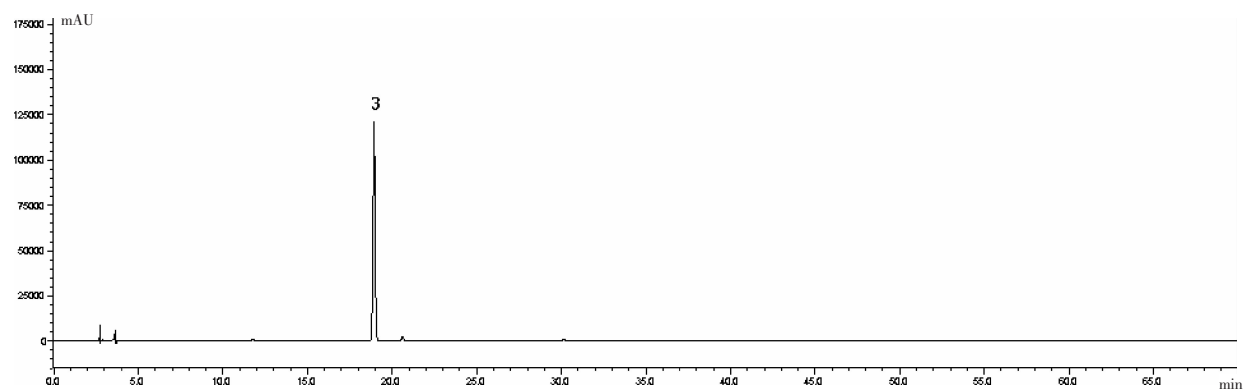


图4 参照峰 militarine HPLC 色谱图

表1 10批白及药材共有峰的相对保留时间(将3号峰的相对保留时间定为1.00)

共有峰	相对保留时间										平均值	RSD/%
	BJ 002	BJ 003	BJ 004	BJ 005	BJ 006	BJ 007	BJ 008	BJ 009	BJ 010	BJ 011		
1	0.5326	0.5372	0.5363	0.5362	0.5362	0.5344	0.5345	0.5313	0.5375	0.5318	0.5348	0.42
2	0.9150	0.9138	0.9135	0.9136	0.9138	0.9140	0.9144	0.9147	0.9139	0.9149	0.9141	0.06
3	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
4	1.4537	1.4525	1.4526	1.4519	1.4526	1.4527	1.4525	1.4526	1.4526	1.4537	1.4527	0.04
5	1.4842	1.4997	1.5018	1.5018	1.4988	1.4926	1.4893	1.4933	1.4935	1.4829	1.4938	0.46
6	1.8988	1.8947	1.8952	1.8936	1.8951	1.8968	1.8965	1.8967	1.8959	1.8992	1.8962	0.09
7	2.0235	2.0409	2.0428	2.0410	2.0382	2.0319	2.0277	2.0312	2.0304	2.0219	2.0330	0.37
8	2.0777	2.0962	2.0978	2.0961	2.0930	2.0867	2.0818	2.0860	2.0843	2.0759	2.0876	0.38
9	2.3268	2.3451	2.3465	2.3436	2.3409	2.3353	2.3299	2.3379	2.3308	2.3252	2.3362	0.33
10	2.4235	2.4433	2.4438	2.4407	2.4369	2.4314	2.4267	2.4349	2.4275	2.4214	2.4330	0.34
11	2.4919	2.5124	2.5138	2.5106	2.5074	2.5013	2.4955	2.5055	2.4957	2.4902	2.5024	0.35

表 2 10 批白及药材共有峰的相对峰面积(将 3 号峰的相对保留时间定为 1.00)

共有峰	相对峰面积											RSD/%
	BJ 002	BJ 003	BJ 004	BJ 005	BJ 006	BJ 007	BJ 008	BJ 009	BJ 010	BJ 011	平均值	
1	0.2847	0.3314	0.3954	0.6574	0.5135	0.6223	0.3633	0.4155	0.2129	0.4242	0.4221	33.41
2	0.1254	0.0882	0.1018	0.1025	0.0967	0.0853	0.0852	0.1022	0.0804	0.0900	0.0958	13.72
3	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
4	0.0917	0.0610	0.1116	0.1829	0.1621	0.1639	0.1101	0.1742	0.0645	0.1447	0.1267	35.59
5	0.8485	0.5534	0.8390	1.1339	0.8625	0.8199	0.9286	0.6081	0.7178	0.9352	0.8247	20.32
6	0.6023	0.5448	0.6282	0.5555	0.7535	0.4236	0.6592	0.7704	0.4712	0.6050	0.6014	18.36
7	0.1625	0.1461	0.2005	0.5599	0.4963	0.7400	0.1609	0.3681	0.1162	0.3780	0.3328	63.75
8	0.1249	0.0815	0.0899	0.1700	0.1270	0.1146	0.1027	0.0798	0.1003	0.1256	0.1116	24.30
9	0.1783	0.1313	0.1347	0.2832	0.1956	0.2124	0.1707	0.1318	0.1351	0.1998	0.1773	27.32
10	0.1191	0.0935	0.0813	0.1932	0.1706	0.2289	0.0969	0.1217	0.0910	0.1493	0.1346	36.83
11	0.0913	0.0940	0.0766	0.1630	0.1257	0.1735	0.0781	0.1072	0.0791	0.1300	0.1119	31.48

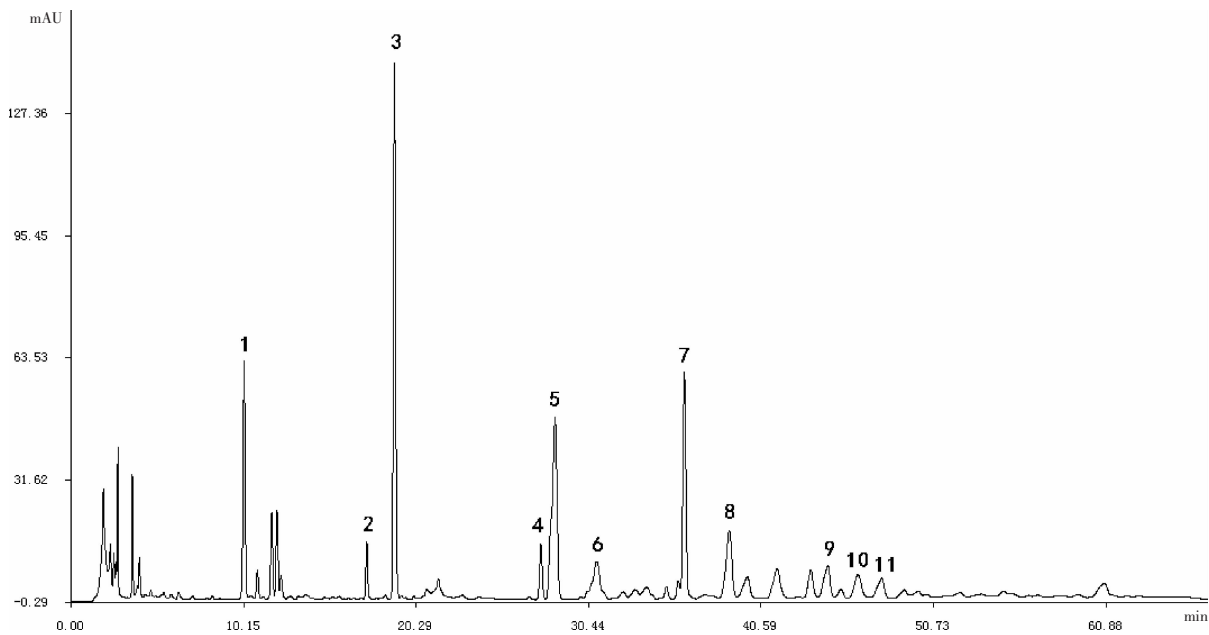


图 5 白及药材 HPLC 特征图谱

表 3 10 批白及药材样品相似度

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.990	0.981	0.995	0.979	0.993	0.958	0.990	0.983	0.979	0.998

3 讨论

2010 版《中国药典》中白及薄层鉴别采用的展开剂,即环己烷-乙酸乙酯-甲醇(6:2.5:1),在室温较高时,易挥发,比例容易发生变化,影响薄层展开的重现性。在薄层鉴别方法改进实验中,笔者摸索了

多种展开剂,最终认为文献[12]报道的展开剂三氯甲烷-甲醇-水(6:0.5:0.05)展开效果最好,并改用 1%香草醛硫酸乙醇溶液为显色剂,薄层色谱图清晰,斑点分离良好,解决了药典方法鉴别耗时长,色谱图清晰度差的问题。此外,改进了供试品溶液制

备方法,结果表明白及药材粉末加适量甲醇超声处理,即可获得与药典方法一致的薄层色谱,省去了萃取等繁琐操作,缩短实验时间,提高了工作效率。

在 HPLC 指纹图谱研究中,参照文献[13-15]选择流动相系统乙腈-水,考察了不同吸收波长 210、254、270nm 下的指纹图谱,结果表明,检测波长为 270nm 下色谱图基线较为平稳,各色谱峰的分离良好,且峰面积较为适宜。供试品溶液制备比较了超声和回流提取方法,结果表明采用超声的方法色谱图主成分峰面积略比回流提取大,且方法简便、快捷;同时考察了采用 50%甲醇溶液、70%甲醇溶液、甲醇超声提取制备供试品溶液,结果表明,70%甲醇溶液超声提取的色谱峰信息量大,主成分峰面积最大,因此选择 70%甲醇提取样品。此外,柱温考察时发现,两个成分峰的分离效果受柱温影响较大,柱温 30℃时两峰重叠,25℃和 35℃时分离良好,且出峰顺序相反,25℃时各色谱峰分离度较 35℃好,因此,将柱温固定为 25℃。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 67-68.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第二十四卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 674-679.
- [3] 雷震, 常明泉, 陈黎, 等. 白及药理作用及临床应用进展[J]. 中国药师, 2013, 16(8): 1240-1242.
- [4] 韩广轩, 孙义华, 罗晓静. 中药白及药理作用及临床应用进展[J]. 药学实践杂志, 2004, 22(4): 215-217.
- [5] 韩广轩, 王立新, 张卫东, 等. 中药白及的化学成分研究(I)[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(4): 443-445.
- [6] 韩广轩, 王立新, 张卫东, 等. 中药白及化学成分研究(II)[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1029-1031.
- [7] 任华忠, 何毓敏, 杨丽. 白及化学成分其药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(2): 134-140.
- [8] 赵艳霞, 邓雁如, 张晓静, 等. 白及属药用植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 1137-1145.
- [9] 张菊, 李艳萍, 曹玺, 等. 白及的化学成分及制剂工艺研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(12): 88-89.
- [10] 鄢艳, 关焕玉, 王爱民, 等. 黔产白及的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 57-60.
- [11] 李敏, 郭顺星, 王春兰. 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苄酯类化合物在兰科植物中的分布特点及药理活性[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(10): 724-726.
- [12] 杨毅, 艾萍, 杨丽萍, 等. 白及薄层色谱条件的改进和主要色谱斑点化学成分鉴定[J]. 亚太传统医学, 2009, 5(9): 23-25.
- [13] 陈黎, 黄良永, 毛闪闪, 等. HPLC 测定白及中 militarine 含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 4(16): 2076-2078.
- [14] 韩广轩, 黄尊动, 王麦丽. 8 种产地白及中两类菲类的含量比较[J]. 中国药师, 2011, 14(12): 1744-1745.
- [15] 何迅, 王爱民, 李勇军. 鄂西北地区白及高效液相指纹图谱研究[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(2): 105-109.

(编辑: 陈柏君)

Improvement in TLC Identification and Study on HPLC Fingerprints of *Bletilla Striata*

YANG Shunli, YANG Zhizhong, LI Long, PENG Xiaoli, MEI Shuangxi[△]

(Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To improve the pharmacopoeia TLC method and establish the HPLC fingerprints of chemical constituents in *Bletilla striata* to provide the basis for its quality control. **Methods** The samples of *Bletilla striata* were treated with the ultrasonic extracting. A mixed solution containing CHCl₃-MeOH-H₂O (6:0.5:0.05) was used as developing agent with ascending manner, and citronellal was used as the color reagent. Thermo Acclaim 120 C18 column (250mm×4.6mm, 5μm) was used with acetonitrile and water as mobile phase in a gradient mode at the flow rate of 1.0mL/min. The detection wavelength was 270 nm and the temperature of column was set at 25℃. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was applied to analysis different batches of *Bletilla striata* samples. **Results** The improved TLC method had the advantages of easy operation, good isolation effects and coloration effects. The HPLC characteristic fingerprint of *Bletilla striata* has been established. Eleven mutual peaks were selected as the fingerprint peaks in 10 batches sample and similarities were all above 0.95. **Conclusion** This method is easy and reliable which can be used to judge the habitat and control the quality of *Bletilla striata*.

KEY WORDS: *Bletilla striata*; TLC; HPLC fingerprint; similarity analysis; quality control