

# HPLC同时测定白及中3种成分的含量

张晓静, 赵艳霞, 邓雁如\*, 丁菲菲, 田华

(天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定白及中红果酸, gymnoside I, militarine 3 种成分的含量。方法:采用 Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B) 梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% A; 10~35 min, 20%~35% A; 35~50 min, 35%~100% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 225 nm, 柱温 25 °C。结果:3 种成分均能达到基线分离, 线性关系良好, 加样回收率在 95%~105%。结论:该方法专属性强, 灵敏度高、重复性好、简单易行, 可用于同时测定白及药材中红果酸, gymnoside I, militarine 3 种成分的含量, 可为白及药材的质量控制提供依据。

**[关键词]** 红果酸; 1-(4-β-D-吡喃葡萄糖氧苄基)-(2R)-2-异丁基苹果酸; 1,4-二[4-(β-D-吡喃葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0040-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210040

**Simultaneous Determination of Three Components in Bletillae Rhizoma by HPLC** ZHANG Xiao-jing, ZHAO Yan-xia, DENG Yan-ru\*, DING Fei-fei, TIAN Hua (Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a HPLC method for simultaneous determination of (2R)-2-(p-hydroxybenzyl) malic acid, gymnoside I and militarine contents in Bletillae Rhizoma. **Method:** The chromatographic conditions were follows: Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile (A) -0.05% phosphoric acid water (B) as mobile phases for gradient elution (0-10 min, 5%-20% A; 10-35 min, 20%-35% A; 35-50 min, 35%-100% A). The flow rate was of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 225 nm and the column temperature was 25 °C. **Result:** All of the three components achieved baseline separation and showed good linearity. The average recoveries were between 95%-105%. **Conclusion:** This is a specific, sensitive, repeatable and simple method for simultaneous determination of (2R)-2-(p-hydroxybenzyl) malic acid, gymnoside I and militarine contents in Bletillae Rhizoma. This method can provide basis for the quality control of Bletillae Rhizoma.

**[Key words]** (2R)-2-(p-hydroxybenzyl) malic acid; gymnoside I; militarine; HPLC

白及为多年生草本<sup>[1]</sup>, 具有收敛止血, 消肿生肌的功效, 临床上广泛用于治疗咳血吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂、肺结核咳血、胃溃疡出血等<sup>[2-4]</sup>。白及的主要成分为联苄类, 二氢菲类, 菲类, 黄酮类, 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基酯类, 多酚类等<sup>[5-7]</sup>。目前, 有关白及的含量测定报道较少。2010年版《中国药典》白及项下无含量测定项, 仅有性状和鉴别。本实验建立了 HPLC 同时测定白及中

红果酸, gymnoside I, militarine 的方法, 为进一步完善白及的质量控制方法提供依据。

## 1 材料

1200 系列高效液相色谱系统(包括四元泵, DAD 检测器, 美国 Agilent), Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), LE225D 型电子分析天平(Sartorius)。

(2R)-2-对羟苯基苹果酸(红果酸), 1-(4-β-D-

**[收稿日期]** 20141106(002)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2011CB505302)

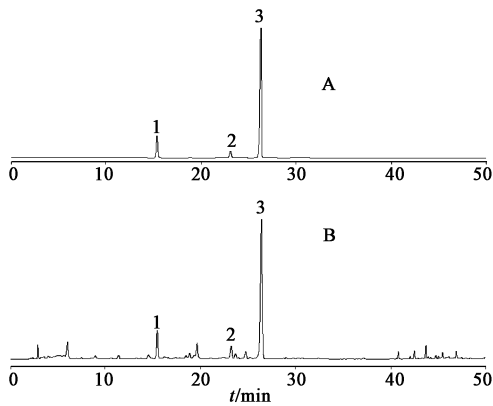
**[第一作者]** 张晓静, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel:15922089352, E-mail: xiaojing5639@163.com

**[通讯作者]** \* 邓雁如, 教授, 博士, 从事中药学研究, E-mail: dyanru@sina.com

吡喃葡萄糖氧苄基)-(2*R*)-2-异丁基苹果酸(gymnoside I), 1,4-二[4-(β-*D*-吡喃葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine)均为自制;经 HPLC 检测,质量分数均 >98%。乙腈为色谱纯(天津市康科德科技有限公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯。白及药材分别购自不同地区药店,经天津中医药大学马琳教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* 的干燥根茎。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% A; 10~35 min, 20%~35% A; 35~50 min, 35%~100% A), 柱温 25 °C, 检测波长 225 nm, 进样量 20 μL 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 红果酸; 2. gymnoside I; 3. militarine  
图 1 白及药材的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of *Bletilla* Rhizoma

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取对照品 1(红果酸)19.48 mg, 对照品 2(gymnoside I)15.94 mg, 对照品 3(militarine)45.29 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得各对照品母液。分别移取红果酸 9.502 mL, gymnoside I 7.5 mL, militarine 10 mL 于同一 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成含红果酸, gymnoside I, militarine 质量浓度分别为 370.20, 239.10, 905.80 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液, 备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 白及药材 60 °C 干燥 2 h, 粉碎, 过 60 目筛, 混合均匀, 称取样品约 1.5 g, 精密称定, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 150 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷至室温, 再称定质量, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 精密量取续滤液 100 mL, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm

微孔滤膜过滤, 备用。

**2.4 线性关系考察** 精密量取 2.1 项下混合对照品溶液 0.005, 0.025, 0.125, 0.375, 2.5, 5, 7.5, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定。以对照品溶液的质量浓度为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y)分别得到 3 种化学成分的标准曲线, 线性关系良好。见表 1。

表 1 3 种成分的回归方程和线性范围

Table 1 Linear range and regression equation of 3 components

对照品	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/μg
红果酸	Y = 52 672.10X + 42.14	0.999 8	0.185 ~ 370.20
gymnoside I	Y = 30 479.72X - 1.67	1.000 0	0.120 ~ 239.10
militarine	Y = 33 633.37X + 97.01	0.999 3	0.453 ~ 905.80

**2.5 精密度试验** 精密称取同一批白及粉末 1.5 g, 按 2.3 项下方法制备白及供试品溶液, 并按 2.1 项下色谱条件, 连续重复进样 6 次, 测定峰面积。红果酸, gymnoside I, militarine 的峰面积 RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 0.4%, 显示仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 精密称取同一批白及粉末 6 份, 各 1.5 g, 按 2.3 项下方法制备白及供试品溶液, 并按 2.1 项下色谱条件进样, 测定峰面积。结果红果酸, gymnoside I, militarine 含量的 RSD 分别为 2.2%, 1.9%, 2.0%。

**2.7 稳定性试验** 精密称取同一批白及粉末 1.5 g, 按 2.3 项下方法制备白及供试品溶液, 并在 2.1 项下色谱条件分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样, 测定峰面积。结果红果酸, gymnoside I, militarine 峰面积 RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 0.4%, 结果表明白及供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的白及粉末 6 份, 各 0.75 g, 加入各对照品适量。按 2.3 项下方法制备白及供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件下进样, 记录色谱峰峰面积, 计算回收率, 结果见表 2。

**2.9 样品测定** 精密称取不同批次及不同产地白及粉末各 1.5 g, 按 2.3 项下方法制备白及供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件进行测定, 结果见表 3。

## 3 讨论

**3.1 结果分析** 对市售的 10 批白及药材进行了含量测定, 结果表明 10 批不同批次(不同产地, 不同批次)的白及药材中 3 种成分的含量差别较大, 红果酸, gymnoside I, militarine 的质量分数分别为 0.041 7~8.155, 0.033 4~3.290, 0.032 7~24.245 mg·g<sup>-1</sup>。

表 2 白及中各成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery test of 3 components in *Bletillae Rhizoma*

成分	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
红果酸	2.234	2.681	4.853	97.68	100.78	1.8
	2.233	2.681	4.996	103.04		
	2.233	2.681	4.952	101.41		
	2.233	2.233	4.438	98.73		
	2.231	2.233	4.519	102.48		
	2.233	2.233	4.453	99.41		
	2.231	1.783	4.041	101.21		
	2.232	1.783	4.058	102.10		
	2.233	1.783	4.035	100.97		
	gymnoside I	0.568	0.684	1.269	102.48	102.29
0.570		0.684	1.262	101.12		
0.570		0.684	1.279	103.72		
0.568		0.569	1.142	100.89		
0.568		0.569	1.155	103.21		
0.568		0.569	1.153	102.87		
0.570		0.457	1.037	102.22		
0.570		0.457	1.035	101.79		
0.570		0.457	1.038	102.32		
militarine		5.822	6.988	12.721	98.73	99.58
	5.823	6.988	12.693	98.31		
	5.825	6.988	12.970	102.25		
	5.822	5.818	11.701	101.05		
	5.821	5.818	11.617	99.63		
	5.831	5.818	11.556	98.41		
	5.830	4.659	10.411	98.33		
	5.824	4.659	10.550	101.44		
	5.822	4.659	10.392	98.10		

**3.2 提取条件的筛选** 由于红果酸, gymnoside I, militarine 易溶于甲醇, 乙醇等有机溶剂, 本实验比较了甲醇回流 2 h, 甲醇超声 2 h, 甲醇索氏提取 2.5 h, 95% 乙醇回流提取 2 h 的提取效果, 结果甲醇回流 2 h 和 95% 乙醇回流提取 2 h 的提取效果最好, 其次是超声提取, 索氏提取。

**3.3 检测波长的确定** 对红果酸, gymnoside I, militarine 的紫外吸收峰进行全波长扫描, 得出它们最大吸收波长依次为 223.8, 225.0, 223.8 nm, 故选择 225 nm 波长为检测波长。

表 3 白及药材含量测定

Table 3 Determination of 3 components in *Bletillae Rhizoma*

来源	红果酸	gymnoside I	militarine
贵州 20100810	1.001	1.020	10.320
贵州, 安国药材	0.114	3.290	10.601
湖南, 安国药材	0.042	1.439	22.645
湖北, 20111218	8.155	0.037	-
安徽, 20121723	6.566	0.033	-
湖南, 天士力药房	0.056	2.463	16.448
广西, 华丰大药房	0.659	0.313	4.500
安国药材, 光明药房	6.955	0.050	0.033
四川, 100901	4.752	0.133	0.359
宁夏, 12042910	5.036	0.042	-

**3.4 色谱条件的选择**<sup>[8]</sup> 本实验以乙腈-0.05% 磷酸水为流动相, 当流速为 1 mL·min<sup>-1</sup> 时, 通过改变初始流动相极性, 不同时段梯度洗脱比例等多种方法, 均不能使要测定的 3 个成分的峰达到较好分离; 但通过对不同梯度洗脱时间段内流速的调节, 各被测成分均能达到基线分离。

[参考文献]

[1] 韩广轩, 王立新, 王麦莉, 等. 中药白及化学成分的研究[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(6):360-361.  
 [2] 冯敢生, 李欣, 郑传胜, 等. 中药白芨提取物抑制肿瘤血管生成的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5):412-415.  
 [3] Li B, Masae Y, Keiko I, et al. Blestrin A and B, bis(dihydrophenanthrene) ethers from *Bletilla striata* [J]. Phytochemistry, 1990, 29(4):1259-1260.  
 [4] 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, 2010:95.  
 [5] 罗新根, 刘文庸, 张卫东. 中药白及的化学成分及临床研究进展[J]. 药学实践杂志, 1999, 17(6):359-364.  
 [6] 王爱民, 鄢艳, 兰波, 等. UPLC 同时测定白及药材中 9 种指标成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11):2051-2055.  
 [7] 韩广轩, 王立新, 张卫东, 等. 中药白及的化学成分研究(II) [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9):1029-1031.  
 [8] 唐修静, 张羽斌, 文运, 等. 不同炮制方法对白及中 militarine 及浸出物含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7):67-69.

[责任编辑 顾雪竹]