

小白及高效液相指纹图谱分析

吴梅, 李宏哲, 薛咏梅, 张庆芝, 冉毅琛, 马莎*
(云南中医学院 中药学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**通过建立小白及高效液相指纹图谱,研究小白及化学成分及其有效成分在指纹图谱中的分布特征。**方法:**采用 HPLC,建立小白及指纹图谱,选择 militarine, coelonin, 山药素Ⅲ, 4-甲氧基-9,10-双氢菲-1,2,7-三醇 4 个成分对色谱峰进行指认,通过相似性评价软件,结合化学计量学方法对 17 批小白及指纹图谱进行分析、比较,同时与正品白及相比较。**结果:**建立了小白及 HPLC 指纹图谱,重复性、稳定性较好;小白及对照指纹图谱共确定了 20 个共有峰,指认了 4 个共有峰, militarine 为 8 号峰,山药素Ⅲ,4-甲氧基-9,10-双氢菲-1,2,7-三醇分别对应 10,14,18 号峰;相似度评价除 S4 较低之外,其余小白及样品的相似度 > 0.85,样品共有峰相对峰面积差异较大;聚类分析的距离 10 时,样品聚为 5 类,具有一定的产地相关性;主成分分析表明引起差异的共有峰主要位于 9 号峰之后,是二氢菲类、联苕类等有效成分的分布区域。小白及与白及的化学成分相似,指纹图谱相似度较高。**结论:**该方法为小白及质量控制提供了方法支撑,并为其作为白及替代品的进一步临床应用提供了理论依据。

[关键词] 小白及;白及;指纹图谱;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0180-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190515

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181120.1557.003.html>

[网络出版时间] 2018-11-21 16:42

HPLC Fingerprint of Bletillae Formosanae Rhizoma

WU Mei, LI Hong-zhe, XUE Yong-mei, ZHANG Qing-zhi, RAN Yi-chen, MA Sha*

(College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of Bletillae Formosanae Rhizoma and the distribution characteristics of active components in the fingerprint by establishing its high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints. **Method:** HPLC was used to establish the fingerprint of Bletillae Formosanae Rhizoma. Four reference substances, i. e. militarine, coelonin, 4-methoxy-9, 10-dihydrophenanthrene-1, 2, 7-triol and batatasin III were used to identify chromatographic peaks. The fingerprints of 17 batches of Bletillae Formosanae Rhizoma fingerprints were analyzed and compared by “Computer-aided-similarity evaluation soft” and stoichiometry, and then compared with the fingerprint of Bletillae Rhizoma. **Result:** The established HPLC fingerprint method of Bletillae Formosanae Rhizoma showed good repeatability and stability. 20 common peaks were marked, four of which were identified by reference substances; militarine was No. 8 common peak, and others corresponded to No. 10, No. 14 and No. 18 common peaks. Results showed that the similarities of samples except S4 were higher than 0.85, but the relative peak area of common peaks was quite different. Within the cluster distance 10, the samples are clustered into 5 categories, reflecting certain origin correlation. Principal component analysis (PCA) showed that the difference in samples was mainly caused by the common peaks located after No. 9 peak, where chemical constituents such as bibenzyl and dihydrophenanthrene were distributed. Bletillae

[收稿日期] 20180821(002)

[基金项目] 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项资金项目(2015FB205[-020])

[第一作者] 吴梅, 硕士, 讲师, 从事中草药鉴定及品质评价研究, E-mail: km_wumei@163.com

[通信作者] * 马莎, 硕士, 副教授, 从事分析化学研究, E-mail: yunnanmasha@126.com

Formosanae Rhizoma and Bletillae Rhizoma showed similar chemical constituents. **Conclusion:** The method provided a theoretical basis for the further clinical application and quality control of Bletillae Formosanae Rhizoma, as a substitute for Bletillae Rhizoma.

[**Key words**] Bletillae Formosanae Rhizoma; Bletillae Rhizoma; fingerprint; HPLC

白及来源于白及属植物白及的干燥块茎,为中医常用止血药^[1]。云南未见正品白及的分布,而同属植物小白及在云南分布较广,资源丰富^[2]。明《滇南本草》中有云南地区白及药用的记载。彝族、傣族等多个少数民族将小白及作为药用,内服治疗吐血、衄血、肺癆咯血等,外敷治疗金疮痈肿,功效与中药白及相似,在云南作为白及地方习用品使用^[3]。生药研究表明小白及与白及在性状特征、显微特征和 TLC 等方面较为相似,不易区分^[4];文献报道以 militarine, 肉桂酸, BHMD (菲类), DHMD (二氢菲类) 4 个成分为指标对台湾产小白及与市售白及商品进行实验,前者含量高于后者^[5]。目前关于小白及所含化学成分整体特征的研究报道较少,陈美君等^[6]在进行白及与黄花白及指纹图谱研究中,对小白及样品进行实验,但仅收集到了 3 批样品。本实验以云南、贵州收集的 17 批小白及为样

本,采用指纹图谱研究小白及次生代谢成分^[7-8],同时以课题组从小白及抗菌、抗氧化活性部位分离得到的 3 个主要成分 coelonin (二氢菲类), 山药素 III (联苕类), 4-甲氧基-9,10-双氢菲-1,2,7-三醇 (二氢菲类) 以及在小白及中含量较高的成分 militarine 对指纹图谱共有峰进行指认,获得其有效成分在指纹图谱中的分布特征及整体质量信息,为小白及作为白及替代品的进一步临床应用及质量控制提供理论依据。

1 材料

药材经云南中医学院李宏哲副教授鉴定为兰科小白及 (*Bletilla formosana*), 兰科白及 (*B. striata*)。药材来源见表 1。以上药材收集时除样品 S1 是干燥药材、样品 S16 是干燥粉末外,其余均为新鲜品。干燥加工方法参照 2015 年版《中国药典》白及药材项下,但不去皮^[1]。干燥后粉碎,过 60 目筛,备用。

表 1 白及小白及药材信息

Table 1 Information of Bletillae Formosanae Rhizoma and Bletillae Rhizoma

编号	药材名称	产地	收集日期	来源
S1	小白及	云南	2016-12-16	购自云南绿生药业
S2	小白及	云南昆明禄劝县转龙镇	2018-07-01	野外采集
S3	小白及	云南楚雄禄丰县罗茨	2016-06-26	野外采集
S4	小白及	云南楚雄禄丰县罗茨	2016-05-04	集市购买鲜品
S7	小白及	云南红河蒙自县红寨镇	2015-10-04	野外采集
S8	小白及	云南红河蒙自县	2015-10-04	集市购买鲜品
S9	小白及	云南保山市	2015-10-23	集市购买鲜品
S11	小白及	云南昆明东川区	2016-11-20	野外采集
S12	小白及	云南曲靖师宗县	2017-05-12	采自白及种植基地
S13	小白及	云南	2014-07-27	集市购买鲜品
S14	小白及	云南大理洱源县三营镇	2017-07-11	野外采集
S15	小白及	云南大理云龙县白石镇	2017-07-10	野外采集
S17	小白及	贵州安顺镇宁县新发村 1#	2014-07-13	野外采集
S18	小白及	贵州安顺镇宁县新发村 2#	2014-07-13	野外采集
S19	小白及	贵州六盘水盘县红果镇	2014-07-11	野外采集
S20	小白及	贵州六盘水水城县吴王山	2016-06-10	野外采集
S38	小白及	云南大理宾川县平川镇	2018-07-13	野外采集
S24	白及	湖北黄冈蕲春县	2017-10-03	采自白及种植基地
S25	白及	贵州遵义正安县	2016-10-23	采自白及种植基地
S26	白及	云南昆明小哨乡	2017-05-12	采自白及种植基地
S16	白及对照药材	-	-	购自中国食品药品检定研究院 (批号 121262-201104)

2695e 系列液相色谱仪系统(配 2489UV-Vis 检测器,美国 Waters);AUW220D 型 1/1 万,1/10 万电子分析天平(日本岛津);JY2001 型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);SK7210HP 型超声波提取器(上海科导超声仪器有限公司,350 W,53 kHz);DFT-200 型粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

双[4-(β-D-吡喃葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯对照品(记作 B1, *militarine*, 上海 TAUTO 生物技术公司,批号 15122224,纯度 98%);2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-双氢菲(记作 B2, *coelonin*),山药素Ⅲ(记作 B3, *batatasin*Ⅲ),4-甲氧基-9,10-双氢菲-1,2,7-三醇(记作 B4)为实验室自制,经¹H-NMR, ¹³C-NMR 鉴定结构,TLC 纯度检查显示为单一斑点,经 HPLC 多波长下面积归一化法检测纯度均 > 95%。乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck),娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A(乙腈)-B(水)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 15% ~ 25% A; 15 ~ 25 min, 25% ~ 33% A; 25 ~ 53 min, 33% ~ 49% A);流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 °C;检测波长 270 nm;进样量 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 B1, B2, B3, B4 对照品 5.22, 4.14, 3.28, 0.42 mg, 用甲醇溶解并定容至 2 mL, 得各储备液。依次取上述储备液 190, 25, 40, 40 μL, 混合后, 用甲醇定容至 2 mL, 得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 药材粉末经 60 °C 干燥, 取 0.25 g, 精密称定, 准确加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 1 h, 用甲醇补足质量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 取同一份供试品溶液, 按 2.1 项下方法连续进样 6 次, 记录色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(V2.0)对检测结果进行统计分析, 结果显示色谱图相似度为 0.999, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.8%, 相对峰面积的 RSD 在 0.3% ~ 4.7%, 表明仪器精密密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一供试品 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 记录色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(V2.0)对检测结果进行统计分析, 结果显示

色谱图相似度均 > 0.989, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%, 相对峰面积的 RSD 在 0.9% ~ 4.6%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 10, 24 h 进行检测, 记录色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(V2.0)对检测结果进行统计分析, 结果显示色谱图相似度均 > 0.987, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积的 RSD 在 0.8% ~ 4.8%, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 小白及指纹图谱的建立及分析

2.5.1 小白及指纹图谱的建立 将 21 批样品按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法进行测定, 记录色谱图。将其中 17 批小白及色谱图导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(V2.0), 采用中位数法生成对照指纹图谱(R)。同法测定混合对照品溶液, 对其中 4 个共有峰进行了指认。见图 1, 2。

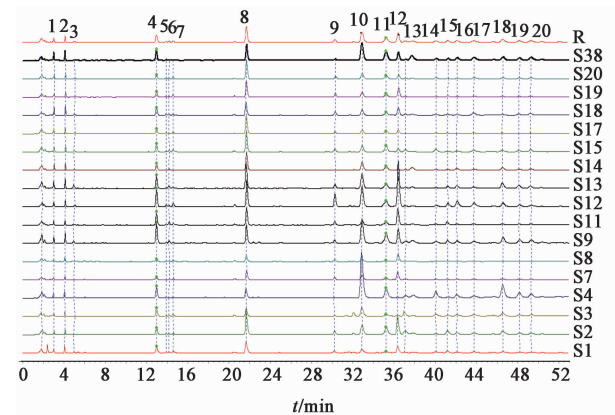
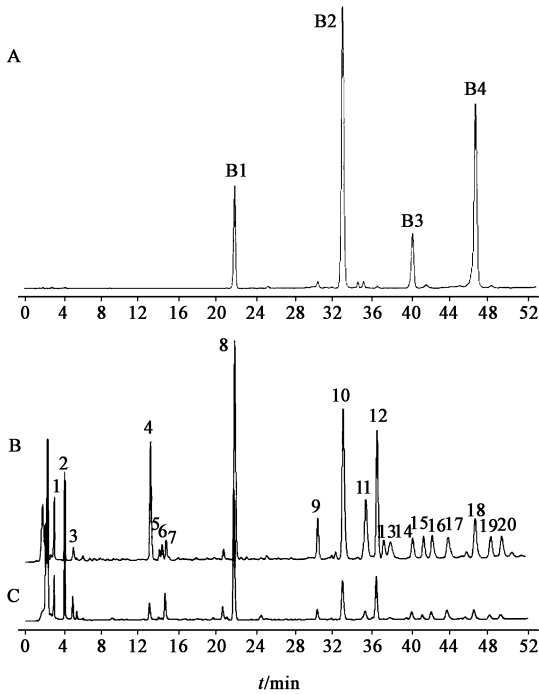


图 1 17 批小白及药材指纹图谱叠加

Fig. 1 HPLC fingerprints of 17 batches of *Bletillae Formosanae Rhizoma*

结果表明, 17 批小白及指纹图谱共确定了 20 个共有峰, 化学成分的整体特征基本一致; 指认的 4 个共有峰分别是 8 号峰(B1), 10 号峰(B2), 14 号峰(B3), 18 号峰(B4)。B1 是 *militarine*, 代表小白及所含中等极性的化学成分, 出峰时间靠前; 而 B2, B3, B4 代表小白及所含二氢菲、联苄类化学成分, 极性较小, 出峰时间靠后。

2.5.2 相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(V2.0), 计算得小白及与 2.5.1 项下对照指纹图谱的相似度; 利用软件中的“分析检验”功能, 计算得白及与小白及对照指纹图谱间的相似度, 见表 2; 以 *militarine* (8 号



A. 混合对照品; B1. militarine; B2. coelonin; B3. 山药素Ⅲ; B4. 4-甲氧基-9,10-双氢菲-1,2,7-三醇; B. 小白及对照指纹图谱; C. 白及对照药材(S16)

图 2 白及、小白及 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Bletillae Formosanae Rhizoma* and *Bletillae Rhizoma*

峰)为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积,见表 3。

表 2 样品指纹图谱与小白及对照指纹图谱的相似度

Table 2 Similarities of samples fingerprint and reference fingerprint of *Bletillae Formosanae Rhizoma*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.896	S15	0.911
S2	0.950	S17	0.925
S3	0.868	S18	0.952
S4	0.751	S19	0.939
S7	0.933	S20	0.910
S8	0.884	S38	0.950
S9	0.957	S24	0.853
S11	0.891	S25	0.907
S12	0.871	S26	0.861
S13	0.983	S16	0.895
S14	0.911	对照指纹图谱	1

结果表明,除样品 S4 的相似度较低之外,其余小白及样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.868~0.983,小白及样品的相似度较高;样品 S4 的相似度只有 0.751,观察其指纹图谱,发现 9 号共

有峰之后的图谱与对照指纹图谱差异很大,表现在共有峰 9,12,15 号非常小,而 10,14,18 号非常高,见图 3。白及对照药材(S16)与小白及对照指纹图谱相似度为 0.895,但缺少共有峰 6,13 号;昆明产白及 S25 的相似度较高,没有缺失的共有峰;白及样品 S24,S26 相似度仅有 0.86 左右,观察指纹图谱,发现差异主要在 9 号峰之后,S24 缺少共有峰 9,14,15 号,S26 缺少峰 15,17,19,20 号。此外,通过各共有峰的相对峰面积计算,各样品间共有峰相对峰面积的 RSD 为 39%~164%,说明样品之间各成分的相对含量差异较大,质量差异较大。

2.5.3 聚类分析 为消除称样量的差异,将各样品的共有峰面积除以每个样品称样量,得到单位质量下的各共有峰峰面积,再按极差法标准化处理数据后,运用 SPSS 20.0 软件对样品进行系统聚类,采用平均组间联结法,以平方欧式距离为样品测度,绘出树状图,见图 4。

结果表明在距离 10 内,样品聚为 5 类。17 批小白及样品中有 11 批样品聚为一类,并且与白及对照药材(S16)和另外 3 批白及样品聚为一类,说明小白及与白及相似度较高;小白及样品 S9,S13,S38 聚为一类,又在距离 11 处与 S2 聚为 1 类;S12,S4 与其他样品差异较大,各为一类,其中 S4 的差异性最大,聚类距离最远,与相似度评价结果相一致。树状图还在一定程度上反映出产地关联性,如贵州产的小白及 S17,S20,S19 最先聚为一类,云南蒙自所产小白及 S7,S8 最先聚为一类。

2.5.4 主成分分析 在聚类分析的基础上,运用 SPSS 20.0 软件对样品进行主成分分析,主成分的特征值及贡献率作为主成分选择的依据。以特征值大于 1 为提取标准,提取得到 5 个主成分,累计贡献率为 89.334%,其中第一主成分贡献率为 44.591%,第二主成分贡献率为 20.791%。根据主成分负荷矩阵,数值越大,说明该共有峰对该主成分的影响就越大,可以看出对第一主成分影响较大的共有峰是 4,10,11,16,17,18,19,20 号峰,影响第二主成分的是 7,9,12 号峰,影响第三主成分的是 1,2,3,6 号峰,影响第四主成分的是 3 号峰,影响第五主成分的是 13 号峰。由此可见样品间的差异主要来源于 9 号及其之后的共有峰,该部分色谱峰数量较多,是二氢菲类、联苕类等主要有效成分的分布区域,可以确定为小白及指纹图谱中重要的指纹区。见表 4。

统计分析软件直接计算出的 5 个主成分的标准

表 3 样品指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks of fingerprint

编号	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.17	0.29	0.05	0.57	0.02	0.06	0.14	0.20	0.45	0.17	0.64	0.07	0.11	0.20	0.10	0.15	0.17	0.07	0.09
S2	0.07	0.09	0.03	0.26	0.03	0.03	0.03	0.14	0.56	0.51	0.84	0.26	0.04	0.21	0.12	0.13	0.26	0.09	0.10
S3	0.22	0.23	0.04	0.94	0.05	0.14	0.23	0.07	1.61	0.39	0.16	0.68	0.42	0.18	0.36	0.44	0.76	0.31	0.42
S4	0.26	0.34	0.12	1.11	0.07	0.04	0.06	0.02	7.67	1.85	0.07	0.47	1.18	0.10	0.54	0.44	2.51	1.11	0.88
S7	0.16	0.20	0.04	0.35	0.02	0.06	0.09	0.27	0.72	0.32	1.04	0.12	0.10	0.09	0.10	0.14	0.20	0.12	0.10
S8	0.19	0.31	0.06	0.45	0.02	0.07	0.17	0.40	0.69	0.25	1.40	0.07	0.15	0.14	0.08	0.07	0.10	0.09	0.07
S9	0.18	0.26	0.09	1.01	0.03	0.12	0.03	0.18	2.04	1.00	0.90	0.19	0.15	0.21	0.20	0.19	0.57	0.38	0.35
S11	0.10	0.13	0.05	0.67	0.04	0.15	0.10	0.24	0.38	0.33	1.15	0.09	0.09	0.24	0.11	0.13	0.10	0.08	0.10
S12	0.09	0.10	0.06	0.60	0.06	0.04	0.14	0.53	1.09	0.44	2.10	0.05	0.08	0.16	0.33	0.28	0.24	0.11	0.09
S13	0.13	0.16	0.10	0.47	0.03	0.09	0.05	0.17	0.81	0.30	0.45	0.07	0.05	0.12	0.17	0.10	0.34	0.20	0.15
S14	0.13	0.17	0.05	0.32	0.02	0.07	0.03	0.01	0.62	0.38	0.08	0.06	0.08	0.08	0.16	0.11	0.24	0.10	0.10
S15	0.12	0.13	0.05	0.35	0.03	0.08	0.08	0.15	0.43	0.49	0.19	0.17	0.20	0.05	0.06	0.15	0.14	0.12	0.18
S17	0.13	0.12	0.04	0.23	0.04	0.02	0.06	0.11	0.28	0.21	0.24	0.03	0.07	0.05	0.03	0.08	0.05	0.04	0.04
S18	0.29	0.32	0.09	0.55	0.07	0.09	0.10	0.32	0.62	0.38	0.74	0.13	0.12	0.12	0.10	0.38	0.12	0.19	0.28
S19	0.11	0.13	0.05	0.30	0.05	0.04	0.12	0.23	0.44	0.32	0.66	0.06	0.07	0.11	0.06	0.13	0.09	0.08	0.09
S20	0.12	0.12	0.04	0.20	0.04	0.03	0.08	0.16	0.41	0.30	0.25	0.04	0.09	0.05	0.06	0.13	0.10	0.08	0.09
S38	0.24	0.26	0.03	0.57	0.05	0.02	0.02	0.11	1.56	0.97	0.62	0.08	0.18	0.18	0.28	0.34	0.40	0.26	0.37
S24	0.17	0.43	0.12	0.12	0.01	0.00	0.18	0.09	0.42	0.02	0.38	0.00	0.08	0.04	0.09	0.12	0.11	0.04	0.05
S25	0.29	0.32	0.12	0.12	0.04	0.00	0.13	0.00	0.38	0.44	0.07	0.24	0.00	0.00	0.12	0.18	0.12	0.13	0.18
S26	0.14	0.13	0.25	0.71	0.03	0.12	0.08	0.22	0.84	0.10	0.75	0.01	0.28	0.05	0.07	0.04	0.15	0.03	0.02
S16	0.13	0.14	0.08	0.11	0.00	0.02	0.15	0.10	0.27	0.09	0.11	0.06	0.05	0.00	0.04	0.00	0.07	0.00	0.00

注:峰 8 (militarine) 为参照峰,相对峰面积为 1.00。

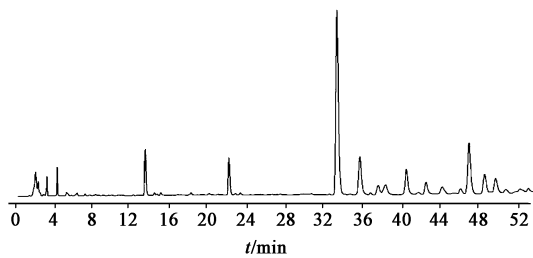


图 3 小白及 S4 的 HPLC 指纹谱
Fig. 3 HPLC fingerprint of S4

化值,可以用来表征每个样品的特征。为便于分析,仅选择第一主成分和第二主成分的标准值绘制样品主成分得分图,见图 5。图中 X 轴代表第一主成分的得分,从左到右第一主成分得分逐渐升高;Y 轴代表第二主成分的得分,从下到上第二主成分得分逐渐升高。结合聚类分析,在图中坐标较为接近的样品 S1, S17, S19, S20, S14, 样品 S7, S8, S16, S24, S26, 样品 S15, S18 在聚类树状图中都是最先聚为一类的。从样品 S2 开始沿 X 轴向右,第一主成分的得分逐渐升高,只有少数样品且较为分散。通过分

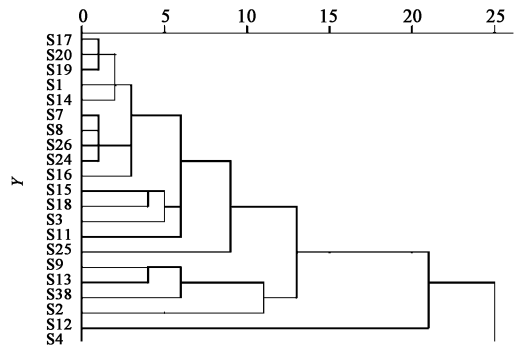


图 4 样品聚类树状关系
Fig. 4 Dendrogram of samples

析第二主成分得分较低的样品 S4, S3, S24, S38 的指纹图谱,发现均产自楚雄罗茨的样品 S4, S3 的共有峰 9, 12 号很小; S38 只是共有峰 9 号很小;白及样品 S24 的共有峰 12 号很小, 9 号缺失。小白及样品 S12 和 S8 在相似度分析中,两者指纹图谱相似度高达 0.93,但在主成分得分图中两者的坐标相距却很远,通过比较两者的指纹图谱,发现彼此在图谱“构型”上十分相似,但在“量”上差异却非常大,相似度

表 4 主成分负荷矩阵

Table 4 Component matrix

共有峰	第一主成分	第二主成分	第三主成分	第四主成分	第五主成分
1	0.635	0.032	0.570	-0.184	-0.365
2	0.548	-0.051	0.580	-0.249	-0.384
3	0.268	0.303	0.510	0.684	0.035
4	0.838	0.340	0.219	0.175	0.147
5	0.687	-0.412	-0.380	0.306	-0.139
6	0.401	0.420	0.507	0.227	0.483
7	0.036	0.708	-0.447	0.265	-0.172
8	0.519	0.611	0.175	-0.094	0.165
9	0.403	0.829	-0.254	0.133	-0.168
10	0.869	-0.382	-0.134	0.215	-0.051
11	0.894	-0.134	-0.015	-0.277	0.059
12	0.464	0.789	-0.296	0.024	-0.062
13	0.510	-0.233	-0.265	-0.289	0.599
14	0.634	-0.504	-0.118	0.485	0.046
15	0.615	0.514	-0.029	-0.391	0.314
16	0.851	0.256	-0.254	-0.023	-0.149
17	0.794	0.229	-0.224	-0.287	-0.282
18	0.829	-0.465	-0.144	0.148	0.087
19	0.875	-0.430	0.016	0.022	0.010
20	0.869	-0.402	0.091	-0.179	-0.043

分析无法体现量的差异, 需要结合主成分分析才能更全面地反映出样品的特征。见图 6, 7。

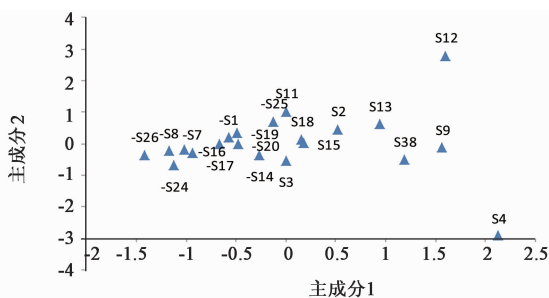


图 5 样品主成分得分

Fig. 5 PCA score of samples

3 讨论

白及传统加工方法需要去皮, 推测其原因是为了保持药材色白的外观, 因为其外皮在干燥过程中会发生不同程度的褐变, 但本课题组前期研究中发现白及去皮会导致化学成分的损失, 特别是二氢菲、联苳类成分, 而这些成分又是白及抗菌、抗氧化、抗癌的主要活性成分^[9-14], 故本实验样品的干燥加工均未去皮。

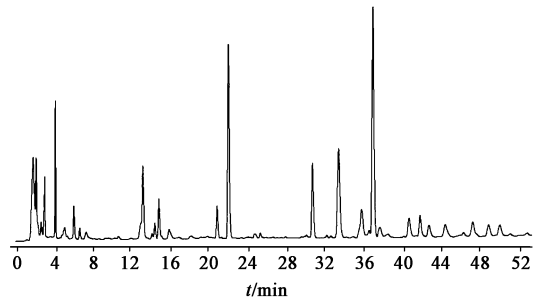


图 6 小白及 S8 的 HPLC 指纹谱

Fig. 6 HPLC fingerprint of S8

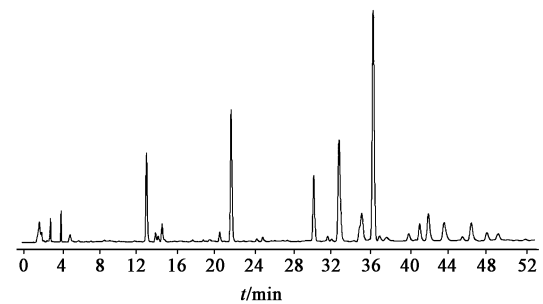


图 7 小白及 S12 的 HPLC 指纹谱

Fig. 7 HPLC fingerprint of S12

通过小白及样品间指纹图谱的对比, 20 个共有峰反映出化学成分的基本一致性, 而共有峰的相对峰面积相差较大, 反映出不同批次的小白及在成分的含量上有较大差异, 其中不乏优质的品种, 如样品 S12 整体化学成分含量较高; 样品 S4 突显在二氢菲、联苳类成分上含量较高。这些优质资源在白及类药材栽培品种优选优育方面具有重要的价值。

白及类药材野生资源濒临枯竭, 人工栽培逐渐成为市场主流, 迫切需要建立其品质评价的方法, 而如何选择评价指标是首要解决的问题。目前使用最多的评价指标是 *militarine*^[15-17], 李霄等^[18] 则提出以 *coelonin* 作为白及质量控制指标。本实验结果表明所有样品中 *militarine* 含量最高, 且较为稳定; 9 号共有峰之后的色谱峰是导致样品差异的主要因素, *coelonin* 是其中主成分之一。 *militarine* 和 *coelonin* 双指标控制白及类药材质量较为合理, 本研究为两者作为白及类药材品质评价的指标成分提供了理论依据。

本实验建立的色谱方法, 重复性、稳定性较好, 色谱图基线平稳, 主成分基本达到基线分离, 分离检测的化学物质信息丰富, 以此建立的小白及对照指纹图谱, 共确定了 20 个共有峰, 较好地反映出小白及所含多种化学成分的整体特征, 并指认了 4 个共有峰, 对有效成分在指纹图谱中的分布特点有了进

一步了解。通过指纹图谱比较小白及与白及的化学成分,两者的相似度较高。本实验为小白及质量控制提供了方法支撑,并为其作为白及替代品的进一步临床应用提供了理论依据。

[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:中国医药科技出版社,2015:103.

[2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 18 卷[M]. 北京:科学出版社,1999:46-51.

[3] 云南省药物研究所,云南省民族药工程技术研究中心. 云南民族药志. 第 5 卷[M]. 昆明:云南民族出版社,2012:30-31.

[4] 苏钦,李学芳,邱斌,等. 滇产习用白及类药材的生物学研究[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(6):18-21.

[5] WU T Y, Lay H L. Effect of growth stages, culture media, and processing methods on the component variations of *Bletilla formosana* and comparison of its component contents to commercial *Rhizoma Bletillae* crude drugs [J]. *J Food Drug Anal*, 2013, 21(4):404-413.

[6] 陈美君,李峰庆,陈鸿平,等. 中药白及与黄花白及的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药与临床,2017,8(5):8-14.

[7] 钱浩泉,谢培山. 中药液相色谱指纹图谱的方法学研究-银杏叶总黄酮指纹图谱个例剖析[J]. 分析测试学报,2004,23(5):7-11.

[8] 于传华. SPSS 与统计分析[M]. 2 版. 北京:电子工业

出版社,2014.

[9] 汤逸飞,阮川芬,应晨,等. 白及属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 中草药,2014,45(19):2864-2872.

[10] 彭芙,万峰,熊亮,等. 白及不同提取部位抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体内外活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):217-220.

[11] 肖雄,唐健波,姚佳,等. 白芨不同极性提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 山地农业生物学报,2013,32(2):146-149.

[12] 仰莲. 白及芪类化学成分及其抗人肺癌细胞 A549 活性研究[D]. 成都:成都中医药大学,2016.

[13] 马先杰,崔保松,韩少伟,等. 中药白及的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(8):1578-1584.

[14] 戴鸥,仰莲,周勤梅,等. 白及化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):43-47.

[15] 何迅,王爱民,李勇军,等. HPLC 测定白及中 militarine 含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2076-2078.

[16] 陈黎,黄良永,毛闪闪,等. 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.

[17] 迟明艳,黄勇,李勇军,等. UPLC 结合化学计量学方法的白及指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):51-56.

[18] 李霄,石连成,艾萍,等. 白及中 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2727-2728.

[责任编辑 顾雪竹]