

Study on the Quality Standard of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. Based on UPLC Fingerprint and Thin Layer Chromatography

Yue Yao¹, Linying Xia¹, Sangqi Huang¹, Xuting Shen¹, Fusheng Jiang², Zhishan Ding^{1*}

¹College of Medical Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

²College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

Email: *dyszjtc@163.com

Received: Apr. 27th, 2020; accepted: May 11th, 2020; published: May 18th, 2020

Abstract

The samples from different producing areas were collected and determined by thin layer chromatography (TLC) and ultra-high performance liquid chromatography (UPLC), which provided theoretical and experimental basis for the improvement of quality evaluation system. *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. authentic were identified by TLC according to Chinese Pharmacopoeia. UPLC analysis was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), the column temperature was 35°C, and the mobile phase was acetonitrile (A) and 0.1% formic acid water (B). The flow rate was 0.208 mL·min⁻¹ with detection wavelength of 270 nm. Taking coelonin as a reference, the UPLC maps of 61 batches of medicinal materials were drawn, and similarity evaluation and cluster analysis were carried out with reference to *B. striata*. Among the 60 samples, 15 samples were qualified by TLC. The UPLC fingerprint of *B. striata* was established, and eight common peaks were determined. The similarity was between 0.623~0.994. The results of cluster analysis showed that it could be divided into four groups when the similarity coefficient was 0.25. This study found that the use of specific spots in thin layer chromatography as the basis for *B. striata* identification was insufficient; *B. striata* UPLC fingerprints were established to provide a reference for the quality control of *B. striata* medicinal materials.

Keywords

Bletilla striata (Thunb.) Reichb.f., Quality Criteria, TLC Identification, UPLC Fingerprint, Cluster Analysis

基于UPLC指纹图谱结合薄层色谱的白及药材质量标准探讨

姚 玥¹, 夏琳颖¹, 黄桑琦¹, 沈徐婷¹, 蒋福升², 丁志山^{1*}

*通讯作者。

文章引用: 姚玥, 夏琳颖, 黄桑琦, 沈徐婷, 蒋福升, 丁志山. 基于 UPLC 指纹图谱结合薄层色谱的白及药材质量标准探讨[J]. 药物资讯, 2020, 9(3): 109-116. DOI: 10.12677/pi.2020.93016

¹浙江中医药大学医学技术学院, 浙江 杭州

²浙江中医药大学生命科学学院, 浙江 杭州

Email: *dkszjtc@163.com

收稿日期: 2020年4月27日; 录用日期: 2020年5月11日; 发布日期: 2020年5月18日

摘要

采集60批不同产地白及进行薄层色谱及超高效液相色谱测定, 为白及质量评价体系改进提供实验依据。采用薄层层析法(TLC)鉴别是否为白及正品; 采用Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 以乙腈(A)和0.1%甲酸水(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速0.208 mL·min⁻¹, 柱温35℃, 检测波长270 nm。以贝母兰宁为参照, 绘制61批药材样品的UPLC图谱, 参照白及对照药材进行相似度评价及聚类分析。60份样品中有15个产地的样品经TLC鉴定合格; 建立了白及药材UPLC指纹图谱, 确定8个共有峰, 不同供试白及指纹图谱与特征图谱相似度在0.623~0.994之间, 聚类分析的距离为0.25时可聚为4类。本研究发现以薄层色谱的特定斑点作为白及鉴别依据不够充分; 建立了白及UPLC指纹图谱, 为白及药材质量控制提供参考。

关键词

白及, 质量标准, 薄层鉴别, 超高效液相指纹图谱, 聚类分析

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. 为兰科白及属多年生草本植物, 又名连及草、甘根等。白及叶形优美, 花色艳丽, 具有很高的观赏价值; 白及更是重要的中药材之一, 入药部位为干燥块茎, 具有收敛止血、截疟、止痢、解毒、补虚等多种功效, 多用于治疗咯血、吐血、崩漏下血、疟疾、痈肿、疮毒等症[1]。

2015年版中国药典一部关于白及药材的质量控制标准中仅有理化鉴别、薄层色谱鉴别及水分、灰分检查等项目。在白及药材鉴别过程中发现, 部分产地白及药材仅因其薄层色谱鉴别结果与白及对照药材色谱结果不一致而被判为不合格。指纹图谱能较全面地反映药材所含成分的相对关系与复杂性, 是实现中药质量标准化的重要方法[2]; 目前, 有关白及药材的指纹图谱研究多采用高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC), 分析时间长达 940 min 以上[3] [4], 而超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)相较于 HPLC 具有更短的分析时间、更高的分离效率及分析灵敏度[5]。本研究拟建立多产地白及薄层色谱与白及超高效液相指纹图谱, 结合相似度评价及聚类分析, 旨在为白及药材鉴别、质量控制以及白及品种选育等方面奠定基础。

2. 材料

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司, 包括二元溶剂管理器、样品管理器、

ACQUITY UPLC TUV 检测器、柱温箱、Empower3 色谱工作站); 薄层色谱数码成像系统(瑞士 CAMMAG 公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); ME403E/02 电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司, 千分之一); Milli-Q IQ7000 超纯水系统(美国 Milli-pore 公司); 高效硅胶板(批号 20180508, 20 × 20 cm, 青岛海洋化工有限公司); 乙腈、甲酸均为色谱纯(美国默克公司); 水为自制超纯水; 其他试剂均为分析纯。

薄层层析和超高效液相供试样品为 55 个白及与 5 个华白及的干燥块茎, 采自于浙江中医药大学种植基地内, 原产地与种类详见表 1, 所有样品经浙江中医药大学丁志山教授鉴定, 均为兰科白及属植物的干燥块茎。白及对对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号 121262-201706)。含有贝母兰宁(2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲)、batatasin III (3,3'-二羟基-5-甲氧基联苕)、3'-甲氧基山药素的实验室自制混合对照品储备液。

Table 1. Samples of *Bletilla striata*

表 1. 白及样品

No.	原产地
S1~13	安徽省(芜湖市 4 处, 宣城市 3 处, 马鞍山市 2 处, 铜陵市、池州市、黄山市、六安市各 1 处)
S14~19	四川省(宜宾市 3 处, 成都市、乐山市、巴中市各 1 处)
S20~28	湖北省(恩施州、黄冈市、宜昌市各 2 处, 襄阳市、荆门市、随州市各 1 处)
S29~33	湖南省(张家界市、郴州市、怀化市各 1 处); 江西省(萍乡市、宜春市各 1 处)
S34~44	浙江省(台州市、宁波市、金华市、杭州市各 2 处, 丽水市、衢州市、绍兴市各 1 处)
S45~50	陕西省(汉中市 1 处); 贵州省(遵义市 2 处, 贵阳市、黔南州各 1 处); 河南省(南阳市 1 处)
S51~55	秦巴山区 2 处; 云南省(曲靖市、昆明市各 1 处); 广东省(清远市 1 处)
S56~60	陕西汉中市 3 处, 湖北荆门市 1 处, 云南玉溪市 1 处

注: 1~55 为白及, 56~60 为华白及。

3. 方法

3.1. 薄层色谱鉴别

供试品溶液制备参照中华人民共和国药典一部白及薄层色谱鉴别法: 室温 25℃ 下, 取白及粉末 1 g, 加 70% 甲醇 20 mL, 40℃ 超声处理(功率 350 W, 频率 53 Hz) 30 min, 冷却至室温, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL, 超声 10 min 溶解, 用 20 mL 乙醚振摇 15 min, 提取 2 次, 合并乙醚液, 挥至 1 mL。对照药材溶液的制备同上。以环己烷 - 乙酸乙酯 - 甲醇(6:2.5:1)为展开剂; 根据中华药典白及薄层鉴别法结合 CAMMAG 薄层色谱数码成像系统操作指南, 在 366 nm 下观察供试品薄层色谱; 在与对照药材色谱相应的位置上, 观察是否显相同的棕红色斑点。

3.2. 基于 UPLC 的白及指纹图谱研究

3.2.1. 色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 检测波长: 270 nm, 柱温 35℃, 以乙腈和 0.1% 甲酸水为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 0.208 mL·min⁻¹, 进样量 4 μL。

3.2.2. 供试品溶液制备

精密称取 60 产地白及粉末及对照药材粉末(过 3 号筛) 1.0 g, 加入 70% 甲醇溶液 20 mL, 超声处理 30

min (频率为 50 MHz, 功率为 350 W), 放冷, 滤过, 将滤液转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。取定容好的供试品溶液 100 μL , 用 70% 甲醇稀释至 8 mL, 混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得白及干粉质量浓度 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

3.2.3. 混合对照品溶液制备

精密吸取 0.01 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 贝母兰宁、batatasin III 和 3'-甲氧基山药素储备液 0.625 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 制得 0.000625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

3.2.4. 方法学考察

精密度试验: 取同一份供试品溶液(S4), 按“3.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定色谱图, 选取一个参比峰, 计算各共有峰相对峰面积 RSD。

稳定性试验: 取同一份供试品溶液(S4), 分别于 0、4、8、16、24 h 进样, 测定色谱图, 选取一个参比峰, 计算各共有峰相对峰面积 RSD。

重复性试验: 取同一批白及样本(S4) 6 份, 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定色谱图, 测定色谱图, 选取一个参比峰, 计算各共有峰相对峰面积 RSD。

3.2.5. 样品测定

取 60 批白及药材样品及白及对照药材, 按 3.2.2 项下方法制备供试品溶液, 在 3.2.1 项下的色谱条件下依次进样检测, 将所有样品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), 自动匹配后生成特征图谱; 以白及对照药材为参照图谱, 进行相似度评价。基于共有峰的相对峰面积, 采用 NTSYSpc2.1 软件生成 UPGMA 聚类分析结果。

4. 结果

4.1. 薄层色谱鉴别

第 3、7、13、17、20、30、33、34、38、41、43、49、50、54、60 号白及的供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的棕红色斑点, 如图 1 所示。根据中国药典可鉴定以上白及药材为正品。

4.2. 基于 UPLC 的白及指纹图谱研究

4.2.1. 方法学考察

以贝母兰宁为参比峰, 精密度、稳定性、重复性试验的结果显示, 各共有峰相对峰面积 RSD 均 $<1.5\%$, 表明精密度、重复性、供试品溶液稳定性较好, 符合指纹图谱要求。

4.2.2. UPLC 图谱建立

指纹图谱见图 2, 通过图谱比较, 确定 8 个色谱峰为共有峰。第 5 个峰为贝母兰宁, 分离度好且含量较高, 以它为参照峰计算 61 份白及的共有峰相对保留时间。

4.2.3. 相似度评价

特征图谱见图 3, 相似度评价结果见表 2。S28 与白及对照药材图谱相似度最高, 为 0.994; S37 与白及对照药材图谱相似度最低, 为 0.623。

4.2.4. 聚类分析

UPGMA 聚类分析结果见图 4。如图 4 虚线所示, 在化学距离系数为 3.81 时, 白及居群被分为 4 类, 43 号浙江衢州江山被单独聚为一类。分类与产地未见明显相关性。

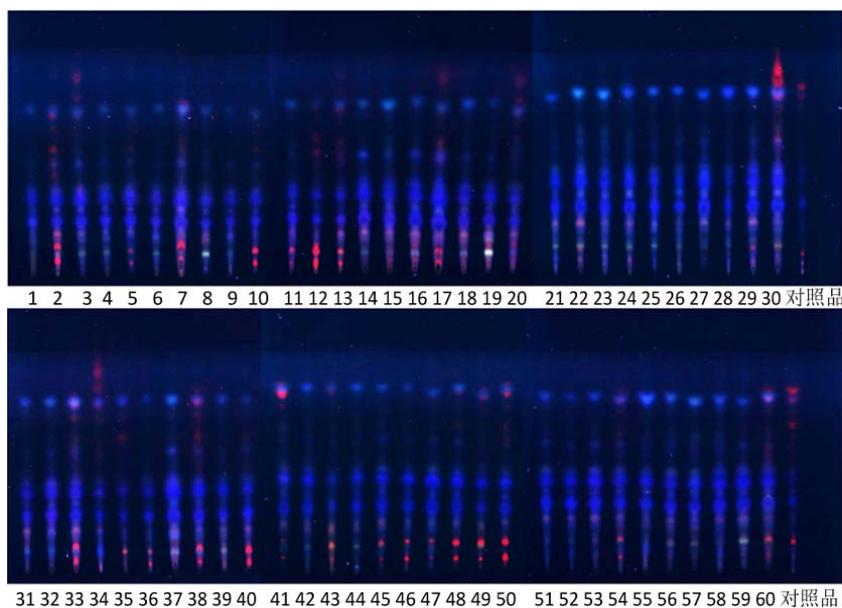


Figure 1. Thin layer chromatography of *Bletilla striata*

图 1. 白及薄层色谱

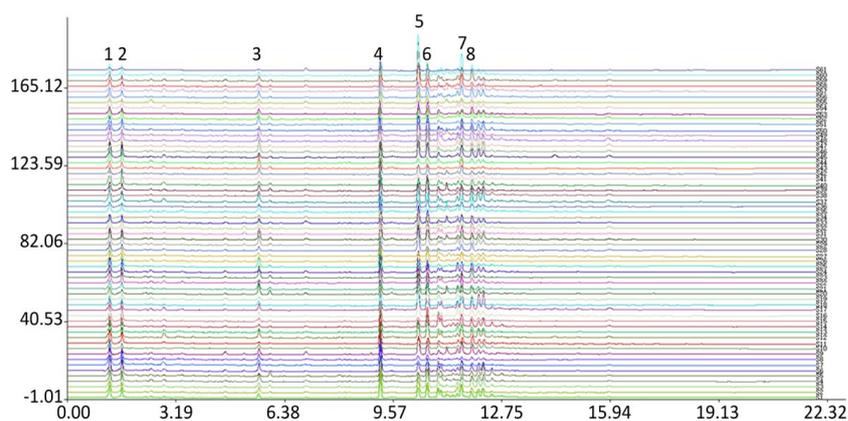
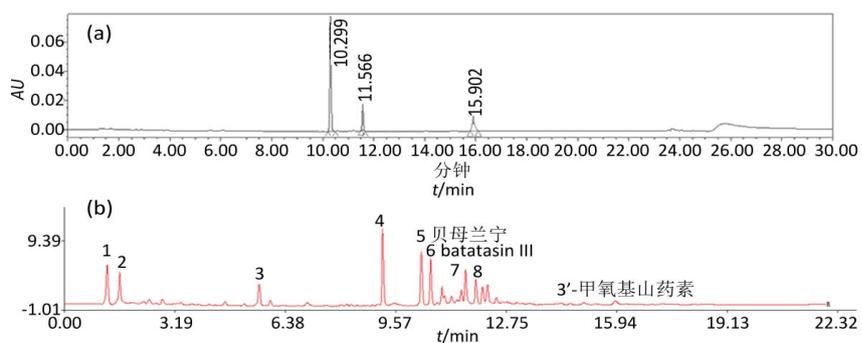


Figure 2. UPLC fingerprint of *Bletilla striata*

图 2. 白及 UPLC 指纹图谱



(a) 混合对照品溶液; (b) 白及特征图谱; 从左至右分别为 5.白及对照品贝母兰宁; 6.batatasin III; 3'-甲氧基山药素

Figure 3. UPLC chromatogram of *Bletilla striata*

图 3. 白及 UPLC 图

Table 2. Similarity evaluation results of 61 batches of *Bletilla striata* medicinal materials
表 2. 61 批白及药材样品相似度评价结果

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
S1	0.980	S2	0.985	S3	0.979
S4	0.983	S5	0.953	S6	0.949
S7	0.978	S8	0.893	S9	0.986
S10	0.985	S11	0.985	S12	0.958
S13	0.978	S14	0.963	S15	0.974
S16	0.978	S17	0.873	S18	0.982
S19	0.989	S20	0.984	S21	0.945
S22	0.976	S23	0.967	S24	0.952
S25	0.878	S26	0.984	S27	0.990
S28	0.994	S29	0.959	S30	0.967
S31	0.939	S32	0.973	S33	0.975
S34	0.860	S35	0.906	S36	0.984
S37	0.623	S38	0.968	S39	0.981
S40	0.983	S41	0.938	S42	0.993
S43	0.982	S44	0.970	S45	0.973
S46	0.955	S47	0.938	S48	0.865
S49	0.922	S50	0.983	S51	0.931
S52	0.914	S53	0.992	S54	0.984
S55	0.901	S56	0.982	S57	0.940
S58	0.980	S59	0.951	S60	0.945
S61	1.000				

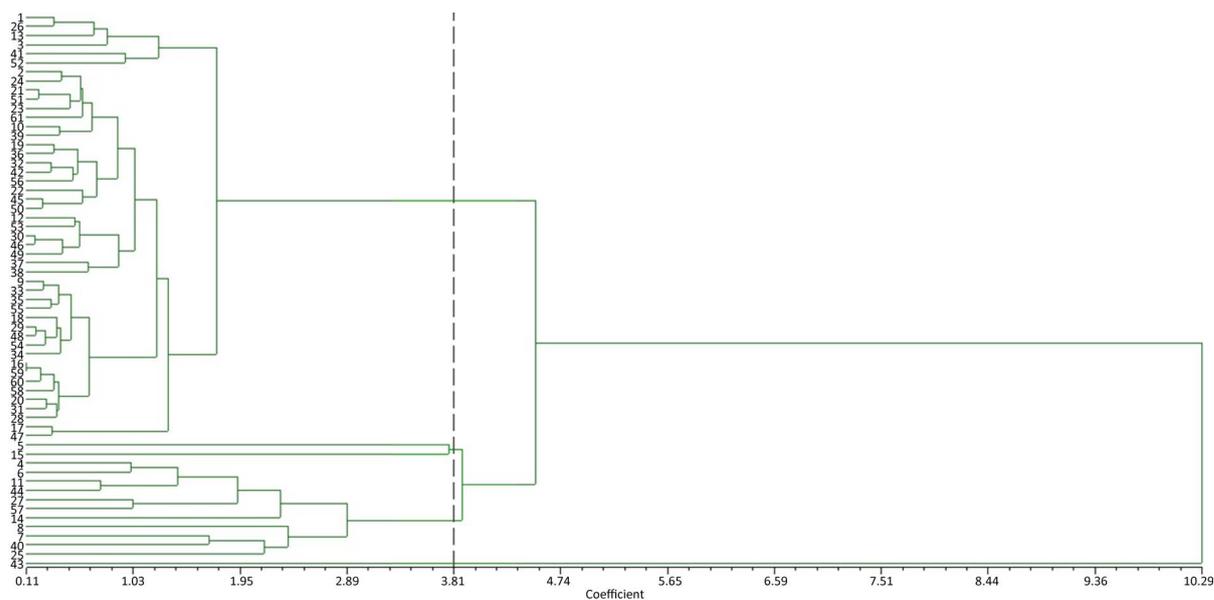


Figure 4. UPGMA tree cluster diagram based on UPLC relative peak area

图 4. 基于 UPLC 相对峰面积的 UPGMA 树状聚类图

5. 讨论

本研究以全国 11 省共 60 份白及属植物作为样本, 测定了薄层色谱和超高效液相指纹图谱。薄层色

谱直观反映了各产地白及的部分化学成分差异；液相色谱指纹图谱对白及化学成分的表征更具整体性，不同产地白及确定了 8 个共有峰，其指纹图谱相似度在 0.623~0.994 之间。

本研究的白及样本采自全国各地后统一种植于某同质园内，供试白及是野生采集白及的块茎繁殖而生，遗传物质未发生变化，故块茎中次生代谢产物的差异主要受遗传因素影响[6]。基因决定中药材的化学成分表型，因此种质资源间遗传相似性与代谢物相似性存在一定的关联[7]。研究显示不同产地白及的遗传聚类与地理分布相吻合[8]。而本研究结果却显示同质园条件下基于化学成分的聚类与采集地不相关，甚至出现浙江衢州江山白及单独成为一类化学型的现象。这可能是白及植株从野外采集引种至同质园内，生境变迁、逆境胁迫引起表观遗传修饰基因[9] [10] [11] [12]，调控了遗传物质表达过程所致。以上猜测尚需通过限制性内切酶片段长度多态性、随机扩增多态性等 DNA 分子标记技术及甲基化敏感扩增多态性技术进行遗传与表观遗传学研究验证。

目前，中国药典对于包括白及在内的众多药材的质量评价仍沿用化学药物的质量控制模式[13]。仅凭薄层色谱中在与对照药材相同位置处是否存在棕红色斑点来鉴别白及药材真伪，与中药本身的多成分复杂体系及中医的整体理念皆相违背，存在局限性。本研究结果显示，按照药典中薄层色谱鉴别标准，60 份白及样品中仅 15 份鉴别为入药正品，正品率较低。而指纹图谱的相似度结果显示，经鉴定为正品的白及与对照药材的相似度为 0.860~0.985 不等；聚类分析结果中，第 2、10、21、23、24、39、51 号样品与白及对照药材化学距离较近，相似度为 0.931~0.981 不等，均未被鉴定为正品白及。可见，薄层鉴别结果与液相相似度评价、聚类分析结果并不一致。作者认为，薄层色谱上棕红色斑点的有或无是差异的一个具体表现，并不能替代白及药材成分的全貌。文献报道白及的活性成分主要为多糖、联苄类、菲、多酚类[14] [15]等，而棕红色斑点对应的化学成分、药理活性尚无研究报道，无法评估其与白及药材质量的相关性。另外，5 个华白及样品与对照药材相似度达 0.940~0.982，化学成分较为接近，但药典仅将白及(紫花)纳入用药正品；是否可将紫花以外的其它白及属植物(华白及、小白及、黄花白及)收入药典标准，拓宽白及药材来源范围，值得进一步深入探究。以薄层色谱上的特定斑点作为鉴别依据不够充分，应增加基于液相色谱的化学评价标准，利用特征图谱和指纹图谱技术，并结合一评多测的白及多个活性成分定性定量测定，以加强对白及药材质量的整体控制。

基金项目

国家自然科学基金项目(81673672)，国家中医药管理局中药饮片质量保障体系研究(201507002-1-11)。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 103.
- [2] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [3] 刘刚, 丁志山, 刘育辰, 等. 白及药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析[J]. 中国药房, 2018, 29(22): 3050-3053.
- [4] 周海婷, 陈志敏, 李文兵, 等. 野生与栽培白及 HPLC 指纹图谱建立及天麻素与 militarine 含量测定[J]. 中药材, 2018, 41(11): 2527-2533.
- [5] 邬伟魁, 严倩茹. 超高效液相色谱指纹图谱在中药质量评价中的应用[J]. 中国执业药师, 2016(2): 36-39.
- [6] Vilmereuil, P.D., Gaggiotti, O.E., Mouterde, M., et al. (2016) Common Garden Experiments in the Genomic Era: New Perspectives and Opportunities. *Heredity*, 116, 249. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.93>
- [7] 朱凤洁, 杨健, 袁媛, 等. 金银花种质资源化学指纹图谱及代谢物相似性分析[J]. 中国中医药杂志, 2018, 43(12): 2575-2579.
- [8] 张燕君, 孙伟, 何艳, 等. 白及属植物资源评价与可持续利用的现状与展望[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 1-12.
- [9] 袁媛, 魏渊, 于军, 等. 表观遗传与药材道地性研究探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2679-2683.

- [10] 谢宜杰, 胡贞贞, 林娃婷, 等. 广藿香 DNA 甲基化水平与其主要化学成分含量的相关性研究[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(5): 570-573.
- [11] 杜康兮, 沈文辉, 董爱武. 表观遗传调控植物响应非生物胁迫的研究进展[J]. 植物学报, 2018(5): 581-593.
- [12] Matteo, B., Giovanna, S., Lorenzo, S., *et al.* (2018) Epigenetic Stability in Saffron (*Crocus sativus* L.) Accessions during Four Consecutive Years of Cultivation and Vegetative Propagation under Open Field Conditions. *Plant Science*, **277**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.09.005>
- [13] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.
- [14] Liao, Z., Zeng, R., Hu, L., *et al.* (2019) Polysaccharides from Tubers of *Bletilla striata*: Physicochemical Characterization, Formulation of Buccoadhesive Wafers and Preliminary Study on Treating Oral Ulcer. *International Journal of Biological Macromolecules*, **122**, 1035-1045. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.050>
- [15] He, X., Fang, J., Wang, X., *et al.* (2017) *Bletilla striata*: Medicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **195**, 20-38. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.026>