

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.021

白及颗粒质量标准研究*

杨深应¹,陶明宝¹,董全玉²,沈红春¹,杨胜芳³,李 杉³,赵兴蕊^{3△}

(1. 云南省保山市食品药品检验检测中心, 云南 保山 678000; 2. 云南省保山市隆阳区疾病预防控制中心, 云南 保山 678000; 3. 保山中医药高等专科学校, 云南 保山 678000)

摘要:目的 建立白及颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对白及颗粒中白及药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定白及药材中指标性成分1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯的含量,色谱柱为 Diamonsil Plus C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为223 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。结果 白及TLC图中特征斑点清晰,阴性对照无干扰。1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯进样量在0.0834~2.5011 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$, $n=7$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0% ($n=6$);平均加样回收率为101.81%, RSD为0.56% ($n=6$)。结论 所建立的方法操作简便,结果准确,稳定性和重复性均较好,可用于白及颗粒的质量控制。

关键词:白及颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯;质量控制

中图分类号:R932;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)19-0080-04

Quality Standard of Baiji Granules

YANG Shenying¹, TAO Mingbao¹, DONG Quanyu², SHEN Hongchun¹, YANG Shengfang³, LI Shan³, ZHAO Xingrui³

(1. Baoshan Inspection and Testing Center for Food and Drug, Baoshan, Yunnan, China 678000; 2. Longyang District Center for Disease Control and Prevention, Baoshan, Yunnan, China 678000; 3. Baoshan College of Traditional Chinese Medicine, Baoshan, Yunnan, China 678000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Baiji Granules. **Methods** The thin-layer chromatography(TLC) method was used for the qualitative identification of Bletillae Rhizoma in Baiji Granules. The high-performance liquid chromatography(HPLC) method was used for the content determination of militarine in Bletillae Rhizoma. The chromatographic column was Diamonsil Plus C₁₈

*基金项目:云南省教育厅科学研究项目[2021J1133];保山中医药高等专科学校百名中青年学术技术带头人培养项目[2020x001]。

第一作者:杨深应,男,大学本科,主管药师,研究方向为药品质量标准,(电话)0875-3066811(电子信箱)429231279@qq.com。

△通信作者:赵兴蕊,女,硕士研究生,副教授,研究方向为中药资源开发与利用,(电子信箱)287757305@qq.com。

的马兜铃科防己(宜宾防己、广防己、冕宁防己、汉中防己)替代或掺伪防己药材生产风痛安胶囊的风险,提示企业应加大原药材的控制,杜绝此类问题的发生。该方法的建立,为进一步查清相关产品的质量状况提供了基础数据和方法依据。

参考文献

- [1] 李秀岩,王清华. 风痛安胶囊的质量标准研究[J]. 中医药学报, 2006,34(6):15-17.
- [2] 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,2020:721-722.
- [3] 税丕先,田 吉,孙 琴. 防己与几种马兜铃科植物药材混淆的鉴别[J]. 西南医科大学学报,2004,27(3):256-257.
- [4] 孟科旭. 防己与广防己不宜混用[J]. 中药材,1990,13(3):48.
- [5] 胡世林. 防己的本草考证[J]. 现代药物与临床,2009,24(5):286-288.
- [6] 李一昂,李 霖,于 锋. 马兜铃酸类化合物使用现状及肾脏毒性研究进展[J]. 药学研究,2017,36(9):534-537.
- [7] 梁爱华,高 月,张伯礼. 含马兜铃酸中药的安全性问题及对策[J]. 中国食品药品监管,2017(11):17-20.
- [8] 庞晓军. 马兜铃酸的毒理学现状[J]. 中国医院用药评价与分析,2006,6(1):47-49.

- [9] FENG W, CHENG XL, MA LY, et al. Analysis of Aristolochic Acids and Analogues in Medicinal Plants and Their Commercial Products by HPLC-PAD-ESI/MS[J]. Phytochem Anal, 2010, 16(3):222-230.
- [10] 李功辉,陈 莎,鄢 兰,等. UPLC-QQQ-MS测定中药材中马兜铃酸I的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(13):61-65.
- [11] 刘 静,刘 汇,姚令文,等. 龙胆泻肝丸中马兜铃酸I的液质联用法检测分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019,21(7):1306-1311.
- [12] 张红梅. 鼻炎灵片中马兜铃酸I的限量检测[J]. 中国合理用药探索,2017,14(7):67-69.
- [13] 陈浩桢,徐国钧,金蓉鸾,等. 防己类药材中马兜铃酸I和总生物碱的含量测定[J]. 中国中药杂志,1994,19(6):323-324.
- [14] 王崇益,隗海龙,李 浩. 高效液相色谱法测定益肾蠲痹丸中的马兜铃酸A[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2017,33(4):406-410.
- [15] 邱 泉,覃聪慧,黄秋燕. 神农蛇药酒中马兜铃酸A含量的HPLC法测定[J]. 广西医科大学学报,2018,35(1):116-118.
- [16] 梁 晟,杨 青,李瑞莲,等. UPLC-MS/MS法测定13种中成药中的马兜铃酸A[J]. 华西药学杂志,2020,35(1):78-81.

(收稿日期:2020-12-28;修回日期:2021-03-20)

column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(22:78, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 223 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The characteristic spots of *Bletillae Rhizoma* in the TLC chromatograms were clear, and the negative control had no interference. The linear range of militarine was 0.083 4-2.501 1 μg($r=0.999\ 9$, $n=7$). The *RSDs* of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recovery of militarine was 101.81% with *RSD* of 0.56% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, stable and reproducible, which can be used for the quality control of Baiji Granules.

Key words: Baiji Granules; TLC; HPLC; militarine; quality control

白及颗粒由白及单味药材经加工制成,具有收敛、止血、补肺功效,临床用于治疗肺结核、慢性气管炎、百日咳、肺气肿、久咳伤肺、咯血吐血^[1]。白及药材为兰科植物白及 *Bletilla striata*(Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎^[2]。因其种子繁育困难,野生资源急剧减少,不能满足市场需求,价格居高不下,导致市场上白及药材掺伪现象突出^[3]。目前白及伪品主要有独蒜兰、云南独蒜兰、黄花白及、水白及、滇黄精、毛梗兰、杜鹃兰、紫花美冠兰、小白及、山慈菇、筒瓣兰等^[4],白及颗粒质量标准收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十二册)》,仅有理化鉴别,无定性、定量检测项目^[1]。参考文献[2-20],本研究中建立了定性鉴别白及颗粒中白及药材的薄层色谱(TLC)法,以及测定白及药材中指标性成分1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括 G1311C 型四元泵带真空脱气机、G1329B 型自动进样器、G1316A 型柱温箱、G1315D 型二极管阵列检测器、Agilent Chemstation 型仪器控制及数据处理系统;Sartorius BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为 0.01 mg/0.1 mg);BPG-9140A 型精密鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);A2S-10-BE 型超纯水机(美国艾科浦国际有限公司);SK2510LHC 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率为 250 W,频率为 35/53 kHz)。

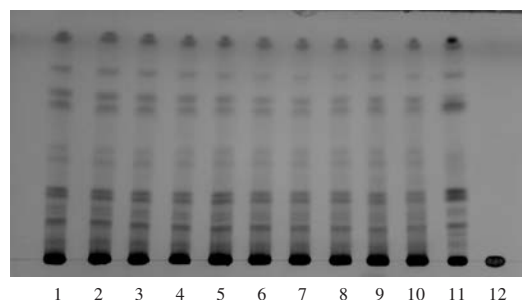
1.2 试剂

白及对照药材(中国食品药品检定研究院,批号为 110770-201918);1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号为 DST190724-025,纯度为 98.61%);白及颗粒(企业 A,云南玉药生物制药有限公司,批号分别为 20200103,20200403,20200412,20180702;企业 B,云南裕丰药业有限公司,批号分别为 2006003,1912005 092,2004006,2004008;企业 C,云南万裕药业有限公司,批号分别为 1904002 097,1906004 081),规格均为每袋 10 g;乙腈为色谱纯,水为超纯水,甲醇、乙醇、磷酸、三氯甲烷等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

分别取 10 批样品,各 5 g,研细,置锥形瓶中,加甲醇 20 mL,超声(功率为 250 W,频率为 35 kHz)处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,即得供试品溶液。取蔗糖适量,同法制备缺白及的阴性对照药材溶液。取白及对照药材 1 g,同法制备白及对照药材溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[8]试验,吸取上述供试品溶液、阴性对照药材溶液各 20 μL,白及对照药材溶液 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(12:1:0.1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷 2% 香草醛硫酸溶液显色,于 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的主斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1。



1-10. 供试品溶液(批号分别为 20200103,20200403,20200412,20180702,2006003,1912005 092,2004006,2004008,1904002 097,1906004 081) 11. 白及对照药材溶液 12. 阴性对照药材溶液

图 1 薄层色谱图

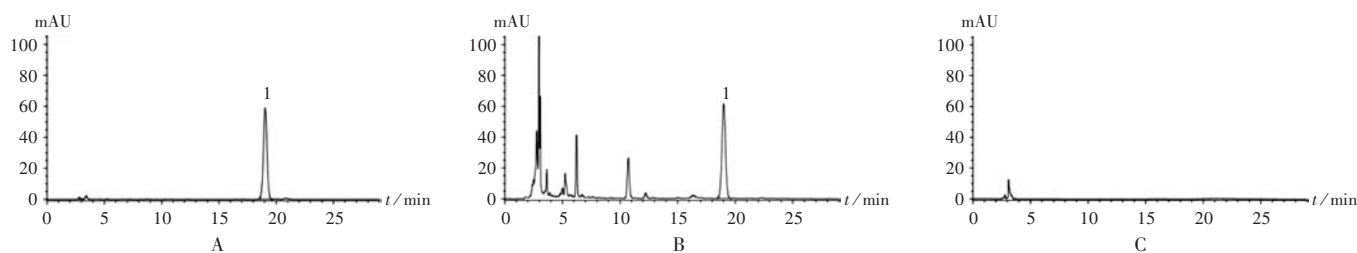
1-10. Test solution(batch numbers:20200103,20200403,20200412,20180702,2006003,1912005 092,2004006,2004008,1904002 097,1906004 081) 11. Reference material solution of *Bletillae Rhizoma* 12. Negative reference medicinal material solution

Fig. 1 TLC chromatogram

2.2 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil Plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液(22:78, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:223 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。理论板数按 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-



1. 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. militarine

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

2-异丁基苹果酸酯峰计应大于3 000。

2.2.2 溶液制备

取1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯对照品28.18 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加稀乙醇溶解,定容,摇匀,得质量浓度为555.77 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液。取贮备液3 mL,置20 mL容量瓶中,加稀乙醇稀释成每1 mL含83.37 μg 的对照品溶液。取样品适量,研细,取1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为250 W,频率为35 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按处方比例及工艺制备空白及的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备空白及的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯色谱峰分离良好,且阴性对照无干扰。详见图2。

线性关系考察:分别精密吸取2.2.2项下对照品溶液(质量浓度为83.37 $\mu\text{g/mL}$)1,5,10,15,20,25,30 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=1585.36731X-1.18373$, $r=0.9999(n=7)$ 。结果表明,1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯进样量在0.0834~2.5011 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液(质量浓度为83.37 $\mu\text{g/mL}$)10 μL ,按2.2.1项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯峰面积的RSD为0.06%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为20200103)1.0 g,精密称定,共6份,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱

条件进样测定。结果1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯含量的平均值为2.1588 mg/g, RSD为0.43%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为20200103),依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,4,8,12,18,24 h时进样测定峰面积。结果1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯峰面积的RSD为1.02%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量为2.1588 mg/g的样品(批号为20200103)0.5 g,精密称定,共6份,依法制备供试品溶液,分别精密加入质量浓度为222.31 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液5 mL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.5158	1.1135	1.1116	2.2484	102.10	101.81	0.56
0.5203	1.1232	1.1116	2.2588	102.16		
0.5052	1.0906	1.1116	2.2098	100.68		
0.5120	1.1053	1.1116	2.2388	101.97		
0.5048	1.0898	1.1116	2.2211	101.77		
0.5163	1.1146	1.1116	2.2502	102.16		

2.2.4 样品含量测定

分别取10批样品,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算样品中1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯的含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 TLC鉴别方法选择

考察了供试品溶液、对照药材溶液的制备方法,白及颗粒按2020年版《中国药典(一部)》白及药材项下TLC法制备供试品溶液及对照药材溶液^[2],结果供试品溶液色谱斑点比对照药材溶液色谱斑点少。考察了甲醇

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of militarine in the samples ($n=3$)

生产企业	批号	含量(mg/g)	RSD(%)	生产企业	批号	含量(mg/g)	RSD(%)
A	20200103	2.157 2	0.30	B	1912005 092	2.826 7	0.14
	20200403	1.644 3	0.41		2004006	3.376 9	0.48
	20200412	0.526 0	0.17		2004008	3.632 6	0.70
	20180702	0.606 8	0.27	C	1904002 097	2.519 7	0.11
B	2006003	2.180 3	0.10		1906004 081	2.786 2	0.09

超声处理后蒸干溶解直接点样的方法,结果供试品溶液的色谱斑点与对照药材溶液的色谱斑点基本一致^[6]。考察了环己烷-乙酸乙酯-甲醇(6:2.5:1, V/V/V)溶液,石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)上层溶液,三氯甲烷-甲醇-水(12:1:0.1, V/V/V)溶液等不同展开系统的展开效果,以及10%硫酸乙醇溶液、1%香草醛-10%硫酸乙醇溶液、2%香草醛硫酸溶液的显色效果,结果以三氯甲烷-甲醇-水(12:1:0.1, V/V/V)溶液为展开剂时斑点的分离度较好,以2%香草醛硫酸溶液为显色剂时的显色较清晰。

3.2 检测波长选择

取1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯对照品溶液,采用紫外分光光度计于190~400 nm波长范围内扫描,结果1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯在223 nm波长处有最大吸收,故选择223 nm作为检测波长。

3.3 提取条件选择

考察了不同溶剂(乙醇、甲醇、70%甲醇、稀乙醇)的提取效果,结果提取溶剂为稀乙醇时待测成分的提取率最高。考察了不同超声时间(20, 30, 45, 60 min)的提取效果,结果超声30 min已提取完全。故提取条件为稀乙醇超声提取30 min。

3.4 样品分析

现代药理学研究表明,1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯具有益智、延缓衰老、防治老年痴呆的功效,是白及药材的指标性成分,且含量较高^[11-17],故选择其作为白及颗粒含量测定的控制指标。本研究中建立了定性鉴别白及颗粒中白及药材的TLC法和1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯^[8]的含量测定方法,并对10批同一厂家不同批号 and 不同厂家的白及颗粒进行了比较。结果TLC鉴别中10批样品的色谱斑点与白及对照药材色谱斑点基本一致,但同一厂家不同批号及不同厂家的白及颗粒中,1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯含量差异较大,表明目前市场上流通的白及颗粒质量参差不齐,需进一步完善白及颗粒的质量控制标准。本研究中建立

的方法操作简便,结果准确,稳定性和重复性均较好,可用于白及颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] WS₃-B-2306-97, 卫生部药品标准·中药成方制剂(第十二册)[S].
- [2] 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, 2020: 106-107.
- [3] 李明华, 程显隆, 李宁新, 等. 白及的质量问题及真伪鉴别方法[J]. 中国药事, 2018, 32(11): 1490-1499.
- [4] 彭翠仙, 向建英. 云南野生药用白及及其混伪品现状调查[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11279-11281.
- [5] 万大群, 赵仁全, 刘 海, 等. 白及的成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2017, 26(2): 93-96.
- [6] 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的鉴定[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9): 23-25.
- [7] 杨顺利, 杨枝中, 李 龙, 等. 白及薄层色谱鉴别方法的改进和高效液相指纹图谱研究[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(5): 41-45.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59-60.
- [9] 王 涛, 王晓辉, 陈衍男, 等. 白及粉末饮片质量评价方法初步研究[J]. 山东科学, 2017, 30(3): 26-32.
- [10] 周海婷, 陈志敏, 赵永峰, 等. 不同产地白及野生品与栽培品质量比较研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(3): 50-54.
- [11] 李 敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 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]. 中国药理学杂志, 2010, 45(10): 724-726.
- [12] 张晓静, 赵艳霞, 邓雁如, 等. HPLC同时测定白及中3种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 40-42.
- [13] 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.
- [14] 梅朝叶, 向文英, 杨 武, 等. UPLC-MS/MS同时测定白及中6个指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1233-1237.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 刘 娜, 袁金凤, 彭诗涛, 等. 基于militarine含量结合UPLC指纹图谱的不同产地白及饮片质量分析[J]. 天津中医药, 2020, 37(5): 583-589.
- [18] 陈美君. 中药白及品质评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [19] 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.
- [20] 张家港清蓝生物医药科技有限公司. 一种白及小分子特征指纹图谱分析方法: CN202010721182. 7[P]. 2020-09-18.

(收稿日期: 2021-01-12; 修回日期: 2021-03-12)