

文章编号: 1674-8085(2020)04-0021-05

# 基于化学计量学黄花白及和小白及 HPLC 指纹图谱分析

秦亚东<sup>1,2</sup>, 汪荣斌<sup>1,2</sup>, \*方凤满<sup>2</sup>, 张立菊<sup>3</sup>, 李林华<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药高等专科学校药系, 安徽, 芜湖 241000; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽, 芜湖 241000;  
3. 鲁南制药股份有限公司质管部, 山东, 临沂 276000)

**摘要:** 采用高效液相色谱 (HPLC) 法建立 6 批黄花白及和 8 批小白及指纹图谱并比较 Militarine 含量, 利用相似度 (SA)、聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 对黄花白及和小白及进行综合评价。结果显示 HPLC 指纹图谱共生成 26 个共有峰, 利用对照品指认 12 号色谱峰为 Militarine, 且其含量在二者之间具显著性差异 ( $P < 0.01$ ); SA 分析显示黄花白及和小白及相似度大于 0.912, 具较高的相似性; HCA 和 PCA 将黄花白及和小白及分为两类, 表明两者存在一定的差异性, 分析结果相互验证。结果表明黄花白及和小白及化学组成类似, HPLC 指纹图谱技术结合化学计量学方法适用于两者的区分和内在质量评价。

**关键词:** 黄花白及; 小白及; 指纹图谱; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R282

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2020.04.005

## FINGERPRINT ANALYSIS OF *BLETILLA OCHRACEA* AND *BLETILLA FORMOSANA* BASED ON HPLC COMBINED WITH CHEMOMETRICS METHODS

QIN Ya-dong<sup>1,2</sup>, WANG Rong-bin<sup>1,2</sup>, \*FANG Feng-man<sup>2</sup>, ZHANG Li-ju<sup>3</sup>, LI Lin-hua<sup>1</sup>

(1. Department of pharmacy, Anhui college of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui 241002, China;

2. College of life sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241002, China;

3. Quality department, Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Linyi, Shandong 276000, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of 6 batches of *Bletilla ochracea* and 8 batches of *B. formosana* were established and the content of Militarine was compared. The quality assessment was achieved by using similarity analysis (SA), hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). The results indicated that twenty-six common characteristic peaks were found in all tested samples, peak 12 was identified as Militarine with significant differences in content ( $P < 0.01$ ); Similarity values were all above 0.912, which indicated the tested samples has high similarity; All above results could validate each other and successfully group these samples into two categories, which showed the samples are different. The results showed that all tested samples have similar chemical composition, HPLC fingerprint technology combined with chemometrics methods could be used for differentiation and quality assessment on the *B. ochracea* and *B.*

收稿日期: 2019-10-27; 修改日期: 2020-03-06

基金项目: 安徽省高校重点科研项目 (KJ2018A0789); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (gxyq2017209); 安徽省高校学科 (专业) 拔尖人才学术资助重点项目 (gxbjZD2016106)

作者简介: 秦亚东(1979-), 男, 安徽宿州人, 副教授, 博士生, 主要从事药用植物生态学研究(E-mail: qydy2007@163.com);

汪荣斌(1978-), 男, 安徽芜湖人, 副教授, 博士生, 主要从事药用植物资源研究(E-mail: 59858705@qq.com);

\*方凤满(1974-), 女, 安徽池州人, 教授, 博士, 主要从事资源环境理论与实践(E-mail: ffm1974@mail.ahnu.edu.cn);

张立菊(1979-), 女, 山东临沂人, 助理工程师, 主要从事药物验收工作(E-mail: 924385258@qq.com);

李林华(1972-), 男, 安徽芜湖人, 助理实验师, 主要从事中药资源研究(E-mail: 1375816221@qq.com).

*formosana* samples.

**Key words:** *Bletilla ochracea*; *Bletilla formosana*; fingerprint; chemometrics; quality assessment

黄花白及*Bletilla ochracea* Schltr. (BOS) 和小白及*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. (BFS) 为在我国分布的4种白及属植物中的2种, 具有较高的观赏价值和药用价值, 广泛分布于云南、贵州、四川等地。白及属药用植物主要含有联苜类、菲类、黄酮类及2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苜酯类等化学成分<sup>[1-2]</sup>, 现代研究表明这些化学成分在抗菌<sup>[3-5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、抗炎<sup>[7]</sup>等方面均体现出活性。

近些年来, 随着市场需求量的增加, 白及野生资源严重退化, 已不能满足市场需求。由于BOS和BFS外观与白及十分相似, 导致白及市场混掺现象时有发生。白及属药材以干燥块茎入药, BOS和BFS具止血补肺、消肿生肌之功效<sup>[1]</sup>, 与《中国药典》2015版一部所载白及属正品白及*Bletilla striata*(Thumb.) Rchbf.收敛止血、消肿生肌<sup>[8]</sup>的功效表述有异, BOS和BFS常作为习用药材及民族传统药材广泛使用<sup>[9-10]</sup>。相对于白及, BOS和BFS在整体品质评价方面研究较为鲜见, 陈美君等<sup>[10]</sup>对BOS和BFS指纹图谱进行了研究, 但仅测定了3批BFS样本; 吴梅等<sup>[11]</sup>进行了BFS指纹图谱研究, 但未与BOS进行对比研究。为从整体角度评价BOS和BFS内在质量的异同, 本研究利用高效液相指纹图谱(HPLC)建立BFS和BFS指纹图谱, 以共有峰峰面积为变量, 采用相似度评价(Similarity Analysis, SA)、聚类分析(Hierarchical Clustering Analysis, HCA)和主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)进行多元统计分析<sup>[12-13]</sup>, 明确BOS和BFS在化学成分方面整体内在质量异同, 以期对BOS和BFS内在质量评价提供理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

超高效液相色谱仪(美国Agilent公司, 1290型)、电子天平(美国Ohaus公司, Discovery DV215CD型)、超声波清洗仪(合肥金尼克机械制造有限公司, JK-250DB型)、台式离心机(德国Eppendorf公司, Minispin型)。

### 1.2 药材

黄花白及和小白及于2017年采收于云南、贵州、四川, 或购自与安徽亳州中药材大市场样品详细信息见表1所示。根据《中国药典》方法<sup>[8]</sup>要求, 除去块茎部分泥土及须根, 煮沸15 min, 晒至半干, 除去外皮, 晒干, 粉碎后过40目筛, 密封后置于4℃冰箱中保存。

表1 Militarine成分的含量(mg/g)及化学计量学统计结果  
Table 1 Content (mg/g) of Militarine in samples and result of chemometrics analysis (SA, HCA and PCA)

样品编号	收集信息	种类	Militarine	Clusster	SA
BOS1	四川都江堰, 2017.6	Species1	28.56	II	0.916
BOS2	贵州大方羊场, 2015.9	Species1	26.34	II	0.920
BOS3	陕西宁强平关, 2017.7	Species1	27.18	II	0.921
BOS4	贵州正安, 2015.9	Species1	26.11	II	0.915
BOS5	甘肃武都汉王, 2017.8	Species1	23.81	II	0.923
BOS6	亳州中药材大市场, 2017.6	Species1	24.12	II	0.912
BFS1	云南保山隆阳蒲缥1, 2017.5	Species2	18.36	I	0.972
BFS2	贵州大方乐寨, 2017.8	Species2	19.39	I	0.982
BFS3	云南保山隆阳杨柳, 2017.8	Species2	16.24	I	0.976
BFS4	贵州正安, 2017.9	Species2	14.85	I	0.984
BFS5	云南保山隆阳蒲缥2, 2017.5	Species2	17.71	I	0.985
BFS6	云南保山隆阳平安, 2017.8	Species2	18.84	I	0.986
BFS7	亳州中药材大市场, 2017.11	Species2	15.75	I	0.978
BFS8	亳州中药材大市场, 2017.11	Species2	17.06	I	0.981

注: Species1, *Bletilla ochracea* Schltr; Species2, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr

### 1.3 试剂

对照品 Militarine (含量 > 98%, 批号: lot16122231) 采购于上海远慕生物科技有限公司; 乙腈、甲酸为色谱级(美国TEADIA公司)、水为超纯水(实验室自制); 其他试剂为市售分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

## 2 方法和结果

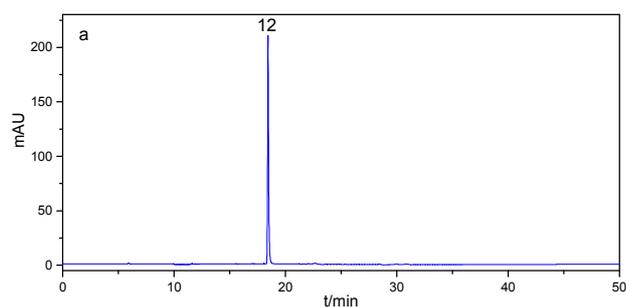
### 2.1 样品溶液的制备

精密称取BOS、BFS粗粉0.2 g, 精密称定, 置

15 mL具塞离心管中,加入10 mL体积分数为60%的甲醇-水溶液,加入冰袋,以控制超声温度不超过20 ℃,防止白及胶及黏液溶出而影响过滤,超声1 h,离心(3000 r/min) 5 min处理,提取液过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,备用。

## 2.2 对照品溶液的制备

精密称定Militarine对照品适量,置于10 mL容量瓶中,以体积分数为60%的甲醇-水溶液为溶剂,定容至刻度,充分摇匀后为对照品溶液,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,备用。



## 2.3 色谱条件

色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C<sub>18</sub> column (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm), 保护柱为Agilent SB-C<sub>18</sub> column (5 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为: 乙腈 (A), 0.1%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序为: 5% A (0 min), 5%~20% A (0~10 min), 20%~30% A (10~18 min), 30%~30% A (18~23 min), 30~33% A (23~30 min), 33~60% A (30~45 min), 60% A (45~50 min); 流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 波长272 nm, 柱温30 ℃, 进样量5 μL, 色谱图如图1所示。

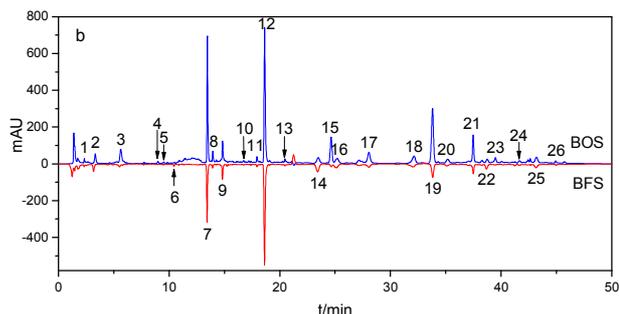


图1 对照品Militarine(a)、黄花白及和小白及(b)典型样品HPLC图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of Militarine standard(a) and representative HPLC chromatograms of BOS, BFS sample(b)

## 2.4 HPLC指纹图谱方法学考察

### 2.4.1 精密度考察

以BOS2为供试样品,按“2.1”项下条件制备供试样品溶液,以“2.3”项下参数设置要求为色谱条件,同一样品(BOS2)重复进样6次,以12号峰(Militarine)为参照,记录并计算各共有峰相对峰面积(Relative Peak Area, RPA)及相对保留时间(Relative Retention Time, RRT)的相对标准偏差(Relative Standard Deviations, RSD),结果RSD值均小于0.41%、0.73%,表明仪器精密度良好。

### 2.4.2 稳定性考察

取BOS2为供试样品,按“2.1”项下条件制备供试样品溶液,以“2.3”项下参数设置要求为色谱条件,于0、2、4、8、12、24 h分别进样,以12号峰(Militarine)为参照,记录并计算各共有峰RPA和RRT的RSD,结果RSD值分别小于0.15%、0.34%,表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.4.3 重复性考察

取BOS2为供试样品6份,按“2.1”项下条件制备供试样品溶液,以“2.3”项下参数设置要求为色谱条件,以12号峰(Militarine)为参照,记录并计

算各共有峰RPA和RRT的RSD,结果RSD值分别小于0.78%、1.26%,表明重复性符合指纹图谱要求。

## 2.5 HPLC指纹图谱的建立

6批BOS样品和8批BFS样品,按“2.1”项下条件制备供试样品溶液,以“2.3”项下参数设置要求为色谱条件进行测试,数据以AIA格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件(中国药典委员会,2004A版),以样品BOS1为参照,时间窗宽度为0.1,采用中位数法,经多点校正、自动匹配生成共有峰26个。测试样品HPLC指纹图谱叠加图如图2。

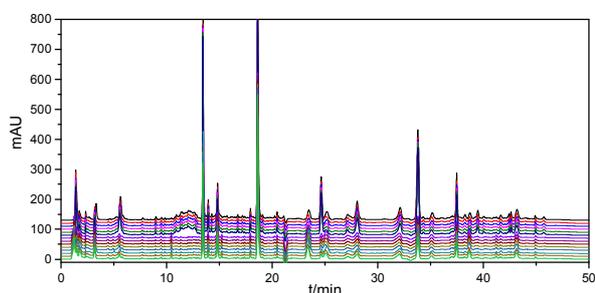


图2 14批白及样品的HPLC指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprints of the 14 batches of *Bletilla striata* samples

## 2.6 定量分析

参照相关文献<sup>[14-15]</sup>,利用外标一点法对主要成

分 (Militarine) 进行定量, 结果见表1所示。由表1直观分析可见, Militarine在BOS样品中的平均含量为26.02 mg/g, 在BFS样品中平均含量为17.28 mg/g, 其在 BOS 样品中的平均含量是其在BFS样品中的平均含量的1.51倍, 差异显著, 具统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 2.7 化学计量学分析

### 2.7.1 SA分析

将6批BOS样品和8批BFS样品HPLC指纹图谱数据以AIA.格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件, 以BOS1号样品为参照图谱, 经多点校正、自动匹配, 生产对照指纹图谱, 结果见图2所示, 以对照指纹图谱为参照, 生成相似度, 结果见表1。由表1可知, BOS样品相似度在0.912~0.923之间, BFS样品相似度在0.972~0.981之间, 相似度均大于0.912, 说明BOS样品和BFS样品的相似度较高, 同时也存在一定差异。

### 2.7.2 HCA分析

采用无监督的HCA分类模式, 考察14批不同样本之间的异同性。以6批BOS样品和8批BFS样品HPLC指纹图谱26个共有峰峰面积为变量, 变量归一化处理后, 形成14 (样品数)  $\times$  26 (变量数) 的数据矩阵, 导入Origin软件, 采用Euclidean距离进行HCA分析, 结果见图3。当Euclidean距离大于2.6时, 14批样品分为两大类, BFS样品均聚集在I大类, BOS样品聚集在II大类。HCA分析结果与SA分析结果相一致, SA结果显示BFS和BOS样品相似度十分接近, 均大于0.89, 但由HCA分析结果可以看出BFS和BOS样品在HPLC指纹图谱上仍体现出内在差异。

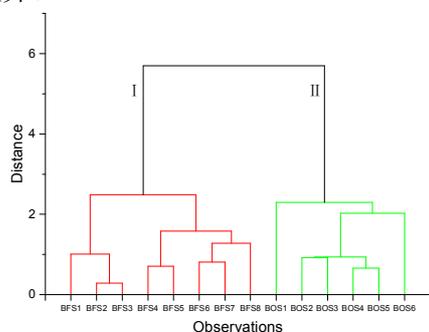


图3 14批样品HPLC指纹图谱聚类分析结果

Fig.3 HCA results for the HPLC fingerprints of 14 batches of samples

### 2.7.3 PCA分析

为更加直观的体现14批样品内在质量差异性, 将14批样品HPLC指纹图谱共有峰峰面积导入SIMCA-P (11.5版) 软件, 变量经归一化处理后, 进行PCA分析, 结果见图4。由图4可见, 所有BFS样品分布在t[1]象限负值区域 (Group 1), BOS样品分布在t[1]象限正值区域 (Group 2), BFS和BOS样品完全分离, 体现两者之间的HPLC指纹图谱的差异性; BFS样品明显的分为两类, 一类分布在t[1]象限负值和t[2]象限负值所组成的象限内, 包括BFS1、BFS2和BFS3, 另一类分布在t[1]象限负值和t[2]象限正值所组成的象限内, 包括BFS4、BFS5、BFS6、BFS7和BFS8, 与SA分析结果完全一致, 说明BFS样品间也存在一定的差异性。PCA结果与SA和HCA结果相一致, 三者之间互相验证。

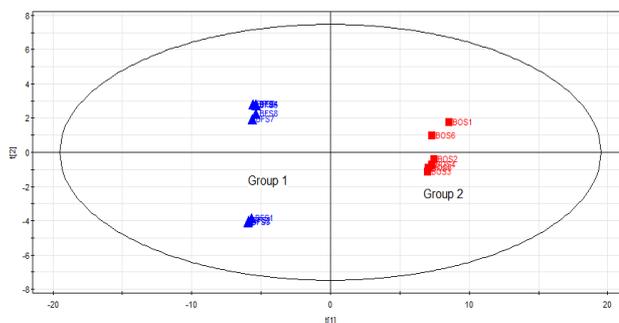


图4 14批样品 PCA 得分图

Fig.4 Scores plot of PCA of 14 batches of samples

## 3 讨论

随着白及属正品药材白及野生资源的枯竭, 以及白及育苗技术现实条件的制约, 近年来白及价格持续攀高, 白及药材匮乏的现状急需解决。然而关于白及属药用植物, 黄花白及和小白及的研究较为鲜见。陈美君等对白及, 黄花白及和小白及进行UPLC指纹图谱研究表明, 相似度均大于0.85, 在化学成分层面, 三者十分相似, 并建议将黄花白及纳入《中国药典》<sup>[10]</sup>, 但小白及只有3批, 小白及样本数偏少; 吴梅等对白及和小白及进行HPLC指纹图谱研究, 结果表明二者的相似度大于0.751<sup>[11]</sup>, 但白及样品只有3批, 同样存在样本数偏少的不足。

黄花白及和小白及两种之间的HPLC指纹图谱研究尚未见报道。由于黄花白及和小白及野生采样

困难,本研究仅对6批黄花白及和8批小白及,除3份来源于亳州中药材大市场外,其余样本均为野生采集。HPLC尤其适用于中药复杂化学成分体系整体表征及定量分析<sup>[10-13,16]</sup>,结合多元统计分析能够合理地反映不同来源样本异同性<sup>[10-13]</sup>。本研究中指纹图谱共匹配出26个共有峰,SA、HCA和PCA分析结果保持一致,可以互相验证,说明黄花白及和小白及在化学组成方面高度相似,但仍存在一定的差异。黄花白及和小白及匹配出26个共有峰,多于白及与黄花白及、白及与小白及匹配出的共有峰数量<sup>[10-11]</sup>,也说明了黄花白及和小白及在化学组成层面较白及更为相似。由图1-b可以直观地看出,两者化学组成类似,各成分含量比例不同;对于主要成分Militarine的含量,黄花白及显著高于小白及,具有统计学意义。黄花白及和小白及在药效学层面是否具有等效性,仍需深入研究证实。本研究通过黄花白及和小白及HPLC指纹图谱研究表明,黄花白及和小白及在化学组成方面十分类似,相似度极高,为黄花白及和小白及质量标准及合理开发使用提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 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(8):1137-1145.
- [2] 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.
- [3] Jiang S, Wan K, Lou HY, et al. Antibacterial bibenzyl derivatives from the tubers of *Bletilla striata*. [J]. Phytochemistry, 2019,162:216-223.
- [4] Qian CD, Jiang FS, Yu HS, et al. Antibacterial biphenanthrenes from the fibrous roots of *Bletilla striata*. [J]. Journal of Natural Products, 2015,78: 939-943.
- [5] 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.
- [6] 孙爱静,庞素秋,王国权. 白及化学成分与抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志,2016,51(2): 101-104.
- [7] Lin C W, Hwang T L, Chen F A, et al. Chemical constituents of the Rhizomes of *Bletilla formosana* and their potential anti-inflammatory activity [J]. Journal of Natural Products, 2016,79: 1911-1921.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 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.
- [9] 苏钰,邱斌,李云. 滇产白及类习用药材资源调查及市场利用评价[J]. 中国野生植物资源,2014, 33(5):49-52.
- [10] 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.
- [11] 吴梅,李宏哲,薛咏梅,等. 小白及高效液相指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):180-186.
- [12] 刘宏,戴胜,秦亚东. 基于主成分分析和聚类分析评价安徽省地产及全国主产区药材半夏质量[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2018, 39(3):93-97.
- [13] 杨元丰,皮达,刘鑫,等. 《中国药典》中四个品种来源的陈皮挥发油GC-MS分析比较[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2018,39(6):77-81.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 江芳,郭娜,谢茹胜. 闽北十县市钩藤中钩藤碱与异钩藤碱的含量比较研究[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2019,40(1):103-106.