

白及

(BLETILLAE RHIZOMA)

白及 MI	2
一、形態:	2
二、顯微	2
白及 HPLC	3
一、材料	3
二、儀器及層析管柱	3
三、實驗藥品及試劑來源	3
四、方法	3
五、結果	6
白及 TLC	13
一、方法	13
二、萃法選擇及濃度測試	14
三、溶媒系統選擇	15
四、觀察方式選擇	16
五、十家樣品檢測	17

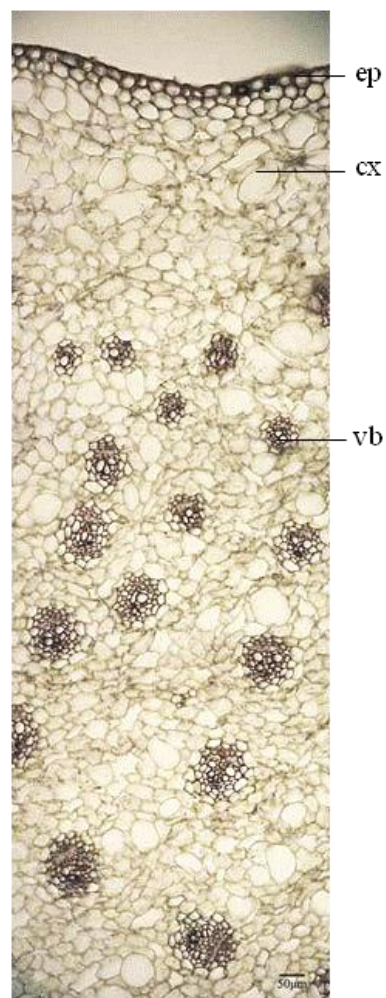
白及 MI

一、形態:

本品為蘭科 Orchidaceae 植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的乾燥根莖。根呈不規則長扁圓形或菱形，常可見似掌狀的 2~3 分歧，長約 1.5~5cm，厚 0.5~1.5cm。表面呈灰白色或黃白色，具已細皺紋，上面有的凸起之莖痕，下面亦有連接另一莖塊的痕跡；以莖痕為中心，周圍可見數個棕褐色的同心環紋，環上有殘留的淡棕色點狀鬚根痕。質堅硬，不易折斷。斷面類白色，角質，半透明，具有散在之點狀維管束。無臭，味苦，嚼之有粘性。以個大、飽滿、色白、半透明、質堅實者較佳。

二、顯微

本品橫切面，最外層為 1 列表皮細胞，胞壁略增厚。維管束散列於基本組織中。薄壁細胞可見糊化澱粉及草酸鈣針晶。



略字解

ep: 表皮 cx: 皮層 vb: 維管束

白及 (Bletillae Rhizoma)

一、材料

購自於北中南各地中藥店白及藥材共 10 家。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2996、Photodiode Array Detector；層析管柱 Cosmosil 5C18-AR-II (250 x 4.6 mm, 5 μ m)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters Acquity Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sample Manager、PDA Detector；層析管柱 Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

Acetonitrile HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)。

(二) 標準品

標準品購自於長雅。標準品 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)，純度在 99% 以上。

四、方法

(一) 對照標準品溶液

取標準品 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)精確稱定 2.5 mg，加甲醇定體積至 50 mL，配製成每 1 mL 含 50.0 μ g，1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)。

(二) 檢品溶液

取本品粉末約 0.2 g，精確稱定，精確加入 75% EtOH 20 mL，置濃縮瓶中，連接迴流冷凝裝置，置水鍋上迴流萃取 60 分鐘，冷卻，以 125 mm No.1 濾紙過濾。定容至 25 mL，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，即得。

(三) 測定法

分別精確吸取標準品溶液與檢品溶液各 10 μ L，注入 HPLC 測定，用標準曲線計算溶液中，1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的含量，即得。

(四) 檢量線

精確吸取 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品儲備液適量(50.0 µg/mL)，以 100% 甲醇稀釋成含 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)分別為 37.5 µg/mL、25.0 µg/mL、12.5 µg/mL、5.0 µg/mL 的標準品溶液。上述溶液各取 10 µL 分別注入 HPLC，進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y=ax+b$ 與相關係數 R^2 。

(五) 精密度試驗

以 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)濃度為 25.0 µg/mL 之標準品儲備液連續進樣五針，以 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(六) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性:取同一家市售白及粉末，依白及檢品溶液製備方法平行製備五份白及檢品溶液，進樣測定，以 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一家市售白及粉末，依白及檢品溶液製備方法製備白及檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的含量為指標，求出相對標準差。

(七) 偵測極限與定量極限試驗

偵測極限(Limit of Detection, LOD): 將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值。定量極限 Limit of Quantitation, LOQ): 將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(八) 添加回收率試驗

取已知 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)含量的白及藥材粉末 0.05 g，精確稱定三份，分別加入 0.5 mg、1.0 mg、1.5 mg 的 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)，並按檢品溶液製備方法製備，每次取 10 µL 注入。

(九) HPLC 分析條件

1. 層析管：Cosmosil 5C18-AR-II (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 223 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：30 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	Acetonitrile (% , v/v)	H ₂ O (% , v/v)
0	5	95
10	25	75
20	32	68
35	32	68

(十) 臺灣市售白及含量測定

取十家市售白及檢品溶液各 10 μL 注入 HPLC，每個檢測品各三重複，所得平均波峰面積依公式計算樣品 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的百分含量。

(十一) UPLC 分析條件

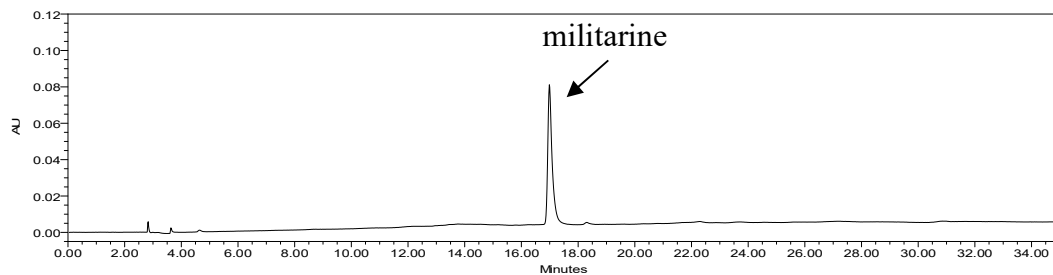
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 223 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	Acetonitrile (% , v/v)	H ₂ O (% , v/v)
0	5	95
3	25	75
4	32	68
8	32	68

五、結果

(一) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之 HPLC 層析

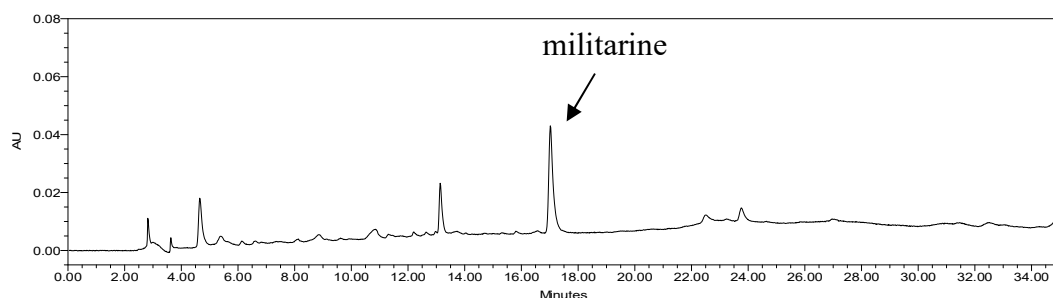
於滯留時間 17.0 分鐘處顯示 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品波峰 (圖一)。



圖一、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售白及檢品之 HPLC 層析

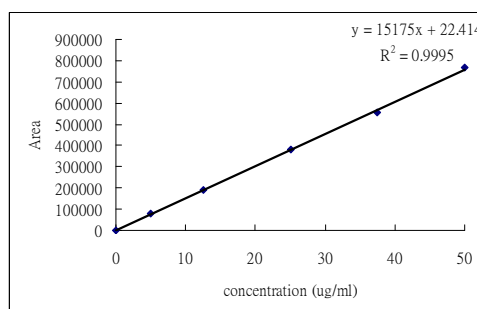
於滯留時間 17.0 分鐘處顯示白及檢品中 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)波峰(圖二)。



圖二、市售白及檢品之 HPLC 層析圖

(三) 標準品 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)檢量線

經不同濃度 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine) (x) 對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 15175x + 22.414$, $R^2 = 0.9995$, 顯示濃度在 2.5–50.0 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之檢量線圖

表一、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]- 2-異丁基蘋果酸酯 (militarine)	2.5–50.0	$Y = 15175x + 22.414$	0.9995

(四) 再現性與精密度試驗

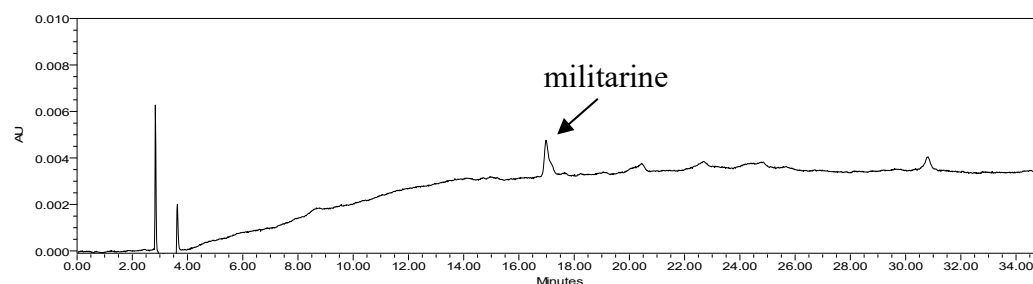
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)精密度之相對標準差為 2.22%，再現性之相對標準差為 1.85%，均在可接受的範圍以內。

(五) 穩定性試驗

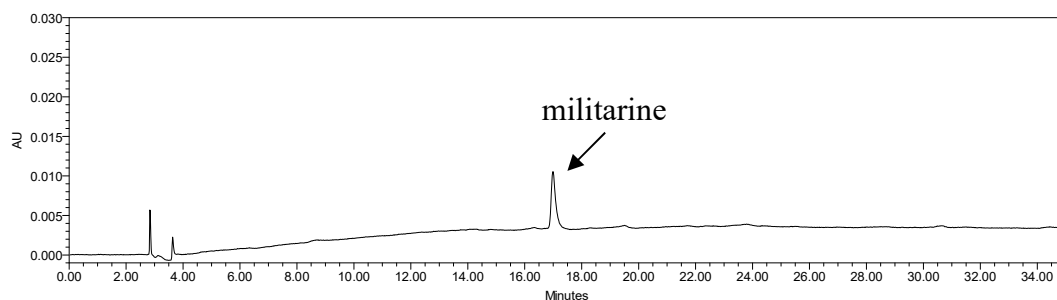
由結果可以得知，1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)在 24 小時內穩定，相對標準差為 2.59%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 $0.5 \mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 $2.5 \mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之 LOD 層析圖



圖五、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之 LOQ 層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 (militarine)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	25.0 µg/mL	2.22
再現性 (n=5)	檢品溶液 (No.2)	1.85
穩定性 (n=6)	檢品溶液 (No.2)	2.59
偵測極限 (n=1)	0.5 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	2.5 µg/mL	-

(七) 添加回收率試驗

1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)平均回收率 102.7%，相對標準偏差 2.03%。

表三、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)添加回收率試驗

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.05	0.7300	0.50	1.2400	102.00	102.67	2.03
2	0.05	0.7300	1.00	1.7400	101.00		
3	0.05	0.7300	1.50	2.3100	105.00		

(八) 臺灣市售白及中 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)含量

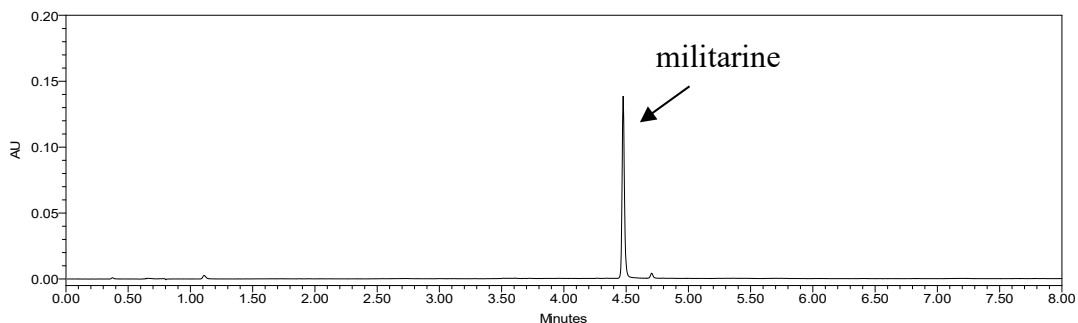
測定 10 家白及藥材之含量測定結果(乾燥品)，藥材中 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的含量為 0.051–1.703%。

表四、臺灣市售白及檢品之 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)含量

中藥店編號 (No.)	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 (militarine)含量(%)	中藥店編號 (No.)	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 (militarine)含量(%)
1	0.327	6	0.164
2	1.509	7	0.144
3	0.106	8	0.051
4	1.703	9	1.397
5	1.569	10	0.051

(九) 標準品 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)之 UPLC 層析

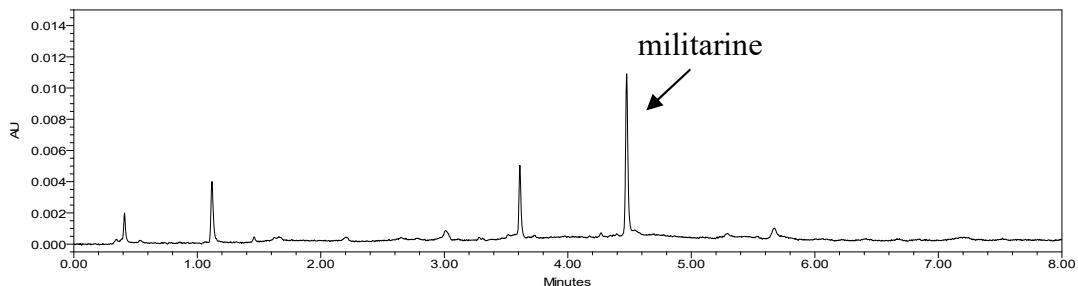
於滯留時間 4.48 分鐘處顯示 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品波峰 (圖六)。



圖六、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十) 市售白及檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 4.48 分鐘處顯示市售白及檢品中 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)標準品波峰 (圖七)。

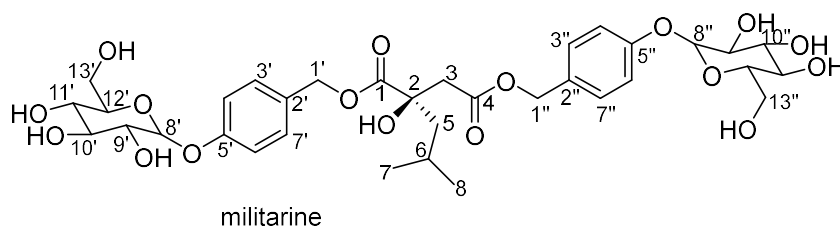


圖七、市售白及檢品之 UPLC 層析圖

(十一) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的分子式、分子量與熔點

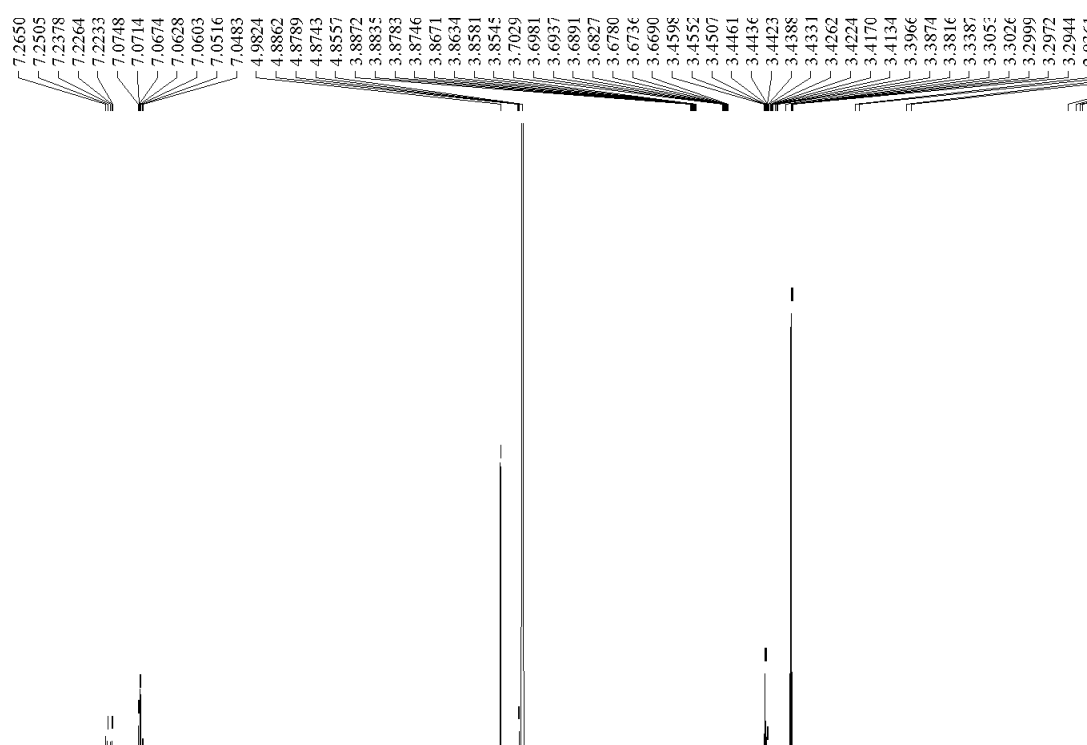
分子式： $C_{34}H_{46}O_{17}$ Mol. Wt.: 726.72 mp: 110–112 °C

(十二) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的結構



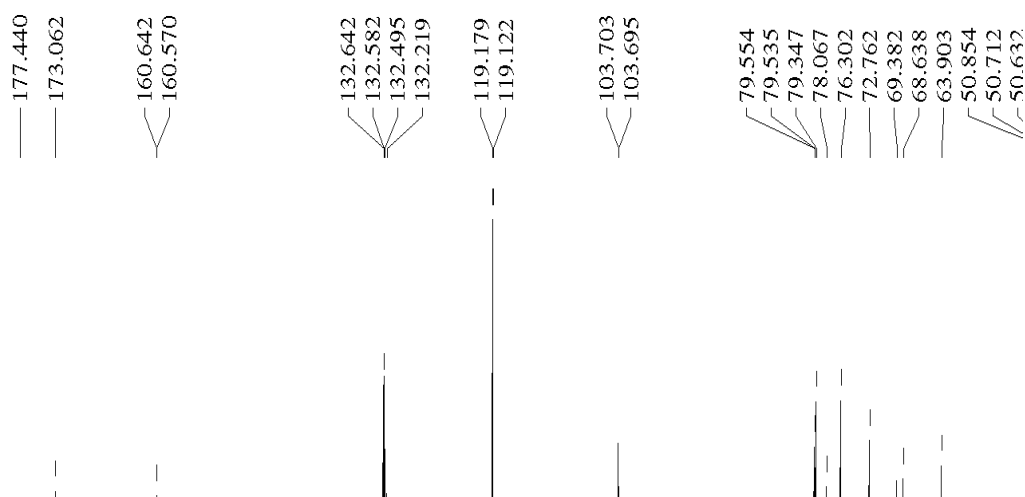
圖八、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的結構

(十三) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ^1H NMR 圖譜



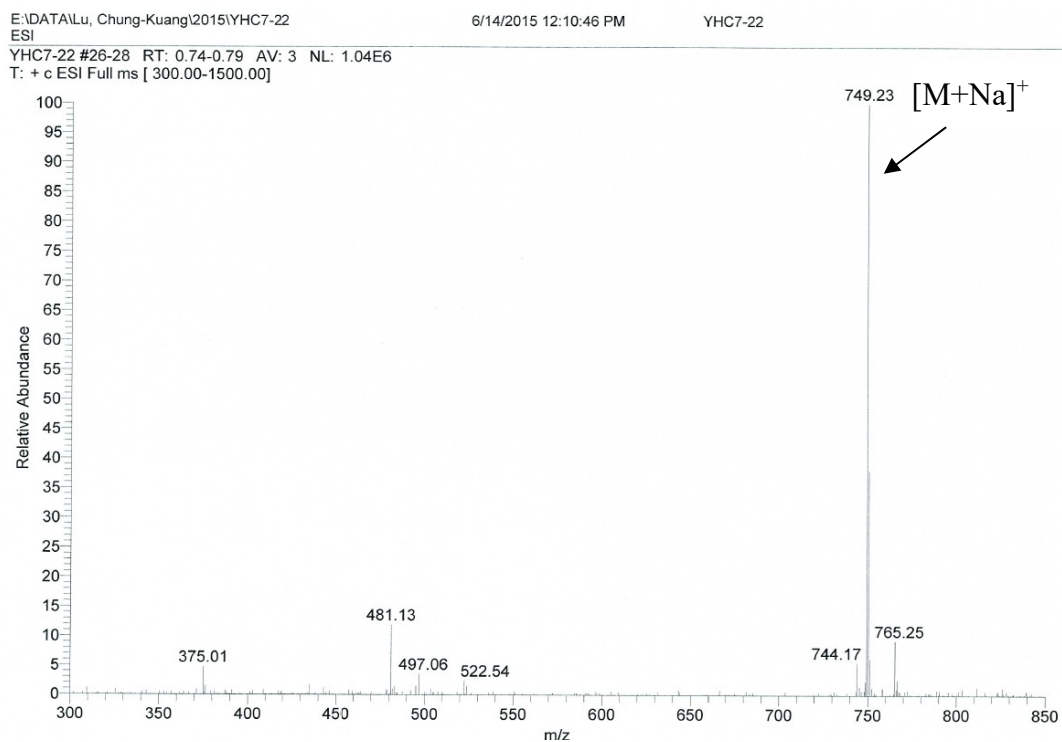
圖九、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ^1H NMR 圖譜

(十四) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ^{13}C NMR 圖譜



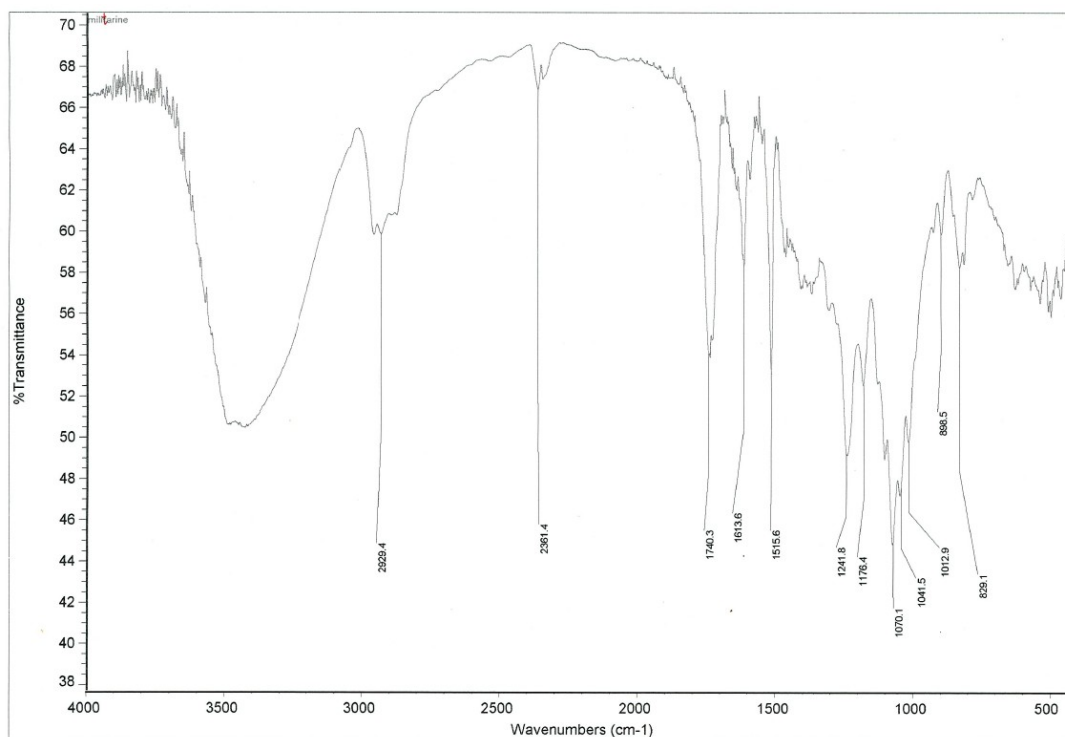
圖十、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ^{13}C NMR 圖譜

(十五) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ESI-MS 圖譜



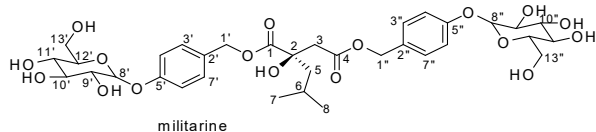
圖十一、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 ESI-MS 圖譜

(十六) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 FTIR 圖譜



圖十二、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的 FTIR 圖譜

(十七) 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的氫、碳化學位移



表五、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(militarine)的氫、
碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	176.0
2	-	76.7
3	2.62 (d); 2.92 (d)	46.2
4	-	171.7
5	1.56 (dd); 1.64 (dd)	49.2
6	1.71 (m)	24.7
7	0.78 (d)	24.0
8	0.90 (d)	25.1
1'	5.0 (s)	68.0
2'	-	131.18
3'	7.23	131.24
4'	7.06	117.8
5'	-	159.24
6'	7.06	117.8
7'	7.23	131.24
8'	4.88 (d)	102.3
9'	3.45	74.9
10'	3.40–3.45	78.0
11'	3.38	71.4
12'	3.40–3.45	78.1
13'	3.68	62.5
1''	5.0 (s)	67.2
2''	-	130.8
3''	7.26	131.1
4''	7.06	117.8
5''	-	159.19
6''	7.06	117.8
7''	7.26	131.1
8''	4.88 (d)	102.3
9''	3.45	74.9
10''	3.40–3.45	78.0
11''	3.38	71.4
12''	3.40–3.45	78.1
13''	3.87	62.5

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

白及

生藥名：BLETILLAE RHIZOMA

英文名：Common Bletilla Tuber

基 原：本品為蘭科 Orchidaceae 植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.之乾燥塊莖。夏、秋二季採挖，去除鬚根，洗淨，置沸水中煮或蒸至無白心，曬至半乾，去除外皮，曬乾。

一、方法

(一) 檢品溶液 【萃取方法 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)

——取本品粉末 2.0 g，加 70% 甲醇 20 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加水 10 mL 使之溶解，用乙醚振搖萃取 2 次，每次 20 mL，合併乙醚液並濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

【萃取方法 3】(自行開發) ✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品溶液 取 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine) 對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。

(三) 薄 層 板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(四) 展 開 劑 【展開劑 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)

——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：2.5：1)

【展開劑 2】(自行開發) ✓

——乙酸乙酯：水：甲酸 (4：1：1)

(五) 展 開 槽 10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(六) 展 開 展開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。

(七) 顯色&檢視 以 10% 硫酸乙醇試液(H₂SO₄/EtOH TS)噴霧後，105 °C 加熱至條帶顯色清晰，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

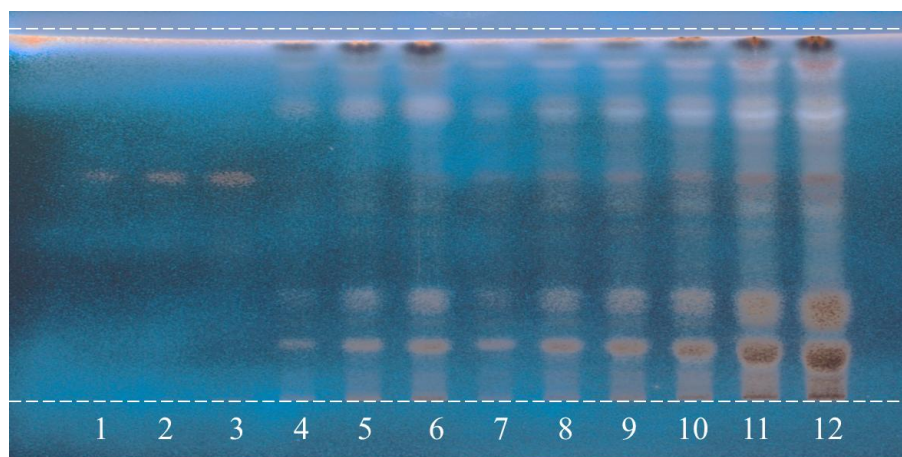
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：105/12/15

相對溼度(RH)：36%

溫度(RT)：24 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：水：甲酸 (4：1：1)



編號	名稱	含量
1, 2, 3	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 (Militarine) (1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 9 【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 9 【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 9 【萃取方法 3】	2, 5, 8 μ L

建議萃法：唯【萃取方法 2】及【萃取方法 3】之檢品溶液有分離與檢出 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯，而由於指標成分所顯示的條帶較清楚，故選擇【萃取方法 3】。

建議點注量：1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine)標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 3】 2 μ L。

三、溶媒系統選擇

實驗日期：105/12/16

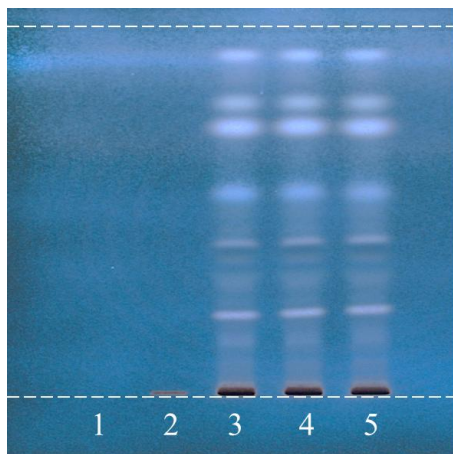
相對溼度(RH)：31%

溫度(RT)：23 °C

【展開劑 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013;修飾中華人民共和國藥典 2015)——

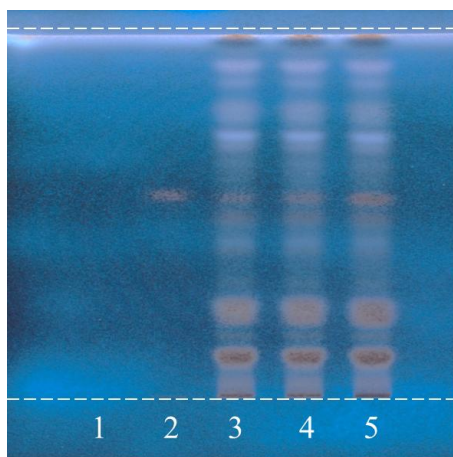
正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (6：2.5：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出
(1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 R_f 值為 0)



【展開劑 2】(自行開發)——乙酸乙酯：水：甲酸 (4：1：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出
(1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯 R_f 值為 0.55)



1：Blank

2：1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine)

3，4：檢品溶液 9

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 3】方式，唯【展開劑 2】可從檢品溶液中分離與檢出 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯，故採用自行開發之【展開劑 2】。

四、觀察方式選擇

實驗日期：105/12/16

相對溼度(RH)：31%

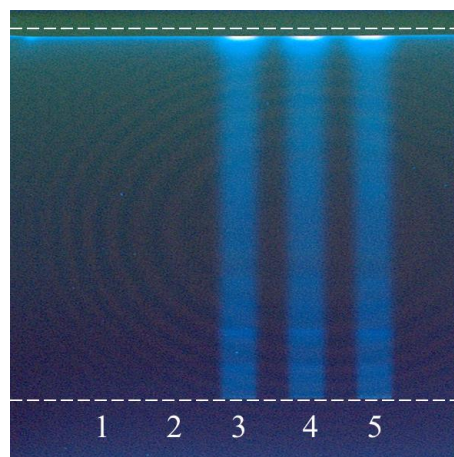
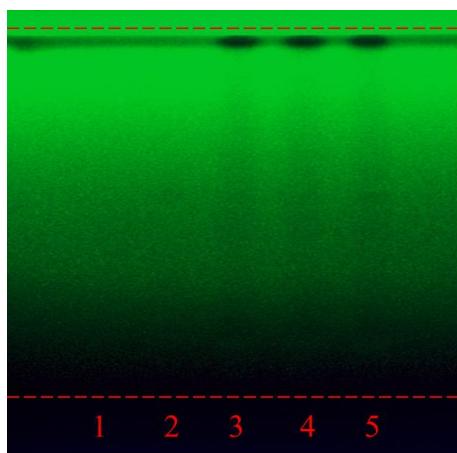
溫度(RT)：23 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：水：甲酸 (4：1：1)

【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC 【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

紫外光(254 nm)檢出

紫外光(365 nm)檢出

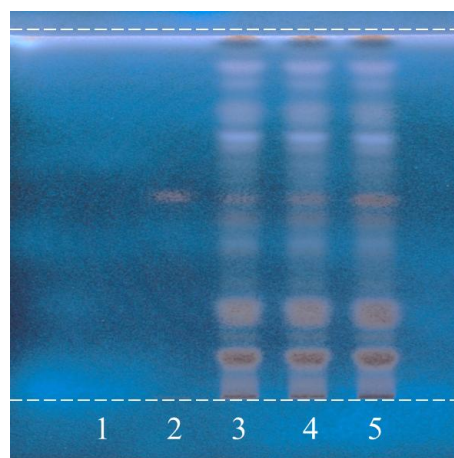
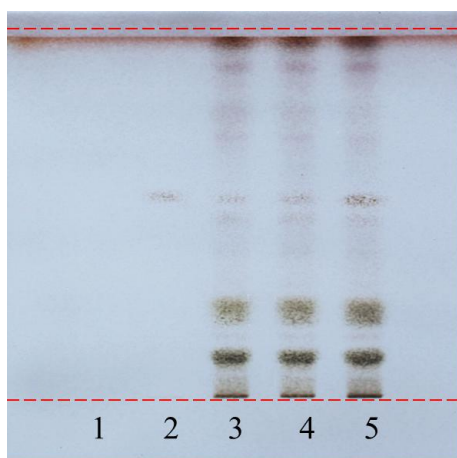


【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

呈色/可見光檢出

【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

呈色/紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine)

3，4：檢品溶液 9

5：Spike

建議觀察方式：經 10%硫酸乙醇呈色後，於紫外光(365 nm)檢視較其他觀察方式有較多明顯之條帶及 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine)標準品斑點。

五、十家樣品檢測

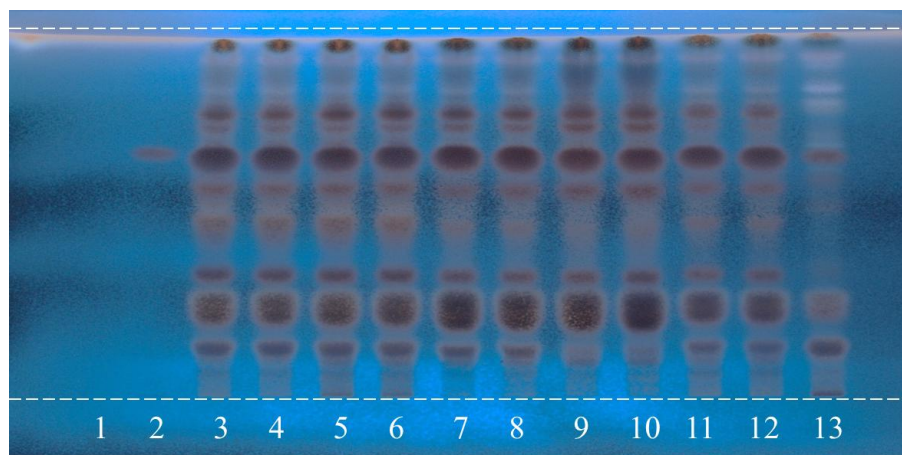
實驗日期：105/12/22

相對溼度(RH)：63%

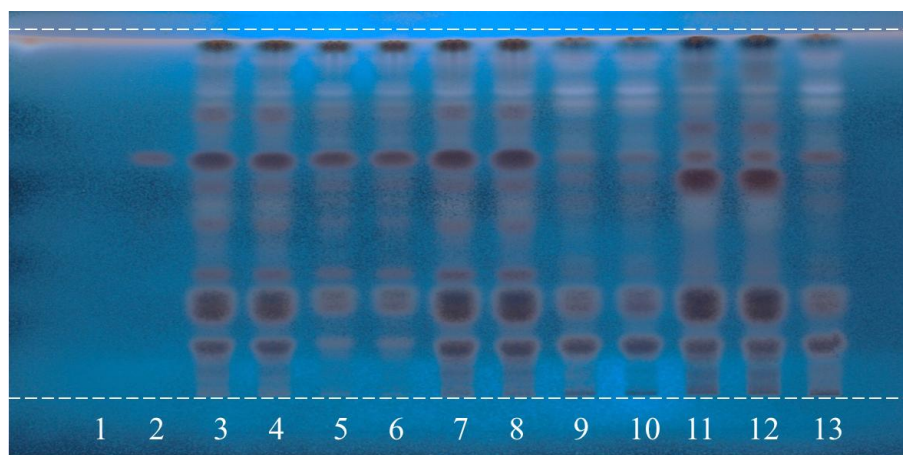
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：水：甲酸 (4：1：1)

【萃取方法 3】 (自行開發)－HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine) (1.0 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 1 (109-1)
5, 6	檢品溶液 2 (109-2)
7, 8	檢品溶液 3 (109-3)
9, 10	檢品溶液 4 (109-4)
11, 12	檢品溶液 5 (109-5)
13	Spike (檢品溶液 9)



1	Blank
2	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine) (1.0 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 6 (109-6)
5, 6	檢品溶液 7 (109-7)
7, 8	檢品溶液 8 (109-8)
9, 10	檢品溶液 9 (109-9)
11, 12	檢品溶液 10 (112-2)
13	Spike (檢品溶液 9)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 3】方式，並以自行開發之【展開劑 2】分離與檢出 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-異丁基蘋果酸酯(Militarine)較佳，以 10% 硫酸乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。