

金果榄质量评价

胡奇志, 贾宪生, 胡成刚*

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**建立评价金果榄药材质量的方法。**方法:**采用 HPLC, Agilent ZORB X SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL, 建立不同产地、不同品种金果榄的 HPLC 指纹图谱, 并测定其不同品种中盐酸药根碱与盐酸巴马汀的含量。**结果:**金果榄药材不同品种的 HPLC 指纹图谱和盐酸药根碱与盐酸巴马汀的含量存在差异, 从金果榄生物碱类成分的指纹图谱中确定了 8 个共有峰, 不同产地的金果榄在生物碱类成分上有差异。相似度大的指纹图谱, 表征其含量的指标 *R* 不一定大; 相似度低的, *R* 不一定小。*R* 的变化趋势与指标成分含量测定结果趋势基本一致。**结论:**本研究建立的指标成分含量测定方法和指纹图谱的精密性、稳定性、重复性好, 可用于表征金果榄质量的差异性, 为金果榄的质量研究提供参考依据。

[关键词] 金果榄; 盐酸药根碱; 盐酸巴马汀; 指纹图谱; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0056-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150056

Quality Evaluation of Tinosporae Radix HU Qi-zhi, JIA Xian-sheng, HU Cheng-gang* (Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to evaluate the quality of Tinosporae Radix. **Method:** By using the HPLC method, the Agilent ZORB X SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted and eluted in gradient with the mobile phase of acetonitrile-water (0.5% phosphoric acid). The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wave length was 280 nm, and the injection volume was 10 μL. HPLC fingerprints of different varieties of Tinosporae Radix from different producing areas were established to determine the content of jatrorrhizine hydrochloride and martin hydrochloride in different varieties. **Result:** There were significant differences between different varieties of Tinosporae Radix in their HPLC fingerprints and contents of jatrorrhizine hydrochloride and martin hydrochloride. The fingerprints for alkaloid constituents in Tinosporae Radix showed eight common peaks, with differences in the alkaloid components in Tinosporae Radix from different producing areas. The index *R* indicating the content may not high in fingerprints with a high similarity. The index *R* may not low in fingerprints with a low similarity. The index *R* changed with the index component content determination results. **Conclusion:** The index component content determination method and fingerprint established in this study was highly precision, stable and repeatable, and can be used to represent the differences in the quality of Tinosporae Radix and provide a reference basis for the quality study on Tinosporae Radix.

[Key words] Tinosporae Radix; jatrorrhizine hydrochloride; martin hydrochloride; fingerprint; quality evaluation

金果榄具有清热解毒、利咽、止痛的功效, 用于咽喉肿痛、痈疽疔毒、泄泻、痢疾、脘腹热痛等^[1]。金果榄中主要含有生物碱、二萜类、甾醇类等化学成

分^[2-4]。文献报道有采用薄层扫描、高效液相色谱和毛细管电泳等方法测定金果榄药材中生物碱的含量^[5-9], 也有用指纹图谱对金果榄中二萜类成分的镇

[收稿日期] 20140909(001)

[基金项目] 贵州省中药现代化专项基金项目(黔科合社字[2012]3001)

[第一作者] 胡奇志, 硕士, 副教授, 从事药品开发、药事管理教学和科研工作, E-mail: liihu2005@aliyun.com

[通讯作者] * 胡成刚, 教授、主任药师, 从事中药生药学与民族医药学研究, Tel: 0851-5652704, E-mail: hu_chenggang@yeah.net

痛、抗炎谱效学特征进行分析^[10]。对金果榄中生物碱类的指纹图谱研究未见报道。为进一步研究金果榄的质量控制方法,本文采用 HPLC 同时测定金果榄中盐酸药根碱与盐酸巴马汀 2 种生物碱成分的含量,同时建立金果榄药材生物碱类成分的指纹图谱,为金果榄药材品质评价及质量控制提供参考依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪和 20AT 紫外检测器(日本岛津),CX-250 型超声波清洗器(中国北京市医疗设备二厂),XS205 型电子天平(瑞士梅特勒

公司)。盐酸药根碱、盐酸巴马汀、金果榄对照药材(批号分别为 0733-200004, 07532-200502, 121474-200401, 中国食品药品检定研究院)。乙腈为色谱纯,磷酸、甲醇等为分析纯,水为纯净水。金果榄样品一部分购于北京同仁堂药房(贵阳)和贵州同济堂药店,为市售饮片;一部分采自贵州省贵阳、贵定、雷山、关岭等地,由贵阳中医学院吴家其副主任药师鉴定为防己科植物青牛胆 *Tinospora sagittata* 和金果榄 *T. capillipes* 的干燥块根。药材粉碎过 40 目筛,备用。药材来源及批号见表 1。

表 1 金果榄药材来源情况

Table 1 Resources situation of *Tinosporae Radix*

No.	药材名称	拉丁学名	产地	批号
1	青牛胆	<i>Tinospora sagittata</i>	对照药材	121474-200401
2	金果榄	<i>T. capillipes</i>	四川(饮片,同仁堂药店)	100301
3	金果榄	<i>T. capillipes</i>	四川(同上)	100401
4	金果榄	<i>T. capillipes</i>	四川(同上)	100501
5	金果榄	<i>T. capillipes</i>	不详(饮片,同济堂药店)	091101
6	青牛胆	<i>T. sagittata</i>	贵州贵阳	101001
7	青牛胆	<i>T. sagittata</i>	贵州关岭	101001
8	青牛胆	<i>T. sagittata</i>	贵州贵定	101001
9	青牛胆	<i>T. sagittata</i>	贵州贵定	101002
10	青牛胆	<i>T. sagittata</i>	贵州雷山	101001

2 方法与结果

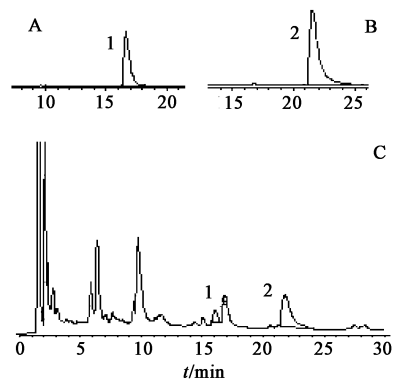
2.1 金果榄中两种生物碱的含量测定

2.1.1 样品溶液的制备 取样品粉末约 0.6 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-氨水(20:1)混合溶液 25 mL,密塞,称定质量,冷浸 1 h,再回流 1 h,放冷,用上述混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中并稀释至刻度,精密量取样品溶液 1 mL 稀释至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品适量,分别配制成 0.170 4, 0.163 0 g·L⁻¹ 的对照品储备溶液。分别精密吸取储备液 1 mL,稀释至 10 mL,作为对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.5% 磷酸水溶液,梯度洗脱(0 ~ 5 min, 15% ~ 20% A; 5 ~ 25 min, 20% ~ 30% A; 25 ~ 30 min, 35% A);检测波长 280 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹。理论塔板数以盐酸药根碱及盐酸巴马汀计算均不低于 1 500。精密吸取对照品溶液和样品溶液各 10 μL,注入液

相色谱仪,按上述色谱条件进行分析,记录色谱图,对照品与样品的色谱见图 1。



A, B. 对照品; C. 供试品; 1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀
图 1 金果榄 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatographic of *Tinospora capillipes*

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取盐酸药根碱及盐酸巴马汀对照品溶液各 4, 6, 8, 10, 12 μL, 注入液相色谱仪,记录色谱图。以其峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线。盐酸药根碱的回归

方程为 $Y_1 = 72\ 850X_1 + 53\ 705$ ($r = 0.999\ 7$); 盐酸巴马汀回归方程为 $Y_2 = 96\ 293X_2 + 77\ 233$ ($r = 0.999\ 7$)。结果表明盐酸药根碱与盐酸巴马汀分别在 68.16 ~ 204.48, 65.22 ~ 195.648 μg 呈现良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取样品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,重复进样 5 次,结果显示盐酸药根碱及盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取样品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样,结果盐酸药根碱及盐酸巴马汀峰面积的 RSD

分别为 2.3%, 1.9%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一样品 6 份,按照 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,结果盐酸药根碱及盐酸巴马汀的平均质量分数分别为 0.654 3, 0.682 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.7%, 2.9%, 表明样品溶液重复性良好。

2.1.8 回收率试验 精密称取已知盐酸药根碱及盐酸巴马汀含量的样品 6 份,每份约 0.3 g,分别精密加入质量浓度为 0.170 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸药根碱对照品储备液 1.2 mL,质量浓度为 0.163 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸巴马汀对照品储备溶液 1.3 mL,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,结果见表 2。

表 2 金果榄中两种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery test results of *Tinosporae Radix*

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
盐酸药根碱	0.300 8	0.196 8	0.204 5	0.406 1	102.35	98.99	3.2
	0.301 5	0.197 3	0.204 5	0.398 3	98.29		
	0.302 3	0.197 8	0.204 5	0.402 2	99.95		
	0.301 2	0.197 1	0.204 5	0.387 6	94.72		
	0.303 6	0.198 6	0.204 5	0.395 6	96.33		
	0.302 5	0.197 9	0.204 5	0.407 1	102.30		
盐酸巴马汀	0.300 8	0.205 4	0.195 6	0.398 1	98.52	102.69	3.1
	0.301 5	0.205 9	0.195 6	0.400 1	99.28		
	0.302 3	0.206 4	0.195 6	0.411 8	105.01		
	0.301 2	0.205 7	0.195 6	0.413 9	106.44		
	0.303 6	0.207 3	0.195 6	0.408 1	102.66		
	0.302 5	0.206 6	0.195 6	0.410 5	104.24		

2.1.9 样品测定 按 2.1.3 项下色谱条件测定了不同产地金果榄样品中盐酸药根碱和盐酸巴马汀的含量。结果见表 3。

表 3 金果榄中盐酸药根碱及盐酸巴马汀的含量 ($n = 3$)

Table 3 Content results of jatrorrhizine hydrochloride and palmatine chloride in *Tinosporae Radix* ($n = 3$) %

No.	样品名称	产地	盐酸药根碱	盐酸巴马汀
1	青牛胆	对照药材	0.822	0.786
2	金果榄	四川	0.184	0.035
3	金果榄	不祥	0.861	0.784
4	青牛胆	贵州贵阳	0.030	0.091
5	青牛胆	贵州关岭	0.148	0.081
6	青牛胆	贵州贵定	0.394	0.921
7	青牛胆	贵州雷山	0.136	0.146

2.2 金果榄生物碱类成分的指纹图谱

2.2.1 样品溶液的制备 同 2.1.1 项下样品溶液的制备方法。

2.2.2 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.5% 磷酸水溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 15% ~ 20% A; 5 ~ 25 min, 20% ~ 30% A; 25 ~ 30 min, 35% A), 检测波长 280 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL 。理论塔板数以盐酸药根碱及盐酸巴马汀计算均不低于 1 500。

2.2.3 参照峰的确定 盐酸巴马汀是金果榄中生物碱的主要成分之一,按上述色谱条件进行测定,在 HPLC 图谱中峰面积较大,出峰时间适中,根据保留时间可知供试品溶液色谱图中第 5 号峰为盐酸巴马汀,并以此峰为参照峰。

2.2.4 精密度试验 取 1 号金果榄样品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,以参照峰计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取 1 号金果榄样品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12,24 h 进样测定,以参照峰计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取 1 号金果榄样品 6 份,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,分别进样,以内参照峰计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%;6 份平行样品的相对质量分数 > 98%,表明方法重复性良好。

2.2.7 金果榄生物碱类成分指纹图谱分析 按 2.2.2 项下色谱条件测定 10 批不同产地、不同品种金果榄样品,结果 10 批样品的参照图谱中共标出 6 个共有峰,其中 3 号峰为盐酸药根碱,5 号峰为盐酸巴马汀,设定 5 号峰为参照峰。所选择的共有峰可以反映样品中生物碱类成分的信息,见图 2。将 10 批指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),采用中位数法设参照图谱匹配谱峰,计算各样品指纹图谱的相似度,见图 3,表 4。10 批金果榄药材生物碱类成分 6 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 5,6。

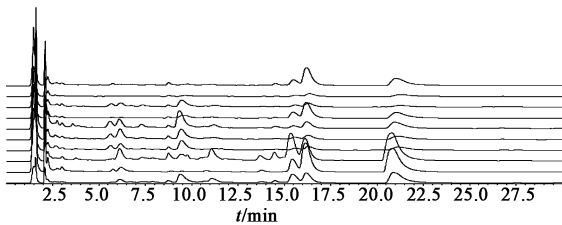
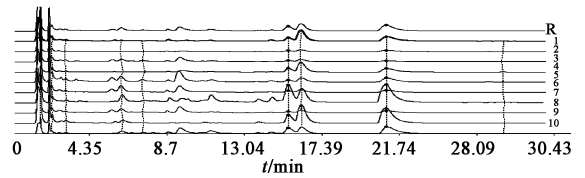


图 2 10 批金果榄药材 HPLC
Fig.2 Ten batch of Tinospora HPLC chromatography

表 4 样品指纹谱与参照指纹谱相似度分析

Table 4 Similarity analysis of sample and reference fingerprint

No.	相似度 (S)	相对质量分数 /%	No.	相似度 (S)	相对质量分数 /%
1	0.872	96.18	6	0.924	59.11
2	0.932	26.25	7	0.774	37.09
3	0.928	48.97	8	0.876	266.72
4	0.926	84.96	9	0.923	207.27
5	0.844	81.76	10	0.781	96.51



R. 对照指纹图谱

图 3 10 批金果榄药材 HPLC 指纹谱

Fig.3 Ten batch of Fingerprint of Tinosporae Radix

表 5 10 批金果榄药材生物碱类成分 6 个共有峰的相对保留时间

Table 5 Six common peak's relative retention time of alkaloids in 10 batch Tinosporae Radix

No.	1	2	3	4	6
1	0.291	0.374	0.738	0.771	1.131
2	0.289	0.349	0.736	0.769	1.298
3	0.290	0.346	0.734	0.767	1.298
4	0.296	0.354	0.736	0.770	1.312
5	0.291	0.348	0.740	0.774	1.315
6	0.291	0.348	0.738	0.771	1.307
7	0.294	0.352	0.738	0.774	1.326
8	0.292	0.349	0.738	0.772	1.309
9	0.296	0.352	0.740	0.775	1.323
10	0.293	0.350	0.740	0.775	1.321

注:5 号峰的相对保留时间均为 1.000。

表 6 10 批金果榄药材生物碱类成分 6 个共有峰的相对峰面积

Table 6 Relative peak area of 6 alkaloids common peaks in 10 batch Tinosporae Radix

No.	1	2	3	4	6
1	0.105	0.091	0.349	1.372	0.007
2	0.168	0.109	0.322	0.801	0.018
3	0.892	0.713	0.534	1.327	0.092
4	0.068	0.060	0.465	1.516	0.011
5	0.601	0.365	0.237	0.621	0.029
6	0.109	0.370	0.348	0.756	0.057
7	0.205	0.104	0.561	0.550	0.009
8	0.292	0.349	0.738	0.772	0.029
9	0.126	0.022	0.277	0.793	0.003
10	0.168	0.085	0.442	0.603	0.010

注:5 号峰的相对峰面积均为 1.000。

3 结论

不同产地的金果榄中生物碱含量有所不同,所测两种生物碱的含量比也有所不同,表明金果榄品质受地域影响较大。

指纹图谱的相似度说明化学成分分布上的相似性,在提取方法一样,取药量和进样量固定的前提

下, R 可以代表指纹图谱中各组分的含量与参照指纹图谱的对应各组分的含量相似情况。计算方式为以参照指纹图谱各峰面积之和为 A_0 , 不同产地指纹图谱的各峰面积和为 A_i , $R = \sum_{i=1}^n A_{i, \text{sample}} / A_0 \times 100\%$ 。 R 越接近 100%, 说明样品中各化学成分的含量与对照指纹图谱中各成分的含量越相同。因此相似度具有定性意义, R 具有一定程度上的定量意义^[11]。

化学指纹图谱是一种能比较全面地反映中药中化学成分分布比例和含量特征的方法^[10]。根据研究结果, 制定了金果榄药材中生物碱成分指纹图谱的技术参数, 共有峰的峰号(相对保留时间)分别为 1(0.291), 2(0.374), 3(0.738), 4(0.771), 5(1.000), 6(1.131)。可以看出, 不同产地的金果榄在生物碱类成分上有差异, 相似度大的指纹图谱, 表征其含量的指标 R 不一定大, (如四川金果榄指纹图谱); 相似度低的, R 不一定小(如贵州雷山青牛胆的指纹图谱), R 的变化趋势与指标成分含量测定结果趋势基本一致。将含量测定和指纹图谱分析结合, 可以较好的反映药材的整体信息, 为药材物质基础研究提供重要分析手段。

4 讨论

在本实验研究中, 考察了超声、回流提取 2 种方法, 选择了回流提取; 考察了甲醇、碱性甲醇进行了溶剂考察, 选择了碱性甲醇提取; 考察了甲醇-水、甲醇-水(磷酸)、乙腈-水、乙腈-水(磷酸)等不同色谱条件系统, 最后选择了乙腈-水(0.5%磷酸)系统; 同时对 260, 280, 300 nm 波长进行了考察, 优选了 280 nm 作为检测波长。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 202.
- [2] 王天志, 杜蕾蕾, 柏川. 金果榄研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(4): 292-294.
- [3] 符小文, 郭幼莹, 林连波. 海南青牛胆非生物碱成分分离与鉴定(II)[J]. 海南医学院学报, 1999, 5(1): 11.
- [4] 林连波, 符小文, 郭幼莹, 等. 海南青牛胆非生物碱成分分离与鉴定(III)[J]. 中草药, 2001, 32(1): 12.
- [5] 徐琰琛, 杨光义, 陈吉炎. 薄层扫描法测定金果榄药材中盐酸药根碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1412-1413.
- [6] 杨宏, 王天志, 杜蕾蕾, 等. RP-HPLC 测定金果榄药材中巴马汀和药根碱的含量[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(3): 195-196.
- [7] 王玉文, 虞科, 程翼宇. 非水毛细管电泳法测定金果榄中巴马汀和药根碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(12): 935-936.
- [8] 崔小敏, 刘有平, 王鑫等. 胶束电动毛细管色谱法测定金果榄中古伦宾和蝙蝠葛任碱的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(9): 689-692.
- [9] 王柳卜, 贾宪生, 陈秀芬, 等. 金果榄二萜类成分色谱及相关药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 83-86.
- [10] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射液特征指纹图谱的探讨[J]. 中成药, 2000, 22(7): 516-520.
- [11] 孙国祥, 万月生, 孙毓庆. 射干的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 色谱, 2004, 22(3): 206-209.

[责任编辑 顾雪竹]