

# Study on UPLC Fingerprint of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes*

Yanghua Li, Qihong Chen, Lanna Liang, Hui Xu, Yanfang Jiang

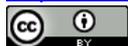
Guangxi Center for Analysis and Test Research, Nanning Guangxi  
Email: 40836254@qq.com

Received: Sep. 26<sup>th</sup>, 2016; accepted: Oct. 14<sup>th</sup>, 2016; published: Oct. 19<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

## Abstract

**Objective:** To establish UPLC fingerprint of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes* which is expected to provide standards for the quality control and identification of the Chinese crude drug. **Method:** The UPLC method was used. Chromatography conditions were Acquity UPLC®BEN C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) column with gradient mobile phase of acetonitrile and 0.3% phosphate acid. UV detection wavelength was 225 nm, the flow rate was 0.25 ml/min and the column temperature was 25°C. **Result:** UPLC fingerprints of 10 samples of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes* were established. 7 mutual peaks were selected as the fingerprint peaks in the samples. Among the obtained fingerprints, most of the detected peaks were separated effectively. 10 samples had higher similarities. **Conclusion:** The established UPLC fingerprint has desirable accuracy, repeatability and stability, which can be used as reference for the quality control of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes*.

## Keywords

*Tinospora sagittata* and *T. capillipes*, UPLC, Fingerprints, Quality Control

# 金果榄药材的UPLC指纹图谱研究

李扬华, 陈秋虹, 梁兰娜, 徐 慧, 蒋艳芳

广西分析测试研究中心, 广西 南宁  
Email: 40836254@qq.com

收稿日期: 2016年9月26日; 录用日期: 2016年10月14日; 发布日期: 2016年10月19日

**文章引用:** 李扬华, 陈秋虹, 梁兰娜, 徐慧, 蒋艳芳. 金果榄药材的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 分析化学进展, 2016, 6(4): 79-85. <http://dx.doi.org/10.12677/aac.2016.64012>

## 摘要

目的：建立金果榄药材的UPLC指纹图谱，为金果榄药材的质量控制提供依据。方法：采用超高效液相色谱法。色谱条件：色谱柱：Acquity UPLC®BEN C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)；流动相A：乙腈；流动相B：0.3%磷酸溶液；流速：0.25 ml/min；检测波长：225 nm；柱温：25℃。结果：建立了10批金果榄药材的指纹图谱。金果榄药材有7个共有峰，多数峰可以达到较好分离，具有较高的相似度。结论：建立的超高效液相指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性，可作为金果榄质量评价参考。

## 关键词

金果榄，UPLC，指纹图谱，质量控制

## 1. 引言

金果榄为防己科植物青牛胆 *Tinospora sagittata* (Oliv.)Gagnep.或金果榄 *Tinospora capillipes* Gagnep.的干燥块根，有清热解毒、利咽、止痛的功效。经研究金果榄含有丰富的化学成分，含掌叶防己碱，青牛胆苦素、巴马汀、金果榄甙、药根碱等化合物。金果榄在广西分布较多，产量较大，是广西特色药材之一，具有重要的经济价值和民间应用基础，已被《中华人民共和国药典》收录，目前现行的《药典》收录有显微鉴别、理化鉴别、巴马汀含量测定等质量控制标准[1]，也有文献报道对金果榄中巴马汀、药根碱的 HPLC 测定方法的研究[2]，但对于金果榄的指纹图谱研究未见文献报道。本实验采用超高效液相色谱法，建立金果榄药材的 UPLC 指纹图谱，为金果榄药材的质量控制提供依据。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器、试剂与材料

超高效色谱仪；Empower 2 色谱工作站，检测器：二极管阵列紫外检测器(美国 WATERS Acquity)；

电子天平(瑞士梅特勒)；

恒温水浴锅(金坛市易晨仪器制造厂)；

盐酸巴马汀标准对照品(中国药品生物制品检定所，批号：110732-200506)；

乙腈(色谱纯，德国 Merck)；

甲醇(分析纯，广东光华科技股份有限公司)；

超纯水(实验室自制)；

金果榄药材：购于广西各地医药市场，经广西药用植物园董青松教授鉴定为防己科植物青牛胆 *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep 或金果榄 *Tinospora capillipes* Gagnep 的干燥块根。产地详见表 1。

### 2.2. 实验方法

1) 色谱条件：色谱柱：Acquity UPLC®BEN C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)；流动相：流动相 A：乙腈；流动相 B：0.3%磷酸溶液，梯度洗脱程序见表 2；流速：0.25 ml/min；检测波长：225 nm；柱温：25℃；进样量：5 μL。

2) 对照品溶液的制备：精密称取盐酸巴马汀标准对照品 1.00 mg，用甲醇溶解，定容于 25 ml 量瓶中，制得浓度为 0.04 mg·mL<sup>-1</sup> 的标准储备液，备用。

**Table 1.** Sources of samples of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes***表1.** 金果榄药材来源

编号	来源
1	广西玉林地区兴业县
2	广西玉林地区北流市
3	广西桂林兴安县(人工栽培品种)
4	广西桂林兴安县(野生品种1)
5	广西桂林兴安县(野生品种2)
6	贵州毕节(人工栽培品种)
7	贵州毕节(野生品种)
8	云南(人工栽培品种)
9	云南(野生品种)
10	越南

**Table 2.** Gradient elution of mobile phase**表2.** 流动性梯度洗脱表

时间(min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~10	10 → 60	90 → 40
10~14	60 → 80	40 → 20
14~15	80 → 10	20 → 90
15~18	10	90

### 3) 供试品溶液的制备

样品溶液制备: 取药材粉末(60目)约1g, 精密称定, 置圆底烧瓶, 加入甲醇50ml, 精密称定重量, 加热回流2小时, 取出, 放冷, 补足重量, 滤过, 过0.2 $\mu$ m微孔滤膜, 即得。

4) 精密度考察: 精密吸取供试品溶液5 $\mu$ L, 连续进样6次, 直观观察指纹图谱的全貌无明显差别, 用相似度计算, 在同一台仪器测得的色谱指纹图谱的相似度均大于0.950, 表明该仪器的精密度良好。

5) 稳定性考察: 取同一份供试品溶液, 分别在0、3、6、9、12、18、24、48、72小时等9个时间点进行检测, 直观观察指纹图谱的全貌无明显变化, 用相似度计算, 指纹图谱的相似度均大于0.950, 供试品溶液的成分在72小时内是稳定的。

6) 重复性: 取同一批号金果榄药材粉末6份, 按照供试品溶液的制备方法制备, 依法检测, 6份供试品溶液测得的色谱指纹图谱的全貌直观观察无明显变化, 用相似度计算, 指纹图谱的相似度均大于0.950, 该方法的重复性较好。

## 2.3. 结果

### 1) 指纹图谱的测定

10批金果榄药材按上述实验方法制成供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别进样并记录22分钟色谱图(1号金果榄药材的色谱图见图1, 盐酸巴马汀标准图谱见图2)。

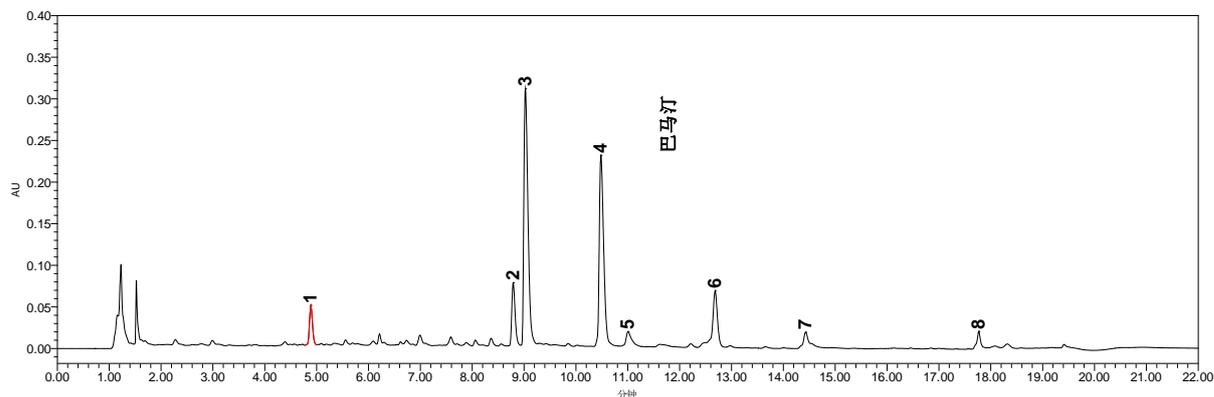


Figure 1. UPLC chromatograms of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes*

图 1. 金果榄药材的 UPLC 色谱图

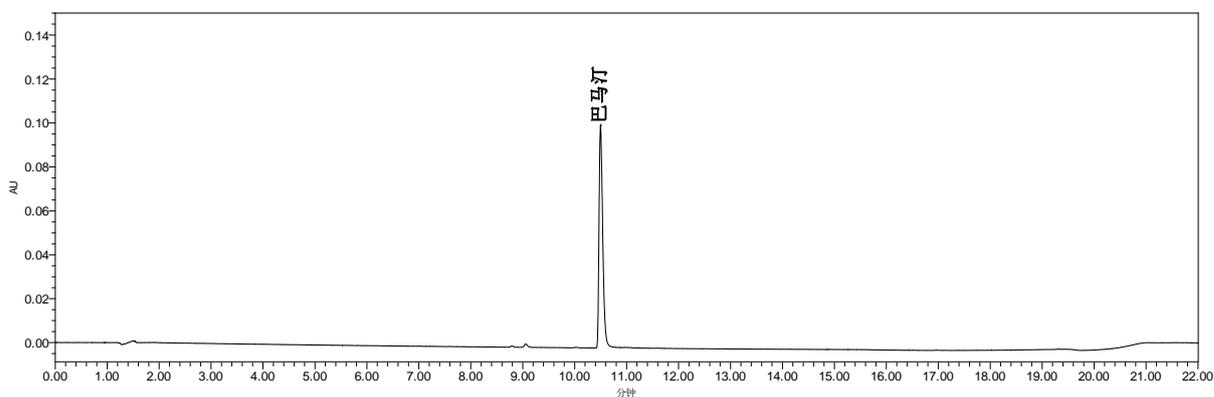


Figure 2. UPLC standard chromatograms of palmatine chloride

图 2. 盐酸巴马汀 UPLC 标准图谱

## 2) 共有峰的确定

22 分钟内共有 8 个主要特征峰。通过与对照品图谱比对，其中保留时间为 10.6 分钟的 4 号峰为盐酸巴马汀，由于 4 号峰含量高、分离度较好且比较稳定，故将其作为参比峰，计算其它各特征峰的相对保留时间和相对峰面积，结果见表 3。10 批金果榄药材色谱图中非共有峰面积占总峰面积的百分比小于 6%，符合指纹图谱技术要求。

## 3) 相似度评价

测定 10 批金果榄药材的供试品，得到不同批次样品的色谱图，采用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”进行相似度评价，10 批金果榄药材指纹图谱匹配后的图谱见图 3，金果榄药材供试品的相似度在 0.947~0.999 之间(见表 4)表明此 10 批金果榄药材提取后的指纹图谱相似度良好。

## 3. 讨论部分

### 1) 提取条件的选择

分别用甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇等四种提取溶剂对供试品进行超声波和加热回流提取，经比较，加热回流提取对同一组分含量提取率高于超声波提取，当提取溶剂为甲醇时，采用热回流提取提取 2 小时，色谱图显示色谱峰数较多且色谱峰较高，以其中主要成分盐酸巴马汀提取溶剂含量测定结果显示，提取溶剂最佳为甲醇(见表 5)。因此提取条件选择甲醇为提取溶剂，加热回流 2 小时。

**Table 3.** Relative peak area and relative retention time of mutual peaks of UPLC fingerprint of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes***表3.** 金果榄药材UPLC指纹图谱共有峰的相对峰面积和相对保留时间

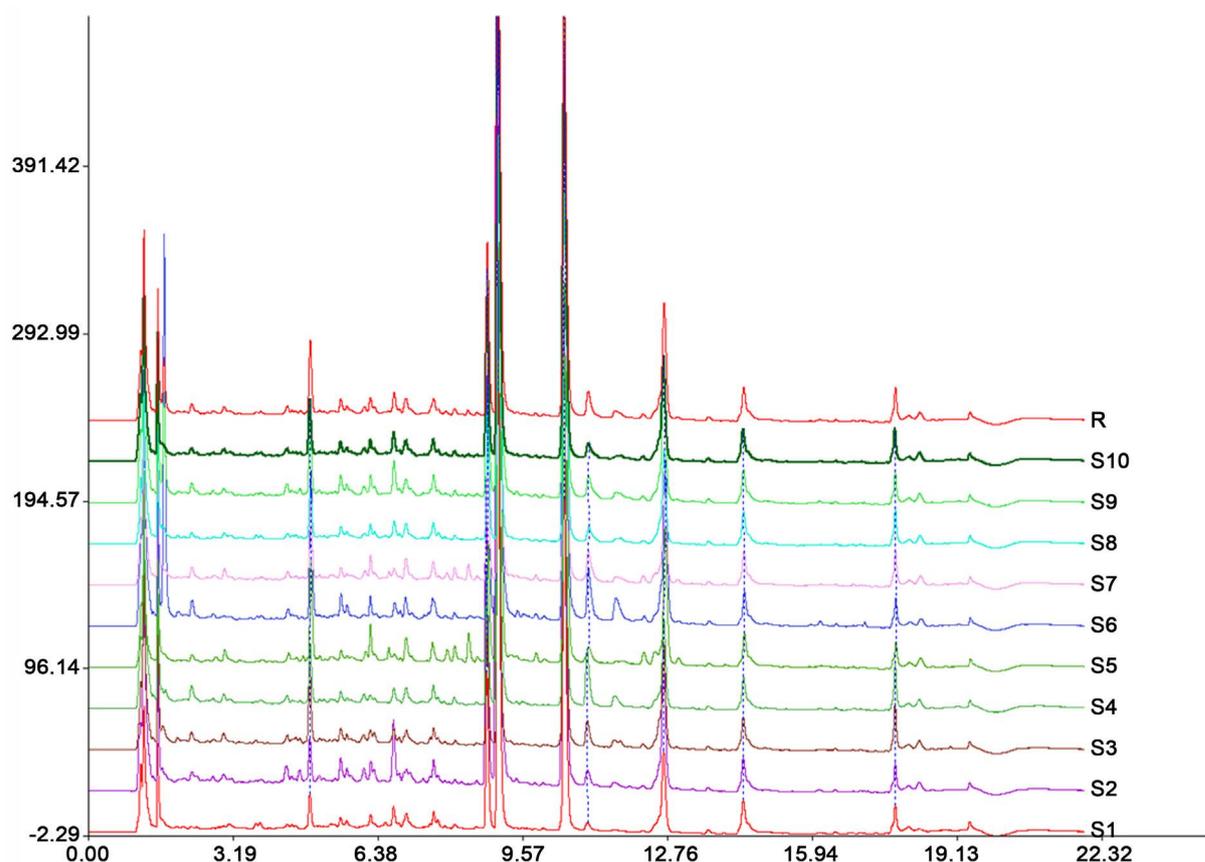
峰号	相对保留时间(平均值)	相对峰面积(平均值)
1	0.47	0.12
2	0.84	0.31
3	0.86	1.24
4	1.00	1.00
5	1.05	0.07
6	1.21	0.29
7	1.38	0.10
8	1.70	0.11

**Table 4.** Similarity results of ten samples of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes***表4.** 10批金果榄药材的相似度结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1										
S2	0.991	1									
S3	0.978	0.947	1								
S4	0.992	0.991	0.97	1							
S5	0.993	0.984	0.983	0.992	1						
S6	0.993	0.985	0.982	0.991	0.998	1					
S7	0.995	0.985	0.983	0.996	0.998	0.994	1				
S8	0.995	0.979	0.99	0.991	0.993	0.994	0.994	1			
S9	0.997	0.997	0.969	0.996	0.994	0.995	0.995	0.992	1		
S10	0.999	0.991	0.98	0.996	0.996	0.996	0.997	0.997	0.998	1	
对照指纹图谱	0.998	0.991	0.98	0.996	0.997	0.997	0.998	0.996	0.999	1	1

**Table 5.** The results of the determination of the content of palmatine chloride in different extraction solvents**表5.** 不同提取溶剂盐酸巴马汀含量测定结果

提取溶剂	样品称重M/g	盐酸巴马汀含量C/mg·g <sup>-1</sup>
甲醇	1.0033	1.5074
乙醇	1.0529	1.4266
50% 甲醇	1.0210	1.2417
50% 乙醇	1.0014	1.2335



**Figure 3.** UPLC fingerprint of *Tinospora sagittata* and *T. capillipes*. S1 - S10: UPLC fingerprint of samples, R: UPLC fingerprint of reference substance

**图 3.** 金果榄药材指纹图谱。S1 - S10: 样品 1~样品 10 指纹图谱, R: 对照指纹图谱

## 2) 色谱条件的选择

a) 色谱柱的选择: 比较了 Acquity UPLC<sup>®</sup>BEN C<sub>18</sub>、Beh shield RP<sub>18</sub>、Phenyl 三种不同的 UPLC 色谱柱。BEN C<sub>18</sub> 色谱柱效果最佳, 通过分析速度与分离效果比较, 从 2.1 × 50 mm、2.1 × 100 mm 和 3.0 × 100 mm 三种型号中最终选择 2.1 × 100 mm 型号 BEN C<sub>18</sub> 色谱柱。该色谱柱对于组分 2 与组分 3 的分离度 ≥ 1, 其余色谱柱在这 2 个组分的分离度在 0.7~0.9。

b) 检测波长的选择: 采用二极管阵列检测器, 对供试品检测波长进行了考察, 结果表明在 225 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 因此选择该波长作为检测波长。

c) 流动相的选择: 选用乙腈 0.3% 磷酸溶液作为流动相。较之其他的溶液系统磷酸盐 - 乙腈, 乙腈 - 十二烷基硫酸钠溶液[3]、乙腈 - 醋酸溶液, 达到更好的分离效果, 且能明显改善色谱峰脱尾现象。采用梯度洗脱对金果榄药材提取液进行分离, 最后确定以流动性梯度洗脱表中的流动相进行洗脱, 在该条件下, 色谱峰的分离效果好, 峰形也较好, 故确定采用该流动相进行色谱分离。

d) 相似度评价: 结果显示 10 批金果榄药材供试品的相似度在 0.947~0.999 之间, 分析其差异原因主要是本试验所用的药材为不同产地的金果榄, 有些为野生品, 有些为栽培品, 由于气候、土壤等因素, 在化学成分等方面存在一定的差异。

金果榄系民间中药, 也是苗族、侗族、瑶族等少数民族的习用药物, 同名异物或同物异名现象较为严重, 容易产生混淆, 对用药及生产种植不利。本实验建立了金果榄药材的 HPLC 指纹图谱的测定方法,

实验方法简便，重复性好，得到了金果榄药材 UPLC 指纹图谱及相关数据，可为金果榄药材及其它含金果榄药材的中药复方制剂制定质量标准提供参考。

### 参考文献 (References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 202.
- [2] 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.
- [3] 杨光义, 杜士明, 黄良永, 等. 不同产地金果榄药材中盐酸巴马汀含量比较[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1116-1117.

#### 期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [aac@hanspub.org](mailto:aac@hanspub.org)