

人字果质量标准的研究

赵 超， 徐文芬*， 孙庆文， 柏彩红
(贵州中医药大学，贵州 贵阳 550025)

摘要：目的 建立人字果 *Dichocarpum dalzielii* (Drumm. et Hutch.) W. T. Wang et Hsiao 质量标准。**方法** HPLC 法测定木兰花碱含量，酸性染料比色法测定总生物碱含量，2015 年版《中国药典》法测定水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物含量。**结果** 木兰花碱在 0.200 2~10.01 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$)，平均加样回收率为 100.70%，RSD 为 2.9%；总生物碱在 4.048~20.24 mg/L 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 8$)，平均加样回收率为 96.70%，RSD 为 3.6%。12 批样品中，木兰花碱、总生物碱、水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物质量分数分别为 0.27%~1.49%、3.35%~5.98%、6.45%~8.50%、9.11%~13.35%、0.27%~2.96%、18.41%~25.06%。**结论** 该方法准确可靠，重复性好，可用于人字果的质量控制。
关键词：人字果；木兰花碱；总生物碱；HPLC；酸性染料比色；2015 年版《中国药典》
中图分类号：R282 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2020)10-2579-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.008

Quality standard for *Dichocarpum dalzielii*

ZHAO Chao， XU Wen-fen*， SUN Qing-wen， BAI Cai-hong
(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine， Guiyang 550025， China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for *Dichocarpum dalzielii* (Drumm. et Hutch.) W. T. Wang et Hsiao. **MEHORDS** HPLC was adopted in the content determination of magnoflorine, acid-dye colorimetry method was applied to determining total alkaloids content, and the contents of water, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract were determined according to Chinese Pharmacopoeia (2015 edition). **RESULTS** Magnoflorine showed a good linear relationship within the range of 0.200 2–10.01 μg ($r=0.999\ 9$), whose average recovery was 100.70% with the RSD of 2.9%. Total alkaloids showed a good linear relationship within the range of 4.048–20.24 mg/L ($r=0.999\ 8$), whose average recovery was 96.70% with the RSD of 3.6%. The mass fractions of magnoflorine, total alkaloids, water, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract were 0.27%–1.49%, 3.35%–5.98%, 6.45%–8.50%, 9.11%–13.35%, 0.27%–2.96% and 18.41%–25.06%, respectively. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of *D. dalzielii*.
KEY WORDS: *Dichocarpum dalzielii* (Drumm. et Hutch.) W. T. Wang et Hsiao; magnoflorine; total alkaloids; HPLC; acid-dye colorimetry; Chinese Pharmacopoeia (2015 edition)

人字果又名岩节连，为毛茛科人字果属植物蕨叶人字果 *Dichocarpum dalzielii* (Drumm. et Hutch.) W. T. Wang et Hsiao 的干燥全草或根茎，为贵州民

间常用药材，具有清热解毒、消肿止痛的功效^[1]，主要分布于贵州、四川、江西、广西等地^[2-5]。2015 年，贵州食品药品监督管理局修订 2003 年版

收稿日期：2019-12-18

基金项目：贵州省中药、民族药材质量标准研究项目（DBYP52010）；贵州省一流学科（中药学）建设项目（GNYL〔2017〕008）；贵州省普通高等学校工程研究中心项目（黔教合 KY 字〔2017〕018）；贵州省 2019 年大学生创新创业训练计划项目（20195200164）

作者简介：赵 超（1995—），男，硕士生，从事中药民族药质量控制与新药研发工作。E-mail: 2540538737@qq.com

* 通信作者：徐文芬（1964—），女，教授，从事中药民族药质量控制与新药研发工作。E-mail: wenfenxu@126.com

《贵州省中药材、民族药材质量标准》，将人字果列为新增补药材品种。

目前，关于人字果的研究较少，仅涉及分类学方面^[6-13]。课题组前期采用 LC-MS、对照品及文献比对^[14-16]等方法，明确了人字果中含有木兰花碱，它具有抗炎、抗抑郁、抗菌等活性，而且对骨关节软骨变形有一定抑制作用^[17-20]，这与该药材消肿止痛功效密切相关，但质量控制手段的缺乏严重制约了其良性发展。因此，本实验通过 HPLC-DAD、酸性染料比色法分别首次测定人字果中木兰花碱、总生物碱含量，并按照 2015 年版《中国药典》四部通则方法测定水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物含量，以期有效控制该药材质量提供依据，也为其后续开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 UltiMate-3000 型高效液相色谱仪，配置 DAD 检测器（美国 Thermo 公司）；UV1800 型紫外-可见分光光度计（日本岛津公司）；AG135 型电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Pntulips BP-C₁₈ 色谱柱（上海谱宁分析技术有限公司）。

1.2 试剂与药物 木兰花碱对照品（成都曼思特生物科技有限公司，批号 MUST-17071711，纯度 99.02%）。乙腈为色谱纯（美国天地公司）；磷酸、三乙胺、二水合磷酸二氢钠、溴百里香酚蓝、二氯甲烷、甲醇、乙醇均为分析纯；水为重蒸馏水。

1.3 药材 人字果均为课题组从贵州主要分布地区采集的野生品，经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为毛茛科植物蕨叶人字果 *Dichocarpum. dalzielii* (Drumm. et Hutch.) W. T. Wang et Hsiao 的干燥全草，具体信息见表 1。药材在 40 ℃ 下烘干，粉碎后过 3 号筛，置于干燥器中备用。

2 方法与结果

2.1 常规物质检查与浸出物含量测定 分别按照 2015 年版《中国药典》四部通则 0832 水分测定法第二法、2302 灰分测定法、2201 浸出物测定法（热浸法）测定水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物含量，结果见表 2。

2.2 木兰花碱含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的木兰花碱对照品 25.02 mg，置于 25 mL 量瓶中，75% 甲醇定容至刻度，摇匀，即得（1 000.8 mg/L）。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples				
编号	采集时间	采集地点	纬度	经度
1S	2016. 06. 15	贵州省绥阳县	28°01'23"	107°05'36"
2S	2016. 06. 15	贵州省绥阳县	28°01'45"	107°05'18"
3S	2016. 06. 15	贵州省绥阳县	28°01'37"	107°05'29"
4S	2016. 08. 07	贵州省独山县	25°54'48"	107°41'57"
5S	2015. 08. 28	贵州省江口县	27°21'10"	108°82'67"
6S	2016. 10. 29	贵州省江口县	27°42'64"	108°49'33"
7S	2016. 10. 29	贵州省江口县	27°88'12"	108°72'56"
8S	2017. 04. 03	贵州省雷山县	26°22'67"	108°10'70"
9S	2017. 04. 03	贵州省雷山县	26°22'31"	108°10'62"
10S	2017. 04. 03	贵州省雷山县	26°22'19"	108°10'84"
11S	2017. 04. 03	贵州省雷山县	26°22'45"	108°10'97"
12S	2017. 04. 03	贵州省雷山县	26°22'05"	108°10'34"

表 2 浸出物、水分、总灰分、酸不溶性灰分含量测定结果（n=3）

Tab. 2 Results of content determination of extract, water, total ash and acid-insoluble ash（n=3）

编号	浸出物/%	水分/%	总灰分/%	酸不性灰分/%
1S	40. 25	6. 87	13. 35	0. 34
2S	36. 64	7. 34	12. 77	0. 71
3S	38. 01	6. 45	13. 15	0. 28
4S	44. 31	7. 58	10. 66	0. 60
5S	46. 18	8. 49	9. 11	0. 35
6S	46. 28	8. 50	9. 25	0. 32
7S	42. 93	7. 73	9. 36	0. 29
8S	47. 47	7. 63	9. 79	0. 45
9S	46. 03	7. 61	9. 11	0. 35
10S	41. 90	7. 37	11. 83	0. 88
11S	47. 28	7. 66	9. 74	0. 32
12S	49. 68	7. 71	9. 86	0. 27

2.2.2 供试品溶液制备 取药材粉末约 1.0 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 25 mL，称定质量，超声（100 W、40 Hz）提取 1 h，取出，放冷，75% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取 15 mL 续滤液，25 mL 石油醚（30~60 ℃）萃取 3~4 次至石油醚层无明显变化，下层萃取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.3 色谱条件 Pntulips BP-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-（0.1% 磷酸-0.1% 三乙胺）（B），梯度洗脱（0~10 min，5%~20% A；10~30 min，20%~40% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 270 nm；进样量 10 μL。

2.2.4 专属性考察 精密吸取对照品、供试品溶液、空白溶液各 10 μL，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，供试品溶液

中各成分色谱峰的保留时间与对照品一致，分离度均大于 1.5，而且达到基线分离，峰纯度在 98% 以上，表明该方法专属性良好。

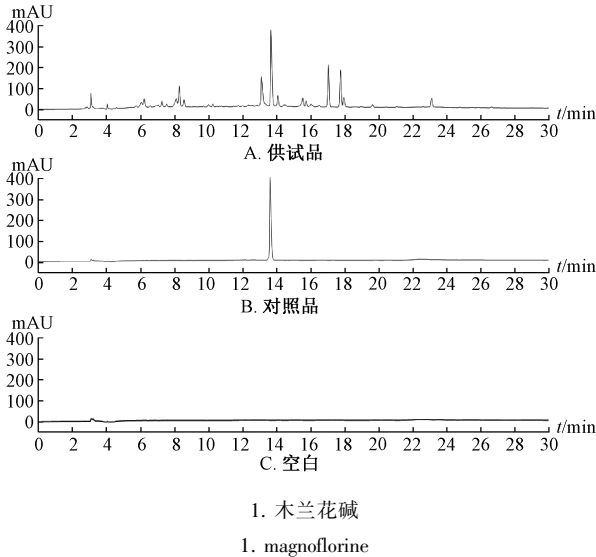


图 1 木兰花碱 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of magnoflorine

2.2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，置于 5 mL 量瓶中，75% 甲醇稀释定容至刻度，摇匀，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定。以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程为 $Y = 21.796X - 0.644$ （ $r = 0.9999$ ），在 0.200 2~10.01 μg 范围内线性关系良好。

2.2.2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得木兰花碱峰面积 RSD 为 0.47%，表明仪器精密度良好。

2.2.2.7 稳定性试验 取药材粉末（5S）约 1.0 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24、48 h 在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得木兰花碱含量 RSD 为 0.60%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.2.8 重复性试验 取药材粉末（5S）6 份，每份约 1.0 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得木兰花碱含量 RSD 为 1.1%，表明该方法重复性良好。

2.2.2.9 加样回收率试验 称取木兰花碱含量已知的药材粉末（5S）9 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别按 1：0.5、1：1、1：1.5 比例加入对照

品溶液，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

表 3 木兰花碱加样回收率试验结果（n=9）

Tab. 3 Results of recovery tests for magnoflorine（n=9）

称样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收	RSD/
g	mg	mg	mg	%	率/%	%
0.500 1	2.272 3	1.000 8	3.309 6	103.6		
0.500 1	2.272 3	1.000 8	3.295 5	102.2		
0.500 0	2.271 8	1.000 8	3.324 5	105.2		
0.500 0	2.271 8	2.001 6	4.285 8	100.6		
0.500 2	2.272 7	2.001 6	4.283 3	100.5	100.70	2.9
0.500 1	2.272 3	2.001 6	4.280 4	100.3		
0.500 2	2.272 7	3.002 4	5.194 8	97.3		
0.500 2	2.272 7	3.002 4	5.216 4	98.0		
0.500 0	2.271 8	3.002 4	5.215 6	98.0		

2.2.2.10 样品含有量测定 取 12 批药材粉末，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 4。

表 4 木兰花碱含有量测定结果（n=3）

Tab. 4 Results of content determination of magnoflorine（n=3）

编号	木兰花碱/%
1S	0.27
2S	0.32
3S	0.31
4S	1.49
5S	0.50
6S	0.57
7S	0.73
8S	0.61
9S	0.71
10S	0.62
11S	0.71
12S	0.96

2.3 总生物碱含有量测定

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的木兰花碱对照品 5.06 mg，置于 50 mL 量瓶中，加水稀释定容至刻度，摇匀，即得（101.2 mg/L）。

2.3.2 供试品溶液制备 取“2.2.2”项下层萃取液 8 mL，稀释定容至 50 mL 量瓶中，即得。

2.3.3 缓冲液制备 取 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液适量，配制成 pH 为 4.5 的溶液，即得。

2.3.4 显色剂制备 取溴百里香酚蓝 0.15 g，2.5 mL NaOH 溶液（1 mol/L）溶解，加水稀释定容至 500 mL，即得。

2.3.5 检测波长筛选 精密吸取对照品溶液 2 mL、供试品溶液（6S）1 mL，置于分液漏斗中，

加入 12 mL 缓冲液，摇匀，再加入 2 mL 显色剂，摇匀，再加入 15 mL 二氯甲烷，充分振摇 2 min，静置 1 h 后分取二氯甲烷液；另取 12 mL 缓冲液，同法制备空白溶液。按照 2015 年版《中国药典》要求，在 300~600 nm 波长处进行扫描，发现对照品、供试品溶液中生物碱与染料所形成的络合物在 409 nm 处均有稳定的最大吸收，故选择其作为检测波长。

2.3.6 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液 0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0 mL，加水稀释定容至 3 mL，按“2.3.5”项下方法测定吸光度，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（*X*），吸光度为纵坐标（*A*）进行回归，得方程为 $A = 36.094X - 0.0563$ （ $r = 0.9998$ ），在 4.048~20.24 mg/L 范围内线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 取“2.3.1”项下对照品溶液 2 mL，按“2.3.5”项下方法测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 0.65%，表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取药材粉末（5S）约 1.0 g，精密称定，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取 1 mL，于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0 h 按“2.3.5”项下方法测定吸光度，测得总生物碱含有量 RSD 值为 2.2%，表明溶液在 5.0 h 内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 取药材粉末（5S）6 份，每份约 1.0 g，精密称定，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取供试品溶液 1 mL，按“2.3.5”项下方法测定吸光度，测得总生物碱含有量 RSD 为 1.1%，表明该方法重复性较好。

2.3.10 加样回收率试验 取总生物碱含有量已知的药材粉末（5S）9 份，每份约 0.5 g，精密称定，按 1：0.5、1：1、1：1.5 比例加入对照品溶液，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取 1 mL，按“2.3.5”项下方法测定吸光度，计算回收率，结果见表 5。

2.3.11 样品含有量测定 取 12 批药材粉末，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取 1 mL，按“2.3.5”项下方法测定吸光度，计算含有量，结果见表 6。

3 讨论

3.1 木兰花碱含有量测定中色谱条件、提取方法筛选 本实验比较了甲醇-水、甲醇-酸水、乙腈-酸水、乙腈-（0.1% 磷酸-0.1% 三乙胺）的洗脱分离

表 5 总生物碱加样回收率实验结果（*n* = 9）

Tab. 5 Results of recovery tests for total alkaloids（*n* = 9）

称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.500 0	16.129 8	8.001 6	23.714 1	94.79		
0.500 0	16.129 8	8.001 6	23.506 3	92.19		
0.500 0	16.129 8	8.001 6	23.701 1	94.62		
0.500 0	16.129 8	15.003 0	30.590 7	96.39		
0.500 0	16.129 8	15.003 0	30.324 5	94.61	96.70	3.6
0.500 0	16.129 8	15.003 0	30.512 8	95.87		
0.500 0	16.129 8	25.005 0	41.649 1	102.06		
0.500 0	16.129 8	25.005 0	41.253 0	100.47		
0.500 0	16.129 8	25.005 0	40.954 3	99.28		

表 6 总生物碱含有量测定结果（*n* = 3）

Tab. 6 Results of content determination of total alkaloids（*n* = 3）

编号	总生物碱/%
1S	3.35
2S	3.68
3S	3.53
4S	5.98
5S	3.52
6S	4.07
7S	4.55
8S	3.47
9S	4.02
10S	5.03
11S	4.52
12S	5.68

注：样品 4S、12S 精密量取 0.5 mL，其他批次样品均精密量取 1 mL。

情况，最终选择乙腈-（0.1% 磷酸-0.1% 三乙胺）；比较了 Thermo Accucore C₁₈（150 mm×4.6 mm，2.6 μm）、依利特 Hypersil ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Agilent StableBond Analytical（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Pntulips BP-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱的分离情况，发现以 Pntulips BP-C₁₈ 色谱柱检测时木兰花碱色谱峰峰形、分离度良好；再比较了不同柱温、进样量对色谱峰峰形、分离度的影响。最终，确定为“2.2.3”项下色谱条件。

然后，比较了 30%、50%、75%、90% 甲醇作为提取溶剂时木兰花碱的提取率，最终选择 75% 甲醇；比较了超声、回流提取时的提取率，发现两者无明显差异，最终选择操作简便的前者；再比较了提取时间、料液比对木兰花碱提取率的影响。最终，确定为“2.2.2”项下提取方法。

3.2 总生物碱含有量测定中提取方法、显色条件筛选 本实验比较了 75% 盐酸甲醇、75% 甲醇作为提取溶剂时总生物碱的提取率，发现两者无明显差

异，最终选择制备方便的后者；比较了不同 pH 值（3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0）及用量（8、10、12、14、16 mL）缓冲液下络合物的吸光度，发现 pH 值 4.5、用量 12 mL 时最大。总生物碱能否反应与酸性染料用量的关系密切，故本实验又比较了不同用量（1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL）酸性染料下络合物的吸光度，发现用量 2 mL 时最大。

最后，比较了二氯甲烷、三氯甲烷作为萃取溶剂时对总生物碱的萃取效果，发现两者无明显差异，最终选择毒性较小的前者。同时，比较了不同用量（8、10、12、15、20、25 mL）二氯甲烷下络合物的吸光度，发现用量 15 mL 时最大，并且用量越低，越难以达到分配平衡，结果越不稳定，只有当其达到一定数值后继续升高，才易于达到分配平衡，萃取结果也更稳定。前期发现，萃取 1、2 次时的效果无明显差异，故选择 1 次。另外，在萃取过程中需不断振荡分液漏斗以保证水层与二氯甲烷层充分接触，从而达到充分萃取的目的，并且振荡后要给予足够时间使其分层，才可达到分配平衡。

4 结 论

本实验首次建立了人字果中木兰花碱、总生物碱含有量的测定方法，其重复性好，稳定可靠，同时测定其中水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物含量，可为该药材质量标准的制定及资源的开发利用提供依据。

参考文献：

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草（第七卷）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：1832.

[2] 何顺志. 贵州毛茛科植物种类与分布补遗（I）[J]. 贵州科学，1995，13(1)：29-34.

[3] 王思琦. 江西老虎脑自然保护区种子植物区系研究[D]. 南昌：江西农业大学，2018.

[4] 陈琳，余泽平，聂堂杰，等. 江西官山 8 种珍贵野生植物资源及保护策略[J]. 中国野生植物资源，2018，37(6)：63-67.

[5] 覃营. 广西德保县药用植物资源调查与评估[D]. 南宁：广西师范大学，2019.

[6] 何顺志. 贵州 41 种毛茛科药用植物种类与分布[J]. 中药材，1995，18(6)：280-283.

[7] 肖培根，王文采. 毛茛科一新属——人字果属[J]. 植物分类学报，1964，9(4)：315-334.

[8] 傅德志. 人字果属的研究兼讨论唐松草亚科的分类问题[D]. 北京：中国科学院植物研究所，1985.

[9] 金艳蕾. 分子标记技术在头花蓼种质资源评价、人字果系统分类研究中的应用[D]. 贵阳：贵阳中医学院，2012.

[10] 吴敏，何顺志，封晔，等. 人字果属及近缘属植物化学成分及药理研究进展[J]. 药物与人，2014，27(4)：21；24.

[11] 王文采，刘冰. 裂瓣人字果，云南毛茛科一新种（英文）[J]. 植物分类与资源学报，2015，37(3)：275-277.

[12] Tao D D. A new species of *Dichocarpum* from Yunnan, China [J]. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*，1989，40（5）：179-180.

[13] 李云超. 中国人字果属 *Dichocarpum* 药用植物的分类学研究[D]. 贵阳：贵阳中医学院，2010.

[14] Chen J H, Zhao H Q, Wang X R, *et al.* Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes [J]. *Electrophoresis*，2008，29(10)：2135-2147.

[15] Avula B, Wang Y H, Rumalla C S, *et al.* Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx using UPLC, HPLC and HPTLC[J]. *J Pharm Biomed Anal*，2011，56(5)：895-903.

[16] Sim H J, Kim J H, Lee K R, *et al.* Simultaneous determination of structurally diverse compounds in different *Fangchi* species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS[J]. *Molecules*，2013，18(5)：5235-5250.

[17] 沈国平，龙启福. 木兰花碱对 HERG 钾通道蛋白表达的影响[J]. 山东医药，2011，51(31)：36-37.

[18] Kim J, Ha Quang Bao T, Shin Y K, *et al.* Antifungal activity of magnoflorine against *Candida* strains [J]. *World J Microbiol Biotechnol*，2018，34(11)：167.

[19] Cai Z, Feng Y, Li C T, *et al.* Magnoflorine with hyaluronic acid gel promotes subchondral bone regeneration and attenuates cartilage degeneration in early osteoarthritis[J]. *Bone*，2018，116：266-278.

[20] 曹冰雁，刘艺洁，武莉莉，等. 木兰花碱减轻慢性应激小鼠抑郁样行为及对脑部 LSD1 组蛋白修饰的影响[J]. 天津医药，2019，47(4)：391-394；450.