

委陵菜 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究

段秀俊, 王 科, 刘 培, 王鹏飞, 张莉丹, 郭宇航, 王伊楠

山西中医药大学, 山西 晋中 030619

摘 要: 目的 建立委陵菜的指纹图谱及多指标含量测定方法, 为委陵菜的质量标准提升提供实验依据。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 260 nm; 建立 10 批委陵菜的指纹图谱, 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004 版) 进行评价, 聚类分析将 10 批药材分为 2 类; 建立同时测定委陵菜药材中没食子酸、槲皮素及山柰酚 3 种成分的含量测定方法。结果 建立了委陵菜的 HPLC 指纹图谱, 共标定了 12 个共有峰; 没食子酸、槲皮素和山柰酚线性关系良好, 相关系数 (r) 均大于 0.999。精密度、稳定性、重复性的 RSD 均小于 3%, 平均回收率分别为 97.44%、97.64%、99.19%。结论 建立的委陵菜的指纹图谱及多指标含量测定方法专属性强、重复性好, 能有效地控制委陵菜的内在质量, 为提高委陵菜的质量评价方法提供参考。

关键词: 委陵菜; 指纹图谱; 没食子酸; 槲皮素; 山柰酚

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)20-5054-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.030

HPLC fingerprint and multicomponents determination of *Potentilla chinensis*

DUAN Xiu-jun, WANG Ke, LIU Pei, WANG Peng-fei, ZHANG Li-dan, GUO Yu-hang, WANG Yi-nan

Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and multicomponents determination of *Potentillae Chinensis Herba*, and provide a scientific basis for the improvement of its quality standards. **Methods** The separation was performed on a chromatographic Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase for gradient elution. Volume flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was 25 °C. Injection was 10 μL and the detection wavelength was 260 nm. The fingerprints of 10 batches of *Potentillae Chinensis Herba* were established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM (version 2004A), which were divided into two categories by clustering analysis. Meanwhile, the content of gallic acid, quercetin, and kaempferol was determined. **Results** The fingerprint of *Potentillae Chinensis Herba* was established. There were 12 common peaks in the fingerprint. Gallic acid, quercetin, and kaempferol were separated with good linearity relationships ($r > 0.999$). The average recovery rates of the investigated compounds were 97.44%, 97.64%, and 99.19%, respectively. **Conclusion** The established fingerprint and multicomponents determination method of *Potentillae Chinensis Herba* have strong specificity and good repeatability, which can effectively control the internal quality of *Potentillae Chinensis Herba* and provide reference for improving the quality evaluation method of *Potentillae Chinensis Herba*.

Key words: *Potentillae Chinensis Herba*; fingerprint; gallic acid; quercetin; kaempferol

委陵菜 *Potentillae Chinensis Herba* 为蔷薇科多年生草本植物委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser. 的干燥全草^[1], 始载于明·朱橚之《救荒本草》, 民间嫩苗可食用亦可做猪饲料用, 其苦, 寒, 归肝、大肠经, 具有清热解毒、凉血止痢功效, 主要用于赤痢腹痛、久痢不止、痔疮出血、痈肿疮毒^[2]。

委陵菜属植物全世界有 500 多种, 我国有 86

种^[2], 而列入《中国药典》2015 年版的只有委陵菜属的委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser.。委陵菜全国各地均有分布, 且应用广泛, 根所含鞣质可提制栲胶, 全草可入药, 现代药理研究表明, 委陵菜属植物具有抗糖尿病、抗菌、抗病毒、抗氧化、镇痛、保肝等药理活性^[3-8], 建立委陵菜合理的质量控制方法, 对于委陵菜的采收加工、市场监控、临床应用等具

收稿日期: 2019-04-06

作者简介: 段秀俊, 女, 副教授, 主要从事中药制剂与质量分析。Tel: 18634319730 E-mail: dxjzhyxy@163.com

有积极意义。

现代研究表明委陵菜属植物主要含有黄酮类、萜类及鞣质类成分,如槲皮素、山柰酚、鼠李素、异鼠李素、杨梅素、5,7,4'-三甲基黄酮醇,刺蒺藜苷等黄酮类成分,单萜、倍半萜及三萜等萜类成分,此外尚含有由儿茶素及其衍生物缩合而成的缩合鞣质,由酚酸及其衍生物形成的可水解鞣质^[3,9-10]。《中国药典》2015 年版委陵菜的含量测定指标只有酚酸类的没食子酸^[1],文献还报道了同时测定委陵菜中多种黄酮类成分的含量测定方法^[7,11-12],以及委陵菜中黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱^[7,13],尚未见同时测定委陵菜中 2 类成分的含量测定方法及指纹图谱研究报道。本实验建立了同时测定委陵菜中黄酮类及酚酸类 2 类成分的 HPLC 方法及指纹图谱,为提高委陵菜的质量标准及其市场质量监控提供实验依据。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 检测器, Empower 色谱工作站(美国沃特世公司); AB135-S 电子天平(十万分之一,瑞士 METTLER 公司); HANGPING FA2104 型万分之一天平(上海精科有限公司); SB-5200 DTDN 超声波清洗器(宁波新艺生物科技股份有限公司)。

对照品没食子酸(批号 110732-201611)、山柰酚(批号 100504)购自中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%;槲皮素(批号 171230)购自上海融禾医药科技有限公司;所以对照品质量分数均大于 98%。甲醇(批号 20161216)购自天津市进丰化工有限公司,磷酸(分析纯,批号 20180108)、乙腈(色谱纯,批号 20140515)购自天津天力化学试剂有限公司;盐酸(批号 20151012)购自天津市津南区盐水沽工业园区。10 批委陵菜药材购自河北智嘉药业有限公司,产地与批号见表 1,经山西中医药大学裴香萍副教授鉴定为蔷薇科多年生草本植物委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser. 的干燥全草,符合《中国药典》2015 年版一部的有关规定。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 混合对照品溶液制备 取没食子酸、槲皮素、山柰酚 3 种对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成含没食子酸 1.02 mg/mL、槲皮素 0.996 mg/mL、山柰酚 1.21 mg/mL 的对照品母液。各吸取上述 3 种对照品母液适量,加甲醇稀释 10 倍,分别制成

表 1 委陵菜药材产地与批号

Table 1 Habitats and batch numbers of *Potentilla chinensis* Herba

编号	批号	产地
S1	20181101	河南平顶山
S2	20180203	河南许昌
S3	20180312	山东聊城
S4	20190106	河南开封
S5	20190217	河南安阳
S6	20180324	安徽亳州
S7	20180404	河南南阳
S8	20180502	河南新乡
S9	20180207	山东临沂
S10	20180306	安徽阜阳

含没食子酸 0.102 mg/mL、槲皮素 0.099 6 mg/mL、山柰酚 0.121 mg/mL 的对照品溶液。分别精密量取以上 3 种对照品溶液 1.0、5.0、4.0 mL,置于 10 mL 量瓶中制成含没食子酸 10.2 μg/mL、槲皮素 49.8 μg/mL、山柰酚 48.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取委陵菜药材粉末(过 50 目筛)约 1.0 g,精密称定,精密加入甲醇-15%盐酸(3:2)混合溶液 50 mL,称定质量,加热回流 4 h,放冷,再称定质量,用甲醇-15%盐酸(3:2)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,置水浴上蒸干,残渣加 30 mL 蒸馏水使溶解,移入分液漏斗中,加水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱:0~15 min, 2% A; 15~17 min, 2%~10% A; 17~35 min, 10%~15% A; 35~45 min, 15%~20% A; 45~65 min, 20%~22% A; 65~70 min, 22%~25% A; 70~90 min, 25%~35% A; 90~95 min, 35%~20% A; 95~100 min, 20%~2% A; 100~110 min, 2% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 260 nm; 理论塔板数按没食子酸峰计算不低于 5 000, 共有峰共有 12 个(图 1)。

2.1.4 精密度试验 取批号为 20181101 委陵菜药材粉末(S1),按照“2.1.2”项下方法制备供试品

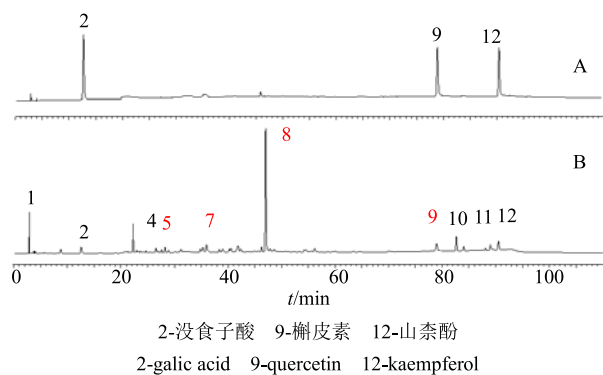


图 1 混合对照品 (A) 及委陵菜供试品 (B) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and *Potentillae Chinensis Herba* (B)

溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件测定,连续进样6次,记录指纹图谱,以8号峰的保留时间和色谱峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于3%。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.2”项下同一供试品溶液(S1),按照“2.1.3”项下色谱条件,分别在0、2、4、6、8、12、16、24 h测定,记录指纹图谱,以8号峰的保留时间和色谱峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于3%。

2.1.6 重复性试验 取同一委陵菜(S1)药材粉末6份,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件测定,记录指纹图谱,以8号峰的保留时间和色谱峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于3%。

2.1.7 指纹图谱的建立及相似度评价 取10批委陵菜药材,分别按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件测定,得到10批委陵菜指纹图谱(图2),将得到的数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A版进行分析,以S1为参照指纹图谱,采用多点校正后进行自动匹配,生成对照指纹图谱(图3),并对色谱峰进行指认。将10批委陵菜供试品色谱图与对照指纹图谱匹配,进行相似度评价,S1~10相似度分别为0.976、0.989、0.999、0.954、0.996、0.993、0.967、0.973、0.968、0.969。

2.1.8 聚类分析 在“2.1.3”项条件下,以S1作为参照图谱自动匹配,运用SPSS 21.0数据统计分

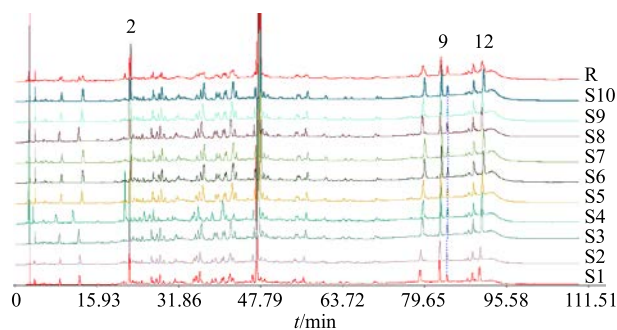


图 2 10 批委陵菜 HPLC 指纹图谱

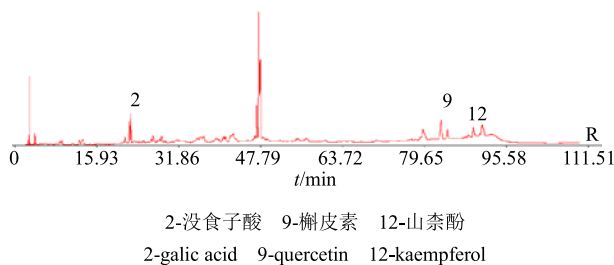
Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of *Potentillae Chinensis Herba*

图 3 委陵菜对照指纹图谱

Fig. 3 Comparison fingerprint of *Potentillae Chinensis Herba*

析软件对其进行系统聚类分析,选用组间连接法,Euclidean 距离为测度进行聚类,聚类结果见图4。结果显示,10批委陵菜药材分为2类,其中产自安徽的2批药材(S6、S10)聚为1类,其余产自河南、山东的8批(S1~S5、S7~S9)聚为1类。

2.2 多指标成分测定

2.2.1 混合对照品溶液制备 同“2.1.1”项下对照

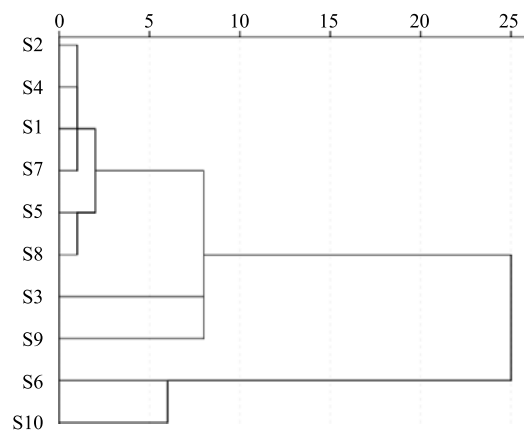


图 4 10 批委陵菜聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis result of 10 batches of *Potentillae Chinensis Herba*

品溶液的制备方法。

2.2.2 供试品溶液的制备 取委陵菜药材粉末(过 50 目筛)约 1.0 g,精密称定,精密加入甲醇-15%盐酸(3:2)混合溶液 50 mL,称定质量,回流提取 4 h,放冷,称定质量,用甲醇-15%盐酸(3:2)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0~15 min, 2% A; 15~20 min, 2%~20% A; 20~25 min, 20%~22% A; 25~30 min, 22%~25% A; 30~65 min, 25%~35% A; 65~70 min, 35%~20% A; 70~75 min, 20%~2% A; 75~85 min, 2% A);体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;进样量 10 μL;检测波长 260 nm;结果各成分色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5,理论塔板数按没食子酸计算不低于 5 000。对照品与供试品色谱图见图 5。

2.2.4 线性关系考察 同“2.2.1”项下方法配制含没食子酸 20.4 μg/mL,槲皮素 99.6 μg/mL,山柰酚 96.8 μg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照

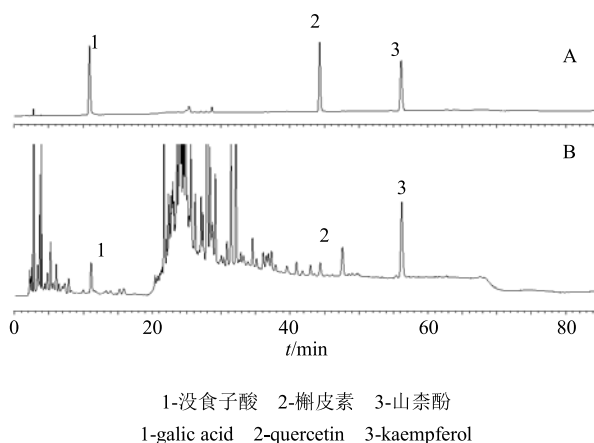


图 5 混合对照品 (A) 及委陵菜供试品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 5 HPLC of reference substance (A) and *Potentilla chinensis Herba* (B)

品溶液 0.20、0.40、0.80、1.00、1.60、2.00 mL 于 2 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,制成 6 个不同质量浓度的对照品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进行测定。并记录色谱峰面积。以色谱峰峰面积为纵坐标(Y),对照品进样质量为横坐标(X),绘制标准曲线,并进行线性回归,得标准曲线方程。3 个成分的线性回归方程见表 2。

表 2 3 种成分标准曲线

Table 2 Calibration curves of three constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
没食子酸	$Y=5\,935\,912\,X+4\,733$	$r=0.999\,6$	0.020 4~0.204
槲皮素	$Y=1\,534\,901\,X-776$	$r=0.999\,6$	0.099 6~0.996
山柰酚	$Y=1\,174\,136\,X-2\,863$	$r=0.999\,6$	0.096 8~0.968

2.2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进行测定,连续进样 6 次,记录峰面积值。计算没食子酸、槲皮素和山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.21%、0.74%、1.81%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一批次委陵菜药材粉末(S1),按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下的色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定,记录峰面积。计算没食子酸、槲皮素和山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.53%、1.12%、0.65%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批次委陵菜药材(S1)粉末 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。计

算没食子酸、槲皮素和山柰酚质量分数的 RSD 值分别为 1.93%、2.61%、0.77%。

2.2.8 加样回收率试验 取已测得 3 种成分含量的委陵菜药材(S1)粉末 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别按已测定的 100%加入没食子酸、槲皮素及山柰酚对照品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。计算没食子酸、槲皮素和山柰酚平均加样回收率分别为 97.44%、97.64%、99.19%,RSD 值分别为 2.11%、1.41%、2.27%。

2.2.9 样品测定 分别取 10 批委陵菜药材粉末,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件测定,计算样品中没食子酸、槲皮素和山柰酚 3 个成分的量,结果见表 3。各指标成分含量累积加合图见图 6。

表 3 10 批委陵菜含量测定结果

Table 3 Determination results of 10 batches of *Potentilla chinensis* Herba

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	没食子酸	槲皮素	山柰酚
S1	0.619	0.125	1.388
S2	0.630	0.132	1.382
S3	0.637	0.137	1.398
S4	0.670	0.120	1.378
S5	0.592	0.131	1.376
S6	0.601	0.128	1.381
S7	0.551	0.122	1.368
S8	0.579	0.126	1.409
S9	0.656	0.130	1.381
S10	0.593	0.136	1.407

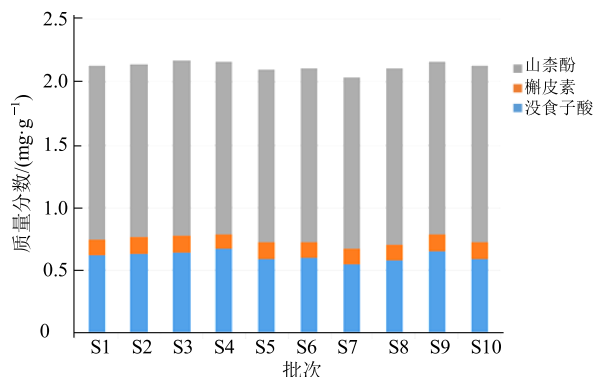


图 6 10 批委陵菜药材指标成分累积加和图

Fig. 6 Sum graph of content of 10 batches of *Potentilla chinensis* Herba

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察

《中国药典》2015 年版委陵菜供试品溶液的制备针对的是酚酸类成分没食子酸, 采取的是稀盐酸溶液提取, 未涉及黄酮类成分槲皮素和山柰酚。实验在参考文献数据^[14]的基础上, 考察了稀盐酸溶液、不同比例的酸性甲醇溶液对各成分提取效果的影响, 实验结果表明甲醇-15%盐酸 (3:2) 加热回流提取效果最好, 故实验选择甲醇-15%盐酸 (3:2) 混合溶剂作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择

没食子酸、槲皮素和山柰酚的紫外光谱图显示, 3 个成分的最大吸收波长介于 260~270 nm, 经考察不同波长下提取的供试品溶液色谱图, 结果

显示供试品色谱图在 260 nm 波长处出峰较多, 各峰分离良好, 尤其是 3 个指标性成分的峰形良好, 故实验选择 260 nm 为检测波长。

3.3 流动相的选择

本实验曾采用甲醇-水作为流动相, 结果发现没食子酸、槲皮素、山柰酚峰形欠佳, 拖尾现象严重, 且分离效果不好。经摸索实验选择了乙腈-0.1%磷酸水系统作为流动相, 在指定色谱条件下, 3 个指定成分出峰稳定, 峰形良好, 其他峰干扰小。

3.4 实验测定结果情况

本实验选定的多指标含量测定方法测得的委陵菜药材 (S1) 中没食子酸质量分数为 0.619 mg/g, 检测波长是 260 nm; 采用《中国药典》2015 年版委陵菜项下含量测定方法测得的同一批委陵菜药材 (S1) 中没食子酸的质量分数为 0.625 mg/g, 检测波长是 272 nm。实验选定方法的测定结果稍低于药典方法, 可能与检测波长有关, 药典选择的是最大吸收波长, 本实验为了兼顾其他 2 个成分, 选择的检测波长稍偏离了最大吸收波长, 但 2 种方法的测定结果没有显著差异。从没食子酸的测定结果看, 实验选定的方法可行性良好, 能保证委陵菜的质量控制。

3.5 质量标志物选择依据

委陵菜为清热解毒、凉血止痢之品^[1]。文献报道没食子酸具有抗炎、抗菌、抗病毒等多种生物活性^[15-16], 槲皮素对金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌和粪肠球菌具有良好的抑制作用, 并具有保护肠黏膜作用^[17-18], 山柰酚可抑制金黄色葡萄球菌及伤寒、痢疾杆菌等^[19], 故实验选择这 3 种与委陵菜功效密切相关的有效成分作为质量标志物科学而合理, 符合中医药理论, 能很好地表征委陵菜的质量及疗效。

实验建立了委陵菜药材的指纹图谱及多指标含量测定方法, 且多指标含量测定涉及到了酚酸类及黄酮类两类成分, 实验整体体现了中药具有整体性、特征性及模糊性的特点, 实验结果对于更为全面的控制委陵菜药材的质量, 提升委陵菜药材质量标准具有积极意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第 4 册第 10 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 李鹏业, 曾 阳, 马祥忠, 等. 委陵菜属植物的化学成分

- 分及药理作用研究进展 [J]. 青海师范大学学报, 2012, 29(3): 61-64.
- [4] 乔卫, 赵川, 卢滨, 等. 委陵菜黄酮对正常小鼠及四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖与血脂的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 611-614.
- [5] 陆璐, 李素君, 刘宗林, 等. 委陵菜降血糖成分的机理研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(6): 387-391.
- [6] 周媛, 李荣, 姜子涛. 食用委陵菜黄酮的抗氧化性及清除自由基能力研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 102-105.
- [7] 孙晓阳. 委陵菜抗菌活性及其质量评价 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2016.
- [8] 张晶, 刘洋, 李灵芝. 委陵菜酸药理活性研究现状 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2016, 25(1): 68-71.
- [9] 高雯. 委陵菜的化学成分研究 [D]. 大连: 沈阳药科大学, 2007.
- [10] 刘普, 段宏泉, 潘勤, 等. 委陵菜三萜成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1875-1879.
- [11] 丁立新, 孙晓阳, 慎爱民, 等. HPLC 法同时测定委陵菜中 5 个黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1214-1218.
- [12] 钱斐, 徐加兵, 邱硕. HPLC 法同时测定仙鹤草及委陵菜提取物中 4 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药师, 2019, 22(4): 674-677.
- [13] 孙晓阳, 刘玉凯, 缪月英, 等. 委陵菜中黄酮类成分 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 广东化工, 2015, 42(18): 13-14.
- [14] 余乐, 刘敏, 李水福. HPLC 法同时测定畚药櫟木叶中没食子酸和槲皮素 [J]. 中国药师, 2014, 17(7): 1239-1241.
- [15] 郑雪花, 杨君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98.
- [16] 高雅, 李骅, 王四旺, 等. 没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(04): 435-438.
- [17] 骆明旭, 罗丹, 赵万红. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(17): 12-14.
- [18] 俞一心, 戈升荣, 王桂珍. 槲皮素及其衍生物的药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(12): 902-904.
- [19] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅, 等. 山萘酚药理作用的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 61-62.