

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0062-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.014



五匹风高效液相色谱指纹图谱及多指标成分定量分析*

陈冰¹, 孙绪², 金倩倩³, 张宝¹, 李勇军³, 李悦^{1△}

(1. 贵州省贵阳市妇幼保健院·贵州省贵阳市儿童医院, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学药学院·贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 建立五匹风药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及相关指标成分含量测定方法。方法 色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为327 nm, 柱温为30℃, 进样量为20 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年A版)建立15批药材样品的HPLC指纹图谱, 并进行相似度评价。采用HPLC法测定5个指标成分的含量。结果 15批药材样品的HPLC指纹图谱共标定6个共有峰, 指认了其中5个, 分别为3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸, 相似度介于0.886~0.996。上述5个成分质量浓度分别在22.37~223.72 μg/mL($r=0.9993$)、6.81~68.08 μg/mL($r=0.9992$)、5.23~52.34 μg/mL($r=0.9993$)、4.05~40.46 μg/mL($r=0.9995$)、17.17~171.74 μg/mL($r=0.9993$)范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.0%; 平均加样回收率分别为102.03%, 104.09%, 95.14%, 97.13%, 98.63%, RSD分别为2.77%, 2.11%, 1.24%, 2.64%, 2.31%($n=6$)。15批药材样品中5个成分的含量分别为0.162%~0.879%、0.011%~0.253%、0.019%~0.047%、0.019%~0.209%、0.037%~0.107%。结论 所建立的方法简便、稳定, 结果准确、可靠, 可为五匹风药材的质量控制提供参考。

关键词: 五匹风; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 含量测定; 质量控制

HPLC Fingerprint of *Potentilla Kleiniana* and Quantitative Analysis of Its Multi-Target Components

CHEN Bing¹, SUN Xu², JIN Qianqian³, ZHANG Bao¹, LI Yongjun³, LI Yue¹

(1. Guiyang Maternal and Child Healthcare Hospital · Guiyang Children's Hospital, Guiyang, Guizhou, China 550003; 2. Guizhou Provincial Institute for Food and Drug Control, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University · Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of *Potentilla kleiniana* and a method for determining the content of its target components. **Methods** The chromatographic column was Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. The HPLC fingerprint of 15 batches of medicinal samples was established by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012 A), and the similarity evaluation was conducted. The content of five target components was determined by the HPLC method. **Results** Six common peaks were marked in

*基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题[QZYY-2021-176]; 贵州省贵阳市卫生健康局科学技术计划项目[[2022]筑卫健科技合同字第010号]。

第一作者: 陈冰, 女, 在读硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药药理学、中药药效物质基础及质量控制, (电子信箱) 270938048@qq.com。

△通信作者: 李悦, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为临床药学、中药药效物质基础及质量控制, (电子信箱) liyue_0407@163.com。

- 2021, 37(9): 1213-1218.
- [20] BURDGE G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004, 7(2): 137-144.
- [21] 常松林, 高晓余, 柳双凤, 等. α-亚麻酸对高脂饮食和链脲佐菌素诱导Ⅱ型糖尿病模型小鼠的降血糖作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 86-94.
- [22] 张文超. 紫苏油α-亚麻酸的分离纯化及其活性研究[D]. 太原: 中北大学, 2021.
- [23] FAN H, HUANG W, GUO Y, et al. α-Linolenic Acid Suppresses Proliferation and Invasion in Osteosarcoma Cells via Inhibiting Fatty Acid Synthase[J]. Molecules, 2022, 27(9): 2741.
- [24] JUNG JY, KWON HH, HONG JS, et al. Effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acid and gamma-linolenic acid on acne vulgaris: a randomised, double-blind, controlled trial[J]. Acta Derm Venereol, 2014, 94(5): 521-525.
- [25] SINCLAIR AJ, GUO XF, ABEDIN L. Dietary Alpha-Linolenic Acid Supports High Retinal DHA Levels[J]. Nutrients, 2022, 14(2): 301.

(收稿日期: 2023-03-03; 修回日期: 2023-06-28)

the HPLC fingerprint of 15 batches of medicinal samples, of which five were identified as 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- β -D-glucopyranoside, kaempferol-3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside, 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- β -D-xylopyranoside, 3,3'-di-O-methylellagic acid and 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid, with a similarity in the range of 0.886 - 0.996. The linear ranges of the above components were 22.37 - 223.72 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r = 0.999\ 3$), 6.81 - 68.08 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r = 0.999\ 2$), 5.23 - 52.34 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r = 0.999\ 3$), 4.05 - 40.46 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r = 0.999\ 5$), 17.17 - 171.74 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r = 0.999\ 3$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rates were 102.03%, 104.09%, 95.14%, 97.13%, 98.63%, with RSDs of 2.77%, 2.11%, 1.24%, 2.64%, 2.31% respectively ($n = 6$). The content of five components in 15 batches of medicinal samples was in the range of 0.162% to 0.879%, 0.011% to 0.253%, 0.019% to 0.047%, 0.019% to 0.209%, 0.037% to 0.107%. **Conclusion** The established method is simple, stable, accurate and reliable, which can provide a reference for the quality control of *Potentilla kleiniana*.

Key words: *Potentilla kleiniana*; HPLC; fingerprint; content determination; quality control

五匹风为蔷薇科委陵菜属植物蛇含委陵菜 *Potentilla kleiniana* Wight. et Arn 的新鲜或干燥全草, 别名蛇含、五爪龙、五匹风、五皮草, 主要分布于我国贵州、湖南、江西、辽宁、黑龙江等地^[1-2]。五匹风在贵州蕴藏丰富, 因其具有良好的清热解毒、祛风止咳等功效, 贵州少数民族地区常用其治疗咳嗽、乳腺炎、风湿关节炎等疾病^[3-5], 现收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 版)^[1]。五匹风具有抗炎、抗氧化、抗菌、降血糖功效, 其药理作用与其含有的大量鞣质、黄酮、萜类成分有关^[6-11]。目前, 关于五匹风药材分离鉴定化合物的研究报道较少, 其成分主要包括黄酮类、鞣质类、酚类、萜类等^[12-16]。国内外对其质量控制的研究报道亦较少, 现行质量标准仅以五匹风药材的性状及显微鉴别作为质量控制指标, 质量控制项目单一, 不能有效、全面地控制药材的质量。因此, 本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法建立贵州不同产地和批次五匹风药材的指纹图谱, 并对 5 种指标成分进行含量测定, 以期提升五匹风药材的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); AE240 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸对照品(贵阳市儿童医院药学部实验室自制, 含量分别为 98.82%, 99.42%, 97.66%, 98.40%, 99.42%); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。五匹风药材(样品信息见表 1), 经贵州医科大学刘春花副教授鉴定为正品。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20210416	贵阳花溪	S9	20220723-1	贵州安顺
S2	20210426	贵阳花溪	S10	20220723-2	贵州安顺
S3	20210505	贵阳清镇	S11	20220725-1	贵州遵义
S4	20210518	贵阳清镇	S12	20220725-2	贵州铜仁
S5	20210525	贵安大学城	S13	20220725-3	贵州毕节
S6	20220527	贵安大学城	S14	20220728	贵州凯里
S7	20220528	贵州毕节	S15	20220808	贵州兴义
S8	20220608	贵州安顺			

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立及分析

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.5% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min 时 10%A→18%A, 12~30 min 时 18%A→40%A, 30~35 min 时 40%A→30%A, 35~50 min 时 30%A→90%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 327 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.1.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别称取 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸对照品各适量, 精密称定, 用甲醇溶解制成质量浓度分别为 118.605, 851.035, 654.300, 505.759, 1073.380 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的单一对照品贮备液; 分别精密量取 2.0, 0.8, 0.8, 1.6 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得质量浓度分别为 223.72, 68.08, 52.34, 40.46, 171.74 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取药材样品粉末(过 3 号筛)1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 60% 乙醇 25 mL, 称定质量, 超声(功率 400 W, 频率 40 kHz)处理 60 min, 放冷至室温, 再次称定质量, 用 60% 乙醇补足减失

的质量,摇匀,静置,取上层液置离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得。

2.1.3 方法学考察

精密度试验:取供试品溶液(编号 S3)适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。以 3 号峰(山柰酚-3,7-二-O- α -L-吡喃鼠李糖苷)为参照峰(下同)计算,结果 6 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(编号 S3)适量,在室温下分别于 0,2,4,8,24,48 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 6 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 48 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号 S3)适量,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 6 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%($n=6$),表明方法重复性良好。

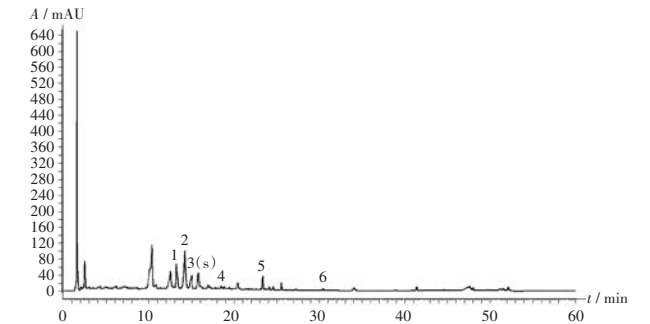
2.1.4 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

取 15 批药材样品适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,得 15 批药材样品的 HPLC 叠加指纹图谱(见图 1),将图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年 A 版)进行分析,利用中位数法进行多点校正后自动匹配生成对照指纹图谱(见图 2)。将 15 批药材样品色谱图与对照指纹图谱匹配,并进行相似度评价,结果见表 2。

2.2 含量测定

2.2.1 方法学考察

系统适用性试验:取 2.1.2 项下混合对照品溶液和供试品溶液各适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,



2.3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷
3.山柰酚-3,7-二-O- α -L-吡喃鼠李糖苷
4.3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O- β -D-吡喃木糖苷
5.3,3'-二甲氧基鞣花酸 6.3,3',4'-三甲氧基鞣花酸

图 2 五匹风药材样品高效液相色谱对照指纹图谱

2.3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- β -D-glucopyranoside
3.Kaempferol-3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside
4.3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O- β -D-xylopyranoside
5.3,3'-di-O-methylellagic acid 6.3,3',4'-tri-O-methylellagic acid

Fig. 2 Reference HPLC fingerprints of *Potentilla kleiniana*

表 2 15 批五匹风药材样品相似度评价结果

Tab. 2 Results of similarity evaluation of 15 batches of *Potentilla kleiniana*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.974	S6	0.961	S11	0.940
S2	0.915	S7	0.909	S12	0.943
S3	0.895	S8	0.924	S13	0.990
S4	0.938	S9	0.905	S14	0.975
S5	0.886	S10	0.918	S15	0.996

记录色谱图。供试品溶液色谱图中,在与混合对照品溶液色谱图相同保留时间处有相应色谱峰,分离度均大于 1.5,理论板数以待测成分峰计均高于 27 000,表明方法适用性良好。详见图 3。

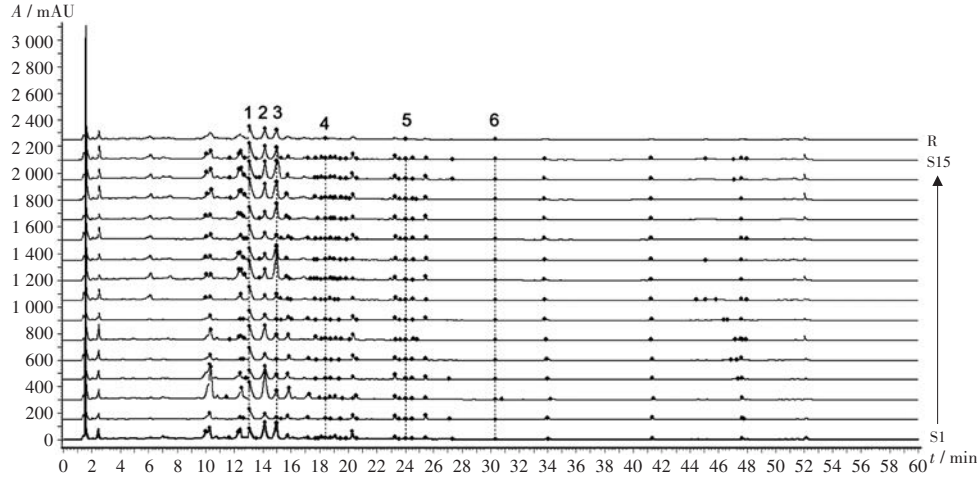
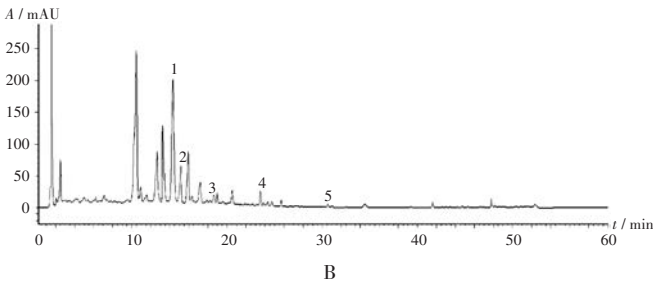
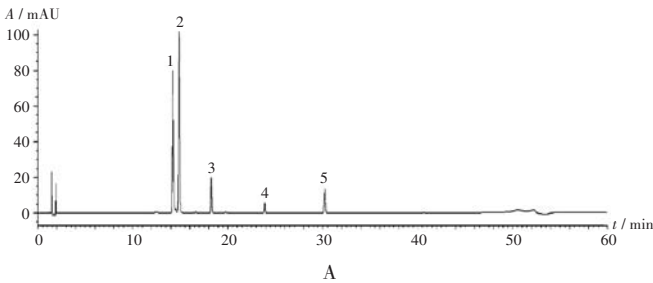


图 1 15 批五匹风药材样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 Superimposed HPLC fingerprints of 15 batches of *Potentilla kleiniana*



1. 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 2. 山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷
3. 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷 4. 3,3'-二甲氧基鞣花酸 5. 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图3 高效液相色谱图

1. 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O-β-D-glucopyranoside 2. Kaempferol-3,7-di-O-α-L-rhamnopyranoside
3. 3,3'-di-O-methylellagic acid-4'-O-β-D-xylopyranoside 4. 3,3'-di-O-methylellagic acid 5. 3,3',4'-tri-O-methylellagic acid
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

线性关系考察:精密量取 2.1.2 项下混合对照品溶液适量,逐级稀释,制备成系列混合对照品溶液,分别按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果表明,5 种待测成分在各自的线性范围内与峰面积线性关系良好。结果见表 3。

检测限与定量限:精密量取 2.1.2 项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比(S/N)为 10 和 3 时对应待测成分的质量浓度分别为定量限和检测限。结果见表 3。

精密度试验:取供试品溶液(编号 S3)适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结

果 5 种成分的 RSD 均小于 3.0% ($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(编号 S3)适量,分别于室温下在 0, 2, 4, 8, 24, 48 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 5 种成分峰面积的 RSD 均小于 3.0% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 48 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号 S3)适量,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 5 种成分峰面积的 RSD 均小于 3.0% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批样品(编号 S3)粉末约 0.5 g,共 6 份,精密称定,按要求分别加入已知含量的 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸的对照品 111.860, 34.041, 26.041, 26.172, 20.230, 85.870 μg ,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 4。

2.2.2 样品含量测定

取 15 批药材样品粉末各适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中 5 种待测成分的含量。结果见表 5。可见,15 批样品中,3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸的含量范围分别为 0.162%~0.879%、0.011%~0.253%、0.019%~0.047%、0.019%~0.209%、0.037%~0.107%,平均含量分别为 0.366%、0.100%、0.032%、0.049%、0.065%。

3 讨论

3.1 提取方法选择

预试验中分别考察了不同提取溶剂(30% 甲醇、60% 甲醇、甲醇、30% 乙醇、60% 乙醇、乙醇、水),提取时间(15, 30, 60 min),提取方式(超声法、回流法)对样品

表3 线性关系及定量限、检测限考察结果($n=6$)

Tab. 3 Results of the linear relation test, limit of quantification and limit of detection ($n=6$)

待测成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限(ng)	检测限(ng)
3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	$Y_1 = 8179.2X_1 - 21750$	0.9993	22.37~223.72	34.00	10.20
山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷	$Y_2 = 28263X_2 - 24453$	0.9992	6.81~68.08	7.67	2.30
3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷	$Y_3 = 6441.1X_3 - 4240.1$	0.9993	5.23~52.34	17.44	5.23
3,3'-二甲氧基鞣花酸	$Y_4 = 2930X_4 - 1778.4$	0.9995	4.05~40.46	40.50	12.15
3,3',4'-三甲氧基鞣花酸	$Y_5 = 1952.6X_5 - 3998.6$	0.9993	17.17~171.74	51.50	15.45

表 4 加样回收试验结果 (n = 6)
Tab. 4 Results of the recovery test (n = 6)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
3,3'-二甲氧基 鞣花酸-4'- O-β-D-吡 喃葡萄糖苷	0.496 5 0.499 1 0.498 8 0.501 2 0.504 9 0.502 5	4 364.235 4 387.089 4 384.452 4 405.548 4 438.071 4 416.975	111.860 111.860 111.860 111.860 111.860 111.860	4 475.144 4 502.338 4 502.229 4 520.138 4 547.817 4 533.455	99.15 103.03 105.29 102.44 98.11 104.13	102.03	2.77
山柰酚-3,7-二- O-α-L-吡 喃鼠李糖苷	0.496 5 0.499 1 0.498 8 0.501 2 0.504 9 0.502 5	451.815 454.181 453.908 456.092 459.459 457.275	34.041 34.041 34.041 34.041 34.041 34.041	488.358 490.074 489.590 491.280 494.157 491.878	107.35 105.44 104.82 103.37 101.93 101.65	104.09	2.11
3,3'-二甲氧基 鞣花酸-4'- O-β-D-吡 喃木糖苷	0.496 5 0.499 1 0.498 8 0.501 2 0.504 9 0.502 5	193.635 194.649 194.532 195.468 196.911 195.975	26.172 26.172 26.172 26.172 26.172 26.172	218.127 219.745 219.435 220.418 221.534 221.317	93.58 95.89 95.15 95.33 94.08 96.83	95.14	1.24
3,3'-二甲氧基 鞣花酸	0.496 5 0.499 1 0.498 8 0.501 2 0.504 9 0.502 5	377.340 379.316 379.088 380.912 383.724 381.900	20.230 20.230 20.230 20.230 20.230 20.230	396.233 399.069 399.085 400.768 403.970 401.054	93.39 97.64 98.85 98.15 100.08 94.68	97.13	2.64
3,3',4'-三甲氧 基鞣花酸	0.496 5 0.499 1 0.498 8 0.501 2 0.504 9 0.502 5	466.710 469.154 468.872 471.128 474.606 472.350	85.870 85.870 85.870 85.870 85.870 85.870	552.477 553.951 556.863 553.950 558.381 555.378	99.88 98.75 102.47 96.45 97.56 96.69	98.63	2.31

中有有效成分的提取效果,在考虑供试品制备方法的高效、简单、方便操作等因素前提下,在选择提取溶剂为 60% 乙醇,超声 60 min 时,供试品溶液色谱图中色谱峰数量较多,且分离效果较好,共有峰面积较大,故选择此条件制备供试品溶液。

3.2 色谱条件优化

预试验中对不同检测波长进行考察,发现 15 批药材样品在 327 nm 波长处出峰较多,共有峰较多,基线分离效果好,比较后最终选择 327 nm 作为检测波长;比较了不同色谱柱的分离效果,发现 Eclipse XDB - C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 具有较高柱效,能较好地分离待测成分与杂质峰;比较了不同流动相 (乙腈 - 0.5% 磷酸水溶液、甲醇 - 0.5% 磷酸水溶液、甲醇 - 水、乙腈 - 水) 的试验效果,发现当流动相为乙腈 - 0.5% 磷酸水溶液

表 5 15 批样品含量测定结果 (% , n = 2)

Tab. 5 Results of content determination of five components in 15 batches of samples (% , n = 2)

编号	3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷	3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷	3,3'-二甲氧基鞣花酸	3,3',4'-三甲氧基鞣花酸
S1	0.266	0.061	0.027	0.022	0.037
S2	0.554	0.130	0.047	0.019	0.064
S3	0.879	0.091	0.039	0.076	0.094
S4	0.281	0.144	0.041	0.209	0.054
S5	0.228	0.011	0.026	0.024	0.065
S6	0.538	0.056	0.027	0.019	0.065
S7	0.204	0.012	0.024	0.040	0.044
S8	0.162	0.045	0.021	0.038	0.093
S9	0.355	0.253	0.045	0.038	0.056
S10	0.198	0.133	0.019	0.026	0.048
S11	0.222	0.031	0.031	0.043	0.077
S12	0.222	0.123	0.022	0.033	0.038
S13	0.482	0.159	0.046	0.042	0.065
S14	0.494	0.161	0.036	0.045	0.070
S15	0.412	0.092	0.035	0.055	0.107

时,各色谱峰的峰形及分离度均较好;还考察了不同柱温 (20, 30, 35 ℃) 及流速 (0.8, 1.0, 1.2 mL / min), 发现 30 ℃ 为分析的最佳柱温,流速采用 1.0 mL / min 时色谱峰分离效果优于 0.8, 1.2 mL / min,故确定本试验中的试验条件为最佳色谱条件。

3.3 方法评价

本研究中指紋图谱结果表明,15 批五匹风药材样品共有峰有 6 个,相似度均大于 0.885,说明贵州省内各产地的药材质量具有较高的均一性。含量测定结果显示,五匹风药材中平均含量由高到低分别为 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸、3,3'-二甲氧基鞣花酸、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷、3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷及 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4'-O-β-D-吡喃木糖苷在各批次间的含量差异较小;山柰酚-3,7-二-O-α-L-吡喃鼠李糖苷和 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸各批次间的含量差异较大,含量差异可能由产地、采收期等多种原因导致,具体原因还需进一步深入研究。

本研究中所建立的指紋图谱及含量测定方法简便、稳定、准确,结果可靠,可为五匹风药材的全面质量控制提供参考。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标