

# 诃子 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

尹春梅<sup>1</sup>, 韩世柳<sup>2</sup>, 田成旺<sup>3</sup>, 张铁军<sup>3\*</sup>, 朱宏吉<sup>2\*</sup>

(1 吉林农业大学, 吉林 长春 130118; 2 天津大学化工学院, 天津 300072; 3 天津药物研究院, 天津 300193)

**摘要:**目的 研究诃子的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立诃子药材的 HPLC 指纹图谱, 收集了 12 批样品进行测定, 并使用主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。采用 HPLC-MS 技术对色谱峰进行了初步归属。结果 通过主成分分析可知, 诃黎勒酸为其中比较重要的指标。结论 本方法为诃子质量控制及综合评价奠定了基础。

**关键词:**诃子; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1467-03

诃子为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz 或绒毛诃子 *T. bellerica* (Gaertn.) Roxb. 的干燥成熟果实, 为《中国药典》收载品种, 在我国产量丰富。诃子苦、酸、涩、平, 归肺、大肠经。具有涩肠敛肺, 降火利咽之功效, 用于久泻久痢, 便血脱肛, 肺虚喘咳, 久咳不止, 咽痛音哑。现代药理实验证明诃子具有抑菌、杀灭或抑制恶性肿瘤细胞等作用, 临床应用广泛, 尤其在藏药和蒙药中最为常用。在藏药学经典著作《晶珠本草》中, 诃子被称为“藏药之王”。诃子在蒙药中也是使用频率最高的药物<sup>[1]</sup>。诃子富含鞣质成分。由于近年来对大分子酚酸类成分的化学及生理活性研究较多, 除抑菌、消炎、清热等作用外, 还具有较强的清除自由基作用逐渐引起人们的注意。又由于大分子酚酸成分的化学不稳定性, 对这类药材的质量控制也备受注意<sup>[2]</sup>。高效液相指纹图谱是控制药材质量的良好手段<sup>[3,5]</sup>, 罗文等<sup>[6]</sup>建立 10 批山楂 HPLC 指纹图谱, 显示了精密、稳定、重现性好的特点。本实验建立了诃子的高效液相指纹图谱, 对其主要色谱峰进行了归属, 并使用主成分分析法对指纹图谱进行了模式识别。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置自动进样器、柱温箱、UV 检测器、Agilent 1100 色谱工作站; AB204N 电子天平 (Mettler Toledo); Autoscience AS3120 超声仪; 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯; 没食子酸对照品购自中国药品生物制品检定所; 诃子样品由中新药业天津第六中药厂提供。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (200 nm ×

4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 2% 甲醇, 10~38 min, 28% 甲醇, 38~80 min, 32% 甲醇, 80~92 min, 40% 甲醇, 92 min 以后, 50% 甲醇; 进样量: 2 μL; 测定波长: 280 nm; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 25 °C。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取没食子酸对照品 3.25 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇 9 mL, 超声 20 min, 冷却后用甲醇滴定至刻度, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 称取诃子药材粉末 0.5 g (过 20 目筛), 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 冷却补足质量, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液, 即得。

2.4 精密度试验: 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 值在 0.1078%~0.434%, 相对峰面积比值的 RSD 值在 0.1881%~3.2531%, 均小于 5%。

2.5 稳定性试验: 取同一批号的供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示相对保留时间的 RSD 值在 0.1891%~0.8727%, 相对峰面积的 RSD 值在 0.1021%~4.7991%, 二者均小于 5%。

2.6 重现性试验: 取同一批号的供试品溶液 5 份, 进行测定, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示相对保留时间的 RSD 值在 0.1282%~1.034%, 相对峰面积的 RSD 值在

\* 收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BA06A01)

作者简介: 尹春梅 (1962-), 女, 副教授, 从事药用植物栽培和质量评价研究。

\* 通讯作者 张铁军 T el: (022) 23006848

0.1261% ~ 3.9184%, 二者均小于 5%。

2.7 样品测定: 取 12 批样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 确定 15 个共有峰。用《中药色谱图的指纹图谱评价系统》软件(2004A)进行色谱峰的匹配, 制定了以没食子酸为参照物的标准指纹图谱, 并制备了 12 批样品的叠加图, 见图 1。

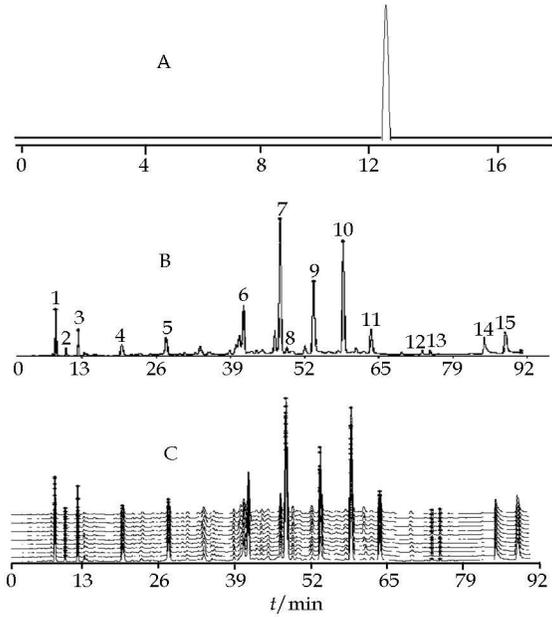


图 1 没食子酸对照品色谱图(A)、诃子药材标准指纹图谱(B)和 12 批样品 HPLC 叠加色谱图(C)

Fig 1 HPLC Chromatograms of gallic acid reference substance (A), *Chebulae Fructus* crude drug standard fingerprint (B), and 12 batches of samples (C)

2.8 色谱峰的归属: 采用液质联用, 只将上述流动相中的磷酸替换为甲酸, 进行测定, 并参考相关的文献报道<sup>[7-8]</sup>, 对部分主要的色谱峰进行了定性, 结果见表 1。保留时间为  $t_R = 47.163$  min 的 7 号峰的质谱解析见图 2, 保留时间为  $t_R = 58.282$  min 的 10 号峰的质谱解析见图 3。

表 1 诃子色谱峰的成分归属

Table 1 Arrangement of components peaks in *Chebulae Fructus*

峰号	$t_R$ / min	准分子离子峰	相对分子质量	归属化合物
7	47.163	953[M - H] <sup>-</sup>	954	诃黎勒酸
10	58.282	955[M - H] <sup>-</sup>	956	诃子酸

2.9 主成分分析: 采用 SPSS 统计分析软件对 12 个样本进行了主成分分析, 即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别, 先将  $12 \times 15$  的原始数据矩阵经标准化处理, 再对其进行运算, 主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前  $m$  个主成分。由分析可知, 前 2 个主成分的累计贡献率就可以达到 93.86%, 包含了大部分信息, 故提取前

2 个特征值。其中, 第一主成分为  $\lambda = 10.197$ , 方差贡献率为 72.834%, 贡献率最大, 包含的信息最多, 影响也最大。第二主成分为  $\lambda = 2.944$ , 方差贡献率为 21.026%。两个主成分的得分图见图 4, 图中每个点对应 1 个样本。可见此 12 个样本分为 3 类。每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数。初始因子载荷矩阵见表 2。

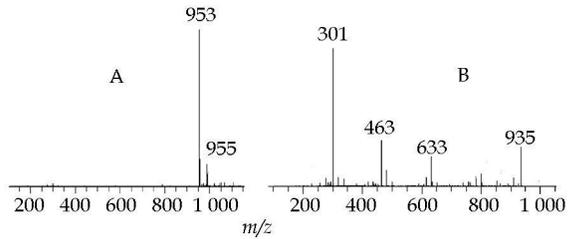


图 2  $m/z$  953 的一级(A)及二级(B)负离子质谱图  
Fig 2 Negative ion MS spectra of 1st (A) and 2nd (B) of  $m/z$  953 ion

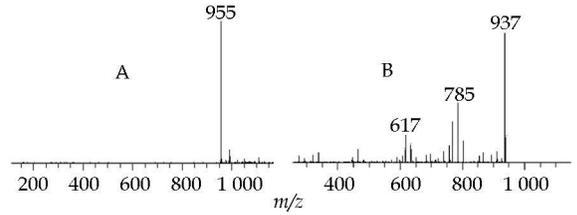


图 3  $m/z$  955 的一级(A)及二级(B)负离子质谱图  
Fig 3 Negative ion MS spectra of 1st (A) and 2nd (B) of  $m/z$  955 ion

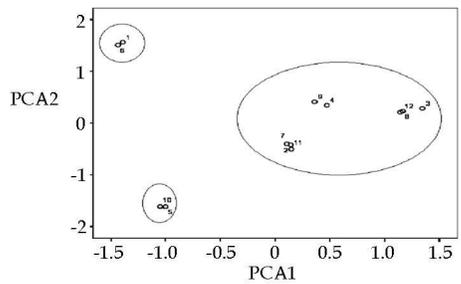


图 4 主成分得分图

Fig 4 Scoring analysis of main principal components

将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到两个主成分中每个指标所对应的系数, 经计算得主成分的模型为:  $F_1 = 0.298719 X_1 + 0.290384 X_2 + 0.235619 X_4 + 0.234507 X_5 + 0.3083 X_6 + 0.309221 X_7 + 0.248302 X_8 + 0.217037 X_9 + 0.217167 X_{10} + 0.297692 X_{11} + 0.244696 X_{12} + 0.221803 X_{13} + 0.305477 X_{14} + 0.279889 X_{15}$ ;  $F_2 = -0.16246 X_1 - 0.03707 X_2 - 0.38154 X_4 - 0.37713 X_5 - 0.07336 X_6 - 0.07837 X_7 + 0.276208 X_8 +$

表 2 初始因子载荷矩阵  
Table 2 Matrix of initial factors

峰号	主成分	
	1	2
1	0.953 882	-0.278 739
2	0.927 267	-0.063 600
4	0.752 388	-0.654 610
5	0.748 837	-0.647 041
6	0.984 478	-0.125 873
7	0.987 419	-0.134 461
8	0.792 888	0.473 894
9	0.693 051	0.686 417
10	0.693 466	0.676 791
11	0.950 603	-0.296 406
12	0.781 374	0.511 267
13	0.708 271	0.643 067
14	0.975 461	-0.187 037
15	0.893 752	-0.171 121

$$0.400\ 076 X_9 + 0.394\ 466 X_{10} - 0.172\ 76 X_{11} + 0.297\ 99 X_{12} + 0.374\ 81 X_{13} - 0.109\ 01 X_{14} - 0.099\ 74 X_{15}$$

两个主成分中,  $F_1$  是特征值最大的, 而第一主成分中系数最大的为  $X_7$ , 即为峰 7 相对于峰 3 的面积经标准化数值, 从归属图上可知, 峰 7 为诃黎勒酸, 证明诃黎勒酸的量在诃子的质量控制中起着相对比较重要的作用。

### 3 讨论

3.1 流动相的选定: 选用不同比例的甲醇-水-磷酸、乙腈-水-磷酸等流动相体系, 进行试验对比, 以确定最佳流动相的组成及洗脱梯度。结果表明, 乙腈-水-磷酸系统, 药材中的组分分离不理想。甲醇-

水-磷酸系统, 各组分均可基线分离, 故选择甲醇-水-磷酸系统为流动相。

3.2 检测波长的选择: 取供试品溶液, 进样 2  $\mu$ L, 进行 210~400 nm 的全波长扫描, 并各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明, 在 280 nm 时图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌, 因此选择 280 nm 作为检测波长。

3.3 提取方式的选定: 试验了水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇提取, 结果表明 70% 乙醇相比其他几种溶剂, 提取的成分多, 故选用 70% 乙醇作为提取溶剂。另外, 比较了超声提取与回流提取, 发现回流提取出的峰较多, 提取率较高, 因此, 样品采用回流提取。

#### 参考文献:

- [1] 王金华, 孙芳云, 杜冠华. 诃子的药理作用研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12(6): 45-47.
- [2] 颜玉贞, 谢培山, 宋力飞, 等. 西青果药材及提取物液相指纹图谱的应用研究[J]. 中成药, 2004, 26(8): 603-607.
- [3] 张铁军, 韩世柳, 田成旺, 等. 清咽滴丸极性成分的高效液相指纹图谱及其模式识别的研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1282-1285.
- [4] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 牛黄降压丸的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 56-57.
- [5] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983.
- [6] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42.
- [7] 张海龙, 裴月湖, 华会明. 诃子化学成分及药理的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 452-455.
- [8] 丁岗, 刘延泽, 王莉, 等. 诃子中主要可水解丹宁的结构鉴定[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(2): 91-93.

## 醋柳黄酮固体分散体的制备研究

谢燕, 邹珊珊, 李国文\*, 荣蓉, 蔡贞贞\*  
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 将醋柳黄酮制成固体分散体, 提高醋柳黄酮中有效成分的体外溶出。方法 以溶出度为指标, 选择载体; 通过单因素和正交试验筛选最佳制备工艺, 制备固体分散体。结果 醋柳黄酮固体分散体的优化制备工艺为: 醋柳黄酮与 Polaxamer 188 比例为 1: 4, 以每 7.5 g 固体分散体溶于 200 mL 80% 乙醇中, 超声 25 min, 挥发溶剂, 4  $^{\circ}$ C 固化 10 h, 研成小块, 干燥 24 h, 取出研细, 得醋柳黄酮固体分散体。结论 以 Polaxamer 188 为载体制备的醋柳黄酮固体分散体体外溶出迅速, 可用于制备速效、高效的醋柳黄酮口服制剂。

关键词: 醋柳黄酮; 固体分散体; Polaxamer 188; 溶出度

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)09-1469-05

\* 收稿日期: 2010-01-30

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目(09ZR1431700); 上海市教育委员会预算内科研项目(09jw 22)  
作者简介: 谢燕(1978-), 女, 重庆璧山人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药新制剂与新剂型的研究与开发。  
Tel: (021) 51322044 E-mail: rosexie\_2004@163.com

\* 通讯作者 李国文 Tel: (021) 51322042 Fax: (021) 51322043 E-mail: lgwshutcm@163.com