

基于指纹图谱分析和多成分同时定量的藏药毛诃子质量评价研究

陈文静¹, 梁文仪¹, 李 师¹, 吴玲芳¹, 崔雅萍¹, 亓 旗¹, 袁永兵^{2*}, 张兰珍^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘 要: **目的** 建立藏药毛诃子药材 HPLC 指纹图谱, 测定毛诃子中没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯量, 为毛诃子药材质量控制提供依据。**方法** 采用 Atlantic T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.2%冰醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C。建立 11 批毛诃子药材 HPLC 指纹图谱共有模式, 并采用化学计量学分析方法分析隐藏信息。采用 HPLC-MSⁿ 对毛诃子药材色谱峰进行指认, 并对特征峰进行定量分析。**结果** 得到毛诃子 HPLC 指纹图谱, 标示出 21 个共有峰, 相似度均在 0.9 以上。采用 HPLC-MSⁿ 方法指认了 18 个化合物。主成分分析和聚类分析将样品大致分为 3 类。并结合偏最小二乘判别分析方法发现区分毛诃子样品的 5 个标志性化合物, 其中指认出 12 号峰为诃子鞣酸。定量分析条件通过方法学验证, 平均加样回收率在 97.24%~98.58%。**结论** 对 HPLC 指纹图谱和主要成分量同时进行分析, 方法快速、简便、重复性好, 可作为藏药毛诃子质量控制有效方法之一。

关键词: 毛诃子; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法; 没食子酸; 柯里拉京; 鞣花酸; 没食子酸甲酯

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)06-1210-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.026

Quality evaluation of *Terminalia billerica* based on HPLC fingerprint and multi-components simultaneous determination

CHEN Wen-jing¹, LIANG Wen-yi¹, LI Shi¹, WU Ling-fang¹, CUI Ya-ping¹, QI Qi¹, YUAN Yong-bing², ZHANG Lan-zhen¹

1. School of Chinese Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and to determine gallic acid, methyl gallate, corilagin, and ellagic acid in *Terminalia billerica*, in order to provide the scientific foundation for quality control of *T. billerica*. **Methods** The analysis was performed on Atlantic T3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) C₁₈ column, mobile phase was acetonitrile-0.2% glacial acetic acid aqueous solution with gradient elution, flow rate was 1.0 mL/min, injection size was 20 μL column, and temperature was maintained at 30 °C. The common mode of *T. billerica* HPLC fingerprint was established, the hidden information was analyzed in the fingerprint by Chemometrics, and the components in *T. billerica* by HPLC-MSⁿ and quantitative analysis characteristic peaks were identified. **Results** There were 21 common peaks in the diagram and the similarity of the fingerprints was over 0.9 in all 11 batches. The information of the 18 common peaks in *T. billerica* was summarized by HPLC-MSⁿ technology. The samples were broadly divided into three kinds by principal component analysis and clustering analysis. The five key compounds were verified by partial least squares discriminant analysis method in quantitative analysis, and identified that the No.12 peak was chabulagic acid, and the average recoveries were in the range of 97.24%—98.58%. **Conclusion** The HPLC fingerprint method and content determination method are reliable, accurate, rapid, simple, and reproducible, and this study could control the quality of *T. billerica*.

Key words: *Terminalia billerica* (Gaertn.) Roxb.; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discrimination analysis; gallic acid; corilagin; ellagic acid; methyl gallate

收稿日期: 2016-11-15

作者简介: 陈文静, 女, 在读硕士研究生。E-mail: 17801080687@163.com

*通信作者 张兰珍, 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药效物质基础与质量控制研究。Tel: (010)84738628 E-mail: zhanglanzhen01@126.com
袁永兵, 男。E-mail: seymour@126.com

毛诃子为使君子科植物毗黎勒 *Terminalia bellirica* (Geartn.) Roxb. 的干燥成熟果实,是常用藏药,具有清热解毒、收敛养血、调和诸药的功效,用于各种热证、泻痢、黄水病、肝胆病、病后虚弱^[1]。毛诃子在藏医药学中运用十分广泛,藏药部颁标准中有数十种方药含有毛诃子,《中国药典》2000 年版一部开始收载毛诃子。毛诃子主要分布于越南、老挝、泰国、柬埔寨、缅甸、印度、马来西亚和印度尼西亚等国^[2],在我国云南、西藏等省亦有少量分布^[3],目前其药材商品主要依靠国外进口。

毛诃子含有鞣质、酚、三萜皂苷、强心苷、木脂素、脂肪酸、维生素等成分^[2],其中以鞣质和多酚类成分为主^[4]。《中国药典》2015 年版仅对毛诃子药材进行性状鉴别、显微鉴别和理化鉴别。毛诃子 HPLC 指纹图谱和定量测定目前尚无报道。本实验首次建立毛诃子药材 HPLC 指纹图谱,并建立同时测定毛诃子药材中主要成分柯里拉京、鞣花酸、没食子酸甲酯和没食子酸量的方法,对不同批次毛诃子药材进行质量评价。

1 材料

Waters 1525 型高效液相色谱仪; Waters 2487 型 DAD 检测器; Breeze 软件; 25 μ L 可调进样器; Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); HWS26 型电热恒温水浴锅; KQ-500DE 超声波清洗器(100 W, 昆山超声仪器有限公司)。

没食子酸(批号 141109)、没食子酸甲酯(批号 151030)、柯里拉京(批号 15101404)、鞣花酸(批号 15091807)均购自成都普菲德生物科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯;水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。11 批毛诃子药材购自北京市藏医院、安徽亳州药材市场和河北安国药材市场,经北京中医药大学药系刘春生教授鉴定为毗黎勒 *Terminalia bellirica* (Geartn.) Roxb. 的干燥成熟果实。其中 S1 和 S4 为进口药材, S2、S3、S5~S11 为国产药材,见表 1。

表 1 药材信息

Table 1 Information of sample batches

批次	产地	批次	产地
S1	巴基斯坦	S7	西藏 2
S2	广西 1	S8	西藏 3
S3	广西 2	S9	西藏 4
S4	尼泊尔	S10	云南 1
S5	新疆	S11	云南 2
S6	西藏 1		

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称定没食子酸对照品 17.25 mg, 没食子酸甲酯对照品 1.05 mg, 柯里拉京对照品 4.46 mg, 置 10 mL 量瓶中加 50% 甲醇溶解, 定容摇匀, 质量浓度分别为 1.725、0.105、0.446 mg/mL; 精密称定鞣花酸对照品 8.64 mg, 置 10 mL 量瓶中加 DMSO 溶解, 定容摇匀, 质量浓度为 0.864 mg/mL。

2.1.2 供试品溶液的制备 取毛诃子药材粉末(过 40 目筛)约 0.1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 25 mL 60% 甲醇, 称定质量, 回流提取 2 h, 放冷, 补足损失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 毛诃子药材指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Atlantic T3 C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-0.2% 乙酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~20 min, 5%~10% A; 20~30 min, 10%~15% A; 30~60 min, 15%~20% A; 60~75 min, 20%~25% A; 75~85 min, 25%~50% A; 85~95 min, 50%~90% A; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L, 检测波长 254 nm。

2.2.2 质谱条件 ESI 离子源, 采用负离子模式扫描, 自动三级, 雾化气体流量为 1.50 L/min, CDL 温度为 200 $^{\circ}$ C, 加热模块温度为 200 $^{\circ}$ C, 干燥气压为 100 kPa, 扫描范围 m/z 100~1 000。

2.2.3 精密度试验 取 S1 批药材, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录保留时间和峰面积。以 15 号峰为参照, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.35%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.66%, 说明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取 S1 批药材, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录保留时间和峰面积。以 15 号峰为参照, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.32%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.52%, 说明样品稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取 S1 批药材, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 记录保留时间和峰面积。以 15 号峰为参照, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.7%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.88%, 说明方法重复性良好。

2.2.6 毛诃子 HPLC 指纹图谱建立及相似度评价

分别取 11 批毛诃子药材粉末,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液进行测定。采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)对 11 批毛诃子药材色谱数据(图 1)进行分析。标定共有峰 21 个,其中 14 号峰峰面积较大,经与对照品比对归属为鞣花酸,且不同批次样品中稳定存在,故选其为参照峰,其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均通过 14 号峰比对获得。毛诃

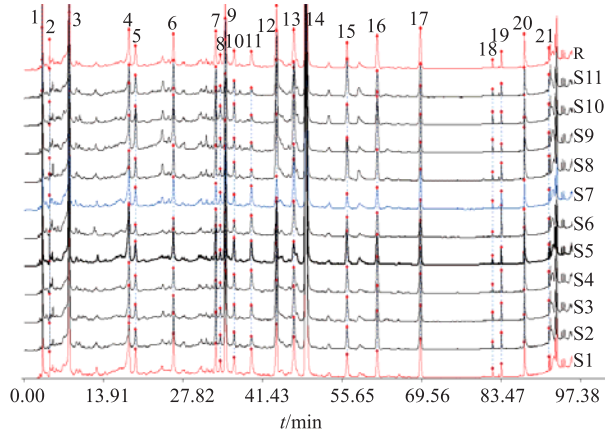


图 1 不同批次毛诃子药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of *T. billerica* from different batches

子药材以 S1 样品图谱作为参照图谱,进行相似度计算,11 批毛诃子药材相似度分别为 0.996、0.998、0.998、0.996、0.995、0.979、0.993、0.995、0.984、0.995、0.994,均大于 0.9,相似度良好。说明 11 批不同批次毛诃子药材的化学成分比较稳定。

2.2.7 HPLC-MSⁿ 法指认毛诃子药材主要色谱峰根据 HPLC-MSⁿ 获得的分子离子碎片峰等信息,结合文献数据 and 对照品图谱,共鉴定出 18 个化合物。毛诃子药材质谱总离子流图见图 2。化合物解析结果见表 2。

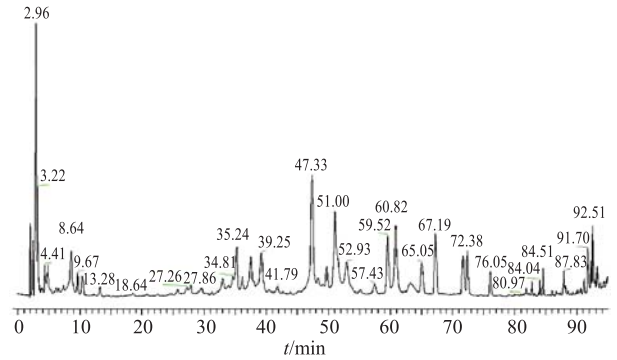


图 2 毛诃子样品总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of *T. billerica* samples

表 2 毛诃子药材化学成分 HPLC-MSⁿ 数据
Table 2 HPLC-MSⁿ data of *T. billerica* components

编号	<i>t_R</i> /min	母离子 (<i>m/z</i>)	质谱特征 ESI/MS ⁿ (<i>m/z</i>)	化合物
1	2.06	201.025 5	156.978 0	2,3,4,5,6-五羟基苯甲酸 ^[5]
2	3.22	331.066 2	313.066 2, 168.862 4	没食子酰葡萄糖 ^[6]
3	4.91	355.029 5	336.940 2	诃子次酸 ^[6]
4	7.34	331.066 7	168.912 1	没食子酰葡萄糖 ^[6]
5	8.64	169.014 1	124.833 2, 106.814 1	没食子酸 ^[6]
6	13.25	483.077 9	331.049 1	3,6-二没食子酰葡萄糖 ^[6]
7	25.78	183.029 7	168.980 8	没食子酸甲酯 ^[7]
8	32.99	635.087 8	465.159 7, 313.017 9	三没食子酰葡萄糖 ^[6]
9	34.61	651.082 1	633.231 8, 607.094 4	诃子宁 ^[8]
10	35.24	633.071 4	301.014 3, 275.010 6	柯里拉京 ^[6]
11	36.16	635.088 1	483.062 7, 331.153 4	三没食子酰葡萄糖 ^[6]
12	37.55	785.082 8	300.950 2, 633.175 4	鞣云实素 ^[7]
13	47.33	953.088 6	476.041 0, 300.982 0	诃子鞣酸 ^[6]
14	51.00	787.981 0	617.225 5, 465.134 4	四没食子酰葡萄糖 ^[6]
15	52.92	300.998 0	283.979 7, 228.914 4	鞣花酸 ^[6]
16	60.82	955.104 2	937.106 5	诃子酸 ^[9]
17	65.05	447.056 1	299.932 7, 271.168 7	鞣花酸脱氧己糖 ^[6]
18	72.38	939.110 5	469.052 4, 787.089 7	五没食子酰葡萄糖 ^[10]

2.3 化学计量学分析

将色谱仪采集的数据采用 IBM SPSS 22.0 软件和 SIMCA 13.0 软件进行聚类分析和主成分分析。

2.3.1 聚类分析 采用平方 Euclidean 距离对药材进行系统聚类分析, 结果见图 3。根据聚类分析结果, 将毛诃子药材大致分为 3 大类, I 类包括 S2、S3、S4、S8、S10、S11; I 类包括 S1、S5、S6、S7; III 类包括 S9。同时, 通过聚类分析发现, 各产地毛诃子药材之间的相关性与相似度分析结果较为一致。

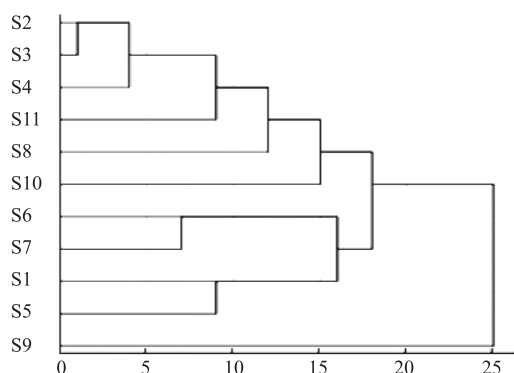


图 3 聚类分析结果

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis

2.3.2 主成分分析 以主成分的特征根和贡献率作为选择主成分的依据。主成分的特征根大于 1 的主成分共 6 个, 且 6 个主成分的累积方差贡献率大于 93.213%。PCA 碎石图可以看出率先提取出来的 6 个主成分的坡度较为陡峭而后续形成的坡度较为平缓。说明所提取的 6 个主成分可以代表毛诃子药材的质量。其中第 1 主成分特征值为 6.670, 方差贡献率为 31.764%; 第 2 主成分特征值为 4.819, 方差贡献率为 22.946%; 第 3 主成分特征值为 3.201, 方差贡献率为 15.244%; 第 4 主成分特征值为 2.050, 方差贡献率为 9.760%; 第 5 主成分特征值为 1.662, 方差贡献率为 7.914%; 第 6 主成分特征值为 1.173, 方差贡献率为 5.585%。用 SIMCA 13.0 分析软件得到 PCA 得分图, 可以看出样品被分为 3 类, 与聚类分析结果一致。结果见图 4。

2.3.3 偏最小二乘判别分析 采用 SIMCA 软件对 11 批样品色谱数据进行 PLS-DA 分析, 结果见图 5。PLS-DA 得分图可以看出 11 批样品被分为 3 类, 与聚类分析和主成分分析结果相一致。PLS-DA 还常用于寻找区分不同批次样品的化学成分。在 PLS-DA 模型中, VIP 图可反映出每个

峰的贡献程度, 并从高到低进行排序。以 VIP 值大于 1.2 为标准, 5、17、6、16、12 号峰可能是鉴别毛诃子样品最主要的色谱峰, 经指认 13 号峰为诃子鞣酸。与主成分分析结果基本一致。

2.4 毛诃子药材中 4 种成分的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Atlantic T3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.2% 冰醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 3% A; 10~35 min, 3%~10% A; 35~45 min, 10%~

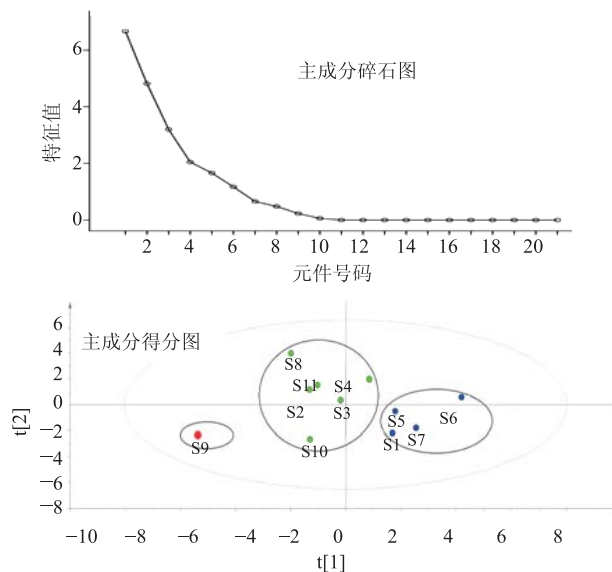


图 4 毛诃子药材主成分分析结果

Fig. 4 PCA results of *T. Billerica*

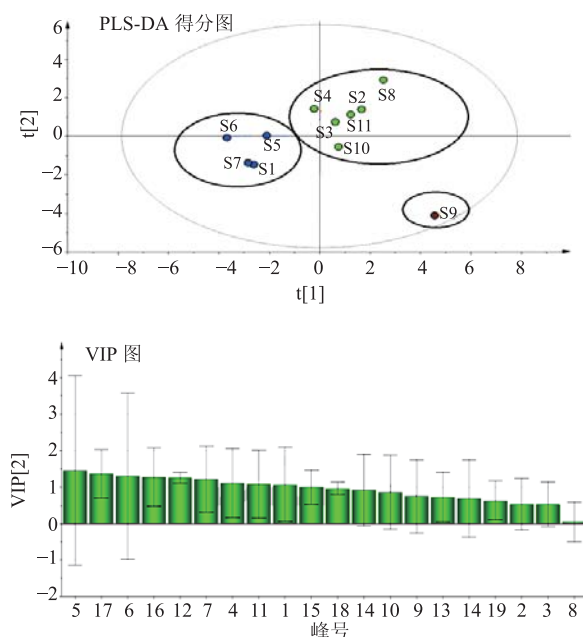


图 5 毛诃子药材 PLS-DA 分析结果

Fig. 5 PLS-DA results of *T. billerica*

14% A; 60~80 min, 14%~20% A。体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL; 检测波长 254 nm (鞣花酸) 和 273 nm (柯里拉京及没食子酸甲酯)。色谱图见图 6。

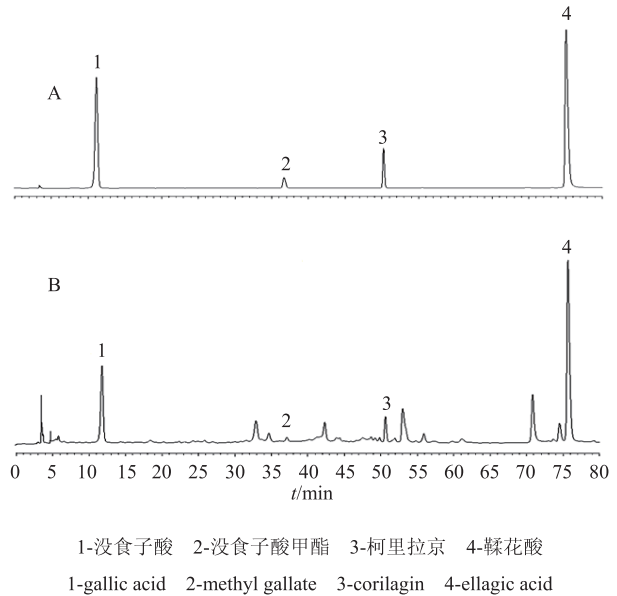


图 6 对照品 (A) 和毛诃子药材样品 (B) HPLC
Fig. 6 HPLC of reference substances (A) and sample (B)

2.4.2 线性关系考察 将已配制好的没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯稀释成 6 个不同浓度的溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得到回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 结果见表 3。

2.4.3 精密度试验 精密称取同一批次毛诃子供试品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯的峰面积 RSD 分别为 0.64%、0.40%、0.84%、2.54%。说明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密称取同一批次毛诃子供试品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在

样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯的峰面积 RSD 分别为 0.34%、0.41%、1.35%、2.86%。说明测定成分在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一批次毛诃子供试品 6 份, 按“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液, 进样, 记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯的质量分数 RSD 分别为 1.61%、0.72%、1.26%、1.90%。说明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已测定的样品 (S10) 6 份, 精密称定, 分别加入对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 测得没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯的平均加样回收率分别为 98.05%、97.24%、97.51%、98.58%, RSD 值分别为 0.65%、0.75%、3.00%、1.31%。结果表明该方法加样回收试验结果良好。

2.4.7 不同产地药材的测定 取不同产地的毛诃子适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算样品中各指标成分的量, 结果见表 4。

表 4 样品测定结果 (n = 3)

Table 4 Results of content determination of samples (n = 3)

批次	质量分数/%				总量
	没食子酸	柯里拉京	鞣花酸	没食子酸甲酯	
S1	2.78	0.44	1.31	0.08	4.61
S2	2.58	0.56	1.03	0.11	4.28
S3	2.70	0.61	1.13	0.14	4.58
S4	2.91	0.64	1.22	0.08	4.85
S5	2.93	0.52	1.34	0.06	4.85
S6	4.69	0.35	1.15	0.08	6.27
S7	3.53	0.34	1.35	0.11	5.33
S8	3.07	0.51	1.09	0.21	4.88
S9	2.29	0.84	1.10	0.22	4.45
S10	2.55	0.58	1.22	0.13	4.48
S11	2.67	0.44	1.02	0.25	4.38

表 3 4 种成分的线性关系

Table 3 Regression equations of different control samples

成分	回归方程	r	线性范围/μg
没食子酸	$Y=6.25 \times 10^7 X+6.82 \times 10^4$	0.999 9	0.331 2~4.140 0
柯里拉京	$Y=3.96 \times 10^7 X+5.28 \times 10^3$	0.999 9	0.071 4~0.892 0
鞣花酸	$Y=1.88 \times 10^8 X-5.35 \times 10^4$	0.999 8	0.027 6~1.209 6
没食子酸甲酯	$Y=6.69 \times 10^7 X+1.39 \times 10^4$	0.999 5	0.008 4~0.420 0

3 讨论

本实验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; 比较了 50%、60%、70%、80% 甲醇提取, 结果表明 50% 甲醇提取的成分多且对 4 种成分的提取率均较高, 故选用 50% 甲醇作为提取溶剂; 比较

了提取 1、1.5、2 h 的提取率,发现 2 h 提取率最高。综合考虑提取方法对药材中成分的提取数量和提取率,采用 50%甲醇回流提取 2 h。

选用甲醇-0.2%冰醋酸水溶液、乙腈-0.2%冰醋酸水溶液作为流动相体系进行试验,以确定最佳流动相的组成及洗脱梯度。结果表明,乙腈-0.2%冰醋酸水溶液系统对毛诃子药材中的组分分离最为理想,因此选用乙腈-0.2%冰醋酸水溶液。

11 批毛诃子药材相似度均在 0.9 以上,相似度良好,说明不同批次毛诃子药材质量相差不大。定量测定结果显示 11 批毛诃子中没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯量差异较大,其中没食子酸差异最大,没食子酸甲酯差异较小。总量结果显示西藏、尼泊尔、新疆和巴基斯坦 4 个成分的量较高,广西和云南等地的量较低。

本实验首次建立了毛诃子药材 HPLC 指纹图谱,并首次建立了同时测定毛诃子药材中主要成分没食子酸、柯里拉京、鞣花酸和没食子酸甲酯含量的方法,方法简便快捷,结果可靠、稳定,可为毛诃子药材及其制剂的质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典. [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈 介. 中国植物志 (第 53 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [3] 王国强. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [4] 王 舒. 药用植物毛诃子研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(5): 65-66.
- [5] Wei W, Pan Y, Chen Y, *et al.* Carboxylic acids from *Phyllanthus urinaria* [J]. *Chem Nat Compd*, 2005, 41(1): 17-21.
- [6] Yang B R, Maaria K, Liu P Z, *et al.* Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(35): 8672-8683.
- [7] Pfundstein B, ElDesouky S K, Hull W E, *et al.* Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(10): 1132-1148.
- [8] Lin M T, Lee S S, Liu K C. Polar constituents from *Phyllanthus myrtifolius* [J]. *Chin Pharm J*, 1998, 50(6): 327-336.
- [9] Yang B, Liu P. Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica* [J]. *J Agri Food Chem*, 2014, 62(3): 529-541.
- [10] 王常喜, 岳丽丽, 徐海燕, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱联用法同时测定蒙药全石榴、中药石榴皮及新鲜石榴中 7 种成分 [J]. 食品科学, 2016, 37(4): 139-143.