

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)05-0047-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.012



高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法评价诃子药材质量

张炜文, 袁 静

(江苏省南通卫生高等职业技术学校, 江苏 南通 226000)

摘要:目的 评价诃子药材的质量。方法 建立诃子药材的高效液相色谱指纹图谱, 采用相似度计算、聚类分析和主成分分析法对其质量进行评价。以柯里拉京为内参物, 建立测定诃子药材中莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸含量的一测多评法, 并将计算结果与外标法测定结果进行比较。结果 18批诃子药材的指纹图谱有23个共有峰, 指出2号峰为莽草酸、7号峰为没食子酸、11号峰为没食子酸甲酯、14号峰为柯里拉京、15号峰为没食子酸乙酯、16号峰为诃黎勒酸、20号峰为鞣花酸、22号峰为诃子酸, 相似度均大于0.95。聚类分析结果显示, 18批诃子药材聚为2类, 其中产地为青海的2批药材聚为一类, 其余药材聚为一类。主成分分析结果显示, 主成分特征值大于1的5个成分累积方差贡献率为84.088%。采用一测多评法计算的18批诃子药材中莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的含量与外标法测定结果无显著差异($P>0.05$)。结论 高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法可有效评价诃子药材的质量。

关键词:诃子; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 一测多评法; 化学模式识别; 质量评价

Quality Evaluation of Terminaliae Chebulae Fructus by HPLC Fingerprint and QAMS

ZHANG Weiwen, YUAN Jing

(Nantong Health College of Jiangsu Province, Nantong, Jiangsu, China 226000)

Abstract: **Objective** To evaluate the quality of Terminaliae Chebulae Fructus. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Terminaliae Chebulae Fructus was established, and its quality was evaluated by similarity calculation, cluster analysis, and principal component analysis. The quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS) was established to determine the contents of shikimic acid, gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, chebulagic acid, ellagic acid and chebulinic acid with corilagin as the internal reference material. The results of QAMS were compared with the results of the external standard method (ESM). **Results** The fingerprints of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus had 23 common peaks, with identification of peak 2 as shikimic acid, peak 7 as gallic acid, peak 11 as methyl gallate, peak 14 as corilagin, peak 15

第一作者: 张炜文, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为药物分析, (电子信箱) zhangweiwen1983@126.com。

- [4] 邹晓慧, 张菊香, 刘书珍, 等. 二冬汤合逐风通痹汤配合西药治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 30(6): 1430-1432.
- [5] 李少锋, 杜少辉. 甘桔二冬汤治疗糖尿病便秘的临床研究[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(8): 1133-1136.
- [6] 张春芳, 孙海波, 顾 权, 等. 二冬汤加减联合甲巯咪唑治疗阴虚火旺型甲状腺功能亢进症的疗效及作用机制分析[J]. 四川中医, 2022, 40(6): 113-117.
- [7] 黄 维, 赵 迪, 蒋云飞, 等. 二黄二冬汤防治鼻咽癌放疗患者放射性脑损伤[J]. 中医学报, 2021, 36(11): 2470-2474.
- [8] 袁新国, 谢梦洲, 杨 英, 等. 二冬汤和有氧运动对2型糖尿病大鼠糖代谢和脂代谢的影响[J]. 重庆医学, 2018, 47(28): 3610-3613.
- [9] 王雅晴, 何泽云. 何泽云自拟二冬汤治疗慢性肾脏病验案2则[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7): 133.
- [10] 顾惠英, 冯高华, 倪 军. 二冬汤治疗慢性支气管炎合并念珠菌感染58例[J]. 河南中医, 2018, 28(11): 62.
- [11] 陈 川, 范忠泽. 中医名方临床集验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2017: 26-29.
- [12] 靳如娜, 郝丽霞, 王 涛, 等. 天冬饮片与标准汤剂的质量评价方法探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 111-118.
- [13] 周燕萍, 谈梦霞, 刘 瑜, 等. 川麦冬药材的特征图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(10): 96-100.
- [14] 赵海茵, 骆红飞, 王华刚, 等. 芪麦活血饮中药汤剂UPLC指纹图谱研究[J]. 浙江中医杂志, 2022, 57(1): 68-70.
- [15] 陈锦霞, 史紫娟, 陈伟钢. 天花粉(栝楼)标准汤剂的UPLC指纹图谱研究[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 419-422.
- [16] 于蓓蓓, 闫雪生, 周洪雷. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS谱-效相关的柴胡-黄芩药对解热质量标志物的筛选及含量测定方法的建立[J]. 中草药, 2022, 53(7): 1983-1992.
- [17] 李军山. 知母饮片、水煎剂和配方颗粒HPLC指纹图谱相关性研究[J]. 河北工业科技, 2018, 35(3): 220-225.
- [18] 杨 耘, 卢雪蕊, 宋平顺, 等. 甘草HPLC指纹图谱及抗氧化活性的谱效关系[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4): 607-617.
- [19] 严玉晶, 施文婷, 曹 嵌, 等. 人参饮片、水煎液、配方颗粒的HPLC指纹图谱相关性研究[J]. 中国药师, 2022, 25(6): 981-986.
- [20] 陈天玲, 肖 雪, 马晋芳. 不同产地荷叶药材HPLC指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(22): 28-31.

(收稿日期: 2023-03-08; 修回日期: 2023-11-01)

as ethyl gallate, peak 16 as chebulagic acid, peak 20 as ellagic acid, and peak 22 as chebulinic acid, all with similarity > 0.95. The clustering analysis results showed that 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus were clustered into two categories, with two batches of samples from Qinghai being clustered into one category and the remaining samples being clustered into another category. The results of principal component analysis showed that the cumulative variance contribution rate of the five components with eigenvalues > 1 was 84.088%. The relative deviation between the content of shikimic acid, gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, chebulagic acid, ellagic acid, and chebulinic acid in 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus determined by QAMS and ESM had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The HPLC fingerprints combined with QAMS can effectively evaluate the quality of Terminaliae Chebulae Fructus.

Key words: Terminaliae Chebulae Fructus; HPLC; fingerprints; QAMS; chemical pattern recognition; quality evaluation

诃子来源于使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实, 性平, 味苦、酸、涩, 归肺、大肠经, 临床用于治疗久泻久痢、便血脱肛、肺虚喘咳、久嗽不止、咽痛音哑等症。现代研究表明, 诃子具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎、降糖、护肝等药理学作用^[1-3]。诃子药材含多种化学成分, 其中主要含鞣质类和酚酸类^[4-6]。2020年版《中国药典(一部)》仅收录了诃子药材的鉴别、检查和浸出物含量^[7], 为完善诃子的质量控制方法, 本研究中建立了不同产地诃子药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 结合指纹图谱的相似度计算及化学计量学分析方法^[8-9], 对收集的18批诃子药材进行综合评价。并采用一测多评法^[10]对莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸8个成分进行测定, 利用外标法验证其科学性和可行性, 为诃子的质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 Waters 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ABS-135S 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); KH-250SPV 型台式双频数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 250 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号为 110831-201906, 纯度为 91.5%), 鞣花酸对照品(批号为 111959-201903, 纯度为 88.8%), 均购自中国食品药品检定研究院; 莽草酸对照品(批号为 138-59-0), 诃子酸对照品(批号为 18942-26-2), 柯里拉京对照品(批号为 23094-69-1), 没食子酸甲酯对照品(批号为 99-24-1), 没食子酸乙酯对照品(批号为 831-61-8), 诃黎勒酸对照品(批号为 18942-26-2), 纯度均不低于 98.0%, 均购自成都德思特生物技术有限公司; 诃子药材(编号为 S1-S18, 样品信息见表 1), 经江苏省南通卫生高等职业技术学校张志义副教授鉴定为正品; 甲醇(分析纯, 西陇科技股份有限公司); 磷酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂

有限公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 水为超纯水。

表 1 18 批诃子药材样品信息

Tab. 1 Information of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus

编号	产地	厂家	编号	产地	厂家
S1	云南	亳州市沪淮药业有限公司	S10	广西	亳州市沪淮药业有限公司
S2	云南	亳州市沪淮药业有限公司	S11	海南	亳州市沪淮药业有限公司
S3	云南	亳州市沪淮药业有限公司	S12	海南	亳州市沪淮药业有限公司
S4	广东	安国市聚药堂药业有限公司	S13	海南	安徽瑞博中药股份有限公司
S5	广东	安国市聚药堂药业有限公司	S14	海南	安徽瑞博中药股份有限公司
S6	广东	亳州市永刚饮片有限公司	S15	新疆	亳州市沪淮药业有限公司
S7	广东	亳州市永刚饮片有限公司	S16	新疆	亳州市沪淮药业有限公司
S8	广西	河北万修药业有限公司	S17	青海	安国市聚药堂药业有限公司
S9	广西	河北万修药业有限公司	S18	青海	安国市聚药堂药业有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 迪马 Diamonsil Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min 时 10%A, 10~20 min 时 10%A → 25%A, 20~25 min 时 25%A → 30%A, 25~33 min 时 30%A → 45%A, 33~40 min 时 45%A → 50%A, 40~46 min 时 50%A → 60%A, 46~50 min 时 60%A → 10%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸对照品各适量, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇超声(功率为 250 W, 频率为 40 kHz)使溶解, 制成莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸质量浓度分别为 992.8, 1 502.0, 365.7, 1 604.0, 205.4, 2 988.0, 980.4, 1 473.0 μg/mL 的混合对照品贮备液; 精密量取 3 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 即得莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸质量浓度分别为 119.1, 180.2, 43.9, 192.5, 24.6, 358.6, 117.6, 176.8 μg/mL 的混合

对照品溶液。

供试品溶液:取药材粉末(过3号筛)0.50 g,精密称定,精密加入70%甲醇50 mL,称定质量,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)40 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别精密吸取2.2项下供试品溶液和混合对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果8个成分与相邻色谱峰间的分离度均大于2.0,理论板数按莽草酸峰、没食子酸峰、没食子酸甲酯峰、柯里拉京峰、没食子酸乙酯峰、诃黎勒酸峰、鞣花酸峰、诃子酸峰计均大于8 900,且8个成分的对称因子在0.95~1.11之间。色谱图见图1。

精密度试验:取2.2项下供试品溶液(编号为S1)适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$),表明仪器精密度良好。

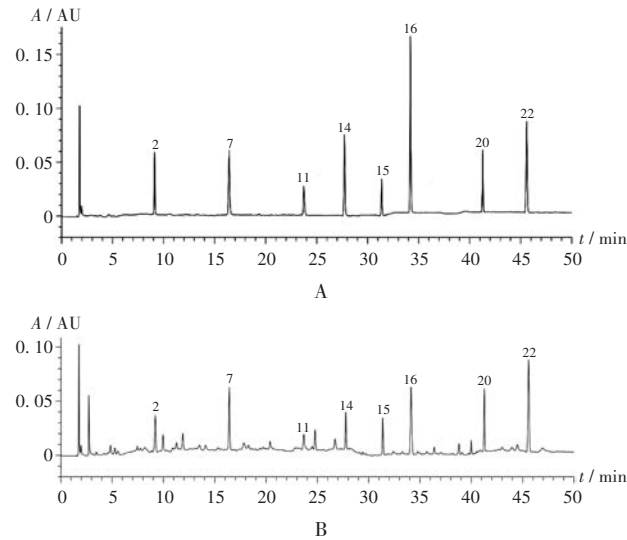
重复性试验:取样品(编号为S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0,2,6,12,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4 指纹图谱建立与分析

2.4.1 指纹图谱建立与相似度评价

取18批诃子药材粉末(过3号筛),按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色



2. 莽草酸 7. 没食子酸 11. 没食子酸甲酯 14. 柯里拉京
15. 没食子酸乙酯 16. 诃黎勒酸 20. 鞣花酸 22. 诃子酸

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

2. Shikimic acid 7. Gallic acid 11. Methyl gallate 14. Corilagin 15. Ethyl gallate 16. Chebulagic acid 20. Ellagic acid 22. Chebulinic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

谱图,将18批样品的色谱图CDF格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版),以编号为S1的药材样品的色谱图作为参照图谱,按中位数法,经多点校正自动匹配生成指纹图谱^[11],结果见图2。对18批诃子药材进行相似度评价,结果相似度均大于0.95。详见表2。

2.4.2 共有峰指认

由图3可知,18批药材样品有23个共有峰,通过与混合对照品溶液HPLC图(图1 A)比对,指认出2号峰为莽草酸,7号峰为没食子酸,11号峰为没食子酸甲酯,

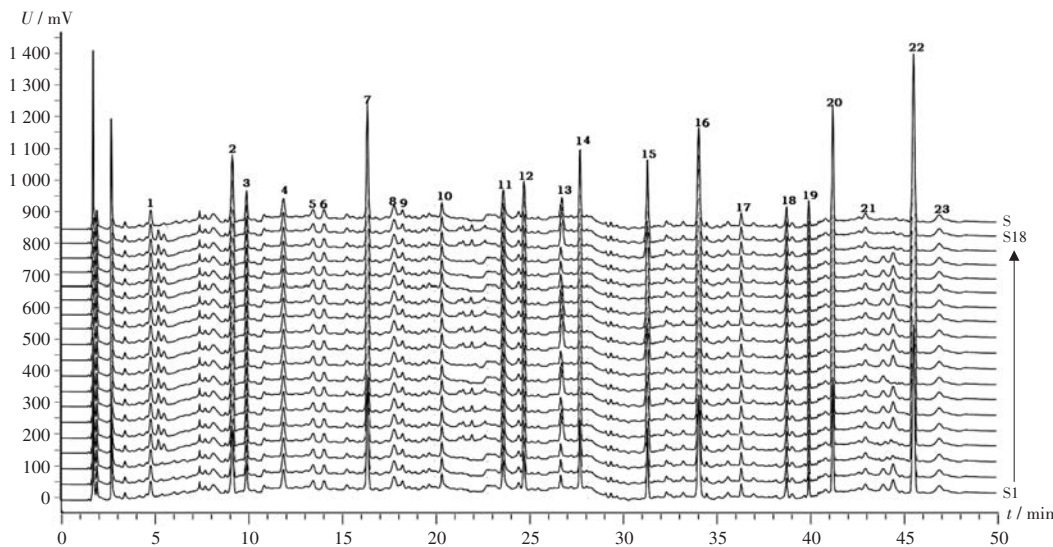


图2 18批诃子药材的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC overlay fingerprints of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus

表 2 18 批诃子药材的相似度

Tab. 2 Similarity of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus					
编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.956	S7	0.967	S13	0.966
S2	0.958	S8	0.955	S14	0.975
S3	0.963	S9	0.959	S15	0.967
S4	0.971	S10	0.979	S16	0.970
S5	0.952	S11	0.981	S17	0.991
S6	0.951	S12	0.977	S18	0.986

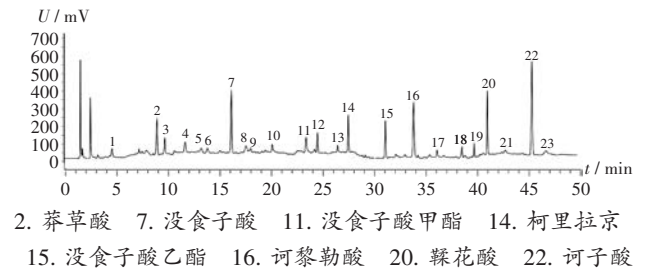


图 3 诃子药材共有峰高效液相色谱对照图谱
2. Shikimic acid 7. Gallic acid 11. Methyl gallate 14. Corilagin 15. Ethyl gallate 16. Chebulagic acid 20. Ellagic acid 22. Chebulinic acid
Fig. 3 HPLC reference chromatogram of the common peak of Terminaliae Chebulae Fructus

14 号峰为柯里拉京,15 号峰为没食子酸乙酯,16 号峰为诃黎勒酸,20 号峰为鞣花酸,22 号峰为诃子酸。选择峰形较好,与相邻色谱峰分离完全,峰面积响应值及保留时间适中的 14 号峰柯里拉京为参照峰(S)。

2. 4. 3 化学计量学分析

聚类分析:采用 SPSS 22. 0 统计学软件分析,以 18 批诃子药材的 23 个共有峰峰面积为变量,采用组间联接法对其进行聚类分析^[12]。当判别条件距离为 15 时,18 批诃子药材被聚为 2 类,其中编号为 S17 和 S18 的样品聚为一类,其余样品聚为一类。详见图 4。

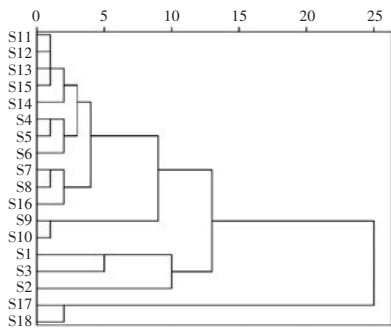


图 4 18 批诃子药材的系统聚类树状图
Fig. 4 Dendrogram for the systematic clustering of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus

主成分分析:以 18 批诃子药材的 23 个共有峰峰面积为变量进行主成分分析^[13-14],以主成分特征值大于 1 为依据,提取得到 5 个主成分的累积方差贡献率为 84. 088%,表明这 5 个主成分能代表 23 个共有峰在 18 批样品中 84. 088% 的信息。详见表 3。根据初始因子载荷

表 3 主成分特征值与方差分析结果

Tab. 3 Characteristic values and analysis of variance results of principal components			
主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)
1	10. 863	47. 231	47. 231
2	3. 212	13. 963	61. 194
3	2. 480	10. 784	71. 978
4	1. 588	6. 906	78. 884
5	1. 197	5. 204	84. 088

表 4 18 批诃子药材样品主成分得分与排名

Tab. 4 Score and ranking of principal components of 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus							
编号	主成分得分					综合得分	排名
	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	(F)	
S1	1. 058	0. 366	- 2. 082	- 2. 718	- 0. 373	0. 142	14
S2	0. 653	0. 296	- 1. 442	- 0. 732	- 0. 250	0. 155	13
S3	0. 175	0. 581	0. 792	- 0. 536	- 0. 194	0. 240	12
S4	0. 899	0. 968	0. 211	- 0. 443	- 0. 413	0. 631	4
S5	2. 949	3. 684	- 2. 517	- 0. 299	- 1. 388	1. 835	3
S6	0. 488	0. 575	1. 499	0. 160	- 0. 878	0. 521	8
S7	0. 594	0. 110	1. 858	- 0. 139	- 0. 640	0. 539	6
S8	0. 702	0. 297	1. 569	- 0. 934	0. 013	0. 569	5
S9	- 0. 021	0. 265	3. 432	0. 484	0. 262	0. 528	7
S10	0. 146	0. 773	1. 891	0. 007	0. 278	0. 471	10
S11	- 0. 298	0. 551	- 0. 024	0. 696	0. 798	0. 028	15
S12	- 0. 273	0. 594	- 0. 370	0. 851	0. 274	- 0. 015	16
S13	- 0. 023	- 0. 051	- 0. 937	0. 979	- 0. 477	- 0. 091	17
S14	0. 260	1. 468	- 1. 831	1. 313	3. 726	0. 493	9
S15	- 0. 297	- 0. 103	0. 539	- 0. 351	0. 128	- 0. 136	18
S16	0. 234	0. 658	0. 970	- 0. 383	0. 593	0. 370	11
S17	4. 617	- 3. 849	- 1. 482	- 0. 068	- 0. 379	1. 735	2
S18	5. 182	- 4. 284	- 0. 215	1. 478	- 0. 054	2. 290	1

矩阵及特征值计算特征向量,由此计算 5 个主成分的得分(F_1, F_2, F_3, F_4, F_5),以 5 个主成分的方差贡献率为权重系数,计算综合得分(F)。 $F = (47. 231\% \times F_1 + 13. 963\% \times F_2 + 10. 784\% \times F_3 + 6. 906\% \times F_4 + 5. 204\% \times F_5) / 84. 088\%$ 。结果青海产诃子药材(编号为 S17, S18)的综合得分最高,质量较好,不同产地及同一产地不同批次诃子药材质量存在一定差异,表明产地与诃子药材的质量差异有关。详见表 4。

2. 5 一测多评法测定诃子药材中 8 个成分的含量

2. 5. 1 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取 2. 2 项下混合对照品贮备液适量,加甲醇依次稀释为不同质量浓度的混合对照品溶液,按 2. 1 项下色谱条件进样测定,以对照品溶液的质量浓度($X, \mu\text{g} / \text{mL}$)为横坐标、各成分的峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,结果见表 5。

表5 线性关系考察结果

Tab. 5 Results of the linear relation test

待测成分	回归方程	R^2	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
没食子酸	$Y=252.58X+5.30$	0.999 6	19.86~277.98
莽草酸	$Y=103.43X-195.54$	0.999 8	30.04~420.56
没食子酸甲酯	$Y=2\,252.56X+28.34$	0.999 8	7.31~102.40
柯里拉京	$Y=98.55X+18.24$	0.999 9	32.08~449.12
没食子酸乙酯	$Y=329.88X+36.05$	0.999 7	4.11~57.51
诃黎勒酸	$Y=27.69X+74.25$	0.999 8	59.76~836.64
鞣花酸	$Y=105.20X+117.17$	0.999 6	19.61~274.51
诃子酸	$Y=104.36X+194.87$	0.999 5	29.46~412.44

精密度试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸峰面积的RSD分别为0.85%,0.96%,1.02%,0.54%,0.71%,0.39%,0.87%,1.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)粉末(过3号筛)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,6,10,16,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸峰面积的RSD分别为0.91%,1.05%,1.24%,0.86%,1.63%,1.47%,0.82%,1.31%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取稳定性试验项下供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算诃子药材中上述8个成分含量及RSD值。结果莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的平均含量分别为12.33,18.76,4.52,20.15,2.53,37.44,12.25,15.47 mg/g,RSD分别为0.96%,1.26%,1.38%,1.04%,1.62%,1.81%,0.99%,1.54%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(编号为S1)粉末(过3号筛)0.25 g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,分别加入2.2项下混合对照品贮备液3.0 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算8个成分的加样回收率。结果莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的平均加样回收率分别为98.75%,96.98%,97.52%,98.65%,98.22%,97.96%,99.02%,98.36%,RSD分别为1.42%,1.63%,1.02%,0.89%,1.36%,1.24%,1.66%,1.18%($n=6$),表明方法回收率良好。

2.5.2 相对校正因子(RCF)计算

采用多点校正法,以柯里拉京为内参物,计算莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的RCF。取2.5.1项下线性关系考察中的系列浓度对照品溶液的峰面积,按公式计算平均RCF值,作为定量用 $\text{RCF}_i = f_{si}/f_i = (A_s \times C_i)/(C_s \times A_i)$ 。式中, A_i 为待测成分峰面积; C_i 为待测成分浓度; A_s 为内参物峰面积; C_s 为内参物浓度; f_{si} 为RCF^[15-16]。结果见表6。

表6 诃子药材中7个成分的相对校正因子

Tab. 6 Relative correction factors of seven components in Terminaliae Chebulae Fructus

系列浓度对照品	没食子酸	莽草酸	没食子酸甲酯	没食子酸乙酯	诃黎勒酸	鞣花酸	诃子酸
1	0.797	0.971	0.389	0.294	3.580	0.920	0.956
2	0.786	0.982	0.381	0.292	3.517	0.932	0.941
3	0.766	0.967	0.380	0.290	3.463	0.916	0.933
4	0.789	0.981	0.398	0.301	3.548	0.929	0.908
5	0.795	0.960	0.393	0.304	3.523	0.920	0.935
6	0.782	0.955	0.388	0.296	3.561	0.94	0.946
$\bar{X}$	0.786	0.969	0.388	0.296	3.532	0.926	0.937
RSD(%)	1.42	1.13	1.78	1.82	1.17	0.98	1.73

2.5.3 RCF耐用性考察

精密量取2.2项下混合对照品溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件进样测定,分别考察不同品牌高效液相色谱仪、不同色谱柱(规格均为250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm)和不同柱温对没食子酸、莽草酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的RCF的影响。结果的RSD均小于2.0%($n=3$),表明不同色谱仪、色谱柱和柱温对没食子酸、莽草酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的RCF无显著影响。详见表7和表8。

2.5.4 待测色谱峰定位

根据2.5.3项下耐用性考察结果,以柯里拉京峰为参照峰,计算莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸相对于柯里拉京的相对保留时间(RRT)。结果的RSD均小于2.0%($n=3$),表明不同仪器、色谱柱和柱温对莽草酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸的RRT影响较小,故可以RRT作为色谱峰的定位。详见表7和表8。

2.5.5 一测多评法与外标法含量测定结果比较

取18批(编号为S1-S18)诃子药材粉末(过3号筛)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,分别采用一测多评法和外标法计算18批诃子药材中8个成分的含量。采用SPSS 22.0统计学软件对2种方法测定结果进行配对 t 检验,考察一测多评法的准确性。结果莽草酸、没食子

表 7 不同高效液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子和相对保留时间的影响 (n = 3)

Tab. 7 Effects of different HPLC instruments and chromatographic columns on RCF and RRT (n = 3)		没食子酸		莽草酸		没食子酸甲酯		没食子酸乙酯		诃黎勒酸		鞣花酸		诃子酸	
高效液相色谱仪型号	色谱柱型号	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT
e2695Waters	迪马 Diamonsil Plus C ₁₈ 柱	0.785	0.327	0.978	0.589	0.385	0.858	0.292	1.125	3.562	1.23	0.923	1.485	0.941	1.463
	Welch Ultimate AQ - C ₁₈ 柱	0.779	0.325	0.985	0.587	0.386	0.851	0.296	1.121	3.544	1.225	0.911	1.496	0.936	1.452
	Waters BEH C ₁₈ 柱	0.796	0.345	0.996	0.582	0.381	0.846	0.298	1.116	3.495	1.219	0.926	1.474	0.923	1.427
Shimadzu Essentia LC - 15C	迪马 Diamonsil Plus C ₁₈ 柱	0.782	0.329	0.976	0.601	0.384	0.844	0.301	1.139	3.466	1.254	0.917	1.469	0.938	1.439
	Welch Ultimate AQ - C ₁₈ 柱	0.789	0.328	0.972	0.595	0.379	0.861	0.289	1.101	3.573	1.206	0.909	1.471	0.934	1.463
	Waters BEH C ₁₈ 柱	0.785	0.327	0.985	0.583	0.399	0.869	0.285	1.128	3.581	1.239	0.936	1.418	0.958	1.471
Agilent 1260	迪马 Diamonsil Plus C ₁₈ 柱	0.791	0.326	0.981	0.576	0.386	0.852	0.294	1.143	3.513	1.208	0.945	1.471	0.941	1.495
	Welch Ultimate AQ - C ₁₈ 柱	0.795	0.323	0.983	0.580	0.388	0.836	0.299	1.125	3.481	1.228	0.939	1.445	0.933	1.463
	Waters BEH C ₁₈ 柱	0.776	0.33	0.989	0.581	0.375	0.861	0.303	1.117	3.562	1.266	0.928	1.461	0.915	1.454
$\bar{X}$		0.786	0.329	0.983	0.586	0.385	0.853	0.295	1.124	3.531	1.231	0.926	1.466	0.935	1.459
RSD(%)		0.88	1.94	0.73	1.35	1.74	1.20	1.97	1.11	1.21	1.62	1.34	1.55	1.29	1.32

注:RCF 为相对校正因子,RRT 为相对保留时间。表 8 同。
Note:RCF refers to relative correction factors,and RRT refers to relative retention time (for Tab. 7 - 8).

表 8 不同柱温对相对校正因子和相对保留时间的影响 (n = 3)

Tab. 8 Effect of different column temperatures on RCF and RRT (n = 3)		没食子酸		莽草酸		没食子酸甲酯		没食子酸乙酯		诃黎勒酸		鞣花酸		诃子酸	
柱温		RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT
25.0 °C		0.773	0.337	0.988	0.591	0.391	0.859	0.286	1.133	3.562	1.248	0.915	1.458	0.928	1.456
28.0 °C		0.781	0.328	0.975	0.582	0.375	0.874	0.279	1.125	3.484	1.233	0.936	1.489	0.931	1.448
30.0 °C		0.795	0.321	0.979	0.574	0.386	0.862	0.293	1.114	3.557	1.221	0.928	1.471	0.944	1.463
32.0 °C		0.776	0.322	0.984	0.596	0.379	0.841	0.284	1.149	3.538	1.209	0.931	1.449	0.946	1.471
35.0 °C		0.789	0.326	0.991	0.583	0.389	0.836	0.283	1.112	3.544	1.234	0.936	1.455	0.936	1.442
$\bar{X}$		0.783	0.327	0.983	0.585	0.384	0.854	0.285	1.127	3.537	1.229	0.929	1.464	0.937	1.456
RSD(%)		1.17	1.95	0.66	1.46	1.77	1.83	1.81	1.34	0.88	1.20	0.93	1.09	0.84	0.79

酸甲酯、没食子酸、没食子酸乙酯、诃黎勒酸、鞣花酸、诃子酸一测多评法与外标法含量测定结果无显著差异 (P = 0.413,0.394,0.438,0.092,0.248,0.559,0.546),表明一测多评法可用于测定诃子药材中 8 个成分的含量。详见表 9。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

分别考察 4 种流动相(甲醇 - 水、甲醇 - 0.1% 磷酸溶液、乙腈 - 水、乙腈 - 0.1% 磷酸溶液)的梯度洗脱效果,结果以乙腈 - 0.1% 磷酸溶液为流动相时,色谱峰峰形较好、色谱峰较多。利用二极管阵列检测器在 190 ~ 400 nm 波长范围内扫描混合对照品溶液,并参考文献[17 - 19],最终选择 270 nm 作为检测波长。

3.2 提取方法考察

分别考察了不同提取溶剂(不同浓度甲醇和乙醇)、不同提取方法(加热回流和超声)、不同提取时间(20,40,60 min)对提取效果的影响,综合考虑测定结果和可操作性,确定以 70% 甲醇为提取溶剂,超声提取 40 min

为提取方法。

3.3 指纹图谱分析

本研究中建立了 18 批诃子药材的 HPLC 指纹图谱,共确定了 23 个共有峰,相似度均大于 0.95,表明云南、广东、广西、海南、新疆、青海 6 个产地的诃子药材质量的一致性较好。其中,编号为 S17 和 S18 的诃子药材的相似度较其他批次高。聚类分析结果显示,诃子药材可聚为 2 类,编号为 S17 和 S18 的样品聚为一类,其余样品聚为一类,与相似度评价结果一致。主成分分析结果显示,降维生成的 5 个主成分能代表共有峰 84.088% 的信息。通过计算 18 批诃子药材的综合得分,编号为 S17 和 S18 的样品的综合得分最高,分别为 1.735,2.290,与相似度分析、聚类分析和主成分分析结果一致,表明产地为青海的诃子药材的质量较好。

3.4 方法评价

本研究中建立的 HPLC 指纹图谱结合一测多评法操作简便、结果准确,能较好地对比诃子药材进行综合质量评价,可为诃子药材质量标准的提升和临床使用提供参考。

表9 18批诃子药材中8个成分含量测定结果(mg / g, n = 3)

Tab. 9 Results of the content determination of eight components in 18 batches of Terminaliae Chebulae Fructus (mg / g, n = 3)

编号	柯里拉京	莽草酸		没食子酸甲酯		没食子酸		没食子酸乙酯		诃黎勒酸		鞣花酸		诃子酸	
		外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
S1	20.13	18.74	18.56	4.52	5.02	12.31	12.25	2.52	2.66	37.41	36.85	12.22	12.58	18.45	18.96
S2	17.69	16.52	16.78	5.12	5.63	14.25	14.3	2.63	2.45	35.62	36.21	10.12	10.45	17.85	17.41
S3	18.52	20.11	19.63	6.41	6.71	13.65	13.68	3.01	3.24	34.22	35.03	11.96	11.02	15.69	15.23
S4	19.32	14.36	14.96	3.25	3.55	14.17	14.12	2.74	2.85	36.52	35.78	14.74	14.13	16.89	17.22
S5	17.45	17.56	17.02	4.02	4.34	16.23	16.31	1.85	1.63	34.96	35.23	10.58	10.96	19.85	19.54
S6	18.14	16.36	16.12	5.74	5.45	13.36	13.31	3.66	3.74	36.54	37.41	12.34	12.14	21.36	21.65
S7	16.35	15.32	15.89	4.87	5.01	10.22	10.15	2.74	2.85	37.82	36.85	14.01	13.25	17.47	18.01
S8	20.12	16.41	16.84	6.33	6.65	17.56	17.48	2.63	2.43	34.12	34.85	13.55	13.87	16.98	17.41
S9	18.65	14.3	14.52	7.12	7.45	13.26	13.35	2.96	2.77	35.62	36.74	9.86	10.12	17.42	18.02
S10	19.36	18.69	18.41	5.49	5.12	12.33	12.41	3.42	3.22	33.85	34.12	10.63	10.31	14.56	14.03
S11	17.44	14.32	14.02	5.21	4.74	14.27	14.19	3.37	3.59	34.75	34.12	12.94	12.41	15.69	16.21
S12	15.25	16.33	16.02	6.14	6.55	15.69	15.81	3.12	3.42	35.12	35.63	13.45	13.84	17.82	18.14
S13	16.32	17.41	17.11	7.12	6.89	14.36	14.52	4.11	4.33	32.14	32.36	14.02	14.51	16.54	16.95
S14	17.12	16.02	15.85	5.44	5.12	11.55	11.44	2.87	3.13	33.47	34.62	12.64	13.02	17.41	17.85
S15	16.56	15.34	15.64	5.85	6.33	10.33	10.36	3.65	3.69	35.14	35.31	13.56	14.01	18.25	17.02
S16	19.39	17.41	17.01	6.01	5.73	14.12	14.21	4.52	4.62	36.96	37.12	11.41	12.33	16.32	16.44
S17	21.56	17.85	17.54	4.87	5.03	14.21	14.32	3.56	3.78	33.41	33.17	15.41	15.11	18.96	18.23
S18	18.63	16.33	16.12	4.69	4.41	15.22	15.16	3.67	3.75	35.75	35.41	12.69	13.11	20.33	19.67

参考文献

[1] 姜 慧,李克琴,李 旭,等. 诃子有效成分组对实验性肝纤维化的影响[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(5): 611 – 614.

[2] 种新禄,侯晓林,陈佳佳,等. 诃子中总多酚粗提取工艺及药理作用研究[J]. 北京农学院学报, 2014, 29(3): 64 – 67.

[3] 杨 雁. 诃子化学成分、生物活性及分析方法研究进展[J]. 西藏科技, 2016(9): 34 – 39.

[4] 李华爽,刘永建,杨洪柳,等. 诃子化学成分、药理作用机制、质量控制及炮制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2130 – 2141.

[5] 久 欣,李 君,张慧文,等. 不同产地诃子药材中 11 种成分的含量测定及其化学计量学综合评价[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 299 – 307.

[6] 安悦言,鞠成国,张 强,等. 诃子不同温度炮制品的化学成分含量变化及抗溃疡性结肠炎作用比较[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 332 – 337.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 194.

[8] 元晓静. 基于指纹图谱结合化学计量学的香砂平胃颗粒质量评价[J]. 中国药业, 2022, 31(23): 88 – 91.

[9] 熊 婧,李慧勇,李广生,等. 化学计量学在中药色谱分析中的应用探讨[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1681 – 1689.

[10] 张 敏,王 芳,刘惠娟,等. 一测多评法在中药质量控制中的应用[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(14): 51 – 55.

[11] 张畅然. 指纹图谱在中药质量控制中的应用探讨[J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(6): 124 – 125.

[12] 汪 涛,徐云霞,李伟莉,等. 聚类分析在中药方剂研究中的应用[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(12): 2035 – 2037.

[13] 廖延武,吴德玲,许凤清,等. 基于聚类分析和主成分分析评价不同产地荆芥药材质量[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(1): 78 – 83.

[14] 单会娇,王 健,何 华. 不同产地五味子种子挥发油中 6 个成分含量测定及主成分分析[J]. 中国现代中药, 2023, 25(2): 290 – 295.

[15] 朱晶晶,王智民,高慧敏,等. 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 220 – 228.

[16] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925 – 1928.

[17] 王 巍,张 强,陈九妹,等. 基于 UPLC 指纹图谱及多指标定量分析的诃子药材质量研究[J]. 化学工程师, 2021, 35(8): 26 – 30.

[18] 梁文仪,元 旗,梁林金,等. 基于化学计量学分析的诃子药材高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2018, 20(9): 1645 – 1649.

[19] 梁林金,元 旗,叶 婷,等. 基于总鞣质和 7 种成分同时测定的诃子药材质量控制研究[J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2018, 20(9): 1638 – 1644.

(收稿日期: 2023 – 04 – 22; 修回日期: 2023 – 10 – 17)