

基于多元统计分析的不同诃子属药材多指标成分研究

李国卫, 索彩仙, 吴文平, 潘礼业, 胡绮萍, 何嘉莹, 孙冬梅*

广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

摘要:建立了诃子属药材的多指标成分含量测定方法,为诃子属药材的质量评价提供依据。测定 44 批不同诃子属药材中 7 个鞣质类成分含量,并结合方差分析、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)评价诃子属 3 种不同药材的鞣质类成分差异。可见诃子属 3 种药材中 7 个成分含量存在明显差异,方差分析结果显示,不同品种间的成分含量差异均具有统计学意义($P < 0.05$);聚类分析、主成分分析及正交偏最小二乘法-判别分析结果显示,不同品种药材间 7 个化学成分含量上存在一定差异,主成分分析及正交偏最小二乘法-判别分析分析结果确定不同诃子属药材间的主要差异成分为安石榴苷 A、安石榴苷 B、诃子酸、柯里拉京、诃黎勒酸、没食子酸。本研究建立的方法简便、准确,为诃子属药材的质量控制提供了可靠的分析方法与参考依据。

关键词:诃子属;方差分析;聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘法-判别分析

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)1-0023-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.004

Multi-indicative component analysis of different species of *Terminalia* L. based on multivariate statistical analysis

LI Guo-wei, SUO Cai-xian, WU Wen-ping, PAN Li-ye, HU Qi-ping, HE Jia-ying, SUN Dong-mei*

Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China

Abstract: To establish a method for content determination of multi-indicative components of *Terminalia* L. and provide a reference for the quality evaluation of *Terminalia* L.. The content of 7 tannins were measured in 44 batches of different species of *Terminalia* L. and the analysis were conducted by variance analysis, cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to evaluate the differences in the tannin content among the three different species of *Terminalia* L.. The results showed that there were distinct differences among 7 tannin content among the three species of *Terminalia* L.. Variance analysis demonstrated that the differences of content were statistically significant ($P < 0.05$). HCA, PCA and OPLS-DA suggested the differences among the species and the results analyzed by PCA and OPLS-DA indicated that the main different components were punicalagin A, punicalagin B, chebulinic acid, corilagin, chebulagic acid and gallic acid. The method is convenient and accurate, which provides a reliable analytical method and reference for the quality control of *Terminalia* L..

Key words: *Terminalia* L.; analysis of variance; HCA; PCA; OPLS-DA

2020 年版《中国药典》收载的诃子属药材品种有诃子、绒毛诃子、西青果。诃子性苦、酸、平,归肺、大肠经,为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *T. chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的成熟果实,每年的秋、冬季果实成熟的时候采收;西青果别名藏青果,是使君子科植物诃子 *T.*

chebula Retz. 的干燥幼果^[1],每年的 9~10 月将尚未成熟的幼果采下,置于沸水中略煮烫,晒干或者是烘干。诃子、绒毛诃子及西青果化学成分较为相似,以可水解类鞣质为主^[2,4],还含有多酚类、黄酮类等化学成分。诃子具有抗病毒、抗炎、降血糖和镇咳等药理作用^[5,6],西青果清热生津,解毒,主治阴虚白喉,具有清除羟自由基、抗氧化等功效,临床常用于咽喉肿痛、咽炎等症状^[7],两者的药理作用、性味功效存在较大不同^[8]。

目前针对诃子属的研究多以单个品种的含量测定及特征图谱为主,但未见有对诃子属药材的整体质量研究^[9-14]。Zhao 等^[15]基于化学成分预测了诃子的 Q-marker 可能为没食子酸、诃子酸、诃藜勒酸、鞣花酸,在此基础上,本研究拟通过建立多指标含量测定方法,利用化学模式识别法,包括方差分析、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),探讨诃子、绒毛诃子和西青果三者的差异,以期对诃子属药材的质量评价及资源利用提供参考依据。

1 仪器与材料

Waters H-Class 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters Cortecs T3 C₁₈(2.1 mm × 150 mm, 1.6 μm);XP-26 型百万分之一天平,ME204E 型万分之一天平(瑞士 Mettler 公司);Milli-Q 超纯水净化系统(美国 Millipore 公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

没食子酸对照品(批号:110831-201906,含量:91.5%)、柯里拉京对照品(批号:111623-200301,含

量:≥98%),由中国食品药品检定研究院提供;诃子次酸对照品(批号:Yz0613211,含量:≥98%)由南京源植生物科技有限公司提供;安石榴苷(A&B)对照品(批号:CFS201901,含量:≥98%)、诃藜勒酸对照品(批号:CFS201901,含量:≥98%)、诃子酸对照品(批号:CFS201902,含量:≥98%),由武汉天植生物技术有限公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯;水为纯化水;其余试剂为分析纯。

实验所用药材共 44 批,经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定,H1 ~ H17 号样品为使君子科植物诃子 *T. chebula* Retz. 的干燥成熟果实;X1 ~ X14 号样品为使君子科植物诃子 *T. chebula* Retz. 的干燥幼果;RH1 ~ RH13 为使君子科植物绒毛诃子 *T. chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实,详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Cortecs T3 C₁₈(2.1 mm × 150

表 1 药材信息来源

Table 1 Information source of *Terminalia* L.

序号 No.	品名 Sample name	来源 Source	序号 No.	品名 Sample name	来源 Source	编号 No.	品名 Sample name	来源 Source
H1	诃子	广东广州	X1	西青果	安徽亳州	RH1	绒毛诃子	云南保山
H2	诃子	广东广州	X2	西青果	四川成都	RH2	绒毛诃子	云南临昌
H3	诃子	广东广州	X3	西青果	河北安国	RH3	绒毛诃子	云南临昌
H4	诃子	广东广州	X4	西青果	广东普宁	RH4	绒毛诃子	云南临昌
H5	诃子	广东广州	X5	西青果	河北保定	RH5	绒毛诃子	云南临昌
H6	诃子	广东广州	X6	西青果	广西南宁	RH6	绒毛诃子	云南临昌
H7	诃子	广西玉林	X7	西青果	安徽亳州	RH7	绒毛诃子	云南临昌
H8	诃子	广西玉林	X8	西青果	河北保定	RH8	绒毛诃子	云南临昌
H9	诃子	广西玉林	X9	西青果	广西玉林	RH9	绒毛诃子	云南临昌
H10	诃子	云南昆明	X10	西青果	安徽亳州	RH10	绒毛诃子	云南临昌
H11	诃子	云南昆明	X11	西青果	广西玉林	RH11	绒毛诃子	云南德宏州
H12	诃子	广东广州	X12	西青果	广西玉林	RH12	绒毛诃子	云南德宏州
H13	诃子	广东广州	X13	西青果	广东广州	RH13	绒毛诃子	云南德宏州
H14	诃子	广东广州	X14	西青果	安徽合肥	-	-	-
H15	诃子	广西南宁	-	-	-	-	-	-
H16	诃子	广西南宁	-	-	-	-	-	-
H17	诃子	广西南宁	-	-	-	-	-	-

注: H1 ~ H17: 诃子; X1 ~ X14: 西青果; RH1 ~ RH13: 绒毛诃子。

Note: H1-H17: Mature fruit of *T. chebula* Retz.; X1-X14: Immature fruit of *T. chebula* Retz.; RH1-RH13: Mature fruit of *T. chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt..

mm, 1.6 μm); 以乙腈(A)-0.2%磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱(0~3 min, 0%A; 3~5 min, 0%→3%A; 5~12 min, 3%→10%A; 12~20 min, 10%A; 20~25 min, 10%→14%A; 25~35 min, 14%→17%A; 35~40 min, 17%→21%A; 40~45 min, 21%→60%A; 45~50 min, 60%A), 流速为 0.35 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 270 nm。

2.2 对照品溶液制备

取诃子次酸、没食子酸、安石榴苷(A&B)、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度分别为 413.560、105.271、519.400、116.700、1609.552、495.635 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取本品粉末(过三号筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 用 70% 甲醇补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性

取“2.2”项下的对照品储备液, 供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 诃子次酸、没食子酸、安石榴苷 A、安石榴苷 B、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸与相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 拖尾因子在 1.00~1.05 之间。混合对照品溶液及供试品溶液见图 1。

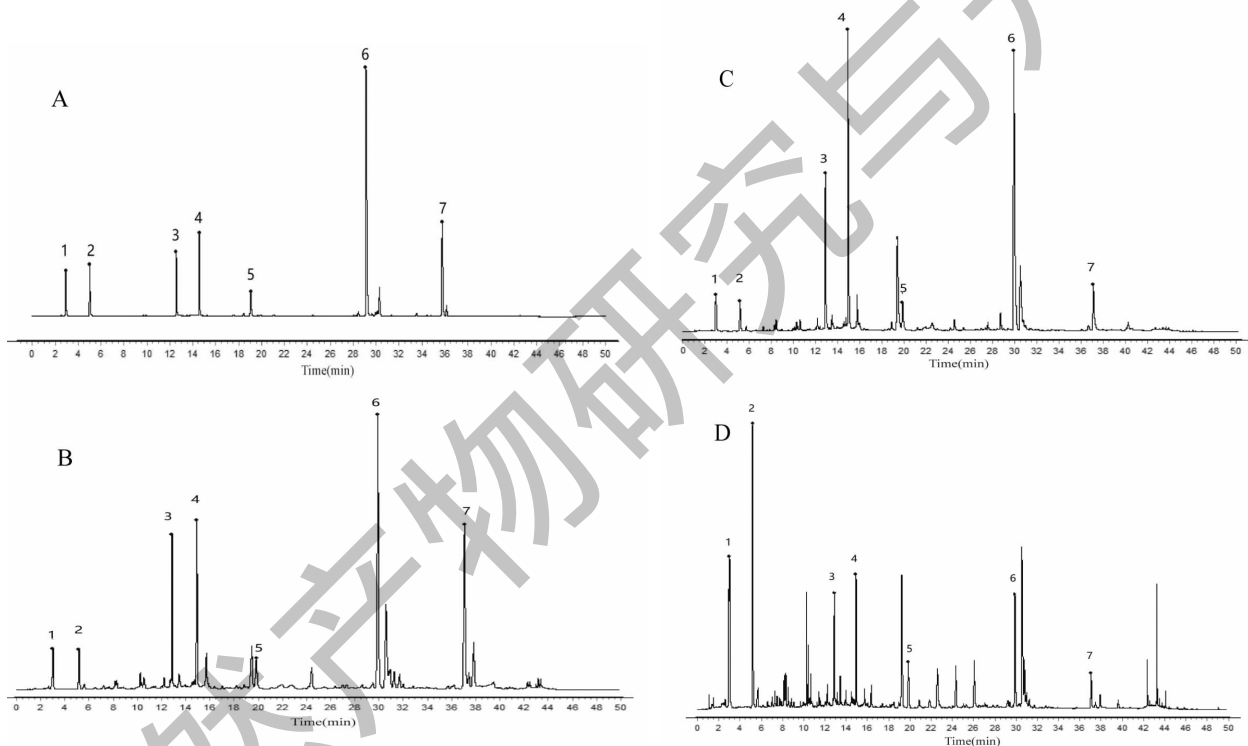


图 1 对照品、供试品 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chart of reference substance and sample

注: A: 混合对照品; B: 诃子; C: 西青果; D: 绒毛诃子。1: 诃子次酸; 2: 没食子酸; 3: 安石榴苷 A; 4: 安石榴苷 B; 5: 柯里拉京; 6: 诃藜勒酸; 7: 诃子酸。Note: A: Mixed references; B: Mature fruit of *T. chebulu* Retz.; C: Immature fruit of *T. chebulu* Retz.; D: Mature fruit of *T. chebulu* Retz. var. *tomentella* Kurt. 1: Chebulic acid; 2: Gallic acid; 3: Punicalagin A; 4: Punicalagin B; 5: Corilagin; 6: Chebulagic acid; 7: Chebulinic acid.

2.4.2 线性范围

取“2.2”项下的对照品储备液, 加甲醇稀释制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 其中诃子次酸质量浓度分别为 0.345、3.446、34.463、206.780、413.560、620.340 $\mu\text{g/mL}$, 没食子酸质量浓度分别为 0.351、3.509、35.090、105.271、210.542、315.812 $\mu\text{g/mL}$, 安石榴苷 A + B 质量浓度分别为 2.841、

28.410、259.700、519.400、831.040、1 038.800 $\mu\text{g/mL}$, 诃藜勒酸质量浓度分别为 0.340、3.404、34.039、1 005.970、1 609.552、2 011.940 $\mu\text{g/mL}$, 柯里拉京质量浓度分别为 0.389、3.890、38.900、116.700、233.400、350.100 $\mu\text{g/mL}$, 诃子酸质量浓度分别为 0.346、3.459、34.594、495.635、793.016、991.270 $\mu\text{g/mL}$, 以峰面积为纵坐标(y), 质量浓度

($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标(x)进行线性回归,得到各个对照品的线性关系良好, R^2 值均值0.999 5以上,结果见表2。

2.4.3 精密度试验

取同一供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件连续进样6次,诃子酸、没食子酸、安石榴苷 A、安石榴苷 B、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸的峰面积 RSD <2%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验

取同一供试品溶液,按“2.1”项下的的色谱条件,分别于0、2、4、6、8、12 h 进样测定,诃子酸、没食子酸、安石榴苷 A、安石榴苷 B、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸的峰面积 RSD <2%,表明供试品溶液在12 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验

取样品粉末约0.25 g,平行6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定,诃子酸、没食子酸、安石榴苷 A、安石榴苷 B、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸的峰面积 RSD <2%,表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率考察

精密称取已知含量的诃子药材(H17)0.125 g,平行6份,加入与样品中含量等量的对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算加样回收率。测得7个成分平均加样回收率均在97.34%~99.75%,RSD <3%,结果见表3。

表2 回归方程及线性范围
Table 2 Regression equation and linear range

指标成分 Component	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 Linear range($\mu\text{g}/\text{mL}$)
诃子次酸 Chebulic acid	$y = 2\,466.5x - 3\,958.1$	$R^2 = 0.999\,9$	0.345 ~ 620.340
没食子酸 Gallic acid	$y = 9\,452.7x - 11\,365$	$R^2 = 0.999\,9$	0.351 ~ 315.812
安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	$y = 6\,426.9x - 206.04$	$R^2 = 0.999\,5$	2.841 ~ 1\,038.800
柯里拉京 Corilagin	$y = 5\,346x - 5\,610.7$	$R^2 = 0.999\,9$	0.389 ~ 350.100
诃藜勒酸 Chebulagic acid	$y = 4\,513.2x - 15\,896$	$R^2 = 0.999\,9$	0.340 ~ 2\,011.940
诃子酸 Chebulinic acid	$y = 5\,980x - 19\,583$	$R^2 = 0.999\,8$	0.346 ~ 991.270

表3 加样回收考察

Table 3 Recovery test

指标成分 Component	称样量 Sample weighing (g)	样品量 Sample amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	加样回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
诃子次酸 Chebulic acid	0.124 9	3.856 2	7.806 3	3.971 0	99.47	99.75	0.99
	0.125 0	3.859 3	7.774 1	3.982 0	98.31		
	0.124 8	3.853 1	7.812 3	3.970 0	99.73		
	0.125 3	3.868 6	7.811 5	3.899 0	101.13		
	0.125 9	3.887 1	7.824 6	3.965 0	99.31		
没食子酸 Gallic acid	0.125 6	3.877 8	7.867 4	3.968 0	100.54	99.27	2.00
	0.124 9	0.881 2	1.604 8	0.731 9	98.86		
	0.125 0	0.881 9	1.631 1	0.731 9	102.36		
	0.124 8	0.880 5	1.597 7	0.731 9	98.00		
	0.125 3	0.884 0	1.601 1	0.731 9	97.98		
	0.125 9	0.888 2	1.600 8	0.731 9	97.36		
	0.125 6	0.886 1	1.625 5	0.731 9	101.02		
安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	0.124 9	7.582 6	13.511 1	6.169 0	96.10	98.05	1.37

续表 3(Continued Tab. 3)

指标成分 Component	称样量 Sample weighing (g)	样品量 Sample amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	加样回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
柯里拉京 Corilagin	0.125 0	7.588 6	14.024 6	6.569 0	97.97	98.06	1.85
	0.124 8	7.576 5	13.664 2	6.102 0	99.77		
	0.125 3	7.606 8	14.141 3	6.592 0	99.13		
	0.125 9	7.643 3	13.807 1	6.270 0	98.31		
	0.125 6	7.625 0	14.289 0	6.869 0	97.01		
	0.124 9	1.636 0	3.657 2	2.103 0	96.11		
	0.125 0	1.637 3	3.611 3	2.003 0	98.55		
	0.124 8	1.634 7	3.652 1	2.110 0	95.61		
	0.125 3	1.641 3	3.595 0	1.983 0	98.52		
诃藜勒酸 Chebulagic acid	0.125 9	1.649 1	3.630 0	1.993 0	99.39	98.20	1.97
	0.125 6	1.645 2	3.619 4	1.971 0	100.16		
	0.124 9	13.435 5	23.751 2	10.729 0	96.15		
	0.125 0	13.446 2	24.200 2	10.802 0	99.56		
	0.124 8	13.424 7	23.756 2	10.689 0	96.66		
	0.125 3	13.478 5	24.272 8	10.776 0	100.17		
	0.125 9	13.543 0	23.882 4	10.708 0	96.56		
	0.125 6	13.510 8	24.377 3	10.851 0	100.14		
	诃子酸 Chebulinic acid	0.124 9	2.170 8	3.625 3	1.519 0		
0.125 0		2.172 5	3.704 7	1.539 0	99.56		
0.124 8		2.169 0	3.632 3	1.511 0	96.84		
0.125 3		2.177 7	3.711 1	1.541 0	99.51		
0.125 9		2.188 1	3.653 7	1.531 0	95.73		
0.125 6		2.182 9	3.731 6	1.602 0	96.67		

2.4.7 结果与分析

2.4.7.1 含量测定结果

精密称取 44 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得到含量测定结果,见表 4。结果显示,3 种药材的 7 个成

分含量存在显著差异,RSD 在 33.03% ~ 77.32% 之间。其中,RSD \geq 50% 的包括 6 个成分,分别为没食子酸(49.5%)、安石榴苷 A & 安石榴苷 B、柯里拉京、诃藜勒酸、诃子酸;诃子次酸在不同批次样品中较为稳定,RSD 为 33.03%。

表 4 含量测定结果

Table 4 Content determination results(mg/g)

编号 No.	诃子次酸 Chebulic acid	没食子酸 Gallic acid	安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	柯里拉京 Corilagin	诃藜勒酸 Chebulagic acid	诃子酸 Chebulinic acid
X1	31.14	6.24	87.92	11.87	162.98	20.59
X2	31.47	8.69	94.18	11.72	142.07	20.39
X3	35.97	8.12	84.76	12.70	148.88	14.76
X4	37.86	10.07	86.88	11.65	140.17	16.83
X5	31.06	9.76	91.38	10.82	140.56	21.30
X6	27.56	7.15	102.37	10.71	144.44	16.05

续表 4 (Continued Tab. 4)

编号 No.	诃子次酸 Chebulic acid	没食子酸 Gallic acid	安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	柯里拉京 Corilagin	诃藜勒酸 Chebulagic acid	诃子酸 Chebulinic acid
X7	31.99	9.35	90.73	11.69	140.21	16.65
X8	30.96	7.81	86.26	11.15	144.85	15.28
X9	36.24	8.64	92.01	12.26	146.87	17.20
X10	38.68	10.18	82.17	11.08	154.43	10.97
X11	33.16	7.55	76.17	10.89	154.42	23.10
X12	34.73	7.57	75.73	11.28	155.43	19.35
X13	28.93	7.38	103.20	10.36	131.95	10.17
X14	33.49	10.31	92.43	11.33	136.09	17.16
H1	12.60	4.62	19.10	8.51	54.07	43.37
H2	19.28	5.66	31.63	8.12	84.55	53.99
H3	20.08	2.78	39.16	10.12	103.38	22.43
H4	14.39	4.82	20.03	5.62	49.89	41.40
H5	10.40	3.02	13.38	4.83	44.07	34.04
H6	17.12	6.17	30.22	8.29	64.78	38.71
H7	19.32	3.43	32.40	8.68	79.60	32.11
H8	17.64	3.11	34.59	8.97	79.48	17.37
H9	16.75	3.50	36.15	8.50	70.67	26.98
H10	11.96	3.48	25.97	6.47	67.07	56.69
H11	13.26	3.08	25.89	7.66	62.30	39.24
H12	17.66	4.07	37.07	8.15	65.25	13.82
H13	20.68	2.63	36.83	9.93	84.75	17.94
H14	11.30	4.28	21.58	5.48	56.64	49.44
H15	30.81	5.45	61.10	17.63	108.11	13.64
H16	32.82	5.85	53.50	16.84	122.24	20.37
H17	30.87	7.06	60.71	13.10	107.57	17.38
RH1	24.37	8.59	16.94	1.87	28.58	3.59
RH2	14.01	5.20	12.48	1.76	20.23	4.40
RH3	32.28	8.91	14.32	2.28	16.80	1.68
RH4	17.57	4.48	13.27	1.13	6.49	0.57
RH5	27.03	9.18	17.53	2.57	24.23	7.86
RH6	21.20	11.51	13.18	1.40	14.44	3.81
RH7	24.45	6.66	17.86	3.26	29.46	7.35
RH8	19.13	8.67	12.36	1.67	19.57	3.24
RH9	30.61	9.00	17.47	2.11	23.94	5.00
RH10	23.81	4.25	17.64	2.13	18.76	1.09
RH11	18.75	12.01	8.35	2.08	23.73	4.63
RH12	28.50	17.14	6.05	1.17	12.83	2.40
RH13	27.10	19.67	5.68	1.23	16.81	7.53
均值 Avg.	24.75	7.21	45.42	7.75	81.90	18.91
RSD(%)	33.03	49.50	72.24	58.50	63.92	77.32

2.4.7.2 方差分析

以上述7个含量测定指标为检验变量,诃子、西青果、绒毛诃子作为分组变量,采用SPSS 20.0软件,通过Shapiro-Wilk检验法对44批药材样品7个成分数据进行正态分布验证,结果显示7个指标的sig.值均小于0.05,不服从正态分布;因此采用非参数检验法(秩和检验)进行下一步分析,选择Kruskal-Wallis法进行对三个不同基原的7个指标进行两两比较,结果见表5。其中,安石榴苷A & B、诃藜勒酸在三组样品间均有极显著差异($P < 0.01$);诃子次酸在诃子与西青果、西青果与绒毛诃

子间有极显著差异($P < 0.01$),在诃子与绒毛诃子间无显著差异;柯里拉京在诃子与绒毛诃子、西青果与绒毛诃子间有极显著统计学差异($P < 0.01$),在诃子与西青果无显著差异;没食子酸在诃子与绒毛诃子、诃子与西青果间有极显著差异($P < 0.01$);在绒毛诃子与西青果间无显著差异;诃子酸在西青果与绒毛诃子、诃子与绒毛诃子间有极显著差异($P < 0.01$),在诃子与西青果间无显著差异;上述分析结果说明诃子、西青果、绒毛诃子三者间的成分含量存在差异。

表5 各含量指标分析表

Table 5 Analysis of content determination

成分 Component	样品 Sample	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	诃子 <i>T. chebula</i> Retz.
诃子次酸 Chebulic acid	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	#	#
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	*
没食子酸 Gallic acid	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	*	#
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	#
安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	#	#
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	#
柯里拉京 Corilagin	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	#	*
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	#
诃藜勒酸 Chebulagic acid	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	#	#
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	#
诃子酸 Chebulinic acid	西青果 Immature fruit of <i>T. chebula</i> Retz.	#	*
	绒毛诃子 <i>T. chebula</i> Retz. var. <i>tomentella</i> Kurt.	-	#

注:# $P < 0.01$; * $P > 0.05$ 。

2.4.7.3 聚类分类

运用SPSS软件对44批药材样品7个成分的含量测定结果进行系统聚类,采用组间平均数联结法,以余弦距离作为样品相似度的距离公式,样品聚为3类(见图2)。13批绒毛诃子样品(RH1~RH13)聚为一类,14批诃子样品(H1~H14)聚为一类,14批西青果样品(X1~X14)与3批诃子(H15~H17)样品聚为一类。从总体数据来看,不同品种药材样品间具有明显差异,其中绒毛诃子与其他两种药材

的差异较大,距离为25时就可以归为不同的类型;西青果和诃子具有一定的相似性,当距离为20时,可以聚为一类,当距离为15时,两者可以区分,但仍然有部分诃子样品未能在西青果样品中分离,在距离为5时才能完全分离,说明两者具有较高的相似性。

2.4.7.4 主成分分析

以7个成分含量测定结果为变量,采用SPSS 22.0软件进行主成分分析,由表6可知,共提取了2

个特征值大于 1 的主成分,累积方差贡献率达 86.674%,表明可以用 2 个主成分反映不同样品主要的质量特征。从表 7 可以看出,在第一主成分有较高载荷的包括安石榴苷 A&B、柯里拉京、河黎勒酸;在第二主成分有较高载荷的包括没食子酸、诃子酸。(载荷值 > 0.80) 以降维得到的 2 个主成分得分作为 X、Y 轴,得到 44 个样品的散点分布图,结果显示,3 种药材样品能实现较好区分,同类样品基本能聚在同一区域,说明 3 种药材之间的成分存在一

定差异,结果见图 4。三批诃子样品(H15 ~ H17)与西青果样品聚在同一区域,与聚类分析结果一致。3 种样品的主成分得分分析:西青果样品除 X1 的主成分 2 评分为-0.08 外,2 个主成分评分基本为正值;绒毛诃子样品主成分 1 评分均为负值,主成分 2 评分除个别批次(RH1)外均为正值;诃子样品除 H15 ~ H17 外,其他样品的两个主成分评分基本为负值,结果见表 8。

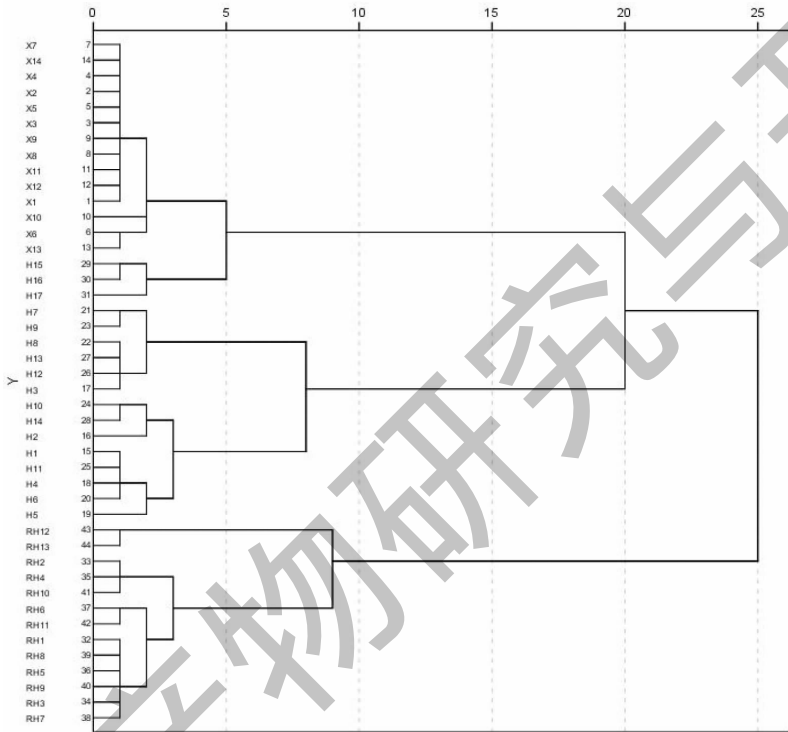


图 2 44 批药材样品聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis results of 44 batches of samples

2.4.7.5 OPLS-DA

依据 PCA 结果,对 3 种不同药材样品进行 OPLS-DA 分析。该 OPLS-DA 模型, $R^2X(\text{cum}) = 0.976$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.936$, $Q^2(\text{cum}) = 0.923$, 均大于 0.5,说明模型稳定可靠,可用于使君子科不同药材样品的区分。结果显示,数据的分类算法中

OPLS-DA 的效果较好,可使 3 种样本点完全被分开,相互之间没有样品出现交叉的情况,且全部样品均位于 95% 可信区间之内,说明 3 种样品在这 7 种化学成分含量上存在一定的差异,结果见图 5。采用变量重要性投影值(variable importance in project, VIP)筛选体现 3 种样品差异性的标志物,其中 VIP

表 6 特征根、各主成分的贡献率

Table 6 Contribution rate of characteristic roots and principal components

成分 Component	特征根值 Characteristic root value	方差贡献率 Variance contribution (%)	累积贡献率 Cumulative variance contribution (%)
1	3.237	53.943	53.943
2	1.964	32.731	86.674

表 7 各因子初始因子载荷矩阵

Table 7 Initial factor load matrix of each factor

成分 Component	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2
诃子次酸 Chebulic acid	0.687	0.672
没食子酸 Gallic acid	-0.026	0.854
安石榴苷 A + B Punicalagin A + B	0.958	0.109
柯里拉京 Corilagin	0.919	-0.250
诃藜勒酸 Chebulagic acid	0.984	-0.065
诃子酸 Chebulinic acid	0.135	-0.848

表 8 主成分得分

Table 8 Principal component score

编号 No.	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	编号 No.	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	编号 No.	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2
H1	-0.53	-1.55	X1	1.29	-0.08	RH1	-1.03	0.82
H2	-0.06	-1.47	X2	1.21	0.27	RH2	-1.35	-0.02
H3	0.16	-0.93	X3	1.32	0.49	RH3	-0.91	1.23
H4	-0.70	-1.29	X4	1.26	0.79	RH4	-1.39	0.18
H5	-0.96	-1.43	X5	1.10	0.38	RH5	-0.93	0.85
H6	-0.30	-1.03	X6	1.13	0.09	RH6	-1.28	1.07
H7	-0.12	-1.11	X7	1.16	0.48	RH7	-0.90	0.43
H8	-0.18	-0.78	X8	1.09	0.30	RH8	-1.27	0.64
H9	-0.24	-1.03	X9	1.35	0.52	RH9	-0.88	1.07
H10	-0.47	-2.04	X10	1.26	1.01	RH10	-1.06	0.35
H11	-0.46	-1.56	X11	1.13	0.11	RH11	-1.28	0.97
H12	-0.32	-0.52	X12	1.17	0.27	RH12	-1.23	2.09
H13	0.01	-0.77	X13	1.05	0.37	RH13	-1.24	2.18
H14	-0.69	-1.72	X14	1.16	0.66	-	-	-
H15	1.07	-0.14	-	-	-	-	-	-
H16	1.11	-0.21	-	-	-	-	-	-
H17	0.78	0.09	-	-	-	-	-	-

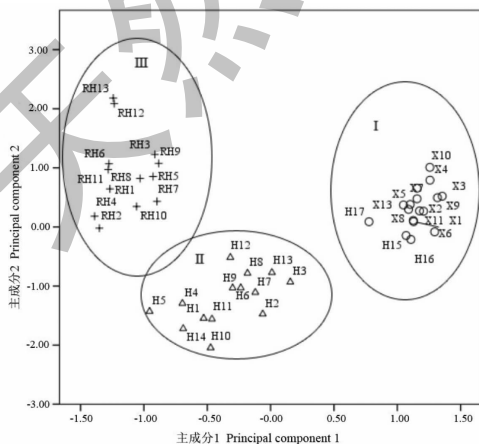


图 3 主成分得分分布图

Fig. 3 Score plot of principal components

值大于 1 的成分包括 3 个,分别为诃子酸(VIP = 1.06)、安石榴苷 A&B(VIP = 1.01),是体现 3 种样品间差异的主要标志性成分,其余峰 VIP 值小于 1,对样品的区分影响较小,结果见图 5。

3 分析与讨论

3.1 检测条件的确定

安石榴苷 A 与安石榴苷 B 为一对同分异构体,且容易发生相互转化,本研究已在色谱条件下将两者分离,呈双峰,但考虑到两者容易发生相互转化若单独计算会影响加样回收率的计算,故以 2 个色谱峰峰面积之和计算。在 200 ~ 400 nm 处进行全波长扫描,诃子次酸、没食子酸、安石榴苷 A、安石榴苷

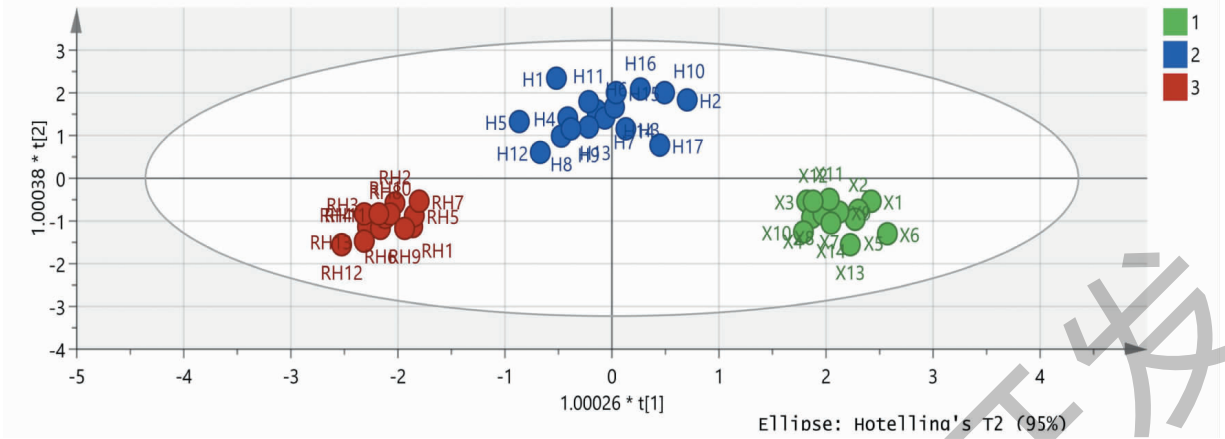


图4 OPLS-DA 得分图

Fig. 4 Score plot of OPLS-DA

注:横坐标 $t[1]$ 为预测主成分值;纵坐标 $t[2]$ 为正交主成分值。

Note: X-axis is predicted principal component value; Y-axis is orthogonal principal component value.

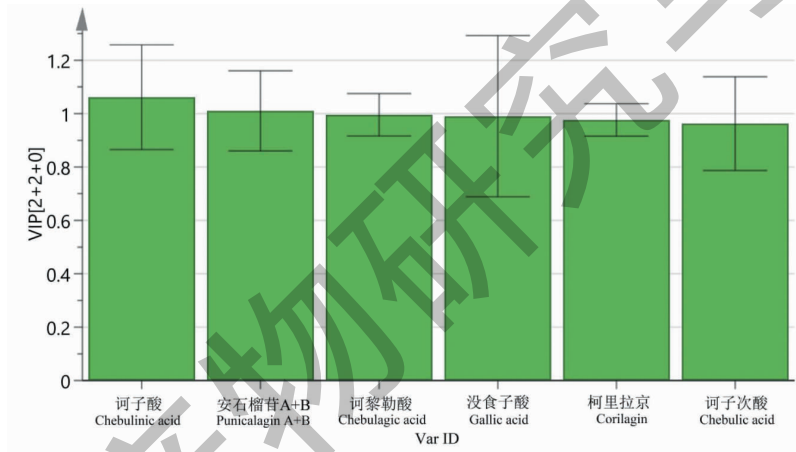


图5 7个化学成分的VIP值

Fig. 5 VIP value of 7 chemical components

B、柯里拉京、诃黎勒酸、诃子酸在 270 nm 均有最大吸收,故选择 270 nm 为同时测定波长。

3.2 多指标含量测定结果分析

本研究测定了 2020 年版《中国药典》收录的 3 种诃子属药材诃子、绒毛诃子、西青果中 7 种化学成分的含量,并结合方差分析、聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析等化学计量法分析了不同种药材含量的差异。方差分析结果显示,诃子次酸、安石榴苷 A& 安石榴苷 B、柯里拉京、诃黎勒酸 5 个成分在西青果中含量均值均最高,且与其他两种药材的含量均值均有明显差异, $P < 0.05$ 具有统计学意义;诃子酸在诃子中含量均值最高,且与其他两种药材的含量均值均有明显差异 ($P < 0.01$) 具

有统计学意义;没食子酸在绒毛诃子中含量最高,但与西青果的含量差异不大,但两者与诃子的含量均值有明显差异 ($P < 0.01$) 具有统计学意义。聚类分析、主成分分析与正交偏最小二乘法-判别分析均可以将不同样品按品种进行划分,主成分分析结果显示安石榴苷 A& 安石榴苷 B、柯里拉京、诃黎勒酸、没食子酸、诃子酸为体现不同品种差异的主要因素,正交偏最小二乘法-判别分析结果显示诃子酸、安石榴苷 A& 安石榴苷 B 为区分不同品种的主要因素。综上所述,不同诃子属药材的化学成分组成较为接近,其差异主要体现在不同化学成分的含量上,安石榴苷 A、安石榴苷 B、诃子酸、柯里拉京、诃黎勒酸、没食子酸等成分在不同诃子属药材间的差异较

大,建议建立对诃子属药材的进行多指标质量控制,才能全面评价该类药材的质量。

在主成分分析结果中有三批诃子样品(H15~H17)其得分分布与西青果靠近,分析含量测定数据发现,这三批样品的含量数据均接近诃子、西青果整体含量均值的中间值,而诃子为使君子科植物诃子干燥成熟果实,而西青果则为使君子科植物诃子的干燥幼果,推测可能是由于果实成熟度不足导致。从本研究中的结果可以看出,除诃子酸外,诃子的其余6个指标均远低于西青果,诃子酸则大幅度高于西青果,说明诃子在成熟的过程中,其含量组成会发生转化,也从另一方面为诃子与西青果药效特点不一致提供了依据。

本研究建立了诃子属药材7个指标成分的UP-LC含量测定方法,对44个不同药材样本进行了测定,并采用方差分析、聚类分析、主成分分析与正交偏最小二乘法-判别分析对含量测定结果进行了分析,分析结果显示3种诃子属药材的成分组成存在明显差异,为诃子属药材的质量控制提供了可靠的分析方法与参考依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 135, 194.
- 2 Ding G, Liu YZ, Song MP, et al. Polyphenols from *Terminalia chebula*[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2001, 32: 193-196.
- 3 Liu YM. The study on the chemical components of saxifrage and *Terminalia*[D]. Guiyang: Guizhou University(贵州大学), 2007.
- 4 Yang XY, Tang RP. Study on chemical components of *Terminalia chebula* Retz[J]. J Xichang Univ; Nat Sci(西昌学院学报:自科版), 2012, 26(2): 65-66.
- 5 Jiang H, Li KQ, Li X, et al. Protective effects of effective components group of medicine *Terminalia* fruit on experimen-

- tal liver fibrosi[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2013, 40: 611-614.
- 6 Zhong XL, Hou XL, Chen JJ, et al. Research on the process of polyphenols crude extract from *Terminalia* and its pharmacological effect[J]. J Beijing Univ Agr(北京农学院学报), 2014, 29(3): 64-67.
- 7 Wang JS, Xie YT, Han P, et al. Identification and clinical application of Chinese white olives, immature fruit of *Terminalia* and *Terminalia chebula* Retz. [J]. Med J West China(西部医学), 2010, 22: 2147-2149.
- 8 Sun P. Identification and clinical application of Chinese white olives, immature fruit of *Terminalia* and *Terminalia chebula* Retz. [J]. Electron J Clin Med Lit(临床医药文献电子杂志), 2017, 4: 10673-10676.
- 9 Wang W, Wen CC, Jie SQ, et al. Simultaneous determination of shikimic acid, gallic acid and ellagic of *Fructus Chebulae* by HPLC[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2017, 32: 819-821.
- 10 Liang LJ, Qi Q, Ye T, et al. Study on quality evaluation of *Terminalia chebular* based on simultaneous determination of total tannin and 7 components[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Tech(世界科学技术-中医药现代化), 2018, 20: 1638-1644.
- 11 Cha DC, Fu W, Zhao XH. Quality control of *Fructus Chebulae* by colorimetric method and HPLC fingerprinting[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25: 937-939.
- 12 Yi CM, Han SL, Tian CW, et al. Study on HPLC fingerprints and pattern recognition of *Terminalia chebula* Retz. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41: 1467-1469.
- 13 Wang W, Zhu QZ, Zhang Q, et al. HPLC Fingerprints of raw and processed *Terminalia chebula* Retz. [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2018, 32(1): 64-67.
- 14 Chen WJ, Liang WY, Li S, et al. Quality evaluation of *Terminalia billericia* based on HPLC fingerprint and multi-components simultaneous determination [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48: 1210-1215.
- 15 Zhao L, Liao CP, Yang XJ, et al. Research progress in *Terminalia chebula* and its predictive analysis on Q-marker[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51: 2732-2744.