

基于化学模式识别及多指标定量分析比较诃子和西青果的差异^Δ

索彩仙*,邱韵静,吴文平,孙冬梅,李秀枝,潘礼业,李国卫[#](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,广东佛山 528244)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)20-2512-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.15

摘要 目的:为鉴别诃子和西青果提供参考。方法:采用超高效液相色谱(UPLC)法。色谱柱为 Waters Cortecs T3 C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.35 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为270 nm,进样量为1 μL。以没食子酸为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立17批诃子和14批西青果药材的指纹图谱并进行相似度评价;通过与对照品、紫外吸收光谱和相关文献对比,指认共有峰。采用SPSS 20.0、SIMCA 14.1软件进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)以筛选主要差异成分;采用上述UPLC法测定诃子和西青果中主要差异成分的含量并比较。结果:诃子和西青果的UPLC指纹图谱中均有共有峰8个,指认峰1、2、3、4、6、7、8分别为诃子次酸、没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、柯里拉京、诃子鞣酸、诃子酸;17批诃子的相似度为0.92~0.99,14批西青果的相似度均大于0.99,诃子对照指纹图谱与西青果对照指纹图谱的相似度为0.909。PCA显示,诃子与西青果存在一定差异;PLS-DA结果与PCA结果一致,其模型的变量重要性投影(VIP)值显示,峰5、4、7、3、2的VIP值均大于1。31批样品中,没食子酸(峰2)、安石榴苷A(峰3)、安石榴苷B(峰4)、诃子鞣酸(峰7)的含量分别为2.63~10.31、5.37~44.63、8.02~60.77、44.07~162.98 mg/g,RSD分别为40.14%、47.91%、53.97%、36.22%(n=31)。诃子和西青果中上述4个成分组间比较差异均有统计学意义(P<0.05)。结论:诃子和西青果存在明显差异,没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸可作为鉴别二者的主要差异成分。

关键词 诃子;西青果;化学模式识别;多指标定量分析;主成分分析;偏最小二乘-判别分析;差异

Comparison of Component Differences in Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus Based on Chemical Pattern Recognition and Multi-index Quantitative Analysis

SUO Caixian, QIU Yunjing, WU Wenping, SUN Dongmei, LI Xiuzhi, PAN Liye, LI Guowei (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd./Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule Enterprise, Guangdong Foshan 528244, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the identification of Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Cortecs T3 C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.35 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 270 nm. The sample size was 1 μL. Using gallic acid as reference, UPLC fingerprints of 17 batches of Chebulae Fructus and 14 batches of Chebulae Fructus Immaturus were established and their similarity was evaluated by *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition). By comparing substance control, UV absorption spectrum and related literatures, common peaks were identified. PCA and PLS-DA were performed by using SPSS 20.0 and SIMCA 14.1 software. The contents of main difference components in Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus were determined by above UPLC method and compared. RESULTS: There were 8 common peaks in UPLC fingerprint of Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus, i.e. chebulic acid (peak 1), gallic acid (peak 2), punicalagin A (peak 3), punicalagin B (peak 4), corilagin (peak 6), chebulagic acid (peak 7) and chebulinic acid (peak 8). The similarities of 17 batches of Chebulae Fructus were from 0.92 to 0.99, while 14 batches of Chebulae Fructus Immaturus were all above 0.99. The similarity of control fingerprint between Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus was 0.909. PCA demonstrated the differences between Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus. The results of PLS-DA were consistent with those of PCA, and the variable importance in projection (VIP) values of peak 5, 4, 7, 3 and 2 were above 1 in the PLS-DA model. In 31 batches of samples, the contents of gallic acid (peak 2), punicalagin A (peak 3), punicalagin B (peak 4) and chebulagic acid (peak 7) were 2.63-10.31, 5.37-44.63, 8.02-60.77, 44.07-162.98 mg/g; RSDs were 40.14%, 47.91%, 53.97%, 36.22% (n=31). There was statistical significance in the differences of the mentioned 4 components between Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus (P<0.05). CONCLUSIONS: There are significant differences between Chebulae Fructus and Chebulae Fructus Immaturus; gallic acid, punicalagin A, punicalagin B and chebulagic acid

Δ 基金项目:广东省省级科技计划项目(科技基础条件建设领域)(No.2018B030323004);佛山市科技创新项目(科技成果转化体系建设)(No.FSOAA-KJ418-1301-0053)

* 学士。研究方向:中药配方颗粒质量标准研究。E-mail: 719412818@qq.com

通信作者:主管中药师,硕士。研究方向:中药配方颗粒质量标准研究。E-mail:452048107@qq.com

are the main difference components for identification.

KEYWORDS Chebulae Fructus; Chebulae Fructus Immaturus; Chemical pattern recognition; Multi-index quantification; PCA; PLS-DA; Difference

诃子 *Chebulae Fructus* 为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *T. chebula* Retz. var. *to-mentella* Kurt. 的干燥成熟果实, 秋、冬二季果实成熟时采收, 除去杂质, 晒干; 该药气微, 味苦酸涩后甜; 粉末为黄白色或黄褐色^[1]。西青果 *Chebulae Fructus Immaturus* 别名藏青果, 是使君子科植物诃子 *T. chebula* Retz. 的干燥幼果, 每年的9~10月将尚未成熟的幼果采下, 置于沸水中略煮烫, 晒干或者烘干; 该药气微, 味苦涩、微甘; 粉末为黄棕色^[1]。已有研究表明, 诃子和西青果的化学成分较为相似, 均以可水解鞣质类成分为主, 还含有多酚类、黄酮类、三萜类等化学成分^[2-4]。有学者通过高效液相色谱法(HPLC)同时测定了诃子中莽草酸、没食子酸、鞣花酸、柯里拉京、五没食子酰葡萄糖等化学成分的含量及总鞣质含量^[5-6], 也有研究建立了诃子、毛诃子、西青果等HPLC指纹图谱及质量评价方法^[7-12], 但未对诃子和西青果药材指纹图谱中的特征信息进行比较。现代药理研究表明, 诃子具有抗病毒、抗氧化、抗糖尿病、抗炎、降血糖和镇咳等药理作用^[13-15]; 西青果可清热生津、解毒, 主治阴虚白喉, 具有清除羟自由基、抗氧化等功效, 临床常用于治疗咽喉肿痛、咽炎等症^[16]; 二者的药理作用存在较大不同^[17]。诃子和西青果是同一种植物不同生长期的果实, 通过外观颜色和果实大小只能进行主观评价, 可能会对其鉴别造成误差。因此, 本研究采用超高效液相色谱法(UPLC), 建立17批诃子和14批西青果药材的指纹图谱, 利用化学模式识别法中的主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)进行联合分析, 寻找诃子和西青果的主要差异成分; 对上述差异成分进行定量分析, 并通过独立样品 *t* 检验进一步比较诃子和西青果中主要成分的差异, 旨在为诃子和西青果的鉴别及质量评价提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters H-Class 型 UPLC 仪(美国 Waters 公司); XP-26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 型超纯水净化系统(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)。

1.2 药品与试剂

没食子酸对照品(批号: 110831-201906, 纯度: 91.5%)、柯里拉京对照品(批号: 111623-200301, 纯度: 100%)均由中国食品药品检定研究院提供; 诃子次酸对照品(南京源生物科技有限公司, 批号: Yz0613211, 纯度: 98%); 安石榴昔对照品[批号: CFS201901, 纯度:

98%(安石榴昔 A: 34.64%, 安石榴昔 B: 65.36%)]、诃子鞣酸对照品(批号: CFS201901, 纯度: 98%)、诃子酸对照品(批号: CFS201902, 纯度: 98%)均由武汉天植生物技术有限公司提供; 甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

试验所用药材共 31 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, 药材来源信息见表 1。

表 1 药材来源信息

Tab 1 Information of medicinal materials sources

编号	品名	成熟阶段	来源	编号	品名	成熟阶段	来源
H1	诃子	成熟果实	广东省广州市	X1	西青果	幼果	安徽省亳州市
H2	诃子	成熟果实	广东省广州市	X2	西青果	幼果	四川省成都市
H3	诃子	成熟果实	广东省广州市	X3	西青果	幼果	河北省安国市
H4	诃子	成熟果实	广东省广州市	X4	西青果	幼果	广东省普宁市
H5	诃子	成熟果实	广东省广州市	X5	西青果	幼果	河北省保定市
H6	诃子	成熟果实	广东省广州市	X6	西青果	幼果	广西省南宁市
H7	诃子	成熟果实	广西省玉林市	X7	西青果	幼果	安徽省亳州市
H8	诃子	成熟果实	广西省玉林市	X8	西青果	幼果	河北省保定市
H9	诃子	成熟果实	广西省玉林市	X9	西青果	幼果	广西省玉林市
H10	诃子	成熟果实	云南省昆明市	X10	西青果	幼果	安徽省亳州市
H11	诃子	成熟果实	云南省昆明市	X11	西青果	幼果	广西省玉林市
H12	诃子	成熟果实	广东省广州市	X12	西青果	幼果	广西省玉林市
H13	诃子	成熟果实	广东省广州市	X13	西青果	幼果	广东省广州市
H14	诃子	成熟果实	广东省广州市	X14	西青果	幼果	安徽省合肥市
H15	诃子	成熟果实	广西省南宁市				
H16	诃子	成熟果实	广西省南宁市				
H17	诃子	成熟果实	广西省南宁市				

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Cortecs T3 C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~3 min, 100% B; 3~5 min, 100% B→97% B; 5~12 min, 97% B→90% B; 12~20 min, 90% B; 20~25 min, 90% B→86% B; 25~35 min, 86% B→83% B; 35~40 min, 83% B→79% B; 40~45 min, 79% B→40% B; 45~50 min, 40% B); 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 270 nm; 进样量: 1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取诃子次酸、没食子酸、安石榴昔、柯里拉京、诃子鞣酸、诃子酸对照品适量, 精密称定, 用 70% 甲醇溶解并稀释, 制成质量浓度分别为 413.560、105.271、519.400、116.700、1 609.552、495.635 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品, 粉碎后, 过三号筛, 精密称

取粉末约0.25 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)处理30 min,冷却至室温,再次称定质量,用70%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.3 指纹图谱的建立与分析

2.3.1 精密密度试验 分别取同一供试品溶液(编号:H17、X1),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。均以没食子酸(峰2,下同)为参照,分别计算两组样品各8个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,两组样品各8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%($n=6$),表明方法精密密度良好。

2.3.2 稳定性试验 分别取同一供试品溶液(编号:H17、X1),分别在室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。均以没食子酸为参照,分别计算两组样品各8个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,两组样品各8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 分别取样品粉末(编号:H17、X1)约0.25 g,平行6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。均以没食子酸为参照,分别计算两组样品各8个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,两组样品各8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的生成 取31批样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将31批样品的UPLC图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,分别以H1和X1号样品的图谱作为参照图谱[2015年版《中国药典》(一部)“诃子”和“西青果”项下均未有含量测定,前期性状鉴别判断H1和X1号样品均符合药材性状规定,故以这两批样品作为参照],设置时间窗口为1,自动匹配生成UPLC叠加指纹图谱,以平均数法生成对照指纹图谱(R)。结果,诃子和西青果指纹图谱中分别有共有峰8个,详见图1。通过与对照品保留时间(见图2A)、紫外吸收光谱和文献信息^[11,17]比对,指认峰1为诃子次酸,峰2为没食子酸,峰3为安石榴苷A,峰4为安石榴苷B,峰6为柯里拉京,峰7为诃子鞣酸,峰8为诃子酸。有研究表明,没食子酸为诃子药材中涩肠止泻、肺虚喘咳主要的化学成分之一^[16,18-19],且其在图谱中的分离度最佳,故选择第2号峰(没食子酸)作为参照。

2.3.5 相似度评价 以对照指纹图谱为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》分别对17批诃子和14批西青果的UPLC指纹图谱进行相似度评价。结果,17批诃子的相似度均在0.919~0.996范围内,14批西青果的相似度均大于0.990,结果见表2、表

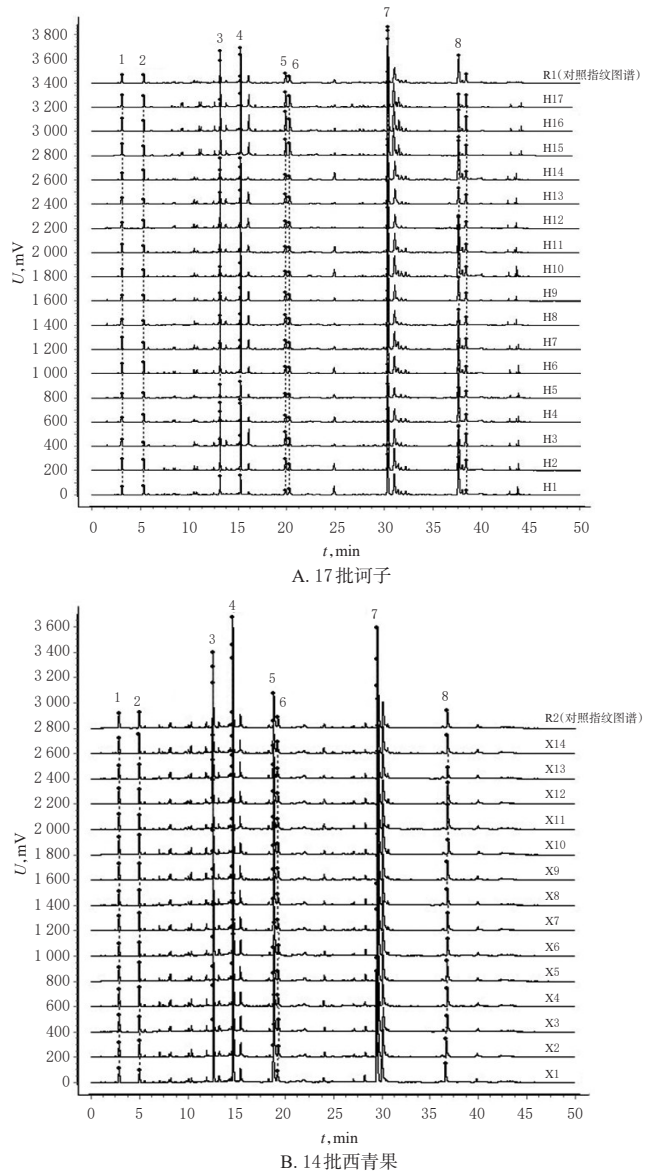


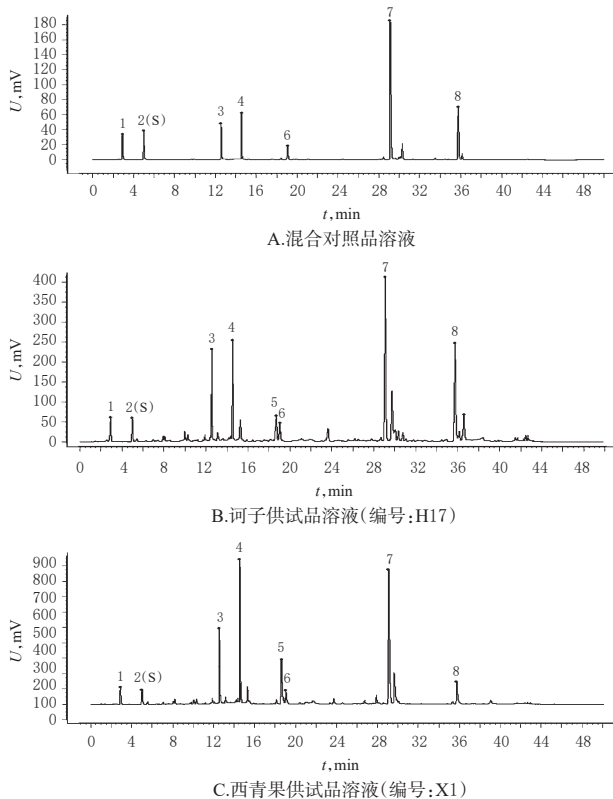
图1 UPLC叠加指纹图谱与对照指纹图谱

Fig 1 UPLC superimposed fingerprints and control fingerprints

3。另外,将已建立的诃子对照指纹图谱(R1)和西青果对照指纹图谱(R2)进行相似度评价,结果,两者的相似度为0.909。结果表明,诃子与西青果在指纹图谱上存在一定差异,所建立的指纹图谱可用于鉴别诃子和西青果。

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 PCA 以31批样品8个共有峰峰面积为变量,通过SPSS 20.0软件进行PCA。以特征值大于1为判断标准,仅提取了1个主成分,即主成分1,其累积方差贡献率达81.131%,说明主成分1可作为样品的主要评价指标,详见表4。通过因子载荷矩阵得知,峰1、2、3、4、5、7在主成分1上有较高载荷,对主成分1产生主要影响,详见表5。以主成分1为变量,计算PCA得分,其得分图见图3,得分结果见表6。由图3可知,31批样品明显被分



注: 1. 诃子次酸; 2. 没食子酸; 3. 安石榴苷 A; 4. 安石榴苷 B; 5. 未知物; 6. 柯里拉京; 7. 诃子鞣酸; 8. 诃子酸

Note: 1. chebulic acid; 2. gallic acid; 3. punicalagin A; 4. punicalagin B; 5. unknown; 6. corilagin; 7. chebulagic acid; 8. chebulinic acid

图2 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

表2 17批诃子的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 17 batches of Chebulae Fructus

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
H1	0.970	H7	0.996	H13	0.959
H2	0.992	H8	0.960	H14	0.962
H3	0.960	H9	0.990	H15	0.919
H4	0.971	H10	0.966	H16	0.943
H5	0.971	H11	0.994	H17	0.921
H6	0.996	H12	0.949		

表3 14批西青果的相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation results of 14 batches of Chebulae Fructus Immaturus

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
X1	0.997	X6	0.997	X11	0.994
X2	0.998	X7	0.999	X12	0.994
X3	0.999	X8	1.000	X13	0.992
X4	0.999	X9	1.000	X14	0.998
X5	0.999	X10	0.997		

为2类,即H1~H17为I类、X1~X14为II类。由表6可知,西青果主成分1的得分均为正值,最低为0.789 39(X11),最高为1.189 60(X10);而诃子除H15、H16、H17号样品主成分1的得分为正值外,其余14批均为负值,最高为0.415 86(H15),表明西青果和诃子存在明显

表4 特征值和累积方差贡献率结果

Tab 4 Results of eigen value and accumulative variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %
1	6.490	81.131	81.131
2	0.775	9.684	90.815
3	0.364	4.549	95.364
4	0.205	2.559	97.923
5	0.115	1.434	99.357
6	0.036	0.446	99.802
7	0.012	0.148	99.950
8	0.004	0.050	100.000

表5 因子载荷矩阵结果

Tab 5 Results of factor loading matrix

编号	主成分1	编号	主成分1
峰1	0.970	峰5	0.954
峰2	0.861	峰6	0.728
峰3	0.960	峰7	0.967
峰4	0.955	峰8	-0.775

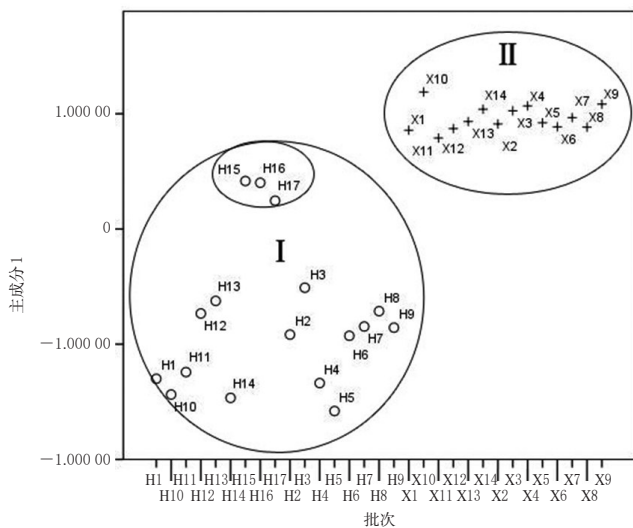


图3 31批样品主成分得分图

Fig 3 Score chart of main components of 31 batches of samples

差异。

2.4.2 PLS-DA 利用SIMCA 14.1软件建立诃子和西青果的PLS-DA模型,得分图见图4;8个共有峰的变量重要性投影值(VIP)图见图5。结果,模型对X矩阵的累积解释率 $R^2X(cum)$ 为0.907,对Y矩阵的累积解释率 $R^2Y(cum)$ 为0.975,累积模型预测参数 $Q^2(cum)$ 为0.967,参考同类型研究文献^[20],上述数据提示模型对17批诃子和14批西青果药材8个共有峰峰面积具有较强的拟合和预测能力,且越接近1能力越强^[21]。由图4可知,31批样品可区分为2类,与PCA分析结果一致;由图5可知,VIP值排序为峰5(未知物)>峰4(安石榴苷B)>峰7(诃子鞣酸)>峰3(安石榴苷A)>峰2(没食子酸),且VIP值均大于1,表明该5个共有峰对应的化合物是区分诃子和西青果的主要差异成分^[22]。

表6 31批样品主成分得分结果

Tab 6 Results of main components score of 31 batches of samples

编号	主成分1	排名	编号	主成分1	排名
H15	0.415 86	15	X10	1.189 60	1
H16	0.401 01	16	X9	1.083 45	2
H17	0.245 27	17	X4	1.068 43	3
H3	-0.509 85	18	X14	1.039 56	4
H13	-0.624 53	19	X3	1.026 01	5
H8	-0.713 08	20	X7	0.966 57	6
H12	-0.733 36	21	X13	0.932 40	7
H7	-0.845 91	22	X5	0.921 07	8
H9	-0.856 27	23	X2	0.911 96	9
H2	-0.916 53	24	X6	0.885 76	10
H6	-0.927 35	25	X8	0.883 35	11
H11	-1.241 98	26	X12	0.871 24	12
H1	-1.299 89	27	X1	0.857 87	13
H4	-1.337 62	28	X11	0.789 39	14
H10	-1.436 37	29			
H14	-1.465 86	30			
H5	-1.580 21	31			

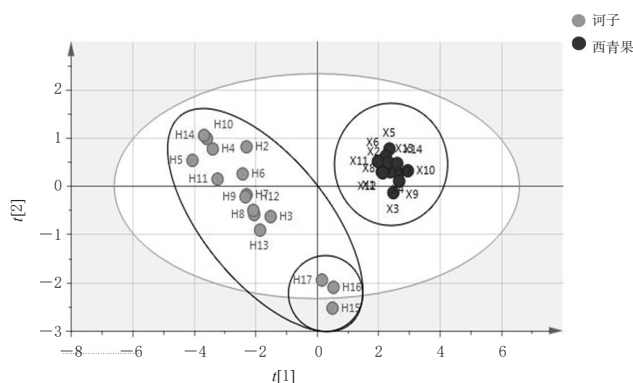


图4 31批样品的PLS-DA得分图

Fig 4 PLS-DA score chart of 31 batches of samples

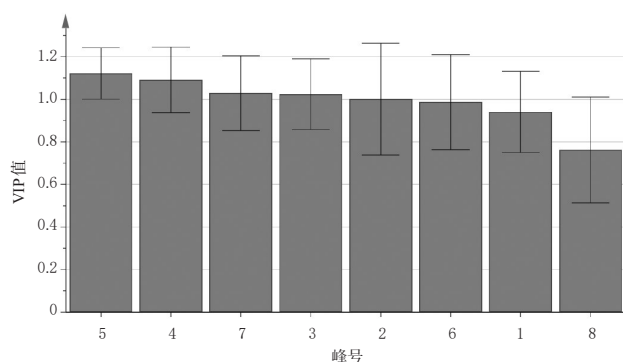


图5 31批样品PLS-DA模型中8个共有峰的VIP值图

Fig 5 VIP value graph of 8 common peaks in PLS-DA model of 31 batches of samples

2.5 多指标含量测定

“2.4”项下结果显示,峰2、3、4、5、7是区分诃子和西青果的主要差异成分,由于峰5为未知物,故以其他4个共有峰对应的化合物没食子酸(峰2)、安石榴苷A(峰3)、安石榴苷B(峰4)、诃子鞣酸(峰7)为含量测定指标,对17批诃子和14批西青果进行定量分析。

2.5.1 色谱条件 同“2.1”项。

2.5.2 溶液的制备 同“2.2”项。

2.5.3 系统适用性考察 取混合对照品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图;分别取诃子和西青果样品(编号:H17、X1),按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,拖尾因子在1.00~1.05之内,详见图2。

2.5.4 线性关系考察 分别取没食子酸、安石榴苷、诃子鞣酸对照品适量,精密称定,分别用70%甲醇溶解并稀释,制成6个不同质量浓度的系列对照品溶液,其中没食子酸质量浓度分别为0.35、3.51、35.09、105.27、210.54、315.81 $\mu\text{g/mL}$,安石榴苷A质量浓度分别为2.84、28.41、259.70、519.40、831.04、1 038.80 $\mu\text{g/mL}$,安石榴苷B质量浓度分别为2.84、28.41、259.70、519.40、831.04、1 038.80 $\mu\text{g/mL}$,诃子鞣酸质量浓度分别为0.34、3.40、34.04、1 005.97、1 609.55、2 011.94 $\mu\text{g/mL}$ 。以质量浓度为横坐标(x, $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析,结果见表7。

表7 回归方程与线性范围

Tab 7 Regression equations and linear ranges

名称	回归方程	R^2	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
没食子酸	$y=9\ 452.7x-11\ 365$	0.999 9	0.35~315.81
安石榴苷A	$y=2\ 127.6x-18\ 829$	0.999 5	2.84~1 038.80
安石榴苷B	$y=4\ 310.1x-32\ 512$	0.999 3	2.84~1 038.80
诃子鞣酸	$y=4\ 513.2x-15\ 896$	0.999 9	0.34~2 011.94

2.5.5 检测限和定量限考察 取混合对照品溶液,以70%甲醇等比例稀释后,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比3:1、10:1分别确定检测限和定量限。结果,没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸的检测限分别为0.04、0.02、0.02、0.11 ng,定量限分别为0.14、0.05、0.06、0.35 ng。

2.5.6 精密度试验 分别取同一供试品溶液(编号:H17、X1),按“2.5.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,两组样品没食子酸峰面积的RSD分别为1.21%、1.34% ($n=6$),安石榴苷A峰面积的RSD分别为1.60%、1.42% ($n=6$),安石榴苷B峰面积的RSD分别为1.74%、1.51% ($n=6$),诃子鞣酸峰面积的RSD分别为0.52%、0.98% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.5.7 稳定性试验 分别取同一供试品溶液(编号:H17、X1),分别在室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,两组样品没食子酸峰面积的RSD分别为1.62%、1.36% ($n=6$),安石榴苷A峰面积的RSD分别为1.93%、1.67% ($n=6$),安石榴苷B峰面积的RSD分别为1.98%、1.79% ($n=6$),诃子鞣酸峰面积的RSD分别为1.08%、0.87% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳

定性良好。

2.5.8 重复性试验 分别取样品(编号H17、X1)粉末约0.25 g,平行6份,按“2.5.2”项下方法制备成供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量。结果,两组样品没食子酸含量的RSD分别为1.24%、1.05%($n=6$),安石榴昔A含量的RSD分别为1.81%、1.48%($n=6$),安石榴昔B含量的RSD分别为1.62%、1.48%($n=6$),诃子鞣酸含量的RSD分别为1.28%、1.42%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.5.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的诃子药材(编号:H17)和西青果药材(编号:X1)粉末各0.125 g,平行6份,加入与样品中含量相当的对照品溶液,按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表8。

表8 加样回收率试验结果
Tab 8 Results of recovery tests

药材	待测成分	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
诃子	没食子酸	0.881 2	0.731 9	1.604 8	98.87	99.26	2.00
		0.881 9	0.731 9	1.631 1	102.36		
		0.880 5	0.731 9	1.597 7	97.99		
		0.884 0	0.731 9	1.601 1	97.98		
		0.888 2	0.731 9	1.600 8	97.36		
		0.886 1	0.731 9	1.625 5	101.02		
	安石榴昔(以安石榴昔A和安石榴昔B总和计)	7.582 6	6.169 0	13.511 1	96.10	98.05	1.37
		7.588 6	6.569 0	14.024 6	97.98		
		7.576 5	6.102 0	13.664 2	99.77		
		7.606 8	6.592 0	14.141 3	99.13		
		7.643 3	6.270 0	13.807 1	98.31		
		7.625 0	6.869 0	14.289 0	97.02		
	诃子鞣酸	13.435 5	10.729 0	23.751 2	96.15	98.2	1.97
		13.446 2	10.802 0	24.200 2	99.56		
		13.424 7	10.689 0	23.756 2	96.66		
		13.478 5	10.776 0	24.272 8	100.17		
		13.543 0	10.708 0	23.882 4	96.56		
		13.510 8	10.851 0	24.377 3	100.14		
西青果	没食子酸	0.780 6	0.701 2	1.481 2	99.91	100.92	1.59
		0.785 6	0.701 2	1.512 1	103.61		
		0.778 1	0.701 2	1.475 0	99.39		
		0.782 5	0.701 2	1.493 6	101.41		
		0.784 4	0.701 2	1.496 7	101.58		
		0.782 5	0.701 2	1.481 2	99.64		
	安石榴昔(以安石榴昔A和安石榴昔B总和计)	10.982 5	9.998 7	21.229 1	102.48	101.99	1.14
		10.991 3	10.051 4	21.061 6	100.19		
		10.973 7	10.164 1	21.288 6	101.48		
		11.017 6	10.125 4	21.515 6	103.68		
		11.070 4	9.981 2	21.229 1	101.78		
		11.044 0	9.954 4	21.229 1	102.32		
	诃子鞣酸	20.388 8	18.014 1	38.386 1	99.91	100.59	1.97
		20.519 2	18.273 2	39.065 8	101.50		
		20.323 6	18.178 9	39.004 0	102.76		
		20.437 7	18.465 4	38.935 4	100.17		
		20.486 6	18.394 8	38.606 4	98.51		
		20.437 7	18.374 1	38.942 2	100.71		

2.5.10 含量测定 精密称取31批样品粉末,按“2.5.2”

项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量,每个样品平行操作2次。结果,诃子和西青果中上述4个成分的含量分别为2.63~10.31、5.37~44.63、8.02~60.77、44.07~162.98 mg/g, RSD 分别为 40.14%、47.91%、53.97%、36.22%,表明其含量存在显著差异,详见表9。

表9 31批样品的含量测定结果($n=2$)

Tab 9 Content determination results of 31 batches of samples($n=2$)

编号	没食子酸,mg/g	安石榴昔A,mg/g	安石榴昔B,mg/g	诃子鞣酸,mg/g
H1	4.62	9.24	9.86	54.07
H2	5.66	14.26	17.37	84.55
H3	2.78	17.80	21.36	103.38
H4	4.82	8.32	11.71	49.89
H5	3.02	5.37	8.02	44.07
H6	6.17	12.93	17.29	64.78
H7	3.43	14.28	18.12	79.60
H8	3.11	14.32	20.27	79.48
H9	3.51	15.58	20.57	70.67
H10	3.48	11.43	14.54	67.07
H11	3.08	11.53	14.36	62.30
H12	4.07	15.90	21.17	65.25
H13	2.63	15.82	21.01	84.75
H14	4.28	9.44	12.14	56.64
H15	5.45	27.22	33.88	108.11
H16	5.85	23.67	29.83	122.24
H17	7.06	26.71	34.00	107.57
X1	6.24	29.07	58.86	162.98
X2	8.69	33.41	60.77	142.07
X3	8.12	30.17	54.59	148.88
X4	10.07	32.13	54.75	140.17
X5	9.76	35.32	56.06	140.56
X6	7.15	40.01	62.36	144.44
X7	9.35	36.65	54.08	140.21
X8	7.81	34.75	51.51	144.85
X9	8.64	37.58	54.43	146.87
X10	10.18	34.32	47.84	154.43
X11	7.55	32.00	44.16	154.42
X12	7.57	32.30	43.42	155.43
X13	7.38	44.63	58.58	131.95
X14	10.31	40.21	52.22	136.09
均值	6.19	24.08	34.81	107.99
RSD,%	40.14	47.91	53.97	36.22

2.6 独立样品t检验

以31批样品中4个成分含量为变量,通过SPSS 20.00软件进行独立样品t检验。结果,诃子和西青果中没食子酸、安石榴昔A、安石榴昔B、诃子鞣酸差异均有统计学意义。没食子酸、安石榴昔A、安石榴昔B在方差方程Levene检验中P均大于0.05,方差相等;诃子鞣酸的P为0.003,小于0.05,方差不相等;4个成分在均值方程t检验中,P均小于0.001,说明这4个成分在诃子和西青果中具有显著差异,结果与PLS-DA结果一致。

3 讨论

诃子和西青果指纹图谱中共指认8个共有峰,两者指纹图谱上存在差异,共指认了其中7个共有峰,分别为

峰1诃子次酸、峰2没食子酸、峰3安石榴苷A、峰4安石榴苷B、峰6柯里拉京、峰7诃子鞣酸、峰8诃子酸。

PCA结果显示,31批样品可划分为两类,即H1~H17为一类、X1~X14为一类;PLA-DA得分图结果与PCA结果一致。PCA得分结果显示,14批西青果的得分均大于17批诃子,且均为正值;而17批诃子中,14批样品的PCA得分为负值,仅H15、H16、H17等3批样品的PCA得分为正值。在PCA、PLA-DA得分图中,31批样品分散在X轴及Y轴上,14批西青果单独分散在右边,17批诃子样品分在左边,区分明显;但笔者发现在17批诃子样品中,H15、H16、H17等3批样品与其他批次的样品较为分散,结合峰面积进行分析,H15、H16、H17等3批诃子样品中8个共有峰峰面积均大于其余14批诃子样品,但小于14批西青果样品,推测这3批样品的成熟度介于诃子和西青果之间。通过PCA得分值可确定,PCA得分值>0.7以上归为西青果,与诃子存在明显差异,两者可实现样品分离。

由PLA-DA结果可知,峰2(没食子酸)、峰3(安石榴苷A)、峰4(安石榴苷B)、峰5(未知物)、峰7(诃子鞣酸)等5个成分的VIP值均大于1,是区分诃子和西青果的主要差异成分。对其中4个已知成分进行定量分析发现,17批诃子和14批西青果中上述成分的含量存在明显差异,西青果中4个成分的含量普遍高于诃子;两种药材中,均以诃子鞣酸含量最高,其次为安石榴苷B、安石榴苷A、没食子酸。通过独立样品*t*检验对4个成分含量数据进行验证显示,在诃子和西青果中,没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸4个成分的含量存在显著差异,与PLA-DA结果一致。

赵鹿等^[23]通过化学成分、药理作用、化学成分特有性、药性、临床新用途等方面对诃子药材进行分析和论证,预测没食子酸、诃黎勒酸、鞣花酸和诃子酸可能是诃子的质量标志物(Q-marker);本研究通过化学模式识别分析方法发现,诃子次酸、没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸、诃子酸对主成分1产生较大影响,结合上述分析结果得出诃子和西青果药材中的主要化合物为鞣质类成分。

综上所述,本研究成功建立了诃子和西青果的UPLC指纹图谱,较全面地比较了二者的成分及含量差异,结果显示,诃子和西青果存在显著差异,没食子酸、安石榴苷A、安石榴苷B、诃子鞣酸可作为区分二者的主要差异成分。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:130、187.
[2] 丁岗,刘延泽,宋毛平,等.诃子中的多元酚类成分[J].中国药科大学学报,2001,32(3):193-196.
[3] 刘玉梅.两种中草药(虎耳草、诃子)化学成分的研究[D].贵阳:贵州大学,2007.

[4] 阳小勇,唐荣平.诃子化学成分的研究[J].西昌学院学报(自然科学版),2012,26(2):65-66.
[5] 王巍,温聪聪,解世全,等.HPLC法同时测定诃子中莽草酸、没食子酸及鞣花酸的含量[J].中华中医药杂志,2017,32(2):819-821.
[6] 梁林金,亓旗,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.
[7] 查道成,付伟,赵新红.比色法结合HPLC指纹图谱法用于诃子质量控制研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(7):936-939.
[8] 尹春梅,韩世柳,田成旺,等.诃子HPLC指纹图谱及模式识别研究[J].中草药,2010,41(9):1467-1469.
[9] 王巍,朱麒麟,张强,等.诃子炮制前后HPLC指纹谱比较研究[J].现代中药研究与实践,2018,32(1):64-67.
[10] 刘雅敏.诃子提取物的HPLC指纹图谱研究[C]//2009年全国中药创新与研究论坛学术论文集,北京:中华中医药学会,2009:334-339.
[11] 颜玉贞,卢平华,谢培山.西青果与诃子的HPLC指纹图谱鉴别研究[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):173-178.
[12] 陈文静,梁文仪,李师,等.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[J].中草药,2017,48(6):1210-1215.
[13] 刘芳,秦红飞,刘松青.诃子化学成分与药理活性研究进展[J].中国药房,2012,23(7):670-672.
[14] 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.
[15] 种新禄,侯晓林,陈佳佳,等.诃子中总多酚粗提工艺及药理作用研究[J].北京农学院学报,2014,29(3):64-67.
[16] 王建设,谢雨洮,韩平,等.青果西青果及诃子的鉴别与临床应用[J].西部医学,2010,22(11):2147-2149.
[17] 孙鹏.青果、西青果及诃子的鉴别与临床应用[J/CD].临床医药文献电子杂志,2017,4(54):10673、10676.
[18] 袁铭,熊晔,向阳,等.高效液相色谱法测定藏青果中没食子酸的含量[J].医药导报,2009,28(7):916-917.
[19] 赵建平.西青果中没食子酸的含量测定[J].广西中医学院学报,2003,6(4):53-55.
[20] 梁文仪,亓旗,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.
[21] 马留纯,马生军,朱金芳,等.新疆紫草的HPLC指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定[J].中国药房,2020,31(14):1732-1738.
[22] 彭亮,杨冰月,张琳,等.野生与栽培远志HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2018,49(21):4998-5003.
[23] 赵鹿,廖翠萍,杨秀娟,等.诃子的研究进展及质量标志物的预测[J].中草药,2020,51(10):2732-2744.

(收稿日期:2020-06-30 修回日期:2020-09-02)

(编辑:邹丽娟)