

基于颜色-成分关联的余甘子商品等级划分分析

罗传红¹, 廖维¹, 袁瑞芳¹, 谭鹏², 高继海¹, 魏夕川¹, 黄浩洲¹,
贺亚男¹, 林俊芝³, 韩丽^{1*}, 张定堃^{1*}

- (1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;
2. 四川省中医药科学院国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 成都 610041;
3. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的: 为余甘子商品规格等级划分提供科学依据。方法: 收集当前市场流通余甘子共计30批, 提取直径、厚度、粒重、表皮颜色 L^* , a^* , b^* 值为外观指标进行量化测量, 采用高效液相色谱法测定没食子酸、柯里拉京、诃黎勒酸、鞣花酸的含量, 利用描述统计分析、方差分析、主成分分析确定各鉴别主征重要程度, 探索外观指标与内在成分的相关性, 制定余甘子商品等级划分标准, 运用肝癌 HepG2 细胞实验验证其科学性。结果: 相关性分析结果表明, 表皮颜色 L^* , a^* , b^* 值与柯里拉京、诃黎勒酸、鞣花酸呈极显著负相关($|r| > 0.5$, $P < 0.01$), 与没食子酸相关性不强($|r| < 0.1$), 综合考虑各指标的变异系数、主成分分析结果及没食子酸作为《中华人民共和国药典》余甘子质控指标, 最终确定表皮颜色 L^* , a^* , b^* 值、没食子酸含量作为分级指标; 根据K-均值聚类分析结果, 当同时满足表皮颜色 $L^* < 44$, $a^* < 7$, $b^* < 10$, 没食子酸含量 $> 1.6\%$ 可判定为一等品; 当不能同时满足上述条件判定为二等品。肝癌 HepG2 细胞实验表明一等品半抑制浓度(IC_{50} 值)低于二等品。此外, 利用表皮颜色 L^* , a^* , b^* 值制定比色卡, 为余甘子商品等级的现场评价提供了可视化工具。结论: 该研究初步建立了余甘子商品等级标准, 有利于引导余甘子商品市场流通分档议价、优质优价。

[关键词] 余甘子; 商品等级; 品质评价; 比色卡; 没食子酸

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0171-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210715

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210327.1635.008.html>

[网络出版日期] 2021-3-29 14:29

Preliminary Study on Commodity Grade Classification of Phyllanthi Fructus Based on Color Component Correlation

LUO Chuan-hong¹, LIAO Wei¹, YUAN Rui-fang¹, TAN Peng², GAO Ji-hai¹, WEI Xi-chuan¹,
HUANG Hao-zhou¹, HE Ya-nan¹, LIN Jun-zhi³, HAN Li^{1*}, ZHANG Ding-kun^{1*}

- (1. School of Pharmacy, State Key Laboratory of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;
2. State Key Laboratory of Quality Evaluation of TCM, National Administration of TCM, Sichuan Academy of Chinese Medical Sciences, Chengdu 610041, China;
3. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a scientific basis for the classification of Phyllanthi Fructus product

[收稿日期] 20210106(020)

[基金项目] 四川省中医药标准化研究项目(2019073); 四川省重点研发项目(2021YFN0100); 成都市科技创新平台资助项目(2019-YF04-00086-JH); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(QNXZ2018003); 成都中医药大学中药学学科特色创新科研团队项目(CXTD2018006); 四川省首批中医药学科建设重点项目——药用植物学(川中医药函[2020]84号)

[第一作者] 罗传红, 硕士, 从事中药制剂新技术研究, E-mail: 1379034021@qq.com

[通信作者] * 韩丽, 博士, 教授, 从事中药制剂新技术研究, E-mail: hanliy@163.com;

* 张定堃, 博士, 副教授, 从事中药制剂与品质评价研究, E-mail: zhangdingkun@cduetcm.edu.cn

grades. **Method:** A total of 30 batches of *Phyllanthi Fructus* currently available in the market were collected for quantification based on such appearance indexes as diameter, thickness, grain weight, and crust colour (L^* , a^* , and b^* values). The contents of gallic acid, corilagin, chebulagic acid, and ellagic acid were measured by high performance liquid chromatography (HPLC), followed by descriptive statistical analysis (DSA), analysis of variance (ANOVA), and principal component analysis (PCA) to determine the importance of each main index and explore the correlations between the appearance indexes and internal components. The classification standard of *Phyllanthi Fructus* product grades was formulated, and its scientificity was verified in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Result:** The correlation analysis revealed that the crust colour L^* , a^* , and b^* values were significantly negatively correlated with corilagin, chebulagic acid, and ellagic acid ($|r| > 0.5$, $P < 0.01$), but irrelevant to gallic acid ($|r| < 0.1$). Considering the variable coefficient of each index, PCA results, and the requirement of gallic acid as quality indicator for *Phyllanthi Fructus* in *Chinese Pharmacopoeia*, the crust colour L^* , a^* , and b^* values and gallic acid content were determined to be the classification indexes. The K-means cluster analysis confirmed that products with crust colour $L^* < 44$, $a^* < 7$, and $b^* < 10$ and gallic acid content $> 1.6\%$ could be classified into the first class, and those failing to meet the above requirements into the second class. The cell experiment demonstrated that the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the first-class product against hepatocellular carcinoma HepG2 cells was lower than that of the second-class product. A colorimetric card was developed based on crust colour L^* , a^* , and b^* values to provide a visual tool for on-site evaluation of *Phyllanthi Fructus* products. **Conclusion:** This study has initially established the classification standard of *Phyllanthi Fructus* product grades, which contributes to guiding price negotiation of *Phyllanthi Fructus* products based on quality grade and thus ensuring high quality and high price.

[Key words] *Phyllanthi Fructus*; commodity grade; quality evaluation; colorimetric card; gallic acid

余甘子是大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* 的干燥成熟果实,是中药、藏族药(简称藏药)特色药材,有清热凉血,消食健胃,生津止咳的功效^[1]。余甘子有“众药之王”之美誉,与诃子、毛诃子并称为藏药“三大果”,也是中药利咽开音之要药,使用频率极高,主要用于血热血瘀、消化不良、腹胀、咳嗽、喉痛及口干等证。由于其药理活性强、营养价值丰富、风味独特,被列入中华人民共和国卫生健康委员会“药食同源”名单,极具开发潜力与价值。余甘子广泛分布于我国东南沿海及西南等省区,在印度、斯里兰卡及中南半岛等热带地区也有分布。目前,在四川省凉山州与攀枝花市的干热河谷地带大量野生或半野生资源分布。在产区,余甘子鲜品被作为水果及果脯使用。随着余甘子大健康产品开发越来越多,加强其质量标准研究,特别是药材商品规格等级标准研究显得尤为重要,合理提升其药材交易价格有助于扶贫增收。

关于余甘子品质评价,仅《新编中国药材学》载:“以个大、肉厚、回甜味浓者为佳”^[2]。市场流通的余甘子药材,缺少商品等级划分标准,均以未去核的统货、去核的“肉统”两种进行流通,药材商品价格混乱,难以优质优价,不利于余甘子产业的健

康发展。然而近年来,国内外对于余甘子药材的研究主要集中在化学成分和药理作用方面,关于其商品规格等级方面的研究较少。且我国1958年制定的《38种药材商品规格标准》,1984年制定的《76种药材商品规格标准》,各地方药材标准,均无余甘子药材的商品规格等级标准。因此,在前期对余甘子去核加工的合理性研究基础上^[3],进一步探索其商品等级划分标准。本研究以2017至2019年采收的云南、福建、四川、广东、广西、江西、缅甸共7个产区30个批次余甘子药材(统货)为研究对象,结合传统外观量化指标和活性成分内在指标,利用现代统计学方法,建立其商品等级划分标准,为余甘子市场流通优质优价提供科学依据。传统的商品规格就是按外观简单的分级,本研究拟通过商品规格和化学评价结果双把关,来制定余甘子的商品规格,并进一步从药理学的角度,通过生物评价对分等结果的科学性、可靠性进行验证,这也是新时代中药材高质量发展的要求。

1 材料

30批余甘子购于四川中庸药业有限公司、河北安国药材市场、安徽亳州中药材市场及成都荷花池中药材市场等地,各样品于2017年至2019年采收,

覆盖云南、四川、广东等7个产区,经成都中医药大学药学院张定堃副教授鉴定为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* 的干燥成熟果实。见表1。

表1 余甘子样品信息

Table 1 Information of *Phyllanthi Fructus*

编号	产地	来源	采收时间
S1	四川甘孜	四川省中庸药材公司	2018
S2	四川甘孜	四川省中庸药材公司	2018
S3	云南楚雄	安徽亳州药材市场	2019
S4	云南楚雄	永仁远东农业	2019
S5	云南	安徽亳州药材市场	2018
S6	福建	安徽亳州药材市场	2018
S7	福建漳州	漳浦油甘产地	2019
S8	福建	安徽亳州药材市场	2019
S9	广东	河北安国药材市场	2019
S10	广西	成都荷花池药材市场	2019
S11	广西	河北安国药材市场	2019
S12	江西赣州	安徽亳州药材市场	2019
S13	江西	安徽亳州药材市场	2019
S14	四川凉山	成都荷花池药材市场	2017
S15	缅甸	成都荷花池药材市场	2018
S16	云南缅甸交界处	成都荷花池药材市场	2018
S17	缅甸	成都荷花池药材市场	2019
S18	云南普洱	安徽亳州药材市场	2018
S19	四川攀枝花	成都荷花池药材市场	2019
S20	四川凉山	成都荷花池药材市场	2017
S21	四川西昌	四川省中庸药材公司	2017
S22	四川西昌	四川省中庸药材公司	2017
S23	云南红河	安徽亳州药材市场	2018
S24	云南	安徽亳州药材市场	2019
S25	云南	安徽亳州药材市场	2019
S26	云南	安徽亳州药材市场	2019
S27	云南楚雄	安徽亳州药材市场	2019
S28	云南	安徽亳州药材市场	2019
S29	云南	安徽亳州药材市场	2019
S30	云南曲靖	河北安国药材市场	2018

Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), U3000型高效液相色谱仪(美国赛默飞公司), BSA224S型1/1万分析天平(德国Sartorius公司), L550型台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司), Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司), KQ-500DE型数控超声仪(300 W, 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司), 游标卡尺(上海恒量量具有限公

司), 3D PhotoBench 260T(日本Ortery公司), SpectraMax iD5型酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司), CKX31型倒置光学显微镜(日本Olympus公司), HR30-II A2型生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

没食子酸、柯里拉京、鞣花酸对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为4051109, PRF7102406, PRF7101305, 纯度均≥98%), 河黎勒酸对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB171222, 纯度≥98%);人肝癌细胞株HepG2(武汉普诺赛生命科技有限公司);伯克改良伊格尔(DMEM)培养基(美国Gibco公司,批号8120335);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号20050503);细胞增殖活性检测(CCK-8)试剂盒(合肥兰杰柯科技有限公司,批号70061000);磷酸盐缓冲液(PBS,北京中科迈晨科技有限公司,批号K1201200);0.25%胰蛋白酶(北京中生奥邦生物科技有限公司,批号NG190505);青-链霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号20201211);水为超纯水,甲醇为色谱级,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 外观指标选择 借鉴传统中药“辨状论质”思想,结合2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)对余甘子的性状描述及本草记载、市场调查和余甘子的特点,提取了直径、果肉厚度、粒重、表皮颜色作为余甘子外观性状指标进行描述或量化测定。采用CIELAB色度空间技术将余甘子表皮颜色数字化,其中L*表示明度,a*和b*表示不同的色调方向。L*值越大明度越大,表示越白;反之越暗。a*表示红绿方向,+a*表示红方向,-a*表示绿方向。b*表示黄蓝方向,+b*表示黄方向,-b*表示蓝方向^[4]。

2.2 余甘子外观指标测定 随机选取45粒样品,用游标卡尺测定各批余甘子果梗到底部凹陷处直径、果肉厚度,测量值精确至0.01 mm;用电子天平称量各样品粒重,测量值精确至0.01 g。随机抓取各批余甘子中的30粒,采用3D自动成像系统进行拍摄,利用Adobe Photoshop CS6读入各批药材文件,读取余甘子表皮色泽数据L*,a*,b*。因大多余甘子表皮存在突起和裂痕,读取色泽数据时统一选取较为平整、颜色均匀的表皮部分。最后以选取样品的平均值代表这批药材的外观指标值。余甘子样品的详细参数信息见表2。

2.3 余甘子化学品质指标测定 没食子酸、鞣花酸、柯里拉京、河黎勒酸等多酚类成分被报道具有

表2 余甘子样品详细信息 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Details of Phyllanthi Fructus samples ($\bar{x}\pm s, n=3$)

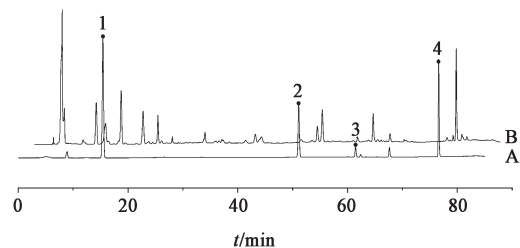
编号	直径/mm	粒重/g	厚度/mm	L^*	a^*	b^*	没食子酸/%	柯里拉京/%	诃黎勒酸/%	鞣花酸/%
S1	12.75±1.27	0.93±0.23	3.46±0.72	40.20±3.62	2.60±1.96	3.20±2.11	1.38	0.58	0.85	0.74
S2	12.68±1.27	0.78±0.24	3.04±0.69	43.07±2.82	4.86±1.24	6.90±2.52	2.22	0.33	0.78	0.80
S3	11.86±1.49	0.93±0.28	2.71±0.76	38.87±3.34	2.70±1.42	4.27±1.98	1.69	0.34	0.83	0.77
S4	12.45±1.16	0.8±0.21	2.76±0.69	36.23±3.22	4.17±1.17	6.17±1.82	1.37	0.36	0.76	0.44
S5	12.33±1.00	0.70±0.15	2.97±0.82	46.07±3.56	5.53±1.33	9.23±2.01	3.06	0.15	0.21	0.56
S6	11.98±1.38	1.08±0.31	2.69±0.8	42.77±2.17	2.00±1.96	2.93±1.77	0.97	0.52	0.96	0.86
S7	11.86±1.36	1.28±0.33	3.19±0.98	41.13±6.10	9.57±2.33	12.13±2.97	0.42	0.50	0.68	0.60
S8	11.68±1.26	0.98±0.29	2.47±0.74	52.07±4.81	4.40±1.85	6.97±3.45	1.19	0.32	0.70	0.43
S9	12.41±1.59	0.79±0.19	2.46±0.63	40.90±5.31	8.30±2.32	11.63±3.90	1.78	0.12	0.58	0.67
S10	13.45±1.36	1.08±0.31	2.87±0.82	30.67±2.62	1.80±1.06	2.50±1.31	1.19	0.70	1.21	0.98
S11	12.87±1.88	0.76±0.23	2.59±0.72	42.47±5.72	8.30±2.28	11.37±4.21	1.97	0.15	0.47	0.63
S12	12.44±1.24	0.91±0.27	2.49±0.59	34.87±3.16	4.13±2.07	5.03±2.47	2.16	0.43	0.87	0.82
S13	12.57±1.26	0.7±0.22	2.35±0.75	39.83±3.06	5.73±2.02	8.70±2.32	1.75	0.41	0.73	0.66
S14	13.23±1.56	1.17±0.38	3.18±0.71	35.30±2.53	3.73±1.67	4.30±2.59	1.28	0.33	0.69	0.5
S15	12.13±1.46	0.88±0.30	2.91±0.81	44.23±2.92	4.40±1.40	5.67±2.92	0.97	0.34	0.78	0.41
S16	14.17±1.54	1.18±0.31	2.97±0.86	32.93±2.00	3.33±2.01	4.13±1.94	1.06	0.50	0.88	0.71
S17	12.75±1.48	0.82±0.20	2.66±0.66	42.73±4.25	6.47±1.25	9.97±3.80	2.33	0.22	0.62	0.58
S18	12.80±1.34	0.90±0.19	3.24±0.88	43.70±3.31	5.23±1.69	8.90±3.00	2.90	0.15	0.21	0.35
S19	15.45±1.17	-	4.09±0.74	46.47±4.56	9.37±1.96	13.23±2.36	0.47	0.09	0.52	0.25
S20	11.23±1.11	0.62±0.14	2.7±0.71	42.33±4.14	7.73±0.95	11.67±3.60	1.45	0.13	0.61	0.73
S21	13.36±1.50	1.19±0.29	3.07±0.81	30.20±2.23	2.13±1.11	2.53±1.31	0.90	0.62	1.17	0.99
S22	12.28±1.15	0.88±0.25	2.91±0.84	33.57±2.67	3.17±1.45	3.47±1.53	1.37	0.35	0.92	0.69
S23	11.95±1.19	0.92±0.20	3.13±0.71	36.30±2.26	4.37±1.73	5.80±1.86	2.77	0.24	0.68	0.60
S24	12.38±1.43	0.92±0.31	2.82±0.95	33.27±2.21	3.37±0.96	4.53±1.93	2.23	0.44	0.89	0.87
S25	12.76±1.64	0.94±0.33	2.42±0.75	33.60±2.65	2.97±1.66	4.33±1.47	2.41	0.47	1.06	0.99
S26	12.11±1.5	1.11±0.41	2.79±0.81	40.27±2.49	2.93±1.80	4.20±2.20	1.88	0.49	0.89	0.79
S27	12.31±1.47	0.96±0.28	2.89±0.93	37.53±3.51	4.50±1.27	7.27±2.30	2.12	0.45	0.73	0.77
S28	11.64±1.21	0.97±0.30	2.7±0.83	38.90±2.64	4.33±1.21	6.40±1.69	0.98	0.44	0.86	0.67
S29	12.96±1.37	1.05±0.29	2.8±0.74	37.23±1.65	5.10±2.01	7.07±1.55	1.35	0.41	0.71	0.72
S30	12.19±1.25	0.81±0.22	2.4±0.65	43.83±3.10	5.13±1.41	8.73±3.23	2.77	0.24	0.68	0.60

注: S19样品破碎不完整,因此没有测得该批次粒重数值。

抗菌、抗氧化、抗炎、降血糖、免疫调节、保肝等作用,是余甘子的主要活性成分,可能是余甘子的质量标志物^[3,5]。因此,按课题组前期色谱条件、供试品制备方法^[3],测定各批余甘子没食子酸、柯里拉京、诃黎勒酸、鞣花酸含量,记录色谱图,见图1,各批余甘子含量测定情况见表2。

2.4 数据分析

2.4.1 描述统计分析 分别将各批余甘子直径,粒重,厚度, L^* , a^* , b^* 值测量结果导入 Origin 2019b,绘



A. 混合对照品; B. 余甘子药材; 1. 没食子酸; 2. 柯里拉京; 3. 诃黎勒酸; 4. 鞣花酸

图1 余甘子药材 S14 的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Phyllanthi Fructus (S14)

制热图,见图2,各批次按从左至右的顺序排列,以此反映批次内、批次间外观指标变化情况。再将测量结果导入SPSS 21.0进行描述统计分析,结果见表3。分析结果可知余甘子直径11.23~14.17 mm,均值为12.47 mm;单粒重在0.62~1.28 g,均值为0.93 g;厚度在2.35~3.46 mm,均值为2.80 mm; L^* 值在30.91~49.56,均值为39.03; a^* 值在2.38~10.2,均值为4.58; b^* 值在3.49~13.49,均值为6.55;没食子酸含量在0.42%~3.06%,均值为1.68%;柯里拉京质量

分数在0.09%~0.70%,均值为0.36%;诃黎勒酸质量分数在0.21%~1.21%,均值为0.75%;鞣花酸质量分数在0.25%~0.99%,均值为0.67%。其中,色泽指标 a^* 、 b^* 值变异系数较大,分别为41%,39%,4个内在指标成分变异系数均较大(>20%),说明离散程度较大,差异明显,表明外观指标的色泽指标4个内在指标可作为划分余甘子商品等级的重要依据。其余指标变异系数均<20%,提示其不适合作为划分余甘子商品等级的依据。

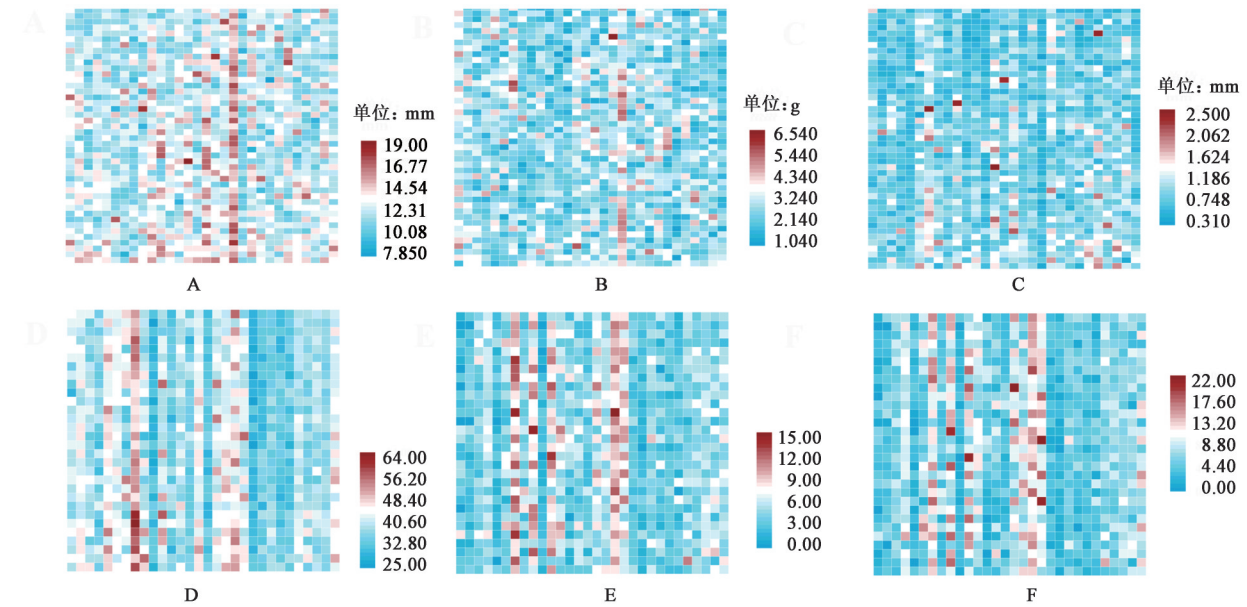


图2 余甘子外观指标测量结果热分析
A.直径;B.粒重;C.厚度;D. L^* ;E. a^* ;F. b^* ;各批次按从左至右顺序排列

Fig. 2 Heat map of appearance index measurement results of Phyllanthi Fructus

表3 30批余甘子不同指标描述统计分析

Table 3 Descriptive statistical analysis of 30 batches of Phyllanthi Fructus

指标	n	极小值	极大值	均值	标准差	变异系数/%
直径/mm	30	11.23	14.17	12.47	0.60	5
粒重/g	29	0.62	1.28	0.93	0.16	17
厚度/mm	30	2.35	3.46	2.80	0.29	10
L^*	30	30.91	49.56	39.03	4.47	11
a^*	30	2.38	10.2	4.58	1.87	41
b^*	30	3.49	13.49	6.55	2.54	39
没食子酸/%	30	0.42	3.06	1.68	0.71	42
柯里拉京/%	30	0.09	0.70	0.36	0.16	44
诃黎勒酸/%	30	0.21	1.21	0.75	0.22	29
鞣花酸/%	30	0.25	0.99	0.67	0.18	27

2.4.2 方差分析 采用SPSS 21.0统计软件进行方差分析,结果见表4。由结果可知,在外观指标中,

色泽指标 L^* 、 b^* 值达到极显著水平($P<0.01$),色泽指标 a^* 值达到显著水平($P<0.05$),且色泽指标 L^* 、 a^* 、 b^* 值 F 均较大(分别为46.488,19.329,27.604);粒重达到显著水平($P<0.05$)但 F 较小(6.721)。内在指标中,柯里拉京、诃黎勒酸达到极显著水平($P<0.01$), F 较大(分别为13.007,14.023),鞣花酸达到显著水平($P<0.05$), F 较小(6.473)。表明色泽指标、柯里拉京、诃黎勒酸是划分余甘子商品规格等级的重要指标。

2.4.3 主成分分析 将10个指标进行主成分分析,结果见表5。结果发现第1主成分的特征根4.975,贡献率49.752%,还不足以全面反映余甘子的整体信息;第2,3主成分的特征根分别为1.454,1.245,前3个主成分累计贡献率76.744%,可反映样品的大部分信息。其中,在第1主成分中,特征向量较大的为 b^* 值、柯里拉京、诃黎勒酸(特征向量>0.8),代表对第1主成分有较大的贡献率,从中提取的信息较多;

表4 余甘子分级指标的方差分析

Table 4 Variance analysis of grading indexes of Phyllanthi Fructus

指标	聚类均方	误差均方	F	P
直径	0.948	0.356	2.666	0.114
粒重	0.145	0.022	6.721	0.015
厚度	0.120	0.077	1.566	0.222
L*	442.134	9.511	46.488	0.000
a*	45.391	2.348	19.329	0.000
b*	122.357	4.433	27.604	0.000
没食子酸	0.274	0.471	0.582	0.452
柯里拉京	0.211	0.016	13.007	0.001
诃黎勒酸	0.481	0.034	14.023	0.001
鞣花酸	0.155	0.024	6.473	0.017

对第2,3主成分贡献较大为厚度(特征向量=0.762)和没食子酸(特征向量=0.693)。表明色泽指标、柯里拉京、诃黎勒酸可作为划分余甘子商品规格标准的主要指标。

2.4.4 余甘子外观性状与内在活性成分相关性分析 采用SPSS 21.0统计软件对各批余甘子外观指标与内在指标进行Pearson相关性分析^[6],见表6。结果显示,色泽指标L*,a*,b*值与柯里拉京、诃黎勒

酸、鞣花酸含量呈极显著负相关(P<0.01),表明余甘子表皮颜色越深,这3个活性成分含量越高。粒重与没食子酸含量呈极显著负相关(P<0.01),与柯里拉京含量呈极显著正相关(P<0.01),与诃黎勒酸含量呈显著正相关(P<0.05),存在矛盾关系,且描述性统计分析、方差分析、主成分分析结果显示其并不适合作为特征性指标,因此暂不纳入余甘子商品等级划分的指标。没食子酸与柯里拉京、诃黎勒酸呈显著负相关(P<0.05),柯里拉京与诃黎勒酸、鞣花酸呈极显著强正相关(P<0.01)。其余两个外观指标中,除厚度与鞣花酸含量呈显著弱相关外,直径、厚度与其他内在活性指标均无显著相关性。综上分析,表皮颜色、没食子酸、诃黎勒酸、柯里拉京、鞣花酸是余甘子分级的重要指标。传统商品规格标准讲究看货议价,主要是基于性状特征,在市场流通中无法保证大部分批次都能提供4个成分的含量测定,因此需建立简单易行、高效准确的商品规格标准。结合2020年版《中国药典》规定以没食子酸的含量作为指标成分,且表皮颜色在一定程度上反映诃黎勒酸、柯里拉京、鞣花酸的含量,综合考虑,最终确定表皮颜色、没食子酸含量作为余甘子分级指标。

表5 余甘子各指标主成分分析特征值

Table 5 Characteristic value of principal component analysis of each index of Phyllanthi Fructus

主成分	直径	粒重	厚度	L*	a*	b*	没食子酸	柯里拉京	诃黎勒酸	鞣花酸	特征根	累积贡献率/%
1	0.466	0.688	0.24	-0.75	-0.783	-0.87	-0.464	0.911	0.891	0.674	4.975	49.752
2	0.207	0.518	0.762	0.123	0.174	0.08	-0.413	0.066	-0.277	-0.509	1.454	64.297
3	0.571	-0.179	0.353	-0.269	-0.243	-0.178	0.693	-0.201	-0.275	-0.036	1.245	76.744

表6 30批余甘子药材各指标相关性分析

Table 6 Correlation analysis of 30 batches of Phyllanthi Fructus

指标	直径	粒重	厚度	L*	a*	b*	没食子酸	柯里拉京	诃黎勒酸	鞣花酸
直径	1.000	0.342	0.575 ²⁾	-0.200	0.084	0.036	-0.237	0.020	0.026	-0.146
粒重	0.342	1.000	0.396 ¹⁾	-0.398 ¹⁾	-0.368 ¹⁾	-0.483 ²⁾	-0.550 ²⁾	0.685 ²⁾	0.485 ²⁾	0.242
厚度	0.575 ²⁾	0.396 ¹⁾	1.000	0.046	0.150	0.084	-0.310	-0.057	-0.185	-0.366 ¹⁾
L*	-0.200	-0.398 ¹⁾	0.046	1.000	0.513 ²⁾	0.604 ²⁾	0.076	-0.599 ²⁾	-0.660 ²⁾	-0.635 ²⁾
a*	0.084	-0.368 ¹⁾	0.150	0.513 ²⁾	1.000	0.972 ²⁾	-0.052	-0.680 ²⁾	-0.670 ²⁾	-0.531 ²⁾
b*	0.036	-0.483 ²⁾	0.084	0.604 ²⁾	0.972 ²⁾	1.000	0.081	-0.745 ²⁾	-0.748 ²⁾	-0.555 ²⁾
没食子酸	-0.237	-0.550 ²⁾	-0.310	0.076	-0.052	0.081	1.000	-0.379 ¹⁾	-0.402 ¹⁾	0.055
柯里拉京	0.020	0.685 ²⁾	-0.057	-0.599 ²⁾	-0.680 ²⁾	-0.745 ²⁾	-0.379 ¹⁾	1.000	0.836 ²⁾	0.662 ²⁾
诃黎勒酸	0.026	0.485 ²⁾	-0.185	-0.660 ²⁾	-0.670 ²⁾	-0.748 ²⁾	-0.402 ¹⁾	0.836 ²⁾	1.000	0.727 ²⁾
鞣花酸	-0.146	0.242	-0.366 ¹⁾	-0.635 ²⁾	-0.531 ²⁾	-0.555 ²⁾	0.055	0.662 ²⁾	0.727 ²⁾	1.000

注:¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

2.5 余甘子商品规格等级的分级

2.5.1 聚类分析 将30批余甘子采用SPSS 21.0软件进行系统聚类分析,结果见图3。谱系图中的距离代表相似度,距离越远差异越大,在25的标度下,现有批次余甘子被分为两大类。以表皮颜色 L^* , a^* , b^* 值、没食子酸含量为指标,进一步采用SPSS软件进行K-均值聚类分析,将余甘子样品初步定为2类,最终聚类中心值见表7。

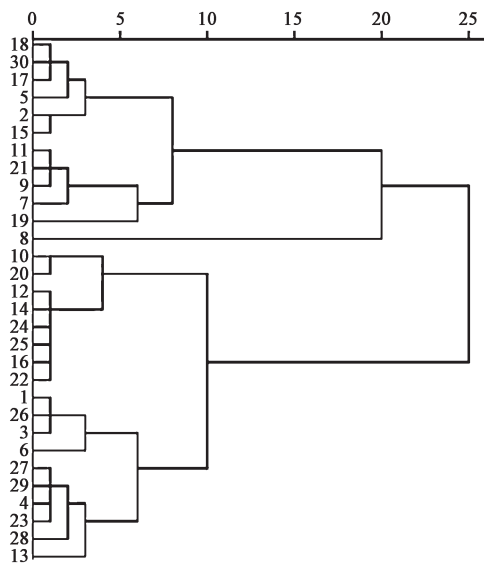


图3 30批余甘子样品系统聚类分析谱系

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 30 samples of Phyllanthi Fructus

表7 余甘子样品K-均值聚类分析的最终聚类中心值

Table 7 Final cluster center values of K-means cluster analysis of Phyllanthi Fructus

评价指标	聚类中心	
	1	2
L^*	36.04	43.76
a^*	3.37	6.54
b^*	4.60	9.62
没食子酸/%	1.6	1.8

2.5.2 余甘子商品等级划分标准建议 根据上述研究结果,结合余甘子药材流通实际,同时考虑到标准的实用性、科学性和可操作性,将余甘子划分为2个等级。2个等级共同点为干货,呈球形或扁球形,直径1.2~2 cm。有浅黄色颗粒状突起,具皱纹及不明显的6棱,有果梗。外果皮厚质硬而脆。内果皮黄白色,硬核样,表面略具6棱,背缝线的偏上部有数条筋脉纹,干后可裂成6瓣,种子6,近三棱形,棕色。气微,味酸涩,回甜。果皮颜色 $L^* < 44$, $a^* <$

7 , $b^* < 10$,没食子酸含量 $> 1.6\%$,4个指标需同时满足即为一等品,4个指标不能同时满足,即为二等品。代表性样品见图4。



A.一等品;B.二等品

图4 不同等级余甘子典型样

Fig. 4 Typical samples of Phyllanthi Fructus of different grades

2.6 不同等级余甘子对肝癌HepG2细胞的抑制作用 现代药理学表明余甘子具有保肝、抗癌作用^[7-10],本研究拟通过考察按上述方法划分的不同等级的余甘子对肝癌HepG2细胞的抑制作用,从药理学角度对该等级划分标准进行验证研究。

2.6.1 不同等级余甘子提取物的制备 随机取6批不同等级余甘子样品(一等品2批,二等品4批),粉碎过3号筛,称取粉末约5.0 g,置于具塞锥形瓶中,加入体积分数50%甲醇溶液200 mL,超声20 min(300 W,40 kHz),3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径32 cm),取上清液35 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸得浓缩液,冷冻干燥,得余甘子提取物粉末。

2.6.2 细胞培养 取人肝癌细胞HepG2,常规培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养液中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 95%饱和湿度条件下常规培养并采用0.25%胰蛋白酶消化后传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.6.3 CCK法检测不同等级余甘子提取物对肝癌HepG2细胞增殖的影响 将上述细胞重悬至5 mL,用培养液将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL,铺入96孔板中,每孔100 μL ,周围孔板用200 μL PBS液封减缓挥发,过夜贴壁。余甘子提取物使用完全培养基配制成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,然后过0.22 μm 微孔滤膜除菌,按比例稀释成不同浓度。弃去原培养基,加入含药培养基,以培养液为空白对照,每组重复3个孔,继续培养24 h。然后更换新鲜培养基(提取物为黄棕色,可能影响实验结果),每孔加入CCK-8试剂(已经含在培养基中)10 μL ,继续孵育4 h,用酶标仪测450 nm处吸光度A。

通过SPSS 21.0软件计算各批次余甘子提取物的半抑制浓度(IC_{50}),余甘子样品一等品S2,二等品

S8, S19, S20, S21, 一等品 S24 的 IC_{50} 分别为 0.236, 0.423, 0.661, 0.527, 0.434, 0.322 $mg \cdot L^{-1}$, 见图 5。由结果可知, 不同等级的 6 批余甘子随着浓度增加都表现出抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的作用, 且呈浓度依赖性趋势, 与二等品相比, 一等品的各批次均显示较强的抑制作用, 且 IC_{50} 均小于二等品各批次, 说明该等级划分标准具有一定科学性。

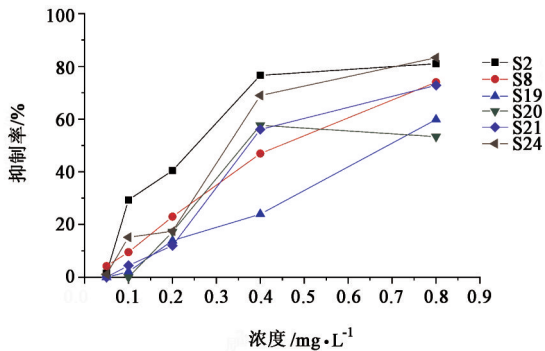


图5 不同等级余甘子提取物对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响
Fig. 5 Effects of different levels of Phyllanthi Fructus extract on proliferation of HepG2 cells

2.7 余甘子商品等级快速评判比色卡制定 根据上述研究结果发现余甘子药材果皮颜色是余甘子经验鉴别的首要特征。但是在果皮颜色实际判别过程中, 采用拍照提取颜色的方式不仅耗时且设备难以获得, 而个人主观判别存在很大的差异性和模糊性^[11], 因此有必要建立快速、可靠的余甘子等级评判工具。根据上述等级划分标准临界值 ($L^*=44$, $a^*=7$, $b^*=10$), 以采集的余甘子为颜色库, 利用 Photoshop 中的拾色器面板进行参数比对, 将余甘子药材果皮颜色进行等级划分, 以制备用于对余甘子药材果皮颜色等级快速评判的比色卡, 开创了余甘子品质快速评价的新途径, 比色卡见图 6。

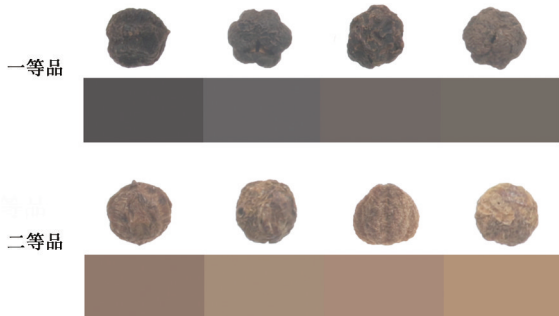


图6 余甘子商品等级快速评判比色卡
Fig. 6 Color chart for quick evaluation of Phyllanthi Fructus commodity grade

3 讨论

中药商品规格等级是衡量中药商品品质优劣

的重要标准^[12]。以《中国药典》为代表的中药质量标准化研究取得令人瞩目的成就, 但其对于中药材质量重在控制, 只有“最低合格线”, 难甄好坏^[13-15]。而中药材商品规格等级长于质量优劣评价, 可用于中药材商品质量快速判断, 亦可用于中药材质量控制, 在中药材市场流通中具有不可替代的主导作用。然而, 我国 1959 年, 1964 年和 1984 年颁布的 3 版中药材商品规格等级标准都是基于外观性状感官的评价, 没有涉及到现代化学、药理学、生物学等方面的指标^[16-17]。中药材商品规格等级标准的地位日渐式微, 现代研究仅有零星报道, 近乎空白, 缺乏系统化的研究领域和方向。

余甘子为中药、藏药特色药材、药食同源品种及攀西地区产业扶贫重点支撑品种, 具有大品种培育与开发价值, 然而目前尚无关于其商品规格等级标准的研究。本研究通过量化分析余甘子传统外观鉴别指标与内在活性成分的特征与联系, 初步制订了余甘子药材商品等级标准, 并通过考察按此标准划分的不同等级的余甘子对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用, 从药理学角度对商品等级划分标准进行验证研究, 同时建立了余甘子商品等级快速评判比色卡。研究结果整体表明余甘子表皮颜色越深, 其柯里拉京、河黎勒酸、鞣花酸含量越高, 单个余甘子质量越轻, 没食子酸含量越高, 而传统认为的“个大(直径), 肉厚(厚度)”并未与活性成分含量挂钩。细胞实验结果表明与二等品相比, 一等品的各批次均显示较强的抑制作用, 且 IC_{50} 值均小于二等品各批次, 提示该等级划分标准较为可靠。现代药理学证实余甘子具有保肝、抗氧化^[18]、抗菌^[19]、抗疲劳^[20]、抗癌^[21]、降血糖^[22]等丰富的药理活性, 而多酚类成分是其主要的活性成分, 将外观性状与余甘子品质密切相关的活性成分如没食子酸、柯里拉京等成分含量联系起来, 以此制定的标准从外观到内在、从主观到较为客观, 都更准确合理地阐述了余甘子的等级分类, 既是对传统商品等级划分方式的传承, 也是一种现代补充, 并首次从药理学角度对商品等级划分标准进行验证研究, 为余甘子药材商品等级的制定及质量控制提供了依据, 对引导中药材市场优质优价具有重要意义, 开创了一种具有一定参考价值的中药材商品规格等级研究模式。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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,2020:186-187.
- [2] 彭成,张文生. 新编中国药材学:第七卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:219.
- [3] 罗传红,黄胜杰,胡琪琪,等. 去核对余甘子药材质量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210147.
- [4] 刘天睿,金艳,孟虎彪,等. 论中药“辨状论质”之辨色泽与品质评价的生物学内涵研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(19):4545-4554.
- [5] THILAKCHAND K R, MATHAI R T, SIMON P, et al. Hepatoprotective properties of the Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn): a review[J]. Food Funct, 2013, 4(10): 1431-1441.
- [6] 史周华,何雁. 中医药统计学与软件应用[M]. 北京:中国中医药出版社,2017:12
- [7] ZHONG Z G, WU D P, HUANG J L, et al. Progallin A isolated from the acetic ether part of the leaves of *Phyllanthus emblica* L. induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells by up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2): 765-772.
- [8] NGAMKITIDECHAKUL C, JAIJOY K, HANSAKUL P, et al. Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of *in vivo* tumour promotion and *in vitro* invasion of human cancer cells [J]. Phytother Res, 2010, 24(9): 1405-1413.
- [9] PINMAI K, CHUNLARATTHANABHORN S, NGAMKITIDECHAKUL C, et al. Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extracts with conventional cytotoxic agents: doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(10): 1491-1497.
- [10] 陈静,冯光远,李登科,等. 藏药余甘子鞣质部位对肿瘤细胞凋亡与周期的影响[J]. 中国药物警戒, 2016, 13(4): 193-196.
- [11] 肖日传,苗琦,罗光明,等. 栀子药材商品规格等级标准研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 663-668.
- [12] 李峰,蒋桂华. 中药商品学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2014:5-6
- [13] 肖小河. 走向精准的中药质量评价与控制[J]. 药学报, 2019, 54(12): 2139-2140.
- [14] 詹志来,邓爱平,方文韬,等. 中药材商品规格等级标准制(修)订的原则依据和方法[J]. 中国现代中药, 2019, 21(6): 699-706.
- [15] 肖小河. 中医药科学发展:新时代,新策略[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 3837-3841.
- [16] 杨光,曾燕,郭兰萍,等. 中药材商品规格等级标准研究现状及几个关键问题的商榷[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1733-1738.
- [17] 肖小河,黄璐琦. 中药材商品规格标准化研究[M]. 北京:人民卫生出版社,2016:18
- [18] LUO W, ZHAO M, YANG B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chem, 2008, 114(2): 499-504.
- [19] DHALE D A, MOGLE U P. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Phyllanthus emblica* (L.) [J]. Sci Res Rep, 2011, 1(3): 138-142.
- [20] 崔炳权,黄伟侨,林元藻. 余甘子抗疲劳、抗缺氧作用实验研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(6): 26-28.
- [21] ZHAO T J, SUN Q, MARQUES M, et al. Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (Indian gooseberry) [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 950890.
- [22] D'SOUZA J J, D'SOUZA P P, FAZAL F, et al. Anti-diabetic effects of the Indian indigenous fruit *Emblica officinalis* Gaertn: active constituents and modes of action[J]. Food Funct, 2014, 5(4): 635-644.

[责任编辑 顾雪竹]