

熟三七饮片 HPLC 指纹图谱的建立及多成分定量测定

黄永亮¹, 余志杰², 黎江华², 唐晓章², 刘玉杰², 吴纯洁^{2*}

1. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立不同产地熟三七饮片的 HPLC 指纹图谱, 并同时测定其中 11 种皂苷类成分含量。方法 采用 Agilent ZorbaxSB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相(洗脱程序: 0~30 min, 20%乙腈; 30~60 min, 20%~45%乙腈; 60~88 min, 45%~75%乙腈; 88~98 min, 75%乙腈; 98~100 min, 75%~20%乙腈), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温 35 ℃, 建立熟三七饮片的 HPLC 指纹图谱, 并对三七皂苷 R₁ 及人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、20S-Rh₁、20R-Rh₁、Rd、Rk₃、Rh₄、20S-Rg₃、20R-Rg₃ 等指标成分的定量测定方法进行方法学考察, 对 10 批(S1~S10)熟三七饮片进行含量测定。结果 建立了熟三七饮片的 HPLC 指纹图谱, 共标定 30 个共有峰, S1~S10 指纹图谱的相似度分别为 0.941、0.938、0.945、0.951、0.913、0.909、0.920、0.928、0.917、0.919; 在所建立的定量测定方法条件下, 同时测定 11 个皂苷成分, 三七皂苷 R₁ 及人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、20S-Rh₁、20R-Rh₁、Rd、Rk₃、Rh₄、20S-Rg₃、20R-Rg₃ 平均质量分数分别为 5.274、20.515、2.838、23.651、3.476、1.407、5.239、1.784、1.580、0.904、0.294 mg/g; 色谱峰均达到了较好地分离, 且在线性范围内线性关系良好, 11 种皂苷的线性回归方程相关系数分别为 0.999 7、0.999 5、0.999 5、0.999 7、0.999 7、0.999 6、0.999 7、0.999 6、0.999 7、0.999 7、0.999 6; 平均加样回收率分别为 101.23%、98.52%、97.67%、99.62%、98.17%、98.92%、99.44%、99.14%、100.25%、98.23%、96.89%; RSD 值分别为 1.35%、1.58%、2.44%、1.05%、1.48%、1.56%、0.85%、2.34%、2.85%、1.25%、1.08%。结论 该方法灵敏、准确、重复性好, 可为熟三七饮片的质量评价提供参考。

关键词: 熟三七; HPLC; 指纹图谱; 皂苷类成分; 质量评价; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 20S-Rh₁; 人参皂苷 20R-Rh₁; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Rk₃; 人参皂苷 Rh₄; 人参皂苷 20S-Rg₃; 人参皂苷 20R-Rg₃
中图分类号: R283; R927 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0589-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.013

HPLC fingerprint of steamed *Panax Notoginseng* and content determination of multi-components

HUANG Yong-liang¹, YU Zhi-jie², LI Jiang-hua², TANG Xiao-zhang², LIU Yu-jie², WU Chun-jie²

1. The Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and simultaneous method for the determination of 11 saponins in steamed *Panax notoginseng* from different origins. **Methods** Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase consisted of acetonitrile-water with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min (elution program: 0—30 min, 20% acetonitrile; 30—60 min, 20%—45% acetonitrile; 60—88 min, 45%—75% acetonitrile; 88—98 min, 75% acetonitrile; 98—100 min, 75%—20% acetonitrile), and the detection wavelength was 203 nm. The establishment of steamed *P. notoginseng* HPLC fingerprint, and determination method of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁, 20S-Rh₁, 20R-Rh₁, Rd, Rk₃, Rh₄, 20S-Rg₃, and 20R-Rg₃ index components were studied methodologically. The content of 11 saponins in 10 batches was determined. **Results** The HPLC fingerprint was establish, and thirty common peaks were selected as characteristic peaks of steamed *P. notoginseng*. The similarities of different samples from 10 areas were 0.941, 0.938, 0.945, 0.951, 0.913, 0.909, 0.920, 0.928, 0.917, and 0.919. In quantitative analysis, eleven saponins were separated well and the average content was 5.274, 20.515, 2.838, 23.651, 3.476, 1.407, 5.239, 1.784, 1.580,

收稿日期: 2017-08-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81503254)

作者简介: 黄永亮 (1985—), 男, 主管药师, 博士, 研究方向为中药炮制与制剂。Tel: (028)61801001 E-mail: ld10000@126.com

*通信作者 吴纯洁 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制与制剂。Tel: (028)61801001 E-mail: wcj-one@263.net

0.904, and 0.294 mg/g, respectively. Additionally, all calibration curves showed good linear regression relationship, with correlation indexes of 0.999 7, 0.999 5, 0.999 5, 0.999 7, 0.999 7, 0.999 6, 0.999 7, 0.999 6, 0.999 7, 0.999 7, and 0.999 6; The average recoveries were 101.23%, 98.52%, 97.67%, 99.62%, 98.17%, 98.92%, 99.44%, 99.14%, 100.25%, 98.23%, and 96.89%, with RSDs of 1.35%, 1.58%, 2.44%, 1.05%, 1.48%, 1.56%, 0.85%, 2.34%, 2.85%, 1.25%, and 1.08%. **Conclusion** This method is sensitive, accurate and reproducible. It can be used to provide a reference for the standard and evaluation of quality of steamed *P. notoginseng*.

Key words: steamed *Panax notoginseng*; HPLC; fingerprint; saponins; quality evaluation; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ginsenoside 20S-Rh₁; ginsenoside 20R-Rh₁; ginsenoside Rd; ginsenoside Rk₃; ginsenoside Rh₄; ginsenoside 20S-Rg₃; ginsenoside 20R-Rg₃

三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma* 为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎^[1]。历代本草记载,在使用本药时,有生、熟之分,素有“生消熟补”之说,即生三七散瘀血、消肿定痛;熟三七补血、补气,主要用于治疗血虚症和癌性贫血,改善术后贫血和化疗引起的白细胞减少症^[2]。有学者认为三七炮制前后所含化学物质的量、相对比例甚至结构均发生了变化,从而引起生、熟三七功效各异^[3-4]。现代研究表明,三七皂苷 R₁ (以下简称 R₁) 和人参皂苷 Rg₁、Rb₁ (以下分别简称 Rg₁、Rb₁,下同) 为生三七的主要活性成分并作为定量测定指标成分,而三七经蒸制后皂苷类成分的种类和含量发生了显著变化:原有 R₁ 和 Rg₁、Re、Rb₁、Rd 的量降低,新生成人参皂苷 F₄、Rh₁、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅、Rh₂ 等成分^[5];蒸制三七及新生成 Rg₃、F₄ 等具有增强免疫、提高记忆、抑制肿瘤的生物活性^[6-9]。

目前三七的质量控制方法多是按照《中国药典》2015 年版测定其中 R₁ 及 Rg₁、Rb₁ 的量为主,而《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版中收录的熟三七饮片也沿用此规定。然而,熟三七与生三七相比,在化学成分及药理作用方面均发生了显著变化,主要皂苷类成分量并不能评价熟三七质量。因此,目前的质量标准或规范并不能全面反映三七炮制品的质量。本实验收集 10 批不同产地的熟三七饮片,建立其 HPLC 指纹图谱分析方法,并同时测定 11 种皂苷类成分^[10-13],以期更全面地评价熟三七质量,为炮制工艺规范化提供参考,并保障其临床用药的有效性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, G1311C 四元泵, G1329B 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1362A 二极管阵列检测器, EZChrom Elite 色谱工作站, 美国 Agilent 公司; Sartorius BP211D 电子天平, 德国赛

多利斯公司; AS10200AT 型超声波清洗器, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; UPT-11-10T 优普系列超纯水器, 成都超纯科技有限公司。

1.2 试剂

对照品 R₁ (批号 110745-201318)、Rg₁ (批号 110703-200424)、Re (批号 110754-201525)、Rb₁ (批号 110704-200420) 均购于中国食品药品检定研究院;对照品 Rd (批号 16012503)、人参皂苷 20S-Rh₁ (20S-Rh₁, 批号 16030717)、20R-Rh₁ (批号 16041923)、Rk₃ (批号 16061518)、Rh₄ (批号 16111713)、20S-Rg₃ (批号 16111713)、20R-Rg₃ (批号 16031802) 均购于成都曼思特科技有限公司;各对照品质量分数均为 98.0% 以上;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水, 自制。

1.3 材料

10 批熟三七饮片中 8 批购自于不同饮片生产企业, 2 批为自行炮制, 具体见表 1。经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为熟三七, 植物基原均为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。

自行炮制过程: 参照《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版熟三七炮制方法, 取三七药材适量,

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品编号	样品来源	样品批号
S1	四川得恩德药业有限公司	20160601
S2	四川得恩德药业有限公司	20160901
S3	云南七丹药业股份有限公司	1604001
S4	云南七丹药业股份有限公司	1603001
S5	四川联成迅康医药股份有限公司	20151101
S6	四川联成迅康医药股份有限公司	20151102
S7	云南文山坤七药业有限公司	20150401
S8	云南文山坤七药业有限公司	20150901
S9	自制样品	20161101
S10	自制样品	20161102

加水润透,于 110 ℃ 蒸制 3 h,50 ℃ 下烘干,即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 20% 乙腈; 30~60 min, 20%~45% 乙腈; 60~88 min, 45%~75% 乙腈; 88~98 min, 75% 乙腈; 98~100 min, 75%~20% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 203 nm; 进样量 5 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取 R₁ 及 R_{g1}、Re、Rb₁、Rd、20S-Rh₁、20R-Rh₁、Rk₃、Rh₄、20S-Rg₃、20R-Rg₃ 对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成单一对照品贮备液;再精密吸取对照品溶液适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇配制成质量浓度分别为 200.6、801.6、121.7、1 003.0、51.0、30.1、60.6、30.4、50.9、40.6、30.2 μg/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取熟三七饮片粉末 (过 4 号筛) 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇约 8 mL,放置过夜,超声处理 (功率 240 W,频率 40 kHz) 30 min,冷却至室温,转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 取熟三七饮片 (S1) 供试品溶

液,连续进样 6 次,测得熟三七饮片 HPLC 各共有峰的峰面积和相对保留时间的 RSD 均<3%,结果表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取熟三七饮片 (S1) 供试品溶液,分别于配制后的 0、4、8、12、18、24 h 进样测定,测得熟三七 HPLC 各共有峰的峰面积和相对保留时间的 RSD 均<3%,结果表明熟三七饮片供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 取熟三七饮片 (S1) 样品粉末 (过 4 号筛) 约 0.5 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,测得熟三七饮片 HPLC 各共有峰的峰面积和相对保留时间的 RSD 均<3%,结果表明该方法的重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱研究

2.4.1 指纹图谱的建立及共有峰定位 取 10 批来源不同的熟三七饮片 (S1~S10),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依法进行分析,记录 HPLC 图谱,如图 1 所示。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》对 10 批熟三七饮片 HPLC 指纹图谱进行拟合得到对照图谱 (R)^[14],如图 1 所示。10 批样品指纹图谱检测到共有峰 30 个。

2.4.2 相似度评价 通过与对照品图谱比对,确定峰面积较大的 3 号峰为 R_{g1},以其为参比峰,计算各共有峰的相对保留时间 (表 2) 和相对峰面积 (表 3)。采用药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》对 10 批熟三七饮片的指纹图谱进行相似度评价。以 S1 为参照图谱,采用中位数

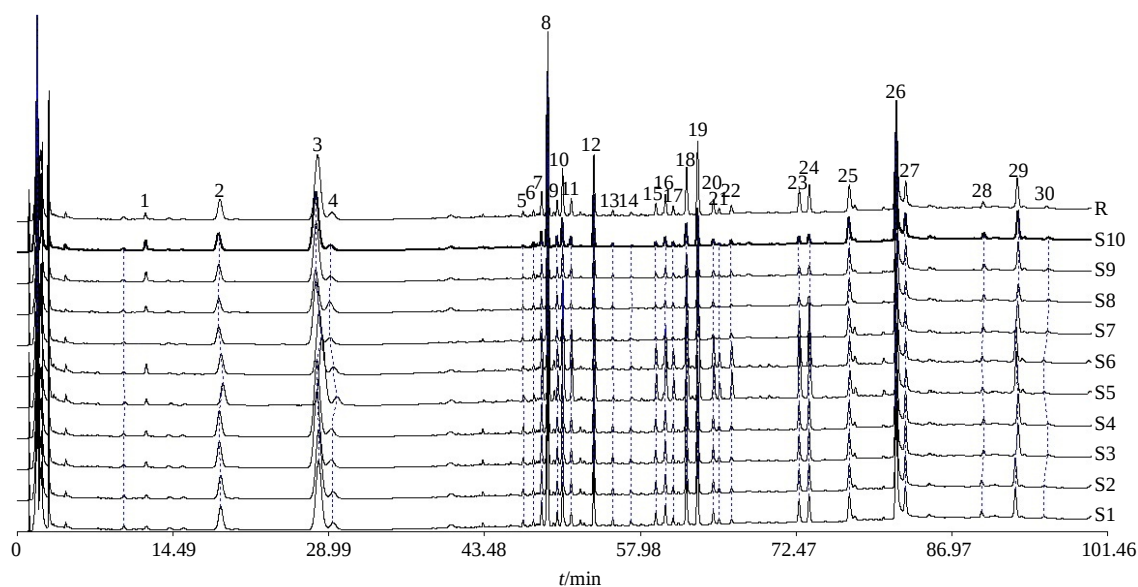


图 1 10 批熟三七饮片的 HPLC 指纹图谱及对照图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint and control chromatogram (R) of 10 batches of steamed *P. notoginseng*

表 2 10 批熟三七饮片各共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks of 10 batches of steamed *P. notoginseng*

峰号	相对保留时间										峰号	相对保留时间									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.354	0.355	0.356	0.358	0.353	0.354	0.351	0.353	0.349	0.354	16	2.151	2.163	2.169	2.198	2.128	2.147	2.114	2.132	2.110	2.169
2	0.675	0.675	0.674	0.676	0.674	0.675	0.675	0.673	0.673	0.674	17	2.177	2.188	2.196	2.224	2.153	2.173	2.139	2.157	2.034	2.194
3(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	18	2.221	2.233	2.240	2.269	2.197	2.217	2.182	2.201	2.175	2.239
4	1.048	1.047	1.047	1.046	1.048	1.047	1.049	1.048	1.051	1.047	19	2.258	2.270	2.277	2.307	2.234	2.254	2.218	2.237	2.110	2.276
5	1.678	1.688	1.692	1.705	1.661	1.675	1.650	1.664	1.670	1.692	20	2.310	2.322	2.330	2.360	2.285	2.306	2.270	2.289	2.158	2.329
6	1.713	1.723	1.727	1.750	1.695	1.710	1.683	1.698	1.602	1.727	21	2.329	2.342	2.390	2.421	2.304	2.326	2.289	2.348	2.176	2.348
7	1.740	1.749	1.754	1.777	1.722	1.737	1.710	1.725	1.728	1.754	22	2.371	2.383	2.448	2.481	2.345	2.366	2.328	2.405	2.213	2.389
8	1.761	1.771	1.775	1.799	1.743	1.758	1.730	1.745	1.746	1.775	23	2.595	2.609	2.618	2.652	2.566	2.590	2.549	2.570	2.466	2.616
9	1.792	1.802	1.807	1.830	1.773	1.789	1.760	1.776	1.676	1.806	24	2.628	2.642	2.651	2.686	2.599	2.623	2.582	2.603	2.553	2.649
10	1.810	1.819	1.825	1.849	1.791	1.807	1.778	1.794	1.693	1.824	25	2.762	2.776	2.785	2.822	2.731	2.756	2.711	2.735	2.776	2.783
11	1.838	1.848	1.854	1.878	1.819	1.836	1.806	1.822	1.719	1.853	26	2.917	2.933	2.942	2.982	2.884	2.912	2.864	2.888	2.820	2.940
12	1.913	1.924	1.930	1.956	1.894	1.911	1.881	1.897	1.889	1.929	27	2.948	2.964	2.974	3.014	2.915	2.942	2.895	2.919	2.849	2.972
13	1.976	1.987	1.993	2.020	1.955	1.973	1.943	1.959	1.948	1.992	28	3.200	3.225	3.234	3.278	3.166	3.196	3.145	3.171	3.188	3.233
14	2.036	2.047	2.053	2.080	2.015	2.033	2.001	2.018	1.903	2.052	29	3.313	3.340	3.350	3.395	3.276	3.307	3.255	3.282	3.296	3.348
15	2.119	2.131	2.137	2.165	2.097	2.116	2.082	2.100	1.991	2.136	30	3.408	3.440	3.449	3.496	3.368	3.399	3.346	3.374	3.488	3.449

表 3 10 批熟三七饮片各共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks of 10 batches of steamed *P. notoginseng*

峰号	相对峰面积										峰号	相对峰面积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.020	0.019	0.015	0.011	0.020	0.015	0.013	0.020	0.013	0.018	16	0.091	0.079	0.033	0.034	0.238	0.235	0.035	0.026	0.061	0.043
2	0.227	0.248	0.198	0.201	0.234	0.230	0.202	0.225	0.208	0.211	17	0.029	0.030	0.015	0.015	0.094	0.092	0.024	0.012	0.027	0.021
3(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	18	0.190	0.208	0.076	0.080	0.492	0.492	0.109	0.070	0.147	0.117
4	0.068	0.070	0.072	0.070	0.091	0.087	0.088	0.071	0.086	0.063	19	0.284	0.300	0.120	0.126	0.737	0.736	0.157	0.109	0.214	0.195
5	0.025	0.018	0.013	0.016	0.019	0.019	0.013	0.013	0.015	0.018	20	0.056	0.059	0.026	0.027	0.153	0.153	0.022	0.023	0.041	0.037
6	0.018	0.019	0.017	0.017	0.024	0.024	0.018	0.016	0.017	0.023	21	0.017	0.018	0.045	0.046	0.062	0.062	0.056	0.051	0.012	0.010
7	0.082	0.086	0.054	0.054	0.141	0.142	0.050	0.048	0.071	0.060	22	0.019	0.019	0.022	0.019	0.121	0.142	0.067	0.068	0.051	0.043
8	0.581	0.614	0.587	0.600	0.850	0.850	0.630	0.603	0.647	0.717	23	0.107	0.113	0.035	0.037	0.286	0.282	0.066	0.046	0.020	0.041
9	0.047	0.050	0.045	0.046	0.089	0.090	0.048	0.037	0.051	0.046	24	0.130	0.137	0.046	0.046	0.346	0.346	0.076	0.058	0.073	0.056
10	0.162	0.171	0.103	0.107	0.388	0.388	0.092	0.088	0.154	0.137	25	0.143	0.135	0.171	0.120	0.144	0.160	0.178	0.137	0.249	0.241
11	0.056	0.058	0.029	0.030	0.172	0.172	0.025	0.019	0.049	0.064	26	0.618	0.577	0.707	0.567	0.632	0.675	0.670	0.548	0.654	0.723
12	0.203	0.214	0.173	0.166	0.304	0.305	0.170	0.195	0.180	0.223	27	0.125	0.131	0.088	0.109	0.087	0.092	0.059	0.062	0.109	0.162
13	0.023	0.024	0.016	0.015	0.014	0.015	0.026	0.016	0.027	0.016	28	0.031	0.028	0.035	0.027	0.037	0.032	0.028	0.033	0.032	0.047
14	0.021	0.022	0.015	0.014	0.023	0.023	0.012	0.017	0.016	0.009	29	0.165	0.173	0.214	0.282	0.249	0.242	0.242	0.237	0.279	0.267
15	0.048	0.051	0.016	0.016	0.114	0.115	0.023	0.015	0.029	0.025	30	0.015	0.015	0.013	0.008	0.092	0.067	0.029	0.024	0.046	0.038

法生成对照图谱后进行自动匹配。S1~S10 指纹图谱的相似度分别为 0.941、0.938、0.945、0.951、0.913、0.909、0.920、0.928、0.917、0.919，可见不同产地的熟三七饮片相似度均在 0.909~0.951，表明各地

出售的熟三七饮片质量相对稳定。

2.5 熟三七皂苷类成分定量测定方法学考察

HPLC 检测条件同指纹图谱方法，精密度、稳定性、重复性试验同“2.3”项指纹图谱方法学考察。

2.5.1 色谱图 按“2.1”项下色谱条件进样测定，分析混合对照品溶液、供试品溶液。各相邻色谱峰

分离度较好，理论塔板数均 $>3\,500$ 。混合对照品溶液和熟三七供试品溶液的色谱图见图 2。

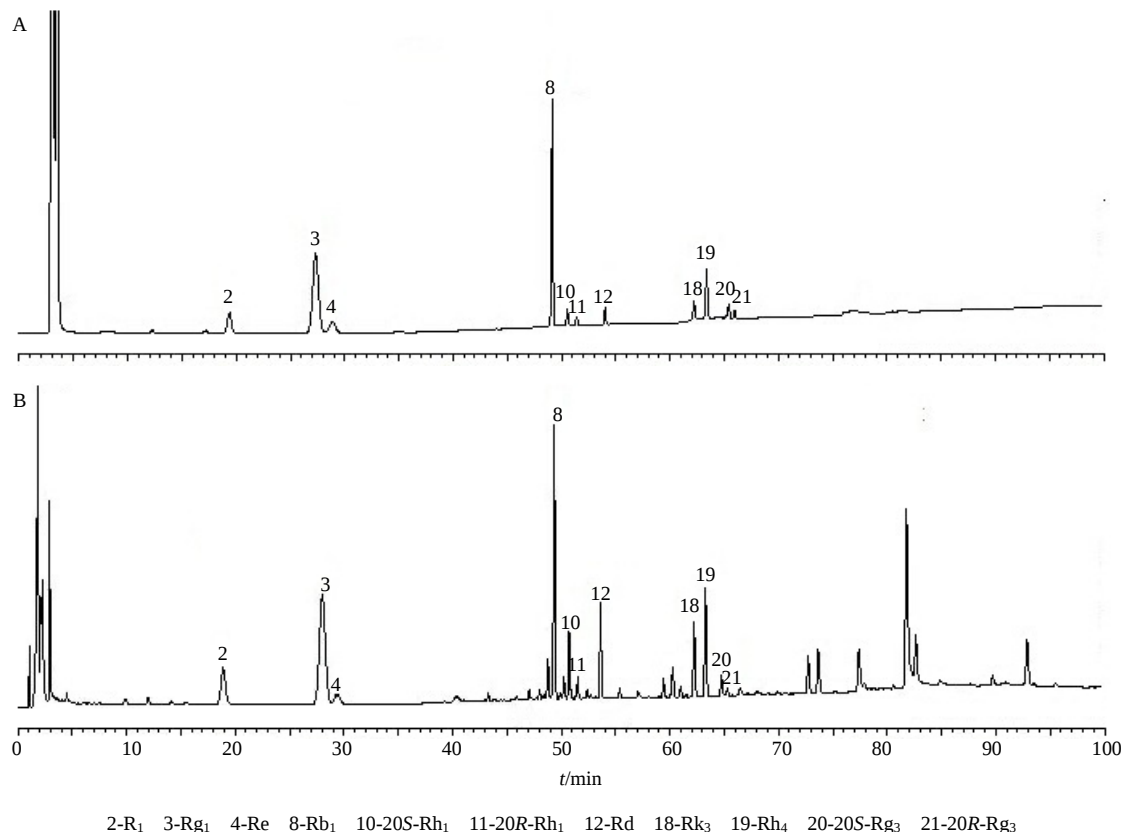


图 2 混合对照品 (A) 和熟三七饮片 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of reference substance (A) and steamed *P. notoginseng* (B)

2.5.2 线性范围考察 精密吸取混合对照品溶液各 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇定容，制成系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析，以各成分的峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X)，分别绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程分别为 $R_1 Y = 1.488 \times 10^5 X + 374\,150$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $8.024 \sim 100.300\, \mu\text{g/mL}$; $R_{g1} Y = 2.144 \times 10^5 X + 1\,740\,404$, $r = 0.999\,5$, 线性范围 $32.064 \sim 400.800\, \mu\text{g/mL}$; $R_e Y = 1.941 \times 10^5 X + 436\,521$, $r = 0.999\,5$, 线性范围 $4.868 \sim 60.850\, \mu\text{g/mL}$; $R_{b1} Y = 1.325 \times 10^5 X - 5\,882$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $40.120 \sim 501.500\, \mu\text{g/mL}$; $20S-R_{h1} Y = 3.983 \times 10^5 X + 18\,450$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $1.204 \sim 15.050\, \mu\text{g/mL}$; $20R-R_{h1} Y = 1.069 \times 10^5 X + 19\,973$, $r = 0.999\,6$, 线性范围 $2.424 \sim 30.300\, \mu\text{g/mL}$; $R_d Y = 2.188 \times 10^5 X + 16\,351$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $2.040 \sim 25.500\, \mu\text{g/mL}$; $R_{k3} Y = 4.569 \times 10^5 X +$

$19\,410$, $r = 0.999\,6$, 线性范围 $1.216 \sim 15.200\, \mu\text{g/mL}$; $R_{h4} Y = 7.437 \times 10^5 X + 54\,269$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $2.036 \sim 25.450\, \mu\text{g/mL}$; $20S-R_{g3} Y = 2.496 \times 10^5 X + 96\,622$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $1.624 \sim 20.300\, \mu\text{g/mL}$; $20R-R_{g3} Y = 2.079 \times 10^5 X - 3\,929$, $r = 0.999\,6$, 线性范围 $1.208 \sim 15.100\, \mu\text{g/mL}$; 结果表明各皂苷成分在各自范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.3 加样回收率试验 取 6 份熟三七饮片 (S_1) 样品粉末 (过 4 号筛) 约 0.25 g，精密称定，置于锥形瓶中，精密加入混合对照品适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依法测定并计算各皂苷类成分的平均加样回收率以及 RSD。结果 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 $20S-R_{h1}$ 、 $20R-R_{h1}$ 、 R_d 、 R_{k3} 、 R_{h4} 、 $20S-R_{g3}$ 、 $20R-R_{g3}$ 平均加样回收率分别为 101.23%、98.52%、97.67%、99.62%、98.17%、98.92%、99.44%、99.14%、100.25%、98.23%、96.89%；RSD 值分别为 1.35%、1.58%、2.44%、1.05%、1.48%、1.56%、0.85%、2.34%、2.85%、1.25%、1.08%。

2.6 熟三七样品皂苷类成分定量测定

分别取 10 批不同来源的熟三七饮片(S1~S10) 0.5 g, 精密称定后, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样 5 μ L, 分析 11 种皂苷类成分的质量分数, 结果见表 4。由结果可见, 熟三七中皂苷类成分仍以 R_1 、 R_{g_1} 、 R_{b_1} 质量

分数最高, 新生成皂苷中, R_{h_1} 质量分数最高, R_{k_3} 、 R_{h_4} 、 R_{g_3} 的质量分数多在 0.1%~0.2%, 其中 S5、S6 新生成皂苷质量分数明显高于其他样品, 推测为炮制工艺差异造成。蒸制三七中部分新生成皂苷成分具有增强免疫、提高记忆等活性, 因此造成三七“生消熟补”的特性。

表 4 10 批熟三七饮片中 11 种皂苷类成分测定结果 ($n=3$)

Table 4 Components determination of 10 batches of steamed *P. notoginseng* ($n=3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	R_1	R_{g_1}	R_e	R_{b_1}	20S- R_{h_1}	20R- R_{h_1}	R_d	R_{k_3}	R_{h_4}	20S- R_{g_3}	20R- R_{g_3}
S1	6.018	20.698	2.497	21.744	3.804	1.435	5.198	1.329	1.103	1.172	0.358
S2	6.854	22.234	2.694	23.673	4.248	1.588	5.918	1.692	1.359	1.313	0.310
S3	4.500	19.949	1.962	22.734	3.524	1.219	4.336	1.547	1.137	0.815	0.313
S4	4.886	20.213	2.737	20.551	2.629	0.963	4.782	1.155	1.037	0.581	0.250
S5	5.322	19.777	3.075	29.902	5.822	3.330	6.944	3.812	3.299	1.221	0.609
S6	4.741	20.133	3.726	26.292	5.890	2.878	6.021	3.203	3.741	1.884	0.441
S7	5.507	21.651	2.437	22.948	2.142	0.531	5.264	1.483	0.826	0.512	0.099
S8	4.773	21.773	2.181	23.893	2.241	0.662	5.381	1.393	1.205	0.441	0.131
S9	4.472	19.205	4.055	22.244	1.878	0.637	4.078	1.078	0.936	0.523	0.208
S10	5.665	19.520	3.015	22.526	2.577	0.826	4.471	1.152	1.157	0.580	0.217

3 讨论

为了更好分离新生成皂苷成分, 本实验经反复实验最终优化了 HPLC 指纹图谱的色谱条件, 所得峰分离度较好, 且有较多的峰数, 能较为全面体现熟三七的化学成分特征^[15]。实验中发现 20R- R_{g_3} 溶解度较差, 经吡啶或二甲基甲酰胺助溶后溶解度得以提高, 但对照品溶剂峰则有所增高; 建立的 HPLC 指纹图谱标定了 30 个共有峰, 其共有峰峰面积占总峰面积的 90% 以上, 符合指纹图谱的技术要求; 对 10 批熟三七饮片中 11 种皂苷类成分进行了定量测定, 结果表明, 不同产地的熟三七饮片全部满足《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版所载熟三七基本标准; 存在的含量差异可能与种质、采收、炮制工艺等因素相关。其中, 炮制工艺对熟三七质量影响较大, 蒸制时间和温度又是炮制工艺的关键工艺参数, 因此必须严格控制熟三七炮制工艺参数, 才能保证熟三七饮片的质量。

笔者在收集熟三七样品时, 发现行业内常将生、熟三七作为同一饮片“三七”使用, 很可能因混用、错用导致不良后果, 值得注意。目前, 对于熟三七的质量控制, 《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版规定, 熟三七含 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及 R_1 的总量不得少于

4.5%^[16]; 而《中国药典》2015 年版三七项下只收录了饮片三七粉, 未收录熟三七, 且规定生三七含以上 3 种皂苷的总量不得少于 5%^[1]; 可以看出, 2 个标准差别不大, 未能较好区分生、熟三七。加之, 三七在蒸制过程中糖苷键的裂解反应和侧链的脱水反应^[17-18]后产生 20S- R_{h_1} 、20R- R_{h_1} 、 R_{k_3} 、 R_{h_4} 、20S- R_{g_3} 、20R- R_{g_3} 等新的皂苷类成分, 若仍采用 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及 R_1 作为定量评价指标缺乏科学性, 建议增加新生成皂苷成分进行定量测定, 更利于控制熟三七饮片质量。本实验收集市售的不同产地熟三七饮片作为研究对象, 优化建立 HPLC 指纹图谱分析方法, 并同时测定 11 种皂苷类成分量, 该方法具备了定性和定量双重作用, 且灵敏、准确、重复性好, 可为熟三七饮片质量标准提升和炮制工艺规范化提供参考和依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 黎江华, 李 涛, 黄永亮, 等. 三七“生消熟补”的炮制机制研究现状和思考 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2016, 42(6): 654-659.
- [3] 赵 军. 三七的生消熟补之谜 [J]. 开卷有益 (求医问药), 2011(1): 37-38.

- [4] 陈 斌, 许慧琳, 贾晓斌. 三七炮制研究进展与研究思路 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 482-487.
- [5] 武 双, 崔秀明, 郭从亮, 等. 不同蒸制法对三七主根中皂苷的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3352-3356.
- [6] Sun S, Qi L W, Du G J, *et al.* Red notoginseng: Higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng [J]. *Food Chem*, 2011, 125(4): 1299-1305.
- [7] 毕云枫, 姜 珊, 郑明珠, 等. 稀有原人参三醇型皂苷的生物转化研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4120-4125.
- [8] Toh D F, Patel D N, Chan E C Y, *et al.* Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells [J]. *Chin Med*, 2011, 6(1): 4-12.
- [9] Chen B, Shen Y P, Zhang D F, *et al.* The apoptosis-inducing effect of ginsenoside F₄ from steamed notoginseng on human lymphocytoma JK cells [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(24): 2351-2354.
- [10] 张永贵, 赵 力, 杨小英. 土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究及主成分的含量测定 [J]. 中国药房, 2016, 27(36): 5143-5146.
- [11] 吴修红, 孙 泽, 杨恩龙, 等. 酒女贞子 HPLC 指纹图谱的建立及多成分含量的测定 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 273-277.
- [12] 付 娟, 张海弢, 王 伟, 等. 茛白平肺颗粒 HPLC 指纹图谱研究及其多指标成分定量分析 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 918-923.
- [13] 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.
- [14] 许 浚, 游飞翔, 袁雪海, 等. 女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4198-4202.
- [15] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [16] 四川省中药饮片炮制规范 [S]. 2016.
- [17] 武 双, 崔秀明, 郭从亮, 等. 三七“生打熟补”物质基础及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 50-53.
- [18] Wang D, Liao P Y, Zhu H T, *et al.* The processing of *Panax notoginseng* and the transformation of its saponin components [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 1808-1813.