

白三七及近源种药材指纹图谱与识别模式的构建及其应用研究

伍红年^{1,2}, 谭诗涵^{1,2}, 王元清³, 雷雅婷^{1,2}, 刘瑞莲⁴, Rida Ahmed¹, 刘乐平², 严建业^{1,2,5*}, 王 炜^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208
3. 中南林业科技大学生命科学与技术学院 生物技术与工程实验室, 湖南 长沙 410004
4. 湖南中医药大学附属中西医结合医院 药剂科, 湖南 长沙 410208
5. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 长沙, 湖南, 410208

摘要: **目的** 建立并识别不同产地白三七药材 HPLC 指纹图谱, 为其质量控制及标准制定提供参考。**方法** 采用 HPLC 法建立白三七指纹图谱, 同时应用相似度评价、聚类分析和主成分分析 (PCA) 对实验数据进行识别, 以分析不同产地白三七药材间及同科同属 5 种药材的相似性及差异性, 并通过总量统计矩法对白三七药材共有峰进行定性定量分析。**结果** 白三七指纹图谱共标定 16 个共有峰, 并指认了人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及竹节参皂苷 V、IV、IVa 色谱峰; 其中竹节参皂苷 V 和 IV 在不同批次白三七样品中的质量波动较小; 各产地白三七样品除产自四川大凉山样品 (S7) 外相似度在 0.90 以上; 聚类分析及主成分分析均将白三七样品分为 3 类; 五加科人参属 5 种药材成分总量统计矩参数差异较大。**结论** 建立的白三七 HPLC 指纹图谱和化学识别模式可为其质量控制和区分同科同属 5 种药材提供科学依据。

关键词: 白三七; 五加科; 指纹图谱; 总量统计矩; 聚类分析; 主成分分析; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 竹节参皂苷 V; 竹节参皂苷 IV; 竹节参皂苷 IVa

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0217-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.032

Establishment and application of chemical fingerprint and pattern recognition for *Panacis Japonici Rhizoma*

WU Hong-nian^{1,2}, TAN Shi-han^{1,2}, WANG Yuan-qing³, LEI Ya-ting^{1,2}, LIU Rui-lian⁴, Rida Ahmed¹, LIU Le-ping², YAN Jian-ye^{1,2,5}, WANG Wei¹

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Institute of Innovation and Applied Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Laboratory of Biotechnology and Engineering, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China
4. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish and identify HPLC fingerprints of *Panacis Japonici Rhizoma* from different regions, and provide a scientific method for quality its control and standardization. **Methods** The fingerprints of *Panacis Japonici Rhizoma* were established based on HPLC method. The similarity evaluation, cluster analysis (CA), and principal component analysis (PCA) were applied for the experimental data, in order to find out the similarities and differences among the 10 batches of *Panacis Japonici Rhizoma* from different regions. Meanwhile, the qualitatively and quantitatively analyze were adopted in the common peaks of *Panacis Japonici Rhizoma* by total statistical moment method. **Results** The HPLC fingerprint with 16 common peaks was established, for the common chemical components, six were identified as ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, chikusetsusaponin V, chikusetsusaponin IV, and

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 湖南省中医药管理局重点项目 (201811 号); 湖南中医药大学一层次学科中药学资助 (湘教通 [2011] 76 号)

作者简介: 伍红年 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新制剂及新技术研究。Tel: 15243632039 E-mail: 970265604@qq.com

*通信作者 严建业 (1975—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师。Tel: (0731)88458227 E-mail: yanjianye201@126.com

王 炜 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师。Tel: (0731)88458227 E-mail: wangwei402@hotmail.com

chikusetsusaponin IVa, respectively. Among them, the contents of chikusetsusaponin V and IV in different batches of *Panax JaponiciRhizoma* samples showed little differences. The similarities of samples from various regions except S7 were over 0.90. The samples were classified into three categories by CA and PCA methods. The parameters of total statistical moment for five species of *Panax* genus showed significantly differences. **Conclusion** The developed HPLC fingerprint of *Panax Japonici Rhizoma* combined with chemical pattern recognition can provide a scientific instruction for the quality control of *Panax Japonici Rhizoma* and the differentiation of five herb medicines from *Panax* genus.

Key words: *Panax Japonici Rhizoma*; Araliaceae; fingerprint; total statistical moment; cluster analysis; PCA; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; chikusetsusaponin V; chikusetsusaponin IV; chikusetsusaponin IVa

白三七又名竹节参、竹节七、竹节人参等，为五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎^[1]，收载于《中国药典》2015 年版一部，是我国西南地区民间常用中草药，被土家族、苗族居民视为“草药之王”，属珍稀濒危的名贵“七类”中药^[2]，兼具北药人参滋补强壮和南药三七活血化瘀的功效^[3]。

目前，《中国药典》2015 年版对白三七药材仅简单记载了其性状、鉴别、水分和总灰分检查。为了更好地深入挖掘与应用这一珍稀濒危的名贵的“草药之王”，深度开发“七类”中药，丰富民族药物的临床应用内涵，提高民族药物现代质量控制势在必行。指纹图谱研究是中药现代质量控制方法之一，能够提供复杂的多组分分布的全局和基本信息，具有进一步鉴别、鉴定和分类的潜力^[4]；同时也符合中药多成分综合作用的特点。而文献研究中关于白三七指纹图谱的分析缺乏定量参数特征^[5-6]，而总量统计矩法将指纹图谱作为众多高斯曲线叠加而成的概率密度函数曲线，用统计学的方法来分析指纹图谱的内在特征，按一维随机向量统计原理，用总量零阶矩（AUC_T）、总量响应率（AUCPW_T）、总量一阶矩（MCRT_T）、总量二阶矩（VCRT_T）4 个参数进行全面的定性定量研究^[7-8]。

白三七、人参、三七、西洋参和扣子七均来源于五加科人参属，为亲缘关系相近的 5 种植物，在化学成分上十分相似，均含人参皂苷类成分，但其皂苷类成分的类型和含量差异明显^[9]。本研究采用 HPLC 法建立白三七指纹图谱并计算总量统计矩参数，采用总量统计矩法、夹角余弦法和相关系数法进行相似度评价，结合聚类分析与主成分分析进行分类识别；并将构建的指纹图谱统计矩参数识别方法应用于五加科人参属药材鉴定，为白三七质量评价及与同科同属 5 种药材区分提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相仪，Waters 2489 UV

检测器，Empower 3 色谱数据工作站（美国 Waters 公司）；LE204E/02 型电子天平（上海梅特勒-托利多有限公司）；Option R7 ultra AN 超纯水系统（英国 ELGA LabWaters 公司）；粉碎机（浙江省永康市金穗机械制造厂）；DZKW-4 型双列六孔水浴锅（北京中兴伟业仪器有限公司）。

1.2 试剂

10 批不同产地白三七及其他五加科人参属药材信息见表 1，经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定为五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎；珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎（扣子七）；人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎；三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎；西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根。对照品人参皂苷 Rg₁（批号 wkq15121303）、人参皂苷 Re（批号 wkq16081605）、人参皂苷 Rb₁（批号 wkq16060402）均购于四川省维克奇生物科技有限公司，质量分数均≥98%；竹节参皂苷 V（批号 HG027158198）、竹节参皂苷 IV（批号 HA305950198）、竹节参皂苷 IVa（批号 HC027157198）均购于宝鸡市辰光生物科技有限公司，质量分数均为 98%；乙腈、甲醇（色谱纯，均购于德国默克股份有限公司）；磷酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；实验用水均为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Venusil XBP C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱，0~5 min，2% A；5~35 min，2%~15% A；35~39 min，15%~21% A；39~60 min，21% A；60~66 min，21%~27% A；66~71 min，27%~32% A；71~105 min，32%~35% A；体积流量 1.2 mL/min；

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品编号	产地	购买时间	品种
S1	湖北恩施	2017-07	白三七饮片
S2	贵州贵阳	2017-11	白三七药材
S3	湖北恩施	2017-11	白三七药材
S4	湖北神农架	2017-08	白三七药材
S5	湖南石门	2017-08	白三七药材
S6	江西吉安	2017-11	白三七药材
S7	四川大凉山	2017-08	白三七药材
S8	四川雅安	2017-08	白三七药材
S9	四川乐山	2017-07	白三七药材
S10	云南丽江	2017-07	白三七药材
S11	湖南石门	2017-08	扣子七药材
S12	吉林长白山	2017-08	人参药材
S13	云南文山	2017-08	三七药材
S14	吉林长白山	2017-08	西洋参药材

检测波长为 203 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_g₁、Re、R_b₁ 及竹节参皂苷 V、IV、IVa 各对照品约 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 贮存于 4 °C 条件下, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白三七及其他 4 种五加科人参属药材 (40 目筛) 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流提取 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取白三七药材 (S7), 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次, 测得各相对保留时间与相对峰面积, 计算其 RSD。以竹节参皂苷 V (11 号峰) 为参照峰, 结果各相对保留时间的 RSD 均小于 0.29%, 各相对峰面积的 RSD 均小于 1.92%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取白三七药材 (S7), 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、24 h 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 测得各相对保留时间与相对峰面积, 计算其 RSD。结果各相对保留时间的 RSD 均小于 0.35%, 各相对峰面积的 RSD 均小于 1.97%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取白三七药材 (S7) 6 份, 精密称定, 分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 测得各相对保留时间与相对峰面积, 计算其 RSD。结果各相对保留时间的 RSD 均小于 0.28%, 各相对峰面积的 RSD 均小于 2.74%, 表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱共有模式的建立 将不同产地白三七药材的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A》软件, 选定 S9 号样品为参照图谱, 设定时间漂移值为 0.3, 采用中位数法自动匹配生成对照图谱, 叠加图谱及对照图谱结果见图 1。由图 1 可知, 共获得 16 个共有峰; 经与对照品溶液色谱图对比后, 指认了其中 6 个共有峰: 人参皂苷 R_g₁ (7 号峰)、人参皂苷 Re (8 号峰)、人参皂苷 R_b₁ (9 号峰)、竹节参皂苷 V (11 号峰)、竹节参皂苷 IV (15 号峰) 及竹节参皂苷 IVa (16 号峰); 其中 11 号峰 (竹节参皂苷 V) 峰面积所占比例较大且相对稳定, 分离度较好, 因此确定其为参照峰 (S)。

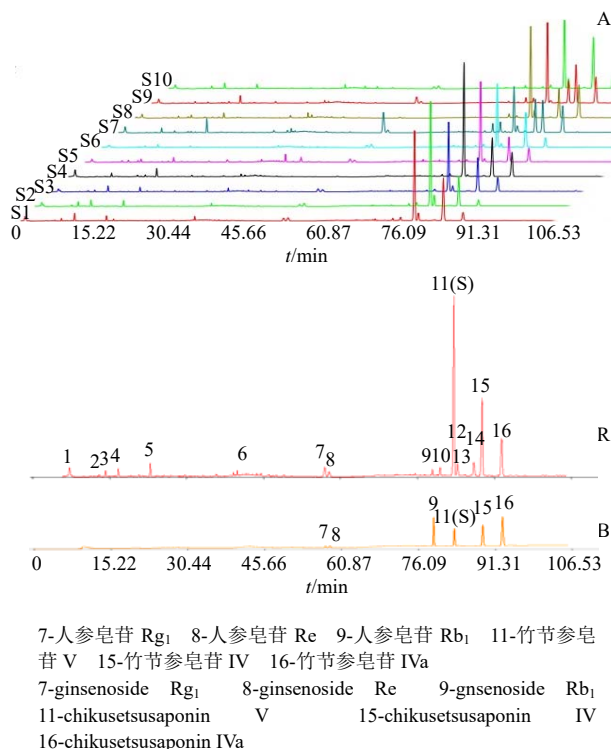


图 1 不同产地白三七样品指纹图谱 (A)、对照图谱 (R) 与混合对照品 HPLC 图 (B)

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Panacis japonici* Rhizoma from different regions (A), control fingerprint (R) and chromatogram of mixed standards (B)

2.4.2 共有峰的相对保留时间与相对峰面积 以各产地样品中的 11 号峰(竹节参皂苷 V)为参照峰,计算同一样品中各共有峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 2、3,由表 2 可知,共有峰相对保留时间的波动较小,而相对峰面积波动较大,表明白三七指纹图谱中主要峰群的整体面貌基本一致,但各成分含有量差别较大。

2.4.3 总量统计矩分析 根据指纹图谱的一种定性定量研究新方法^[7]—总量统计矩法分析不同产地

的白三七样品, AUC_T、AUCPW_T、MCRT_T、VCRT_T 结果见表 4。不同产地白三七的指纹图谱的总量统计矩参数表明不同产地白三七样品在“量”上具有一定的差异性。

2.4.4 相似度分析 分别采用总量统计矩法、夹角余弦法、相关系数法^[10]对 10 批不同产地白三七样品的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价,其结果见表 5~7,总量统计矩法计算的相似度范围为 0.921~0.961、夹角余弦法和相关系数法计算的

表 2 各共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks

样品	相对保留时间															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11(S)	12	13	14	15	16
S1	0.088 0	0.157 9	0.172 7	0.203 7	0.278 4	0.485 2	0.693 2	0.703 7	0.949 1	0.967 2	1.000 0	1.009 0	1.026 0	1.046 9	1.067 6	1.113 5
S2	0.087 9	0.158 5	0.173 3	0.203 3	0.279 7	0.485 9	0.692 9	0.703 4	0.949 0	0.958 7	1.000 0	1.008 7	1.025 2	1.046 1	1.066 1	1.112 3
S3	0.087 3	0.157 1	0.172 2	0.203 4	0.278 3	0.484 7	0.694 7	0.705 4	0.949 1	0.967 4	1.000 0	1.009 5	1.026 7	1.047 7	1.068 3	1.114 8
S4	0.087 7	0.158 3	0.173 2	0.203 2	0.279 1	0.485 9	0.692 9	0.703 2	0.948 9	0.966 8	1.000 0	1.008 4	1.025 1	1.046 2	1.066 2	1.112 7
S5	0.087 8	0.158 5	0.173 4	0.203 2	0.279 7	0.485 9	0.693 6	0.704 1	0.949 3	0.967 3	1.000 0	1.009 0	1.025 2	1.046 7	1.066 4	1.113 2
S6	0.088 4	0.158 6	0.173 6	0.203 6	0.280 1	0.486 3	0.693 9	0.704 5	0.949 5	0.967 5	1.000 0	1.009 2	1.025 8	1.046 6	1.066 9	1.113 2
S7	0.087 5	0.158 0	0.173 0	0.203 5	0.279 0	0.486 2	0.693 5	0.703 9	0.950 0	0.967 9	1.000 0	1.007 5	1.025 9	1.050 3	1.067 5	1.114 3
S8	0.088 0	0.158 6	0.173 4	0.203 7	0.279 8	0.486 2	0.693 0	0.703 3	0.949 2	0.967 2	1.000 0	1.008 8	1.025 7	1.046 2	1.066 3	1.113 4
S9	0.087 9	0.158 2	0.173 2	0.203 5	0.279 3	0.486 1	0.692 9	0.703 3	0.949 4	0.967 4	1.000 0	1.007 1	1.025 4	1.049 5	1.067 0	1.113 5
S10	0.087 5	0.157 9	0.172 8	0.203 4	0.279 0	0.485 7	0.694 0	0.704 5	0.949 3	0.967 3	1.000 0	1.009 1	1.026 0	1.046 9	1.067 7	1.113 5
平均值	0.087 8	0.158 2	0.173 1	0.203 4	0.279 2	0.485 8	0.693 5	0.703 9	0.949 3	0.966 5	1.000 0	1.008 6	1.025 7	1.047 3	1.067 0	1.113 4

表 3 各共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peak

样品	相对峰面积															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11(S)	12	13	14	15	16
S1	0.059 5	0.007 7	0.018 9	0.054 7	0.036 4	0.022 9	0.044 1	0.052 4	0.018 1	0.034 7	1.000 0	0.081 5	0.003 1	0.012 9	0.566 8	0.120 7
S2	0.037 1	0.012 2	0.028 0	0.040 5	0.039 2	0.013 7	0.026 4	0.042 5	0.016 0	0.028 8	1.000 0	0.104 1	0.002 5	0.008 3	0.347 1	0.078 2
S3	0.043 4	0.015 2	0.017 2	0.056 0	0.044 2	0.024 6	0.057 0	0.044 9	0.012 2	0.034 8	1.000 0	0.081 3	0.002 7	0.010 7	0.593 3	0.267 8
S4	0.058 4	0.005 7	0.020 8	0.001 1	0.053 5	0.005 6	0.000 1	0.007 2	0.011 6	0.019 4	1.000 0	0.013 0	0.003 4	0.010 6	0.399 3	0.274 2
S5	0.037 2	0.013 0	0.016 8	0.028 8	0.039 7	0.017 1	0.055 1	0.037 8	0.021 0	0.022 6	1.000 0	0.038 7	0.006 0	0.004 1	0.373 9	0.233 2
S6	0.048 8	0.006 9	0.016 7	0.026 7	0.015 4	0.011 5	0.051 5	0.074 8	0.021 6	0.041 1	1.000 0	0.055 1	0.006 3	0.009 4	0.675 7	0.203 7
S7	0.145 6	0.008 5	0.065 7	0.029 7	0.223 6	0.021 9	0.630 9	0.089 8	0.152 4	0.194 0	1.000 0	0.179 6	0.040 8	0.862 9	0.863 1	0.812 2
S8	0.037 6	0.002 8	0.014 5	0.020 1	0.038 6	0.014 3	0.012 6	0.003 5	0.033 2	0.019 1	1.000 0	0.080 3	0.003 7	0.009 5	0.380 2	0.493 8
S9	0.058 9	0.005 3	0.012 8	0.011 2	0.068 3	0.006 2	0.110 7	0.003 7	0.050 3	0.046 2	1.000 0	0.036 8	0.011 6	0.318 0	0.573 6	0.428 4
S10	0.053 0	0.002 9	0.021 5	0.047 0	0.035 4	0.022 3	0.031 4	0.049 9	0.013 9	0.033 6	1.000 0	0.123 5	0.004 8	0.017 6	0.805 1	0.172 4
平均值	0.057 9	0.008 0	0.023 3	0.031 6	0.059 4	0.016 0	0.102 0	0.040 6	0.035 0	0.047 4	1.000 0	0.079 4	0.008 5	0.126 4	0.557 8	0.308 5

表 4 不同产地白三七样品的总量统计矩参数

Table 4 Parameters of total quantum statistical matrix of samples from different regions

样品	AUC _T /(AU·min ⁻¹)	AUCPW _T /(AU·min·mL ⁻¹ ·mg ⁻¹)	MCRT _T /min	VCRT _T /min	
S1	7.47×10 ⁵		492	75.95	491.11
S2	7.09×10 ⁵		462	76.73	445.74
S3	6.16×10 ⁵		400	76.93	473.09
S4	8.77×10 ⁵		569	77.00	505.71
S5	6.29×10 ⁵		428	73.47	516.02
S6	5.50×10 ⁵		346	79.41	344.20
S7	9.05×10 ⁵		609	74.26	533.54
S8	7.86×10 ⁵		496	79.19	416.72
S9	8.92×10 ⁵		571	78.09	428.05
S10	7.42×10 ⁵		471	78.77	389.71
平均值	7.54×10 ⁵		484	75.95	491.11

表5 总量统计矩法计算不同产地白三七样品的相似度

Table 5 Similarities of samples from different regions by total statistical matrix method

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.973	0.981	0.980	0.955	0.895	0.966	0.931	0.951	0.926
S2	0.973	1.000	0.985	0.969	0.934	0.921	0.941	0.951	0.973	0.951
S3	0.981	0.985	1.000	0.984	0.936	0.912	0.947	0.950	0.969	0.944
S4	0.980	0.969	0.984	1.000	0.938	0.899	0.951	0.941	0.956	0.931
S5	0.955	0.934	0.936	0.938	1.000	0.857	0.985	0.887	0.908	0.886
S6	0.895	0.921	0.912	0.899	0.857	1.000	0.862	0.954	0.942	0.968
S7	0.966	0.941	0.947	0.951	0.985	0.862	1.000	0.897	0.917	0.893
S8	0.931	0.951	0.950	0.941	0.887	0.954	0.897	1.000	0.978	0.982
S9	0.951	0.973	0.969	0.956	0.908	0.942	0.917	0.978	1.000	0.974
S10	0.926	0.951	0.944	0.931	0.886	0.968	0.893	0.982	0.974	1.000
平均值	0.956	0.960	0.961	0.955	0.928	0.921	0.936	0.947	0.957	0.945

表6 夹角余弦法计算不同产地白三七样品的相似度

Table 6 Similarities of samples from different regions by cosine method

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.983	0.992	0.976	0.978	0.994	0.744	0.934	0.937	0.986
S2	0.983	1.000	0.969	0.978	0.984	0.961	0.693	0.934	0.912	0.941
S3	0.992	0.969	1.000	0.984	0.981	0.995	0.784	0.964	0.959	0.985
S4	0.976	0.978	0.984	1.000	0.994	0.970	0.747	0.981	0.952	0.946
S5	0.978	0.984	0.981	0.994	1.000	0.970	0.745	0.971	0.944	0.942
S6	0.994	0.961	0.995	0.970	0.970	1.000	0.770	0.938	0.948	0.994
S7	0.744	0.693	0.784	0.747	0.745	0.770	1.000	0.781	0.905	0.762
S8	0.934	0.934	0.964	0.981	0.971	0.938	0.781	1.000	0.953	0.910
S9	0.937	0.912	0.959	0.952	0.944	0.948	0.905	0.953	1.000	0.932
S10	0.986	0.941	0.985	0.946	0.943	0.994	0.762	0.910	0.932	1.000
平均值	0.952	0.935	0.961	0.953	0.951	0.954	0.793	0.937	0.944	0.940

表7 相关系数法计算不同产地白三七样品相似度

Table 7 Similarities of samples from different regions by correlation coefficients

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.982	0.992	0.975	0.977	0.993	0.732	0.932	0.935	0.985
S2	0.982	1.000	0.967	0.977	0.984	0.955	0.682	0.932	0.909	0.939
S3	0.992	0.967	1.000	0.983	0.980	0.995	0.774	0.962	0.958	0.984
S4	0.975	0.977	0.983	1.000	0.993	0.969	0.738	0.980	0.951	0.944
S5	0.977	0.984	0.980	0.993	1.000	0.968	0.730	0.970	0.941	0.940
S6	0.993	0.955	0.995	0.970	0.968	1.000	0.760	0.936	0.946	0.993
S7	0.732	0.682	0.774	0.738	0.730	0.760	1.000	0.772	0.900	0.752
S8	0.932	0.932	0.962	0.980	0.970	0.936	0.772	1.000	0.951	0.907
S9	0.935	0.909	0.958	0.951	0.941	0.946	0.900	0.951	1.000	0.930
S10	0.985	0.939	0.984	0.944	0.940	0.993	0.752	0.907	0.930	1.000
平均值	0.950	0.933	0.960	0.951	0.948	0.952	0.784	0.934	0.942	0.937

相似度除了 S7 (产地四川大凉山) 外均在 0.90 以上, 3 种相似度评价结果均表明各产地白三七样品的质量相对稳定, 在“形”上具有一定的相似性。

2.5 各产地白三七样品的聚类分析

聚类分析是通过将观察对象依据某些特征加以归类, 从而建立样本与样本之间的相似关系或亲疏关系的一种探索性数据分析手段, 目前已广泛应用于中药鉴别、质量评价和品种分类等方面^[11]。采用 SPSS 19.0 软件, 以 10 个不同产地的白三七药材的 16 个共有峰峰面积为变量, 选用组间联接法, Euclidean 距离为测度, 进行聚类, 聚类结果见图 2。由图 2 可知, 当类间距离为 10~15 时, 白三七药材可以聚为 3 类, 其中 S4、S8、S9 为一类, S1、S2、S3、S5、S6、S10 为一类, S7 (产地四川大凉山) 为单独一类, 观察各共有峰相对峰面积可发现, S7 有较多色谱峰 (如 7、14 与 16 号峰等) 高于其他产地, 提示这可能是造成差异的原因之一。

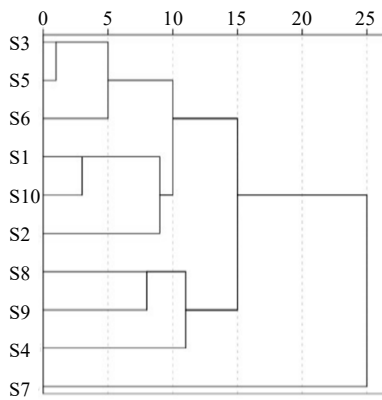


图 2 不同产地白三七样品聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *Panacis Japonici Rhizoma* from different regions

2.6 各产地白三七样品的主成分分析

为了更直接地评价 16 个共有成分对样品的分辨能力, 将 10 个不同产地的白三七药材的 16 个共有峰的峰面积导入 SPSS 19.0, 对共有峰峰面积进行标准化处理, 进行主成分分析。主成分个数提取原则为主成分的特征值大于 1 的前 m 个主成分。经计算可得, 前 4 个主成分的特征值大于 1, 即 7.169、3.520、1.913、1.574, 对方差的贡献率分别为 44.806%、21.999%、11.959%、9.839%, 累积贡献率为 88.603%, 见表 8。从图 3 可见, 前 3 个成分较陡, 剩余的其他成分之间比较平缓, 又因前 3 个主成分的特征值相对较大, 故选择前 3 个主成分

反映白三七药材中化学成分的基本特征。分别以 PC1、PC2、PC3 建立坐标系进行投影, 得到不同产地白三七样品的主成分三维分布图 (图 4)。由图 4 可知, S4、S8、S9 为一类, S1、S2、S3、S5、S6、S10 为一类, S7 号样品 (产地四川大凉山) 与其他样品投影点相距较远为单独的一类, 其结果与聚类分析一致。

表 8 白三七 PCA 的特征值与贡献率

Table 8 Eigenvalue and contribution rate of PCA of *Panacis Japonici Rhizoma*

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.169	44.806	44.806
2	3.520	21.999	66.805
3	1.913	11.959	78.764
4	1.574	9.839	88.603
5	0.946	5.915	94.518
6	0.460	2.877	97.395
7	0.257	1.608	97.395
8	0.119	0.744	99.003
9	0.041	0.253	100.000

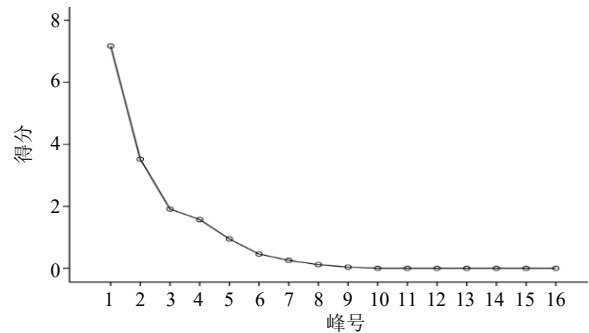


图 3 白三七主成分分析碎石图

Fig. 3 PCA scree plot of *Panacis Japonici Rhizoma*

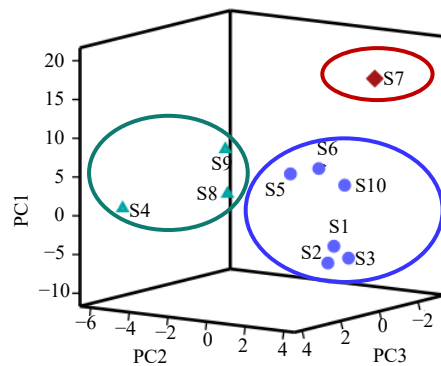


图 4 不同产地白三七药材主成分 3D 得分图

Fig. 4 3D PCA score of *Panacis Japonici Rhizoma* from different regions

2.7 各产地白三七样品的质量波动分析

为了探究各产地样品之间的质量波动, 根据文献方法引入参数 P 值^[12], 对不同产地的白三七药材质量进行评价, 计算公式为 $P = \text{给定化合物的测定浓度} / \text{平均浓度}$, P 值越接近 1, 批间的一致性越好。一般来说, P 值在 0.75~1.25 是可以接受的^[13]。从图 5 Box-chart 图可知, 只有竹节参皂苷 V (11 号峰) 和竹节参皂苷 IV (15 号峰) 在范围内, 说明了这 2 个成分在不同批次白三七样品中的质量波动范围较小; 由图 1 可知, 竹节参皂苷 V (11 号峰) 和竹节参皂苷 IV (15 号峰) 是白三七的 2 个主要的色谱峰。

2.8 白三七指纹图谱模式在五加科人参属药材中的应用

2.8.1 指纹图谱共有模式的建立 将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A》软件, 建立五加科人参属药材的指纹图谱共有模式, 结果见图 6, 白三七和扣子七 2 个样品色谱图较相似, 含有指认的人参皂苷 Rg_1 、 Re 与 Rb_1 及竹节参皂苷 V 与竹节参皂苷 IVa 色谱峰, 未指认的色

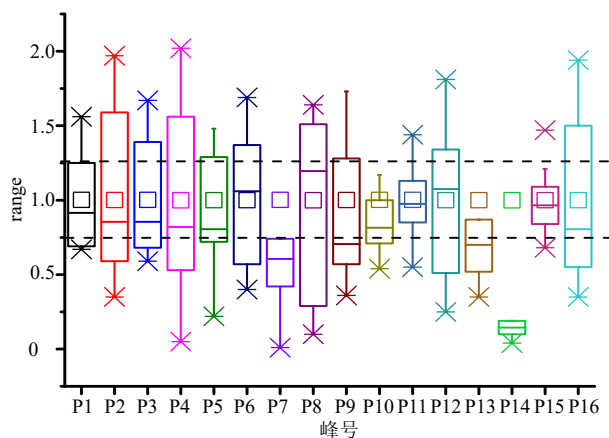


图 5 16 个共有峰 Box-chart 图

Fig. 5 Box chart of 16 common peaks of *Panacis Japonici Rhizoma* from different regions

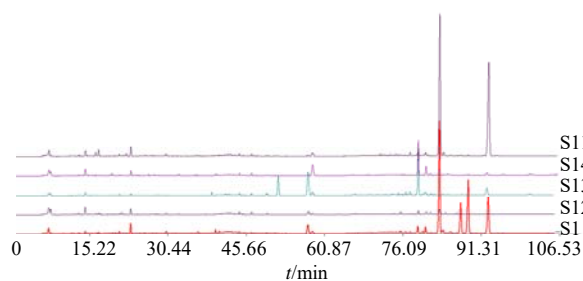


图 6 五加科人参属 5 种药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC fingerprint of five herb medicines of *Panax* genus

谱峰也较多的同时出现在 2 个样品中, 可知竹节参皂苷 IV 为白三七独有特征峰; 另外人参属 5 种药材均含有指认的人参皂苷 Rg_1 、 Re 与 Rb_1 。

2.8.2 总量统计矩参数分析 总量统计矩分析法分析五加科人参属药材样品总量统计矩参数, 其结果见表 9, 5 种药材指纹图谱的总量统计矩存在较大的差异, AUC_T 、 $AUCPW_T$ 及 $MCRT_T$ 的大小顺序为扣子七 > 白三七 > 三七 > 西洋参 > 人参; $VCRT_T$ 的大小顺序为人参 > 西洋参 > 扣子七 > 白三七 > 三七。

3 讨论

3.1 实验条件的优化

本实验在供试品溶液的制备中, 对不同的提取溶剂 (甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、70% 乙醇、20% 乙腈)、提取方式 (超声与回流)、提取时间 (30、45、60、90 min) 进行考察, 最终确定了 70% 甲醇加热回流提取 60 min 作为供试品溶液的制备方法; 考察了不同流动相 (0.05% 磷酸、0.05% 醋酸、0.1% 甲酸、超纯水), 不同体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同的色谱柱温度 (25、30、35 °C)、不同色谱柱 [Waters Sun FireTM C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Venusil MP C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、

表 9 五加科人参属 5 种药材的总量统计矩参数

Table 9 Parameters of total quantum statistical moment of five herb medicines from *Panax* genus

样品	$AUC_T / (AU \cdot \text{min}^{-1})$	$AUCPW_T / (AU \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	$MCRT_T / \text{min}$	$VCRT_T / \text{min}$
白三七	7.54×10^5	484.0	75.95	491.11
人参	6.41×10^4	81.3	39.44	913.20
三七	2.71×10^5	213.0	63.63	381.37
西洋参	1.89×10^5	161.0	58.44	807.29
扣子七	8.90×10^5	571.0	77.98	558.15

Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)] 对指纹图谱的影响, 最终确定色谱条件为水相为 0.05%磷酸, 体积流量为 1.2 mL/min, 色谱柱温度 35 °C, Venusil MP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 此条件下基线平稳, 色谱峰峰形较好、分离效果较佳。

3.2 白三七指纹图谱识别分析

本实验采用 HPLC 法建立了 10 批来自不同产地的白三七药材指纹图谱, 同时建立了 5 种五加科人参属药材指纹图谱, 白三七药材共标定了 16 个共有峰, 并通过化学对照品指认了其中 6 个化学成分: 人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、竹节参皂苷 V、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa。

在指纹图谱识别模式中采用同时具有定性定量方法之总量统计矩法, 其具有以下特点: ①抗干扰性, 可以降低测试方法的要求, 对各峰的分离状态、形状、重现性、稳定性、共有与非共有没有严格的要求; ②加合性, 能用来消除仪器的干扰; ③偶联性, 能与多维向量偶联构成多维曲线中心矩及偏差分析。通过计算总量统计矩参数 AUC_T、AUCPW_T、MCRT_T、VCRT_T、AUC_T, 得到定量数值, 四川大凉山产地值偏大, 湖北神农架、四川雅安与乐山产地值较相近, 贵州贵阳、湖北恩施、湖南石门、江西吉安、云南丽江产地值较相近, 其结果与聚类分析与主成分分析的分类一致。

实验中同时采用夹角余弦法、总量统计矩法和相关系数法评价不同产地白三七样品的相似度, 发现除四川大凉山产地药材外, 具有较高的相似度。另外, 在白三七指纹图谱评价中首次引用质量波动评价的 *P* 值分析, 全面评价各色谱峰对质量波动的影响, 发现除了竹节参皂苷 V (11 号峰) 和竹节参皂苷 IV (15 号峰) 外, 其他色谱峰在各样品中的波动较大, 这可能与生长环境、土壤条件、采收时间、加工方式等因素有关。构建的指纹图谱及识别模式应用于五加科人参属 5 种药材的鉴别研究, 在“形”上可判别白三七和扣子七 2 个样品较相似, 在“量”上 5 种药材的总量统计矩参数差异较大, 研究表明本实验建立的方法简便、准确、可靠, 可为白三七的质量评价和标准的制定以及同科同属药材的区分鉴别提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 沈芳仪, 刘 杨, 苏 维, 等. 土家族“七”类药物考辨 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(1): 1-6.
- [3] 欧阳丽娜, 向大位, 吴 雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 1023-1027.
- [4] Hakimzadeh N, Parastar H, Fattahi M. Combination of multivariate curve resolution and multivariate classification techniques for comprehensive high-performance liquid chromatography-diode array absorbance detection fingerprints analysis of *Salvia reuterana* extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1326: 63-72.
- [5] 胡远浪, 袁 丁, 何毓敏, 等. 竹节参 HPLC-ELSD 指纹图谱和化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1009-1013.
- [6] 任 冰. 人参属药材竹节参和珠子参化学成分指纹图谱研究 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2015.
- [7] 贺福元, 周宏灏, 邓凯文, 等. 指纹图谱的一种定性定量研究新方法: 总量统计矩分析法 [J]. 药学学报, 2008, 43(2): 195-201.
- [8] 王元清, 韩 彬, 向 荣, 等. 总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2863-2869.
- [9] 董晓强, 董文天, 洪 霞, 等. 三七、人参和西洋参化学成分与药效学之间的关系 [J]. 承德医学院学报, 2011, 28(3): 307-309.
- [10] 杨岩涛, 吴春英, 刘文龙, 等. 不同相似度法对当归补血汤指纹图谱分析的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1431-1435.
- [11] 曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 767-772.
- [12] Liu X, Wu Z, Yang K, et al. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76(6): 70-74.
- [13] Gao F, Xu Z, Wang W, et al. A comprehensive strategy using chromatographic profiles combined with chemometric methods: Application to quality control of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1466: 67-75.