

## 基于偏最小二乘判别分析建立熟三七粉的质量评价方法

刘梦楠<sup>1</sup>, 杨晓燕<sup>2</sup>, 屈文佳<sup>1</sup>, 贾天颖<sup>1</sup>, 辛洁萍<sup>1</sup>, 王海丽<sup>1</sup>, 韩婷<sup>1</sup>, 贾哲<sup>1</sup>, 李向日<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111

**摘要:** 目的 建立熟三七粉的 HPLC 特征图谱, 并对其 8 种稀有皂苷的含量进行测定, 结合偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和聚类分析, 为熟三七粉质量的科学评价提供方法。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A)-水 (B) 为流动相洗脱梯度: 0~10 min, 19%~33% A; 10~30 min, 33%~38% A; 30~45 min, 38%~50% A; 45~60 min, 50%~60% A, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 建立熟三七粉的 HPLC 特征图谱, 并对其人参皂苷 20 (S)-Rh<sub>1</sub>、20 (R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20 (S)-Rg<sub>3</sub>、20 (R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub> 和 Rg<sub>5</sub> 共 8 种指标性成分定量测定方法进行方法学考察, 对 63 批熟三七粉进行含量测定。结果 建立了熟三七粉的 HPLC 特征图谱, 共标定 19 个共有峰。同时测定 8 种稀有皂苷成分含量, 色谱峰达到了较好的分离, 且线性关系良好, 8 种皂苷线性回归方程的相关系数分别为 0.999 9、0.999 5、0.999 4、0.999 3、0.999 1、0.999 3、0.999 1、0.999 3; 平均加样回收率为 95%~105%; RSD 值均低于 2%。63 批样品按色泽分为棕红色与淡黄色 2 组, 棕红色组质量明显优于淡黄色组。结论 熟三七粉的质量优劣与色泽有关, 该方法灵敏、准确、重现性好, 可为熟三七粉的质量评价提供参考。

**关键词:** 熟三七; 稀有皂苷; 色泽; 特征图谱; 质量控制

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5319-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.027

## Quality evaluation of steamed *Panax notoginseng* Powder based on partial least squares discriminant analysis

LIU Meng-nan<sup>1</sup>, YANG Xiao-yan<sup>2</sup>, QU Wen-jia<sup>1</sup>, JIA Tian-ying<sup>1</sup>, XIN Jie-ping<sup>1</sup>, WANG Hai-li<sup>1</sup>, HAN Ting<sup>1</sup>, JIA Zhe<sup>1</sup>, LI Xiang-ri<sup>1</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Yunnan Pharmaceutical Research Institute, Kunming 650111, China

**Abstract: Objective** To establish the method for the specific chromatograms analysis of steamed *Panax notoginseng* Powder and determine the content of eight components, combined with clustering analysis and partial least square discriminant analysis (PLS-DA), with aim to provide reference for the quality control of steamed *Panax notoginseng* Powder. **Methods** HPLC with Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile (B)-water (A) in a gradient elution mode, the detection wavelength was set at 203 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 °C, and sample size 10 μL. HPLC characteristic spectrum of steamed *Panax notoginseng* Powder was established, and quantitative determination methods of eight index components, ginsenoside 20 (S)-Rh<sub>1</sub>, 20 (R)-Rh<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, Rh<sub>4</sub>, 20 (S)-Rg<sub>3</sub>, 20 (R)-Rg<sub>3</sub>, Rk<sub>1</sub> and Rg<sub>5</sub>, were investigated, its content in 63 batches of samples were determined. **Results** The specific chromatograms of steamed *Panax notoginseng* Powder effective parts were established and 19 common peaks were designated. Among them, eight rare saponins including ginsenoside 20 (S)-Rh<sub>1</sub>, 20 (R)-Rh<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, Rh<sub>4</sub>, 20 (S)-Rg<sub>3</sub>, 20 (R)-Rg<sub>3</sub>, Rk<sub>1</sub> and Rg<sub>5</sub> all showed good linear relationship within the ranges of 0.999 9, 0.999 5, 0.999 4, 0.999 3, 0.999 1, 0.999 3, 0.999 1, and 0.999 3, respectively. The average recovery was 95%—105%, with the RSD value less than 2%. Moreover, the 63 batches of samples were divided into two groups: brown red and light yellow, and the quality of brown red group was obviously better than that of pale yellow group. **Conclusion** The quality of the steamed *Panax notoginseng* Powder is related to the color and lustre. This method is accurate, sensitive and reproducible, which can provide reference for the quality evaluation of steamed *Panax notoginseng* Powder.

**Key words:** steamed *Panax notoginseng* Powder; rare saponins; color and lustre; specific chromatograms; quality control

收稿日期: 2019-05-03

基金项目: 国家中药标准化项目: 三七等 2 种中药饮片标准化建设 (ZYBZH-Y-YN-44)

作者简介: 刘梦楠, 在读研究生, 研究方向为中药炮制。E-mail: liumengnan@bucm.edu.cn

\*通信作者 李向日, 教授, 从事中药炮制及质量控制研究。Tel: (010)84738616 E-mail: lixiangri@sina.com

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 始载于《本草汇精要》, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效, 常用于咯血、咳血、衄血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、扑跌肿痛等病症<sup>[1]</sup>。三七经炮制(蒸制或油炸)后功效发生改变, 滋补力胜<sup>[2]</sup>, 《本草纲目拾遗》载其“大补血, 亦不行血”“补血第一”, 可用于身体虚弱, 气血不足。广西民间常将三七与鸡同蒸以供补虚之用。熟三七粉临床上常见, 但外观颜色上存在差异, 有的粉末呈淡黄色, 有的粉末呈棕红色。

在《中国药典》2015 年版中, 三七饮片项下仅收载了三七粉, 对其主要药效成分人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量进行了规定。在广西、山西、安徽、四川 4 省的炮制规范中虽有熟三七粉饮片规格, 但标准简单、没有含量测定项目, 不利于其质量控制<sup>[3-6]</sup>。三七作为生熟异用的典型中药, 具有“生消熟补”之别, 其在炮制过程中, 化学成分和药理作用均发生了明显的改变<sup>[7-10]</sup>, 稀有皂苷类成分增加, 具有显著的抗肿瘤、神经保护等作用, 生熟三七功效各异。若仍采用人参皂苷 R<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub> 及三七皂苷 R<sub>1</sub> 作为熟三七粉定量评价指标难以体现熟三七蒸制的目的。为此, 本研究建立了熟三七粉 HPLC 特征图谱及人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub> 和 Rg<sub>5</sub> 共 8 种稀有皂苷含量测定的方法, 该方法可用于鉴别熟三七粉的真伪优劣, 有助于反映其质量的专属性。并对 8 种稀有皂苷含量测定结果与外观颜色采用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)、聚类分析等多元统计分析方法进行了相关性分析, 以期更全面、客观地评价熟三七粉的质量, 并为规范熟三七的炮制工艺及确保临床疗效发挥提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

检测器 2489 UV/Vis Detector, 进样器 Alliance (2695), Waters-e2695 型高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>; DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱 (常州诺基仪器有限公司); Sartorius BS110S 分析天平 (德国赛多利斯公司); FW-100 型高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); HH-2 型电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); PL2002 型电子天平 [梅特勒-托利多 (上海) 有限公司]; SX4-10 型箱式电阻炉 (上海树立仪器仪表有限公司); TL1622 型电陶炉 (佛山

艾诗凯奇电气有限公司); 国际潘通色卡。

### 1.2 试剂

甲醇 (分析纯, 购于北京化工厂); 乙腈 (色谱纯, 购于赛默飞世尔科技有限公司); 对照品人参皂苷 Rk<sub>1</sub> (批号 PS010828)、人参皂苷 Rk<sub>3</sub> (批号 PS010059)、人参皂苷 Rh<sub>4</sub> (批号 PS010043)、人参皂苷 Rg<sub>5</sub> (批号 PS180126-03)、人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub> (批号 PS010067)、人参皂苷 20(R)-Rh<sub>1</sub> (批号 PS010068), 质量分数均大于 98%, 购于成都普斯生物科技股份有限公司; 人参皂苷 20(S)-Rg<sub>3</sub> (批号 ST03850120MG)、人参皂苷 20(R)-Rg<sub>3</sub> (批号 ST02530120MG), 质量分数均大于 98%, 购于上海诗丹德生物技术有限公司; 液相所用水为娃哈哈纯净水。

### 1.3 材料

本实验用 63 批熟三七粉进行研究, 其中 29 批由云南白药有限公司收集于不同饮片生产企业, 另外 34 批熟三七为从不同产地收集三七药材, 课题组对重点工艺环节进行考察, 炮制得熟三七, 具体工艺及样品信息见表 1。上述收集的药材及饮片经北京中医药大学李向日教授通过性状分别初步鉴定为三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 及熟三七。

采用国际潘通色卡对收集的熟三七粉样品进行色泽测定, 将其分为棕红色 (色号 465、7510 u)、淡黄色 (色号 468、467 u) 2 组。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Waters-e2695 型高效液相色谱仪, Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C, 检测波长 203 nm; 梯度洗脱条件为 0~10 min, 19%~33% A; 10~30 min, 33%~38% A; 30~45 min, 38%~50% A; 45~60 min, 50%~60% A。进样量 10 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 对照品适量, 加甲醇制成含人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub> 0.2 mg/mL、人参皂苷 20(R)-Rh<sub>1</sub> 0.2 mg/mL、人参皂苷 Rk<sub>3</sub> 1.0 mg/mL、人参皂苷 Rh<sub>4</sub> 1.0 mg/mL、人参皂苷 20(S)-Rg<sub>3</sub> 1.0 mg/mL、人参皂苷 20(R)-Rg<sub>3</sub> 0.5 mg/mL、人参皂苷 Rk<sub>1</sub> 1.0 mg/mL、人参皂苷 Rg<sub>5</sub> 1.0 mg/mL 的溶液, 作为储备液。使用前分别精密量取适量体积的上述对照品溶液, 混合摇匀, 作为混合对照品溶液。

表 1 样品信息  
Table 1 Sample information

样品编号	来源	批号	色泽	样品编号	来源	色泽
S1	云南文山苗乡三七实业有限公司	c20170401	棕红色	S33	自制	棕红色
S2	云南文山苗乡三七实业有限公司	c20170402	棕红色	S34	自制	棕红色
S3	云南向辉药业有限公司	F20170305	淡黄色	S35	自制	棕红色
S4	云南向辉药业有限公司	F20161005	淡黄色	S36	自制	淡黄色
S5	云南向辉药业有限公司	F20170205	淡黄色	S37	自制	淡黄色
S6	红河云百草药业有限公司	YZ150703	淡黄色	S38	自制	棕红色
S7	红河云百草药业有限公司	160613	棕红色	S39	自制	棕红色
S8	云南七丹药业股份有限公司	1611004 019	淡黄色	S40	自制	棕红色
S9	云南健之佳连锁健康药房有限公司	F20170809	淡黄色	S41	自制	棕红色
S10	云南鸿翔一心堂药业(集团)股份有限公司	20151202	淡黄色	S42	自制	棕红色
S11	云南寻甸熟三七粉	20180513	淡黄色	S43	自制	棕红色
S12	云南寻甸熟三七粉	20180514	淡黄色	S44	自制	棕红色
S13	云南寻甸熟三七粉	20180515	淡黄色	S45	自制	棕红色
S14	云南寻甸熟三七粉	20180516	淡黄色	S46	自制	淡黄色
S15	云南寻甸熟三七粉	20180517	淡黄色	S47	自制	棕红色
S16	云南文山熟三七粉	20180423C	淡黄色	S48	自制	棕红色
S17	云南文山熟三七粉	20180424C	淡黄色	S49	自制	棕红色
S18	云南文山熟三七粉	20180425C	淡黄色	S50	自制	棕红色
S19	云南文山熟三七粉	20180426C	淡黄色	S51	自制	棕红色
S20	云南文山熟三七粉	20180427C	淡黄色	S52	自制	棕红色
S21	云南红河熟三七粉	20180511	淡黄色	S53	自制	棕红色
S22	云南红河熟三七粉	20180512	淡黄色	S54	自制	棕红色
S23	云南红河熟三七粉	20180513	淡黄色	S55	自制	棕红色
S24	云南红河熟三七粉	20180514	淡黄色	S56	自制	棕红色
S25	云南红河熟三七粉	20180515	淡黄色	S57	自制	棕红色
S26	河北橘井药业有限公司	5180501	淡黄色	S58	自制	棕红色
S27	云南白药集团有限公司	2421805	淡黄色	S59	自制	淡黄色
S28	云南白药集团有限公司	2421806	淡黄色	S60	自制	棕红色
S29	云南白药集团有限公司	2421807	淡黄色	S61	自制	棕红色
S30	自制		棕红色	S62	自制	棕红色
S31	自制		棕红色	S63	自制	棕红色
S32	自制		棕红色			

### 2.3 供试品溶液的制备

取熟三七粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 20 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h, 放凉, 用甲醇补足损失质量, 滤过, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 HPLC 特征图谱方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一熟三七粉(S7)供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 17 号峰为参照峰(S),

各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 5.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一熟三七(S7)粉末约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按“2.3”项制备供试品溶液, 分别进样, 以 17 号峰为参照峰(S), 各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 5.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明该方法的重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一熟三七粉(S7)供试品

溶液, 分别于供试品溶液制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以 17 号峰为参照峰 (S), 各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 5.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定。

**2.5 HPLC 含量测定方法学考察**

HPLC 熟三七 8 种稀有皂苷含量测定检测条件同特征图谱方法。

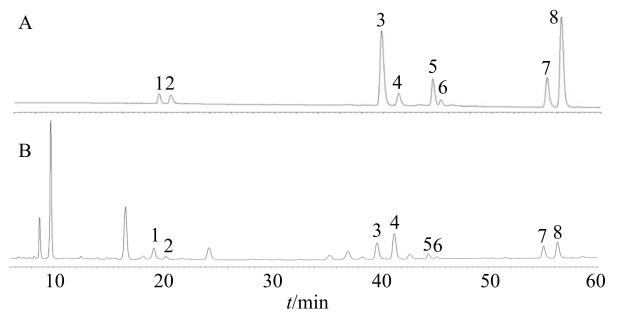
**2.5.1 精密度试验** 取混合对照品供溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积。计算人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 峰面积 RSD 值分别为 2.30%、0.60%、0.51%、0.63%、1.29%、1.67%、2.38%、1.40%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取同一熟三七 (S7) 粉末约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按“2.3”项制备供试品溶液, 分别进样, 记录峰面积。计算人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 峰面积 RSD 值分别为 0.87%、2.31%、2.69%、2.43%、2.75%、2.33%、2.35%、2.16%, 表明本法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一熟三七粉 (S7) 供试品溶液, 分别于供试品溶液制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录峰面积。计算人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 峰面积 RSD 值分别为 1.54%、1.41%、2.48%、2.62%、1.58%、2.51%、2.90%、2.70%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定。

**2.5.4 样品测定** 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 分析混合对照品、供试品溶液。各相邻色谱峰的分度度 > 1.5, 理论塔板数 > 3 500。混合对照品和熟三七供试品溶液的色谱图见图 1。

**2.5.5 线性范围考察** 精密吸取按“2.2”项所制备



1-人参皂苷 20 (S)-Rh<sub>1</sub> 2-人参皂苷 20 (R)-Rh<sub>1</sub> 3-人参皂苷 Rk<sub>3</sub>  
4-人参皂苷 Rh<sub>4</sub> 5-20 (S)-人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 6-20 (R)-人参皂苷 Rg<sub>3</sub>  
7-人参皂苷 Rk<sub>1</sub> 8-人参皂苷 Rg<sub>5</sub>  
1-ginsenoside 20 (S)-Rh<sub>1</sub> 2-ginsenoside 20 (R)-Rh<sub>1</sub> 3-ginsenoside Rk<sub>3</sub>  
4-ginsenoside Rh<sub>4</sub> 5-20(S)-ginsenoside Rg<sub>3</sub> 6-20 (R)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>  
7-ginsenoside Rk<sub>1</sub> 8-ginsenoside Rg<sub>5</sub>

**图 1 混合对照品 (A) 和熟三七粉 (B) 的 HPLC 图**  
**Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and steamed Panax notoginseng Powder (B)**

的混合对照品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 以各成分峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 分别绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到回归方程和相关系数 (r<sup>2</sup>), 见表 2。

**2.5.6 加样回收率试验** 精密称取含已测定样品 (S7) 6 份, 每份 0.25 g, 加入适量的对照品, 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, 计算回收率以及 RSD, 人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、20(R)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub>、20(S)-Rg<sub>3</sub>、20(R)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 的加样回收率分别为 104.35%、97.20%、102.00%、101.22%、97.39%、103.74%、99.48%、102.24%, RSD 值分别为 1.13%、1.25%、1.11%、1.78%、1.53%、1.32%、1.86%、1.11%。

**2.6 数据处理**

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 63 批熟三七粉的特征图谱进

**表 2 线性回归方程和相关系数**

**Table 2 Linear regression equation and correlation coefficient**

成分	回归方程	r <sup>2</sup>	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )
人参皂苷 20 (S)-Rh <sub>1</sub>	Y=6 014 542.9 X-8 319.3	0.999 9	0.003 2~0.153 0
人参皂苷 20 (R)-Rh <sub>1</sub>	Y=5 662 925.8 X-14 490.4	0.999 5	0.003 2~0.052 8
人参皂苷 Rk <sub>3</sub>	Y=11 611 177.3 X-80 985.5	0.999 4	0.031 6~0.253 0
人参皂苷 Rh <sub>4</sub>	Y=756 409.4 X-39 430.9	0.999 3	0.031 2~1.050 0
人参皂苷 20 (S)-Rg <sub>3</sub>	Y=3 476 084.9 X-13 807.1	0.999 1	0.015 8~0.253 0
人参皂苷 20 (R)-Rg <sub>3</sub>	Y=1 638 710.1 X-7 721.5	0.999 3	0.007 8~0.124 8
人参皂苷 Rk <sub>1</sub>	Y=4 266 046.6 X-31 946.9	0.999 1	0.031 6~0.252 5
人参皂苷 Rg <sub>5</sub>	Y=13 153 336.3 X-77 917.2	0.999 3	0.015 6~0.249 5

行相似度评价, 采用 SIMCA 13.0 软件对饮片吸收峰的吸收值进行 PLS-DA 判别分析, SPSS 2.0 软件对饮片进行聚类分析和非参数检验。

### 3 结果与分析

#### 3.1 HPLC 特征图谱研究

**3.1.1 特征图谱的建立及共有峰定位** 取 63 批熟三七粉 (S1~S63), 按“2.1”项下方法检测并记录其 HPLC 特征图谱, 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》进行匹配生成对照图谱, 建立熟三七 HPLC 对照特征图谱 (图 2), 并通过对照品加入法指认其中 6 个特征峰: 11 号峰为人参皂苷 20(S)-Rh<sub>1</sub>、12 号峰为人参皂苷 20(R)-Rh<sub>1</sub>、16 号峰为人参皂苷 Rk<sub>3</sub>、17 号峰为人参皂苷 Rh<sub>4</sub>、18 号峰为人参皂苷 Rk<sub>1</sub>、19 号峰为人参皂苷 Rg<sub>5</sub>, 图 3 为 63 批熟三七粉的 HPLC 特征图谱。

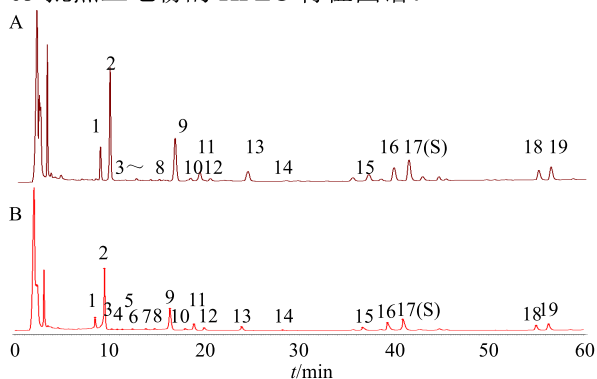


图 2 熟三七粉特征图谱 (A) 和对照图谱 (B)

Fig. 2 HPLC characteristic spectrum (A) and control chromatogram (B) of steamed *Panax notoginseng* Powder

**3.1.2 特征峰相对保留时间的确定** 63 批熟三七特征图谱有 19 个特征峰, 其中, 17 号峰为稀有皂苷 Rh<sub>4</sub>, 峰面积相对较大, 分离度、重复性好, 信号较强, 确定为参照峰 (S)。依据《中国药典》2015 年版关于中药特征图谱的相关规定, 计算各特征峰与 S 峰之间的相对保留时间和相对峰面积, 其 29 个峰的相对保留时间的 RSD 值均低 1.0%, 说明参考特征图谱中的各特征峰为熟三七粉的共有成分。

**3.1.3 相似度评价** 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 29 批熟三七粉的特征图谱进行相似度评价, 以 S2 为参照图谱, 采用中位数法生成对照图谱后进行自动匹配。S1~S63 特征图谱的相似度分别为 0.987、0.987、0.922、0.917、0.916、0.925、0.999、0.966、0.924、0.921、0.933、0.930、0.927、0.931、0.939、0.937、0.939、

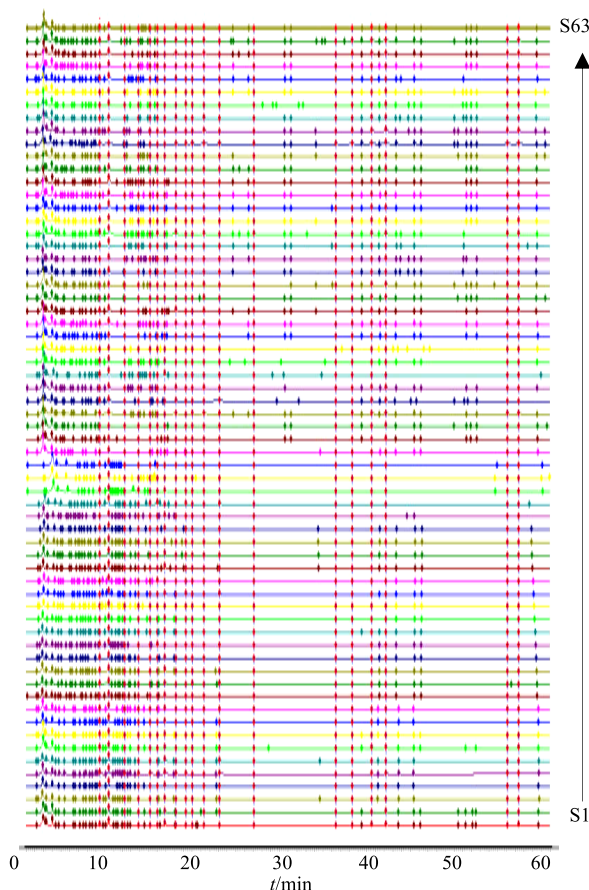


图 3 63 批熟三七粉的 HPLC 特征图谱

Fig. 3 HPLC characteristic spectrum of 63 batches of steamed *Panax notoginseng* Powder

0.938、0.930、0.929、0.931、0.931、0.932、0.931、0.927、0.911、0.934、0.922、0.918、0.970、0.696、0.478、0.959、0.940、0.896、0.927、0.959、0.982、0.942、0.961、0.977、0.617、0.615、0.990、0.920、0.914、0.954、0.957、0.989、0.925、0.977、0.950、0.717、0.580、0.601、0.866、0.891、0.861、0.932、0.960、0.965、0.949、0.953, 可见 29 批 (S1~S29) 不同企业的熟三七粉相似度大部分在 0.918~0.999, 表明各地出售的都是熟三七粉, 工艺的区别不显著, 而自制饮片的相似度 (S30~S63) 在 0.478~0.990, 考虑主要是由于炮制工艺的差异导致样品内稀有皂苷转化程度不同, 则其皂苷含量差异大引起其峰面积差异十分显著, 因而相似度差异较大, 说明炮制工艺对熟三七粉的质量有明显影响。

#### 3.2 HPLC 熟三七稀有皂苷类成分定量测定研究

将 63 批熟三七按照“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 按照“2.1”项下的色谱条件进样 10 μL, 分析 8 种稀有皂苷成分的含量, 结果见表 3。由表

表 3 8 种稀有皂苷成分含量  
Table 3 Content of eight rare saponins

编号	质量分数/%								总和
	人参皂苷 20 (S)-Rh <sub>1</sub>	人参皂苷 20 (R)-Rh <sub>1</sub>	人参皂苷 Rk <sub>3</sub>	人参皂苷 Rh <sub>4</sub>	人参皂苷 20 (S)-Rg <sub>3</sub>	20 (R)-Rg <sub>3</sub>	人参皂苷 Rk <sub>1</sub>	人参皂苷 Rg <sub>5</sub>	
S1	0.24	0.05	1.76	4.14	0.15	0.13	0.35	0.16	6.99
S2	0.40	0.11	3.10	7.12	0.26	0.22	0.56	0.26	12.04
S3	0.11	0.02	0.60	0.94	0.04	0.00	0.06	0.04	1.80
S4	0.11	0.02	0.50	0.75	0.03	0.00	0.05	0.04	1.50
S5	0.11	0.02	0.50	0.76	0.03	0.00	0.05	0.04	1.52
S6	0.10	0.02	0.60	1.00	0.04	0.00	0.07	0.05	1.87
S7	0.33	0.12	2.39	5.44	0.23	0.20	0.38	0.18	9.27
S8	0.21	0.07	1.22	2.52	0.10	0.09	0.14	0.08	4.44
S9	0.12	0.02	0.57	0.94	0.04	0.00	0.06	0.04	1.79
S10	0.11	0.02	0.51	0.71	0.03	0.00	0.05	0.03	1.45
S11	0.10	0.03	0.56	0.99	0.04	0.03	0.06	0.04	1.85
S12	0.10	0.03	0.56	0.98	0.04	0.04	0.06	0.04	1.86
S13	0.11	0.04	0.57	0.94	0.04	0.04	0.06	0.04	1.85
S14	0.10	0.03	0.58	1.02	0.04	0.04	0.06	0.04	1.91
S15	0.10	0.04	0.56	1.07	0.04	0.04	0.06	0.04	1.95
S16	0.11	0.04	0.65	1.24	0.05	0.05	0.07	0.05	2.26
S17	0.08	0.04	0.56	1.03	0.04	0.05	0.06	0.04	1.91
S18	0.09	0.03	0.59	1.05	0.04	0.04	0.06	0.04	1.95
S19	0.10	0.04	0.62	1.11	0.05	0.04	0.06	0.04	2.06
S20	0.10	0.04	0.61	1.05	0.04	0.05	0.06	0.04	2.00
S21	0.12	0.04	0.64	1.21	0.05	0.05	0.07	0.04	2.22
S22	0.12	0.04	0.65	1.24	0.05	0.05	0.07	0.04	2.26
S23	0.12	0.04	0.64	1.25	0.05	0.05	0.07	0.05	2.28
S24	0.13	0.04	0.66	1.21	0.05	0.05	0.07	0.04	2.25
S25	0.07	0.03	0.50	0.80	0.03	0.04	0.06	0.04	1.57
S26	0.09	0.00	0.51	0.73	0.03	0.00	0.06	0.04	1.47
S27	0.06	0.03	0.69	1.28	0.05	0.00	0.09	0.04	2.23
S28	0.12	0.02	0.54	0.96	0.03	0.00	0.07	0.04	1.78
S29	0.10	0.02	0.46	0.78	0.03	0.00	0.06	0.04	1.49
S30	0.29	0.14	2.80	5.86	0.16	0.15	0.32	0.15	9.87
S31	0.49	0.23	5.08	11.32	0.34	0.31	0.69	0.32	18.78
S32	0.52	0.26	5.78	14.09	0.48	0.46	0.88	0.42	22.87
S33	0.35	0.17	2.96	6.29	0.27	0.27	0.45	0.20	10.96
S34	0.35	0.17	2.94	6.32	0.26	0.26	0.40	0.18	10.89
S35	0.42	0.24	3.39	7.58	0.21	0.23	0.39	0.18	12.63
S36	0.02	0.02	0.61	0.98	0.08	0.00	0.07	0.05	1.82
S37	0.11	0.03	0.95	1.88	0.06	0.04	0.12	0.06	3.26
S38	0.28	0.14	2.36	5.00	0.18	0.17	0.32	0.15	8.58
S39	0.33	0.15	2.93	6.98	0.20	0.18	0.41	0.20	11.37
S40	0.36	0.14	3.16	6.50	0.21	0.19	0.46	0.20	11.22
S41	0.22	0.08	2.25	5.22	0.21	0.16	0.47	0.22	8.84
S42	0.59	0.31	6.09	14.12	0.56	0.53	0.99	0.46	23.66
S43	0.44	0.23	4.82	11.29	0.47	0.57	1.09	0.46	19.37
S44	0.29	0.14	2.09	2.03	0.21	0.20	0.36	0.17	5.48
S45	0.41	0.23	3.56	3.42	0.29	0.26	0.46	0.22	8.85
S46	0.12	0.02	0.60	1.20	0.03	0.00	0.07	0.05	2.09
S47	0.16	0.05	1.15	2.55	0.09	0.06	0.15	0.09	4.31
S48	0.34	0.13	3.48	7.82	0.25	0.21	0.53	0.25	13.01
S49	0.34	0.12	3.38	7.47	0.20	0.17	0.45	0.22	12.35
S50	0.33	0.11	3.36	7.84	0.26	0.20	0.63	0.30	13.04
S51	0.44	0.17	4.51	10.01	0.24	0.21	0.53	0.25	16.36
S52	0.33	0.10	2.98	6.50	0.18	0.14	0.40	0.19	10.83
S53	0.46	0.21	4.51	10.02	0.33	0.32	0.64	0.30	16.78
S54	0.59	0.28	5.80	13.21	0.45	0.43	0.87	0.40	22.02
S55	0.51	0.23	5.37	12.56	0.40	0.35	0.80	0.37	20.60
S56	0.40	0.19	3.15	2.98	0.28	0.26	0.45	0.21	7.92
S57	0.45	0.21	3.43	3.23	0.30	0.27	0.47	0.21	8.56
S58	0.53	0.26	3.73	3.55	0.33	0.31	0.47	0.22	9.40
S59	0.13	0.03	0.63	1.24	0.04	0.00	0.07	0.05	2.18
S60	0.32	0.10	3.13	6.80	0.19	0.14	0.44	0.20	11.32
S61	0.29	0.09	2.77	6.07	0.17	0.12	0.39	0.18	10.07
S62	0.31	0.09	3.06	6.66	0.20	0.15	0.46	0.22	11.15
S63	0.34	0.10	3.18	6.83	0.18	0.14	0.43	0.20	11.40

3 可看出, 人参皂苷  $Rk_3$ 、 $Rh_4$  含量较高, 而  $20(R)\text{-Rh}_1$ 、 $20(S)\text{-Rg}_3$ 、 $20(R)\text{-Rg}_3$  含量偏低, 甚至部分收集样品中人参皂苷  $20(R)\text{-Rg}_3$  含量略微。可能是由于蒸制温度及时间影响蒸制过程中糖苷键的水解和侧链的脱水反应所致。

### 3.3 熟三七色泽与稀有皂苷含量关系

对不同色泽的 63 批熟三七样品稀有皂苷成分的含量进行比对分析, 由 SPSS 软件作聚类分析, 输出系统聚类分析图, 见图 4。由图 4 可知, 63 批样品被分为 3 组。

将 3 组样品进行非参数检验, 第 1 组与第 3 组之间无显著性差异 ( $P>0.5$ ), 第 2 组与第 1、3 两组均有显著性差异 ( $P<0.01$ ), 综上所述, 仍将第 1 组与第 3 组归为 1 组, 即棕红色组, 第 2 组为淡黄色组, 其聚类结果与色泽分组结果相符。

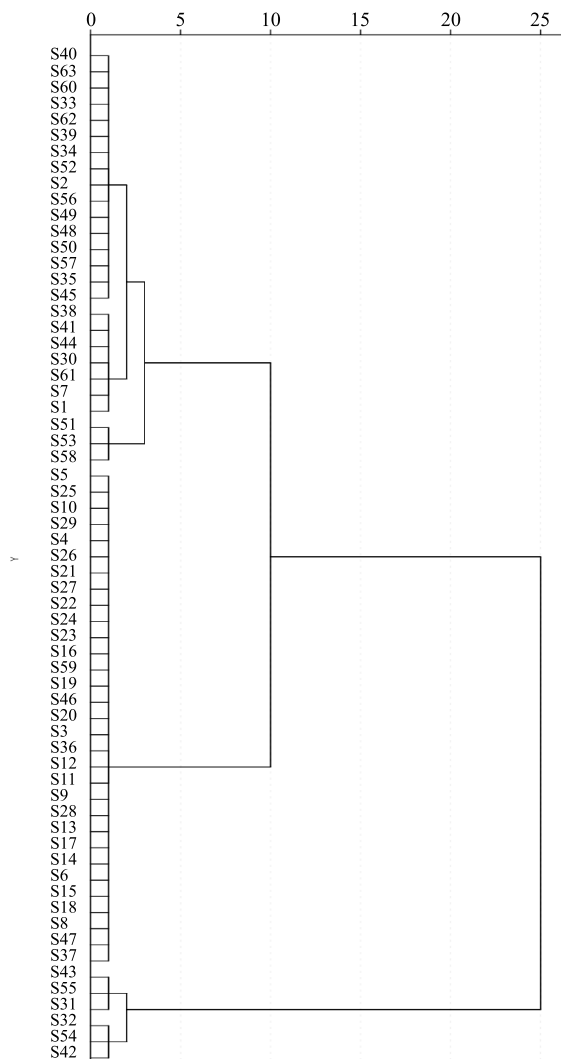


图 4 系统聚类分析图

Fig. 4 System cluster analysis diagram

采用 SIMCA 13.0 软件对不同色泽熟三七特征图谱吸收峰的吸收值进行 PLS-DA 分析, PLS-DA 得分图见图 5, 客观显示了 63 个不同色泽的三七样品之间的成分与色泽的关系, 得分图的每一个点代表一个样品, 依据复杂的紫外光谱信息能直观显示不同色泽样品之间的关系, 图谱相似的样品聚在较近区域, 图谱有差异的样品区分较明显, 不同色泽样品被分为 2 类, 淡黄色组聚集在右侧区域, 棕红色组聚集在左侧区域, 图 6 显示不同色泽三七样品的吸收峰对区别样品贡献的大小, 第 28、39、41 号吸收峰对区别样品的贡献较大, 这 3 个成分分别为人参皂苷  $20(R)\text{-Rh}_1$ 、 $Rk_3$  和  $Rh_4$ 。

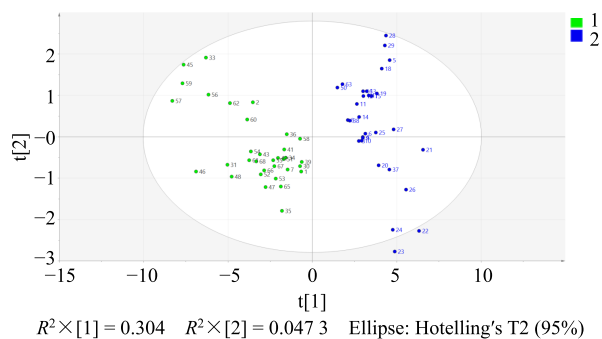


图 5 PLS-DA 得分图

Fig. 5 PLS-DA score diagram

本实验通过建立熟三七稀有皂苷 HPLC 特征图谱及同时测定人参皂苷  $20(S)\text{-Rh}_1$ 、 $20(R)\text{-Rh}_1$ 、 $Rk_3$ 、 $Rh_4$ 、 $20(S)\text{-Rg}_3$ 、 $20(R)\text{-Rg}_3$ 、 $Rk_1$ 、 $Rg_5$  8 种稀有皂苷含量的方法。

由样品有效成分的含量结合 PLS-DA、聚类分析、非参数检验等多元统计分析可以看出, 棕红色样品的有效成分含量均高于 3%, 明显优于淡黄色组, 说明样品色泽与质量之间的关系, 即色泽较深的熟三七稀有皂苷含量更高, 质量更好, 以期更全面地控制熟三七的质量和评价其等级, 并为其炮制工艺的规范化提供参考。

## 4 讨论

### 4.1 实验考察

彭茗等<sup>[11]</sup>发现人参皂苷  $20(S)\text{-Rh}_1$ 、 $20(R)\text{-Rh}_1$ 、 $20(S)\text{-Rg}_3$ 、 $20(R)\text{-Rg}_3$ 、 $Rk_3$ 、 $Rh_4$ 、 $Rk_1$  和  $Rg_5$  是熟三七优选的化学标记物, 具有良好的抗癌、抗肿瘤、神经保护的作用<sup>[12-15]</sup>, 人参皂苷  $Rh_4$ 、 $Rg_5$  是 2 个含量相对较高的皂苷类成分, 但在生三七中含量很低<sup>[16]</sup>, 人参皂苷  $20(S)\text{-Rh}_1$ 、 $20(R)\text{-Rh}_1$ 、 $20(S)\text{-Rg}_3$ 、 $20(R)\text{-Rg}_3$  属于四环三萜达玛烷型人参皂苷, 其中的 S 构型是

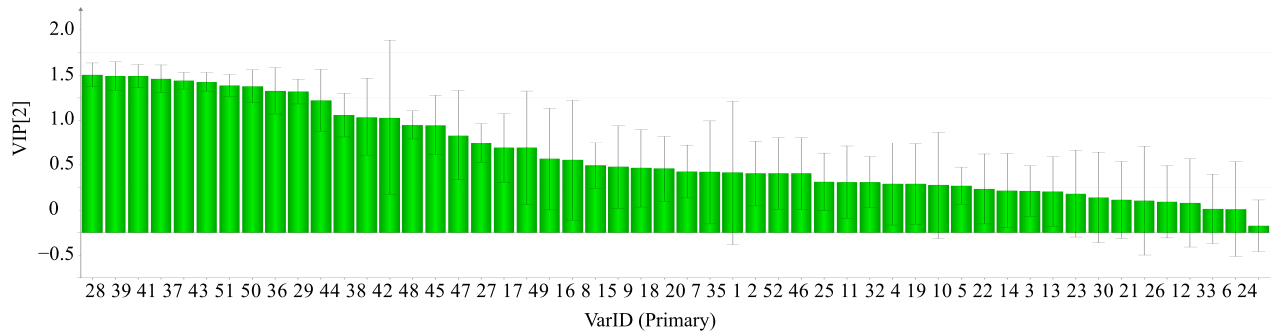


图 6 PLS-DA 自变量投影重要性指标 VIP 图

Fig. 6 VIP projection of PLS-DA independent variable projection importance index

天然存在于三七中，而 *R* 构型是经过加热发生异构反应新生成的稀有皂苷。因此选择以上 8 种稀有皂苷作为熟三七质量评价的指标性成分。

本实验为了更好地分离稀有皂苷成分，经反复实验最终优化了 HPLC 特征图谱的色谱条件，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<sup>[17]</sup>。对特征图谱相似度进行分析，相似度良好，建立的 HPLC 特征图谱标定了 19 个共有峰，且共有峰峰面积占总峰面积的 90% 以上，符合特征图谱的技术要求，说明所建立的特征图谱具有可靠性。

为提高稀有皂苷的提取效率，本实验考察不同提取方式（超声、回流、微沸）、不同物料比（1:20、1:40、1:60、1:80、1:100）、不同提取时间（0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h）对提取效率的影响，最终确定物料比 1:40 回流 1.5 h 是最优的提取方式，既能将熟三七中稀有皂苷成分提取完全，且含量稳定。在配制对照品溶液中，发现 20(*R*)-Rg<sub>3</sub> 在甲醇溶液中溶解度较差，考虑是由于该皂苷在甲醇中溶解度略低，加 5% 水助溶后溶解度得以提高且对溶剂峰峰面积无显著影响。

同时，在数据分析中也对 8 种稀有皂苷含量与熟三七粉粉末粒径进行了相关性分析，发现其无显著相关性 ( $P > 0.5$ )。

在所测定的 8 种稀有皂苷中，20(*S*)-Rh<sub>1</sub>、20(*R*)-Rh<sub>1</sub>、Rk<sub>3</sub>、Rh<sub>4</sub> 为三醇型人参皂苷，20(*S*)-Rg<sub>3</sub>、20(*R*)-Rg<sub>3</sub>、Rk<sub>1</sub>、Rg<sub>5</sub> 为二醇型人参皂苷。对 8 种稀有皂苷含量进行相关性分析，发现其呈正相关 ( $P > 0.5$ )，建议在二醇型、三醇型人参皂苷中分别选择含量高、药效好的成分，作为熟三七质量评价的指标性成分。

#### 4.2 稀有皂苷含量与色泽之间的关系

对特征图谱峰面积、8 种稀有皂苷成分的含量进行 PLS-DA、聚类及非参数检验分析，对样品间各成分含量进行了考察比较，发现峰面积及含量差异与样品色泽有关，色泽越深，样品峰面积越大，稀有皂苷含量越高。

样品的色泽差异主要是由于梅拉德 (Maillard) 反应程度不同，梅拉德反应的起始阶段即为氨基酸与还原糖加热，氨基与羰基缩合生成席夫碱，经过 Amadori 重排生成了 Amadori 化合物，中间阶段的产物与氨基化合物进行醛基—氨基反应，最终生成类黑精，反映其反应速度及程度与温度和时间呈正相关。也就是蒸制工艺不同，熟三七粉的颜色不一致。

研究发现，蒸制温度越高，大量皂苷水解向稀有皂苷的转化越迅速<sup>[13-17]</sup>。因此在一定限度内，蒸制温度越高、时间越长，稀有皂苷含量越高。大量皂苷水解的同时，也产生了还原糖。随着还原糖的增加，美拉德反应持续发生，熟三七粉的颜色加深。蒸制温度与稀有皂苷含量及熟三七粉色泽呈现正相关。因此有必要深入研究蒸制工艺，确定合理的蒸制参数，引导皂苷的水解反应和美拉德反应生成药效活性更高的稀有皂苷，并在性状颜色上得到稳定、美观的熟三七。

笔者发现，《中国药典》中三七的饮片规格单一，只有三七粉。而市场上也是将生、熟三七粉统称为“三七粉”。“生熟异用”是中药炮制的基本理论之一，“生消熟补”是三七最明显的药用特点，现今市场熟三七粉的应用日益增多，因此药典有必要增加其饮片规格及相应的质量评价指标。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.



- [2] 高学敏, 王永炎, 颜正华. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [3] 徐冬英. 三七补益功效考 [J]. 中药材, 2002, 25(12): 906-908.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 由凤鸣. 从“生消熟补”谈炮制三七的应用——专家谈熟三七炮制规范及临床应用 [J]. 世界中医药, 2015, 25(5): 289-294.
- [7] 周新惠, 赵荣华, 张荣平, 等. 三七不同加热炮制品中5种皂苷类成分的含量测定 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6): 11-14.
- [8] 周新惠, 龙丽莉, 李春梅, 等. 生三七与蒸制熟三七部分药理作用的比较研究 [J]. 环球中医药, 2014, 7(6): 420-426.
- [9] 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.
- [10] 何宜航, 桑文涛, 杨桂燕, 等. 基于“生消熟补”理论的三七补血作用及其机理研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(5): 647-651.
- [11] 彭 茗. 基于三七皂苷差向异构体的三七质量评价研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2016.
- [12] Kim J W, Jung S Y, Kwon Y H, *et al.* Ginsenoside Rg<sub>3</sub> attenuates tumor angiogenesis via inhibiting bioactivities of endothelial progenitor cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 504-515.
- [13] Popovich D G, Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line [J]. *Arch Bioch Biophys*, 2002, 406(1): 1-8.
- [14] Wang H. Upregulation of M1 muscarinic receptors expressed in CHOml cells by panaxynol via cAMP pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 383(1): 121-126.
- [15] Jung J S, Kim D H, Kim H S. Ginsenoside Rh<sub>1</sub> suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in IFN-gamma-stimulated microglia via modulation of JAK/STAT and ERK signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2010, 397(2): 323-329.
- [16] 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.
- [17] 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.