

烤制、蒸制三七中皂苷类成分的化学模式识别及定量测定

张海莹, 王淑冰, 敖选丽, 刘倩如, 何怡霖, 赏宇, 陈兴龙, 张文平, 毛晓健, 王亭, 张荣平*, 侯博*

云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: **目的** 建立生三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma* 与烤制三七、蒸制三七 HPLC 指纹图谱, 并结合多元统计分析研究三七炮制前后化学成分变化, 为三七炮制质量评价与质量标志物 (Q-Markers) 识别提供参考。**方法** 采用 HPLC 法进行测定, 建立不同炮制方法下的指纹图谱; 通过热图分析和层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 对指纹图谱进行分析评价, 同时对 10 个主要成分进行定量测定, 阐明炮制前后差异成分, 结合超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 法快速预测熟三七中的化合物, 对主要色谱峰进行鉴定, 分析裂解规律。**结果** 建立三七不同炮制时间、方法的叠加指纹图谱, 共匹配 13 个主要色谱峰, 通过对照品比对指认了其中 10 个色谱峰。烤制 230 °C、6 h 时, 新生成的皂苷较蒸制转化率高且含量最大, 进而把该烤制条件作为最佳的炮制方法。HCA 将不同条件下炮制的三七分为 2 类, PCA 可以明显区分不同炮制方法及时间的三七, OPLS-DA 的 VIP 值确定了人参皂苷 Rk₁、Rg₅、Rk₃、Rh₄、Rb₁、Rd 这 6 个 Q-Markers, 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对熟三七中化合物进行预测, 对其主要色谱峰进行定性分析, 推测新生成皂苷可能的裂解规律。已有文献报道人参皂苷 Rk₃、Rh₄ 均具有补血的作用, 验证三七“生打熟补”的传统应用, 说明建立的烤制方法具备科学依据。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱、含量测定、UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析结果指出, 与传统蒸制相比, 烤制法可使三七中“熟补”的化学成分转化率高; 对三七及其炮制品的质量控制具有重要意义。

关键词: 三七; 烤制; 蒸制; 指纹图谱; 化学模式识别; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-7979-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.006

Chemical pattern recognition and quantitative determination of saponins in baking and steaming *Notoginseng Radix et Rhizoma*

ZHANG Haiying, WANG Shubing, AO Xuanli, LIU Qianru, HE Yilin, SHANG Yu, CHEN Xinglong, ZHANG Wenping, MAO Xiaojian, WANG Ting, ZHANG Rongping, HOU Bo

School of Chinese Materia Medica & Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of raw Sanqi (*Notoginseng Radix et Rhizoma*, NRR) with steamed NRR and baked NRR, and to study the changes of chemical constituents before and after NRR concocting by combining multivariate statistical analyses and measurements, so as to provide a reference for the evaluation of NRR concocting quality and the quality markers (Q-Markers). **Methods** The determination was performed by HPLC to establish the fingerprints under different concoctions; The fingerprints were analyzed and evaluated by heatmap analysis, hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and quantitative determination of the ten main components to identify the differences in components before and after processing. Ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole

收稿日期: 2024-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82360690); 云南省基础研究计划中医药联合专项-面上项目 (202301AZ070001-044); “云岭学者”支持计划; 云南省重点领域科技计划项目 (202303AC100025); 云南省科技厅重大科技专项计划 (202402AA310027); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2024Y351)

作者简介: 张海莹 (1999—), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为中药活性物质研究与产品开发。

Tel: 19862122362 E-mail: zhanghaiying1689@163.com

***通信作者:** 侯博, 博士, 副研究员, 研究方向为抗病毒天然产物活性物质发现。Tel: 18787498858 E-mail: kib_drug@163.com

张荣平, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 13888963089 E-mail: zhrpkm@163.com

time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to rapidly predict the compounds in cooked NRR, and the major chromatographic peaks were analyzed qualitatively to speculate the possible cleavage pattern of the newly generated saponins. **Results** A total of 13 principal chromatographic peaks were matched in the superimposed fingerprints of different processing times and methods of NRR, and 10 of these peaks were identified by comparison with the control sample. At 230 °C for 6 h of baking, the newly generated saponins had a higher conversion rate and the largest content than that of steaming, and then 230 °C and 6 h of baking were taken as the optimal concoction method and concoction time. HCA classified NRR with different concoction times into two categories, and PCA could obviously distinguish NRR with different concoction times. VIP values in OPLS-DA identified six markers of quality—ginsenoside Rk₁, Rg₅, Rk₃, Rh₄, Rb₁ and Rd. UPLC-Q-TOF-MS/MS was used for the prediction of the compounds in ripe NRR. The main chromatographic peaks of raw and cooked NRR were qualitatively analyzed, and speculate on the possible cleavage pattern of the newly generated saponins. The ginsenoside Rk₃ and Rh₄ have the effect of tonifying blood, which verifies the traditional application of NRR. **Conclusion** The results of HPLC fingerprinting and content determination, UPLC-Q-TOF-MS/MS qualitative analyses pointed out that compared with traditional steaming, the baking method can achieve a higher conversion rate of the chemical components in NRR; which is of great significance for the quality control of NRR and its concocted products.

Key words: *Notoginseng Radix et Rhizoma*; baking method; steaming method; fingerprint; chemical pattern recognition; notoginsenoside R₁; ginsenoside

药用三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 性温, 味甘、微苦, 归肝、胃经, 具有散瘀止血、消肿定痛之功效^[1]。三七始载于《本草纲目》, 素有“金不换”“南国神草”之美誉。中医认为“凡入药者必先炮”, 自古医家在遣药组方时亦十分讲究“药之生熟”, 三七作为生熟异用的典型中药, 且有“生打熟补”之说^[2], 生三七可止血、祛瘀、定痛消肿^[3-4], 三七炮制品具有补气补血、增强免疫、抑制肿瘤等功效^[5-7]。《本草纲目拾遗》记载: “人参补气第一, 三七补血第一。味同而功亦等, 故人并称曰: 人参三七”^[8]。

三七中含有黄酮、皂苷、氨基酸、多糖等化学成分, 近代研究表明, 皂苷类成分是三七的主要有效成分之一^[9-10]。三七经炮制后皂苷类成分的种类和含量发生了显著变化: 原有三七皂苷 R₁ (R₁) 和人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rd (Rg₁、Re、Rb₁、Rd) 的含量降低, 新生成人参皂苷 F₄、Rh₁、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅、Rh₂ (F₄、Rh₁、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅、Rh₂) 等成分^[11]。有研究表明, Rk₃ 通过促进骨髓和髓外造血, Rh₄ 通过促进髓外造血, 从而达到补血的目的^[12]。Rg₃、Rk₁ 通过降低血浆中的白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 水平, 抑制神经炎症^[13], Rk₁、Rk₃、Rh₄、Rg₅ 通过降低小鼠肺部组织中羟脯氨酸, 缓解特发性肺纤维化^[14]。Rk₃、20(S)-人参皂苷 Rg₃ [20(S)-Rg₃] 则可通过提高亚铁螯合物和血红素的水平, 进而发挥抗贫血活性^[15]。

本研究利用 HPLC 技术, 建立三七炮制前后指纹图谱, 对生三七中 5 种皂苷类成分 (R₁、Rg₁、Re、

Rb₁、Rd) 和炮制三七中的 5 种皂苷类成分 (Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅) 进行定性和定量分析, 并结合热图分析和层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 对其进行综合评价, 阐明了三七炮制前后的差异性成分; 进一步使用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对烤制三七的化学成分进行分析, 共预测出 30 个皂苷类成分。

本研究不仅提供炮制前后物质基础变化, 也为进一步完善熟三七质量标准的制定提供参考, 创新性地采用烤制法能方便、快速获得熟三七质量标志物 (Q-Markers)。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Agilent 1290 型超高效液相色谱-Agilent 6530 型四极杆飞行时间串联质谱仪: 配有电喷雾双离子源 (Dual AJS ESI) 及 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.10.0 数据处理系统, 美国安捷伦科技有限公司; 改进 K35FK609 型控温旋转烤箱, 浙江苏泊尔股份有限公司; XS205DU 型十万分之一分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; UPT-II-20T 型超纯水机, 四川优普超纯科技有限公司; YM-100PLUS 型超声波清洗机, 深圳市方奥微电子科技有限公司。

1.2 材料

对照品 R₁ (批号 BBP03407)、Rg₁ (批号

BBP03421)、Re (批号 BBP03463)、Rb₁ (批号 BBP03511)、Rd (批号 BBP03464)、Rk₃ (批号 BBP06427)、Rh₄ (批号 BBP04099)、Rg₃ (批号 BBP03810)、Rk₁ (批号 BBP60151)、Rg₅ (批号 BBP04091), 购自云南西力生物技术股份有限公司, 以上对照品质量分数均为 98%。乙醇, 利妍科技有限公司, 食品级; 乙腈, HPLC 级, 德国默克公司; 超纯水, 实验室自制。三七样品购买自云南省文山州的云南白药集团三七产业有限公司, 经云南省南药可持续利用研究重点实验室左爱学副教授鉴定, 为五加科人参属植物三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 登记号码 NY-001-2857。

2 方法与结果

2.1 炮制方法

2.1.1 烤制 将生三七打粉, 过 80 目筛, 在 230 °C 下烤制, 分别在不同烤制时间 (0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18 h) 取样, 晾凉, 即得烤制样品 A01~A12。

2.1.2 常压蒸制 将生三七打粉, 过 80 目筛, 取生三七粉适量, 置于蒸笼内常压蒸制, 每隔 2 h 取出 1 次, 分别在不同蒸制时间 (2、4、6、8、10、12、14、16、18 h) 取样, 60 °C 干燥 12 h, 即得常压蒸制样品 B01~B09。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 乙腈-水为流动相, 进行梯度洗脱: 0~20 min, 20%乙腈; 20~45 min, 20%~46%乙腈; 45~55 min, 46%~55%乙腈; 55~60 min, 55%乙腈; 60~90 min, 55%~100%乙腈; 90~100 min, 100%乙腈; 100~101 min, 100%~20%乙腈; 101~105 min, 20%乙腈; 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.3 供试品溶液的制备

称取各三七粉末 2 g, 精密称定, 精密加入 80%乙醇 50 mL, 置 80 °C 水浴上回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液旋干后得到三七总皂苷粗提物。取提取物 25 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 70%甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.4 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅ 适量, 加 70%甲醇定容, 制成含 R₁ 0.6 mg/mL、Rg₁ 1.9 mg/mL、Re 0.5 mg/mL、

Rb₁ 1.2 mg/mL、Rd 0.7 mg/mL、Rk₃ 1.5 mg/mL、Rh₄ 0.1 mg/mL、Rg₃ 0.1 mg/mL、Rk₁ 0.9 mg/mL、Rg₅ 0.8 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.5 三七炮制前后 HPLC 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 精密称取生三七、A06 (烤制 6 h) 粉末各 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 重复进样 6 次, 分别以 Rd、Rk₃ 峰为参照峰, 记录各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD。测得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均<0.04%, 相对峰面积的 RSD 均<1.96%, 表明仪器精密度良好。

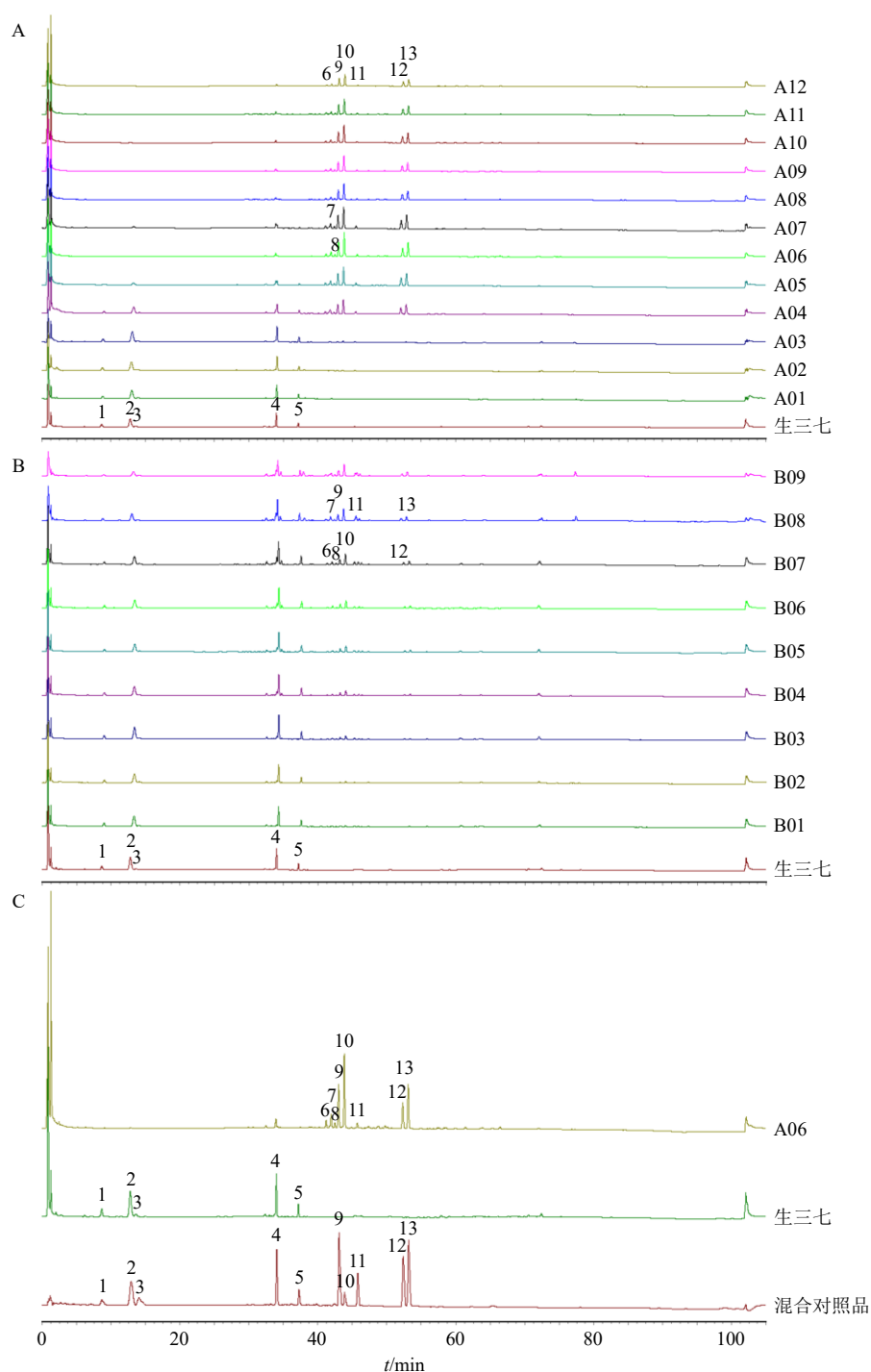
2.5.2 重复性试验 精密称取生三七、A06 (烤制 6 h) 粉末各 2 g, 各称取 6 份, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别以 Rd、Rk₃ 峰为参照峰, 记录各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD。测得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均<0.04%, 相对峰面积的 RSD 均<2.61%, 表明该提取方法重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.5.3 稳定性试验 精密称取生三七、A06 (烤制 6 h) 粉末各 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 分别进样测定, 分别以 Rd、Rk₃ 峰为参照峰, 记录各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD。测得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均<0.14%, 相对峰面积的 RSD 均<2.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内较稳定, 符合指纹图谱要求。

2.5.4 指纹图谱的建立及主要色谱峰的指认 按“2.3”项下方法分别制备生三七及不同炮制时间、不同炮制方法的三七样品 (A01~A12、B01~B09) 的供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得到 HPLC 指纹图谱 (图 1)。取“2.4”项下混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得到混合对照品的色谱图。经与对照品对比, 共指认出 1~5、9~13 号 10 个主要色谱峰, 分别为 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅。

2.6 炮制前后 10 种成分的定量测定

2.6.1 线性关系考察 精密称定 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd、Rk₃、Rh₄、Rg₃、Rk₁、Rg₅ 适量, 70%甲醇溶解, 配置成适量质量浓度的混合对照品溶液。以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得 10 种成分的线性回归方程与线性范围, 结果分别为 R₁ $Y=379.7968X-16.6606$, $R^2=0.9999$, 线性范围 2.8408~



A-烤制的三七; B-蒸制的三七; C-混合对照品、生三七和烤制 6 h 的三七样品; 1-R₁; 2-R_{g₁}; 3-R_e; 4-R_{b₁}; 5-R_d; 9-R_{k₃}; 10-R_{h₄}; 11-R_{g₃}; 12-R_{k₁}; 13-R_{g₅}。

A-baked NRR; B-steamed NRR; C-mixed reference substances, samples of raw NRR and bake NRR for 6 h; 1-R₁; 2-R_{g₁}; 3-R_e; 4-R_{b₁}; 5-R_d; 9-R_{k₃}; 10-R_{h₄}; 11-R_{g₃}; 12-R_{k₁}; 13-R_{g₅}。

图 1 不同炮制方法下三七中总皂苷的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectra of total saponins in NRR under different processing methods

39.926 1 μg ; R_{g₁} $Y=394.843\ 3\ X+17.763\ 3$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 39.024 8~243.218 7 μg ; R_e $Y=262.986\ 3\ X-4.773\ 7$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 21.478 3~124.611 7 μg ; R_{b₁} $Y=339.330\ 5\ X+7.518\ 1$,

$R^2=0.999\ 9$, 线性范围 33.520 6~204.769 1 μg ; R_d $Y=304.920\ 7\ X-1.716\ 1$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 11.740 3~70.066 5 μg ; R_{k₃} $Y=343.223\ 9\ X+14.494\ 5$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 58.985 8~363.341 9 μg ; R_{h₄}

$Y=425.8677X-5.8284$, $R^2=0.9999$, 线性范围 $9.6222\sim158.4474\mu\text{g}$; Rg_3 $Y=380.9297X-1.5725$, $R^2=0.9999$, 线性范围 $23.9780\sim139.1992\mu\text{g}$; Rk_1 $Y=350.6088X+2.0216$, $R^2=0.9999$, 线性范围 $46.6423\sim285.7290\mu\text{g}$; Rg_5 $Y=353.1004X+7.6697$, $R^2=0.9998$, 线性范围 $59.6712\sim359.4798\mu\text{g}$ 。

2.6.2 精密度试验 精密称取生三七粉末 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 重复进样 6 次, 计算 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 峰面积的 RSD 分别为 1.32%、0.46%、1.94%、0.81%、0.58%。精密称取 A06 (烤制 6 h) 粉末 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 重复进样 6 次, 计算 Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5 峰面积的 RSD 分别为 0.14%、1.96%、0.63%、0.14%、0.17%, 表明该仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 精密称取生三七粉末 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 分别进样测定, 计算 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 峰面积的 RSD 分别为 1.46%、0.66%、0.95%、0.78%、0.56%。精密称取 A06 (烤制 6 h) 粉末 2 g, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 分别进样测定, 计算 Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5 峰面积的 RSD 分别为 0.14%、2.86%、0.64%、0.14%、0.17%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.4 重复性试验 精密称取生三七粉末 2 g, 平行 6 份, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 计算 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 质量分数的 RSD 分别为 1.64%、0.64%、2.61%、1.04%、1.17%。精密称取 A06 (烤制 6 h) 粉末 2 g, 平行 6 份, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液 6 份, 在“2.2”项下色谱条件进样测定, 计算 Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5 质量分数的 RSD 分别为 1.34%、0.99%、1.24%、0.40%、0.49%, 表明该方法重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取已测知 5 种成分 (R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd) 含量的生三七粉末 9 份, 每份约 1 g, 分别按生三七样品中 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 质量分数的 80%、100%、120% 加入对照品, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 计算生三七样品中 5 种成分的平均加样回收率及其 RSD 值。结果 R_1 、 Rg_1 、 Re 、

Rb_1 、 Rd 的平均加样回收率分别为 101.07%、97.83%、103.98%、103.70%、102.76%, RSD 分别为 0.70%、3.17%、1.11%、1.17%、1.64%。

精密称取已测知 5 种成分 (Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5) 含量的炮制三七粉末 (A06) 9 份, 每份 1 g, 分别按炮制三七样品 (A06) 中 Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5 质量分数的 80%、100%、120% 加入对照品, 按“2.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 计算炮制三七样品 A06 中 5 种成分的平均加样回收率及其 RSD 值。结果 Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 、 Rg_5 的平均加样回收率分别为 103.98%、100.67%、100.28%、102.79%、103.39%, RSD 分别为 0.72%、1.12%、0.31%、1.98%、0.75%。

2.6.6 样品测定 按照“2.3”项下方法分别制备生三七和炮制三七样品的供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分别进行含量测定, 计算 10 种成分的实际含量, 可以看出 (表 1), 烤制 6 h 时, Rk_3 、 Rh_4 、 Rg_3 、 Rk_1 的质量分数均达到最大值, 且检测不到 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rd 。

2.7 化学模式识别分析

2.7.1 蒸制三七和烤制三七指纹图谱的热图分析和 HCA 将生三七和炮制三七样品的 13 个主要色谱峰的峰面积, 导入 TBtools 1.113 软件中进行热图分析和 HCA (图 2), 结果显示, 生三七、A01~A03、B01~B09 聚为一类, A04~A12 聚为一类, 表明随着炮制时间的延长, 三七中的成分发生变化, 且烤制三七比蒸制三七变化要大。

2.7.2 生三七和炮制三七指纹图谱的 PCA 将生三七和炮制三七样品的 13 个主要色谱峰的峰面积, 导入 SPSS 26.0.0.0 软件, 经过 KMO 和 Bartlett 检验, $\text{KMO}=0.758>0.5$, $P<0.001$, 表明符合因子分析条件, 可进行 PCA。将共有峰标准化处理后进行 PCA, 得到 PCA 得分图 (图 3), 可明显区分不同方法、不同时间炮制的三七。

2.7.3 生三七和炮制三七指纹图谱的 OPLS-DA 在 PCA (图 3) 的基础上, 进一步利用 OPLS-DA 对生三七和炮制三七样品进行分析, 结果如图 4-A 所示。所建立的模型中累积解释能力参数 $R^2_{Y\text{cum}}$ 为 0.987, $R^2_{Y\text{cum}}$ 为 0.838, 预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.788 >0.5 , 表明此模型为有效模型。其中, 生三七、A01~A03、B01~B09 归为同一类, A04~A07 归为同一类, A08~A12 归为同一类, 可以有效地将不同炮制条件下的三七样品区分开。进一步将烤制三七进

表 1 生三七和炮制三七中 10 种成分含量测定结果 (n = 3)

Table 1 Content determination results of ten components in raw and processed NRR (n = 3)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	R ₁	R _{g1}	R _e	R _{b1}	R _d	R _{k3}	R _{h4}	R _{g3}	R _{k1}	R _{g5}
生三七	31.937 4	126.672 2	22.050 2	93.949 6	31.403 3	—	—	1.040 0	—	—
A01	33.060 5	135.975 2	23.621 4	102.773 6	32.050 9	—	0.547 4	3.141 3	—	—
A02	32.889 0	137.030 3	24.087 9	98.133 1	34.593 7	1.901 3	4.860 9	5.011 8	—	—
A03	41.739 3	172.412 9	29.075 7	65.834 1	41.320 3	5.366 9	9.600 3	6.788 2	4.663 6	7.041 1
A04	24.561 2	99.177 2	16.567 9	31.216 0	24.528 9	76.663 5	97.810 4	18.256 7	64.112 2	90.742 5
A05	10.442 1	30.996 0	—	25.004 6	8.203 6	99.752 9	130.483 9	18.939 1	83.623 1	119.225 1
A06	—	—	—	22.999 5	—	112.197 0	158.622 8	21.386 3	93.223 7	134.743 4
A07	—	—	—	18.680 0	—	91.261 4	152.751 1	13.666 5	84.795 8	139.459 1
A08	—	—	—	13.719 5	—	78.894 5	106.727 3	7.562 9	56.319 0	80.976 1
A09	—	—	—	16.638 2	—	77.392 3	103.425 7	9.161 0	58.980 6	82.838 1
A10	—	—	—	16.081 4	—	86.215 6	117.792 5	9.977 5	62.638 3	89.957 6
A11	—	—	—	15.919 8	—	77.035 6	102.503 1	9.529 2	57.321 3	79.318 2
A12	—	—	—	11.413 4	—	62.358 3	81.806 8	6.469 7	45.526 4	61.430 3
B01	28.087 4	109.571 3	18.667 6	87.509 2	30.045 1	0.606 9	4.075 2	2.937 1	—	—
B02	23.362 4	91.487 7	15.727 7	79.469 3	27.479 4	1.780 1	5.849 4	3.240 1	—	—
B03	29.534 4	118.707 7	20.153 3	107.622 9	39.116 4	7.115 7	14.239 8	5.955 0	3.217 4	4.616 9
B04	23.266 4	92.195 6	15.671 4	91.992 6	42.067 4	13.285 5	21.661 9	7.367 6	5.768 5	8.882 4
B05	20.186 0	79.497 9	13.647 2	85.295 2	36.212 1	15.758 4	26.010 6	8.439 2	6.977 5	10.988 8
B06	20.739 9	82.834 5	14.476 3	91.256 2	35.916 6	20.992 1	34.352 5	10.067 8	9.729 9	15.210 5
B07	19.884 6	81.641 5	14.336 5	101.999 0	48.658 9	29.695 1	47.216 8	15.210 5	13.235 0	21.375 4
B08	17.046 5	68.257 0	12.471 8	94.840 1	36.047 4	31.985 5	52.754 2	28.722 3	15.638 3	25.825 9
B09	10.839 0	42.101 1	8.011 2	69.854 1	27.888 9	29.751 1	49.601 6	28.651 6	15.681 7	25.474 4

“—” 未检测到。

“—” not detected.

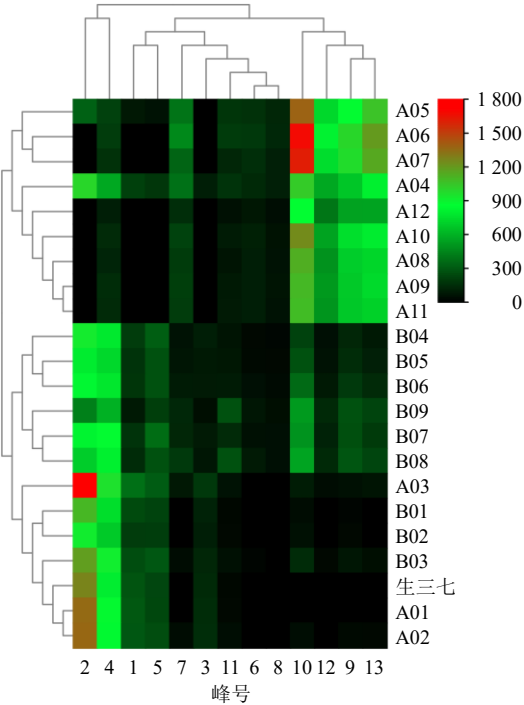


图 2 蒸制和烤制三七的热图和 HCA

Fig. 2 Heatmap and HCA of steamed and baked NRR

行 OPLS-DA (图 4-B), 发现生三七、A01~A03 归为同一类, A04~A07 归为同一类, A08~A12 归为同一类, 与不同方法炮制三七的 OPLS-DA 结果一致, 进一步说明三七经过烤制, 皂苷类成分的转化率最大。以变量重要性投影值 (projection value of variable importance, VIP) > 1 为标准筛选差异性成分, 共筛选出 6 个差异成分, 它们是造成生三七和蒸制、烤制三七样品差异的主要成分 (图 5)。影响显著性排序为峰 12 (R_{k1}) > 峰 13 (R_{g5}) > 峰 9 (R_{k3}) > 峰 10 (R_{h4}) > 峰 4 (R_{b1}) > 峰 5 (R_d), 比较发现, 峰 12、13、9、10 (R_{k1}、R_{g5}、R_{k3}、R_{h4}) 为炮制后新产生的成分; 生品中含有的峰 4、5 (R_{b1}、R_d), 炮制后含量降低。

2.8 烤制三七和生三七的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性鉴定

取烤制三七 (A06) 和生三七供试品溶液, 使用 UPLC-Q-TOF-MS/MS, 按 “2.2” 项下色谱条件对三七中皂苷类成分进行定性分析, 研究发现, 三七皂苷类成分在负离子模式下具有较好的响应以及峰形

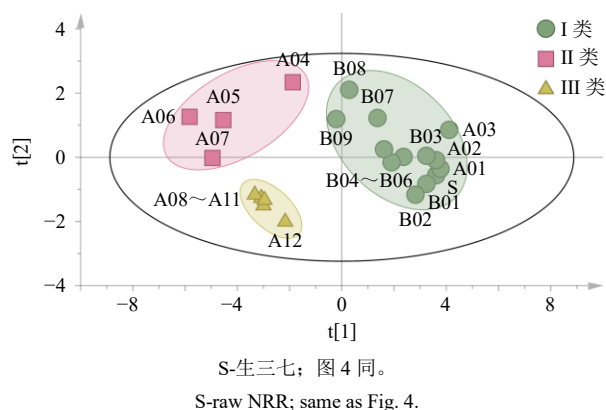


图 3 烤制、蒸制三七的 PCA

Fig. 3 PCA analyses of baked and steamed NRR

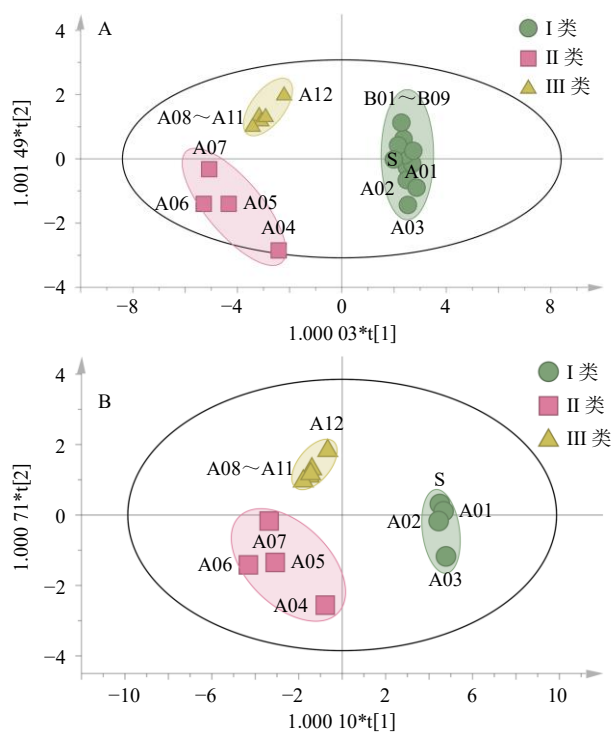


图 4 烤制、蒸制三七 (A) 和烤制三七 (B) 的 OPLS-DA
Fig. 4 OPLS-DA analyses of baked and steamed NRR (A),
OPLS-DA analyses of baked NRR (B)

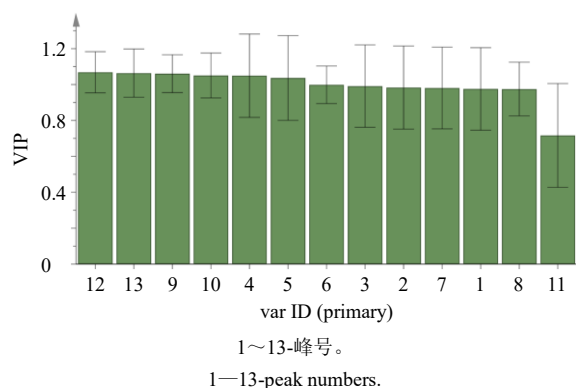


图 5 烤制、蒸制三七的 VIP 值

Fig. 5 VIP value of baked and steamed NRR

(图 6), 因此, 选择该模式进行检测, 在烤制三七 (A06) 提取物中预测了 30 个成分 (表 2)。经生三七和烤制三七 (A06) 与对照品对比 (表 2), 共鉴定出 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 、 R_{k3} 、 R_{h4} 、 R_{g3} 、 R_{k1} 、 R_{g5} 10 个成分。

13、15 号峰 $[M+Cl]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 相同, 分别为 m/z 787.442 0、797.470 9, 计算值分别为 m/z 787.440 5、797.469 3, 预测其分子式为 $C_{41}H_{68}O_{12}$, 是同分异构体, 在二级质谱中, m/z 751.462 8、601.410 7 分别为 $[M-H]^-$ 、 $[M-H-Xyl]^-$ 苷元, 对比已报道的三七药材中所含皂苷的种类及色谱保留行为, 推断 13 号峰为三七皂苷 T_5 , 15 号峰为 $3\beta, 12\beta$ -dihydroxydammarane-(E)-20(22), 24-diene-6- O - β - D -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β - D -glucopyranoside^[16-17]。16 号峰 $[M-H]^-$ m/z 765.479 0、 $[M+Cl]^-$ m/z 801.457 9、 $[M+HCOO]^-$ m/z 811.485 4, 计算值分别为 m/z 765.479 5、801.456 1、811.484 9, 预测其分子式为 $C_{42}H_{70}O_{12}$, 在二级质谱中, m/z 621.701 5、460.263 3 分别为 $[M-H-Rha]^-$ 、 $[M-H-Rha-Glu]^-$ 苷元, 对比已报道的三七药材中所含皂苷的种类及色谱保留行为, 推断 16 号峰为人参皂苷 F_4 ^[18-20], 其余化合物指认见图 6 及表 2。

以 R_e 为例, 负离子模式下, 在一级质谱中 (图 7-A), 测得 $[M-H]^-$ m/z 945.542 5, $[M+Cl]^-$ m/z 981.520 7, $[M+HCOO]^-$ m/z 991.549 1, 预测其分子式为 $C_{48}H_{82}O_{18}$, 不饱和度为 8。三七中三萜皂苷的苷元含有 5 个不饱和度, 说明该化合物还含有 3 个糖, 共组成 8 个不饱和度。在二级质谱中 (图 7-B), m/z 945.542 3、799.483 3、637.430 8、475.379 4 分别为 $[M-H]^-$ 、 $[M-H-Rha]^-$ 、 $[M-H-Rha-Glc]^-$ 、 $[M-H-Rha-Glc-Glc]^-$ 苷元。检测到其他碎片离子如 m/z 179.055 6、161.044 8、143.034 9、119.034 2 等碎片, m/z 179.055 6、161.044 8、119.034 2 的碎片为 C-20 位丢失 Glc 后产生, m/z 143.034 9 碎片与 Rha 裂解有关。Re 可能的裂解途径见图 7-C。

3 讨论

本实验考察了不同炮制时间、不同炮制方法对三七药材中皂苷类成分含量的影响, 结果发现, 常压蒸制过程中, 随蒸制时间的增加, 主要成分 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 等含量不断减少, R_{k3} 、 R_{h4} 、 R_{g3} 、 R_{g5} 等成分不断增加但转化率低; 而烤制过程中, R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 等成分不断向其他化合物转化, 且转化速度快, 含量高。常压蒸制在 0~18 h 时, 随

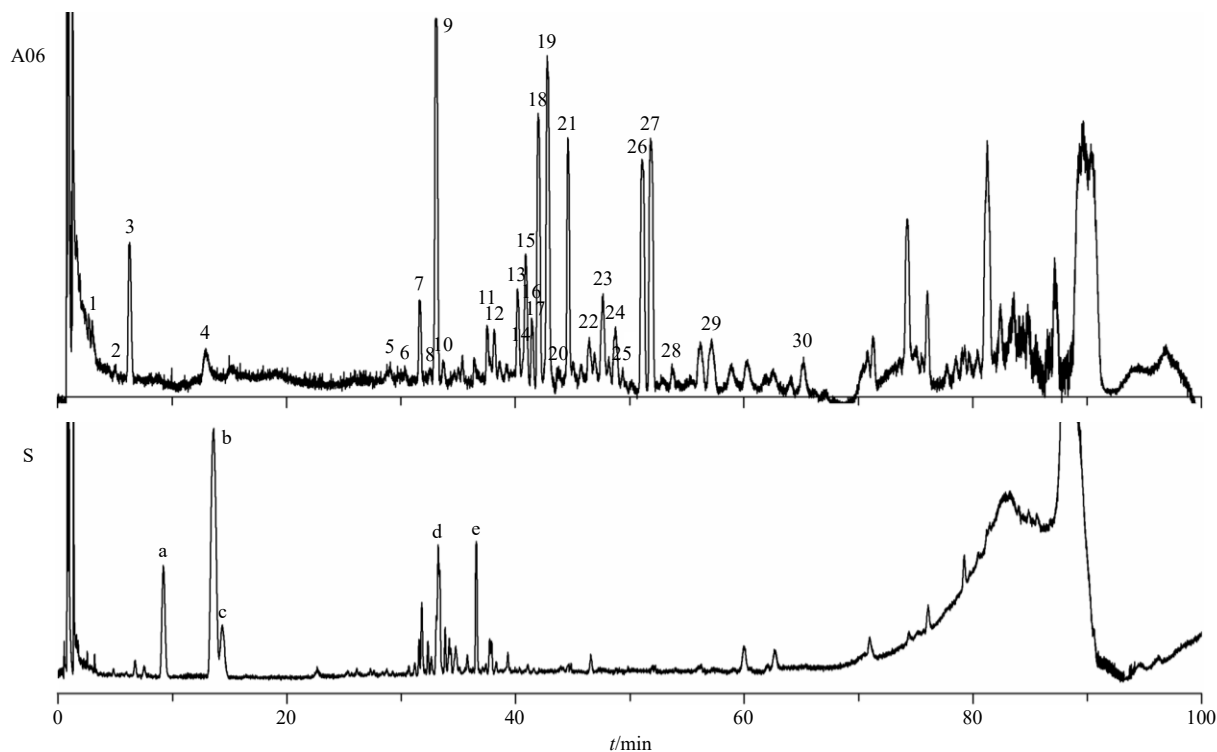


图 6 烤制三七 (A06) 和生三七 (S) 负离子模式下的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 基峰图

Fig. 6 Typical UPLC-Q-TOF-MS/MS base peak diagram of baked NRR (A06) and raw NRR (S) in negative ions modes

表 2 烤制三七和生三七中皂苷类成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

Table 2 Analysis of chemical constituents in baked NRR and raw NRR by UPLC-Q-TOF-MS/MS

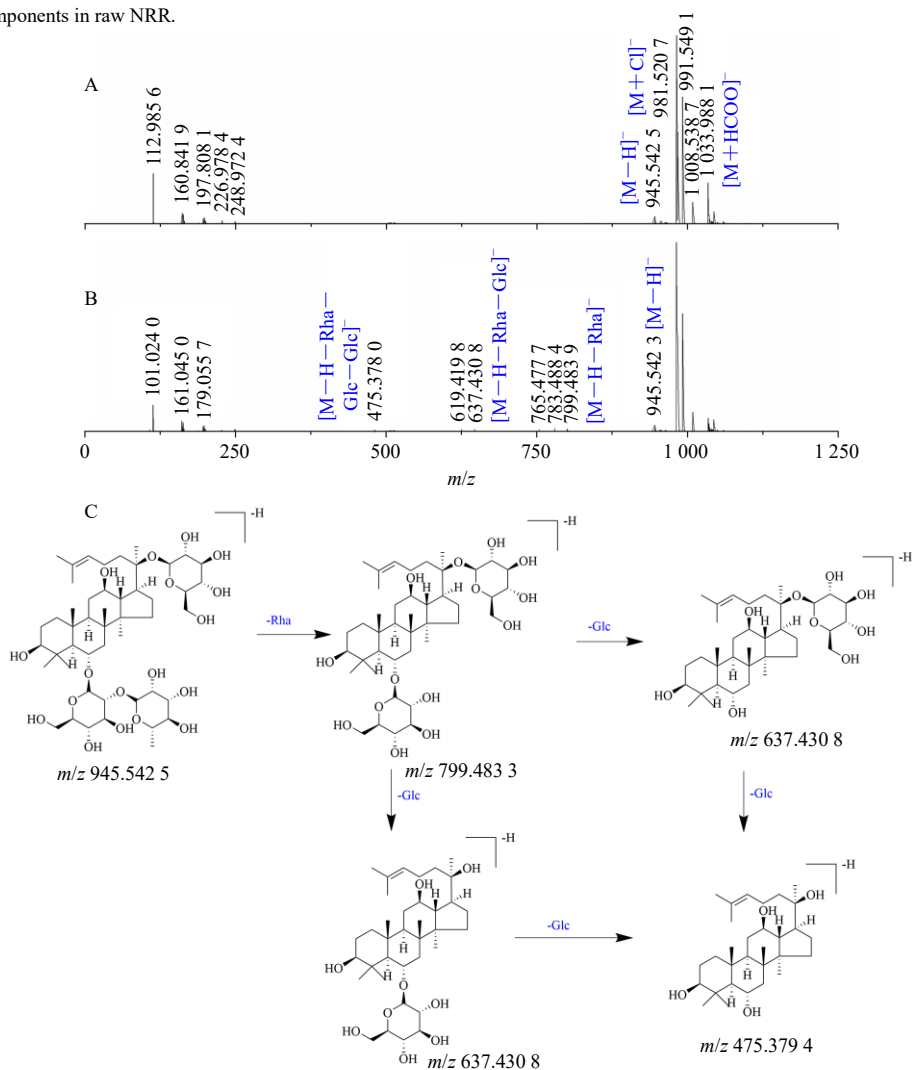
峰号	t_R/min	成分	分子式	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	实测值 (m/z)	相对误差 ($\times 10^{-6}$)	质谱 分辨率
1	2.492	三七皂苷 R_{10}	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_9$	—	599.342 9	—	554.343 7	-1.42	-0.79
2	4.139	三七皂苷 ST_8	$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_9$	—	625.358 2	—	580.361 1	-1.96	-1.14
3	6.203	三七皂苷 ST_2	$\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{O}_{15}$	829.494 8	875.492 9	—	830.502 8	-0.84	-0.70
a	8.869	R_1	$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	931.523 5	—	—	932.534 5	-3.96	-3.69
4	13.026	三七皂苷 SP_3	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{15}$	815.479 4	861.477 2	875.495 6	816.487 1	-0.55	-0.45
b	13.142	Rg_1	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	799.485 1	845.489 6	—	800.492 2	0.21	0.17
c	13.830	Re	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	945.542 5	991.549 1	—	946.550 1	-0.36	-0.34
5	29.101	三七皂苷 ST_6	$\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_9$	—	—	679.405 2	619.384 6	-1.75	-1.09
6	31.481	三七皂苷 Fa	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	1 239.637 0	1 285.641 0	—	1 240.645 0	-0.74	-0.92
7	32.230	三七皂苷 D	$\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{O}_{31}$	1 371.676 0	1 417.654 0	1 431.701 0	1 372.688 0	-2.90	-3.98
8	32.580	20(R)-人参皂苷 Rh_1	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	637.431 1	683.437 9	697.452 8	638.439 4	-1.58	-1.01
9/d	33.212	Rb_1	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	1 107.595 0	1 153.600 0	—	1 108.603 0	-0.69	-0.76
10	33.711	三七皂苷 SP_{10}	$\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{O}_{11}$	683.437 9	729.437 1	743.454 5	684.444 9	0.46	0.31
e	36.521	Rd	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	945.543 7	991.549 5	—	946.550 1	0.91	0.86
11	37.838	绞股蓝皂苷 XVII	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	945.535 8	991.546 4	—	946.544 2	-1.23	-1.17
12	38.188	三七皂苷 SP_{14}	$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$	665.427 3	711.429 0	725.447 6	666.434 3	0.42	0.28
13	40.251	三七皂苷 T_5	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$	751.463 0	797.470 9	811.481 6	752.471 1	-1.06	-0.80
14	40.904	人参皂苷 Rg_6	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$	765.477 5	811.455 7	—	766.486 7	-2.55	-1.95
15	40.989	3 β ,12 β -dihydroxydammarane-(E)-20(22),24-diene-6-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$	751.463 1	797.470 9	811.484 7	752.471 1	-0.93	-0.70
16	41.466	人参皂苷 F_4	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$	765.479 0	811.485 4	—	766.486 7	0.61	0.40
17	42.049	三七皂苷 SP_{18}	$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}$	—	—	709.416 3	649.395 2	-0.85	-0.55

表 2 (续)

峰号	t_R/min	成分	分子式	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	实测值 (m/z)	相对误差 ($\times 10^{-6}$)	质谱 分辨率
18	42.079	Rk ₃	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	—	665.427 7	—	620.428 8	1.09	0.68
19	42.847	Rh ₄	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	619.419 9	665.427 0	—	620.428 8	-2.65	-1.64
20	43.114	20(R)-三七皂苷 Ft ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.526 9	961.536 4	975.550 4	916.539 6	-5.86	-5.37
21	44.645	Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.488 6	829.494 8	—	784.497 3	-1.80	-1.42
22	47.024	三七皂苷 ST ₁₄	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	635.415 7	—	695.418 3	636.423 7	-1.19	-0.76
23	47.773	人参皂苷 Rs ₃	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₄	825.499 1	871.504 8	—	826.507 9	-1.79	-1.48
24	48.239	三七皂苷 Ft ₃	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₆	897.519 8	943.526 0	957.541 2	898.529 0	-2.13	-1.91
25	51.135	三七皂苷 SP ₁₉	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	811.484 6	857.482 4	—	812.492 2	-0.41	-0.33
26	51.151	Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.479 0	811.485 1	—	766.486 7	-0.59	-0.45
27	51.900	Rg ₅	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.478 2	811.484 8	—	766.486 7	-1.63	-1.25
28	53.787	20(R)-人参皂苷 Rh ₂	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	—	667.441 8	—	668.449 9	-1.30	-0.87
29	57.276	人参皂苷 Rs ₄	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₃	807.488 9	853.494 8	867.508 9	808.497 3	-1.38	-1.12
30	64.132	人参皂苷 Rh ₃	C ₃₆ H ₆₀ O ₇	—	649.431 6	—	604.433 9	-0.84	-0.51

a~e-生三七中的 5 种主成分。

a~e-five main components in raw NRR.



黑色数字代表碎片离子，蓝色字体代表碎片离子的产生形式。

The black numbers represent fragment ions and the blue font represents the form in which the fragment ions are produced.

图 7 负离子模式下 Re 的一级 (A) 和二级 (B) 质谱图及其可能的裂解途径 (C)

Fig. 7 MS (A), MS/MS (B) spectra and possible mass spectrometry fragmentation pathway of Re in negative ion mode (C)

着蒸制时间的延长,三七中的主要成分含量变化不明显;而使用烤制法炮制 6 h 时,可明显观察到生三七中的主要成分(R₁、R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d)基本消失,新生成的皂苷类成分(R_{k3}、R_{h4}、R_{g3}、R_{k1}、R_{g5})峰面积大、峰值高,揭示烤制 6 h 可作为三七的最佳炮制方法和时间。

基于建立的 HPLC 指纹图谱,以三七中化学成分为依据,通过化学模式识别能够明显区分生三七与炮制三七。热图分析和 HCA 能明显区分生三七、烤制 1 h 以下及常压蒸制的三七和烤制 2 h 及以上的三七。通过 PCA、OPLS-DA 将不同炮制时间的三七明显区分,并根据 VIP 值>1 筛选出 6 个差异性成分,显著性排列顺序为峰 12(R_{k1})>峰 13(R_{g5})>峰 9(R_{k3})>峰 10(R_{h4})>峰 4(R_{b1})>峰 5(R_d)。含量测定结果显示,6 种成分在不同炮制时间存在显著差异,揭示 R_{k1}、R_{g5}、R_{k3}、R_{h4}、R_{b1}、R_d 可作为炮制三七质量差异的特征性指标成分。通过裂解途径发现,糖苷键受热发生裂解,脱除部分糖基,最终转化成含糖基较少的单糖基皂苷,会导致炮制后的熟三七皂苷类成分极性降低。

综上所述,通过 HPLC 指纹图谱的建立,对三七炮制前后的化学成分进行定性定量分析可概括为“生五熟五”质量标志物转化规律,即生三七含有 R₁、R_{g1}、R_e、R_{b1}、R_d;熟三七含有 R_{k3}、R_{h4}、R_{g3}、R_{k1}、R_{g5}。本研究阐述了三七的炮制机制,为熟三七质量标准的制定及炮制前后药效变化提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 12.
- [2] 刘人凤, 岳璇, 周平, 等. 基于三七用药沿革对其炮制品熟三七研究进展的思考 [J]. 成都中医药大学学报, 2023, 46(1): 67-74.
- [3] Dong T T, Cui X M, Song Z H, et al. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and seasonal variations in its active constituents [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(16): 4617-4623.
- [4] 刘永姝, 李新, 韩梁, 等. “伤科要药”三七在骨伤与创伤中的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1738-1750.
- [5] 杨连梅. 三七“生打熟补”的临床使用及炮制机制进展探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(11): 111-112.
- [6] Zhang Z J, Chen L J, Cui X M, et al. Identification of anti-inflammatory components of raw and steamed *Panax notoginseng* root by analyses of spectrum-effect relationship [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(31): 17950-17958.
- [7] Xiong Y, Halima M, Che X Y, et al. Steamed *Panax notoginseng* and its saponins inhibit the migration and induce the apoptosis of neutrophils in a zebrafish tail-fin amputation model [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 946900.
- [8] 清·赵学敏著. 闫冰等校注. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 65-67.
- [9] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [10] Zhao W J, Han L L, Li T, et al. Effects of steaming process on rare saponins and efficacy of *Panax ginseng*, *Panax notoginseng* and *Panax quinquefolium* [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 521-528.
- [11] 刘梦楠, 杨晓燕, 屈文佳, 等. 基于偏最小二乘判别分析建立熟三七粉的质量评价方法 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5319-5327.
- [12] Wei B, Duan Z G, Zhu C H, et al. Anti-anemia effects of ginsenoside R_{k3} and ginsenoside R_{h4} on mice with ribavirin-induced anemia [J]. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2447-2455.
- [13] Li Z M, Zhao L J, Chen J B, et al. Ginsenoside R_{k1} alleviates LPS-induced depression-like behavior in mice by promoting BDNF and suppressing the neuroinflammatory response [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 530(4): 658-664.
- [14] 姚磊, 屈琳琳, 范代娣. 稀有人参皂苷对特发性肺纤维化的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5): 607-613.
- [15] Xiong Y, Hu Y P, Chen L J, et al. Unveiling active constituents and potential targets related to the hematinic effect of steamed *Panax notoginseng* using network pharmacology coupled with multivariate data analyses [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1514.
- [16] Chen G T, Yang M, Lu Z Q, et al. Microbial transformation of 20(S)-protopanaxatriol-type saponins by *Absidia coerulea* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(7): 1203-1206.
- [17] Hao F R, Pang X, Xu K K, et al. Anaphylactic rare saponins separated from *Panax notoginseng* saponin and a proteomic approach to their anaphylactic mechanism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7565177.
- [18] Wan J Y, Wang C Z, Liu Z, et al. Determination of American ginseng saponins and their metabolites in human plasma, urine and feces samples by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1015/1016: 62-73.
- [19] 侯万超, 李赛男, 郭力菲, 等. 利用液质联用技术分析人参叶中化学成分 [J]. 北方园艺, 2018(4): 145-151.
- [20] 张语迟, 刘箬瑶, 刘春明, 等. 利用液质联用技术分析高温处理对人参皂苷的转化规律 [J]. 长春师范大学学报, 2022, 41(2): 70-74.

[责任编辑 郑礼胜]