

不同生长年限三七花的指纹图谱建立及其人参皂苷的含量比较研究[△]

黄再强^{1,2,3*},朱琳¹,高明菊^{1,2,3#},冯光泉¹,马小双¹,常征¹(1.文山学院三七学院,云南文山 663099;2.文山生物资源开发研究中心,云南文山 663099;3.云南省三七资源可持续利用重点实验室,昆明 650500)

中图分类号 R932;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0969-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.13

摘要 目的:比较不同生长年限三七花的化学成分类别及人参皂苷含量的差异,探讨生长年限对三七花品质的影响。方法:收集2年生、3年生、4年生三七花样品各10批,采用高效液相色谱法(HPLC)进行测定。色谱柱为Shim-pack GIST C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为0.5 mL/min,检测波长为203 nm,进样量为20 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》绘制30批样品的指纹图谱并指认特征成分,同时进行相似度分析;采用SPSS 22.0软件对样品进行聚类分析。采用上述HPLC法对不同生长年限三七花共30批样品中的人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc进行含量测定;采用SPSS 22.0软件进行质量控制分析。结果:所建指纹图谱的精密度、稳定性、重现性均良好;含量测定方法线性关系($R^2 > 0.999$)、定量限、精密度、稳定性、重复性、准确性均良好。通过指纹图谱指认了不同生长年限三七花中人参皂苷Re、R₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃等6个共有成分以及3年生三七花样品中的人参皂苷Rd;2年生、3年生、4年生三七花各10批样品指纹谱图在同一年限样品间比较的平均相似度分别为0.881、0.952、0.945,不同生长年限样品之间进行比较的相似度也均不低于0.817。30批三七花样品可聚为4个类别,第Ⅱ类均为4年生样品,第Ⅲ类均为3年生样品,第Ⅰ、Ⅳ类多为2年生样品以及少量3年生、4年生样品。2年生样品中4种人参皂苷成分含量及总含量的RSD为8.90%~21.43%,总皂苷含量为11.65%~17.76%;3年生样品中上述成分含量及总含量的RSD为6.45%~14.23%,总皂苷含量为15.74%~19.30%;4年生样品中上述成分含量及总含量的RSD为7.50%~18.86%,总皂苷含量为15.92%~20.16%。质量控制分析结果显示,2年生样品主要分布在Ⅱ、Ⅲ类区域,3年生、4年生样品主要分布在Ⅰ、Ⅱ类区域,人参皂苷成分的含量大小排序为Ⅰ>Ⅱ>Ⅲ。结论:不同生长年限三七花的化学成分类别大体接近,但仍存在一定差异,其中2年生样品中人参皂苷类成分含量较低、波动较大,整体品质略差;3年生、4年生样品中人参皂苷类成分含量更高、波动相对更小,整体品质较高且趋于稳定。

关键词 三七花;生长年限;高效液相色谱法;指纹图谱;人参皂苷;含量测定

Establishment of Fingerprints and Comparative Study on Ginsenoside Content of *Panax notoginseng* Flower with Different Growing Years

HUANG Zaiqiang^{1,2,3}, ZHU Lin¹, GAO Mingju^{1,2,3}, FENG Guangquan¹, MA Xiaoshuang¹, CHANG Zheng¹ (1. School of Sanqi, Wenshan College, Yunnan Wenshan 663099, China; 2. Wenshan Biological Resource Development and Research Center, Yunnan Wenshan 663099, China; 3. Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization of *Panax notoginseng* Source, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare chemical composition types and ginsenoside content of *Panax notoginseng* flowers with different growing years, and to explore the effect of growing year on the quality of *P. notoginseng* flowers. METHODS: Each 10 batches of biennial, triennial and quadrennial *P. notoginseng* flower were collected and determined by HPLC. The determination was performed on Shim-pack GIST C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set at 30℃, and the detection wavelength was set at 203 nm. The sample size was 20 μL. Similarity Evaluation System of TCM Chromatogram Fingerprint was used to establish the fingerprint of 30 batches of samples, identify the diagnostic components and analyze the similarity. Cluster analysis was conducted by using SPSS 22.0 software. The contents of ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rb₃ and Rc in 30 batches of *P. notoginseng* flower with different growing years were determined by above HPLC. The quality control analysis was conducted by using SPSS 22.0 software. RESULTS: Established fingerprint showed good precision, stability and reproducibility. There were good linear relationship ($R^2 > 0.999$), quantitative limit, precision, stability, repeatability and accuracy of the content determination method. Six common components as ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rb₃ and Rc were identified in *P. notoginseng* flower with different growing years by fingerprint; ginsenoside Rd was identified in triennial *P. notoginseng* flower. The similarities of the fingerprints among 10 batches of biennial, triennial and quadrennial *P.*

△基金项目:云南省地方高校联合专项(No.KX182504Y)

*助教,硕士。研究方向:中药资源开发。电话:0876-2684947。

E-mail: wshuangzaiqiang@163.com

#通信作者:研究员,硕士。研究方向:中药资源开发。电话:

0876-8883731。E-mail: gaomingju@163.com

notoginseng flower were 0.881, 0.952 and 0.945, respectively. The similarity among samples with different growing years was more than 0.817. Thirty batches of *P. notoginseng* flower could be grouped into 4 categories, the category II was quadrennial samples, the category III was triennial samples, while the categories I and IV were mostly biennial samples and a small number of triennial and quadrennial samples. RSDs of 4 ginsenosides contents and their total contents in biennial samples were 8.90% -21.43% and total saponin contents were 11.65% -17.76%, respectively. RSDs of 4 ginsenosides contents and their total contents in triennial samples were 6.45% -14.23%, and total saponin contents were 15.74% -19.30%. RSDs of 4 ginsenosides contents and their total contents in quadrennial samples were 7.50% -18.86%, and total saponin contents were 15.92% -20.16%. The results of quality control analysis showed that biennial samples mainly distributed in the areas of II and III; triennial and quadrennial samples mainly distributed in the areas of I and II; the order of ginsenosides content was I > II > III. CONCLUSIONS: Chemical components of *P. notoginseng* flower with different growing years are generally close in types but there still are some differences, among which the content of ginsenosides in biennial samples is lower, fluctuates more, and the overall quality is slightly poor; the content of ginsenosides in triennial and quadrennial samples is higher, fluctuates less, and the overall quality is higher and tends to be stable.

KEYWORDS *Panax notoginseng* flowers; Growing year; HPLC; Fingerprint; Ginsenosides; Content determination

三七花是传统名贵中药五加科植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥花蕾, 其性味甘凉, 具有清热、平肝、降压之功效, 有较好的药用价值和保健作用^[1]。三七在第1年生长期一般不开花(偶有出现“梦花”), 第2年起正常开花, 目前市场上以2年生、3年生、4年生三七花为主。有关三七花化学成分的研究报道较多, 主要集中在人参皂苷 Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd 等成分的含量测定^[2-3], 也可见三七花与其他五加科人参属花的鉴别研究^[4-6]。但关于不同年限三七花中化学成分及其质量差异的研究报道较少。有学者研究发现, 2年生、3年生三七花在成分类别及其含量上存在较大差异^[7], 但研究报道中三七花样本量偏小。为了全面系统地研究不同生长年限三七花在化学成分类别及人参皂苷含量上的差异, 本课题组收集了2年生、3年生、4年生三七花共计30个批次的样品, 通过高效液相色谱法(HPLC)建立其指纹图谱并进行多个指标成分(人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc)的含量测定, 以期综合比较生长年限对三七花品质的影响。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030型HPLC仪(日本Shimadzu公司); BP121S型万分之一电子分析天平、BP211D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司); SQP型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; SB-3200DTD型超声仪(宁波新艺超声设备有限公司); DFY-500D型粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 药品与试剂

2年生、3年生、4年生三七花样品各10批(均为2018年6—10月采收的三七花)和加样回收率试验用样品1批(批号: WS-1, 于2018年2月采收的三七花), 均购自文山市三七国际交易中心, 产地主要为文山当地及周边地区。样品经云南农业大学农学与生物技术学院文国松副研究员、文山学院三七学院黄再强助教鉴定为五加科人参属三七 [*P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥

花蕾, 并在参考采样记录的基础上, 通过花蕾的大小、颜色等性状确定了其生长年限。2018年6—10月采收的30批三七花样品信息详见表1。

表1 30批三七花样品信息

Tab 1 Sample information of 30 batches of *P. notoginseng* flowers

样品编号	生长年限	采收地	样品编号	生长年限	采收地	样品编号	生长年限	采收地
S2-1	2年生	砚山大寨	S3-1	3年生	麻栗坡猛洞	S4-1	4年生	砚山干河
S2-2	2年生	砚山干河	S3-2	3年生	砚山阿猛	S4-2	4年生	砚山盘龙
S2-3	2年生	麻栗坡大坪	S3-3	3年生	砚山五株	S4-3	4年生	红河金平
S2-4	2年生	砚山盘龙	S3-4	3年生	砚山盘龙	S4-4	4年生	丘北平寨
S2-5	2年生	丘北平寨	S3-5	3年生	红河新平	S4-5	4年生	丘北新店
S2-6	2年生	丘北田冲	S3-6	3年生	石林圭山	S4-6	4年生	广南珠街
S2-7	2年生	红河金平	S3-7	3年生	广南珠街	S4-7	4年生	广南朱琳
S2-8	2年生	石林圭山	S3-8	3年生	砚山阿基	S4-8	4年生	砚山干河
S2-9	2年生	广南朱琳	S3-9	3年生	广南南屏	S4-9	4年生	石林圭山
S2-10	2年生	广南莲城	S3-10	3年生	丘北新店	S4-10	4年生	红河新平

人参皂苷 Re (批号: MUST-18032502, 纯度: ≥ 98.00%)、人参皂苷 R₁ (批号: MUST-14042810, 纯度: ≥ 99.52%)、人参皂苷 Rd (批号: MUST-18032202, 纯度: ≥ 98.00%)、人参皂苷 Rb₂ (批号: MUST-18032302, 纯度: ≥ 99.32%)、人参皂苷 Rb₃ (批号: MUST-17042812, 纯度: ≥ 99.65%)、人参皂苷 Rc (批号: MUST-18042803, 纯度: ≥ 98.00%) 等对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 人参皂苷 Rb₁ 对照品(北京世纪奥科生物科技有限公司, 批号: C54H92023, 纯度: ≥ 98.00%); 乙腈、磷酸均为色谱纯, 乙醇为分析纯, 水为超纯水。

2 不同年限三七花 HPLC 指纹图谱研究

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取人参皂苷 Re、R₁、Rd、Rc、Rb₁、Rb₂、Rb₃ 对照品各适量, 加 50% 乙醇溶解制成每 1 mL 分别含上述成分 0.51、0.45、0.41、0.87、0.81、0.75、0.84 mg 的单一对照品溶液, 4 °C 低温保存, 备用。

2.1.2 供试品溶液 将三七花样品粉碎成粗粉, 取样品粉末 1 g, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入 50% 乙醇 100 mL, 称定质量, 超声(频率: 40 kHz, 功率: 200 W) 提取 40

min,冷却至室温后,再次称定质量,加50%乙醇补足缺失质量,以16层锥形滤纸(底部塞有脱脂棉)滤过,取续滤液,即得供试品溶液,于4℃保存,备用。

2.2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack GIST C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 min,3% A;8 min,10% A;20 min,25% A;30 min,36% A;60 min,36% A);柱温:30℃;流速:0.5 mL/min;检测波长:203 nm;进样量:20 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.1.1”项下人参皂苷Rb₃单一对照品溶液(该成分在三七花中含量相对较高,故用来进行方法学考察,下同)适量,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果,各色谱峰峰面积的RSD≤0.35%、保留时间的RSD≤0.38%(n=6),表明仪器精密度良好。

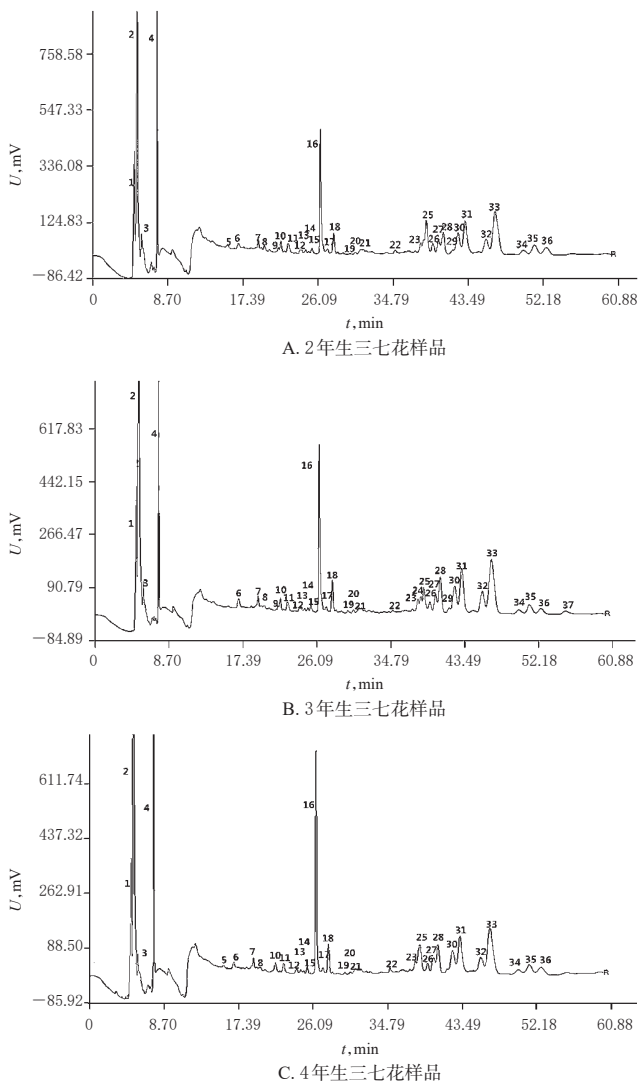
2.3.2 稳定性试验 取供试品溶液(批号:S3-1)适量,分别于室温下放置0、8、16、24 h时,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在26~45 min保留时间内(这一时间段色谱图上特征峰出峰较多,下同),各色谱峰峰面积的RSD≤0.35%、保留时间的RSD≤0.30%(n=4);同时,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版A)》进行相似度分析,结果不同时间点各色谱图的相似度≥0.97,表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取三七花样品粉末(批号:S3-1)1 g,平行6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在26~45 min保留时间内,各色谱峰峰面积的RSD≤0.30%、保留时间的RSD≤0.22%(n=6);同时,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版A)》进行相似度分析,结果不同样品各色谱图的相似度≥0.98,表明本方法重复性良好。

2.4 不同年限三七花 HPLC 指纹图谱生成与相似度分析

取不同生长年限的30批三七花样品粉末各1 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将不同批次三七花样品的色谱图AIA格式文件导出,依次全谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版A)》中,生成指纹图谱的共有模式(R),即对照指纹图谱(见图1),再经软件处理后建立不同生长年限三七花各10批样品的叠加指纹图谱(见图2),同时进行相似度分析。

相似度分析结果显示,2年生、3年生、4年生三七花样品的指纹谱图在同年限10批间进行比较的相似度分别≥0.823、≥0.847、≥0.830,平均相似度分别为0.881、0.952、0.945。这表明,同一生长年限的三七花样品之间的化学成分类别较为一致,相对较稳定。不同生长年限样品之间进行比较的结果显示,2年生与3年生样品之



注:19.人参皂苷Re;21.人参皂苷R₁;28.人参皂苷Rb₁;31.人参皂苷Rc;32.人参皂苷Rb₂;33.人参皂苷Rb₃;37.人参皂苷Rd

Note: 19. ginsenoside Re; 21. ginsenoside R₁; 28. ginsenoside Rb₁; 31. ginsenoside Rc; 32. ginsenoside Rb₂; 33. ginsenoside Rb₃; 37. ginsenoside Rd

图1 不同生长年限三七花样品的HPLC对照指纹图谱
Fig 1 HPLC control fingerprints of *P. notoginseng* flowers with different growing years

间相似度≥0.825,2年生与4年生样品之间相似度≥0.817,3年生与4年生样品之间相似度≥0.865。这表明,不同生长年限三七花样品中化学成分类别大体接近,但仍存在一定差异。

2.5 不同生长年限三七花样品HPLC指纹图谱特征峰的指认

根据采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版A)》对不同生长年限三七花各10批样品的色谱图处理分析后生成的各生长年限三七花样品的对照指纹图谱(见图1),确认了各生长年限三七花样品的36个共有色谱峰,并通过比各单一对照品溶液的主峰保留时间,指认了不同生长年限三七花中共有的人参皂苷Re、R₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃等6个共有成分以及3年生三七花

样品中的人参皂苷Rd。

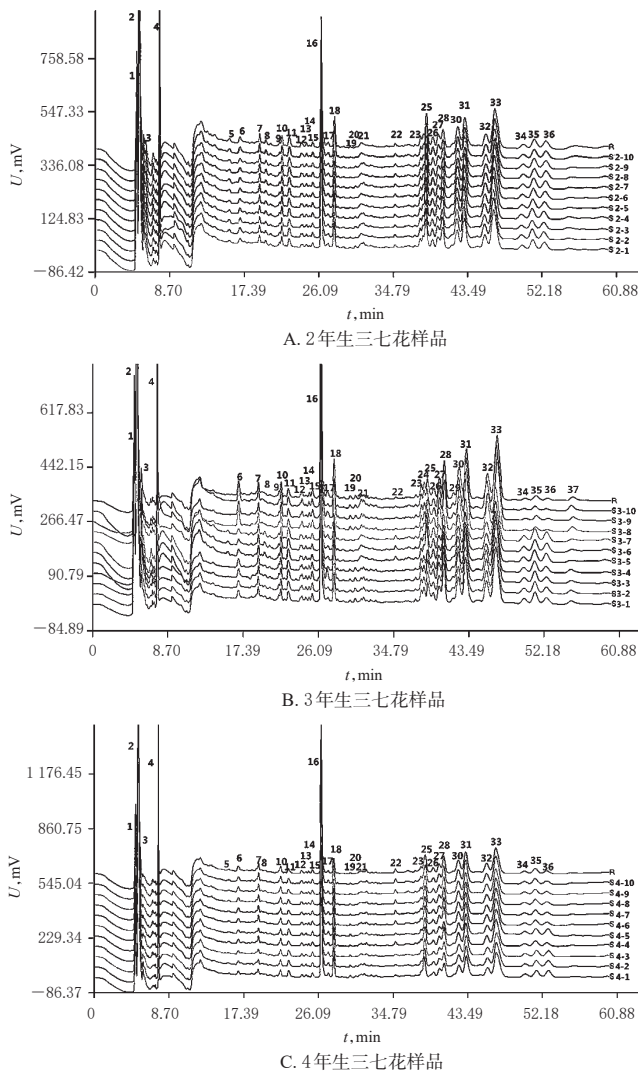


图2 不同生长年限三七花样品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 2 HPLC superimposed fingerprints of *P. notoginseng* flowers with different growing years

由图1可见,2年生三七花样品中大部分色谱峰面积都较3年生、4年生三七花样品小;2年生、4年生三七花色谱图中都很有小的5号峰,而在3年生三七花中未见该色峰;与3年生三七花比较,4年生三七花色谱图中6、7、18、32、37号峰有变小的趋势。各年限三七花的成分种类较为一致,而各成分峰面积大小存在明显差异,3年生、4年生三七花样品的对照指纹图谱中色谱峰数目较多、峰面积较大,而2年生三七花样品对照指纹图谱中色谱峰数目略少、峰面积较小。根据对照指纹图谱可以初步认为,3年生、4年生三七花样品中各成分含量相对较高,2年生样品各成分含量略低。

2.6 不同生长年限三七花样品指纹图谱的聚类分析

采用SPSS 22.0软件对不同生长年限三七花样品的原始指纹图谱进行聚类分析,以平方欧式距离作为样品的测度,以Ward连接法进行聚类,结果见图3。聚类分析结果显示,30批三七花样品可聚为4个类别,其中第

II类均为4年生三七花样品,第III类均为3年生三七花样品,而第I、IV类多为2年生三七花样品以及少量3年生、4年生三七花样品。

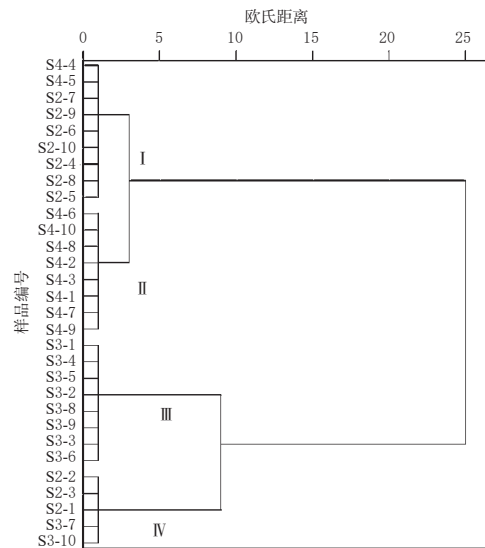


图3 30批三七花样品的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram of 30 batches of *P. notoginseng* flowers

3 不同生长年限三七花样品中4种人参皂苷的含量测定

基于30批三七花样品的指纹图谱研究结果及已有相关对照品,本研究选择色谱峰面积相对较大、含量相对较高的人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc等4种成分进行含量测定,比较不同生长年限三七花样品中上述成分的含量差异。

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液 精密称取人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc对照品各适量,加50%乙醇溶解制成每1 mL分别含上述成分0.551、0.475、0.510、0.530 mg的单一对照品溶液,4℃低温保存,备用。

3.1.2 供试品溶液 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,于4℃保存,备用。

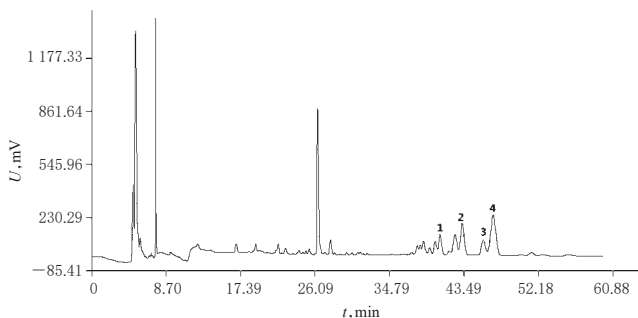
3.2 色谱条件及系统适用性试验

采用“2.2”项下色谱条件进样测定。取“3.1.2”项下供试品溶液(批号:S3-1)进样测定,记录色谱图(见图4),并与“3.1.1”项下单一对照品溶液和空白溶剂色谱图(图略)进行对比。结果,理论板数以人参皂苷Rb₃计不低于6 000,4种待测人参皂苷的色谱峰分离度均大于1.5,空白溶剂无干扰,表明本色谱条件系统适用性良好。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系与定量限考察 取“3.1.1”项下人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc各单一对照品溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按“3.2”项下色谱条件分别进样4、8、12、16、20、24、28 μL,以峰面积(y)为纵坐标、进样量(x, μg)为横坐标进行线性回归。结果,上述4种人参皂苷在相应

进样量范围内与峰面积线性关系良好($R^2 > 0.999$)。各待测成分的回归方程及线性范围见表2。



注: 1. 人参皂苷 Rb₁; 2. 人参皂苷 Rc; 3. 人参皂苷 Rb₂; 4. 人参皂苷 Rb₃

Note: 1. Rb₁; 2. Rc; 3. Rb₂; 4. Rb₃

图4 三七花样品含量测定系统适用性试验色谱图

Fig 4 Chromatogram of content determination system suitability trial for *P. notoginseng* flowers

表2 回归方程及线性范围

Tab 2 Regression equation and Linear range

待测成分	回归方程	R^2	线性范围, μg
人参皂苷 Rb ₁	$y = 423.857x + 362.858$	0.9997	2.204~15.428
人参皂苷 Rb ₂	$y = 309.361x + 83.047$	0.9998	1.900~13.300
人参皂苷 Rb ₃	$y = 603.505x + 302.084$	0.9999	2.040~14.280
人参皂苷 Rc	$y = 636.110x + 396.218$	0.9996	2.120~14.840

取上述单一对照品溶液,用50%乙醇逐级稀释后,同法进样20 μL ,以信噪比10:1计算定量限。结果,人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 的定量限分别为0.15、0.07、0.08、0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.3.2 精密度试验 取“3.1.1”项下人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 各单一对照品溶液,按“3.2”项下色谱条件分别进样测定5次,记录色谱图。结果,上述待测成分峰面积的RSD分别为0.22%、0.23%、0.18%、0.24% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

3.3.3 稳定性试验 取三七花供试品溶液(批号:S3-1)适量,经0.45 μm 微孔滤膜滤过后,分别在室温下放置0、8、16、24 h时,按“3.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 峰面积的RSD分别为0.21%、0.25%、0.15%、0.26% ($n=4$),表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定性良好。

3.3.4 重复性试验 取三七花样品粉末(批号:S3-1)1 g,平行6份,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,经0.45 μm 微孔滤膜滤过后,按“3.2”项下色谱条件进样测定。采用标准曲线法计算人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 的含量。结果,上述待测成分的平均含量分别为3.56%、5.01%、7.64%、4.33%,RSD分别为0.22%、0.23%、0.16%、0.24% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

3.3.5 加样回收率试验 取已知含量的三七花样品粉末(批号:WS-1,人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 的含量经测定分别为1.77%、2.50%、3.81%、2.15%)0.1 g,平行6份,分别按质量比为1:1加入人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc

各对照品,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,经0.45 μm 微孔滤膜滤过后,再按“3.1”项下色谱条件进样测定。采用标准曲线法计算上述待测成分的含量并计算加样回收率。结果,上述待测成分的平均加样回收率分别为98.85%、98.87%、99.83%、100.74% (RSD均小于4%, $n=6$),表明该方法准确性良好,详见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	已知样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
人参皂苷 Rb ₁	1.78	1.55	3.30	98.06	98.85	3.86			
	1.77	1.54	3.25	96.10					
	1.79	1.55	3.31	98.06					
	1.76	1.56	3.28	97.44					
	1.75	1.54	3.39	106.49					
	1.79	1.64	3.38	96.95					
	人参皂苷 Rb ₂	2.51	2.52	4.93			96.03	98.87	2.92
		2.50	2.51	5.11			103.98		
		2.52	2.50	4.95			97.20		
2.49		2.49	4.99	100.40					
2.48		2.49	4.91	97.59					
2.52		2.51	4.98	98.01					
人参皂苷 Rb ₃		3.82	3.65	7.41	98.36	99.83	1.85		
		3.79	3.66	7.49	101.09				
		3.84	3.71	7.52	99.19				
	3.80	2.67	6.55	103.00					
	3.79	2.65	6.40	98.49					
	3.84	2.57	6.38	98.83					
	人参皂苷 Rc	2.16	2.15	4.35	101.86			100.74	3.51
		2.14	2.14	4.21	96.73				
		2.17	2.15	4.31	99.53				
2.14		2.11	4.20	97.63					
2.13		2.11	4.29	102.37					
2.17		2.05	4.35	106.34					

3.4 样品含量测定

取30批三七花样品粉末各1 g,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,经0.45 μm 微孔滤膜滤过后,按“3.2”项下色谱条件进样测定,采用标准曲线法计算人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 的含量及其总含量。平行3份操作,取平均值,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 4 Content determination results of samples($n=3$)

样品	项目	人参皂苷含量, %				
		Rb ₁	Rb ₂	Rb ₃	Rc	总含量
2年生三七花(S2-1~S2-10)	最小值	0.99	1.54	5.35	3.57	11.65
	最大值	2.19	2.85	8.16	4.68	17.76
	$\bar{x} \pm s$	1.82 ± 0.39	2.37 ± 0.50	6.98 ± 1.14	4.38 ± 0.39	15.54 ± 2.19
	RSD, %	21.43	21.10	16.33	8.90	14.09
3年生三七花(S3-1~S3-10)	最小值	2.14	2.46	7.09	3.49	15.74
	最大值	3.14	3.19	9.08	4.84	19.30
	$\bar{x} \pm s$	2.60 ± 0.37	2.76 ± 0.27	8.03 ± 0.66	4.28 ± 0.37	17.67 ± 1.14
	RSD, %	14.23	9.78	8.22	8.64	6.45
4年生三七花(S4-1~S4-10)	最小值	2.24	2.51	6.86	4.10	15.92
	最大值	3.31	3.49	9.54	5.17	20.16
	$\bar{x} \pm s$	2.81 ± 0.53	2.79 ± 0.31	7.73 ± 1.06	4.67 ± 0.53	17.72 ± 1.33
	RSD, %	18.86	11.11	13.71	11.35	7.50

由表4可见,2年生三七花样品中4种人参皂苷成分含量及总含量的RSD为8.90%~21.43%,总皂苷含量为11.65%~17.76%;3年生三七花样品中上述成分含量及总含量的RSD为6.45%~14.23%,总皂苷含量为15.74%~19.30%;4年生三七花样品中上述成分含量及总含量的RSD为7.50%~18.86%,总皂苷含量为15.92%~20.16%。结果表明,与2年生三七花比较,3年生、4年生样品中4种人参皂苷(Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc)的总含量更高,含量波动相对更小,提示三七花生长至第3、4年时各成分逐渐趋于稳定。

3.5 不同生长年限三七花样品多指标成分含量的质量控制分析

采用SPSS 22.0统计软件,对不同生长年限三七花共30批样品中人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc的总含量进行质量控制分析,并根据分析结果将30批样品分为3类区域,结果见图5。结果显示,2年生三七花样品主要分布在Ⅱ、Ⅲ类区域,3年生、4年生三七花样品主要分布在Ⅰ、Ⅱ类区域,人参皂苷成分的含量大小排序为Ⅰ>Ⅱ>Ⅲ,表明3年生、4年生三七花的品质相对较高,2年生三七花品质略差。

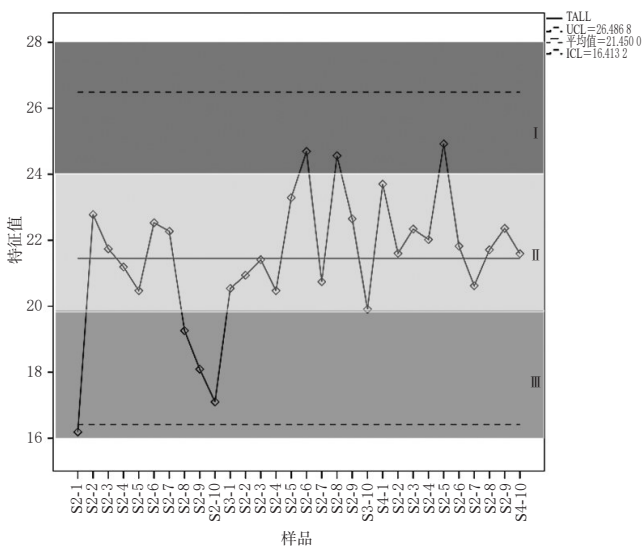


图5 30批三七花样品质量控制图

Fig 5 Quality control diagram of 30 batches of *P. notoginseng* flowers

4 讨论

本研究建立了不同生长年限三七花的HPLC指纹图谱,并选择含量相对较高的人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc为指标,建立了同时测定上述4种成分的含量测定方法,以比较研究了不同生长年限三七花样品化学成分类别及含量,从而评价其品质差异。相比文献方法^[6],本研究建立的三七花HPLC指纹图谱分析时间缩短,且色谱峰峰形明显改善、色谱峰数明显增加,能更为完整地体现三七花的化学成分的整体特征;同时,所建立的含量测

定方法能同时测定三七花中人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc等4种成分,方法简便可行,精密密度、准确度、稳定性均良好。

综合比较不同生长年限三七花样品的HPLC指纹图谱和4种人参皂苷(Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc)的含量测定结果后发现,各生长年限样品的化学成分类别大体接近但仍存在一定差异,其中2年生样品的人参皂苷类成分含量较低、波动较大,整体品质略差;而相对而言,3年生、4年生样品的人参皂苷类成分含量更高、波动更小,整体品质较高、趋于稳定。笔者推测,生长年限对三七花成分含量的影响可能是由于在2年生长长期时,三七的植物吸收和代谢系统才基本形成,此时植物需要大量吸收营养成分以促进生长,且生长主要集中在根部,因此提供给花、茎、叶的养分较少;而到了第3、4年生长长期时,三七根部生长趋势减慢,植物代谢系统较为发达,提供给三七花、茎、叶的养分增加,故其相应化学成分含量逐渐增加^[8]。

由于本研究受项目条件等限制,本课题组获得的对照品类有限,故本次试验仅指认了不同生长年限三七花样品中人参皂苷Rc、R₁、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃等6个共有成分以及3年生三七花样品中的人参皂苷Rd,并对含量相对较高的人参皂苷成分Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc进行了定量检测,而色谱图中峰面积最大的16、18、25号等色谱峰未能指认,也未能进行含量测定。因此,在下一步研究中,本课题组拟通过扩大对照品来源等手段,进一步对16、18、25号等色谱峰进行指认,并增加相应含量测定指标,以深入研究和综合评价不同生长年限三七花的品质。

参考文献

- [1] 孟祥松,蒋磊,于元元,等.三七花及其易混淆品的微性状鉴别[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):39-43.
- [2] 张冰,陈晓辉,毕开顺. HPLC法同时测定三七花中鸟苷和腺苷的含量[J].药物分析杂志,2009,12(12):2113-2115.
- [3] 张媛,崔蓉,杜洪建,等. HPLC测定三七花蕾中的皂苷含量研究[J].中国现代应用药学,2009,26(1):67-71.
- [4] 满茹.识别真假三七花[J].开卷有益:求医问药,2017,5(5):45-46.
- [5] 张素清.人参花与三七花的鉴别[J].中国乡村医药,2017,24(11):30.
- [6] 孟祥松,蒋磊,于元元,等.三七花及其易混淆品HPLC指纹图谱鉴别研究[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(6):8-10.
- [7] 魏莉,杜奕,周浩.不同产地和生长年限三七花蕾中总皂苷及单体皂苷的含量测定[J].上海中医药杂志,2008,42(4):76-78.
- [8] 欧小宏,金航,郭兰萍,等.三七营养生理与施肥的研究现状与展望[J].中国中药杂志,2011,36(29):2620-2624.

(收稿日期:2019-04-20 修回日期:2020-03-10)

(编辑:段思怡)