

基于高效液相色谱和红外光谱的生三七及其炮制品的鉴别[△]

李雨昕^{1*}, 邢娜¹, 张志宏², 于天颖³, 马恩耀³, 王雪¹, 白浩东¹, 曾元宁², 王秋红^{1,2#}(1.黑龙江中医药大学药学院/教育部北药基础与应用研究重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2.广东药科大学中药学院, 广州 510006; 3.广州采芝林药业有限公司, 广州 510145)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)18-2194-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.18.04



摘要 目的:鉴别生三七及其炮制品。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)建立指纹图谱。以人参皂苷Rb₁为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》绘制15批生三七及其炮制品的HPLC指纹图谱并进行相似度评价,通过与对照品对比确定共有峰。采用SPSS 21.0、SIMCA 14.1软件进行聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法分析,以变量重要性投影(VIP)值大于1为标准,筛选造成生三七及其炮制品质量差异的标志性成分。采用OMNIC 8.2.0软件建立生三七及其炮制品的红外(IR)指纹图谱并进行相似度评价,采用双指标序列分析法对15批生三七及其炮制品的IR指纹图谱吸收峰进行分析。结果:15批生三七有16个共有峰,相似度为0.911~1.000;炮制品有25个共有峰,相似度为0.862~1.000;二者共有12个相同的共有峰,并指认其中3个共有峰,分别为三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁。聚类分析结果显示,当距离为10时,15批生三七可聚为两类,SW1~SW5聚为一类,SH1~SH5、SQ1~SQ5聚为一类;15批炮制品ZW1~ZW5、ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。当距离为5时,15批生三七可聚为3类,SW1~SW5聚为一类,SH2~SH5、SQ2聚为一类,SQ1、SQ3~SQ5、SH1聚为一类;15批炮制品可聚为两类,ZW1~ZW5聚为一类,ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。主成分分析结果显示,前两个主成分的累计方差贡献率为80.104%。正交偏最小二乘法分析结果显示,5个峰的VIP值大于1,分别为峰H、峰G、峰J、峰F(人参皂苷Rg₁)、峰I。15批生三七及其炮制品IR指纹图谱的相似度分别为0.889 7~1.000 0、0.972 8~1.000 0;共有峰率均为80%~100%,变异峰率分别为0~17.65%、0~18.75%。经吸收峰波数对比发现,生三七在3 440、1 450 cm⁻¹处,炮制品在1 530、575 cm⁻¹处存在差异。结论:所建HPLC指纹图谱和IR指纹图谱的相似度均较好,能有效区分生三七及其炮制品。不同产地生三七及其炮制品的共有峰率高、变异率低,二者化学成分不同;峰H、峰G、峰J、人参皂苷Rg₁、峰I为引起生三七及其炮制品质量差异的标志性成分。

关键词 三七;炮制品;高效液相色谱法;红外光谱;不同产地

Identification of *Panax notoginseng* and Its Processed Products Based on HPLC and IR Spectrum

LI Yuxin¹, XING Na¹, ZHANG Zhihong², YU Tianying³, MA Enyao³, WANG Xue¹, BAI Haodong¹, ZENG Yuanning², WANG Qihong^{1,2}(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine/Key Laboratory of Foundation and Application Research of Northern Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education/Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangzhou Caizhilin Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510145, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify *Panax notoginseng* and its processed products. METHODS: The fingerprint was established by HPLC. Using ginsenoside Rb₁ as reference, HPLC fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products were drawn and the similarity evaluation was conducted by using the *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprints* (2012 edition). The common peaks were confirmed by comparing with substance control. SPSS 21.0 and SIMCA 14.1 software were used to perform cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis; taking the variable importance projection (VIP) value greater than 1 as the standard, the differential marker components causing the quality difference between *P. notoginseng* and its processed products were screened. IR fingerprints of *P. notoginseng* and its processed products were established by OMNIC 8.2.0 software, and the spectral similarity was evaluated; double index sequence analysis was used to analyze absorption peaks of IR fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products. RESULTS: There were 16 common peaks in the fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng*, and the similarities were 0.911-1.000; there were 25 common peaks in the fingerprints of processed products, and the similarities were 0.862-1.000. They had 12 identical common peaks, and three of them were identified as sanchinoside R₁, ginsenoside

[△] 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2018YFC1707100)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制原理及饮片质量。电话:020-39353241。E-mail:1004099453@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药炮制、中药药效物质基础和作用机制。电话:020-39353241。E-mail:qh-wang668@sina.com

Rg₁ and ginsenoside Rb₁. Results of cluster analysis showed that when the distance was 10, 15 batches of *P. notoginseng* could be clustered into two categories, SW1-SW5 into one category, SH1-SH5 and SQ1-SQ5 into one category, ZW1-ZW5, ZH1-ZH5 and ZQ1-ZQ5 of 15 batches of processed products could be clustered into one category. When the distance was 5, 15 batches of *P. notoginseng* could be clustered into three categories, SW1-SW5 into one category, SH2-SH5 and SQ2 into one category, SQ1, SQ3-SQ5 and SH1 into one category. Fifteen batches of processed products could be clustered into two categories, ZW1-ZW5 into one category, ZH1-ZH5 and ZQ1-ZQ5 into one category. The results of principal component analysis showed that the cumulative variance contribution rate of the first two principal components was 80.104%. The results of orthogonal partial least squares-discriminant analysis showed that the VIP values of the five peaks were greater than 1, which were peak H, peak G, peak J, peak F (ginsenoside Rg₁) and peak I. The similarity of IR fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products were 0.889 7-1.000 0 and 0.972 8-1.000 0; the common peak rates were 80%-100%, and the variation peak rates were 0-17.65% and 0-18.75%, respectively. By comparing the wave numbers of absorption peaks, it was found that there were differences between *P. notoginseng* at 3 440 and 1 450 cm⁻¹ and processed products at 1 530 and 575 cm⁻¹. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and IR fingerprint have good similarity, and could effectively distinguish *P. notoginseng* and its processed products. *P. notoginseng* and its processed products from different habitats have high common peak rate and low variation rate, and their chemical components are different; peak H, peak G, peak J, ginsenoside Rg₁ and peak I are differential marker components causing the quality difference between *P. notoginseng* and processed products.

KEYWORDS *Panax notoginseng*; Processed products; HPLC; IR spectrum; Different habitats

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎,主产于我国云南、广西等地,具有散瘀止血、消肿定痛的功效,常用于治疗咯血、吐血、衄血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛等症^[1]。三七作为传统名贵中药,在中成药处方中使用频繁,亦是一种大众青睐的保健食品^[2]。三七有生品和熟品之分,生三七收录于2020年版《中国药典》(一部)^[1];三七炮制方法有焙、炒、蒸、油炸、砂烫、发酵及微波等^[3-4],其中蒸法和油炸法可见于个别地区炮制规范中,如蒸三七已被四川、安徽、广西等地的炮制规范收录^[5]。

有研究表明,生三七功效偏于散瘀止血、消肿定痛;熟三七功效偏于补益,且其益气补血活血作用优于生三七^[6-8]。除功效差异外,两者的化学成分也有不同:生三七经炮制后,所含的皂苷类成分发生脱水或去糖,可产生新的皂苷类成分;氨基酸类、黄酮类成分受热含量减少,多糖类成分含量则与炮制参数相关^[3]。目前,有关生、熟三七的研究多为药理作用差异分析,多从三七“生打熟补”特点入手,验证熟三七的补血补益作用^[6,8-9],或以皂苷类成分为指标优选最优炮制工艺^[10-11],而对熟三七的质量评价较少。现行2020年版《中国药典》(一部)仅对生三七药材的性状、显微鉴别、薄层鉴别以及水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物、指标成分(三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁)含量测定等进行规范,但未对其炮制品作出规定^[1]。虽然,有部分省份的炮制规范对熟三七的炮制方法进行了描述,但未见具体的参数要求^[12],加之熟三七使用的日益增多,因此有必要对熟三七的质量进行评价。

高效液相色谱(HPLC)作为物质特有性分析的一种

方法,能够对药材成分进行定性、定量分析,借助化学信息反映中药质量^[13]。与采用成分含量多少来评价药材质量的方法相比,中药指纹图谱技术结合聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法分析等化学模式识别能更加客观地反映药材质量^[14]。红外(IR)光谱又称分子指纹光谱,能够提供较为丰富的分子结构特征性信息^[15]。近年来,IR光谱在中药材鉴别领域发挥了重要作用,可用于鉴别药材真伪、产地及不同药用部位,有助于保障中药使用的安全性^[16]。双指标分析法提高了样品信息的独立性、特征性;变异率与共有峰率作为两个相互独立的鉴别指标表示样品两两比较的相似性和差异性,可构成二维指标空间,较单指标的鉴别方法,具有更强的鉴别能力,可利用药材本身所含有的信息进行鉴别,并可通过建立多维且独立的鉴别指标空间而将药材共性与差异进行量化^[17]。基于此,本研究建立了不同产地生、熟三七的HPLC指纹图谱及IR指纹图谱,同时结合化学模式识别进行分析,旨在为生、熟三七的辨别和产地的区分提供参考,亦为探讨三七作用机理及炮制机制奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用仪器主要有 Waters e2695 型 HPLC 仪[沃特世科技(上海)有限公司],UV-1800 型紫外-可见分光光度计、FTIR-8400S 型 IR 光谱仪(日本 Shimadzu 公司),SB25-12DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),N-1300 型旋转蒸发器(日本 EYELA 公司),GZX-9140MBE 型电热恒温鼓风干燥箱、HH-6 型数显恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),GZX-9140MBE 型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易

(上海)有限公司], Milli-Q Advantage A10 型超纯水台式纯水系统(德国 Millipore 公司)等。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号 RFS-R01211810029, 纯度 98.58%)、人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号 RFS-R01511812013, 纯度 99.16%)、三七皂苷 R₁ 对照品(批号 RFS-S0021181-1027, 纯度 98.52%) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 溴化钾(KBr, 光谱纯, 批号 C11570025) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 甲醇(美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 为质谱纯, 乙腈[赛默飞世尔科技(中国)有限公司] 为色谱纯, 水为超纯水。

15 批生三七药材为广州采芝林药业有限公司提供的净制药材, 分别产自云南曲靖、文山、红河等 3 个地区(每产地各 5 批), 经广东药科大学中药资源系刘基柱教授鉴定均为五加科植物三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。取三七药材, 按其质量的 40% 加水浸润 24 h 至无白心; 蒸锅加热至有蒸汽冒出, 放入已润制的生三七药材, 蒸制 3 h 后取出, 趁热将其切成厚约 2~3 mm 的薄片, 于 50 °C 烘干, 即得 15 批炮制品(依次编号 ZQ1~ZQ5、ZW1~ZW5、ZH1~ZH5), 具体来源信息见表 1。

表 1 15 批生三七药材的来源信息

Tab 1 Source information of 15 batches of *P. notoginseng*

生三七编号	产地	批号	炮制品编号
SQ1	云南省曲靖市	YCB010001	ZQ1
SQ2	云南省曲靖市	YCB010002	ZQ2
SQ3	云南省曲靖市	YCB010003	ZQ3
SQ4	云南省曲靖市	YCB010004	ZQ4
SQ5	云南省曲靖市	YCB010005	ZQ5
SW1	云南省文山市	YCB010006	ZW1
SW2	云南省文山市	YCB010007	ZW2
SW3	云南省文山市	YCB010008	ZW3
SW4	云南省文山市	YCB010009	ZW4
SW5	云南省文山市	YCB010010	ZW5
SH1	云南省红河州	YCB010011	ZH1
SH2	云南省红河州	YCB010012	ZH2
SH3	云南省红河州	YCB010013	ZH3
SH4	云南省红河州	YCB010014	ZH4
SH5	云南省红河州	YCB010015	ZH5

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 以 Sunfire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 为色谱柱, 以乙腈(A)-水(B) 为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 10% A; 5~25 min, 10% A→46% A; 25~30 min, 46% A→100% A; 30~50 min, 100% A); 流速为 1 mL/min; 检测波长为 203 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 对照品各 5 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 混匀, 制成质量浓度均为 1

mg/mL 的单一对照品溶液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取生三七或其炮制品粉末(过四号筛) 3.75 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加入 70% 甲醇 25 mL, 涡旋后超声(功率 600 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 于 25 °C 下以 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得, 备用。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号 ZH1), 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以人参皂苷 R_{b1} 为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 12 个相同共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.81% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.78%~2.59% (n=6), 表明方法精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取同一炮制品样品(编号 ZH1), 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 以人参皂苷 R_{b1} 为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 12 个相同共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.42% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 1.48%~2.48% (n=6), 表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号 ZH1), 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、16、18、24 h 时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 以人参皂苷 R_{b1} 为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 12 个相同共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.03%~0.48% (n=8), 相对峰面积的 RSD 为 0.92%~2.56% (n=8), 表明上述溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 HPLC 指纹图谱的建立 取 15 批生三七及其炮制品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》, 随机选择以 SW3 为生三七的参照、ZW3 为炮制品的参照, 采用中位数法生成对照图谱, 设定时间窗宽度为 0.1, 经多点校正, 得到 15 批生三七及其炮制品的叠加指纹图谱和对照图谱。结果显示, 15 批生三七有 16 个共有峰, 15 批炮制品有 25 个共有峰; 经对比, 生三七与炮制品中共有 12 个共有峰相同, 即生三七图谱中的 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、13、16 号峰(共有峰依次编号为峰 A~峰 L) 分别与炮制品图谱中的 1、2、4、5、7、10、11、12、22、23、24、25 号峰(共有峰依次编号为峰 A~峰 L) 对应, 详见图 1、图 2。

2.1.8 HPLC 指纹图谱的相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》对 15 批生三七及其炮制品进行相似度评价。结果显示, 15 批生三七及其炮制品与对应对照指纹图谱的相似度分别为 0.911~1.000, 0.862~1.000, 表明不同产地生三七及其炮制品中含有的化学成分种类相似, 药材质量稳定, 详见表 2。

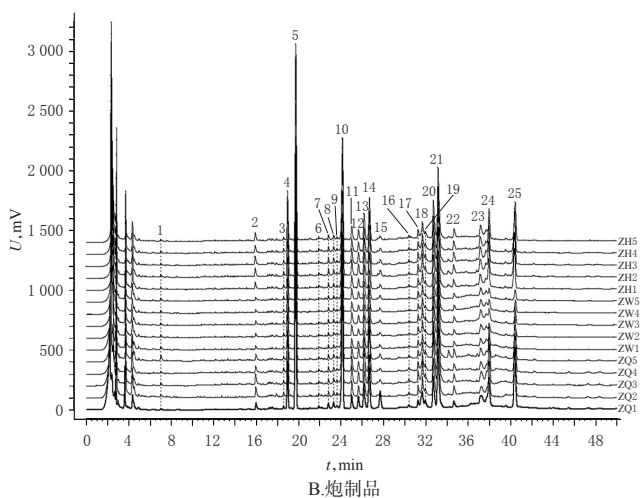
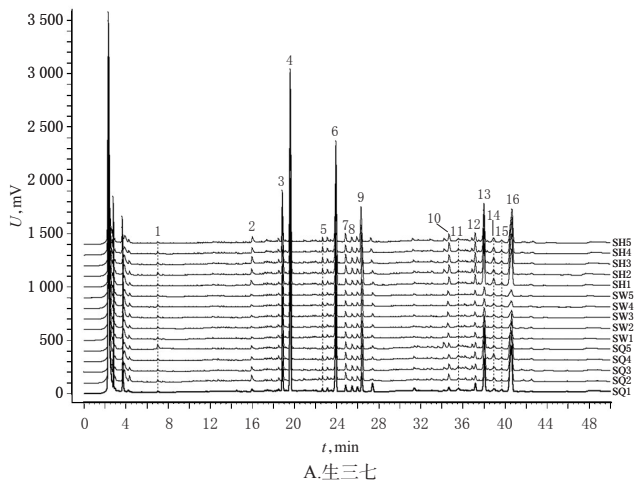


图1 15批生三七及其炮制品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

2.1.9 共有峰的指认 因人参皂苷Rb₁峰形较好、含量较高,且为2020年版《中国药典》(一部)三七药材含量测定的指标成分,故以人参皂苷Rb₁为参照峰。通过与对照品HPLC图(取“2.1.2”项下各单一对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,得到图3)对比,指认生三七指纹图谱中的3、4、6号峰和炮制品指纹图谱中的4、5、10号峰分别均为三七皂苷R₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rg₁。

2.2 聚类分析

以生三七及其炮制品中12个相同共有峰的峰面积为变量,采用瓦尔德法以平方欧氏距离为区间^[18],使用SPSS 21.0软件进行聚类分析,结果见图4。由图4可知,当距离为10时,15批生三七可聚为两类,SW1~SW5聚为一类,SH1~SH5、SQ1~SQ5聚为一类;15批炮制品ZW1~ZW5、ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。当距离为5时,15批生三七可聚为3类,SW1~SW5聚为一类,SH2~SH5、SQ2聚为一类,SQ1、SQ3~SQ5、SH1聚为一类;15批炮制品可聚为两类,ZW1~ZW5聚为一类,ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。

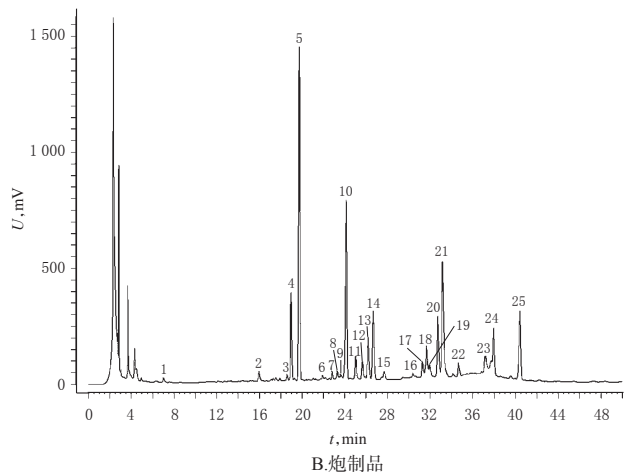
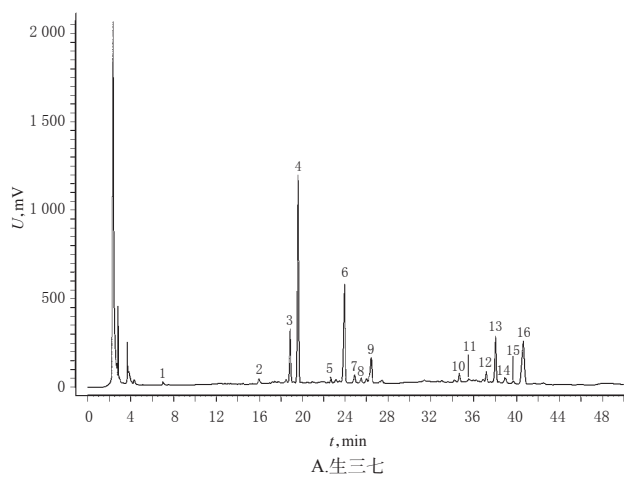


图2 生三七及其炮制品的对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprints of *P. notoginseng* and its processed products

表2 15批生三七及其炮制品的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

生三七编号	相似度	炮制品编号	相似度
SQ1	0.960	ZQ1	0.873
SQ2	0.969	ZQ2	0.960
SQ3	0.911	ZQ3	0.902
SQ4	0.937	ZQ4	0.862
SQ5	0.982	ZQ5	0.984
SW1	0.999	ZW1	0.995
SW2	0.999	ZW2	0.996
SW3	1.000	ZW3	1.000
SW4	1.000	ZW4	0.998
SW5	1.000	ZW5	0.996
SH1	0.970	ZH1	0.991
SH2	0.965	ZH2	0.986
SH3	0.959	ZH3	0.974
SH4	0.970	ZH4	0.979
SH5	0.964	ZH5	0.979

2.3 主成分分析

采用SIMCA 14.1软件,以生三七及其炮制品中12个相同共有峰的峰面积为变量进行主成分分析^[19],结果见图5。由图5可知,生三七SW1~SW5位于图的左侧,

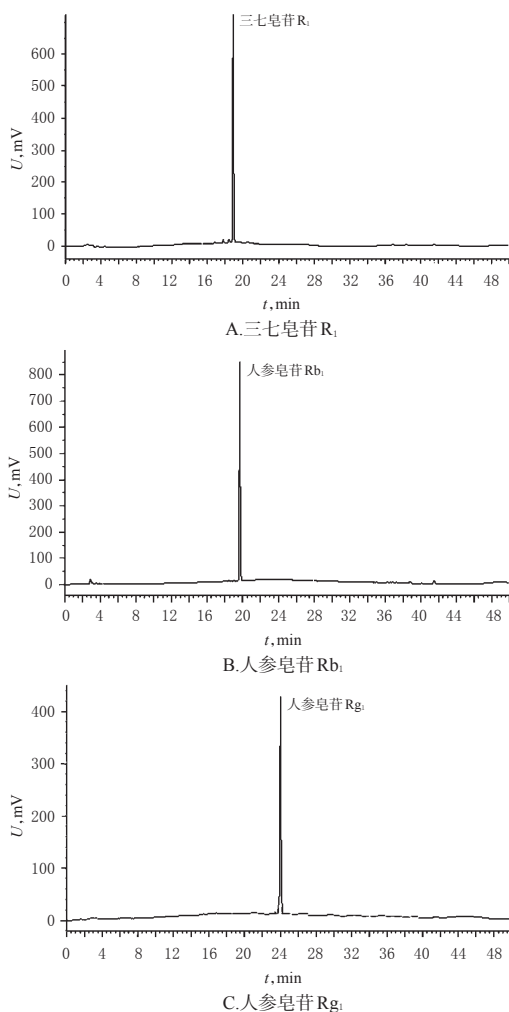


图3 三七皂苷R₁等3种成分的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatograms of 3 components as sanchinoside R₁

SH2~SH5、SQ2位于图的右下方，SQ1、SQ3~SQ5、SH1位于图的左下侧；炮制品ZW1~ZW5位于图的正上方，ZH1~ZH5、ZQ1~Q5位于图的右侧，与聚类分析结果基本一致。

以主成分特征值和贡献率为依据，采用SPSS 21.0软件进行主成分因子分析，结果见表3。由表3可知，前两个主成分的累计方差贡献率为80.104%，表明前两个主成分能够客观地反映样品的质量。

根据表3中特征值，采用SPSS 21.0软件绘制主成分分析碎石图，结果见图6。由图6可知，前两个成分较陡，后面十个成分较平缓，表示前两个成分足以代表原来变量。在特征向量中，变量前对应系数即为该变量主成分载荷。主成分载荷的绝对值越大，表示主成分的变量代表性越大^[20]。通过SPSS 21.0软件得到两个主成分F₁、F₂对应的特征向量分别为F₁=0.116 4×峰A+0.292 9×峰B+0.293 3×峰C+0.341 4×峰D+0.298 8×峰E+0.336 2×峰F+0.336 2×峰G+0.301 1×峰H+0.342 5×峰I+0.277 6×峰J+0.248 1×峰K+0.189 2×峰L；F₂=-0.057 8×峰A+

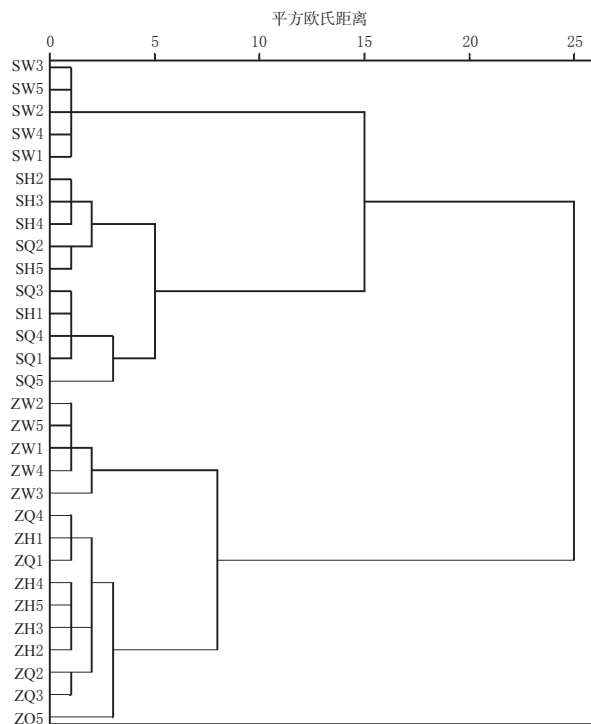


图4 15批生三七及其炮制品的聚类分析树状图

Fig 4 Cluster analysis dendrogram of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

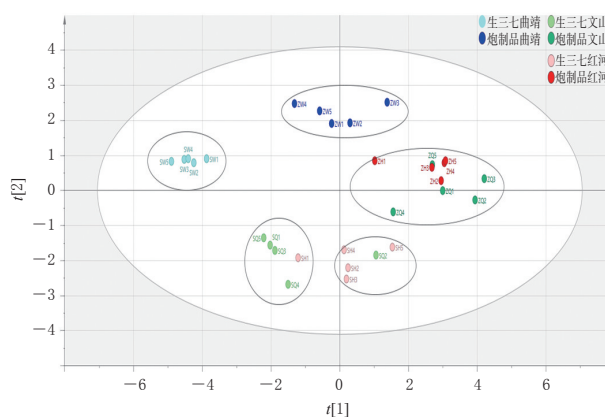


图5 15批生三七及其炮制品的主成分分析图

Fig 5 PCA diagram of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

0.257 3×峰B+0.266 3×峰C+0.201 5×峰D-0.155 9×峰E-0.238 7×峰F-0.231 0×峰G-0.329 2×峰H-0.089 2×峰I-0.321 5×峰J+0.441 5×峰K+0.519 2×峰L。主成分1、2对多个载荷较大的变量(峰B~峰L)具有代表性^[20]，表明生三七及其炮制品质量差异为多种成分共同作用的结果，并初步推断峰B~峰L所对应的11种成分(三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁及8种未知成分)为影响生三七及其炮制品质量的成分。

2.4 正交偏最小二乘法分析

以生三七及其炮制品中12个相同共有峰的峰面积为变量，采用SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘法分析，结果见图7、图8(图8中代表变量的点距离原点越

表3 生三七及其炮制品中12个相同共有峰的特征值与方差贡献率

Tab 3 Eigen value and variance contribution rate of 12 identical common peaks for 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

成分	初始特征值			提取平方和载荷		
	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %
1	7.184	59.868	59.868	7.184	59.868	59.868
2	2.428	20.236	80.104	2.428	20.236	80.104
3	0.989	8.243	88.347			
4	0.485	4.041	92.388			
5	0.274	2.286	94.674			
6	0.216	1.798	96.472			
7	0.179	1.496	97.968			
8	0.138	1.152	99.120			
9	0.057	0.475	99.594			
10	0.023	0.191	99.786			
11	0.020	0.163	99.949			
12	0.006	0.051	100.000			

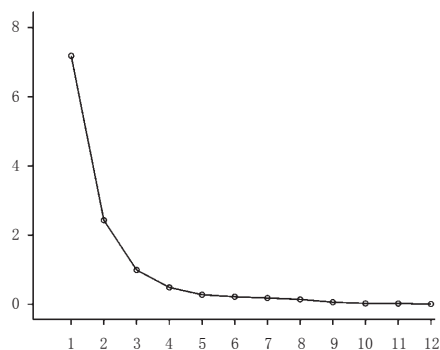


图6 生三七及其炮制品的主成分分析碎石图

Fig 6 Gravel diagram of *P. notoginseng* and its processed products by principal component analysis

远,表示变量对模型的影响权重越大^[21]。由图7、图8可知,模型累积解释能力参数 $R^2X(\text{cum})$ 为0.845, $R^2Y(\text{cum})$ 为0.972,模型预测度 $Q^2(\text{cum})$ 为0.943,均大于0.8,表示拟合的预测模型稳定、可靠^[22]。生三七位于图的左侧,炮制品位于右侧,二者能够明显分开。

当变量重要性投影(VIP)值大于1,表示变量对于整体的贡献较大^[23]。采用SIMCA 14.1软件中“VIP predictive”插件得到VIP值,选取VIP值大于1的化合物,共得到贡献相对较大的5个峰,分别为峰H、峰G、峰J、峰F(人参皂苷 Rg_1)、峰I,详见图9。

2.5 IR指纹图谱的建立

2.5.1 供试品的制备及测定 将15批生三七及其炮制品于60℃下烘干,粉碎,过九号筛,取粉末2mg,置于玛瑙研钵中,加入KBr粉末200mg,充分研磨后压制成薄片,即为供试样品片。同法制备KBr空白片,置于IR光谱仪中进行背景扫描,再放置生三七及其炮制品供试样品片进行扫描。

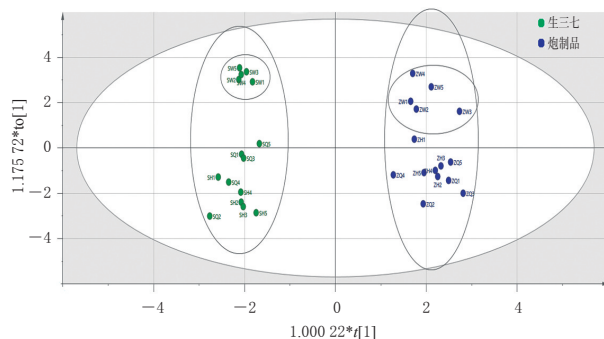


图7 15批生三七及其炮制品的正交偏最小二乘法分析得分图

Fig 7 OPLS-DA score of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

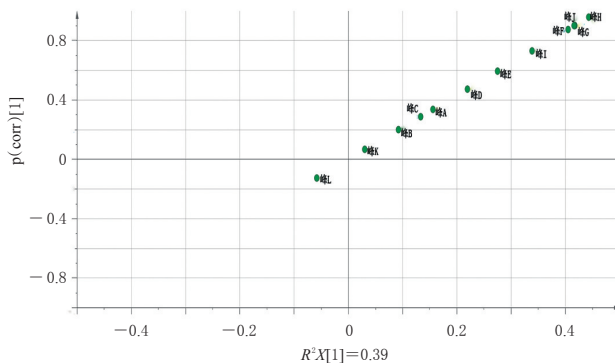


图8 15批三七及其炮制品的正交偏最小二乘法分析载荷图

Fig 8 OPLS-DA load diagram of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

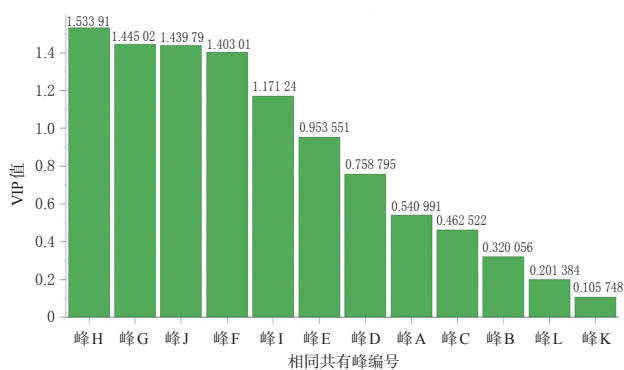


图9 生三七及其炮制品相同共有峰的VIP值

Fig 9 VIP values chart of the identical common peak for *P. notoginseng* and its processed products

2.5.2 精密度试验 取炮制品样品粉末(编号ZH1),按“2.5.1”项下方法制备供试样品片并连续测定5次,将所测得的图谱导入OMNIC 8.2.0软件进行相似度评价。结果显示,IR图谱的相似度为0.995 6~0.998 6($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取炮制品样品粉末(编号ZH1),按“2.5.1”项下方法制备供试样品片,分别于室温下放置0、10、20、30、40、50 min时按“2.5.1”项下方法测定,将所测

得的图谱导入OMNIC 8.2.0软件进行相似度评价。结果显示,IR图谱的相似度为0.988 4~0.998 7($n=6$),表明样品在室温下放置50 min内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取炮制品样品粉末(编号ZH1),共6份,按“2.5.1”项下方法制备供试样品片并测定,将所测得的图谱导入OMNIC 8.2.0软件进行相似度评价。结果显示,IR图谱的相似度为0.992 8~0.999 5($n=6$),表明方法重复性良好。

2.5.5 IR指纹图谱的相似度评价 采用OMNIC 8.2.0软件对15批生三七及其炮制品的IR图谱进行基线矫正、平滑,建立指纹图谱,生三七以SW3为参照,得相似度分别为0.978 8、0.991 9、0.987 0、0.970 6、0.973 6、0.937 8、0.997 2、1.000 0、0.990 6、0.995 4、0.907 0、0.889 7、0.954 0、0.936 8、0.966 8;炮制品以ZW3参照,得相似度分别为0.972 8、0.988 5、0.994 5、0.992 9、0.974 7、0.994 3、0.998 1、1.000 0、0.993 7、0.991 2、0.990 0、0.984 0、0.986 6、0.988 8、0.983 9。IR指纹图谱见图10。

2.5.6 双指标序列分析 本研究分别对15批生三七及其炮制品的IR指纹图谱进行双指标序列分析。共有峰率(P)= $(Ng/Nd) \times 100\%$;指纹图谱a的变异峰率(Pva)= $(Na/Ng) \times 100\%$;指纹图谱b的变异峰率(Pvb)= $(Nb/Ng) \times 100\%$ ^[24];Nd= $Ng+Na+Nb$ 。式中,Nd表示两个IR指纹图谱中的独立峰总数,独立峰指IR指纹图谱中不同的吸收峰;Ng表示两个IR指纹图谱中都出现的吸收峰的个数,Na表示指纹图谱a中相对于其共有峰的非共有峰数(称为a的变异峰数),Nb表示指纹图谱b中相对于其共有峰的非共有峰数(称为b的变异峰数);Pv指在该IR指纹图谱中变异峰数与其共有峰数的比值^[25]。具体结果见表4。

以SQ2:SH2(90.00,5.56,5.56)为例,其序列数据表示以SQ2为参照,SQ2与SH2之间的共有峰率为90%,SQ2与SH2的变异峰率均为5.56%,表明SQ2与SH2之间共有峰率大、变异率小。由表4可知,15批生三七及

其炮制品经两两比对均有105组结果,生三七共有峰率为80%~100%,相似度较高;其中69组共有峰率大于90%,27组共有峰率为85%~90%,9组共有峰率小于85%。炮制品共有峰率为80%~100%,相似度较高;其中71组共有峰率大于90%,34组共有峰率为85%~90%。这表明生三七及其炮制品的IR指纹图谱相似度较高、变异率低。

2.5.7 IR指纹图谱数据分析 由生三七及其炮制品的IR指纹图谱可以看出,不同产地生三七及其炮制品各自的相似度较高。生三七在3 440、3 300、2 930、2 310、2 150、1 660、1 450、1 425、1 370、1 245、1 155、1 020、855、760、700、530 cm^{-1} 处有16个共有峰;炮制品在3 350、2 928、2 360、2 150、1 650、1 530、1 425、1 375、1 245、1 155、1 025、855、760、700、575、525 cm^{-1} 处有16个共有峰(具体波数数据表略)。生三七与炮制品的共有峰波数相似,仅个别峰不同,生三七体现在3 440、1 450 cm^{-1} 处,炮制品体现在1 530、575 cm^{-1} 处。此外,生三七在3 000~3 700 cm^{-1} 处有多个中等强度的尖峰,而炮制品在此区间为一大宽峰,且炮制品的图谱更具统一性,较为规整。笔者推测,生三七经蒸制后,所含化学成分发生转化,结构不稳定的成分发生降解,官能团种类减少^[26]。

3 讨论

本研究参考相关文献[27]和2020年版《中国药典》(一部)^[1],建立了生三七及其炮制品的HPLC指纹图谱。通过HPLC指纹图谱及相似度评价发现,15批生三七相似度为0.911~1.000,共16个共有峰;15批炮制品相似度为0.862~1.000,共25个共有峰。经对比,生三七与炮制品中共有12个共有峰相同;经与对照品对比,共指认了其中3个共有峰,分别为三七皂苷R₁、人参皂苷R_{b1}、人参皂苷R_{g1}。此外,炮制品色谱图中的色谱峰较生三七明显增多,表明生三七经炮制后产生了新的成分。但本研究并未对炮制后的新增成分进行确定,后续

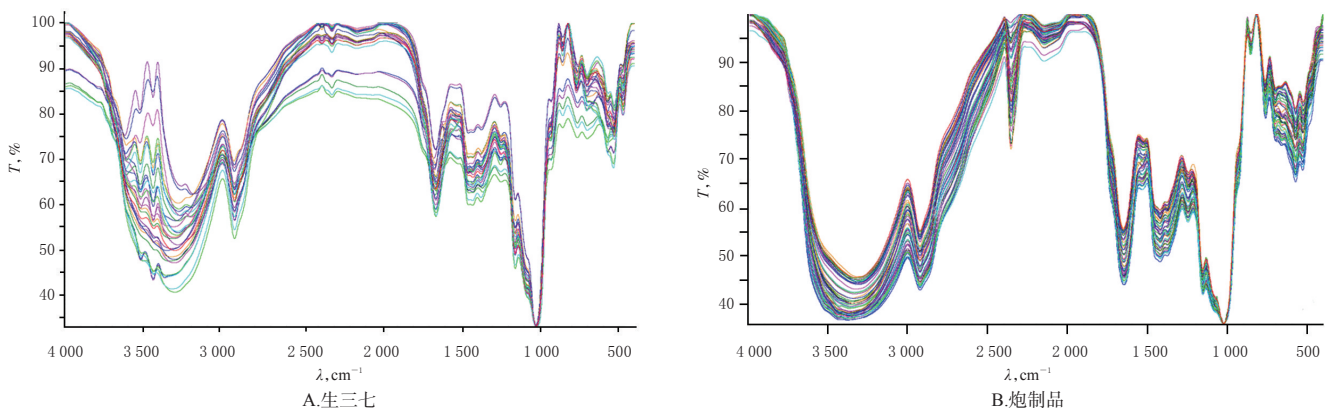


图10 15批生三七及其炮制品的IR指纹图谱

Fig 10 IR fingerprints of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

表4 15批生三七及炮制品的双指标序列分析结果

Tab 4 Results of double index sequence analysis of 15 batches of *P. notoginseng* and its processed products

P, Pva, Pvb	生三七序列	P, Pva, Pvb	炮制品序列
100.00, 0, 0	(SQ2:SQ4), (SQ2:SW5), (SQ3:SQ5), (SQ4:SW5), (SW1:SH1), (SW1:SH4), (SH1:SH4)	100.00, 0, 0	(ZQ1:ZH4), (ZQ1:ZH5), (ZQ2:ZQ3), (ZQ2:ZW1), (ZQ2:ZW4), (ZQ3:ZW1), (ZQ3:ZW4), (ZQ4:ZH1), (ZW1:ZW4), (ZW2:ZW3), (ZH4:ZH5), (ZQ2:ZQ5), (ZQ3:ZQ5), (ZQ5:ZW1), (ZQ5:ZW4)
95.00, 5.26, 0	(SW1:SW4), (SW1:SW5), (SW1:SH2), (SW1:SH3), (SW1:SH5), (SH1:SH2), (SH1:SH3), (SH1:SH5), (SH4:SH5)	94.74, 5.56, 0	(ZQ4:ZW2), (ZQ4:ZW3), (ZW5:ZH4), (ZW5:ZH5), (ZH3:ZH4), (ZH3:ZH5)
95.00, 0, 5.26	(SQ2:SW1), (SQ2:SH1), (SQ2:SH4), (SQ4:SW1), (SQ4:SH1), (SQ4:SH4), (SW4:SH1), (SW4:SH4), (SW5:SH1), (SW5:SH4), (SH2:SH4), (SH3:SH4)	94.74, 0, 5.56	(ZQ1:ZW5), (ZQ1:ZH3), (ZW2:ZW5), (ZW2:ZH1), (ZW3:ZW5), (ZW3:ZH1)
94.74, 5.56, 0	(SQ2:SQ3), (SQ2:SQ5), (SQ2:SW2), (SQ4:SQ5), (SQ4:SW2)	94.44, 0, 5.88	(ZQ2:ZW2), (ZQ2:ZW3), (ZQ3:ZW2), (ZQ3:ZW3), (ZW1:ZW2), (ZW1:ZW3), (ZQ5:ZW2), (ZQ5:ZW3), (ZW4:ZH3)
94.74, 0, 5.56	(SQ3:SQ4), (SQ3:SW5), (SQ3:SH3), (SQ5:SW5), (SQ5:SH3), (SW2:SW5), (SW2:SH5)	94.44, 5.88, 0	(ZW2:ZW4), (ZW3:ZW4)
94.44, 0, 5.88	(SQ1:SW2)	90.00, 5.56, 5.56	(ZQ4:ZW5), (ZQ4:ZH2), (ZQ4:ZH3), (ZW5:ZH1), (ZW5:ZH3), (ZH1:ZH2), (ZH1:ZH3), (ZH2:ZH3)
94.44, 5.88, 0	(SW2:SW3)	89.47, 0, 11.76	(ZQ2:ZQ4), (ZQ2:ZW5), (ZQ2:ZH1), (ZQ3:ZQ4), (ZQ3:ZW5), (ZQ3:ZH1), (ZQ5:ZW5), (ZQ5:ZH1), (ZW1:ZW5), (ZW1:ZH1), (ZW4:ZW5), (ZW4:ZH1)
90.00, 5.56, 5.56	(SQ2:SW4), (SQ2:SH2), (SQ2:SH3), (SQ2:SH5), (SQ4:SW4), (SQ4:SH2), (SQ4:SH3), (SQ4:SH5), (SW4:SW5), (SW4:SH2), (SW4:SH3), (SW4:SH5), (SW5:SH2), (SW5:SH3), (SW5:SH5), (SH2:SH3), (SH2:SH5), (SH3:SH5)	89.47, 11.76, 0	(ZQ4:ZQ5), (ZQ4:ZW1), (ZQ4:ZW4)
90.00, 0, 11.11	(SQ3:SW1), (SQ3:SH1), (SQ3:SH4), (SQ5:SW1), (SQ5:SH1), (SQ5:SH4), (SW2:SH1), (SW2:SH4)	89.47, 5.88, 5.88	(ZQ1:ZW2), (ZQ1:ZW3), (ZW2:ZH4), (ZW2:ZH5), (ZW3:ZH4), (ZW3:ZH5)
90.00, 11.11, 0	(SW1:SW2)	88.89, 0, 12.50	(ZQ2:ZH5), (ZQ3:ZH5), (ZW1:ZH5), (ZW4:ZH5)
89.47, 0, 11.76	(SQ1:SQ2), (SQ1:SQ4), (SQ1:SW5), (SQ1:SH2), (SQ1:SH5), (SW3:SW5), (SW3:SH5)	85.00, 5.88, 11.76	(ZQ1:ZQ4), (ZQ1:ZH1), (ZQ1:ZH2), (ZW2:ZH2), (ZW2:ZH3), (ZW3:ZH2), (ZW3:ZH3)
89.47, 11.76, 0	(SQ2:SW3), (SQ4:SW3)	85.00, 11.76, 5.88	(ZQ1:ZH4), (ZQ1:ZH5), (ZH1:ZH4), (ZH1:ZH5), (ZH2:ZH4), (ZH2:ZH5)
89.47, 5.88, 5.88	(SQ3:SW2), (SQ5:SW2)	84.21, 6.25, 12.50	(ZQ2:ZH4), (ZQ3:ZH4), (ZW1:ZH4), (ZW4:ZH4), (ZQ5:ZH4), (ZQ5:ZH5)
88.89, 6.25, 6.25	(SQ1:SW3)	84.21, 12.50, 6.25	(ZQ1:ZQ2), (ZQ1:ZQ3), (ZQ1:ZQ5), (ZQ1:ZW1), (ZQ1:ZW4)
85.00, 0, 17.65	(SQ1:SW1), (SQ1:SH1), (SQ1:SH4), (SW3:SH1), (SW3:SH4)	80.95, 11.76, 11.76	(ZW5:ZH2)
85.00, 5.88, 11.76	(SQ3:SW4), (SQ3:SH2), (SQ3:SH5), (SQ5:SW4), (SQ5:SH2), (SQ5:SH5), (SW2:SW4), (SW2:SH2), (SW2:SH3)	80.00, 6.25, 18.75	(ZQ2:ZH2), (ZQ2:ZH3), (ZQ3:ZH2), (ZQ3:ZH3), (ZQ5:ZH2), (ZQ5:ZH3), (ZW1:ZH2), (ZW1:ZH3), (ZW4:ZH2)
85.00, 17.65, 0	(SW1:SW3)		
84.21, 6.25, 12.50	(SQ1:SQ3), (SQ1:SQ5)		
84.21, 12.50, 6.25	(SQ3:SW3), (SQ5:SW3)		
80.00, 6.25, 18.75	(SQ1:SW4), (SQ1:SH3), (SW3:SW4), (SW3:SH2), (SW3:SH3)		

有待采用液质联用等技术进一步辨别。

聚类分析结果显示,当距离为10时,15批生三七可聚为两类,SW1~SW5聚为一类,SH1~SH5、SQ1~SQ5聚为一类;15批炮制品ZW1~ZW5、ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。当距离为5时,15批生三七可聚为三类,SW1~SW5聚为一类,SH2~SH5、SQ2聚为一类,SQ1、SQ3~SQ5、SH1聚为一类;15批炮制品可聚为两类,ZW1~ZW5聚为一类,ZH1~ZH5、ZQ1~ZQ5聚为一类。这提示云南红河及曲靖产生三七有交叉现象,对于此现象,笔者通过查阅云南省地图发现,曲靖、文山、红河三地呈“品”字型分布,两两接壤,由此推测可能由于红河与曲靖的地理环境相近,使得三七质量较为相似,亦或是药材采购过程中,个别批次收集出现差错。

主成分分析结果显示,前两个主成分能代表共有峰80.104%的信息,主成分分析图与聚类分析结果一致。正交偏最小二乘法分析结果显示,峰H、峰G、峰J、峰F(人参皂苷R_{g1})、峰I的VIP值均大于1。虽然,本研究未指出除对照品外的其余未知成分,但指纹图谱结合化

学模式识别可区分不同产地生三七及其炮制品,并初步推断三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}和其他8种未知成分为影响生三七及其炮制品质量的成分^[18],后续可结合含量测定及未知成分指认等实验对其进行鉴定;筛选出峰H、峰G、峰J、人参皂苷R_{g1}、峰I为引起其质量差异的标志性成分,表明生三七及其炮制品所含成分的含量特征差异较大^[28]。

IR光谱在定性鉴别研究中具有独特优势,能够提供丰富的分子结构信息,具有良好的专属性、重现性,可综合反映不同产地三七化学成分的复杂性和多样性^[29]。IR图谱将三七不同成分中同类官能团以叠加峰的形式展示,能够从不同角度对三七质量进行评价^[14]。本建立了15批生三七及其炮制品的IR指纹图谱,并进行相似度评价和双指标序列分析。结果显示,经峰位对比发现,生三七在3 440、1 450 cm⁻¹处,炮制品在1 530、575 cm⁻¹处存在差异,生三七及其炮制品吸收峰不同,表明经炮制后三七的化学成分发生变化,可以此对二者进行鉴别。双指标序列法可通过量化关系比对出亲缘关系

相近的样本^[30]。本研究结果显示,15批生三七的共有峰率为80%~100%,相似度较高;炮制品的共有峰率为80%~100%,相似度较高。这表明云南3个不同产地的三七化学种类相似,与聚类分析结果一致,但双指标序列法虽然较精确,但计算较为繁杂,不适用于大样本量比对^[31]。

本研究采用HPLC指纹图谱及IR指纹图谱对生三七及其炮制品进行了鉴别,所得结果均能够有效区分不同产地生三七及其炮制品。本研究的不足之处为仅收集了云南3个产地共15批生三七及其炮制品,样本量较小且为同一省份产药材;虽然通过HPLC指纹图谱及化学模式识别能明显鉴别生三七及其炮制品,但IR光谱在产地鉴别上有所欠缺,今后有待收集更多省份地区的三七药材样品进行鉴别,以确认IR光谱在产地鉴别上的价值。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:12-13.

[2] 杨国伟,来国防,刘录.云南不同地域三七中皂苷类成分的比较研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2019,28(6):542-545.

[3] 邢娜,彭东辉,张志宏,等.炮制对三七化学成分及药理作用影响的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(16):210-217.

[4] 陈新彤,黄胜男,庄伟,等.三七用药咨询常见问题分析[J].北京中医药杂志,2019,38(3):284-286.

[5] 曹晖,付静.全国中药炮制经验与规范集成(增修本)[M].北京:北京科学技术出版社,2017:3-4.

[6] 王洁.熟三七炮制工艺及炮制前后化学成分与活血补血药效差异研究[D].武汉:湖北中医药大学,2020.

[7] 万晓青,陈素红,彭芸崧,等.三七及其炮制品对血虚模型大鼠的补血益气作用比较[J].中国现代应用药学,2014,31(6):696-699.

[8] 武双.三七“生打熟补”物质基础及补血作用研究[D].昆明:昆明理工大学,2016.

[9] 胡玉飘.熟三七皂苷类成分提取纯化工艺优化及其生物活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2019.

[10] 王莹.熟三七炮制工艺及人参皂苷稳定性研究[D].昆明:昆明理工大学,2017.

[11] 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.

[12] 刘梦楠,熊慧,薛雪,等.三七炮制历史及标准现状分析[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1477-1480.

[13] 王磊.高效液相色谱法在中药质量检测中的运用实践研究[J].中国处方药,2018,16(8):27-28.

[14] 陈丽华,肖发林,黄诗雨,等.中药质量评价研究思路及创

新发展趋势[J].中草药,2021,52(9):2541-2547.

[15] 熊婧,何兰,魏锋,等.牛黄类药材及牛胆的红外光谱特征性分析与研究[J].药物分析杂志,2021,41(4):735-740.

[16] 李燕,吴然然,于佰华,等.红外光谱在中药定性定量分析中的应用[J].光谱学与光谱分析,2006,26(10):1846-1849.

[17] 邹华彬,袁久荣,吕青涛,等.共有峰率和变异率双指标序列分析法分析甘草紫外指纹图谱[J].中药材,2003,(9):625-629.

[18] 杨玉莹,张丹丹,罗心遥,等.指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量[J].中草药,2020,51(4):1082-1088.

[19] 高微,陈明生,韦广辉,等.尖尾风药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2018,29(16):2215-2219.

[20] 祁航,谢涛,吕东峰,等.玉泉丸HPLC指纹图谱的建立及6个成分定量分析[J].中草药,2019,50(23):5753-5759.

[21] 严雅慧,李淑萍,热依木古丽·阿布都拉,等.芦荟的HPLC指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定[J].天然产物研究与开发,2021,33(3):353-361.

[22] 徐鑫,戚华文,高德嵩,等.基于化学模式识别的栀子UPLC定量指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2020,45(18):4416-4422.

[23] 韩晴雯,周斌,李玉平,等.HPLC指纹图谱技术结合模式识别分析评价参莲胶囊的质量[J].药物分析杂志,2020,40(7):1300-1308.

[24] 刘冰晶,肖海.山药红外指纹图谱相似度分析[J].赣南医学院学报,2018,38(1):16-22.

[25] 课净璇,黎杉珊,申光辉,等.基于双指标分析法和聚类分析法的花椒红外指纹图谱研究[J].食品与机械,2017,33(3):55-61.

[26] 余河水,张丽娟,宋新波,等.三七炮制品化学成分研究[J].中国中药杂志,2013,38(22):3910-3917.

[27] 李宁,高小惠,王子幼,等.三七HPLC指纹图谱及5种成分测定[J].中成药,2020,42(5):1232-1237.

[28] 邱俊娜,张榆,张双,等.基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究[J].中草药,2020,51(23):2842-2850.

[29] 梅德强,王建华.红外光谱法研究中药进展[J].重庆大学学报(自然科学版),2003,26(11):56-59.

[30] 周晔,张庆伟,李佩孚,等.傅里叶红外光谱法鉴别不同产地中药独活的研究[J].中国中药杂志,2013,38(19):3309-3312.

[31] 王晓敏,史冠莹,王赵改,等.基于双指标分析法和聚类分析法的香椿红外指纹图谱研究[J].食品工业科技,2019,40(20):231-236.

(收稿日期:2021-04-16 修回日期:2021-07-29)

(编辑:陈宏)