

基于质量标志物的三七粉质量标准提升研究*

刘耀晨¹, 郭海彪², 张 杨³, 王德勤², 刘建庭^{3,4}, 李楚源², 张洪兵^{3,4},
韩彦琪^{3,4}, 张铁军^{3,4,5**}, 许 浚^{3,4,5**}

(1. 天津医科大学药学院 天津 300070; 2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515; 3. 天津药物研究院天津市中药质量标志物重点实验室 天津 300301; 4. 天津药物研究院中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室 天津 300301; 5. 天津药物研究院释药技术与药代动力学国家重点实验室 天津 300301)

摘要:目的 基于三七粉质量标志物的研究结果,完善三七粉质量标准,为其质量标准的修订提供科学依据。方法 利用高效液相色谱技术,结合“一测多评”等分析方法,对三七粉质量标志物进行含量测定,对不同厂家三七粉及不同商品规格原料药材进行质量标志物差异分析。建立指纹图谱,采用新的相似度计算模型-等同系数法和模式识别对三七粉及原料药材进行质量一致性评价。结果 不同厂家三七粉中三七素含量存在差异,收集到的白云山和黄中药三七粉中三七素含量均高于其余厂家,提示三七素可能为白云山和黄中药三七粉的优势指标。原料药材中三七素和皂苷含量与头数不具相关性,但与季节、部位具有相关性。皂苷方面表现为冬三七>春三七,芦头>主根>须根>筋条;三七素方面表现为冬三七>春三七,须根>芦头>筋条>主根。应用等同系数法计算指纹图谱相似度实现了不同厂家三七粉的区分,进一步结合化学模式识别实现了不同规格原料药材的区分。结论 建立的含量测定及指纹图谱方法稳定可行,专属性强,对于控制三七粉质量具有显著意义。与2020年版《中国药典》相比,该文修订了三七粉含量测定项,增加了HPLC指纹图谱项,可为三七粉的质量标准提升及其原料药材的选择提供科学依据。

关键词:三七粉 质量标志物 含量测定 指纹图谱 质量标准

doi: 10.11842/wst.20210615017 中图分类号: R282 文献标识码: A

三七粉具有散瘀止血、消肿定痛的功效^[1],在预防及改善心脑血管疾病方面作用显著,且无明显毒副作用,有效性安全性极高,市场需求量极大。2013年我国提出“一带一路”建设,中医药行业响应“一带一路”倡议,中药在国际市场上的贸易额不断加大。从出口方向上看,主要为亚洲地区,尤其东盟各国由于地理位置及文化背景等原因,用药习惯与我国相近,相对于西方发达国家市场,更加认可中药以药品形式进口,例如泰国、新加坡政府允许中药作为药品合法进口。2010年中国-东盟自由贸易区建成,对决大多数

商品实行“零关税”政策,今年上半年东盟已成为我国的第一大贸易伙伴,东盟正成为我国中药出口最具潜力的市场。由于多数东盟国家经济医疗水平较低,且都已进入老龄化社会,而三七粉在防治慢性疾病方面具有优势,因此,三七粉非常符合东盟国家的需求^[2]。三七粉具有有效成分可快速释放的优点,三七粉饮片品牌众多,但缺少统一的三七粉质量标准,掺假的鉴别较为困难^[3-4]。对于三七粉的质量评判国内多参考《中国药典》规定指标,三七粉的质量标准主要是测定其中三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g₁}及R_{b₁}的总量^[1],这不能

收稿日期:2021-06-15

修回日期:2021-11-10

* 国家自然科学基金委员会重点项目(81830111):基于“成分构成-靶标网络-生物效应”多维整合的中药质量标志物发现与确认,负责人:许海玉;国家中医药管理局国家中医药国际合作专项(0610-2140NF020630):中国-德国中药与植物药创新研发国际合作基地,负责人:刘昌孝。

** 通讯作者:张铁军,研究员,主要研究方向:中药新产品开发和质量管理;许浚,研究员,主要研究方向:中药药效物质基础和质量研究。

表1 三七粉样品信息

编号	批号	生产企业
S1	YPA8L0004	白云山和黄中药
S2	YPA8K0001	
S3	YPA8J0002	
S4	YPA8L0002	
S5	YPA9D0001	
S6	YPA8J0003	
S7	YPA8L0006	
S8	YPA9L0001	
S9	20200401	
S10	YPA9E0003	
S11	YPA9D0002	
S12	YPB0G0002	
S13	YPA8L0005	
S14	180450431	康美药业股份有限公司(简称“康美药业”)
S15	180901	云南三七科技药业有限公司(简称“云三七”)
S16	2422702	云南白药集团股份有限公司(简称“云南白药”)

表2 三七药材样品信息

编号	规格	产地
S1	春三七 20头	云南文山
S2	春三七 60头	
S3	春三七 80头	
S4	春三七 120头	
S5	冬三七 60头	
S6	冬三七 120头	
S7	春三七 60头	
S8	春三七 120头	
S9	春三七(芦头)	
S10	春三七(须根)	
S11	春三七(筋条)	
S12	春三七(主根)	

表3 三七素线性关系考察

成分	回归方程	R	线性范围
三七素	$Y=2.9776X+58.749$	0.9994	175.6-1756 $\mu\text{g/ml}$

全面反映三七粉的质量。针对三七粉的质量标准研究,刘永利在法定检验的基础上,已围绕重金属检查、有效成分检测等方面进行了初步研究,并建议增加多成分含测指标,防止掺假造假^[5]。再看东盟各国的中药质量标准,存在着过于西化、体系混乱等问题,一方面造成假冒伪劣产品流入东盟市场,另一方面导致中药产品注册困难^[2]。因此,提升现有三七粉的质量标准,成为未来制定三七粉国际标准和促进三七粉国内外贸易的关键。

中药质量标志物(quality marker, Q-Marker)在解决现在中药质量标准存在的问题和中药质量研究上有很好的指导意义,有利于提高中药在国际上的地位^[6-7]。根据中药Q-Marker基本条件,对现行三七粉评价指标做出改善需要明确三七粉中的有效成分群、特有成分群的组成同时兼顾成分的可测性^[7]。经过本课题组前期的研究,最终确定三七素、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 、 R_{g_2} 、 R_d 符合Q-Marker基本条件,可为三七粉的质量标志物。本实验建立了基于三七粉质量标志物的HPLC含量测定和指纹图谱方法,对不同厂家三七粉及不同商品规格原料药材进行质量标志物差异分析和质量一致性评价。此外,由于传统的相似度评价方法在中药质量控制中存在一定不足,及为了提高三七粉质量标志物在质量评价上的作用,参考相关文献采用一种新的相似度评价方法-等同系数模型,该模型中权重系数的确定采取层次分析法结合CRITIC法的方式^[8-12]。最后,为了更加全面评价三七药材质量,使用了模式识别进行综合分析。本研究结果可为三七粉的质量标准提升及原料药材的选择提供科学依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

AB204-N电子天平(德国Mettler公司);超声波清洗仪(宁波新芝生物科技公司);BT25S电子天平(德国Sartorius公司);Agilent 1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Waters Alliancee 2695高效液相色谱仪(美国Waters公司);Waters Atlantis T3 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 美国Waters公司);Agilent ZORBAX Eclipse C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 美国Agilent公司)。

1.2 材料

三七素(纯度 $\geq 90\%$,批号:R06S8F43250),人参皂苷 R_{g_1} (批号:G30N10Y104330)、人参皂苷 R_{b_1} (批号:G01O11Y126429)纯度均大于98%,均购自上海源叶生物科技有限公司;三七皂苷 R_1 (批号:110745-201921)、人参皂苷 R_e (批号:110754-202028)、人参皂苷 R_{g_2} (批号:111779-200801)、人参皂苷 R_d (批号:111818-201603)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均大于98%。纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司,磷酸、乙腈、甲醇均为色谱纯,购自天津市光复科

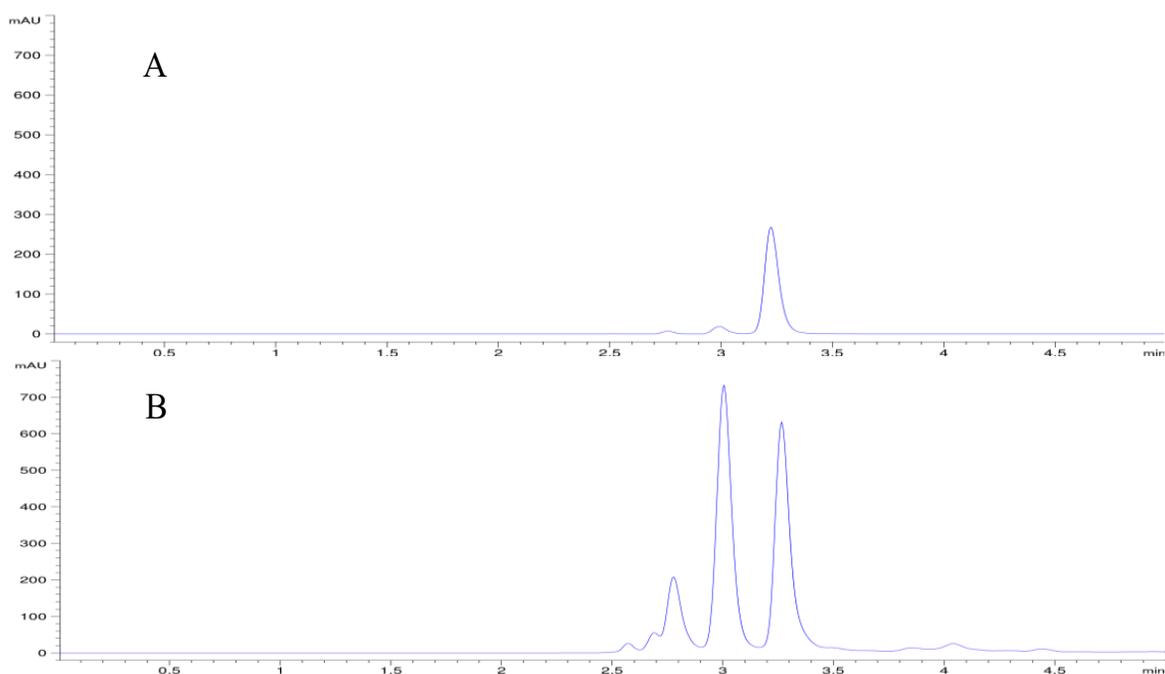


图1 (A)对照品色谱图;(B)样品色谱图

技发展有限公司和康科德科技有限公司。

1.3 样品

三七粉及三七药材均由广州白云山和记黄埔中药有限公司(简称“白云山和黄中药”)负责收集,具体信息见表1-表2。所有样品经天津药物研究院张铁军研究员鉴定均来源于五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen。

2 方法与结果

2.1 三七素含量测定

2.1.1 色谱条件

Waters Atlantis T3 C₁₈ 色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2%磷酸水;检测波长213 nm;进样量:10 μL;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:20°C。0.2%磷酸水洗脱5 min。结果见图1。

2.1.2 对照品溶液制备

取三七素对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加入少量纯水溶解后稀释至刻度,摇匀,即得三七素对照品储备液(1.756 mg·mL⁻¹)。精密量取储备液5 mL置10 mL量瓶中,加纯净水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液制备

取三七粉、药材粉末各约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入纯水20 mL,称定重量,超声45 min,放冷,再称定重量,并用纯水补足减失的重量,摇

匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察

取三七素对照品置于量瓶中,配置储备液,将溶液逐级稀释,共配成五个浓度梯度的线性溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,得回归方程,结果见表3。

2.1.5 重复性实验

取三七粉(YPA8L0004),按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,平行制成6份供试品溶液,连续测定,结果表明三七素峰面积RSD不大于2%,符合含量测定方法学验证要求。

2.1.6 稳定性实验

取同一批三七粉,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在室温放置0、2、4、6、8、12 h后分别进样,记录三七素色谱峰面积,并计算RSD值。结果显示RSD不大于2%,表明供试品溶液在室温条件下放置12 h内稳定。

2.1.7 中间精密度实验

由另一分析人员于不同日期照重复性试验项下方法重新配置6份供试品溶液,使用不同仪器进样测定,将测定结果与重复性试验结果进行比较,两组测定结果RSD均不大于2%,该方法精密度良好。

2.1.8 准确度实验

取同一批三七粉(含量已通过重复性试验测得,

表4 准确度实验结果

	编号	称样量(g)	样品已知量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	RSD(%)
三七素	1	0.5002	8.5534	8.5000	16.5894	94.54	1.39
	2	0.5007	8.5688	8.5000	16.8914	97.91	
	3	0.5006	8.5671	8.5000	16.8763	97.75	
	4	0.5005	8.5603	8.5000	16.7841	96.75	
	5	0.5005	8.5603	8.5000	16.7792	96.69	
	6	0.5003	8.5551	8.5000	16.6500	95.23	

表5 三七素含量测定结果

样品	含量(%)
YPA8J0002	2.18
YPA8L0004	1.77
YPA8L0002	1.27
YPA8K0001	2.50
YPA8L0006	1.13
YPA9D0001	1.49
YPA9E0003	1.61
YPA8J0003	1.50
YPA9L0001	1.03
YPA9D0002	1.50
YPB0G0002	1.31
20200401	2.15
YPA8L0005	1.22
2422702	0.83
180901	0.78
180450431	0.82
春三七 20头	0.97
春三七 60头	1.20
春三七 80头	0.52
春三七 120头	0.79
春三七 60头	0.78
春三七 120头	0.67
冬三七 60头	1.98
冬三七 120头	4.25
春三七(芦头)	1.77
春三七(须根)	6.71
春三七(筋条)	1.58
春三七(主根)	0.70

取其含量平均值)约0.5 g放置于50 mL锥形瓶内。加入定量的三七素对照品,称重,超声处理45 min,放冷,再称定重量,并用纯水补足减失的重量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液。平行制备6份,分别进样于色谱仪,依法测定,计算加样回收率(表4)。结果表明,三七素加样回收率在92%~105%之间,符合方法学验证要求,该方法具有良好的准确度。

表6 皂苷成分线性关系

成分	回归方程	R	线性范围
三七皂苷 R ₁	2.7643X+14.541	0.9993	50.6-506 μg·mL ⁻¹
人参皂苷 R _{g₁}	3.313X+108.72	0.9994	202.6-2026 μg·mL ⁻¹
人参皂苷 R _e	2.6924X-15.771	0.9990	32.1-321 μg·mL ⁻¹
人参皂苷 R _{b₁}	1.9125X+80.344	0.9992	210.3-2103 μg·mL ⁻¹
人参皂苷 R _{g₂}	4.1213X+2.5854	0.9990	6.86-68.6 μg·mL ⁻¹
人参皂苷 R _d	2.6713X+26.28	0.9992	50.4-504 μg·mL ⁻¹

2.1.9 含量测定

取三七粉及三七药材,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,并取“2.1.2”项下对照品溶液,依次进样测定(表5)。

2.2 皂苷成分含量测定

2.2.1 色谱条件

ZORBAX Eclipse C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B);检测波长203 nm;进样量:10 μL;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:25℃。流动相洗脱梯度:0-30 min, 20% A; 30-40 min, 20%-34% A; 40-46 min, 34% A; 46-53 min, 34%-39% A。结果见图2。

2.2.2 对照品溶液制备

取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、R_e、R_{b₁}、R_{g₂}、R_d对照品适量,精密称定,分别置于量瓶中,用甲醇配成浓度分别为0.253、1.013、0.161、1.051、0.034、0.252 mg·mL⁻¹混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备

取三七粉、三七药材粉末各约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定重量,超声45 min,放冷,再称定重量,并用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察

取6种皂苷对照品置于量瓶中,配置储备液,将溶液逐级稀释,共配成五个浓度梯度的线性溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,得回归方程,结果见表6。

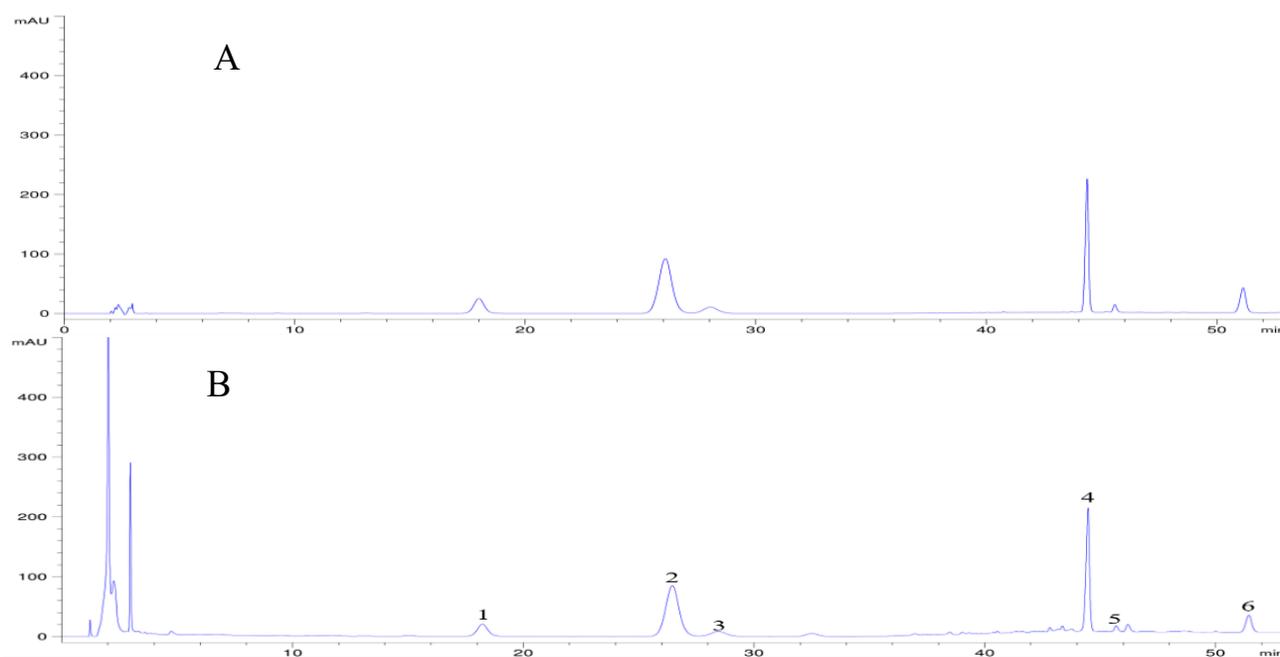


图2 (A)混合对照品色谱图;(B)样品色谱图

注:1:三七皂苷R₁;2:人参皂苷R_g;3:人参皂苷R_e;4:人参皂苷R_b₁;5:人参皂苷R_g₂;6:人参皂苷R_d

2.2.5 重复性实验

取三七粉(YPA8L0004),按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,平行制成6份供试品溶液,连续测定,结果表明6种皂苷的峰面积RSD均不大于2%,符合含量测定方法学验证要求。

2.2.6 稳定性实验

取同一批三七粉,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在室温放置0、2、4、8、12、24 h后分别进样,记录色谱峰面积,并计算RSD值。结果表明6种皂苷的峰面积RSD均不大于2%,表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定。

2.2.7 中间精密度实验

由另一分析人员于不同日期照重复性试验项下方法重新配置6份供试品溶液,使用不同仪器进样测定,将测定结果与重复性实验结果进行比较,两组测定结果RSD均不大于3%,该方法精密度良好。

2.2.8 准确度实验

取同一批三七粉(含量已通过重复性试验测得,取其含量平均值)约0.5g,置于25ml容量瓶中,加入定量的6种皂苷对照品溶液,超声处理45min,放冷,即得。平行制备6份,依法测定,加样回收率结果见表7。加样回收率均符合方法学验证要求,该方法具有良好的准确度。

2.2.9 相对校正因子计算

取“2.2.4”项下五个浓度梯度混合对照品溶液,以人参皂苷R_b₁峰面积为内标,分别计算6种皂苷的相对校正因子(f_r),结果RSD<5%,差异较小(表8)。

2.2.10 相对校正因子耐用性验证

2.2.10.1 用不同C18色谱柱测定的耐用性验证

取“2.2.2”项下的混合对照品溶液,在同一台高效液相色谱仪上,分别采用3根同一厂家不同批号色谱柱进行检测,求算以R_b₁作为参照成分时其他4种成分的 f_r ,各相对校正因子RSD在0.07%~1.74%, f_r 在使用不同色谱柱时耐用性良好(表9)。

2.2.10.2 用不同仪器测定的耐用性验证

取“2.2.2”项下的混合对照品溶液,分别在不同厂家高效液相色谱仪上,采用相同色谱柱进行检测,分别计算以R_b₁作为参照成分时其他4种成分的 f_r ,各相对校正因子RSD在0.20%~1.14%, f_r 在使用不同仪器时耐用性良好(表10)。

2.2.11 待测组份色谱峰定位

色谱峰的定位一般可以采用保留时间差或相对保留值,相对保留值计算公式: $r_{as}=t_{Ra}/t_{Rs}$;保留时间差计算公式: $\Delta t_{Ras}=t_{Ra}-t_{Rs}$ 。

考察保留时间差值及相对保留值对6种皂苷成分色谱峰在色谱图上的定位准确度。保留时间差值及

表7 准确度实验结果

成分	取样量(g)	样品已知含量(mg)	加入对照品的量(mg)	实际测得总量(mg)	回收率(%)	RSD(%)
三七皂苷 R ₁	0.5011	2.6859	0.9880	3.7286	105.54	1.997
	0.4992	2.6757	0.9880	3.6870	102.35	
	0.5013	2.6870	0.9880	3.7286	105.43	
	0.4990	2.6746	0.9880	3.6875	102.52	
	0.4990	2.6746	0.9880	3.6698	100.73	
	0.5013	2.6870	0.9880	3.7286	105.43	
人参皂苷 R _{g₁}	0.5011	12.1667	15.2608	28.4641	106.80	0.494
	0.4992	12.1206	15.2608	28.5035	107.35	
	0.5013	12.1716	15.2608	28.6306	107.85	
	0.4990	12.1157	15.2608	28.4640	107.13	
	0.4990	12.1157	15.2608	28.3352	106.28	
	0.5013	12.1716	15.2608	28.5324	107.21	
人参皂苷 Re	0.5011	1.6737	2.0500	3.7763	102.57	1.967
	0.4992	1.6673	2.0500	3.7337	100.80	
	0.5013	1.6743	2.0500	3.8098	104.17	
	0.4990	1.6667	2.0500	3.7466	101.46	
	0.4990	1.6667	2.0500	3.7363	100.96	
	0.5013	1.6743	2.0500	3.8447	105.87	
人参皂苷 R _{b₁}	0.5011	13.6500	15.5820	29.7334	103.22	0.914
	0.4992	13.5982	15.5820	29.7885	103.90	
	0.5013	13.6554	15.5820	30.0090	104.95	
	0.4990	13.5928	15.5820	29.8308	104.21	
	0.4990	13.5928	15.5820	29.5912	102.67	
	0.5013	13.6554	15.5820	29.6283	102.51	
人参皂苷 R _{g₂}	0.5011	0.3157	0.6000	0.9110	99.21	1.757
	0.4992	0.3145	0.6000	0.9188	100.73	
	0.5013	0.3158	0.6000	0.9360	103.37	
	0.4990	0.3144	0.6000	0.9267	102.06	
	0.4990	0.3144	0.6000	0.9389	104.09	
	0.5013	0.3158	0.6000	0.9317	102.65	
人参皂苷 Rd	0.5011	2.2550	2.5050	4.6525	95.71	1.702
	0.4992	2.2464	2.5050	4.5470	91.84	
	0.5013	2.2559	2.5050	4.5998	93.57	
	0.4990	2.2455	2.5050	4.5901	93.60	
	0.4990	2.2455	2.5050	4.5373	91.49	
	0.5013	2.2559	2.5050	4.5619	92.06	

相对保留值的 RSD 分别为 1.62%–12.39%、0.43%–3.32%。由结果可知,相对保留值可以用于待测成分色谱峰的定位(表 11–表 12)。

- (1) 不同 C18 色谱柱及仪器保留时间差重现性
- (2) 不同 C18 色谱柱及仪器相对保留值差重现性

2.2.12 含量测定

以人参皂苷 R_{b₁} 为参照成分作为“一测多评”法的

参照成分,测定样品中 6 种皂苷成分的含量(%),“一测多评”法(QASM)测定结果与外标法(ESM)进行比较(表 13)。将两种结果进行 t 检验, $P > 0.05$, 故“一测多评”法测定结果与外标法测定结果不存在显著性差异。

2.3 指纹图谱

对照品溶液及供试品溶液制备方法同“2.2.2”和

“2.2.3”项。

2.3.1 色谱条件

ZORBAX Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)–纯水(B);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长:203 nm;柱温为 25℃;进样量:10 μL;流动相梯度:0–30 min, 20% A; 30–40 min, 20%–34% A; 40–46 min, 34% A; 46–53 min, 34%–39% A; 53–65 min, 39%–67% A。

2.3.2 精密度实验

取三七粉(YPA8L0006)约 1.0 g, 制备供试品溶

表 8 相对校正因子计算结果

浓度梯度	人参皂苷 Rb ₁				
	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _e	人参皂苷 R _{g₂}	人参皂苷 R _d
I	1.38	1.71	1.27	2.07	1.39
II	1.47	1.72	1.27	2.20	1.40
III	1.45	1.71	1.27	2.12	1.39
IV	1.43	1.68	1.25	2.08	1.37
V	1.44	1.70	1.27	1.96	1.39
平均 f _r	1.43	1.70	1.27	2.09	1.39
RSD%	2.48	0.84	0.57	4.25	0.76

液,连续进样 6 次,以人参皂苷 Rb₁ 的保留时间和色谱峰面积为参照,计算出各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果表明,各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均不大于 5%。

表 9 使用不同色谱柱测定并计算得到的各待测成分的相对校正因子

色谱柱	人参皂苷 Rb ₁				
	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _e	人参皂苷 R _{g₂}	人参皂苷 R _d
色谱柱-1	1.48	1.73	1.34	1.90	1.40
色谱柱-2	1.47	1.73	1.31	1.90	1.42
色谱柱-3	1.46	1.73	1.30	1.90	1.42
RSD%	0.48	0.13	1.74	0.07	0.70

表 10 使用不同仪器测定并计算得到的各待测成分的相对校正因子

仪器	人参皂苷 Rb ₁				
	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _e	人参皂苷 R _{g₂}	人参皂苷 R _d
仪器-1	1.49	1.73	1.31	2.05	1.39
仪器-2	1.48	1.70	1.31	2.04	1.38
RSD%	0.41	1.14	0.25	0.20	0.48

表 11 使用不同仪器及色谱柱测定的保留时间差值

仪器	色谱柱	保留时间差				
		\Delta tR(R ₁ /Rb ₁)	\Delta tR(R _{g₁} /Rb ₁)	\Delta tR(R _e /Rb ₁)	\Delta tR(R _{g₂} /Rb ₁)	\Delta tR(R _d /Rb ₁)
Agilent 1260	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -1#	25.54	16.83	14.66	1.22	7.26
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -2#	24.89	15.73	13.31	1.31	7.60
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -3#	24.87	15.87	13.51	1.29	7.31
Waters Alliancee 2695	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -1#	25.52	16.80	14.61	1.22	7.27
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -2#	25.69	16.99	15.12	1.62	6.55
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -3#	26.01	17.51	15.67	1.60	6.45
平均值		25.42	16.62	14.48	1.38	7.07
RSD%		1.62	3.79	5.76	12.39	5.96

表 12 使用不同仪器及色谱柱测定的相对保留值

仪器	色谱柱	相对保留值				
		tR(R ₁ /Rb ₁)	tR(R _{g₁} /Rb ₁)	tR(R _e /Rb ₁)	tR(R _{g₂} /Rb ₁)	tR(R _d /Rb ₁)
Agilent 1260	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -1#	0.43	0.62	0.67	1.03	1.16
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -2#	0.44	0.65	0.70	1.03	1.17
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -3#	0.44	0.64	0.70	1.03	1.16
Waters Alliancee 2695	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -1#	0.43	0.62	0.67	1.03	1.16
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -2#	0.42	0.62	0.66	1.04	1.15
	Agilent ZORBAX Eclipse C ₁₈ -3#	0.41	0.60	0.64	1.04	1.15
平均值		0.43	0.63	0.67	1.03	1.16
RSD%		3.13	2.80	3.32	0.43	0.80

表 13 “一测多评”法与外标法测定 6 种皂苷成分含量的比较

样品	人参皂苷 Rb ₁		三七皂苷 R ₁		人参皂苷 Rg ₁		人参皂苷 Re		人参皂苷 Rg ₂		人参皂苷 Rd	
	ESM	ESM	QASM	ESM	QASM	ESM	QASM	ESM	QASM	ESM	QASM	
YPA8L0006	3.04	0.72	0.72	2.86	2.87	0.40	0.38	0.09	0.09	0.70	0.70	
YPA8J0003	2.48	0.67	0.67	2.62	2.62	0.38	0.37	0.09	0.09	0.60	0.60	
YPA8L0005	3.24	0.69	0.70	2.78	2.78	0.36	0.35	0.09	0.08	0.64	0.64	
YPA8J0002	2.51	0.60	0.60	2.58	2.59	0.37	0.36	0.08	0.07	0.51	0.51	
YPA8L0002	2.49	0.60	0.60	2.64	2.64	0.38	0.37	0.08	0.08	0.65	0.65	
YPA8L0004	2.42	0.69	0.69	2.62	2.62	0.37	0.36	0.08	0.08	0.57	0.57	
YPA8K0001	2.59	0.60	0.60	2.58	2.59	0.36	0.35	0.07	0.07	0.68	0.68	
YPA9L0001	2.47	0.65	0.65	2.59	2.59	0.37	0.36	0.08	0.08	0.61	0.61	
YPA9D0002	2.68	0.80	0.80	2.96	2.97	0.42	0.41	0.08	0.07	0.81	0.81	
YPA9E0003	2.39	0.62	0.63	2.53	2.54	0.37	0.36	0.07	0.07	0.76	0.76	
YPB0G0002	2.47	0.64	0.64	2.59	2.59	0.38	0.37	0.11	0.10	0.90	0.90	
20200401	3.85	0.91	0.91	3.40	3.41	0.50	0.48	0.10	0.09	0.70	0.70	
YPA9D0001	2.12	0.76	0.76	2.48	2.48	0.38	0.36	0.09	0.08	0.53	0.53	
180901	3.02	0.80	0.80	2.95	2.96	0.45	0.43	0.20	0.19	0.75	0.75	
2422702	3.31	0.97	0.98	3.29	3.30	0.48	0.47	0.09	0.08	0.81	0.82	
180450431	2.63	0.77	0.77	2.58	2.58	0.37	0.36	0.09	0.09	0.78	0.78	
春三七 60 头	2.92	0.72	0.73	2.87	2.89	0.49	0.48	0.13	0.13	0.65	0.66	
春三七 120 头	2.20	0.71	0.71	3.04	3.05	0.33	0.32	0.06	0.06	0.59	0.60	
冬三七 60 头	3.58	1.67	1.68	3.24	3.25	0.50	0.49	0.14	0.14	0.68	0.67	
冬三七 120 头	6.43	1.18	1.19	6.39	6.40	0.84	0.81	0.16	0.16	1.61	1.62	
春三七(主根)	2.59	0.77	0.77	3.12	3.13	0.34	0.32	0.08	0.07	1.08	1.08	
春三七(芦头)	5.75	1.56	1.56	5.90	5.91	0.78	0.75	0.14	0.13	1.54	1.54	
春三七(筋条)	2.09	0.67	0.67	2.05	2.05	0.21	0.21	0.06	0.06	0.48	0.49	
春三七(须根)	2.04	0.72	0.72	2.44	2.44	0.39	0.37	0.08	0.07	0.48	0.48	
春三七 20 头	2.63	0.85	0.85	3.33	3.34	0.49	0.47	0.07	0.07	0.95	0.95	
春三七 60 头	3.56	0.53	0.54	3.12	3.13	0.74	0.72	0.13	0.13	0.86	0.87	
春三七 80 头	1.89	0.83	0.83	1.95	1.96	0.38	0.37	0.07	0.07	0.52	0.52	
春三七 120 头	2.68	0.63	0.63	2.80	2.81	0.39	0.38	0.06	0.06	0.72	0.72	

表 14 白云山和黄中药三七粉指纹图谱相似度

样品	等同系数相似度
YPA8J0002(S1)	0.9833
YPA8J0003(S2)	0.9838
YPA8K0001(S3)	0.9815
YPA8L0002(S4)	0.9811
YPA8L0004(S5)	0.9819
YPA8L0006(S6)	0.9847
YPA9D0001(S7)	0.9827
YPB0G0002(S8)	0.9753
YPA9D0002(S9)	0.9830
YPA9E0003(S10)	0.9830
YPA9L0001(S11)	0.9763
20200401(S12)	0.9569
YPA8L0005(S13)	0.9835

2.3.3 稳定性实验

取精密度下的供试品溶液,室温下分别在 0、2、4、8、12、24 h 时检测。结果表明,各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均不大于 5%。

2.3.4 重复性实验

取同一批三七粉约 1.0 g,平行制备供试品溶液 6 份,进样。结果表明,各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均不大于 5%。

2.3.5 指纹图谱测定和色谱峰指认

对所有样品进行测定,确定三七药材和三七粉的共有峰。将混合对照品溶液注入液相色谱仪进行分析,得到各对照品色谱峰。白云山和黄中药所产三七粉、不同厂家三七粉、三七药材各形成 14、23、21 个共有峰,其中指认 5 个色谱峰(图 3~图 5)。

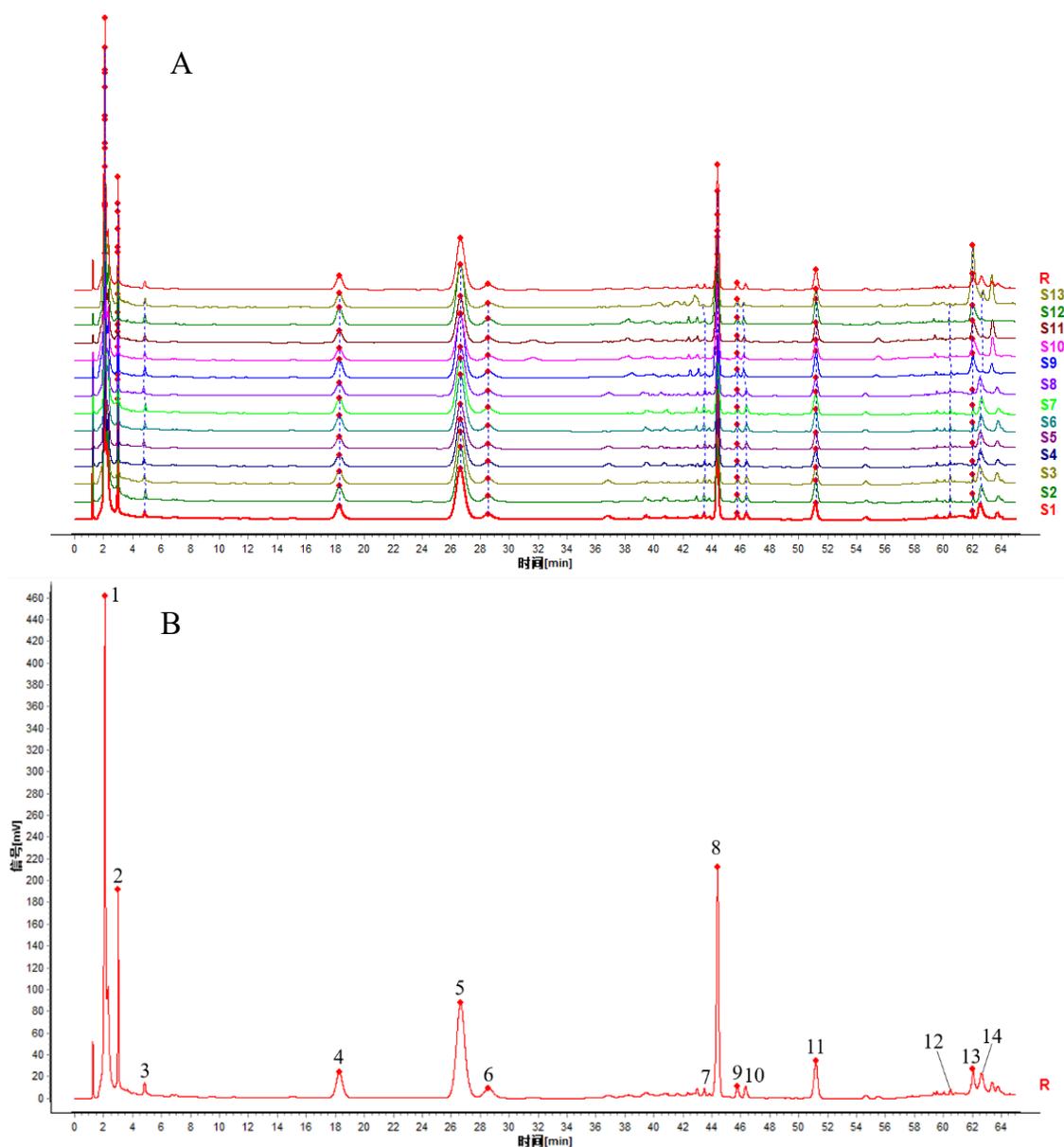


图3 (A) 白云山和黄中药三七粉指纹图谱;(B) 白云山和黄中药三七粉共有模式图

注:(注:4:三七皂苷R₁;5:人参皂苷R_{g1};6:人参皂苷R_e;8:人参皂苷R_{b1};9:人参皂苷R_{g2};11:人参皂苷R_d)

2.3.6 指纹图谱等同系数相似度计算

等同系数相似度结果见表14~表16。根据表中结果,得出质量波动范围的95%置信区间下限分别为0.9797、0.9745、0.9713,以这些值进行评价,实现了白云山和黄中药三七粉中差异批次(表14中S8、S11、S12)、不同厂家三七粉及冬三七120头的区分。但未有效区分出冬三七60头、春三七(筋条)、春三七(须根)、春三七(芦头),同时为了寻找对不同厂家三七粉质量差异贡献度较大的质量标志物,需要结合化学模式识别进行更深入的研究。

表15 不同厂家三七粉指纹图谱相似度

样品	等同系数相似度
白云山和黄中药三七粉标准指纹图谱(S1)	1.0000
康美药业三七粉(S2)	0.9586
云南白药三七粉(S3)	0.9665
云三七三七粉(S4)	0.9739

2.3.7 化学模式识别研究

(1) 主成分分析(PCA)

将三七药材共有峰面积数据导入SIMCA-P 14.1软件中,进行PCA分析,PCA得分图见图6。由图可

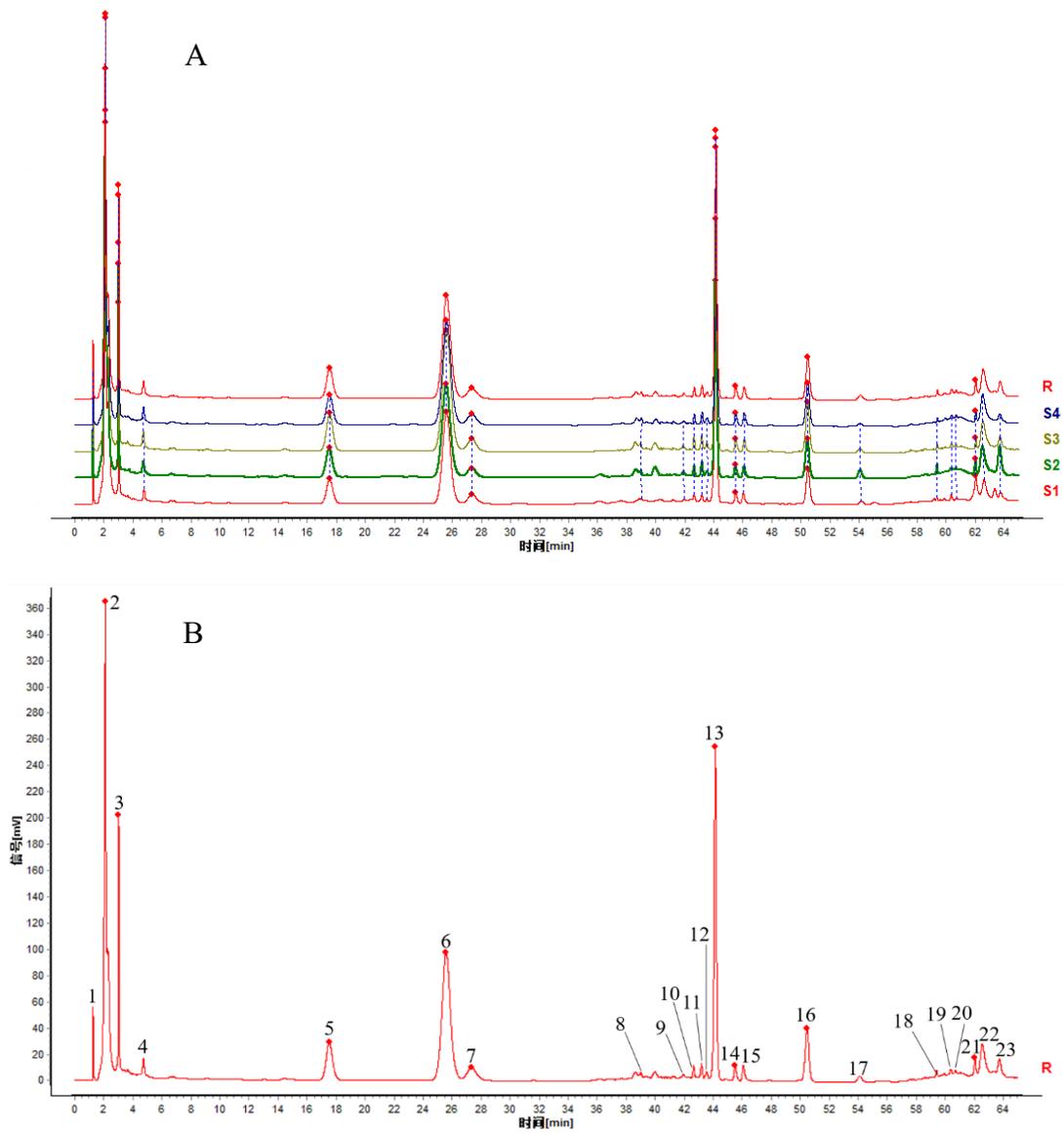


图4 (A) 不同厂家三七粉指纹图谱(S1为白云山和黄中药三七粉标准指纹图谱);(B) 不同厂家三七粉共有模式图
注:(注:5:三七皂苷R₁;6:人参皂苷R_{g1};7:人参皂苷Re;13:人参皂苷R_{b1};14:人参皂苷R_{g2};16:人参皂苷R_d)

见,PCA可实现冬三七60头、冬三七120头、春三七(芦头)、春三七(须根)的区分,但春三七(筋条)没有得到有效区分。

(2) 聚类分析(CA)

将三七药材共有峰面积数据导入SPSS 26软件中,以欧式平方距离为测度,采用组间联接法进行CA分析,CA谱系图见图7。由图可见,CA可将三七药材聚为五类,冬三七60头、冬三七120头、春三七(芦头)、春三七(须根)各为一类,其余样品为一类,所得结果与PCA结果一致。

(3) 偏最小二乘回归分析(PLS-DA)

将三七药材共有峰面积数据导入SIMCA-P 14.1软件中,进行有监督的PLS-DA分析,PLS-DA得分图见图8。由图可见,春三七主根主要集中于右下象限,冬三七位于左下象限,其他药用部位位于上半部分。

通过对不同厂家三七粉进行PLS-DA分析,发现质量标志物色谱峰中峰5(三七皂苷R₁)、峰13(人参皂苷R_{b1})、峰14(人参皂苷R_{g2})、峰16(人参皂苷R_d)的变量投影重要度(Variable importance for the projection, VIP)值大于1(图9)。

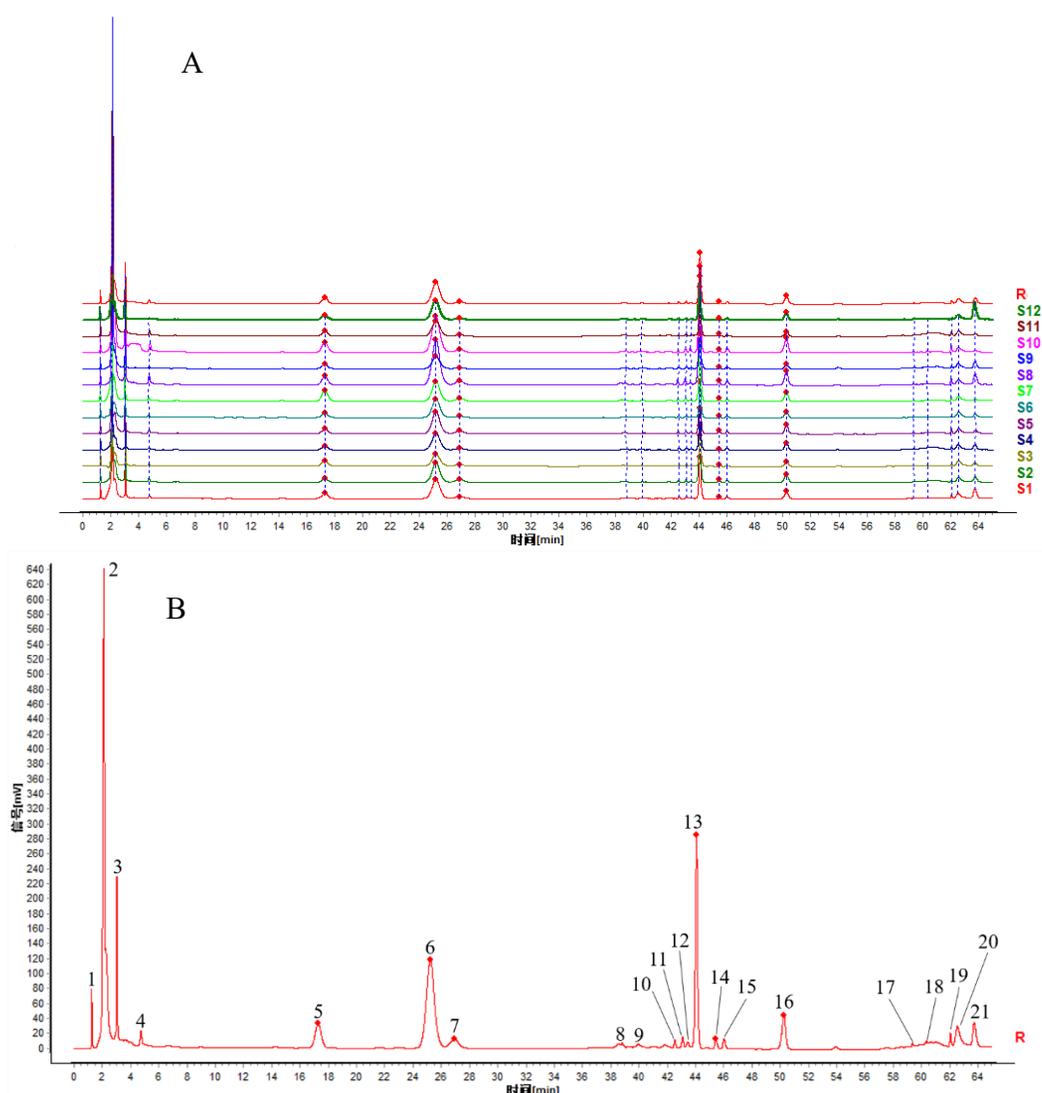


图5 (A)三七药材指纹图谱;(B)三七药材共有模式图

注:(注:5:三七皂苷R₁;6:人参皂苷R_{G1};7:人参皂苷Re;13:人参皂苷R_{B1};14:人参皂苷R_{G2};16:人参皂苷R_d)

3 讨论与结论

本实验在确定三七粉质量标志物的基础上建立了皂苷成分“一测多评”法和三七素含量测定方法,方法更简单快捷,待测成分分离度良好,且降低了含量测定成本,方法学考察符合要求,为三七粉质量控制提供参考。建议三七粉质量标准制定时可考虑增加相关指标性成分。

三七素含量测定结果表明:①三七素含量与头数关系不大,与崔秀明、徐娜等的研究结果一致^[13-15];②冬三七三七素含量高于春三七,原因可能与总氨基酸的积累有关^[16],而冬三七中多种氨基酸含量高于春三七^[17],三七中某些氨基酸可能会参与其生物合成;③芦

表16 三七药材指纹图谱相似度

样品	等同系数相似度
春三七20头(S1)	0.9907
春三七60头(S2)	0.9903
春三七80头(S3)	0.9818
春三七120头(S4)	0.9861
春三七60头(S5)	0.9872
春三七120头(S6)	0.9848
冬三七60头(S7)	0.9884
冬三七120头(S8)	0.9532
春三七筋条(S9)	0.9840
春三七芦头(S10)	0.9719
春三七须根(S11)	0.9778
春三七主根(S12)	0.9849

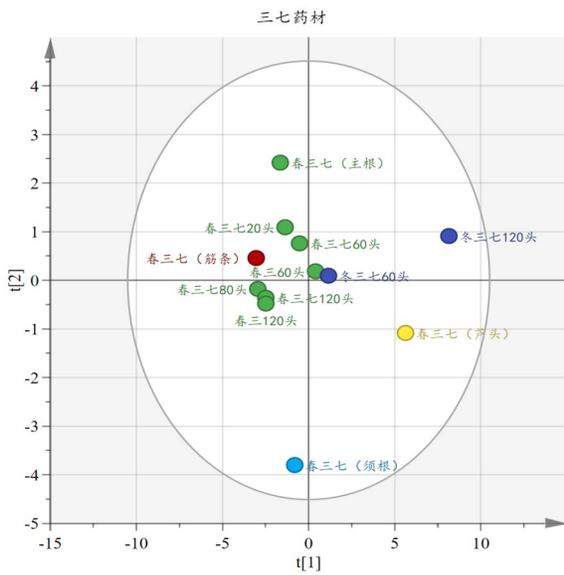


图6 三七药材PCA得分图

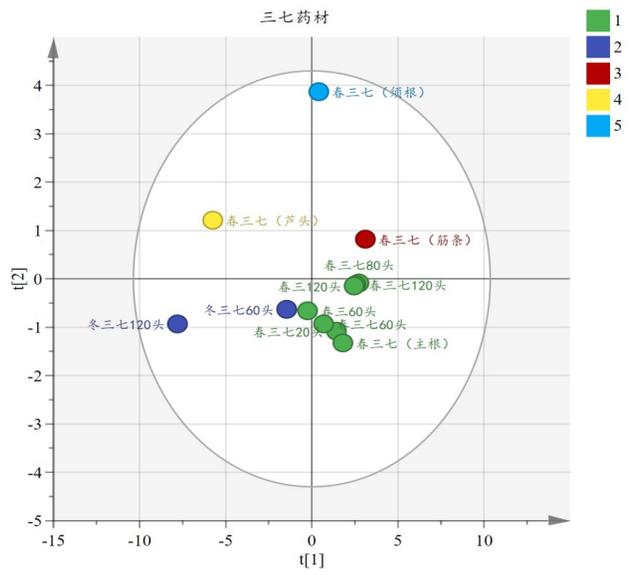


图8 三七药材PLS-DA得分图

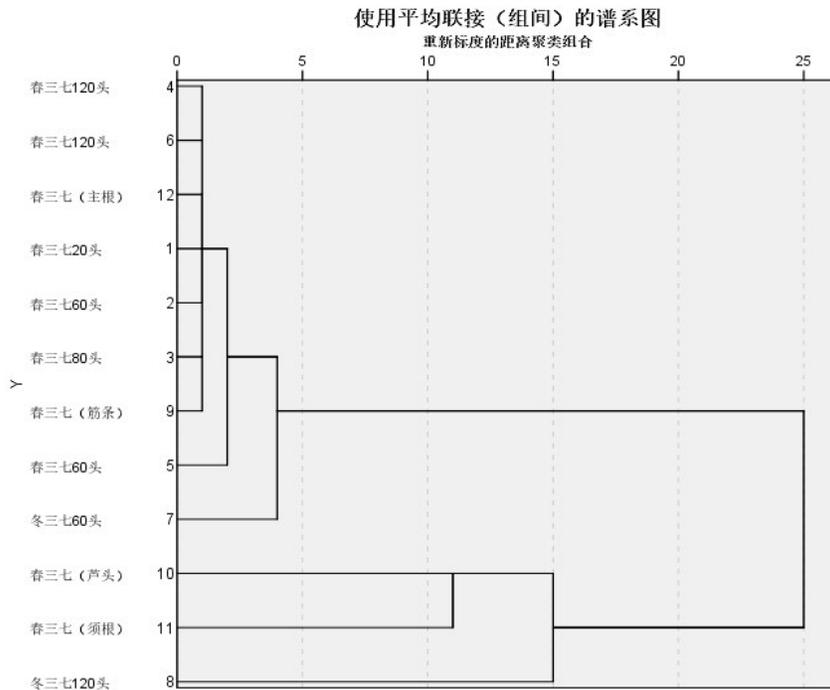


图7 三七药材CA谱系图

头、须根、筋条的三七素含量高于主根,与黄海霞等的研究结果相符^[18]。有研究表明,三七素作为富氮有机物可能经成熟组织运送至生长分化能力强的组织^[19],因此三七素在这三个部位的积累可能多于主根;④白云山和黄中药三七粉中三七素可能为市场上主流厂家产品中的优势指标,这可能与不同厂家的生产工艺或原料药材来源不同有关。拟定优质三七粉三七素

含量不小于1.0%并列入质量标准。

三七皂苷含量测定结果表明:①总皂苷及单体皂苷含量和头数关系不大,与王其华、徐娜等的研究结果相同^[14,20];②不同药用部位中,总皂苷及单体皂苷含量趋势均表现为芦头>主根>须根>筋条,与已有研究结果基本相符^[15,20-21];③冬三七中单体皂苷及总皂苷含量均高于春三七,以往有研究表明春三七皂苷含量

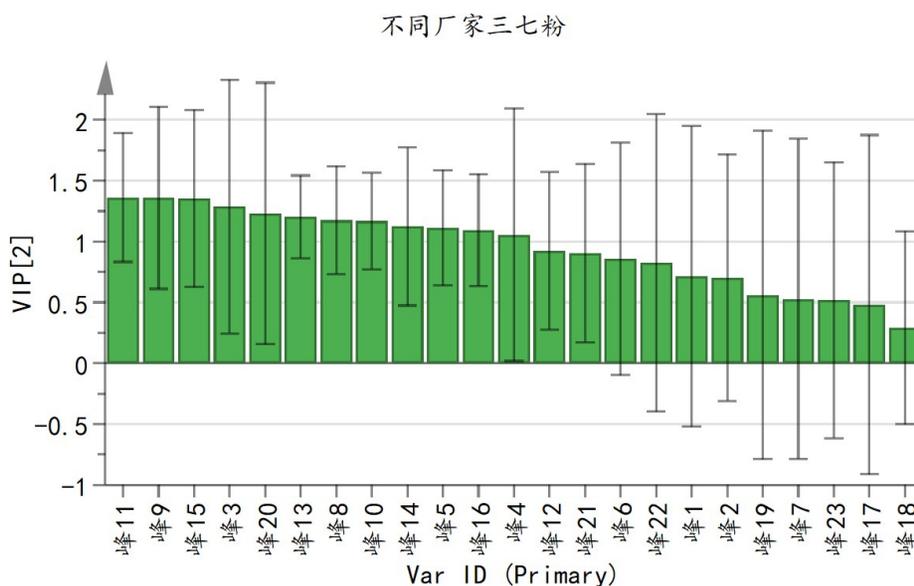


图9 不同厂家三七粉 VIP 图

高于冬三七^[21],但有研究发现种子成熟过程的生理活动可能有利于三七皂苷的形成^[23-24],因此冬三七皂苷含量也可能会高于春三七^[14,22]。拟定优质三七粉中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_g₁、R_e、R_b₁、R_g₂、R_d 含量之和不少于 6.5% 并列入质量标准。

综合三七素和皂苷成分含量测定结果,考虑应以冬三七为三七粉的原料。目前三七主要的药用部位为主根,建议在三七粉生产中也应提高三七须根、芦头的利用,避免三七药用资源的浪费。

另外,本文在 2020 年版《中国药典》基础上新增了三七粉 HPLC 指纹图谱,并对指纹图谱相关色谱峰进行指认,建议在制定质量标准时增加 HPLC 指纹图谱测定。指纹图谱实验对供试品制备方法进行了考察,包括不同提取方法(超声提取和加热回流提取);提取溶剂(水、不同浓度甲醇溶液、不同浓度乙醇溶液);提取时间(30、45、60 min)等对三七粉指纹图谱的影响。对色谱条件进行了考察,包括不同流动相(乙腈-水、

乙腈-0.1% 磷酸水);不同的柱温(20、25、30℃);波长范围(200-400 nm 全扫描),以色谱峰分离度、峰型、峰数为依据,确定了最优条件。将等同系数模型和模式识别联用应用于三七粉和原料药材质量一致性评价,相似度评价很好地区分出白云山和黄中药三七粉中的三个差异批次和不同厂家三七粉,其原因可能与生产原料来源、车间生产工艺及质量控制方法不同有关。模式识别研究一方面实现了不同三七药材的区分,表明不同采收期、不同部位三七存在差异,不同部位三七的质量评价结果与孟哲研究结果相符^[25];另一方面,得出质量标志物中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_b₁、R_g₂、R_d 可作为不同厂家三七粉的质量差异标志物,对于质量差异的贡献度较大。

综上,本文根据三七粉质量标志物对 2020 年版《中国药典》三七粉含量测定项进行修订,新增 HPLC 指纹图谱测定法。本文研究方法和结果可为以后三七粉的质量标准制定及原料药材选择提供参考。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- 2 刘娇, 秦子楠, 刘国秀, 等. “一带一路”倡议下中医药贸易在东盟现状分析及发展策略思考. 世界中医药, 2021, 16(11):1769-1774.
- 3 侯琴. 三七超微粉体物理特性及有效成分的提取. 哈尔滨: 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2014.
- 4 刘梦楠, 熊慧, 薛雪, 等. 三七炮制历史及标准现状分析. 中华中医药杂志, 2019, 34(4):1477-1480.
- 5 刘永利, 赵振霞, 苏建, 等. 三七粉质量评价研究. 中国药事, 2017, 31(4):407-411.
- 6 阳长明, 杨平, 刘乐环, 等. 中药质量标志物(Q-Marker)研究进展及对中药质量研究的思考. 中草药, 2021, 52(9):2519-2526.

- 7 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念. 中草药, 2016, 47(9):1443-1457.
- 8 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):282-287.
- 9 谷瑞敏. 指纹图谱等同系数的理论、方法及应用. 天津: 天津大学博士研究生学位论文, 2008.
- 10 孙莹莹, 孙巍, 王萍, 等. 基于UPLC指纹图谱的逍遥片批次一致性评价研究. 中草药, 2020, 51(20):5154-5165.
- 11 黄诗淇, 武正华, 缪文清, 等. 基于高效液相色谱法结合层次分析和正交设计法优选土茯苓醇提工艺. 中南药学, 2021, 19(4):642-648.
- 12 俞越童, 邹慧琴, 姚月保, 等. 基于AHP-CRITIC法结合正交设计优选复方血竭跌打膏中四味中药提取工艺. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8):2807-2816.
- 13 崔秀明, 徐璐珊, 王强, 等. 三七中三七素的含量测定. 中国药学杂志, 2005(13):1017-1019.
- 14 徐娜. 三七药材商品质量影响因素研究. 昆明: 昆明理工大学硕士研究生学位论文, 2016.
- 15 刘大会, 徐娜, 郭兰萍, 等. 三七药材质量特征和商品规格等级标准研究. 中国中药杂志, 2016, 41(5):776-785.
- 16 李冠烈. 三七的现代研究与进展(一). 世界中西医结合杂志, 2008(10):619-623.
- 17 郝莉雨, 杨小玉, 秦梦圆, 等. “春七”和“冬七”中17种氨基酸的比较研究. 现代中药研究与实践, 2019, 33(3):9-12.
- 18 黄海霞, 徐怡, 牛延菲, 等. 柱前衍生RP-HPLC检测三七中三七素和18种游离氨基酸. 广州化工, 2021, 49(3):66-69.
- 19 Xu Q, Liu F, Chen P, et al. β -N-Oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP) content in *Lathyrus sativus*: the integration of nitrogen and sulfur metabolism through β -cyanoalanine synthase. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):526.
- 20 王其华, 唐爱国, 濮存海. 三七不同药用部位及规格所含皂苷总量比较. 药学与临床研究, 2012, 20(6):499-501.
- 21 孙大雨, 王德民, 王彦波. 不同季节及用药部位三七药材的质量分析. 黑龙江医药, 2014, 27(3):634-635.
- 22 刘格, 逢晓阳, 芦晶, 等. 云南文山春七和冬七中皂苷类成分的UPLC-MS/MS及HPLC分析. 中南药学, 2020, 18(5):838-843.
- 23 崔秀明, 陈中坚, 王朝梁, 等. 三七皂苷积累规律的研究. 中国中药杂志, 2001, 26(1):25-26.
- 24 徐率, 赵昶灵, 陈中坚, 等. 三七皂苷时空积累特征的研究进展. 中国农学通报, 2018, 34(7):13-17.
- 25 孟哲, 王丽君, 黄洋, 等. 中药三七不同药用部位的指纹图谱及模式识别研究. 中国药学杂志, 2020, 55(7):504-509.

Improvement Researches on Quality Standard of *Radix Notoginseng* Powder Based on Quality Marker

Liu Yaochen¹, Guo Haibiao², Zhang Yang³, Wang Deqin², Liu Jianting^{3,4}, Li Chuyuan², Zhang Hongbing^{3,4}, Han Yanqi^{3,4}, Zhang Tiejun^{3,4,5}, Xu Jun^{3,4,5}

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Guangzhou Baiyun Mountain Hutchison Whampoa Traditional Chinese Medicine Co. Ltd., Guangzhou 510515, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 4. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 5. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

Abstract: Objective To improve the quality standard and supply the scientific basis for *Radix Notoginseng* Powder based on the results of the quality marker (Q-Marker) of *Radix Notoginseng* Powder. Methods High performance liquid chromatography technology, combined with QASM and other analytical methods were used to determine the content of Q-Marker. The difference analysis of *Radix Notoginseng* Powder of different manufacturers and different commodity norms of raw materials was carried out. The fingerprints were established and a new similarity calculation model—equivalence coefficient method combined with pattern recognition was used to evaluate the quality consistency of the *Radix Notoginseng* Powder and its raw materials. Result There were differences in the content of dencichine in the *Radix Notoginseng* Powder from different manufacturers. The content of dencichine in the *Radix Notoginseng* Powder of Guangzhou Baiyun Mountain and Hutchison Whampoa Co., Ltd. was higher than that of other manufacturers, suggesting

that dencichine was the advantage index of it. The content of dencichine and saponins in the raw materials had little relationship with the number, but had correlation with the season and part. The content of saponins showed as Dong *Radix Notoginseng*>Chun *Radix Notoginseng*, reed head> tap root> fibrous root> tendon. Dencichine showed Dong *Radix Notoginseng*>Chun *Radix Notoginseng*, fibrous root> reed head> tendon> tap root. We applied the equivalent coefficient method to calculate the similarity of fingerprints to realize the distinction between different manufacturers of *Radix Notoginseng* Powder, and further combined the pattern recognition to distinguish the raw materials of different norms. Conclusion The established method for content determination and fingerprint is stable, feasible, specific, and has significant meaning for controlling the quality of *Radix Notoginseng* Powder. Compared with the 2020 edition of the *Chinese Pharmacopoeia*, this article has revised the content determination items of *Radix Notoginseng* Powder and added HPLC fingerprint, which can provide a scientific basis for the promotion of quality standards for *Radix Notoginseng* Powder and the selection of raw materials.

Keywords: *Radix Notoginseng* Powder, Quality marker, Content determination, Fingerprint, Quality standard

(责任编辑:周阿剑、刘玥辰, 责任译审:周阿剑, 审稿人:王瑀、张志华)