

本文引用: 刘乐平, 张苡嘉, 何子洲, 胡新悦, 黄嘉诚, 严建业, 王 炜. UPLC 指纹图谱与一测多评法结合化学模式识别分析的扣子七质量控制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 2032-2042.

UPLC 指纹图谱与一测多评法结合化学模式识别 分析的扣子七质量控制研究

刘乐平¹, 张苡嘉^{1,2}, 何子洲³, 胡新悦^{1,2}, 黄嘉诚^{1,2}, 严建业^{1,2*}, 王 炜^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院/中药民族药物创新与发展实验室, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208; 3. 湘潭大学化学学院, 湖南 湘潭 411105

[摘要] **目的** 建立扣子七的超高效液相(ultra high performance liquid chromatography, UPLC)指纹图谱, 同时建立一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)对 8 个化学成分进行含量测定, 并结合化学模式识别分析对扣子七进行质量评价。**方法** 采用 Waters CORTECS UPLC T3 色谱柱, 以 0.1% 磷酸水-乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 建立扣子七 UPLC 指纹图谱, 进行聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析, 并以竹节参皂苷 IVa 为内标, 建立人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁ 和金盏花苷 E 的相对校正因子, 计算 8 种成分的含量, 并与外标法测定结果进行比较, 以验证 QAMS 方法的准确性、重复性及可行性。**结果** 14 批指纹图谱共确定 12 个共有峰, 指认人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁ 和金盏花苷 E 8 种主要特征成分。14 批样品图谱的相似度在 0.793-0.993 之间, 聚类分析可将 14 批样品分为 4 类, 主成分分析得到 4 个主成分, 累计方差贡献率为 83.20%, 正交偏最小二乘法-判别分析筛选出 5 个差异质量标志物。QAMS 法计算值与外标法实测值无统计学差异。**结论** 该研究建立的扣子七 UPLC 指纹图谱结合一测多评法简便可行, 结合化学模式识别可有效为扣子七药材整体质量控制提供参考。

[关键词] 扣子七; 超高效液相; 指纹图谱; 一测多评; 质量控制; 化学模式识别

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.013

Quality control methods for Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma) by combining UPLC fingerprint and QAMS method with chemical pattern recognition

LIU Leping¹, ZHANG Yijia^{1,2}, HE Zizhou³, HU Xinyue^{1,2}, HUANG Jiacheng^{1,2}, YAN Jianye^{1,2*}, WANG Wei^{1*}

1. School of Pharmacy (Traditional Chinese Medicine and Ethnomedicine Innovation & Development International Laboratory), Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Science & Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The College of Chemistry, Xiangtan University, Xiangtan, Hunan 411105, China

[Abstract] **Objective** To establish an ultra high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint for Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma), to develop a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method for the quantitative determination of eight chemical components of it, and to conduct a quality evaluation of Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma) by

[收稿日期] 2024-07-31

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(22A0242); 中药炮制技术传承基地开放基金项目(2022ZYPZ06, 2022ZYPZ12)。

[通信作者] * 王 炜, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wangwei402@hotmail.com; 严建业, 男, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, E-mail: yanjianye201@126.com。

combining chemical pattern recognition analysis. **Methods** A Waters CORTECS UPLC T3 column was used with a mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid water–acetonitrile solution for gradient elution. A UPLC fingerprint of Kouziqui (*Panacis Majoris Rhizoma*) was established at a column temperature of 30°C and a flow rate of 0.3 mL/min, followed by cluster analysis, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares–discriminant analysis (OPLS–DA). Using chikusetsusaponin IVa as an internal standard, relative correction factors were established for ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb₃, chikusetsusaponin IV, ginsenoside Rd, zingibroside R₁, and calendulose E. The content of these eight components was determined and compared with the results obtained by the external standard method to verify the accuracy, repeatability, and feasibility of the QAMS method. **Results** Twelve common peaks were identified from the fingerprints of 14 batches of samples, recognizing ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb₃, chikusetsusaponin IV, chikusetsusaponin IVa, ginsenoside Rd, zingibroside R₁, and calendulose E as the main characteristic components. The similarity of the chromatograms among the 14 batches of samples ranged from 0.793 to 0.993. Cluster analysis divided the 14 batches of samples into four categories. PCA yielded four principal components with a cumulative variance contribution rate of 83.20%, and OPLS–DA identified five differential quality markers. The calculated values by the QAMS method showed no statistically significant differences from the measured values obtained by the external standard method. **Conclusion** The established UPLC fingerprint combined with the QAMS method for Kouziqui (*Panacis Majoris Rhizoma*) is simple and feasible. Coupled with chemical pattern recognition, it effectively provides a reference for the overall quality control of Kouziqui (*Panacis Majoris Rhizoma*).

[**Keywords**] Kouziqui (*Panacis Majoris Rhizoma*); ultra high performance liquid chromatography; fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single marker; quality control; chemical pattern recognition

扣子七又名珠子参、大叶三七、钮子七、疙瘩七、盘七,收载于2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》),为五加科人参属植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎,分布于湖南、湖北、云南和重庆等地,为土家族药物七十二“七”药之上品,被誉为“土家圣药”之一,有补肺养阴、祛瘀止痛、止血等功效^[1]。现代药理学研究显示,扣子七具有抗肿瘤、抗炎镇痛、抗氧化、心脑血管保护及肝脏保护等多种药理活性^[2]。其主要化学成分包括皂苷类和多糖类等,皂苷类成分中以齐墩果烷型的人参皂苷 Ro 和竹节参皂苷 IVa 含量最高^[3]。

《中国药典》仅对珠子参的竹节参皂苷 IVa 单一指标进行含量测定,但中药化学成分复杂,单一成分难以全面反映扣子七整体质量的优劣,而指纹图谱在中药分析方面具有整体性、能灵敏反映样品特征的优点^[4-5]。有研究建立了珠子参总皂苷的 HPLC 特征图谱^[6],还有研究对扣子七采用 HPLC 法对扣子七中多指标成分进行定量检测及质量控制^[7]。但尚未有研究使用 UPLC 法对扣子七进行质量评价,UPLC 比 HPLC 具有更短的分析时间、更好的分离效果、更加经济环保。中药质量控制提倡全面性,故指纹图谱结合多指标成分测定为中药质量控制的直接有效的方法^[8-12]。但传统的多指标含量测定方法存在对照品

紧缺,成本高昂等缺点。一测多评法下的多指标质量控制解决了上述的缺点,它整合了内标、校正因子等方法的优点,仅用一个对照品(价廉,易得,有效)就可以进行多成分的含量测定,极大的降低成本,减轻工作量^[13-20]。目前,还未见有研究建立扣子七的一测多评含量测定方法。

因此,本研究采用 UPLC 建立扣子七药材的指纹图谱及一测多评方法,以扣子七中成分含量相对较高的人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁ 和金盏花苷 E 为指标进行含量测定,并结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法–判别分析对扣子七进行整体质量评价,旨在为扣子七药材的质量控制和相关研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY H-CLASS UPLC 液相色谱仪(美国 Waters 公司);XSR205DU/A 十万分之一分析天平,ME204E 万分之一分析天平(梅特勒–托利多仪器上海有限公司);Option R7 ultra AN 超纯水系统(英国 ELGA LabWaters 公司);KQ-800DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 对照品及试剂

对照品人参皂苷 Rb₁(批号:WP23101801,纯度≥98.0%)、人参皂苷 Ro(批号:WP23090604,纯度≥

98.0%)、人参皂苷 Rb₃(批号:wkq23061504,纯度≥98.0%)、竹节参皂苷 IV(批号:WP23072713,纯度≥98.0%)、竹节参皂苷 IV a(批号:WP23051713,纯度≥98.0%)、人参皂苷 Rd(批号:wkq23050807,纯度≥98.0%)、姜状三七皂苷 R₁(批号:wkq22091910,纯度≥98.0%)均购自四川省维克奇生物科技有限公司;金盏花苷 E(批号:F13HB175447,纯度≥98.0%)购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈[色谱纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 样品

14 批扣子七样品具体产地信息见表 1,经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定为正品,药材符合《中国药典》的规定品种,其中 S2、S5、S10 和 S12 的样品为羽叶三七 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎,其余的产地样品为珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters CORTECS UPLC T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm,1.6 μm),流动相为 0.1%磷酸水(A)–乙腈(B),梯度洗脱(0~7 min,30%~32% B;7~10 min,32%~35% B;10~13 min,35%~48% B;13~15 min,48%~54% B;15~25 min,54%~70% B;25~30 min,70%~70% B);流速 0.3 mL·min⁻¹;检测波长 203 nm;柱温 30 ℃;进样量 1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IV a、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁ 以及金盏花苷 E 对照品适量,置于 2 mL 量瓶中,用 60%

乙醇溶解并定容,得各对照品储备液,再取各对照品储备液适量,定容至 5 mL,得到浓度分别为303.70、2 279.09、299.44、1 366.18、1 910.64、380.76、189.15、521.60 μg·mL⁻¹ 混合对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取扣子七粉末约 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 60%乙醇溶液 50 mL,称定重量,超声提取(功率 360 W,频率 40 kHz) 40 min,放冷再称定重量,用 60%乙醇溶液补足减失的重量,精密称定,过 0.22 μm 有机滤膜,即得供试品溶液。

2.3 指纹图谱研究

2.3.1 精密度实验 取同一供试品(S2)的溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以人参皂苷 Ro 峰为参照峰,计算各主要共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.8%,相对峰面积 RSD 均小于 0.85%,结果表明该方法精密度良好。

2.3.2 稳定性实验 取同一供试品(S2)的溶液,按“2.1”项下色谱条件,于 0、2、4、8、16、24、36、48 h 分别进样 1 次,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以人参皂苷 Ro 峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.96%,相对峰面积 RSD 均小于1.93%,结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.3 重复性实验 取同一供试品(S2),按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以人参皂苷 Ro 峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.31%,相对峰面积 RSD 均小于1.64%,结果表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 取 14 批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。将 14 批样品图谱导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版),采用平均数生成对照图谱,设置时间窗宽度为 0.1 min,进行多点校正 Mark 峰及全谱

表 1 扣子七产地信息

Table 1 Origin information of Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	云南玉龙县	23061001	S8	湖北神农架	23061202
S2	湖南石门县	24030901	S9	四川雅江县	23061203
S3	湖南桑植县	23061002	S10	四川大邑县	24031001
S4	湖南石门县	23061003	S11	贵州兴义县	24031002
S5	云南维西县	24030902	S12	贵州赫章县	24031201
S6	云南禄劝县	23061201	S13	安徽亳州	23061204
S7	湖南桑植县	24030903	S14	甘肃西和县	23061205

匹配,生成共有峰。结果 14 批样品指纹图谱共确认 12 个共有峰(图 1),14 批指纹图谱的相似度在 0.793~0.993 之间。

通过供试品(S2)溶液色谱图与混合对照品色谱图进行归属比对,指认出指纹图谱中 8 个化合物(图2),峰 1 为人参皂苷 Rb_1 ,峰 2 为人参皂苷 Ro ,峰 3 为人参皂苷 Rb_3 ,峰 4 为竹节参皂苷 IV,峰 5 为竹节参皂苷 IVa,峰 6 为人参皂苷 Rd ,峰 8 为姜状三七皂苷 R_1 ,峰 9 为金盏花苷 E。

2.3.5 聚类分析 将 14 批扣子七样品中 12 个共有峰的峰面积导入 SPSS 25.0 软件,采用系统聚类分析方式,以组间联接法和欧式平方距离进行分类,详见图 3。当欧式距离=10 时,14 批扣子七样品分

为 4 类,S2、S9、S10 样品各自单独聚为一类,其余样品聚为一类。

2.3.6 主成分分析 以 14 批扣子七指纹图谱中 12 个共有峰的峰面积为变量,利用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行主成分分析,以主成分特征值>1 为提取标准得到 4 个主成分,其方差贡献率分别为 32.06%、22.52%、16.03%、12.60%,累计方差贡献率为 83.20%,可以代表 12 个共有成分的大部分信息,详见表 2。主成分 1 贡献率较高的有峰 5、峰 7 和峰 12,其中峰 12 为负载荷,主成分 2 贡献率较高的有峰 8 和峰 9,均为负载荷,主成分 3 贡献率较高的有峰 1 和峰 6,主成分 4 贡献率较高的有峰 2,详见表 3。将 4 个主成分的得分分别记为 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 ,以各

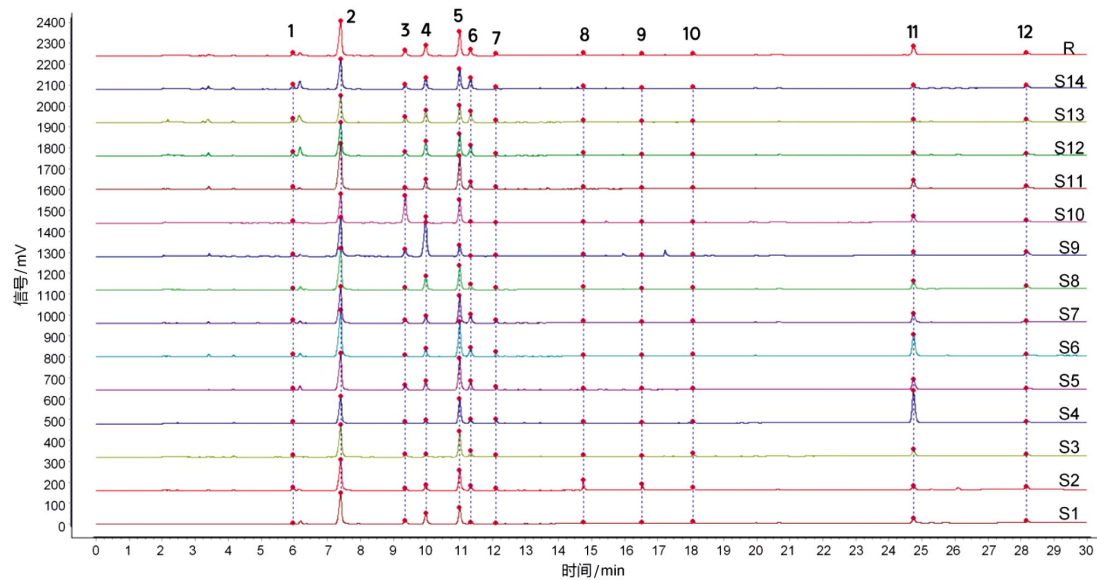


图 1 14 批次扣子七 UPLC 指纹图谱

Fig.1 UPLC fingerprints of 14 batches of Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

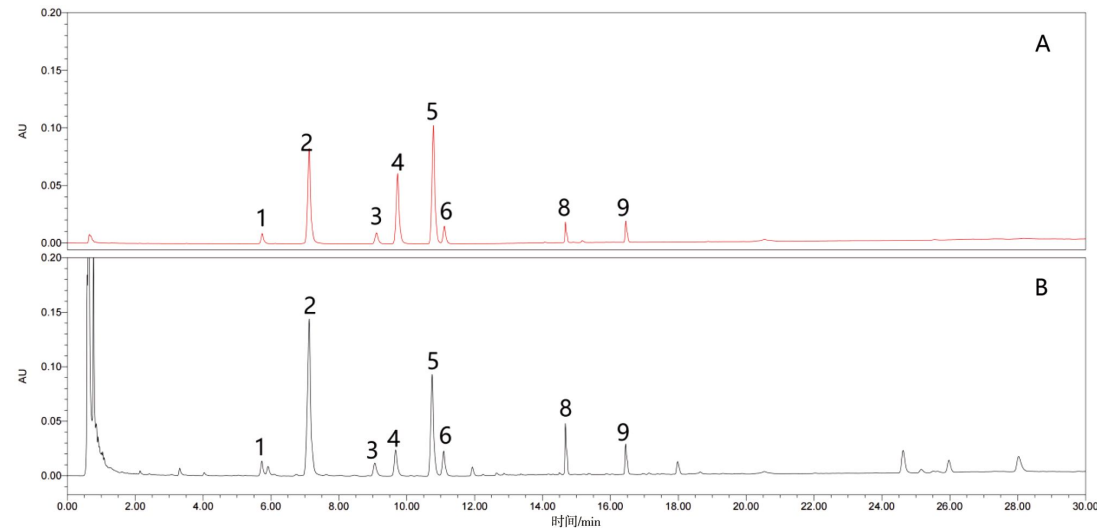


图 2 对照品(A)和供试品(B)色谱图

Fig.2 Chromatograms of the reference standard (A) and test sample (B)

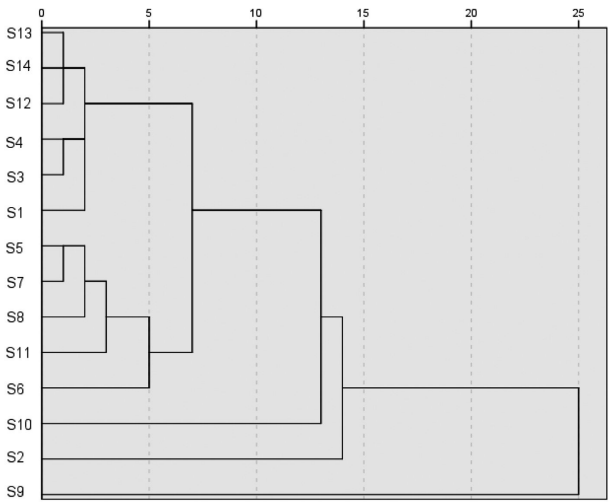


图 3 14 批扣子七样品聚类分析图

Fig.3 Clustering analysis of 14 batches of kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

表 2 扣子七主成分分析特征值及方差贡献率

Table 2 Eigenvalues and variance contribution rates of PCA for Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

主成分	特征值	方差占比/%	累积方差比例/%
主成分 1	3.847	32.06	32.06
主成分 2	2.702	22.52	54.57
主成分 3	1.923	16.03	70.60
主成分 4	1.512	12.60	83.20

表 3 扣子七 PCA 因子载荷矩阵

Table 3 PCA factor loading matrix for Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
1	0.089	-0.311	0.792	-0.458
2	0.276	0.258	0.311	0.729
3	-0.462	0.352	-0.246	-0.583
4	-0.625	0.206	0.405	0.514
5	0.846	0.174	0.014	0.105
6	0.503	-0.277	0.760	-0.248
7	0.887	-0.007	0.196	0.021
8	-0.098	-0.919	-0.180	0.167
9	-0.090	-0.917	-0.198	0.074
10	0.457	-0.668	-0.287	0.116
11	0.723	0.311	-0.322	0.066
12	-0.809	-0.190	0.317	0.209

主成分对应的贡献率作为权重系数,建立主成分综合得分模型:

$$Y=0.320\ 6Y_1+0.225\ 2Y_2+0.160\ 3Y_3+0.126\ 0Y_4\ (1)$$

得分结果详见表 4,得分反映各批次扣子七的质量情况,得分越高,则质量越好。将 14 批样品中的 12 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进

表 4 14 批扣子七主成分因子得分及排序

Table 4 Scores and rankings of the principal components for 14 batches of Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

编号	Y1	Y2	Y3	Y4	Y	排序
S1	-1.281 8	0.301 0	-1.931 6	0.406 9	-0.601 5	11
S2	-0.705 1	-4.930 1	-1.572 3	0.522 7	-1.522 5	14
S3	0.443 2	-0.315 0	-1.118 1	-0.145 9	-0.126 5	8
S4	2.254 7	1.258 9	-1.476 0	-0.489 2	0.708 1	3
S5	1.692 8	0.646 3	-0.042 8	0.025 6	0.684 6	4
S6	3.469 5	0.667 4	0.292 9	1.115 1	1.450 1	1
S7	1.366 3	0.019 0	0.285 3	-0.242 4	0.457 5	5
S8	-0.362 9	0.485 8	0.055 3	1.500 2	0.190 9	6
S9	-4.443 8	1.446 5	0.761 6	1.967 1	-0.729 0	12
S10	-2.156 2	1.917 8	-1.766 8	-2.458 7	-0.852 4	13
S11	0.881 9	0.658 1	0.841 6	1.212 0	0.718 6	2
S12	-0.212 5	-0.362 6	1.815 2	-0.836 5	0.035 8	7
S13	-0.378 0	-0.847 2	1.756 8	-1.310 3	-0.195 5	9
S14	-0.567 9	-0.945 8	2.098 8	-1.266 7	-0.218 2	10

行 PCA 处理,得分图详见图 4,与聚类结果相似。

2.3.7 正交最小偏二乘法-判别分析(OPLS-DA) 为了进一步分析不同产地扣子七之间的差异性,将 14 批扣子七指纹图谱中 12 个共有峰的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析,该模型参数 $R^2X=0.972$, $R^2Y=0.980$, $Q^2=0.355$,其得分图结果与聚类分析和主成分分析结果相似,见图 5。以 $VIP>1$ 为筛选标准,峰 4(竹节参皂苷 IV)、峰 3(人参皂苷 Rb3)、峰 9(金盏花苷 E)、峰 8(姜状三七皂苷 R₁)和峰 10 的 VIP 值分别为 1.245 8、1.235 3、1.082 6、1.080 5 和 1.016 3,均大于 1,这 5 个成分可作为扣子七潜在的差异质量标志物。对 OPLS-DA 模型进行置换 200 次,得置换检验图,详见图 6。结果 R^2 和 Q^2 在 Y 轴的截距均小于原始值,表明建立的模型未过度拟合。详见图 7。

2.4 含量测定方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密移取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL,分别用 60%乙醇定容至 2 mL,制备 6 份不同浓度的混合对照品溶液,再将人参皂苷 Rb₃ 母液稀释 5 倍,按“2.1”项下色谱条件,依次进样,记录色谱图峰面积。以相应成分的峰面积为纵坐标,对照品浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线,得到人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁ 和金盏花苷 E 8 种成分的回归方程及线性范围,分别以信噪比(S/N)为 3 和 10 时的浓度计算各个成分的检测限(limit of defection, LOD)及定量限(limit of quantitation, LOQ)。详见表 5。

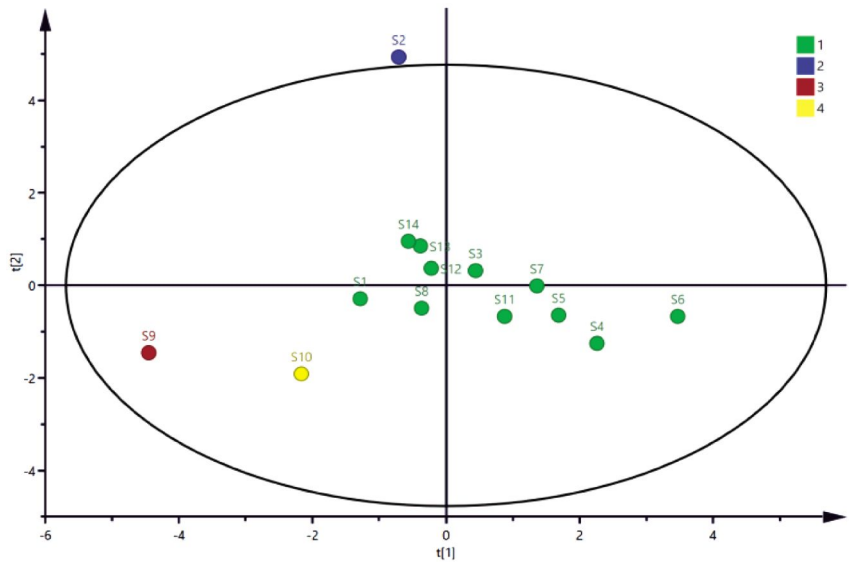


图 4 扣子七主成分分析得分图

Fig.4 PCA score plot

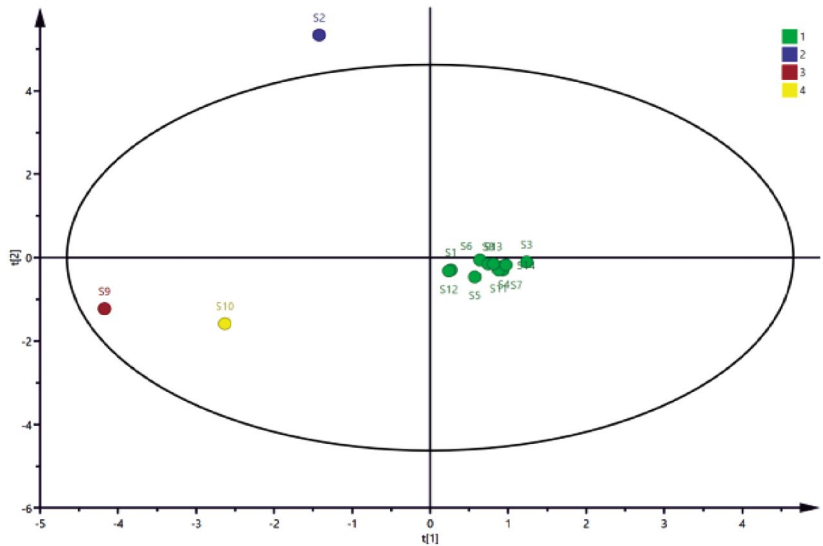


图 5 扣子七 OPLS-DA 得分图

Fig.5 OPLS-DA score plot

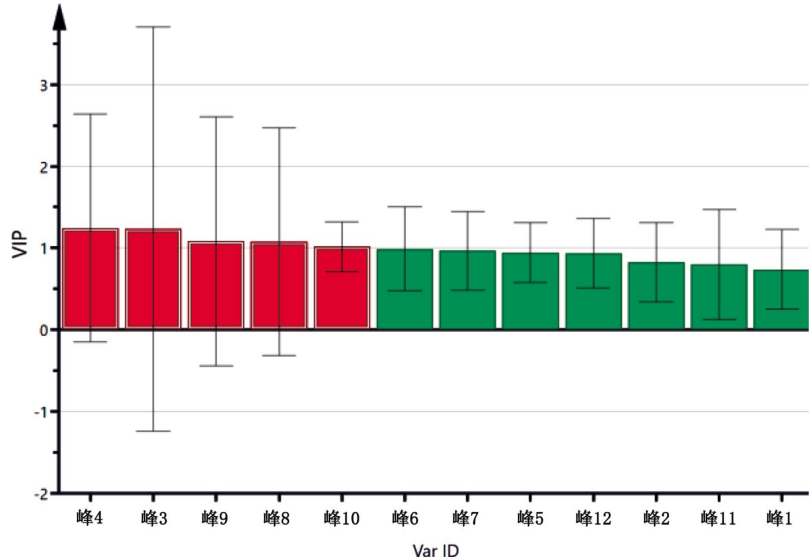


图 6 扣子七主要成分的 VIP 值

Fig.6 VIP values of the main constituents from Kouziqi (Panacis Majoris Rhizoma)

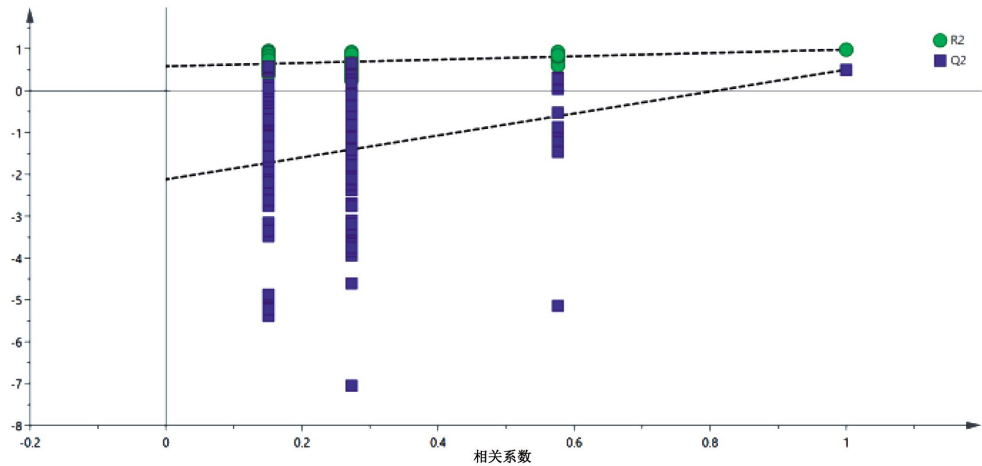


图 7 扣子七的置换检验图

Fig.7 Permutation test plot of Kouziqui (Panacis Majoris Rhizoma)

表 5 扣子七中 8 个成分的线性关系考察

Table 5 Examination of linear relationships among eight components in Kouziqui (Panacis Majoris Rhizoma)

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 Rb_1	$Y=677.64X-2\ 135.1$	0.999 9	7.59~303.70	1.9	4.7
人参皂苷 Ro	$Y=972.68X-26\ 590$	0.999 9	56.98~2 279.09	2.2	4.5
人参皂苷 Rb_3	$Y=1\ 343.4X-42\ 668$	0.999 8	7.49~1 498.00	2.4	5.1
竹节参皂苷 IV	$Y=1\ 184.2X-19\ 863$	0.999 9	34.15~1 366.18	3.1	6.7
竹节参皂苷 IV a	$Y=1\ 341.1X-28\ 873$	0.999 9	47.77~1 910.64	2.2	3.8
人参皂苷 Rd	$Y=953.11X-3\ 850.9$	0.999 9	9.52~380.76	1.8	3.5
姜状三七皂苷 R_1	$Y=1\ 325.2X-2\ 548.1$	0.999 9	4.73~189.15	1.1	2.9
金盏花苷 E	$Y=556.7X-2\ 896.5$	0.999 9	13.04~521.60	1.2	3.1

2.4.2 精密度实验 取同一供试品(S2)的溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,结果人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rb_3 、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IV a、人参皂苷 Rd 、姜状三七皂苷 R_1 、金盏花苷 E 的峰面积 RSD 分别为 1.93%、0.74%、1.44%、0.97%、0.87%、1.73%、0.84%、0.63%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性实验 取同一供试品(S2)的溶液,按“2.1”项下色谱条件,于 0、2、4、8、16、24、36、48 h 分别进样 1 次,结果人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rb_3 、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IV a、人参皂苷 Rd 、姜状三七皂苷 R_1 、金盏花苷 E 的峰面积 RSD 分别为 0.86%、0.31%、0.62%、0.25%、0.19%、0.59%、0.35%、0.43%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.4 重复性实验 取同一供试品(S2),按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,结果人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rb_3 、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IV a、

人参皂苷 Rd 、姜状三七皂苷 R_1 、金盏花苷 E 的峰面积 RSD 分别为 1.18%、1.62%、1.33%、1.07%、1.65%、1.00%、1.15%、1.30%,表明仪器重复性良好。

2.4.5 加样回收实验 精密称取 6 份已知成分含量的供试品(S2)粉末约 0.5 g 置于锥形瓶中,按约 1:1 的成分含量比例加入各对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件下进样分析,计算得人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rb_3 、竹节参皂苷 IV、竹节参皂苷 IV a、人参皂苷 Rd 、姜状三七皂苷 R_1 、金盏花苷 E 的平均加样回收率分别为 104.74%、103.10%、105.70%、101.65%、95.79%、102.60%、96.41%、101.47%,表明本方法的加样回收率良好。详见表 6。

2.5 一测多评研究

2.5.1 相对校正因子的计算 取系列浓度梯度的混合对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以竹节参皂苷 IV a 为内标物,计算人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rb_3 、竹节参皂苷 IV、人参皂苷 Rd 、姜状三七皂苷 R_1 、金盏花苷 E 的相对校

表 6 加样回收结果
Table 6 Recovery results of spiked samples

成分	序号	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
人参皂苷 Rb ₁	1	0.500 1	1.988	1.932	4.016	104.95	0.83	104.74
	2	0.501 2	1.992	1.932	4.021	105.00		
	3	0.499 2	1.985	1.932	4.027	105.72		
	4	0.500 4	1.989	1.932	4.025	105.38		
	5	0.499 8	1.987	1.932	3.996	103.98		
	6	0.500 9	1.991	1.932	3.989	103.42		
人参皂苷 Ro	1	0.500 1	23.447	23.145	47.373	103.37	0.47	103.10
	2	0.501 2	23.499	23.145	47.212	102.45		
	3	0.499 2	23.405	23.145	47.279	103.15		
	4	0.500 4	23.462	23.145	47.314	103.06		
	5	0.499 8	23.433	23.145	47.212	102.74		
	6	0.500 9	23.485	23.145	47.518	103.84		
人参皂苷 Rb ₃	1	0.500 1	1.950	2.055	4.119	105.55	0.60	105.70
	2	0.501 2	1.955	2.055	4.146	106.63		
	3	0.499 2	1.947	2.055	4.114	105.45		
	4	0.500 4	1.951	2.055	4.128	105.92		
	5	0.499 8	1.949	2.055	4.127	105.97		
	6	0.500 9	1.953	2.055	4.105	104.71		
竹节参皂苷 IV	1	0.500 1	2.763	2.704	5.511	101.66	1.04	101.65
	2	0.501 2	2.769	2.704	5.492	100.73		
	3	0.499 2	2.758	2.704	5.472	100.40		
	4	0.500 4	2.764	2.704	5.511	101.61		
	5	0.499 8	2.761	2.704	5.523	102.17		
	6	0.500 9	2.767	2.704	5.561	103.34		
竹节参皂苷 IV _a	1	0.500 1	10.288	10.344	20.304	96.82	0.79	95.79
	2	0.501 2	10.311	10.344	20.221	95.81		
	3	0.499 2	10.270	10.344	20.177	95.78		
	4	0.500 4	10.295	10.344	20.225	96.00		
	5	0.499 8	10.282	10.344	20.055	94.48		
	6	0.500 9	10.305	10.344	20.220	95.85		
人参皂苷 Rd	1	0.500 1	2.786	2.648	5.513	102.98	1.43	102.60
	2	0.501 2	2.792	2.648	5.496	102.11		
	3	0.499 2	2.781	2.648	5.496	102.54		
	4	0.500 4	2.788	2.648	5.573	105.19		
	5	0.499 8	2.784	2.648	5.487	102.07		
	6	0.500 9	2.790	2.648	5.458	100.74		
姜状三七皂苷 R ₁	1	0.500 1	2.887	2.839	5.634	96.77	0.59	96.41
	2	0.501 2	2.893	2.839	5.611	95.73		
	3	0.499 2	2.882	2.839	5.610	96.10		
	4	0.500 4	2.889	2.839	5.611	95.91		
	5	0.499 8	2.885	2.839	5.634	96.85		
	6	0.500 9	2.892	2.839	5.648	97.11		
金盏花苷 E	1	0.500 1	4.628	4.552	9.194	100.31	0.80	101.47
	2	0.501 2	4.638	4.552	9.257	101.47		
	3	0.499 2	4.620	4.552	9.203	100.70		
	4	0.500 4	4.631	4.552	9.277	102.07		
	5	0.499 8	4.625	4.552	9.263	101.87		
	6	0.500 9	4.635	4.552	9.296	102.40		

正因子(f_i/s)。

$$f_i/s=f_i/f_s=(A_i/W_i)/(A_s/W_s) \quad (1)$$

式中 W_i 为内标物质量浓度, A_i 为内标峰面积, W_s 为待测物质量浓度, A_s 为待测物峰面积。详见表 7。

2.5.2 待测成分色谱峰定位 采用相对保留时间即各待测成分与竹节参皂苷 IV_a 保留时间的比值, 对色谱峰进行定位, 结果人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb₃、竹节参皂苷 IV_a、人参皂苷 Rd、姜状三七皂苷 R₁、金盏花苷 E 的相对保留时间分别为 0.547 0、0.696 0、0.852 4、0.911 8、1.020 2、1.305 5、1.459 9, RSD 分别为 3.35%、2.62%、1.62%、0.57%、0.39%、0.92%、0.63%, 表明各待测成分相对保留时间波动较小, 无显著性差异。详见表 8。

2.5.3 耐用性考察 按“2.1”项下色谱条件, 考察 4 根色谱柱(具体型号及批号见表 8)、流速(0.25、0.3、0.35 mL·min⁻¹、柱温(25、30、35 ℃)对相对校正因子的影响, 结果表明 RSD<2.81%, 不同条件下各成分耐用性良好。详见表 9—11。

表 7 竹节参皂苷 IV_a 对各成分的相对校正因子

Table 7 Relative correction factors of each component based on chikusetsusaponin IV_a

序号	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₃	竹节参皂苷 IV _a	人参皂苷 Rd	姜状三七皂苷 R ₁	金盏花苷 E
1	1.847 9	1.399 1	1.474 9	1.144 0	1.438 1	0.983 8	2.647 7
2	1.862 1	1.376 3	1.448 2	1.144 0	1.435 2	0.968 9	2.680 1
3	1.871 7	1.377 0	1.458 2	1.144 3	1.435 2	0.996 0	2.850 3
4	1.866 0	1.378 8	1.455 8	1.141 2	1.422 8	1.004 6	2.673 8
5	1.852 3	1.385 2	1.455 9	1.138 9	1.417 8	1.007 0	2.659 6
6	1.853 0	1.377 9	1.456 7	1.138 3	1.417 7	1.005 4	2.660 4
平均值	1.858 8	1.382 4	1.458 3	1.141 8	1.427 8	0.994 3	2.695 3
RSD/%	0.50	0.64	0.61	0.24	0.66	1.52	2.85

表 8 各成分相对保留时间(min)

Table 8 Relative retention times for each component (min)

不同色谱柱	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₃	竹节参皂苷 IV _a	人参皂苷 Rd	姜状三七皂苷 R ₁	金盏花苷 E
Waters CORTECS UPLC T3(2.1×100 mm, 1.6 μm, 批号:01153932315931)	0.563 1	0.689 2	0.865 3	0.915 9	1.025 3	1.297 3	1.453 9
Waters CORTECS UPLC T3(2.1×100 mm, 1.6 μm, 批号:01153932315945)	0.562 4	0.692 8	0.863 2	0.916 6	1.021 4	1.293 5	1.450 5
Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 1.7 μm, 批号:02473428215748)	0.528 7	0.722 1	0.838 9	0.906 6	1.017 8	1.318 4	1.470 0
Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 1.7 μm, 批号:03493930915175)	0.533 8	0.679 9	0.842 1	0.908 2	1.016 5	1.312 7	1.465 1
平均值	0.547 0	0.696 0	0.852 4	0.911 8	1.020 2	1.305 5	1.459 9
RSD/%	3.35	2.62	1.62	0.57	0.39	0.92	0.63

表 9 不同仪器对相对校正因子的影响

Table 9 Effects of different instruments on relative correction factors

不同色谱柱	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₃	竹节参皂苷 IV _a	人参皂苷 Rd	姜状三七皂苷 R ₁	金盏花苷 E
Waters CORTECS UPLC T3(2.1×100 mm, 1.6 μm)	1.861 7	1.376 7	1.461 8	1.146 7	1.434 0	0.971 3	2.633 6
Waters CORTECS UPLC T3(2.1×100 mm, 1.6 μm, 批号:01153932315945)	1.867 9	1.376 9	1.458 9	1.144 3	1.438 0	1.006 1	2.557 6
Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 1.7 μm, 批号:02473428215748)	1.836 6	1.374 7	1.529 3	1.137 6	1.485 8	0.998 6	2.686 7
Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 1.7 μm, 批号:03493930915175)	1.844 7	1.373 4	1.529 0	1.138 1	1.487 5	0.978 4	2.665 2
平均值	1.852 7	1.375 4	1.494 8	1.141 7	1.461 3	0.988 6	2.635 8
RSD/%	0.79	0.12	2.66	0.40	2.01	1.66	2.14

表 10 不同流速对相对校正因子的影响

Table 10 Effects of different flow rates on relative correction factors

流速/(mL·min ⁻¹)	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₃	竹节参皂苷 IV	人参皂苷 Rd	姜状三七皂苷 R ₁	金盏花苷 E
0.25	1.873 2	1.375 7	1.455 5	1.141 1	1.361 4	0.988 7	2.568 1
0.3	1.861 7	1.376 7	1.461 8	1.146 7	1.434 0	0.971 3	2.633 6
0.35	1.890 7	1.381 5	1.470 3	0.116 4	1.425 1	0.995 9	2.693 6
平均值	1.875 2	1.378 0	1.462 5	1.144 0	1.406 9	0.985 3	2.631 8
RSD/%	0.78	0.22	0.51	0.25	2.81	1.28	2.38

表 11 不同柱温对相对校正因子的影响

Table 11 Influence of different column temperatures on relative correction factors

柱温/℃	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Rb ₃	竹节参皂苷 IV	人参皂苷 Rd	姜状三七皂苷 R ₁	金盏花苷 E
25	1.866 2	1.376 6	1.454 3	1.139 9	1.447 7	0.924 2	2.659 9
30	1.862 1	1.376 3	1.448 2	1.144 0	1.435 2	0.968 9	2.680 1
35	1.865 8	1.378 4	1.512 1	1.142 2	1.486 7	0.961 0	2.553 8
平均值	1.864 7	1.377 1	1.471 5	1.142 0	1.456 5	0.951 4	2.631 2
RSD/%	0.12	0.08	2.40	0.18	1.84	2.51	2.58

2.5.4 样品的含量测定 分别采用一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)与外标法(external standard method, ESM)对 14 批次扣子七样品进行上述 8 种成分的含量进行测定,以相对平均偏差对两个方法的结果进行准确性评价。

$$RAD=\frac{Xi-\bar{X}}{\bar{X}}\times 100\% \tag{2}$$

式中, X_i 为 QAMS 方法测定的结果; $\bar{X}$ 为两种方法测定结果的平均值。

计算结果详见表 12,结果表明一测多评法在扣子七多指标成分含量评价中的应用具有可行性。

表 12 一测多评法与外标法比较

Table 12 Comparison of results for content determination of eight components between QAMS and ESM

成分	测定法	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
竹节参皂苷 IV _a	ESM	14.96	20.58	24.15	24.42	31.65	35.83	26.81	23.76	10.05	22.07	33.57	20.89	17.33	19.37
	ESM	0.68	3.98	2.81	3.03	3.23	3.95	4.58	2.03	2.74	3.31	4.47	7.25	6.5	7.7
	QAMS	0.71	4.37	2.74	2.88	3.11	3.93	4.36	1.96	2.78	3.32	4.16	6.76	6.8	7.39
	RAD/%	2.16	4.68	-1.27	-2.54	-1.90	-0.26	-2.47	-1.76	0.73	0.16	-3.60	-3.50	2.26	-2.06
人参皂苷 Ro	ESM	47.75	46.89	49.92	41.66	58.96	77.28	58.15	68.76	62.72	42.95	78.67	53.87	44.2	46.39
	QAMS	47.34	50.28	50.18	41.01	59.37	78.77	58.06	68.99	63.25	43.89	79.15	53.66	43.78	46.75
	RAD/%	-0.44	3.49	0.26	-0.79	0.35	0.96	-0.08	0.17	0.43	1.09	0.31	-0.20	-0.48	0.39
	ESM	4.96	3.9	4.19	2.57	7.1	2.79	4.89	3.67	11.35	44.93	2.53	6.08	8.9	7.19
人参皂苷 Rb ₃	QAMS	4.73	3.88	3.93	2.4	6.95	2.87	4.78	3.54	10.76	43.78	2.42	5.7	8.18	7.38
	RAD/%	-2.38	-0.26	-3.21	-3.43	-1.07	1.42	-1.14	-1.81	-2.67	-1.30	-2.23	-3.23	-4.22	1.31
竹节参皂苷 IV	ESM	11.91	5.53	2.61	4.16	10.06	8.51	7.75	15.76	55.22	0.43	10.53	16.54	14.3	12.69
	QAMS	11.68	5.48	2.56	4.07	9.93	8.85	7.81	15.73	54.47	0.4	10.29	16.2	13.8	12.94
	RAD/%	-0.98	-0.46	-0.97	-1.10	-0.66	1.96	0.39	-0.10	-0.69	-3.62	-1.16	-1.04	-1.78	0.98
人参皂苷 Rd	ESM	1.84	5.58	6.34	5.22	10.23	10.81	10.98	6.67	0.69	0.62	8.52	12.71	15.29	14.54
	QAMS	1.86	5.95	5.86	5.22	10.54	10.98	11.47	6.79	0.69	0.63	8.91	13.19	16.35	15.55
	RAD/%	0.55	3.21	-3.94	0.00	1.50	0.79	2.19	0.90	0.00	0.81	2.24	1.86	3.36	3.36
姜状三七皂苷 R ₁	ESM	0.8	5.78	0.73	0.56	0.74	0.69	0.87	1.17	0.76	0.25	1.03	1.21	1.14	0.93
	QAMS	0.79	5.9	0.77	0.55	0.71	0.72	0.88	1.19	0.82	0.26	1.06	1.18	1.07	0.96
	RAD/%	-0.63	1.03	2.67	-0.91	-2.07	2.13	0.58	0.85	3.80	1.97	1.44	-1.26	-3.17	1.59
金盏花苷 E	ESM	1.25	9.26	1.09	0.88	1.21	1.22	1.29	1.01	0.96	0.9	1.57	1.91	1.91	1.79
	QAMS	1.37	10.03	1.10	0.81	1.25	1.32	1.39	1.09	1.05	0.92	1.72	1.96	1.90	1.91
	RAD/%	4.59	4.00	0.46	-4.15	1.63	3.94	3.74	3.81	4.48	1.10	4.56	1.30	-0.27	3.25

3 讨论

为了选出扣子七的最佳制备方法,在前期预试验中分别考察了提取时不同提取溶液(60%甲醇、70%甲醇、60%乙醇、70%乙醇)、不同提取方式(超声和回流)、不同提取时间(40、60、80 min),从提取的色谱信息全面性、色谱峰丰度、杂质干扰等方面考虑,发现 60%乙醇超声提取 40 min 为扣子七供试品制备的最佳方法。同时还考察了不同流动相系统(乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液)和不同洗脱程序对供试品溶液色谱图的影响,结果显示,乙腈-0.1%磷酸溶液按 2.1 项梯度程序运行时,所得色谱图中基线平稳、色谱峰数量较多且色谱峰丰度饱满。

本研究选取了不同产地的扣子七作为研究对象,建立了 UPLC 指纹图谱,标定了 12 个共有峰,指认其中 8 个成分,完成了扣子七的定性分析,并结合聚类分析和主成分分析将不同产地的扣子七分为 4 类,分类结果表明大部分产地的扣子七质量差异不大,这提示扣子七药材有扩大产地栽培的可能。OPLS-DA 发掘出 5 个差异性成分,其中 4 个是已指认成分竹节参皂苷 IV、人参皂苷 Rb₃、金盏花苷 E 和姜状三七皂苷 R₁。

扣子七中 8 个已指认的成分被用于扣子七的定量分析,并建立一测多评法对扣子七进行定量分析。参照 QAMS 法建立的技术指南^[21],内参物应选择在各类样品中含量均较高,保留时间适中的有效成分,竹节参皂苷 IVa 对照品化学性质稳定,易于得到,且为《中国药典》中珠子参含量测定项下的被测成分,因此本实验确定选择竹节参皂苷 IVa 作为内参物建立扣子七的一测多评法。结果显示,QAMS 法含量测定数据与 ESM 法测定数据无显著性差异,可用 QAMS 法代替 ESM 法对扣子七中此 8 种成分进行含量测定,能更加经济和快捷地为扣子七的质量控制做出评价。

综上所述,本文采用指纹图谱与一测多评法结合化学模式识别分析对扣子七进行质量评价,建立的定性定量方法简便、快速、价廉,所建立的扣子七 UPLC 指纹图谱可以快速对扣子七进行定性评价,分析扣子七药材真伪,首次建立的扣子七多指标成分的 QAMS 可以简便快速的对扣子七进行定量评价,分析扣子七药材优劣,为该药材的质量控制和评价提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 283.
- [2] 刘琪琪, 李 晔, 宗时宇, 等. 太白七药珠子参的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(6): 53-58.
- [3] 杨 延, 张 翔, 姜 森, 等. 珠子参中皂苷成分及其药理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 347-356.
- [4] 伍红年, 谭诗涵, 王元清, 等. 竹节参 HPLC 指纹图谱的建立及 7 种成分测定[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1074-1080.
- [5] 叶 彬, 闫小巧, 雷 婷, 等. 葛根药材 HPLC 指纹图谱与 6 种成分含量测定研究[J]. 中草药, 2023, 54(24): 8222-8227.
- [6] 任华忠, 朱丽金, 何毓敏. 珠子参总皂苷的 HPLC 特征图谱及化学成分研究[J]. 中成药, 2022, 44(9): 2885-2890.
- [7] 李海燕, 王慧然, 那丽莎, 等. 基于主成分分析、正交偏最小二乘判别分析及加权逼近理想解排序-灰色关联度融合模型评价不同产地珠子参质量[J]. 中草药, 2024, 55(9): 3116-3126.
- [8] 温海成, 苏永精, 谢 澳, 等. 指纹图谱结合一测多评法的壮药南酸枣树皮质量控制方法研究[J]. 中药材, 2024(4): 934-939.
- [9] 杨柯楠, 关永霞, 范建伟, 等. 川蛭通络胶囊 HPLC 指纹图谱建立及 9 个成分测定[J]. 中药材, 2024(6): 1477-1481.
- [10] 张思敏, 张 也, 伍红年, 等. 不同产地竹节参中 7 种皂苷含量测定及化学计量学评价[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 65-70, 79.
- [11] 叶 彬, 闫小巧, 林敏生, 等. 南五味子药材的指纹图谱研究[J]. 中药材, 2023, 46(12): 3063-3067.
- [12] 贾天宁, 刘 芳, 陈 鹏, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别对狗脊药材的质量评价[J]. 中草药, 2023, 54(24): 8214-8221.
- [13] 张国鑫, 刘佳琪, 恽辰珂, 等. UPLC 指纹图谱结合一测多评法的芦蒿废弃茎叶酚酸类成分质量控制方法研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(13): 3566-3573.
- [14] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [15] 孙云波, 陈育鹏, 张创峰, 等. 一测多评法同时测定连花清瘟胶囊中 7 个成分[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(7): 1128-1136.
- [16] 杜俊潮, 浦香兰, 范恺磊, 等. 基于 UPLC 指纹图谱及一测多评法的天麻标准汤剂质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4909-4917.
- [17] 王 赵, 赵剑锋, 咎 珂, 等. 一测多评法测定不同企业心脑血管制剂中 9 个成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (22): 6082-6089.
- [18] 张明晓, 李 化, 陈 娜, 等. 一测多评法同时测定辣木叶中硫苷及黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3285-3294.
- [19] 谭诗涵, 伍红年, 雷雅婷, 等. 一测多评法测定竹节参中 7 种皂苷类成分的含量[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4164-4169.
- [20] 曾杨丽, 徐 菲, 蔡 思, 等. 一测多评结合指纹图谱的肝复乐胶囊质量控制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(4): 94-100.
- [21] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 656-658.

(本文编辑 苏 维)