

中药研究

三七酚类成分特征图谱质量表征关联评价研究

杨元¹ 陈唯¹ 张芳¹ 孔静¹ 孙道涵¹ 冯朵¹ 杨书娟¹ 申立峰² 胡少伟¹周德勇¹ 潘婷¹ 姜艳艳^{1,3} 石任兵^{1,3}

(1 北京中医药大学中药学院, 北京, 100029; 2 首都医科大学, 北京, 100000; 3 北京市教委中药质量控制技术工程中心, 北京, 100029)

摘要 采用 HPLC-PDA 法建立三七酚类成分特征图谱, 筛选 9 个特征峰并通过相对保留时间表征其质量关联性, 同时测定对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量, 以对羟基苯甲酸为对照表征酚酸类含量, 采用分光光度法测定三七中总酚含量, 从而对三七酚类成分含量及其相对比值进行质量表征, 然后对三七中各酚类成分含量进行关联分析, 从而发现各成分含量的关联性、质量分布规律性, 同时将不同批次的药材与经过药效验证的参比药材进行关联度分析, 结合关联度分析, 筛选出质量优佳三七药材; 运用本方法可全面精确的控制和评价三七的质量。

关键词 三七; 特征图谱; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素; 总酚; 关联分析

**Quality Representation of Characteristic Chromatogram and Correlation Analysis
of Phenolic Components in Panax notoginseng**

Yang Yuan¹, Chen Wei¹, Zhang Fang¹, Kong Jing¹, Sun Daohan¹, Feng Duo¹, Yang Shujuan¹,Shen Lifeng², Hu Shaowei¹, Zhou Deyong¹, Pan Ting¹, Jiang Yanyan^{1,3}, Shi Renbing^{1,3}

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Capital Medical University, Beijing 100000, China; 3 Chinese Medicine Quality Control Technology Engineering Center, Beijing Municipal Education Committee, Beijing 100029, China)

Abstract Characteristic chromatogram of Phenolic Components in Panax notoginseng was established by HPLC - PDA method and 9 featured peaks were screened. Their quality correlation was represented by relative retention schedule. Contents of P - hydroxybenzoic acid, quercetin, kaempferol, isorhamnetin and total phenols were determined, taking p - hydroxybenzoic acid as the control content agent. The total phenolic content of Panax notoginseng was determined by spectrophotometry. Quality representation was made with the contents of phenols in Panax notoginseng and their relative ratio. Correlation analysis of content of each phenol in Panax notoginseng was performed to summarize correlation and quality distribution rules among components in Panax notoginseng. The correlation between different batches of medicinal materials and referential materials which had pharmacodynamics validation was analyzed. The optimal Panax notoginseng could be selected based on the results of correlation analysis. This method can fully and accurately control and evaluate the quality of Panax notoginseng.

Key Words Panax notoginseng; Characteristic chromatogram; Quercetin; Kaempferol; Isorhamnetin; Total phenols; Correlation analysis

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.039

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。具有散瘀止血, 消肿定痛的功效; 用于咯血, 吐血, 衄血, 便血, 崩漏, 外伤出血, 胸腹刺痛, 跌扑肿痛。在 2015 版《中国药典》中以三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 的总量对三七进行质量控制^[1]; 文献对三七的质量表征研究贡献在皂苷类^[2-3]、氨基酸类^[4-12]、总黄酮^[13-16]的含量测定方面, 而对酚类指标性成分、总

酚含量测定方面尚未见报道。

然中药的质量表征和质量评价应为其相关药物体系所导向^[21]。银荷三七参方为王永炎院士拟定的临床经验方, 由银杏叶、三七、人参、荷叶组成, 三七为其组方主要药味。笔者在研究本方药物制备物药学-药效质量表征关联分析时发现, 组方中酚类成分的含量及其相对比值的变化, 对其活血止血功效有显著性影响。可见, 要实现三七药物质量精准预

基金项目: 十二五国家科技支撑计划项目 (编号: 2012BAI29B06); 北京中医药大学创新团队资助项目 (编号: 2011-CXTD-12)

作者简介: 杨元 (1989.01—), 男, 在读硕士, 研究方向: 中药药效物质基础及质量控制方法研究, E-mail: yangyuan501x@163.com

通信作者: 石任兵 (1957.12—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药复方有效物质基础与药物创新, E-mail: shirb@126.com; 姜

艳艳 (1980.12—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药复方有效物质基础与质量控制方法研究, E-mail: jyyjm129@163.com

期,需关联其药物体系进行质量表征。

因此,本文建立了三七酚类成分特征图谱及对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素、总酚的含量测定方法,从而对三七酚类成分含量进行测定与质量表征,然后对三七中各酚类成分含量进行关联分析,从而发现各成分含量的关联性、质量分布规律性,同时运用课题组所建立的中药药物质量表征关联评价模式^[17-20],进行有效指标性成分-类型-比值质量表征关联分析评价,筛选出质量优佳三七药材,以实现三七药物质量精准控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Waters 2695 自动进样高效液相色谱仪,2996PDA 检测器,Empower 工作站;TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);Sartorius-BT25S 型 1/100000 电子分析天平、KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。对羟基苯甲酸(批号:yy91251,纯度 $\geq 98\%$)、槲皮素(批号:YY90129,纯度 $\geq 98\%$)、山柰酚(批号:YY90129,纯度 $\geq 98\%$)、异鼠李素(批号:YY90190,纯度 $\geq 98\%$),均购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈(色谱级,Fisher Scientific 公司);甲醇(AR),购自北京化学试剂公司;娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);三氯化铁(AR),购自天津市申泰化学试剂有限公司;铁氰化钾(AR),购自广东汕头市西陇化工厂;浓盐酸(AR),购自北京化工厂;其余试剂均为分析纯。15 批三七药材购自北京市各药店,经北京中医药大学刘春生教授鉴定均为 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根与根茎。药材样品现存于北京中医药大学中药学院中药化学系。

1.2 方法

1.2.1 特征图谱方法学考察及指标性成分含量测定

1.2.1.1 对照品溶液的制备 取对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升各含对羟基苯甲酸 10 μg 、槲皮素 71.8 μg 、山柰酚 40 μg 、异鼠李素 29.2 μg 的混合溶液,即得。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 10 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 300 mL,密塞,称定重量,放置过夜,置 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保持微沸 3 h,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 250 mL,回收溶剂至干,残渣加 30 mL 水溶解,转移至 50 mL 量

瓶中,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz)30 min,取出,放冷,加水至刻度,摇匀,静置,精密量取上清液 40 mL,加入聚酰胺柱(100~200 目,5 g,内径 1.5 cm,用水湿法装柱)上,用 20 mL 水洗除杂,然后用 50 mL 5% 氨水-甲醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂至干,残渣加甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液 5 mL,加热回流 30 min,放冷,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇置刻度,摇匀,即得供试品溶液。

1.2.1.3 色谱条件 waters Atlantis 色谱柱(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm),流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B)梯度洗脱(洗脱梯度 0~12 min,12% A;12~60 min,12%~55% A),流速 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 260 nm,进样量 20 μL 。在此色谱条件下,对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素与其他色谱峰分离度良好,对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 图见图 1。

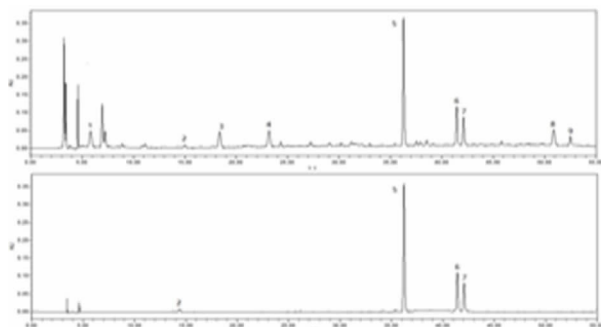


图 1 酚类成分 HPLC 图

注:A 样品,B 对照品;1、3、4、8、9 酚酸类,2 对羟基苯甲酸,5 槲皮素,6 山柰酚,7 异鼠李素。

1.2.1.4 特征图谱方法学考察 1) 特征图谱精密考察:按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件,连续进样测定 6 次,计算各色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.83%,相对峰面积 *RSD* 均小于 2.27%,表明精密度良好。2) 特征图谱稳定性考察:按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件,分别与 0、2、4、6、12、24 h 分别进样,计算各色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.72%,相对峰面积 *RSD* 均小于 2.88%,表明样品溶液 24 h 内稳定。3) 特征图谱重复性考察:按照 1.2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件进样测定,计算各色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.87%,相对峰面积 *RSD* 均小

于 3.78% ,表明样品溶液重复性良好。

1.2.1.5 指标性成分含量测定方法 1)线性关系考察:分别精密量取 1.2.1.1 项下的混合对照品溶液 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得不同浓度的混合对照品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件,分别进样测定对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素峰面积,以对照品的浓度(mg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数为:对羟基苯甲酸: $y = 4 \times 10^7 x + 4171.7$, ($r = 0.999\ 7, n = 6$)、槲皮素: $y = 7 \times 10^7 x + 52\ 081$, ($r = 0.999\ 2, n = 6$); 山柰酚: $y = 6 \times 10^7 x - 3895\ 5$, ($r = 0.999\ 4, n = 6$); 异鼠李素: $y = 6 \times 10^7 x - 37323$, ($r = 0.999\ 5, n = 6$)。表明对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素分别在 0.002 ~ 0.01 mg/mL、0.014 3 ~ 0.071 7 mg/mL、0.008 0 ~ 0.0399 9 mg/mL、0.005 8 ~ 0.029 2 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。2)精密度考察:按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件,连续进样测定 6 次,测定对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素峰面积,计算 RSD 分别为为 1.35%、0.83%、1.09%、1.27% ,表明精密度良好。3)稳定性试验:按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h 按照 1.2.1.3 项下方法测定峰面积,测得对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素峰面积 RSD 分别为 1.45%、1.68%、0.74%、1.59% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。4)重复性试验:按照 1.2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按照 1.2.1.3 项下方法测定峰面积,测得对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素平均含量分别为 0.0004%、0.0072%、0.0025%、0.0020% ,RSD 分别为 2.53%、1.50%、2.25%、1.51% ,表明此方法重复性良好。5)加样回收率考察:精密称取三七粉末约 5 g,共 6 份,加入对照品适量,按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下方法测定峰面积,计算对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素平均加样回收率分别为 98.25%、97.93%、98.41%、98.67% ,RSD 分别为为 2.54%、2.60%、0.91%、2.08% ,表明本方法准确可靠。

1.2.2 总酚含量测定方法

1.2.2.1 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 0.8 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 100 mL 70% 甲醇,密塞,称定重量,放置过夜,超声(功率 500 W,频率 40 kHz)处理 1 h,放冷,再称定重量,用

70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

1.2.2.2 对照品溶液的制备 取槲皮素对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 70% 甲醇制成含 33 μg/mL 的溶液,即得。

1.2.2.3 吸光度的测定方法 精密量取供试品溶液适量,置于 25 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇至 5 mL,加入 0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2.6 mL,摇匀,加入新配置的 0.6% 三氯化铁-0.9% 铁氰化钾(1:1)混合液 2.0 mL,在暗处放置 7 min,用 0.1% 的盐酸定容至 25 mL,摇匀后于暗处静置 40 min,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(中国药典通则 0401)在 780 nm 的波长处测定吸光度。

1.2.2.4 线性关系考察 精密量取槲皮素对照品溶液 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL,按照 1.2.2.3 项下的方法进行测定,以对照品量(mg)为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,并进行线性回归分析,计算回归方程为 $y = 31.554x - 0.033\ 0$ ($r = 0.999\ 5, n = 5$)。结果表明,槲皮素对照品量在 0.003 3 ~ 0.029 7 mg 范围内与吸光度线性关系良好。

1.2.2.5 重复性试验 按照 1.2.2.1 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按照 1.2.2.3 项下的方法测定吸光度,计算总酚平均含量为 1.99% ,RSD 为 0.86% ,表明此方法重复性良好。

1.2.2.6 加样回收率考察 精密称取同一三七粉末约 0.4 g,共 6 份,置于具塞锥形瓶中,分别加入对照品适量,然后精密加入 100 mL 70% 甲醇,密塞,称定重量,放置过夜,超声(功率 500 W,频率 40 kHz)处理 1 h,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得总酚加样回收率供试品溶液;按照 1.2.2.3 项下的方法测定吸光度,计算总酚平均加样回收率 103% ,RSD 为 1.82% ,表明本方法准确可靠。

表 1 三七酚类成分质的关联性

特征峰编号	化学类型	保留时间	相对保留时间
1	酚酸类	5.925	0.1606
2	对羟基苯甲酸(酚酸类)	7.162	0.1941
3	酚酸类	19.102	0.5177
4	酚酸类	23.966	0.6495
5	黄酮类(槲皮素)	36.899	1.0000
6	黄酮类(山柰酚)	41.916	1.1360
7	黄酮类(异鼠李素)	42.538	1.1528
8	酚酸类	51.623	1.3990
9	酚酸类	53.452	1.4486

表 2 基于酚类成分含量的 15 批三七药材样品质量表征(% ,*n* = 2)

样品号	产地	规格	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	对羟基苯甲酸	酚酸类含量和	黄酮类含量和	总酚
1	云南	120 头	0. 0090	0. 0030	0. 0025	0. 0006	0. 0129	0. 0145	0. 2123
2	云南	20 头	0. 0048	0. 0020	0. 0014	0. 0002	0. 0119	0. 0081	0. 1205
3	云南	20 头	0. 0052	0. 0017	0. 0016	0. 0003	0. 0059	0. 0085	0. 1131
4	云南	40 头	0. 0070	0. 0025	0. 0020	0. 0005	0. 0107	0. 0115	0. 1212
5	云南	切片	0. 0073	0. 0020	0. 0024	0. 0003	0. 0034	0. 0116	0. 1632
6	云南	40 头	0. 0112	0. 0038	0. 0027	0. 0004	0. 0093	0. 0177	0. 1864
7	云南	60 头	0. 0032	0. 0013	0. 0012	0. 0003	0. 0038	0. 0058	0. 0921
8	云南	120 头	0. 0034	0. 0022	0. 0014	0. 0003	0. 0064	0. 0069	0. 0915
9	云南	20 头	0. 0046	0. 0019	0. 0015	0. 0005	0. 0100	0. 0080	0. 1211
10	云南	80 头	0. 0046	0. 0025	0. 0016	0. 0003	0. 0055	0. 0087	0. 1259
11	云南	30 头	0. 0054	0. 0024	0. 0017	0. 0003	0. 0058	0. 0094	0. 0931
12	云南	80 头	0. 0064	0. 0023	0. 0018	0. 0003	0. 0094	0. 0104	0. 1734
13	云南	60 头	0. 0013	0. 0007	0. 0005	0. 0001	0. 0076	0. 0025	0. 0251
14	云南	60 头	0. 0072	0. 0025	0. 0020	0. 0004	0. 0088	0. 0116	0. 1455
15	云南	60 头	0. 0040	0. 0015	0. 0013	0. 0002	0. 0080	0. 0067	0. 0723

表 3 基于酚类含量相对比值的 15 批三七药材样品质量表征

样品号	产地	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	对羟基苯甲酸	酚酸类含量和	黄酮类含量和	总酚
1	云南	1. 0000	0. 3391	0. 2781	0. 0696	1. 4433	1. 6172	23. 7151
2	云南	1. 0000	0. 4074	0. 2910	0. 0371	2. 4750	1. 6985	25. 1324
3	云南	1. 0000	0. 3278	0. 3072	0. 0544	1. 1323	1. 6349	21. 7149
4	云南	1. 0000	0. 3620	0. 2888	0. 0758	1. 5255	1. 6508	17. 3257
5	云南	1. 0000	0. 2730	0. 3237	0. 0470	0. 4679	1. 5966	22. 4296
6	云南	1. 0000	0. 3428	0. 2401	0. 0359	0. 8352	1. 5829	16. 7095
7	云南	1. 0000	0. 4182	0. 3656	0. 0812	1. 1697	1. 7837	28. 5466
8	云南	1. 0000	0. 6424	0. 4242	0. 0866	1. 8986	2. 0665	27. 2630
9	云南	1. 0000	0. 4236	0. 3330	0. 0993	2. 1775	1. 7566	26. 4665
10	云南	1. 0000	0. 5483	0. 3335	0. 0589	1. 1831	1. 8818	27. 0910
11	云南	1. 0000	0. 4464	0. 3146	0. 0563	1. 0857	1. 7609	17. 4012
12	云南	1. 0000	0. 3651	0. 2753	0. 0506	1. 4696	1. 6404	27. 2269
13	云南	1. 0000	0. 4868	0. 3744	0. 0881	5. 6685	1. 8611	18. 7299
14	云南	1. 0000	0. 3416	0. 2741	0. 0546	1. 2224	1. 6157	20. 2207
15	云南	1. 0000	0. 3787	0. 3218	0. 0628	2. 0296	1. 7004	18. 2908

表 4 15 个批次三七药材样品关联度表征

样品号	产地	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	对羟基苯甲酸	酚酸类含量和	黄酮类含量和	总酚	非关联系数	非关联度
1	云南	1. 0000	0. 9926	1. 0145	1. 2751	1. 1807	1. 0009	1. 1728	0. 6513	9. 3040
2	云南	1. 0000	1. 1927	1. 0617	0. 6797	2. 0247	1. 0512	1. 2429	1. 8935	27. 0506
3	云南	1. 0000	0. 9595	1. 1206	0. 9961	0. 9263	1. 0119	1. 0739	0. 3245	4. 6353
4	云南	1. 0000	1. 0597	1. 0537	1. 3882	1. 2480	1. 0217	0. 8568	0. 9144	13. 0631
5	云南	1. 0000	0. 7991	1. 1809	0. 8618	0. 3828	0. 9882	1. 1092	1. 2582	17. 9746
6	云南	1. 0000	1. 0035	0. 8761	0. 6577	0. 6833	0. 9797	0. 8264	0. 9805	14. 0065
7	云南	1. 0000	1. 2242	1. 3337	1. 4876	0. 9569	1. 1040	1. 4118	1. 6044	22. 9194
8	云南	1. 0000	1. 8805	1. 5474	1. 5856	1. 5532	1. 2790	1. 3483	3. 1941	45. 6294
9	云南	1. 0000	1. 2400	1. 2149	1. 8184	1. 7814	1. 0872	1. 3089	2. 4507	35. 0106
10	云南	1. 0000	1. 6052	1. 2168	1. 0793	0. 9678	1. 1647	1. 3398	1. 4378	20. 5406
11	云南	1. 0000	1. 3067	1. 1477	1. 0306	0. 8882	1. 0899	0. 8606	0. 8261	11. 8021
12	云南	1. 0000	1. 0688	1. 0043	0. 9262	1. 2022	1. 0153	1. 3465	0. 7110	10. 1565
13	云南	1. 0000	1. 4250	1. 3658	1. 6144	4. 6372	1. 1519	0. 9263	5. 2679	75. 2562
14	云南	1. 0000	1. 0000	1. 0000	1. 0000	1. 0000	1. 0000	1. 0000	0. 0000	0. 0000
15	云南	1. 0000	1. 1086	1. 1739	1. 1512	1. 6603	1. 0524	0. 9046	1. 2418	17. 7405

2 结果

2.1 基于三七酚类成分质的表征 取 15 批三七药材,按照 1.2.1.1 项下方法制备对照品溶液,按照 1.2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按照 1.2.1.3 项下色谱条件,分别进样,得到 15 批三七药材特征图谱(图 1),特征图谱在 260 nm 下含特征峰 9 个,其中黄酮类特征峰 3 个,酚酸类特征峰 6 个,15 批三七药材均含此 9 个特征峰。选择槲皮素为 S 峰,将其保留时间设为 1,其他特征性成分的保留时间做相应转换,计算各特征峰的相对保留时间。结果见表 1。

2.2 基于三七酚类成分量的表征

2.2.1 基于酚类成分含量的质量表征 取 15 批三七药材样品,按“1.2.1”项下方法测定对羟基苯甲酸、槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量,以槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量加和表征黄酮类含量和;以对羟基苯甲酸为对照品,通过主要酚酸类成分峰面积加和表征酚酸类含量和;按“1.2.2”项下方法测定总酚含量;以经过药效验证的药材(样品号 14)作为参比药材;从而对三七药材中有效指标性成分与总成分的含量进行全面表征。结果见表 2。

2.2.2 基于酚类成分含量相对比值的的质量表征 以有效指标性成分槲皮素的含量为参比,将 15 个三七药材样品中各成分含量与槲皮素含量的相对比值予以表征,结果见表 3。

2.2.3 三七质量表征关联分析

2.2.3.1 三七药材酚类成分含量的关联性、质量分布规律分析 根据表 2 含量测定结果,绘制 3 种黄酮苷元含量分布曲线。见图 2,由图 2 可知,3 种黄酮苷元呈现规律的分布,各成分含量大小趋势为:槲皮素 > 山柰酚 > 异鼠李素,槲皮素与山柰酚比值为 (2.56 ± 1) ,槲皮与异鼠李素的比值为 (3.22 ± 1) 。

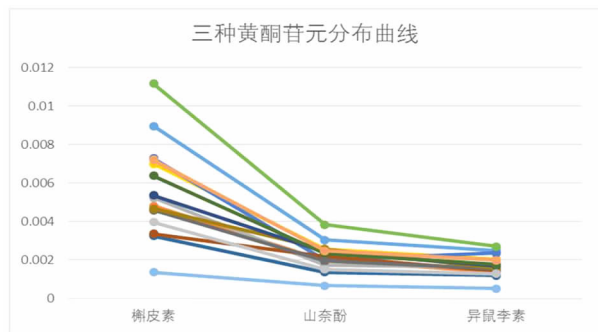


图 2 3 种黄酮苷元分布曲线

根据表 2 含量测定结果,采用 SPSS 19 进行分析,总黄酮含量、总酚含量之间显著相关(线性回归方程:总酚含量 = 总黄酮含量 $\times 11.586 + 0.014$),而酚酸类含量、总酚含量之间不相关;即三七总酚含量

随着总黄酮含量升高而升高,说明黄酮类对总酚的贡献度较大,三七中酚类成分以黄酮为主,因此,采用黄酮类含量和为指标,即可初步评价三七药材质量。由表 2 可知,黄酮类含量和最大相差约 7.07 倍,含量从高到低排序为:批次 6 > 1 > 14 > 5 > 4 > 12 > 11 > 10 > 3 > 2 > 9 > 8 > 15 > 7 > 13。将黄酮类含量和最高的批次 6 设为 100,其余批次按比例换算,得图 3;由图 3 可知,批次 6、1 为前 30% 优质药材,其黄酮类含量和不得低于 0.014%;批次 14、5、4、12、11、10 为 30% ~ 50% 良好药材,其黄酮类含量和不得低于 0.008%;批次 3、2、9、8、15、7 为 50% ~ 80% 普通药材,其黄酮类含量和不得低于 0.005%。

2.2.3.2 关联度分析 将表 3 中 15 个三七药材中酚类成分含量相对比值与参比药材样品相对比值的比值进行关联分析,得图 4,表 4。

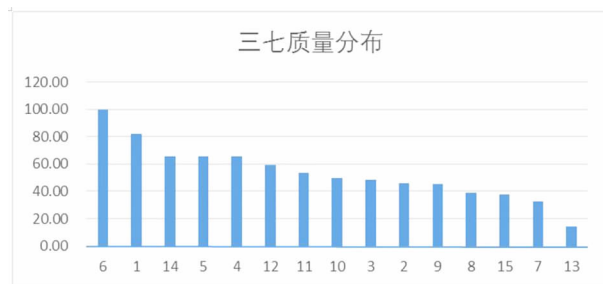


图 3 三七质量分布

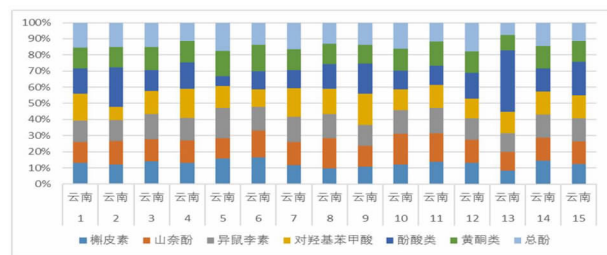


图 4 15 个三七药材中酚类成分含量相对比值与参比药材对应成分含量相对比值的比值

图 4 中不同颜色的矩形条代表各药材中有效指标性成分含量与类型成分含量相对比值与参比药材对应成分含量相对比值的比值,矩形条大小与参比药材中相同颜色的矩形条大小越相近,代表该药材有效指标性成分含量与类型成分含量比值与参比药材越接近,即质量表征关联密切。由图可知,批次 3、1、12、11 与参比药材质量表征关联密切。15 个批次的样品与参比药材含量相对比值的比值差值的绝对值之和,即非关联系数;非关联系数与有效指标性成分的数目的比值,即非关联度,进而得到关联度,以反映药材质量之间的关联性。见表 4。由表 4 可知,关联度由高到低排序为:14 (0/100) > 3 (0.3245/95.36) > 1 (0.6513/90.7) > 12 (0.711/

89.84) > 11(0.8261/88.2) > 4(0.9144/86.94) > 6(0.9805/85.99) > 15(1.2418/82.26) > 5(1.2582/82.03) > 10(1.4378/79.46) > 7(1.6044/77.08) > 2(1.8935/72.95) > 9(2.4507/64.99) > 8(3.1941/54.37) > 13(5.2679/24.74)。即样品 3、1、12、11、4、6 与参比药材的关联度较高。

3 讨论

三七中酚类成分含量较低,富集之前无法检测,故本文采用聚酰胺对三七酚类成分进行富集,然后用 HPLC 法分别对酸水解前后的酚类部位进行检测,在 360 nm 下,仅可检测到黄酮类色谱峰,在 260 nm 下,酚酸类、黄酮类均有较强吸收,且色谱峰信息较多,故选用 260 nm 为测定波长。结果发现,酸水解前,可以检测到黄酮类、酚酸类成分色谱峰,但未检测到槲皮素、山柰酚、异鼠李素,酸水解后,原黄酮类色谱峰消失,均转化为槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种苷元。见图 5;说明三七中黄酮类成分以苷的形式存在,其苷元主要为槲皮素、山柰酚、异鼠李素,因此测定 3 种黄酮苷元的含量,即可表征三七中黄酮类含量。

中药质量与其所含有效化学成分类型及存在的量、组成比例等有关。本文在自然药学观相关理论的指导下^[28-32],运用相关中药药物质量表征关联评价模式^[18-28],对 15 个不同批次的三七药材样品的质量进行表征,从而筛选出优质、良好、普通饮片,并以经过药效验证的药材为参比药材,进行质量关联度分析比较,确定出批次 3、1、12、11、4、6 与参比药材 14 关联度最高,综合质量表征及关联分析结果,得出批次 1、6 质量最佳,其次为批次 3、12、11、4。本文综合精准评价出三七药材质量的优良度,即综合考量了三七应用有效性及质量关联性,从而为三七资源筛选及其药物的原料质量控制和应用提供了依据,亦为其他中药药材及其饮片的质量评价提供了研究借鉴。

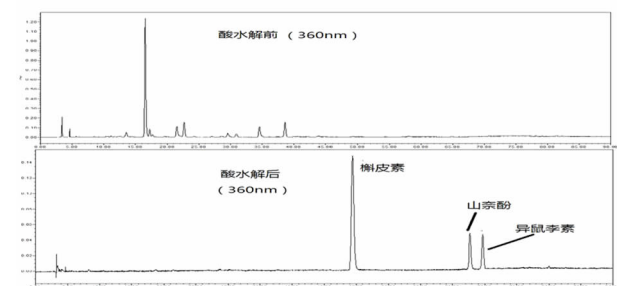


图5 酸水解前后黄酮类成分变化

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 王超群, 贾秀虹, 陈季, 等. 中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3438-3445.
- [3] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 一测多评法同步测定人参与三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学报, 2008, 43(12): 1211-1216.
- [4] 杨玲娟, 高二全, 焦成瑾. 柱前衍生 HPLC 法测定三七中的三七素[J]. 资源开发与市场, 2015, 31(1): 1-3, 34.
- [5] 鞠政财, 何纯勇, 刘青, 等. HILIC 测定三七片中三七素的含量[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2594-2597.
- [6] 王艳艳. 三七活血止血有效物质基础表征研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- [7] 崔秀明, 徐璐珊, 王强, 等. 三七中三七素的含量测定[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(13): 1017-1019.
- [8] 刘光, 刘云江, 胡炜彦. HPLC 法测定三七总皂苷提取废液中三七素的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(2): 61-62.
- [9] 付春梅, 朱静, 刘三康, 等. HPLC 法测定三七及其制剂中三七素[J]. 中草药, 2006, 37(1): 68-69.
- [10] 郑萍. 毛细管区带电泳法测定三七药材中的三七素[J]. 华西药理学杂志, 2012, 27(4): 453-454.
- [11] 鲁歧, 李向高. 三七止血成分的分离鉴定与含量测定[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(13): 1017.
- [12] 焦成瑾, 杨玲娟, 赵非佚, 等. 三七素检测方法研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2015, 37(3): 15-20.
- [13] 刘英, 曲媛, 王承潇, 等. 不同产地不同部位三七中总黄酮的含量测定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(15): 54-55, 58.
- [14] 郑莹, 李绪文, 桂明玉, 等. 三七茎叶黄酮类成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(3): 176-178.
- [15] 魏均娴, 王菊芬. 三七叶黄酮类成分的研究[J]. 中药通报, 1987, 12(11): 61.
- [16] 张冰. 三七花化学成分和质量控制方法的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [17] 左胜, 孙雅殊, 迟蕾, 等. 基于药物体系的藁本质量评价研究[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(7): 481-485, 后插 1.
- [18] 唐雪阳, 安琪, 孙道涵, 等. 基于药物体系的紫苏子特征图谱质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报, 2015, (4): 241-246.
- [19] 李焕娟, 张璐, 彭平, 等. 基于药物体系质量评价模式的远志质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(12): 834-840, 后插 4.
- [20] 黄亚婷, 潘婷, 温静, 等. 基于药物体系的肉桂特征图谱质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(5): 344-350.
- [21] 石任兵, 王永炎, 吕松涛. 中药药物质量精准预期的相关性思考[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3343-3346.

(2016-01-14 收稿 责任编辑: 王明)