

基于高效液相色谱仪多组分定量联合灰色关联度分析的三七综合质量评价

闻浩, 胡丹东*

(北京市延庆区市场监管检验检测监控中心, 北京 102100)

摘要: 目的 探讨基于高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 多组分定量联合灰色关联度分析的三七综合质量评价。**方法** 采用 HPLC 法同时测定不同产地、不同商品规格三七样品中三七皂苷 R1, 人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rd 含量, 结合灰色关联法建立整体质量评价模型。**结果** 所建立方法同时测定了三七皂苷 R1, 人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rd 成分含量, 方法学考察结果良好; 灰色关联法可以区分出道地产区样品、合格样品和不合格样品。**结论** 构建 HPLC 多组分定量与灰色关联度融合模型, 可以为精准评估三七药材质量提供科学评价依据。

关键词: HPLC 多组分定量; 灰色关联度分析; 三七综合质量评价

Comprehensive quality evaluation of *Panax notoginseng* based on high performance liquid chromatography multi-component quantitative combined with grey correlation analysis

WEN Hao, HU Dan-Dong*

(Market Supervision Inspection and Testing Monitoring Center, Yanqing District, Beijing 102100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the comprehensive quality evaluation of *Panax notoginseng* based on high performance liquid chromatography (HPLC) multi-component quantification combined with grey relational analysis. **Methods** HPLC was used to simultaneously determine the contents of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1, and Rd in *Panax notoginseng* samples from different origins and different commercial specifications. A comprehensive quality evaluation model was established by combining the grey relational method. **Results** The established method simultaneously determined the contents of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1, and Rd, with good methodological investigation results. The grey relational method could distinguish between samples from authentic origins, qualified samples, and unqualified samples. **Conclusion** The fusion model of HPLC multi-component quantification and grey relational analysis was constructed to accurately evaluate the quality of *Panax notoginseng*, providing a scientific evaluation basis.

KEYWORDS: high performance liquid chromatography multi-component quantification; grey relational analysis; comprehensive quality evaluation of *Panax notoginseng*

0 引言

三七, 被誉为中医药界的璀璨明珠及“南域灵草”, 其悠久

的医疗历史中展现出卓越疗效, 深受医药专家青睐。随着市场需求持续攀升, 三七的品质鉴别成为亟待解决的挑战, 科学构建评价体系以确保药材真伪与质量, 已成为当务之急, 刻不容

基金项目: 北京市延庆区金桥工程种子资金项目: 基于 UHPLC-MS 法快速检测调节三高类保健食品中非法添加药物方法的建立 (NO. 24005)

Fund: Seed Funding Project of Jinqiao Project, Yanqing District, Beijing: Establishment of a Method for Rapid Detection and Regulation of Illegal Drug Addition in Three High Class Health Food Based on UHPLC-MS Method (NO. 24005)

* 通信作者: 胡丹东, 博士, 副主任药师, 研究方向为药物分析与药物评价。E-mail: dongdanhu@163.com

* Corresponding author: HU Dan-Dong, Ph.D, Deputy Chief Pharmacist, Market Supervision Inspection and Testing Monitoring Center, Yanqing District, Beijing 102100, China. E-mail: dongdanhu@163.com

缓^[1]。为深入剖析三七的化学组分及其相互增效机制, 构建一套高效且精确的评价框架势在必行。鉴于高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC) 具备卓越的分离效能、迅捷的分析速度及高度灵敏的检测能力, 它在中药质量控制领域得到了广泛应用, 成为评估三七品质不可或缺的技术手段, 有效促进了中药研究与发展^[2]。利用 HPLC 实现三七中关键活性成分的精准量化, 有效辅助质量控制流程。然而, 为确保全面评估其药效, 必须深入考虑并整合多种活性成分间的复杂协同作用机制, 以此为基础构建更为完善的评价体系, 降低分析重复性的同时, 提升整体评估的科学性与准确性^[3]。

本文旨在通过 HPLC 技术结合灰色关联度分析 (grey relational analysis, GRA), 构建一套科学、全面的三七综合质量评价体系。三七作为传统名贵中药材, 其药效成分复杂多样, 质量直接关乎临床疗效与患者安全。本研究目的在于精准测定三七中多种关键活性成分的含量, 利用 HPLC 的高分离度与灵敏度优势, 确保数据准确性^[4]。引入灰色关联度分析, 探索各成分含量与三七整体质量之间的内在联系及权重分配, 为三七药材的优劣评判提供客观依据^[5]。此举不仅有助于规范三七市场, 提升中药材质量控制水平, 还能促进中药现代化、国际化进程, 保障中医药产业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 仪器

在实验装备配置方面, 集成了高性能的 Waterse2695 HPLC 系统, 该系统融合了 2998PDA 高精度检测器, 配备了四通泵以实现复杂样品的快速分离, 并集成了自动除气单元以确保流动相的稳定性。系统配套使用 Empower 软件, 便于数据分析与管理。采用了宁波新芝品牌下的 SB-5200DTD 型超声清洗仪, 其高效能确保实验器材的彻底清洁。对于质量测量, 引入了梅特勒-托利多的 ME104E/02 型电子秤, 其高精度满足实验室严苛的称量需求。在温控方面, 北京长风 HW.SY21-KP4 智能温控水浴为实验提供了稳定的温度环境。而样品的细化处理则依赖于北京科伟永兴 FW-200 高速研磨机, 其强大性能确保了样品的前处理效率与质量^[6]。整体配置兼顾了精准度、自动化与高效性, 满足了科研及生产中的多样化需求。

1.2 试剂

在基于 HPLC 多组分定量分析与灰色关联度分析相结合的三七综合质量评价研究中, 对实验材料、方法的选择理由进行了精简阐述, 并补充了关键试剂的规格、生产厂家信息, 以及梯度洗脱程序的设置和灰色关联度分析模型的构建细节。

本研究针对 50 批次经过权威教授细致鉴别的三七样本进行, 这些样本均确认源自三七的根部及根茎部分, 广泛分布于十个不同地域, 并由多家企业提供, 确保了样本的多样性与代表性。所有样本均达到高标准, 其有效成分含量不低于 98%, 体现了卓越的品质。在检测分析中, 选用了以下高纯度试剂: 甲醇 (纯度 $\geq 99.9\%$, 生产厂家 Sigma-Aldrich) 作为 HPLC 分析中常用的有机溶剂, 高纯度甲醇能有效溶解三七中的多种活性成分, 确保提取与分析的准确性。乙腈 (纯度 $\geq 99.9\%$, 生产厂家 Tedia) 同样作为高效溶剂, 乙腈在 HPLC 分析中展现出优异

的溶解性和分离能力, 有助于精准测定三七样品中的微量成分。纯净水 (符合 HPLC 级, 生产厂家 Millipore) 采用超纯水系统制备的 HPLC 级纯净水, 确保了分析过程中溶剂的纯净度, 减少背景干扰。以下为方法与梯度洗脱程序。(1) 为确保三七样品中多种成分的有效分离与精确定量, 设计了优化的梯度洗脱程序。该程序通过调整流动相中甲醇与水的比例, 实现了从极性大到非极性成分的逐步洗脱。(2) 初始条件: 以较低比例的甲醇 (如 20%) 作为起始流动相, 保持一段时间 (如 5 min), 以洗脱极性较大的成分。(3) 梯度上升: 甲醇比例线性增加至中等水平 (如 60%), 持续一段时间 (如 20 min), 分离中等极性的成分。(4) 高比例洗脱: 继续提高甲醇比例至较高水平 (如 80%), 并维持一段时间 (如 10 min), 以充分洗脱非极性成分。(5) 回归与平衡: 甲醇比例逐渐降低回至初始条件, 并保持一段时间以恢复系统平衡。灰色关联度分析被用于评估三七样本中不同成分含量与其综合质量之间的关联性。具体构建步骤如下。确定参考序列: 基于专家意见和文献数据, 选定关键质量指标 (如总皂苷含量) 作为参考序列, 代表三七的理想质量状态。构建比较序列: 将各三七样本中相应成分的含量数据作为比较序列, 形成比较矩阵。数据标准化: 采用极差法等方法对参考序列与比较序列进行无量纲化处理, 确保数据可比性。计算关联系数: 根据灰色系统理论, 计算各比较序列与参考序列在各点上的关联系数, 反映两者之间的相似程度。求关联度: 对关联系数进行加权平均或求和, 得到各样本与理想质量状态的关联度。排序与评估: 根据关联度大小对三七样本进行排序, 并结合实际情况进行综合质量评价。

1.3 供试品溶液的制备

将三七细粉精细筛选, 通过 65 目筛网后, 精确量取 1.0 g 此细粉, 随后将其缓缓加入 50 mL 甲醇溶液中, 确保充分混合后, 静置于室温环境下过夜, 以促进有效成分的溶解。次日, 启动加热回流装置, 持续处理该混合物 2 h, 期间保持温度适宜以促进提取效率。完成回流后, 通过精确调控, 将甲醇溶液量恢复至初始水平, 利用孔径为 0.35 μm 的精密滤膜进行细致过滤, 以去除不溶性杂质。将过滤后的澄清溶液转移至专用的液相小瓶中, 密封保存, 以备后续分析或实验使用^[7]。此处理流程有效确保了三七提取物的纯净度与稳定性, 满足高质量检测标准。

1.4 对照品溶液的配制

在制备混合对照品的过程中, 精确量取了三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、Re、Rb1 及 Rd, 其质量分别为 4.31、10.50、4.01、12.02、2.30 mg。随后, 向这些成分中逐步添加甲醇, 直至总体积达到 25 mL, 从而成功制备了含有上述五种皂苷的混合溶液。此混合对照品中, 各皂苷中三七皂苷 R1 和人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rd 的浓度分别 0.1724、0.4200、0.1604、0.4808、0.0920 mg/mL, 确保了各成分在溶液中的精确浓度分布。

1.5 色谱条件

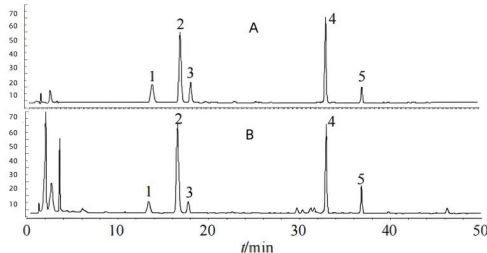
在色谱分析过程中, 选用了 Zorbax SB-Aq 作为固定相柱体, 以乙腈与水的混合溶液作为动态流动相体系, 通过实施梯度洗脱技术, 实现了对目标物的有效分离。操作设定流速恒定于每分钟 1 mL, 确保了分离过程的稳定性和效率。检测环节则采用了 203 nm 波长的紫外光作为检测手段, 这一波长选择基于目标化

合物的特性优化,以提高检测的灵敏度和准确性。为了维持柱效和分离效果,将柱温精确控制在 25°C。在进样步骤中,精确量取了 10 μL 的样品注入系统,确保了分析的精确性和可重复性。

1.6 样品测定

样品制备依据“1.3”所述方法执行,不同规格的三七根据各自产地进行分类处理。检测流程严格遵循“1.5”条款进行,重点在于记录各样本中皂苷成分的峰面积数据。

利用标准曲线法计算各皂苷成分,具体涵盖 R1、Rg1、Re、Rb1 及 Rd 等关键指标的含量。HPLC 色谱图见图 1。



注: 1——三七皂苷 R1; 2——人参皂苷 Rg1; 3——人参皂苷 Re; 4——人参皂苷 Rb1; 5——人参皂苷 Rd

图 1 混合对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig.1 Chromatogram of mixed reference substances(A)and sample (B)

2 结果与分析

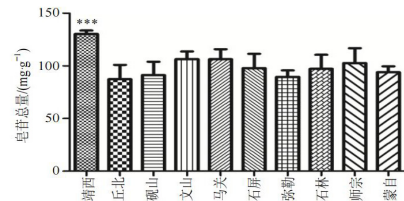
2.1 不同产地和不同规格 5 种皂苷含量对比分析

利用 SAS 9.4 对 10 个产地三七样品的 5 种皂苷总量进行多组 F 检验与多重比较,数据满足正态及方差齐性要求。分析显示 $F=1.37, P>0.05$,表明整体间无显著差异。然而,广西靖西与云南各产地间皂苷总量差异极显著 ($P<0.001$),详见图 2。规格不同的三七样品在 5 中皂苷含量上差异显著,见图 3。

2.2 灰色关联分析法综合评价不同产地、不同规格三七样品质量

基于 HPLC 多组分定量联合灰色关联度分析的三七综合质量评价结果显示,不同样品在关键活性成分(三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rd)的关联度上存在显著差异。样品 SL5、YS5 和 SZ2 在关联度上表现最优,分别位列前三,显示

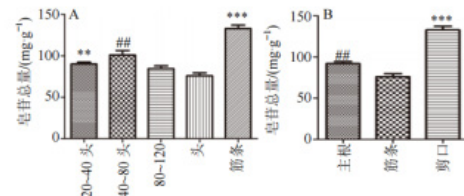
出与最优参考序列的高度相似性,因此被评定为等级 I,表明这些样品在活性成分含量上最为接近理想标准。相反, QB4、SP4 和 SZ4 等样品关联度较低,排名靠后,被评定为等级 IV 或 V,表明其活性成分含量与理想标准相差较大。样品间的相对关联度也呈现出明显差异,这反映了各样品在活性成分含量上的相对稳定性或一致性。例如, YS5 和 SZ2 不仅关联度高,而且相对关联度也较高,说明这些样品在活性成分含量上不仅接近理想标准,而且各成分间比例也较为均衡。通过 HPLC 多组分定量联合灰色关联度分析,可以全面、客观地评价三七样品的综合质量,为三七药材的质量控制提供科学依据。



注: 与其他产地相比: *** $P<0.001$

图 2 不同产地三七 5 种皂苷总量对比分析

Fig.2 Comparative analysis of the total amount of five saponins in *Panax notoginseng* from different origins



注: 图 A 中与筋条、剪口组相比: ** $P<0.05$; 与 80~120 头三七、筋条、剪口组相比: ** $P<0.05$; 与其他组相比: *** $P<0.001$; 图 B 中与其他组相比: ** $P<0.05$, *** $P<0.001$

图 3 不同商品规格(A)和不同部位(B)三七 5 种皂苷总量对比分析

Fig.3 Comparative analysis of the total amount of five saponins in *Panax notoginseng* with different commercial specifications (A) and different parts (B)

表 1 各样品相对于最优参考序列的关联系数、关联度、相对关联度、排序及等级

Table 1 Correlation coefficients, degrees of correlation, relative degrees of correlation, ranking, and grades of each sample relative to the optimal reference sequence

样品	关联系数					关联度	相对关联度	排序	等级
	三七皂苷 R1	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb1	人参皂苷 Rd				
JX1	0.829	0.469	0.897	0.602	0.468	0.661	0.479	11	II
JX2	0.871	0.479	1.000	0.613	0.479	0.692	0.498	9	I
JX3	0.841	0.458	0.918	0.558	0.452	0.653	0.467	12	II
JX4	0.798	0.451	0.937	0.571	0.453	0.641	0.473	13	II
JX5	0.952	0.469	0.659	0.612	0.467	0.692	0.498	8	I
QB1	0.698	0.389	0.661	0.597	0.389	0.553	0.412	29	III
QB2	0.699	0.352	0.634	0.602	0.351	0.541	0.389	37	IV
QB3	0.668	0.351	0.661	0.561	0.353	0.522	0.367	45	IV
QB4	0.612	0.329	0.631	0.522	0.329	0.492	0.331	50	V
QB5	0.881	0.418	0.862	0.828	0.418	0.679	0.522	6	I
YS1	0.732	0.369	0.619	0.553	0.382	0.531	0.382	41	IV
YS2	0.723	0.371	0.678	0.598	0.371	0.551	0.403	31	III
YS3	0.691	0.349	0.653	0.557	0.366	0.522	0.386	44	IV
YS4	0.693	0.358	0.652	0.572	0.348	0.519	0.381	42	IV
YS5	0.879	1.000	0.812	0.678	0.359	0.798	0.559	1	I

续表

样品	关联系数					关联度	相对关联度	排序	等级
	三七皂苷 R1	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb1	人参皂苷 Rd				
WS1	0.689	0.361	0.761	0.671	0.663	0.571	0.441	20	Ⅲ
WS2	0.761	0.372	0.732	0.656	0.364	0.579	0.432	19	Ⅲ
WS3	0.819	0.364	0.722	0.638	0.361	0.558	0.431	18	Ⅲ
WS4	0.731	0.357	0.708	0.651	0.358	0.561	0.422	25	Ⅲ
WS5	0.842	0.418	0.922	0.842	0.419	0.692	0.518	7	I
MG1	0.729	0.378	0.691	0.631	0.389	0.419	0.419	24	Ⅲ
MG2	0.758	0.432	0.838	0.641	0.431	0.462	0.461	15	Ⅱ
MG3	0.762	0.392	0.838	0.641	0.431	0.419	0.418	23	Ⅲ
MG4	0.763	0.379	0.711	0.608	0.378	0.413	0.407	32	Ⅲ
MG5	0.711	0.372	0.698	0.615	0.372	0.522	0.522	5	I
SP1	0.951	0.429	0.879	0.748	0.429	0.419	0.431	22	Ⅲ
SP2	0.781	0.372	0.731	0.622	0.372	0.437	0.439	16	Ⅲ
SP3	0.841	0.378	0.741	0.598	0.379	0.372	0.371	46	Ⅳ
SP4	0.661	0.352	0.641	0.576	0.352	0.365	0.366	48	Ⅳ
SP5	0.671	0.62	0.618	0.549	0.362	0.518	0.531	3	I
mL1	0.952	0.389	0.819	0.931	0.378	0.402	0.398	34	Ⅲ
mL2	0.718	0.369	0.668	0.569	0.369	0.426	0.432	21	Ⅲ
mL3	0.812	0.379	0.702	0.598	0.378	0.411	0.411	30	Ⅲ
mL4	0.667	0.349	0.628	0.528	0.349	0.362	0.362	49	Ⅳ
mL5	0.729	0.381	0.741	0.598	0.381	0.435	0.442	17	Ⅲ
SL1	0.702	0.361	0.661	0.592	0.364	0.389	0.389	38	Ⅳ
SL2	0.719	0.364	0.649	0.568	0.363	0.388	0.388	39	Ⅳ
SL3	0.731	0.362	0.679	0.598	0.364	0.411	0.397	35	Ⅲ
SL4	0.691	0.361	0.662	0.618	0.364	0.389	0.395	36	Ⅳ
SL5	1.000	0.412	0.871	1.000	0.412	0.422	0.551	2	I
SZ1	0.792	0.369	0.661	0.622	0.368	0.517	0.422	26	Ⅲ
SZ2	0.941	0.479	0.881	0.692	0.491	0.369	0.519	4	I
SZ3	0.689	0.339	0.661	0.569	0.338	0.371	0.382	43	Ⅳ
SZ4	0.669	0.349	0.631	0.562	0.349	0.489	0.374	47	Ⅳ
SZ5	0.922	0.398	0.808	0.689	0.406	0.412	0.489	10	Ⅱ
MZ1	0.742	0.361	0.708	0.579	0.361	0.551	0.413	28	Ⅲ
MZ2	0.761	0.391	0.681	0.581	0.392	0.563	0.405	27	Ⅲ
MZ3	0.729	0.372	0.692	0.589	0.372	0.551	0.398	33	Ⅲ
MZ4	0.708	0.359	0.659	0.561	0.358	0.528	0.379	40	Ⅳ
MZ5	0.831	0.378	0.738	0.672	0.379	0.602	0.461	14	Ⅲ

3 讨论与结论

HPLC 技术凭借高精度,精确量化三七多组分,革新质控体系,同步测定活性成分,全面把控品质,降低波动,提升质控水平^[8]。HPLC 多组分定量与灰色关联度分析结合的三七质量评价揭示,产地及规格不同的三七样品在五中关键皂苷含量上差异显著^[9]。

利用 HPLC 技术定量分析三七成分,结合灰色关联度模型创新评估质量,构建科学质控策略,突破传统局限,提升评价全面性准确性。

参考文献

- [1] 王子亮,龚沙沙,余森,等.基于HPLC多组分定量联合化学计量学及灰色关联度分析的癣宁搽剂质量控制研究[J].今日药学,2023,33(08):600-608,616.
- [2] 晏明英,魏谭军,赵丹,等.基于化学计量学及熵权TOPSIS分析联合多组分定量的麸炒苍术综合质量评价[J].中医药导报,2023,29(09):55-62.
- [3] 蒋自可,王淑君,解慧芳,等.基于灰色关联度和聚类分析的谷子

品种(系)综合评价与筛选[J].农业科技通讯,2023,(01):27-30.

- [4] 田清清,钟志奎,张雪兰,等.基于UPLC指纹图谱,灰色关联度分析及化学模式识别的土茯苓质量评价研究[J].中国医药导报,2023,20(21):19-24.
- [5] 巴小翠,孙俊英,陈玉洁,等.基于HPLC多指标成分定量联合OPLS-DA,EW-TOPSIS法的天丹通络胶囊质量评价研究[J].现代药物与临床,2023,38(05):1094-1101.
- [6] 梁增文,高明刚,李金玲,等.基于灰色关联度分析和主成分分析的辣椒栽培水肥条件综合评价[J].蔬菜,2023,(06):29-32.
- [7] 常幸远,胡杨,祁玉良,等.灰色关联度分析法和DTOPSIS法在两系杂交粳稻品种综合评价中的应用研究[J].杂交水稻,2023.
- [8] 王柳璿,郭焕佳,姬生国.基于熵权法和灰色关联度法的铁皮石斛质量评价[J].中成药,2023,45(02):483-487.
- [9] 汪安,程倩,苏敏,等.利用灰色关联度法评价九蒸九晒黄精质量[J].中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生,2023,(05):6.

作者简介

闻浩,药师,研究方向为药物分析、药物评价。

胡丹东,博士,副主任药师,研究方向为药物分析与药物评价。