

党参 HPLC 指纹图谱结合多种化学模式识别研究

黄娜娜^{1,2}, 李俊^{1,2*}, 普俊学³, 饶高雄^{1,2}, 浦滇^{1,2}, 和秋婷^{1,2}, 杨树超⁴, 舒润生⁴, 和建辉⁴(1.云南中医药大学, 昆明 650500; 2.云南省高校药食同源资源养生产品工程研究中心, 昆明 650500; 3.昆明积大制药股份有限公司, 昆明 650500; 4.云南香格里拉兰草药业有限公司, 云南 维西 674601)

摘要: 目的 基于 HPLC 指纹图谱对党参药材中多种化学成分进行含量检测, 并结合多种化学计量学统计分析评价多产地多来源多批次的党参药材整体质量。方法 用 ACE Neptune-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.15%甲酸水溶液为流动相, 体积流量 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 20 ℃, 对 41 批次来源于多个产地的党参药材构建 HPLC 指纹图谱并结合化学计量学分析对党参质量进行评价, 同时筛选出特征性成分进行含量检测及分析。结果 建立了党参 HPLC 指纹图谱, 确定了 23 个共有峰, 并指认了其中 7 个色谱峰; 41 批党参 HPLC 指纹图谱的相似度在 0.650~0.962; 聚类分析将 41 批次党参聚为 2 类; 主成分分析中 6 个主要成分分别反映 23 个共有峰信息; 偏最小二乘法判别分析中根据投影重要性指标的值进一步筛选出主要影响党参间差异的 9 个成分峰, 并进行多指标成分的方法学考察, 结果各成分的加样回收率在 99.09%~103.68%, RSD 为 1.21%~3.68%。结论 不同产地和来源的党参药材存在一定的质量差异。通过指纹图谱、聚类分析、主成分分析及偏最小二乘法判别分析等方法相结合可全面地评价党参的质量, 此方法的建立可以为党参的质量控制、产品评价提供一定的参考依据。

关键词: 党参; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)16-2103-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.16.009

引用本文: 黄娜娜, 李俊, 普俊学, 等. 党参 HPLC 指纹图谱结合多种化学模式识别研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(16): 2103-2111.

Study on HPLC Fingerprint of Codonopsis Radix Combined with Multiple Chemical Pattern Recognition

HUANG Nana^{1,2}, LI Jun^{1,2*}, PU Junxue³, RAO Gaoxiong^{1,2}, PU Dian^{1,2}, HE Qiuting^{1,2}, YANG Shuchao⁴, SHU Runsheng⁴, HE Jianhui⁴(1.Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2.Medical and Food Health Products Engineering Research Center of Yunnan University, Kunming 650500, China; 3.Kunming Jida Pharmacy Co., Ltd., Kunming 650500, China; 4.Yunnan Shangri-La Lancan Pharmaceutical Co., Ltd., Weixi 674601, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect the content of various chemical components in Codonopsis Radix based on HPLC fingerprints, combined with a variety of chemometric statistical analysis to evaluate the overall quality of Codonopsis Radix from multiple sources and batches. **METHODS** ACE Neptune-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, mobile phase was acetonitrile-0.15% formic acid aqueous solution, volume flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, detection wavelength was 260 nm, column temperature was 20 ℃, for 41 batches Codonopsis Radix medicinal materials from multiple origins were used to construct HPLC fingerprints and combined with chemometric analysis to evaluate the quality of Codonopsis Radix. At the same time, the characteristic components were screened for content detection and analysis. **RESULTS** The HPLC fingerprint of Codonopsis Radix was established, 23 common peaks were identified, and 7 chromatographic peaks were identified. The similarity of the HPLC fingerprints of 41 batches of Codonopsis Radix was between 0.650 and 0.962. Cluster analysis grouped 41 batches of Codonopsis Radix into 2 categories. The 6 main components in the principal component analysis reflected the information of 23 common peaks respectively. In the discriminant analysis of partial least squares, the 9 component peaks that mainly affect the difference between Codonopsis Radix were further screened according to the variable importance in projection. The methodological investigation of the index components showed that the sample recovery rate of each component was 99.09%~103.68%, and the RSD was 1.21%~3.68%. **CONCLUSION** There are differences in quality of Codonopsis Radix from different origins and sources. The combination of fingerprint, cluster analysis, principal component analysis and partial least square discriminant analysis can comprehensively evaluate the quality of Codonopsis Radix. The establishment of this method can provide a certain reference for the quality control and product evaluation of Codonopsis Radix.

KEYWORDS: Codonopsis Radix; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis

基金项目: 云南省重大科技专项(2018ZF014)

作者简介: 黄娜娜, 女, 硕士生 E-mail: 2273440100@qq.com
411790624@qq.com

*通信作者: 李俊, 女, 硕士, 高级工程师, 硕导

E-mail:

党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根^[1]。性甘味平, 补中益气, 和胃生津, 祛痰止咳。临床常用于脾虚食少便溏, 四肢无力、心悸气短、口干自汗、脱肛等, 同时常作为人参替代品, 用于原使用人参的成方制剂中。现代药理研究发现, 党参具有免疫调节、抗疲劳、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等功能^[2-7]。

自 20 世纪 60 年代起, 国内外众多专家与学者就开始研究党参的化学成分, 从中分离并鉴定的化合物类型有三萜类、聚炔类、甾醇类、糖苷类、生物碱类等, 以及多种无机元素和氨基酸^[8-10]。关琳静^[11]采用 RP-HPLC, 测定 74 批次党参药材中主要成分党参炔苷和苍术内酯 III 的含量, 并比较差异, 发现不同来源党参样品含量差异明显, 可将苍术内酯 III 作为反映潞党参道地性的特征成分, 结果表明潞党参品质好, 具有道地性。陈前锋等^[12]建立 HPLC 同时测定不同产地党参中党参炔苷和丁香苷含量的方法, 实验结果表明党参炔苷与丁香苷色谱峰分离良好, 该方法操作简便、结果稳定可靠, 为多指标控制党参药材的质量提供了实验基础。庞维荣等^[13]采用 RP-HPLC 分析潞党参、素花党参、川党参中党参内酯和党参炔苷的含量, 发现党参内酯和党参炔苷之间存在着良好的相关性, 党参炔苷含量高的样品, 相应的党参内酯含量也高, 为党参的质量控制找到新的简便易行的方法。崔晓雯等^[14]建立同时适用于岭南特色饮片熟党参及其生品的 HPLC 指纹图谱分析方法, 对比党参蒸制前后成分的变化, 发现不同批次熟党参样品存在一定的差异性, 为进一步建立熟党参质量控制标准奠定基础。

党参是我国传统的补中益气药材, 是集药用、食用、饮用、保健等多种功能为一体的天然绿色食品, 在我国具有悠久的食用及药用历史, 质量必须严格把控, 而关于其质量标准的研究多以某一产地的党参为研究对象, 质量控制指标也仅仅为 2~3 个成分, 并不能反映党参的整体质量特征。本研究从各个党参主产地采集不同批次的党参药材, 基于其多种成分同检的方法, 及指纹图谱共有模式的建立, 可以更全面地控制党参药材的质量, 以期对党参药材整体质量的全面控制和评价

及后期谱效学的深入研究提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BSM120.4 万分之一电子天平(上海卓精电子科技有限公司); AB265-S 十万分之一电子天平(Mettler-Toledo 公司); SKSSOOH 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); ACE Neptune-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); Shimadzu LC-2030 液相色谱仪、UV 检测器(日本 Shimadzu)。

1.2 试剂

甲醇、甲酸(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 水为超纯水(实验室自制); 对照品: 色氨酸(批号: 140686-201303; 供含量检测用)、丁香苷(批号: 111574-201504; 供含量检测用)均购自中国食品药品检定研究院; 腺苷(批号: 190206; 供含量检测用)、党参苷 I(批号: DST191020-190; 供含量检测用)、党参新物质(批号: AF9040903; 供含量检测用)均购自河南信阳中间计量生物科技有限公司; 党参炔苷(批号: 20061010; 供含量检测用)、白术内酯 III(批号: 19030203; 供含量检测用)均购自云南昆明森岚科技有限公司, 以上对照品均为市售品; 41 批(S1~S41)党参样品共购自 28 个不同产地, 均经云南中医药大学陈绍田教授鉴定, 其中 S1、S2、S15 和 S36~38 样品来源于川党参, S4、S19、S21、S27 和 S31~35 样品来源于素花党参, 剩下 26 批样品均来源于党参, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的配制

取腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷 I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯 III 7 种对照品适量, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成含腺苷 23.200 μg·mL⁻¹、色氨酸 43.600 μg·mL⁻¹、丁香苷 5.088 μg·mL⁻¹、党参苷 156.400 μg·mL⁻¹、党参新物质 61.200 μg·mL⁻¹、党参炔苷 61.200 μg·mL⁻¹ 以及白术内酯 III 49.200 μg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液。精密移取混合对照品储备液 4 mL, 置于 10 mL 量瓶中加入适量甲醇, 振摇后定容, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取中间续滤液, 即得。

2.2 供试品溶液的配制

取本品粉末(过三号筛)2.0 g, 精密称定, 置 250 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 20 mL,

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	ABZCDS20200801	四川阿坝州	S22	MXDS-20191001	甘肃岷县
S2	BQDS20191001	湖北恩施	S23	MXDS20191201	甘肃岷县
S3	DDSD20200801	吉林长白山	S24	NMDS20200801	内蒙古
S4	FDS20191001	山西平顺	S25	NXDS20200801	宁夏
S5	GSDS20200601	甘肃定西	S26	PSLDS20191001	山西长治 平顺
S6	GSDS20200602	甘肃定西	S27	QHYDS20191001	青海
S7	GSDS20200603	甘肃定西	S28	SDLDS20200601	山西上党
S8	GSDS20200604	甘肃定西	S29	SXLDS20200601	山西五 台山
S9	GSDS20200605	甘肃定西	S30	SXXADS20200801	陕西西安
S10	GSDS20200606	甘肃定西	S31	TDS20191001	山西五 台山
S11	GSDS20200607	甘肃定西	S32	WDS20191001	甘肃文县
S12	GSDS20200608	甘肃定西	S33	WDS20191201	甘肃文县
S13	GSDS20200609	甘肃定西	S34	WDS20200601	甘肃文县
S14	GSDS20200610	甘肃定西	S35	WDS20200602	甘肃文县
S15	GZZDS20200801	四川甘孜州 炉霍	S36	WSMD20191001	重庆巫山
S16	HBDS20200801	河北	S37	WSMD20191201	重庆巫山
S17	HDXDS20191201	云南维西	S38	WSMD20191202	重庆巫山
S18	HLJDS20200801	黑龙江伊春	S39	WYBQDS20200601	甘肃渭源
S19	LNWDS20200701	甘肃陇南	S40	XZZDS20200801	西藏
S20	LXBTDS20191001	甘肃陇西	S41	YNGSDS20200801	云南高山
S21	LXXDS20200801	甘肃陇西			

密塞，称定重量，超声处理(功率 140 W，频率 42 kHz) 30 min 后取出，静置到室温，再次称定重量，用 70%甲醇补足减失的重量，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取中间续滤液，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 ACE Neptune- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.15%甲酸水溶液(B)，梯度洗脱：0~10 min，5% $\rightarrow$ 8%A；10~36 min，8% $\rightarrow$ 14%A；36~55 min，14% $\rightarrow$ 30%A；55~58 min，30% $\rightarrow$ 55%A；58~60 min，55% $\rightarrow$ 60%A；60~70 min，60% $\rightarrow$ 70%A；70~75 min，70% $\rightarrow$ 5%A；75~80 min，5%A；体积流量 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ；检测波长 260 nm；柱温 20 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 20 μL ；理论板数按党参炔苷计算 $\geq$ 6 000。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取党参样品(批号：GSDS20200610)精密称定，按“2.2”项下方法制备得到供试品溶液，重复进样 6 次，按“2.3”项

下色谱条件进样测定，以 14 号峰(党参苷 I)为参比峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均 $<$ 2.98%。

2.4.2 稳定性试验 取党参样品(批号：GSDS20200610)精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后的 0，2，4，6，8，10，12，24 h 按“2.3”项下色谱条件进样测定，以 14 号峰(党参苷 I)为参比峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均 $<$ 3.02%。

2.4.3 重复性试验 取党参样品(批号：GSDS20200610)精密称定 6 份，按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，以 14 号峰(党参苷 I)为参比峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均 $<$ 3.87%。

2.5 HPLC 指纹图谱的构建及多种化学计量学统计分析

2.5.1 HPLC 指纹图谱的构建 取收集的 41 批党参样品按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，得到 41 批党参样品 HPLC 色谱图，并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件，以 S17 图谱作为参照图谱，采用多点校正建立指纹图谱后，生成叠加图及对照指纹图谱，见图 1。

选择其中主要成分且分离度较好的色谱峰(14 号峰党参苷 I)作为特征峰，共标记 23 个共有峰，确定 23 个色谱峰为党参药材的指纹图谱共有峰。并对其中 7 个共有峰成分进行了指认，分别为 7 号峰(腺苷)、10 号峰(色氨酸)、11 号峰(丁香苷)、14 号峰(党参苷 I)、17 号峰(党参新物质)、20 号峰(党参炔苷)、21 号峰(白术内酯 III)，见图 2。

2.5.2 相似度评价 将“2.5.1”项下检测得的 41 批党参药材指纹图谱导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)，匹配色谱峰并生成对照指纹图谱，通过软件计算导出不同批次之间与对照指纹图谱(SP)的相似度结果，见表 2。结果表明，各产地间指纹图谱相似度存在差异，41 个批次党参药材相似度为 0.650~0.962，19 个批次相似度 $>$ 0.9，且只有 2 个批次相似度 $<$ 0.7，说明不同产地的党参药材质量虽具有一定差异，但整体质量相似，表明指纹图谱可用来对不同产地间党参进行比较。

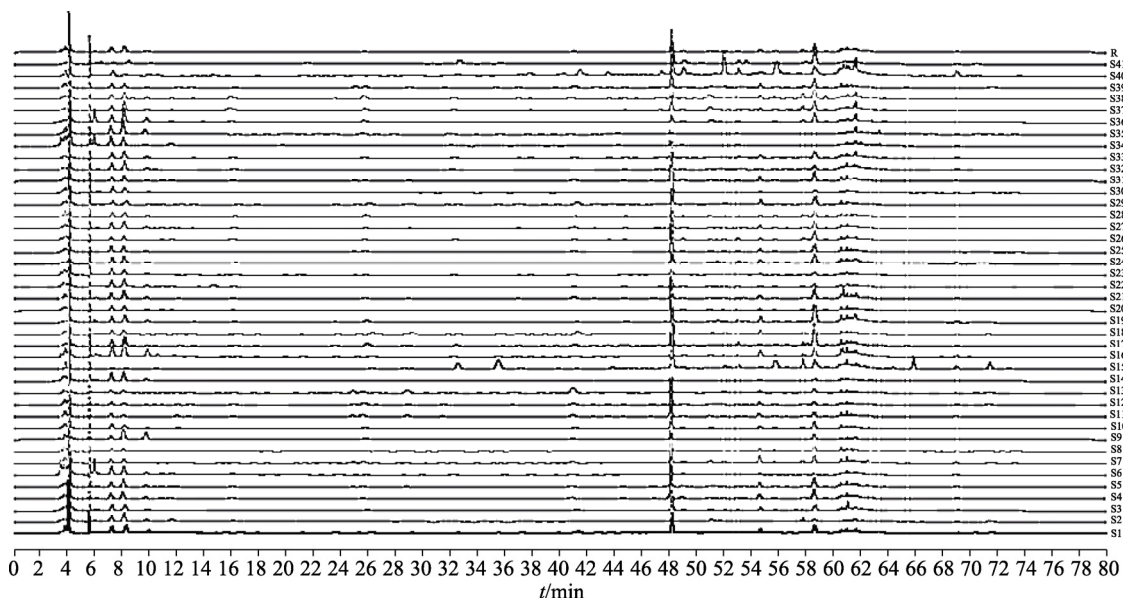


图1 不同产地党参 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 HPLC fingerprint overlay of Codonopsis Radix from different producing areas

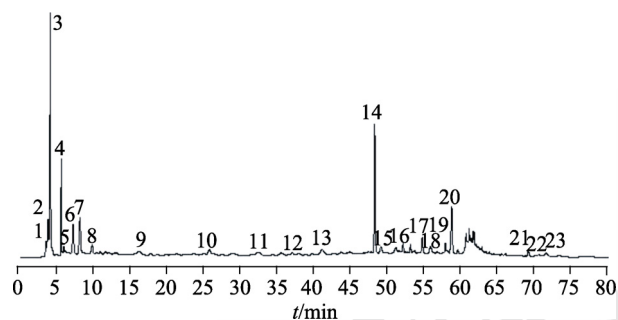


图2 不同产地党参 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig. 2 HPLC fingerprint common pattern of Codonopsis Radix from different producing areas

表2 党参药材 HPLC 指纹图谱相似度结果

Tab. 2 Similarity results of HPLC fingerprint of Codonopsis Radix

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.947	S22	0.894
S2	0.817	S23	0.861
S3	0.932	S24	0.823
S4	0.959	S25	0.956
S5	0.961	S26	0.906
S6	0.791	S27	0.962
S7	0.919	S28	0.957
S8	0.949	S29	0.908
S9	0.872	S30	0.913
S10	0.957	S31	0.952
S11	0.893	S32	0.868
S12	0.924	S33	0.927
S13	0.889	S34	0.788
S14	0.844	S35	0.773
S15	0.669	S36	0.857
S16	0.878	S37	0.881
S17	0.796	S38	0.888
S18	0.868	S39	0.939
S19	0.834	S40	0.650
S20	0.962	S41	0.800
S21	0.934	SP	1.000

2.5.3 聚类分析 将 41 批党参样品 23 个共有峰的相对峰面积数据输入 SPSS 22.0 软件,对样品进行系统聚类,采用组间连接法,以欧式平方距离为分类依据。由图 3 可见,当欧式距离>20 时,41 批党参聚为 2 类,6, 34 聚为一类,其他批次聚为一类;当欧式距离>10 时,41 批党参聚为 4 类,6, 34 聚为一类,40 聚为一类,15, 17 聚为一类,其他批次聚为一类,由聚类分析结果可看出不同产地、批次之间党参药材存在差异,但没有明显的地域聚集,表明整体质量较为稳定,结论与指纹图谱相似度一致。

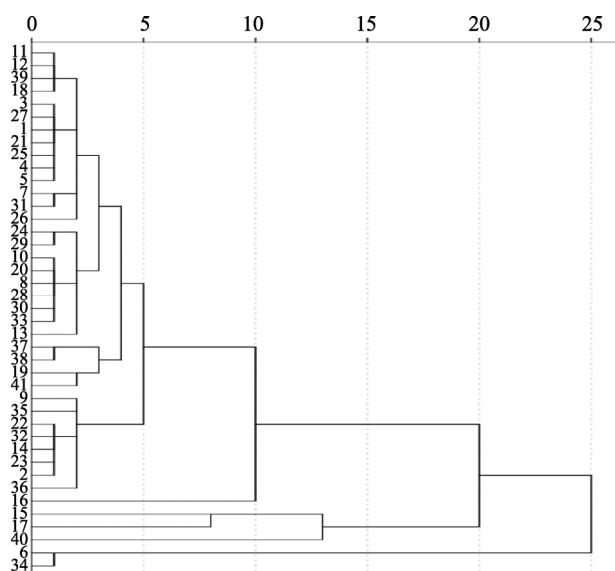


图3 41 批党参聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of 41 batches of Codonopsis Radix

2.5.4 主成分分析(principal component analysis, PCA) 为进一步比较不同批次间党参样品的质量差异,将各个批次党参中的 23 个共有峰面积导入 SPSS 22.0 软件中进行主成分分析,结果见表 3。其中特征值>1 的因子有 6 个,对总方差的累计贡献率共为 81.27%。表明这 6 个主成分包含了全部测量指标所含有的主要信息,达到了降维的目的。旋转后共有峰因子载荷矩阵见表 4,在第一主成分中,色谱峰 12~15, 17~18 和 20~22 的系数较大,说明第一主成分主要反映上述色谱峰的信息;色谱峰 1~4 在第二主成分上有较高载荷,说明第二主成分主要反映它们的信息;第三主成分主要反映色谱峰 5~8 的信息;第四主成分主要反映色谱峰 9~10, 16 和 19 的信息。而主成分 5 和主成分 6 分别反映色谱峰 11 和色谱峰 23。为了分析党参药材质量的差异性规律,利用 SIMCA14.1 软件对 41 批不同产地党参药材指纹图谱的原始数据进行 PCA-X 分析,见图 4。样品分布距离越远表明差异性越大,可以直观看出各产地样品特征分布情况,各个产地的党参样品各自聚为一类,甚至相同产地不同批次的党参分别聚为 2 类,表明不同产地、不同批次的党参间存在一定的差异性。

表 3 特征值和累积贡献率

Tab. 3 Eigenvalue and cumulative contribution

成分	初始特征值		
	合计	方差/%	累积/%
1	6.343	27.578	27.578
2	4.946	21.505	49.083
3	2.783	12.100	61.184
4	1.994	8.671	69.854
5	1.390	6.044	75.898
6	1.236	5.372	81.270
7	0.924	4.016	85.286
8	0.747	3.250	88.535
9	0.644	2.801	91.336
10	0.377	1.639	92.976
11	0.341	1.483	94.459
12	0.283	1.228	95.688

2.5.5 偏最小二乘法判别分析(partial least-squares discrimination analysis, PLS-DA) PLS 方法在普通多元回归的基础,结合了 PCA 和 CCA(典型相关分析)的思想,解决回归分析中自变量多重共线性的问题。采用 SIMCA 14.1 软件,将主成分分析中聚为一类但内部仍具有差异的 36 个批次进行有监督的偏最小二乘法回归分析,发现这 36 批党参

表 4 初始因子载荷矩阵

Tab. 4 Component matrix

色谱	主成分					
	1	2	3	4	5	6
1	-0.106	0.940	0.231	-0.003	0.046	0.038
2	-0.059	0.796	0.207	-0.251	-0.256	0.345
3	-0.181	0.859	0.389	0.004	0.030	0.020
4	0.046	0.838	-0.091	0.144	0.137	-0.245
5	0.254	0.453	0.582	-0.178	-0.264	-0.072
6	0.075	0.478	0.801	0.121	-0.036	-0.088
7	-0.102	0.068	0.923	0.248	-0.016	-0.027
8	-0.054	0.091	0.922	0.081	0.102	0.005
9	-0.009	0.311	0.114	0.821	0.033	-0.268
10	0.126	-0.158	0.047	0.768	-0.070	0.321
11	0.256	0.072	-0.016	0.112	0.874	0.200
12	0.763	0.180	-0.032	0.255	0.192	0.042
13	0.858	0.002	-0.067	0.021	-0.103	-0.019
14	0.521	-0.180	-0.411	0.227	0.177	0.375
15	0.764	0.051	0.201	-0.119	0.509	-0.063
16	0.102	-0.023	0.255	0.795	0.070	0.118
17	0.821	-0.079	0.075	0.218	-0.172	0.199
18	0.799	-0.102	-0.039	-0.031	0.464	-0.047
19	0.130	-0.181	-0.151	0.632	0.467	0.460
20	0.555	-0.350	-0.143	0.411	0.299	-0.031
21	0.829	-0.024	0.176	-0.022	0.337	0.213
22	0.519	-0.167	-0.149	-0.034	-0.073	-0.201
23	0.017	0.049	-0.086	0.159	0.150	0.885

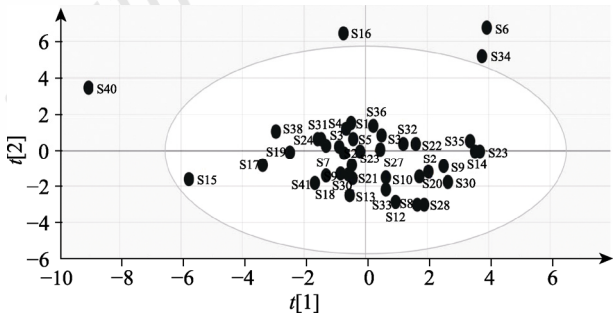


图 4 不同产地党参指纹图谱 PCA-X 得分图

Fig. 4 PCA-X score chart of fingerprint of Codonopsis Radix from different producing areas

明显分开,结果见图 5。 $R^2X(cum)=0.604$, $R^2Y(cum)=0.730$, $Q^2=0.76$, 均>0.5,说明模型稳定可靠,适合作为党参指纹图谱的模式识别方法,同时从折线得分图中可知,各数据在主成分中没有较强偏离值,结果见图 6。且自变量投影重要性指标(variable importance in projection, VIP)以 $VIP>1.0$ 为筛选标准,得到主要引起党参间不同差异的标记性成分峰依次为 18, 13, 17, 12, 14,

20, 21, 4, 15, 结果与主成分分析中主要的 2 个主成分峰结果一致, 可作为指导党参质量控制的 关键成分, 结果见图 7。

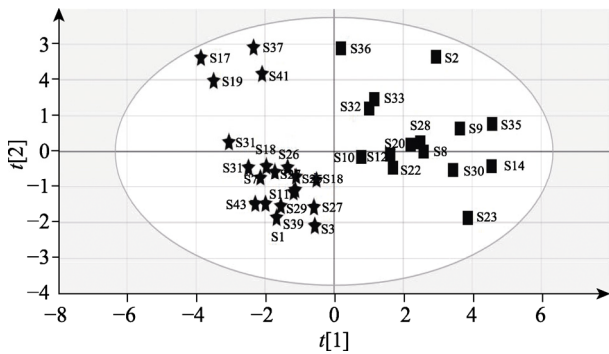


图 5 党参偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 5 Score chart of partial least squares discriminant analysis of Codonopsis Radix

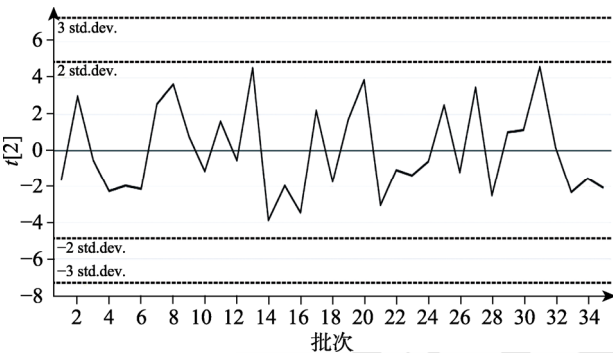


图 6 党参偏最小二乘判别分析折线得分图

Fig. 6 Score chart of broken line in partial least squares discriminant analysis of Codonopsis Radix

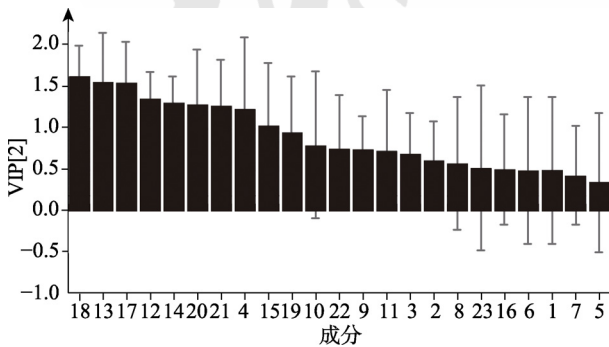


图 7 党参偏最小二乘判别分析 VIP 值图

Fig. 7 VIP value diagram of partial least squares discriminant analysis of Codonopsis Radix

2.6 对党参 7 种指标性成分的含量测定

2.6.1 专属性试验 精密量取“2.1”“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL , 按“2.3”项下色谱条件进样测定。结果显示 7 种主要检测成分的色谱峰与相邻谱峰的分度良好, 对称因子为 0.90~1.10, 理论板数以党参炔苷峰计均>

6 000。供试品色谱图中, 在与对照品色谱图腺苷(峰 1)、色氨酸(峰 2)、丁香苷(峰 3)、党参苷 I(峰 4)、党参新物质(峰 5)、党参炔苷(峰 6)及白术内酯 III(峰 7)相应位置上, 均有相同保留时间的色谱峰, 阴性对照溶液在相应保留时间处未见色谱峰, 不干扰测定, 表明系统的适用性良好, 方法的专属性良好。色谱图见图 8。

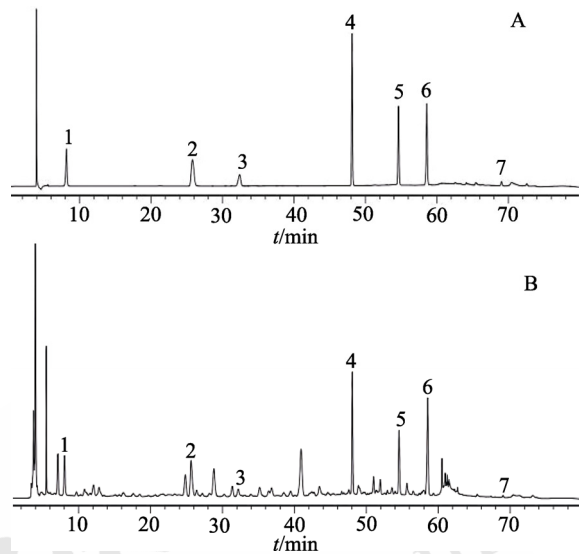


图 8 对照品(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 图

1-腺苷; 2-色氨酸; 3-丁香苷; 4-党参苷 I; 5-党参新物质; 6-党参炔苷; 7-白术内酯 III。

Fig. 8 HPLC diagrams of reference substance(A) and test substance solution(B)

1-adenosine; 2-tryptophan; 3-syringin; 4-tangshenoside I; 5-lobetyolinin; 6-lobetyolin; 7-atractylenolide III.

2.6.2 线性关系考察 取“2.1”项下混合对照品贮备液 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 定容, 摇匀。分别精密吸取 20 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以对照品浓度为横坐标, 相应的峰面积积分值为纵坐标, 得到各待测成分的线性回归方程和线性范围, 各成分 R^2 均> 0.999 3, 符合要求, 表明线性关系良好。结果见表 5。

表 5 7 种成分的回归方程及线性范围

Tab. 5 Regression equation and linear range of 7 components

化合物	回归方程	R^2	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
腺苷	$Y=26\ 830X-1\ 421.6$	0.999 9	0.046 4~0.464 0
色氨酸	$Y=21\ 520X-3\ 226.7$	0.999 8	0.087 2~0.872 0
丁香苷	$Y=73\ 727X-356.9$	0.999 9	0.010 2~0.101 8
党参苷 I	$Y=31\ 567X-3\ 054.5$	0.999 9	0.112 8~1.128 0
党参新物质	$Y=18\ 248X-5\ 262.4$	0.999 6	0.122 4~1.224 0
党参炔苷	$Y=21\ 092X-2\ 956.8$	0.999 8	0.122 4~1.224 0
白术内酯 III	$Y=1\ 377X-217.88$	0.999 4	0.098 4~0.984 0

2.6.3 仪器精密度试验 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 20 μL , 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 重复 6 次, 计算腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III峰面积 RSD 分别为 0.92%, 0.62%, 0.68%, 0.33%, 0.89%, 0.24%, 1.28%, 符合要求, 表明仪器精密度良好。

2.6.4 稳定性试验 精密吸取“2.2”项下供试品溶液 20 μL , 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 注入液相色谱仪, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III峰面积 RSD 分别为 1.14%, 0.48%, 1.11%, 0.99%, 0.45%, 0.37%, 2.84%, 符合要求, 表明供试品在 24 h 内稳定良好。

2.6.5 重复性试验 取党参样品(批号: GSDS20200610), 精密称定 6 份, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 测得腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III的峰面积值, 计算其含量 RSD 分别为 1.01%, 1.51%, 3.65%, 2.94%, 2.24%, 2.27%, 1.91%, 符合要求, 表明本方法重复性良好。

2.6.6 加样回收率试验 取已知含量(腺苷 0.015 7%、色氨酸 0.026 6%、丁香苷 0.002 2%、党参苷I 0.028 4%、党参新物质 0.036 5%、党参炔苷 0.046 5%、白术内酯III 0.014 5%)的党参药材粉末 1.0 g, 精密称定, 分别按对照品加入量与供试品中待测成分含量的比为 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1, 精密加入腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III对照品适量, 按“2.2”项下方法, 分别平行制备 3 份样品, 按照“2.3”项下色谱条件进行分析, 以外标法计算含量, 并计算加样回收率, 结果腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III的平均回收率分别为 100.00%, 101.89%, 99.09%, 100.12%, 100.33%, 103.68%, 100.69%, RSD 值分别为 2.83%, 1.80%, 2.37%, 3.68%, 2.70%, 1.21%, 2.21%, 符合要求。

2.6.7 样品含量测定 按“2.2”项下供试品溶液的制备方法制备各批次供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样检测, 结果见表 6。

3 讨论

3.1 色谱条件及含量测定

本研究过程中, 在测定党参中 7 种成分含量时, 对各个成分进行全波长扫描, 发现其中腺苷、色氨酸、党参新物质和党参炔苷都在 260 nm 左右紫外吸收较高, 丁香苷、党参苷I和白术内酯III在 220 nm 处有较大紫外吸收, 采用上述 2 个波长进样检测发现, 220 nm 波长下基线非常不稳定, 对成分出峰有较大影响, 综合考虑最终选择 260 nm 作为最佳检测波长, 对样品制备不同溶剂(100%甲醇、70%甲醇、50%甲醇)、不同提取方式(超声提取、回流提取)、不同提取时间(30, 40 min)的考察, 通过对比样品各成分含量, 筛选得到党参药材各成分均为百分百提取的供试品制备方法。以及考察了不同流速(1.0, 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、不同流动相系统(乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.15%甲酸、甲醇-0.15%甲酸、乙腈-0.2%甲酸)、不同柱温(20, 25, 30 $^{\circ}\text{C}$), 通过对比各条件下成分出峰时间及峰型, 最终确定了最佳色谱条件。

3.2 结果讨论

在不同产地和不同来源的党参含量测定结果中, 腺苷、丁香苷、党参苷I和党参炔苷 4 个成分在整体含量上均为川党参>素花党参>党参, 色氨酸含量为川党参>党参>素花党参, 另外 2 种成分党参新物质和白术内酯III含量整体上素花党参>川党参>党参。且川党参中来源于湖北恩施的板桥党参含量偏低, 素花党参中来源于甘肃产地的纹党参整体含量偏低, 党参中的西藏和云南 2 个产地的党参含量较高。结果表明, 在党参的 3 个来源中, 川党参的含量整体高于其他品种, 素花党参次之, 党参含量偏低, 这可能与不同来源和不同产地的党参生长环境中的水分、温度、光照、土壤、微生物、生物竞争等因素有关^[15]。

指纹图谱可以在一定程度上反映样品中大部分化学成分的种类及相对含量的高低, 进而从整体上分析中药的质量特征^[16-18]。本研究建立了全国 28 个产地 41 批次党参药材的 HPLC 指纹图谱, 指出腺苷、色氨酸、丁香苷、党参苷I、党参新物质、党参炔苷、白术内酯III 7 种主要特征成分, 化学计量学分析结果中 41 批样品的相似度虽存在差异性, 但只有 2 批相似度<0.70, 表明虽不同批次党参间由于地域、环境等自然原因形成的本质差异无法避免, 但是从整体上看党参的质量还是

表 6 样品含量测定结果

Tab. 6 Results of content determination of samples

产地	批号	含量/%						
		腺苷	色氨酸	丁香苷	党参苷 I	党参新物质	党参炔苷	白术内酯 III
四川阿坝州	ABZCDS20200801	0.057 1	0.021 4	0.003 3	0.077 8	0.039 9	0.062 7	0.169 0
湖北恩施	BQDS20191001	0.052 5	0.005 3	0.002 7	0.019 5	0.003 1	0.016 1	0.042 4
四川甘孜州	GZZDS20200801	0.011 7	0.022 1	0.016 5	0.186 7	0.033 9	0.096 5	0.320 9
重庆巫山	WSMD20191001	0.071 0	0.038 4	0.006 7	0.034 6	0.013 5	0.069 3	0.094 3
重庆巫山	WSMD20191201	0.044 5	0.028 0	0.005 5	0.053 0	0.016 2	0.068 6	0.061 4
重庆巫山	WSMD20191202	0.038 6	0.038 7	0.007 1	0.080 5	0.030 7	0.107 2	0.107 4
甘肃陇南	LNWDS20200701	0.042 3	0.033 6	0.006 0	0.060 1	0.061 7	0.147 1	0.194 4
山西平顺	FDS20191001	0.039 7	0.017 1	0.001 0	0.097 2	0.047 6	0.080 4	0.174 5
山西五台山	TDS20191001	0.034 1	0.016 8	0.004 4	0.124 1	0.047 0	0.073 6	0.150 5
甘肃陇西	LXXDS20200801	0.053 4	0.022 9	0.003 6	0.128 4	0.044 1	0.093 5	0.161 1
甘肃	WDS20191001	0.047 3	0.008 5	0.005 9	0.027 6	0.023 9	0.045 4	0.180 2
甘肃	WDS20191201	0.038 0	0.015 0	0.003 8	0.042 3	0.027 8	0.057 8	0.076 2
甘肃	WDS20200601	0.051 8	0.014 4	0.008 9	0.033 2	0.016 6	0.017 7	0.083 0
甘肃	WDS20200602	0.076 0	0.022 0	0.004 9	0.018 7	0.004 9	0.010 1	0.061 4
东北	DDS20200801	0.038 7	0.017 1	0.002 8	0.0718	0.037 6	0.052 3	0.151 6
甘肃	GSDS20200601	0.039 0	0.018 7	0.003 4	0.104 4	0.041 3	0.072 6	0.171 0
甘肃	GSDS20200602	0.051 7	0.012 9	0.006 1	0.027 3	0.020 1	0.021 2	0.194 5
甘肃	GSDS20200603	0.026 5	0.027 4	0.002 8	0.122 2	0.058 7	0.061 7	0.211 5
甘肃	GSDS20200604	0.015 9	0.010 7	0.001 0	0.060 2	0.021 4	0.037 3	0.054 5
甘肃	GSDS20200605	0.071 9	0.015 9	0.002 2	0.039 2	0.008 4	0.041 0	0.030 5
甘肃	GSDS20200606	0.024 4	0.020 9	0.002 1	0.049 7	0.023 3	0.050 5	0.053 3
甘肃	GSDS20200607	0.015 6	0.031 0	0.002 7	0.095 1	0.030 6	0.041 8	0.146 6
甘肃	GSDS20200608	0.013 2	0.024 2	0.001 0	0.092 7	0.022 7	0.026 4	0.054 9
甘肃	GSDS20200609	0.016 9	0.021 3	0.002 6	0.060 8	0.022 5	0.038 2	0.074 0
甘肃	GSDS20200610	0.049 9	0.007 0	0.001 5	0.019 0	0.012 6	0.018 9	0.039 6
河北	HBDS20200801	0.119 9	0.036 2	0.006 0	0.068 6	0.065 4	0.079 5	0.299 2
云南淮登乡	HDXDS20191201	0.043 9	0.037 4	0.005 7	0.239 4	0.029 8	0.155 5	0.104 5
黑龙江	HLJDS20200801	0.024 1	0.033 6	0.004 2	0.110 3	0.036 6	0.063 2	0.079 9
甘肃陇西	LXBTD20191001	0.028 4	0.007 3	0.001 9	0.068 5	0.020 2	0.047 2	0.038 4
甘肃岷县	MXDS20191001	0.045 3	0.009 5	0.004 2	0.036 6	0.016 6	0.026 7	0.071 8
甘肃岷县	MXDS20191201	0.036 8	0.004 7	0.001 5	0.025 6	0.014 6	0.019 8	0.021 5
内蒙古	NMDS20200801	0.044 8	0.025 4	0.003 4	0.057 9	0.046 2	0.086 1	0.217 1
宁夏	NXDS20200801	0.034 6	0.022 7	0.003 0	0.090 8	0.035 9	0.063 8	0.102 0
山西平顺	PSLDS20191001	0.024 6	0.017 8	0.007 4	0.144 0	0.019 0	0.068 0	0.089 6
青海	QHYDS20191001	0.039 5	0.015 5	0.003 6	0.069 1	0.033 8	0.055 3	0.098 7
山西上党	SDLDS20200601	0.023 8	0.018 5	0.000 8	0.041 7	0.010 5	0.037 7	0.023 8
山西	SXLDS20200601	0.0249	0.025 1	0.002 9	0.060 5	0.045 8	0.066 5	0.042 9
陕西西安	SXXADS20200801	0.034 7	0.011 7	0.001 3	0.037 7	0.012 8	0.025 9	0.025 5
甘肃渭源	WYBTDS20200601	0.022 3	0.021 1	0.002 1	0.083 5	0.036 0	0.061 3	0.064 4
西藏	XZZDS20200801	0.018 6	0.025 5	0.010 6	0.155 9	0.060 5	0.122 3	0.614 6
云南高山	YNGSDS20200801	0.026 6	0.017 0	0.015 5	0.073 1	0.015 5	0.117 2	0.105 8

存在一定的相关性。且指纹图谱的聚类分析结果将 41 批党参聚为 4 类,除了其中 5 个批次分别聚为 3 类外,剩下 36 个批次的党参均被聚为一类,同样说明不同产地和批次的党参整体质量比较稳定。PCA 通过降维分析筛选出导致各批次党参出现分类差异的 6 个主要化学成分,并可以从因子载荷图看出,指纹图谱中指认的 7 种化学成分均作为主要信息参与了党参质量的表达,表明其作为党参整体质量的控制指标是较为合理的。党参指纹图谱 PCA-X 得分图以及 PLS-DA 分析发现引

起不同批次党参间化学质量差异的主要成分峰为 18, 13, 17, 12, 14, 20, 21, 4, 15, 其中 14 号峰(党参苷I)、17 号峰(党参新物质)、20 号峰(党参炔苷)、21 号峰(白术内酯III)均为党参中主要的活性成分,说明针对党参 7 种成分的含量测定具有一定的代表性和准确性。且各分析结果表明不同产地党参药材的综合化学质量存在差异,但无明显的地域性规律,这进一步说明产地不能作为党参质量评价的唯一依据,需综合考虑海拔、气候、前处理方法等其他因素。

4 结论

指纹图谱是一种评价中药真实性、稳定性和有效性的可行模式,在中药质量控制领域被广泛应用^[19]。党参化学成分复杂多样,单凭借一种或几种化学成分不足以表明党参整体的质量特征,而本研究建立了党参药材的HPLC中药指纹图谱,共标定了23个色谱峰,指认了其中7个色谱峰的化学成分,并结合化学模式识别方法对其信息做进一步综合分析,实现对党参药材的全面综合评价,简便、快捷,精密度、稳定性、重复性良好,并通过含有量进行定量分析,以期对党参药材质量控制和品质评价提供参考,后期以此为理论依据,进一步开展深入的药效学研究,可使党参质量与其药理作用真正结合起来,有助于阐明其机制,为中药临床应用奠定更扎实的理论基础。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 293.
- [2] GAO Z Z, ZHANG C, JING L R, et al. The structural characterization and immune modulation activities comparison of *Codonopsis pilosula* polysaccharide (CPPS) and selenizing CPPS (sCPPS) on mouse *in vitro* and *vivo*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020(160): 814-822.
- [3] 马铭, 白瑞斌, 刘景龙, 等. 3种党参提取物体外抗氧化活性探究[J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2514-2517.
- [4] XIE Q, SUN Y T, CAO L L, et al. Antifatigue and antihypoxia activities of oligosaccharides and polysaccharides from *Codonopsis pilosula* in mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(7): 6352-6362.
- [5] HAO Y Y, HE P, NIE C X, et al. Mechanism of different processed products of *Codonopsis pilosula* on spleen deficiency rats based on 1H-NMR metabonomics[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(19): 4241-4248.
- [6] 梁玉华, 梅全喜, 李亦聪, 等. 基于网络药理学的党参治疗慢性萎缩性胃炎的机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(4): 838-841.
- [7] LIU Y H, CAI J B, WANG H L. Effects of *Codonopsis pilosula* polysaccharide on PI3K/AKT pathway on growth and motility of HepG2 cells in human liver cancer[J]. *Chin J Immunol*(中国免疫学杂志), 2020, 36(9): 1108-1113.
- [8] WANG X X, ZHUANG P Y, CHEN J M, et al. Study on chemical constituents of *Codonopsis pilosula*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48(9): 1719-1723.
- [9] ZHANG X, LI J K, ZHAO Y J, et al. Analysis of chemical constituents in *Codonopsis Radix* and its *in vitro* antioxidant activities[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(24): 53-59.
- [10] SU J S, QIN F Y, ZHANG Y, et al. Compounds of *Codonopsis Radix*[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2018, 41(4): 863-867.
- [11] GUAN L J. Determination of the ingredients of *Codonopsis Radix* from different sources and study on the HPLC specific chromatograms of *Codonopsis Radix*[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015.
- [12] CHEN Q F, DENG X Y, ZHU H F. Determination of lobetyolin and syringin in *Codonopsis Radix* from different places by HPLC[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2016, 37(6): 64-67.
- [13] PANG W R, SHUANG S M, LIU Y Q. RP-HPLC determination of the contents and correlation of atractylenolide and lobetyolin[J]. *World J Integr Tradit West Med*(世界中西医结合杂志), 2008, 3(2): 89-91.
- [14] CUI X W, LU M J, WANG J Y, et al. Comparative study on HPLC fingerprint of Lingnan characteristics decoction pieces processed *Codonopsis Radix* before and after processing[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2021, 38(8): 953-958.
- [15] MENG X C, HUANG L Q, CHEN S L, et al. On formation factors of major producing areas for Chinese materia medica and planting regionalization[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37(21): 3334-3339.
- [16] ZOU C C, YAN H Y. Research progress on chromatographic fingerprint similarity evaluation method for traditional Chinese medicine in the past 30 years(1988-2017) and its prospect[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(19): 4241-4248.
- [17] ZHEN Y Q, ZHI Y J, WANG M, et al. Comparative study on Cistanches herba formula granules and ultrafine granular power based on UPLC fingerprints and multi-components content determination[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2021, 30(13): 1227-1235.
- [18] ZHAO Z F, ZOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription Huanglian Decoction and determination of the contents of 6 components[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.
- [19] LIU Z J, ZHANG W, GU L H, et al. HPLC fingerprints of Houerhuan anti-inflammation granule based on principal component analysis coupled cluster analysis[J]. *Pharm Today*(今日药学), 2020, 30(9): 608-611.

收稿日期: 2021-12-08

(本文责编: 沈倩)