

新疆紫草的HPLC指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定[△]

马留纯^{1*}, 马生军^{1#}, 朱金芳^{1,2}, 杨建波³, 周明聪¹, 宋晓雨¹(1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052; 2.中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; 3.中国食品药品检定研究院中药民族药检定所, 北京 100050)

中图分类号 R284.1; R286.0 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1732-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.13

摘要 目的:建立新疆紫草的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,进行化学模式识别分析,并测定其中3种成分的含量。方法:采用HPLC法。以乙酰紫草素为参照,绘制34批不同来源新疆紫草药材样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)》进行相似度评价,确定共有峰;采用SPSS 19.0、SIMCA 14.1统计软件进行聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析,以变量投影重要性值大于1为标准,筛选影响新疆紫草药材质量的差异标志物,并以相同HPLC法测定其中3种成分的含量。结果:34批新疆紫草药材共有12个共有峰;除市售样品中的3批药材相似度低于0.72外,其余药材的相似度均高于0.86;共指认出左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁等3个共有峰。34批新疆紫草药材可聚为2类,其中S1、S4~S6、S13、S15~S20、S22、S26~S34聚为一类,其余聚为一类。前3个主成分因子的方差贡献率分别为52.834%、18.600%、8.387%,累积方差贡献率为79.821%。左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁等6个成分为影响其质量的差异标志物。左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁检测质量浓度的线性范围分别为0.72~90、2.05~410、2.50~500 $\mu\text{g/mL}$ (r 均大于0.999);定量限分别为0.132、0.135、0.118 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为0.040、0.041、0.036 $\mu\text{g/mL}$;精密度、稳定性(24 h)、重复性、耐用性试验的RSD均小于3%;加样回收率分别为95.959%~100.201% (RSD=1.669%, $n=6$)、97.818%~102.698% (RSD=1.788%, $n=6$)、95.831%~99.344% (RSD=1.600%, $n=6$)。含量分别为0.002%~0.134%、0.025%~1.388%、0.022%~0.881%。结论:所建HPLC指纹图谱和含量测定方法简便、稳定性好,可用于新疆紫草药材的质量评价和定量分析;左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁等成分的含量各有不同,为不同来源新疆紫草的差异标志物。

关键词 新疆紫草;高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析;聚类分析;正交偏最小二乘法-判别分析;含量测定

HPLC Fingerprint Establishment, Chemistry Pattern Recognition Analysis and Content Determination of *Arnebia euchroma*

MA Liuchun¹, MA Shengjun¹, ZHU Jinfang^{1,2}, YANG Jianbo³, ZHOU Mingcong¹, SONG Xiaoyu¹(1. College of Food and Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 3. Institute for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Control, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *Arnebia euchroma*, analyze them with chemical pattern recognition technology, and determine the contents of 3 components. METHODS: HPLC method was adopted. Using acetylshikonin as reference, HPLC fingerprint of 34 batches of *A. euchroma* from different sources were drawn. *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint* (2012A edition) was used to evaluate the similarity of the samples, and common peaks were determined. SPSS 19.0 and SIMCA 14.1 statistical software was used for cluster analysis, principle component analysis and orthogonal partial least squares-discriminate analysis. According to the standard of the variable importance in the project greater than 1, the differential markers affecting the quality difference of *A. euchroma* were screened. Meanwhile, the contents of 3 components were determined by the same HPLC method. RESULTS: There were 12 common peaks in HPLC

[△] 基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2016A3005-5)

* 硕士研究生。研究方向:药用植物资源与栽培。电话:0991-8762461。E-mail:1483813614@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药材规范化生产及其质量调控机制。电话:0991-8762461。E-mail:1921431697@qq.com

fingerprints for 34 batches of *A. euchroma*. The similarity of other samples were more than 0.86, except that the three batches of medicinal herbs on the market were less than 0.72; 3 common peaks were identified, such as shikonin, acetylshikonin, β, β' -dimethylacrylic acanine. These 34 batches of samples could be classified into two categories. S1, S4-S6, S13, S15-S20, S22, S26-S34 were clustered into one

category, and others clustered into the other category. By principal component analysis, the contribution rates of three principle components were 52.834%, 18.600% and 8.387%. Accumulative contribution rate was 79.821%. Six constituents, such as shikonin, acetylshikonin and β, β' -dimethylacrylic acanine were screened as differential markers, representing the major differences of *A. euchroma*. The linear range of above three components were 0.72-90, 2.05-410, 2.50-500 $\mu\text{g/mL}$ (r all more than 0.999), respectively. The limits of quantification were 0.132, 0.135, 0.118 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The limits of detection were 0.040, 0.041, 0.036 $\mu\text{g/mL}$, respectively. RSDs of precision, stability (24 h), reproducibility and durability tests were all lower than 3%. Recoveries were 95.959%-100.201% (RSD=1.669%, $n=6$), 97.818%-102.698% (RSD=1.788%, $n=6$), 95.831%-99.344% (RSD=1.600%, $n=6$). The contents of above three components were 0.002%-0.134%, 0.025%-1.388%, 0.022%-0.881%.

CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and content determination method are simple and stable, can be used for quality evaluation and quantitative analysis of *A. euchroma*. Shikonin, acetylshikonin and β, β' -dimethylacrylic acanine are different in the content and are differential markers of *A. euchroma* from different source.

KEYWORDS *Arnebia euchroma*; HPLC; Fingerprint; Principle component analysis; Cluster analysis; Orthogonal partial least squares discriminate analysis; Content determination

紫草为我国传统中药材,其种类丰富,药性因产地来源不同而存在明显差异^[1]。在众多种类的紫草药材中,属产自新疆地区的新疆紫草质量最优,有道地药材之誉^[2]。新疆紫草[*Arnebia euchroma*(Royle) Johnst.]又名新疆软紫草,属紫草科软紫草属,为我国二级保护植物,是维医常用药材,被收载于2015版《中国药典》(一部)中^[3]。该药的主要活性成分为脂溶性的萘醌类天然色素——紫草素及其衍生物,此外还含有多糖、生物碱、苯醌等化学成分,具有抗癌、抑菌、抗炎、保肝护肝等活性^[4-8]。近年来,随着医药行业的科技创新,新疆紫草不仅被用于临床治疗,还作为天然色素被广泛应用于食品、化妆品、印染工业等行业中^[9-11]。由于新疆紫草生长周期长,对环境要求苛刻,市场上供应的药材几乎皆为野生品,加之多年掠夺式采挖严重,导致其野生资源日益减少,且至今尚无成熟技术应用于该药材的大规模人工种植,供需矛盾突出,以致市场上出现以假乱真、以次充好等现象^[2]。因此,深入研究新疆紫草的质量监控方法,对于确保紫草药材的疗效和提高其药用价值具有重要意义。

指纹图谱和化学模式识别技术是评价中药材质量的有效手段。其中,指纹图谱主要关注整体性,可全面揭示药材中含有活性成分的数量与种类;化学模式识别技术则强调差异性,可对指纹图谱数据信息进行充分的整合和校正;两者结合可更加准确、客观地反映中药的质量差异,进而整体描述和合理评价其质量,已广泛应用于种子鉴定、食品特征成分分析、中药鉴别及质量控制等领域^[12-15]。目前,新疆紫草的相关研究主要为化学成分测定、提取和生物活性分析,而对其指纹图谱的研究较少,且多集中于不同产地野生品或市售品指纹图谱方法的建立^[16-20],对于新疆紫草栽培品及其化学模式识别的研究尚未见报道。此外,新疆紫草的相关质量标准也仅有2015年版《中国药典》(一部)中规定了“ β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁含量不得少于0.3%”^[3]。基于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了34批不同来源新疆紫草药材的指纹图谱,并结合化学模式识别技术

研究其化学组分特征,以筛选其质量差异标志物;同时,测定了其中3种萘醌类成分(左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁)的含量,旨在从生产源头确保药材品质,亦为新疆紫草质量评价标准的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC20-AB型HPLC仪,包括LC-20AB型二元泵、SIL-20AC型自动进样器、SPD-M20A型二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);AL204-IC型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];JBT/C-YCL400T/3P(D)型超声波药品处理机(济宁金百特工程机械有限公司);RE-52B型旋转蒸发器(上海洪纪仪器设备有限公司);UVS-1型涡旋振荡器(北京优晟联合科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

左旋紫草素对照品(批号:R18D8F50911,纯度: $\geq 98\%$)、乙酰紫草素对照品(批号:R21J7F16576,纯度: $\geq 98\%$)、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品(批号:Y02A9H67135,纯度: $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;甲酸、乙腈为色谱纯,石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)为分析纯,水为纯净水。

34批新疆紫草药材(编号:S1~S34,其中S1~S14为野生品、S15~S24为栽培品、S25~S34为市售品),经新疆农业大学食品科学与药学院马生军副教授鉴定均为紫草科植物新疆紫草[*A. euchroma*(Royle) Johnst.]的干燥根。样品信息来源见表1。

2 方法与结果

2.1 HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液的制备 取样品适量,粉碎。精密称取上述粉末0.5 g,加入石油醚25 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:33 kHz)提取30 min,放冷,再次称定质量,用石油醚补足减失的质量,混匀,滤过。取续滤液10 mL,置于锥形瓶中,蒸干,残渣加乙腈适量溶解,涡旋30 s,加乙腈定容至10 mL量瓶中,摇匀,经0.45 μm 微

孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

表1 新疆紫草样品来源信息

Tab 1 Source information of *A. euchroma* samples

编号	来源/产地	采集时间	编号	来源/产地	采集时间
S1	新疆巴州和静县	2017年9月7日	S18	新疆伊犁州昭苏县	2018年9月17日
S2	新疆巴州和静县	2017年9月7日	S19	新疆伊犁州昭苏县	2018年10月30日
S3	新疆巴州和静县	2017年9月7日	S20	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2019年1月11日
S4	新疆巴州和静县	2017年9月7日	S21	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2019年4月3日
S5	新疆伊犁州昭苏县	2017年7月3日	S22	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2019年4月3日
S6	新疆伊犁州昭苏县	2017年9月2日	S23	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2019年5月25日
S7	新疆伊犁州昭苏县	2018年4月22日	S24	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2019年5月25日
S8	新疆伊犁州昭苏县	2018年5月22日	S25	安徽亳州药材市场	2019年3月1日
S9	新疆伊犁州昭苏县	2018年5月30日	S26	安徽亳州药材市场	2019年3月1日
S10	新疆伊犁州昭苏县	2018年9月16日	S27	新疆国医馆(乌鲁木齐)	2019年4月9日
S11	新疆伊犁州察布查尔锡伯自治县	2018年8月26日	S28	济康大药房(乌鲁木齐)	2019年4月9日
S12	新疆伊犁州霍尔果斯市	2018年9月16日	S29	百草堂大药房(乌鲁木齐)	2019年4月9日
S13	新疆伊犁州尼勒克县	2018年10月3日	S30	新疆维吾尔自治区中医院	2019年4月12日
S14	新疆乌鲁木齐市乌鲁木齐县	2017年9月7日	S31	新疆医科大学第一附属医院	2019年4月12日
S15	新疆巴州和静县	2017年9月7日	S32	新疆维吾尔自治区中医院	2019年4月12日
S16	新疆伊犁州昭苏县	2017年9月7日	S33	乌鲁木齐市中医医院	2019年4月12日
S17	新疆伊犁州昭苏县	2017年9月7日	S34	哈萨克斯坦(进口)	2019年5月10日

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取左旋紫草素、乙酰紫草素、 β 、 β' -二甲基丙烯酸阿卡宁对照品各适量,精密称定,加乙腈制成上述3种成分质量浓度分别为90、410、500 $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品贮备液。取各单一对照品贮备液适量,置于5 mL棕色量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得上述3种成分质量浓度分别为36、164、333 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 66% A \rightarrow 70% A; 5~20 min, 70% A \rightarrow 80% A; 20~25 min, 80% A \rightarrow 85% A; 25~38 min, 85% A; 38~40 min, 85% A \rightarrow 66% A; 40~50 min, 66% A); 检测波长: 275 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号:

S6)适量,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定6次,以乙酰紫草素为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号: S6)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,以乙酰紫草素为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取药材样品(编号: S6)适量,粉碎。精密称取上述粉末0.5 g,共6份,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,以乙酰紫草素为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.7 指纹图谱的生成 取34批药材样品适量,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)》,以S13为参照图谱,建立34批药材样品的指纹图谱。叠加指纹图谱见图1、对照指纹图谱见图2。

2.1.8 共有峰的指认 34批样品共有12个共有峰,与混合对照品色谱图(见图3A)进行比对,指认2号峰为左旋紫草素、4号峰为乙酰紫草素、11号峰为 β 、 β' -二甲基丙烯酸阿卡宁。本研究前期试验确认,新疆紫草药材中乙酰紫草素含量较高,且出峰稳定,加之分离度较好,故以其为参照,计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,34批样品相对保留时间的RSD为0~0.79%,相对峰面积的RSD为0~96.41%。

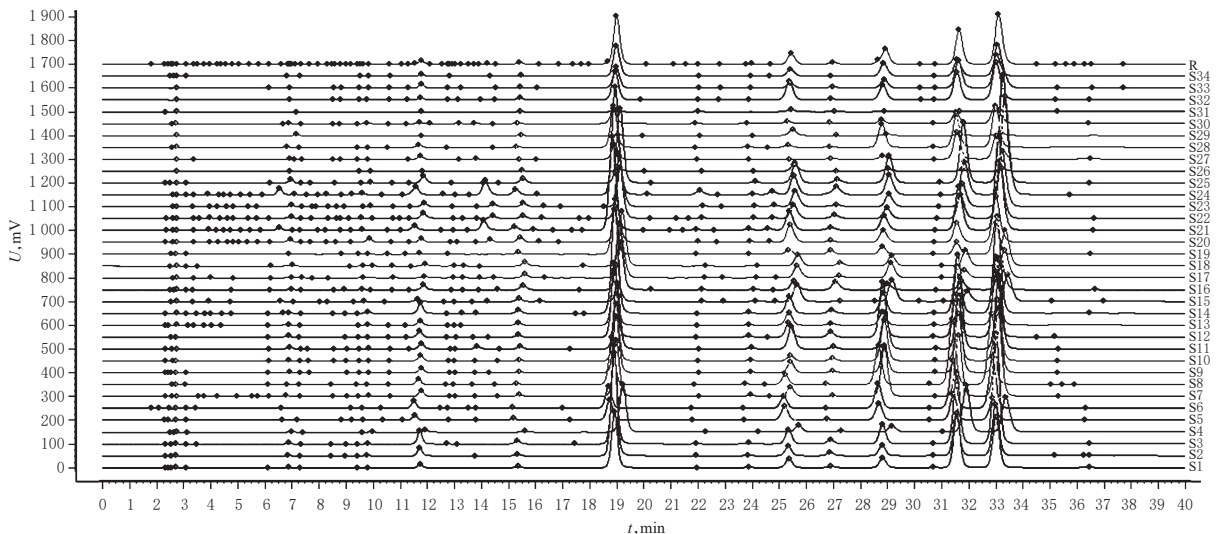


图1 34批样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 34 batches of samples

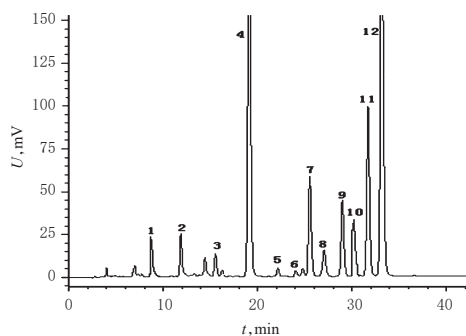
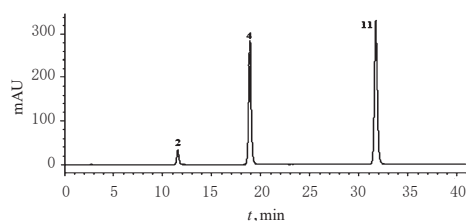
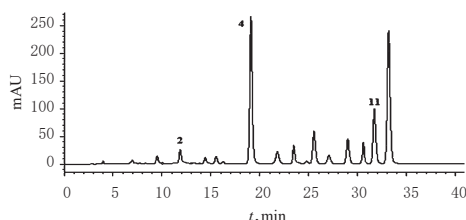


图2 样品的HPLC对照指纹图谱

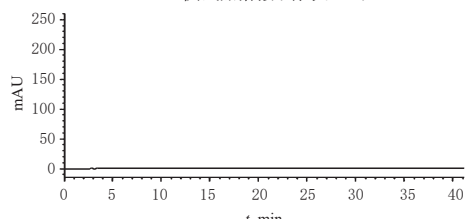
Fig 2 HPLC control fingerprint of samples



A. 混合对照品溶液



B. 供试品溶液(编号:S11)



C. 阴性对照溶液

注:2.左旋紫草素;4.乙酰紫草素;11.β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁
Note: 2. shikonin; 4. acetylshikonin; 11. β,β'-dimethylacrylic acanine

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

2.1.9 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)》,以软件生成的新疆紫草的共有模式图作为参照图谱,进行相似度评价,结果见表2。结果,除S26、S29、S31的相似度小于0.72外,其余样品的相似度均大于0.86;其中,野生品(编号:S1~S14)相似度0.902~0.996,栽培品(编号:S15~S24)相似度0.864~0.983,市售品(编号:S25~S34)相似度0.536~0.990;表明野生品、栽培品与对照指纹图谱的相似度较高;而市售品与对照指纹图谱的相似度较低,化学成分存有一定的差异。

2.2 聚类分析

以34批药材样品的12个共有峰峰面积为变量,采用SPSS 19.0统计软件,以组间联接平方欧式距离为测度进行聚类分析,结果见图4。由图4可知,34批药材样

表2 相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.977	S13	0.996	S25	0.990
S2	0.926	S14	0.990	S26	0.678
S3	0.993	S15	0.922	S27	0.929
S4	0.957	S16	0.864	S28	0.981
S5	0.902	S17	0.941	S29	0.536
S6	0.924	S18	0.955	S30	0.986
S7	0.965	S19	0.953	S31	0.716
S8	0.959	S20	0.979	S32	0.977
S9	0.967	S21	0.977	S33	0.950
S10	0.972	S22	0.983	S34	0.975
S11	0.981	S23	0.978		
S12	0.971	S24	0.963		

品可聚为两类,S1、S4~S6、S13、S15~S20、S22、S26~S34聚为I类,其余聚为II类,其中I类又可聚为两类,S5、S15、S26、S27、S29~S31、S34为Ia类,S1、S4、S6、S13、S16~S20、S22、S28、S32~S33为Ib类;II类也可聚为两类,S7~S12为IIa类,S2、S3、S14、S21、S23~S25为IIb类;提示野生品、栽培品及市售品存在交叉现象。

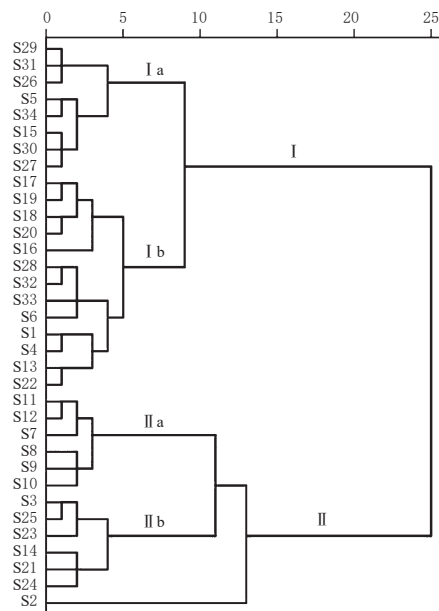


图4 34批样品的聚类分析树状图

Fig 4 Hierarchical cluster analysis for 34 batches of samples

2.3 主成分分析

以共有峰的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1统计软件进行主成分分析。结果,前3个主成分的方差贡献率分别为52.834%、18.600%、8.387%,累积方差贡献率为79.821%,表明前3个主成分可揭示药材来源与12个共有成分的相关性,可反映药材中大部分的差异信息。根据主成分分析结果,构建主成分分析得分图,详见图5。由图5可知,各样品并未按其来源区分,大部分野生品(S2、S3、S7~S12、S14)分布于得分图的右侧;市售品(S26~S34)除S25外,其余均处于得分图的左侧;栽培

品均匀分布在两侧,其中S15、S17~S20在左侧,S16、S21~S24在右侧。野生品中S1、S4~S6、S13和市售品中S25未按来源归类,其结果与聚类分析结果基本一致。此外,野生品中来自于巴州的S1、S4与伊犁州的S7~S12区分开;栽培品中来自乌鲁木齐市的S21、S23、S24与来自伊犁州的S16~S19区分开;市售品较集中地聚在一起。

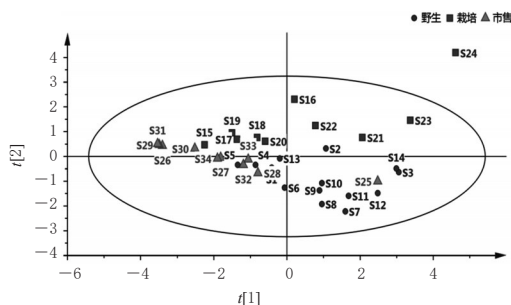


图5 主成分分析得分图
Fig 5 Score plot of PCA

2.4 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

OPLS-DA拟合效果的评价指标主要是累积解释能力参数(R^2X 、 R^2Y)和预测能力参数(Q^2),若 R^2Y 、 Q^2 均大于0.5,则表示拟合效果较好,且越接近1越好^[21]。将34批药材样品按来源分为野生组、栽培组、市售组,采用SIMCA 14.1统计软件进行OPLS-DA分析,其得分散点图见图6。由图6可知,野生组与栽培组分别分布于得分散点图的两侧, $R^2X=0.608$, $R^2Y=0.903$, $Q^2=0.858$;栽培组与市售组分别分布于得分散点图的两侧, $R^2X=0.678$, $R^2Y=0.869$, $Q^2=0.811$;野生组与市售组分别分布于得分散点图的两侧, $R^2X=0.760$, $R^2Y=0.722$, $Q^2=0.611$,均超过0.5。这表明,OPLS-DA预测模型可用于区分不同来源的新疆紫草,3组样品的化学成分含量存在差异。

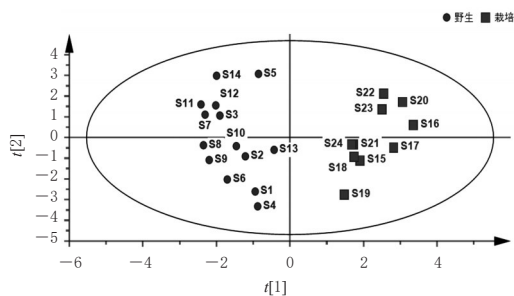
提取OPLS-DA模型中12个共有峰峰面积的变量投影重要性(VIP)值,并选择其中VIP值大于1的共有峰^[22],结果见图7。由图7可知,VIP值大于1的色谱峰分别为11号峰(β 、 β' -二甲基丙烯酰阿卡宁,VIP值为1.1559)、10号峰(VIP值为1.1533)、12号峰(VIP值为1.1139)、6号峰(VIP值为1.1046)、2号峰(左旋紫草素,VIP值为1.0712)、4号峰(乙酰紫草素,VIP值为1.0492),表明这6种化学成分是影响新疆紫草质量的差异标志物。

2.5 含量测定

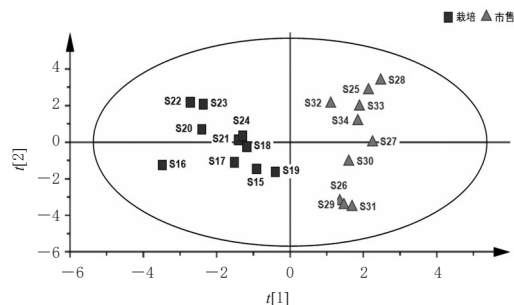
2.5.1 色谱条件 同“2.1.3”项。

2.5.2 溶液的制备 供试品溶液的制备同“2.1.1”项;混合对照品溶液的制备同“2.1.2”项;以乙腈为阴性对照溶液。

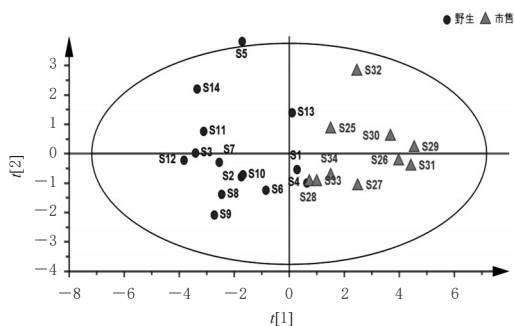
2.5.3 系统适用性试验 取“2.5.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果见图3。由图3可



A.野生组与栽培组



B.栽培组与市售组



C.市售与栽培

图6 OPLS-DA得分散点图

Fig 6 Score scatter plots of OPLS-DA

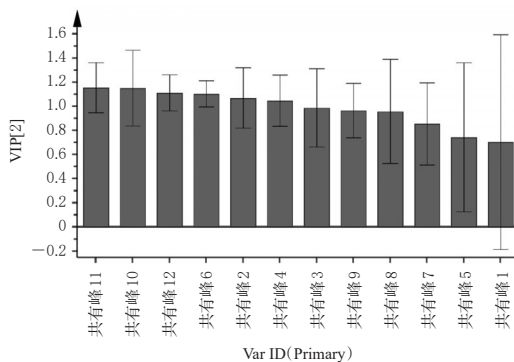


图7 34批样品OPLS-DA模型中共有峰的VIP值

Fig 7 VIP values of common peaks in OPLS-DA model of 34 batches of samples

知,3种待测成分色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数均不低于10000,阴性对照无干扰,表明方法专属性好。
2.5.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下各单一对照品贮备液适量,加乙腈制成系列质量浓度的混合对照品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,以各待测成分质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行回归分析。结果,左旋紫草素的回归方程为

$Y=27\ 811X-7\ 826.8$ ($r=0.999\ 9$), 乙酰紫草素的回归方程为 $Y=31\ 222X-95\ 144$ ($r=0.999\ 8$), β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁的回归方程为 $Y=34\ 776X-94\ 892$ ($r=0.999\ 9$); 上述3种成分检测质量浓度的线性范围分别为0.72~90、2.05~410、2.50~500 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.5 定量限与检测限考察 分别精密吸取“2.5.2”项下混合对照品溶液适量, 加乙腈倍比稀释, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁的定量限分别为0.132、0.135、0.118 $\mu\text{g/mL}$, 检测限分别为0.040、0.041、0.036 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.6 精密度试验 取“2.5.2”项下混合对照品溶液适量, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁峰面积的RSD分别为0.667%、0.538%、0.742% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.5.7 稳定性试验 取供试品溶液(编号:S6)适量, 分别于室温下放置0、2、6、12、18、24 h时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁峰面积的RSD分别为1.660%、0.139%、0.103% ($n=6$), 表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.8 重复性试验 取药材样品(编号:S6)适量, 粉碎。精密称定上述粉末0.5 g, 共6份, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁含量的RSD分别为1.888%、1.863%、1.709% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.5.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的药材样品粉末(编号:S6), 每份约0.25 g, 共6份, 分别加入等量的“2.1.2”项下各单一对照品贮备液, 混匀, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁的加样回收率分别为95.959%~100.201% (RSD=1.669%, $n=6$)、97.818%~102.698% (RSD=1.788%, $n=6$)、95.831%~99.344% (RSD=1.600%, $n=6$)。

2.5.10 耐用性试验 精密称取药材样品粉末(编号:S6)适量, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.1”项下色谱条件, 分别以不同流动相(B)浓度(0.02%、0.05%、0.08%)、流速(0.7、0.8、0.9 mL/min)、柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)进样测定, 记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果, 左旋紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁含量的RSD均小于3% ($n=$

3), 表明该方法能够满足试验要求, 耐用性良好。

2.5.11 样品含量测定 取34批药材样品粉末适量, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。每样品平行操作3次, 结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3, \%$)

编号	左旋紫草素	乙酰紫草素	β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁	编号	左旋紫草素	乙酰紫草素	β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁
S1	0.038	0.651	0.617	S18	0.031	0.695	0.304
S2	0.087	1.260	0.476	S19	0.014	0.516	0.146
S3	0.134	1.010	0.769	S20	0.043	0.555	0.347
S4	0.029	0.613	0.582	S21	0.067	1.196	0.535
S5	0.054	0.255	0.301	S22	0.077	0.795	0.315
S6	0.083	0.283	0.561	S23	0.090	0.985	0.309
S7	0.069	0.635	0.668	S24	0.109	1.388	0.409
S8	0.069	0.552	0.733	S25	0.081	0.913	0.717
S9	0.058	0.682	0.827	S26	0.004	0.050	0.032
S10	0.063	0.659	0.536	S27	0.041	0.190	0.340
S11	0.067	0.781	0.881	S28	0.033	0.514	0.372
S12	0.069	0.847	0.779	S29	0.003	0.025	0.023
S13	0.070	0.864	0.465	S30	0.014	0.393	0.246
S14	0.112	1.347	0.691	S31	0.002	0.030	0.022
S15	0.057	0.420	0.306	S32	0.031	0.357	0.332
S16	0.030	0.426	0.068	S33	0.045	0.265	0.336
S17	0.024	0.459	0.108	S34	0.021	0.398	0.231

3 讨论

本研究前期预试验比较了冷浸、回流和超声等3种提取方法对待测成分色谱峰的影响。结果发现, 超声提取的样品色谱峰峰形好、响应强且杂质干扰少, 故选择超声提取制备供试品溶液。同时, 本研究又比较了以乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%乙酸水溶液和乙腈-0.05%甲酸水溶液等为流动相的分离效果。结果显示, 当以乙腈-0.05%甲酸水溶液进行梯度洗脱时, 色谱图基线平稳, 色谱峰数量多且对称性、分离度较好, 故选择乙腈-0.05%甲酸水溶液为流动相。此外, 本研究通过在200~800 nm波长范围内对供试品溶液进行扫描后发现, 当检测波长为275 nm时, 各色谱峰均有较强吸收, 且分离度较好, 故选择275 nm为检测波长。

中药材来源广泛, 具有地域性、有限性和复杂性等特点, 除自然因素外, 采收加工等人为因素也会对其品质产生影响, 造成药材质量参差不齐^[23]。本研究结果显示, 34批新疆紫草样品的相似度为0.536~0.996, 其中野生品和栽培品的相似度较高, 表明样品质量稳定; 市售品中有3批样品相似度较低(均小于0.72), 表明市售样品间质量存在差异。34批样品相对峰面积的RSD差异较大(RSD为0~96.41%), 表明其含量存在差异。

指纹图谱结合化学模式识别是科学评价和合理控制中药材质量优劣的有效技术手段^[22]。指纹图谱的建

立需要广泛的中药资源,因此采集时应兼顾野生、传统产区 and 基地样品,从而进行正确的模式识别^[24]。本研究结果显示,34批样品可分为两类,S1、S4~S6、S13、S15~S20、S22、S26~S34聚为一类,S2、S3、S7~S12、S14、S21、S23~S25聚为一类;主成分分析结果与该结果基本一致。左旋紫草素、乙酰紫草素、 β,β' -二甲基丙烯酰阿卡宁等6个成分为影响新疆紫草药材质量的差异标志物。含量测定结果显示,34批药材样品中,左旋紫草素、乙酰紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰阿卡宁的含量分别为0.002%~0.134%、0.025%~1.388%、0.022%~0.881%,各样品间含量差异明显。笔者分析原因可能为不同种植管理、采收加工等导致化学成分含量发生改变,不同产地新疆紫草的种质来源、栽培技术、地理环境及贮存运输等因素会对次生代谢成分的积累造成影响,从而导致差异性^[25]。

综上所述,本研究所建HPLC指纹图谱和含量测定方法简便、稳定性好,可为新疆紫草药材质量的评价及控制提供参考;左旋紫草素、乙酰紫草素、 β,β' -二甲基丙烯酰阿卡宁等成分的含量各有不同,为不同来源新疆紫草的差异标志物。

参考文献

- [1] 毛艳,张瑞萍,贺金华,等.紫草中萘醌类化学成分的快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术分析[J].中国药房,2014,25(43):4090-4092.
- [2] 田佳鑫,高峰,詹志来,等.紫草药材品种变迁与药用资源分析[J].中国现代中药,2018,20(9):1064-1067.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:340-341.
- [4] 兰卫,陶宁,耿直.新疆紫草素超声提取工艺研究[J].新疆医科大学学报,2010,33(8):865-866.
- [5] 宋艳华,孙晖,张爱华,等.紫草的研究进展[J].中医学报,2013,41(4):123.
- [6] 詹志来,胡峻,刘谈,等.紫草化学成分与药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(21):4127-4135.
- [7] 赵献敏,李南,宋艳丽,等.紫草化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):47-50.
- [8] NASIRI E, HOSSEINIMEHR SJ, ZAGHI HOSSEINZADEH A, et al. The effects of Arnebia euchroma ointment on second-degree burn wounds: a randomized clinical trial[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016. DOI:10.1016/j.jep.2016.05.029.
- [9] HUANG SY, XIONG YB, ZOU Y, et al. A novel colorimetric indicator based on agar in-corporated with Arnebia euchroma root extracts for monitoring fish freshness[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.12.009.
- [10] 张小铿,陈乾华,梁国康,等.4种植物的提取混合液在法黑头粉刺化妆品中的应用及功效评价[J].广东化工,2016,43(23):25-27.
- [11] 路振翔,杨勇,赵亚楠,等.紫草染料的提取及在真丝染色中的应用[J].纺织科学与工程学报,2016,33(2):115-118.
- [12] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [13] 陈林伟,秦昆明,徐雪松,等.中药指纹图谱数据库的研究现状及展望[J].中草药,2014,45(21):3041-3047.
- [14] 杨冰月,胡本祥,张琳,等.野生与栽培太白米HPLC指纹图谱及化学模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(5):187-191.
- [15] 王淑慧,宋沙沙,曹学丽.基于滋味成分HPLC指纹图谱的判别分析及相似度评价在信阳毛尖茶分等定级中的应用[J].食品科学,2019,40(8):180-185.
- [16] 孙健文,温宪春,蔡德富,等. RP-HPLC法同时测定新疆紫草中紫草素、乙酰紫草素、 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的含量[J].中国药房,2018,29(4):455-457.
- [17] 高召军,刘秋月,曲晓兰,等.泰山紫草与新疆紫草的HPLC指纹图谱对比研究[J].中国现代应用药学,2019,36(10):1193-1196.
- [18] 咎珂,苏蕊,滕爱君,等.新疆紫草HPLC特征图谱和紫草类药材6种萘醌类成分含量测定[J].药物分析杂志,2016,36(9):1526-1535.
- [19] 李方悦,曹雪霖,郝盛源,等.新疆紫草指纹图谱的建立[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2016,29(3):187-192.
- [20] 马留纯,马生军,朱金芳,等.基质和外源激素对新疆紫草种子萌发及幼苗生长的影响[J].河南农业科学,2019,48(4):46-54.
- [21] 徐锋,杨澜,成婷婷,等.地瓜藤的UPLC指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J].中国药房,2019,30(24):3388-3392.
- [22] 彭亮,杨冰月,张琳,等.野生与栽培远志HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2018,49(21):4998-5003.
- [23] 詹志来,郭兰萍,金艳,等.中药材品质评价与规格等级的历史沿革[J].中国现代中药,2017,19(6):868-876.
- [24] 刘江,陈兴福,邹元锋.基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(8):1081-1088.
- [25] 董娟娥,梁宗锁.植物次生代谢物积累量影响因素分析[J].西北植物学报,2004,24(10):1979-1983.

(收稿日期:2020-03-09 修回日期:2020-05-07)

(编辑:陈宏)