

新疆紫草野生品与栽培品的质量比较研究*

黄瑞^{1,2}, 戴胜云¹, 吴东雪¹, 马晓军³, 刘杰¹, 过立农¹, 道尔加拉⁴, 敬松⁵, 马双成^{1**}, 郑健^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 中国药科大学, 南京 211198; 3. 伊犁哈萨克自治州检验检测认证研究院, 伊犁 835000;

4. 新疆德立凯农牧科技发展有限公司, 乌鲁木齐 830000; 5. 新疆欣嘉农业科技开发有限公司, 伊犁 835400)

摘要 目的: 对新疆紫草野生品与栽培品的质量进行比较研究, 包括性状对比和结合化学计量学分析新疆紫草野生品与 3 个不同地区栽培品的差异性成分。方法: 分别采集新疆紫草野生品与栽培品, 对其性状进行对比; 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.05% 甲酸水为流动相, 检测波长 275 nm, 流速 0.2 mL · min⁻¹, 对 48 批野生品和栽培品中的右旋紫草素、乙酰紫草素、β - 乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β, β' - 二甲基丙烯酰阿卡宁和异戊酰紫草素 6 个成分进行含量测定, 并结合主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘 - 判别分析 (OPLS - DA) 分析野生品和栽培品中的差异性成分。结果: 新疆紫草野生品与栽培品在性状上存在较大差异, 建立的含量测定方法线性关系良好, $r > 0.999$, 平均加样回收率 93.4% ~ 102.9%, RSD < 3.0%, 不同批次新疆紫草中 6 个成分含量差异较大, 其中野生品中右旋紫草素、β - 乙酰氧基异戊酰阿卡宁含量均明显高于栽培品, 说明野生品与栽培品还存在一定的差异; 建立的 PCA 模型可区分野生品和栽培品, 且通过 OPLS - DA 确定了异丁酰紫草素和 β, β' - 二甲基丙烯酰阿卡宁是野生品和栽培品中的 2 个差异性成分。结论: 通过对比野生品和栽培品的木心大小、栓皮卷曲程度以及特异性气味, 可对二者进行初步鉴别; 建立的含量测定方法重复性好, 专属性强, 稳定可行; 确定了新疆紫草野生品与 3 个不同地区栽培品的差异性成分, 为新疆紫草的质量控制提供依据, 为扩大紫草药源提供了思路。

关键词: 新疆紫草; 栽培品; 野生品; 差异性分析; β, β' - 二甲基丙烯酰阿卡宁; β - 乙酰氧基异戊酰阿卡宁; 异丁酰紫草素

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024) 05 - 0783 - 13

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.05.06

Comparative study on the quality of wild and cultivated *Arnebie Radix**HUANG Rui^{1,2}, DAI Sheng - yun¹, WU Dong - xue¹,
MA Xiao - jun³, LIU Jie¹, GUO Li - nong¹, Dao - er - jia - la⁴,
JING Song⁵, MA Shuang - cheng^{1**}, ZHENG Jian^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. Yili Institute of Inspection, Testing and Certification, Yili 835000, China; 4. Xinjiang Delikai Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology Development Co., Ltd., Urumqi 830000, China; 5. Xinjiang Xinjia Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Ili 835400, China)

Abstract Objective: To compare the quality of wild and cultivated *Arnebie Radix*, using macroscopic investigation

* 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金 (2021X4); 新疆维吾尔自治区药品监督管理局智力援疆创新拓展人才计划——“新疆特色民族药研究(以新疆紫草为例)团队”项目

** 通信作者 马双成 Tel: (010) 53852076; E - mail: mashuangcheng@nifdc.org.cn

郑健 Tel: (010) 53852080; E - mail: zhengjian@nifdc.org.cn

第一作者 黄瑞 Tel: (010) 53852078; E - mail: huangrui2019513@163.com

戴胜云 Tel: (010) 53852078; E - mail: daisy@nifdc.org.cn

and chemometric analysis of the different components in wild and cultivated *Arnebiae Radix* from three different habitats. **Methods:** Wild and cultivated *Arnebiae Radix* were collected and their macroscopic features were compared. Using the ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) column, with acetonitrile - 0.05% formic acid water as the mobile phase, the contents of *D* - shikonin, acetylshikonin, β - acetoxyisovalerylshikonin, isobutyrylshikonin, β, β' - dimethylacrylalkannin and isovalerylshikonin in 48 batches of wild and cultivated *Arnebiae Radix* were determined. The detection wavelength was 275 nm and the flow rate was 0.2 mL \cdot min⁻¹. PCA and OPLS - DA were performed to reveal the differential components of wild and cultivated *Arnebiae Radix*. **Results:** There were great differences in macroscopic features of wild and cultivated *Arnebiae Radix*, and the linear relationship between the contents of six naphthoquinone components was good. The correlation coefficients were above 0.999, the average recovery rates were 93.4% - 102.9%, and the RSDs were less than 3.0%. The contents of six components in different batches of wild and cultivated *Arnebiae Radix* were quite different, and the contents of *D* - shikonin and acetylshikonin in wild products were significantly higher than those in cultivated products, indicating that there were still certain differences between wild products and cultivated products. The PCA model established could distinguish wild products and cultivars, and two differentiating components in wild products and cultivars were revealed by OPLS - DA, namely isobutyryl shikonin, β, β' - dimethylacrylalkannin. **Conclusion:** By comparing the core size, cork curl degree and specific odor of wild and cultivated products, the two can be identified. The established content determination method is repeatable, specific, stable and feasible. The differential components in wild and cultivated *Arnebiae Radix* in three different regions are identified, which provides a basis for the quality control of *Arnebiae Radix* and provides ideas for expanding the source of *Arnebiae Radix*.

Keywords: *Arnebiae Radix*; cultivated species; wild species; assay; β, β' - dimethylacrylalkannin; β - acetoxyisovalerylshikonin; isobutyrylshikonin

紫草是常见的传统药材,始载于《神农本草经》^[1],在我国有着非常悠久的药用历史。紫草在古代最初作为染料使用,《本草纲目》中记载“此草花紫根紫,可以染紫,故名紫草”^[2],作为染料,紫草有重要的经济价值,《齐民要术》中记载“种蓝十亩,敌谷田一顷。能自染青者,其利又倍矣”^[3]。宋代以后,其药用价值逐渐被人们熟悉且重用,由此紫草作为药材在临床的使用日渐成熟。新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 来源于软紫草属,具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效,可用于治疗血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤等^[4],主要分布在我国新疆南北部高寒草原以及西藏西部高海拔地区,多长于路边、田野、荒山、山地草丛中和干燥的灌木林下^[5],生长环境严苛,对自然环境要求较高,具有耐寒、喜湿的特性,生长缓慢,种群更新能力弱^[6]。近年来,随着医疗需求的增加与相关产业链蓬勃发展、气候环境的恶化以及野生资源的大肆开发与过度采挖,使得野生

新疆紫草资源面临资源枯竭的状态。针对这个原因以及对紫草资源的合理开发,人工栽培品逐步推广应用,在传统栽培经验基础上结合人工种植经验,制定了相对完整的新疆紫草栽培技术规程^[7]。受地理环境和气候条件的影响,新疆不同地区的栽培品质量不明确,在市场上暂未见样品流通。近年来有关新疆紫草的文献报道主要集中在来源产地、化学成分、药理活性等^[8-13],而未见有对野生品与栽培品的外观性状、化学成分研究的文献报道。

基于上述现状,本研究将对新疆紫草野生品与栽培品的性状进行比较,并对右旋紫草素、乙酰紫草素、 β - 乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β, β' - 二甲基丙烯酰阿卡宁和异戊酰紫草素等6个萘醌类成分进行含量测定,进一步结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法 - 判别分析(OPLS - DA)2种化学模式识别方法,筛选出可区分新疆紫草野生品与栽培品的差异性成分,以期新疆紫草栽培品的质量控制奠定基础,为扩大

紫草药源提供科学依据,实现野生资源的保护和可持续开发。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC H - Class 超高效液相色谱仪, 四元溶剂管理器, PDA 检测器, 工作站 Empower 3.0 版本 (Waters 公司); XS105DU 型万分之一电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); XPE105 型万分之一电子天平 (Mettler Toledo 公司); Milli - Q Advantage A10 超纯水器 (Millipore 公司); KQ - 500DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Labofuge 400 离心机 (Centrifuge 公司)。

1.2 试药

乙腈: 色谱纯, 霍尼韦尔贸易上海有限公司; 甲酸: 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司; 石油醚: 60 ~ 90 °C, 国药集团化学试剂有限公司; 水: 纯净水,

娃哈哈有限公司。

对照品: 右旋紫草素 (批号 ST78490120, 纯度 98.0%)、乙酰紫草素 (批号 ST78820120, 纯度 98.0%)、 β - 乙酰氧基异戊酰阿卡宁 (批号 ST17190120, 纯度 98.0%)、异戊酰紫草素 (批号 STC9540105, 纯度 98.0%), 上海诗丹德标准技术服务有限公司; 异丁酰紫草素 (批号 DST220318 - 341, 纯度 98%), 乐美天医药德思特生物公司; β, β' - 二甲基丙烯酰阿卡宁 (批号 111689 - 201805, 纯度 98.0%), 中国食品药品检定研究院。

1.3 药材

药材样品来自药材市场或产地采集, 经中国食品药品检定研究院郑健研究员鉴定为紫草科软紫草属新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. 的干燥根。新疆紫草样品 48 批, 包括 27 批野生品和 3 个不同地区的 21 批栽培品。样品来源信息见表 1。

表 1 新疆紫草野生品与栽培品的来源信息

Tab. 1 Information of wild and cultivated *Arnebiae Radix* samples

编号 (No.)	品种 (variety)	产地 (habitat)	栽培年限 (cultivation year)
1	野生品 (wild)	博尔塔拉州 (Bortala Prefecture)	-
2	野生品 (wild)	昭苏 (Zhaosu)	-
3	野生品 (wild)	博尔塔拉州 (Bortala Prefecture)	-
4	野生品 (wild)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	-
5	野生品 (wild)	那拉提 (Narat)	-
6	野生品 (wild)	那拉提 (Narat)	-
7	野生品 (wild)	博尔塔拉州 (Bortala Prefecture)	-
8	野生品 (wild)	伊犁哈萨克自治州 (Ili Kazakh Autonomous Prefecture)	-
9	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
10	野生品 (wild)	伊犁哈萨克自治州 (Ili Kazakh Autonomous Prefecture)	-
11	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
12	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
13	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
14	野生品 (wild)	霍城县 (Huocheng)	-
15	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
16	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
17	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
18	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
19	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
20	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
21	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
22	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
23	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-

表 1(续)

编号 (No.)	品种 (variety)	产地 (habitat)	栽培年限 (cultivation year)
24	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
25	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
26	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
27	野生品 (wild)	新疆 (Xinjiang)	-
28	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	二年生 (two years)
29	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	二年生 (two years)
30	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	三年生 (three years)
31	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	三年生 (three years)
32	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	三年生 (three years)
33	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	三年生 (three years)
34	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	三年生 (three years)
35	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	四年生 (four years)
36	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	五年生 (five years)
37	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	五年生 (five years)
38	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	五年生 (five years)
39	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	五年生 (five years)
40	栽培品 (cultivated)	巴音布鲁克 (Bayingbrooke)	五年生 (five years)
41	栽培品 (cultivated)	乌鲁木齐南山 (Nanshan, Urumqi)	四年生 (four years)
42	栽培品 (cultivated)	乌鲁木齐南山 (Nanshan, Urumqi)	四年生 (four years)
43	栽培品 (cultivated)	乌鲁木齐南山 (Nanshan, Urumqi)	四年生 (four years)
44	栽培品 (cultivated)	乌鲁木齐南山 (Nanshan, Urumqi)	四年生 (four years)
45	栽培品 (cultivated)	昭苏 (Zhaosu)	三年生 (three years)
46	栽培品 (cultivated)	昭苏 (Zhaosu)	三年生 (three years)
47	栽培品 (cultivated)	昭苏 (Zhaosu)	三年生 (three years)
48	栽培品 (cultivated)	昭苏 (Zhaosu)	三年生 (three years)

2 方法与结果

2.1 性状比较

选取 2 批自行采集的新疆紫草野生品与 4 批同一栽培基地不同年限的栽培品,进行性状比较分析。根据 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)、《中药鉴定学》及相关参考文献资料,从形状、大小、色泽、断面、质地及气味等方面对比野生品与栽培品的特点。

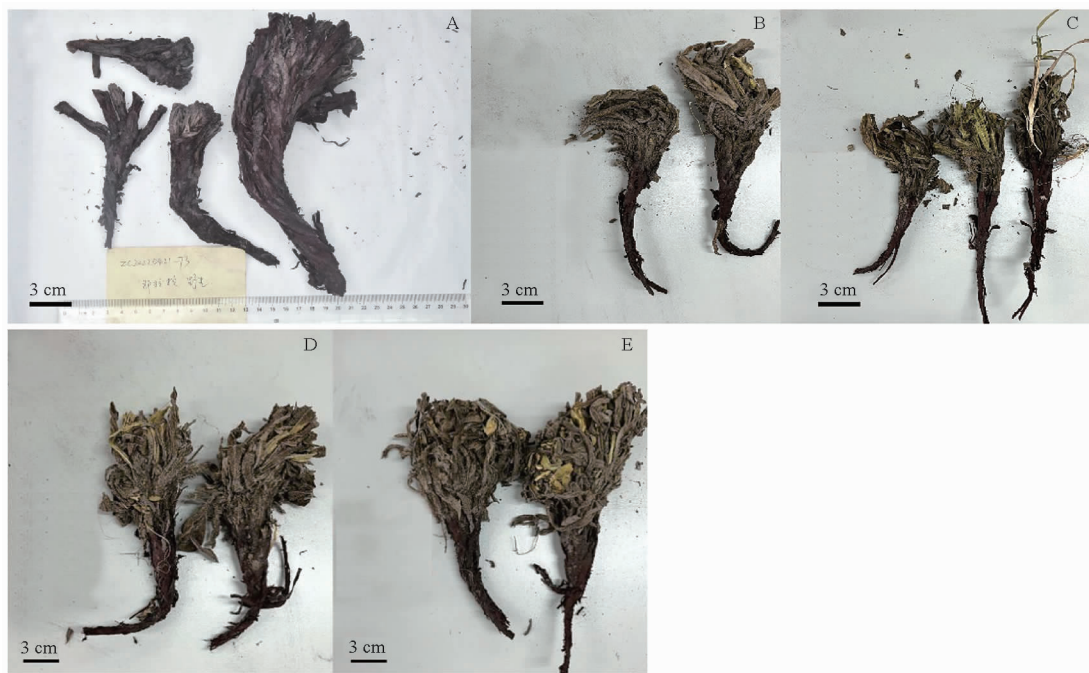
新疆紫草野生品与栽培品在性状上存在较大差异,具体描述如下:(1)野生品:呈不规则的长圆柱形,多扭曲,长 7~20 cm,直径 1~2.5 cm;表面紫红色或紫褐色,皮部疏松,颜色为紫红色,呈条形片状,常 10 余层重叠,易剥落;顶端有的可见分歧的茎残基,被灰白色短硬毛^[6];质松,体轻,易折断,折断面不整齐,木部较小,黄白色或黄色;气特异,味微苦、涩。如图 1-A 所示。

(2)栽培品:呈不规则的长圆柱形,略弯曲,长 6~23 cm,直径 0.7~2.1 cm。表面紫褐色或灰棕色,栓皮较少,颜色为紫褐色或灰褐色,呈不规则长条状,少见重叠,随着栽培年限的增长增多且卷曲,可见灰白色短硬毛。质硬,体轻,易折断,折断面不平坦,木部较大,木心大小随栽培年限增长而缩小,淡黄白色或灰褐色;气微特异,味微苦、涩。如图 1-B~E 所示。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 35 °C,流速 0.2 mL · min⁻¹,以乙腈-0.05% 甲酸水溶液 (70:30) 为流动相,检测波长 275 nm,进样量 2 μL。色谱图见图 2。

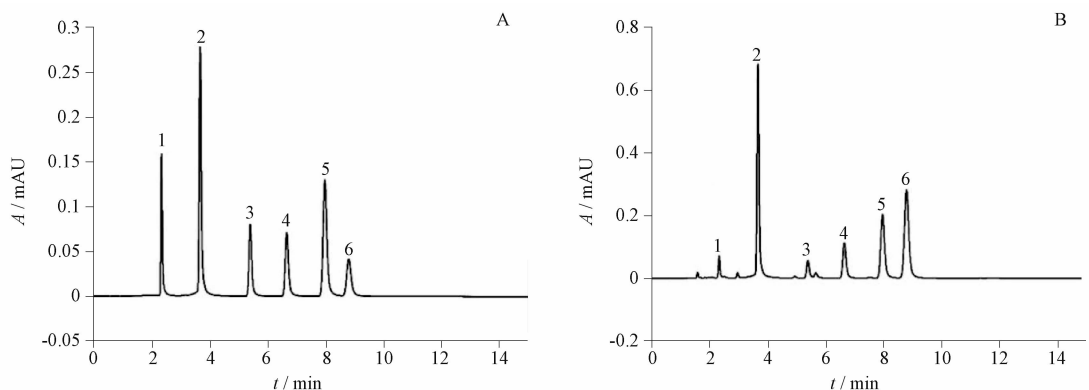
2.2.2 混合对照品溶液的制备 取右旋紫草素、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁和异戊酰紫草素的



A. 野生品(wild) B~E. 栽培品(cultivated) B. 二年生(two years) C. 三年生(three years) D. 四年生(four years) E. 五年生(five years)

图1 新疆紫草野生品与栽培品性状比较图

Fig. 1 Comparison of morphological features of wild and cultivated *Arnebie Radix*



1. 右旋紫草素(*D*-shikonin) 2. 乙酰紫草素(acetylshikonin) 3. β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁(β -acetoxisovalerylshikonin) 4. 异丁酰紫草素(isobutrylshikonin) 5. β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁(β, β' -dimethylacrylalkannin) 6. 异戊酰紫草素(isovalerylshikonin)

图2 混合对照品(A)和样品(B)的UPLC色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of mixed reference substance(A) and sample(B)

对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 即得各单一成分对照品储备液。分别取各上述储备液适量, 置同一 10 mL 量瓶中, 加乙腈配制成上述 6 个成分质量浓度分别为 50.11、100.05、50.43、48.45、100.02、49.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入石油醚

(60~90 $^{\circ}\text{C}$) 25 mL, 称定质量, 超声(40 kHz, 200 W)处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)补足减失的质量, 转移至 50 mL 离心管, 以转速 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 10 mL 至蒸发皿, 蒸干, 残渣加乙腈溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加乙腈至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液

0.1、0.2、0.5、1.0 mL 分别置于 4 个 10 mL 量瓶中,加乙腈定容至刻度,摇匀,即得 1~4 号对照品混合溶液,精密量取“2.2.2”项下各对照品储备液 1 mL 至 2 mL 量瓶中,加乙腈定容至刻度,摇匀,即得 5 号对照品混合溶液。分别精密吸取 1~5 号混合对照品溶液及单个对照品溶液各 2 μL ,注入液相

色谱仪,记录峰面积,以各对照品的浓度 ($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程。结果显示,新疆紫草中 6 个成分在测定的范围内相关系数 r 均 ≥ 0.999 ,在相应的浓度范围内线性关系良好,结果见表 2。

表 2 6 个成分的回归方程和线性范围考察结果

Tab. 2 Investigation results of regression equation and linear range of 6 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r
右旋紫草素(<i>D</i> -shikonin)	$Y = 1.060 \times 10^4 X + 1.775 \times 10^4$	0.495 ~ 495	0.999 8
乙酰紫草素(acetylshikonin)	$Y = 1.350 \times 10^4 X + 2.058 \times 10^4$	0.513 ~ 513	0.999 9
β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁(β -acetoxisovalerylshikonin)	$Y = 1.076 \times 10^4 X - 1.256 \times 10^3$	0.507 ~ 507	0.999 9
异丁酰紫草素(isobutylshikonin)	$Y = 1.163 \times 10^4 X - 4.095 \times 10^3$	0.465 ~ 465	0.999 9
β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁(β, β' -dimethylacrylalkannin)	$Y = 1.255 \times 10^4 X - 1.733 \times 10^4$	0.501 ~ 501	0.999 9
异戊酰紫草素(isovalerylshikonin)	$Y = 9.023 \times 10^3 X - 8.259 \times 10^3$	0.480 ~ 480	0.999 9

2.3.2 精密度考察 精密吸取“2.2.2”项混合对照品溶液 2 μL ,连续进样 6 次,记录峰面积并计算 RSD。结果显示右旋紫草素、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素峰面积的 RSD($n=6$)分别为 1.3%、1.3%、0.72%、1.9%、1.6%、1.4%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性考察 取样品粉末(样品 5 号)6 份,分别按“2.2.3”项方法制备成供试品溶液,按“2.2.1”项方法分别注入色谱仪,计算 6 个成分含量及 RSD。结果显示右旋紫草素、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素的含量分别为 0.12%、1.31%、0.17%、0.37%、0.76%、1.65%,RSD 分别为 2.8%、1.6%、2.6%、0.49%、2.6%、1.9%,表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性考察 取同一批次新疆紫草(样品 5 号),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、6、12、24、48 h,按“2.2.1”项下色谱条件分别注入色谱仪,记录 6 个成分峰面积,并计算 RSD。结果显示右旋紫草素、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素峰面积的 RSD 分别为 1.3%、0.50%、1.9%、0.76%、1.8%、2.2%,表明仪器稳定

性良好。

2.3.5 加样回收率试验 分别取右旋紫草素、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素的对照品适量,精密称定,置量瓶中,加乙腈溶解配制成质量浓度分别为 0.196 6、1.213、0.151 4、0.490 1、1.485、1.498 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6 个对照品溶液。取已知含量的样品粉末(样品 5 号),每份各约 0.25 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,精密加入上述 6 个对照品溶液各 1 mL,再精密加入石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$) 25 mL,按照“2.2.3”项下方法平行制备供试溶液,进样分析,计算回收率,结果见表 3。

2.4 样品测定及结果

取 48 批次新疆紫草野生品和栽培品粉末 0.5 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定 6 个成分的峰面积,采用外标法计算各成分含量,测定结果见表 4。结果显示,不同批次新疆紫草野生品和栽培品中 6 个成分含量差异较大,其含量从大到小的排列顺序依次为异戊酰紫草素、乙酰紫草素、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、右旋紫草素,含量平均值依次为 1.21%、0.86%、0.57%、0.27%、0.19%、0.09%。48 批新疆紫草中 6 个成分总量结果如图 3 所示。

表 3 加样回收率试验 ($n=6$)
 Tab. 3 The recoveries of six hydroxyl naphthoquinones

成分 (component)	称样量 (weight of sample)/g	样品中的量 (content)/ mg	加入量 (added)/ mg	测得量 (measured)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
右旋紫草素 (<i>D</i> -shikonin)	0.257 4	0.183 6	0.196 6	0.389 5	104.7	102.8	2.5
	0.249 0	0.177 6	0.196 6	0.376 3	101.1		
	0.243 4	0.173 6	0.196 6	0.369 0	99.4		
	0.255 6	0.182 3	0.196 6	0.381 6	101.4		
	0.267 2	0.190 6	0.196 6	0.399 1	106.0		
	0.258 7	0.184 5	0.196 6	0.389 8	104.4		
乙酰紫草素 (acetylshikonin)	0.250 2	3.283 2	3.250	6.678 8	104.5	101.1	2.3
	0.245 2	3.217 5	3.250	6.451 6	99.5		
	0.250 1	3.282 7	3.250	6.544 7	100.4		
	0.250 7	3.290 5	3.250	6.639 0	103.0		
	0.250 4	3.286 6	3.250	6.569 4	101.0		
	0.249 4	3.273 4	3.250	6.458 0	98.0		
β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁 (β -acetoxisovalerylshikonin)	0.252 3	0.247 2	0.251 0	0.485 1	94.8	93.4	2.0
	0.253 3	0.248 2	0.251 0	0.485 5	94.6		
	0.251 3	0.246 2	0.251 0	3.514 4	92.1		
	0.254 2	0.249 1	0.251 0	0.476 6	90.6		
	0.253 3	0.248 2	0.251 0	0.487 6	95.4		
	0.250 4	0.245 4	0.251 0	0.479 1	93.1		
异丁酰紫草素 (isobutyrylshikonin)	0.251 8	0.452 8	0.251 0	0.941 1	99.6	97.1	3.0
	0.251 1	0.451 6	0.490 1	0.942 1	100.1		
	0.251 0	0.451 4	0.490 1	0.936 8	99.0		
	0.245 0	0.440 6	0.490 1	0.908 0	95.4		
	0.251 7	0.452 8	0.490 1	0.920 5	95.4		
	0.248 9	0.447 6	0.490 1	0.903 4	93.0		
β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁 (β, β' -dimethylacrylalkannin)	0.250 5	1.375 5	1.486	2.797	95.6	97.6	3.0
	0.257 7	1.415 2	1.486	2.830	95.2		
	0.258 3	1.418 6	1.486	2.941	102.4		
	0.256 3	1.407 6	1.486	2.840	96.4		
	0.258 5	1.419 8	1.486	2.904	99.9		
	0.253 5	1.392 1	1.486	2.815	95.7		
异戊酰紫草素 (isovalerylshikonin)	0.252 7	2.427 8	2.430	4.781	96.9	95.1	1.4
	0.253 2	2.432 6	2.430	4.763	95.9		
	0.253 1	2.431 7	2.430	4.702	93.4		
	0.253 3	2.433 1	2.430	4.744	95.1		
	0.253 5	2.435 5	2.430	4.714	93.8		
	0.247 1	2.374 1	2.430	4.694	95.5		

表 4 48 批新疆紫草野生品与栽培品中 6 个成分含量测定结果

Tab. 4 Contents of six components in 48 batches of wild and cultivated *Arnebia Radix* samples

编号 (No.)	含量 (content) / %						总量 (total) / %
	右旋紫草素 (<i>D</i> -shikonin)	乙酰紫草素 (acetyl-shikonin)	β -乙酰氧基异 戊酰阿卡宁 (β -acetoxy- isovalerylshikonin)	异丁酰紫草素 (isobutyryl- shikonin)	β, β' -二甲基 丙烯酰阿卡宁 (β, β' -dimethylac- rylalkannin)	异戊酰紫草素 (isovalerylshikonin)	
1	0.10	0.76	0.36	0.37	0.31	1.00	2.90
2	0.18	0.35	0.17	0.32	0.61	0.81	2.44
3	0.15	0.54	0.33	0.51	0.95	1.29	3.77
4	0.05	0.44	0.07	0.11	0.61	0.71	1.99
5	0.04	0.59	0.19	0.47	0.59	0.90	2.78
6	0.12	1.50	0.18	0.38	0.74	1.69	4.61
7	0.06	1.04	0.09	0.14	0.67	1.13	3.13
8	0.12	1.33	0.17	0.28	0.52	1.88	4.30
9	0.03	0.10	0.01	0.05	0.27	0.53	0.99
10	0.08	0.54	0.74	0.55	0.43	1.34	3.68
11	0.15	2.06	0.51	0.51	0.93	3.22	7.38
12	0.01	0.05	0.27	0.08	0.81	0.61	1.83
13	0.19	0.69	0.43	0.54	0.55	1.21	3.61
14	0.15	1.10	0.31	0.37	0.87	2.23	5.03
15	0.11	0.84	0.10	0.59	0.75	1.26	3.65
16	0.04	0.27	0.12	0.16	0.42	0.69	1.70
17	0.08	0.49	0.18	0.24	0.49	1.01	2.49
18	0.07	0.44	0.21	0.32	0.50	0.76	2.30
19	0.08	0.65	0.23	0.55	0.57	1.16	3.24
20	0.11	0.45	0.23	0.45	0.67	0.99	2.90
21	0.05	0.37	0.29	0.18	0.42	0.80	2.11
22	0.03	0.19	0.04	0.11	0.33	0.61	1.31
23	0.06	0.18	0.20	0.24	0.56	0.60	1.84
24	0.03	0.17	0.22	0.16	0.49	0.60	1.67
25	0.03	0.24	0.29	0.21	1.46	1.07	3.30
26	0.03	0.17	0.15	0.17	0.57	0.59	1.68
27	0.02	0.21	0.07	0.11	0.46	0.67	1.54
28	0.14	1.67	0.10	0.60	0.88	1.62	5.01
29	0.09	0.71	0.15	0.11	0.39	0.99	2.44
30	0.08	1.41	0.11	0.19	0.62	1.16	3.57
31	0.14	1.62	0.18	0.29	0.58	2.08	4.89
32	0.17	2.35	0.27	0.40	0.81	2.48	6.48
33	0.09	1.75	0.21	0.32	0.69	2.18	5.24
34	0.14	2.19	0.33	0.47	0.80	2.41	6.34
35	0.14	2.06	0.15	0.26	0.59	2.14	5.34
36	0.23	2.14	0.23	0.30	0.91	2.75	6.56
37	0.12	1.75	0.15	0.26	0.74	1.60	4.62
38	0.09	1.84	0.15	0.39	0.75	2.22	5.44
39	0.14	2.05	0.31	0.42	0.82	2.34	6.08
40	0.17	2.70	0.22	0.45	0.80	2.73	7.07

表 4(续)

编号 (No.)	含量(content)/%						总量 (total)/ %
	右旋紫草素 (<i>D</i> -shikonin)	乙酰紫草素 (acetylshikonin)	β -乙酰氧基异 戊酰阿卡宁 (β -acetoxy- isovalerylshikonin)	异丁酰紫草素 (isobutyrylshikonin)	β, β' -二甲基 丙烯酰阿卡宁 (β, β' -dimethylac- rylalkannin)	异戊酰紫草素 (isovalerylshikonin)	
41	0.09	0.47	0.12	0.10	0.32	0.50	1.60
42	0.10	0.10	0.07	0.04	0.15	0.19	0.65
43	0.13	0.41	0.09	0.08	0.33	0.53	1.57
44	0.05	0.16	0.05	0.04	0.15	0.27	0.72
45	-	0.02	0.04	0.01	0.06	0.05	0.18
46	-	0.02	0.07	0.01	0.05	0.06	0.21
47	-	-	0.03	-	0.03	0.03	0.09
48	0.01	-	0.11	0.03	0.14	0.15	0.44

注(note):“-”表示未检出或低于定量限(the symbol“-”showed that the contents were not detected or below quantification limit)

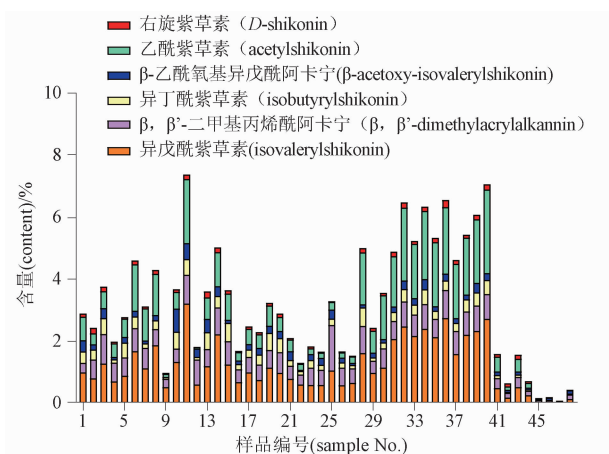


图 3 48 批新疆紫草中 6 个成分含量测定结果

Fig. 3 Content determination results of 6 components in 48 batches of *Arnebiae Radix*

新疆紫草野生品和栽培品中均含有萘醌类成分,且含量上存在差异,不同产地的栽培品也存在较大差异。产自巴音布鲁克地区的栽培品萘醌类成分总量最高,平均值为 5.31%,说明该产地的栽培品质量优良,其次是野生品,平均值为 2.90%。而乌鲁木齐南山地区和昭苏园区的栽培品 6 个萘醌成分总含量较低,平均值分别为 1.14% 和 0.23%。

2.5 新疆紫草野生品与栽培品差异成分分析

2.5.1 主成分分析 主成分分析(PCA)是一种无监督的多元处理技术,可对数据处理中变异数据进行总结,它将会产生一个视觉散点图,可定性分析

多元数据中的异同。为了更加清晰的区分 48 批紫草样品,将 6 个化合物的数据进行了 PCA。将 48 批样品 6 个化合物的数据导入 Chempattern 软件,采用 PCA,样本变异量 88.5 (PC1 77.58%, PC2 10.92%),累积 $R^2 X = 0.902$, $R^2 Y = 0.415$, $Q^2 = 0.344$,说明所建立的模型具有良好的稳定性及预测能力。结果如图 4 所示,野生品与乌鲁木齐南山、昭苏园区栽培品完全分离;巴音布鲁克栽培品与乌鲁木齐南山、昭苏园区栽培品完全分离;而野生品与巴音布鲁克栽培品有部分重合,巴音布鲁克栽培品组中包含 3 个野生品。

2.5.2 正交偏最小二乘-判别分析 PCA 反映出野生品与三地区栽培品在 6 个萘醌成分含量上有差异,为了进一步探究他们之间的差异性,使用正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA),分析如图 5 所示,野生品与乌鲁木齐南山、昭苏园区栽培品完全分离;巴音布鲁克栽培品与乌鲁木齐南山、昭苏园区栽培品完全分离;野生品与巴音布鲁克栽培品虽相对于 PCA 而言聚集性增强,但二者均未分开。提取 OPLS-DA 模型中 6 个化合物含量的变量投影重要性(VIP)值,其中 VIP 值 >1 的成分有 2 个,分别为异丁酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁,且 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁的贡献度最大,表明这 2 个化学成分是区别新疆紫草野生品和 3 个不同地区栽培品的差异标志物,在 6 个萘醌类化学成分中,乙酰紫草素的含量虽较高,但其在区分差异性方面贡献率较低。

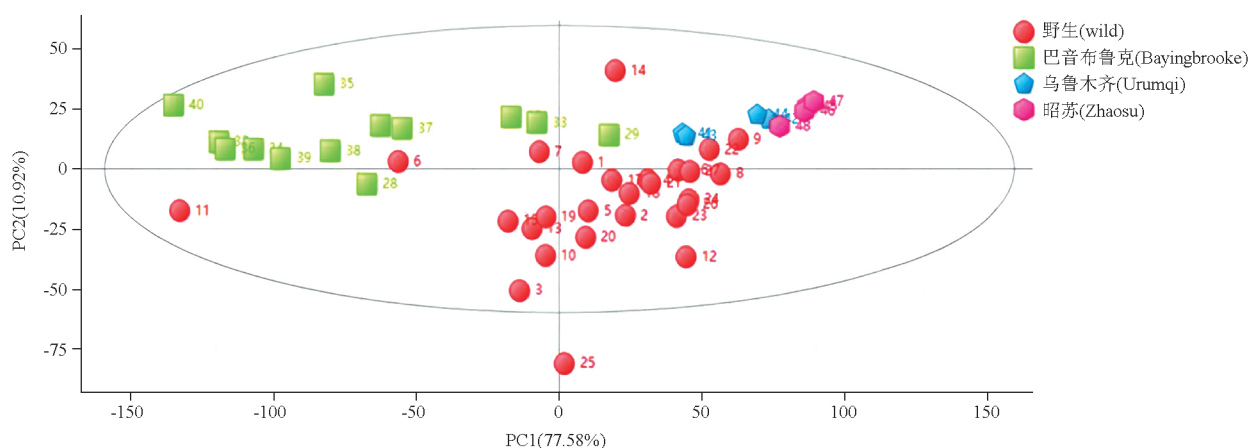


图 4 新疆紫草 PCA 得分图

Fig. 4 Score plot of PCA of the wild and cultivated *Arnebie Radix*

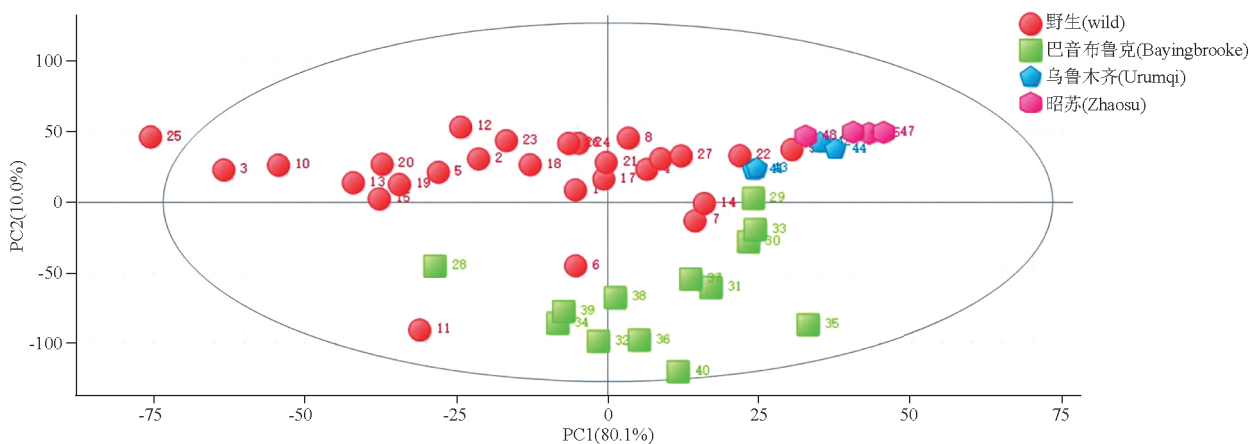


图 5 新疆紫草 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 5 Score plot of OPLS-DA of the wild and cultivated *Arnebie Radix*

使用 OPLS-DA, 分析野生品与不同产地栽培品化学成分的差异, 如图 6 所示, 野生品与巴音布鲁克栽培品部分重合, 与乌鲁木齐南山、昭苏园区栽培品完全分离, 通过 VIP 对野生品和巴音布鲁克栽培品的差异标志物进行分析, 发现 VIP 值 > 1 的化学成分为乙酰紫草素和异戊酰紫草素, 得到引起野生品、巴音布鲁克栽培品差异的主要化合物为乙酰紫草素和异戊酰紫草素; 引起野生品、乌鲁木齐南山栽培品差异的主要化合物为异丁酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁; 引起野生品、昭苏园区栽培品差异的主要化合物为 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁, 可以看出不同产地的新疆紫草质量存在差异。

2.6 巴音布鲁克不同栽培年限新疆紫草 6 个萘醌化学成分含量分析

巴音布鲁克地区的栽培品在不同的栽培年限上

存在含量差异, 计算两年生、三年生、四年生以及五年生样品的含量平均值, 结果如图 7 所示。五年生栽培品萘醌类成分总含量最高, 平均值为 5.95%, 其次是三年生栽培品, 平均值为 5.31%, 最后是四年生栽培品和两年生栽培品, 萘醌成分总含量分别为 5.30% 和 3.71%, 提示五年生的栽培品质量最佳。以上 6 个成分存在 2 种变化趋势, 右旋紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素和 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁这 4 个成分在不同年限的栽培品中变化不明显, 其含量随着栽培年限的增长缓慢增加。乙酰紫草素和异戊酰紫草素的变化明显, 三年生栽培品含量比起两年生栽培品含量出现明显上升, 后持续平稳上升, 分别由 1.19% 和 1.31% 增加到 2.10% 和 2.33%, 说明这 2 个成分受栽培年限的影响程度很大。

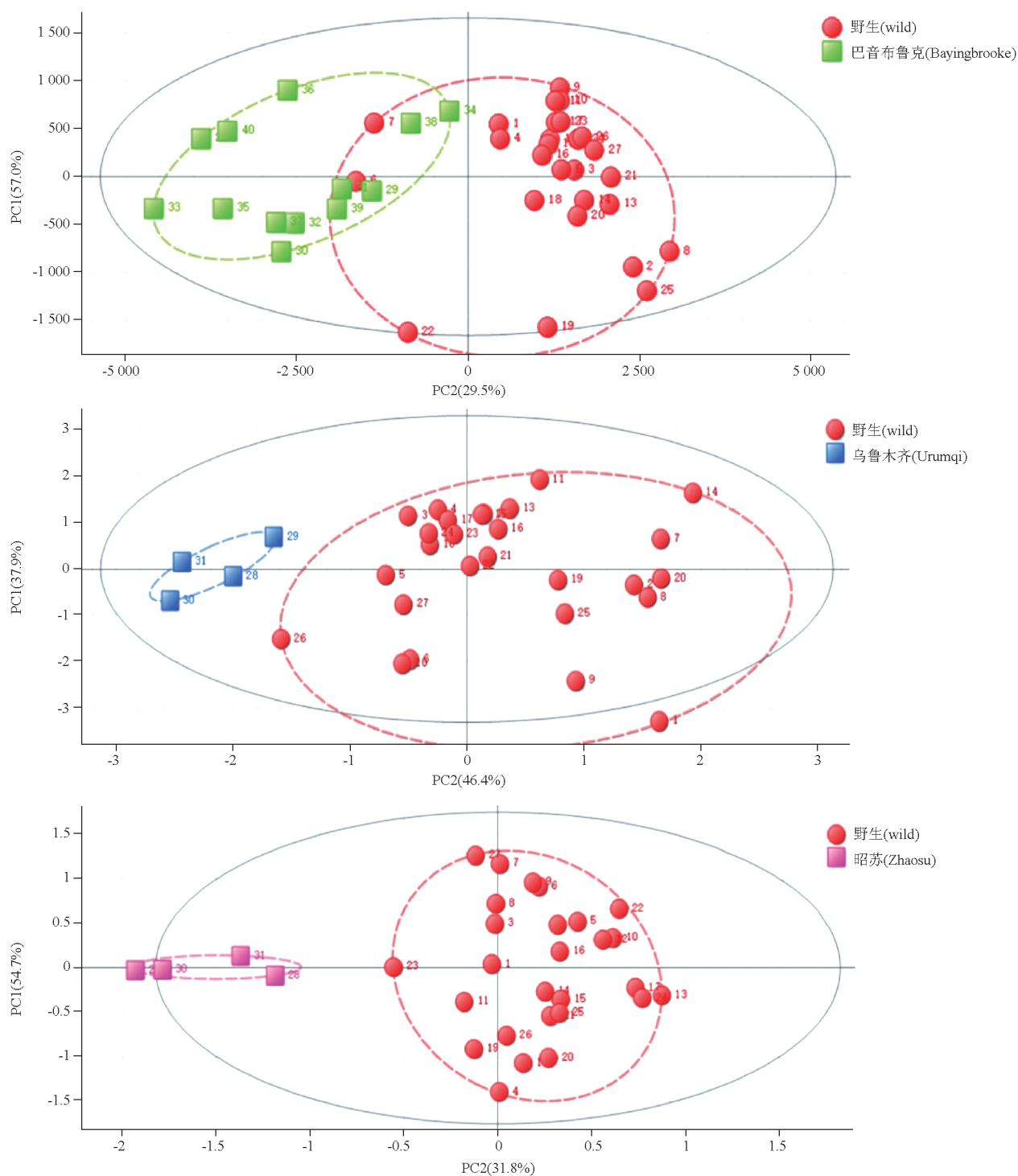


图6 新疆紫草野生品与不同产地栽培品的 OPLS - DA 得分图

Fig. 6 OPLS - DA score plot of wild and cultivated Arnebieae Radix from different origins

《中国药典》规定,紫草药材中标志性成分 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁不得少于 0.30%,巴音布鲁克各个年限的栽培品均远高于上述要求,在含量方面符合规定,达到药用要求。

3 讨论

3.1 性状比较

因巴音布鲁克产区的新疆紫草栽培品质量最优,故本研究对新疆紫草野生品与巴音布鲁克产区

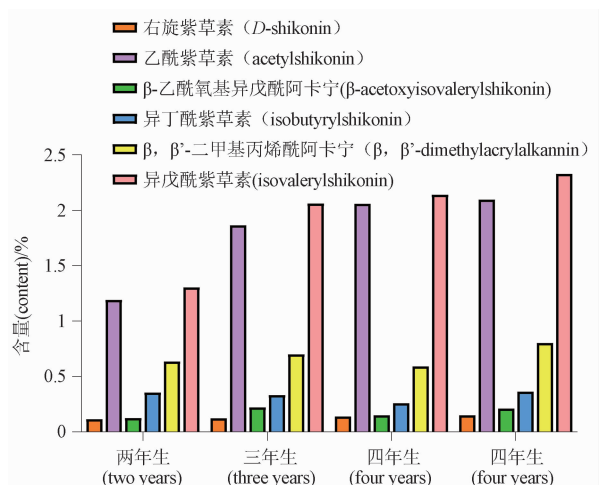


图7 不同栽培年限巴音布鲁克栽培品新疆紫草中6个成分含量
Fig. 7 Content determination results of 6 components in *Arnebia Radix* from Bayingbrooke cultivars of different cultivation years

的栽培品进行了性状的对比,找出了能区分二者的性状特征,通过对二者进行性状对比之后得知二者均含有紫色物质,从外观形态来看,二者有明显的性状差异。野生品栓皮重叠且卷曲,木心较小,有明显的特异性气味。而巴音布鲁克产区栽培品质地较硬,栓皮较少且弯曲不明显,木心较大,特异性气味不明显。故野生品与巴音布鲁克产区栽培品可以通过性状特征来进行区分。而来源于其他产区的栽培品因样本数量过小,无代表性特征等原因,未有单独对其性状与野生品进行对比研究,后续应针对不同产地、不同年限栽培品进行性状鉴定。

3.2 成分含量

产地对药材质量会有一些影响,本研究中的27批野生品虽来源于不同的产地,但均来源于我国新疆省,在对48批新疆紫草样品进行含量测定后,将其结果进行了聚类分析,结果显示除了4个样品外,各个产地的野生品都能很好地聚为一类并与栽培品分离,故将新疆紫草野生品归为一个组,便于后续的结果分析。

本文参考《中国药典》一部含量测定项下色谱条件选择和溶液制备方法,在其基础上进行优化,建立测定6个成分的UPLC分析方法。测定的6个萘醌类成分极性较小,故采用石油醚提取,乙腈溶解残渣。课题组前期筛选了检测波长,结果显示当波长为275 nm时,均能检测到上述6个成分,且各峰的分度良好,因此确定检测波长为275 nm^[14]。含量测

定结果显示,新疆紫草野生品与栽培品在成分含量上有一定的区别,但未呈现一定的规律性,且本文只对巴音布鲁克、乌鲁木齐南山、昭苏园区3个栽培产区进行分析,不能代表所有栽培品的质量,故后续需进一步研究。此外,本文只对巴音布鲁克产区不同年限的栽培品进行成分含量对比,故后续应对其他产区不同年限的栽培品进行分析。

产于乌鲁木齐南山地区(海拔1200 m左右)的四年生栽培品,其β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁平均值为0.24%,同样生长年限的巴音布鲁克(海拔2500 m左右)栽培品,其β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁平均值为0.59%,产于昭苏园区(海拔800 m左右)的三年生栽培品,β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁平均值为0.07%,远低于同年生的巴音布鲁克栽培品0.70%的含量,不符合2020年版《中国药典》规定,推测可能受到产地海拔的影响,栽培年限过短,造成其质量不佳。延长其栽培年限是否能够增加昭苏园区栽培品的含量,后续还需要进一步研究。

乌鲁木齐南山地区栽培品含量略高于昭苏园区,二者栽培品质量都远低于巴音布鲁克栽培品,进一步证实了海拔对紫草质量的影响,海拔越高,环境越严苛,越利于其成分的累积。来自于巴音布鲁克地区不同生长年限的栽培品均达到《中国药典》的要求,但其性状与野生品相比,还有较大的差异,后续需跟进观察七年生、八年生、九年生等更多生长年限的栽培品,将其性状与野生品进行对比研究。

3.3 其他

课题组前期对新疆紫草野生品与栽培品的DNA进行了ITS2序列测序,结果显示新疆紫草野生品与栽培品ITS2序列相同,是同一物种,但栽培品的性状与《中国药典》中规定的性状差异较大。本研究发现,生长年限与生长地区海拔均会影响其成分含量,生长年限越长、海拔越高、生长环境越苛刻,越会长出质量更优的紫草,这也是造成紫草野生资源短缺的重要原因。紫草市场资源的匮乏,导致了有很多的掺伪品,后续需要更多深入的研究。

4 结论

本文对新疆紫草野生品与栽培品的性状进行对比研究,可根据栓皮是否卷曲,木心的大小和有无明显的特异性气味区分野生品与巴音布鲁克产区的栽培品。本文对新疆紫草野生品与栽培品中6个萘醌

类成分进行含量测定,根据含量测定结果,产于巴音布鲁克的栽培品 6 个萘醌类成分总含量最高,而产于昭苏园区的所有批次药材栽培品中指标性成分 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁均不符合《中国药典》规定,说明栽培品质量层次不齐,栽培品的质量控制尚需要进一步研究。

本研究采用 UPLC 建立了在同一色谱条件下,同时测定新疆紫草野生品与栽培品中 6 个萘醌类成分的含量测定方法,该方法的精密度、重复性、稳定性均符合规定,方法稳定可行,6 个萘醌类成分可以作为控制新疆紫草质量的指标性成分;同时采用 PCA 和 OPLS-DA 2 种化学模式识别技术确定了异丁酰紫草素和 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁可有效区分新疆紫草野生品与栽培品。巴音布鲁克地区栽培品含量已达到《中国药典》的标准,但其性状与野生品差异较大,不符合《中国药典》标准,后续将继续开展新疆紫草栽培品的研究。本研究发现,海拔越高,环境越严苛,越利于新疆紫草的生长。正因为生长环境的严峻,才导致新疆紫草野生资源的短缺,建议加大栽培品的研究力度和种植范围,扩大规模,跟踪其生长年限,栽培出符合《中国药典》规定的药材,以解决新疆紫草资源匮乏的问题。

参考文献

- [1] 佚名. 神农本草经[M]. 北京:中国医药科技出版社,2018:99
YIMING. Shennong Bencaojing [M]. Beijing:China Medical Science Press, 2018:99
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 福州:福建科学技术出版社,2020:212
LI SZ. Bencaogangmu [M]. Fuzhou:Fujian Science & Technology Press, 2020:212
- [3] 贾思勰. 齐民要术[M]. 北京:团结出版社,1996:467
JIA SX. Qimin Yaoshu [M]. Beijing:Unity Press,1996:467
- [4] 中华人民共和国药典 2020 版,一部[S]. 2020:1902
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:1902
- [5] 陈康,李敏. 中药材种植技术[M] 北京:中国医药科技出版社,2006:443
CHEN K, LI M. Chinese Herbal Medicine Planting Technology [M]. Beijing:China Medical Science Press, 2006:443
- [6] 徐海燕. 新疆软紫草属资源及其药材品质评价的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2021
XU HY. Research on the Quality Evaluation and Resources of *Arnebia* L. and Their Medicinal Materials [D]. Beijing:Beijing University of Chinese Medicine,2021
- [7] 杨亮杰,刘秋琼,敬松,等. 绿色食品原料新疆紫草栽培技术规程[J]. 现代农业科技,2020,766 (8):72
YANG LJ, LIU QQ, JING S, et al. Technical regulations for the cultivation of green food raw materials *Arnebia euchroma* [J]. Mod Agric Sci Technol, 2020, 766 (8):72
- [8] 叶雨,樊丛照,张际昭,等. 基于 MaxEnt 和 GIS 的新疆紫草产地生态适宜性分析[J]. 中国现代中药,2022,24 (5):770
YE Y, FAN CZ, ZHANG JZ, et al. Ecological suitability of *Arnebia euchroma* producing area based on MaxEnt and GIS [J]. Mod Chin Med, 2022, 24 (5):770
- [9] 丁文欢,王东东,王延蛟,等. 新疆 3 种软紫草资源现状调查与分析[J]. 时珍国医国药,2023,34 (1):162
DING WH, WANG DD, WANG YJ, et al. Investigation and analysis of three species of *arnebia* resource situation in Xinjiang [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34 (1):162
- [10] 钱雪,李海涛,曾万祥,等. 紫草化学成分、药理作用及产品应用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2021,40 (3):52
QIAN X, LI HT, ZENG WX, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and product application of gromwell root [J]. Chin Wild Plant Resour, 2021, 40 (3):52
- [11] 徐景怡,吴硕,李玉环,等. 新疆紫草及其活性成分抗病毒作用研究进展[J]. 中国医药生物技术,2019,14 (6):549
XU JY, WU S, LI YH, et al. Research progress on the antiviral effect of *Arnebia euchroma* and its active ingredients [J]. Chin Med Biotechnol, 2019, 14 (6):549
- [12] 廖梅,张声源. 新疆紫草的化学成分研究[J]. 中药材,2020,43 (11):2701
LIAO M, ZHANG SY. Chemical constituents from the roots of *Arnebia euchroma* [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43 (11):2701
- [13] 李静,李耀磊,于健东,等. 一测多评法结合特征图谱的新疆紫草质量控制研究[J]. 药物分析杂志,2020,40 (7):1209
LI J, LI YL, YU JD, et al. Quality control of *Arnebiae Radix* based on characteristic chromatogram and QAMS [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40 (7):1209
- [14] 管珂,苏蕊,滕爱君,等. 新疆紫草 HPLC 特征图谱和紫草类药材萘醌类成分含量测定[J]. 药物分析杂志,2016,36 (9):1526
ZAN K, SU R, TENG AJ, et al. HPLC specific chromatogram of *Arnebia euchroma* and determination of six naphthoquinones in *Boraginaceae* Herbs [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36 (9):1526

(本文于 2023 年 6 月 15 日收到)