新疆紫草总酚酸提取物指纹图谱建立及 4 种成分测定

张红伟[1]， 唐 英[2,3]， 樊敏伟[2,3*]
(1. 上海慈济药业有限公司，上海 201203；2. 国家中药制药工程技术研究中心，上海 201203；3. 上海中药制药技术有限公司，上海 201203)

摘要：目的 建立新疆紫草总酚酸提取物 HPLC 指纹图谱，并测定总酚酸、咖啡酸、咖啡酸四聚体、紫草酸的含有量。**方法** 新疆紫草总酚酸提取物 70% 乙醇溶液的分析采用 Waters Symmtry C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈-0.05% 甲酸水，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 220 nm。**结果** 9 批样品指纹图谱中共有 8 个特征峰。总酚酸、咖啡酸、咖啡酸四聚体、紫草酸的含有量分别为 55.62%～62.84%、0.20%～0.23%、18.55%～25.49%、0.46%～0.77%。**结论** 该方法稳定可靠，可用于新疆紫草的质量控制。

关键词：新疆紫草；指纹图谱；总酚酸；咖啡酸；咖啡酸四聚体；紫草酸；HPLC
中图分类号：R284.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)12-2941-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.023

Establishment of HPLC fingerprints of total phenolic acid extract from *Arnebia euchroma* and determination of four constituents

ZHANG Hong-wei[1], TANG Ying[2,3], FAN Min-wei[2,3*]
(*1. Shanghai Ciji Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 2. National Engineering Research Center for TCM, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai TCM Technology Co., Ltd, Shanghai 201203, China*)

KEY WORDS: *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.; fingerprints; total phenolic acids; caffeic acid; caffeic acid tetramers; shikonin; HPLC

新疆紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma*（Royle）Johnst. 的干燥根。始载于《神农本草经》，其性甘、咸，寒。归心、肝经。具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效。用于治疗血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤[1]。研究表明紫草中的化学成分有紫草萘醌类、单萜苯醌类及苯酚类、生物碱类、酚酸类等多种具有生物活性的化合物[2]。其中脂溶性强的紫草萘醌类包括紫草素、乙酰紫草素、β，β′-二甲基丙烯酰阿卡宁、去氧紫草素、去氢阿卡宁等。水溶性成分酚酸类含咖啡酸、迷迭香酸、没食子酸、阿魏酸和咖啡酸三聚体、咖啡酸四聚体等[3]。目前 2015 年版《中国药典》以紫草羟基萘醌总色素、β，β′-二甲基丙烯酰阿卡宁作为紫草的质量控制指标，相关文献对萘醌类的成分研究也较为深入，对酚酸类的成分研究较少，多见于紫草成分的结构鉴定[4-6]。

本研究以新疆紫草为对象，采用 70% 乙醇提取，通过大孔树脂吸附洗脱的工艺得到总酚酸含有量达到 50% 以上的提取物，并对提取物进行指纹图谱研究，通过 LC-MS 分析确认酚酸类的主要成分有咖啡酸、咖啡酸四聚体及其异构体、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C 等。

1 材料

Waters 2695-ZQ2000 液相色谱质谱联用仪（美国 Waters 公司）；Agilent 1100 液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；UV2450 紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；D101 型大孔吸附树脂（郑州艾诺

收稿日期：2018-12-05
基金项目：国家科技重大专项（2018ZX01031301-001）；上海市科委“科技创新行动计划”（15401903500）；上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划［ZY（2018-2020）-CCCX-2006］
作者简介：张红伟（1968—），男，执业药师，化学工程师，从事质量管理研究。E-mail：zhanghongwei@fangxinhealth.com
*通信作者：樊敏伟（1967—），女，博士，教授，从事新药及新技术品的研究开发。E-mail：fanmw0455_cn@sina.com

化工科技有限公司)。咖啡酸对照品(批号 110885-201502,中国食品药品检定研究院);紫草酸对照品(批号 ST13620120MG,上海诗丹德生物技术有限公司,含有量 98.0%);咖啡酸四聚体(批号 20160320,上海新生源医药集团有限公司,含有量 98.0%);乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司);甲酸为分析纯(中国医药集团有限公司)。

新疆紫草(批号 1612001),购自亳州市远光中药饮片厂,经上海市中药研究所叶愈青主任药师鉴定为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 总酚酸提取物制备 采用大孔树脂纯化川芎中的阿魏酸和总酚酸、巴西甘薯叶中的总酚酸、芦根中的总酚酸等已多有文献报道,但分离纯化紫草中的总酚酸还未见报道[7-12]。通过前期工艺研究[13-15],确定紫草中总酚酸的提取纯化工艺,取紫草药材加 70% 乙醇回流提取,滤液浓缩,浓缩液上 D101 大孔树脂柱,先用水洗脱,再用 40% 乙醇洗脱,将收集的洗脱液浓缩干燥,即得总酚酸提取物。根据制备工艺,分别制得 9 批样品(20170301、20170302、20170303、20170401、20170402、20170403、20170501、20170502、20170503)的总酚酸提取物,平均得率 0.42%。

2.2 总酚酸含有量测定

2.2.1 咖啡酸对照品溶液制备 取咖啡酸对照品适量,精密称定,用 70% 乙醇溶解制成质量浓度 0.1 mg/mL 的溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取紫草总酚酸提取物约 50 mg,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加入 70% 乙醇超声溶解,定容,摇匀。精密吸取 2.0 mL 溶液置 20 mL 棕色量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,制得 0.2 mg/mL 的供试品溶液。

2.2.3 最大吸收波长确认 精密量取咖啡酸对照品溶液和供试品溶液各 0.5 mL 于 25 mL 棕色量瓶中,加 70% 乙醇至 5.0 mL,分别加入 0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2.0 mL,0.6% 三氯化铁与 0.9% 铁氰化钾(1∶1)混合溶液 2.0 mL,暗处放置 5 min,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,暗处放置 20 min,以 70% 乙醇溶液代替咖啡酸为空白对照,于 400~900 nm 波长下扫描,并记录结果,见图 1。由此可知,最大吸收波长为 780 nm。

2.2.4 线性关系考察 准确吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 咖啡酸对照品溶液于 25 mL 棕色量瓶中,加 70% 乙醇至 5.0 mL,分别加入 0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2.0 mL,0.6% 三氯化铁与 0.9% 铁氰化钾(1∶1)混合溶液 2.0 mL,暗处放置 5 min,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,放置 20 min,以 70% 乙醇溶液为空白,同法操作制备空白对照,在最大吸收波长处测定吸光值,以吸光度为纵坐标(A),质量浓度为横坐标(C)进行回归,得回归方程为 $A = -0.043\ 1 + 9.810\ 5C$,$r = 0.999\ 6$,结果表明咖啡酸在 0.022~0.132 mg/mL 范围内线性关系良好。

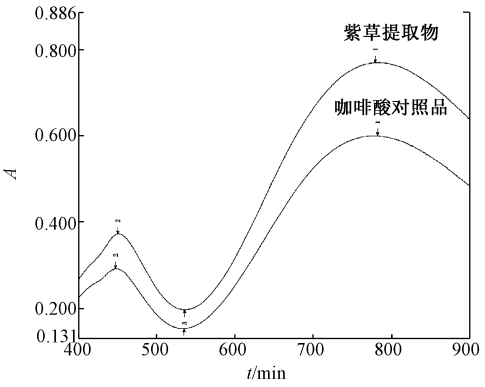


图 1 各样品光谱图

Fig. 1 Spectrograms of various samples

2.2.5 总酚酸含有量测定 分别取不同批号的总酚酸提取物,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别取 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中,自加 70% 乙醇至 5.0 mL 起,在“2.2.4”项条件下显色,780 nm波长下测定吸光度,计算总酚酸含有量,结果见表 1。

表 1 各样品总酚酸含有量测定结果(%)

Tab. 1 Results of total phenolic acids content determination of various samples (%)

编号	批号	总酚酸含有量
1	20170301	58.54
2	20170302	57.47
3	20170303	59.61
4	20170401	55.62
5	20170402	56.77
6	20170403	57.98
7	20170501	60.15
8	20170502	62.84
9	20170503	60.59

2.3 指纹图谱建立

2.3.1 色谱条件 Waters Symmtry® C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.05% 甲酸(B),梯度洗脱;体积流量 1.0 mL/min;柱温

25 ℃；检测波长 220 nm。

2.3.2　对照品溶液制备　取咖啡酸、紫草酸、咖啡酸四聚体对照品适量，精密称定，用 70% 乙醇溶解制成约 0.1 mg/mL 的溶液。

2.3.3　供试品溶液制备　取紫草总酚酸提取物约 100 mg，精密称定，置 10 mL 棕色量瓶中，加入 70% 乙醇超声溶解，定容，摇匀，制得 10.0 mg/mL 供试品溶液。

2.3.4　指纹图谱研究

2.3.4.1　检测波长确认　通过比较不同检测波长下紫草总酚酸提取物的液相色谱图（图 2），在 220 nm 波长下色谱峰反映的信息量最多，因此选择 220 nm 为检测波长。

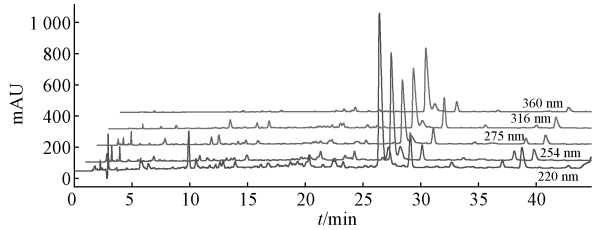
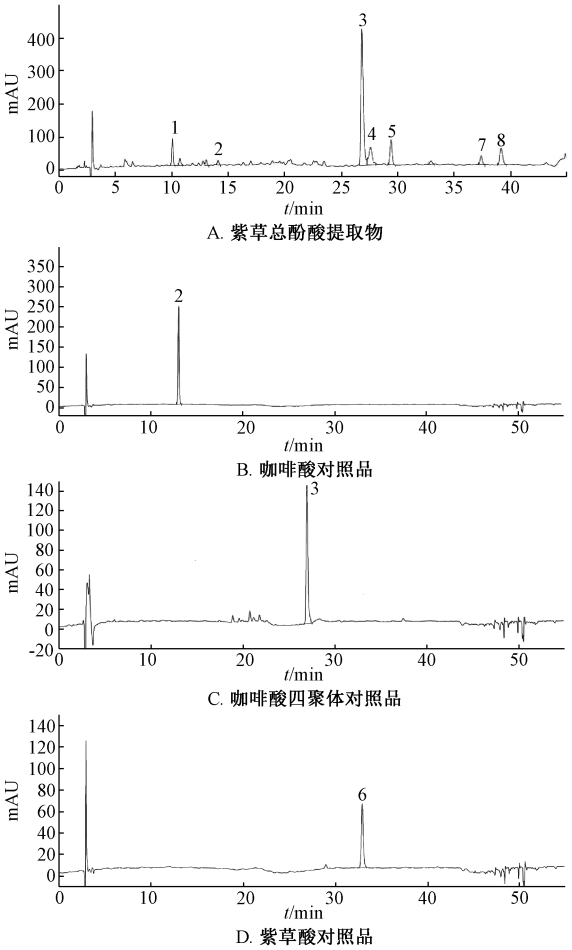


图 2　不同波长下总酚酸提取物 HPLC 色谱图

Fig. 2　HPLC chromatograms of total phenolic acid extract at different wavelengths

2.3.4.2　结果分析　根据中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）对 9 批样品进行分析，建立其特征指纹图谱，9 批样品图谱中均含有 8 个特征峰，通过对照品比对及 LC-MS 质谱分析，初步标定 7 个特征峰分别为咖啡酸、咖啡酸四聚体及其异构体、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C，结果见表 2。色谱图见图 3。



2. 咖啡酸　3. 咖啡酸四聚体　4. 咖啡酸四聚体异构体　5. 迷迭香酸　6. 紫草酸　7. 咖啡酸四聚体异构体　8. 丹酚酸 C

2. caffeic acid　3. caffeic acid tetramer　4. caffeic acid tetramer isomer　5. rosmarinic acid　6. shikonic acid　7. caffeic acid tetramer isomer　8. salvianolic acid C

图 3　各成分 HPLC 色谱图

Fig. 3　HPLC chromatograms of various constituents

表 2　总酚酸提取物主要化学成分

Tab. 2　Main chemical constituents of total phenolic acid extract

编号	出峰时间/min	化合物	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	分子式	分子量	相对含有量/%
1	10.047	未知化合物	631.22	629.21	$C_{28}H_{38}O_{16}$	630.59	0.54
2	13.051	咖啡酸	181.15	179.15	$C_9H_8O_4$	180.15	1.09
3	26.810	咖啡酸四聚体	741.47 $[M+Na]^+$	717.61	$C_{36}H_{30}O_{16}$	718.61	58.89
4	27.564	咖啡酸四聚体异构体	741.48 $[M+Na]^+$	717.84	$C_{36}H_{30}O_{16}$	718.61	8.90
5	29.378	迷迭香酸	383.07 $[M+Na]^+$	359.07	$C_{18}H_{16}O_8$	360.33	5.28
6	32.934	紫草酸	561.10 $[M+Na]^+$	537.10	$C_{27}H_{22}O_{12}$	538.46	0.77
7	37.369	咖啡酸四聚体异构体	741.44 $[M+Na]^+$	717.70	$C_{36}H_{30}O_{16}$	718.61	2.39
8	39.137	丹酚酸 C	515.10 $[M+Na]^+$	491.10	$C_{26}H_{20}O_{10}$	492.10	5.61

2.3.5　方法学考察

2.3.5.1　精密度试验　取同一份紫草总酚酸提取物（批号 20170501），按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下连续进样 6 次。测得 8 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明该仪器精密度良好。

2.3.5.2　稳定性试验　取同一份紫草总酚酸提取物（批号 20170501），按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下，分别于 0、2、4、6、8、24 h 进样，测得 8 个共有峰相对

保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5.3 重复性试验 取紫草总酚酸提取物（批号 20170501）6 份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样。测得 8 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明该方法重复性较好。

2.3.5.4 指纹图谱分析 取 9 批紫草总酚酸提取物，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样，色谱图见图 4，将其导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版），选择 S1 样品色谱图作为参照，采用平均数法，时间宽度设定为 0.3，多点校正后，共确定 8 个共有峰，生成紫草总酚酸提取物的对照指纹图谱，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，两者 RSD 分别为 0.21%～0.44%、14.52%～28.36%。

9 批样品的色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.998、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999，表明不同紫草总酚酸提取物的相似度均达到 0.95 以上，相似度较好。

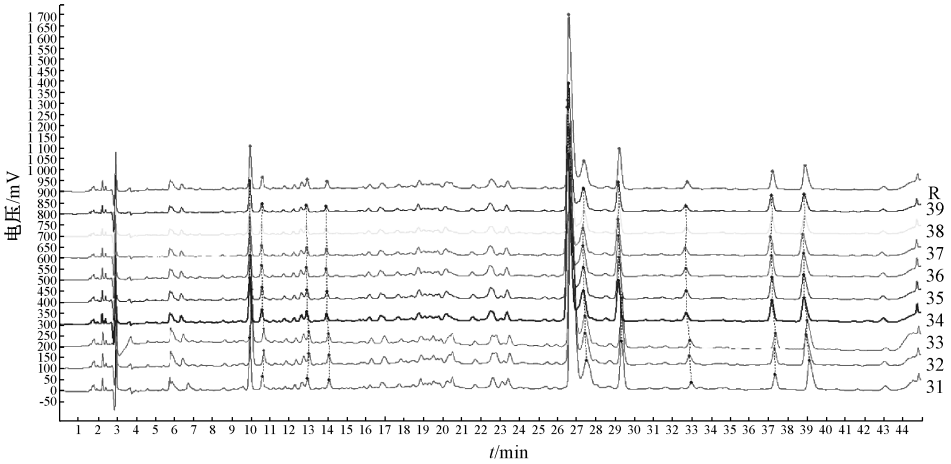


图 4 9 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 HPLC fingerprints of nine batches of samples

2.4 样品含有量测定 咖啡酸、咖啡酸四聚体、紫草酸为紫草总酚酸提取物指纹图谱中的共有峰，以此 3 种成分作为含有量测定控制指标，通过一系列的方法学考察，测得各批号总酚酸提取物中的各指标含有量，结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果（%）

Tab. 3 Results of content determination of various consti-tuents（%）

编号	批号	咖啡酸	咖啡酸四聚体	紫草酸
1	20170301	0.23	20.43	0.75
2	20170302	0.23	21.06	0.75
3	20170303	0.20	20.75	0.77
4	20170401	0.20	18.55	0.67
5	20170402	0.23	20.42	0.74
6	20170403	0.21	20.85	0.77
7	20170501	0.20	24.46	0.46
8	20170502	0.22	25.49	0.73
9	20170503	0.21	24.28	0.71

3 讨论

在前期新疆紫草研究中，发现不同批次间药材中的酚酸类成分差异较大，因此在后续开展紫草总酚酸提取物的制备工艺研究时对紫草进行优选，建立了新疆紫草的内控对照品。

本研究在优选新疆紫草药材的基础上，通过一系列的提取纯化工艺研究，确定以 70% 乙醇为提取溶剂，浓缩液通过大孔树脂吸附洗脱的工艺可得到总酚酸含有量达到 50% 以上的提取物。通过对色谱条件的研究，以乙腈-0.05% 甲酸为流动相，采用梯度洗脱，比较不同检测波长下紫草总酚酸提取物的液相色谱图，在 220 nm 波长下色谱峰反映

的信息量最多，因此选择 220 nm 为检测波长。同时根据色谱条件建立紫草总酚酸提取物的特征指纹图谱，可标定出 8 个共有的特征峰，包括咖啡酸、咖啡酸四聚体及其异构体、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 C，其中咖啡酸四聚体的色谱峰相对含有量最高。

为系统评价紫草总酚酸提取物的成分组成及质量情况，根据现有的对照品及建立的特征指纹图谱，选择咖啡酸、咖啡酸四聚体、紫草酸作为含有量控制指标，结果显示咖啡酸、紫草酸的含有量较低，不适宜为含有量指标，而咖啡酸四聚体的含有量相对较高，适宜作为控制指标，而相对含有量较高的成分迷迭香酸、丹酚酸 C，后续也可作为控制指标进行研究。

目前《中国药典》及相关文献对紫草药材中萘醌类成分研究较为深入，建立的指纹图谱多以萘醌类成分为主，而对水溶性成分如酚酸类的研究较少，多见于紫草成分的结构鉴定[16-17]。本研究通过对紫草总酚酸提取物的工艺和质量研究，较为系统、全面的体现了紫草药材中紫草酚酸类成分的状况，以期为今后新疆紫草水溶性成分的深入研究提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：340-341.
[2] 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.
[3] 买尔旦·马合木提，秦冬梅，贺金华，等. 新疆软紫草水溶性化学成分的研究[J]. 新疆医科大学学报，2009，32(4)：371-373.
[4] 宋艳华，孙 晖，张爱华，等. 紫草的研究进展[J]. 中医药学报，2013，41(4)：123-125.
[5] 祁 英，刘玉梅. 新疆紫草不同极性部位的抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学，2013，30(8)：850-856.
[6] 崔晓秋. 中药紫草化学成分及药理作用最新研究进展[J]. 济宁医学院学报，2015，38(5)：356-358，362.
[7] 刘 韶，谭阳阳，徐平声，等. 大孔吸附树脂法纯化巴西甘薯叶中的总酚酸[J]. 中国医院药学杂志，2009，29(18)：1534-1536.
[8] 邓一平，李 乔，秦汝兰，等. 不同采收期兴安升麻中 3 种酚酸类成分和总酚酸的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报，2016，33(1)：87-92.
[9] 杨 洁，戚 进，余伯阳. 不同产地夏枯草中总三萜及总酚酸的含量测定[J]. 海峡药学，2015，27(8)：29-31.
[10] 张 艳，余正勇，耿福能，等. 蒲公英提取物中总酚酸含量测定方法的优化[J]. 食品研究与开发，2018，39(3)：123-126.
[11] 李 欣，薛治浦，朱文学. 丹参不同部位总酚酸和总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学，2011，32(3)：108-111.
[12] 马 强，董 玉，那生桑，等. 冬葵果中总酚酸的含量测定[J]. 时珍国医国药，2010，21(10)：2583-2584.
[13] 秦冬梅，买尔旦·马合木提，贺金华. 新疆软紫草中咖啡酸四聚体对照品的制备[J]. 时珍国医国药，2007，18(8)：1857-1858.
[14] 秦冬梅，胡利萍，买尔旦·马合木提. 高效液相色谱法同时测定紫草中咖啡酸四聚体及其异构体含量[J]. 中国医院药学杂志，2010，30(19)：1707-1709.
[15] 秦冬梅，买尔旦·马合木提，贺金华. HPLC 法同时测定复方紫草颗粒中咖啡酸四聚体和丹酚酸 B 的含量[J]. 中国药房，2010，21(15)：1411-1412.
[16] 毛 艳，张瑞萍，贺金华，等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱分析紫草中酚酸类化合物[J]. 药物分析杂志，2016，36(7)：1199-1206.
[17] 昝 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.