

基于指纹图谱结合化学计量法对乌头属藏药材榜那的多指标成分分析

王 容¹, 魏 屹², 周春岚², 宋良科², 谭 睿^{2*}

1. 西南交通大学医学院, 四川 成都 610031

2. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

摘要: **目的** 建立常用乌头属藏药材榜那的指纹图谱及多指标成分含量测定方法, 为多基原药材的质量标准制定和临床安全用药提供参考。**方法** 采用 HPLC 建立榜那药材的指纹图谱并进行相似度评价; 测定 30 批榜那药材中 7 种生物碱成分含量, 并结合主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 评价榜那药材的 2 种不同基原植物的生物碱成分的差异。**结果** 建立的指纹图谱确认 17 个共有峰, 指出 12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱 7 个色谱峰。基于相似度分析, 铁棒锤和伏毛铁棒锤种内化学指纹图谱均一, 种间指纹图谱存在一定差异。PCA 和 OPLS-DA 结果表明铁棒锤和伏毛铁棒锤 2 种基原物种在这 7 种化学成分含量上存在一定差异; 且依据 OPLS-DA 和 *t* 检验分析结果可确定伏毛铁棒锤中主要差异成分 12-表-欧乌头碱和乌头碱含量显著高于铁棒锤 ($P < 0.01$)。**结论** 本实验所建立的指纹图谱和多组分定量分析方法简便、易操作、信息量大, 可用于榜那药材的质量和临床用药安全性控制; 有必要建立和完善榜那的双酯型生物碱限度测定。

关键词: 榜那; 铁棒锤; 伏毛铁棒锤; 指纹图谱; 化学计量学; 多指标成分; 12-表-欧乌头碱; 雪上一枝蒿庚素; 苯甲酰新乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 新乌头碱; 乌头碱; 3-乙酰乌头碱

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-3037-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.023

Study on multi-index components of Tibetan medicine Bangna of *Aconitum* genus according to fingerprints and chemometrics

WANG Rong¹, WEI Yi², ZHOU Chun-lan², SONG Liang-ke², TAN Rui²

1. School of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: **Objective** To establish the chemical fingerprint and multi-index components determination of Tibetan medicine Bangna of *Aconitum* genus, and provide references for the formulation of quality standards of multi-base original medicinal materials and clinically safe medication. **Methods** HPLC fingerprint of Bangna was established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM. In addition, the content of the seven components of Bangna from 30 batches and the difference of chemical information between the two species of Bangna was investigated by principal component analysis and orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) respectively. **Results** A total of 17 common peaks were identified in the fingerprint that was established by the determination of 30 batches of Bangna, and seven components of which were identified with 12-*epi*-napelline, songorine, benzoylmesaconitine, benzoylaconine, mesaconitine, aconitine, 3-acetylaconitine. Based on similarity results, the fingerprint had good consistency between the same origin and minor diversity between the different sources. The results of principal component analysis and OPLS-DA showed that there were some differences in the content of seven components between the two species. Based on the results of OPLS-DA and *t* test, it could be determined that the contents of 12-*epi*-napelline and aconitine of *Aconitum flavum* were significantly higher than those in *Aconitum pendulum* ($P < 0.01$). **Conclusion** The fingerprint and multi-component quantitative analysis methods were used for the quality and clinically safe medication control of Bangna in this paper is simple, easy to operate, and informative. Moreover, it is necessary to establish and improve the limit determination of diester alkaloids.

Key words: Bangna; *Aconitum pendulum* Busch; *Aconitum flavum* Hand. -Mazz.; fingerprint; chemometrics; multi-index component; 12-*epi*-napelline; songorine; benzoylmesaconitine; benzoylaconine; mesaconitine; aconitine; 3-acetylaconitine

收稿日期: 2020-01-02

基金项目: 国家重点研发专项 (2018YFC1706200); 全国第四次中药资源普查专项 (财社 (2017) 66 号); 四川省重点研发项目 (20ZDYF3291); 四川省中医药管理局重点项目 (2018C031)

作者简介: 王 容, 在读研究生, 研究方向为中药和民族药质量标准 and 安全性研究。Tel: 17738145280 E-mail: wangrong6705@163.com

*通信作者: 谭 睿, 教授, 博士生导师, 主要从事中药复方质量标准 and 安全性研究、基于临床的中药成分调控干细胞命运以及协同治疗体系研究、中藏药脑血管神经保护药效物质与新药开发。E-mail: tanrui@swjtu.com

藏药榜那(藏语音译名)是常用的藏药之一,《月王药诊》《四部医典》《晶珠本草》等藏医典籍均有记载,具有驱寒止痛、祛风定惊的功效,专治跌打损伤、骨折、风湿腰痛、冻疮等症^[1-2]。《中华本草·藏药卷》《中国藏药》《羌族医药》《全国中草药汇编》等现代医药典籍均记载其入药^[3-6]。现《中华人民共和国卫生部药品质量标准·藏药卷》(1995 版)明确规定其来源为毛茛科乌头属植物伏毛铁棒锤 *Aconitum flavum* Hand. -Mazz. 和铁棒锤 *A. pendulum* Busch. 的干燥块根^[7]。《中国药典》2015 年版附录中有收载以及在二十五味珊瑚丸、十二味翼首散等藏药成方制剂处方中,以榜那为药材名入药^[8]。现代研究表明入药的乌头属植物活性成分主要是生物碱类成分,如川乌、草乌、铁棒锤、伏毛铁棒锤和地方习用品多裂乌头、缩梗乌头等,但均为毒性较大的药材,基于安全性考量限于外用。经研究榜那毒性来自于其中的双酯型生物碱,包括乌头碱、新乌头碱、次乌头碱^[9-11]。因此有必要对榜那 2 个基原物种的生物碱含量进行比较分析,并针对毒性成分双酯型生物碱建立限度测定方法,以保障临床安全(藏医口服用药)用药。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent 公司; KQ-500VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius CPA225D 电子分析天平(赛多利斯科

学仪器有限公司); EYELA 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品雪上一枝蒿庚素(批号 MUST-18052515)购于成都曼思特生物科技有限公司; 12-表-欧乌头碱(批号 PS000023)、苯甲酰新乌头碱(批号 PS161223-03)、苯甲酰乌头原碱(批号 PS010300)、乌头碱(批号 PS0150-0025)均购于成都普思生物有限公司; 新乌头碱(批号 17071310)购于成都普菲德生物技术有限公司; 3-乙酰乌头碱(S16J8C28710)购于上海源叶生物有限公司,以上对照品质量分数均大于 98%; 甲醇(色谱纯, Sigma 公司)、乙腈(色谱纯, Sigma 公司)、磷酸(色谱纯, Sigma 公司)、三乙胺(色谱纯, Sigma 公司)、水为超纯水。

1.3 药材

铁棒锤药材(S1~S25)采自四川、西藏、陕西、云南、青海、甘肃; 伏毛铁棒锤药材(S26~S30)采自青海、宁夏,均为野生品。铁棒锤和伏毛铁棒锤药材经西南交通大学宋良科副教授鉴定为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch. 和伏毛铁棒锤 *Aconitum flavum* Hand. -Mazz. 的干燥块根。各批次药材信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱分离采用 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A),

表 1 榜那药材信息
Table 1 Information of Bangna medicinal materials

编号	品种	来源	编号	品种	来源
S1	铁棒锤	四川省阿坝藏族自治州	S16	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州
S2	铁棒锤	四川省阿坝藏族自治州	S17	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州
S3	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S18	铁棒锤	陕西省宝鸡市太白县
S4	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S19	铁棒锤	西藏藏族自治区
S5	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S20	铁棒锤	云南省昆明市东川区
S6	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S21	铁棒锤	甘肃省兰州市永登县连城镇
S7	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S22	铁棒锤	甘肃省兰州市永登县河桥镇
S8	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S23	铁棒锤	青海省巴扎藏族乡大通河流域
S9	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S24	铁棒锤	青海省天峻县苏里乡哈拉湖
S10	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S25	铁棒锤	青海省天峻县苏里乡瓦斯屋煤矿
S11	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S26	伏毛铁棒锤	青海省果洛藏族自治州班玛县
S12	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S27	伏毛铁棒锤	青海省海东市乐都区松花顶
S13	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S28	伏毛铁棒锤	青海省玉树藏族自治州
S14	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S29	伏毛铁棒锤	宁夏固原市隆德县
S15	铁棒锤	四川省甘孜藏族自治州	S30	伏毛铁棒锤	宁夏固原市泾源县

0.1%磷酸水溶液（每 1 000 毫升加三乙胺 2.5 mL）（B），采用梯度洗脱，0~8 min，5%~15% A；8~18 min，15%~25% A；18~28 min，25%~27% A；28~38 min，27%~33% A；38~44 min，33%~36% A；44~46 min，36%~35% A；46~53 min，35%~38% A；53~60 min，38%~40% A；60~70 min，40%~60% A；70~74 min，60%~73% A；74~79 min，73%~90% A；79~84 min，90% A。体积流量 1 mL/min，柱温：32 ℃，进样量 10 μ L，检测波长 0~21 min，210 nm；21~84 min，235 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱对照品适量，加 0.05%盐酸-甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为 2.656、2.505、0.805、0.967、0.849、3.814、0.802 mg/mL 的单品对照品储备液，再分别精密吸取上述混合对照品溶液各 1 mL，置于 10 mL 棕色量瓶中，加 0.05%盐酸-甲醇稀释至刻度，即得混合对照品溶液，避光低温保存。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末（过三号筛）约 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加氨试液 6 mL，精密加入异丙醇-醋酸乙酯（1：1）混合溶液 80 mL，称定质量，超声处理（180 W，45 kHz，水温 25 ℃ 以下）30 min，放冷，再称定，补足，摇匀，滤过。精密取续滤液 40 mL，40 ℃ 以下减压回收溶剂至干，残渣精密加入 0.05%盐酸-甲醇混合溶液 5 mL 溶解，0.45 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

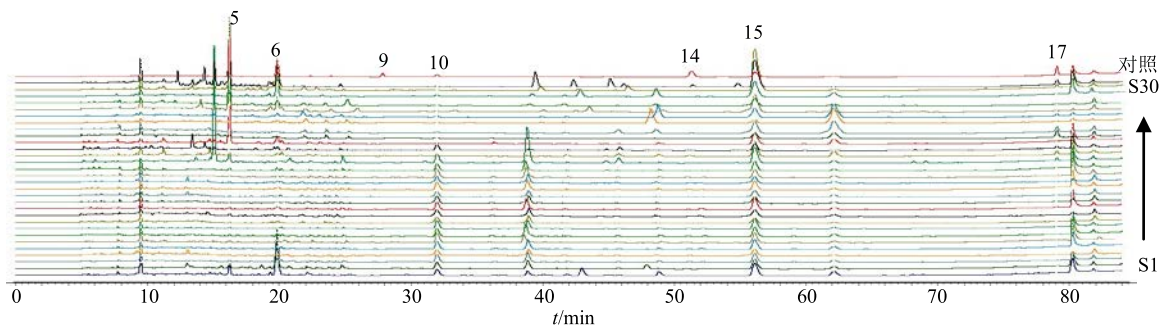
2.1.4 精密度试验 取铁棒锤药材样品（S17），按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进行色谱分析，连续进样 6 次，记录色谱图。以乌头碱色谱峰为参照峰，计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时

间和相对峰面积，结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.03%~1.81%，各共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.49%~2.42%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取铁棒锤药材样品（S17）供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析，以乌头碱色谱峰为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.06%~0.31%，各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.62%~2.61%，表明供试品溶液在 24 h 内是稳定的。

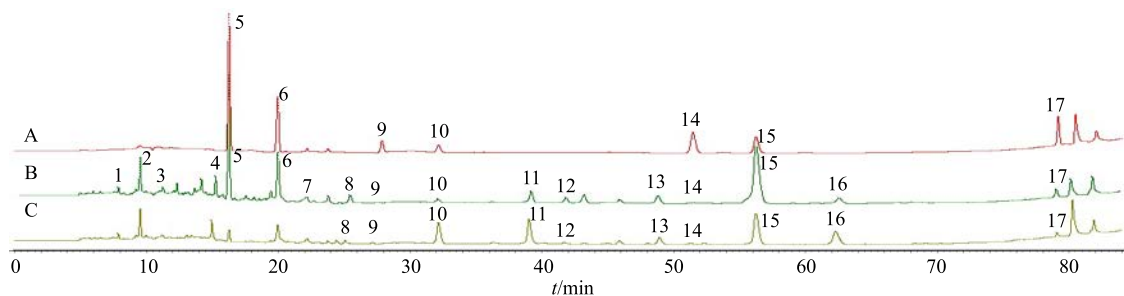
2.1.6 重复性试验 精密称取铁棒锤药材样品（S17）粉末 6 份，每份 2.0 g，按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液，进样分析，以乌头碱色谱峰为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.07%~0.35%，各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.52%~2.48%，表明所用方法重复性良好。

2.1.7 指纹图谱相似度评价 取 30 批榜那药材样品，按“2.1.3”项下制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进行进样检测。获得的色谱图，以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012A 版）软件，以中位数法对铁棒锤和伏毛铁棒锤分别进行色谱峰匹配，拟合建立铁棒锤和伏毛铁棒锤对照指纹图谱并分别进行相似度评价，见图 1、2 和表 2。结果表明均获得 17 个共有峰，所含化学成分基本一致。通过对照保留时间及样品与对照品相应峰的 DAD 紫外吸收图，指认其中 7 个生物碱成分，分别为双酯型生物碱：乌头碱、新乌头碱；单酯型生物碱：苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱；其他生物碱：12-表-欧乌头碱、雪上一



5-12-表-欧乌头碱 6-雪上一枝蒿庚素 9-苯甲酰新乌头碱 10-苯甲酰乌头原碱 14-新乌头碱 15-乌头碱 17-3-乙酰乌头碱
5-12-*epi*-napelline 6-songorine 9-benzoylmesaconitine 10-benzoylaconine 14-mesaconitine 15-aconitine 17-3-acetylaconitine

图 1 榜那药材 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of Tibetan medicine Bangna



5-12-表-欧乌头碱 6-雪上一枝蒿庚素 9-苯甲酰新乌头碱 10-苯甲酰乌头原碱 14-新乌头碱 15-乌头碱 17-3-乙酰乌头碱
5-12-*epi*-napelline 6-songorine 9-benzoylmesaconitine 10-benzoylaconine 14-mesaconitine 15-aconitine 17-3-acetylaconitine

图 2 混合对照品 (A)、伏毛铁棒锤 (B) 和铁棒锤 (C) 的对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprints of references (A), *A. pendulum* (B) and *A. flavum* (C)

表 2 铁棒锤和伏毛铁棒锤药材相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of *A. pendulum* and *A. flavum*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.910	S11	0.975	S21	0.915
S2	0.913	S12	0.926	S22	0.920
S3	0.970	S13	0.971	S23	0.924
S4	0.931	S14	0.940	S24	0.936
S5	0.964	S15	0.944	S25	0.930
S6	0.920	S16	0.939	S26	0.908
S7	0.987	S17	0.955	S27	0.911
S8	0.944	S18	0.928	S28	0.903
S9	0.941	S19	0.926	S29	0.912
S10	0.961	S20	0.919	S30	0.941

枝蒿庚素、3-乙酰乌头碱。相似度评价结果显示铁棒锤样品相似度在 0.910~0.987, 伏毛铁棒锤相似度在 0.903~0.941, 且两者对照指纹图谱相似度为 0.802, 说明铁棒锤和伏毛铁棒锤种内化学指纹图谱均一, 种间指纹图谱在存在一定差异, 故需在指纹图谱建立时予以区分。

2.2 榜那药材中 7 种生物碱成分含量测定

本实验在已建立的指纹图谱基础上, 同时测定榜那药材中 7 种成分含量, 该方法高效、准确, 可

为榜那药材的质量与安全性控制提供参考。

2.2.1 系统适应性试验 按“2.1.1”项下色谱条件进行分析, 7 个成分色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均在 5 000 以上。

2.2.2 线性关系考察 按“2.1”项下色谱条件测定 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0 μL 不同进样体积的对照品溶液, 校正曲线方程用 $Y=aX+b$ 表示, Y 为峰面积, X 为待测成分进样质量浓度, 见表 3。

2.2.3 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次, 记录 7 种生物碱成分的峰面积并计算 RSD 值。12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 0.90%、1.00%、1.82%、0.57%、0.73%、0.97%、0.84%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取铁棒锤药材样品 (S17) 供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析, 记录 7 种生物碱成分的峰面积并计算 RSD 值。12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱的峰面积 RSD 值分别为 1.88%、1.96%、2.31%、1.33%、2.44%、0.72%、0.95%, 表

表 3 对照品的线性回归方程

Table 3 Linear regression data of reference substance

成分	检测波长/nm	回归方程	r	线性范围/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	定量限/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	检测限/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
12-表-欧乌头碱	210	$Y=8.981X+104.890$	0.999 0	5.312~531.2	1.342	0.461
雪上一枝蒿庚素	210	$Y=7.869X+1.119$	0.999 9	5.010~501.0	1.065	0.350
苯甲酰新乌头碱	235	$Y=11.600X-0.666$	1.000 0	1.610~161.0	1.450	0.452
苯甲酰乌头原碱	235	$Y=11.301X+19.024$	0.999 7	1.934~193.4	1.651	0.553
新乌头碱	235	$Y=11.490X-1.958$	1.000 0	1.698~169.8	1.250	0.381
乌头碱	235	$Y=12.438X+3.789$	0.999 7	7.628~762.8	1.560	0.510
3-乙酰乌头碱	235	$Y=13.456X+2.650$	0.999 9	1.604~160.4	1.475	0.360

明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取铁棒锤药材样品 (S17) 粉末 6 份, 每份 2.0 g, 按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液, 进样分析, 计算 7 种生物碱成分的含量, 并计算测定结果的 RSD 值。12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱质量分数的 RSD 值分别为 1.61%、0.96%、1.91%、2.03%、1.46%、1.51%、1.95%, 表明该方法重复性较好。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取已测定的 S17 样品 1.0 g, 平行 6 份, 按照 100% 分别加入 7 种化合物对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 记录 7 种生物碱成分的峰面积, 计算各成分的含量和加样回

收率。12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱的平均回收率分别为 97.48%、96.15%、96.13%、97.58%、95.96%、97.51%、95.98%, RSD 分别为 2.02%、1.18%、1.06%、1.10%、1.01%、0.81%、1.05%。

2.2.7 样品测定 分别取 30 批榜那药材样品, 按照“2.1.3”项下供试品溶液制备方法和“2.1.1”项下色谱条件分析, 分别测定 30 批样品中 7 种生物碱 (表 4)。结果表明, 榜那药材中 12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、3-乙酰乌头碱、双酯型生物碱、单酯型生物碱的质量分数分别为 0.013 7~4.257 9 mg/g、0.035 1~2.362 9 mg/g、0.014 8~0.369 9 mg/g、0.286 7~3.645 9 mg/g、0.039 9~0.807 7 mg/g, 平均质量分数分别为 0.385 5、0.366 0、0.069 7、1.099 2、

表 4 30 批药材中 7 种成分的质量分数

Table 4 Content of seven compounds in 30 batches of Bangna

编号	品种	单酯型生物碱/(mg·g ⁻¹)			双酯型生物碱/(mg·g ⁻¹)			其他生物碱/(mg·g ⁻¹)		
		苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头原碱	总量	新乌头碱	乌头碱	总量	12-表-欧乌头碱	雪上一枝蒿庚素	3-乙酰乌头碱
S1	铁棒锤	0.013 3	0.402 7	0.416 0	0.036 1	0.976 8	1.012 9	0.361 1	2.277 8	0.033 2
S2	铁棒锤	0.010 8	0.437 0	0.447 8	0.035 2	0.763 2	0.798 4	0.142 5	2.362 9	0.037 5
S3	铁棒锤	0.026 7	0.534 4	0.561 1	0.073 7	0.682 1	0.755 8	0.030 5	0.205 4	0.047 8
S4	铁棒锤	0.021 2	0.585 7	0.606 9	0.061 5	0.797 2	0.858 7	0.020 6	0.064 1	0.046 7
S5	铁棒锤	0.031 1	0.545 8	0.576 9	0.050 3	0.729 5	0.779 8	0.013 7	0.106 2	0.037 6
S6	铁棒锤	0.035 7	0.695 4	0.731 1	0.054 0	0.729 5	0.783 5	0.028 9	0.133 6	0.048 7
S7	铁棒锤	0.035 0	0.772 7	0.807 7	0.056 0	0.708 0	0.764 0	0.036 4	0.191 5	0.039 1
S8	铁棒锤	0.025 7	0.582 5	0.608 2	0.058 6	0.752 8	0.811 4	0.036 5	0.075 8	0.033 1
S9	铁棒锤	0.017 6	0.513 3	0.530 9	0.053 0	0.663 0	0.716 0	0.021 0	0.096 1	0.029 9
S10	铁棒锤	0.028 8	0.504 2	0.533 0	0.044 3	0.800 9	0.845 2	0.035 0	0.084 9	0.039 4
S11	铁棒锤	0.024 3	0.545 3	0.569 6	0.035 1	0.943 9	0.979 0	0.077 4	0.148 0	0.042 7
S12	铁棒锤	0.024 0	0.585 4	0.609 4	0.054 0	0.825 9	0.879 9	—	0.055 4	0.043 3
S13	铁棒锤	0.027 6	0.459 4	0.487 0	0.048 0	0.713 2	0.761 2	—	0.063 1	0.033 3
S14	铁棒锤	0.027 0	0.564 5	0.591 5	0.061 1	0.742 3	0.803 4	0.023 2	0.063 5	0.036 9
S15	铁棒锤	0.029 8	0.557 5	0.587 3	0.065 8	0.752 3	0.818 1	0.061 4	0.130 1	0.038 5
S16	铁棒锤	0.029 8	0.633 0	0.662 8	0.061 8	0.678 8	0.740 6	0.025 6	0.113 7	0.041 3
S17	铁棒锤	0.021 7	0.501 1	0.522 8	0.054 4	0.758 7	0.813 1	0.049 5	0.168 0	0.039 8
S18	铁棒锤	0.063 4	0.638 4	0.701 8	0.028 8	1.313 3	1.342 1	0.370 3	0.035 1	0.112 4
S19	铁棒锤	0.035 9	0.117 5	0.153 4	0.077 6	1.157 5	1.235 1	0.077 4	0.271 5	0.122 7
S20	铁棒锤	0.067 6	0.373 5	0.441 1	0.094 3	0.561 1	0.655 4	0.032 2	0.170 6	0.095 3
S21	铁棒锤	—	0.039 9	0.039 9	—	0.912 9	0.912 9	0.158 5	0.049 5	0.019 0
S22	铁棒锤	—	0.056 4	0.056 4	0.045 9	0.509 2	0.555 1	0.043 6	0.185 5	0.228 6
S23	铁棒锤	—	0.082 0	0.082 0	0.026 7	1.058 4	1.085 1	0.075 4	0.135 6	0.174 7
S24	铁棒锤	—	0.086 9	0.086 9	0.020 6	0.266 1	0.286 7	0.043 2	0.199 2	0.035 7
S25	铁棒锤	—	0.084 4	0.084 4	0.036 0	0.807 7	0.843 7	0.033 0	0.200 5	0.069 0
S26	伏毛铁棒锤	—	0.131 8	0.131 8	—	2.450 8	2.450 8	4.257 9	0.838 9	0.050 0
S27	伏毛铁棒锤	—	0.082 9	0.082 9	—	1.691 8	1.691 8	0.897 3	0.407 2	0.023 4
S28	伏毛铁棒锤	—	0.084 6	0.084 6	—	1.741 4	1.741 4	0.879 1	1.337 7	0.014 8
S29	伏毛铁棒锤	—	0.120 3	0.120 3	—	3.645 9	3.645 9	1.476 8	0.534 0	0.108 1
S30	伏毛铁棒锤	0.082 4	0.120 8	0.203 2	0.179 6	2.428 6	2.608 2	1.485 1	0.275 4	0.369 9

“—” 表示低于定量限

“—” below the limit of quantitation

0.404 0 mg/g, 其中双酯型生物碱含量较高。

另除苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、3-乙酰乌头碱具有抗炎镇痛活性外, 最新研究表明 12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、也具有抗炎、镇痛等活性, 与榜那药材功效一致^[12-15]。因此, 以上 7 种生物碱成分均可作为榜那药材的药效物质基础, 控制其含量可以很好地保证药材的质量均一性。通过不同产地的榜那药材含量测定分析, 伏毛铁棒锤和铁棒锤虽然都作为同一药材榜那入药, 两者均含有新乌头碱和乌头碱 2 种双酯型生物碱, 且均以后者为主, 但在含量上两者有明显差异, 伏毛铁棒锤的乌头碱含量可高达铁棒锤中乌头碱含量的 3 倍。因此需进一步对铁棒锤和伏毛铁棒锤的安全性评价作进一步的比较分析。

2.3 基于化学计量学对不同基原榜那药材生物碱成分的比较与分析

为了更好地区分不同基原榜那药材及其质量,

分析比较二者之间化学成分含量的差异, 将 30 批榜那中 7 种成分含量数据导入 SPSS 23.0 和 SIMCA 13.0 软件进行聚类分析、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。并且根据 OPLS-DA 中变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 参数进行分析, 拥有较大的 VIP 值的变量 (至少大于 1) 对分类的贡献越大, 以 $VIP > 1.2$ 作为标准, 筛选出铁棒锤和伏毛铁棒锤两组间含量的主要差异成分。此外, 采用 Graphpad Prism 软件对主要差异成分进行 t 检验分析, $P < 0.01$ 具有统计学意义。

PCA 和 OPLS-DA 结果均显示 30 批榜那药材大致可分为 2 类, 其中包括 S1~S25 为一类, 样品来源均为铁棒锤; S26~S30 为一类, 样品来源均为伏毛铁棒锤, 且相互间样本没有出现交叉的情况。结果表明铁棒锤和伏毛铁棒锤 2 种基原品种在这 7 种化学成分含量上存在一定的差异。见图 3。

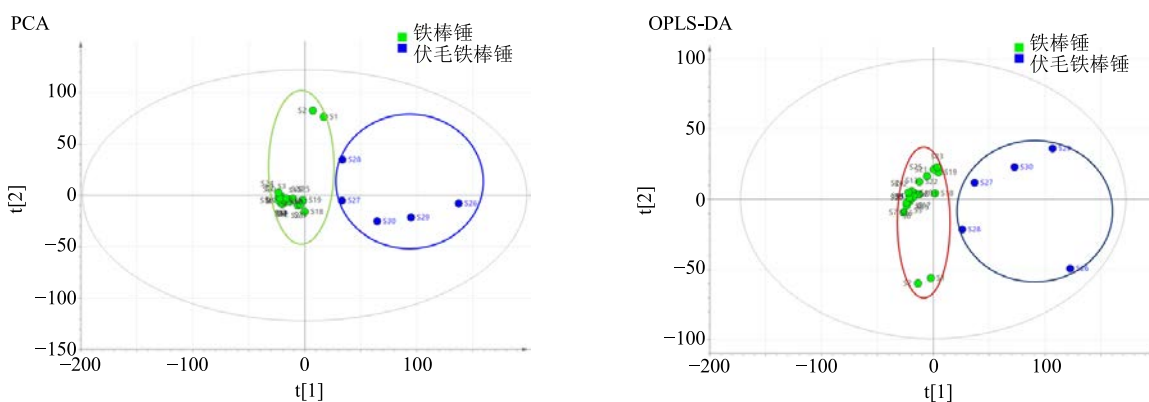


图 3 榜那药材的化学计量学分析
Fig. 3 Chemometrics analysis of Bangna

通过 OPLS-DA 中变量重要性投影 VIP 得分图 (图 4) 可见, 铁棒锤和伏毛铁棒锤 2 组间分类贡献较大的 2 个变量依次为 12-表-欧乌头碱 ($VIP = 1.8$) 和乌头碱 ($VIP = 1.75$), 说明该 2 种成分是铁棒锤和伏毛铁棒锤样品之间含量差异的主要成分。同时, 对铁棒锤和伏毛铁棒锤中这 2 种化学成分进行 t 检验分析, 结果见图 5, 表明伏毛铁棒锤在这 2 种成分含量上均显著高于铁棒锤 ($P < 0.01$), 与 OPLS-DA 中的 VIP 结果一致。另外, 对铁棒锤和伏毛铁棒锤中双酯型生物碱总量进行 t 检验分析, 结果表明, 伏毛铁棒锤中双酯型生物碱总量显著高于铁棒锤 ($P < 0.01$)。

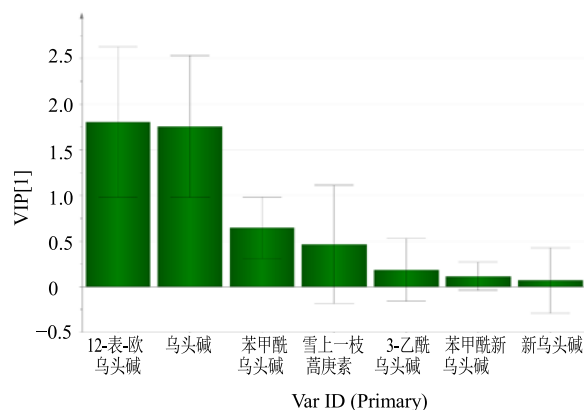


图 4 榜那药材中 7 种成分的 VIP 值
Fig. 4 Result of VIP about seven components of Bangna

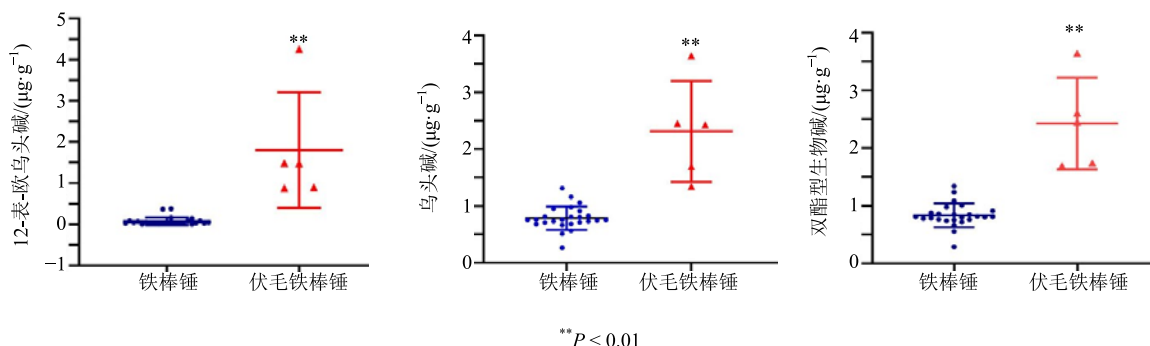


图 5 差异成分的 t 检验

Fig. 5 T test of difference components

3 讨论

正如川乌、草乌系中药中重要的乌头属有毒药材，铁棒锤和伏毛铁棒锤为藏药中重要的乌头属有毒常用药材，其中的生物碱既是其药效成分，也是其毒性成分^[16-24]。针对现有国家标准中榜那缺乏含量测定对药材质量的定量控制，也缺乏双酯型生物碱限度测定对其安全性的严格把控。结合不同的 2 个基原植物中生物碱成分，建立了 17 种成分的指纹特征图谱方法，并指认其中 7 种成分；建立了相应的双酯型生物碱限度测定方法，又根据其毒性成分乌头碱的种间含量差异较大，提出了双酯型生物碱检查限度，提高和完善现有国家榜那药材标准，以保障临床用药质量控制和安全性。

3.1 藏药榜那生物碱类成分指纹图谱及含量测定方法的建立

参照《中国药典》2015 年版对乌头属药材的制备方法，分别考察了醋酸乙酯、甲醇、异丙醇-醋酸乙酯（1：1）作为提取溶剂的提取率；考察了异丙醇-三氯甲烷（1：1）、甲醇、0.05% 盐酸-甲醇作为复溶溶剂的样品稳定性；考察了氨水用量（3、6、9 mL）、提取溶剂用量（50、80、100 mL）以及超声时间（15、30、60 min）等因素对生物碱的提取效率，最终确认加入氨水 6 mL，以异丙醇-醋酸乙酯（1：1）80 mL 作为提取溶剂，超声 30 min，0.05% 盐酸-甲醇作为复溶溶剂的提取效果最佳，样品稳定性好。本实验也对流动相、检测波长进行考察，根据 7 种成分的分离度、对称因子等确定最优的色谱条件。该色谱条件对榜那 2 个基原种铁棒锤和伏毛铁棒锤的鉴定具有一定的参考价值。

3.2 榜那 2 种基原物种的 7 种生物碱成分的比较

本研究测定了榜那药材的不同基原（铁棒锤和伏毛铁棒锤）中 7 种化学成分的含量，并结合 PCA

和 OPLS-DA 等化学计量法分析了多基原药材生物碱含量的差异，结果表明伏毛铁棒锤在 12-表-欧乌头碱和乌头碱含量上均显著高于铁棒锤（ $P < 0.01$ ）。其中乌头碱为乌头属药材中毒性较大成分，但现行《中华人民共和国卫生部药品质量标准·藏药卷》1995 年版中并未对榜那中双酯型生物碱进行限度控制，只规定其用法用量 0.6~1.2 g。本实验通过 t 检验分析比较铁棒锤和伏毛铁棒锤的双酯型生物碱的含量，差异显著（ $P < 0.01$ ），在榜那用药（藏医口服）方面存在极大隐患。

综上，2 种基原的榜那药材中化学成分基本相同，但从毒性成分含量的角度分析，伏毛铁棒锤毒性大于铁棒锤。参照《中国药典》2015 年版中“川乌”“草乌”的双酯型生物碱限定质量分数分别为 0.05%~0.17%、0.10%~0.50%，收集全国所有藏区 30 批榜那药材检测结果表明，基原植物铁棒锤的符合川乌限度范围，伏毛铁棒锤更符合草乌限度范围，考虑到藏药榜那没有同属中药川乌、草乌临床用药前需炮制的使用习惯，其临床应用存在严重安全隐患。故从安全用药角度考量，建议榜那药材中双酯型生物碱新乌头碱和乌头碱之和为 0.05%~0.17%，且以上 87% 榜那药材满足该限度范围，并建议仿照中药，经炮制后使用。另外，12-表-欧乌头碱、雪上一枝蒿庚素、3-乙酰乌头碱具抗炎、镇痛等活性，与榜那药材功效基本一致，可作为榜那药材质量评控指标成分。

参考文献

- [1] 藏医药经典文献集成编委会. 晶珠本草 [M]. 北京: 民族出版, 2005.
- [2] 宇妥元丹贡布等著. 四部医典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 青海:

- 青海人民出版社, 1991.
- [4] 青海省药品检验所, 青海省藏医药研究所. 中国藏药第一卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995.
- [5] 国家中医药管理局. 中华本草(藏药卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [6] 罗达尚. 中华藏本草 [M]. 北京: 民族出版社, 1997.
- [7] 中华人民共和国卫生部药品质量标准藏药 (第一册) [S]. 1995.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] Wang B, Dong J, Ji J, *et al.* Study on the Alkaloids in Tibetan Medicine *Aconitum pendulum* Busch by HPLC-MSn combined with column chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(5): 752-758.
- [10] 赵梅宇, 宋良科, 任瑶瑶, 等. 榜那-铁棒锤药材名称与基源考证 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(11): 6-9.
- [11] 万萌萌. 藏药榜那的鉴别与毒性成分研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2016.
- [12] Nesterova Y V, Yeva T N P, Suslov N I, *et al.* Analgesic activity of diterpene alkaloids from *Aconitum Baikalsis* [J]. *Bull Exper Biol Med*, 2014, 157(4): 448-491.
- [13] Nesterova Y V, Povetieva T N, Suslov N I, *et al.* Anti-inflammatory activity of diterpene alkaloids from *Aconitum baikalense* [J]. *Bull Exper Biol Med*, 2014, 156(5): 665-668.
- [14] Wang J, Meng X H, Chai T, *et al.* Diterpenoid alkaloids and one lignan from the roots of *Aconitum pendulum* Busch [J]. *Nat Products Bioprospect*, 2019, 9(6): 419-423.
- [15] 黄青, 董琳, 王丹, 等. 宁夏地道药材铁棒锤抗炎镇痛活性部位的筛选 [J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(11): 1043-1044.
- [16] Wang Y, Zhang J, Zeng C, *et al.* Three new C₁₉-diterpenoid alkaloids from *Aconitum pendulum* [J]. *Phytochem Lett*, 2011, 4(2): 166-169.
- [17] 刘治民. 藏药榜嘎、榜那的资源调查和药用合理性评价 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [18] 欧丽娜. 藏药榜那质量标准研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [19] 贾鑫. 伏毛铁棒锤 30%醇部位抗炎镇痛及化学成分研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2012.
- [20] 付雪艳, 康小兰, 张百通, 等. 伏毛铁棒锤活性部位化学成分及抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 747-751.
- [21] 康小兰. 伏毛铁棒锤有效部位对大鼠佐剂性关节炎治疗作用的初步研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2013.
- [22] 梁永锋, 陈作涛, 刘立红, 等. 人工种植伏毛铁棒锤的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 862-865.
- [23] 郝文婧. 铁棒锤生物碱部位化学成分研究及其抗肿瘤活性的初步筛选 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2014.
- [24] 魏鼎华, 王菲, 宋蓓, 等. 铁棒锤中二萜生物碱成分及其生物活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 48-52.