

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及 3 种成分定量分析的铁棒锤质量评价

尹可欣^{1,4}, 韩静^{1,4}, 宁淑可^{1,4}, 宁洪鑫⁴, 樊慧蓉⁴, 刘睿³, 张洪兵^{2*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301617

2. 天津理工大学, 天津 300384

3. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 301617

4. 中国医学科学院创新药物放射药代动力学重点实验室, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

摘要: **目的** 建立藏药铁棒锤 *Aconitum pendulum* 的 HPLC 指纹图谱及多成分定量分析方法, 用于评价不同批次铁棒锤的质量。**方法** 建立 15 批铁棒锤的 HPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别方法分析共有峰, 并对苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱 3 种成分进行定量测定。**结果** HPLC 指纹图谱共标定 10 个共有峰, 成功指认出 3 个特征色谱峰, 分别为苯甲酰乌头原碱 (峰 4)、乌头碱 (峰 9)、3-脱氧乌头碱 (峰 10); 15 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均在 0.9 以上, 表明不同批次样品整体化学组成较为一致。层次聚类分析 (HCA) 与主成分分析 (PCA) 均将 15 批铁棒锤分为 2 大类; 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 中, 以变量投影重要性 (VIP) 值 >1 为阈值, 获得 4 个主要差异成分, 分别为 9 号峰 (乌头碱)、1 号峰、7 号峰及 8 号峰, 其中乌头碱是区分两类药材质量的关键指标。15 批铁棒锤样品中, 苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱的质量分数分别为 0.024 2~0.057 7、0.329 8~1.257 0、0.218 0~0.377 1 mg·g⁻¹。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱及多成分定量分析方法操作简便、结果可靠, 结合化学模式识别方法, 可为藏药铁棒锤的质量评价、质量标准提升及临床合理应用提供科学的数据支撑。

关键词: 铁棒锤; 指纹图谱; 化学模式识别; 乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 3-脱氧乌头碱

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)03-0885-09

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.014

Quality evaluation of *Aconitum pendulum* based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and quantitative analysis of three components

YIN Kexin^{1,4}, HAN Jing^{1,4}, NING Shuke^{1,4}, NING Hongxin⁴, FAN Huirong⁴, LIU Rui³, ZHANG Hongbing²

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China

3. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. Key Laboratory of Radiopharmacokinetics for Innovative Drugs, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medicine Science, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To establish methods for HPLC fingerprint, and multi-component quantitative analysis of *Aconitum pendulum*, a Tibetan medicine, for quality evaluation of different batches of the herb. **Methods** HPLC fingerprints of 15 batches *A. pendulum* were established, and common peaks were analyzed combined with chemical pattern recognition. Quantitative determination was carried out for three components: benzoyleaconine, aconitine, and 3-deoxyaconitine. **Results** A total of 10 common peaks were calibrated in the HPLC fingerprint, among which three characteristic peaks were identified: benzoyleaconine (peak 4), aconitine (peak 9), and 3-deoxyaconitine (peak 10). The similarity degree between the fingerprint patterns of the 15 test samples and the control fingerprint pattern was all above 0.9, indicating that the overall chemical composition of the different batches of samples was relatively

收稿日期: 2025-12-29

基金项目: 西藏自治区科技计划项目 (XZ202401ZY0015)

作者简介: 尹可欣 (2001—), 女, 满族, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准提升。E-mail: yinkexin2023@163.com

*通信作者: 张洪兵 (1988—), 男, 副研究员, 研究方向为中药质量标志物与二次开发。E-mail: zhanghb626@163.com

consistent. Both hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) divided the 15 batches into two categories. In orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), with variable importance in projection (VIP) > 1 as the threshold, four main differential components were obtained: peak 9 (aconitine), peak 1, peak 7, and peak 8. Aconitine was the key index distinguishing the two categories. The mass fractions of benzoyleaconine, aconitine, and 3-deoxyaconitine in 15 batches were 0.024 2—0.057 7, 0.329 8—1.257 0, 0.218 0—0.377 1 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint, and multi-component quantitative methods are simple and reliable. Combined with chemical pattern recognition, they can provide scientific data support for quality evaluation, improvement of quality standards, and rational clinical application of *A. pendulum*.

Key words: *Aconitum pendulum* Busch; fingerprint; chemical pattern recognition; aconitine; benzoyleaconine; 3-deoxyaconitine

铁棒锤为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand. -Mazz. 的干燥块根^[1], 别名八百棒、草乌、雪上一支蒿等。其味辛、苦, 性温, 归肺、心经, 主要分布于西藏、甘肃南部、青海等地^[2], 具有祛风活血、散瘀止痛、解毒散结之功效^[3], 外用可治疗瘰疬、痈肿等病症^[4]。藏医药经典著作《月王药诊》中记载, 铁棒锤“治疗疮、痛风、瘰疬, 有拔毒、镇痛之奇效^[5]”;《晶珠本草》亦有描述:“榜那, 其根如铁锤, 色黑褐, 质坚。然其毒烈, 非精于炮制、明于配伍者, 不可轻用^[6]”, 明确其药用部位为块根, 块根呈倒圆锥形且有剧毒^[7-8]。现代药理研究表明, 铁棒锤中含有的多种二萜类生物碱成分^[9-12], 是其发挥镇痛^[13]、抗炎^[14-15]、抗肿瘤^[16-17]、杀虫^[18-19]等药理活性的重要物质基础。

目前,《中国药典》2025 年版尚未收录铁棒锤的鉴别方法, 其质量相关规范仅见于现行国家标准《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第一册), 该标准对铁棒锤的基源、性状、鉴别及检查项进行了明确规定。尽管已有部分研究报道了基于薄层色谱 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 的铁棒锤成分分析方法, 但有关其化学模式识别的相关研究仍较为匮乏。例如, 林丽等^[20]采用环己烷-醋酸乙酯-二乙胺 (8.0 : 1.5 : 1.0) 作为展开系统, 在 254 nm 紫外灯下对 14 批次不同产地铁棒锤进行 TLC 鉴别, 同时建立了铁棒锤的 HPLC 指纹图谱并测定了乌头碱含量; 张娇等^[21]以正己烷-丙酮-二乙胺 (2.8 : 1.0 : 0.1) 为展开剂, 采用碘化铋钾显色剂对 14 批不同产地的铁棒锤药材进行薄层色谱鉴别, 测定了苯甲酰乌头碱和 8-乙氧基乌头碱的含量, 但该研究未涉及主产地青海地区样本, 且未考察乌头碱的含量情况。值得注意的是, 中药 HPLC 指纹图谱凭借其整体性与模糊性的核心特征^[22], 能够对中药复杂的化学成分体系进行系统性、全局性评价, 有效弥补了

单一成分分析的局限性^[23]。当前, 将中药 HPLC 指纹图谱与化学模式识别方法、精准的成分定量分析相结合, 已发展成为中药质量综合评价领域的关键技术路径^[24]。

基于此, 本研究以铁棒锤为研究对象, 采用 HPLC 技术构建其化学成分专属指纹图谱; 在此基础上, 整合层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等化学模式识别方法, 开展多维度质量综合评价, 同时考察 15 批不同批次铁棒锤中 3 种乌头碱类成分的含量差异。本研究结果可为铁棒锤质量控制方法的优化、质量评价标准的完善与提升, 以及后续相关产品的研发提供科学、可靠的理论支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ARC 型高效液相色谱仪, 美国 WATERS CORPORATION 公司; PB-10 型 pH 计、SQP 型电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; Auto Vap S60 型样品全自动浓缩仪, 上海析友分析仪器有限公司; SB25-12DTD 型超声波清洗器 (600 W、40 kHz), 宁波新芝生物科技股份有限公司; 150B 摇摆式高速中药粉碎机 (1 300 W、25 000 r·min⁻¹), 瑞安市永历制药机械有限公司。

1.2 试剂

乙腈 (批号 250712)、甲醇 (批号 250711), 均为色谱纯, 天津康科德科技有限公司; 氨试液 (批号 J2319263)、醋酸 (批号 F2526136)、三乙胺 (批号 K2401251)、醋酸乙酯 (批号 C2518798), 均为色谱纯, 上海阿拉丁生化科技有限公司; 三氯甲烷 (批号 20250514)、乙醚 (批号 20250707), 均为分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; 实验室用水为超纯水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司。

对照品 3-脱氧乌头碱 (质量分数 98%、批号 D2311532), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 苯甲酰

乌头原碱（质量分数 98%，批号 JB304581），上海源叶生物科技有限公司；乌头双酯型生物碱对照提取物（质量分数新乌头碱 31.7%、次乌头碱 30.0%、乌头碱 31.8%，批号 19645-S241001）、铁棒锤对照药材（批号 121744-201701），中国食品药品检定研究院。

1.3 药材

15 批铁棒锤由安徽贺林中药饮片科技有限公司提供，经中国医学科学院放射医学研究所侯文彬研究员鉴定为铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 的干燥块根，将干燥块根粉碎，过八号筛，即得铁棒锤药材粉末。药材信息见表 1。

表 1 铁棒锤样品信息

Table 1 Sample information of *A. pendulum*

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	青海互助	YL-718-2411-001	S9	青海西宁	YL-718-2501-003
S2	青海互助	YL-718-2411-002	S10	青海西宁	YL-718-2501-004
S3	青海互助	YL-718-2412-001	S11	青海互助	YL-718-2502-001
S4	青海互助	YL-718-2412-002	S12	青海互助	YL-718-2502-002
S5	甘肃天祝	YL-718-2412-003	S13	青海西宁	YL-718-2503-001
S6	甘肃天祝	YL-718-2412-004	S14	青海西宁	YL-718-2503-002
S7	甘肃天祝	YL-718-2501-001	S15	甘肃天祝	YL-718-2503-003
S8	青海西宁	YL-718-2501-002			

2 方法与结果

2.1 铁棒锤指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 采用 Luna Omega PS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相为乙腈 (A) -0.2% 醋酸 (B, 三乙胺调 pH 至 6.20) 梯度洗脱 0~44 min, 21% → 33% A; 44~55 min, 33% → 35% A; 55~60 min, 21% A; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 检测波长 235 nm; 柱温 30 °C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品苯甲酰乌头原碱、3-脱氧乌头碱各 1.0 mg, 分别置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制得质量浓度均为 1 mg·mL⁻¹ 的对照品母液。另精密称取乌头双酯型生物碱混合提取物 3.0 mg, 按“2.1.1”项下方法制备混合对照品母液。

分别精密量取上述苯甲酰乌头原碱母液 0.04 mL、3-脱氧乌头碱母液 0.1 mL、乌头双酯型生物碱混合母液 0.5 mL, 置于同一 1.0 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。其终质量浓度分别为: 苯甲酰乌头原碱 0.04 mg·mL⁻¹、3-脱氧乌头碱 0.10 mg·mL⁻¹、乌头碱 0.50 mg·mL⁻¹、新乌头碱 0.50 mg·mL⁻¹、次乌头碱 0.45 mg·mL⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取铁棒锤药材粉末 3.0 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 10% 氨试液 6 mL 与乙醚-三氯甲烷 (3:1) 混合溶液 30 mL, 摇匀后浸泡过夜; 随后超声处理 10 min, 继续浸泡

6 h, 再次同条件超声处理 10 min, 放冷至室温。经中性快速滤纸滤过, 残渣用乙醚-三氯甲烷 (3:1) 混合溶液 30 mL 分 3 次洗涤, 合并滤液与洗涤液, 于氮气流下挥干溶剂。残余物加甲醇 5 mL, 超声处理使溶解, 临用前经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.4 精密度考察 取 S1 药材粉末, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以 9 号峰 (乌头碱) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 值分别低于 0.29%、4.01%, 表明仪器的精密度良好。

2.1.5 重复性考察 取 S1 批次药材粉末, 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。以 9 号峰 (乌头碱) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别低于 0.22%、3.95%, 表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性考察 取 S1 批次药材粉末, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.1.1”项下方法进样测定, 以 9 号峰 (乌头碱) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 值分别低于 0.29%、3.42%, 表明该样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 按照“2.1.3”项方法制备 15 批供试品溶液, 按“2.1.1”

项色谱条件进样分析, 得到 15 批次铁棒锤的色谱图 (图 1), 在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”中打开色谱图数据的 cdf 格式文件, 生成多批次叠加指纹图谱, 时间窗宽度设置为 0.1 min, 以样品 S1 为参照图谱, 用平均数法生成铁棒锤的对照指纹图谱 R。结果表明, 以 9 号峰 (乌头碱) 为对照峰, 共标定 10 个共有峰, 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液, 按照“2.1.1”项下条件进样分析, 根据紫外吸收及对照品标定出峰时间对比, 指出 3 个色谱峰 (图 2), 分别为峰 4 (苯甲酰乌头原碱)、峰 9 (乌头碱)、峰 10 (3-脱氧乌头碱)。将样品与对照指纹图谱进行

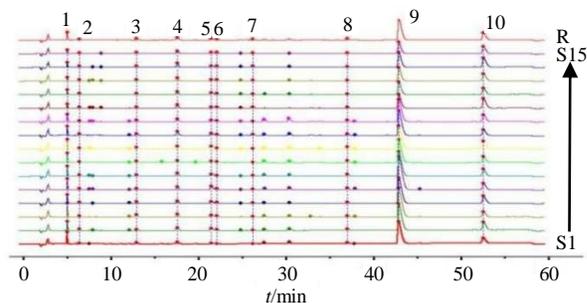


图 1 15 批铁棒锤药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint chromatograms of 15 batches of

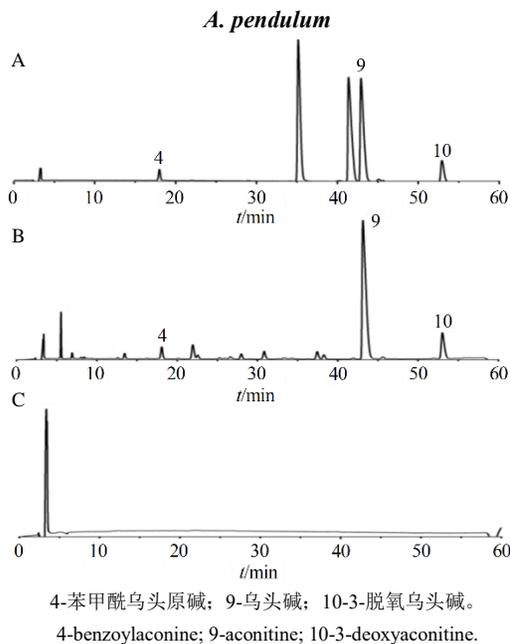


图 2 混合对照品溶液 (A)、S1 样品溶液 (B)、空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substance solution (A), S1 sample solution (B), and blank solvent (C)

相似度评价分析, 计算 15 批铁棒锤样品 (S1~S15) 与对照指纹图谱 (R) 的相似度, 结果分别为 0.997、1.000、0.990、0.999、0.989、0.999、0.998、1.000、0.995、1.000、0.925、0.983、0.970、0.956、0.959。15 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均在 0.9 以上, 表明不同批次样品整体化学组成较为一致。

2.2 化学计量学分析

2.2.1 HCA 以 15 批铁棒锤指纹图谱中 10 个共有峰的峰面积为变量, 将数据导入 Origin 2024 软件, 采用欧氏距离法结合 Z 标准化法进行 HCA。结果显示 (图 3), 当组间距离为 3.00 时, 15 批铁棒锤药材可明确聚为 2 大类: S1~S10 聚为一类, S11~S15 聚为一类。该结果提示 2 类批次的铁棒锤间存在导致质量差异的关键变量, 故进一步采用 PCA 对该差异变量进行筛选与验证。

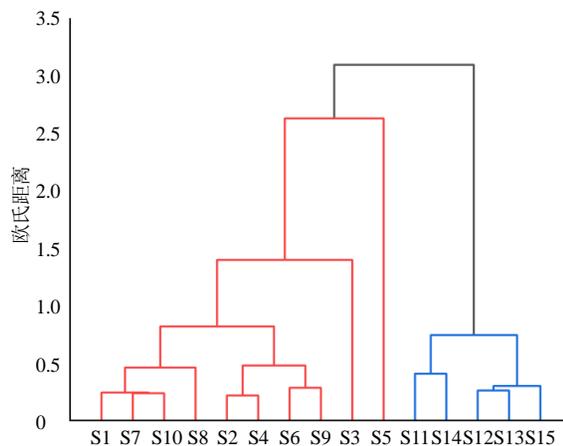


图 3 15 批铁棒锤 HCA 图

Fig. 3 HCA diagram of 15 batches of *A. pendulum*

2.2.2 PCA 以 15 批铁棒锤指纹图谱中 10 个共有峰的峰面积为变量, 将数据导入 Origin 2024 软件进行 PCA, 结果见图 4, 横纵坐标分别代表第一和第二主成分 (PC), 右、上坐标代表载荷系数, 反映共同峰与主成分之间相关性的强度和方向, 载荷绝对值越接近 1, 说明该峰对主成分的影响越大。结果显示, 15 批样品均分布于 95% 置信区间内, 其中 S1~S10、S11~S15 各自呈集中分布趋势, 提示 15 批铁棒锤的质量存在明显批次差异, 该结果与 HCA 结果基本一致。

经降维因子分析, 共提取出 3 个特征值大于 1 的主成分。其中 PC1 特征值为 4.825, 方差贡献率 48.3%, 其信息主要来源于 1、7、8、9 号峰; 9 号

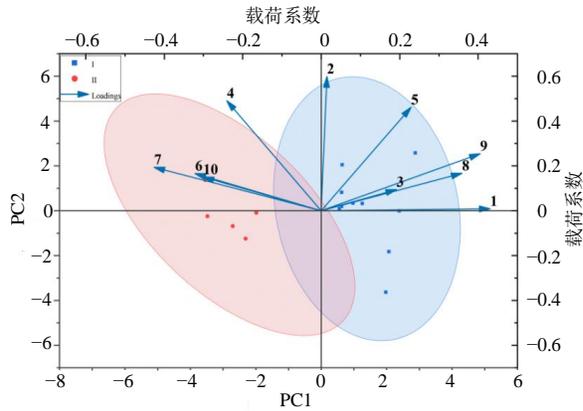


图 4 15 批铁棒锤的 PCA 双标图

Fig. 4 PCA Biplot of 15 batches of *A. pendulum*

峰为双酯型生物碱乌头碱,作为铁棒锤毒-效一体的核心成分,其含量波动可能是造成样品质量批次差异的主要原因。PC2 特征值为 2.306,方差贡献率 23.1%,信息主要来源于 2、4、5 号峰;4 号峰为苯甲酰乌头原碱,该成分毒性显著低于双酯型生物碱,且在 15 批样品中含量相对稳定,无显著批次差异,是铁棒锤炮制与质量评价中反映药效保留的重要指标。PC3 特征值为 1.449,方差贡献率 14.5%,信息主要来源于 3、6、10 号峰;10 号峰为 3-脱氧乌头碱,是铁棒锤区别于川乌、草乌等其他乌头属植物的专属成分^[9-12],该类成分构成铁棒锤的物种特征成分群,在 15 批样品中含量相对稳定,主要反映铁棒锤的基源特征。各成分因子载荷矩阵详见表 2,特征向量值越大,代表对应原始变量对主成分的信息贡献度越高。上述 3 个 PC 的累积方差贡献率达 85.9%,可反映铁棒锤化学成分的大部分信息,适用于其整体质量的综合评估。

2.2.3 OPLS-DA 为进一步筛选造成 15 批铁棒锤

表 2 铁棒锤样品主成分因子载荷矩阵

Table 2 Principal component factor loading matrix of *A. pendulum*

峰号	PC1	PC2	PC3
1	0.430 2	0.008 7	0.108 5
2	0.014 5	0.598 4	0.066 0
3	0.191 8	0.094 3	0.709 1
4	-0.240 6	0.490 2	0.092 3
5	0.228 9	0.461 1	-0.218 8
6	-0.321 5	0.166 2	0.389 9
7	-0.425 8	0.193 5	-0.023 5
8	0.358 7	0.167 2	-0.339 5
9	0.404 9	0.254 1	0.016 9
10	-0.300 6	0.150 2	-0.395 7

质量批次差异的核心特征变量,在 HCA 聚类分组与 PCA 差异趋势分析的基础上,以 10 个共有峰面积为变量开展 OPLS-DA,得分图见图 5。结果显示, S1~S10 与 S11~S15 样品实现显著的组间分离(I 和 II),且组内呈现良好的聚集性,分类结果与 HCA、PCA 分析结果高度一致,进一步验证了 15 批铁棒锤存在明显的批次质量差异。

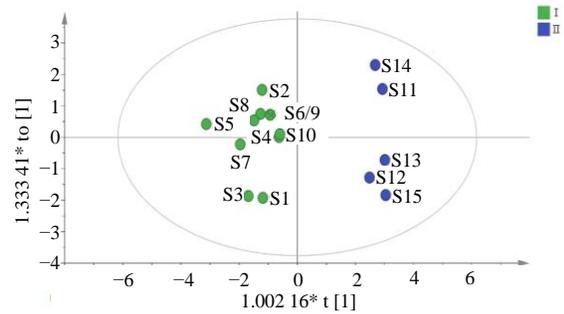


图 5 15 批铁棒锤药材的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score diagram of 15 batches of *A. pendulum*

为保障分析结果的可靠性,对 OPLS-DA 模型进行系统性验证。结果显示,模型自变量拟合指数 (R^2) = 0.638、因变量拟合指数 (R^2) = 0.921、模型预测指数 (Q^2) = 0.839,各指标均大于 0.5,表明模型对数据的拟合度与预测能力良好。进一步采用 200 次置换检验对模型进行验证,所得置换检验图见图 6,结果显示 R^2 与 Q^2 的回归线与纵轴交点均位于负半轴,表明模型未出现过拟合现象,稳定性与可靠性良好,可用于铁棒锤批次间质量差异的分析与评价。

在模型验证可靠的基础上,采用变量重要性投影值 (VIP) 对组间差异贡献变量进行筛选, VIP 值越高代表对应变量对组间区分的贡献度越大,以 $VIP > 1$ 为筛选阈值,所得 VIP 得分图见图 7。结果显示,共有 4 个色谱峰的 VIP 值大于 1,按 VIP 值

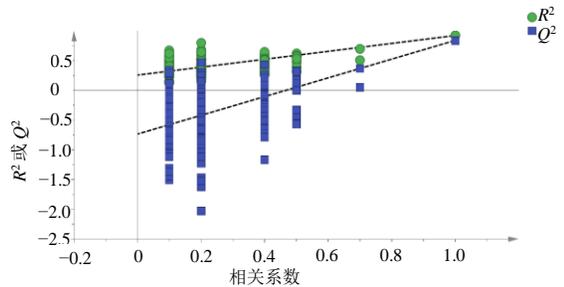


图 6 15 批铁棒锤药材的 OPLS-DA 模型置换检验

Fig. 6 Permutation test of OPLS-DA model for 15 batches of *A. pendulum*

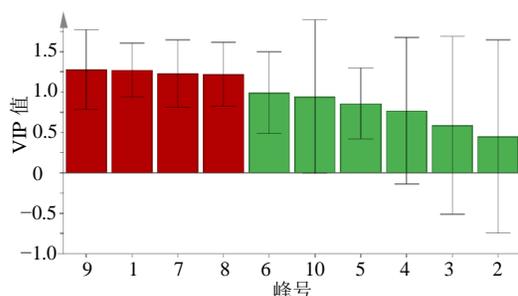


图 7 15 批铁棒锤药材中 10 个共有成分的 VIP 得分图
Fig. 7 VIP of 10 common constituents in 15 batches of *A. pendulum*

从高到低依次为峰 9、峰 1、峰 7、峰 8，该 4 个色谱峰的含量波动是造成不同批次铁棒锤质量差异的核心因素，具备作为铁棒锤质量评价的潜在价值；其中峰 9 为乌头碱，其 VIP 值最高，是导致 15 批铁棒锤批次间质量差异的关键成分。

2.3 样品含量测定

2.3.1 色谱条件 同“2.1.1”项

2.3.2 对照品溶液的制备 同“2.1.2”项

2.3.3 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项

2.3.4 线性关系考察 取“2.1.2”中的混合对照品溶液，分别制备 20、40、60、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苯甲酰乌头原碱溶液，50、100、150、200、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 3-脱氧乌头碱溶液和含乌头碱 50、200、500、800、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乌头双酯型生物碱对照提取物溶液，将一系列不同浓度的对照品溶液注入 HPLC 仪器，按“2.1.1”项下色谱方法测定对照品的色谱峰面积。以质量浓度 (X) 为横坐标，相应的峰面积 (Y) 为纵坐标，进行线性回归分析，得苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱的线性方程分别为 $Y=12\,527.37X+2\,281$, $r=0.999\,4$; $Y=11\,126.68X-114\,586.49$, $r=0.999\,9$; $Y=9\,097.18X-117\,331.50$, $r=0.999\,8$ 。

2.3.5 精密度考察 取 S1 批次药材粉末，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项色谱条件连续进样分析 6 次。结果显示，苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱峰面积的 RSD 值分别 2.78%、2.79%、3.00%，表明仪器精密度符合要求。

2.3.6 重复性考察 取 S1 批次药材粉末，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1.1”项色谱条件进样分析。结果显示，苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱质量分数的 RSD 值分别为 2.64%、1.79%、1.75%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 将按“2.1.3”项方法制备的铁棒锤药材 (S1) 供试品溶液置于室温下，分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1.1”项色谱条件进样分析。结果显示，苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 0.62%、0.75%、1.31%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率考察 取已知成分含量 S1 批次药材粉末 3 批，每批 6 份，每份约 1.5 g，按照已知样品含量的 100% 分别加入苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱对照品，按“2.1.3”项方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项色谱条件进样分析，计算各成分的加样回收率。结果表明，苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱的平均加样回收率分别为 101.31%、102.08%、103.88%，RSD 值分别为 1.37%、0.72%、1.23%，说明该方法准确度良好。

2.3.9 3 种成分测定结果 乌头碱是乌头属植物的典型双酯型二萜生物碱，为铁棒锤的毒性与药效双重核心成分；3-脱氧乌头碱为铁棒锤中特有的二萜生物碱亚型，已证实其为铁棒锤区别于其他乌头属植物的特征性成分；苯甲酰乌头原碱为乌头碱的水解代谢产物，是铁棒锤中主要的单酯型二萜生物碱，既保留一定药效，又毒性显著降低，是铁棒锤炮制与质量评价的重要指标。本研究经 OPLS-DA 筛选，确定乌头碱为造成铁棒锤批次质量差异的核心变量，因成分 1、7、8 的化学结构尚未明确鉴定，且暂无市售对照品可获得，综合考量成分的药效重要性、检测可行性及标准品可获得性等实际因素，将乌头碱列为含量测定的首选指标。苯甲酰乌头原碱 (共有峰 4) 与 3-脱氧乌头碱 (共有峰 10) 均为指纹图谱中明确标定的共有峰，且在 15 批样品中均能稳定检出，可作为表征铁棒锤整体质量的代表性成分，故本研究同步对上述 3 种生物碱成分开展含量测定。

以上述提取方法和色谱条件制备供试品溶液并进样测定，将苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱的峰面积代入相应线性回归方程，采用外标法计算 15 批铁棒锤中 3 种生物碱的含量，结果见表 3。15 批铁棒锤中苯甲酰乌头原碱质量分数为 0.024 2~0.057 7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，其中 S14 批次含量最高，S1 批次含量最低；乌头碱质量分数为 0.329 8~1.257 0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，S5 批次含量最高，S15 批次含量最低，且 S11~S15 批次乌头碱含量整体低于 S1~S10 批次，提示 S1~S10 批次铁棒锤的药效活性更强，

表 3 15 批次铁棒锤药材中 3 种成分的含量
Table 3 Contents of three constituents in 15 batches of *A. pendulum*

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	苯甲酰乌头原碱	乌头碱	3-脱氧乌头碱
S1	0.024 2	0.692 1	0.211 0
S2	0.041 6	0.856 4	0.315 0
S3	0.037 4	0.968 1	0.202 8
S4	0.038 1	0.850 5	0.277 8
S5	0.045 0	1.257 0	0.251 0
S6	0.048 0	0.790 1	0.259 2
S7	0.028 5	0.729 7	0.229 8
S8	0.035 6	0.735 9	0.301 3
S9	0.056 0	0.823 8	0.218 0
S10	0.037 7	0.692 7	0.250 5
S11	0.046 0	0.377 0	0.377 1
S12	0.045 3	0.357 9	0.229 1
S13	0.045 1	0.370 9	0.277 5
S14	0.057 7	0.429 3	0.358 1
S15	0.037 4	0.329 8	0.269 7

但伴随更高的毒性风险, 临床应用中需严格控制其炮制工艺与用药剂量; 而 S11~S15 批次的毒性风险更低, 但其核心药效成分乌头碱含量不足, 可能导致镇痛、抗炎等药理作用减弱。3-脱氧乌头碱质量分数为 0.218 0~0.377 1 mg·g⁻¹, S11 批次含量最高, S3 批次含量最低。值得注意的是, S11~S15 批次中苯甲酰乌头原碱与 3-脱氧乌头碱的含量略高于 S1~S10 批次, 推测该批次样品中发生了双酯型生物碱向单酯型生物碱的水解转化, 这也是造成其乌头碱含量降低的重要原因之一。

3 讨论

本研究依次考察了 3 种流动相体系对 HPLC 色谱分离效果的影响, 分别为①甲醇-水、②乙腈-水、③乙腈-0.2%醋酸水 (三乙胺调 pH 至 6.20)。结果显示, 采用流动相③时, 各目标色谱峰分离度均大于 1.5, 以乌头碱峰计理论塔板数均大于 5 000, 且基线噪声低于 0.005 AU, 色谱分离效果最优, 故确定其为最佳流动相。同时考察了甲醇、醋酸乙酯、乙醚-三氯甲烷 (3:1) 3 种提取溶剂对检测结果的影响, 结果表明, 以乙醚-三氯甲烷 (3:1) 为提取溶剂时, 所得色谱峰数量最多、响应信号最强, 提取效果最佳, 故将其作为最佳提取溶剂。

铁棒锤为我国民间常用藏药, 在活血化瘀、止痛消肿等方面具有独特的临床应用价值, 但其质量

控制与产业发展因质量标准体系不完善而面临诸多瓶颈。本研究建立了 15 批铁棒锤的 HPLC 指纹图谱, 成功标定 10 个共有峰, 并指出苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱 3 个特征成分; 含量测定结果显示, S11~S15 批次的乌头碱含量显著低于其余批次, 与前期分析结果相吻合, 提示该批次样品与其他批次间存在明显质量差异, 该差异可能与药材的采收时间、储藏条件及生产环境等因素相关。本研究构建了铁棒锤的 HPLC 指纹图谱, 同时完成了苯甲酰乌头原碱、乌头碱、3-脱氧乌头碱 3 种生物碱的含量测定, 研究结果可为铁棒锤的整体质量评估及相关产品的品质评价提供科学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-1 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 138-140. Editorial Board of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine. *Chinese Materia Medica-1* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999: 138-140.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 725. Editorial Group of Compendium of traditional Chinese medicine in China. *Compendium of Chinese Herbal Medicines in China* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1957: 725.
- [3] 赵国平. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2615-2616. Zhao G P. *Dictionary of Chinese Materia Medica* [M]. 2nd Ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2006: 2615-2616.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第二十七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 319. Editorial Committee of Flora of China. Chinese Academy of Sciences. *Flora of China: Vol. 27* [M]. Beijing: Science Press, 1979: 319.
- [5] 毛继祖. 月王药诊 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 56. Mao J Z. *Yue Wang Yao Zhen (King Moon's Treasury of Medicinal Herbs)* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2012: 56.
- [6] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 106. Dharma D. *Jing Zhu Ben Cao (Crystal Pearl Materia Medica)* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical

- Publishers, 1986: 106.
- [7] 梁彩霞, 陈彦宇, 兰伟, 等. 铁棒锤毒性研究及防中毒的研究进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2014, 36(2): 83-85.
Liang C X, Chen Y Y, Lan W, et al. Research progress on toxicity and anti-poisoning effect of *Aconitum pendulum* [J]. Sichuan J Physiol Sci, 2014, 36(2): 83-85.
- [8] 刘贤烽, 江虹, 陶红林, 等. 藏药铁棒锤-诃子药对配伍的减毒存效作用研究 [J]. 中药与临床, 2022, 13(3): 69-72.
Liu X F, Jiang H, Tao H L, et al. Study on toxicity reduction and effect preservation of the compatibility of Tibetan medicine *Aconitum pendulum* and *Terminalia chebula* [J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2022, 13(3): 69-72.
- [9] 张琴, 徐斌, 贾琦, 等. C18 型二萜生物碱化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1109-1114.
Zhang Q, Xu B, Jia Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of C18 diterpenoid alkaloids [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(5): 1109-1114.
- [10] 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.
Wei D H, Wang F, Song B, et al. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum pendulum* and their bioactivities [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2015, 21(19): 48-52.
- [11] 王毓杰, 张静, 曾陈娟, 等. 铁棒锤砂炒炮制品中二萜生物碱化学成分的研究 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(1): 11-13.
Wang Y J, Zhang J, Zeng C J, et al. Study on the diterpene alkaloids from processed roots of *Aconitum pendulum* [J]. West China J Pharm Sci, 2011, 26(1): 11-13.
- [12] 陈晓峥, 程菊, 石小艺, 等. 乌头属二萜生物碱的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3765-3773.
Chen X Z, Cheng J, Shi X Y, et al. Progress in antitumor activity of diterpenoid alkaloids in plants of *Aconitum* [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(14): 3765-3773.
- [13] 李雨竹. 二萜生物碱的制备及镇痛活性研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2023.
Li Y Z. Preparation and analgesic activity of diterpenoid alkaloids [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2023.
- [14] 孙英浩, 臧双耀, 于文慧, 等. 乌头属二萜生物碱的药理学与毒理学作用及挑战 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22(6): 601-607.
Sun Y H, Zang S Y, Yu W H, et al. Effects and challenges of pharmacology and toxicology of *Aconitum* diterpenoid alkaloids [J]. Chin J Pharmacovigil, 2025, 22(6): 601-607.
- [15] 李梦佳, 李聪颖, 沙梦香, 等. 基于毒效评价和代谢组学的铁棒锤抗类风湿关节炎的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(7): 1774-1784.
Li M J, Li C Y, Sha M X, et al. Study on mechanism of *Aconitum pendulum* in treating rheumatoid arthritis based on toxicity efficacy evaluation and metabonomics [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(7): 1774-1784.
- [16] 孙建瑞, 邱智军, 王大红, 等. 铁棒锤中 3-乙酰乌头碱和宋果灵抗肿瘤活性 [J]. 精细化工, 2018, 35(7): 1163-1169.
Sun J R, Qiu Z J, Wang D H, et al. Anti-tumor activity of 3-acetylaconitine and songorine from *Aconitum szechenyianum* gay [J]. Fine Chem, 2018, 35(7): 1163-1169.
- [17] 石艺璇, 李志浩, 孔令旗, 等. 生物碱类化合物抗肝癌活性及其机制研究进展 [J]. 湖北医药学院学报, 2024, 43(4): 457-462.
Shi Y X, Li Z H, Kong L Q, et al. Research progress on anti-liver cancer activity and mechanism of alkaloid compounds [J]. J Hubei Univ Med, 2024, 43(4): 457-462.
- [18] 多杰措, 李彩霞, 许显莉, 等. 伏毛铁棒锤资源可持续利用、化学成分及药理作用研究进展与展望 [J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(9): 67-74.
Duo J C, Li C X, Xu X L, et al. Research progress and prospects of sustainable utilization, chemical composition and pharmacological effects of the resource of *Aconitum flavum* hand.-mazz [J]. Chin Wild Plant Resour, 2022, 41(9): 67-74.
- [19] 何少军. 铁棒锤化学成分及其杀虫活性研究 [D]. 兰州: 兰州交通大学, 2024.
He S J. Chemical constituents and insecticidal activity of *Aconitum pendulum* Busch [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiaotong University, 2024.
- [20] 林丽, 高素芳, 陈红刚, 等. 基于药材表征和色谱技术对铁棒锤药材质量标准提升的相关研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(11): 1804-1810.
Lin L, Gao S F, Chen H G, et al. Study on quality standard improvement of *Aconitum pendulum* based on medicinal materials characterization and chromatographic technique [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(11): 1804-1810.
- [21] 张娇, 王菲, 白玮, 等. 铁棒锤质量标准研究 [J]. 中成药, 2018, 40(9): 2100-2103.
Zhang J, Wang F, Bai W, et al. Study on quality standard of *Aconitum pendulum* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(9): 2100-2103.
- [22] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与

- 应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655.
- Xie P S. Concept, attribute, technology and application of chromatographic fingerprint identification of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2001, 26(10): 653-655.
- [23] 熊贤招, 祝瑶露, 汪新婵, 等. 中药质量分析方法研究进展 [J]. 中国医药科学, 2025, 15(1): 35-38.
- Xiong X Z, Zhu Y L, Wang X L, et al. Research progress in quality analysis methods for traditional Chinese medicine [J]. *China Med Pharm*, 2025, 15(1): 35-38.
- [24] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- Zhao J, Xie S J, Zhao X H, et al. Research progress on quality control methods of fingerprint of traditional Chinese medicine [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2020, 41(1): 82-86.

[责任编辑 孙英杰]