

四川道地产区江油附子和川乌中4种核苷类成分含量测定及多元统计分析

杨正明¹, 刘哲², 邓秋林¹, 陈雨¹, 张亚琴¹, 刘圆^{2*}, 王少军³, 章卉³, 陈兴福^{1*}

1. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130

2. 西南民族大学民族医药研究院药学院, 四川 成都 610041

3. 江西汉和生物科技有限公司, 江西 南昌 338000

摘要: 目的 建立 UPLC 法同时测定附子和川乌中尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷 4 种核苷类成分含量的方法, 并采用多元统计分析方法比较附子和川乌中的核苷类成分的含量差异。方法 水超声提取附子和川乌中的核苷类成分, 采用 BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 乙腈-水梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 ℃; 进样体积 4 μL; 检测波长 260 nm。采用差异显著性分析、聚类热图分析、主成分分析和 TOPSIS 分析进行数据处理, 综合评价附子和川乌的质量。结果 方法学考察结果符合规定, 尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷线性关系良好 ($r^2 > 0.999$), 平均加样回收率分别为 99.86%、99.14%、99.74% 和 98.71%, RSD 均小于 2.0%。以 4 种核苷类成分作为评价指标, 18 号附子样品质量最优, 23 号川乌样品质量最优。结论 建立的方法操作简单、准确可靠, 具有良好的精密度、稳定性、重复性, 可用于附子和川乌中核苷类化合物的定量测定, 为附子和川乌水溶性成分的研究提供依据。

关键词: 附子; 川乌; 尿嘧啶; 腺苷; 鸟嘌呤核苷; 尿嘧啶核苷; 超高效液相色谱法; 多元统计分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5657-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.027

Determination and multivariate statistical analysis of four nucleosides in *Aconiti Lateralis Radix praeparata* and *Aconiti Radix* in Jiangyou of Sichuan ProvinceYANG Zheng-ming¹, LIU Zhe², DENG Qiu-lin¹, CHEN Yu¹, ZHANG Ya-qin¹, LIU Yuan², WANG Shao-jun³, ZHANG Hui³, CHEN Xing-fu¹

1. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. Ethnic Medicine Institute, College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

3. Jiangxi Hanhe Biotechnology Co. Ltd., Nanchang 338000, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for the simultaneous determination of uracil, adenosine, guanosine, and uridine in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP) and *Aconiti Radix* (AR), and to compare the content difference of four nucleosides in the samples based on multivariate statistical analysis. **Methods** Nucleosides in ALRP and AR were extracted with purified water by ultrasonic extraction. The UPLC method was performed on a BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) through a gradient elution of acetonitrile and water at a flow rate of 0.2 mL/min with column temperature at 30 ℃. The injection volume was set at 4.0 μL, and the detection wavelength was set at 260 nm. Difference significance analysis, hierarchical cluster heatmap analysis, principal component analysis, and TOPSIS analysis were used for data processing to comprehensively evaluate the quality of ALRP and AR. **Results** The method was in accordance with the regulations, the quantitative evaluation of uracil, adenosine, guanosine, and uridine was in good linear range ($r^2 > 0.999$), and the average recovery was 99.86%, 99.14%, 99.74%, and 98.71% respectively, and the RSDs were all less than 2.0%. Taking the four nucleosides as indexes, the samples No. 18 of ALRP and the samples No. 23 of AR were the best in quality. **Conclusion** The established method is simple, accurate, and reliable with good precision, repeatability, and stability, which can be used for the simultaneous determination of four nucleosides in ALRP and AR, and it might provide the scientific basis for the study of water-soluble constituents in ALRP and AR.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Aconiti Radix*; uracil; adenosine; guanosine; uridine; high performance liquid chromatography; multivariate statistical analysis

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家中药标准化项目“川乌等2种中药材饮片标准化建设”(ZYBZH-Y-JX-28)

作者简介: 杨正明, 男, 博士研究生, 主要从事川产道地药材生理生态与栽培研究。E-mail: yzmsau@163.com

*通信作者: 刘圆, 教授, 博士生导师, 从事少数民族药物研究和教学。Tel: (028)85528812 E-mail: 499769896@qq.com

陈兴福, 教授, 博士生导师, 研究方向为川产道地及特色药材生理生态与栽培。Tel: (028)65368946 E-mail: chenxf64@sohu.com

乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx 是毛茛科乌头属植物, 又名五毒根, 是我国乌头属中分布最广的种, 药用历史悠久, 在《神农本草经》中被列为下品^[1]。乌头药材分川乌 (乌头母根 *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, ALRP) 和附子 (乌头子根 *Aconiti Radix*, AR), 二者在加工方法、性状、功效等也有区别, 虽然《中国药典》2015 年版已明确了药用部位, 但附子和川乌的混用还是较多^[2-3]。四川江油为乌头药材的道地产区, 有着悠久的种植历史, 其年产量占了全国乌头药材很大的比重。核苷是生物细胞维持生命活动的基本组成元素, 是一类具有广泛生理活性的水溶性成分, 对人体代谢、免疫以及肝脏、心血管及神经系统等都有调节作用, 具有抗肿瘤、抗抑郁、抗病毒、免疫调节、改善心脑血管血液循环、抗心肌缺血等多种生物活性^[4-8]。目前, 核苷类成分的同时测定已广泛运用于药材的真伪鉴别和品质评价^[9]。耿昭^[10]从附子水提液中分离纯化得到腺苷、次黄嘌呤、尿嘧啶和尿嘧啶核苷 4 种核苷类成分, 并建立了腺苷的 HPLC 测定方法。本实验拟采用 UPLC 法同时测定江油附子和川乌中 4

种核苷类成分, 以期为附子和川乌水溶性成分的进一步研究及其质量控制提供更有效的方法。

1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC[®] H-Class 超高效液相色谱仪, 包括四元泵溶剂系统、自动进样器、PDA 检测器和 Empower 3 色谱工作站 (美国 Waters 公司); Sartorius BT 25 S 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司], TGL-16G 台式高速冷冻离心机 (四川蜀科仪器有限公司)。尿嘧啶 (批号 N-024-150730) 和腺苷 (批号 X-022-151027), 成都瑞芬斯生物科技有限公司; 鸟嘌呤核苷 (批号 PS1215-0100) 和尿嘧啶核苷 (批号 PS1216-0100), 成都普斯生物科技股份有限公司, 质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯, 水为屈臣氏饮用水。乌头药材于 2017 年 6 月 24~25 日自采于江油市彰明镇和太平镇, 采用 5 点法取样, 每点取 3 株, 共 15 株, 经四川农业大学陈兴福教授鉴定, 样品信息见表 1。除去泥沙, 流水冲洗, 分母根 (川乌) 和子根 (附子), 105 °C 杀青 15 min, 晒干, 粉碎, 过 3 号筛, 备用。

表 1 附子和川乌样品来源

Table 1 Samples of ALRP and AR

编号	样品来源	海拔/m	经度 (E) / 纬度 (N)	采集时间
1	江油市彰明镇长庚村 5 组	501	104°42.417'/31°42.413'	2017 年 6 月 24 日
2	江油市彰明镇长庚村 5 组	501	104°42.375'/31°42.529'	2017 年 6 月 24 日
3	江油市彰明镇长庚村 3 组	503	104°42.601'/31°42.505'	2017 年 6 月 24 日
4	江油市彰明镇长庚村 3 组	500	104°42.696'/31°42.487'	2017 年 6 月 24 日
5	江油市彰明镇长庚村 5 组	501	104°42.321'/31°42.399'	2017 年 6 月 24 日
6	江油市彰明镇长庚村 5 组	507	104°42.274'/31°42.432'	2017 年 6 月 24 日
7	江油市彰明镇长庚村 5 组	511	104°42.339'/31°42.668'	2017 年 6 月 24 日
8	江油市彰明镇长庚村 5 组	503	104°42.379'/31°42.718'	2017 年 6 月 24 日
9	江油市太平镇桥楼村 4 组	501	104°41.540'/31°42.350'	2017 年 6 月 25 日
10	江油市太平镇桥楼村 6 组	501	104°42.009'/31°42.828'	2017 年 6 月 25 日
11	江油市太平镇桥楼村 5 组	503	104°41.745'/31°42.605'	2017 年 6 月 25 日
12	江油市太平镇桥楼村 2 组	501	104°41.893'/31°42.487'	2017 年 6 月 25 日
13	江油市太平镇桥楼村 2 组	501	104°41.773'/31°42.446'	2017 年 6 月 25 日
14	江油市太平镇普照村 3 组	507	104°41.242'/31°43.241'	2017 年 6 月 25 日
15	江油市太平镇普照村 1 组	511	104°41.246'/31°43.599'	2017 年 6 月 25 日
16	江油市太平镇河江村 10 组	503	104°41.820'/31°43.791'	2017 年 6 月 25 日
17	江油市太平镇双胜村 6 组	503	104°41.596'/31°43.819'	2017 年 6 月 25 日
18	江油市太平镇普照村 2 组	503	104°41.301'/31°43.837'	2017 年 6 月 25 日
19	江油市太平镇普照村 4 组	503	104°41.407'/31°43.850'	2017 年 6 月 25 日
20	江油市太平镇龙门村 10 组	503	104°41.358'/31°44.947'	2017 年 6 月 25 日
21	江油市太平镇竹林村 2 组	503	104°41.775'/31°45.031'	2017 年 6 月 25 日
22	江油市太平镇竹林村 3 组	503	104°41.526'/31°44.814'	2017 年 6 月 25 日
23	江油市太平镇竹林村 1 组	503	104°41.755'/31°45.232'	2017 年 6 月 25 日
24	江油市太平镇竹林村 4 组	503	104°42.004'/31°44.793'	2017 年 6 月 25 日
25	江油市太平镇竹林村 6 组	503	104°42.003'/31°45.105'	2017 年 6 月 25 日
26	江油市太平镇竹林村 5 组	503	104°42.136'/31°44.908'	2017 年 6 月 25 日

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B);

梯度洗脱: 0~3 min, 1%~5% A, 3~7 min, 5%~10% A, 7~8 min, 10%~15% A; 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 °C; 进样体积 4 μL; 检测波长 260 nm。色谱图见图 1。

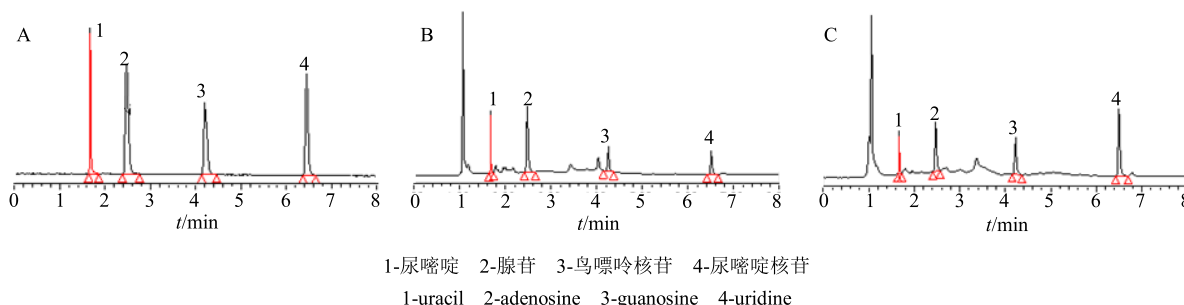


图 1 混合对照品溶液 (A) 和附子 (B)、川乌 (C) 供试品溶液的色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of four mixed reference substances (A), ALRP (B), and AR (C)

2.2 对照品溶液制备

取适量尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷, 精密称定, 加水定容至 10 mL, 得质量浓度分别为 0.212、0.241、0.201 和 0.202 mg/mL 的对照品储备液, 于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

2.3 供试品溶液制备

取 0.1 g 样品, 精密称定, 加入 6 mL 水, 55 °C 超声 10 min, 离心 20 min (8 000 r/min), 取上清液

以 0.22 μm 微孔滤头滤过, 续滤液即得。

2.4 线性关系考察

准确吸取对照品储备液适量配制成 6 个质量浓度系列混合对照品溶液, 按照“2.1”项色谱条件进行测定。以对照品质量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程、相关系数和线性范围。逐级稀释混合对照品母液, 按信噪比(S/N)=10 计算定量限, 按 S/N=3 计算检出限。结果见表 2。

表 2 线性关系、检测限和定量限结果

Table 2 linearity, LOD, and LOQ of UPLC analysis

成分	回归方程	相关系数	线性范围/ng	检测限/ng	定量限/ng
尿嘧啶	$Y=2 \times 10^7 X+800.91$	1.000 0	0.424~21.20	0.085 3	0.284 2
腺苷	$Y=2 \times 10^7 X-840.45$	0.999 5	1.205~48.20	0.191 0	0.636 6
鸟嘌呤核苷	$Y=1 \times 10^7 X-2\ 164.7$	0.999 3	2.020~50.50	0.265 4	0.884 5
尿嘧啶核苷	$Y=1 \times 10^7 X-1\ 588.7$	0.999 6	2.010~50.25	0.246 8	0.822 6

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算各成分峰面积的相对标准偏差(RSD)值。结果尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷峰面积的 RSD 值分别是 0.30%、0.37%、0.42%和 0.44%。

2.5.2 稳定性试验 取同一附子供试品溶液(1号), 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 计算各成分峰面积的 RSD 值。结果尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷峰面积的 RSD 值分别是 1.26%、1.06%、0.66%和 0.87%。

2.5.3 重复性试验 取 1 号样品粉末 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备样品, “2.1”项下色谱条件进样测定, 计算各成分峰面积的 RSD 值。结

果尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷质量分数的 RSD 值分别是 1.67%、1.57%、0.88%和 1.31%。

2.5.4 加样回收率试验 取 0.1 g 已测定的附子粉末 6 份, 精密称定, 分别依次加入适量“2.2”项下的对照品溶液, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备样品, “2.1”项下色谱条件进样测定, 得各成分含量, 计算加样回收率和 RSD 值, 结果尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷的平均加样回收率为 99.86%、99.14%、99.74%和 98.71, RSD 分别为 1.62%、1.14%、1.11%和 1.59%。

2.6 样品测定

取附子和川乌样品粉末, 按“2.3”项下制备方法制备样品, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 外标法计算含量。

3 结果与分析

3.1 附子与川乌核苷类成分含量

附子和川乌核苷类成分含量测定结果见表 3。附子中尿嘧啶含量为 8.25~183.36 $\mu\text{g/g}$ ，腺苷含量为 90.53~390.45 $\mu\text{g/g}$ ，鸟嘌呤核苷含量为 97.63~338.15 $\mu\text{g/g}$ ，尿嘧啶核苷含量为 99.91~508.05

$\mu\text{g/g}$ ；川乌中尿嘧啶含量为 30.91~73.35 $\mu\text{g/g}$ ，腺苷含量为 157.91~468.08 $\mu\text{g/g}$ ，鸟嘌呤核苷含量为 316.87~587.92 $\mu\text{g/g}$ ，尿嘧啶核苷含量为 465.45~1 109.17 $\mu\text{g/g}$ ；附子中 4 种核苷类成分的 RSD 值高于川乌中 4 种核苷类成分的 RSD 值，表明种植的地块对附子中 4 种核苷成分含量影响较大。

表 3 附子和川乌核苷类成分含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Determination results of nucleosides in ALRP and AR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	附子中各成分质量分数($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)				川乌中各成分质量分数($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	尿嘧啶 (X_{F1})	腺苷 (X_{F2})	鸟嘌呤核苷 (X_{F3})	尿嘧啶核苷 (X_{F4})	尿嘧啶 (X_{C1})	腺苷 (X_{C2})	鸟嘌呤核苷 (X_{C3})	尿嘧啶核苷 (X_{C4})
1	112.64±1.06	390.45±2.53	246.20± 2.08	281.62± 4.58	73.35±0.54	216.42± 0.17	450.09± 0.49	530.78± 0.93
2	137.36±1.21	318.94±1.99	142.82± 2.05	324.27±19.21	31.74±0.40	196.07± 1.47	428.68± 1.92	465.45± 1.02
3	32.09±0.67	289.05±3.30	230.98± 5.66	190.69± 1.48	38.83±0.13	244.93± 2.49	490.33± 3.41	607.92± 2.68
4	140.11±1.58	316.54±3.19	141.78± 0.95	401.84± 9.27	45.36±0.19	257.29± 0.62	551.08± 3.83	580.71± 4.36
5	43.96±1.65	201.73±4.06	269.86± 3.26	270.06± 4.20	41.61±0.27	257.29± 0.50	450.32± 4.75	609.38± 6.76
6	8.25±0.31	90.53±0.86	97.63± 2.48	99.91± 1.46	30.91±0.57	276.35± 0.76	550.87± 2.00	643.63± 4.36
7	13.23±0.72	97.34±2.71	135.14± 0.28	183.64± 1.75	57.05±0.43	339.65± 9.03	476.27± 2.85	751.56± 4.78
8	18.66±1.37	93.01±3.38	118.96± 3.86	101.38± 1.77	43.21±0.73	263.11± 0.57	488.53± 4.54	568.62± 3.86
9	12.35±0.77	113.60±1.39	174.53± 3.72	196.89± 6.01	66.70±1.40	234.49± 1.28	380.94± 0.73	681.19± 1.27
10	28.51±0.10	239.83±0.80	338.15± 2.89	415.80± 6.04	40.51±0.37	176.11± 1.36	356.94± 2.57	543.83± 2.03
11	39.14±0.32	209.41±1.34	272.54± 2.85	335.77± 4.15	35.44±0.68	351.73± 6.27	363.14± 2.59	839.15± 4.98
12	89.40±0.44	224.95±5.10	166.10± 1.72	398.33± 5.98	54.17±1.00	233.00± 3.74	316.87± 1.26	626.15± 6.88
13	73.43±0.77	328.40±6.62	178.55± 2.74	491.97± 8.88	62.50±0.86	226.83± 3.65	402.31± 1.58	747.60± 5.54
14	75.43±1.36	234.15±1.30	146.26± 1.07	441.04±14.67	35.17±0.54	191.23± 1.91	432.51± 3.40	560.55± 4.51
15	182.66±7.32	295.31±5.05	130.97± 2.48	376.34± 4.48	54.06±0.40	199.10± 4.53	452.35± 3.23	567.49±11.81
16	95.20±0.98	329.62±0.98	165.15± 0.78	477.31± 6.91	58.26±0.48	223.75± 2.37	450.00± 9.40	858.15± 7.29
17	47.34±0.57	233.88±2.41	228.95± 1.10	508.05± 3.42	41.11±0.57	217.95± 2.24	456.67±12.34	591.45± 3.33
18	183.36±2.49	308.01±1.18	154.69± 1.86	428.28±42.45	45.62±0.65	282.59±10.26	503.89± 2.98	748.99± 1.57
19	122.45±0.16	346.65±1.97	151.17± 1.51	453.94± 4.75	41.19±0.60	259.05± 6.86	587.92± 6.36	554.00± 3.45
20	17.92±0.93	225.44±1.80	275.88± 3.37	391.23± 2.44	69.04±0.23	288.27± 5.00	564.77± 5.19	685.90± 0.89
21	55.57±0.28	222.60±1.60	217.30± 4.26	505.48± 2.67	40.99±0.79	277.36± 4.66	529.08± 1.50	682.44± 3.03
22	35.49±0.42	211.09±2.19	291.40± 2.49	356.59± 1.26	36.04±0.35	243.25± 2.36	456.06±10.00	605.35± 4.20
23	44.49±0.56	209.38±0.94	323.97± 2.62	358.22± 0.87	42.20±0.56	468.08± 3.80	582.91± 6.09	1 109.17± 1.77
24	93.31±1.14	165.21±2.74	116.82± 2.86	265.61± 2.69	47.75±0.58	257.31± 3.63	516.85± 8.13	619.20± 8.68
25	28.08±0.53	203.72±6.24	308.99±13.01	339.01± 4.54	41.55±0.38	157.91± 8.34	511.91± 4.14	608.96± 6.30
26	31.06±0.35	196.95±0.27	287.97± 2.20	361.38± 1.37	34.03±1.01	232.14± 4.24	515.70± 5.28	528.42±10.12
RSD	76.62	34.68	35.62	33.96	25.45	24.69	15.00	20.50

3.2 差异显著性分析

对 26 个不同地块种植的附子和川乌 2 种药材中尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷 4 个核苷及其总和进行差异性比较分析，结果如图 2 所示。同一地块种植的乌头附子和川乌 2 种药材中尿嘧啶含量(5 号和 22 号除外)、腺苷含量(12 号除外)、鸟嘌呤核苷含量(10 号除外)和尿嘧啶核苷含量差异极显著，

川乌中鸟嘌呤核苷含量和尿嘧啶核苷含量极显著高于附子中的含量；不同地块种植的附子和川乌中 4 种核苷类成分含量分别存在极显著差异。

3.3 聚类热图分析

为了直观地分析 4 种核苷在不同种植地附子和川乌中的含量变化，采用 Heml-1.0 软件进行热图和聚类分析，结果如图 3 所示^[11]。

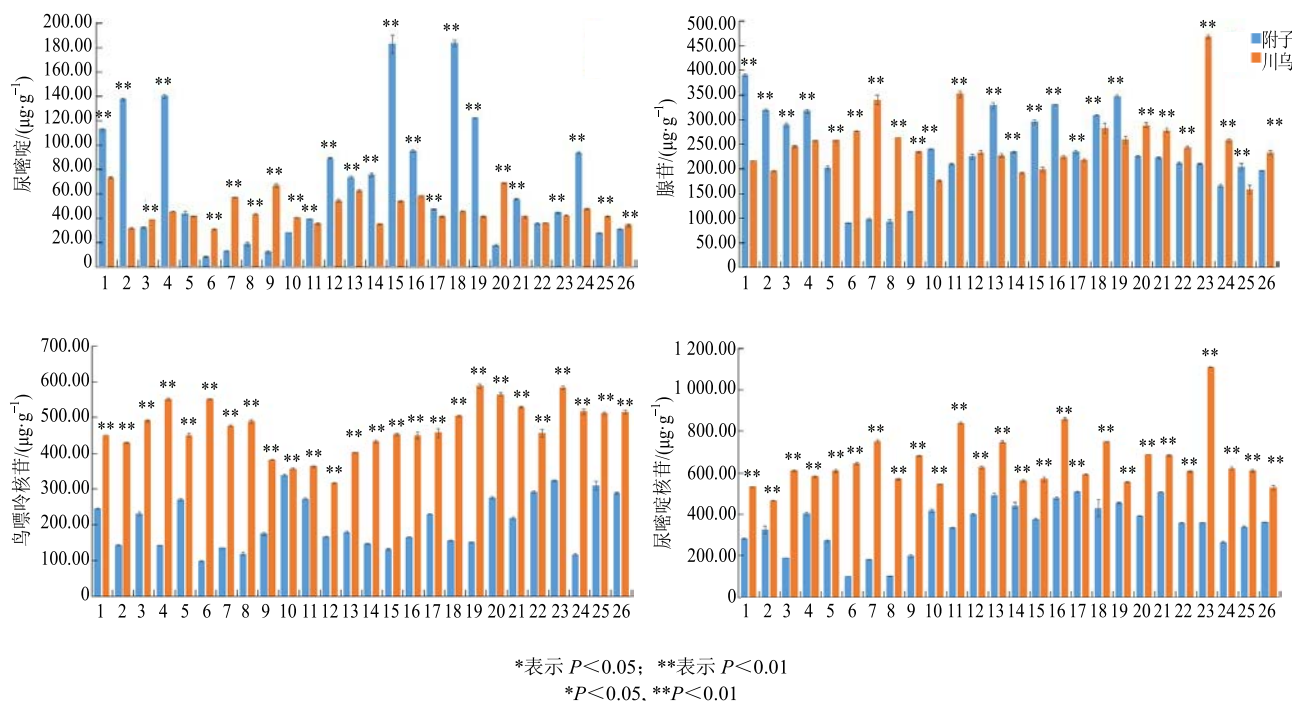


图 2 附子和川乌各核苷类成分差异比较

Fig. 2 Difference comparison of uracil, adenosine, guanosine, and uridine

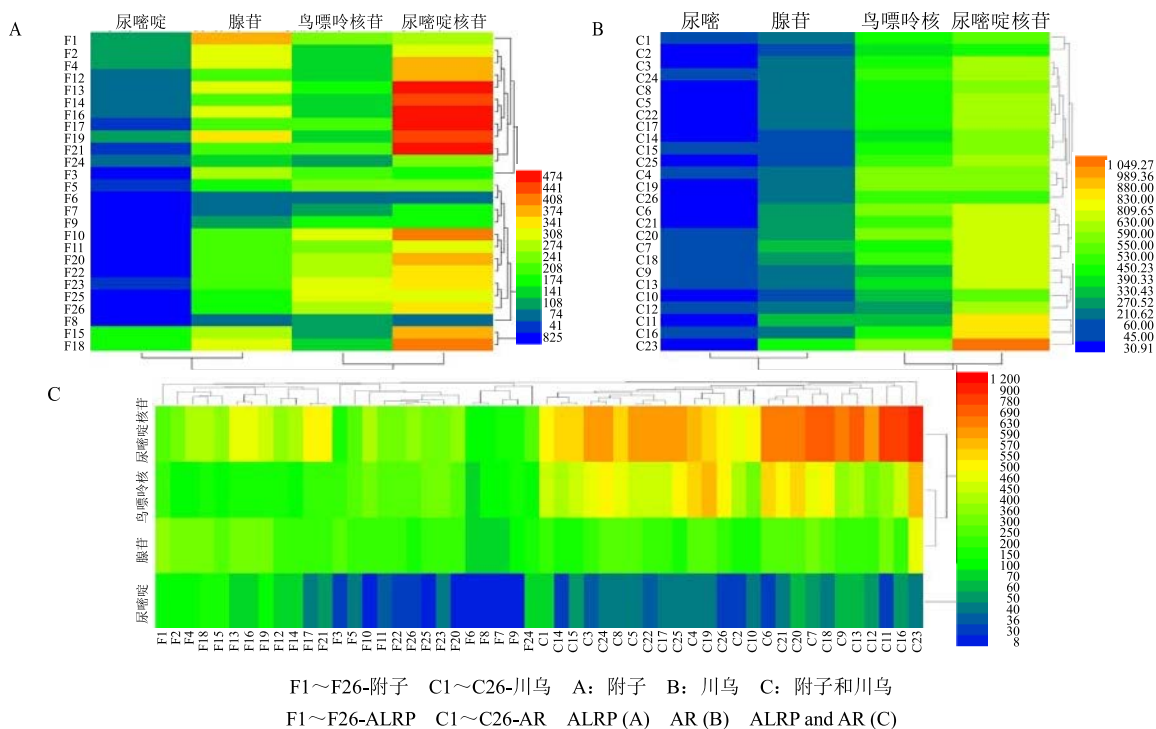


图 3 附子和川乌的聚类热图

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis and heat-map of content of nucleosides in ALRP and AR

聚类热图除通过纵向聚类反映样品的关系外, 还可以通过横向聚类反映 4 种核苷的关系, 并以热图颜色的深浅反映样品中相应成分含量大小^[12-13]。聚类分析结果显示, 附子可分为 2 类, 核苷含量较高的 15 和 18 号单独聚为一类, 其他地块种植的聚

为一类; 川乌也分为 2 类, 核苷含量较高的 23 号单独聚为一类, 其他地块种植的聚为一类; 附子和川乌可单独分为 2 类。热图分析结果显示, 附子和川乌质量差异主要体现在鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷的含量上。

3.4 主成分分析

应用 SPSS 21.0 统计软件对附子和川乌 4 种核苷类成分测定结果进行主成分分析^[14], 分析结果如表 4 所示。

附子中特征值>1 的主成分有 2 个, 且累积方差贡献率达 86.685%, 基本可以客观反映附子样本信息。尿嘧啶和腺苷在第一主成分有较高载荷, 表明第 1 主成分基本可以反映这 2 个成分的信息, 呈高度正相关; 鸟嘌呤核苷在第 2 主成分有较高载荷, 表明第 2 主成分基本反映了鸟嘌呤核苷的信息, 呈高度正相关。附子中主要的核苷成分为尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷。

川乌中特征值>1 的主成分有 2 个, 且累积方差贡献率达 77.274%, 也基本可以客观反映附子样本信息。腺苷和尿嘧啶核苷在第 1 主成分有较高载荷, 表明第 1 主成分基本可以反映这 2 个成分的信息, 呈高度正相关; 尿嘧啶在第 2 主成分有较高载荷, 表明第 2 主成分基本反映了尿嘧啶的信息, 呈高度正相关。川乌中主要的核苷成分为尿嘧啶、腺苷、尿嘧啶核苷。

附子和川乌主成分分析得分图见图 4。如图 4 所示, 各附子样品分布相对分散, 而川乌分布较集中, 这可与附子和川乌各成分含量的变异系数结果相对应。

表 4 附子和川乌主成分分析结果

Table 4 Results of principal component analysis of ALRP and AR

样品	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	尿嘧啶	腺苷	鸟嘌呤核苷	尿嘧啶核苷
附子	1	2.175	54.367	54.367	0.864	0.915	-0.113	0.761
	2	1.293	32.318	86.685	-0.408	0.135	0.955	0.443
川乌	1	1.923	48.068	48.068	0.043	0.946	0.500	0.881
	2	1.168	29.205	77.274	0.854	-0.014	-0.588	0.306

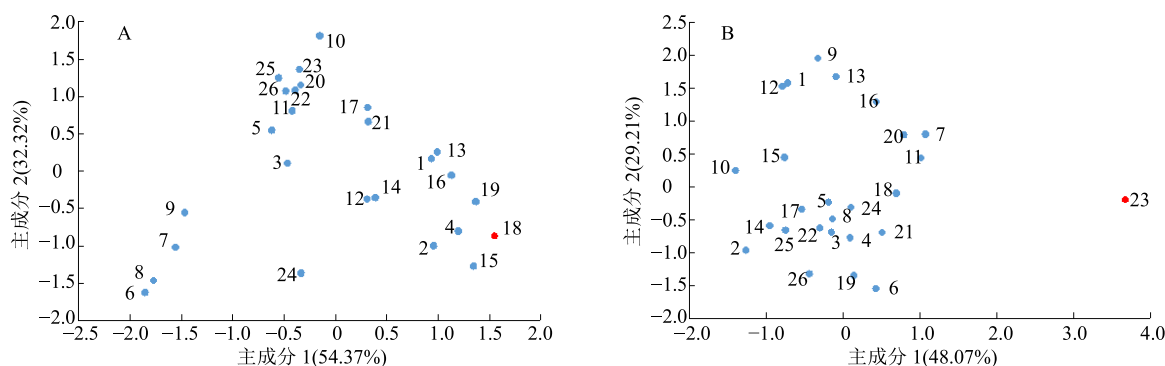


图 4 附子 (A) 和川乌 (B) 主成分分析得分图

Fig. 4 Score plot obtained by principal components analysis of ALRP (A) and AR (B)

根据得分系数矩阵结果, 附子各主成分得分模型为 $Y_{1F}=0.585\ 8\ ZX_{F1}+0.620\ 4\ ZX_{F2}-0.076\ 6\ ZX_{F3}+0.516\ 0\ ZX_{F4}$, $Y_{2F}=-0.358\ 8\ ZX_{F1}+0.118\ 7\ ZX_{F2}+0.839\ 9\ ZX_{F3}+0.389\ 6\ ZX_{F4}$, 综合得分模型为 $Y_F=0.233\ 6\ ZX_{F1}+0.433\ 4\ ZX_{F2}+0.265\ 1\ ZX_{F3}+0.468\ 9\ ZX_{F4}$; 川乌各主成分得分模型为 $Y_{1C}=0.031\ 0\ ZX_{C1}+0.682\ 2\ ZX_{C2}+0.360\ 6\ ZX_{C3}+0.635\ 3\ ZX_{C4}$, $Y_{2C}=0.790\ 2\ ZX_{C1}-0.013\ 0\ ZX_{C2}-0.544\ 1\ ZX_{C3}+0.028\ 31\ ZX_{C4}$, 综合得分模型为 $Y_C=0.317\ 3\ ZX_{C1}+0.418\ 6\ ZX_{C2}+0.018\ 6\ ZX_{C3}+0.501\ 2\ ZX_{C4}$ 。根据主成分综合模型以标准化后的数据计算综合主成分

值, 并对其按综合主成分值进行排序^[14], 结果见表 5。结果表明, 以核苷类成分做评价指标, 19 号附子样品质量最优, 23 号川乌样品质量最优。

3.5 TOPSIS 分析

根据各核苷类成分权重结果, 以标准化的数据采用 DPS 软件进行 TOPSIS 分析, 结果见表 5。结果表明, 以核苷类成分做评价指标, 根据最优值相对接近度 (CI) 排名, 18 号附子样品质量最优, 23 号川乌样品质量最优。由于评价指标独立性强, 故采用 CV 法来计算附子和川乌质量评价指标的权重^[15], 结果见表 6。

表 5 附子和川乌主成分和 TOPSIS 评价的结果
Table 5 Results of PCA and TOPSIS of ALRP and AR

序号	主成分 (附子)		主成分 (川乌)		TOPSIS (附子)		TOPSIS (川乌)	
	综合主成分	排名	综合主成分	排名	指标 CI	排名	指标 CI	排名
1	0.934 3	5	0.021 1	10	0.609 0	6	0.440 1	6
2	0.458 8	11	-1.482 6	26	0.686 5	4	0.113 2	26
3	-0.388 7	21	-0.413 1	17	0.229 9	21	0.265 5	19
4	0.765 6	6	-0.241 3	13	0.706 2	3	0.329 6	13
5	-0.341 0	20	-0.260 6	14	0.269 4	16	0.291 1	18
6	-2.403 9	26	-0.264 6	15	0.000 0	26	0.309 7	15
7	-1.872 8	24	1.247 2	2	0.062 2	24	0.562 9	2
8	-2.260 2	25	-0.321 8	16	0.058 0	25	0.307 3	16
9	-1.593 5	23	0.511 0	8	0.090 4	23	0.444 8	5
10	0.625 6	9	-1.105 6	25	0.285 5	15	0.137 7	25
11	-0.048 5	19	1.048 0	3	0.266 2	18	0.462 6	4
12	0.123 7	15	-0.058 7	12	0.466 8	8	0.335 3	12
13	1.024 1	3	0.602 1	6	0.430 9	10	0.430 0	8
14	0.208 9	13	-1.064 7	24	0.406 5	11	0.139 3	24
15	0.702 3	7	-0.474 0	19	0.807 9	2	0.300 5	17
16	1.021 0	4	0.895 7	5	0.522 4	7	0.438 4	7
17	0.650 8	8	-0.603 7	21	0.321 5	13	0.226 0	21
18	1.067 8	2	0.555 4	7	0.832 1	1	0.408 0	9
19	1.089 7	1	-0.432 0	18	0.643 0	5	0.312 4	14
20	0.176 0	14	1.000 6	4	0.228 8	22	0.544 9	3
21	0.575 0	10	0.152 6	9	0.345 9	12	0.357 0	10
22	0.096 2	16	-0.517 8	20	0.266 8	17	0.240 4	20
23	0.252 7	12	3.082 3	1	0.309 0	14	0.690 8	1
24	-0.888 7	22	-0.041 4	11	0.448 8	9	0.346 9	11
25	0.017 1	17	-0.914 3	22	0.249 4	20	0.201 8	23
26	0.007 6	18	-0.919 7	23	0.250 4	19	0.215 3	22

表 6 变异系数确定权重结果

Table 6 Results of attribute weight determined by coefficient variation method

项目	附子		川乌	
	CV	权重	CV	权重
尿嘧啶	0.766 2	0.423 6	0.254 5	0.297 2
腺苷	0.346 8	0.191 7	0.246 9	0.288 2
鸟嘌呤核苷	0.356 2	0.196 9	0.150 0	0.175 2
尿嘧啶核苷	0.339 6	0.187 7	0.205 0	0.239 4

4 讨论

本实验考察了超声时间 (10、20、30、40 min)、超声温度 (25、35、45、55、65 °C) 和料液比 (1 : 10~1 : 90) 对 4 种核苷提取率的影响, 以 4 种核苷含量总和为评价指标, 确定最佳提取条件为: 料液比 1 : 60 (g/mL), 55 °C 超声 10 min。本实验建

立的 UPLC 测定方法操作简单、准确可靠, 具有良好的精密度、稳定性和重复性, 运用该方法检测附子和川乌中的核苷类化合物, 可为其水溶性成分的研究及其质量控制提供更有效的方法。

多元统计分析可实现对中药质量更准确, 更全面地控制, 在中药资源的质量评价、成分浅析、真伪鉴别等方面运用广泛。由附子和川乌中核苷类成分的变异系数结果和主成分得分图可知, 种植地的不同对附子中 4 种核苷成分含量影响较大, 而对川乌的影响较小。主成分和 TOPSIS 分析得到的各种种植地附子的排名差别较大, 而川乌排名变化不大。可见, 主成分和 TOPSIS 分析法对于产地影响较小的数据分析可得到基本一致的排名结果。对于排名靠前的样品, 主成分和 TOPSIS 分析法均可得到相似的结果, 二者共同使用可得到更为准确的较优结

果排名。多种统计方法的联合运用能够更客观地实现中药质量的全面控制^[16]。

本研究结合差异显著性分析、聚类热图分析、主成分分析和 TOPSIS 分析,对江油 26 个种植地的附子和川乌样品的 4 种核苷类成分含量进行数据分析,以综合评价附子和川乌的药材质量。综合多种分析方法,以尿嘧啶、腺苷、鸟嘌呤核苷和尿嘧啶核苷 4 种核苷类成分为评价指标,18 号附子样品质量最优,23 号川乌样品质量最优。从本实验研究看出,同一气候条件下,不同地块种植的乌头植物,附子与川乌药材的核苷类成分含量存在差异,引起差异的原因有待进一步研究。

附子和川乌核苷类成分含量差异显著,聚类分析结果显示二者可单独聚为一类。结合生物碱类成分差异、多糖类成分差异和毒性差异等^[17],可进一步表明附子和川乌以不同入药部位药用的科学性,二者不能混用。

参考文献

- [1] 马立杰. 乌头须根化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [2] 滕爱武, 孙巧英, 刘 蕾. 川乌与附子不可混用 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(10): 900.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 孙印石, 王燕华, 王玉方, 等. UPLC 法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 840-846.
- [5] 周 浓, 张 杰, 潘兴娇, 等. HPLC 法同时测定重楼属药用植物中 10 种核苷和碱基 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2927-2932.
- [6] 王胜男, 华愉教, 邹立思, 等. 不同加工玄参核苷类成分的含量测定及 TOPSIS 分析 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(4): 274-279.
- [7] 陈东东, 陈亚运, 周 萍, 等. HPLC 同时测定延胡索中 6 个核苷成分含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1571-1575.
- [8] 刘盼盼, 许云章, 王静霞, 等. UPLC 法同时测定彝药多星韭中四种核苷类成分的含量 [J]. 中药材, 2015, 38(8): 1618-1621.
- [9] 樊修和, 吴启南, 蒋 征, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同产地浮萍中 9 种核苷类成分的量 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3253-3257.
- [10] 耿 昭. 附子化学成分研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [11] 谭 鹏, 张海珠, 张 青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.
- [12] 张 悦, 朱 荫, 叶火香, 等. 不同产地香茶的主要化学成分含量的差异分析 [J]. 食品科学, 2017, 38(22): 184-191.
- [13] 谢俊大, 孙 磊. 重楼药材多指标含量分析及化学计量学综合质量评价 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1585-1590.
- [14] 张文霖. 主成分分析在 SPSS 中的操作应用 [J]. 市场研究, 2005, 12: 31-34.
- [15] 侯小龙, 熊苗苗, 朱红莲, 等. 不同品系子莲荷叶中荷叶碱和槲皮素的含量测定及品质评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(8): 666-668.
- [16] 刘 娜, 李 军, 李宝国. 多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4268-4271.
- [17] 钱长敏, 宋兆辉, 张兰兰, 等. 四川道地产区乌头药材不同部位 6 种生物碱含量对比研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2761-2767.