

基于多元统计分析的川产道地药材江油附子和川乌中6种生物碱含量比较研究

杨正明¹, 威则日沙², 李学学², 邓秋林¹, 雷飞益¹, 李思佳¹, 刘 圆^{2*}, 王少军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苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱 6 种生物碱含量的方法, 并采用多元统计方法比较附子和川乌中的 6 种生物碱的含量差异。**方法** 采用 0.05 mol/mL 盐酸水超声提取附子和川乌中的生物碱类成分, BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 乙腈-水梯度洗脱; 体积流量 0.1 mL/min, 柱温 35 ℃; 进样体积 4 μL; 检测波长 235 nm。采用差异显著性分析、效/毒值分析、毒性成分指数分析、相关性分析、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, 附子和川乌中苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和 MDAs 含量差异极显著, 苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰乌头原碱含量差异显著, 乌头碱和双酯型生物碱 (DDAs) 含量差异不显著。以 6 种生物碱为评价指标, 15 号附子样品质量最优, 7 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生物碱类化合物的定量测定; 效/毒值、毒性成分指数的运用能更精确、简便地实现附子和川乌的质量控制; 基于多元统计分析可更准确地进行药材质量评价。可为进一步完善《中国药典》附子和川乌中酯型生物碱的分析测定提供参考, 为附子和川乌的质量控制及评价提供科学依据。

关键词: 附子; 川乌; 生物碱; 效/毒值; 超高效液相色谱法; 多元统计分析; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)06-1461-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.031

Comparative study on six alkaloids in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Aconiti Radix* in Jiangyou of Sichuan Province based on multivariate statistical analysis

YANG Zheng-ming¹, WEIZE Ri-sha², LI Xue-xue², DENG Qiu-lin¹, LEI Fei-yi¹, LI Si-jia¹, LIU Yuan², WANG Shao-jun³, 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 benzoylmesaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, mesaconitine, hypaconitine and aconitine in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP) and *Aconiti Radix* (AR), and to compare the content difference of six alkaloids in the samples with multivariate statistical analysis. **Methods** Alkaloids in ALRP and AR were extracted with 0.05 mol/mL hydrochloric acid solution 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 0.1 mL/min with column temperature at 35 ℃. The injection volume was set at 4.0 μL, and the detection wavelength was set at 235 nm. Difference significance analysis, activity ratio analysis, toxic constituents index analysis, correlation analysis, hierarchical cluster heatmap analysis, principal

收稿日期: 2018-12-28

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-YJX-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

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. Compared with the content of six alkaloids in ALRP and AR, significant difference existed in mesaconitine, benzoylhypaconitine, aconitine, and monoester diterpenoid alkaloids (MDAs); Significant difference existed in benzoylmesaconitine and benzoylaconitine; There were no significant difference in hypaconitine and diester-diterpenoid alkaloids (DDAs). Taking the six alkaloids as indexes, the sample No. 15 of ALRP was the best in quality and the samples No. 7 of AR was 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 six alkaloids in ALRP and AR. It is much more accurate and convenient to conduct the quality evaluation by using activity ratio, toxic constituents index and multivariate statistical analysis. The study could provide a reference for improving analysis and determination of ester-type alkaloids in ALRP and AR in ChP, and providing a reference for quality control and evaluation of ALRP and AR.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Aconiti Radix*; alkaloids; activity ratio; ultra-high performance liquid chromatography; multivariate statistical analysis; benzoylmesaconitine; benzoylaconitine; benzoylhypaconitine; mesaconitine; aconitinein; hypaconitine

乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx 是毛茛科乌头属植物, 药用历史悠久, 药材分为川乌(乌头母根)和附子(乌头子根), 二者在加工方法、性状、功效等有区别, 虽然药典已明确了药用部位, 仍存在混用的情况^[1-2]。四川江油为乌头药材的道地产区, 种植历史悠久, 年产量占全国乌头药材很大的比重^[3]。酯型生物碱是附子和川乌中的主要毒、效成分, 多采用《中国药典》附子、川乌项下“异丙醇-醋酸乙酯混合液”制备供试液, 通过 HPLC 或 UPLC 法测定^[3-8]。酯型生物碱在酸性条件下稳定, 研究表明酸水超声提取制备供试液, 酯型生物碱含量明显高于药典方法, 且操作更简单^[9-10]。本实验拟采用酸水提取、UPLC 法同时测定江油附子和川乌中 6 种生物碱, 并采用多元统计分析方法比较附子和川乌中 6 种生物碱的含量差异。

1 仪器与试药

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); TGL-16G 台式高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司); Sartorius BT 25 S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

对照品新乌头碱(批号 PS0489-0020MG)、次乌头碱(批号 PS0462-0025MG)、乌头碱(批号 PS0150-0025)、苯甲酰新乌头原碱(批号 PS1132-0025)、苯甲酰乌头原碱(批号 PS1133-0020)、苯甲酰次乌头原碱(批号 PS1134-0025), 购于成都普斯生物科技股份有限公司, 质量分数大于 98%; 乙腈、四氢呋喃、醋酸铵和冰醋酸为色谱纯, 水为屈臣氏饮用水。

乌头药材于 2017 年 6 月 24~25 日采于江油市彰明镇和太平镇, 每个样地采用五点法取样, 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。每株药材经除去泥沙, 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。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (100 mm×1.0 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为乙腈-四氢呋喃 25:15, B 为 0.1 mol/L 醋酸铵(每 1 L 加冰醋酸 0.5 mL), 梯度洗脱: 0~1 min, 15%~30% A; 1~3 min, 30%~38% A; 3~6 min, 38%~45% A; 6~8 min, 45%~15% A; 体积流量 0.1 mL/min, 柱温 35 °C; 进样体积 4 μL; 检测波长 235 nm。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取适量苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱对照品, 精密称定, 加 0.05% 的盐酸甲醇溶液定容至 10 mL, 得质量浓度分别为 0.184、0.136、0.173、0.214、0.211 和 0.253 mg/mL 的混合对照品储备液, 于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取 0.2 g 样品, 精密称定, 加入 0.05 mol/mL 盐酸水溶液 5 mL, 混匀, 超声 30 min, 离心 10 min (转速 8 000 r/min), 取上清液以 0.22 μm 微孔滤头滤过, 续滤液即得^[10-12]。

2.4 线性关系考察

准确吸取各对照品储备液适量配制成多个浓度系列的对照品溶液, 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 $S/N=3$ 计算检测限。结果见表 2。

表 1 附子和川乌样品来源
Table 1 Sources 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	E: 104°42.417'/N: 31°42.413'	2017-06-24
2	江油市彰明镇长庚村 5 组	501	E: 104°42.375'/N: 31°42.529'	2017-06-24
3	江油市彰明镇长庚村 3 组	503	E: 104°42.601'/N: 31°42.505'	2017-06-24
4	江油市彰明镇长庚村 3 组	500	E: 104°42.696'/N: 31°42.487'	2017-06-24
5	江油市彰明镇长庚村 5 组	501	E: 104°42.321'/N: 31°42.399'	2017-06-24
6	江油市彰明镇长庚村 5 组	507	E: 104°42.274'/N: 31°42.432'	2017-06-24
7	江油市彰明镇长庚村 5 组	511	E: 104°42.339'/N: 31°42.668'	2017-06-24
8	江油市彰明镇长庚村 5 组	503	E: 104°42.379'/N: 31°42.718'	2017-06-24
9	江油市太平镇桥楼村 4 组	501	E: 104°41.054'/N: 31°42.035'	2017-06-25
10	江油市太平镇桥楼村 6 组	501	E: 104°42.009'/N: 31°42.828'	2017-06-25
11	江油市太平镇桥楼村 5 组	503	E: 104°41.745'/N: 31°42.605'	2017-06-25
12	江油市太平镇桥楼村 2 组	501	E: 104°41.893'/N: 31°42.487'	2017-06-25
13	江油市太平镇桥楼村 2 组	501	E: 104°41.773'/N: 31°42.446'	2017-06-25
14	江油市太平镇普照村 3 组	507	E: 104°41.242'/N: 31°43.241'	2017-06-25
15	江油市太平镇普照村 1 组	511	E: 104°41.246'/N: 31°43.599'	2017-06-25
16	江油市太平镇河江村 10 组	503	E: 104°41.820'/N: 31°43.791'	2017-06-25
17	江油市太平镇双胜村 6 组	503	E: 104°41.596'/N: 31°43.819'	2017-06-25
18	江油市太平镇普照村 2 组	503	E: 104°41.301'/N: 31°43.837'	2017-06-25
19	江油市太平镇普照村 4 组	503	E: 104°41.407'/N: 31°43.850'	2017-06-25
20	江油市太平镇龙门村 10 组	503	E: 104°41.358'/N: 31°44.947'	2017-06-25
21	江油市太平镇竹林村 2 组	503	E: 104°41.775'/N: 31°45.031'	2017-06-25
22	江油市太平镇竹林村 3 组	503	E: 104°41.526'/N: 31°44.814'	2017-06-25
23	江油市太平镇竹林村 1 组	503	E: 104°41.755'/N: 31°45.232'	2017-06-25
24	江油市太平镇竹林村 4 组	503	E: 104°42.004'/N: 31°44.793'	2017-06-25
25	江油市太平镇竹林村 6 组	503	E: 104°42.003'/N: 31°45.105'	2017-06-25
26	江油市太平镇竹林村 5 组	503	E: 104°42.136'/N: 31°44.908'	2017-06-25

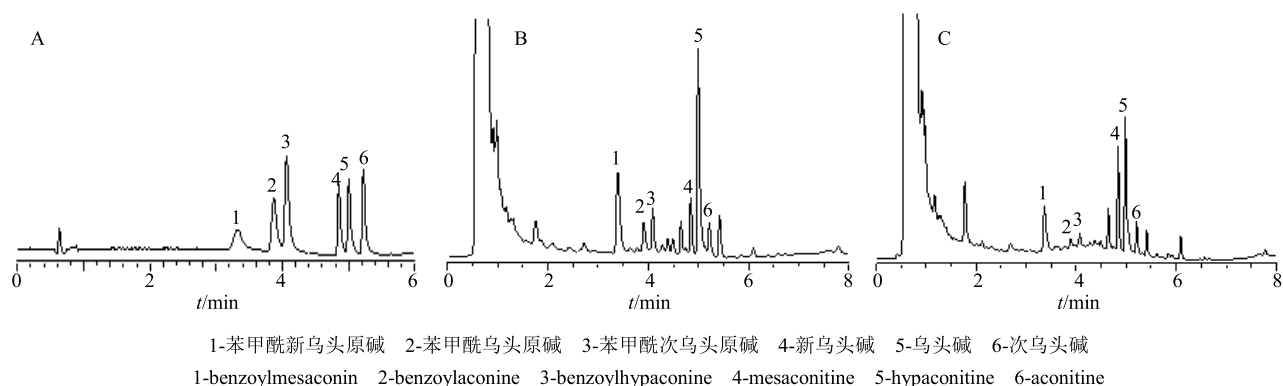


图 1 混合对照品溶液 (A)、附子 (B) 和川乌 (C) 供试品溶液的色谱图
Fig. 1 UPLC of six mixed reference substances (A), ALRP (B), and AR (C)

表 2 线性关系、检测限和定量限结果

Table 2 UPLC analysis of linearity, LOD, and limit of quantitation

成分	回归方程	r^2	线性范围/ng	检测限/ng	定量限/ng
苯甲酰新乌头原碱	$Y=10\,142\,X+4\,735.3$	0.999 5	7.36~184.00	0.56	1.87
苯甲酰乌头原碱	$Y=11\,227\,X-10\,629$	0.999 5	1.36~68.00	0.72	2.39
苯甲酰次乌头原碱	$Y=11\,551\,X-10\,299$	0.999 7	1.73~86.50	1.04	3.45
新乌头碱	$Y=11\,200\,X-17\,063$	0.999 8	4.28~214.00	0.37	1.23
次乌头碱	$Y=12\,220\,X-21\,859$	0.999 7	8.44~316.50	0.41	1.37
乌头碱	$Y=11\,906\,X-12\,314$	1.000 0	2.53~126.50	0.44	1.47

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。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 0.63%、0.65%、0.46%、0.40%、0.25%、0.38%。

2.5.2 稳定性试验 取同一 S1 附子供试品溶液,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。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 0.98%、1.6%、1.29%、0.86%、1.39%、1.92%。

2.5.3 重复性试验 取 S1 附子粉末 6 份,精密称定,按“2.3”项方法制备样品,“2.1”项下色谱条件进样测定,计算各成分峰面积的 RSD 值。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 1.6%、1.98%、1.53%、1.36%、1.18%、1.13%。

2.5.4 加样回收率试验 取 0.2 g 已测定含量的 S1 附子粉末 6 份,精密称定,分别依次加入适量“2.2”项下的对照品贮备液,按“2.3”项方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件进样测定,得各成分质量分数,计算加样回收率和 RSD 值,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的平均加样回收率为 99.43%、98.64%、97.09%、96.36%、98.00%、97.98%,RSD 分别为 1.77%、1.14%、1.50%、1.75%、1.61%、1.31%。

2.6 样品测定

取附子和川乌样品粉末,按“2.3”项方法制备供试品溶液,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 生物碱含量测定结果

附子和川乌 6 种生物碱含量测定结果见表 3 和表 4。附子中苯甲酰新乌头原碱量为 106.69~668.32 $\mu\text{g/g}$,苯甲酰乌头原碱量为 16.12~145.74 $\mu\text{g/g}$,苯甲酰次乌头原碱量为 33.67~126.29 $\mu\text{g/g}$,新乌头碱量为 100.7~637.3 $\mu\text{g/g}$,次乌头碱量为 246.23~1 320.87 $\mu\text{g/g}$,乌头碱量为 25.91~271.17 $\mu\text{g/g}$;川乌中苯甲酰新乌头原碱量为 167.69~703.51 $\mu\text{g/g}$,苯甲酰乌头原碱量为 17.70~92.36 $\mu\text{g/g}$,苯甲酰次乌头原碱量为 18.20~50.31 $\mu\text{g/g}$,新乌头碱量为 214.52~753.98 $\mu\text{g/g}$,次乌头碱量为 146.86~555.20 $\mu\text{g/g}$,乌头碱量为 31.17~151.55 $\mu\text{g/g}$ 。附子中 6 种生物碱的 RSD 均高于川乌中 6 种生物碱的 RSD,表明种植的地块对附子中 6 种生物碱含量影响较大。

3.2 附子和川乌中 6 种生物碱含量比较分析

对 26 个不同地块种植的附子和川乌中 6 种生物碱的含量进行差异性分析,结果如图 2 所示。同一地块种植的附子和川乌中苯甲酰新乌头原碱(18 和 25 号含量差异显著)、苯甲酰乌头原碱(9 号和 11 号含量差异不显著,20 号含量差异显著)、苯甲酰次乌头原碱(3、11 和 14 号含量差异不显著)、新乌头碱(9 号和 25 号含量差异显著)、次乌头碱和乌头碱(18 号含量差异不显著,9 号和 24 号含量差异显著)含量差异极显著。就整体而言,附子和川乌中苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和单酯型生物碱(MDAs,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱含量总和)含量差异极显著,乌头碱和双酯型生物碱(DDAs,新乌头碱、次乌头碱和乌头碱含量总和)含量差异不显著。

表 3 附子 6 种生物碱含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Determination results of six alkaloids in ALRP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

序号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	单酯型生物碱	双酯型生物碱
1	475.80±18.38	49.13±1.27	124.16±1.97	190.88± 3.21	1 055.88±3.00	35.45±0.65	649.09±19.42	1 282.21± 6.24
2	300.85± 0.80	38.53±0.36	115.73±0.69	115.97± 0.77	866.26± 5.26	31.79±0.15	455.12± 0.96	1 014.01± 5.83
3	228.61± 5.26	42.88±0.40	50.77±2.12	554.20±13.29	945.95± 7.93	151.67±3.18	322.25± 6.32	1 651.82±21.42
4	250.19± 1.02	43.10±0.26	125.59±0.42	104.28± 0.17	956.80± 9.68	33.45±0.56	418.88± 1.58	1 094.52±10.03
5	276.04± 5.00	52.81±0.31	86.31±2.12	136.97± 2.12	761.93± 9.92	40.84±0.12	415.15± 5.70	939.74±11.87
6	201.53± 0.90	56.12±1.22	42.39±3.25	509.49± 7.21	952.89±10.37	225.7±0.52	300.04± 4.05	1 688.09±17.96
7	330.13± 1.06	101.08±1.73	55.47±0.64	339.21± 2.20	700.86± 2.06	182.59±1.92	486.68± 1.96	1 222.66± 6.01
8	241.93± 0.82	65.47±1.11	45.16±1.99	637.30± 5.01	802.29± 5.34	271.17±1.45	352.56± 1.23	1 710.76±11.78
9	210.44± 1.76	32.95±0.32	47.57±1.63	334.14± 4.24	904.80± 7.68	77.44±0.51	290.96± 1.15	1 316.38±11.41
10	171.12± 1.38	26.37±0.23	59.38±1.27	200.99± 1.70	893.07± 9.19	38.37±0.78	256.88± 2.55	1 132.43±11.37
11	256.91± 0.77	45.45±1.33	39.13±2.88	215.78± 2.38	540.86± 9.20	65.24±0.25	341.48± 4.91	821.89±10.30
12	391.87± 4.22	79.99±1.32	93.46±0.56	263.47± 2.63	930.28± 8.07	83.73±1.02	565.31± 5.93	1 277.48±11.38
13	197.92± 0.50	27.02±0.18	66.48±0.71	120.02± 1.07	686.97± 0.92	25.91±0.40	291.42± 0.99	832.91± 1.91
14	668.32± 3.92	79.52±1.35	38.01±0.69	213.00± 1.07	246.23± 0.46	55.97±0.47	785.84± 5.58	515.20± 1.28
15	530.38±11.08	145.74±3.49	113.2±0.77	140.63± 2.87	483.49± 8.52	69.59±2.10	789.32±15.31	693.71±13.14
16	226.42± 2.48	31.91±0.72	67.13±0.36	124.77± 1.53	667.29± 5.49	35.38±0.08	325.47± 3.22	827.44±6.98
17	501.30± 1.67	89.14±1.25	56.43±0.22	475.21± 6.62	654.82± 4.12	142.51±2.17	646.86± 2.45	1 272.55±12.25
18	256.45± 3.86	32.75±0.92	110.83±2.05	100.70± 2.32	682.97±11.04	29.56±1.89	400.03± 6.31	813.23±15.15
19	303.16± 2.49	44.54±0.13	121.01±2.07	107.36± 2.32	801.94± 8.07	28.82±1.46	468.72± 0.39	938.12±11.62
20	106.69± 0.28	16.12±1.13	46.47±2.05	353.58± 4.27	1 320.87± 3.67	57.08±1.65	169.28± 3.37	1 731.54± 3.40
21	230.16± 2.66	29.70±0.20	69.66±0.33	157.09± 0.86	775.01± 1.44	40.28±0.66	329.51± 2.35	972.37± 1.23
22	461.64± 4.92	60.54±1.17	33.67±1.67	432.98± 4.87	531.46± 9.67	116.02±1.35	555.85± 7.65	1 080.47± 9.38
23	265.29± 1.33	33.60±0.36	58.26±0.44	171.54± 0.81	728.18± 1.74	51.71±0.25	357.16± 1.07	951.43± 2.67
24	423.71± 0.52	105.54±1.06	126.29±0.58	165.60± 0.65	624.94± 3.20	86.41±1.39	655.54± 0.94	876.95± 4.49
25	176.45± 2.21	34.34±1.03	58.68±2.50	250.15± 2.14	1 069.97±12.68	89.68±1.45	269.47± 3.71	1 409.80±15.53
26	184.12± 1.71	24.39±2.07	65.18±0.39	271.51± 0.98	1 004.97±13.25	62.47±1.04	273.69± 1.87	1 338.95±14.34
RSD/%	44.26	57.12	42.74	59.67	27.88	78.26	38.88	28.88

3.3 附子和川乌效/毒值分析

依据《中国药典》2015 年版一部,以 DDAs 和 MDAs 含量作为附子含量测定评价指标;以 DDAs 含量作为川乌含量测定评价指标。为更准确和全面地评价附子和川乌的品质,同时测定附子和川乌中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱 3 种单酯型生物碱,以及新乌头碱、次乌头碱和乌头碱 3 种双酯型生物碱,并计算效/毒值(MDAs 含量/DDAs 含量),并对其按效/毒值大小进行排序,结果见表 5。效/毒值越大,表明附子和川乌的药效越强、毒性越弱,可认为其品质相对较优^[13]。

附子和川乌的效/毒值范围、均值及差异性分析结果(图 3)可见:附子和川乌的效/毒值差异不显著;附子的变异系数大于川乌的,表明种植的地块对附子的效/毒值影响较大,与 6 种生物碱的变异系数结果相一致。以 6 种生物碱类成分做评价指标,根据效/毒值,14 号附子样品质量最优;6 号川乌样品质量最优,7 号川乌样品次之。

3.4 附子毒性成分指数分析

附子毒性指数(toxic constituents index, TCI)是一种基于毒性系数校正的含量测定方法,通过整合附子毒性及其多组分含量测定以达到对附子药材、饮片以量评毒(效)的目的^[14]。附子毒性指数

表 4 川乌 6 种生物碱含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Determination results of six alkaloids in AR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

序号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	单酯型生物碱	双酯型生物碱
1	591.80±0.56	31.70±0.97	37.36±1.88	545.92±1.86	466.24±2.67	60.43±0.24	660.86±1.30	1 072.59±4.03
2	367.25±1.30	26.48±0.32	38.44±0.42	430.36±1.79	452.64±2.77	65.01±0.42	432.18±1.12	948.00±4.22
3	578.03±6.07	47.96±1.10	50.31±1.19	647.22±8.70	421.85±4.90	104.07±0.45	676.29±8.03	1 173.14±13.61
4	167.69±1.94	31.05±0.47	49.25±0.83	280.09±1.45	555.20±1.28	79.94±1.33	247.98±1.73	915.23±1.27
5	490.46±2.90	48.40±0.82	48.05±0.34	461.49±1.88	478.88±2.43	90.20±1.04	586.91±3.75	1 030.57±3.51
6	580.37±3.89	54.76±0.97	19.76±0.10	403.35±4.87	146.86±9.54	88.22±3.94	654.89±2.87	638.43±15.91
7	703.51±2.84	92.36±0.67	33.37±1.15	497.77±3.62	339.83±0.93	136.63±2.45	829.24±3.94	974.23±3.82
8	620.75±10.89	84.44±0.22	19.06±2.16	566.23±7.11	432.30±2.41	151.55±0.56	724.25±12.45	1 150.08±5.54
9	306.69±3.24	32.66±0.42	37.40±1.77	321.33±2.48	442.84±14.93	76.07±0.37	376.76±4.88	840.24±13.29
10	308.67±3.40	36.01±1.06	40.51±0.49	324.16±3.46	428.62±3.14	76.63±1.50	385.18±2.19	829.41±5.19
11	576.60±7.28	44.57±0.38	39.09±0.33	475.94±5.32	312.59±3.06	76.51±1.53	660.26±7.37	865.04±8.12
12	525.12±1.57	33.98±0.08	36.15±0.32	753.98±7.55	533.68±5.78	120.50±0.91	595.25±1.56	1 408.16±13.83
13	271.85±2.60	25.32±0.59	29.64±0.19	300.23±2.85	394.97±8.26	55.81±0.74	326.80±2.12	751.00±10.43
14	258.88±0.91	40.73±0.62	36.85±2.02	326.22±1.50	380.30±3.19	77.61±1.17	336.47±2.80	784.13±5.71
15	582.99±4.91	60.72±0.63	24.63±1.62	473.56±3.21	367.45±2.81	98.46±2.23	668.33±5.42	939.47±6.56
16	252.65±1.25	23.52±0.38	40.18±0.94	279.36±3.01	446.81±4.91	50.72±0.62	316.35±0.75	776.89±8.39
17	253.44±1.41	20.37±0.33	35.79±1.55	292.35±3.50	518.69±3.98	41.96±0.54	309.60±1.08	852.99±6.76
18	238.79±7.40	21.24±0.45	35.77±2.50	214.52±6.33	470.48±11.41	31.65±0.94	295.80±9.77	716.65±18.57
19	232.76±2.65	17.70±0.47	34.38±1.84	299.64±0.77	443.97±2.78	37.55±0.81	284.85±4.90	781.15±4.27
20	284.06±3.22	18.78±0.26	40.19±1.12	317.64±1.64	498.28±2.77	31.17±0.15	343.03±1.86	847.08±3.98
21	335.39±0.61	33.82±0.62	27.25±1.79	500.54±0.29	367.69±1.91	84.44±2.69	396.47±2.62	952.68±3.28
22	524.61±10.25	38.89±1.01	18.20±0.50	726.62±8.30	269.50±2.20	98.51±3.45	581.70±11.67	1 094.63±11.87
23	280.95±4.01	29.90±0.26	29.62±1.15	241.67±3.74	381.87±4.77	43.39±0.49	340.47±3.73	666.94±8.35
24	397.11±4.07	52.07±0.71	24.71±0.29	328.46±0.33	530.63±2.43	82.66±1.19	473.90±4.08	941.75±3.00
25	195.92±11.48	22.36±0.58	32.48±2.85	279.69±13.92	496.46±24.26	47.96±1.56	250.76±14.82	824.12±39.57
26	331.91±5.99	32.05±0.49	27.75±0.83	468.26±3.14	401.77±0.61	93.60±2.42	391.71±4.73	963.63±4.38
RSD/%	40.19	48.51	25.42	35.56	21.23	40.09	36.67	18.79

计算公式如下。

$$\text{TCI} = 0.3387 X_{\text{MA}} + 0.1835 X_{\text{HA}} + 0.4778 X_{\text{AC}}$$

X_{MA} 、 X_{HA} 和 X_{AC} 分别为附子样品中新乌头碱、次乌头碱和乌头碱含量

26 个不同地块种植的附子的毒性指数计算结果见图 4。附子毒性指数为 14.41~48.89, 以毒性指数为评价指标, 14 号样品质量最优, 15 号附子样品次之。附子毒性指数与新乌头碱、次乌头碱和乌头碱含量呈极显著正相关, 与附子效/毒值呈极显著负相关。

3.5 相关性分析

附子和川乌中 6 种生物碱的相关性分析结果表明(表 6), 附子中除了苯甲酰新乌头原碱和次乌头碱外, 其余 4 种生物碱含量均与川乌中一个或多个生物碱含量呈显著(极显著)正(负)相关; 而川乌中 6 种生物碱含量均与附子中一个或多个生物碱含量呈显著(极显著)正(负)相关。附子中苯甲酰乌头原碱含量与川乌中苯甲酰乌头原碱呈极显著正相关, 与苯甲酰新乌头原碱和乌头碱含量呈显著正相关; 附子中苯甲酰次乌头原碱含量与川乌

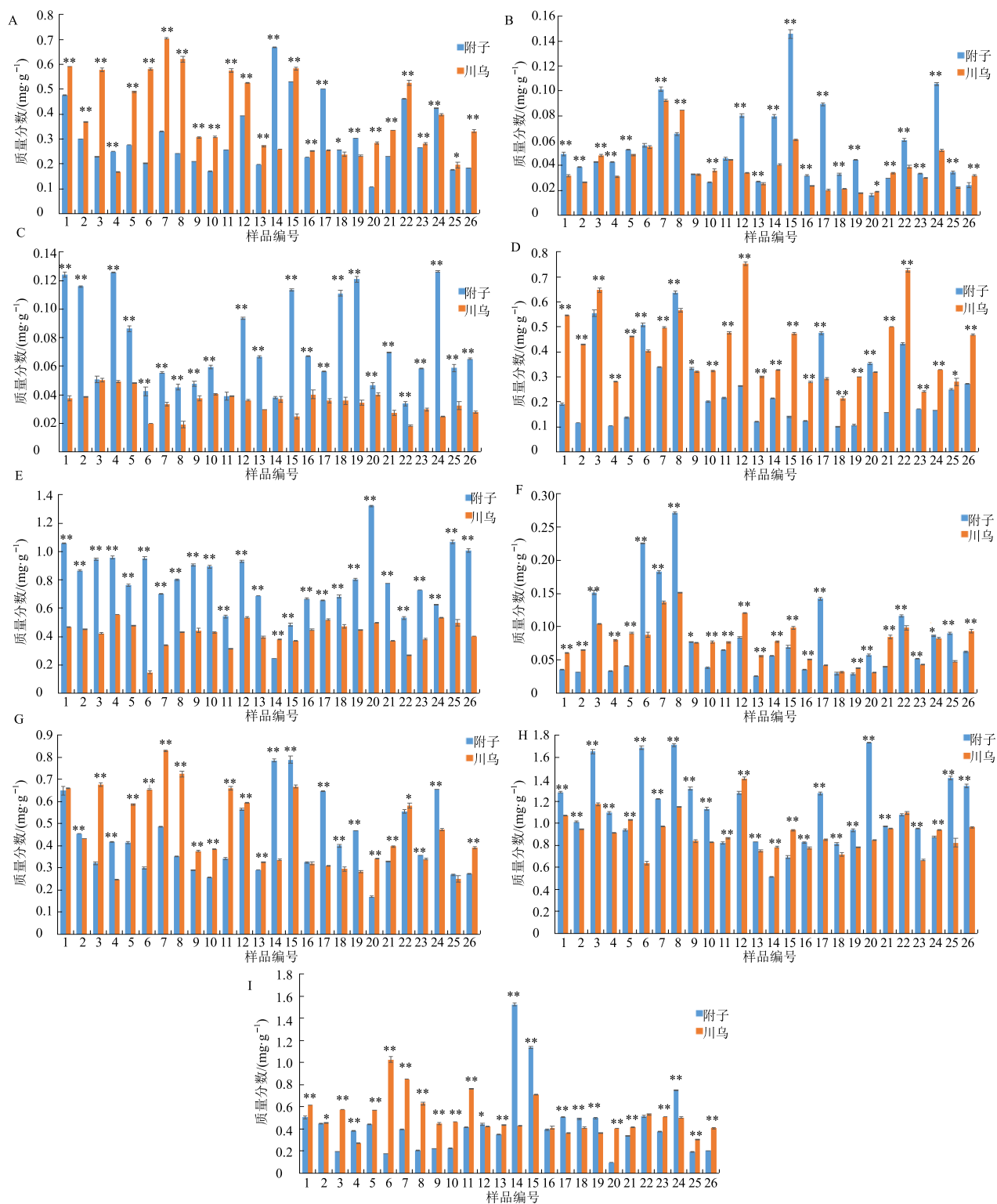


图 2 附子和川乌的生物碱含量差异比较

Fig. 2 Comparison on difference of content of alkaloids in ALRP and AR

表 5 附子和川乌效/毒值和 TOPSIS 评价的结果

Table 5 Results of activity ratio and TOPSIS analysis of ALRP and AR

序号	效/毒值				TOPSIS			
	附子比值	附子排名	川乌比值	川乌排名	附子指标 CI	附子排名	川乌指标 CI	川乌排名
1	0.506 2	6	0.616 1	6	0.496 6	8	0.353 7	12
2	0.448 8	9	0.455 9	13	0.518 9	5	0.259 1	24
3	0.195 1	23	0.576 5	7	0.146 5	26	0.387 9	8
4	0.382 7	15	0.271 0	26	0.522 0	4	0.280 7	21
5	0.441 8	11	0.569 5	8	0.458 0	10	0.378 0	10
6	0.177 7	25	1.026 2	1	0.170 7	25	0.489 8	3
7	0.398 1	13	0.851 2	2	0.346 1	16	0.572 5	1
8	0.206 1	21	0.629 7	5	0.207 8	22	0.513 9	2
9	0.221 0	20	0.398 7	22	0.192 6	24	0.275 4	23
10	0.226 8	19	0.464 4	12	0.363 8	14	0.294 8	19
11	0.415 5	12	0.763 3	3	0.291 6	18	0.399 7	6
12	0.442 5	10	0.422 8	16	0.368 9	13	0.279 0	22
13	0.349 9	17	0.435 2	14	0.513 6	7	0.284 9	20
14	1.525 3	1	0.429 1	15	0.514 4	6	0.303 4	17
15	1.137 8	2	0.711 4	4	0.606 7	1	0.444 9	4
16	0.393 4	14	0.412 7	19	0.452 6	11	0.312 7	16
17	0.508 3	5	0.363 0	24	0.353 0	15	0.329 9	14
18	0.491 9	8	0.412 7	18	0.534 9	3	0.426 3	5
19	0.499 7	7	0.364 6	23	0.560 3	2	0.345 6	13
20	0.097 8	26	0.405 0	21	0.216 0	21	0.398 1	7
21	0.338 9	18	0.416 2	17	0.392 3	12	0.228 3	25
22	0.514 5	4	0.531 4	9	0.287 7	19	0.315 5	15
23	0.375 4	16	0.510 5	10	0.336 1	17	0.380 2	9
24	0.747 5	3	0.503 2	11	0.486 9	9	0.374 4	11
25	0.191 2	24	0.304 2	25	0.193 7	23	0.302 1	18
26	0.204 4	22	0.406 5	20	0.233 8	20	0.211 0	26

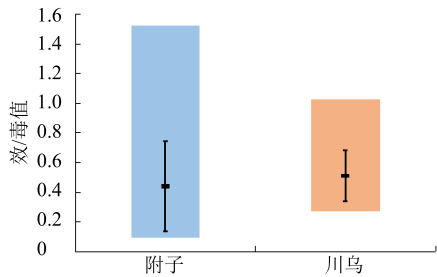


图 3 附子和川乌的效/毒值范围及均值
Fig. 3 Range and average value of activity ratio in ALRP and AR

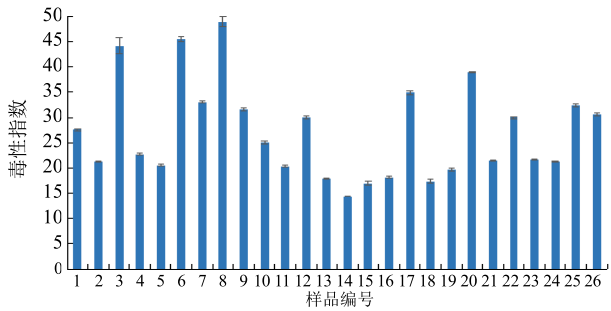


图 4 附子毒性指数
Fig. 4 Toxicity index of ALRP

表 6 附子和川乌中 6 种生物碱的相关性

Table 6 Correlation among content of six alkaloids of ALRP and AR

成分	F1	F2	F3	F4	F5	F6
C1	0.204	0.481*	-0.140	0.466*	-0.087	0.589**
C2	0.161	0.579**	-0.196	0.439*	-0.255	0.703**
C3	-0.164	-0.310	0.180	-0.277	0.243	-0.439*
C4	0.225	0.271	-0.135	0.436*	0.017	0.378
C5	-0.004	-0.060	0.517**	-0.299	0.295	-0.380
C6	0.141	0.458*	-0.190	0.471*	-0.137	0.626**

F1~6 为附子中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱；C1~6 为川乌中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱；* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

F/C1—6: benzoylmesaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, mesaconitine, aconitine, hypaconitine in ALRP and AR; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

中次乌头碱含量呈极显著正相关；附子中新乌头碱含量与川乌中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱含量呈显著正相关；附子中乌头碱含量与川乌中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、乌头碱含量呈极显著正相关，与苯甲酰次乌头原碱含量呈显著负相关。

3.6 聚类热图分析

为了直观地分析 6 种生物碱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^[15]，结果如图 5 所示。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 6 种生物碱的关系，并以热图颜色的深浅反映样品中相应成分含量大小^[16-17]。

聚类分析结果显示，附子可分为 2 类，14 和

15 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，3、5、6、7、8、11、15 和 22 号聚为一类，其他地块种植的聚为一类；附子和川乌中单酯型生物碱和双酯型生物碱可分为 2 类。热图分析结果显示，附子和川乌质量差异主要体现在乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱和新乌头原碱的含量上。

3.7 主成分分析

应用 SPSS 21.0 统计软件对附子和川乌 6 种生物碱类成分测定结果进行主成分分析^[18]，分析结果如表 7 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 78.259%，基本可以客观反映附子样本信息。新乌头碱和乌头碱在第 1 主成分有较高载荷，表明第 1 主成分基本可以反应这 2 个成分的信

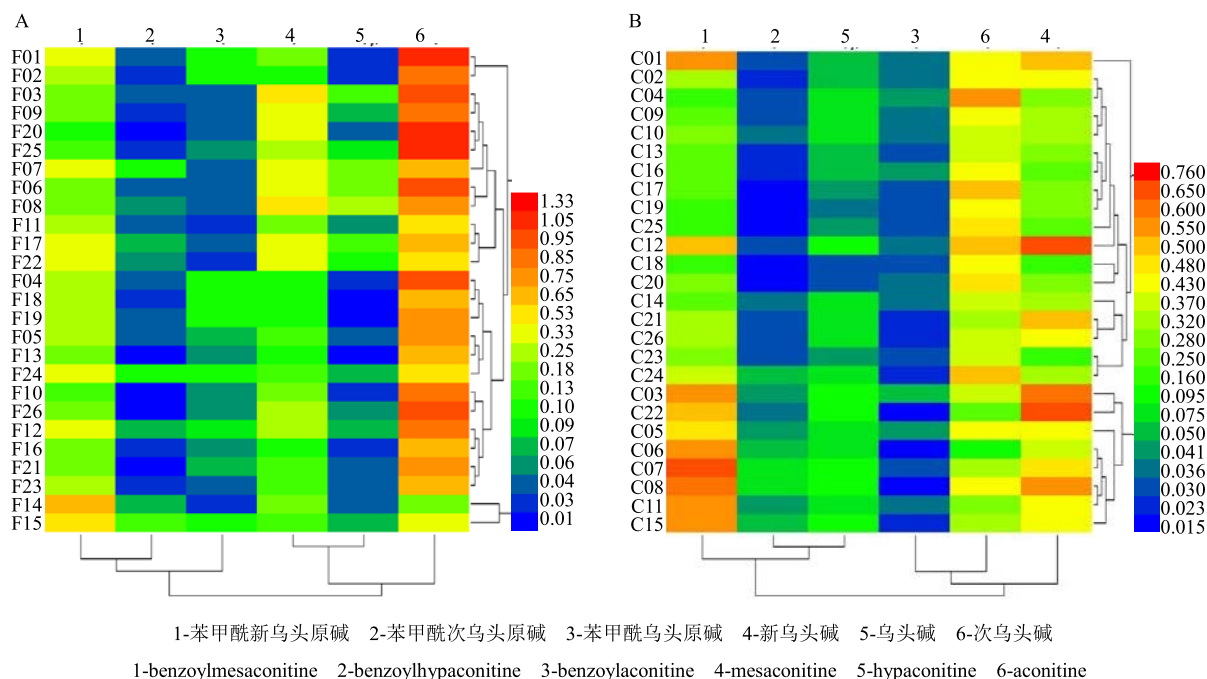


图 5 附子 (A) 和川乌 (B) 中生物碱含量聚类热图

Fig. 5 Hierarchical clustering analysis and heat-map of content of alkaloids in ALRP (A) and AR (B)

表 7 附子和川乌主成分分析结果

Table 7 Results of principal component analysis of ALRP and AR

项目	成分 (附子)		成分 (川乌)	
	1	2	1	2
特征值	2.370	2.326	3.506	1.202
方差贡献率/%	39.494	38.765	58.440	20.025
累积方差贡献率/%	39.494	78.259	58.440	78.465
苯甲酰新乌头原碱	-0.318	0.863	0.916	0.153
苯甲酰乌头原碱	-0.089	0.900	0.865	0.079
苯甲酰次乌头原碱	-0.763	-0.026	-0.464	0.740
新乌头碱	0.940	0.223	0.773	0.328
次乌头碱	0.279	-0.751	-0.558	0.661
乌头碱	0.848	0.395	0.891	0.281

息,呈高度正相关;苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰乌头原碱在第 2 主成分有较高载荷,表明第 2 主成分基本反映了这 2 个成分的信息,呈高度正相关。

川乌中特征值>1 的主成分有 2 个,且累积方差贡献率达 78.465%,也基本可以客观反映附子样本信息。苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱和乌头碱在第 1 主成分有较高载荷,表明第 1 主成分基本可以反映这几个成分的信息,呈高度正相关;苯甲酰次乌头原碱在第 2 主成分有较高载荷,表明第 2 主成分基本反映了苯

甲酰次乌头原碱的信息,呈高度正相关。

3.8 TOPSIS 分析

6 种生物碱为独立的评价指标,采用变异系数法来计算附子和川乌质量评价指标的权重^[19],结果见表 8。根据各生物碱类成分权重结果,以标准化的数据采用 DPS 软件进行 TOPSIS 分析(新乌头碱、次乌头碱和乌头碱为低优指标),结果见表 5。结果表明,以 6 种生物碱类成分为评价指标,15 号附子样品质量最优,7 号川乌样品质量最优。

表 8 RSD 确定权重结果

Table 8 Results of attribute weight determined by coefficient variation method

成分	附子		川乌	
	RSD	权重	RSD	权重
苯甲酰新乌头原碱	0.442 6	0.142 8	0.401 9	0.190 5
苯甲酰乌头原碱	0.571 2	0.184 3	0.485 1	0.229 9
苯甲酰次乌头原碱	0.427 4	0.137 9	0.254 2	0.120 5
新乌头碱	0.596 7	0.192 5	0.355 6	0.168 5
次乌头碱	0.278 8	0.090 0	0.212 3	0.100 6
乌头碱	0.782 6	0.252 5	0.400 9	0.190 0

4 讨论

本实验建立了酸水超声提取、UPLC 法同时测定附子和川乌中 6 种生物碱含量。酯型生物碱在酸性条件下稳定,酸水超声提取较《中国药典》2015 年版附子和川乌的含量测定的溶液制备方法更加简便、易于操作,且 6 种生物碱的测定结果明显高于药典方法;UPLC 法的建立使得 6 种生物碱在 8 min 内实现分离测定,大幅度节约了分析成本;在单独规定 DDAs 和 MDAs 含量限度的同时,增加二

者含量比值(效/毒比),能更准确和全面地评价附子和川乌的品质。

多元统计分析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,可实现对中药质量更准确、更全面地控制。附子和川乌中生物碱类成分的变异系数结果可见,种植地的不同对附子中 6 种生物碱含量影响较大,而对川乌的影响较小,研究结果与核苷测定分析结果一致^[20]。聚类分析可将不同种植地质量优劣的附子和川乌分开,表明该方

法适用于附子和川乌生物碱类成分的数据分析。以 26 个不同地块种植的附子和川乌的 6 种生物碱测定结果,通过效/毒值分析、附子毒性成分指数分析、TOPSIS 分析可得到相近的结果,共同使用可得到更为准确的较优结果排名。附子毒性成分指数只适用于附子药材及其饮片进行以量评毒(效)的分析,川乌或是其他药材的毒(活)性成分指数的研究有待进一步的展开。

本研究结合差异显著性分析、聚类热图分析、效/毒值分析、毒性成分指数分析、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 6 种生物碱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,以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱 6 种生物碱为评价指标,15 号附子样品质量最优,7 号川乌样品质量最优。同一气候条件下,不同地块种植的乌头植物,附子与川乌药材的生物碱类成分含量存在差异,引起差异的原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [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] 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.
- [4] 徐 婷,钟凌云,罗诣涵. 不同姜制附子中 6 种生物碱含量的比较 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2555-2559.
- [5] 刘科兰,刘荣华,黄慧莲. 附子不同炮制品三种单酯型生物碱的含量差异研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 864-866.
- [6] 舒晓燕,余 马,侯大斌,等. 不同栽培区附子生物碱含量的比较研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(30): 10519-10520.
- [7] 黄志芳,易进海,陈东安,等. 制川乌 HPLC 特征图谱研究和 6 种酯型生物碱的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 217-221.
- [8] 赵 纳,侯大斌,刘向鸿. 不同炮制方法对附子中乌头总碱和双酯型生物碱含量的影响 [J]. 中药材, 2011, 34(1): 39-42.
- [9] Xie Y, Jiang Z H, Zhou H, *et al.* Simultaneous determination of six Aconitum alkaloids in proprietary Chinese medicines by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1093(1): 195-203.
- [10] 黄志芳,易进海,唐小龙,等. 乌头类药材酯型生物碱含量测定方法的优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 101-104.
- [11] 黄志芳,杨昌林,张意涵,等. UPLC-MS/MS 法测定市售附子中的 13 种生物碱 [J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(5): 505-508.
- [12] 唐小龙,易进海,夏燕莉,等. 不同炮制方法对附子 6 种酯型生物碱含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 96-100.
- [13] 张定堃,王伽伯,杨 明,等. 中药品质整合评控实践: 附子品质综合指数 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2582-2588.
- [14] 张定堃. 中药质量整合评控模式和方法研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 杨正明,刘 哲,邓秋林,等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5657-5664.