

液质联用技术追踪生物碱类成分在川乌茎叶生长周期的动态变化规律

李 燕¹, 贺亚男¹, 黄浩洲¹, 刘 彬², 傅超美¹, 耿福能², 许润春¹, 杨 明³, 张定堃^{1,2*}, 裴 瑾^{1*}

1. 成都中医药大学药学院 中药标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

2. 四川好医生攀西药业有限责任公司, 四川 西昌 615000

3. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 研究川乌茎、叶中生物碱类成分在不同生长期的含量变化。**方法** 采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 质谱采用 ESP 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式扫描; 建立 HPLC-MS/MS 方法同时测定川乌茎叶中乌头碱、新乌头碱、印乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头原碱、尼奥林、附子灵、宋果灵、塔拉乌头胺、去甲乌药碱、去甲猪毛菜碱 14 种生物碱的含量。结合主成分分析 (PCA) 追踪川乌茎叶在生长过程中不同生物碱的含量变化规律。**结果** 14 种生物碱在各自浓度范围内线性关系良好 ($r^2 > 0.990 0$), 定量限为 2.27~18.27 ng/mL, 平均回收率在 94.73%~104.50%。结果表明, 川乌茎叶中均含有相当量的生物碱, 且茎中生物碱总量高于叶, 茎在 5、6、7、8 月的生物碱总量分别为 0.087 1%、0.182 8%、0.141 0%、0.199 4%, 呈现波浪形上升趋势, 8 月份到达峰值; 叶在 5、6、7、8 月生物碱总量分别为 0.074 7%、0.075 9%、0.081 4%、0.058 9%, 呈现出先上升后下降的变化趋势, 叶中生物碱的总量 7 月最高。**结论** PCA 发现茎、叶中生物碱含量在不同时期表现出不同的变化趋势。茎中生物碱在采收期达到峰值, 生物碱含量可观, 具有成为新药资源潜力与开发价值。

关键词: 川乌茎叶; HPLC-MS/MS; 生物碱; 乌头碱; 新乌头碱; 印乌头碱

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1985-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.032

Dynamic changes of alkaloids in growth cycle in stems and leaves of *Aconitum carmichaelii* by HPLC-MS/MS

LI Yan¹, HE Ya-nan¹, HUANG Hao-zhou¹, LIU Bin², FU Chao-mei¹, GENG Fu-neng², XU Run-chun¹, YANG Ming³, ZHANG Ding-kun^{1,2}, PEI Jin¹

1. Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Good Doctor Panxi Pharmaceutical Co., Ltd., Xichang 615000, China

3. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the content changes of alkaloids in stems and leaves of *Aconiti Radix* at different growth period.

Methods The Phenomenex C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile was selected as mobile phase; The mass spectrum was scanned by ESI⁺ multiple reaction monitoring (MRM) mode. The HPLC-MS/MS method was established for the simultaneous determination of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, indaconitine, benzoyleaconine, benzoylmesaconine, benzoylhypaconitine, aconine, fuziline, neoline, talatisamine, songorine, higenamine, and salsoline in the stems and leaves of *Aconite Radix*. Combined with principal component analysis (PCA), the transfer rule of various alkaloids was tracked in the growth cycle of *Aconiti Radix*. **Results** Methodological validation results showed that the linear range of the 14 compounds was good ($r^2 > 0.990 0$). The limit of quantification was 2.27—18.27 ng/mL, and the average recovery was 94.73%—104.50%. The results showed that there was considerable amounts of alkaloids in stems and leaves of *Aconiti Radix*, and the total contents of alkaloids in

收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 四川省中医药管理局中医药科研专项 (2018QN008); 成都中医药大学中药学科特色创新科研团队 (CXTD2018006); 成都中医药大学科技发展基金资助项目 (ZRQN1515)

作者简介: 李 燕 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术、新工艺研究。Tel: 18408257866 E-mail: 3205418910@qq.com

*通信作者 张定堃 E-mail: 465790643@qq.com

裴 瑾 E-mail: peijin@163.com

stems were higher than those in leaves. In May, June, July, and August, the total content of alkaloids in stems was 0.087 1%, 0.182 8%, 0.141 0%, and 0.199 4% respectively, which showed a wave-like upward trend. The total content of alkaloids in leaves was 0.074 7%, 0.075 9%, 0.081 4%, and 0.058 9% respectively, which showed a trend of rising first and then decreasing, and the total content of alkaloids in leaves was highest in July. **Conclusion** PCA found that the alkaloids content in stems and leaves showed different variation trend in the different period. The considerable alkaloids in stems reached the peak value at the harvest time. The amount of alkaloids is considerable, which has the potential and development value of becoming new medicinal resources.

Key words: stem and leaves of *Aconiti Radix*; HPLC-MS/MS; alkaloids; aconitine; mesaconitine; hypaconitine

近年来,慢性病患率不断升高,经济资源短缺,病人对医疗服务需求不断增大,对医疗服务质量要求更高,使得寻找新的,更廉价,更安全的药用资源非常迫切。寻找未知资源作为药用,不仅需要投入较大的人力物力,而且风险大,研究周期长。但是,从已知药用植物的非传统药用部位着手开发新药,相对未知资源,不仅可以减少投入,降低风险,还可以综合利用药用资源,实现药用资源的可持续发展。

川乌,正名为乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx., 是毛茛科乌头属植物^[1],其母根与子根是确有疗效的毒性药材乌头与附子^[2],作用迅猛而独特,需求量巨大,是传统大宗药材。川乌作为川产道地药材,已经有 1 300 多年的栽培历史,其子根和母根被广泛用于治疗各种疾病,如风湿性关节炎^[3]、心律失常^[4]、腹泻^[5]、肿瘤^[6]以及内分泌失调^[7]等。但由于它的子根和母根有剧毒,临床上一经炮制加工后再使用,然而其有效成分在炮制加工中流失严重,直接使用毒性又太大,导致许多医生想用而不敢使用。

子根与母根为川乌的传统药用部位^[8],而占全植物生物量 40% 的茎叶部分^[9]则被遗弃不用,仅布拖地区年废弃物就达 1 500 t 以上,造成药用资源大量浪费。对《中国植物志》79 种乌头属植物调查发现^[10],所有植物均以块根入药,但也有 35 种以全草、叶、花、种子等部位入药,如草乌叶与草乌芽、榜嘎被《中国药典》2015 年版收录。在四川江油、布拖等地,亦有使用川乌茎叶水煎液熏洗、泡脚预防与治疗风湿疾病的经验^[11]。项目组前期研究发现,川乌茎叶与根部成分类似、活性相近,生物碱含量超过 0.1%^[12],具有良好镇痛抗炎作用,但毒性更低、安全窗更宽^[13]。基于民族民间用法与前期研究,提出川乌茎叶可能是外用治疗风湿类疾病的新药补充与替代资源,具有良好成药性与经济价值。通过新药部位与新提取物系统开发,有望变废为宝,延伸附子产业,践行精准扶贫,服务地方社会。本实验采用 HPLC-MS/MS 法对川乌茎叶生

长周期中 14 个生物碱成分进行含量监测^[12],以期通过对川乌茎、叶中生物碱类成分的分析比较,了解其不同生长期内含量的变化规律,为川乌资源的综合利用开发提供科学依据,推动中药资源绿色发展。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配有在线脱气机、四元泵、自动进样器)、Agilent 6460C 三重串联四极杆液质联用仪(配有 ESI 离子源),美国 Agilent 公司;BP211 DAG 电子分析天平(德国 Satoriusg 公司);KQ-300 DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯(Thermo fisher Scientific 公司);JYY-20M3 电压力锅(九阳股份有限公司);甲酸为色谱纯(成都科龙化工试剂厂),水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司),其余试剂均为分析纯。

对照品新乌头碱(MA,批号 MUST-16032504)、乌头碱(AC,批号 MUST-16062206)、次乌头碱(HA,批号 MUST-16032106)、乌头原碱(AN,批号 MUST-16060306)、尼奥林(NE,批号 MUST-16052503)、宋果灵(SO,批号 MUST-17022505)、塔拉乌头胺(TA,批号 MUST-16031801)、印乌头碱(DA,批号 MUST-16101810)购于成都曼斯特生物科技有限公司;苯甲酰新乌头原碱(BMA,批号 CHB151203)、苯甲酰乌头原碱(BAC,批号 CHB160912)、苯甲酰次乌头原碱(BHA,批号 CHB160326)、附子灵(FU,批号 CHB160812)、去甲乌药碱(HI,批号 CHB151111)、去甲猪毛菜碱(SA,批号 CHB160922)购于成都克洛玛生物科技有限公司。所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。川乌茎叶,2017 年 5 月—8 月实地采收于川乌主产区四川省布拖县火灯 GAP 精准扶贫基地,采样时在火灯村选定 3 个地块分期采样。各批样品均经成都中医药大学中药资源系裴瑾教授鉴定合格,为毛茛科乌头属植物川乌 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的茎、叶,统一处理,置阴凉通风处,晾干,粉碎过 2 号筛,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 2%~20% B; 1~5 min, 20%~50% B; 5~10 min, 50%~75% B; 10~15 min, 75%~100% B); 体积流量为 0.45 mL/min, 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.1.2 质谱条件 采用 ESI 源, 正离子模式检测; 脱溶剂温度 300 °C; 脱溶剂气流 N₂ 11 L/min; 雾化器压力 15 psi (1 psi=6.895 kPa); 毛细管电压 4 000 V; 扫描方式为 MRM 检测; 14 个化合物测定的离子对、碎裂电压和碰撞能量见表 1。待测成分的 MRM 色谱图见图 1。

表 1 14 种生物碱的质谱条件

Table 1 Forteen kinds of alkaloids of mass spectrometry data

生物碱	<i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
MA	632.3/105.1	180	46
AC	646.3/105.1	180	50
HA	616.3/105.0	180	46
DA	630.3/105.1	200	46
BMA	590.3/105.0	205	46
BAC	604.3/105.0	180	45
BHA	574.3/105.0	200	46
AN	500.3/58.1	180	48
FU	454.3/58.1	180	50
NE	438.3/58.1	180	46
TA	422.3/58.2	180	44
SO	358.3/58.0	140	40
HI	272.3/106.9	110	16
SA	180.2/117.0	100	20

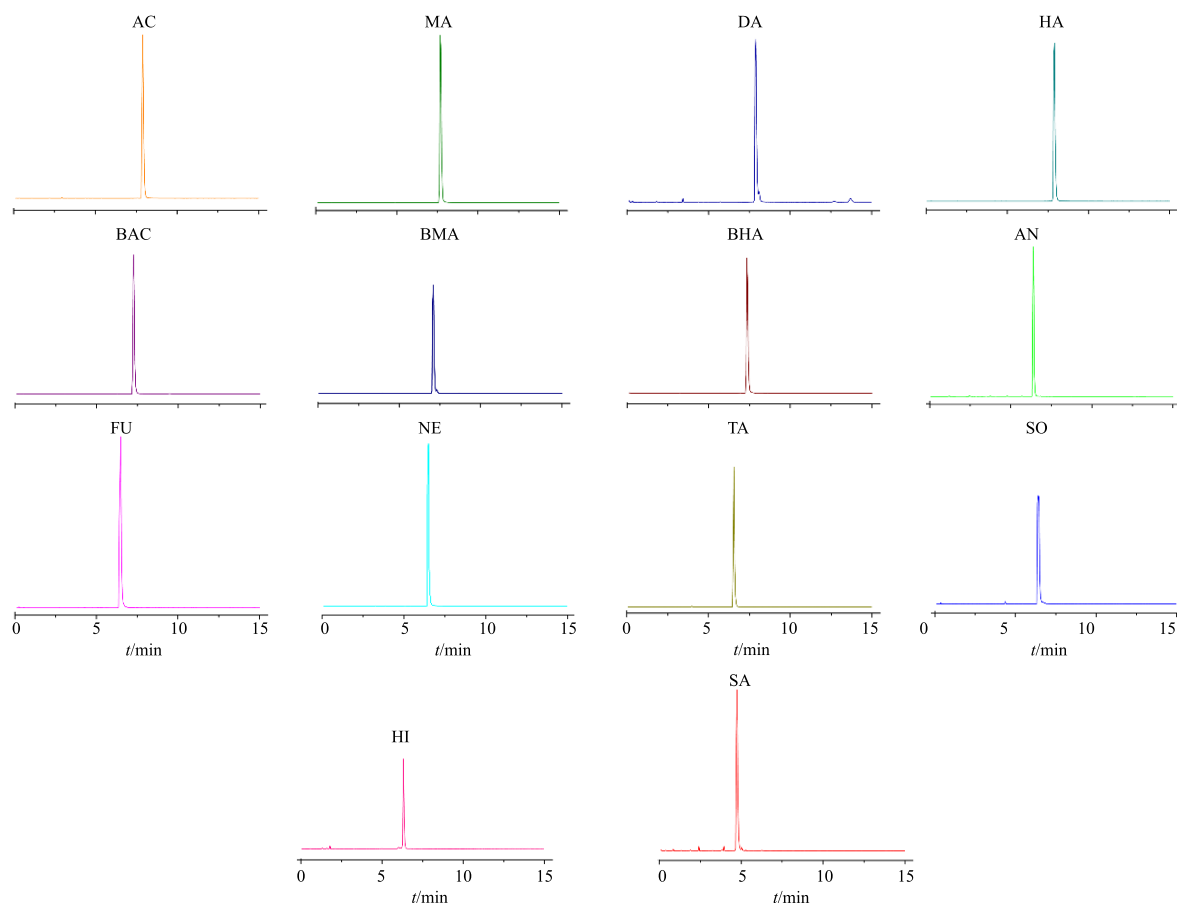


图 1 待测成分的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram for components to be tested

2.2 对照品溶液的制备

分别取各对照品适量, 精密称定, 用甲醇配制含 1.905 μg/mL AC、10.200 μg/mL MA、7.620 μg/mL HA、1.160 μg/mL DA、16.800 μg/mL BAC、

32.200 μg/mL BMA、4.500 μg/mL BHA、0.520 μg/mL AN、9.100 μg/mL FU、2.032 μg/mL NE、1.650 μg/mL TA、2.904 μg/mL SO、60.134 μg/mL HI、6.240 μg/mL SA 的对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取干燥后的川乌茎粉末各 0.1 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 称定质量, 超声提取 30 min, 取出, 放冷, 精密称定, 补足减失质量, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。川乌叶的制备方法同茎。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 方法学验证参照 ICH Q2B 技术指导原则

进行。取对照品溶液适量, 色谱甲醇稀释为不同浓度梯度对照品溶液, 在拟定的 HPLC-MS/MS 条件下测定。以待测物的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数。同时测定各待测物的定量限 ($S/N=10$) 和检测限 ($S/N=3$), 14 种生物碱的回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ 的结果见表 2。14 个生物碱有良好的线性关系 ($r^2>0.990\ 0$)。

表 2 14 种生物碱的回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 2 Forteen kinds of alkaloids of regression equation, correlation coefficient, linear range, LOD, and LOQ

生物碱	回归方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
AC	$Y=37\ 436\ X+900.91$	0.999 3	0.010 20~1.304 00	0.79	3.20
MA	$Y=19\ 840\ X+3\ 707.8$	0.998 9	0.045 00~11.520 00	0.77	3.02
HA	$Y=13\ 769\ X+7.464\ 8$	0.999 7	0.003 72~0.372 00	0.70	2.70
DA	$Y=17\ 124\ X-64.283$	0.996 7	0.003 48~0.464 00	0.66	2.60
BAC	$Y=14\ 991\ X-81.709$	0.993 5	0.003 36~0.336 00	0.71	2.91
BMA	$Y=11\ 976\ X-37.124$	0.996 6	0.004 83~0.644 00	0.74	3.09
BHA	$Y=17\ 357\ X-68.626$	0.996 0	0.003 60~0.360 00	0.87	3.37
AN	$Y=10\ 935\ X+82.031$	0.995 6	0.003 12~0.312 00	0.54	2.27
FU	$Y=13\ 671\ X+200.09$	0.999 3	0.018 20~1.820 00	3.86	15.86
NE	$Y=11\ 687\ X+1.789\ 2$	0.998 4	0.007 62~0.762 00	1.83	7.41
TA	$Y=22\ 519\ X-12.615$	0.999 9	0.006 70~0.670 00	1.66	6.65
SO	$Y=3\ 841.3\ X+82.675$	0.995 1	0.019 36~1.936 00	4.50	18.27
HI	$Y=4\ 081.8\ X+92.212$	0.999 2	0.008 04~0.804 00	1.79	7.32
SA	$Y=2\ 231.5\ X+35.356$	0.991 3	0.036 40~0.728 00	1.62	6.56

2.4.2 精密度试验 将母液稀释 10 倍, 按上述检测条件进行分析, 连续进样 6 针, 记录各组峰面积, 计算其 RSD 值。14 种生物碱精密度 RSD 均在 0.51%~4.65%, 表明该方法精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进行分析, 计算 14 种待测成分的 RSD 值。14 种生物碱的 RSD 均在 0.04%~4.40%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一茎粉末 0.1 g, 平行 6 份, 精密称定, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 川乌叶的制备方法同茎。进行 HPLC-MS/MS 分析, 根据所建立的标准曲线计算待测物质量分数及 RSD。14 种待测物重复性 RSD 均小于 3.85%, 表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定的茎粉末 0.05

g, 共 6 份, 精密称定, 置于 10 mL 具塞离心管中, 分别加入各对照品适量, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 川乌叶的制备方法同茎, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 计算各待测物的平均回收率及回收率 RSD。14 种待测物的加样回收率在 94.73%~104.50%, 回收率 RSD 在 1.19%~4.73%, 表明该方法的准确度良好。

2.5 样品测定

取川乌茎样品, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每个样品平行制备 6 份供试品溶液, 川乌叶的制备方法同茎。按照“2.1.1”和“2.1.2”项的条件进样测定, 带入线性回归方程计算各供试品溶液中 14 种生物碱的含量, 结果见表 3。川乌茎、叶中均含有相当量的生物碱类成分。对总生物碱来说, 茎在 5、6、7、8 月的总量分别为 0.087 1%、0.182 8%、0.141 0%、0.199 4%, 呈现 S 型变化趋

表 3 14 种生物碱的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Content of 14 kinds of alkaloid determination results ($\bar{x} \pm s, n=6$)

部位 月份		质量分数/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)							
		AC	MA	HA	DA	BAC	BMA	BHA	
茎	5	31.69 $\pm$ 3.15	135.21 $\pm$ 9.91	58.17 $\pm$ 4.93	4.45 $\pm$ 0.27	0.17 $\pm$ 0.02	133.58 $\pm$ 5.77	4.42 $\pm$ 0.58	
	6	125.48 $\pm$ 10.40	309.60 $\pm$ 14.40	221.32 $\pm$ 16.87	38.26 $\pm$ 3.95	0.35 $\pm$ 0.04	192.00 $\pm$ 8.30	11.63 $\pm$ 1.09	
	7	81.23 $\pm$ 6.53	295.60 $\pm$ 17.43	107.87 $\pm$ 6.81	7.27 $\pm$ 0.83	0.54 $\pm$ 0.07	300.82 $\pm$ 8.08	10.60 $\pm$ 1.25	
	8	129.35 $\pm$ 4.35	602.00 $\pm$ 6.39	163.64 $\pm$ 5.60	9.19 $\pm$ 1.06	0.98 $\pm$ 0.14	87.35 $\pm$ 9.28	6.57 $\pm$ 0.80	
叶	5	13.14 $\pm$ 1.92	113.01 $\pm$ 8.11	23.16 $\pm$ 2.82	2.67 $\pm$ 0.67	0.03 $\pm$ 0.01	10.84 $\pm$ 1.52	2.97 $\pm$ 0.40	
	6	23.31 $\pm$ 3.60	136.10 $\pm$ 18.87	40.48 $\pm$ 4.39	4.20 $\pm$ 0.46	0.05 $\pm$ 0.02	14.32 $\pm$ 1.10	6.52 $\pm$ 0.44	
	7	33.40 $\pm$ 2.16	199.74 $\pm$ 10.55	30.89 $\pm$ 2.33	3.15 $\pm$ 0.24	0.06 $\pm$ 0.02	64.27 $\pm$ 3.51	14.44 $\pm$ 1.69	
	8	6.48 $\pm$ 0.44	42.06 $\pm$ 3.48	40.01 $\pm$ 5.29	2.28 $\pm$ 0.26	0.04 $\pm$ 0.01	5.04 $\pm$ 0.50	8.29 $\pm$ 0.68	

部位 月份		质量分数/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)							
		AN	FU	NE	TA	SO	HI	SA	
茎	5	44.61 $\pm$ 2.87	118.22 $\pm$ 4.33	169.12 $\pm$ 7.87	3.65 $\pm$ 0.29	93.14 $\pm$ 2.74	9.60 $\pm$ 0.74	12.75 $\pm$ 0.83	
	6	9.98 $\pm$ 0.67	176.69 $\pm$ 9.60	625.84 $\pm$ 40.21	20.30 $\pm$ 1.42	108.61 $\pm$ 6.25	8.25 $\pm$ 1.62	50.09 $\pm$ 2.04	
	7	17.63 $\pm$ 1.12	63.82 $\pm$ 5.44	429.29 $\pm$ 26.05	5.63 $\pm$ 0.17	79.62 $\pm$ 4.49	7.73 $\pm$ 0.22	42.32 $\pm$ 2.48	
	8	9.02 $\pm$ 0.89	77.45 $\pm$ 3.03	249.01 $\pm$ 17.88	9.01 $\pm$ 0.64	502.71 $\pm$ 18.29	23.90 $\pm$ 2.23	256.20 $\pm$ 5.61	
叶	5	1.23 $\pm$ 0.04	21.59 $\pm$ 2.23	39.01 $\pm$ 1.79	4.11 $\pm$ 0.44	96.11 $\pm$ 3.20	71.77 $\pm$ 5.71	159.84 $\pm$ 7.03	
	6	2.69 $\pm$ 0.41	39.28 $\pm$ 6.41	129.75 $\pm$ 10.41	10.28 $\pm$ 2.10	23.82 $\pm$ 1.14	41.32 $\pm$ 3.29	225.06 $\pm$ 18.71	
	7	3.73 $\pm$ 0.51	31.33 $\pm$ 3.06	145.42 $\pm$ 5.75	5.08 $\pm$ 0.38	37.53 $\pm$ 6.29	64.95 $\pm$ 2.58	124.27 $\pm$ 9.03	
	8	1.19 $\pm$ 0.17	27.17 $\pm$ 2.58	55.36 $\pm$ 4.02	8.76 $\pm$ 1.10	134.36 $\pm$ 9.63	206.83 $\pm$ 12.56	74.65 $\pm$ 4.37	

势; 叶在 5、6、7、8 月生物碱总量分别为 0.074 7%、0.075 9%、0.081 4%、0.058 9%, 呈现出先上升后下降的变化趋势, 叶中生物碱的总量 7 月最高。如图 2 所示, 在茎中, AC、HA、DA、FU、TA 在川乌生长期均呈现 S 型变化趋势, 且均在 6 月份达到峰值, 下降一段时间后又开始上升; SA、SO 含量从 5 月开始升高, 6~7 月较稳定, 在 8 月剧烈升高; MA、BAC 一直呈现上升趋势; BMA、BHA 和 NE 的含量, 先呈上升趋势, 达到各自峰值后, 含量又呈下降趋势; HI 含量变化不大, 一直较为稳定。在叶中, AC、MA、BMA、BHA、FU、NE 的含量先呈上升趋势, 达到峰值后, 开始下降; HA、DA、TA 的含量均在 6 月达到峰值, 然后开始下降, 7 月以后又有所上升; SO、HI 在 6 月达到最低值, 此后呈上升趋势; BAC 的含量变化不大; SA 的含量一直呈上升趋势。茎中 AC、MA、SA 含量在 7 月急剧升高, 而叶中相应成分的含量却在 7 月骤然下降, 这可能是由于叶中相应成分转移到茎中所致。

2.6 主成分分析 (PCA)

PCA 为一种无监督的模式识别方法, 通过对数据进行降维处理, 可以从整体上直观地显示各组数据的差异^[14]。由于川乌茎、叶在生长期 14 个生物碱类成分的变化规律并不一致, 进一步采用 SIMCA 13.0 软件对数据进行降维处理。结果见图 3。

PCA 载荷图为确定产生差异的标志物质提供帮助, 载荷图上每一个点代表一个变量, 点的密度

越大, 说明该变量对分类的贡献最大。对于川乌茎来说, 如图 3-A、B 所示, 5 月与 6 月的欧氏距离较大, 主要由于 NE、DA、BHA 的含量引起。8 月份与其他月份距离较远, 主要是因为 BAC、SO、HI 的含量, 这 3 个生物碱的含量在 8 月达到了峰值。川乌叶中的生物碱含量在每一个月波动都较大, 见图 3-C、D。叶中生物碱波动的原因主要是由 BAC、NE、AN、AC、MA、BMA 的含量变化引起。茎叶 PCA 可以看出生物碱的含量变化不同时期表现出不同的变化趋势。

3 讨论

近年来, 由于城市化进程不断加快, 江油人民生活水平的不断提高, 川乌、附子已不再是当地农民的主要经济来源, 江油川乌、附子产量连年降低^[15]。四川凉山州布拖县是川乌、附子的新兴产区, 为附子精准扶贫产业基地, 更有“中国附子第一县”的称号^[16]。布拖县川乌的种植面积达 467 多公顷, 年产附子 2 000 多吨, 全国 60% 的附子均来自布拖。布拖地处高海拔地区, 最高海拔 3 891 m, 附子生长缓慢, 4 月份附子正处于幼苗期, 且当地传统的附子采收期为 8 月底 9 月初, 综合各种因素考虑, 课题组在布拖县火灯村附子精准扶贫产业基地定地块采取 5~8 月的川乌茎叶作为实验样品。

川乌中主要的抗炎镇痛成分是双酯型生物碱^[17] (AC、MA、HA)、单酯型生物碱^[18] (BAC、BMA、BHA)、醇胺型原碱 (AN), 其中双酯型生

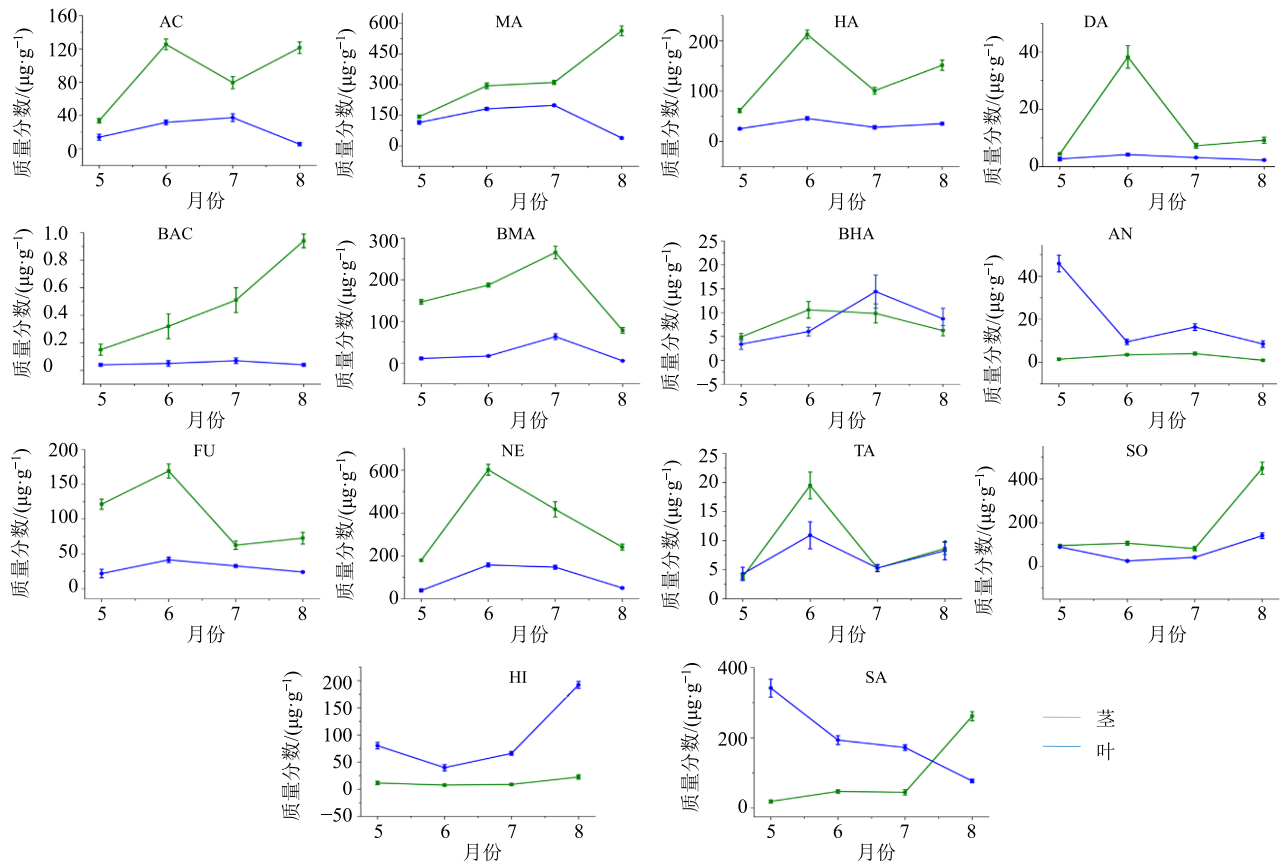


图 2 川乌茎、叶 14 个生物碱类成分含量在其生长期的动态变化趋势

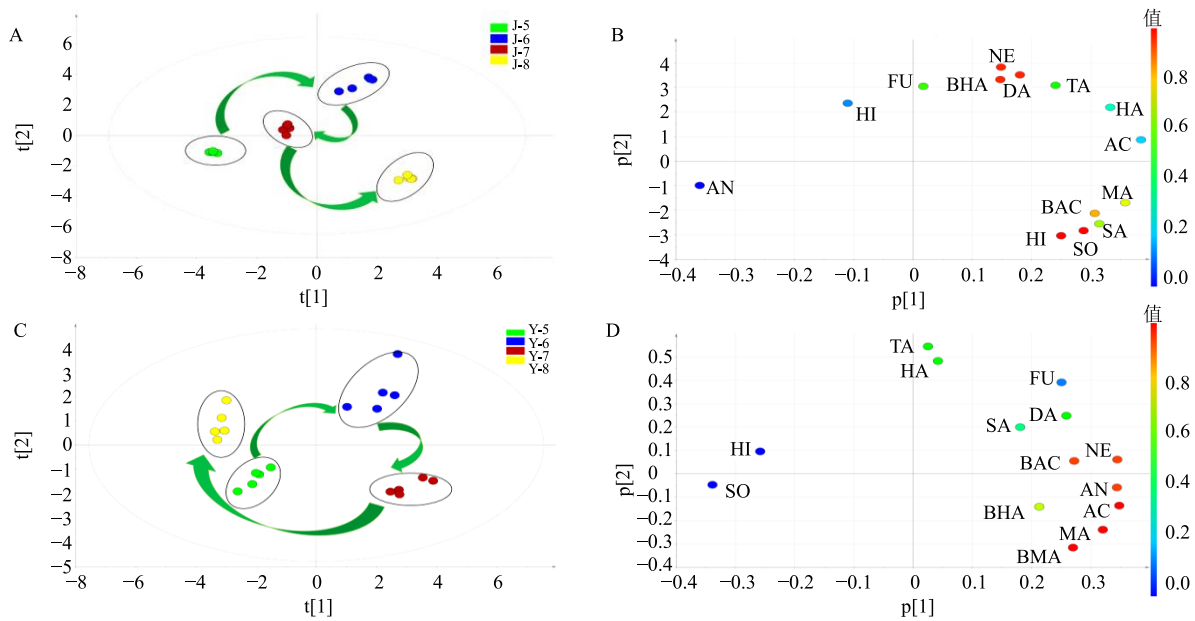
Fig. 2 Forteen alkaloids component content in stems and leaves of *Aconiti Radix* in growth period of dynamic change trend

图 3 川乌茎、叶中 14 个生物碱类成分在生长期的 PCA 得分图 (A、C) 与载荷图 (B、D)

Fig. 3 Forteen alkaloids contents stems and leaves of *Radix Aconiti* in growth period of PCA and chart (A, C) and load diagram (B, D)

物碱也是川乌中的主要毒性成分^[19]。《中国药典》2015年版规定,川乌中双酯型生物碱的总量应为0.05%~0.17%;附子中单酯型生物碱的总量不少于0.01%^[20]。在5~8月川乌茎中双酯型生物碱的总量分别为0.022 5%、0.065 6%、0.048 5%、0.089 5%;单酯型生物碱的总量分别为0.013 8%、0.020 4%、0.031 2%、0.094 9%。川乌叶中双酯型生物碱的总量分别为0.012 9%、0.020 0%、0.026 4%、0.088 5%;单酯型生物碱的总量分别为0.001 4%、0.002 1%、0.007 7%、0.001 3%。FU、NE、SO也是抗炎镇痛活性之一^[21],且在茎叶中含量较高,尽管川乌茎中双酯和单酯的含量刚好符合药典的要求,叶中单酯和双酯含量低于药典要求,但是川乌茎叶仍具有开发成为抗炎镇痛类药物的价值。HI和SA是附子中主要的强心物质^[22],并且还具有抗心律失常和降压作用,TA是附子中抗心律失常的主要活性成分。川乌茎叶中TA含量较低,HA和SI含量在8月显著升高,具有开发潜力。从实验结果可以看出,川乌茎中总生物碱含量在8月达到最高,而叶中总生物碱含量则在7月份达到最高。但川乌的传统采收期为8月底或9月初^[23],若在7月或者8月采收川乌,此时川乌的地下部分尚未完全成熟,不利于主要药用资源的利用。因此,考虑川乌资源的综合开发利用,应当在川乌的传统采收期,收集川乌的地上、地下部分,将地上部分开发为新的药用资源。

通过研究与民间用药用法发现,川乌茎叶中含有相当量生物碱类成分,具有作为一种新的药用资源的潜力。加之,布拖县是国家精准扶贫的重点对象,川乌的综合开发,有利于当地农民脱贫致富,推动地方经济发展。总的来说,川乌茎叶安全性较高,又容易获得,具有开发成为新的药用资源的潜力。

志谢:四川好医生攀西药业有限责任公司尾种拉贵、王长虹师傅与火灯村村支书马查阿俄同志在采样过程中提供帮助。

参考文献

- [1] 李谦,过立农,郑健.乌头属药用植物的研究进展[J].药物分析杂志,2016,36(7):1129-1149.
- [2] 张定堃,韩雪,李瑞煜,等.UPLC-Q-TOF-MS分析不同产地泥附子化学成分的差异[J].中国中药杂志,2016,41(3):463-469.
- [3] 王玉,涂胜豪.乌头汤加味治疗类风湿关节炎临床研究[J].中医学报,2017,32(9):1716-1719.
- [4] 赵志浩,张定堃,吴明权,等.基于大鼠室性早搏心脏毒性的附子质量生物评价方法研究[J].中国中药杂志,2016,41(20):3814-3820.
- [5] 白云飞,林志健,张冰,等.祛风湿类中药饮片安全问题分析与用药警戒思考[J].中华中医药杂志,2016,31(10):4117-4123.
- [6] 郑亚秋,耿胜男,孟明静,等.川乌对小鼠二阶段皮肤乳头状瘤的抑制作用[J].河南大学学报:医学版,2016,35(1):5-8.
- [7] 王晓丽,李丽静,李玉梅,等.附子与人参不同配伍对心肌细胞的减毒作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(11):153-158.
- [8] Duc L V, Thanh T B, Huu T N, et al. Alkaloids isolated in the roots of *Aconitum Carmichaeli* Debx growing in Vietnam [J]. *Inter J Pharm Phytochem Res*, 2015, 7(3): 576-578.
- [9] 欧水平.基于“一体多用”的乌头新药部位及制剂研究——川乌头茎叶治疗类风湿性关节炎的成药性研究[D].成都:成都中医药大学,2013.
- [10] 吴征镒,陈心启.中国植物志(第1卷)[M].北京:科学出版社,2004.
- [11] 李凤,陈昌霞.川乌茎叶中生物碱提取及含量测定[J].黑龙江科技信息,2007(16):39-39.
- [12] 欧水平,郑琴,王森,等.乌头各组织部位生物碱类成分动态差异性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):83-87.
- [13] 李梦然,曲玮,梁敬钰.乌头属化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2010,22(4):1-6.
- [14] 邢俊鹏,林娜,刘志强,等.超高效液相色谱-质谱结合主成分分析方法研究制川乌配伍前后的肠内菌代谢差异[J].分析化学,2014,42(11):1646-1650.
- [15] 马建烈.四川道地药材附子栽培技术[J].四川农业科技,2016(3):12-14.
- [16] 刘振启.走进四川布拖附子GAP种植生产基地[J].首都医药,2012,19(5):39.
- [17] 杨华生,黎晓丽,闻丽珍,等.基于经皮给药途径研究白芍对制川乌6个酯型生物碱组织分布的影响[J].药物分析杂志,2017,37(6):1029-1037.
- [18] 熊茜,潘媛,张婷,等.HPLC-MS/MS多组分定量测定结合化学计量学研究市售小金丸的质量一致性[J].中草药,2017,48(11):2189-2196.
- [19] 王蕾,张先灵,王鑫,等.UPLC-MS法对生川乌、生附片化学成分的比较研究[J].药物分析杂志,2017,37(9):1640-1647.
- [20] 中国药典[S].一部.2015.
- [21] 李燕,李芸霞,龚小红,等.附子灵和尼奥宁的药理研究进展[J].中药与临床,2014,5(3):56-58.
- [22] Guo S, Li P, Fu B, et al. Systems-biology dissection of mechanisms and chemical basis of herbal formula in treating chronic myocardial ischemia [J]. *Pharm Res*, 2016, 114: 196-208.
- [23] 邵财,张浩,张亚玉.草乌适宜采收期的初步研究[J].时珍国医国药,2016,27(2):470-472.