

采用傅里叶变换红外光谱和 HPLC 法分析附子炮制品黑顺片和白附片差异

蒲婷婷¹, 刘杰¹, 周忠瑜¹, 管芹¹, 张蕾², 陶爱恩^{1*}, 段宝忠^{1*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 大理州种子管理站, 云南 大理 671000

摘要: **目的** 基于成分分析探讨黑顺片和白附片的差异。**方法** 基于傅里叶红外光谱 (fourier transforms infrared, FTIR) 和 HPLC, 结合化学计量学方法, 对黑顺片和白附片的整体化学成分进行研究, 并通过独立样本 *t* 检验对其有效和毒性成分含量进行比较分析。**结果** FTIR 结合正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 结果显示, 白附片和黑顺片整体化学成分差异明显, 饮片类型的差异高于产地差异; HPLC 的聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、OPLS-DA 和相似度分析 (similarity analysis, SA) 均能将黑顺片、白附片区分为 2 类, 表明 2 种饮片的成分差异较大; 含量测定结果显示, 黑顺片的单酯型生物碱量显著高于白附片, 具有统计学意义 ($P < 0.01$), 而双酯型生物碱含量差异不显著, 无统计学意义。**结论** 白附片和黑顺片化学成分差异较大, 临床上应区分使用, 古代本草“白缓黑急”理论具有一定的合理性。

关键词: 黑顺片; 白附片; 化学表征; 白缓黑急; 合理性; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰新乌头碱; 苯甲酰次乌头碱; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)02-0596-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.025

Differences between processed product Heishunpian and Baifupian using fourier transform infrared spectroscopy and HPLC

PU Tingting¹, LIU Jie¹, ZHOU Zhongyu¹, GUAN qin¹, ZHANG Lei², TAO Aien¹, DUAN Baozhong¹

1. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China

2. Dali Seed Management Station, Dali 671000, China

Abstract: Objective To explore the rationality for clinical application of Heishunpian and Baifupian based on chemical composition. **Methods** Fourier transforms infrared (FTIR), high-performance liquid chromatographic (HPLC), and combined with pattern recognition methods were used to investigate the difference in comprehensive chemical composition of Heishunpian and Baifupian. Furthermore, the content of active and toxic components of Heishunpian and Baifupian was comparative analyzed using Student's *t*-test. **Results** The FTIR combined with orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) analysis revealed a significant difference in the chemical ingredients of Heishunpian and Baifupian, which was more influenced by the decoction type than the region. While the Heishunpian was distinguishable from Baifupian by hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), OPLS-DA, and similarity analysis (SA) of HPLC, there was a significant difference in composition. Compared with Baifupian, Heishunpian showed a significant increase in monoester diterpenoid alkaloids ($P < 0.01$), but no significant difference in diester diterpenoid alkaloids according to the content determination results. **Conclusion** The chemical composition of Heishunpian and Baifupian exhibited apparent discrepancies, which are used for different diseases in clinics. The theory of “Baihuanheiji” in ancient materia medica is reasonable.

Key words: Heishunpian; Baifupian; chemical characterization; Baihuanheiji; reasonable; benzoyleaconine; benzoylmesaconine; benzoylhypaconine; aconitine; mesaconitine; hypaconitine

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 云南省专家工作站 (202105AF150053); 云南省重大科技专项 (202002AA100007); 云南省万人“青年拔尖人才”计划 (YNWR-QNBJ-2020251)

作者简介: 蒲婷婷, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: bravosy_520@126.com

*通信作者: 段宝忠, 教授, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (0872)2257411 E-mail: bzduan@126.com

陶爱恩, 讲师, 研究方向为道地药材与民族药资源开发。E-mail: 2515073996@qq.com

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum armichaelii* Debx. 的子根加工品, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效, 用于亡阳虚脱、肢冷脉微和心阳不足等^[1], 因其具有毒性, 临床上主要使用其炮制品^[2], 炮制后能有效降低毒性、改变药性、提高药效^[3-4]。目前附子炮制品主要以黑顺片和白附片为主^[5-6], 从炮制工艺来看黑顺片、白附片的主要差异在于去皮者为“白附片”, 不去皮者为“黑顺片”。针对 2 种附片的使用, 历代医籍大多记载为“白缓黑急”, 即病轻、缓者, 以去皮炮制后的附子入药, 如《伤寒论》治少阴病、手足痛^[7], 《普济方》治大便秘结^[8], 《本草拾遗》治喉痹肿塞^[9]; 病较急者则以不去皮炮制后的附子入药^[10], 如《经验方》治呃逆翻胃^[11], 《宣明论方》治一切厥心痛^[12], 《简易方论》治中风偏废^[11]。目前, 黑顺片和白附片均被用于治疗急性心肌梗死、冠心病和慢性心力衰竭等^[13-14], 临床上并无严格区分^[15], 与古代传统应用不一致, 二者是否应区分使用, 是值得关注和思考的问题。关于黑顺片和白附片, 已有学者报道了指纹图谱和含量测定等研究^[16-18], 但尚未见采用多维仪器联用结合化学计量学从整体化学成分、主要活性组分和毒性指标差异性, 探究附子饮片“白缓黑急”临床应用的合理性。已有大量研究表明, 附子不同炮制品的功效与化学成分差异密切相关^[19-20], 鉴于此, 本研究采用傅里叶变换红外光谱 (fourier transforms infrared, FTIR) 和 HPLC, 结合化学计量法对黑顺片、白附片整体成分、主要活性组分和毒性指标成分的等同性和差异性进行了探讨, 以期安全、合理地应用黑顺片和白附片奠定科学基础。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Nexus 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo Nicolet 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (G1322A 型在线脱气机、G1311A 型四元梯度泵、G1313A 型进样器、G1316A 型柱温箱、G1314A 型 VWD 检测器和 Chem Station 色谱工作站); MS205DM 型电子天平 (梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司); HW-3 型红外烘干箱 (天津市光学仪器厂); HY-12 型压片机 (天津天光光学仪器有限公司); FY135 型中草药粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); SB25-12D 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 材料

光谱级溴化钾单晶粉末 (批号 170421) 购自天津天光光学仪器有限公司; 对照品苯甲酰乌头碱 (批号 MUST-18110710)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 MUST-19032406)、苯甲酰次乌头碱 (批号 MUST-19032807)、乌头碱 (批号 MUST-18110905)、新乌头碱 (批号 MUST-19080210)、次乌头碱 (批号 MUST-18111308) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司, 以上对照品质量分数均 >98%。色谱级乙腈 (批号 20171031) 购自德国默克公司; 乙酸铵 (批号 C11805665) 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。35 批饮片样品购于云南、四川当地市场, 经大理大学段宝忠教授鉴定为毛茛科植物乌头 *A. carmichaelii* Debx. 的子根加工品, 详细信息见表 1。

表 1 35 批饮片样品信息

Table 1 Information of decoction pieces of 35 batches of samples

编号	饮片名称	产地
S1~S10	黑顺片	云南大理
S11~S16	黑顺片	四川江油
S17~S18	白附片	云南丽江
S19~S29	白附片	云南大理
S30~S35	白附片	四川江油

2 方法

2.1 FTIR

2.1.1 供试品的制备 取样品粉末 1 mg 至玛瑙研钵中, 加入溴化钾粉末 200 mg 作为分散剂, 混合研磨均匀, 取适量细粉平铺于模具中, 以 20 MPa 压片, 压制 1 min, 取出, 对光检视, 以样品均匀、半透明为佳, 作为供试品^[21]。

2.1.2 FTIR 条件和方法学考察 光谱扫描范围 400~4 000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描累加 32 次, 每次扫描时均扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰。精密度、稳定性实验等参照本课题组已发表文献方法进行^[22]。

2.2 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 对照品溶液的制备 取对照品苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 以甲醇超声溶解并定容至刻度, 分别制成 1.80、1.80、1.60、2.05、2.05、1.10 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛) 2 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加氨试液 3 mL, 精密加入异丙醇-醋酸乙酯(1:1) 50 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 补足减失的质量, 离心 15 min (3000 r/min)。取上清液于 50 ℃ 水浴挥干, 残渣精密加入异丙醇-三氯甲烷(1:1) 混合溶液 2 mL 溶解, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

2.2.3 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈(A)-0.1 mol/L 醋酸铵(B)为流动相; 梯度洗脱程序为: 0~10 min, 10% A; 10~23 min, 10%~35% A; 23~33 min, 35% A; 33~47 min, 35%~58% A; 47~53 min, 58%~100% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样体积 10 μL; 检测波长 235 nm。

2.2.4 稳定性试验^[23] 精密称定 S1 样品粉末, 按“2.2.2”项方法制备样品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样测定, 记录色谱峰。以保留时间、峰面积均适中且分离度较好的苯甲酰新乌头原碱为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。其峰面积的 RSD 分别为 1.64%、1.85%、1.47%、1.67%、1.55%、1.96%、1.87%。

2.2.5 精密度试验^[23] 精密吸取供试品溶液(S1), 按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 进行精密度考察, 以苯甲酰新乌头原碱为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。6 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.998%、0.97%、1.34%、1.13%、0.78%、1.21%。

2.2.6 重复性试验^[23] 精密吸取供试品溶液(S1), 平行 6 份, 按“2.2.3”项下色谱条件分别进样测定, 以苯甲酰新乌头原碱为参照峰, 计算峰面积。6 种生物碱含量的 RSD 值分别为 0.96%、1.24%、1.11%、0.88%、0.79%、1.05%。

2.3 指标成分测定

2.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2.1”项。

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.2.2”项。

2.3.3 色谱条件 同“2.2.3”项。

2.3.4 方法学考察 精密度、重复性、稳定性试验参考本课题组^[23]之前研究, 均符合要求。精密吸取供试品溶液(S1), 平行 6 份, 分别加入 6 个对照品适量, 按“2.2.3”项色谱条件记录色谱图。苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱、

乌头碱、新乌头碱、次乌头碱平均加样回收率分别为 98.34%、97.19%、94.58%、100.45%、99.88%、101.20%, RSD 分别为 1.08%、1.23%、1.53%、1.70%、1.12%、1.13%。

2.3.5 线性关系考察 分别精密吸取各化合物对照品贮备液, 逐级稀释, 配成 6 个浓度, 每个对照品进样 5 μL, 进样测定。以进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 3 所示。苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱线性回归方程分别为 $Y=270.22 X+6.847 6$ ($R^2=0.999 9$)、 $Y=229.9 X+5.725$ ($R^2=0.998 9$)、 $Y=209.05 X+6.994$ ($R^2=0.998 7$)、 $Y=173.58 X+5.027 9$ ($R^2=0.998 2$)、 $Y=365.86 X+19.023$ ($R^2=0.998 4$) 和 $Y=115.21 X+14.595$ ($R^2=0.997 9$), 线性范围分别为 0.18~3.60、0.18~3.60、0.16~3.20、0.205~4.100、0.205~4.100 和 0.11~2.20 mg/mL。

2.3.6 样品含量测定 分别取 35 批样品 2 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进样, 每个样品平行 3 份, 采用外标法计算苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的含量。

2.4 数据分析

红外光谱数据采用 OMNIC 9.2 软件进行坐标归一化、基线校正和自动平滑等处理, 并计算二阶导数, 红外指纹图谱采用 OriginPro 2018 绘制^[24]; HPLC 指纹图谱相似度采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版)进行计算^[25]; 聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)和统计学检验采用 IBM SPSS (version 19.0) 软件; 主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares-discrimination analysis, OPLS-DA)采用 SIMCA 13.0 软件^[26]。

3 结果与分析

3.1 FTIR 指纹图谱分析

3.1.1 方法学结果 精密度实验结果显示各光谱间相关系数均大于 0.999 6, RSD 为 0.09%; 重复性结果显示各光谱间相关系数均大于 0.999 3, RSD 为 0.06%; 稳定性结果显示各光谱间相关系数均大于 0.999 1, RSD 为 0.52%, 表明供试品 5 h 内稳定。

3.1.2 FTIR 指纹图谱 红外光谱技术可从药材的整体化学信息探究饮片质量的等同性和差异性^[27-28]。黑顺片和白附片的平均红外光谱见图 1，从图 1 中可以看出，二者峰形、峰位基本相似，而峰高，即吸光度 (A) 值具有差异，表明附子饮片中化学成分组成基本相同，但累积量不同；中强度吸收 578.66 cm^{-1} 可能为脂肪酮的 C-CO-C 面内弯曲振动， 767.44 cm^{-1} 和 858.75 cm^{-1} 归属为苯环 C-H 键的弯曲振动， 926 cm^{-1} 归属于烯烃中 C-H 面内变形振动， $1\,028.04\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,084.47\text{ cm}^{-1}$ 主要为羰基 C-O 键的弯曲振动， $1\,158.34\text{ cm}^{-1}$ 处为 C-O 单键伸缩振峰， $1\,367.64$ 和 $1\,425.10\text{ cm}^{-1}$ 为烷烃中 CH_3 的 C-H 键的弯曲振动所产

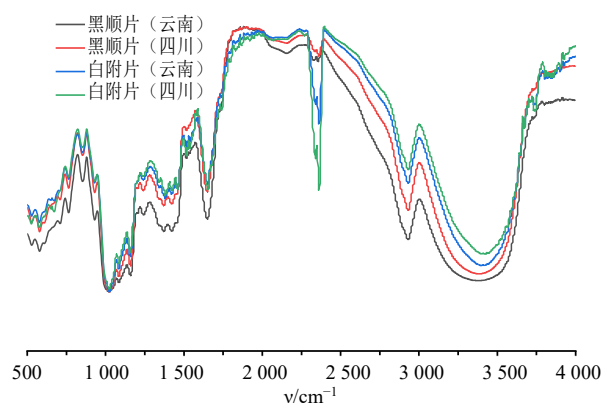


图 1 黑顺片和白附片的平均红外光谱图
Fig. 1 Average infrared spectra of Heishunpian and Baifupian

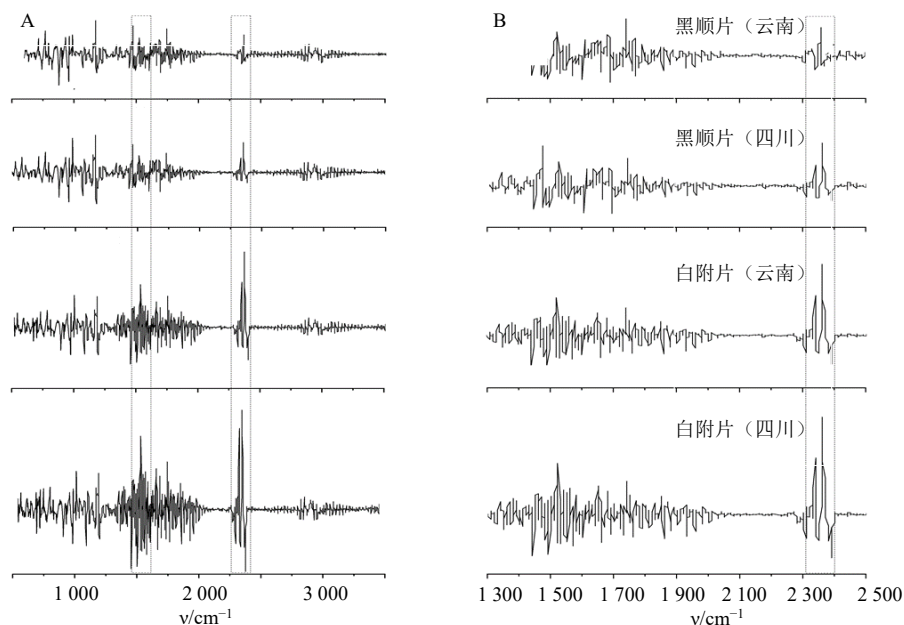


图 2 黑顺片和白附片的红外二阶导数图谱 (A) 及其局部放大图 (B)
Fig. 2 Second derivative FTIR spectra (A) and local enlarged drawing (B) of Heishunpian and Baifupian

生的吸收峰， $1\,645.69\text{ cm}^{-1}$ 归属于 C=C 键伸缩振动峰， $2\,160.74$ 和 $2\,359.78\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰归属 C≡C 的吸收振动， $2\,931.26\text{ cm}^{-1}$ 为亚甲基的 C-H 振动伸缩^[29-30]。为进一步探讨 2 种附片整体化学成分的差异，提高样品鉴别的分辨率^[22,31]，本研究对红外光谱数据进行二阶导数处理，结果见图 2，可见 2 种附片在 $1\,430\sim 2\,000\text{ cm}^{-1}$ 羰基特征区处的“锯齿”吸收峰，数量和强度存在明显差异。

3.1.3 OPLS-DA 为更直观表征黑顺片和白附片整体化学成分差异，采用 OPLS-DA 进行分析，将 35 批样品红外光谱矩阵数据导入 SIMCA 13.0，绘制散点图，结果见图 3。结果显示，云南和四川产黑顺片和白附片分别聚为 2 大类 (I、II)，2 种饮片类型明显分开，同一饮片类型下，亦可根据产地进行区分，表明白附片和黑顺片整体化学成分差异明显，饮片类型差异高于产地差异。

3.2 HPLC 指纹图谱分析

3.2.1 HPLC 指纹图谱 为进一步探究黑顺片与白附片主要活性组分差异。取上述 35 批样品，按照“2.2.2”项下方法制备供试品，“2.2.3”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。19 批白附片和 16 批黑顺片的指纹图谱分别导入《中药指纹图谱相似度评价系统》，采用中位数法进行多点校正，时间窗宽度设置为 0.1 min，生成各自的共有模式指纹图谱及叠加指纹图谱，结果见图 4。通过与混合对照品保留

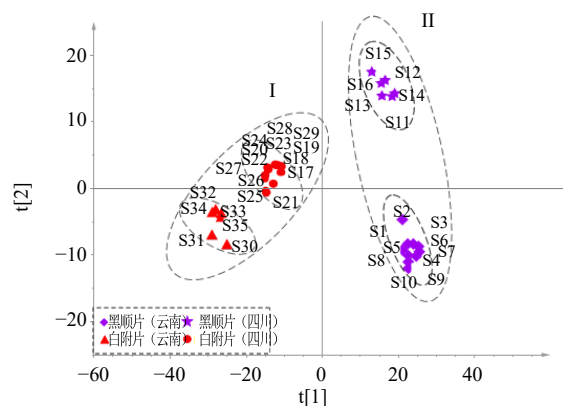
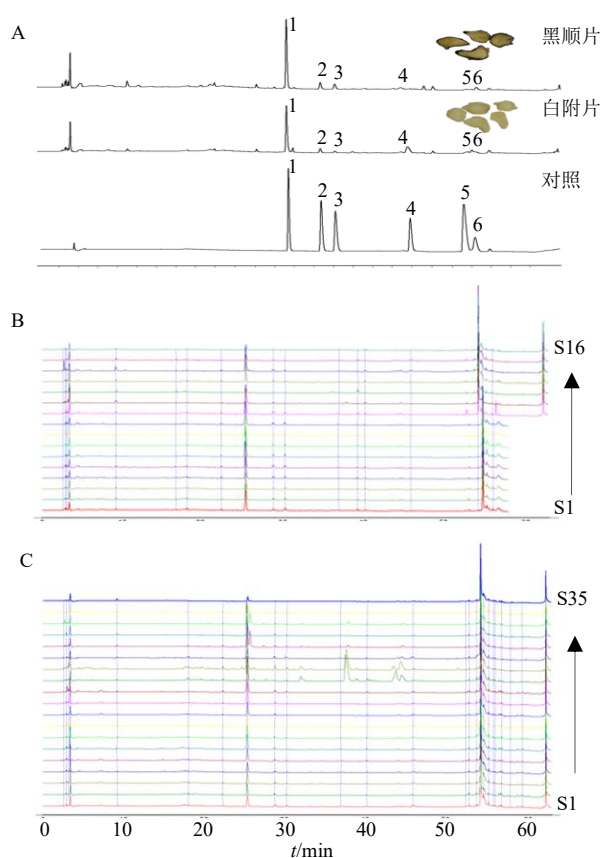


图 3 35 批样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot for 35 batches of samples



1-苯甲酰乌头原碱, 2-苯甲酰新乌头碱, 3-苯甲酰次乌头碱, 4-乌头碱, 5-新乌头碱, 6-次乌头碱。

1-benzoylaconine, 2-benzoylmesaconine, 3-benzoylhypaconine, 4-aconitine, 5-mesaconitine, 6-hypaconitine

图 4 黑顺片和白附片样品共有指纹图谱 (A)、黑顺片叠加指纹图谱 (B) 和白附片的 HPLC 叠加指纹图谱 (C)

Fig. 4 HPLC of mutual fingerprint of Heishunpian and Baifupian (A), HPLC superimposed fingerprint of Baifupian (B) and r Baifupian (C)

时间比对, 确认 1、2、3、4、5、6 号峰分别为苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱。

3.2.2 相似度分析 (similarity analysis, SA) 将 19 批白附片和 16 批黑顺片导入软件进行分析, 分别生成共有模式指纹图谱, 35 批样品分别与白附片和黑顺片的共有模式图谱比较, 计算相似度, 结果显示, 19 批白附片与分差异较大, 相比饮片类型, 产地对成分的影响相对较小。

白附片共有模式图谱比较, 相似度为 0.808~0.908, 与黑顺片共有模式图谱比较, 相似度均小于 0.5; 16 批黑顺片与黑顺片共有模式图谱比较, 相似度为 0.806~0.990, 与白附片共有模式图谱比较, 相似度均小于 0.5, 通过相似度值可有效区分白附片和黑顺片, 见图 5。上述结果表明黑顺片和白附片的组内及组间相似度具有明显区分度, HPLC 指纹图谱主要组分差异较大。

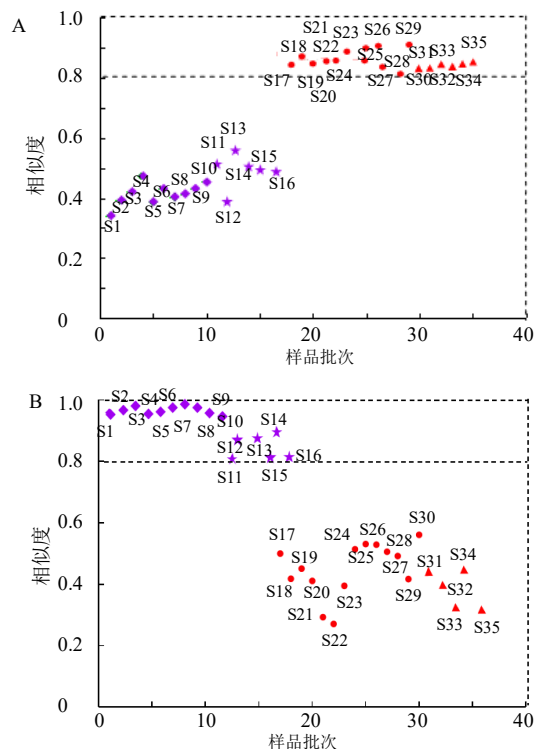


图 5 白附片 (A) 和黑顺片 (B) 的相似度结果分布图

Fig. 5 Similarity evaluation results of Baifupian (A) and Heishunpian (B)

3.2.3 HCA 以 35 批样品的共有峰的峰面积为变量, 采用组间联接法和欧几里得度量法进行系统聚类, 结果见图 6。根据聚类图可以看出, 当分类距离为 20 时, 35 批样品被划分为 2 个类群, 其中 16

批黑顺片(S1~S16)聚为第 I 类; 19 批白附片(S17~S35)聚为第 II 类, 表明不同附子饮片类型的化学组分存在明显差异, 而相同饮片不同产地的活性组分指纹图谱较为一致, 提示附片质量与其炮制工艺存在较高相关性, 与产区相关性较弱, 该结果与相似度评价结果一致。

3.2.4 PCA 将 35 批样品的共有峰的峰面积数据导入 SIMCA 13.0 软件, 采用无监督模式识别方法进行 PCA, 并绘制得分散点图, 结果见图 7。模型解释率参数 R^2_X 为 0.69, 预测能力参数为 0.39, 表明提取的主成分可解释 69% 的原始变量, 模型预测能力为 39%。从 PCA 散点图可看出, 35 批样品聚为 2 组, 不同产地的白附片和黑顺片分别聚为 2 类,

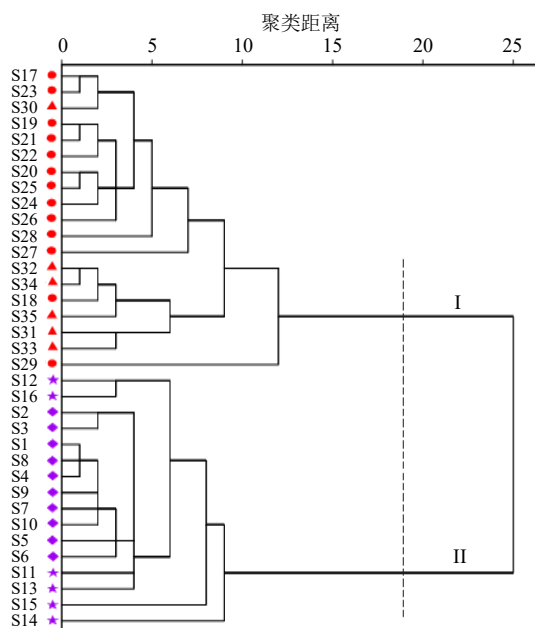


图 6 35 批样品的聚类分析树状图

Fig. 6 Dendrogram of cluster analysis for 35 batches of samples

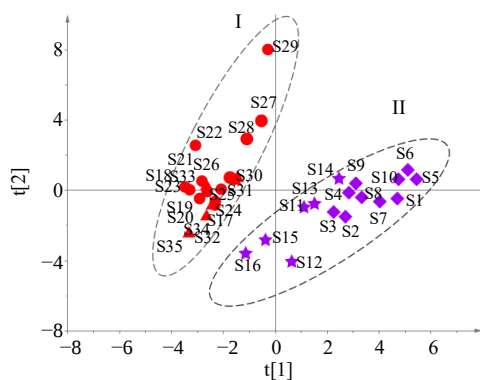


图 7 35 批样品 PCA 得分图

Fig. 7 PCA score plot for 35 batches of samples

2 种饮片类型明显分开, 而产地相互交叉, PCA 结果与 HCA 一致, 表明白附片与黑顺片主要活性组分差异较大, 相比饮片类型, 产地对成分的影响相对较小。

3.2.5 OPLS-DA 为进一步筛选导致黑顺片和白附片产生差异标志性成分, 将 35 批样品共有峰的峰面积数据, 导入 SIMCA 13.0 进行有监督模式的 OPLS-DA, 见图 8。结果显示, 该预测模型累计解释能力参数 R^2_X 为 0.67, R^2_Y 为 0.76, 预测能力 Q^2 为 0.60, 均大于 0.5, 表明模型稳定可靠、预测能力强; 此外, 采用置换检验 ($n=200$) 验证, 结果显示左端随机排列产生的 R^2 和 Q^2 均小于右端的原始值[检验参数 $R^2=(0.0, 0.225)$, $Q^2=(0.0, -0.42)$], 表明所建 OPLS-DA 模型拟合度良好。OPLS-DA 得分图见图 8-A, 可见 35 批样品划分为 2 类, 黑顺片聚为一类, 白附片聚为另外一类, 结果与 PCA 一致。根据变量重要性投影值 (VIP) 越高对组间差异的影响越大^[32], 以 VIP 值 >1 为阈值, 筛选出 15 个差异性质量标志物, 结果见图 8-B, 得分前 3 名的分别是 9、25、18 号峰, 提示这 3 个成分是白附片和黑顺片的差异标志性成分, 其中 18 号峰与对照品保留时间比对确认为苯甲酰乌头原碱, 另外 2 个峰需进一步确认。

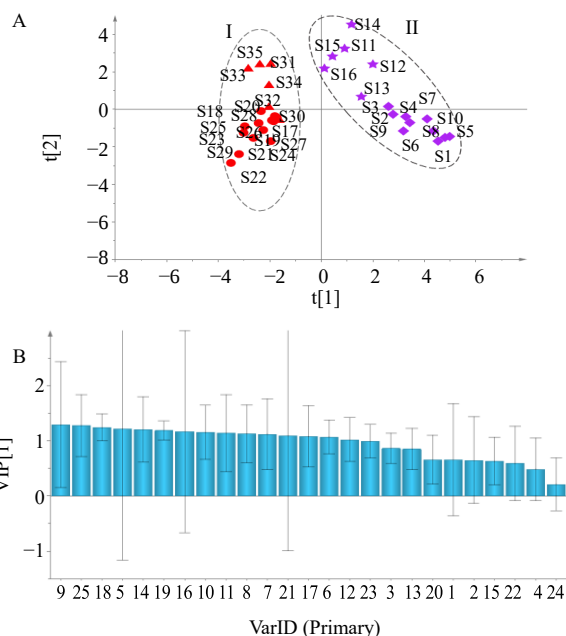
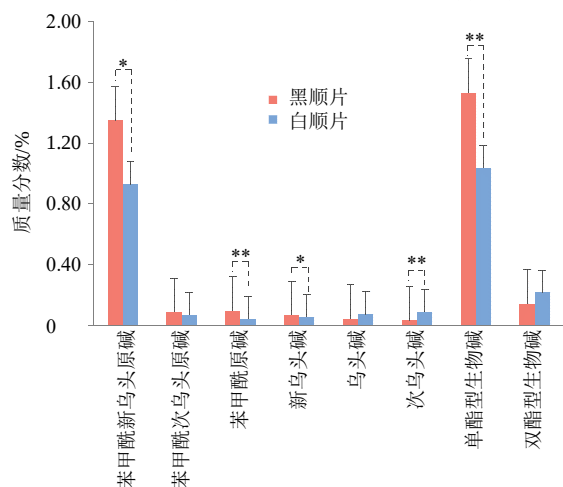


图 8 35 批样品的 OPLS-DA 得分图 (A) 及其 VIP 值 (B)

Fig. 8 OPLS-DA score plot (A) and VIP values (B) for 35 batches of samples

3.3 活性成分含量

为了辨识 2 种饮片的差异,本研究对白附片和黑顺片的 6 种成分含量进行了测定,包括活性成分单酯型生物碱(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)和毒性成分双酯型生物碱(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱),结果表明白附片的单酯型生物碱和双酯型生物碱质量分数分别为 0.003%~0.017%和 0.001%~0.017%;黑顺片分别为 0.003%~0.023%及 0.000 7%~0.002 0%。按《中国药典》2020 年版附子质控要求,即单酯型生物碱 $\geq 0.01\%$,双酯型生物碱 $\leq 0.01\%$ ^[1],35 批药材中有 13 批不符合《中国药典》2020 年版要求,其中白附片 11 批,占 19 批白附片的 57.89%。通过 Student's *t* 检验,发现黑顺片和白附片中的单酯型生物碱含量差异显著,具有统计学意义($P < 0.01$),而双酯型生物碱含量差异不显著($P > 0.05$),见图 9,进一步证实了附子不去皮炮制(黑顺片)能提高单酯型生物碱含量,增强药效,佐证了“白缓黑急”的合理性。35 批样品中 6 种生物碱成分含量见表 2。



*差异显著 ($P < 0.05$); **差异极显著 ($P < 0.01$)。

*Difference is significant ($P < 0.05$); ** Difference is very significant ($P < 0.01$).

图 9 白附片及黑附片生物碱成分统计学检验结果

Fig. 9 Statistical test of alkaloids components of Baifupian and Heishunpian

4 讨论

本研究基于 FTIR 和 HPLC,结合化学计量学方法,对黑顺片和白附片的整体化学成分进行研究,并通过独立样本 *t* 检验对其有效和毒性成分含量进行比较分析。FTIR 和 HPLC 研究结果显示,2 种饮片的成分类型有明显差异,同一饮片类型下,亦可根据产地进行区分,表明白附片和黑顺片整体化学

表 2 35 批样品的 6 种生物碱成分含量

Table 2 Content of six alkaloids of 35 batches of samples

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	苯甲酰乌 头原碱	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
S1	1.404 6	0.088 5	0.150 2	0.075 5	0.029 8	0.024 2
S2	1.083 2	0.078 4	0.100 2	0.066 9	0.027 2	0.022 1
S3	1.101 2	0.070 6	0.092 8	0.064 1	0.029 8	0.026 2
S4	1.515 2	0.099 3	0.120 4	0.069 0	0.045 9	0.027 2
S5	1.849 0	0.124 3	0.134 5	0.080 4	0.033 5	0.030 2
S6	1.995 9	0.132 2	0.182 2	0.091 5	0.044 0	0.040 8
S7	1.442 7	0.104 9	0.107 0	0.067 4	0.067 0	0.034 6
S8	1.412 9	0.091 6	0.101 7	0.063 8	0.0541	0.023 8
S9	1.631 4	0.104 9	0.139 7	0.073 5	0.051 7	0.025 6
S10	1.844 6	0.124 4	0.117 4	0.077 8	0.060 6	0.027 0
S11	0.341 0	0.025 7	0.007 1	0.047 8	0.006 5	0.032 1
S12	1.257 3	0.052 1	0.019 9	0.047 3	0.055 7	0.019 6
S13	0.288 7	0.018 1	0.012 2	0.041 4	0.007 4	0.027 7
S14	1.428 8	0.085 4	0.063 8	0.059 3	0.034 8	0.027 1
S15	1.654 7	0.085 9	0.065 7	0.059 6	0.067 4	0.109 4
S16	0.420 9	0.028 0	0.016 9	0.043 7	/	0.100 6
S17	1.021 2	0.050 9	0.024 3	0.046 8	0.093 6	0.098 7
S18	0.751 2	0.063 0	0.028 3	0.044 2	0.006 9	0.075 1
S19	0.727 1	0.062 5	0.025 0	0.061 7	/	0.100 6
S20	0.595 4	0.056 7	0.025 1	0.052 8	/	0.089 1
S21	0.830 8	0.065 4	0.028 2	0.055 1	/	0.088 1
S22	1.102 0	0.086 0	0.038 6	0.069 9	/	0.086 7
S23	0.778 5	0.060 3	0.031 6	0.047 9	/	0.133 1
S24	1.118 5	0.083 4	0.042 5	0.057 4	/	0.087 5
S25	0.820 3	0.065 3	0.032 0	0.054 5	/	0.083 4
S26	1.463 8	0.097 1	0.046 1	0.058 7	0.012 2	0.081 3
S27	1.566 5	0.110 8	0.073 6	0.062 2	0.023 8	0.082 7
S28	1.605 2	0.035 8	0.024 2	0.035 4	0.436 3	0.106 5
S29	1.434 8	0.164 5	0.113 2	0.067 4	0.561 0	0.113 9
S30	0.566 0	0.081 0	0.099 0	0.067 2	0.099 3	0.163 8
S31	1.368 8	0.062 7	0.035 3	0.056 7	0.073 1	0.050 8
S32	0.793 9	0.055 2	0.027 9	0.060 5	0	0.046 9
S33	0.074 1	0.073 1	0.068 4	0.047 1	0.026 6	0.044 3
S34	0.678 9	0.041 5	0.019 0	0.051 9	0.005 5	0.050 1
S35	0.283 7	0.014 6	0.006 5	0.046 8	0.008 9	0.051 2

成分差异明显,饮片类型的差异高于产地差异。本研究中,黑顺片和白附片中的单酯型生物碱含量差异显著,具有统计学意义($P < 0.01$),而双酯型生物碱含量差异无统计学意义($P > 0.05$),且黑顺片单酯型生物碱含量更高,已有研究表明单酯型生物碱是附子发挥抗炎、镇痛和调节免疫的主要活性成分之一^[33-34],与临床治疗类风湿关节炎机制密切相

关^[35], 邵峰等^[36]证实黑顺片镇痛抗炎作用优于白附片, 佐证了古代医籍记载附子临床区分使用的合理性。目前, 在临床应用中, 黑顺片和白附片并无严格区分, 主要用于抗炎、镇痛, 以及急性心肌梗塞、冠心病和慢性心力衰竭等引起的休克^[15,37], 本研究显示白附片和黑顺片化学成分差异较大, 活性成分含量差异显著, 因此, 在临床上应将 2 者区分使用。此外, 活性成分及毒性成分含量测定结果显示, 35 批饮片中有 13 批不符合《中国药典》2020 年版要求, 有关研究指出, 附子在加工过程中有炮制过度的现象, 难于保证临床用药的有效^[38], 本研究显示当前附子饮片质量参差不齐, 与之前学者研究认为附子加工缺乏统一炮制规范、市场流通附子饮片质量不稳定^[39]的结论一致, 今后附子饮片加工应进一步规范, 以确保临床用药质量稳定。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 200.
- [2] Yang B, Xu Y Y, Wu Y Y, *et al.* Simultaneous determination of ten *Aconitum* alkaloids in rat tissues by UHPLC MS/MS and its application to a tissue distribution study on the compatibility of Heishunpian and *Fritillariae Thunbergii* Bulbus [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1033/1034: 242-249.
- [3] 杨明, 徐楚江, 张为亮. 炮附子的文献探讨 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 664-666.
- [4] Wen R Q, Li D H, Zhao X, *et al.* Rationality of the processing methods of *Aconiti Lateralis Radix* (Fuzi) based on chemical analysis [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(2): 286-290.
- [5] 刘芳, 于向红, 李飞, 等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1160-1162.
- [6] 李梦佳, 董臣林, 刘洪涛. 2015 年版《临床用药须知》中含附子及其炮制品成方制剂收载情况及临床应用分析 [J]. 中国医药导刊, 2021, 23(9): 715-720.
- [7] 汉·张仲景撰. 伤寒论 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2018: 249-250.
- [8] 明·朱棣. 普济方 (第一册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 281.
- [9] 任犀然. 本草纲目 要义 [M]. 杭州: 浙江工商大学出版社, 2018: 108.
- [10] 龚又明, 方莉, 林华, 等. 附子不同部位及其炮制品生物碱的含量比较 [J]. 北方药学, 2013, 10(8): 6-8.
- [11] 邓文斌. 药证 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2018: 89.
- [12] 秦玉龙. 明医心鉴: 历代名医临床经验集粹 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 197.
- [13] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, *et al.* *Aconitum* in traditional Chinese medicine: A valuable drug or an unpredictable risk? [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1): 18-30.
- [14] Sun L L, You G J, Cao X X, *et al.* Comparative investigation for raw and processed *Aconiti Lateralis Radix* using chemical UPLC-MS profiling and multivariate classification techniques [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(1): 365-372.
- [15] Zhou G H, Tang L Y, Zhou X D, *et al.* A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 160: 173-193.
- [16] 黄慧莲, 刘科兰, 邵峰, 等. 附子不同炮制品的指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 411-413.
- [17] 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.
- [18] 陈东安, 易进海, 黄志芳, 等. 附片指纹图谱研究及 6 种酯型生物碱含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2829-2833.
- [19] 罗思妮, 孙冬梅, 魏梅, 等. 基于指纹图谱和化学计量学的不同产地药用大黄的质量评价 [J]. 中药材, 2020, 43(9): 2194-2199.
- [20] Liu Y Y, Wei M Y, Yue K X, *et al.* Non-target metabonomic method provided new insights on the therapeutical mechanism of Gancan Fuzi Decoction on rheumatoid arthritis rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1105: 93-103.
- [21] 陶爱恩, 杜泽飞, 赵飞亚, 等. 基于多糖组成和含量的 3 种基原黄精质量比较和识别研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2467-2473.
- [22] 胡建勇, 缪明锦, 闻焜, 等. 基于红外光谱结合化学计量学及 HPLC 色谱的紫丹参及其近缘种成分差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 8-14.
- [23] 段宝忠, 黄林芳, 尚飞能, 等. 云南野生抚育粗茎秦艽药材的品质评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 82-86.
- [24] 李彦希, 李晓朋, 顾健, 等. 红外光谱结合化学计量学鉴别美洲大蠊及其他虫类药材研究 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3045-3050.
- [25] 王娟, 周植星, 杨莉, 等. 补骨脂药材 UPLC 指纹图谱建立及 12 种主要成分含量测定 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 552-557.
- [26] 徐超, 林杰, 金传山, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学比较同株不同生长年限亳白芍化学成分差异 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2408-2413.

- [27] 赵花荣, 温树敏, 王晓燕, 等. 金银花道地品与非道地品的 FTIR 光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(5): 705-707.
- [28] 周湘萍, 刘刚, 时有明, 等. 普洱茶的傅里叶变换红外光谱鉴别研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 594-596.
- [29] 吴志生, 刘晓娜, 谭鹏, 等. 基于 2D-COS 红外光谱的附子炮制过程时序段解析研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(6): 1745-1748.
- [30] 蒋先明, 何伟平. 简明红外光谱识谱法 [M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 1992.
- [31] 刘宇, 陈文仿, 王江瑞, 等. 红外光谱结合化学计量分析对不同产地玛咖的鉴别 [J]. 中药材, 2016, 39(12): 2733-2737.
- [32] 郑振兴, 胡瀚文, 曾利, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 174-180.
- [33] 蓝鲜艳, 周畅玢, 毛敏, 等. 附子不同炮制品的相关差异及临床合理选用探讨 [J]. 中成药, 2021, 43(4): 994-997.
- [34] 贺亚男, 张定堃, 许润春, 等. 附子品质评价方法的研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2568-2572.
- [35] 彭成. 中华道地药材 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 1307-1309.
- [36] 邵峰, 李赛雷, 刘荣华, 等. 附子不同炮制品镇痛抗炎作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2329-2330.
- [37] Yang M B, Ji X Y, Zuo Z. Relationships between the toxicities of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (Fuzi) and the toxicokinetics of its main diester-diterpenoid alkaloids [J]. *Toxins*, 2018, 10(10): 391.
- [38] 陈彦琳, 杜杰, 梁焕, 等. 道地药材附子炮制加工规范化探讨 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(7): 42-44.
- [39] 梅超南. 基于疗效的川产道地药材附子品质评价方法研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.

[责任编辑 时圣明]