

不同产地伏毛铁棒锤 HPLC 指纹图谱及 4 种生物碱含量测定

多杰措^{1,2,3}, 李彩霞^{1,2}, 许显莉^{1,2,3}, 宋文珠^{1,2}, 马世震^{1,2*}

¹中国科学院西北高原生物研究所; ²青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810008;
³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:建立伏毛铁棒锤的 HPLC 指纹图谱,并对 4 种生物碱成分进行含量测定,为不同产地伏毛铁棒锤药材质量评价提供参考。采用 ACE excel C₁₈ PFP(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(1 000 mL加 2.5 mL 三乙胺)(B)为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 35 °C,检测波长 215 nm,进样量 10 μL。共标定了 18 个共有峰,指认了 12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱和 3-乙酰乌头碱,质量分数分别为 0.010 8~1.784 5、0.011 3~3.123 4、0.018 4~2.598 1、0.018 8~0.655 7 mg/g。聚类分析将 15 批样品分为 4 类,主成分分析筛选出了 5 个主成分,累计方差贡献率为 82.549%,说明主成分能够综合伏毛铁棒锤药材成分的大部分信息。15 批样品相似度范围在 0.769~0.952,说明不同批次伏毛铁棒锤样品的差异性较大。该方法可以有效评价不同产地伏毛铁棒锤药材的质量差异,为其质量控制提供参考。

关键词:伏毛铁棒锤;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;含量测定

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)2-0200-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.2.003

HPLC fingerprints analysis of *Aconitum flavum* Hand. -Mazz. from different areas and content determination of four alkaloids

DUO Jie-cuo^{1,2,3}, LI Cai-xia^{1,2}, XU Xian-li^{1,2,3}, SONG Wen-zhu^{1,2}, MA Shi-zhen^{1,2*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;

²Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Xining 810008, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: HPLC fingerprints of *Aconitum flavum* Hand. -Mazz. were established, and the contents of four alkaloids were determined to provide reference for the quality evaluation of *A. flavum* in different production areas. The analysis was performed on Ace excel C₁₈ PFP (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid solution (add 2.5 mL triethylamine per 1 000 mL) (B) as mobile phase in a gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 °C, the detection wavelength was set at 215 nm and the injection volume was 10 μL. There were 18 common peaks in the HPLC chromatogram of 15 batches of *A. flavum*, among which the percentages of 12-epinapelline, songrine, aconitine and 3-acetylaconitine were as follows: 0.010 8-1.784 5, 0.011 3-3.123 4, 0.018 4-2.598 1 and 0.018 8-0.655 7 mg/g. According to the cluster analysis, the 15 batches of *A. flavum* were classified into four categories, principal component analysis (PCA) screened out five principal components, with the cumulative variance contribution rate of 82.549%, indicating that the principal components contained most information of original data. The similarity of 15 batches of *A. flavum* ranged from 0.769 to 0.952, indicating that there was difference between batches of *A. flavum*. This method can effectively evaluate the quality difference of *A. flavum* from different producing areas, and provide reference for the quality control of medicinal materials.

Key words: *Aconitum flavum* Hand. -Mazz.; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; content determination

收稿日期:2022-08-11 接受日期:2022-12-05

基金项目:中国科学院青海省人民政府三江源国家公园联合研究
专项(LHZX-2020-09)

*通信作者 E-mail:szma@nwipb.cas.cn

伏毛铁棒锤(*Aconitum flavum* Hand. -Mazz.)属于毛茛科乌头属植物,别名断肠草、乌药和一支蒿等^[1],是我国传统民族药材和民间中草药,块根和

幼苗入药,其干燥块根俗称“铁棒锤”^[2]。《陕西中草药》记载伏毛铁棒锤具有活血祛瘀、止痛、祛风湿、消肿败毒、止血、治跌打损伤、风湿性关节炎、腰腿痛等功效。

据文献报道,生物碱类是伏毛铁棒锤的主要活性成分^[3],乌头碱是铁棒锤药材的主要化学成分且含量较高^[4,5]。伏毛铁棒锤和铁棒锤含量差异的主要成分是 12-表欧乌头碱和乌头碱,伏毛铁棒锤中 12-表欧乌头碱和乌头碱的含量高于铁棒锤^[5]。现代药理学实验研究表明,乌头碱、12-表欧乌头碱、宋果灵和 3-乙酰乌头碱具有镇痛、抗炎、抗癌等活性^[6-9]。

目前对伏毛铁棒锤质量标准的研究鲜有报道,中药指纹图谱广泛用于中药质量评价,可以较全面地反映中药所含化学成分的种类与数量^[10,11]。因此,本研究建立了 15 批不同产地伏毛铁棒锤药材的 HPLC 指纹图谱,并测定 12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱、3-乙酰乌头碱等 4 种生物碱的含量;其次,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)进行相似度评价,SPSS 软件进行聚类分析和主成分

分析,以期为伏毛铁棒锤药材指标成分的筛选和系统全面地控制伏毛铁棒锤药材质量提供科学依据。

1 试剂与材料

1.1 试剂

12-表欧乌头碱(批号 DST200815-067)、宋果灵(批号 DST210519-073)、乌头碱(批号 DSTDW000602)、3-乙酰乌头碱(批号 DST200825-127),质量分数均大于 98%,均购自成都德思特生物技术有限公司;甲醇(分析纯,成都市科隆化学制品有限公司);乙腈(色谱纯,德国默克股份两合公司);甲醇(色谱纯,德国默克股份两合公司);磷酸(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);三乙胺(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 材料

实验材料主要来自青海、甘肃、四川,经中国科学院西北高原生物研究所马世震研究员鉴定为伏毛铁棒锤(*Aconitum flavum* Hand. -Mazz.),标本已存在西北高原生物研究所标本馆,标本编号 0341653,详细信息见表 1。

表 1 伏毛铁棒锤药材来源

Table 1 Source of *A. flavum*

样品编号 Sample No.	产地 Origin	采集或购买时间 Collect or purchase time
S1	甘肃省	2022-05-05(购买)
S2	四川省阿坝州	2021-09-17(购买)
S3	青海省玉树州江西林场	2021-08-20
S4	青海省果洛州久治县	2021-08-28
S5	青海省果洛州玛沁机场	2021-08-26
S6	青海省果洛州甘德县县色尔雄秀玛村	2021-08-27
S7	青海省果洛州甘德县色日里羊村	2021-08-27
S8	青海省果洛州甘德县青珍乡	2021-08-27
S9	青海省果洛州玛多县	2021-08-29
S10	青海省果洛州玛多县花石峡镇	2021-08-29
S11	青海省果洛州玛沁县	2021-08-26
S12	青海省玉树州巴塘乡	2022-03-21
S13	青海省海南州兴海县	2021-08-29
S14	青海省海东市互助县	2021-09-10
S15	青海省海南州贵南县	2021-08-25

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACE excel C₁₈ PFP(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱 0~8 min, 5% A; 20~30 min, 10% A; 30~31 min, 10% → 11% A; 31~50 min, 11% A; 50~55 min, 11% → 16% A; 55~59 min, 16% → 18% A; 59~65 min, 18% A; 65~66 min, 18% → 21% A; 66~75

min, 21% → 25% A; 75~80 min, 25% → 30% A; 80~85 min, 30% → 32% A; 85~95 min, 32% → 40% A; 95~100 min, 40% A; 100~105 min, 40% → 43% A; 105~110 min, 43% A; 110~111 min, 43% → 45% A; 111~120 min, 45% A。检测波长 215 nm, 检测时间为 120 min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 体积流量 1.0 mL/min。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱

和3-乙酰乌头碱对照品适量,加甲醇制成含12-表欧乌头碱0.18 mg/mL、宋果灵0.2 mg/mL、乌头碱0.225 mg/mL、3-乙酰乌头碱0.2 mg/mL的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精确称取伏毛铁棒锤根的干燥粉末1.00 g,粉末过60目筛,置于50 mL三口异型烧瓶中,在选定的微波时间、温度、料液比以及甲醇体积分数下提取,共三次,抽滤得提取液并定容至5 mL的容量瓶中,过0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。采用高效液相色谱法对提取液进行测定。

2.4 伏毛铁棒锤药材 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验

取S14样品粉末,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件进行检测,连续进样6次,记录色谱图,并计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。各共有峰相对保留时间RSD为0.05%~0.70%,各共有峰相对峰面积RSD为0.3%~2.9%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取S14样品粉末,按“2.2”项下制备方法平行制备6份,按“2.1”项下色谱条件分别进样检测,记

录色谱图,并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。各共有峰相对保留时间RSD为0.08%~1.8%,相对峰面积RSD为0.8%~3.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取S14样品粉末,按“2.3”项下制备方法平行制备6份,按“2.1”项下色谱条件分别进样,分别在0、2、4、6、8、12、24 h进样,记录色谱图,并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。各共有峰相对保留时间RSD为0.01%~0.7%,相对峰面积RSD为0.3%~3.1%,表明该供试品在24 h内基本稳定。

2.4.4 指纹图谱的建立及共有峰的标定版

取15批伏毛铁棒锤样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得到HPLC图谱。以AIA格式将15批样品图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版),共标定了18个共有峰,通过与对照品比对,指认出其中四个生物碱成分,分别为12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱和3-乙酰乌头碱。混合对照品色谱图见图1A、样品色谱图见图1B及叠加图谱见图1C,其中R是对照图谱。

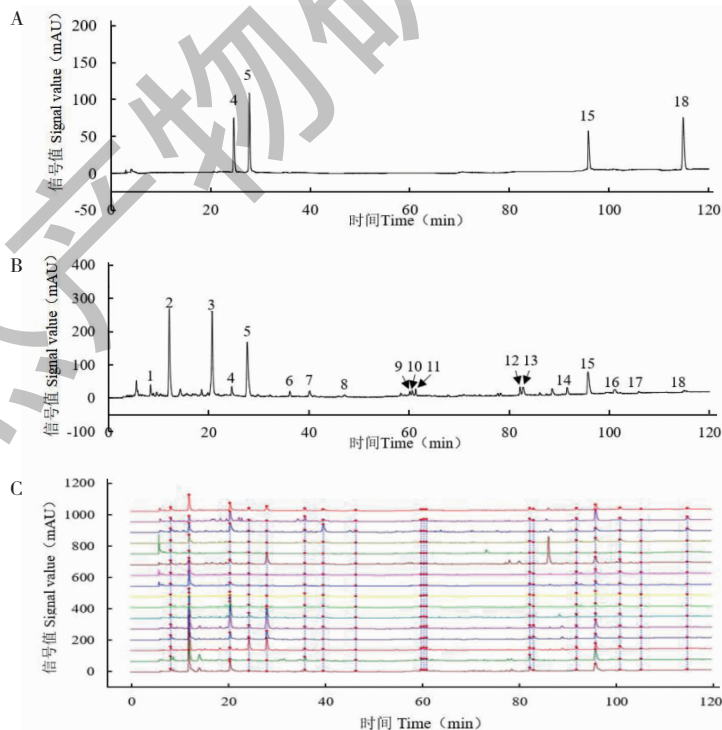


图1 混合对照品(A)、供试品(B)色谱图以及15批药材叠加指纹图谱(C)

Fig. 1 Chromatograms of Mixed reference substance (A) and sample (B) and superposition HPLC fingerprints of 15 batches of *A. flavum* samples (C)

注:4:12-表欧乌头碱;5:宋果灵;15:乌头碱;18:3-乙酰乌头碱。Note:4:12-Epinapelline;5:Songorine;15:Aconitine;18:3-Acetylaconitine.

2.4.5 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)进行相似度评价,15 批次伏毛铁棒锤药材图谱与对照指纹图谱相似度范围在 0.769 ~ 0.952,说明不同产地伏毛铁棒锤药材质量存在一定差异(见表 2)。

表 2 15 批次伏毛铁棒锤样品指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of 15 batches of *A. flavum* samples

样品 Sample	相似度 Similarity
S1	0.942
S2	0.872
S3	0.880
S4	0.952
S5	0.923
S6	0.926
S7	0.777
S8	0.839
S9	0.942
S10	0.879
S11	0.791
S12	0.790
S13	0.889
S14	0.793
S15	0.769

2.4.6 不同产地伏毛铁棒锤样品聚类分析

将 15 批不同产地的伏毛铁棒锤的 18 个共有峰面积导入 SPSS 25.0 软件进行系统聚类分析,采用瓦尔德法,以平方欧式距离为样品间距离,Z 标准化进行聚类分析,聚类分析结果见图 2。由图可知,伏毛铁棒锤药材被分为 4 类,S1、S2 样品为 I 类,即甘肃和四川产地聚为一类;S3 ~ S5 样品为 II 类;S6 ~ S13 为 III 类;S14、S15 为 IV 类。不同产地质量具有一定差异。

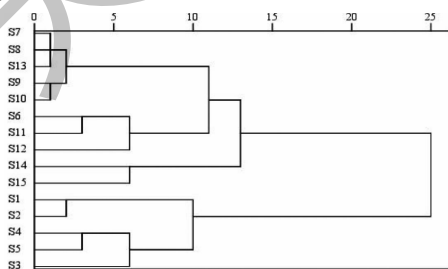


图 2 聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis results

2.4.7 主成分分析(PCA)

采用 SPSS25.0 软件对 15 批伏毛铁棒锤药材中 18 个共有峰的峰面积进行标准化处理后,对 18 个共有峰进行主成分分析,结果见表 3,以特征值大于 1.2 为提取标准,得到 5 个主成分,其累积方差贡献率为 82.549%,可代表伏毛铁棒锤指纹图谱共有峰的大部分信息。

表 3 特征值及累积方差贡献率

Table 3 Eigenvalue and cumulative variance contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Characteristic value	贡献率 Contribution rate(%)	累积贡献率 Cumulative contribution rate(%)
1	5.387	29.928	29.928
2	3.562	19.791	49.719
3	2.585	14.359	64.078
4	2.049	11.381	75.459
5	1.276	7.090	82.549

通过正交旋转,得到 18 个指标在 5 个主成分中的旋转成分矩阵(见表 4)。根据旋转矩阵推测,影响伏毛铁棒锤药材质量差异的成分不是单一成分,而是多成分协同作用的结果^[12,13]。主成分 1 的信息主要来自峰 2、9、10、11、12、15;主成分 2 的信息主要来自峰 6、8、17、18;主成分 3 的信息主要来自峰 1、7、8;主成分 4 的信息主要来自峰 3、4、5、14、

表 4 伏毛铁棒锤成分矩阵

Table 4 Component matrix of *A. flavum*

峰号 Peak No.	成分 Component				
	1	2	3	4	5
1	0.566	-0.179	0.522	-0.024	0.288
2	0.853	-0.201	-0.097	0.053	-0.014
3	0.403	-0.035	0.487	0.483	-0.469
4	0.403	-0.321	-0.180	0.441	0.655
5	0.511	-0.580	0.340	0.440	0.004
6	0.167	0.849	0.073	0.027	0.159
7	-0.047	0.560	0.582	0.399	0.054
8	0.198	0.653	0.572	0.176	0.146
9	0.846	0.312	-0.227	-0.210	0.038
10	0.899	0.040	-0.209	-0.008	0.244
11	0.920	0.124	-0.065	-0.027	-0.003
12	0.694	0.260	-0.414	-0.292	-0.286
13	0.554	-0.496	0.078	0.301	-0.441
14	0.016	0.391	-0.558	0.656	-0.170
15	0.678	0.348	-0.024	-0.444	-0.028
16	-0.214	-0.019	-0.638	0.498	0.264
17	0.004	0.608	-0.434	0.365	-0.232
18	-0.139	0.719	0.251	0.054	0.057

16;主成分5的信息主要来自峰4。结合实际检测结果可同时采用对5个主成分贡献最大峰面积也较大的2、3、4、5、6、15号共有峰作为后期伏毛铁棒锤的质量控制指标。其中4号峰为12-表欧乌头碱,5号峰为宋果灵,15号峰为乌头碱,2、3、6号峰需要进

一步确认。

利用SIMCA14.1分析软件绘制主成分得分图见图3。结果表明,伏毛铁棒锤药材被分为4类,S1、S2样品为I类,S3~S5为II类,S6~S13为III类,S14、S15为IV类。与聚类分析结果一致。

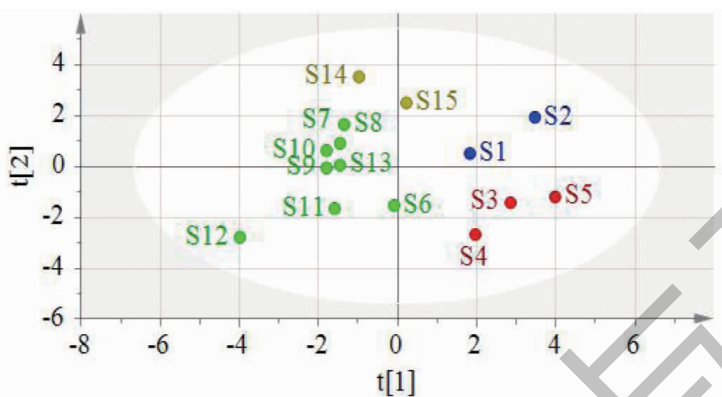


图3 15批伏毛铁棒锤样品PCA得分图

Fig. 3 PCA score chart of 15 batches of *A. flavum*

2.5 伏毛铁棒锤中4种生物碱成分的含量测定

2.5.1 线性关系考察

吸取2.2项下配制的混合标准品溶液,过0.22 μm 微孔滤膜滤过,依次设定进样量为0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、20 μL ,按2.1项下的色谱条件进行测定分析。以峰面积(Y)为纵坐标,对照品质量(X)

为横坐标,进行线性回归(见表5)。

2.5.2 精密度试验

取混合对照品溶液连续进样6次,记录4种生物碱成分的峰面积并计算RSD值。12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱、3-乙酰乌头碱峰面积的RSD分别为1.8%、0.4%、1.9%、2.9%,表明仪器精密度良好。

表5 对照品线性关系

Table 5 Reference linear relationship

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range (μg)
12-表欧乌头碱 12-Epinapelline	$Y = 615.72X + 2.3904$	0.9999	0.045 ~ 3.6
宋果灵 Songorine	$Y = 649.09X + 14.315$	0.9998	0.05 ~ 4.0
乌头碱 Aconitine	$Y = 517.54X + 2.9705$	0.9999	0.05625 ~ 4.5
3-乙酰乌头碱 3-Acetylaconitine	$Y = 525.84X + 22.288$	0.9999	0.05 ~ 4.0

2.5.3 重复性试验

精密称取S14样品粉末,每份1.00 g,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,进样分析,计算4种生物碱成分的含量,并计算测定结果的RSD值。12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱、3-乙酰乌头碱峰面积的RSD分别为2.0%、0.9%、3.0%、2.6%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验

取S14样品粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样分析,记录4种生物碱成分的峰面

积并计算RSD值。12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱、3-乙酰乌头碱峰面积的RSD分别为1.3%、0.4%、1.3%、1.5%,表明供试品在24 h内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验

加样回收率试验结果见表6。

2.5.6 样品含量测定

分别取15批伏毛铁棒锤药材样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,分别测定15批样品中4种生物碱(见表7)。结果表明,伏毛铁棒锤药材中12-表欧乌头碱、

表 6 加样回收率试验 ($n=6$)
Table 6 Sample recovery test ($n=6$)

成分 Component	称样量 Sample weight (g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
12-表欧乌头碱 12-Epinapelline	1.000 6	0.098	0.097	0.190	94.85	99.04	3.01
	1.000 5	0.097	0.096	0.189	95.83		
	1.000 2	0.091	0.090	0.181	100.00		
	1.000 6	0.091	0.092	0.183	100.00		
	1.000 3	0.085	0.083	0.169	101.20		
	1.000 5	0.084	0.085	0.171	102.35		
宋果灵 Songorine	1.000 6	0.013	0.013	0.026	100.00	98.89	2.72
	1.000 5	0.013	0.013	0.026	100.00		
	1.000 2	0.015	0.015	0.029	93.33		
	1.000 6	0.015	0.014	0.029	100.00		
	1.000 3	0.014	0.014	0.028	100.00		
	1.000 5	0.014	0.014	0.028	100.00		
乌头碱 Aconitine	1.000 6	0.668	0.660	1.345	102.58	101.40	2.47
	1.000 5	0.727	0.720	1.435	98.33		
	1.000 2	0.719	0.720	1.429	98.61		
	1.000 6	0.692	0.700	1.404	101.71		
	1.000 3	0.636	0.650	1.316	104.62		
	1.000 5	0.661	0.660	1.338	102.58		
3-乙酰乌头碱 3-Acetylaconitine	1.000 6	0.562	0.562	1.118	98.93	96.74	2.26
	1.000 5	0.556	0.556	1.110	99.64		
	1.000 2	0.572	0.570	1.127	97.37		
	1.000 6	0.595	0.590	1.157	95.25		
	1.000 3	0.599	0.590	1.161	95.25		
	1.000 5	0.604	0.600	1.168	94.00		

宋果灵、乌头碱和 3-乙酰乌头碱的质量分数分别为 0.010 8 ~ 1.784 5、0.011 3 ~ 3.123 4、0.038 7 ~ 2.598 1、0.018 8 ~ 0.655 7 mg/g, 平均质量分数为 0.266 5、0.689 5、1.316 6、0.184 1 mg/g, 其中乌头碱含量最高。青海果洛玛沁机场样品中四种生物碱总量最高, 为 5.319 8 mg/g, 青海玉树巴塘样品中最低, 为 0.193 1 mg/g。青海玉树江西林场样品中 12-表欧乌头碱含量最高, 为 1.784 5 mg/g; 青海玛沁机场样品中宋果灵含量最高, 为 3.123 4 mg/g; 四川阿坝样品中乌头碱含量最高, 为 2.598 1 mg/g; 青海贵南样品中 3-乙酰乌头碱含量最高, 为 0.655 7 mg/g。

3 讨论

3.1 色谱条件的确定

12-表欧乌头碱、宋果灵的最大吸收波长为 210

nm, 乌头碱、3-乙酰乌头碱的最大吸收波长为 235 nm, 考察了 210、215、220、230 nm, 为兼顾四个峰使响应值达到最高, 最终选择 215 nm 为检测波长。考察了 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Unitary C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、JADE-PAK ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 ACE excel C₁₈ PFP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 通过对比对称因子、分离度及峰形, 最终选择 ACE excel C₁₈ PFP 色谱柱。考察了水相加入 2.0、2.5、3.0 mL 的三乙胺, 加入 2.5 mL 的三乙胺色谱峰峰形及梯度洗脱效果较好, 因此水相加入 2.5 mL 三乙胺。根据药典和文献^[5,14,15]考察了乙腈:0.1% 醋酸铵、乙腈:0.2% 冰乙酸 (加三乙胺调 PH = 6.2)、乙腈和水、乙腈:0.1% 磷酸等流动相, 最终选择乙腈:0.1% 磷酸水溶

液梯度洗脱,基线平滑,色谱峰分布均匀,分离效果好。

表7 15批伏毛铁棒锤药材中4种生物碱成分的含量
Table 7 Contents of four alkaloids in 15 batches of *A. flavum*

样品编号 Sample No.	含量 Content(mg/g)				总量 Total
	12-表欧乌头碱 12-Epinapelline	宋果灵 Songrine	乌头碱 Aconitine	3-乙酰乌头碱 3-Acetylaconitine	
S1	0.010 8	<0.010 0	2.122 7	0.165 1	2.301 4
S2	0.021 4	0.033 0	2.598 1	0.082 3	2.734 8
S3	1.784 5	1.682 9	1.187 1	0.075 5	4.730 1
S4	0.272 1	1.563 9	1.348 3	0.084 1	3.268 5
S5	0.382 5	3.123 4	1.814 0	<0.010 0	5.319 8
S6	0.468 6	1.712 5	0.561 5	0.018 8	2.761 4
S7	0.228 3	0.020 5	0.719 2	0.039 4	1.007 4
S8	0.216 6	0.135 0	1.212 0	0.191 6	1.755 2
S9	0.061 3	<0.010 0	1.058 7	0.299 7	1.422 6
S10	0.132 5	0.015 5	1.205 7	0.342 5	1.696 2
S11	0.110 4	1.895 9	1.621 9	<0.010 0	3.628 2
S12	0.054 6	0.099 8	0.038 7	<0.010 0	0.193 1
S13	0.092 5	0.011 3	1.124 6	0.225 7	1.454 1
S14	0.093 1	0.015 1	0.687 6	0.581 4	1.377 2
S15	0.067 9	0.028 3	2.318 6	0.655 7	3.070 5

3.2 指纹图谱及含量测定分析

在指纹图谱中不同产地伏毛铁棒锤样品色谱峰的个数、保留时间及相同保留时间下峰面积都存在差异;15批药材指纹图谱相似度评价结果在0.769~0.952;聚类分析将S1、S2样品为I类;S3~S5样品为II类;S6~S13为III类;S14、S15为IV类。与主成分分析结果一致。主成分分析筛选出共有的特征成分,找出决定因素,为伏毛铁棒锤药材质量评价提供参考。主成分分析以特征值大于1.2为提取标准,累积方差贡献率大于80%时,得到5个主成分,可代表伏毛铁棒锤指纹图谱共有峰的大部分信息。根据含量测定结果可知12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱的含量较高且前期查阅文献发现均有抗炎镇痛^[6-9]等活性,而3-乙酰乌头碱含量在各个样品普遍较低不作为伏毛铁棒锤质量控制指标。因此,根据含量测定和主成分分析结果本实验同时采用对5个主成分贡献较大、峰面积也较大的2、3、4(12-表欧乌头碱)、5(宋果灵)、6和15(乌头碱)等6个特征性成分,其中2、3、6号峰未知,可以通过质谱进一步确认,研究是否作为后期伏毛铁棒锤质量控制指标。

含量测定结果表明青海产区的玉树(S3)、久治(S4)、玛沁(S5)的生物碱含量较高;Wang等^[5]测定

了青海果洛、玉树、海东和宁夏固原伏毛铁棒锤生物碱含量,结果表明果洛班玛和玉树的伏毛铁棒锤中生物碱含量最高,这与本研究结果一致。4种成分中乌头碱的总量最高,3-乙酰乌头碱的总量最低,与Zhao^[16]的研究结果一致。12-表欧乌头碱、宋果灵、乌头碱和3-乙酰乌头碱的含量最高的产地分别是青海玉树江西林场、青海玛沁机场、四川阿坝、青海贵南;其中江西林场和玛沁机场样品中四种生物碱总量也为最高。不同地区伏毛铁棒锤药材质量存在差异,这种差异可能由于药材的生长环境、气候、土壤、采集时间及生长年限等因素^[17]对药材次生代谢产物的积累产生影响,从而导致药材相似度以及含量的差异性^[18,19]。

《中国药典》未涉及伏毛铁棒锤药材的HPLC质量控制相关内容,因此,本研究采用HPLC-DAD法建立了伏毛铁棒锤药材指纹图谱,并对4种生物碱成分进行含量测定,同时应用相似度评价、聚类分析及主成分分析对不同产地伏毛铁棒锤药材的质量进行综合评价,三者相互验证补充,避免了以单一成分含量来评价药材质量好坏的弊端^[13],可以为伏毛铁棒锤药材的质量评价提供参考。

参考文献

- 1 Flora of China Committee, Chinese Academy of Sciences. Flora of China; Vol 27 (中国植物志:27 卷) [M]. Beijing: Science Press, 1979;318.
- 2 Editorial Board of Chinese Materia Medica, State Administration of traditional Chinese medicine. Chinese Materia Medica; Tibetan medicine volume (中华本草:藏药卷) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002, 274-275.
- 3 Li Q, Guo LN, Zheng J, et al. Reaserch progress of medicinal genus *Aconitum* [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2016, 36:1129-1149.
- 4 Lin L, Gao SF, Chen HG, et al. Study on quality standardimprovement of *Aconitum pendulum* based on medicinal materials characterization and chromatographic technique [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2020, 22:1804-1810.
- 5 Wang R, Wei Y, Zhou CL, et al. Study on multi-index components of Tibetan medicine Bangna of *Aconitum* genus according to fingerprints and chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51:3037-3044.
- 6 Hao WJ. Study on the chemical constituents of the alkaloids from the root of *Aconitum flavum* Hand. -Mazz and its anti-tumor activities [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University (宁夏医科大学), 2014.
- 7 Zhang XC, Zheng QG, Yang JH, et al. Research progress on structure and activity of C₁₉ diterpeneoid alkaloids from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51:531-541.
- 8 Wang XF, Yu L, Hao WJ, et al. Chemical constituents of *Aconitum flavum* [J]. Chem Nat Compd, 2016, 52:769-770.
- 9 Sun JR, Qiu ZJ, Wang DH, et al. Anti-tumor activity of 3-acetylaconitine and songorine from *Aconitum szechenyianum* Gay [J]. Fine chem (精细化工), 2018, 35:1163-1169.
- 10 Zhou G, Feng YM, Li ZC, et al. Fingerprinting and determination of hepatotoxic constituents in *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* of different producing places by HPLC [J]. J Chromatogr Sci. 2022, 60:440-449.
- 11 Xie SM, Ji QY, Lu S, et al. Study on establishment of HPLC fingerprints and chemical pattern recognition of *Chrysanthemum indicum* from different regions [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52:7616-7623.
- 12 Kong H, Guo QM, Wang HH, et al. Principal components analysis in traditional chinese medicine quality evaluation [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2014, 41:890-892.
- 13 Zhou BQ, Gao XM, Yang Y, et al. Quality analysis of *Caulis Bambusae* in Taeniam from different origins by HPLC coupled with chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53:853-857.
- 14 Luo C, Yi F, Xia Y, et al. Comprehensive quality evaluation of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx. (Fuji): simultaneous determination of nine alkaloids and chemical fingerprinting coupled with chemometric analysis [J]. J Sep Sci. 2019, 42:980-990.
- 15 Cheng TY, Liu YY, Hu HB, et al. Study on specific chromatogram and multi-components determination of alkaloids in hulisian tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2021, 38:1594-1600.
- 16 Zhao MY. Study on identification and progressing attention of Tibetan drug Bangna [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), 2018.
- 17 Zhao XM, Yang ZJ, Yuan WJ, et al. Fingerprint analysis and determination of alkaloids in *Aconitum excelsum* Reichb by HPLC [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2019, 28:2776-2782.
- 18 Zhang LJ, Dai HR, Fan Q, et al. HPLC fingerprints analysis of *Aconitum sinomontanum* from different areas and content determination of two alkaloids [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23:41-46.
- 19 Yan YH, Li SP, Abdula R, et al. Establishment of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition analysis and content determination of aloe [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:353-361.