

# 不同产地高乌头药材 HPLC 指纹图谱及 2 种生物碱成分含量测定

张立军, 戴海蓉, 樊秦, 夏鹏飞, 姚娟, 李芸\*

(甘肃中医药大学药学院, 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:**建立不同产地高乌头药材的 HPLC 指纹图谱,并测定其中 2 种主要生物碱成分含量,为高乌头药材质量控制提供参考依据。**方法:**采用 HPLC-DAD 技术,以 Dikma spursil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠水溶液为流动相梯度洗脱,建立高乌头药材的指纹图谱并进行含量测定;采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)对 10 批样品进行共有峰确认及相似度评价;通过 SPSS 21.0 统计软件采用主成分分析(PCA)和聚类分析(CA)对 HPLC 指纹图谱进行模式识别分析。**结果:**建立了高乌头药材指纹图谱,10 批高乌头药材的相似度均>0.90;标定共有峰 11 个,并对其 2 主要成分(高乌甲素、冉乌头碱)进行含量测定;聚类分析法(CA)将所有批次高乌头药材共分为 4 类,反映了 10 个批次不同地区高乌头药材的质量特征;主成分分析法(PCA)筛选出累计贡献率达到 89.748% 的 4 个主成分,得到决定高乌头药材质量 5 个化学成分。**结论:**建立的 HPLC 指纹图谱结合含量测定,PCA,CA 方法,可以客观、有效、全面地用于高乌头药材的质量评价。

**[关键词]** 高乌头; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析; 不同产区; 高乌甲素; 冉乌头碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0041-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170041

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.1011.024.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-12 10:11

## HPLC Fingerprints Analysis of *Aconitum sinomontanum* from Different Areas and Content Determination of Two Alkaloids

ZHANG Li-jun, DAI Hai-rong, FAN Qin, XIA Peng-fei, YAO Juan, LI Yun\*

(College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chemistry and Quality of Traditional Chinese Medicine (TCM) of the College of Gansu Province, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of *Aconitum sinomontanum* from different areas, determine the contents of two alkaloids, and provide basis for quality control of *A. sinomontanum*. **Method:** HPLC-DAD method was developed to establish fingerprints for *A. sinomontanum*, and the contents were determined by Dikma spursil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.05 mol·L<sup>-1</sup> sodium phosphate dibasic solution as the mobile phase for gradient elution. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 edition) was used to confirm the common peaks in 10 batches of samples and evaluate the similarity. SPSS 21.0 statistical software was used to make principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) for the HPLC fingerprint. **Result:**

**[收稿日期]** 20170226(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560650);甘肃省自然基金项目(1107RJZA242)

**[第一作者]** 张立军,在读硕士,从事中药制药工艺研究,Tel:18791071858,E-mail:1570914816@qq.com

**[通讯作者]** \*李芸,博士,教授,硕士生导师,从事中药活性成分分析、中药加工炮制及制剂工艺研究,Tel:0931-8765585,E-mail:liyunherb@163.com

The common mode for *A. sinomontanum* fingerprint was established; the similarity was greater than 0.90 in 10 batches of *A. sinomontanum* medicinal herbs; 11 common fingerprint peaks were identified, and the content of lappacontine and ranaconitine was determined. All batches of samples can be classified into four groups by using CA, reflecting the quality characteristics of 10 batches of *A. sinomontanum* in different areas. Four principal components with a cumulative contribution rate of 89.748% were screened by using principle component analysis to obtain five chemical compositions that could determine the quality of *A. sinomontanum*. **Conclusion:** The HPLC fingerprint, PCA and CA methods can objectively, effectively and comprehensively evaluate the quality of *A. sinomontanum*.

**[Key words]** *Aconitum sinomontanum*; fingerprint; principal component analysis; cluster analysis; different areas; lappacontine; ranaconitine

高乌头是我国甘肃等中西部地区民间习用中药,在《中华本草》,《中药大辞典》等本草著作中均有记载<sup>[1-2]</sup>,具有祛风除湿、理气止痛、活血散瘀的功效,用于治疗风湿痹痛、关节肿痛、跌打劳伤、急慢性菌痢等。现代研究表明高乌头具有镇痛、抗炎、解热、局麻、抗心律失常等广泛的药理作用<sup>[3-4]</sup>,临床上常用于治疗类风湿性关节炎和局部镇痛<sup>[5]</sup>。化学成分研究显示高乌头中主要含有二萜类生物碱,目前已发现高乌头中含有 28 种生物碱成分<sup>[3]</sup>,其中高乌甲素和冉乌头碱含量最高,而活性成分之一高乌甲素已开发出不同剂型广泛应用于临床<sup>[6-8]</sup>。

通过对不同产区高乌头资源调查发现,高乌头品种混乱,同名异物现象严重,造成其混淆乱用,如湖北地区误把麻花秦艽作为高乌头使用<sup>[9]</sup>,安徽西部地区将瓜叶乌头称为高乌头,此外作为高乌头现有标准《甘肃省中药材标准》(2009 年版)<sup>[10]</sup>,却没有含量测定项,过于简单,难以全面反映其内在质量,而现在指纹图谱用于中药材质量控制,能够更宏观、全面反映中药所含化学成分的种类与数量,进而反映中药材的质量<sup>[11]</sup>。因此本实验采用建立不同产地高乌头的 HPLC 指纹图谱并测定 2 种主要生物碱成分的含量;其次,结合主成分分析和聚类分析法对不同来源的高乌头药材进行模式识别研究,评价不同产区高乌头药材的质量差异,旨在为更加全面、系统地控制高乌头药材质量提供实验依据。

### 1 材料

BT125D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),KQ3200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),FW-400A 型高建万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司),HHS-11S 型数显恒温水浴锅(上海宜昌仪器筛厂),1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司,DAD 检测器),SHB-3 型循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂),旋转蒸

发仪等。

对照品高乌甲素(甘肃神龙药业股份有限公司,批号 20001001,纯度  $\geq 97.50\%$ ),冉乌头碱(成都克洛玛生物科技有限公司,批号 150404,纯度  $\geq 98.00\%$ );乙腈、甲醇、三乙胺、磷酸二氢钠均为色谱纯;三氯甲烷、氨水、异丙醇、乙酸乙酯,95% 乙醇为分析纯。高乌头药材分别购于甘肃、青海、西藏等地。经甘肃中医药大学药学院杨扶德教授鉴定为毛茛科乌头属植物高乌头 *Aconitum sinomontanum* 的干燥根,结果见表 1。

表 1 高乌头药材样品来源

Table 1 Source of *Aconitum sinomontanum* radix samples

No.	购买时间	采购地点
S1	2016-04-27	青海省海北藏族自治州海晏县(市售)
S2	2016-09-20	青海省西宁市大通回族土族自治县(药农采挖)
S3	2015-05-05	甘肃省天祝藏族自治县先明峡(药农采挖)
S4	2016-09-16	甘肃省临夏州和政县松鸣岩(药农采挖)
S5	2016-04-27	甘肃省天祝藏族自治县朱岔峡(药农采挖)
S6	2016-08-29	青海省海南藏族自治州贵德县(药农采挖)
S7	2016-09-10	西藏藏族自治区日喀则地区日喀则(药农采挖)
S8	2015-03-29	甘肃省天祝藏族自治县炭山岭(药农采挖)
S9	2016-04-27	青海省互助土族自治县加定乡(药农采挖)
S10	2016-09-08	青海省黄南藏族自治州同仁县(药农采挖)

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Dikma spursil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 4% ~ 20% B, 流速 1.0 ~ 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 10 ~ 25 min, 20% ~ 25% B, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 25 ~ 50 min, 25% ~ 30% B, 流速 0.5 ~ 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 50 ~ 55 min, 30% ~ 50% B, 流速 0.4 ~ 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 55 ~ 63 min, 50% B, 流速 0.8 ~ 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 63 ~

65 min, 50% ~ 60% B, 流速 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; 65 ~ 70 min, 60% ~ 80% B, 流速 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; 70 ~ 78 min, 80% ~ 100% B, 流速 0.6 ~ 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 78 ~ 85 min, 100% B, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称定冉乌头碱、高乌头甲素对照品适量, 加甲醇制备质量浓度分别为 0.296 0, 0.800 4 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 存贮于 4 °C 冰箱中备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取高乌头药材粉末 1 g (过四号筛), 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加氨试液-三氯甲烷(6:44) 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 300 W, 频率 50 kHz, 水温 25 °C) 45 min, 放冷, 补足减失质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 20 mL, 40 °C 以下减压回收溶剂, 残渣加甲醇溶解, 定容至 10 mL, 密塞, 摇匀, 进样前用 0.45 μm 微孔膜过滤, 作为供试品溶液。

#### 2.4 高乌头药材 HPLC 指纹图谱的建立

**2.4.1 空白溶剂的考察** 取甲醇, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 进样量 5 μL, 结果表明溶剂无干扰。

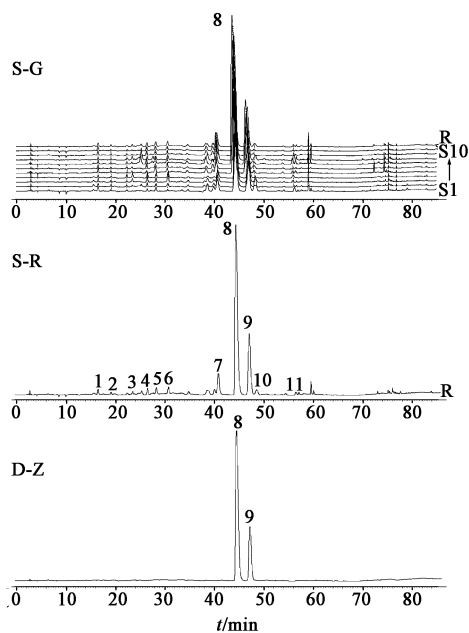
**2.4.2 精密度试验** 取同一批供试品溶液 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以高乌头甲素色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 1.7%, 表明仪器的精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 测定, 记录色谱图, 以高乌头甲素色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 1.9%, 表明 24 h 内样品的稳定性良好。

**2.4.4 重复性试验** 取同一批次样品粉末(过四号筛), 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 以高乌头甲素色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 1.7%, 表明本法有良好的重复性。

**2.4.5 不同产区高乌头药材指纹图谱建立与共有峰的标定** 取 10 批高乌头样品供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 并将数据导入

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件, 采用中位数矢量法进行多点校正生成高乌头药材指纹图谱及共有模式, 确定共有峰 11 个, 见图 1。通过与对照品的色谱图相比对, 确定其中 8 号峰为高乌头甲素, 9 号峰为冉乌头碱。由于高乌头甲素在各批次高乌头中均有出现, 分离度良好且峰面积较大, 故选择高乌头甲素作为参照峰(s), 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 2。每批样品中的非共有峰面积占总峰面积的比值均 < 20%, 符合指纹图谱技术要求。



S-G. 共有模式; S-R. 对照指纹谱; D-Z. 混合对照品; 8. 高乌头甲素; 9. 冉乌头碱

图 1 10 批高乌头药材 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches *Aconitum sinomontanum radix*

**2.4.6 高乌头药材样品 HPLC 指纹图谱相似度评价** 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)的分析处理, 生成高乌头指纹图谱共有模式, 得到相似度评价结果。相似度可以体现不同批次样品之间各成分在种类和相对含量上的相似程度; 由于相似度不能反映不同批次样品间成分绝对含量的差异, 所以同时采用总峰面积比(总峰面积比 = 样品总峰面积/10 批样品平均总峰面积)和相似度 2 个指标共同来对样品进行评价, 结果见表 3。相似度均 > 0.90, 表明各批次样品之间具有较高的相似性; 而从总峰面积比值上分析, 各批次之间比值不同, 可能受产地不同、采集时间不同的影响。

**2.4.7 不同产区高乌头样品聚类分析(CA)** 以不同地区高乌头药材的 11 个共有峰的峰面积为原始

表 2 10 批高乌头样品 HPLC 指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area analysis of common peaks of 10 batches *Aconitum sinomontanum* radix

No.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11
S1	0.016	0.004	0.003	0.007	0.015	0.006	0.113	0.447	0.005	0.003
S2	0.013	0.007	0.005	0.019	0.014	0.019	0.060	0.243	0.004	0.004
S3	0.013	0.006	0.004	0.027	0.018	0.044	0.088	0.239	0.004	0.003
S4	0.013	0.007	0.007	0.030	0.033	0.043	0.064	0.303	0.008	0.005
S5	0.020	0.008	0.003	0.009	0.027	0.019	0.124	0.520	0.003	0.004
S6	0.014	0.005	0.002	0.020	0.016	0.022	0.041	0.292	0.003	0.003
S7	0.009	0.003	0.002	0.012	0.021	0.018	0.140	0.375	0.004	0.003
S8	0.010	0.010	0.003	0.014	0.016	0.022	0.156	0.276	0.009	0.004
S9	0.016	0.004	0.004	0.015	0.017	0.015	0.068	0.305	0.008	0.003
S10	0.013	0.006	0.004	0.027	0.018	0.044	0.088	0.239	0.004	0.003

注:峰 8 均为 1.000。

数据,SPSS 21.0 软件对药材进行系统聚类分析,采用组间平均数联结,以夹角余弦为样品相似度的距离公式,聚类分析结果见图 2。由图可知,高乌头药材被分为 4 大类,S7 为 I 类;S4 为 II 类;S2,S3,S6,S8,S9,S10 为 III 类;S1,S5 为 IV 类。结合高乌甲素和冉乌头碱的含量情况可以认为,S7(西藏产区)质量最优,S4(甘肃和政)质量较好,S2,S3,S6,S8,S9,S10 质量次之,S1,S5 质量较差。

S8,S9,S10 为 III 类;S1,S5 为 IV 类。结合高乌甲素和冉乌头碱的含量情况可以认为,S7(西藏产区)质量最优,S4(甘肃和政)质量较好,S2,S3,S6,S8,S9,S10 质量次之,S1,S5 质量较差。

表 3 10 批高乌头药材样品相似度评价

Table 3 Result of similarity comparison of *Aconitum sinomontanum* radix from 10 habitats

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.975	0.977	0.981	0.988	0.979	0.99	0.982	0.982	0.977
S2	0.975	1	0.999	0.997	0.968	0.998	0.989	0.989	0.998	0.999
S3	0.977	0.999	1	0.997	0.968	0.997	0.99	0.992	0.996	0.954
S4	0.981	0.997	0.997	1	0.98	0.999	0.994	0.988	0.999	0.997
S5	0.988	0.968	0.968	0.98	1	0.977	0.991	0.969	0.981	0.968
S6	0.979	0.998	0.997	0.999	0.977	1	0.992	0.986	0.999	0.997
S7	0.990	0.989	0.99	0.994	0.991	0.992	1	0.991	0.995	0.990
S8	0.982	0.989	0.992	0.988	0.969	0.986	0.991	1	0.988	0.992
S9	0.982	0.998	0.996	0.999	0.981	0.999	0.995	0.988	1	0.996
S10	0.977	0.999	0.954	0.997	0.968	0.997	0.99	0.992	0.996	1
对照	0.989	0.996	0.996	0.998	0.985	0.997	0.998	0.993	0.999	0.996
总峰面积比	1.235	0.756	0.947	0.622	1.045	0.875	1.616	1.005	0.950	0.947

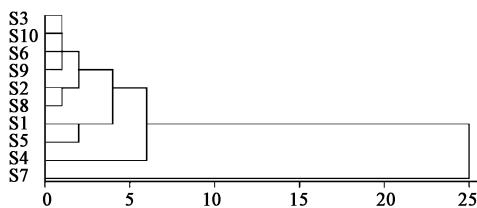


图 2 高乌头样品共有峰面积聚类分析树状关系

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of *Aconitum sinomontanum* radix

头药材指纹图谱中 11 个共有峰(变量)进行主成分分析,结果见表 4。

由表可知,前四个主成分累计贡献率达到 89.748%,其中,第一主成分的特征值为 4.475,贡献率为 40.686%;第二主成分的特征值为 2.565,贡献率为 23.314%,特征值均 >2。以第一、第二主成分为变量,得到二维投影图,见图 3。以 X 轴为例,在投影图中选取距离原点较远的几个点,得到第一主成分中变量的权重值,权重值越大,表明该化合物在高乌头药材中作用越大,其中前 5 个变量的权重值为 0.912,0.881,0.876,0.826,0.801,分别为 11,8,9,7,5 号峰,其中 8 号峰为高乌甲素,9 号峰为

表 4 高乌头指纹谱共有峰特征值

Table 4 Characteristic values of common peaks in *Aconitum sinomontanum* radix

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
A1	4.475	40.686	40.686
A2	2.565	23.314	64.000
A3	1.546	14.055	78.055
A4	1.286	11.693	89.748
A5	0.482	4.384	94.132
A6	0.329	2.992	97.124
A7	0.272	2.477	99.601
A8	0.044	0.399	100.000

冉乌头碱, 11, 7, 5 号峰未知, 需要进一步分析确认。

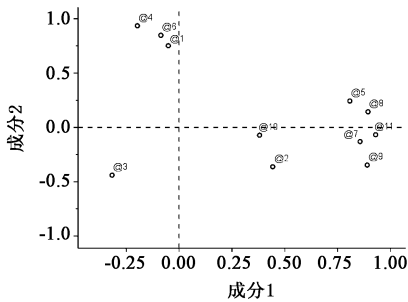


图 3 高乌头 HPLC 指纹图谱二维投影  
Fig. 3 2D projection map of HPLC fingerprint of *Aconitum sinomontanum* radix

## 2.5 高乌头样品中高乌甲素与冉乌头碱含量测定

**2.5.1 线性关系的考察** 精密吸取混合对照品贮备液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 mL 用甲醇定容至 5.0 mL, 摇匀。分别按 2.1 项下色谱条件进样分析, 进样量 5  $\mu$ L, 测定峰面积, 以峰面积 (Y) 对质

量浓度 (X) 进行线性回归。结果表明, 高乌甲素在 0.200 1 ~ 4.002  $\mu$ g 线性关系良好, 回归方程  $Y = 10\ 954X + 4.741\ 9$  ( $r = 0.999\ 8$ ); 冉乌头碱在 0.074 0 ~ 1.480 0  $\mu$ g 线性关系良好, 回归方程  $Y = 10\ 005X - 3.252\ 6$  ( $r = 0.999\ 7$ )。

**2.5.2 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 5  $\mu$ L, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 结果冉乌头碱、高乌甲素峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.7%, 表明仪器的精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 测定, 记录冉乌头碱与高乌甲素的峰面积。其峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.2%。结果表明 24 h 内样品的稳定性良好。

**2.5.4 重复性试验** 取同一批次样品粉末 (过四号筛), 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 计算高乌甲素和冉乌头碱的质量分数 (0.742%, 0.753%, 0.723%, 0.743%, 0.771%, 0.713%; 0.267%, 0.285%, 0.239%, 0.289%, 0.271%, 0.292%)。结果表明, 本方法有良好的重复性, 高乌甲素和冉乌头碱含量的 RSD 分别为 2.0%, 1.8%。

**2.5.5 加样回收率试验** 取已知含量的高乌头粉末 0.5 g (高乌甲素质量分数为 0.911%, 冉乌头碱质量分数 0.289%) 共 6 份, 精密称定。分别加入相当于样品成分含量 100% 的高乌甲素和冉乌头碱对照品, 按 2.3 项下方法制备, 依法测定, 计算高乌甲素和冉乌头碱的平均回收率均分别为 97.8%, 100.6%, RSD 分别为 2.1%, 1.2%, 表明方法的回收率良好, 结果见表 5。

表 5 冉乌头碱与高乌甲素加样回收试验

Table 5 Results of recovery for lappacontine and ranaconitine

称样量/g	样品中量/mg		加入量/mg		测得量/mg		回收率/%		平均回收率/%	
	冉乌头碱	高乌甲素	冉乌头碱	高乌甲素	冉乌头碱	高乌甲素	冉乌头碱	高乌甲素	冉乌头碱	高乌甲素
0.500 60	1.45	4.56	1.42	4.52	2.85	9.17	99.05	101.90		
0.501 64	1.45	4.57	1.44	4.70	2.82	9.22	95.40	99.04		
0.501 47	1.45	4.57	1.43	4.42	2.88	9.09	99.79	102.27	97.80	100.60
0.505 15	1.46	4.60	1.47	4.93	2.93	9.54	99.67	100.22		
0.506 12	1.46	4.61	1.47	4.94	2.90	9.58	97.82	100.60		
0.512 81	1.48	4.67	1.48	4.51	2.89	9.17	95.20	99.80		

**2.5.6 样品含量测定** 取 10 批高乌头样品供试液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 测定样品高乌甲素和冉乌头碱的含量, 结果见表 6。不同产地的高

乌头样品中高乌甲素和冉乌头碱成分均有不同程度的差异。推测可能受到药材产地、采集时间等因素影响。

表 6 10 批高乌头药材中高乌甲素和冉乌头碱的质量分数  
Table 6 Contents of lappacontine and ranaconitine of 10 batches of *Aconitum sinomontanum* radix %

No.	高乌甲素	冉乌头碱
S1	0.647	0.173
S2	0.783	0.385
S3	0.678	0.206
S4	0.911	0.289
S5	0.512	0.171
S6	0.687	0.392
S7	1.132	0.466
S8	0.759	0.200
S9	0.776	0.261
S10	0.756	0.243

### 3 讨论

**3.1 提取溶剂和提取方式的选择** 分别考察了稀氨水-异丙醇-乙酸乙酯(3:25:25);氨水-三氯甲烷(6:44);氨水-95%乙醇(6:44);95%乙醇各 50 mL 作为提取溶剂。结果显示氨水-三氯甲烷作为提取溶剂时,色谱峰数目较多,而 95%乙醇作为提取溶剂时,色谱峰数目过多很难分离,综合分析最终选择氨水-三氯甲烷作为提取溶剂。试验还考察了超声处理 30,45,60 min 及回流 60 min 4 种提取方法,结果表明超声 45 min 的方法提取效率高且简单方便,故采用超声 45 min 提取方法。

**3.2 色谱条件的选择** 分别采用了甲醇-水,乙腈-水作流动相,梯度洗脱,高乌头中部分化学成分能够较好的基线分离,但采用甲醇-水作为流动相时在 254 nm 时基线漂移较为严重,故采用乙腈-水作为流动相。在上述 2 种流动相系统,高乌甲素和冉乌头碱很难达到基线分离,由于高乌甲素和冉乌头碱结构相似,极性相近。在此基础上,试验分别加入三乙胺和磷酸二氢钠作为缓冲盐时,两者均能够达到很好的基线分离,但采用三乙胺作为缓冲盐时 pH 很不稳定,对色谱柱损害较大,故采用磷酸二氢钠作为缓冲盐。同时也考察了波长(235, 254, 272, 308 nm)及柱温对分离的影响,结果显示试验所用条件为最佳条件。

**3.3 分析方法评价** 本研究运用 HPLC-DAD 方法建立了高乌头药材指纹图谱并测定了 2 种主要生物碱成分的含量,同时应用聚类分析和主成分分析对不同产区高乌头药材进行分类和质量评价,两者相互验证,相互补充,可以为高乌头药材质量评价提供

参考。植物类药材由于生长环境、气候、土壤,采集时间等因素影响,其成分种类和含量也有所不同,表现在色谱图中则是色谱峰的个数、保留时间以及相同保留时间下色谱峰峰面积的差异。聚类分析可以将不同产区药材聚为一类,但由于所收集药材来源批次有限,后期可以增加收集样品来源批次数量,为筛选出质量最优药材产区提供依据。而主成分分析则能够筛选出共有的特征成分,找出决定因素,为高乌头药材质量评价提供参考依据。本实验共选出 5 个特征成分,其中分别为高乌甲素、冉乌头碱和未知的 11 号峰,7 号峰,5 号峰,可以通过质谱进一步确定。运用 PCA-CA 能够更全面、准确地判别药材的真伪和优劣,可以作为高乌头药材质量评价手段。

#### [参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 7 卷 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:1746-1747.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:751-752.

[3] 徐斌,张琴,郭夫江,等. 高乌头的研究进展 [J]. 中成药,2016,38(4):882-890.

[4] Vakhitova Iu V, Farafontova E I, Khisamutdinova R Iu, et al. To the mechanisms of antiarrhythmic action of Allapinine [J]. Bioorg Khim, 2013, 39(1):105-116.

[5] WANG Y Z, XIAO Y Q, ZHANG C, et al. Study of analgesic and anti-inflammatory effects of *Lappaconitine gelata* [J]. J Trad Chin Med, 2009, 29(2):141-145.

[6] 胡雪莲,雷健,邢茂,等. 氢溴酸高乌甲素分散片的处方优化及制备 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(8):613-616.

[7] WEN X S, TUN G D, CHUN M D. Crystal structure analysis and antinociceptive property of lappaconitine hydrochloride [J]. Adv Materials Res, 2011, 343/344:1049-1052.

[8] 张勇,龚正寿,黎志. 联用小剂量的氢溴酸高乌甲素片和甲氨蝶呤片治疗类风湿关节炎的效果观察 [J]. 当代医药论丛, 2015, 13(20):189-190.

[9] 王文军,李寿林. 麻花秦艽及其混淆品麻布七的鉴别 [J]. 中药材, 1989, 12(3):28.

[10] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药材标准 [M]. 兰州:甘肃文化出版社, 2009:117-118.

[11] 洪燕,韩燕全,夏伦祝,等. 不同产地苍耳子 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11):1766-1771.

[责任编辑 顾雪竹]