



黄草乌栽培品 UPLC-MS/MS 多指标含量测定 及化学计量学分析

陈 威, 程子丹, 李国栋, 马晓霞**
(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要:建立超高效液相色谱-三重四级杆质谱多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)定量分析方法,检测黄草乌中生物碱含量,为黄草乌的质量控制提供参考。色谱柱: ACQUITY UPLC®BEH C₁₈(ϕ 2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m);流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱;测定 18 批黄草乌中塔拉萨敏、滇乌碱、黄草乌碱甲等 9 个生物碱成分的含量,并结合化学计量法对测定结果进行分析。测定的 9 个成分在相应质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好($R^2>0.998\ 0$),平均加样回收率为 96.74%~101.2%, RSD 为 0.65%~1.9%。测定结果表明黄草乌中 9 个成分含量差异较大,无明显的地域性差别。根据聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析的结果发现 18 份黄草乌栽培品基本可以分两类,其中塔拉萨敏、黄草乌碱甲、滇乌碱、膝乌宁碱丙、南乌碱乙为主要差异成分。建立了 UPLC-MS/MS 同时测定黄草乌栽培品中 9 个生物碱成分含量的方法,该方法分析时间短、专属性强、灵敏度高,可为不同产地的黄草乌质量评价提供参考。

关键词:黄草乌;超高效液相色谱串联质谱法;含量测定;化学计量学

中图分类号:O657.63; R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**0258-7971(2025)02-0365-08

黄草乌为毛茛科乌头属植物黄草乌(*Aconitum vilmorinianum* Kom.)的干燥块根,主产于云南中西部地区^[1]。黄草乌味辛,性温,有大毒,归心、肝经,具有祛风除湿、散寒止痛、温经通络的功效,多用于治疗风寒湿痹、中风瘫痪、心腹冷痛、四肢逆冷、跌扑损伤,外用可治疗疗疮初起^[2]。黄草乌是云南红药、虎力散、三乌胶等云南特色伤科药的原料药材之一,有着较高的药用价值,在云南较多地方实现了人工大面积栽培。本课题组前期以滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙 3 种双酯型二萜生物碱为指标成分,采用 HPLC 法建立了黄草乌的定量分析方法^[3],发现几个产地栽培品之间成分差异较大,进一步研究发现黄草乌栽培品存在种源混杂的情况^[4]。因此本文扩大了黄草乌栽培品药材的收集范围,同时增加指标成分,建立液质联用的方法并结合化学计量学分析手段对黄草乌栽培品药材质量

差异情况进行研究。

黄草乌药材中主要活性成分是二萜生物碱^[5-7],李继印等^[8]曾利用 UPLC-MS/MS 技术对黄草乌中的滇乌碱、粗茎乌头碱甲以及塔拉萨敏的含量进行测定,发现塔拉萨敏在黄草乌中的含量高于其他两个成分。本课题组在多批次黄草乌药材薄层色谱分析中也发现醇胺型生物碱含量较大,因此本文选取了从黄草乌中分离到的 4 个双酯型生物碱:滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙和膝乌宁碱丙,3 个单酯型生物碱:8-去乙酰基滇乌碱、南乌碱乙和 Acoforesticine,以及 2 个醇胺型生物碱:黄草乌碱丁和塔拉萨敏,共 9 个成分作为指标,以泸西、建水、个旧、东川、禄劝、巧家等地种植的 18 份黄草乌药材作为研究对象,采用 UPLC-MS/MS 法对 9 个成分进行同时定量检测,并结合化学计量学进行分析,以期对黄草乌栽培品的质量评价及规范化种

收稿日期:2024-03-25; 接受日期:2024-10-09; 网络出版日期:2024-10-17

基金项目:国家自然科学基金(82160746);云南省“万人计划”青年拔尖人才专项(YNWR-QNBJ-2019-011)。

作者简介:陈 威(1996-),男,广东人,硕士生,主要研究民族药质量标准。E-mail: 897625661@qq.com。

** 通信作者:马晓霞(1980-),女,回族,云南人,博士,副研究员;主要研究中药质量控制。E-mail: 51578410@qq.com。

植提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Xevo TQMS 三重四级杆质谱(美国 Waters 公司); HU-10260F 超声清洗仪器(天津市恒奥科技发展有限公司); AUW1200 型电子分析天平(日本岛津公司)。

1.2 材料 对照品塔拉萨敏(Talatisamine)、滇乌碱(Yunaconitine)、黄草乌碱甲(Vilmorrianine A)、黄草乌碱丙(Vilmorrianine C)、黄草乌碱丁(Vilmorrianine D)、膝乌宁碱丙(Geniculatine C)、南乌碱乙(Austroconitine B)、8-去乙酰基滇乌碱(8-deacetyl-yunaconitine)、Acoforesticine 均为课题组前期从黄草乌药材中分离得到,经 HPLC 检测,纯度均 $\geq 98\%$ 。乙腈(Merck 公司,色谱纯);甲醇(天津市致远化学试剂科技有限公司,分析纯);异丙醇、乙酸乙酯(天津风船化学试剂科技有限公司,分析纯);氨水(四川西陇化工有限公司,分析纯);甲酸(上海泰坦科技股份有限公司,分析纯)。18 批黄草乌栽培品药材的来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ ($\phi 2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0~15 min, A 为 5%~100%(体积比); 流速: 0.25 mL/min, 柱温: 30 °C, 进样量: 1 μL 。

质谱条件: 电喷雾负离子模式, 毛细管电压:

2.5 kV; 脱溶剂气流: N₂, 流速: 600 L/h, 脱溶剂温度: 350 °C; 锥孔气流: N₂, 流速 150 L/h; 离子源温度: 150 °C; Extractor: 3.00 V; 碰撞气体: 氩气。采用 MRM 定量模式, 9 种分析物的质谱分析条件参数见表 2。在此条件下, 对照品与样品的提取离子流图见图 1。

2.2 对照品溶液配制及样品处理

2.2.1 对照品溶液的制备 取塔拉萨敏, 滇乌碱, 8-去乙酰基滇乌碱, 黄草乌碱甲, 黄草乌碱丙, 黄草乌碱丁, Acoforesticine, 南乌碱乙, 膝乌宁碱丙对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 2.28、2.58、2.12、2.13、2.18、2.16、2.27、2.33、2.07 mg/mL 的对照品母液, 分别取 1 μL , 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至 10 mL, 制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将采集的黄草乌栽培品药材晒干、打粉, 过 0.301 mm(60 目)筛。精密称取 2.00 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加 25% 氨水 3 mL 润湿。精密量取异丙醇-乙酸乙酯(体积比 1:1)混合溶液 25 mL, 称重, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称重, 用异丙醇-乙酸乙酯(体积比 1:1)混合溶液补足失重, 摇匀, 过滤。精密量取续滤液 15 mL, 40 °C 减压回收至干。残渣用甲醇溶解, 转移至 5 mL 容量瓶中, 定容至刻度。用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液 10 μL , 用甲醇定容至 1 mL, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密称取“2.2”项下对照品溶液, 加甲醇稀释至 5 个不同质量浓度, 由低至

表 1 黄草乌栽培品药材的来源信息

Tab. 1 Source information of cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani

编号	样品来源	编号	样品来源
S1	红河哈尼族彝族自治州泸西县三塘乡菊畹村/黄皮	S10	昆明市禄劝彝族苗族自治县干海子撒营盘/黄皮
S2	红河哈尼族彝族自治州泸西县向阳乡木柅村/黄皮	S11	昆明市禄劝彝族苗族自治县干海子撒营盘/紫皮
S3	红河哈尼族彝族自治州泸西县向阳乡木柅村/紫皮	S12	昭通市巧家县药山镇大村黄家坪社/黄皮
S4	红河哈尼族彝族自治州个旧市对门山/黄皮	S13	昭通市巧家县药山镇大村黄家坪社/紫皮
S5	红河哈尼族彝族自治州个旧市对门山/紫皮	S14	昭通市巧家县药山镇大村岔河社/黄皮
S6	红河哈尼族彝族自治州建水县普雄乡三道沟/黄皮	S15	昭通市巧家县药山镇大村岔河社/紫皮
S7	昆明市东川区汤丹镇新华村/黄皮	S16	昭通市巧家县药山镇大村水塘社/黄皮
S8	昆明市东川区汤丹镇新华村/紫皮	S17	昭通市巧家县药山镇大村水塘社/紫皮
S9	昆明市禄劝彝族苗族自治县干海子撒营盘(珠芽繁殖)	S18	丽江市宁蒗彝族自治县永宁乡红桥/紫皮

表 2 MRM 参数列表
Tab. 2 MRM parameter list

序号	成分	保留时间/min	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
P1	黄草乌碱丁	3.56	392.40	341.85	30	30
				359.92	30	40
P2	塔拉萨敏	3.61	422.50	357.86	30	35
				371.87	30	30
P3	8-去乙酰基滇乌碱	5.70	618.47	134.72	30	45
				567.81	30	35
P4	膝乌宁碱丙	6.08	614.30	423.89	40	30
				431.90	40	30
P5	南乌碱乙	6.29	602.07	134.74	40	45
				551.92	40	35
P6	滇乌碱	6.73	660.40	567.84	30	35
				599.65	30	25
P7	Acoforesticine	6.88	586.50	134.74	30	40
				553.83	30	30
P8	黄草乌碱甲	7.34	644.40	551.82	30	40
				583.59	30	40
P9	黄草乌碱丙	7.81	628.45	503.84	30	40
				535.85	30	30

高依次进样,按“2.1”项下色谱条件进行分析,以质量浓度($\mu\text{g/mL}$)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。相关系数(R^2)大于 0.998,表明该方法的线性关系良好。

2.3.2 精密度实验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL ,按“2.1”项下进行分析,连续进样 6 次,记录峰面积。结果显示,塔拉萨敏、滇乌碱、8-去乙酰基滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙、黄草乌碱丁、Acoforesticine、南乌碱乙、膝乌宁碱丙的峰面积 RSD 分别为 0.16%、0.050%、0.070%、0.48%、0.060%、0.080%、0.25%、0.39%、0.21%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性考察 取同一供试品溶液分别于 0、2、4、8、12 h 和 24 h 进样分析,按“2.1”项下测定,记录峰面积。结果显示,塔拉萨敏、滇乌碱、8-去乙酰基滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙、黄草乌碱丁、Acoforesticine、南乌碱乙、膝乌宁碱丙的峰面积 RSD 分别为 0.48%、0.22%、0.54%、0.20%、0.63%、0.33%、0.43%、0.63%、0.79%,表明供试品溶液于室温下放置 24 h 稳定性良好。

2.3.4 重复性考察 取同一供试品,按“2.2”项下

供试品处理方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下测定,记录峰面积。结果显示,塔拉萨敏、滇乌碱、8-去乙酰基滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙、黄草乌碱丁、Acoforesticine、南乌碱乙、膝乌宁碱丙的峰面积 RSD 分别为 0.35%、0.76%、1.8%、0.59%、0.67%、0.56%、0.45%、0.97%、1.5%,表明该方法重现性良好。

2.3.5 加样回收率考察 精密称取已测含量的供试品粉末 1.00 g,共 6 份,分别精密加入相当量的对照品溶液,按“2.2”项下供试品处理方法制备供试品溶液,按“2.1”项下测定,记录峰面积,根据测得量和加入量计算回收率,并计算平均值和 RSD。结果显示,塔拉萨敏、滇乌碱、8-去乙酰基滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙、黄草乌碱丁、Acoforesticine、南乌碱乙、膝乌宁碱丙的平均加样回收率分别为 100.5%、100.3%、100.8%、99.59%、96.74%、101.2%、100.2%、97.63%、97.87%,RSD 分别为 0.66%、0.69%、1.6%、0.65%、0.72%、1.9%、1.4%、0.96%、1.2%。

2.4 不同产地样品含量测定 18 批黄草乌样品按照“2.2”项下供试品处理方法以及“2.1”项下条件

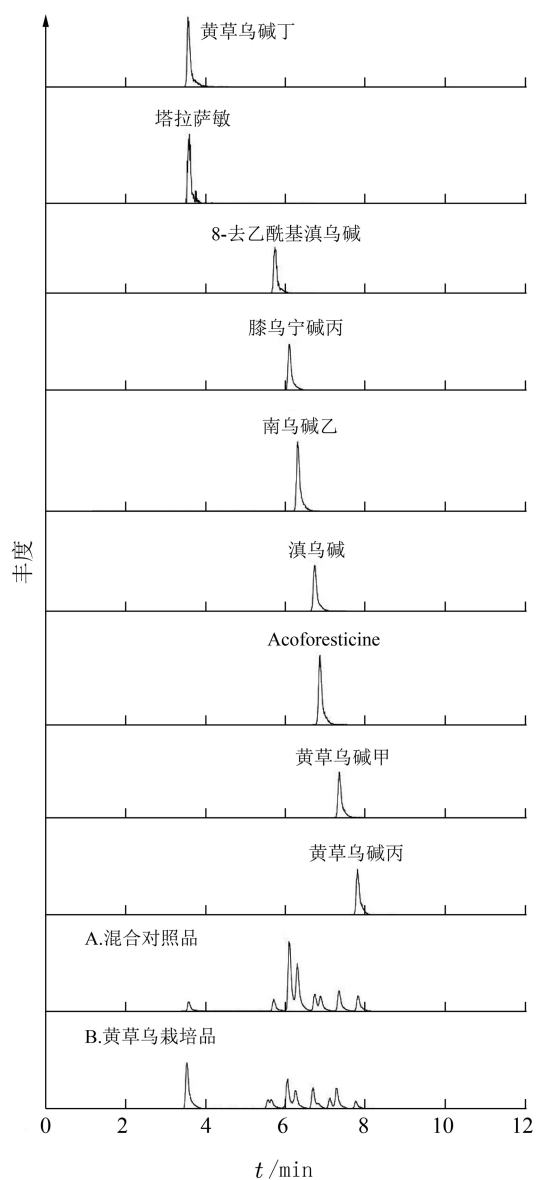


图 1 对照品与样品的提取离子流图

Fig. 1 The extracted ion chromatogram of reference substance and sample

测定, 根据峰面积计算出 9 个成分的质量分数, 结果见表 4. 滇乌碱质量分数在 0.034 9 ~ 0.747 8 mg/g、黄草乌碱甲在 0.012 2 ~ 0.535 3 mg/g、黄草乌碱丙在 0.000 3 ~ 0.076 6 mg/g、膝乌宁碱丙在 0.005 2 ~ 0.041 5 mg/g、8-去乙酰基滇乌碱在 0.005 1 ~ 0.221 8 mg/g、南乌碱乙在 0.005 7 ~ 0.269 1 mg/g、Acoforesticine 在 0.001 3 ~ 0.059 8 mg/g、黄草乌碱丁在 0.275 4 ~ 0.910 3 mg/g、塔拉萨敏在 0.396 3 ~ 2.100 7 mg/g, 表明不同批次的黄草乌之间各成分的含量差异普遍较大. 从生物碱类型来看, 醇胺型的含量远高于双酯型和单酯型; 双酯型中, 滇乌碱和黄草乌碱甲的含量相对较高, 膝乌宁碱丙和黄草乌碱丙含量整体较低; 单酯型中, 8-去乙酰基滇乌碱和南乌碱乙的含量相对较高, Acoforesticine 含量较低, 甚至有一批黄草乌并未检测出该成分. 不同产地黄草乌的成分含量差异较大, 即便同一产地, 例如巧家(表 1, S12 ~ S17)的黄草乌样品中黄草乌碱甲的含量差异也非常大, 最高相差 42.5 倍, 说明生物碱成分的含量不仅跟产地有关, 还可能与栽培品的种源混杂情况有关.

2.5 化学计量学分析

2.5.1 聚类分析 (CA) 利用 SPSS 19.0 对 18 批不同产地不同批次的黄草乌样品进行系统聚类分析, 以 9 个成分的峰面积为变量, 采用离差平方和法, 得到了系统聚类分析图, 结果见图 2. 由图 2 可知, 在欧式距离 25 时, 可将 18 批样品聚为 2 大类. S2、S6、S10、S13、S17、S11、S15、S3、S5、S9 聚为第 1 类, S8、S16、S1、S4、S7、S18、S12、S14 聚为第 2 类. 泸西、个旧、巧家产地的药材分别聚在不同的大类, 说明产地不是药材质量的决定性因

表 3 回归方程、线性范围和相关系数

Tab. 3 Regression equations, linear ranges and correlation coefficients

化合物	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
8-去乙酰基滇乌碱	$y=3\,275.82x-37.58$	0.999 7	0.019 2 ~ 0.532 4
膝乌宁碱丙	$y=12\,043.2x-135.4$	0.999 5	0.018 7 ~ 0.196 2
黄草乌碱丁	$y=2\,442.23x-17.24$	0.999 7	0.020 0 ~ 0.204 0
滇乌碱	$y=3\,965.41x-28.601$	0.999 9	0.023 5 ~ 2.450 5
黄草乌碱甲	$y=6\,467.82x+9.657\,5$	0.999 9	0.018 3 ~ 2.015 8
黄草乌碱丙	$y=4\,864.3x-118.68$	0.999 7	0.018 1 ~ 2.085 7
南乌碱乙	$y=9\,478.82x-57.823$	0.998 3	0.022 4 ~ 2.178 0
Acoforesticine	$y=3\,625.76x+61.133$	0.999 6	0.020 0 ~ 2.140 9
塔拉萨敏	$y=155.737x-0.654\,2$	0.999 7	0.020 2 ~ 2.180 8

表 4 不同产地黄草乌中 9 个成分质量分数

Tab. 4 Content of nine components of Radix Aconitum Vilmoriniani from different origins

mg/g

样品	黄草乌碱丁	塔拉萨敏	8-去乙酰基滇乌碱	膝乌宁碱丙	南乌碱乙	滇乌碱	Acoforesticine	黄草乌碱甲	黄草乌碱丙
S1	0.644 1	1.615 0	0.038 9	0.011 2	0.097 5	0.163 0	0.024 6	0.203 1	0.047 2
S2	0.368 5	1.012 1	0.038 7	0.010 5	0.145 5	0.034 9	0.059 8	0.073 8	0.035 5
S3	0.437 0	0.642 6	0.029 3	0.019 4	0.154 9	0.048 7	0.029 5	0.081 1	0.042 7
S4	0.450 7	1.551 8	0.054 0	0.005 2	0.083 9	0.121 5	0.016 5	0.126 1	0.036 1
S5	0.275 4	0.583 7	0.034 4	0.020 7	0.031 2	0.085 9	0.009 7	0.046 1	0.024 0
S6	0.413 2	1.076 6	0.020 7	0.010 0	0.073 4	0.048 7	0.018 2	0.075 9	0.044 8
S7	0.725 0	1.400 7	0.058 5	0.017 8	0.179 5	0.362 1	0.006 2	0.535 3	0.024 4
S8	0.910 3	1.967 1	0.221 8	0.023 7	0.269 1	0.374 1	0.018 5	0.289 6	0.024 0
S9	0.342 6	0.396 3	0.007 2	0.038 9	0.011 8	0.177 9	0.002 0	0.098 0	0.009 4
S10	0.335 9	1.011 3	0.017 4	0.027 6	0.050 5	0.337 5	0.021 6	0.228 3	0.076 6
S11	0.738 2	0.709 7	0.005 1	0.032 6	0.025 0	0.144 1	0.010 7	0.326 6	0.061 6
S12	0.438 2	1.530 0	0.024 9	0.021 3	0.041 6	0.624 0	0.003 8	0.375 7	0.019 7
S13	0.321 1	0.961 5	0.011 1	0.037 9	0.005 7	0.301 9	—	0.012 2	0.000 3
S14	0.512 0	1.326 7	0.052 8	0.016 5	0.090 2	0.697 6	0.007 3	0.519 0	0.044 0
S15	0.608 3	0.821 7	0.027 4	0.017 2	0.037 2	0.257 9	0.001 3	0.142 7	0.007 5
S16	0.510 5	2.100 7	0.040 7	0.016 8	0.030 7	0.747 8	0.010 4	0.276 3	0.051 2
S17	0.579 5	1.013 5	0.025 1	0.041 5	0.022 2	0.459 1	0.006 7	0.184 7	0.030 7
S18	0.731 1	1.251 4	0.041 6	0.022 2	0.149 2	0.299 0	0.013 7	0.435 3	0.023 3

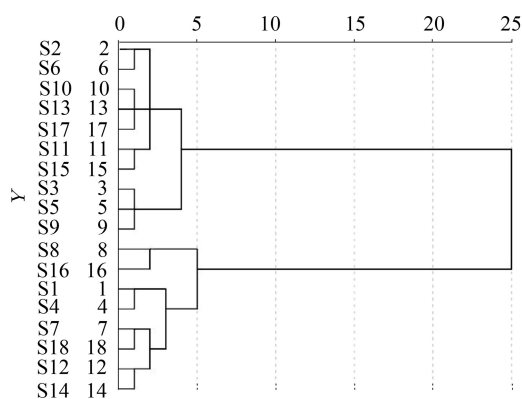


图 2 18 批黄草乌栽培品 CA 图

Fig. 2 The CA figure of 18 batches of cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani

素. 采集过程中关注到的紫皮与黄皮的药材也没有在聚类中完全分开, 说明根皮颜色并不是药材种类的重要表征, 并且几乎每个产地都能收集到不同根皮颜色的药材, 表明这种差异与地域因素无关.

2.5.2 主成分分析 (PCA) 将 18 批黄草乌样品 9 个成分的峰面积数据导入 SIMCA-P 软件, 以无监督化学模式识别进行 PCA, 见图 3. 结果发现栽培品可分为两类, S8、S1、S7、S4、S12、S16、S14、

S18 为一类, S2、S6、S10、S13、S17、S11、S15、S3、S5、S9 为一类, 该分类结果与聚类分析结果一致. 故将样品以此法分为 2 组进行正交偏最小二乘法-判别分析.

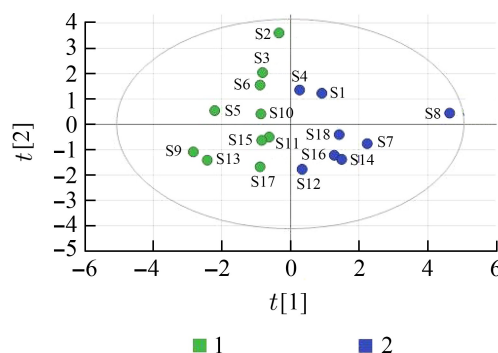


图 3 18 批黄草乌样品 PCA 图

Fig. 3 The PCA figure of 18 batches of cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 将 18 批黄草乌样品的 9 个成分的峰面积数据导入 SIMCA-P 软件, 采用有监督的 OPLS-DA 方法分析数据. 其 OPLS-DA 得分 [图 4(a)] 显示, 18 批黄草乌样品被分为两类, 且分类结果与聚类分析结果一

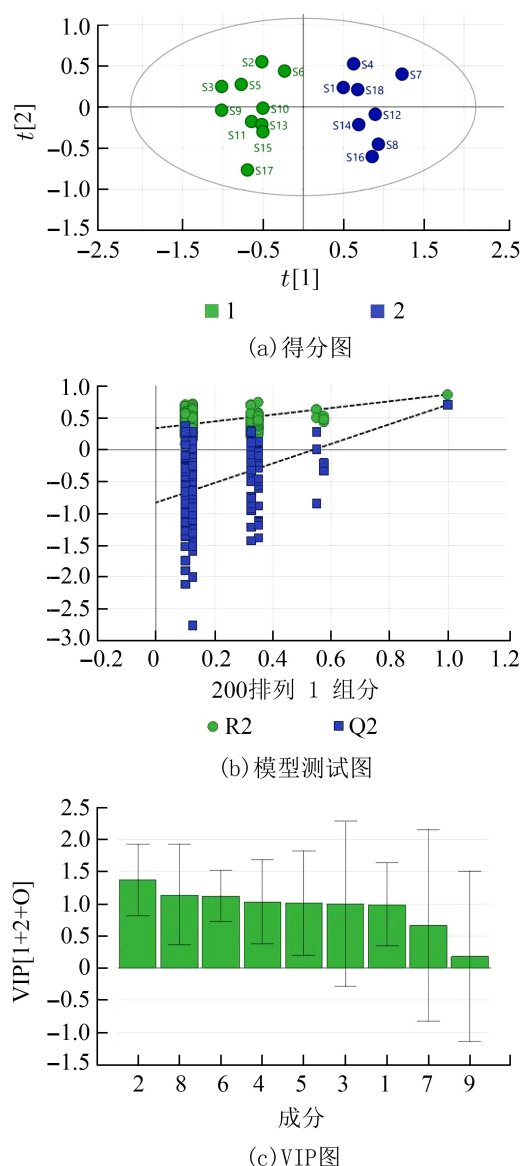


图 4 18 批黄草乌样品 OPLS-DA 分析结果

Fig. 4 The OPLS-DA results of 18 batches of cultivated *Radix Aconitum Vilmoriniani*

致,说明分类合理。由图 4(b)可知,左端任意一次随机排列产生的 R2 和 Q2 均小于右端,表明所建模型有效。由图 4(c)可知, P2, P8, P6, P4, P5 的变量重要性投影(VIP)值均>1,是引起两类样品差异的主要成分。其中 P2 为塔拉萨敏, P8 为黄草乌碱甲, P6 为滇乌碱, P4 为膝乌宁碱丙, P5 为南乌碱乙。

3 讨论

天然药材的成分复杂,活性成分在天然药材中的含量相对较低,液相色谱-质谱联用技术可以有效地解决这一问题^[9]。超高效液相-质谱联用技术是液质联用中的一种,它充分发挥了超高效液相分离效果好、分析速度快与质谱选择性强、灵敏度高

的特点,可以同时多种成分进行定性、定量分析^[10]。本研究选用了 9 个对照品,如果采用常规的高效液相色谱法,洗脱时间较长,且黄草乌的主要生物碱成分塔拉萨敏和黄草乌碱丁为醇胺型生物碱,无紫外吸收,液质联用能很好解决这一问题。此外,采用甲醇或乙腈-水为流动相峰型拖尾严重,在水中加入 0.1% 甲酸后,峰型得到改善,因此选取乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相。在上述色谱条件下,采用 MRM 模式进行定量分析,通过 Mass Tune 对 4 种主要质谱参数进行优化,然后对每个成分的毛细管电压和锥孔电压进行优化,选取响应较高的毛细管电压和锥孔电压,确定了最佳的毛细管电压、锥孔电压,并考察了最佳的碰撞能量,在选择定量离子时选取子离子中响应值最高的作为定量离子。

该研究建立了使用 UPLC-MS/MS 同时测定黄草乌中滇乌碱、黄草乌碱甲、黄草乌碱丙、膝乌宁碱丙、8-去乙酰基滇乌碱、南乌碱乙、Acoforesticine、黄草乌碱丁、塔拉萨敏 9 个生物碱成分含量的方法,根据含量测定的结果,发现 18 批黄草乌中塔拉萨敏、黄草乌碱丁两个醇胺型生物碱的含量都比较高,双酯型生物碱黄草乌碱丙和膝乌宁碱丙及单酯型生物碱 8-去乙酰基滇乌碱和 Acoforesticine 的含量相对较低。通过对含量测定的结果进行聚类分析、主成分分析及正交偏最小二乘法-判别分析,结果表明 18 批黄草乌栽培品被分为两类,同一产地药材可聚在不同的大类,不同产地亦可聚在同一大类,可见产地不是药材质量的决定性因素。紫皮与黄皮的药材在聚类中没有完全分开,因此根皮颜色并不是药材种类的重要表征。塔拉萨敏,黄草乌碱甲,滇乌碱,膝乌宁碱丙,南乌碱乙为主要差异成分,可考虑进一步将其作为质量差异性的指标成分,对不同产地的黄草乌栽培品进行质量评价。从目前的研究结果看,黄草乌栽培药材质量存在较大差异,而产地并不是决定性因素,可能还与种源混杂有关,应进一步将药材的化学成分与基原鉴别一一对应进行研究,为黄草乌的规范化种植提供科学依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志 (第十一卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 89-91.
Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science. Flora of Yunnan (Vol 11)[M]. Beijing: Science Press, 2000: 89-91.

- [2] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准 (第七册)[M]. 2005 年版. 昆明: 云南科技出版社, 2013: 69-70.
Yunnan Provincial Food and Drug Administration. Standard for traditional Chinese Medicine in Yunnan Province. (Vol 7)[M]. 2005 Edition. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2013: 69-70.
- [3] 董帅, 陈翠玲, 朱培芳, 等. HPLC 测定云南不同产地野生与栽培黄草乌中 3 种双酯型二萜生物碱成分含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(4): 74-77.
Dong S, Chen C L, Zhu P F, et al. HPLC determination of three diester diterpenoid alkaloids of wild and cultivated *Aconitum Vilmorinianum* Radix from different producing areas in Yunnan Province[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2020, 27(4): 74-77.
- [4] 施晓静, 程子丹, 张颖敏, 等. 基于全叶绿体基因组分析的栽培黄草乌基源研究 [J]. 广西植物, 2023, 43(10): 1 892-1 906. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202207033.
Shi X J, Cheng Z D, Zhang Y M, et al. Complete chloroplast genome analysis based study on origins of cultivated *Radix Aconitum Vilmoriniani*[J]. *Guihaia*, 2023, 43(10): 1 892-1 906.
- [5] 汪焕芹, 刘波, 詹睿, 等. 黄草乌二萜生物碱成分研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2014, 29(5): 773-777. DOI: 10.3969/j.issn.1004-390X(n).2014.05.025.
Wang H Q, Liu B, Zhan R, et al. Study on diterpenoid alkaloids from *Aconitum vilmorinianum* Kom[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2014, 29(5): 773-777.
- [6] Chen C L, Tan W H, Wang Y, et al. New norditerpenoid alkaloids from *Aconitum vilmorinianum* Komarov [J]. *J Nat Med*, 2015, 69(4): 601-607. DOI: 10.1007/s11418-015-0926-4.
- [7] Yin T P, Cai L, Fang H X, et al. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum vilmorinianum*[J]. *Phytochemistry*, 2015, 116: 314-319. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.05.002.
- [8] 李继印, 李绍鹏, 张瑞林, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定云南黄草乌中滇乌碱、粗茎乌头碱甲和塔拉萨敏的含量 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2017, 39(4): 650-655. DOI: 10.7540/j.ynu.20160666.
Li J Y, Li S P, Zhang R L, et al. Simultaneous determination of the contents of yunaconitine, crassicauline A and talatisamine in *Aconitum vilmorinianum* Kom from Yunnan by UPLC-MS/MS method[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 39(4): 650-655.
- [9] 王迪, 俞佳, 詹固, 等. 液质联用技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 68-71. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2022.02.015.
Wang D, Yu J, Zhan G, et al. Advances in application of liquid chromatography-mass spectrometry technology in study of Traditional Chinese Medicine[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 40(2): 68-71.
- [10] 白东虎, 贾宇荣, 白春梅, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用在中药指纹图谱和质量评价中的应用 [J]. 云南化工, 2022, 49(6): 12-16. DOI: 10.3969/j.issn.1004-275X.2022.06.04.
Bai D H, Jia Y R, Bai C M, et al. Application of UPLC-Q-TOF-MS in fingerprint and quality evaluation of Traditional Chinese Medicine[J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2022, 49(6): 12-16.

UPLC-MS/MS multi-index content determination and chemometric analysis of the cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani

CHEN Wei, CHENG Zidan, LI Guodong, MA Xiaoxia**
(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China)

Abstract: A multiple indexes quantitative analysis method using ultra performance liquid chromatography united triple quadrupole mass spectrometry in multiple reaction monitoring (MRM) for determination of alkaloid content in Radix Aconitum Vilmoriniani was established. The research provide a reference for the quality control of Radix Aconitum Vilmoriniani. Chromatography columns: ACQUITY YPLC®BEH C₁₈ (φ2.1 mm×50 mm, 1.7 μm). Mobile Phases: acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B), gradient elution. The contents of talatisamine, yunaconitine, vilmorrianine A and other six diterpenoid alkaloids in 18 batches of cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani were determined by UPLC-MS/MS and evaluated combining with chemometric methods. Good linearity ($R^2>0.9980$) was observed for the contents of nine ingredients with respect to their peak areas measured in the corresponding concentration ranges. The average spiked recovery rate were 96.74%–101.2% with the RSD of 0.65%–1.9%. The determination results showed that the contents of nine components in Radix Aconitum Vilmoriniani varied largely, but there were no significant geographical differences. According to the results of HCA, PCA and OPLS-DA, 18 batches of cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani were found to be basically divided into two categories, in which talatistamine, vilmorrianine A, yunaconitine, geniculatine C and austroconitine B were the main differential components. The method was developed for the simultaneous determination of the contents of nine alkaloid components in cultivated Radix Aconitum Vilmoriniani by UPLC-MS/MS. The method have advantage of high specificity and sensitivity with short analysis time, and can provide a reference for the quality evaluation of Radix Aconitum Vilmoriniani from different origins.

Key words: Radix Aconitum Vilmoriniani; UPLC-MS/MS; content determination; chemometrics