

乌头属植物中生物碱毒素检验方法及溯源研究进展

刘天宇¹, 宋歌², 杨瑞琴^{1*}, 张云峰^{2*}, 张成龙¹

(1. 中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038; 2. 公安部鉴定中心, 北京 100038)

摘要: 作为乌头属植物中最主要的化学毒素成分, 乌头类生物碱 (*Aconitum* alkaloids, ATs) 同时具有重要的药用价值, 在传统中医药以至现代临床医学领域都有极为广泛的应用。然而, 受其剧毒性的影响, ATs 在药品、食品、环境中的不合理使用会对人体健康造成严重威胁, 由此引发一系列中毒案件。因此, 开发有效的检验方法至关重要。文中综述了常见基质中 ATs 前处理和检验方法的研究进展, 包括高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法以及快速检测方法。此外, 为进一步探究实际中毒案例中 ATs 的具体来源, 探讨了基于植物形态学、化学指纹图谱分析以及 DNA 条形码技术的综合溯源策略, 对 ATs 的检验和溯源技术发展提出综合性的展望, 以期为法庭科学领域相关研究提供参考。

关键词: 乌头属植物; 生物碱; 检测; 指纹图谱; 溯源

中图分类号: D918.9; O657.7

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)04-0899-09

Research progress on detection methods and traceability of alkaloid toxins in *Aconitum* species

LIU Tian-yu¹, SONG Ge², YANG Rui-qin^{1*}, ZHANG Yun-feng^{2*}, ZHANG Cheng-long¹

(1. School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China; 2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract: As the predominant toxic constituent within the *Aconitum* genus, *Aconitum* alkaloids (ATs) exhibit both significant pharmaceutical value and substantial toxicity, have been widely used in traditional Chinese medicine and the realm of contemporary clinical medicine. However, owing to their high toxicity, inappropriate employment of ATs in pharmaceuticals, edibles, and the environment will pose serious threats to human health, inciting a series of toxic incidents. Consequently, it is very important to develop effective analytical methods. This paper presents a comprehensive review of the advancements in research pertaining to the pretreatment and detection methods in common substrates, including high performance liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and rapid detection methods. To explore the specific sources of ATs in actual poisoning cases, the comprehensive traceability strategy based on plant morphology, chemical fingerprint analysis and DNA barcoding technology was discussed, proposing a comprehensive prospect for the development of ATs analysis and traceability, in order to provide guidance for related research within the forensic science domain.

Key words: *Aconitum*; alkaloid; detection; fingerprint analysis; traceability

乌头属植物在我国应用历史悠久, 在我国主要分

布于云南、四川等地, 其中约有 40 种可供药用, 如附子、川乌等, 合理使用可以对风湿病、多种肿瘤及系统性红斑狼疮等疾病具有积极的治疗作用^[1-4]。中国药典 (2020 年版) 收录的涉及乌头成分的方剂有 87 种, 如附子理中丸、三七伤药片等, 占总数的 5.41%^[5]。乌头类生物碱 (*Aconitum* alkaloids, ATs) 是乌头属植物普

收稿日期: 2023-08-21; 修回日期: 2023-10-17.

基金项目: 中国人民公安大学刑事科学技术双一流创新研究专项 (2023SYL06); 中央级公益性科研院所基本科研业务费库重点项目 (2022JB004).

*通讯作者 E-mail: yangruiqin@ppsuc.edu.cn; 17020395@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0984

遍含有的一类二萜生物碱,含有剧毒,如乌头碱 (aconitine, AC)、次乌头碱 (hypoaconitine, HAC)、中乌头碱 (mesaconitine, MAC) 等,种类高达数十种,在化学结构上相似(图1),根据酯键的数量可归为二酯二萜类 (DDAs)、单酯二萜类 (MDAs)、萜醇类 (NDAs) 三种。DDAs在体内通过酶转化形成中MDAs,之后进一步转化为低毒性的NDAs。

ATs具有强毒性,每年因植物自制中药或误认某种优质中药治病、养生而发生中毒事件屡见不鲜^[6-8],利用其毒性进行的犯罪案件也时有发生,对中药质量控制以及公共安全的维护提出了巨大挑战。准确有效的ATs检测方法有助于侦查人员确定中毒原因,为中毒案件的侦查工作提供方向。本文综述了ATs检验过程中先进的前处理技术与检测分析方法,并着重概述近年来针对ATs的溯源鉴别方法研究,以期对侦查人员挖掘有毒植物信息资源提供帮助,为进一步预防和打击乌头属植物中毒案件的发生提供参考和借鉴。

1 乌头属生物碱毒素检验前处理方法

在法庭科学领域,ATs常见的分析基质为生物样本、草药或中成药煎煮药渣、食品等,基质体系、种类复杂。合理的样品前处理能有效提取目标成分,减少基质效应的影响,提高检验灵敏度。

1.1 QuEChERS QuEChERS法基于盐析效应提取与分散固相萃取分离,既可以净化提取物,还能从复杂的基质中分离出各种分析物,在血浆、尿液等生物样本的前处理中应用广泛^[9,10]。Natori等^[11]采用QuEChERS法,以MgSO₄-NaAC (4:1)作盐析剂提取全血中的9种ATs,结合LC-MS/MS分析了人体死后10个不同部位的血液样本中的ATs,基质效应为94%~100%,为后续研究ATs体内药物再分配提供了依据。Zhong等^[12]采用改良的QuEChERS法结合UHPLC-MS/MS测定血

液中的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、滇乌头碱。以NaCl作为盐析剂,有效避免了MgSO₄作盐析剂吸水放热引发的ATs分解,PSA与C₁₈作吸附剂,对4种ATs的加标回收率为96.3%~109%。

1.2 固相萃取 固相萃取 (solid-phase extraction, SPE) 简单高效,是乌头属植物毒素检测分析的重要前处理方式之一。SPE使用有机溶剂的量少,同传统的液液萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE) 相比更加绿色安全,同时能有效弥补QuEChERS法对基质类型敏感、基质效应高的缺点。SPE可选择的吸附剂种类多,C₁₈^[13]、MCX^[14]、HLB^[15]等吸附剂已被广泛应用于提取各种基质中的ATs。Song等^[16]开发了在线固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定中药保健品中10种ATs含量的方法,以C₁₈为吸附剂,10种ATs的加标回收率为86.1%~112.9%。

大多数SPE吸附剂在强酸或强碱条件下的物理和化学稳定性有限,加之容量小、耗时长,一定程度上限制了SPE的应用。目前,诸多研究团队正致力于新型固相萃取吸附剂以及纳米材料的研发,以适配于不同分析体系与基质的前处理需求,低成本与低污染是发展的趋势。Liu等^[17]采用NKA-II树脂填充柱对乌头植物中的6种ATs进行富集,平均回收率为89.2%~104.6%。近年来,碳纳米管^[18]和石墨烯^[19]因其独特的结构和性质,如高表面积、易于以共价和非共价形式官能化等,在新型SPE吸附剂的研究中受到广泛关注。He等^[20]合成了一种新型离子液体与纳米二氧化钛包覆改性氧化石墨烯复合材料,以其为吸附剂快速提取人体血浆中的3种ATs,样品回收率为82.7%~108%,基质效应为82.9%~106%。与未经处理的血浆样本相比,经该方法处理后的基质效应与回收率得到明显改善,为人体血浆中ATs的提取分析提供了思路。

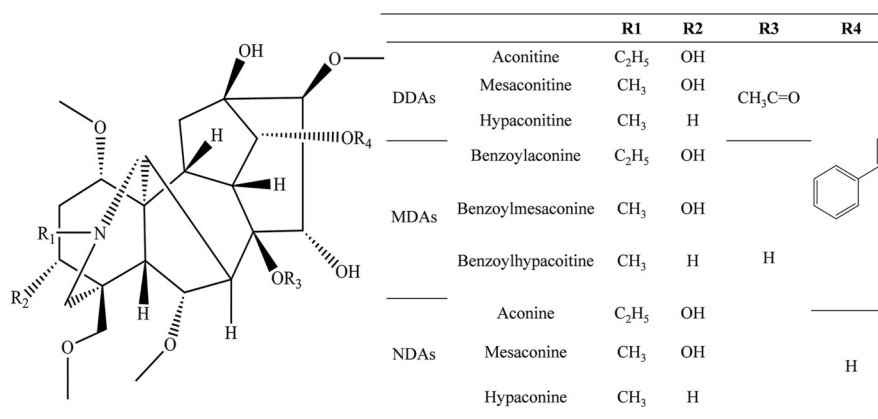


Figure 1 Structures of common *Aconitum* alkaloids (ATs). DDAs: Diester diterpenoid alkaloids; MDAs: Monoester diterpenoid alkaloids; NDAs: Norditerpenoid alkaloids

1.3 磁性固相萃取 磁性固相萃取 (magnetic solid-phase extraction, MSPE) 在传统 SPE 的基础上创新而成, 省去了传统 SPE 较长的平衡时间, 更加快速高效。MSPE 吸附剂易于分散, 接触面积更大, 能够在短时间从大体积待测体系中吸附和萃取待测物质, 无需离心和过滤处理, 只需外部磁场即可收集, 简化了分离过程 (图 2A)^[21]。Fe₃O₄ 纳米颗粒易于修饰、回收能力强、分散性好, 是磁性纳米颗粒 (MNPs) 最常用的材料。Zhang 等^[22]制备了一种 Fe₃O₄ 纳米颗粒包覆羟基化多壁碳纳米管的碳纳米材料 (Fe₃O₄-EC-MWCNTs-OH), 用于人血清中 AC、MAC、HAC 三种生物碱的萃取, 有效改善了基质效应, 回收率在 98.0%~103.0%。近年来, 碳纳米管 (CNTs) 磁性复合材料与分子印迹聚合物因其独特的结构和非凡的理化性能^[23,24], 在 MSPE 领域具有巨大的探索和应用潜力。Cheng 等^[25]合成了一种聚酰胺功能化磁性碳纳米管 (PAMAM@Mag-DCNTs), 用于分离肉类和蔬菜中 12 种 ATs, 对肉类样本中回收率为 83.4%~125%, 对蔬菜中回收率为 84.4%~122%, 证明了在食品基质中分离 ATs 的能力。之后, 该研究组将该方法与其他两种材质 (NH₂-SPE 与 Oasis PriME HLB) 的固相萃取效果进行比较, 回收率明显优于其他两种前处理方法 (图 2B)。然而, 功能化 Fe₃O₄ 纳米颗粒的制备工艺复杂, 特别是磁性分子印迹聚合物 (MMIP) 和磁性聚合物材料; 另一方面, 功能化 Fe₃O₄ 可能会影响分离修饰材料 (如表面活性剂) 对目标分析物的检测。因此, 开发物理化学稳定性高、使用寿命长、吸附容量大、萃取效率高、选择性好的新型磁性纳米材料仍是 MSPE 领域的重要研究课题。

2 乌头属生物碱毒素检验方法

目前, 液相色谱与液相色谱-质谱联用是检测 ATs 最行之有效的, 方法检出限低、重现性好, 可实现准确定量。近些年随着检测需求的不断提升, 光谱法、免疫分析、环境质谱法等快速检测技术也逐步应用于 ATs

的现场检验分析, 与传统检测方法形成补充, 有效提升了检测效率, ATs 不同检测方法的比较见表 1^[17,26-35]。

2.1 液相色谱与液相色谱质谱联用 ATs 主要成分为二萜类生物碱, 相对分子质量介于 400~700, 挥发性弱, 采用气相色谱检测灵敏度差, 通常采用基于液相色谱的分离与分析方法, 目前检测灵敏度达到 ng·mL⁻¹ 级别, 满足痕量检测的需要。Wang 等^[36]建立了检测人体血浆中 AC、MA、HA 及其代谢物的 HPLC-DAD 方法, 采用 235 nm 的检测波长, 方法检出限为 1.6~2.1 ng·mL⁻¹。Cho 等^[37]报道了一例急性乌头中毒案例, 采用 LC-MS/MS 对人体死后血液、脑脊液和尿液中的 MA、HA、AC 进行检测, 方法检出限分别为 0.02、0.02、0.2 ng·mL⁻¹, 首次在脑脊液中发现 ATs 残留。Natori 等^[11]采用 QuEChERS 法结合 LC-MS/MS 对尸检血液标本中的 AC 及其代谢物进行分析, 选取 10 个采样部位, 分析物回收率为 75%~80%, 检出限为 0.2 ng·mL⁻¹。ATs 在人死后右心房的浓度最高, 说明 AC 和 HA 在右心房血液积累, 为中毒案例中的 ATs 采样分析提供依据。液相色谱与质谱联用定性准确度高、抗干扰抗污染能力强, 能够对多种 ATs 实现大规模筛查^[38]; 与高分辨质谱 (TOF^[39]、Orbitrap^[40]) 联用, 通过高分辨质谱数据实现对共有峰的指认、鉴定以及未知物质的充分挖掘, 获取的物质信息更加准确、客观^[41]。Wei 等^[42]采用超高效液相色谱-飞行时间质谱对乌头与蜂蜜结合使用后的毒性成分变化, 共筛查出 118 种化合物, 在加工后消失 6 种化合物, 产生 5 种化合物, 为进一步加强质量控制与阐明解毒机制奠定基础。Shen 等^[43]采用 UHPLC-MS/MS 同时定量大鼠血浆中参附注射液 (SFI) 的 28 种主要活性成分, 包括 18 种人参皂苷和 10 种 ATs。质谱分析采用正、负离子化切换模式的多反应监测, 整个分析过程在 14 min 内完成, 成功应用于大鼠血浆中多种成分的药代动力学研究, 为 SFI 的临床使用和药物相互作用提供科学依据。

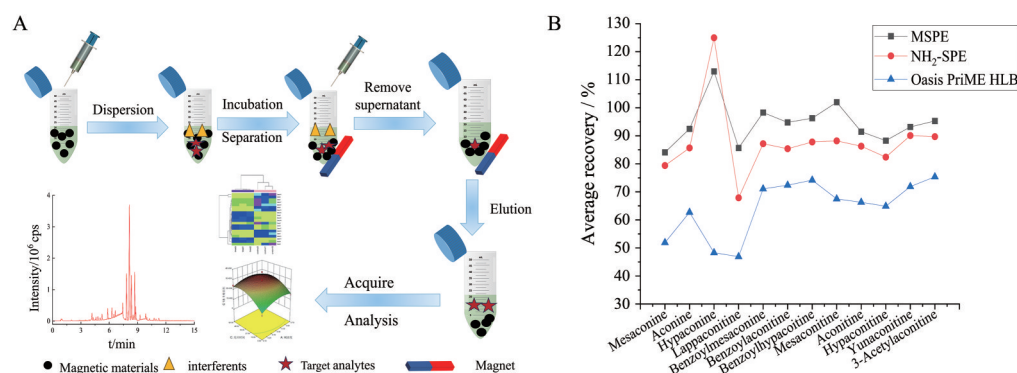


Figure 2 Analysis effect of magnetic solid-phase extraction (MSPE) method on ATs. A: Process of MSPE; B: Comparison of recovery of ATs from meat samples by three pretreatment methods

2.2 快速检测方法 HPLC与LC-MS已经被证实是检测ATs的可靠工具。然而,这些方法需要复杂的样品前处理和制备步骤,无法在紧急情况下实现快速检验和识别中毒患者所摄入的有毒中草药成分。因此,探索利用快速样品提取和便携式仪器设备进行现场分析的快检方法,是未来发展的重要趋势。

光谱分析技术凭借无损、快速的优势,目前已应用于多种基质中ATs的筛选与检测。Dai等^[44]应用近红外光谱(NIR)结合最小二乘支持向量机(LS-SVM)建立了附子中关键成分的快速无损检验方法,可快速预测DDAs和MDAs的总量,结果与HPLC法检测结果实现印证。Wang等^[28]开发了对三种结构相似的Ats(AC、HA、MA)进行痕量检测的表面增强拉曼光谱(SERS)法,采用100 nm的Ag NPs胶体作为SERS底物,在3 min内实现了对食品和饮料样品中添加的微量ATs的定性和半定量分析,LOD为 $5.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性范围为 $5.0\sim 100.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。目前,光谱法的灵敏度已能够满足公共安全应急响应所需的浓度水平,有望应用于食品安全和刑事鉴定领域的ATs快速检验。

免疫分析是一种基于抗原和抗体特异性反应的快速检测方法,通过酶、放射性元素、胶体金或其他可用标记材料放大标记抗原或抗体的反应信号,价格低廉,可简化前处理过程。目前应用于ATs的免疫分析法包括酶联免疫吸附法(ELISA)与免疫分析测定(ICA),Liu等^[45]开发了一种新的ELISA方法,用于定量测定大鼠血浆中的BHA,检出限为 $0.35 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,为快速测定生物样本中单酯型ATs提供了思路;2020年,Li等^[29]通过小鼠筛选出一种高特异性和高灵敏度的单克隆抗体,IC-ELISA法对乌头碱的检出范围为 $1.13\sim 11.76 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。之后,该研究团队在此基础上研发了胶体金试纸用于检测药材中的AC,5 min内即可得到结果,视觉检出限为 $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,为中药材中AC的快速检测和质量筛查提供了方法。需要特别注意的是,由于ATs结构的相似性,免疫分析法有时会产生假阳性结果^[46],在采用免疫分析法时,需要标准方法进行验证。

环境质谱法(AMS)可以对样品进行直接表面分析,通过离子化技术产生离子进行质谱分析,包括电喷雾激光解吸电离质谱(ELDI-MS)、实时直接分析质谱(DART-MS)等^[47]。AMS只需极少或无需样品前处理,同传统的LC-MS相比更加快速高效。Zhou等^[48]建立了对乌头切片进行原位分析的DART-MS方法,通过多级串联质谱对ATs的36种代谢物实现定性分析,同UPLC-MS与ESI-MS法相比,检测时间更短、有机溶剂用量更少,可提供更多代谢物类型信息;Su等^[30]利用ELDI-MS对草药中AC、MA、HA进行测定,在30 s内

对样品完成分析。同标准的LC-MS/MS数据进行比较,由于LC复杂的前处理过程造成部分目标物质的损失,ELDI-MS法检出的AC、MA、HA含量分别是LC-MS/MS法的1.27倍、1.38倍和1.28倍,可作为色谱方法的有效补充。直接质谱分析检测速度快,有望应用于样品的在线连续监测,Qiu等^[49]采用萃取电喷雾电离质谱法(EESI-MS),建立了中药熬制体系连续采样与实时定量分析的装置,对复方附子-肉的熬制方法进行长达150 min的实时监测,对熬制过程中毒性的变化做出了评估,为中药复方的实时分析与评价开拓了新的研究思路。

3 乌头属生物碱毒素溯源研究

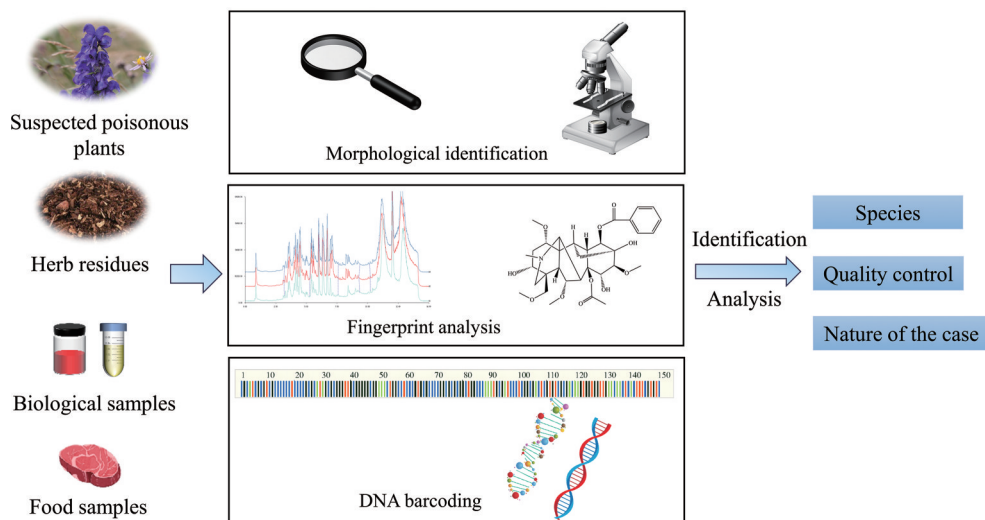
ATs本源于毛茛科乌头属植物,这类植物在自然界中分布广泛,同时由于近代化学和农业技术在医药学中的发展,越来越多从植物中提取ATs而制成的药品、保健品、食品、标准品等产品出现在人们的生产生活中,以致因ATs中毒的案事件频频发生,其毒素成分的检验和溯源是医院抢救和公安侦查迫切需要的关键信息。然而,目前对此类植物中毒的判定仅依据有限的几种毒素成分的鉴定,如AC、MAC、HAC等,对于植物资源信息挖掘整合程度有限,毒素来源往往根据现场调查结果推断,带来了一定的滞后性和不确定性。近年来关于有毒植物的形态组织学、指纹图谱、DNA条形码的研究,为毒案件的植物毒素的溯源、质量控制以及案件性质的判定提供了新思路、新途径(图3)。

3.1 形态学鉴定 植物的根、茎、种子形态性状相对稳定,不同产地、不同种属在细胞、纤维特征上有其固有的特征,可作为植物鉴别、质量评价及系统分类的科学依据^[50]。Liu等^[51]采用连续切片法对乌头根的显微结构进行分析,构建了乌头的石蜡切片的三维模型,为微观形态鉴定提供了新方法;Dang等^[52]借助光学显微镜、扫描电镜观察药材性状及根、茎、叶、花粉粒、药材粉末的显微特征,发现根、叶上表皮的显微特征及花粉粒的形态特征可作为鉴别不同品种乌头的依据,露蕊乌头的花序特征与另外2种药材存在明显区别。然而,形态学仅根据外观形状进行判断,不能提供具体的物质信息,对鉴定人员资质要求高。此外,实际案例中的涉案乌头植物样本往往是中药药渣,也给常规的形态学鉴定造成了困难。

3.2 化学指纹图谱 指纹图谱技术利用色谱技术分析药材化学成分,探究同一种属植物的相似性,反映复杂成分的中药及其制剂内在质量的稳定性,对中药质量控制和溯源研究具有优秀的应用价值。目前已有20余种中药指纹图谱检验方法收录在中国药典中,HPLC指纹图谱是目前使用最多的化学指纹图谱^[51],

Table 1 Detection methods for aconitum alkaloids. MA: Mesaconitine; HA: Hypaconitine; AC: Aconitine

Matrix	Analyte	Sample preparation	Detection method	Analytical time	Recovery	LOD	Ref.
Aconitum Radix	MA, HA, AC	Isopropyl alcohol-ethyl acetate (1:1, <i>V/V</i>)	HPLC-PDA	33 min	95.8%–101.6%	2.68–7.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	[17]
Blood	4 ATs	LLE:ether	QTRAP	18 min	78.8%–116.2%	0.31–3.26 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[26]
Urine	5 ATs	Acetonitrile-deionized water (1:1, <i>V/V</i>)	UPLC-MS/MS LC-MS/MS	20 min	82.2%–96.4%	2.5–10.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[27]
Drinks and cooked foods	MA, HA, AC	–	SERS	3 min	0.2%–9.0%	5.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[28]
Herb	6 ATs	Acid and alkaid extraction	IC-ELISA	5 min	–	25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[29]
Radix aconitum	MA, HA, AC	–	ELIDI-MS	30 s	–	–	[30]
Fuzi	DDAs	Isopropyl alcohol-ethyl acetate (1:1, <i>V/V</i>)	2D quantitative NMR	< 30 min	96.8%–101.1%	36.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[31]
20 Aconitum proprietary medicines	9 ATs	–	Online extraction ESI-MS	<15 min	–	0.001–0.015 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[32]
Rat intestinal bacteria	MA, HA, AC	–	DART-MS	<10 s	–	Semi quantitative	[33]
Fuzi Lizhong Pills	5 ATs	Ethyl ether extraction and dissolved with 0.05% hydrochloric acid methanol solution	MIR sensor (MIPs ratiometric fluorescence sensor)	8 min	95.2%–103.1%	24 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[34]
Serum	AC	–	Electrochemical sensor	<10 min	–	0.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[35]

**Figure 3** Research strategies on traceability of aconitum alkaloids

在乌头属植物的溯源研究中潜力巨大。Yang等^[53]对高乌头炮制前后毒性部位多波长指纹图谱进行了研究,建立了生、制品高乌头毒性部位指纹图谱,通过对比发现炮制后该部位化学成分发生了明显的变化,消失10个色谱峰,新增7个色谱峰,这可能是高乌头“减毒存效”的物质基础,为进一步开展谱-毒关系与谱-效关系研究奠定基础。Jamtsho等^[54]将传统民族生药学和现代生药评价相结合,研究了两种喜马拉雅乌头属植物在生态适应、微观形态、解剖、化学性质和

HPLC指纹图谱等方面的差异,为不丹藏药的质量和安全管理提供依据。Luo等^[55]构建乌头植物的HPLC指纹图谱,对来自4个产地的42个乌头样品进行分析,结合主成分分析(PCA)、层次聚类分析(HCA)等统计学方法阐明不同地区乌头样品的生物碱含量存在明显差异,雪上一枝蒿乙素的含量可能是确定道地药材产地的关键因素;Miao等^[56]选取6种代表性ATs进行含量测定,结合生物碱含量、指纹图谱相似度以及线性判别分析对三个乌头药材产地实现区分,为乌头产地溯

源提供了可参考的预测模型。

近年来在指纹图谱的建立与研究中, UPLC 凭借其高效快速的分析能力, 弥补了传统 HPLC 指纹图谱操作周期长、无法表征无紫外吸收物质的不足, 逐渐成为指纹图谱研究的可靠手段^[57]。指纹图谱结合化学计量法在多特征性化学成分的发现和 ATs 溯源研究中发挥着重要的作用^[58], Shi 等^[59]建立了乌头属植物的 UPLC 指纹图谱, 对 13 种乌头属植物共 121 份样品进行分析, 将指纹图谱、UPLC-QTOF-MS 数据、代谢物数据库与化学计量学相结合, 基于 QTOF-MS 数据集生成 PCA、OPLS-DA 和 S-plot 模型, 发现 MA、HA、BMA 与附子灵是乌头的标志物质, 此外确定了 15 种可作为区分乌头与伪品的标志物, 用于鉴别其他近缘种或掺假种。需要注意的是, ATs 的代谢消除变化可能对溯源研究产生影响, 因此有必要针对 ATs 代谢指纹图谱进行研究, Sui 等^[60]采用 UPLC-Q-TOF 对大鼠血浆、尿液中的 ATs 代谢产物进行研究, 筛选出 19 种判定 ATs 中毒的生物标志物, 包括单酯型与氢醇型二萜生物碱、原卞啉 IX、左旋肉碱等, 并揭示了相关的代谢途径, 为生物样本中 ATs 的溯源提出思路。

3.3 DNA 条形码 DNA 条形码技术是加拿大动物学家 Paul Hebert 于 2003 年首次提出的一种新型分子诊断技术^[61], 摆脱了传统形态鉴定方法依赖长期经验的障碍。通过建立鉴定数据库将物种信息数字化, 仅需少数几个基因片段即可对绝大部分物种进行准确鉴定^[62,63]。该技术操作简单, 具有高重复性和稳定性。同时, 可通过互联网和信息平台对物种序列信息进行集中统一管理, 有效缓解分类鉴定人才短缺的问题, 成为有毒植物分子鉴定方法学上的创新^[64]。

在国际上, 加拿大奎尔夫大学于 2007 年初步建立生命条形码数据库系统 (BOLD)。国内 DNA 条形码鉴定技术也在近几年迅速发展, 多学科多用途的条形码数据库建设不断完善。中国医学科学院药用植物研究所率先开展了中药材 DNA 条形码分子鉴定方法研究, 经过十余年的努力, 已构建全球最大的中药材 DNA 条形码鉴定数据库, 其中包括中国、日本、韩国、印度、欧盟和美国等多国药典收录的 95% 以上的中草药品种。中草药 DNA 条形码分子鉴定指导原则, 已被纳入中国药典 (2015 版)。

目前, DNA 条形码技术已被广泛应用于生物物种鉴定, 在 ATs 溯源方面具有巨大潜力。Meng 等^[65]在研究中确定了乌头属物种鉴定的 8 个可变区作为 DNA 条形码, 实现乌头与其他属植物的区分。Wang 等^[66]发展了乌头属植物的 23 个碱基核苷酸标记, 即使 DNA 浓度低至 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 仍可从食物样本中提取核苷酸

序列, 成功应用于已加工乌头成分的检测, 在 DNA 条形码鉴定已加工样品和 DNA 降解食品混合物方面具有重要意义, 为乌头属植物毒素的鉴定和检测提供了新视角和有力支持。

4 总结与展望

在 ATs 的前处理方面, QuEChERS 法被广泛应用于从生物样本中提取 ATs, 如血浆、尿液等。SPE 是目前最为行之有效的方法, 在食品、药材以及生物样本中均有出色的分离效果, 吸附材质的种类是影响分离效果的重要因素, 研究人员正致力于新型吸附材质的合成以提高萃取效率, 如多孔树脂、石墨烯等。MSPE 在传统 SPE 的基础上进一步缩短了前处理时间, Fe_3O_4 纳米颗粒是目前应用最广泛的磁芯材质, 部分新型材料也正应用于 ATs 的前处理, 如碳纳米管、MIP 等。

在 ATs 的检测方面, HPLC 与 LC-MS 法检出限低、可重复性高, 是目前 ATs 检测的黄金标准。然而, 基于液相色谱的传统检验方法需要复杂的样品预处理过程, 无法在紧急情况下实现快速检验。光谱法、环境质谱、免疫分析等技术已用于中药、食品、生物样本中 ATs 的快速检测中。其中, NIR 和 SERS 已经被证实分别是定性和定量 ATs 的可靠方法, 微型化发展是未来发展的方向; DART、ELIDI 等可以实现原位质谱分析, 分析效率高; ELISA、ICA 是目前应用范围广的免疫分析技术, 但 ATs 结构类似, 在免疫分析的过程需要注意假阳性的情况。因此, 以上方法均有望推广于 ATs 的分析领域。

在 ATs 的溯源方面, 综合运用植物形态学研究、化学指纹图谱、DNA 条形码技术, 可以有效的深度挖掘中毒案件中的植物信息, 是建立 ATs 综合溯源研究的有效策略之一。针对不同类型的样本, 尤其是面对陈旧样本时, ATs 代谢产物可能比原型成分更具有分析价值, 成为溯源鉴定的重要标志物。针对于 ATs 的溯源工作, 未来应注重以下方面: 一是继续探索适用于复杂基质的前处理与检测方法, 提升分析效率; 二是进一步缩短分析时间, 开发高通量、低成本和自动化的检测仪器与方法, 降低对工作人员的使用门槛; 三是积极与机器学习、区块链等统计学方法与现代计算机技术相结合, 完善形态学、指纹图谱、DNA 条形码数据库的建立, 实现 ATs 成分的精准溯源, 合理质控, 保障人民的生命财产安全。

作者贡献: 刘天宇为本文第一作者, 负责构建论文框架、查找文献和论文撰写; 宋歌、杨瑞琴、张云峰负责论文整体设计及修改指导; 张成龙对论文语言修改提供了一定帮助。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang Y, Chen S, Fan F, et al. Neurotoxicity mechanism of aconitine in HT22 cells studied by microfluidic chip-mass spectrometry [J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13: 88-98.
- [2] Li X, Gu L, Yang L, et al. Aconitine: a potential novel treatment for systemic lupus erythematosus [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 133: 115-121.
- [3] Li T, Wu F, Zhang A, et al. High-throughput chinmeddmics strategy discovers the quality markers and mechanisms of Wutou Decoction therapeutic for rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 854087.
- [4] He Y N, Yang X, Wu J, et al. "Liquid seal to detoxification-drying and puffing" of two stage processing technology design and pharmacodynamic study of aconite (*Aconiti lateralis radix praeparata*) processed by microwave [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1328-1337.
- [5] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Part 1. 2020 Ed. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2020: 1086-1087.
- [6] Michel A, Siebe I, Auwärter V, et al. Aconitine poisoning due to confusion of aconite leaves with lovage [J]. *Anaesthesist*, 2021, 70: 633-638.
- [7] Wang XC, Jia Q Z, Yu YL, et al. Inhibition of the I(Na/K) and the activation of peak I(Na) contribute to the arrhythmogenic effects of aconitine and mesaconitine in guinea pigs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 218-229.
- [8] Yan S, Wang K, Al Naggar Y, et al. Natural plant toxins in honey: an ignored threat to human health [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424: 127682.
- [9] Kim K, Choi Y, Mok S, et al. Optimization of the QuEChERS method for multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in aquaculture products [J]. *Food Chem*, 2023, 399: 133958.
- [10] Chen ZF, Tang YT, Liao XL, et al. A QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for rapid determination of organophosphate flame retardants and their metabolites in human urine [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 826: 153989.
- [11] Natori Y, Kamioka S, Yoshimoto T, et al. A simple and rapid method for quantifying aconitines and their metabolites in whole blood by modified QuEChERS and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) [J]. *Forensic Sci Int*, 2022, 341: 111475.
- [12] Zhong SH, Ren XX, Yu ZS, et al. UHPLC-MS/MS determination of 4 *Aconitum* alkaloids in blood with QuEChERS [J]. *Phys Testing Chem Anal Part B Chem Anal (理化检验-化学分册)*, 2019, 55: 591-596.
- [13] Fan B, Xu S, Bi J, et al. Simultaneous determination of six alkaloids in rat plasma by SPE-HPLC-MS/MS and their pharmacokinetics after oral administration of *Radix Aconiti Preparata* extract [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4: 118-127.
- [14] Ji X, Yang M, Or K H, et al. Tissue accumulations of toxic aconitum alkaloids after short-term and long-term oral administrations of clinically used *Radix Aconiti Lateralis* preparations in rats [J]. *Toxins*, 2019, 11: 353.
- [15] Carlier J, Guitton J, Romeuf L, et al. Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin. Application to forensic toxicology [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 975: 65-76.
- [16] Song Y L, Zhang N, Jiang Y, et al. Simultaneous determination of aconite alkaloids and ginsenosides using online solid phase extraction hyphenated with polarity switching ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 6419-6428.
- [17] Liu J, Li Q, Liu R, et al. Enrichment and purification of six *Aconitum* alkaloids from *Aconiti kusnezoffii* radix by macroporous resins and quantification by HPLC-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 174-81.
- [18] Li WK, Zhang HX, Shi YP. Simultaneous determination of bifenox, dichlobenil and diclofop methyl by hollow carbon nanospheres enhanced magnetic carboxylic multi-walled carbon nanotubes [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1011: 40-49.
- [19] Chen Q, Zhu L, Chen J, et al. Recent progress in nanomaterial-based assay for the detection of phytotoxins in foods [J]. *Food Chem*, 2019, 277: 162-178.
- [20] He S W, Zhang Y, Zhao YG, et al. Multiply-functionalized graphene oxide on-line pass-through cleanup for the fast determination of aconitum alkaloids in human plasma by LC-MS/MS [J]. *Anal Methods*, 2019, 11: 3144-3149.
- [21] Yin SJ, Zhao J, Yang FQ. Recent applications of magnetic solid phase extraction in sample preparation for phytochemical analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 192: 113675.
- [22] Zhang HF, Shi YP. Preparation of Fe₃O₄ nanoparticle enclosure hydroxylated multi-walled carbon nanotubes for the determination of aconitines in human serum samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 724: 54-60.
- [23] Li WK, Zhang HX, Shi YP. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and zearalenone by magnetic nanoparticle filled amino-modified multi-walled carbon nanotubes [J]. *Anal Methods*, 2018, 10: 3353-3363.
- [24] Li WK, Shi YP. Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction [J]. *Trends Analyt Chem*, 2019, 118: 652-665.
- [25] Cheng HL, Wang FL, Zhao YG, et al. Simultaneous determination of fifteen toxic alkaloids in meat dishes and vegetable dishes using double layer pipette tip magnetic dispersive solid phase extraction followed by UFLC-MS/MS [J]. *Anal Methods*, 2018, 10: 1151-1162.

- [26] Zhang S, Chen S, Zhu F, et al. Rapid determination of five common toxic alkaloids in blood by UPLC-MRM-IDA-EPI: application to poisoning case [J]. *Leg Med* 2023, 63: 102267.
- [27] Li M, Cai Z. Simultaneous determination of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, bulleyaconitine and lappaconitine in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2013, 5: 4034-4038.
- [28] Wang WL, Lu JL, Gu JL, et al. Rapid qualitative and quantitative analysis of trace aconitum phytotoxin by SERS [J]. *Food Chem*, 2022, 391: 133234.
- [29] Li S, Wu X, Kuang H, et al. Development of an ic-ELISA and an immunochromatographic strip assay for the detection of aconitine [J]. *Food Agric Immunol*, 2020, 31: 243-254.
- [30] Su H, Liu KT, Chen BH, et al. Rapid identification of herbal toxins using electrospray laser desorption ionization mass spectrometry for emergency care [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27: 415-427.
- [31] Lin Q, Meng C, Liu J, et al. An optimized two-dimensional quantitative nuclear magnetic resonance strategy for the rapid quantitation of diester-type C(19)-diterpenoid alkaloids from aconitum *carmichaelii* [J]. *Anal Chem*, 2023, 95: 8452-8460.
- [32] Qiu ZD, Chen JL, Zeng W, et al. Real-time toxicity prediction of aconitum stewing system using extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 903-912.
- [33] Li X, Hou G, Xing J, et al. Direct analysis in real time-mass spectrometry for the rapid detection of metabolites of aconite alkaloids in intestinal bacteria [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, 25: 2181-2184.
- [34] Luo K, Chen H, Zhou Q, et al. A facile one step solvothermal controllable synthesis of FeS₂ quantum dots with multiple color emission for the visual detection of aconitine [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 240: 118563.
- [35] Yang L, Ran X, Cai L, et al. Calix[8]arene functionalized single-walled carbon nanohorns for dual-signalling electrochemical sensing of aconitine based on competitive host-guest recognition [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83: 347-352.
- [36] Wang X, Li X, Li L, et al. Sensitive determination of three aconitum alkaloids and their metabolites in human plasma by matrix solid-phase dispersion with vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with diode array detection [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 1971-1978.
- [37] Cho YS, Choi HW, Chun BJ, et al. Quantitative analysis of aconitine in body fluids in a case of aconitine poisoning [J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2020, 16: 330-334.
- [38] Zhang DK, Zhao ZH, Li CY, et al. Quality evaluation of different processed products of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* combining bioassay and toxicity detection [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2169-2177.
- [39] Sang Q, Jia Q, Zhang H, et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 194: 113771.
- [40] Dai SY, Cui YF, Xu J, et al. Comparison of alkaloids in *Aconiti Kusnezoffii Radix*, *Aconiti Radix*, and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2023, 48: 126-139.
- [41] Kharbach M, Marmouzi I, El Jemli M, et al. Recent advances in untargeted and targeted approaches applied in herbal-extracts and essential-oils fingerprinting - a review [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112849.
- [42] Wei N, Song D, Lu C, et al. Identification and quality evaluation of different processed products of *aconitum carmichaelii* by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2023, 46: e2300235.
- [43] Shen BQ, Qu C, Mi L, et al. Simultaneous quantification of twenty-eight components of Shenfu Injection in rat plasma by UHPLC-QQQ MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203: 114211.
- [44] Dai SY, Ma Q, Jiang SH, et al. Rapid determination of six alkaloids in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* based on near infrared spectroscopy [J]. *J Instrum Anal (分析测试学报)*, 2021, 40: 57-64.
- [45] Liu CC, Xu YH, Yuan S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for monoester-type aconitic alkaloids and its application in the pharmacokinetic study of benzoylhypaconine in rats [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20: 352-360.
- [46] Ren Z, Zhang H, Wang Z, et al. Progress in immunoassays of toxic alkaloids in plant-derived medicines: a review [J]. *Toxins* 2022, 14: 165.
- [47] Yang Y, Deng J. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry [J]. *Trends Analyt Chem*, 2016, 82: 68-88.
- [48] Zhou F, Zhu H, Liu S, et al. *In situ* analysis for herbal pieces of *Aconitum* plants by using direct analysis in real time mass spectrometry [J]. *Chin J Chem*, 2015, 33: 241-246.
- [49] Qiu ZD, Wei XY, Sun RQ, et al. Limitation standard of toxic aconitines in *Aconitum* proprietary Chinese medicines using on-line extraction electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1511-1520.
- [50] Wani TA, Kaloo ZA, Dangroo NA. *Aconitum heterophyllum* Wall. ex Royle: a critically endangered medicinal herb with rich potential for use in medicine [J]. *J Integr Med*, 2022, 20: 104-113.
- [51] Liu CC, Cheng ME, Peng H, et al. Identification of four *Aconitum* species used as "Caowu" in herbal markets by 3D reconstruction and microstructural comparison [J]. *Microsc Res Tech*, 2015, 78: 425-432.
- [52] Dang YH, Guo K, Liu FJ, et al. Morphohistological study of three Tibetan medicinal herbs of the genus aconite [J]. *Chin*

- Tradit Pat Med (中成药), 2022, 44: 289-293.
- [53] Yang ZJ, Zhang LJ, Ma DN, et al. HPLC multi-wavelength chromatographic fingerprints study of toxicity parts in crude and processed the roots of *Aconitum sinomontanum* Nakai [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2019, 34: 770-780.
- [54] Jamtsho T, Yeshi K, Samten, et al. Comparative analysis of two Himalayan *Aconitum* species for their phytopharmaceutical properties [J]. J Herb Med, 2022, 32: 100497.
- [55] Luo C, Yi F, Xia Y, et al. Comprehensive quality evaluation of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx. (Fuzi): simultaneous determination of nine alkaloids and chemical fingerprinting coupled with chemometric analysis [J]. J Sep Sci, 2019, 42: 980-990.
- [56] Miao LL, Zhou QM, Peng C, et al. Discrimination of the geographical origin of the lateral roots of *Aconitum carmichaelii* using the fingerprint, multicomponent quantification, and chemometric methods [J]. Molecules, 2019, 24: 4124.
- [57] Zhu Y, Zheng Q, Sun Z, et al. Fingerprint-efficacy study of Radix Aconiti Lateralis Preparata (Fuzi) in quality control of Chinese herbal medicine [J]. J Therm Anal Calorim, 2014, 118: 1763-1772.
- [58] Li Y, Shen Y, Yao CL, et al. Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: a review [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 185: 113215.
- [59] Shi Y, Zhao Y, Qian J, et al. *Aconitum* diterpenoid alkaloid profiling to distinguish between the official traditional Chinese medicine (TCM) Fuzi and adulterant species using LC-QToF-MS with chemometrics [J]. J Nat Prod, 2021, 84: 570-587.
- [60] Sui Z, Li Q, Zhu L, et al. An integrative investigation of the toxicity of *Aconiti kusnezoffii* radix and the attenuation effect of its processed drug using a UHPLC-Q-TOF based rat serum and urine metabolomics strategy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145: 240-247.
- [61] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
- [62] Yu J, Wu X, Liu C, et al. Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 208: 111691.
- [63] Song F, Deng YF, Yan HF, et al. Flora diversity survey and establishment of a plant DNA barcode database of Lomas ecosystems in Peru [J]. Sci Data, 2023, 10: 294.
- [64] Han J, Pang X, Liao B, et al. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding [J]. Sci Rep, 2016, 6: 18723.
- [65] Meng J, Li X, Li H, et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of four aconitum medicinal species [J]. Molecules, 2018, 23: 1015.
- [66] Wang G, Liu Y, Bai X, et al. Identification and poisoning diagnosis of aconitum materials using a genus-specific nucleotide signature [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 237: 113539.