·论　著·

基于模拟炮制技术的高乌头炮制过程中主要生物碱含量动态变化研究

贾春艳[1]，强宇靖[1]，杨锡仓[2]，苗小楼[3]，李芸[1*](1.甘肃中医药大学，兰州 730000；2.甘肃中医药大学附属医院，兰州 730020；3.中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所，兰州 730050)

摘要：目的　探讨甘草汁蒸制高乌头过程中主要生物碱含量动态变化规律。**方法**　将高乌头加甘草汁和不加甘草汁分别蒸制 0，0.5，1，2，3，4，5 h，干燥处理，采用 HPLC 测定高乌头不同炮制品中高乌甲素、冉乌头碱以及新增成分的含量；采用高乌甲素和冉乌头碱对照品进行模拟炮制；采用制备液相分离新增成分并结合 NMR 及 UPLC-QTOF-MS 进行鉴定。**结果**　高乌头加或不加甘草汁蒸制过程中，随蒸制时间的延长，高乌甲素和冉乌头碱含量明显降低，同时产生 2 个新峰(峰 1，峰 2)，其含量明显增加，说明新增成分和甘草汁无关，而与蒸制处理有关，对比不加甘草汁蒸制，加甘草汁蒸制后毒-效成分高乌甲素和冉乌头碱含量降低幅度适中，说明加甘草汁比不加甘草汁蒸制合理；模拟炮制结果显示，炮制过程中高乌甲素和冉乌头碱含量逐渐降低；经鉴定新增成分(峰 2)为 5-羟基甲糖醛。**结论**　高乌头炮制后主要生物碱成分发生了较大变化，可能与加甘草汁蒸制“减毒存效”密切相关。

关键词：高乌头；甘草汁；高乌甲素；冉乌头碱；模拟炮制；UPLC-QTOF-MS
中图分类号：R283.3　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2023)15-2041-07
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222952
引用本文：贾春艳，强宇靖，杨锡仓，等. 基于模拟炮制技术的高乌头炮制过程中主要生物碱含量动态变化研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2041-2047.

Study on the Dynamic Change of Main Alkaloids Content in *Aconitum Sinomontanum* Nakai Processing Based on the Simulated Processing Technology

JIA Chunyan[1], QIANG Yujing[1], YANG Xicang[2], MIAO Xiaolou[3], LI Yun[1*](*1.Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China; 3.Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To explore the dynamic changes of main alkaloids in the processing process of *Aconitum sinomontanum* Nakai prepared by liquorice juice. **METHODS**　*Aconitum sinomontanum* Nakai with or without liquorice juice were steaming for 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h, respectively, and then dried. HPLC was used to determine the content of lappaconitine, ranaconitine and new components in different processed products of *Aconitum sinomontanum* Nakai. The simulated processing was carried out with the reference substance of lappaconitine and ranaconitine. The new components were separated by preparative liquid and analyzed by NMR and UPLC-QTOF-MS. **RESULTS**　With the extension of steaming time, the content of lappaconitine and ranaconitine decreased significantly during the steaming *Aconitum sinomontanum* Nakai with or without liquorice juice, and two new peaks(peak 1 and peak 2) were produced and their content increased observably, this indicated that the new compounds were not related to licorice juice, only related to steaming process. Compared with the steaming process without liquorice juice, the contents of toxic and effective components lappaconitine and ranaconitine decreased moderately steamed with liquorice juice, indicating that the addition of liquorice juice steaming was more reasonable; The results of the simulated processing showed that the contents of lappaconitine and ranaconitine gradually decreased in the processing. After isolation and identification find the compound 1(peak 2) was 5-hydroxymethylfurfural. **CONCLUSION**　The main alkaloids components of *Aconitum sinomontanum* Nakai are changed greatly after processing, which may be closely related to the “reduction of toxicity and increase of efficiency” in the steaming process of adding liquorice juice.

KEYWORDS: *Aconitum sinomontanum* Nakai; liquorice juice; lappaconitine; ranaconitine; simulation processing; UPLC-QTOF-MS

高乌头系毛茛科乌头属植物高乌头 *Aconitum sinomontanum* Nakai 的干燥根，是中国甘肃等中西部地区民间习用中药，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、

基金项目：国家自然科学基金项目(81560650)
作者简介：贾春艳，女，硕士生　E-mail: 3479352937@qq.com　*通信作者：李芸，女，博士，教授，博导　E-mail: liyunherb@163.com

跌打损伤等症，现收载于《甘肃省中药材标准》(2009 年版)[1]。高乌头中含有生物碱、黄酮、甾体、糖苷类等成分，以二萜类生物碱为主，其中高乌甲素与冉乌头碱含量最高，是主要的毒-效成分。高乌头生品有较强毒性[2]，本课题组前期研究发现高乌头加甘草汁蒸制可使毒性降低[3]，筛选出高乌头最佳炮制工艺(高乌头生品饮片加入 10%甘草汁，127 ℃，0.15 MPa 加压蒸 5 h)，但是炮制过程中主要生物碱含量动态变化规律尚不清楚，不能为高乌头炮制方法提供完整依据。

为了进一步探索高乌头炮制过程中主要生物碱含量如何随蒸制时间不同而变化，本实验以加甘草汁蒸制和不加甘草汁蒸制的不同时间为考察因素，寻找高乌甲素、冉乌头碱以及新增化学成分含量的动态变化规律，采用高乌甲素和冉乌头碱对照品进行模拟炮制，探索炮制时间对单个成分的影响，以期为构建高乌头炮制“减毒增效”的科学内涵奠定基础，为控制毒-效成分提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 Series 型高效液相色谱仪、Agilent 1260 Series 制备液相色谱仪均购自美国 Agilent 科技有限公司；DAD 检测器(俊齐仪器设备有限公司)；色谱柱 DiKMA spursil C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)；BT125D 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)；KQ3200DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；FW-400A 高建万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)；HHS-11S 数显恒温水浴锅(上海宜昌仪器纱筛厂)；SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂)；PHS-430 型 pH 计(方舟电子科技有限责任公司)；LDZX-30FA 立式压力蒸汽灭菌器(上海中安医疗器械厂)；LDZX-30FA 旋转蒸发仪(上海贤德实验仪器有限公司)；SYNAPT G2-S Q-TOF 质谱仪、ACQUITY UPLCTM 液相色谱仪均购自美国 Waters 公司。

1.2 试剂与药材

高乌头药材购自甘肃省天祝藏族自治县农贸市场，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* Nakai)的根。

高乌甲素对照品(甘肃神龙药业股份有限公司，批号：20001001；HPLC 测定质量分数≥97.50%)；5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural，5-HMF，成都克洛玛生物科技有限公司，批号：161228；HPLC 测定质量分数≥ 98.00%)；冉乌头碱对照品(甘肃神龙药业股份有限公司，批号：150404；HPLC 测定质量分数≥ 98.00%)。亮氨酸脑啡肽、甲酸、甲酸铵、乙腈、甲醇、磷酸二氢钠均为色谱纯，均购自广州化学试剂厂；石油醚(60~90 ℃)、三氯甲烷、氨水、异丙醇、醋酸乙酯、95%乙醇均为分析纯，均购自天津大茂化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 高乌头加甘草汁蒸制不同时间对生物碱含量的影响

2.1.1 高乌头不同炮制品的制备[3] 取 3 批高乌头药材，制成高乌头生品饮片，每一批药材分成 12 份(每份 200 g)，将其中 6 份用 10%甘草汁(3 mL 甘草汁含 1 g 甘草)润透后置立式压力蒸汽灭菌器内，在 127 ℃，0.15 MPa 条件下分别蒸制 0.5，1，2，3，4，5 h，并将高乌头蒸制品分别命名为 Z0-0 h，Z1-0.5 h，Z2-1 h，Z3-2 h，Z4-3 h，Z5-4 h，将蒸制 5 h 的炮制品分成 3 份，分别为 Z6-5 h，Z7-5h，Z8-5 h。另 6 份不加甘草汁在同样的条件下蒸制 0.5，1，2，3，4，5 h 后取出晾干，分别取适量，粉碎过 40 目筛备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 分别取“2.1.1”项下高乌头炮制品粉末 1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，加氨试液 3 mL，再加入异丙醇-乙酸乙酯(1∶1)混合溶液 50 mL，称定质量，超声处理(频率 50 kHz；水温 25 ℃) 30 min，摇匀，滤过，精密量取续滤液 10 mL，40 ℃以下减压回收溶剂，残渣加甲醇溶解，定容至 25 mL，密塞，摇匀，进样前用 0.45 μm 微孔膜过滤。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别取冉乌头碱、高乌头甲素对照品，精密称定，加甲醇溶解并定容制成冉乌头碱和高乌甲素对照品溶液，再分别精密量取上述 2 种对照品溶液适量，配制混合对照品溶液(冉乌头碱浓度为 0.175 0 $mg·mL^{-1}$，高乌甲素浓度为 0.337 5 $mg·mL^{-1}$)。

2.1.4 甘草汁阴性样品溶液的制备 取甘草 20 g，加 10 倍量水煎煮 2 次，每次 30 min，合并煎煮液，过滤，浓缩至 180 mL(9 mL 甘草汁含 1 g 甘草)，取 9 mL 甘草汁，水浴蒸干，残渣加甲醇定容至 5 mL，即得。

2.1.5 色谱条件 流动相为三乙胺水溶液(pH 为 9.3~9.6)(A)-甲醇(B)；梯度洗脱[0~30 min，5%→

35%(B)，流速 0.4 mL·min^{-1}；30~70 min，35%→100%(B)，流速 0.4 mL·min^{-1}；70~80 min，100%(B)，流速 0.4 mL·min^{-1}；80~85 min，100%(B)，流速 1.0 mL·min^{-1}]，检测波长为 308 nm，柱温为 35 ℃。

2.1.6 高乌头炮制品 HPLC 的建立

2.1.6.1 专属性考察 分别取混合对照品溶液、甘草汁阴性样品溶液及甲醇阴性对照溶液，按“2.1.5”项下色谱条件，各进样 10 μL，结果见图 1。高乌甲素和冉乌头碱的保留时间分别为 74.851 min 和 73.133 min。结果表明甲醇阴性对照溶液、甘草汁阴性样品溶液在与对照品色谱相应位置上无干扰。理论板数按高乌甲素计算≥5 000。

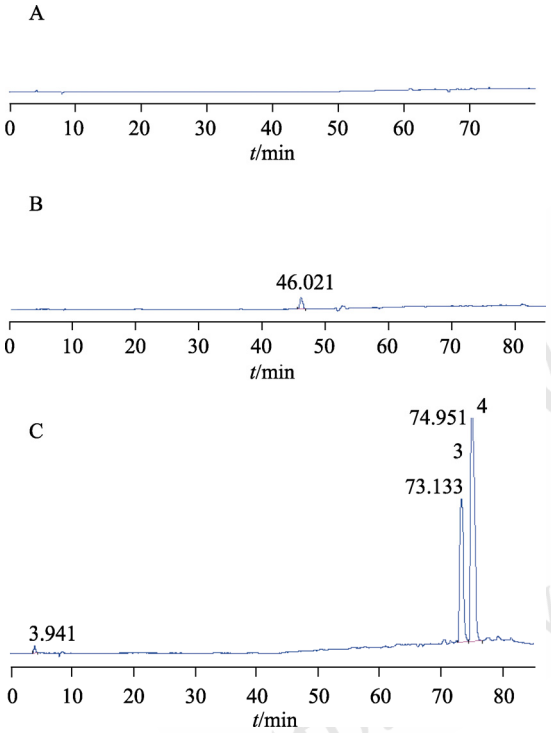

图 1 甲醇阴性溶液(A)、甘草汁阴性溶液(B)及高乌甲素和冉乌头碱混合溶液(C)色谱图

3–冉乌头碱；4–高乌甲素。

Fig. 1 Chromatogram of negative of methanol solution(A), negative of liquorice juice solution(B) and reference of lappaconitine and ranaconitine solution(C)

3–ranaconitine; 4–lappaconitine.

2.1.6.2 线性关系考察 精密吸取一定体积混合对照品，按倍数关系稀释成 7 个不同质量浓度的溶液，分别吸取 10 μL 进样分析，测定峰面积，以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归。结果表明，高乌甲素在 0.168 8~3.375 0 μg 内线性关系良好，回归方程 Y=1 158.8X+2.128，r=0.999 9；冉乌头碱在 0.087 5~1.750 0 μg 内线性关系良好，回归方程 Y=1195.3X–2.035，r=0.999 8。

2.1.6.3 仪器精密度试验 精密吸取对照品混合溶液 20 μL，按“2.1.5”项下色谱条件进样分析，连续进样 5 次，冉乌头碱、高乌甲素峰面积的RSD分别为 0.77%，0.97%(n=5)，表明仪器精密度良好。

2.1.6.4 稳定性试验 取蒸制 5 h 的供试品溶液，按“2.1.5”项下色谱条件进样，分别于 0，3，6，9，12，24 h 内测定，记录冉乌头碱与高乌甲素的峰面积。其含量 RSD 分别为 2.34%，1.52%(n=5)。结果显示，24 h 内样品稳定性良好。

2.1.6.5 重复性试验 取蒸制 5 h 的样品粉末，平行称取 5 份，按供试品溶液制备方法制备供试品溶液，按“2.1.5”项下色谱条件进行测定，计算样品中高乌甲素和冉乌头碱的含量。结果显示 5 份样品中高乌甲素的平均含量为 1.240%，RSD 为 2.49%，冉乌头碱平均含量为 0.239%，RSD 为 2.51%，表明方法的重复性良好。

2.1.6.6 加样回收率试验 取已知高乌甲素和冉乌头碱含量的高乌头粉末 0.5 g 共 5 份，精密称定。分别加入含有等量高乌甲素和冉乌头碱的对照品，按供试品溶液的制备方法制备，依法测定，计算高乌甲素和冉乌头碱的平均回收率分别为 100.13%和 98.25%，RSD 分别为 2.66%，3.06%，表明方法的回收率良好，结果见表 1。

表 1 加样回收试验

Tab. 1 Results of sample recovery

取样量/g	含有量/mg		加入量/mg		测得值/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	1.20	6.21	1.05	4.52	2.21	10.99	96.19	104.19	98.25	100.13
0.501 64	1.20	6.22	1.05	4.70	2.19	10.88	94.29	99.36		
0.501 47	1.20	6.22	1.05	4.42	2.24	10.83	99.05	103.05		
0.505 15	1.21	6.26	1.05	4.93	2.27	11.20	100.95	100.16		
0.512 81	1.23	6.36	1.05	5.01	2.25	11.33	97.14	99.37		
0.512 80	1.23	6.36	1.05	4.99	2.3	11.01	101.90	94.65		

2.1.7 样品含量测定 取“2.1.2”项下制备好的高乌头炮制品供试液，分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，见图 2，并记录 4 种检测指标成分的光谱图，见图 3。其中高乌甲素和冉乌头碱按外标法一点法计算含量，而新增峰 1 和峰 2 没有相应的对照品，故含量变化用峰面积和浓度比值(A/C)表示，4 个成分的含量变化结果见表 2。

结果发现，高乌头加甘草汁炮制过程中，高乌甲素和冉乌头碱的含量随着蒸制时间的延长均有一定程度降低。除冉乌头碱和高乌甲素含量有

明显变化外，随蒸制时间的延长，新峰 1 和新峰 2 含量均明显增加。图 2 中其他相应峰也有明显量变和质变。

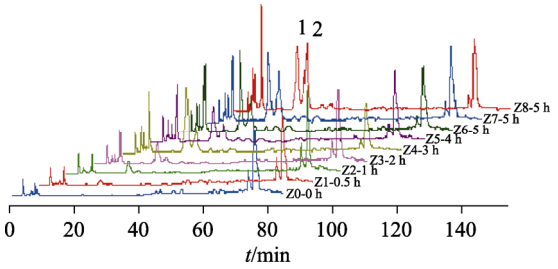

图 2 高乌头加甘草汁蒸制不同时间化学成分动态变化 HPLC 色谱图

1–新峰 1；2–新峰 2。

Fig. 2 HPLC chromatogram of components dynamic change of *Aconitum sinomontanum* Nakai add liquorice juice steamed for different times

1–new peak 1; 2–new peak 2.

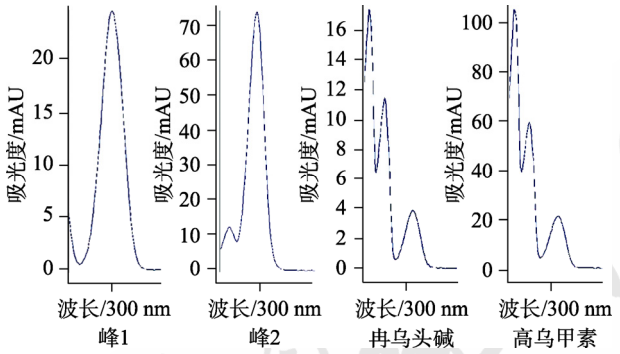

图 3 4 个化学成分的光谱图

Fig. 3 Spectrograms of four chemical component

表 2 高乌头加甘草汁蒸制不同时间 4 个化学成分的含量测定结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 2 Contents of four chemical components of *Aconitum sinomontanum* Nakai add liquorice juice steamed for different times($\bar{x}\pm s$, n=3)

样品名称	新峰 1(A/C)	新峰 2(A/C)	冉乌头碱/%	高乌甲素/%
加甘草汁蒸 0 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.153±1.21	0.750±1.97
加甘草汁蒸 0.5 h	11.07±2.36	0.00±0.00	0.146±0.25	0.732±0.17
加甘草汁蒸 1 h	30.05±1.37	0.00±0.00	0.135±0.25	0.649±0.31
加甘草汁蒸 2 h	50.03±0.28	5.10±0.96	0.109±2.01	0.642±1.62
加甘草汁蒸 3 h	74.83±1.54	46.64±1.13	0.065±1.35	0.612±0.84
加甘草汁蒸 4 h	78.74±1.61	49.14±1.07	0.059±2.01	0.609±1.35
加甘草汁蒸 5 h	142.16±0.37	126.67±1.04	0.056±0.36	0.598±2.83

2.2 高乌头不加甘草汁蒸制不同时间对生物碱含量的影响

将高乌头不加甘草汁蒸制 0，0.5，1，2，3，4，5 h 制备好的样品溶液，在“2.1.5”项下色谱条件下分别进样，进样体积为 20 μL，结果见图 4 和表 3，在蒸制过程中同样产生 2 个新峰，其紫外吸收与加甘草汁蒸制产生的 2 个新峰一致。

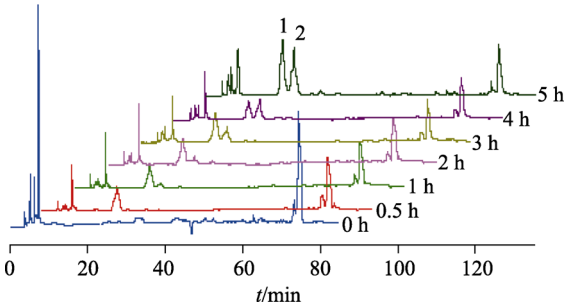

图 4 高乌头不加甘草汁蒸制不同时间化学成分动态变化 HPLC 色谱图

1–新峰 1；2–新峰 2。

Fig. 4 HPLC chromatogram of components dynamic changes of *Aconitum sinomontanum* Nakai without liquorice juice steamed for different times

1–new peak1; 2–new peak 2.

表 3 高乌头不加甘草汁蒸制不同时间 4 个化学成分的含量测定结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 3 Contents of four components of *Aconitum sinomontanum* Nakai without liquorice juice steamed for different times($\bar{x}\pm s$, n=3)

样品名称	新峰 1(A/C)	新峰 2(A/C)	冉乌头碱/%	高乌甲素/%
不加甘草汁蒸 0 h	0.00±0.00	0.00±0.00	0.169±0.13	1.240±0.37
不加甘草汁蒸 0.5 h	90.90±1.23	0.00±0.99	0.166±1.82	0.732±0.48
不加甘草汁蒸 1 h	92.29±1.17	7.97±0.53	0.135±1.21	0.649±1.16
不加甘草汁蒸 2 h	96.85±0.15	19.54±1.37	0.109±2.06	0.642±1.38
不加甘草汁蒸 3 h	102.16±2.03	48.37±1.31	0.096±0.95	0.621±0.47
不加甘草汁蒸 4 h	124.78±1.32	67.63±2.07	0.065±0.74	0.566±0.41
不加甘草汁蒸 5 h	176.30±0.21	147.37±1.46	0.047±1.21	0.536±1.57

结果发现，高乌头不加甘草汁蒸制与加甘草汁蒸制相比，出峰数目明显减少。随蒸制时间的延长，高乌甲素和冉乌头碱含量的降低幅度明显增大且超过一半，新增峰 1 和 2 含量增加幅度也较为明显，高乌头炮制讲究“适中”的炮制工艺，因此加甘草汁炮制更为合理。

2.3 模拟炮制对高乌甲素和冉乌头碱含量的影响

将高乌甲素和冉乌头碱对照品分别蒸制 0，0.5，1，2，3，4 及 5 h，在“2.1.5”项下条件下分别进样分析，相应的 HPLC 图谱见图 5，含量变化结果见表 4。

结果发现，冉乌头碱和高乌甲素对照品在模拟炮制过程中，随蒸制时间的延长，含量均有相应程度的降低，高乌甲素含量降低 35%左右，冉乌头碱含量能降低 7%左右，高乌甲素含量降低幅度比冉乌头碱大。

2.4 高乌头炮制过程中新增成分的分离及鉴定

2.4.1 新增成分制备分离　采用制备液相对高乌头炮制过程中产生的新成分进行制备分离，选用迪马 C_{18} 钻石色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流

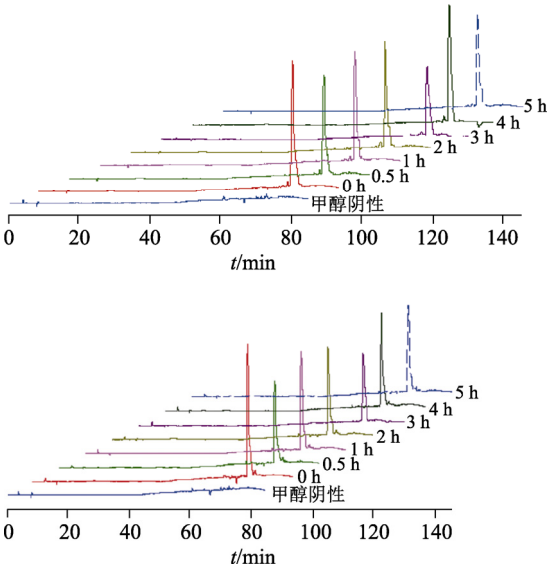

图 5 高乌甲素(A)和冉乌头碱(B)蒸制不同时间的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of lappaconitine(A) and ranaconitin(B) at different steaming time

表 4 冉乌头碱和高乌甲素对照品蒸制过程中含量变化

Tab. 4 Content changes of ranaconitine and lappaconitine reference substance during steaming process

蒸制时间/h	冉乌头碱/%	高乌甲素/%
0	100.00	100.00
0.5	97.74	88.28
1	96.65	80.83
2	94.86	79.87
3	94.39	69.29
4	93.37	66.21
5	92.35	64.18

动相为 0.05 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠水溶液(A)-乙腈(B)；梯度洗脱[0~10 min，4%→10%(B)，流速 1.0 mL·min^{-1}；10~23 min，10%(B)，流速 1.0 mL·min^{-1}；23~30 min，10%→25%(B)，流速 1.0 mL·min^{-1}；30~35 min，25%→30%(B)，流速 1.0~0.6 mL·min^{-1}；35~45 min，30%(B)，流速 0.6 mL·min^{-1}；45~55 min，30%→35%(B)，流速 0.6 mL·min^{-1}；55~75 min，35%→100%(B)，流速 0.6 mL·min^{-1}]；检测波长为 290 nm；柱温为 30 ℃，在分离过程中合并相同馏分，最终制备得到化合物 **1**(峰 2)。

2.4.2 对照品溶液的制备 取 5-HMF 对照品，精密称定，加甲醇配制成浓度为 1.115 0 mg·mL^{-1} 的溶液，冷藏备用，临用时加甲醇稀释。

2.4.3 UPLC-QTOF-MS 分析

2.4.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLCBET C_{18} 柱(1.7 μm，2.1 mm×50 mm)；流动相为 5 mmol·L^{-1} 甲酸铵溶液(A)-乙腈(B)；梯度洗脱[0~11 min，5%→50%(B)]；流速为 0.3 mL·min^{-1}；柱温 35 ℃；检测波长 280 nm；进样量 2 μL。

2.4.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)，离子模式 ES^{+}；扫描范围 50~1 200 Da，毛细管电压为 2.50 kV，锥孔电压为 30 V，除溶剂温度为 400 ℃，除溶剂气体为 600 L·h^{-1}，锥孔气流为 30 L·h^{-1}，离子源温度为 110 ℃。采用 MSE 采集方式，扫描时间为 1.0 s，数据采集模式 Continuum；碰撞电压为 20~40 V；碰撞气体为高纯氩气；用高纯液氮脱溶剂。亮氨酸脑啡肽(1 ng·μL^{-1})以流速为 10.0 μL·min^{-1} 进行 Lockspray 实时校正，以确保实验结果中相对分子质量的精确度和重现性，并扣除背景。

2.4.4 新增成分 ^{1}H-NMR 及 ^{13}C-NMR 分析 化合物 **1**(峰 2)为棕黄色油状化合物，常温下易溶于水、甲醇、乙醇、氯仿等，难溶于乙醚，不溶于石油醚。能使 $KMnO_4$ 褪色，与 5-HMF 对照品比较有相同的理化性质。在相同的色谱条件下与 5-HMF 具有相同的保留时间(1.18 min)，其色谱图与光谱图见图 6 和图 7。^{1}H-NMR(400 MHz，$CDCl_3$) δ 9.61(s, 1H)，7.21(d, J=3.5 Hz, 1H)，6.52(d, J=3.5 Hz, 1H)，4.72(s, 2H)，3.49(s, 3H)，1.63(s, 4H)，1.47(d, J=6.8 Hz, 1H)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ：57.7(6-C)，110.0(4-C)，122.4(3-C)，152.5(2-C)，160.4(5-C)，177.6 (>C=O)。可确定该化合物为 5-HMF。

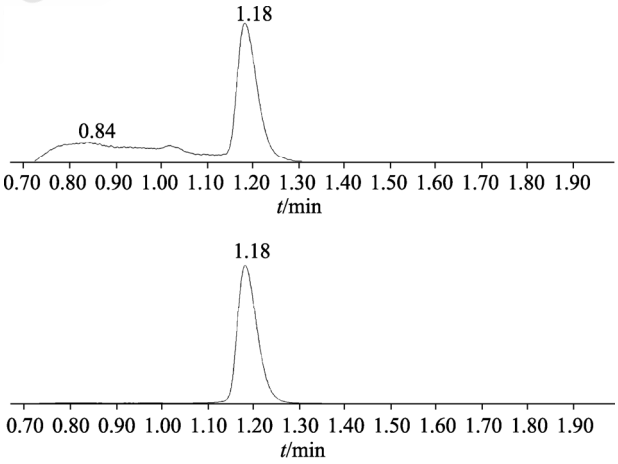

图 6 化合物 **1** 和 5-HMF 色谱图

Fig. 6 Chromatograms of compound **1** and 5-HMF

2.4.5 新增成分 UPLC-QTOF-MS 分析

2.4.5.1 化合物 **1**(峰 2)的定性分析 通过 UPLC-Q/TOF-MS 检测，化合物 **1** 与 5-HMF 正离子模式下总离子流图见图 8。化合物 **1** 的二级图谱见图 9。

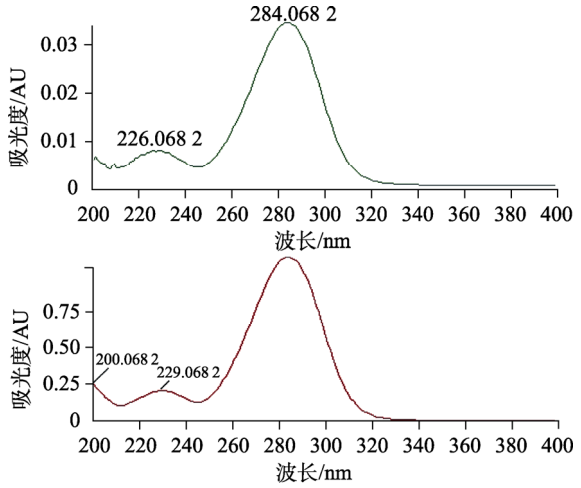

图 7 化合物 **1** 和 5-HMF 光谱图

Fig. 7 Spectrogram of compound **1** and 5-HMF

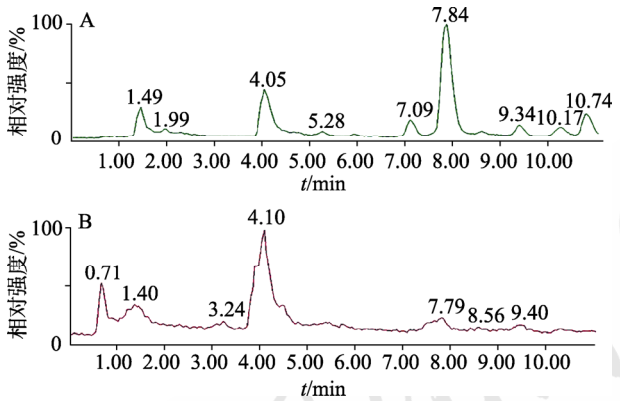

图 8 5-HMF(A)与化合物 **1**(B)的 UPLC-QTOF-MS 正离子模式总离子流图

Fig. 8 5-HMF(A) and compound1(B) total ion flow diagram of UPLC-QTOF-MS positive ion mode

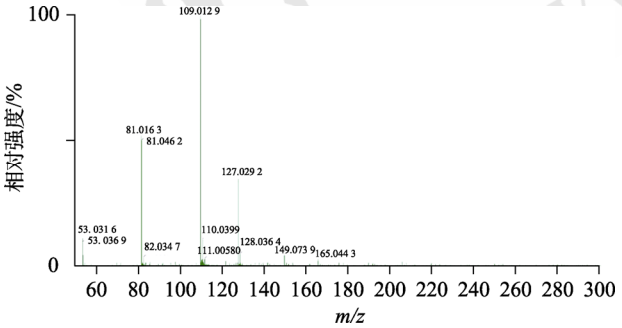

图 9 化合物 **1** 的二级图谱

Fig. 9 Secondary profile of compound **1**

2.4.5.2 化合物 **1** 特征碎片离子归属及其可能的质谱断裂机制 化合物 **1** 分子式为 $C_6H_6O_3$，结构中含有羰基(-O-)，易得到 1 个 H 质子，得到 M+1 的特征峰，脱去一分子 H_2O，得到 M-18 的特征峰，再脱去中性分子-CO，得到 M-46 的特征峰，化合物 **1** 的质谱图中各特征碎片离子的归属及其可能的质谱断裂机制与 5-HMF 相同，结果见图 10。

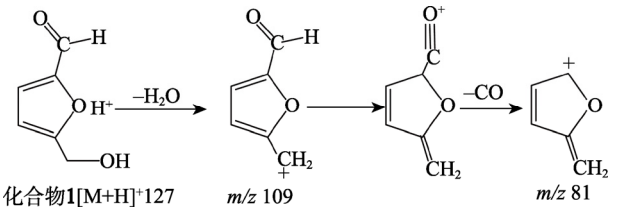

图 10 化合物 **1** 的质谱裂解机制

Fig. 10 Mass spectrometric fragmentation pathway of new compound **1**

3 讨论

课题组前期研究表明，高乌头经甘草汁炮制后毒性降低而药效增强[3]，与新增化学成分密切相关，推测炮制后新产生的化合物可能为“减毒增效”的药效物质基础，除与炮制后化学成分的改变有关外，也可能与辅料甘草“缓和药性”的作用密切相关。高乌甲素与冉乌头碱均为二萜类生物碱，在高乌头中两者含量最高，目前一直是研究的热点，其中高乌甲素具有良好的镇痛、抗炎及解热作用，尤其作为中国首创的非成瘾性镇痛药，临床上广泛应用于各种程度疼痛治疗。峰 1 和峰 2 是蒸制过程中新增的峰，其含量变化非常明显。故选择上述 4 种化学成分作为检测指标来比较加甘草汁蒸制不同时间对高乌头的影响。

从实验结果可以看出，加甘草汁润透后，随着蒸制时间的延长，高乌头中化学成分发生明显的变化，其中高乌甲素与冉乌头碱含量有一定程度的降低，同时也新增了不少化学成分，目前尚不清楚，而最为明显的峰 1 和峰 2，随着加甘草汁蒸制时间的延长，含量明显增加。高乌头不加甘草汁炮制，也能检测到 2 个新增成分，说明新成分的增加与甘草汁无关。但不能就此否认甘草的解毒作用，甘草的解毒作用体现在其他方面，可能与有毒成分生成新物质，只是在本试验条件下未能检测到，而甘草本身在体内的解毒作用早已被试验所证实。

通过色谱分离，NMR 及 UPLC-QTOF-MS 分析，其中化合物 **1**(峰 2)为 5-HMF。5-HMF 主要是由糖类经加热分解产生，广泛存在于含有糖类物质的植物和食品中。在白附子[4]、黄精[5]、地黄[6]等许多中药中曾分离得到。高乌头本身含有糖类成分，在炮制过程中可能发生 2 个反应，一个是糖的热降解反应，另一个是糖类之间发生美拉德(Maillard)反应，这 2 个反应均能产生 5-HMF，5-HMF 含量的高低与炮制时间、炮制温度以及炮制辅料有关[7]。有研究表明 5-HMF 具有很好的抗氧

化[8-10]、改善血液流变学[11-12]、抗炎[13]等药理作用，这可能与高乌头止痛、活血散瘀功效有关。

毒性中药的有效成分往往也是其毒性成分，在炮制过程中，高乌头毒性虽然降低，但有效成分也在流失，因此需要一个“适中”的炮制工艺，既能保证降低毒性，又能使药效保持，而加甘草汁炮制刚好能满足该要求。文献调查也发现高乌甲素本身具有一定的毒性，曾有不良反应报道[14-16]，目前有关高乌头炮制前后毒性变化相关性的研究较少，故尚需进一步研究构建高乌头炮制减毒增效的科学内涵，本研究为指导毒性中药炮制减毒增效的研究以及科学化、规范化的临床应用提供参考。

REFERENCES

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

[2] 国家中医药管理局, 中华本草编委会. 中华本草.第七卷[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 1746-1747.

[3] 李芸, 胡昌江, 侯桃霞, 等. 正交实验优选高乌头解毒的炮制工艺研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 905-909.

[4] ZHANG H W, ZHANG Z L, LIU B. Isolation and identification of the newly added chemical constituent from processed Rhizoma typhonii[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(5): 1197-1198.

[5] ZENG L Y, SONG Z Q, WEI Z, et al. Isolation of chemical constituents produced in processing of Polygonati Rhizoma and their content changes[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(12): 1584-1588.

[6] ZHU M F, LIU X Q, WU Z X, et al. Effect of concentration of catalpol and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from processing of Rehmanniae Radix[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(12): 1155-1157.

[7] LI Y H, LÜ X Y, ZHU X H. Effects of process on 5-hydroxymethyl production in fructus *Schisandra chinensis*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(11): 992-995.

[8] QIAN W, HUANG C Y, ZHANG W N. GC determination of degradation product 5-HMF in glucose-bearing injections[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(10): 1601-1603.

[9] 朱丹妮, 严永清, 李志明. 生脉散复方化学动态变化与药效关系的研究: 生脉散复方化学的研究(Ⅲ)[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(8): 483-485.

[10] DING X, WANG M Y, YU Z L, et al. Studies on separation, appraisal and the biological activity of 5HMF in *Cornus officinalis*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(4): 392-396, 484.

[11] 耿放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术, 2005, 7(6): 52-56, 94.

[12] KUBO M, ASANO T, MATSUDA H, et al. Studies on Rehmanniae Radix. III. The relation between changes of constituents and improvable effects on hemorheology with the processing of roots of *Rehmannia glutinosa*[J]. Yakugaku Zasshi, 1996, 116(2): 158-168.

[13] KIM H K, CHOI Y W, LEE E N, et al. 5-Hydroxymethylfurfural from black garlic extract prevents TNFα-induced monocytic cell adhesion to HUVECs by suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression, reactive oxygen species generation and NF-κB activation[J]. Phytother Res, 2011, 25(7): 965-974.

[14] 魏华波, 范艾玲, 秦争平. 注射用氢溴酸高乌甲素致耳毒性不良反应 2 例[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(17): 1413-1414.

[15] BRYZGALOV A O, ROMANOV V E, TOLSTIKOVA T G, et al. Lappaconitine: influence of halogen substituent on the antiarrhythmic activity[J]. Cardiovasc Hematol AgentsMed Chem, 2013: 11(3): 211-7.

[16] 林鹏锋, 张亚坤. 氢溴酸高乌甲素粉针剂静脉滴注致过敏反应 1 例[J]. 中国药业, 2013, 22(22): 53.

收稿日期：2022-08-19

(本文责编：陈怡心)

http://www.chinimap.com