

油浴模拟砂炒过程中印乌碱的结构转化途径及转化产物毒性研究

王 艳, 陶 培, 王毓杰*, 邓维佳

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘 要: **目的** 研究印乌碱在砂炒(油浴模拟)过程中的结构转化途径并比较印乌碱及其转化产物的毒性。**方法** 采用 HPLC 法筛选出印乌碱发生结构转化的温度和时间参数;通过柱色谱法和 NMR、MS 等波谱法,分离、鉴定出印乌碱的砂炒转化产物;采用心脏毒性实验比较原型成分印乌碱及其转化产物的毒性。**结果** 通过比较不同炮制温度、时间样品的 HPLC 色谱图,筛选出印乌碱在 160~180 °C,加热 10~30 min 时发生结构转化;分离、鉴定出砂炒产物 mithaconitine;II 导联心电图(electrocardiogram, ECG)表明,0.06 mg/kg 印乌碱可引起正常大鼠出现室性早搏(ventricular premature beat, VPB)、室性心动过速(ventricular tachyrrhythmia, VT)等心律失常现象;mithaconitine 在该剂量下未引起大鼠典型的心律失常 ECG。**结论** 砂炒过程中,印乌碱的 C-8 位脱去乙酰基,转化为 14-benzoylpseudoaconine;接着,14-benzoylpseudoaconine 的 C-8 位、C-15 位发生脱水反应转化为 mithaconitine,达到砂炒减毒的目的。

关键词: 炮制;砂炒;印乌碱;mithaconitine;心律失常;油浴;毒性

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)05-1205-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.017

Study on structural transformation pathway of indaconitine in stir-frying with sand process and toxicity of its processing products

WANG Yan, TAO Pei, WANG Yu-jie, DENG Wei-jia

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the structural transformation pathway of indaconitine in stir-frying with sand process and compare the toxicity of indaconitine with its processing products. **Methods** Using high performance liquid chromatography to screen out the temperature and time parameters of the structural transformation of indaconitine. The processing products were separated by column chromatography and identified by NMR and MS. The cardiotoxicity test was chosen to compare the toxicity of indaconitine with its processing products. **Results** Indaconitine was converted into mithaconitine when it was heated at 160—180 °C for 10—30 min. With a dose of 0.06 mg/kg, indaconitine could induce ventricular arrhythmia in rats, such as ventricular premature beat, ventricular tachycardia. However, mithaconitine had no arrhythmogenic effect at the same dosage. **Conclusion** The structural transformation pathway of indaconitine has been defined: deacetylating at C-8 position, generating 14-benzoylpseudoaconine, and converting benzoylpseudoaconine into mithaconitine by dehydration reaction at C-8 and C-15 position. Compared with indaconitine, the toxicity of mithaconitine was reduced.

Key words: process; stir-frying with sand; indaconitine; mithaconitine; arrhythmia; oil bath; toxicity

毛茛科(Ranunculaceae)乌头属 *Aconitum* L. 植物是一类重要的药用植物,我国约有 167 种,主要集中在云南西北部、四川西部和西藏东部^[1-3]。其中有 76 种可供药用^[4],常用品种有乌头 *Aconitum*

carmichaelii Debx.、草乌 *A. kusnezoffii* Reichb.^[5]及少数民族医常用的铁棒锤 *A. pendulum* Busch、康定乌头 *A. tatsienense* Finet & Gagnep.、工布乌头 *A. kongboense* Lauener、准噶尔乌头 *A. soongaricum*

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81403104);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(新教师类)(20135132120011);四川省科技厅省级科技计划项目(20YYJC0970);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(030041070)

作者简介: 王 艳(1996—),女,硕士研究生,主要方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 13983054649 E-mail: 1650857380@qq.com

***通信作者** 王毓杰(1980—),男,副研究员,硕士生导师,研究方向为中药及民族药药效物质基础及炮制原理。

Tel: 18980923679 E-mail: superwangyj@126.com

Stapf. 等^[6-8], 主要用于治疗风湿性关节炎、跌打损伤、腰腿痛等疾病, 疗效确切^[9]。但由于含有毒性生物碱^[10-11], 需炮制后使用。

目前, 中医对于乌头类药材的炮制主要采用水煮法(加水煮沸 4~6 h)及蒸制法(蒸 6~8 h)^[5], 其炮制减毒原理为毒性生物碱通过酯键水解反应, 由双酯型生物碱依次转化为毒性较低的单酯型和醇胺型生物碱, 如乌头碱转化为苯甲酰乌头原碱和乌头原碱^[12]。藏、羌医通常采用砂炒法炮制乌头类药材, 仅需炒制 5~10 min 即可达到减毒的目的。课题组前期以铁棒锤为例, 对砂炒法的炮制原理进行研究, 发现其炮制减毒原理为毒性生物碱通过高温热解的方式转化成毒性较小的生物碱^[13-16]。并在此基础上建立了一种油浴模拟砂炒炮制的方法^[17], 能够更加精准地控制加热温度, 真实地反映出砂炒炮制过程中指标成分发生转化的温度范围。

康定乌头作为南派藏医的另一常用品种, 主要毒性成分为印乌碱和滇乌碱。本实验以康定乌头中的主要成分之一印乌碱^[18]为例, 采用油浴模拟砂炒法: (1) 通过 HPLC 色谱法, 对不同炮制温度、炮制时间的样品进行监测, 明确印乌碱在什么温度下、炮制多长时间开始发生结构转化, 筛选出转化的温度和时间参数; (2) 以筛选出的参数作为依据, 对转化成分进行定向分离、结构鉴定, 比较原型生物碱印乌碱及其转化产物的结构, 明确印乌碱在砂炒过程中的结构转化途径; (3) 选择心脏毒性实验比较印乌碱及其转化成分的毒性大小。从化学结构和毒性 2 个层次初步阐明康定乌头的砂炒炮制原理, 为乌头类药材砂炒炮制工艺的规范化提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, Agilent Chem Station 色谱工作站, 美国 Agilent 公司; BL-420F 多功能生理记录仪, 成都泰盟软件有限公司; CPA2250 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; ULUP-I-10T 优普超纯水机, 成都超纯科技有限公司; HH-SJ 集热式磁力搅拌器, 油浴用, 金坛市城东新瑞仪器厂; RE-2000A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; XT-4 显微熔点仪, 上海精密科学仪器有限公司, 温度计未校正; Perkin-Elmer 341 polarimeter 旋光仪, 美国 Perkin-Elmer 公司; Bruker Avance 600 spectrometer 核磁共振仪(TMS 为内标)、

Bruker micrO-TOF-Q-II mass spectrometer 质谱仪, 德国 Bruker 公司。

1.2 药材与试剂

康定乌头药材采自四川省甘孜州市泸定县下草坪, 植物标本经成都中医药大学王毓杰副研究员鉴定为康定乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb., 凭证标本存放于成都中医药大学民族医药学院标本室。

薄层色谱硅胶 G 和柱色谱硅胶, 200~300 目, 青岛海洋化工厂; 印乌碱对照品, 批号 T-043-161216, 质量分数>98%, 陕西昊辰生物科技有限公司; 乌拉坦, 批号 2017090501, 成都市科龙化工试剂厂; 生理盐水, 批号 L218090910, 四川科伦药业股份有限公司; 色谱所用石油醚沸点 60~90 °C; 显色剂为改良碘化铋钾试剂; 乙腈为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级健康成年 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量(200±20)g, 均由成都达硕实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号 SCXK(川)-2015-030。

2 方法与结果

2.1 印乌碱的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 COSMOSIL PAK 5 C₁₈-MS-II(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.03 mol/L 碳酸氢铵溶液(浓氨水调 pH 9.5)(43:57)等度洗脱; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 230 nm。理论板数按印乌碱色谱峰计算不得低于 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取印乌碱对照品 46.26 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加二氯甲烷制成质量浓度为 462.6 μg/mL 的反应储备液。取 4 mL 该反应储备液, 置 10 mL 量瓶中, 挥干溶剂, 加 0.1% 盐酸-甲醇定容, 制成 185.04 μg/mL 的对照品溶液, 摇匀, 过微孔滤膜(0.45 μm), 取续滤液, 即得。

2.1.3 炮制品供试溶液的制备 取圆底烧瓶 20 个, 分为 120、140、160、180 °C 4 个温度组, 每个温度下设置 5 个时间点(1、10、20、30、40 min), 分别加入“2.1.2”项下反应储备液 4 mL, 挥干溶剂后, 按照设置的温度、时间进行炮制, 反应结束后, 放冷, 加 0.1% 盐酸-甲醇溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 盐酸-甲醇定容至刻度, 作为炮制品供试溶液, 摇匀, 过微孔滤膜(0.45 μm), 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系、检测限和定量限考察 取印乌碱

对照品适量,加 0.1%盐酸-甲醇制成质量浓度为 2 mg/mL 的储备液,精密吸取该储备液 0.025、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、3.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加 0.1%盐酸-甲醇定容至刻度,制成质量浓度为 5、20、40、80、160、200、400、600 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,摇匀,过微孔滤膜 (0.45 μm),取续滤液,即得。

精密吸取上述对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件,测定峰面积,并以进样量为横坐标 (X),以峰面积为纵坐标 (Y),进行线性回归,得回归方程为 $Y=11.913 X+1.373 9$, $r=0.999 2$,表明印乌碱在 5~600 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。根据 3 倍和 10 倍信噪比所对应的印乌碱的质量浓度,确定方法的检测限 (LOD) 为 1.075 $\mu\text{g/mL}$,定量限 (LOQ) 为 3.440 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取印乌碱对照品溶液 10 μL ,按“2.1.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,得印乌碱峰面积的 RSD 为 1.06%,表明精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取印乌碱对照品溶液于 0、1、2、4、8、12 h,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,进样量 10 μL 。测得印乌碱峰面积的 RSD 为 1.30%,表明对照品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取圆底烧瓶 6 个,分别加入“2.1.2”项下反应储备液 4 mL,挥干溶剂后,于 160 $^{\circ}\text{C}$ 下炮制 20 min,反应结束后,放冷,加 0.1%盐酸-甲醇溶解,并转移至 10 mL 量瓶中,加 0.1%盐酸-甲醇定容至刻度,摇匀,过微孔滤膜 (0.45 μm),取续滤液,即得。按“2.1.1”项下色谱条件分别进行测定,进样量 10 μL 。测得印乌碱峰面积的 RSD 为 1.17%。

2.1.8 印乌碱炮制前、后含量测定 分别吸取“2.1.2”项下印乌碱对照品溶液和“2.1.3”项下不同温度、时间炮制品供试溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件进行含量测定。

2.2 炮制工艺参数的筛选

通过测定印乌碱的含量,观察不同温度、时间条件下的色谱图中有无新的色谱峰出现,能够直观地反映出印乌碱在不同温度、时间条件下的转化过程,结果见图 1、2 及表 1。

如表 1 所示,炮制前印乌碱的质量浓度为 185.04 $\mu\text{g/mL}$,在 160 $^{\circ}\text{C}$ 炮制 10 min 后,质量浓度降为 74.82 $\mu\text{g/mL}$,炮制 20 min 后质量浓度降为 38.47 $\mu\text{g/mL}$,180 $^{\circ}\text{C}$ 炮制 10 min 后,质量浓度降为 8.65 $\mu\text{g/mL}$,20 min 时,质量浓度降为 0。观察

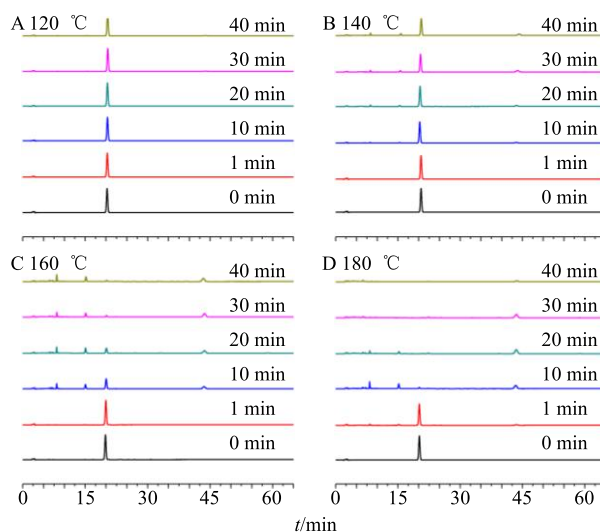


图 1 印乌碱在不同炮制温度和时间条件下的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of indaconitine at different processing temperatures and time

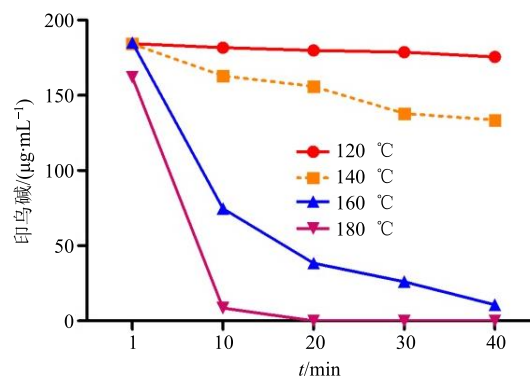


图 2 印乌碱在不同温度、时间条件下含量变化趋势

Fig. 2 Content variation trend chart of indaconitine at different temperatures and time

表 1 不同炮制品中印乌碱含量

Table 1 Content of indaconitine at different processing temperatures and time

时间/min	印乌碱/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	120 $^{\circ}\text{C}$	140 $^{\circ}\text{C}$	160 $^{\circ}\text{C}$	180 $^{\circ}\text{C}$
0	185.04	185.04	185.04	185.04
1	184.40	184.25	185.02	162.01
10	181.83	162.84	74.82	8.65
20	179.98	155.96	38.47	0
30	178.79	137.93	26.17	0
40	175.58	133.57	10.67	0

图 1-C、1-D 发现,160 $^{\circ}\text{C}$ -10~30 min 及 180 $^{\circ}\text{C}$ -10~20 min 色谱图中,在保留时间 8、15、43 min 处,出现了 3 个新的色谱峰。通过对比各温度、时间色谱图发现,保留时间 43 min 处的化合物稳定性

最好,故本实验对其进行了分离、鉴定。

2.3 印乌碱炮制转化成分的分离和结构鉴定

2.3.1 柱色谱分离样品的制备 取印乌碱 520 mg,置 250 mL 圆底烧瓶中,加适量二氯甲烷溶解,用旋转薄膜蒸发仪蒸干溶剂,使印乌碱均匀地附着在圆底烧瓶内壁,并于 160 °C 下油浴 30 min,取出,放凉,加二氯甲烷溶解后,转移至蒸发皿中,挥干溶剂,得到印乌碱炮制产物 (450 mg),供上柱用。

2.3.2 分离纯化 将印乌碱炮制产物进行硅胶柱色谱 (200~300 目,120 g),石油醚-丙酮-三乙胺 (8:1:0.01、6:1:0.01、3:1:0.01) 梯度洗脱,每个梯度 1.5 L,薄层板检视,合并相近流分后,得到 A、B、C 3 个组分。组分 B (260 mg) 进一步采用硅胶柱色谱 (200~300 目,120 g),洗脱剂为石油醚-丙酮-三乙胺 (5:1:0.01),得到化合物 **1** (90 mg)。

2.3.3 印乌碱炮制转化成分的结构鉴定 化合物 **1**: 白色晶体, mp: 109~111 °C, $[\alpha]_D^{20} +220.1^\circ$ ($c = 1.05$, CH₃OH), C₃₂H₄₃NO₈。HR-ESI-MS: m/z 570.306 0 [M+H]⁺ (计算值 570.298 9), 从 NMR 谱 (表 2) 可以看出, 化合物 **1** 属于乌头碱型二萜生物碱^[19], 具有一个 -N-CH₂-CH₃ (δ_H 1.09, 3H, t, $J = 7.3$ Hz; δ_H 2.56, 2.65, 各 1H, m; δ_C 13.6 q, 49.8 t), 4 个甲氧基 (δ_H 3.24, 3.27, 3.39, 3.32, 各 3H, s; δ_C 56.4 q, 58.1 q, 59.3 q, 57.2 q), 以及 1 个苯甲酰基 [δ_H 7.42, 2H, t, $J = 7.7$ Hz; 7.53, 1H, t, $J = 7.7$ Hz; 8.05, 2H, d, $J = 7.7$ Hz; δ_C 168.1 s, 130.4 d, 129.9 d (2C), 128.2 d (2C), 132.9 d]; δ_H 4.96 (1H, d, $J = 3.7$ Hz) 归属于 H-14 β , 表明苯甲酰基连接于 C-14 位^[20-21]; HMBC 远程相关谱表明, 1-OCH₃ (δ_H 3.24, s), 6-OCH₃ (δ_H 3.27, s), 16-OCH₃ (δ_H 3.39, s) 18-OCH₃ (δ_H 3.32, s) 分别与 C-1 (δ_C 83.2, d), C-6 (δ_C 83.6, d), C-16 (δ_C 83.5, d), C-18 (δ_C 76.7, t) 相连 (图 3); 从 ¹³C-NMR 谱中可以看出, 化合物 **1** 具有 7 个含氧碳信号, 因此, 除了苯甲酰基和 4 个甲氧基外, 化合物 **1** 还具有 2 个羟基, HMBC 谱也表明, C-3 (δ_C 72.0, d) 与 H-2 (δ_H 2.18, 2.26), H-5 (δ_H 2.10), H-18 (δ_H 2.69, 3.79) 相关; C-13 (δ_C 77.6, s) 与 H-9 (δ_H 3.06), H-10 (δ_H 2.22), H-12 (δ_H 2.25, 2.00), H-14 (δ_H 4.96), H-16 (δ_H 3.47) 相关, 证实这 2 个羟基分别位于 C-3 位和 C-13 位 (表 2)。

化合物 **1** 与印乌碱的 NMR 图谱相似, 区别在于: (1) 印乌碱的 C-8 位有 1 个乙酰氧基, 而化合

物 **1** 在 C-8 位没有乙酰氧基; (2) ¹³C-NMR 中, 印乌碱的 C-8、C-15 的化学位移分别为 85.3 和 39.4^[22], 而化合物 **1** 的 C-8、C-15 的化学位移分别向低场迁移到 146.6 和 116.3。因此, ¹H-NMR 中, δ_H 5.57 (1H, d, $J = 6.2$ Hz) 归属于 H-15, 表明 C-8 和 C-15 之间形成了双键^[23]。根据 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 2D-NMR (HMBC、¹H-¹H COSY、NOESY) 数据 (表 2), 可以确定化合物 **1** 的结构为 mithaconitine [8,15-didehydro-1 α ,6 α ,16 β -trimethoxy-4 β -(methoxymethyl)-20-ethyl-aconitane-3 α ,13 β ,14 α -triol 14-benzoate]。

2.4 康定乌头砂炒品中印乌碱转化途径验证实验

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Polar-phenyl (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.03 mol/L 碳酸氢铵溶液 (浓氨水调 pH 9.5) (37:63) 等度洗脱; 柱温 40 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 230 nm。理论板数按印乌碱色谱峰计算不得低于 3 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 取“2.1.2”项下印乌碱储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 盐酸-甲醇定容, 制成 92.5 μ g/mL 的对照品溶液, 摇匀, 过微孔滤膜 (0.45 μ m), 取续滤液, 即得印乌碱对照品溶液。

取 mithaconitine 适量, 加 0.1% 盐酸-甲醇制成 mithaconitine 的对照品溶液, 摇匀, 过微孔滤膜 (0.45 μ m), 取续滤液, 即得 mithaconitine 对照品溶液。

2.4.3 砂炒炮制品的制备 将砂置热锅内, 炒至灵活状态, 温度计测量温度为 160 °C 时, 投入康定乌头药材粉末 (过 4 号筛), 不断翻动, 至有焦香气溢出, 取出, 筛砂, 放凉, 即得。

2.4.4 供试品溶液的制备 取康定乌头生品和砂炒品 (过 4 号筛) 各 6 g, 精密称定, 置 500 mL 具塞锥形瓶中, 加乙醚 300 mL 和氨试液 12 mL, 冷浸 1 h (时时振摇), 滤过, 滤液低温蒸干, 残渣加 0.1% 盐酸-甲醇溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 盐酸-甲醇定容至刻度, 作为康定乌头生品和砂炒品供试溶液, 摇匀, 过微孔滤膜 (0.45 μ m), 取续滤液, 即得。

2.4.5 印乌碱及 mithaconitine 检测 分别吸取“2.4.2”项下印乌碱及 mithaconitine 对照品溶液 10 μ L 和“2.4.4”项下康定乌头生品和砂炒品供试溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按“2.4.1”项下色谱条件进行检测。

2.4.6 康定乌头砂炒品中印乌碱转化途径 康定乌头生品中印乌碱质量分数为 848.33 μ g/g, 砂炒品中

表 2 化合物 1 (mithaconitine) 的波谱数据
Table 2 NMR data for compound 1 (mithaconitine)

碳位	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC	NOESY	^1H - ^1H COSY
1	3.09 m	83.2 d	C-2, C-11, C-17, 1-OCH ₃	H-3	H-2 α , H-2 β
2	2.18 m (α)	33.3 t	C-1, C-3, C-4, C-11	H-17, H-19	H-1, H-2 β , H-3
	2.26 m (β)		C-1, C-3, C-4, C-11	—	H-1, H-2 α , H-3
3	3.65 dd (12.4, 4.4)	72.0 d	C-4, C-18, C-19	H-1, H-5	H-2 α , H-2 β
4	—	43.9 s	—	—	—
5	2.10 d (6.6)	49.7 d	C-2, C-3, C-4, C-7, C-9, C-11, C-18, C-19	H-3, H-18	H-6
6	4.26 d (6.6)	83.6 d	C-4, C-8, C-17, 6-OCH ₃	H-9, 6-OCH ₃	H-5, H-7
7	2.98 s	48.2 d	C-5, C-6, C-8, C-9, C-11	H-10, H-15	H-6, H-17
8	—	146.6 s	—	—	—
9	3.06 m	46.4 d	C-8, C-11, C-12, C-13, C-15	H-6	H-10, H-14
10	2.22 m	48.0 d	C-7, C-11, C-13	H-7, H-16	H-9, H-12 α , H-12 β
11	—	51.7 s	—	—	—
12	2.25 m (α)	38.1 t	C-10, C-13, C-16	—	H-10, H-12 β
	2.00 m (β)		C-9, C-10, C-13, C-16	H-14	H-10, H-12 α
13	—	77.6 s	—	—	—
14	4.96 d (3.7)	78.5 d	C-8, C-10, C-13, C-16, ArC = O	H-12 β	H-9
15	5.57 d (6.24)	116.3 d	C-7, C-9, 10, C-13, C-16	H-7, H-17, 16-OCH ₃	H-16
16	3.47 d (6.24)	83.5 d	C-8, C-13, C-14, C-15, 16-OCH ₃	H-10	H-15
17	3.03 s	77.9 d	C-5, C-6, C-8, C-10, C-11, C-21	H-2 α , H-15, H-21	H-7
18	2.69 d (9.5)	76.7 t	C-3, C-4, C-5, 18-OCH ₃	H-5, H-19, 18-OCH ₃	H-18 (3.79)
	3.79 d (9.5)			H-5, H-19, 18-OCH ₃	H-18 (2.69)
19	2.49 d (10.9)	47.7 t	C-3, C-4, C-5, C-18	H-18	H-19 (2.92)
	2.92 d (10.9)		C-3, C-4, C-5, C-17	H-2 α , H-22	H-19 (2.49)
21	2.56 m, 2.65 m	49.8 t	C-17, C-22	H-17	H-22
22	1.09 t (7.3)	13.6 q	C-21	H-19	H-21
1-OCH ₃	3.24 s	56.4 q	C-1	—	—
6-OCH ₃	3.27 s	58.1 q	C-6	H-6	—
16-OCH ₃	3.39 s	57.2 q	C-16	H-15	—
18-OCH ₃	3.32 s	59.3 q	C-18	—	—
ArC = O	—	168.1 s	—	—	—
1'	—	130.4 s	—	—	—
2',6'	8.05 d (7.7)	129.9 d	C-4', ArC = O	H-3', 5'	H-3', 5'
3',5'	7.42 t (7.7)	128.2 d	C-1', C-2', 6', C-4'	H-2', 6'	H-2', 6'
4'	7.53 t (7.7)	132.9 d	C-2', 6'	H-3', 5'	H-3', 5'

印乌碱质量分数降为 72.83 $\mu\text{g/g}$ ；观察康定乌头砂炒品色谱图（图 4-D），发现图中出现了与 mithaconitine（图 4-B）保留时间相一致的色谱峰。表明在砂炒炮制过程中，康定乌头中的印乌碱转化为了 mithaconitine，与印乌碱在砂炒（油浴模拟）过程中的转化途径相一致。结果见图 4。

2.5 印乌碱及砂炒产物的心脏毒性实验

取 SD 大鼠 20 只，雌雄各半，随机分为 2 组（ $n=10$ ），即印乌碱组和 mithaconitine（化合物 1）组。通过前期预试验，即印乌碱组 SD 大鼠，ip 乌拉坦 1.2 g/kg 麻醉后，仰位固定，针型电极插入四肢皮下，静置观察并记录 II 导联心电图

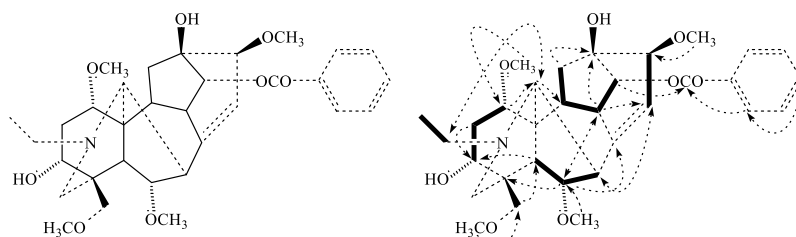
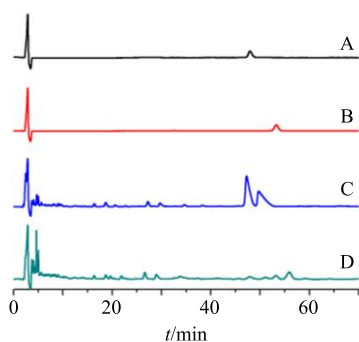
图 3 化合物 1 的结构及 ^1H - ^1H COSY (—)、HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) 和 NOESY ($\leftrightarrow$) 相关谱Fig. 3 Structure and ^1H - ^1H COSY (—), HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) and NOESY ($\leftrightarrow$) correlation of compound 1A-印乌碱 B-mithaconitine C-康定乌头生品 D-康定乌头砂炒品
A-indaconitine B-mithaconitine C-raw *A. tatsienense* D-products
from process of stir-frying with sand

图 4 康定乌头生品及砂炒炮制品 HPLC 图

Fig. 4 Chromatogram of raw *A. tatsienense* and products from process of stir-frying with sand

(electrocardiogram, ECG); 20 min 后, 经股静脉快速推注 0.06 mg/kg 的印乌碱, 观察到正常大鼠 II 导联 ECG 出现 VPB、VT 等心律失常特征 ECG。通过观察 mithaconitine 组大鼠在相同剂量、相同给药方式下是否出现典型的心律失常 ECG, 能够直观地反映出经过炮制后, 印乌碱结构上的改变是否引起其毒性的降低。

与正常 ECG 相比, VPB 主要发生于心律失常初期, 表现为 QRS 波提前出现, 形态异常, T 波与 QRS 主波方向相反, 且 P 波消失^[24]; VT 是 VPB 进一步发展的结果, 主要表现为连续出现 3 次或 3 次以上的室性期前收缩, QRS 波群宽大畸形, 无恒定的 P 波。因此, VPB 和 VT 可以作为衡量印乌碱及其砂炒产物的心脏毒性大小的指标。

在 0.06 mg/kg 剂量下, 印乌碱组大鼠 II 导联 ECG 均出现了 VPB、VT 这 2 种心律失常特征 ECG, 甚至有动物发展为室颤 (ventricular fibrillation, VF), 进而出现死亡的现象; 相同剂量下, mithaconitine 组大鼠未出现上述典型的心律失常 ECG。因此, 与原型成分印乌碱相比, 炮制转化产物 mithaconitine 的毒性降低, 见表 3、图 5。

表 3 印乌碱及砂炒产物的毒性比较

Table 3 Cardiotoxicity of indaconitine and its converted compound

化合物	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	VPB 潜伏期/ s	VT 发生 率/%	死亡率/ %
印乌碱	0.06	148.8 $\pm$ 30.7	100	20
mithaconitine	0.06	—	0	0

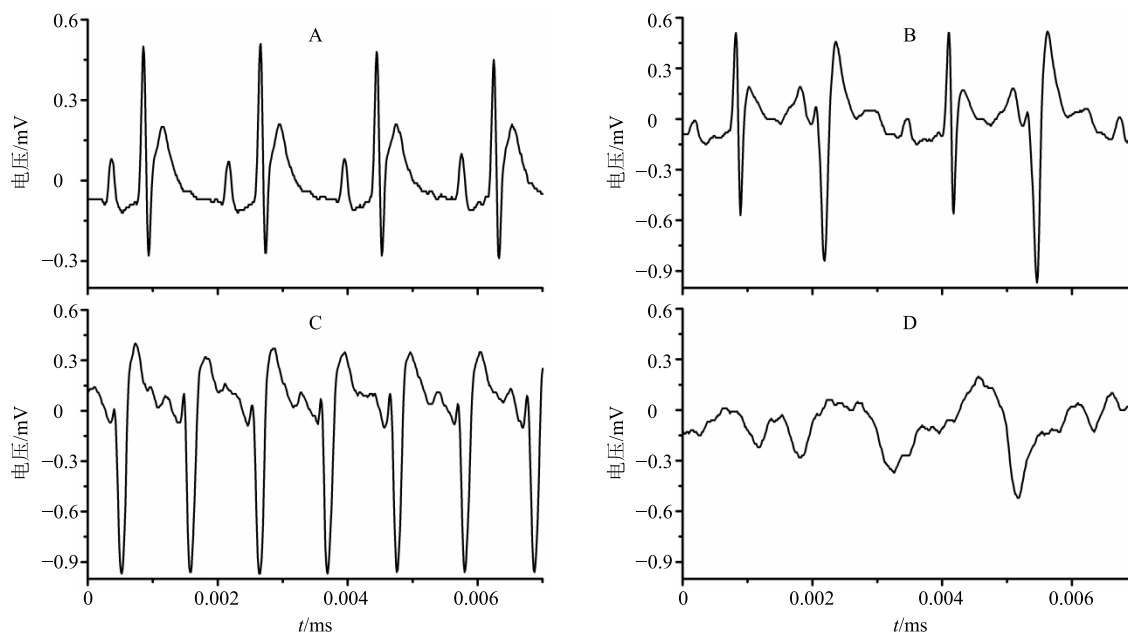
“—”表示在给药 30 min 内, 未出现 VPB

“—” indicates no VPB during the observation period (30 min after administration)

3 讨论

为了探究砂炒炮制过程中不同双酯型二萜生物碱的结构转化途径, 进一步阐明砂炒法炮制减毒原理。本实验选择康定乌头中的主要二萜生物碱印乌碱作为研究对象, 以油浴的方式模拟砂炒炮制过程。选择油浴, 是因为印乌碱是单体化合物, 量少, 不便于用砂炒的方式进行炮制, 并且炒锅不容易准确控制炒制温度。因此, 本实验采用课题组前期建立的一种油浴模拟砂炒的方法^[17], 能够精准地控制加热温度, 更加真实地反映砂炒炮制过程。

目前, 对于乌头类药材的炮制, 中医主要采用水煮及蒸制法, 其炮制减毒途径为双酯型生物碱通过酯键水解反应, 依次转化为毒性较小的单酯型生物碱和醇胺型生物碱, 如乌头碱转化为苯甲酰乌头原碱和乌头原碱^[25-26]。课题组前期对铁棒锤的水煮法和蒸制法炮制原理进行研究时, 也发现了类似的转化规律: 去氧乌头碱转化为苯甲酰去氧乌头碱, 3-乙酰乌头碱转化为 polyschistine-D^[14]。按照这一规律, 推测印乌碱在水煮、蒸制过程中的转化途径为 C-8 位、C-14 位依次脱去乙酰基和苯甲酰基, 转化为 14-benzoylpseudaconine^[27]和伪乌头宁 (pseudaconine)^[28] (图 6)。本实验采用柱色谱法, 分离得到了印乌碱砂炒产物 mithaconitine, 将其与原型化合物印乌碱进行结构对比, 发现在砂炒过程中, 印乌碱的转化途径与水煮及蒸制法不完全相同:



A-正常心电图 B-室性早搏 C-室性心动过速 D-室颤

A-a normal sinus rhythm electrocardiogram B-ventricular premature beats C-ventricular tachyarrhythmia D-ventricular fibrillation

图 5 SD 大鼠特征心电图

Fig. 5 Typical ECG traces showing normal sinus rhythm, VPB, VT and VF

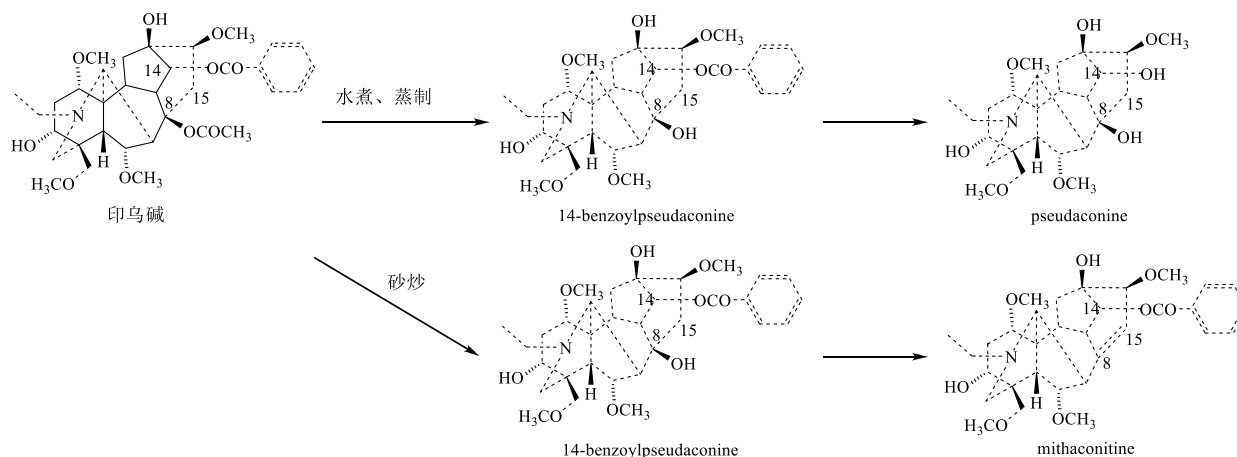


图 6 印乌碱在水煮、蒸制及砂炒过程中的转化途径

Fig. 6 Transformation pathway of indaconitine in processes of decocting, steaming and stir-frying with sand

首先，C-8 位脱去乙酰基，转化为 14-benzoylpseudoaconitine；接着，C-8 位、C-15 位脱水形成双键，转化为 mithaconitine（图 6）。因此，水煮法、蒸制法与砂炒法的不同之处在于：前 2 种方法中，印乌碱脱去 C-8 位乙酰基后，继续水解脱去 C-14 位苯甲酰基；而砂炒法中，印乌碱脱去 C-8 位乙酰基后，剩余的羟基与 C-15 位的氢原子发生脱水反应，形成双键结构，C-14 位苯甲酰基未发生变化。

本实验分析，导致双酯型二萜生物碱在砂炒法与水煮及蒸制法炮制过程中结构转化途径不同的原

因如下：（1）炮制温度不同，在正常大气压下，水的沸点为 100 °C，蒸汽的温度略高于 100 °C，而砂炒的温度能够达到 200 °C 甚至更高，本实验筛选出的印乌碱发生转化的温度为 160~180 °C，远高于 100 °C；（2）加热的介质不同：水煮或者蒸制法中接触药材的介质为沸水或水蒸汽，属于炮制方法中的“水火共制^[29]”；而砂炒法中接触药材的细砂属于固体介质，在整个炮制过程中，除了药材本身含有的符合药典规定的少量水分外，几乎没有水的参与，更接近于“火制”^[30]。

为了进一步验证康定乌头砂炒炮制品中印乌碱

的含量变化,以及康定乌头药材砂炒品是否有印乌碱的砂炒产物 *mithaconitine* 存在。本实验采用 HPLC 法测定康定乌头生品及砂炒品中印乌碱的含量,发现砂炒品中印乌碱质量分数由 848.33 $\mu\text{g/g}$ 降为 72.83 $\mu\text{g/g}$ 。观察康定乌头砂炒品色谱图,发现图中出现了与 *mithaconitine* 保留时间相一致的色谱峰。表明在砂炒炮制过程中,康定乌头中的印乌碱的确转化为 *mithaconitine*,这一结果与印乌碱在油浴模拟砂炒过程中的转化途径相一致。由于康定乌头生品中主要含有印乌碱和滇乌碱,二者的结构非常相似,利用普通的 C_{18} 柱无法实现 2 种成分的基线分离,因此本实验选择苯基柱^[31]对印乌碱进行含量测定。

由于乌头类药材的毒性,主要表现为心脏毒性和神经毒性,如心律失常、呼吸抑制等^[32]。那么,印乌碱转化为 *mithaconitine*,是否达到了炮制减毒的目的?因此,本实验采用心脏毒性实验对印乌碱及其砂炒产物 *mithaconitine* 的毒性进行了研究。结果表明,0.06 mg/kg 的印乌碱,可使正常大鼠的 II 导联 ECG 出现 VPB、VT 等心律失常现象,甚至有 20% 大鼠因为严重的心律失常而死亡;在相同剂量下, *mithaconitine* 组大鼠未出现上述心律失常现象。

综上所述,本实验采用油浴模拟砂炒的方法,筛选出印乌碱发生结构转化的温度和时间参数,为康定乌头等乌头类药材炒制工艺的规范化和量化提供了依据。印乌碱砂炒产物 *mithaconitine* 的分离、鉴定及毒性研究,从化学结构和毒性 2 个层次初步阐明了康定乌头砂炒炮制的减毒原理。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] 王锋鹏. 乌头属和翠雀属植物中生物碱化学研究概况 [J]. 药学学报, 1981, 16(12): 943-959.
- [3] 肖培根, 王锋鹏, 高峰, 等. 中国乌头属植物药用亲缘学研究 [J]. 植物分类学报, 2006, 44(1): 1-46.
- [4] 傅立国. 中国高等植物 (第三卷) [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 杨丽华, 林丽美, 王智民, 等. 乌头属藏药化学成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 363-376.
- [7] 杨茗, 万丽, 陈斌, 等. 川乌氯仿部位的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 223-226.
- [8] 付玲, 戴丽莉, 赵翡翠, 等. 新疆准噶尔乌头中乌头碱及脱氧乌头碱水解机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5794-5802.
- [9] 艾嫦, 朱妍妍, 赵长琦. 乌头属植物化学成分、药理作用及其内生菌的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(2): 248-259.
- [10] 刘帅, 李妍, 李卫飞, 等. 乌头类中药毒性及现代毒理学研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4095-4102.
- [11] 贾雪岩, 林华, 沈玉巧, 等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
- [12] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [13] 王毓杰, 曾陈娟, 姚喆, 等. 铁棒锤及其炮制品中二萜生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 347-351.
- [14] 王毓杰, 张静, 田会萍, 等. 民族药铁棒锤炮制减毒原理初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 588-592.
- [15] 王毓杰, 张静, 曾陈娟, 等. 铁棒锤砂炒炮制品中二萜生物碱化学成分的研究 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(1): 11-13.
- [16] Wang Y J, Zhang J, Zeng C J, et al. Three new C_{19} -diterpenoid alkaloids from *Aconitum pendulum* [J]. *Phytochem Lett*, 2011, 4(2): 166-169.
- [17] 王毓杰, 康云雪, 孙海霞. 一种模拟炒制类药材炮制工艺的方法: 中国, CN107115388 A [P]. 2017-09-01.
- [18] 吕光华, 李正邦, 袁玲, 等. 康定乌头根的化学成分研究 [J]. 中草药, 1999, 30(3): 164-167.
- [19] Pelletier S W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives Volume Two* [M]. New York: A Wiley Interscience Publication, 1984.
- [20] Pelletier S W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives 7* [M]. New York: Springer Verlag GmbH, 1991.
- [21] Gao F, Chen D L, Wang F P. Two new C_{19} -diterpenoid alkaloids from *Aconitum hemisleyanum* var. *circinacum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(1): 117-118.
- [22] William P S, Naresh V M, Rajinder S S, et al. Application of carbon-13 NMR spectroscopy to the structural elucidation of C_{19} -diterpenoid alkaloids from *Aconitum* and *Delphinium* species [J]. *Heterocycles*, 1977, 7(1): 327-339.
- [23] Yue J M, Xu J, Chen Y Z, et al. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum talassicum* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(5): 1467-1470.
- [24] Hazari M S, Haykal-Coates N, Winsett D W, et al. A single exposure to particulate or gaseous air pollution increases the risk of aconitine-induced cardiac arrhythmia in hypertensive rats [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112(2): 532-542.

- [25] Yue H, Pi Z, Song F, *et al.* Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSⁿ [J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1800-1807.
- [26] 姜 婷, 张 江, 木卡代斯·斯依提, 等. 基于中药模拟炮制的乌头属植物水解机制及液质联用测定方法的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3543-3550.
- [27] Khetwal K S. Constituents of high altitude Himalayan herbs. Part 20. A C-19 diterpenoid alkaloid from *Aconitum balfourii* [J]. *ChemInform*, 2007, 38(50): 1364-1366.
- [28] Pelletier S W, Mody N V, Venkov A P, *et al.* Alkaloids of *Delphinium virescens* Nutt.: Virescenine and 14-acetylvirescenine [J]. *Heterocycles*, 1979, 12(6): 779-786.
- [29] Liu S, Li F, Li Y, *et al.* A review of traditional and current methods used to potentially reduce toxicity of *Aconitum* roots in traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 207: 237-250.
- [30] 钟凌云, 龚千锋, 杨 明, 等. 传统炮制技术流派特点及发展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3405-3408.
- [31] 邵琳智, 柏 骥, 刘文英. 西嗪伪麻缓释片中伪麻黄碱在人体内的立体选择性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(13): 1017-1019.
- [32] Ishimi K, Makino M, Asada Y, *et al.* Norditerpenoid alkaloids from *Aconitum manshuricum* [J]. *J Nat Med*, 2006, 60(3): 255-257.