

基于模拟炮制研究滇乌碱砂炒转化途径及其前后毒效变化

刘丛改, 陶 培, 郑清洋, 陈佳佳, 周园园, 陈 蓉, 王毓杰*

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要:目的 研究滇乌碱在砂炒过程中的结构转化途径, 比较滇乌碱与转化产物的急性毒性和转化产物的抗心律失常活性。方法 采用 HPLC 法筛选出滇乌碱发生结构转化的温度和时间参数, 通过柱色谱法和核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、质谱 (mass spectrometry, MS) 技术, 分离鉴定出滇乌碱的砂炒转化产物; 采用急性毒性实验比较原型成分和转化产物的毒性强弱; 采用乌头碱建立大鼠心律失常模型, 明确转化产物的抗心律失常作用。结果 通过比较不同炮制温度、时间样品的 HPLC 色谱图, 筛选出滇乌碱在 140~180 °C, 加热 5~30 min 时发生结构转化; 分离、鉴定出滇乌碱的砂炒产物 pyroyunaconitine; 急性毒性实验结果表明, 滇乌碱的半数致死量 (lethal dose 50%, LD₅₀) 为 0.353 mg/kg, pyroyunaconitine 的 LD₅₀ 为 62.563 mg/kg, 炮制后毒性明显降低。抗心律失常实验结果显示, 随着炮制产物 pyroyunaconitine 剂量的增大, 大鼠的室性早搏 (ventricular premature beat, VPB) 潜伏期延长, 室性心动过速 (ventricular tachycardia, VT) 发生率降低, 心律失常完全抑制率逐渐升高, 呈剂量相关性, 表明其具有一定的抗心律失常作用。结论 砂炒过程中, 滇乌碱的 C-8 位脱去乙酰基, 生成 8-去乙酰滇乌碱; 接着, 8-去乙酰滇乌碱的 C-8 位和 C-15 位之间脱水形成双键, 生成 pyroyunaconitine; pyroyunaconitine 的毒性远低于原型成分滇乌碱, 并具有一定的抗心律失常活性。

关键词: 乌头属; 炮制; 滇乌碱; 砂炒; pyroyunaconitine; 心律失常; 急性毒性; HPLC; 半数致死量

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)20-6671-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.011

Transformation pathway of yunaconitine and toxic-efficacy changes before and after stir-frying based on simulation processing technology

LIU Cong-gai, TAO Pei, ZHENG Qing-yang, CHEN Jia-jia, ZHOU Yuan-yuan, CHEN Rong, WANG Yu-jie

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the structural transformation pathway of yunaconitine during the stir-frying process with sand, and compare the acute toxicity and antiarrhythmic activity of yunaconitine with its processing products. **Methods** Using HPLC to screen out the temperature and time parameters of the structural transformation of yunaconitine; The processing products of yunaconitine were separated and identified using column chromatography, nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS); The acute toxicity test was performed to compare the toxicity of yunaconitine with its processing products; The aconitine-induced arrhythmia model was used to clarify the activity of the processing products. **Results** Yunaconitine was converted into pyroyunaconitine when it was heated at 140—180 °C for 5—30 min. The acute toxicity test results showed that the lethal dose 50% (LD₅₀) of yunaconitine and pyroyunaconitine were 0.353 mg/kg and 62.563 mg/kg, respectively. The toxicity of yunaconitine was significantly reduced after processing. In the antiarrhythmic assay, the pyroyunaconitine could delay the onset time of ventricular premature beat (VPB), reduce the incidence of ventricular tachycardia (VT) and increase arrhythmia inhibition rate with increasing dose. The result indicated that pyroyunaconitine dose-dependently exhibited antiarrhythmic activities. **Conclusion** The structural transformation pathway of yunaconitine has been defined: The acetoxyl group at C-8 of yunaconitine was firstly hydrolyzed to a hydroxyl group, and then a double bond was subsequently introduced at C-8/C-15 via further dehydration, resulting in the formation of pyroyunaconitine. Compared with yunaconitine, the toxicity of pyroyunaconitine was reduced. And it possesses

收稿日期: 2023-05-19

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YJ0131); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (QJRC2022046)

作者简介: 刘丛改 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 15649367318 E-mail: 1160743059@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炮制原理。

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

specific antiarrhythmic properties.

Key words: *Aconitum* L.; processing; yunaconitine; stir-frying with sand; pyroyunaconitine; arrhythmia; acute toxicity; HPLC; lethal dose 50%

毛茛科 (Ranunculaceae) 乌头属 *Aconitum* L. 植物在全世界有 300 余种, 广泛分布于北半球温带地区。我国分布有 200 余种, 其中 76 种可供药用^[1-2]; 常用品种有乌头 *A. carmichaelii* Debx.、北乌头 *A. kusnezoffii* Reichb.、短柄乌头 *A. brachypodum* Diels. 和甘青乌头 *A. tanguticum* (Maxim) Stapf 等。该属植物中的主要成分为二萜生物碱, 具有显著的生理活性, 已开发出氢溴酸高乌甲素片、乙酰乌头碱片、草乌甲素片等镇痛类药物, 用于缓解风湿痛、手术后疼痛等多种类型的疼痛^[3]。

二萜生物碱也是乌头类药物的主要毒性成分, 可引起严重的心律失常及呼吸中枢抑制, 例如, 乌头碱可与心肌细胞、神经细胞膜上的钠通道结合, 使钠通道持续开放, 钠离子内流增加, 进而引起细胞膜电位失衡, 导致心律失常、呼吸抑制等症状^[4-5]。因此, 为了确保用药的安全性, 乌头类药物需要经过炮制, 才能用于临床。常用的炮制方法包括: 蒸法、煮法和砂炒法。前 2 种制法的炮制原理是: 乌头碱型有毒生物碱的 C-8 位、C-14 位酯键在炮制过程中依次发生水解, 生成毒性较低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、乌头原碱^[6]。课题组研究证实, 相对于蒸法和煮法, 砂炒法能够在更短的炮制时间内实现减毒目的, 并且炮制原理与蒸法、煮法有明显区别, 毒性生物碱的结构转化途径更为丰富^[7-10]。

滇乌碱 (yunaconitine) 是短柄乌头、康定乌头 *A. tatsienense* Finet & Gagnep. 中的主要二萜生物碱, 其结构与印乌碱、草乌甲素相似, 区别在于 C-3 位、C-4' 位的取代基不同。滇乌碱的 C-4' 位为甲氧基, 印乌碱的 C-4' 位为氢原子; 滇乌碱的 C-3 位为羟基, 草乌甲素的 C-3 位为氢原子。这些结构差异对滇乌碱在砂炒过程中的结构转化过程及砂炒产物的毒性、活性会带来哪些影响, 尚不清楚。

本实验以滇乌碱为例, 以油浴的方式模拟砂炒炮制; 采用色谱和波谱法对炮制产物进行分离鉴定, 并通过药材砂炒品进行验证; 采用急性毒性实验比较滇乌碱及炮制产物的毒性大小; 采用乌头碱建立心律失常模型, 明确炮制产物的抗心律失常活性, 阐明砂炒过程中滇乌碱的结构转化途径及转化产物的毒性和抗心律失常活性, 为乌头类药物的炮制原

理研究及抗心律失常的药物研发提供思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BL-420F 型多功能生理记录仪, 成都泰盟软件有限公司; 岛津 LC-2010A 型高效液相色谱仪, Lab Solutions 色谱工作站, 日本岛津公司; ULUP-I-10T 型优普超纯水机, 成都超纯科技有限公司; CPA2250 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; HH-SJ 型集热式磁力搅拌器, 油浴用, 金坛市城东新瑞仪器厂; MicrO-TOF-Q-II 型质谱仪、Avance 600 型核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; 5 型多功能炒货机, 常州市金坛迈斯机械有限公司。

1.2 药品与试剂

滇乌碱 (质量分数 $\geq 98.0\%$, 本课题组从短柄乌头中分离得到)、pyroyunaconitine (质量分数 $\geq 95.0\%$, 本课题组从滇乌碱砂炒炮制品中分离得到), 通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和高分辨电喷雾电离质谱 (high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, HR-ESI-MS) 确定结构; 乌头碱, 批号 WTZ10013, 质量分数 99.0% , 陕西昊辰生物科技有限公司; 8-去乙酰滇乌碱, 批号 DST230131-369, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 成都德思特生物技术有限公司; 盐酸普罗帕酮 (批号 101190-201702, 质量分数 99.8%)、盐酸利多卡因 (批号 100341-202104, 质量分数 93.1%), 中国食品药品检定研究院; 乌拉坦, 批号 2017090501, 成都市科龙化工试剂厂; 柱色谱硅胶, 200~300 目, 青岛海洋化工厂; 生理盐水, 批号 L122091801, 四川科伦药业股份有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯; 柱色谱所用石油醚沸点 $60\sim 90\text{ }^\circ\text{C}$; 显色剂为碘蒸气。

短柄乌头由西藏林芝市藏医院提供, 植物标本经成都中医药大学王毓杰副研究员鉴定, 为短柄乌头 *A. brachypodum* Diels., 凭证标本存放于成都中医药大学民族医药学院标本室。

1.3 动物

SPF 级健康成年 SD 大鼠, 雌雄兼用, 7~8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g; SPF 级昆明小鼠, 雌雄兼用, 7~8 周龄, 体质量 (18 ± 2) g; 均由北京斯贝福生物有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (京)

2019-0010。实验前进行适应性喂养 2 d, 自由饮水及进食, 室温维持在 20~25 ℃, 昼夜光照及通风环境自然调节, 实验前禁食 12 h。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准, 伦理备案号为 2020-15。

2 方法与结果

2.1 滇乌碱的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Supersil ODS-B 柱(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), 梯度洗脱: 0~30 min, 35%乙腈; 30~70 min, 35%~45%乙腈; 70~90 min, 45%乙腈; 柱温 35 ℃; 检测波长 260 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取滇乌碱约 100 mg, 精密称定, 至 250 mL 量瓶, 加二氯甲烷制成质量浓度为 400.16 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%盐酸甲醇溶液定容, 制得质量浓度为 160.06 μg/mL 的对照品溶液, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得对照品溶液。

2.1.3 炮制品供试溶液的制备 取圆底烧瓶 24 个, 分为 120、140、160、180 ℃ 4 个温度组, 每个温度下设置 6 个炮制时间点(1、5、10、20、30、40 min)。分别精密加入“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%盐酸甲醇溶液 4 mL 溶解, 溶液转移至 10 mL 量瓶中, 圆底烧瓶再加 0.1%盐酸甲醇溶液洗 2 次, 每次 2 mL, 洗液转移至同一 10 mL 量瓶中, 加 0.1%盐酸甲醇溶液定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得炮制品供试溶液。

2.1.4 线性关系考察 将准确称量的滇乌碱溶解在 0.1%盐酸甲醇溶液中, 制备线性储备液, 质量浓度达到 2 mg/mL。在每个 10 mL 量瓶中分别精密加入储备液 0.025、0.100、0.200、0.400、0.800、1.000、2.000 mL, 加 0.1%盐酸甲醇溶液定容至刻度, 以制备最终质量浓度为 5、20、40、80、160、200、400 μg/mL 的对照品溶液。将上述对照品溶液进样 10 μL, 按照“2.1.1”项下色谱条件, 测定峰面积, 并以进样质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 构建标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=119\ 56 X+184\ 57$, $r=0.999\ 7$, 结果表明, 滇乌碱在 5~400 μg/mL 线性关系良好。

根据 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)所对应的滇乌碱质量浓度, 确定该方法的检测限为 0.26 μg/mL, 定量限为 0.75 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一质量浓度为 160.06 μg/mL 的滇乌碱对照品溶液, 进样量 10 μL, 连续进样 6 次, 测定滇乌碱的峰面积, 计算其 RSD 值为 0.45%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取圆底烧瓶 5 个, 分别加入“2.1.2”项下反应储备液 4 mL, 挥干溶剂后, 于 160 ℃下炮制 10 min, 反应结束后, 放冷, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件分别进行测定, 进样量 10 μL, 测定滇乌碱的峰面积, 计算其质量分数的 RSD 值为 2.59%, 表明该方法的重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(160 ℃下炮制 10 min)于 0、2、4、6、8、10、12 h, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 进样量 10 μL, 测定滇乌碱的峰面积, 计算其 RSD 值为 2.35%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.8 滇乌碱炮制前后含量测定 分别吸取“2.1.2”项下滇乌碱对照品溶液和“2.1.3”项下不同炮制温度、不同炮制时间的供试品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行含量测定。从表 1 中可以看出炮制温度越高, 时间越久, 滇乌碱的含量变化越明显。例如, 在 160 ℃炮制 5 min 后含量降为 106.79 μg/mL, 160 ℃炮制 30 min 后含量降为 14.79 μg/mL; 180 ℃炮制 5 min 后含量降为 7.78 μg/mL。

2.2 滇乌碱炮制转化参数筛选

分别吸取滇乌碱对照品溶液及不同炮制品供试溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 得到不同温度、不同

表 1 不同炮制品中滇乌碱含量

Table 1 Content of yunaconitine at different processing temperature and time

炮制时间/ min	滇乌碱/(μg·mL ⁻¹)			
	120 ℃	140 ℃	160 ℃	180 ℃
0	160.06	160.06	160.06	160.06
1	157.50	156.57	158.55	151.70
5	156.57	152.02	106.79	7.78
10	155.81	149.78	62.09	2.89
20	153.27	125.21	27.72	0.00
30	151.85	105.33	14.79	0.00
40	148.73	99.26	4.86	0.00

时间条件下的色谱图,能够直观反映出滇乌碱及其炮制产物的含量变化过程,结果见图 1、2。可知,炮制前的滇乌碱含量为 $160.06 \mu\text{g/mL}$,在不同温度下,随着炮制时间的延长,滇乌碱的含量逐渐降低,并有新的色谱峰出现。温度越高,时间越久,滇乌碱及炮制产物的含量变化越明显。同时,从图 1 可以看出,滇乌碱在 $140\sim 180^\circ\text{C}$,炮制 $5\sim 40 \text{ min}$ 后,

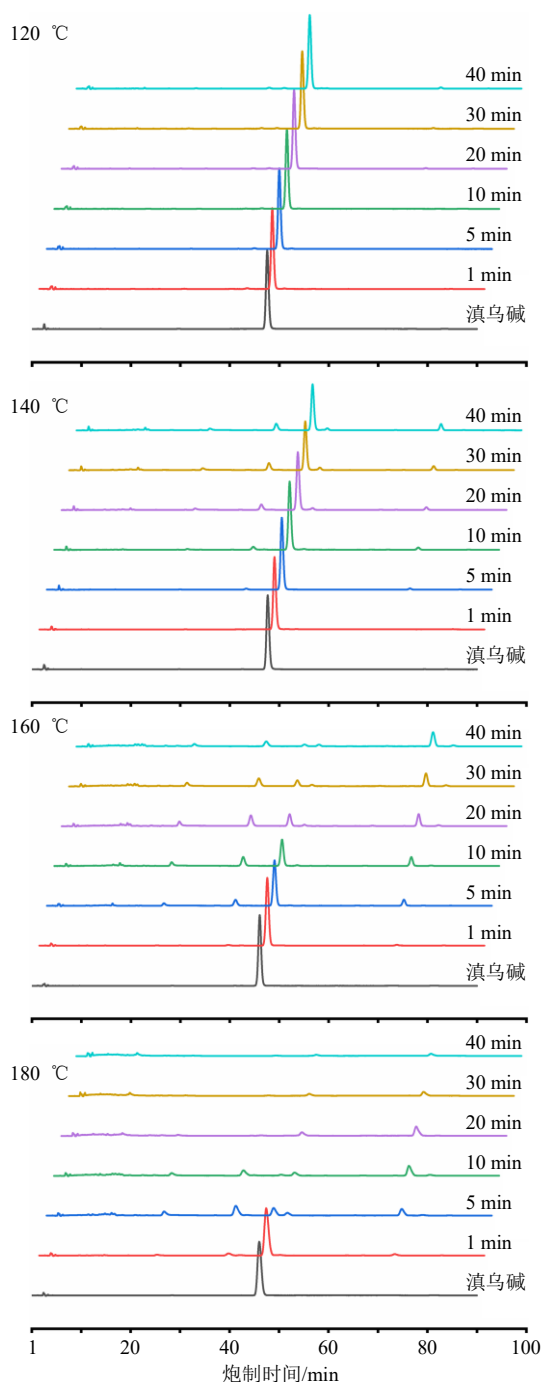


图 1 滇乌碱在不同炮制温度和时间条件下的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of yunaconitine at different processing temperature and time

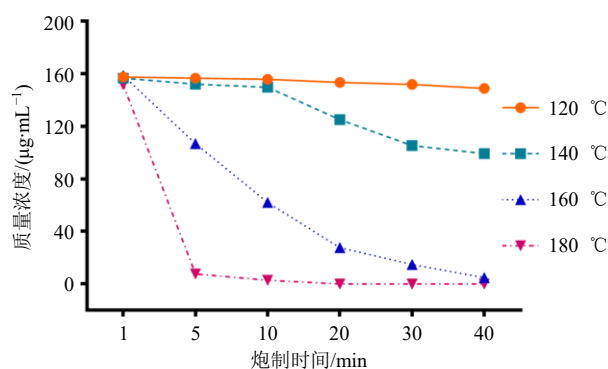


图 2 滇乌碱在不同温度、时间条件下含量变化趋势

Fig. 2 Content variation trend chart of yunaconitine at different temperature and time

在保留时间 24、38、72 min 处有较明显的新色谱峰出现,提示在上述炮制温度和炮制时间条件下,滇乌碱有 3 个炮制产物。在 160°C 炮制 30 min 时,炮制产物的数量较多,含量较高,因此,本实验选择在该温度、时间条件下对滇乌碱的砂炒转化产物进行分离制备。

2.3 滇乌碱砂炒转化产物的分离及结构鉴定

2.3.1 柱色谱样品的制备 取滇乌碱 1.49 g,置 250 mL 圆底烧瓶中,加适量二氯甲烷溶解,用旋转薄膜蒸发器蒸干溶剂,使滇乌碱均匀地附着在圆底烧瓶内壁,将圆底烧瓶置于 160°C 下油浴 30 min,取出,放凉,反应物加二氯甲烷溶解后,转移至蒸发皿中,挥干溶剂,得到滇乌碱炮制产物 (1.35 g),供上柱用。

2.3.2 分离纯化 将滇乌碱炮制产物进行硅胶柱色谱 (200~300 目, 130 g),分别用石油醚-丙酮-三乙胺 10:1:0.01 (2.2 L)、8:1:0.01 (2.7 L)、6:1:0.01 (4.2 L)、4:1:0.01 (3 L)、2:1:0.01 (2.1 L)、1:1:0.01 (3 L) 梯度洗脱,薄层板检视,合并相近流分后,得到 A~C 3 个组分。组分 A (0.5 g) 进一步采用硅胶柱色谱 (200~300 目, 130 g) 分离纯化,洗脱剂为石油醚-丙酮-三乙胺 (6:1:0.01),得到砂炒产物 **1** (200 mg)。

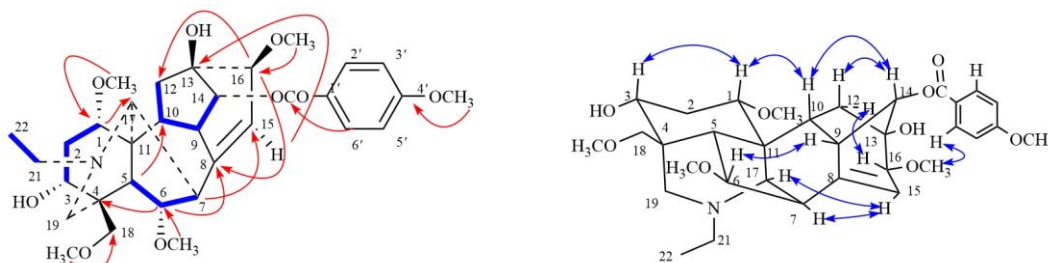
2.3.3 滇乌碱砂炒产物的结构鉴定 砂炒产物 **1**: 白色粉末, $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_9$ 。HR-ESI-MS m/z : 600.316 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 600.316 7),从 NMR 谱 (表 2) 中可以看出,砂炒产物 **1** 属于乌头碱型二萜生物碱^[11],具有 1 个 $-N\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ (δ_{H} 1.07, 3H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$; δ_{H} 2.56, 2.64, 各 1H, m; δ_{C} 13.5 q, 49.9 t), 4 个甲氧基 (δ_{H} 3.22, 3.27, 3.37, 3.29, 各 3H, s; δ_{C} 56.4 q, 58.1 q, 57.2 q, 59.2 q), 以及 1 个对甲氧苯甲酰基 (δ_{H} 7.98,

表 2 砂炒产物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, CDCl_3)
Table 2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data for compound 1 (600/150 MHz, CDCl_3)

碳位	δ_{H}	δ_{C} , type	HMBC	NOESY	^1H - ^1H COSY
1	3.06 (m)	83.1, CH	C-10, C-17, 1-OCH ₃	H-3, H-10, 1-OCH ₃	H-2 α , β
2 α	2.19 (m)	33.3, CH ₂	C-3, C-4, C-11	—	H-1, H-2 β , H-3
2 β	2.17 (m)	33.3, CH ₂	C-3, C-4, C-11	—	H-1, H-2 α , H-3
3	3.64 (dd, J = 12.6, 4.8 Hz)	71.9, CH	C-4	H-1, H-5	H-2 α , β
4	—	43.9, C	—	—	—
5	2.07 (d, J = 6.6 Hz)	49.6, CH	C-10, C-19	H-3, H-18 α , β	H-6
6	4.24 (d, J = 6.6 Hz)	83.6, CH	C-4, C-8, C-17, 6-OCH ₃	H-9, 6-OCH ₃	H-5, H-7
7	3.02 (s)	48.1, CH	C-6, C-8, C-9, C-11, C-15, C-17	H-15	H-6, H-17
8	—	146.5, C	—	—	—
9	3.03 (m)	46.4, CH	C-11, C-12, C-13, C-15	H-6	H-10, H-14
10	2.16 (m)	48.1, CH	C-8, C-11	H-1, H-14	H-9, H-12 α , β
11	—	51.6, C	—	—	—
12 α	2.23 (m)	38.1, CH ₂	C-11, C-16	H-16	H-10, H-12 β
12 β	1.95 (m)	38.1, CH ₂	C-9, C-13, C-16	H-14	H-10, H-12 α
13	—	77.6, C	—	—	—
14	4.90 (d, J = 3.0 Hz)	78.2, CH	C-8, C-16	H-10, H-12 β	H-9
15	5.54 (d, J = 6.0 Hz)	116.3, CH	C-7, C-9, C-13, C-16	H-7, H-17	H-16
16	3.43 (d, J = 6.0 Hz)	83.5, CH	C-7, C-8, C-12, C-15, 16-OCH ₃	H-12 α	H-15
17	2.96 (s)	77.9, CH	C-1	H-15, H-21, H-22	—
18 α	3.67 (d, J = 9.0 Hz)	76.6, CH ₂	C-3, C-4, C-5, C-19, 18-OCH ₃	H-5, H-19 α , β , 18-OCH ₃	H-18 β
18 β	3.77 (d, J = 9.0 Hz)	76.6, CH ₂	C-3, C-4, C-5, C-19, 18-OCH ₃	H-5, H-19 α , 18-OCH ₃	H-18 α
19 α	2.47 (d, J = 10.8 Hz)	47.7, CH ₂	—	H-18 α , β	H-19 β
19 β	2.89 (d, J = 10.8 Hz)	47.7, CH ₂	—	H-18 α	H-19 α
21 α	2.56 (m)	49.9, CH ₂	—	H-17	H-22
21 β	2.64 (m)	49.9, CH ₂	—	H-17	H-22
22	1.07 (t, J = 7.2 Hz)	13.5, CH ₃	C-21	H-17	H-21 α , β
1-OCH ₃	3.22 (s)	56.4, CH ₃	C-1	H-1	—
6-OCH ₃	3.27 (s)	58.1, CH ₃	C-6	H-6	—
16-OCH ₃	3.37 (s)	57.2, CH ₃	C-16	H-16, H-2', 6'	—
18-OCH ₃	3.29 (s)	59.2, CH ₃	C-18	H-18 α , β	—
ArC=O	—	167.8, C	—	—	—
1'	—	122.8, C	—	—	—
2', 6'	7.98 (d, J = 8.4 Hz)	132.0, CH	C-4', ArC=O	16-OCH ₃	H-3', 5'
3', 5'	6.88 (d, J = 8.4 Hz)	113.5, CH	C-1', C-4'	4'-OCH ₃	H-2', 6'
4'	—	163.3, C	—	—	—
4'-OCH ₃	3.82 (s)	55.4, CH ₃	C-4'	H-3', 5'	—

2H, d, J = 8.4 Hz; 3.82, 3H, s; 6.88, 2H, d, J = 8.4 Hz; δ_{C} 167.8 s, 122.8 s, 132.0 d (2C), 113.5 d (2C), 163.3 s, 55.4 q; δ_{H} 4.90 (1H, d, J = 3.0 Hz) 归属于 H-14 β , 表明对甲氧苯甲酰基连接于 C-14 位^[12-13]; HMBC 远

程相关谱表明: 1-OCH₃ (δ_{H} 3.22, s), 6-OCH₃ (δ_{H} 3.27, s), 16-OCH₃ (δ_{H} 3.37, s) 18-OCH₃ (δ_{H} 3.29, s) 分别与 C-1 (δ_{C} 83.1, d), C-6 (δ_{C} 83.6, d), C-16 (δ_{C} 83.5, d), C-18 (δ_{C} 76.6, t) 相连 (图 3); 从 ^{13}C -NMR

图 3 砂炒产物 1 的 ^1H - ^1H COSY (→), HMBC (H→C) 和 NOESY (↔) 相关谱Fig. 3 Key ^1H - ^1H COSY (→), HMBC (H→C), and NOESY (↔) correlations of compound 1

谱中可以看出砂炒产物 1 具有 9 个含氧碳信号, 因此, 除了对甲氧苯甲酰基和 4 个甲氧基外, 该化合物还具 2 个羟基, HMBC 谱也表明 C-3 (δ_{C} 71.9, d) 与 H-2 (δ_{H} 2.17, 2.19), H-18 (δ_{H} 3.67, 3.77) 相关, C-13 (δ_{C} 77.6, s) 与 H-9 (δ_{H} 3.03), H-12 β (δ_{H} 1.95), H-15 (δ_{H} 5.54) 相关。因此, 这 2 个羟基分别位于 C-3 位和 C-13 位 (表 2)。

砂炒产物 1 与滇乌碱的 NMR 图谱相似, 区别在于: (1) 滇乌碱的 C-8 位有 1 个乙酰氧基, 而该化合物在 C-8 位没有乙酰氧基; (2) ^{13}C -NMR 中, 滇乌碱的 C-8、C-15 的化学位移分别为 85.5 和 39.6^[14], 而砂炒产物 1 的 C-8、C-15 的化学位移分别向低场迁移到 146.5 和 116.3。因此, ^1H -NMR 中, δ_{H} 5.54 (1H, d, J = 6.0 Hz) 归属为 H-15, 表明 C-8 和 C-15 之间形成了双键^[15-17]。根据 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 及 2D-NMR (HMBC、 ^1H - ^1H COSY、NOESY) 数据 (表 2), 可以确定砂炒产物 1 的结构为 *N*-乙基-8,15-双去氢-14 α -[(4'-甲氧基)苯甲酰氧基]-1 α ,6 α ,16 β ,18-四甲氧基-乌头烷-3 α ,13 β -二醇, 即 pyroyunaconitine。

2.4 短柄乌头药材砂炒品验证实验

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Supersil ODS-B 柱 (250 mm $\times$ 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), 梯度洗脱: 0~40 min, 25%乙腈; 40~80 min, 25%~40%乙腈; 80~100 min, 40%~60%乙腈; 100~120 min, 60%~80%乙腈; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 260 nm。

2.4.2 对照品溶液的制备 取砂炒产物 1 约 20 mg, 精密称定, 至 100 mL 量瓶中, 加 0.1% 盐酸甲醇溶液溶解, 定容, 制得质量浓度为 207 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得砂炒产物 1 对照品溶液。

取滇乌碱约 20 mg, 精密称定, 至 100 mL 量瓶

中, 加 0.1% 盐酸甲醇溶液溶解, 定容, 制得质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得滇乌碱对照品溶液。

取 8-去乙酰滇乌碱约 5 mg, 精密称定, 至 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 盐酸甲醇溶液溶解, 定容, 制得质量浓度为 520 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得 8-去乙酰滇乌碱对照品溶液。

2.4.3 砂炒炮制品的制备 将短柄乌头药材除去杂质、低温烘干后切制成长度为 1~2 cm 的段, 以适量干净的河沙 (粒度为 10~24 目, 河沙用量以能够完全淹没药材为度), 在滚筒式炒药机中加热至 160 $^{\circ}\text{C}$ 后, 投入切制好的药材, 炒制 10 min, 转速为 15 r/min。

2.4.4 供试品溶液的制备 取短柄乌头生品和砂炒品粉末 (过 7 号筛) 各 2 g, 精密称定, 加氨试液 2 mL 和乙醚 60 mL, 混匀, 放置过夜, 滤过, 药渣加乙醚 40 mL, 振摇 1 h, 滤过, 药渣再加乙醚洗 3 次, 每次 20 mL, 滤过, 合并滤液和洗液, 低温蒸干, 残渣加三氯甲烷 2 mL 溶解, 转入分液漏斗, 用三氯甲烷 3 mL 洗容器, 洗液并入分液漏斗中, 用 0.05 mol/L H_2SO_4 提取 3 次, 每次 5 mL, 合并酸液, 酸液用三氯甲烷 10 mL 洗涤后, 加氨试液调 pH 至 9 左右, 再用三氯甲烷提 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 三氯甲烷液用水 20 mL 振摇洗涤后, 低温蒸干, 残渣加 0.1% 盐酸甲醇溶液溶解, 定容至 5 mL 量瓶中, 作为短柄乌头药材生品和砂炒品供试溶液, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液^[18]。

2.4.5 短柄乌头生品和砂炒品中滇乌碱及炮制产物的测定 分别吸取 “2.4.2” 项下滇乌碱、砂炒产物 1 和 8-去乙酰滇乌碱对照品溶液 10 μL 和 “2.4.4” 项下短柄乌头生品和砂炒品供试溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按照 “2.4.1” 项下色谱条件进行

检测。

2.4.6 短柄乌头药材砂炒品验证结果 滇乌碱在生品中的质量分数为 349.12 $\mu\text{g/g}$ ，在炮制品中下降至 5.00 $\mu\text{g/g}$ 。8-去乙酰滇乌碱在生品中的质量分数为 125.01 $\mu\text{g/g}$ ，在炮制品中上升至 196.49 $\mu\text{g/g}$ ，炮制品中还出现了 pyroyunaconitine 的色谱峰，质量分数为 38.60 $\mu\text{g/g}$ 。结果表明在砂炒过程中，滇乌碱依次转化为 8-去乙酰滇乌碱和 pyroyunaconitine，结果见图 4。

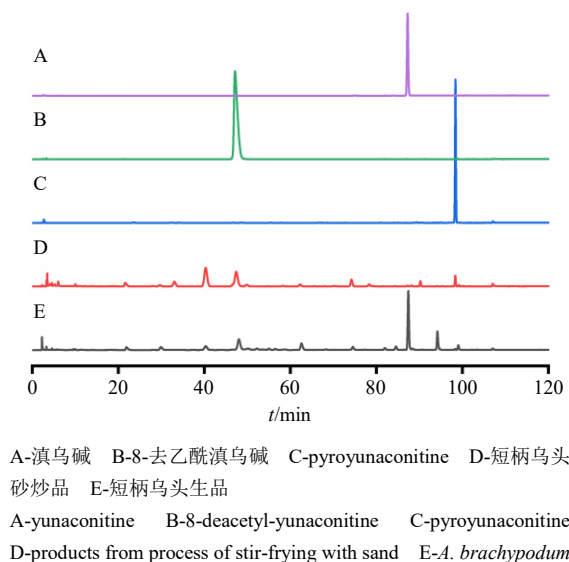


图 4 短柄乌头生品及砂炒品 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of *A. brachypodum* and products from process of stir-frying with sand

2.5 滇乌碱及其砂炒产物的毒性比较

2.5.1 实验药物的配制

(1) 空白溶剂的配制方法：取 1% 盐酸乙醇溶液 4 mL，加生理盐水稀释，用 5% NaOH 调 pH 值至 7 左右，加生理盐水定容至 100 mL。

(2) 滇乌碱及砂炒产物 1：取滇乌碱及砂炒产物 1 适量，加适量 1% 盐酸乙醇溶液溶解，生理盐水稀释，用 5% NaOH 调 pH 值至 7 左右，加生理盐水配制成不同质量浓度，充分混匀，备用。

2.5.2 急性毒性实验 按预实验结果选用 SPF 级昆明小鼠 300 只，雌雄各半，按体质量分层后随机分为 30 组。每个受试化合物分别设置 5~8 个剂量组（组间距 $r=0.8\sim0.9$ ），同时设置溶剂对照组。每只小鼠均按照 0.015 mL/g 尾静脉给药 1 次，分别观察给药后 14 d 内出现的中毒症状，死亡情况及死亡时间，对观察期满或中毒死亡的小鼠进行解剖，肉眼观察主要脏器的改变。

按 Bliss 方法计算动物的半数致死量（lethal dose 50%， LD_{50} ）及其 95% 的可信限。

2.5.3 滇乌碱及砂炒转化产物的毒性比较结果 课题组前期已完成印乌碱及其转化产物的心脏毒性研究，为了明确滇乌碱的 C-4' 甲氧基对急性毒性带来的影响，除了滇乌碱和 pyroyunaconitine 之外，本实验增加了印乌碱及其砂炒产物 mithaconitine 和 $\Delta^{15(16)}$ -16-demethoxyindaconitine 的急性毒性研究。不同受试药物组小鼠在给药后大多数于 1~10 min 内死亡，所有动物均出现呃逆、舔足、流涎等症状，严重者可见跳跃、角弓反张、小便失禁。

Pyroyunaconitine 组有部分小鼠出现口鼻、四肢及尾巴变红、便血、瞳孔变白的症状，少数动物解剖后出现胃部胀气、胸腔及肺部瘀血，其余器官无肉眼可见异常。不同受试化合物的 LD_{50} 及 95% 可信限见表 3。

2.6 砂炒产物 1 的抗心律失常活性研究

取 SD 大鼠 98 只，随机分为空白溶剂组、模型对照组、阳性对照组（普罗帕酮、利多卡因）、砂炒产物 1 不同剂量组（0.4、0.6、0.8 mg/kg）7 组。空白溶剂的配制方法：取 1% 盐酸乙醇溶液 4 mL，加生理盐水稀释，用 5% NaOH 调 pH 值至 7 左右，加生理盐水定容至 100 mL。乌头碱、阳性药和受试药物均采用空白溶剂的配制方法进行配制。

SD 大鼠 ip 20% 乌拉坦（剂量 1.2 g/kg^[19]）麻醉，仰位固定，针型电极插入四肢皮下，使用 BL-420F 多功能生理记录仪观察大鼠正常 II 导联心电图 20 min 后，暴露股静脉，从股静脉分别注射相应剂量的受试药物、阳性药和等体积空白溶剂，10 min 后再从股 iv 乌头碱（0.03 mg/kg）建立心律失常模型^[20-21]，记录 30 min 内各组大鼠第 1 次出现室性早搏（ventricular premature beat, VPB）的时间（VPB 潜伏期）、是否出现心动过速以及心律失常的发生率。

实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。如果数据符合正态分布，并且方差齐者，采用单因素方差分析；如果数据符合正态分布，但方差不齐者，采用 Tamhane's T^2 检验。心动过速发生率和心律失常完全抑制率数据采用 χ^2 检验判断发生频率的显著性。

2.6.1 Pyroyunaconitine 对乌头碱诱发大鼠 VPB 潜伏期的影响 空白溶剂组大鼠在整个观察期内，心电图未见异常。模型组大鼠经股 iv 乌头碱后出现典

表 3 不同受试化合物的 LD₅₀Table 3 LD₅₀ of different test compounds

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%	LD ₅₀ /(mg·kg ⁻¹)	95%可信限/(mg·kg ⁻¹)
滇乌碱	0.443	10	10	100	0.353	0.324~0.391
	0.398	10	5	50		
	0.359	10	4	40		
	0.323	10	4	30		
	0.290	10	4	40		
	0.261	10	0	0		
印乌碱	0.672	10	10	100	0.453	0.407~0.501
	0.605	10	8	80		
	0.544	10	6	60		
	0.490	10	5	50		
	0.441	10	5	40		
	0.397	10	5	50		
	0.357	10	2	20		
	0.321	10	1	10		
pyroyunaconitine	86.420	10	10	100	62.563	56.923~67.547
	77.778	10	8	80		
	70.000	10	6	60		
	63.000	10	6	60		
	56.700	10	4	40		
	51.030	10	1	10		
mithaconitine	49.380	10	9	90	42.323	39.480~46.468
	44.440	10	6	60		
	40.000	10	2	20		
	36.000	10	2	20		
	32.400	10	1	10		
Δ ¹⁵⁽¹⁶⁾ -16-demethoxyindaconitine	16.000	10	10	100	9.013	7.982~10.028
	12.800	10	9	90		
	10.240	10	8	80		
	8.192	10	4	40		
	6.554	10	0	0		

型的室性早搏 (ventricular premature beat, VPB)、室性心动过速 (ventricular tachycardia, VT), 并有一部分动物出现室颤 (ventricular fibrillation, VF), 持续 30 min 以上, 表明心律失常模型建立成功。模型组的 VPB 潜伏期为 (105.6±28.3) s, 普罗帕酮组为 (201.7±77.0) s, 利多卡因组为 (208.5±69.6) s; 与模型组相比, 2 种阳性药均有显著性差异 ($P<0.05$)。Pyroyunaconitine 不同剂量组 (0.4、0.6、0.8 mg/kg) 的 VPB 潜伏期分别为 (187.1±93.7)、(229.5±77.8)、(419.1±166.1) s; 与模型组相比,

0.6 mg/kg 和 0.8 mg/kg 剂量组均有显著差异 ($P<0.05$); 与普罗帕酮及利多卡因组相比, 0.8 mg/kg 剂量组有显著差异 ($P<0.05$), 结果如表 4 所示。

2.6.2 Pyroyunaconitine 对乌头碱诱发大鼠 VT 发生率的影响 如果 VPB 没有得到及时治疗, 将会进一步发展为 VT, VT 的心电图特征为连续出现 3 次或 3 次以上的 VPB, QRS 波群宽大畸形, 无恒定的 P 波^[24]。VT 发生率可用于评价药物的抗心律失常作用, VT 发生率越低, 抗心律失常作用越好。

χ^2 检验结果显示, 3 个剂量组之间的 VT 发生率

表 4 Pyroyunaconitine 对乌头碱诱发大鼠 VPB 潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of pyroyunaconitine on latent period of VPB induced by aconitine in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	VPB 潜伏期/s
空白溶剂	0	10	未出现
模型	0.03	10	105.6±28.3
普罗帕酮	3.2 ^[22]	10	201.7±77.0*
利多卡因	5.0 ^[23]	10	208.5±69.6*
pyroyunaconitine	0.4	10	187.1±93.7
	0.6	13	229.5±77.8*
	0.8	19	419.1±166.1*#Δ

与模型组比较: * $P<0.05$; 与普罗帕酮组比较: # $P<0.05$; 与利多卡因组比较: Δ $P<0.05$
* $P<0.05$ vs model group; # $P<0.05$ vs propafenone group; Δ $P<0.05$ vs lidocaine group

无显著性差异 ($P>0.05$), 但从表 5 中可以看出, 随着剂量的增加, VT 发生率逐渐降低(由 0.4 mg/kg 组的 100%降为 0.8 mg/kg 组的 56.5%)。

2.6.3 Pyroyunaconitine 对大鼠心律失常完全抑制率的影响 心律失常发生率^[25-26]是指大鼠预先注射

受试药物, 再用乌头碱建立心律失常模型后, 30 min 内出现心律失常(包括 VPB、VT、VF)的比例。心律失常完全抑制率=1-心律失常发生率, 即 30 min 内未出现心律失常的比例, 可以评价受试药物能否完全拮抗乌头碱的致心律失常作用。

根据 χ^2 检验的要求, 将受试药物的 0.4 mg/kg 和 0.6 mg/kg 2 个剂量组合并为 0.4~0.6 mg/kg 剂量组。总的卡方检验结果显示, 0.4~0.6 mg/kg 组、0.8 mg/kg 组及利多卡因组的心律失常完全抑制率有差异 ($P<0.05$), 结果如表 6 所示。两两比较结果显示, 0.4~0.6 mg/kg 剂量组的心律失常完全抑制率为 4.2%, 显著低于利多卡因组 ($P<0.05$); 0.8 mg/kg 剂量组的心律失常完全抑制率为 17.4%, 与利多卡因组没有显著性差异 ($P>0.05$)。0.4~0.6 mg/kg 剂量组与 0.8 mg/kg 剂量组的心律失常完全抑制率虽然没有显著性差异 ($P>0.05$), 但随着剂量的增加, 抑制率逐渐增大, 呈现一定的量效关系。结果如表 7 所示。

3 讨论

通过 HPLC 法比较不同炮制温度、炮制时间条

表 5 Pyroyunaconitine 的 VT 发生率 χ^2 分析
Table 5 Chi-square analysis of incidence of VT of pyroyunaconitine

剂量/(mg·kg ⁻¹)	总数/只	发生心动过速/只	未发生心动过速/只	未出现心律失常/只	χ^2	P
0.4	10	10	0	0	4.401	0.111
0.6	14	11	2	1		
0.8	23	13	6	4		

表 6 Pyroyunaconitine 心律失常完全抑制率 χ^2 分析
Table 6 Chi-square analysis of arrhythmia inhibition rate of pyroyunaconitine

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	总数/只	出现心律失常/只	未出现心律失常/只	χ^2	P
pyroyunaconitine	0.4~0.6	24	23	1	7.402	0.025
	0.8	23	19	4		
利多卡因	5.0	16	10	6		

表 7 Pyroyunaconitine 对乌头碱诱发大鼠心律失常完全抑制率的影响

Table 7 Effect of pyroyunaconitine on arrhythmia inhibition rate induced by aconitine in rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心律失常完全抑制率/%
利多卡因	5.0	37.5
pyroyunaconitine	0.4~0.6	4.2*
	0.8	17.4

与利多卡因组比较: * $P<0.05$
* $P<0.05$ vs lidocaine group

件下滇乌碱的结构转化情况, 发现在 160 ℃下炮制 30 min 时炮制产物的数量较多, 含量较高。因此, 选择该温度、时间条件制备滇乌碱炮制品, 并采用柱色谱和波谱法, 分离鉴定出炮制产物 pyroyunaconitine。

验证实验证实药材砂炒品中 8-去乙酰滇乌碱的含量较生品增加, 并且出现了 pyroyunaconitine。与滇乌碱相比, pyroyunaconitine 的 C-8 位没有乙酰基, C-8 位和 C-15 位之间形成了双键; 通过结构对比, 可以推测出滇乌碱在炮制过程中的转化途径之一

为：滇乌碱的 C-8 位酯键裂解，生成 8-去乙酰滇乌碱；8-去乙酰滇乌碱的 C-8 位羟基和 C-15 位氢原子，

发生脱水反应形成双键，生成 pyroyunaconitine。反应过程如图 5 所示。

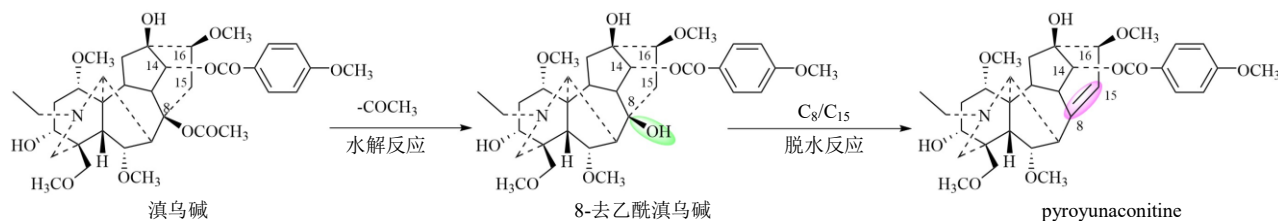


图 5 滇乌碱在砂炒过程中的转化途径

Fig. 5 Transformation pathway of yunaconitine in processes of stir-frying with sand

急性毒性实验结果显示滇乌碱的 LD_{50} 为 0.353 mg/kg, pyroyunaconitine 的 LD_{50} 为 62.563 mg/kg, 是滇乌碱的 177 倍；类似的, 印乌碱的 LD_{50} 为 0.453 mg/kg, 炮制产物 mithaconitine 和 $\Delta^{15(16)}$ -16-demethoxyindaconitine 的 LD_{50} 分别为 42.323 mg/kg 和 9.013 mg/kg, 是印乌碱的 93 倍和 20 倍。上述结果表明, 炮制产物的急性毒性均远低于原型成分, 不同结构的炮制产物相比, 具有 C-8 和 C-15 位双键的炮制产物毒性更低, 这与草乌甲素炮制产物 pyrocraassicauline A 的结果一致^[9]。

滇乌碱和印乌碱的结构差异在于 C-4' 位取代基不同, 从 LD_{50} 值可以看出, 滇乌碱的急性毒性大于印乌碱, 表明 4'-OCH₃ 能够增加该类成分的毒性。滇乌碱和草乌甲素的结构差异在于 C-3 位取代基不同, 草乌甲素的 LD_{50} 为 0.659 mg/kg^[9], 大于滇乌碱的 LD_{50} 值, 表明该类型化合物的 3-OH 能够增加毒性。再结合印乌碱的 LD_{50} 值可以进一步推测出, 3-OH 增加急性毒性的作用大于 4'-OCH₃。

抗心律失常活性实验采用乌头碱建立大鼠心律失常模型, 其机制为乌头碱激活心肌细胞膜的钠通道, 使其处于开放状态, 钠离子内流增加, 动作电位时程延长, 引起心律失常。钠通道阻断剂分为 Ia、Ib 和 Ic 类。其中, Ib 类的利多卡因和 Ic 类的普罗帕酮是临床常用的抗心律失常药物, 可以阻断乌头碱的作用, 广泛用于治疗室性早搏、室性心动过速等心律失常。因此, 本实验选择了利多卡因和普罗帕酮作为阳性药。

以 VPB 潜伏期、VT 发生率、心律失常完全抑制率作为评价受试药物抗心律失常活性的指标, VPB 潜伏期和 VT 发生率均证实 pyroyunaconitine 具有较好的抗心律失常作用。与 VPB 潜伏期和 VT 发生率相比, 心律失常完全抑制率更能直接反映出受试药物的抗心律失常作用强弱, 抑制率越高, 说

明受试药物的作用越好。阳性药利多卡因组的抑制率为 37.5%, 与 0.8 mg/kg 组的 17.4% 没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但显著高于 0.40~0.60 mg/kg 组的 4.2% ($P < 0.05$)。综合考虑上述指标的结果, 可以看出 pyroyunaconitine 的抗心律失常作用虽然弱于利多卡因, 但是在延长 VPB 潜伏期方面具有一定的优势。本实验通过比较滇乌碱及 pyroyunaconitine 的结构, 梳理出滇乌碱在砂炒过程中的结构转化途径。通过整体动物实验证实, pyroyunaconitine 的毒性远低于滇乌碱, 并有一定的抗心律失常作用。研究结果对于乌头类药物砂炒炮制原理的阐明、砂炒工艺的规范和质量标准的完善具有积极作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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 (第二十七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 113.
- [2] 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.
- [3] 高黎明, 毛学峰, 魏小梅, 等. 二萜类生物碱的药理作用及构效关系研究概况 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 1999, 35(1): 98-103.
- [4] Wang F P, Chen Q H, Liu X Y. Diterpenoid alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(4): 529-570.
- [5] Ameri A, Shi Q, Aschoff J, et al. Electrophysiological effects of aconitine in rat hippocampal slices [J]. *Neuropharmacology*, 1996, 35(1): 13-22.
- [6] 钟凌云. 中药炮制学 [M]. 第 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 322-324.
- [7] Wang Y J, Tao P, Wang Y. Attenuated structural transformation of aconitine during sand frying process and antiarrhythmic effect of its converted products [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 7243052.
- [8] Wang Y J, Wang Y, Tao P. Structural characterization, in vivo toxicity and biological activity of two new pyro-type

- diterpenoid alkaloids derived from 3-acetylaconitine [J]. *J Integr Med*, 2023, 21(3): 302-314.
- [9] Tao P, Wang Y, Wang Y J. Attenuation and structural transformation of crassicauline A during sand frying process and antiarrhythmic effects of its transformed products [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 734671.
- [10] Wang Y, Tao P, Wang Y J. Attenuated structural transformation of indaconitine during sand frying process and anti-arrhythmic effects of its transformed products [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 8606459.
- [11] Li Y Z, Qin L L, Gao F, *et al.* Kusnezosines A-C, three C₁₉-diterpenoid alkaloids with a new skeleton from *Aconitum kusnezoffii* Reichb. var. *gibbiferum* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 144: 104609.
- [12] Pelletier S W, Joshi B S. Carbon-13 and proton NMR shift assignments and physical constants of norditerpenoid alkaloids [A] // Pelletier S W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* [M]. New York: Springer, 1991: 297-564.
- [13] Gao F, Chen D L, Wang F P. Two new C₁₉-diterpenoid alkaloids from *Aconitum hemsleyanum* var. *circinacum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(1): 117-118.
- [14] 王建莉, 周先礼, 王锋鹏. 秦岭翠雀花中生物碱成分的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2003, 15(6): 498-501.
- [15] Desai H K, Hart B P, Caldwell R W, *et al.* Certain norditerpenoid alkaloids and their cardiovascular action [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(6): 743-748.
- [16] Yue J M, Xu J, Chen Y Z, *et al.* Diterpenoid alkaloids from *Aconitum talassicum* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(5): 1467-1470.
- [17] Yue J M, Chen Y Z, Li Y Z. C₁₉-diterpenoid alkaloids of *Aconitum kongboense* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2379-2380.
- [18] 王毓杰, 曾陈娟, 姚喆, 等. 民族药铁棒锤不同药用部位中生物碱含量测定 [J]. *中成药*, 2010, 32(8): 1390-1393.
- [19] Bai D L, Chen W Z, Bo Y X, *et al.* Discovery of N-(3, 5-bis(1-pyrrolidylmethyl)-4-hydroxybenzyl)-4-methoxybenzenesulfamide (sulcardine) as a novel anti-arrhythmic agent [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(9): 1176-1186.
- [20] 王艳, 陶培, 王毓杰, 等. 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 [J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1205-1213.
- [21] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1173-1174.
- [22] Hong B H, He J L, Le Q Q, *et al.* Combination formulation of tetrodotoxin and lidocaine as a potential therapy for severe arrhythmias [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 685.
- [23] 李红, 牛欣, 李国彰, 等. 调脉饮注射液抗心律失常的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(9): 759-762.
- [24] Brady W J, Mattu A, Tabas J, *et al.* The differential diagnosis of wide QRS complex tachycardia [J]. *Am J Emerg Med*, 2017, 35(10): 1525-1529.
- [25] Bartosova L, Novak F, Bebarova M, *et al.* Antiarrhythmic effect of newly synthesized compound 44Bu on model of aconitine-induced arrhythmia: Compared to lidocaine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 575(1/2/3): 127-133.
- [26] 王培德, 马学民, 张慧灵, 等. 刺乌头碱对麻醉大鼠心电图的影响及其抗实验性心律失常作用 [J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(3): 263-265.

[责任编辑 郑礼胜]