

基于UHPLC-ESI-MS/MS多组分定量的乌头汤制备工艺量值传递规律研究

刘旸哲, 陶楚君, 马 晗, 仇 峰*

首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要:目的 基于UHPLC-ESI-MS/MS多组分定量技术,系统研究乌头汤制备过程中化学成分的动态变化规律,阐明其量值传递特征,为优化制备工艺提供科学依据。方法 采用Waters Acquity UPLC Hss T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),以0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,结合三重四极杆质谱检测器,建立测定乌头汤中29种化学成分的定量分析方法,并进行方法学验证。基于该方法监测乌头汤现代制备工艺各阶段化学成分的动态变化规律,通过量值传递分析优化乌头汤关键工艺参数。结果 所建立的UHPLC-ESI-MS/MS方法符合《中国药典》2020年版相关要求,29种成分在方法学验证各项检测指标的RSD均小于10.0%。量值传递结果表明,制川乌先煎90 min双酯型生物碱含量波动下降,可有效控制以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱为例的双酯型生物碱的总量,而一煎煎煮60 min可显著提高单酯型生物碱及黄酮类成分的溶出,二煎煎煮30 min各化学成分已达最大溶出率。优化后的制备工艺:制川乌单独煎煮90 min后,下麻黄、白芍、黄芪及炙甘草,合煎60 min,药渣再煎30 min。9批验证试验结果显示,测定大部分化学成分含量的RSD值均低于20%,7种微量成分或热敏性成分的RSD值也≤30.5%,表明当前优化工艺基本稳定可控。结论 通过UHPLC-ESI-MS/MS多组分定量技术,系统揭示了乌头汤制备过程中的量值传递规律,并据此优化了关键工艺参数;建立的制备方法可有效控制毒性成分含量,同时保证药效成分的充分溶出,为乌头汤临床安全药效的应用奠定基础。

关键词: 乌头汤; UHPLC-ESI-MS/MS; 制备工艺; 量值传递; 工艺优化; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 黄酮; 制川乌; 麻黄; 白芍; 黄芪; 炙甘草

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-4991-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.006

Study on quantitative value transfer pattern in preparation process of Wutou Decoction based on multi-component quantification by UHPLC-ESI-MS/MS

LIU Yizhe, TAO Chujun, MA Han, QIU Feng

School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective Based on the UHPLC-ESI-MS/MS multi-component quantitative technology, this study systematically investigates the dynamic changes of chemical components during the preparation of Wutou Decoction (乌头汤), elucidates its quantitative transfer characteristics, and provides a scientific basis for optimizing the preparation process. **Methods** The analysis was performed using a Waters Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution as the mobile phase. Coupled with a triple quadrupole mass spectrometer detector, a quantitative analytical method was established for the simultaneous determination of 29 chemical components in Wutou Decoction. Method validation was also conducted. Based on this method, the dynamic changes of chemical components were monitored across different stages of the modern preparation process of Wutou Decoction. Quantitative transfer analysis was applied to optimize key process parameters. **Results** The established UHPLC-ESI-MS/MS method complied with the relevant requirements of the *Chinese Pharmacopoeia*. The RSD values of most of the 29 components in the method validation tests were less than 10.0%. Quantitative transfer analysis revealed that pre-decoction of Zhichuanwu (*Aconiti Radix Cocta*) for 90 min the content of diester-diterpenoid alkaloids continues to decrease, effectively controlling the total amount of three diester-diterpenoid alkaloids aconitine, hypaconitine, and mesaconitine. Meanwhile, subsequent combined decoction for 60 min significantly enhanced the dissolution of monoester-diterpenoid alkaloids and flavonoids. In the second round of

收稿日期: 2025-02-22

基金项目: 国家中医药管理局“国家中药炮制技术传承基地建设项目”(〔2022〕59号)

作者简介: 刘旸哲, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制和质量分析研究。E-mail: chloelyz2024@163.com

*通信作者: 仇 峰, 教授, 从事中药炮制、质量分析和药理学研究。E-mail: qiufeng@ccmu.edu.cn

decoction, a 30 min boiling time is sufficient to achieve the maximum dissolution rate for all these chemical components. The preparation process was optimized as follows: *Aconiti Radix Cocta* was firstly heated for 90 min, then Mahuang (*Ephedrae Herba*), Baishao (*Paeoniae Radix Alba*), Huangqi (*Astragali Radix*) and Zhigancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*) were mixed with this *Aconiti Radix Cocta* solution and further heated for 60 min. After filtration through the gauze, the decocted aqueous solution was collected. The filtered residue was heated for another 30 min. Two decocted aqueous solution was mixed and this was the final Wutou Decoction. Validation tests across nine batches showed that most of the chemical components had the RSD < 20%, while seven trace or heat-sensitive components had RSD ≤ 30.5%, confirming the robustness and controllability of the optimized process. **Conclusion** This study systematically elucidated the quantitative transfer patterns during the preparation of Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS multi-component quantitative analysis, and further optimized the key process parameters based on these findings. The established preparation method effectively controls the content of toxic constituents while ensuring sufficient extraction of bioactive components, thereby laying a solid foundation for the safe and effective clinical application of Wutou Decoction.

Key words: Wutou Decoction; UHPLC-ESI-MS/MS; preparation process; quantitative value transferring; process optimization; aconitine; hypaconitine; mesaconitine; diester alkaloids; monoester alkaloids; flavonoids; *Aconiti Radix Cocta*; *Ephedrae Herba*; *Paeoniae Radix Alba*; *Astragali Radix*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*

乌头汤出自东汉张仲景《金匱要略》，由川乌、麻黄、白芍、黄芪和甘草（炙）组成，主治“病历节不可屈伸，疼痛”，其病机为寒湿痹阻，导致关节剧痛，且痛处不移，不可屈伸^[1]。现代临床多用于治疗类风湿性关节炎、坐骨神经痛和颈椎病等，疗效显著^[2-3]。然而，方中君药川乌含有双酯型生物碱具有一定不良反应^[4]，易因炮制或煎煮不当导致毒性残留，引发心律失常甚至死亡^[5-6]。因此，明确乌头汤煎煮过程中化学成分的动态变化规律，优化其制备工艺，是实现其临床安全有效应用的关键。

现代研究表明，乌头汤可通过抑制炎症因子 [如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)] 释放、调节疼痛相关信号通路 [如瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)] 发挥抗炎镇痛作用^[7-8]；其药效物质除乌头类生物碱外，还涉及麻黄中的麻黄碱、白芍中的芍药苷及甘草中的黄酮类等成分^[9-11]。另外，方中除乌头外的其余 4 味中药麻黄、白芍、黄芪和甘草，与川乌配伍可在煎煮制备、体内药动学和药效学等多个环节通过不同的机制发挥减毒增效作用^[12-15]。然而，现有研究多聚焦于单一成分或最终汤剂的质量控制，对煎煮过程中多成分的动态变化及量值传递规律缺乏系统研究。

历经千年，乌头汤的现代临床制法较《金匱要略》原文记载已有较大改变，如川乌蜜煮取蜜液入药改为水煮，再以身煮后的制川乌入药^[16-19]；原方中甘草（炙）经考证为清炒甘草^[20-21]，而现代临床则多使用蜜炙甘草。本研究秉承张仲景乌头汤原方的遣方策略，并结合现代临床大量的用药经验，选

择当前临床主流常用的制备方法，以《中国药典》2020 年版收载的制川乌和蜜炙甘草等作为药味制备乌头汤。此外，现代制备工艺的煎煮时间多基于经验，缺乏科学量化依据，可能导致成分溶出不稳定，影响疗效与安全性。本研究拟采用 UHPLC-ESI-MS/MS 法对乌头汤中 29 种化学成分进行煎煮全程的定量监测，通过动态监测各成分的溶出与转化规律，揭示其量值传递特征，最终优化乌头汤的制备工艺，为其临床安全且有效的应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

IKA Vortex2 型涡旋振荡器，艾卡（广州）仪器设备有限公司；API 6500 Qtrap 型液相色谱质谱联用系统，含 G4220A 泵，G1316C 柱温箱，G4226A 进样器，G1330B 恒温器，ESI 和 APCI 离子源，Analyst 1.6.3 质谱工作站软件，美国应用生物系统公司；KQ-500E 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DV215CD 型电子天平、CP224C 型电子天平，奥豪斯仪器（上海）有限公司；Sigma 3k-15 型低温台式离心机，北京五洲东方科技发展有限公司。

1.2 试药

对照品盐酸麻黄碱（批号 171241-201809）、盐酸伪麻黄碱（批号 171237-201510）、甘草苷（批号 111610-201106）、芍药苷（批号 110736-201438）均购于中国食品药品检定研究院；对照品牡荆素（批号 PS0760-0025MG）、新乌头碱（批号 PU0463-0025MG）、次乌头碱（批号 PS0462-0025MG）、苯甲酰乌头原碱（批号 PS1133-0025MG）、苯甲酰次乌头原碱（批号 PS1134-0025MG）、苯甲酰新乌头原碱（批号 PS1132-0025MG）、新乌头原碱（批号

PS2906-0010MG)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 PS0409-0025MG)、毛蕊异黄酮(批号 PS0524-0025MG)、黄芪甲苷(批号 PS2646-0025MG)、芒柄花素(批号 PS0215-0025MG)、芹糖甘草苷(批号 PS1841-0025MG)、芒柄花苷(批号 PS0441-0025MG)、甘草酸铵(批号 PS1525-0025MG)、芹糖异甘草苷(批号 PU0884-0025MG)、芍药内酯苷(批号 PS1168-0025MG)、苯甲酰芍药苷(批号 PS13011802)、氧化芍药苷(批号 PS1170-0025MG)均购于成都普思生物科技有限公司;对照品乌头碱(批号 HA001001)、乌头原碱(批号 HA001011)、次乌头原碱(批号 HA001751)、脱氧乌头碱(批号 HD001022)、准噶尔乌头碱(批号 HA001750)均购于宝鸡辰光生物科技有限公司;对照品塔拉萨敏(批号 B21233)购于上海源叶生物科技有限公司;对照品甘草素(批号 150922)购于上海吉至生化科技有限公司;以上对照品的质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。

本研究选用的正、负离子内标分别为盐酸丁螺环酮(批号 6-EOD-111-1,质量分数 98.0%,购于 TRC 公司)和苯妥英钠(批号 BNV229,质量分数 99.97%,购于上海毕得医药科技有限公司)。色谱纯甲醇(批号 178335)、色谱纯乙腈(批号 172473)、LC-MS 甲酸(批号 F115-50),购于 Fisher 公司;二甲基亚砜(DMSO,批号 2543C551),购于 Amresco 公司;甲酸,购于国药集团化学试剂北京有限公司;水为纯净水,购于杭州娃哈哈有限公司;分析纯氨水(批号 20230801),购于天津市北联精细化学品开发有限公司;分析纯异丙醇(批号 2303290412)、分析纯醋酸乙酯(批号 2310291115),购于现代东方(北京)科技发展有限公司。

1.3 饮片

制川乌(批号 221101)、麻黄(批号 230501)、白芍(批号 231201)、黄芪(批号 240301)和蜜炙甘草(批号 230302)饮片购于北京本草方源药业有限公司(安国分公司),均由首都医科大学中医药学院仇峰教授根据《中国药典》2020 年版一部鉴定,制川乌为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根的炮制加工品,麻黄为麻黄科麻黄属植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎,白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,蜜炙甘草为

豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎的蜜炙炮制加工品。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别取 29 种对照品适量,精密称定,以适量 DMSO 溶解,配制成质量浓度均为 1.00 mg/mL 的单独对照品储备液。依据乌头汤化学成分的质谱响应差异,分别精密量取质量浓度为 1.00 mg/mL 的 29 种单独对照品储备液适量,置于同一量瓶中,以甲醇稀释并定容,即得含有不同质量浓度乌头汤成分的混合对照品储备液,其中含乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、脱氧乌头碱、次乌头原碱和塔拉萨敏的质量浓度均为 1.00 ng/mL,含苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱和毛蕊异黄酮的质量浓度均为 2.00 ng/mL,含苯甲酰乌头原碱、乌头原碱、新乌头原碱、准噶尔乌头碱和芒柄花苷的质量浓度均为 5.00 ng/mL,含芒柄花素的质量浓度为 20.00 ng/mL,含毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量浓度为 50.00 ng/mL,含甘草苷、甘草素和牡荆素的质量浓度均为 200.00 ng/mL,含麻黄碱、伪麻黄碱、氧化芍药苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷和甘草酸的质量浓度均为 500.00 ng/mL,含芍药苷和芍药内酯苷的质量浓度均为 1.00 $\mu\text{g/mL}$,含苯甲酰芍药苷和黄芪甲苷的质量浓度均为 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 。精密量取该混合对照品储备液适量,以甲醇稀释并定容,配制成同时含有不同质量浓度乌头汤成分的系列混合对照品溶液。

2.2 内标溶液的制备

取盐酸丁螺环酮对照品适量,精密称定,以适量 DMSO 溶解,配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的丁螺环酮对照品储备液。取苯妥英钠对照品适量,精密称定,以适量 DMSO 溶解,配制成质量浓度为 20.0 mg/mL 的苯妥英对照品储备液。

精密量取 1 μL 丁螺环酮对照品储备液(1.00 mg/mL)和 1 mL 苯妥英对照品储备液(20.0 mg/mL),加适量甲醇稀释至 20 mL,混合均匀,即得同时含丁螺环酮(50.00 ng/mL)和苯妥英(1.00 mg/mL)的甲醇溶液。丁螺环酮和苯妥英分别作为本实验定量测定的正、负离子内标。

2.3 乌头汤供试品溶液的制备

取制川乌 6 g 加水适量,煎煮 90 min,于 0、10、20、30、60、90 min 测量体积,均匀取样,作为制川乌煎煮不同时间的样品溶液。加入麻黄、白芍、黄芪和蜜炙甘草各 9 g,继续煎煮 90 min,分别

于 0、10、20、30、60、90 min 测量体积，均匀取样，作为乌头汤一煎不同时间的样品溶液。收集药液，药渣再加适量水继续煎煮 90 min，分别于 0、10、20、30、60、90 min 测量体积，均匀取样，作为乌头汤二煎不同时间的样品溶液。煎煮结束收集药液。合并 2 次煎煮的药液，记录体积，作为最终乌头汤样品溶液。

2.4 UHPLC-ESI-MS/MS 分析方法

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 柱温 25 °C; 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(A); 梯度洗脱: 0~0.5 min, 2.0% B; 0.5~3.5 min, 2.0%~6.0% B; 3.5~4.0 min, 6.0%~6.7% B; 4.0~4.5 min, 6.7%~7.0% B; 4.5~7.0 min, 7.0%~98.0% B; 7.0~8.0 min, 98.0% B; 8.0~11.0 min, 98.0%~2.0% B; 体积流量 0.40 mL/min; 进样量 5 μL。每个样品的运行时间为 11.0 min。

2.4.2 质谱条件 根据不同化学成分的结构特点，首先对 29 种待测化学成分的检测模式进行了筛选。研究发现，这些化合物在不同检测模式下的响应差异很大，例如大部分生物碱类成分因其结构中含有 N 原子，具有碱性，因此多在正离子模式下具有良好的响应；而芍药苷等单萜苷类成分却在负离子模式下具有良好的响应。因此，本研究根据各化合物的质谱响应强度与响应的稳定性选择相应的检测模式，最终在实验中采用正、负离子模式同时进行检测。

(1) 正离子模式检测的质谱条件：经考察，乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、脱氧乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱、新乌头原碱、准噶尔乌头碱、塔拉萨敏、麻黄碱、伪麻黄碱、黄芪甲苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 18 种化学成分显示出较强且稳定的正离子信号，因此采用电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 离子化源，以正离子扫描的 MRM 模式对其进行检测，具体质谱条件如表 1 所示。ESI 源在正离子模式 (ESI⁺) 下进行扫描，气帘气 (curtain gas)、雾化气 (ion source gas 1) 和涡流加热气 (ion source gas 2) 均使用氮气，其设定值分别为 206.843、413.685、413.685 kPa (30、60、60 psi)。离子源温度 (TEM) 设定为 600 °C，正离子模式下的源喷射电压 (ion spray voltage) 设定为 5 500 V。MRM 模式下每个通道的滞留时间设

表 1 采用 UHPLC-ESI-MS/MS 法在正离子模式下定量测定乌头汤化学成分的质谱工作参数

Table 1 Mass spectral parameters for quantitative determination of components in Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS in positive ion mode

化学成分	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电 压/V	碰撞能 量/eV
乌头碱	646.3	586.0	90	47
次乌头碱	616.3	556.3	80	50
新乌头碱	632.2	572.0	85	47
脱氧乌头碱	630.4	570.2	70	53
苯甲酰乌头原碱	604.3	554.0	40	50
苯甲酰次乌头原碱	574.3	542.3	60	54
苯甲酰新乌头原碱	590.3	540.3	40	50
乌头原碱	500.3	450.2	60	50
次乌头原碱	470.2	438.2	20	47
新乌头原碱	486.3	436.3	60	50
准噶尔乌头碱	358.3	340.0	80	45
塔拉萨敏	422.3	390.2	50	53
麻黄碱	166.0	148.0	45	20
伪麻黄碱	166.0	148.0	80	20
黄芪甲苷	807.0	627.4	169	60
芒柄花苷	431.3	269.0	120	26
毛蕊异黄酮	285.2	269.9	120	30
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447.1	285.2	90	24
丁螺环酮	386.0	122.0	100	47

定均为 20 ms。

(2) 负离子模式检测的质谱条件：经考察，牡荆素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸和芒柄花素 11 种化学成分显示出较强且稳定的负离子信号，因此采用 ESI 离子化源，以负离子扫描的 MRM 模式对其进行检测，具体质谱条件如表 2 所示。ESI 源在负离子模式 (ESI⁻) 下进行扫描，气帘气 (curtain gas)、雾化气 (ion source gas 1) 和涡流加热气 (ion source gas 2) 均使用氮气，其设定值分别为 206.843、413.685、413.685 kPa (30、60、60 psi)。离子源温度 (TEM) 设定为 600 °C，负离子模式下的源喷射电压 (ion spray voltage) 设定为 -4 500 V。MRM 模式下每个通道的滞留时间设定均为 20 ms。

2.5 方法学验证

依据《中国药典》2020 年版，本研究对建立的 UHPLC-ESI-MS/MS 法进行了方法学验证。

2.5.1 选择性考察 本研究首先对比了空白溶剂、

表 2 采用 UHPLC-ESI-MS/MS 法在负离子模式下定量测定乌头汤化学成分的质谱工作参数

Table 2 Mass spectral parameters for quantitative determination of the components in Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS in negative ion mode

化学成分	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/ V	碰撞能量/ eV
牡荆素	431.2	311.1	-130	-37
芍药苷	525.2	449.1	-120	-30
芍药内酯苷	525.2	479.0	-85	-28
苯甲酰芍药苷	583.3	121.0	-130	-17
氧化芍药苷	495.0	137.0	-180	-40
芹糖甘草苷	549.1	255.1	-150	-45
芹糖异甘草苷	549.1	255.1	-200	-50
甘草苷	417.3	255.1	-64	-38
甘草素	255.0	119.0	-120	-36
甘草酸	821.6	351.1	-210	-54
芒柄花素	267.1	252.1	-120	-35
苯妥英	251.0	102.0	-28	-38

混合对照品溶液和 1 份未知样品溶液的色谱图，以评估方法的选择性。图 1-A、B 给出了混合对照品溶液的代表性色谱图。图 1-C、D 给出了乌头汤样品溶液的代表性色谱图。乌头汤中 29 种化学成分的保留时间介于 5.24~7.01 min，正、负离子内标的保留时间分别为 6.38、6.82 min；不同通道化学成分互不干扰，即便是同一通道出峰的同分异构体也均能实现良好分离（分离度>1.5），如对映异构体麻黄碱和伪麻黄碱的保留时间分别为 5.25、5.50 min；溶剂和样品中的其他共存成分均不干扰 29 种化学成分及正、负离子模式内标的定量测定，且 29 种化学成分及正、负离子模式内标彼此之间也不存在干扰，表明该方法具有良好的选择性。

2.5.2 线性关系及检测限和定量限考察 分别以每种化学成分与相应内标峰面积的比值对其质量浓度进行线性回归，权重因子为 $1/x^2$ ，得到相应的线性回归方程。29 种化学成分的线性回归方程及线性范围见表 3。本方法所建立的线性范围均可达到 1 000 倍，线性范围宽，适合高、低质量浓度差异较大、且在制备体系中质量分数变化较大的中药复杂体系中多种成分的同时测定。按照峰响应值约为基线噪音的 3 倍 ($S/N=3$) 时的质量浓度为检测限，峰响应值约为基线噪音的 10 倍 ($S/N=10$) 时的质量浓度为定量限，测得 29 种化学成分的检测限和定量限见表 3。

2.5.3 精密度和准确度试验 选择“2.1”项下低、中、高质量浓度的混合对照品溶液，按照“2.4”项下条件进样检测，重复进样 6 次，得到混合对照品中各成分的峰面积，计算得到各化学成分的分析准确度均介于 90.0%~110.0%，以 RSD 表示的日内和日间精密度均<15.0%，结果见表 4，表明该方法精密度和准确度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一批乌头汤样品 6 份，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，依法测定，根据相应化学成分的标准曲线计算含量，以质量分数的 RSD 值代表重复性。结果见表 4，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一批乌头汤样品，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，室温放置，分别于制备后 0、4、8、12、24、48 h 取样依法测定，记录各成分峰面积。结果见表 4，29 种化学成分在当前实验条件下均具有良好的稳定性，RSD<10.0%。

2.5.6 加样回收率试验 取各化学成分含量已测知的同 1 份乌头汤样品，精密称定，分别精密加入低（各化学成分相应质量浓度的 80%）、中（各化学成分相应质量浓度的 100%）、高（各化学成分相应质量浓度的 120%）3 个水平的对照品溶液适量，制备供试品溶液，测定各化学成分的峰面积，计算相应回收率及其 RSD 值。结果见表 4，所有化学成分的回收率均在 90.0%~110.0%，RSD 值均低于 5.00%，表明该方法对 29 种化学成分的定量具有良好的准确度。

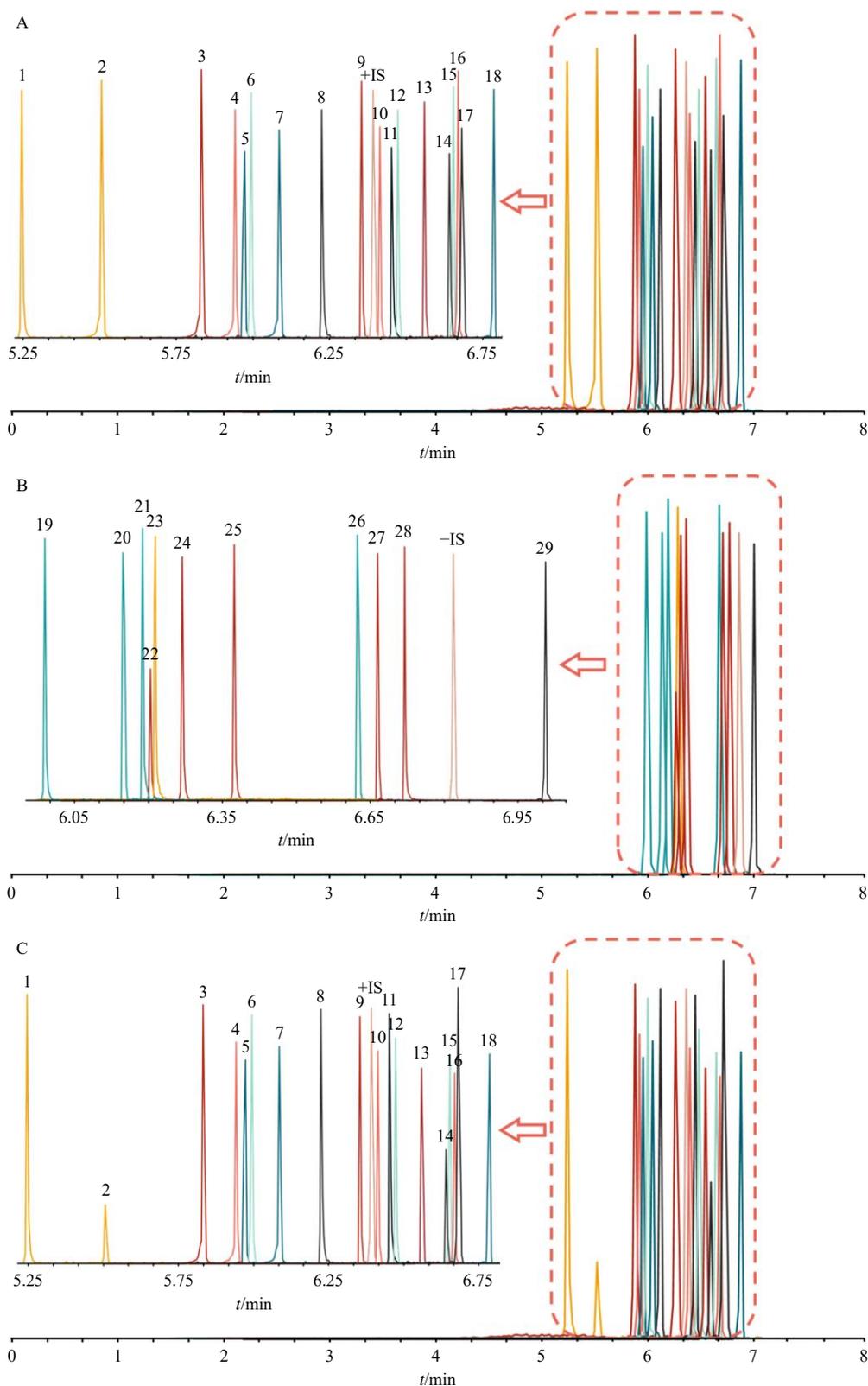
2.6 乌头汤煎煮过程中的量值传递规律

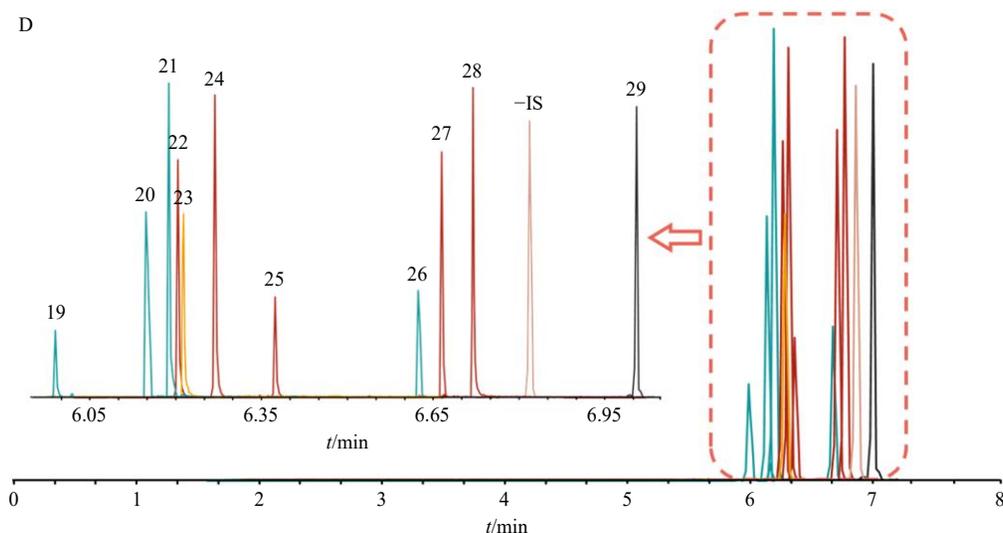
本研究根据现代临床乌头汤的常用制法^[16-19]，采用《中国药典》2020 年版收载的制川乌进行煎煮，且实施先煎处理，再将其与麻黄、白芍、黄芪和蜜炙甘草混合煎煮。乌头汤的现代临床煎煮可划分为以下 3 个阶段：①制川乌先煎；②下其余 4 味中药一煎；③二煎。本研究定量监测每个阶段汤剂中的主要化学成分，根据定量测定结果绘制了各成分的含量变化趋势图，以期揭示乌头汤煎煮全过程的量值传递规律。

2.6.1 制川乌先煎过程中的量值传递规律 依据现代临床乌头汤的制法，制川乌在应用时需要先煎久煎，按照目前临床应用方法通常先煎 90 min。制川乌先煎过程中生物碱类成分的含量变化趋势图见图 2。图 2-A 表示以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱和脱氧乌头碱为代表的双酯型生物碱的变化规律。

在为期 90 min 的先煎过程中,新乌头碱和脱氧乌头碱含量在 0~60 min 时大致呈上升趋势,推测此阶段双酯型生物碱主要从制川乌饮片向汤剂中溶出转移;而在 60~90 min,其含量逐渐下降,随着煎煮时间的延长双酯型生物碱逐渐发生水解,导致含

量降低。单酯型生物碱的含量变化趋势图如图 2-B 所示,在先煎全过程中苯甲酰乌头原碱等单酯型生物碱的含量均呈现缓慢上升趋势,推测此类生物碱由饮片转移至汤剂中,且双酯型生物碱的水解也会生成单酯型生物碱,导致其含量上升。以乌头原碱、





A、B-混合对照品溶液正、负离子模式代表性色谱图；C、D-乌头汤样品溶液正、负离子模式代表性色谱图；1-麻黄碱；2-伪麻黄碱；3-新乌头原碱；4-乌头原碱；5-准噶尔乌头碱；6-次乌头原碱；7-塔拉萨敏；8-毛蕊异黄酮葡萄糖苷；9-苯甲酰新乌头原碱；10-苯甲酰乌头原碱；11-芒果柄花苷；12-苯甲酰次乌头原碱；13-新乌头碱；14-黄芪甲苷；15-次乌头碱；16-乌头碱；17-毛蕊异黄酮；18-脱氧乌头碱；+IS-丁螺环酮；19-氧化芍药苷；20-芍药内酯苷；21-芍药苷；22-芹糖甘草苷；23-牡荆素；24-甘草苷；25-芹糖异甘草苷；26-苯甲酰芍药苷；27-甘草素；28-甘草酸；29-芒果柄花素；-IS-苯妥英。

A, B-chromatogram of mixed standard solution in positive, negative ion mode; C, D-chromatogram of Wutou Decoction sample solution in positive, negative ion mode; 1-ephedrine; 2-pseudoephedrine; 3-mesaconine; 4-aconine; 5-songorine; 6-hypaconine; 7-talatisamine; 8-calycosin 7-O-glucoside; 9-benzoylmesaconine; 10-benzoylaconine; 11-ononin; 12-benzoylhypaconitine; 13-mesaconitine; 14-astragaloside IV; 15-hypaconitine; 16-aconitine; 17-calycosin; 18-deoxyaconitine; +IS-buspirone; 19-oxypaeoniflorin; 20-albiflorin; 21-paeoniflorin; 22-liquiritin apioside; 23-vitexin; 24-liquiritin; 25-isoliquiritin apioside; 26-benzoylpaeoniflorin; 27-liquiritigenin; 28-glycyrrhizic acid; 29-formononetin; -IS-phenytoin.

图 1 采用 UHPLC-ESI-MS/MS 法定量测定乌头汤中所含 29 种成分的代表性提取色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms for quantitative determination of 29 components in Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS

次乌头原碱和新乌头原碱为代表的醇胺型生物碱由于几无毒性和活性，在川乌及其复方制剂的研究中往往被忽视。但醇胺型生物碱的含量变化在一定程度上能够反映双酯型和单酯型生物碱的水解程度和速度，因此对阐明乌头汤煎煮过程中的量值传递规律同样重要。本研究关注醇胺型生物碱的含量变化趋势图如图 2-C 所示，乌头原碱等在 90 min 的煎煮过程中含量持续上升，表明在先煎过程中此类生物碱从饮片中的溶出以及双酯型和单酯型生物碱的持续水解，而这也一定程度上证实了先煎减毒的必要性。综上所述，制川乌在为期 90 min 的煎煮过程中，生物碱类成分从制川乌饮片中溶出到煎液里，同时双酯型和单酯型生物碱逐渐发生水解，单酯型生物碱和醇胺型生物碱在 90 min 时含量正处于峰值。

2.6.2 乌头汤一煎过程中的量值传递规律 制川乌先煎后，下其余 4 味中药合煎 2 次，即得乌头汤。现代临床中通常煎煮 2 次，每次 90 min。为全面监测合煎过程中各成分的量值传递规律，本研究在 2 次合煎的过程中分别设置了以 90 min 为终点的 5 个

取样点，并采用 UHPLC-ESI-MS/MS 法进行定量分析。乌头汤一煎期间川乌生物碱类成分的含量变化趋势图见图 3。一煎开始 10 min 时，双酯型生物碱在汤液中的含量接近定量下限，表明其已基本水解，达到减毒效果。图 3-A 给出了单酯型生物碱的含量变化趋势，在一煎 10~60 min 期间含量基本保持稳定，一煎 60 min 开始含量出现明显下降，表明此时开始发生大量水解，这一结果也表明先煎 90 min，足以使单酯型生物碱几乎完全转移至汤剂中。醇胺型生物碱的含量变化趋势与单酯型生物碱相似（图 3-B），但其在煎煮 60~90 min 期间的含量下降趋势较单酯型生物碱更平缓，推测可能原因是单酯型生物碱继续水解生成了醇胺型生物碱，但醇胺型生物碱的热降解速率大于源自单酯型生物碱水解的生成速率，导致其表现含量仍呈现下降趋势。

乌头汤一煎期间其余 4 味中药中化学成分的含量变化趋势图见图 4。麻黄碱、伪麻黄碱和牡荆素作为麻黄的代表性成分，在一煎 90 min 内含量呈先升后降的趋势，在一煎 60 min 时到达峰值，表明此时化学成分由饮片大量转移至汤液中，从 60 min 后

表3 采用UHPLC-ESI-MS/MS法定量测定乌头汤中29种化学成分的线性回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限结果

Table 3 Results of calibration curves, correlation coefficients, linear ranges, LODs and LOQs for the quantitative determination of 29 components in Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS

化学成分	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(pg·mL ⁻¹)	定量限/(pg·mL ⁻¹)
乌头碱	$Y=5.05 \times 10^{-3} X+7.43 \times 10^{-6}$	0.999 0	0.001~1.000	0.50	1.00
次乌头碱	$Y=2.59 \times 10^{-3} X+6.62 \times 10^{-6}$	0.999 3	0.001~1.000	0.50	1.00
新乌头碱	$Y=7.43 \times 10^{-3} X-5.95 \times 10^{-6}$	0.999 7	0.001~1.000	0.50	1.00
脱氧乌头碱	$Y=4.64 \times 10^{-3} X+1.79 \times 10^{-5}$	0.997 8	0.001~1.000	0.50	1.00
苯甲酰乌头原碱	$Y=2.89 \times 10^{-4} X+1.32 \times 10^{-5}$	0.999 3	0.005~5.000	2.50	5.00
苯甲酰次乌头原碱	$Y=5.22 \times 10^{-3} X+2.10 \times 10^{-5}$	0.999 3	0.002~2.000	1.00	2.00
苯甲酰新乌头原碱	$Y=1.53 \times 10^{-3} X+2.68 \times 10^{-5}$	0.999 2	0.002~2.000	1.00	2.00
乌头原碱	$Y=3.51 \times 10^{-4} X-5.63 \times 10^{-6}$	0.999 2	0.005~5.000	2.50	5.00
次乌头原碱	$Y=3.49 \times 10^{-3} X+1.49 \times 10^{-5}$	0.998 7	0.001~1.000	0.50	1.00
新乌头原碱	$Y=3.83 \times 10^{-4} X+2.54 \times 10^{-5}$	0.999 1	0.005~5.000	2.50	5.00
准噶尔乌头碱	$Y=7.53 \times 10^{-4} X+1.27 \times 10^{-6}$	0.999 0	0.005~5.000	2.50	5.00
塔拉萨敏	$Y=1.34 \times 10^{-3} X+1.03 \times 10^{-5}$	0.999 7	0.001~1.000	0.50	1.00
麻黄碱	$Y=7.27 \times 10^{-4} X-1.67 \times 10^{-4}$	0.996 2	0.500~500.000	250.00	500.00
伪麻黄碱	$Y=9.49 \times 10^{-4} X-2.29 \times 10^{-4}$	0.997 8	0.500~500.000	250.00	500.00
牡荆素	$Y=0.026 5 X+1.22 \times 10^{-3}$	0.999 5	0.200~200.000	100.00	200.00
芍药苷	$Y=1.24 \times 10^{-3} X+3.07 \times 10^{-4}$	0.998 5	1.000~1 000.000	500.00	1 000.00
芍药内酯苷	$Y=4.40 \times 10^{-3} X+1.70 \times 10^{-3}$	0.999 0	1.000~1 000.000	500.00	1 000.00
苯甲酰芍药苷	$Y=1.50 \times 10^{-4} X+2.58 \times 10^{-4}$	0.997 2	5.000~5 000.000	2 500.00	5 000.00
氧化芍药苷	$Y=4.38 \times 10^{-3} X+3.06 \times 10^{-5}$	0.999 5	0.500~500.000	250.00	500.00
蔗糖甘草苷	$Y=7.62 \times 10^{-3} X+9.26 \times 10^{-5}$	0.999 0	0.500~500.000	250.00	500.00
蔗糖异甘草苷	$Y=4.32 \times 10^{-3} X-1.42 \times 10^{-3}$	0.999 3	0.500~500.000	250.00	500.00
甘草苷	$Y=0.019 3 X+1.28 \times 10^{-3}$	0.999 3	0.200~200.000	100.00	200.00
甘草素	$Y=6.14 \times 10^{-3} X+7.09 \times 10^{-4}$	0.999 3	0.200~200.000	100.00	200.00
甘草酸	$Y=2.91 \times 10^{-3} X+1.13 \times 10^{-3}$	0.995 0	0.500~500.000	250.00	500.00
黄芪甲苷	$Y=1.45 \times 10^{-5} X-3.42 \times 10^{-6}$	0.996 3	5.000~5 000.000	2 500.00	5 000.00
芒柄花素	$Y=0.048 5 X+1.88 \times 10^{-3}$	0.999 3	0.020~20.000	6.67	20.00
芒柄花苷	$Y=7.50 \times 10^{-4} X+1.76 \times 10^{-5}$	0.997 5	0.005~5.000	2.50	5.00
毛蕊异黄酮	$Y=1.47 \times 10^{-3} X+8.60 \times 10^{-5}$	0.999 4	0.002~2.000	1.00	2.00
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=8.54 \times 10^{-4} X+3.66 \times 10^{-5}$	0.999 0	0.050~50.000	25.00	50.00

表4 采用UHPLC-ESI-MS/MS法定量测定乌头汤中29种化学成分的精密性、准确性、稳定性、重复性和回收率结果

Table 4 Results of precision, accuracy, stability, repeatability and recovery for quantitative determination of 29 components in Wutou Decoction using UHPLC-ESI-MS/MS

化学成分	精密性 RSD/%		RSD/%		加样回收率		化学成分	精密性 RSD/%		RSD/%		加样回收率	
	日内	日间	稳定性	重复性	平均值/%	RSD/%		日内	日间	稳定性	重复性	平均值/%	RSD/%
乌头碱	6.73	6.10	5.10	5.10	92.80	0.41	芍药苷	4.07	6.43	5.52	5.52	95.30	3.87
次乌头碱	3.88	5.39	7.45	7.45	100.00	3.09	芍药内酯苷	6.78	8.73	5.55	5.55	100.00	1.67
新乌头碱	3.09	4.80	5.83	5.83	99.10	3.39	苯甲酰芍药苷	3.08	8.76	5.39	5.39	96.40	3.52
脱氧乌头碱	5.16	7.30	7.43	7.43	101.00	1.82	氧化芍药苷	6.08	5.33	3.66	3.66	100.00	3.67
苯甲酰乌头原碱	3.89	3.66	8.44	8.44	98.70	0.52	蔗糖甘草苷	4.15	5.86	5.14	5.14	103.00	4.72
苯甲酰次乌头原碱	3.92	6.85	6.03	6.03	99.10	4.67	蔗糖异甘草苷	2.15	5.61	4.87	4.87	98.10	3.21
苯甲酰新乌头原碱	2.65	4.21	7.34	7.34	102.00	3.69	甘草苷	7.68	7.11	5.86	5.86	103.00	2.11
乌头原碱	3.91	5.14	9.48	9.48	101.00	4.23	甘草素	4.85	5.79	8.73	8.73	99.50	1.87
次乌头原碱	3.43	5.71	4.62	4.62	102.00	0.82	甘草酸	4.41	4.81	9.56	9.56	97.30	4.91
新乌头原碱	5.04	5.95	6.25	6.25	101.00	3.04	黄芪甲苷	4.81	6.33	5.79	5.79	99.80	1.90
准噶尔乌头碱	2.69	4.87	3.68	3.68	97.00	4.23	芒柄花素	5.41	4.85	4.85	4.85	103.00	3.74
塔拉萨敏	4.59	4.89	4.10	4.10	99.40	4.48	芒柄花苷	4.41	5.00	6.13	6.13	100.00	1.80
麻黄碱	3.53	9.32	8.72	8.72	99.20	2.55	毛蕊异黄酮	8.04	8.23	7.97	7.97	101.00	2.75
伪麻黄碱	5.63	9.56	5.75	5.75	101.00	3.34	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	6.74	6.13	9.16	9.16	101.00	3.88
牡荆素	5.13	5.55	9.27	9.27	98.90	3.30							

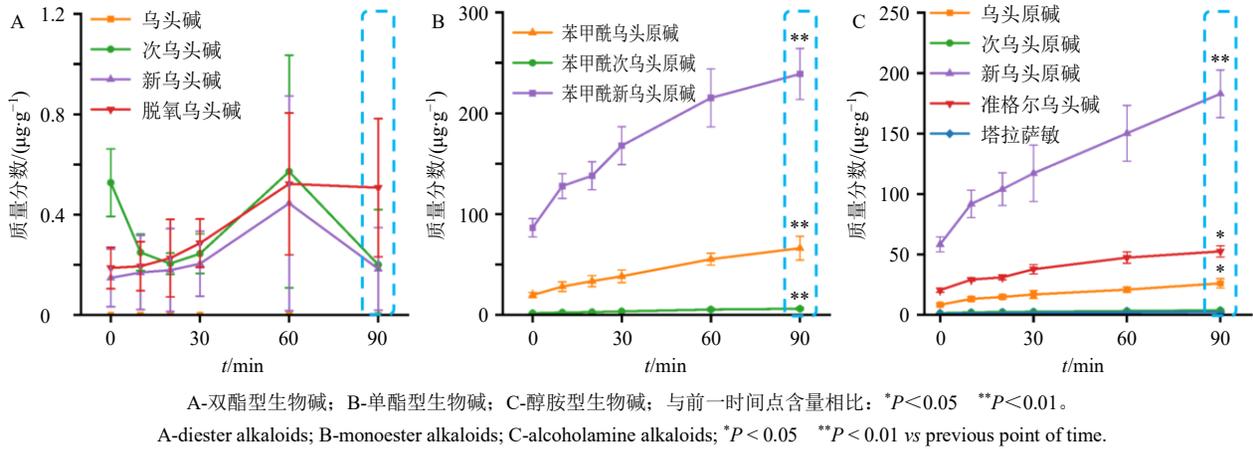


图2 采用UHPLC-ESI-MS/MS法测定制川乌先煎期间川乌中生物碱类化学成分含量变化趋势图

Fig. 2 Trend chart of content changes for alkaloids in *Aconiti Radix Cocta* during pre-decoction process determined using UHPLC-ESI-MS/MS method

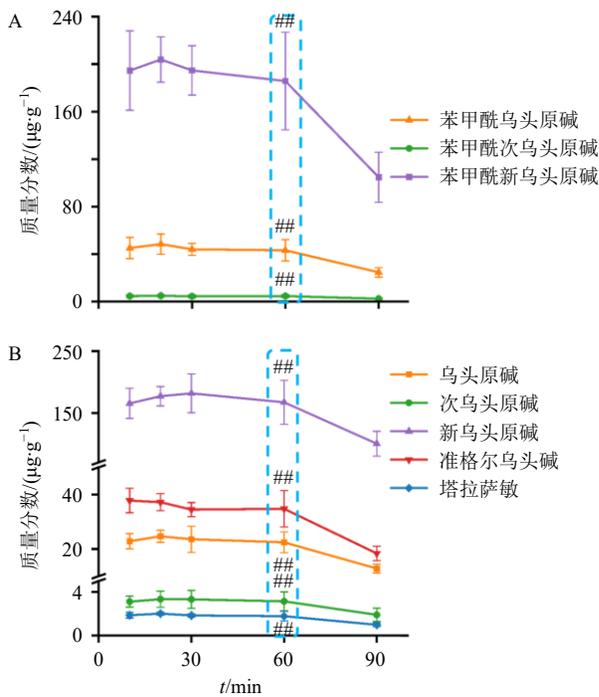


图3 采用UHPLC-ESI-MS/MS法测定乌头汤一煎期间川乌中生物碱类化学成分的含量变化趋势图

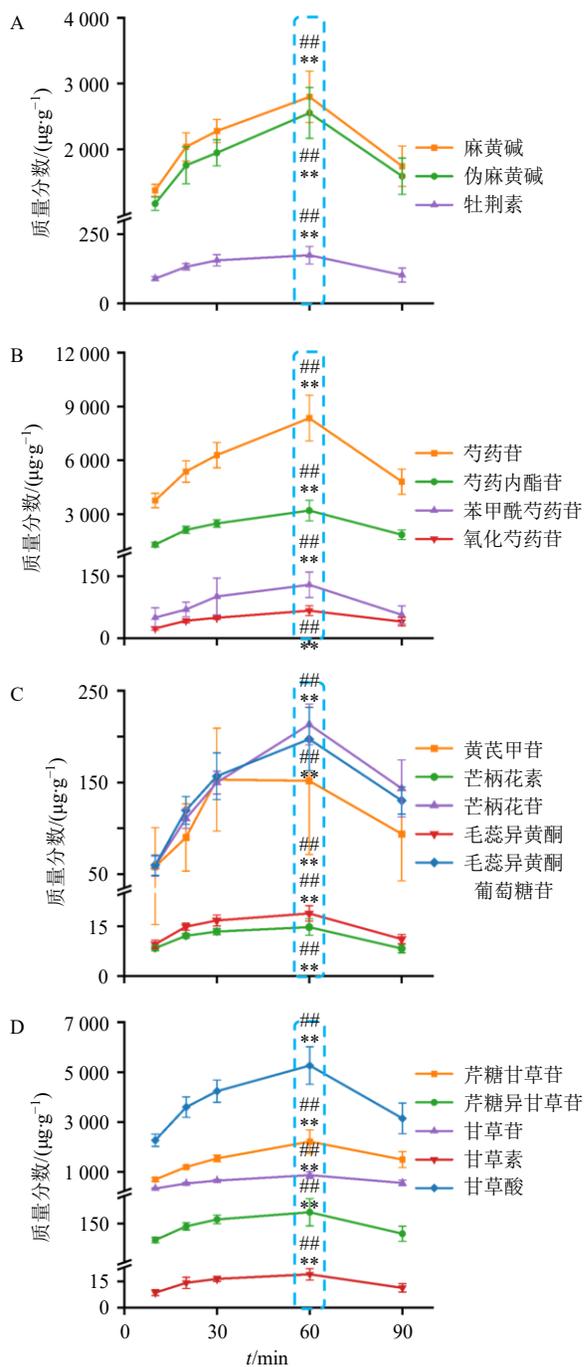
Fig. 3 Trend chart of content changes of alkaloids in *Aconiti Radix Cocta* during the first decoction of Wutou Decoction determined by UHPLC-ESI-MS/MS

含量开始下降,表明此时可能存在受热降解;白芍中的化学成分主要为单萜苷类,本研究所选芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷的含量变化趋势与麻黄中的成分相似,在一煎至60 min

时各成分到达峰值。黄芪和甘草中所选的成分主要为黄酮类和三萜皂苷类,其含量变化趋势与麻黄和白芍的代表性成分相似,含量均在一煎至60 min时达到峰值,而后随着煎煮时间延长含量显著降低。

图2、3结果显示,制川乌经90 min先煎后双酯型生物碱基本水解完全,达到减毒效果;加入其余药味后,单酯型生物碱在一煎前60 min保持稳定,60 min后因受热降解而下降。结合图3、4,乌头汤一煎最佳时长为60 min,此时生物碱、单萜苷和黄酮等成分充分溶出;超过60 min则成分降解,影响疗效。

2.6.3 乌头汤二煎过程中的量值传递规律 乌头汤一煎结束后,倾出汤液,留存备用。为煎煮充分,将药渣加水进行二煎。乌头汤二煎期间川乌生物碱类成分的含量变化趋势图见图5。图5-A表明单酯型生物碱含量在二煎30 min时到达峰值,30~60 min含量基本稳定;图5-B显示醇胺型生物碱含量在二煎全程中未见显著变化。二煎期间麻黄、白芍、黄芪和甘草中化学成分的含量变化趋势与一煎相似(图6)。麻黄中麻黄碱、伪麻黄碱和牡荆素的含量在二煎10~30 min发生显著上升,而后含量保持相对稳定(图6-A);白芍中的芍药苷含量在10~30 min有小幅上升(图6-B),其余成分在二煎过程中未有显著变化;黄芪中的芒柄花素及毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量在10~30 min有小幅上升(图6-C);甘草中5种成分含量在煎煮10~30 min均可见显著上升,后保持相对稳定(图6-D)。结合图5、6可知,在二煎期间,仍有部分一煎中未被溶出的成分再次由饮片转移至汤液中,证实了二煎的必要性;二煎

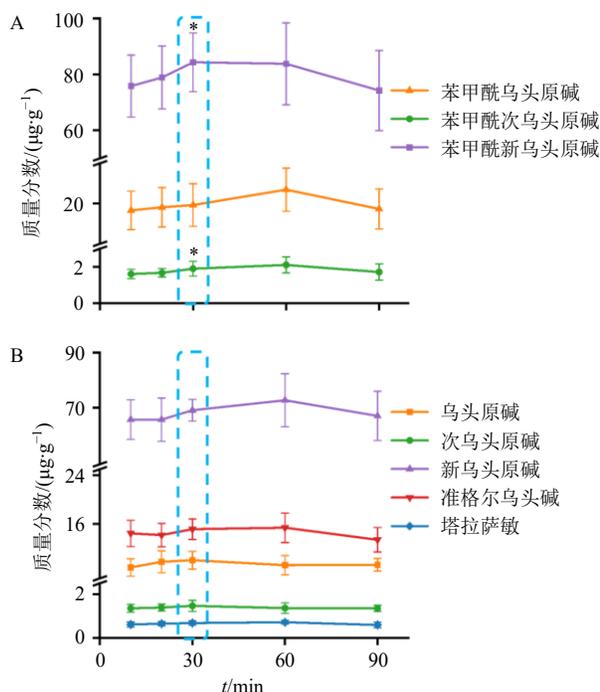


A-麻黄; B-白芍; C-黄芪; D-炙甘草; 蓝框表示最终优化的一煎时间; 与蓝框前一时间点含量相比: ** $P < 0.01$; 与蓝框后一时间点含量相比: ### $P < 0.01$ 。

A-*Ephedrae Herba*; B-*Paeoniae Radix Alba*; C-*Astragali Radix*; D-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Preparata cum Melle*; Blue box indicates final optimized time for first decoction of Wutou Decoction; ** $P < 0.01$ vs previous point of time before blue box; ### $P < 0.01$ vs next point of time after blue box.

图4 采用UHPLC-ESI-MS/MS法测定乌头汤一煎期间其余4味中药中化学成分的含量变化趋势图

Fig. 4 Trend of content changes of components in other four herbs during the first decoction of Wutou Decoction determined by UHPLC-ESI-MS/MS



A-单酯型生物碱; B-醇胺型生物碱; 蓝框所示为最终优化的二煎时间; 与蓝框前一时间点含量相比: * $P < 0.05$ 。

A-monoester alkaloids; B-alcoholamine alkaloids; Blue box indicates optimized time for second decoction of Wutou Decoction; * $P < 0.05$ vs previous point of time before blue box.

图5 采用UHPLC-ESI-MS/MS法测定乌头汤二煎期间川乌中生物碱类化学成分的含量变化趋势图

Fig. 5 Trend chart of content changes of alkaloids in *Aconiti Radix Cocta* during the first decoction of Wutou Decoction determined by UHPLC-ESI-MS/MS

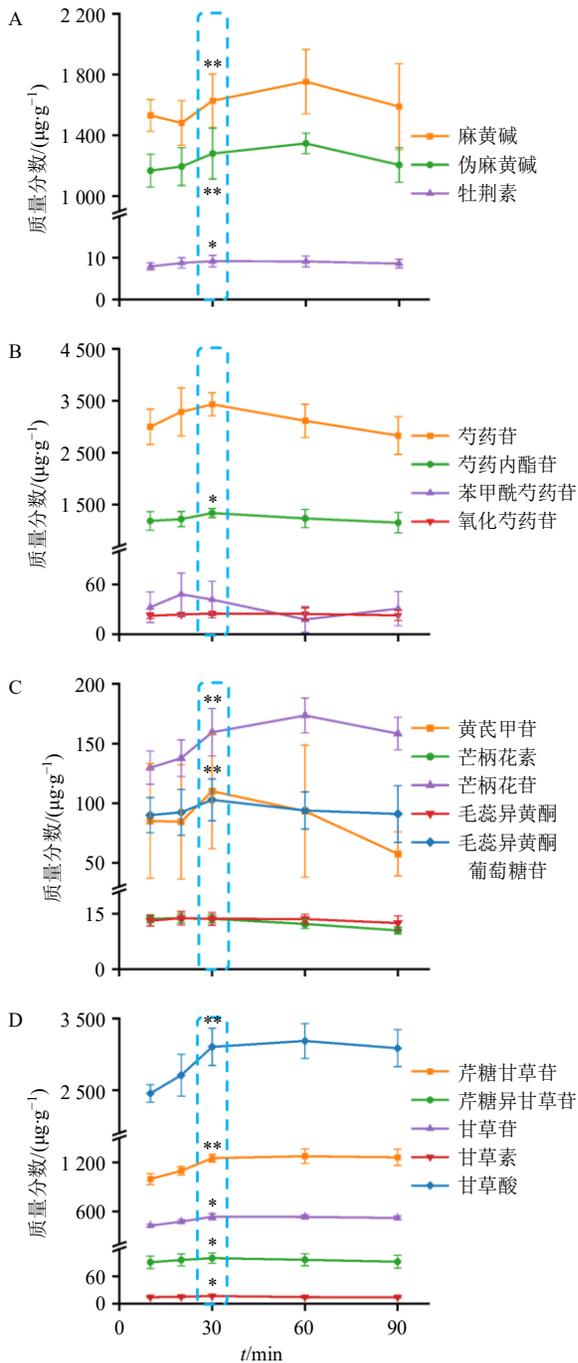
30 min 时各化学成分达到最大溶出率, 如果二煎时间继续延长, 部分成分的含量反而可能出现下降, 故建议二煎时间维持在 30 min 为宜。

2.7 乌头汤煎煮工艺优化结果

基于上述量值传递规律分析结果, 结合乌头汤安全且有效的临床应用, 优化确定乌头汤的煎煮工艺如下: 取处方量的制川乌, 加水先煎 90 min; 下麻黄、白芍、黄芪和蜜炙甘草合并煎煮 60 min, 倾出药液; 药渣加水继续煎煮 30 min; 合并 2 次药液, 即得。

2.8 乌头汤定量测定

采用上述优化的制备工艺, 平行制备 9 批乌头汤, 并采用上述建立并验证的 UHPLC-ESI-MS/MS 法进行定量测定, 根据 Analyst 1.6.3 软件计算得出的质量浓度和测得汤液的体积, 按照煎煮汤剂药材的生药量进行含量计算, 以 $\mu\text{g/g}$ 生药表示的测定结果见表 5。9 批乌头汤的定量测定结果与量值传递规律结果具有良好的一致性。以代表性成分甘草酸



A-麻黄; B-白芍; C-黄芪; D-炙甘草; 蓝框表示最终优化的二煎时间; 与蓝框前一时间点含量相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
A-Ephedrae Herba; B-Paeoniae Radix Alba; C-Astragali Radix; D-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Preparata cum Melle; Blue box indicates the final optimized time for the second decoction of Wutou Decoction; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs compared with the previous point of time before the blue box.

图6 采用UHPLC-ESI-MS/MS法测定乌头汤二煎期间其余4味中药中化学成分的含量变化趋势图

Fig. 6 Trend of content changes of components in the other four herbs during the second decoction of Wutou Decoction determined by UHPLC-ESI-MS/MS

为例,一煎 60 min 时质量分数为 $(5\ 266 \pm 751)\ \mu\text{g/g}$,二煎 30 min 时质量分数为 $(3\ 104 \pm 261)\ \mu\text{g/g}$,二者总量为 $(8\ 370 \pm 1\ 012)\ \mu\text{g/g}$;而最终汤剂中甘草酸定量测定值为 $(9\ 958 \pm 629)\ \mu\text{g/g}$,量值传递规律预测值与实际测定值差异为 16%,表明二者吻合度良好。

3 讨论

3.1 乌头汤的制备工艺

《金匮要略》记载乌头汤的制备方法:“麻黄、芍药、黄芪各三两,甘草三两(炙),川乌五枚(咬咀,以蜜二升,煎取一升,即出乌头)。上五味,咬咀四味,以水三升,煮取一升,去滓,内蜜煎中更煎之,服七合。不知,尽服之”^[1]。随着时代发展,乌头汤组方剂量、药材炮制规格及煎煮方法均显著变化。因川乌毒性,需规范现代制备工艺,保障用药安全有效。《金匮要略》中川乌以蜂蜜煎煮,弃川乌取蜜煮液,体现“去性存用”思想,以蜜煮川乌实现炮制减毒。现代临床多用《中国药典》“水煮法”炮制川乌,简化流程,但可能改变毒性成分控释规律,凸显了深入研究现代制备工艺的必要性。

关于《金匮要略》记载乌头汤中的药味甘草(炙),考证蜜炙这一炮制方法的历史沿革发现,汉代只有炙焦为末(《金匮玉函经》)、微炒的方法,唐代始有蜜制法(《千金要方》),明清才增加了蜜炙(《医学衷中参西录》)。据此认为张仲景《金匮要略》成书的东汉记载的甘草(炙)并非现代理解的蜜炙甘草,而应为清炒甘草^[20-23]。国家中医药管理局发布的多批《古代经典名方信息表》也采纳了这种说法,将《伤寒论》及《金匮要略》记载方剂中的甘草(炙)明确为清炒甘草。本研究查阅了大量文献,发现现代临床煎煮乌头汤多默认采用蜜炙甘草^[16-19],究其原因,《中国药典》2020年版甘草项下仅收载了甘草和炙甘草2个炮制规格,并无清炒甘草;各地方炮制规范对清炒甘草也鲜有记载,仅山东省和河北省中药饮片炮制规范有甘草炒黄的记载。综上,本研究秉承张仲景乌头汤的遣方策略,结合现代临床的用药经验,选择了当前广泛应用的主流制备方法进行研究。

现代临床制备乌头汤首先根据《中国药典》对制川乌进行先煎处理,为使有效成分达到最大溶出率,常进行二次煎煮^[16-19],但煎煮时间等煎煮要素并不明确,尤其是对于如何在煎煮过程中实现减毒保效的关键环节缺乏明确指导。煎煮时间是影响乌

表5 平行制备9批乌头汤中29种化学成分的定量测定结果

Table 5 Determined contents of 29 components in nine batches of Wutou Decoction prepared in parallel

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱	脱氧乌头碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	乌头原碱	次乌头原碱	新乌头原碱
1	0.212	0.313	0.550	0.195	49.300	55.000	340.000	20.700	18.200	150.000
2	0.175	0.499	0.720	0.364	50.100	52.600	386.000	21.700	20.200	163.000
3	0.190	0.498	0.463	0.228	32.700	54.000	333.000	18.500	23.600	164.000
4	0.221	0.607	0.601	0.306	35.900	68.300	346.000	20.100	27.200	164.000
5	0.137	0.528	0.723	0.253	37.500	53.800	326.000	18.800	20.000	159.000
6	0.331	0.395	0.473	0.223	59.100	50.100	387.000	26.100	18.900	183.000
7	0.238	0.309	0.540	0.382	59.500	64.000	360.000	24.000	19.600	172.000
8	0.322	0.298	0.616	0.258	45.000	46.400	375.000	23.900	20.800	189.000
9	0.162	0.342	0.683	0.269	45.500	38.400	337.000	27.800	22.200	201.000
均值	0.221	0.421	0.596	0.275	46.100	53.600	354.000	22.400	21.200	172.000
s	0.067	0.114	0.099	0.064	9.570	8.800	23.300	3.260	2.790	16.300
RSD/%	30.50	27.10	16.50	23.10	20.80	16.40	6.57	14.60	13.20	9.51

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	准噶尔乌头碱	塔拉萨敏	麻黄碱	伪麻黄碱	牡荆素	芍药苷	芍药内酯苷	苯甲酰芍药苷	氧化芍药苷	芹糖甘草苷
1	116.000	7.050	3 700.000	4 933.000	51.700	11 667.000	5 067.000	273.000	301.000	3 533.000
2	133.000	6.670	4 133.000	4 800.000	64.000	13 067.000	5 467.000	411.000	325.000	3 027.000
3	121.000	7.940	3 996.000	4 708.000	52.900	8 125.000	4 875.000	429.000	273.000	3 721.000
4	133.000	9.210	3 550.000	4 839.000	43.000	13 650.000	5 453.000	285.000	306.000	3 449.000
5	118.000	6.910	3 806.000	4 693.000	62.900	12 314.000	4 822.000	189.000	287.000	3 496.000
6	126.000	9.800	3 973.000	5 022.000	55.600	16 089.000	6 267.000	414.000	348.000	3 409.000
7	121.000	8.450	3 400.000	3 867.000	55.000	8 500.000	3 027.000	268.000	314.000	3 367.000
8	130.000	8.780	3 156.000	3 810.000	58.600	7 449.000	2 713.000	245.000	270.000	3 625.000
9	117.000	8.520	3 683.000	4 044.000	56.800	7 506.000	4 511.000	287.000	354.000	3 414.000
均值	124.000	8.150	3 711.000	4 524.000	55.600	10 929.000	4 689.000	311.000	309.000	3 449.000
s	6.870	1.090	310.000	450.000	6.280	3 136.000	1 150.000	85.300	30.000	194.000
RSD/%	5.55	13.30	8.36	9.95	11.30	28.70	24.50	27.40	9.71	5.64

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	芹糖异甘草苷	甘草苷	甘草素	甘草酸	黄芪甲苷	芒柄花素	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	
1	527.000	3 063.000	80.000	10 067.000	347.000	48.000	453.000	68.300	510.000	
2	511.000	3 840.000	116.000	9 289.000	426.000	48.400	556.000	73.800	596.000	
3	654.000	4 075.000	135.000	9 958.000	492.000	55.800	521.000	83.300	563.000	
4	581.000	3 582.000	115.000	9 858.000	345.000	43.300	498.000	61.000	618.000	
5	577.000	3 328.000	129.000	9 300.000	418.000	50.400	504.000	69.300	495.000	
6	587.000	4 049.000	145.000	10 978.000	328.000	43.400	502.000	60.000	458.000	
7	617.000	3 900.000	114.000	9 167.000	324.000	41.700	510.000	50.000	397.000	
8	590.000	3 901.000	167.000	10 463.000	326.000	60.700	402.000	65.400	430.000	
9	607.000	5 056.000	144.000	10 539.000	451.000	53.300	486.000	75.400	432.000	
均值	583.000	3 866.000	127.000	9 958.000	384.000	49.500	492.000	67.400	500.000	
s	43.600	560.000	24.900	629.000	63.400	6.330	43.400	9.780	78.300	
RSD/%	7.47	14.50	19.60	6.31	16.50	12.80	8.82	14.50	15.70	

头汤中主要毒性成分双酯型生物碱向主要药效成分单酯型生物碱转化的重要因素,不及则毒存,太过则效失。因此,本研究主要聚焦于煎煮时间的优化,根据煎煮各阶段的量值传递规律,科学调整煎煮时长,旨在找到既能有效保留药效成分,又能最大程度降低毒性成分的最佳煎煮时间,以期为乌头汤的临床应用提供更加安全和有效的制备工艺。

3.2 目标化合物的选择

乌头汤由川乌、麻黄、白芍、黄芪和甘草(炙)组成,化学成分复杂。本研究以《中国药典》2020年版收载这5味中药的质控指标为基础,参考相关文献,选取与乌头汤不良反应及药效密切相关的关键化学成分作为检测对象。川乌是君药,主要发挥祛风散寒、温经止痛作用,其毒性成分和药效成分均为双酯型和单酯型生物碱^[24-25],值得重点关注。二者水解产物醇胺型生物碱几无毒性和活性,常被忽视,但其含量变化能反映双酯型和单酯型生物碱的水解程度和速度,对阐明乌头汤煎煮过程中的量值传递规律至关重要,需给予重视。塔拉萨敏和准噶尔乌头碱含量高且具有良好的抗风湿活性^[26],纳入定量监测目标物。

其余4味中药的化学成分也具良好药理活性。麻黄中麻黄碱、伪麻黄碱可发汗散寒,牡荆素具有抗炎活性^[9];白芍中单萜苷类成分对类风湿性关节炎疗效好^[10-11],除芍药苷外,氧化芍药苷和苯甲酰芍药苷活性较好^[27];黄芪补气升阳,皂苷类是其主要活性成分,芒柄花苷含量高且与药效相关^[28];甘草中芹糖异甘草苷含量高,能提高机体免疫力^[29],常用于质量控制^[30]。甘草素、芹糖甘草苷、芍药内酯苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素等成分作为苷元或同分异构体,活性良好且在煎煮过程中可能转化为目标待测物。为全面阐明乌头汤煎煮全程的量值传递规律,需将这些成分纳入定量测定目标物。

3.3 UHPLC-ESI-MS/MS 方法的优化

本研究采用UHPLC-ESI-MS/MS法对乌头汤中29种化学成分进行定量分析。因部分成分结构与性质差异大,难以在同一条件下准确定量,故需优化色谱条件。乌头汤中部分成分结构相似、存在同分异构体,如麻黄碱与伪麻黄碱等3对异构体,普通HPLC难以良好分离,影响定量准确性。UHPLC可提高分离度和灵敏度,降低溶剂消耗,缩短运行时间,故本研究采用UHPLC分离目标成分。

以麻黄碱与伪麻黄碱为例,二者为对映异构

体,其化学结构差异仅在羟基所连接的碳原子的立体构型不同,化学性质非常相似,极性差异甚微,查询文献发现,目前欲完全分离麻黄碱与伪麻黄碱,色谱方法的运行时间多在30 min以上^[31-32]。由于麻黄碱与伪麻黄碱是亲水性成分,在设计色谱梯度时,拉长了高水相梯度的运行时间,在流动相中加入0.1%甲酸,有利于化学成分的离子化,最终仅用11 min实现了对麻黄碱与伪麻黄碱的良好分离,同时其余27种成分色谱峰峰形良好,且分离度均符合要求。

本研究优化后的分析方法针对各化学成分的定量限均较低,如新乌头碱的定量限为1.00 pg/mL,远低于文献的定量限160 pg/mL^[16];次乌头原碱的定量限也低至1.00 pg/mL,远低于文献中的3.20 ng/mL^[33];结构稳定不易击碎的皂苷类成分,如黄芪甲苷,其定量限为2.50 ng/mL,同样远低于文献中的112.5 ng/mL^[34],表明当前方法更为灵敏,适合复杂中药体系中微量乃至痕量组分的测定。

3.4 量值传递规律及制备工艺优化

由表5可知,9批乌头汤中均可检出5味中药中的化学成分,表明当前制备工艺能够实现化学成分由饮片至汤剂的转移,例如检出了微量双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱和新乌头碱以及在汤剂中大量存在的麻黄碱、芍药苷和甘草酸等成分。本研究中9批乌头汤煎煮液中大部分化学成分的批间RSD值小于20%,但3种双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱和脱氧乌头碱)、1种单酯型生物碱(苯甲酰乌头原碱)和3种单萜类成分(芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷)共7种成分测定结果的RSD值介于20.80%~30.50%。究其原因,对于3种双酯型生物碱而言,其在煎煮过程中表现出热不稳定性,容易发生水解^[35];另外这些成分在煎煮液中的含量均较低(低于1 μg/g),煎煮体系微小的变化均可能导致其RSD值的差异。众所周知,双酯型生物碱是乌头汤中的主要毒性成分,也是通过煎煮要大大降低其含量的目标化合物群,值得注意的是,虽然这些成分的批间差异较大,但其绝对含量均已控制在安全阈值以下,充分保证了该汤剂的用药安全性。苯甲酰乌头原碱作为双酯型生物碱的水解产物,其含量变化具有典型的动态平衡特征。在煎煮过程中,它既是乌头碱的水解产物,又可进一步水解为乌头原碱^[35]。这种双向转化反应导致其含量处于动态变化状态,从而增大了其批间差异。对于芍药苷、

芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷等白芍中的重要化学成分,芍药苷在受热条件下也会发生水解反应,转化为芍药内酯苷或苯甲酰芍药苷^[36-37]。在包括一煎和二煎的整个煎煮过程中,芍药苷与苯甲酰乌头原碱从药材中溶出,同时受热发生部分降解,使得这些成分的差异相应增大。本研究通过煎煮过程的含量监控,测得这 7 种成分的含量差异较大,一方面证实了重点关注这些化合物在煎煮过程中含量动态变化的必要性,另一方面也表明煎煮工艺优化的必要性。

在保证工艺优化后乌头汤质量稳定可靠的同时,其安全性与有效性是本研究的重点。众所周知,乌头汤君药川乌中的双酯型生物碱若剂量过大可产生严重的不良反应^[4-6],本研究在优化后的乌头汤中检测到双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱和新乌头碱质量分数分别为(0.221±0.067)、(0.421±0.144)、(0.596±0.099) μg/g,三者总量为(1.238±0.310) μg/g,按照《中国药典》2020 年版规定,成人每日使用制川乌的最大值 3 g 计,双酯型生物碱总量不超过 4.56 μg,远低于人体产生毒性反应的最低剂量 200 μg^[38],表明工艺优化后的乌头汤能够确保其安全性。本研究所选与乌头汤药效密切相关的成分单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的质量分数分别为(46.100±9.570)、(53.600±8.800)、(354.000±23.300) μg/g,三者总量为(453.700±41.670) μg/g。这一数值不仅高于中国食品药品检定研究院发布的含制川乌制剂(如小活络丸)的含量标准,还略高于文献中按照临床常用制法制备乌头汤的测得值(266.0±11.3) μg/g^[39]。这一结果表明,工艺优化后乌头汤的有效性符合同类制剂规定,且在原工艺的基础上有所提升。其他有效成分如芍药苷和甘草酸等,其质量分数均稳定在 9 000~11 000 μg/g,亦高于其发挥抗炎活性的有效剂量^[40-41]。

综上,当前优化确定的工艺稳定,能够获得质量均一的乌头汤,还能够在保证安全性的同时发挥良好疗效,打消临床使用乌头汤对其毒性的疑虑,为乌头汤的广泛应用奠定基础。

4 结论

本研究通过文献检索,参考乌头汤各药味化学成分煎煮转化规律,选择与疗效和不良反应密切相关的 29 种成分作为目标化学成分,建立、优化并验证了灵敏性、专属性、准确性的 UHPLC-ESI-

MS/MS 法,应用于现代临床常用乌头汤煎煮制备全程的含量监测,以分析其量值传递规律,优化制备工艺。最终工艺起始于《中国药典》2020 年版,制川乌加水先煎 90 min,再下麻黄、白芍、黄芪和蜜炙甘草一煎 60 min,二煎 30 min,合并 2 次药液,即得。采用该优化工艺平行制备 9 批乌头汤,证实当前工艺稳定,能够获得质量均一的乌头汤,在保证安全性的同时可发挥良好疗效。

本研究基于乌头汤化学成分动态变化规律建立的工艺优化,不仅为其安全性和有效性提供了技术保障,更对中药复方现代化研究具有重要的参考意义。然而,中药复方的作用机制具有多成分、多靶点的特点,未来研究仍需结合毒理学评价和药效学验证,通过“成分-毒性-药效”关联分析,系统阐明乌头汤的量效关系和毒效阈值,为其临床安全有效的应用奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 汉·张仲景撰.何任,何若苹整理.金匱要略[M].北京:人民卫生出版社,2005:19.
- [2] 温桂荣.乌头汤治疗杂病临证心得[J].中医杂志,2013,54(12):1058-1060.
- [3] Han L, Yan J H, Li T T, et al. Wutou Decoction alleviates arthritis inflammation in CIA mice by regulating Treg cell stability and Treg/Th17 balance via the JAK2/STAT3 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 334: 118463.
- [4] 王金勇.乌头类中药呼吸系统体内外毒作用研究[D].成都:四川大学,2007.
- [5] Guo Y J, Yao J J, Guo Z Z, et al. HBB contributes to individualized aconitine-induced cardiotoxicity in mice via interfering with ABHD5/AMPK/HDAC4 axis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(6): 1224-1236.
- [6] Yang Y, Zhang Z X, Liu C, et al. Reflections on the aconitine poisoning[J]. *J Forensic Sci*, 2021, 66(5): 2035-2040.
- [7] Shen P, Lin W J, Huang Y, et al. Wutou Decoction attenuates rheumatoid arthritis in rats through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF-κB pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 3): 118921.
- [8] 王丹华,刘春芳,谭淑芳,等.乌头汤对大鼠的镇痛作用及初步机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):109-112.
- [9] 王如峰,糜迪,吴秀稳,等.金莲花中四种主要成分的抗炎活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(9):2115-2116.
- [10] Huang L C, Hu S Q, Shao M Y, et al. Combined *Cornus officinalis* and *Paeonia lactiflora* Pall. therapy alleviates

- rheumatoid arthritis by regulating synovial apoptosis via AMPK-mediated mitochondrial fission [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 639009.
- [11] Peng J E, Lu X R, Xie K L, *et al.* Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of paeony [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 204.
- [12] 李文, 杨晓琴, 章津铭, 等. 甘草酸和甘草苷对乌头碱诱导斑马鱼心脏毒性的拮抗作用 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3): 55-58.
- [13] 刘洪, 钟凌云, 邓延文, 等. 不同附子炮制品四逆汤化学成分及毒性差异分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1397-1410.
- [14] 杨洁红, 张宇燕, 万海同, 等. 附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 439-444.
- [15] Zhang L, Yu J, Wang C, *et al.* The effects of total glucosides of paeony (TGP) and paeoniflorin (Pae) on inflammatory-immune responses in rheumatoid arthritis (RA) [J]. *Funct Plant Biol*, 2019, 46(2): 107-117.
- [16] 毛霞. 乌头汤缓解类风湿性关节炎寒证的关键药效物质基础及其作用机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [17] 狄舒男, 周妍妍, 王涛, 等. 乌头汤对 CIA 大鼠血清相关细胞因子水平的影响 [J]. *中医药学报*, 2016, 44(5): 50-52.
- [18] Lin W J, Shen P, Huang Y, *et al.* Wutou Decoction attenuates the synovial inflammation of collagen-induced arthritis rats via regulating macrophage M1/M2 type polarization [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115802.
- [19] Yan B Z, Luo D, Li J C, *et al.* Molecular mechanism of Wutou Decoction in the treatment of osteoarthritis: A bioinformatics and molecular docking study [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(7): 7706-7720.
- [20] 张树峰, 宋素英. 《伤寒论》甘草炙法探讨 [J]. *河南中医*, 1987, 7(6): 13.
- [21] 吴世强, 种月荣, 石勇强. 甘草的多法炮制及历史考证 [J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(1): 36.
- [22] 段君, 许海, 沈峰. 甘草古今炮制方法考证及饮片质量研究现状 [J]. *实用中医药杂志*, 2022, 38(9): 1655-1658.
- [23] 王孝涛主编. 薛庆海, 白洁, 姚红编著. 中药饮片炮制与临床组方 [M]. 北京: 金盾出版社, 2010: 102.
- [24] Wang J, Zheng S J, Li Y, *et al.* Investigate the effect of honey on the absorption of seven active ingredients from wu-Tou decoction in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36(4): e5323.
- [25] 李国卫. 乌头汤配伍减毒及对 RA-HFSL PI3K/AKT 信号通路调控的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [26] 木卡代斯·斯依提. 基于细胞膜色谱法的新疆准噶尔乌头生物碱及水解产物的药理活性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.
- [27] 张树蓉, 赵宏芬, 佟沫儒, 等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(16): 5215-5224.
- [28] 张淑娟, 张育贵, 李东辉, 等. 基于指纹图谱和多指标定量的蜜炙黄芪饮片质量控制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3081-3088.
- [29] 龚雪, 刘海亮. 芹糖异甘草苷对小鼠免疫功能的影响及抗肿瘤作用 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2023, 44(1): 15-23.
- [30] 李欢欢, 林丽, 郭爽, 等. 基于网络药理学及定性定量研究的甘草质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2680-2688.
- [31] 曹蓉蓉, 王文金, 严筱楠, 等. 麻杏止咳糖浆的薄层色谱法鉴别及高效液相色谱法测定其中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷 [J]. *化学分析计量*, 2021, 30(8): 46-49.
- [32] 陈璐, 何羽. 高效液相色谱法测定黔产丽江麻黄中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量 [J]. *中国药物经济学*, 2023, 18(3): 101-105.
- [33] 代珊, 朱红梅, 李帅, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同附子炮制品中 14 种生物碱 [J]. *中成药*, 2022, 44(4): 1198-1203.
- [34] 刘蓬蓬, 单国顺, 张凡, 等. UPLC-MS 比较有机酸定向炮制黄芪中 12 种活性成分的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 113-118.
- [35] 王峰峰, 宋兆辉, 张兰兰, 等. 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱水解和醇解产物的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(11): 1564-1569.
- [36] 王秋艳, 王世新, 隋方宇, 等. 白芍活性成分、药理作用及成分变化的影响因素研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(5): 1817-1829.
- [37] 徐攀, 胡轶娟, 占靓卉, 等. 白芍单萜苷成分与生物合成相关基因的时空表达特性及其相关性研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(11): 1490-1498.
- [38] 侯家玉, 方泰惠. *中药药理学* [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 114.
- [39] 吴成凤, 李国卫, 王樟根, 等. LC-MS/MS 法同时测定乌头汤中乌头碱型生物碱含量 [J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(6): 833-837.
- [40] Ruan Y L, Ling J Y, Ye F, *et al.* Paeoniflorin alleviates CFA-induced inflammatory pain by inhibiting TRPV1 and succinate/SUCNR1-HIF-1 α /NLPR3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108364.
- [41] Yu J Y, Ha J Y, Kim K M, *et al.* Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13041-13054.

[责任编辑 郑礼胜]