

秦巴山区马兜铃科两种常用药材中马兜铃酸含量分析

赵 桦, 吴梦茹

(陕西理工学院·生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

摘要:目的 分析测定秦巴山区产细辛 *Aristolochia sieboldii* Miq. 和汉中防己 *A. heterophylla* Hemsl. 两种药材中马兜铃酸 A 的含量。方法 色谱柱: Agilent ODS (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相: 甲醇-乙腈-1% 冰乙酸 (47: 17: 36); 流速 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 检测波长 315 nm。结果 细辛中马兜铃酸 A 的平均含量为 74.1 $\mu\text{g/g}$, 汉中防己中马兜铃酸 A 的平均含量为 2.14 mg/g。结论 汉中防己中的马兜铃酸 A 含量是细辛中马兜铃酸 A 含量的 30 倍左右。

关键词: 细辛; 汉中防己; 马兜铃酸 A; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1008-0805(2009)06-1387-02

细辛为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag., 华细辛 *A. sieboldii* Miq. 的干燥全草, 主要分布于辽宁、吉林、黑龙江、陕西、山东等省。临床上用于祛风散寒, 通窍止痛, 温肺化痰^[1]。汉中防己为马兜铃科马兜铃属异叶马兜铃 *Aristolochia heterophylla* Hemsl. 的干燥根, 生于山坡灌丛中, 主产于陕西。原植物为缠绕藤本, 高 2~3 m, 根圆柱形, 长 8~15 cm, 直径 2~5 cm, 有香气, 外皮黄棕色或灰褐色。性寒, 味苦, 能祛风, 利湿, 镇痛, 用于水肿、小便不利、风湿痹痛等症。

近年来, 马兜铃科植物体含有的马兜铃酸引起肾脏损害的临床报道和毒理研究受到广泛重视, 许多研究报告对一些常用的含马兜铃酸药材进行了分析^[2-7], 为这些药材的临床使用提供科学依据。由于植物体内的化学成分含量与生长环境有密切的关系, 不同产地的同一种药材化学成分存在一定的差异, 在现有的报道中, 不同产地的细辛所含马兜铃酸 A 的量差异也较大^[8-15]。秦巴山区有丰富的药用植物资源, 但含马兜铃酸药材的分析研究还较少。本文选用产于秦巴山区的两种含马兜铃酸的常用药材细辛和汉中防己, 分析其药用部位马兜铃酸的含量, 为药用资源的开发利用以及常用药材的安全使用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 紫外分光光度计 (TU-1221), 高效液相色谱仪 (Agilent 1200), 微型植物试样粉碎机 (FZ102), 电子天平, 索氏提取仪, 三用电热恒温水箱。

1.2 材料 本实验所用实验材料华细辛 (原植物为华细辛 *A. sieboldii* Miq. 全草) 和汉中防己 (原植物为异叶马兜铃 *A. heterophylla* Hemsl. 干燥根) 产自陕西汉中, 均由陕西省汉中市药品检验所提供。

1.3 试剂 马兜铃酸 A 对照品购自中国药品生物制品鉴定所 (批号: 110746-200406); 乙腈为色谱纯, 甲醇, 分析纯, 西安化学试剂厂; 乙醚, 分析纯, 天津市化学试剂六厂; 水为纯化水; 3.6% 硫酸溶液; 0.5% 氢氧化钠溶液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 高效液相色谱仪 (Agilent 1200); 色谱柱: Agilent ODS (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm, Agilent); 流动相: 甲醇-乙腈-1% 冰乙酸 (47: 17: 36); 流速 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 检测波长 315 nm。进样量: 20 μl , 保留时间: 12 min。

2.2 实验材料准备 用微型植物试样粉碎机分别粉碎细辛和汉中防己两种药材, 按照《中国药典》操作, 药材粉末过 40 目筛,

盛于洁净干燥的广口瓶中备用。

2.3 对照品溶液的制备 用电子天平精密称取马兜铃酸 A 标准品 7.5 mg, 用甲醇定容至 25 ml 的容量瓶中 ($C=0.3$ mg/ml)。摇匀, 再精密吸取 0.5 ml 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 使其成为 15 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

2.4 供试品溶液的制备 用电子天平精密称取汉中防己药材粉末 1 g, 置于 150 ml 索氏提取仪中, 加入适量的甲醇, 加热回流 5h。将提取液回收至干, 用 15 ml 0.5% NaOH 溶液, 使其完全溶解, 转至分液漏斗中, 调 pH=10, 用乙醚萃取两次, 15 ml/次。萃取后的碱液, 用 3.6% 的硫酸溶液调 pH=2, 再用乙醚萃取 4 次, 15 ml/次, 合并萃取液, 水浴蒸干, 用甲醇定容于 150 ml 容量瓶中备用。

用电子天平精密称取细辛药材粉末 5 g, 置于 150 ml 索氏提取仪中, 用上述方法进行提取, 纯化后用甲醇定容至 50 ml 容量瓶中备用。

2.5 检测波长的测定 取马兜铃酸 A 标准品储备液, 在 200~400 nm 波长范围内扫描, 在 390, 315 nm 处有最大吸收峰。高效液相色谱实验结果表明, 在 315 nm 处干扰弱, 灵敏度高, 因此选择 315 nm 作为检测波长。

2.6 线性关系的考察 分别吸取浓度为 15 $\mu\text{g/ml}$ 的马兜铃酸 A 标准品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μl 进入高效液相色谱仪中进行分析。以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为 $Y=28.804X-1.12$, 相关系数 $r=0.999958$, 表明马兜铃酸 A 在 0.075~0.375 μg 范围内进样量和峰面积值呈现良好的线性关系。见图 1。

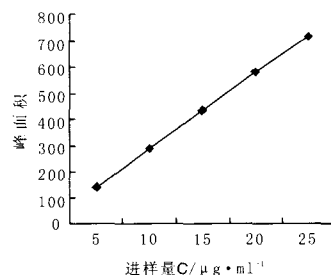


图 1 马兜铃酸 A 标准曲线图

2.7 精密实验 精密吸取浓度为 15 $\mu\text{g/ml}$ 的马兜铃酸 A 标准品储备液 20 μl , 注入高效液相色谱仪中分析。连续进样 5 次, 计算峰面积的 RSD 值为 0.6%。

2.8 稳定性实验 取细辛和汉中防己的均匀供试品溶液各一份, 室温放置, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 20 ml 测定, 样品在 10 h 内稳定。细辛和汉中防己供试品溶液的峰面积的 RSD 值分别为 2.0% 和 0.28%。

2.9 重复性实验 取同一批细辛和汉中防己药材, 按供试品溶

收稿日期: 2008-06-25; 修订日期: 2008-08-29

基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划项目资助 (No. 07JK214)

作者简介: 赵桦 (1957-), 男 (汉族), 陕西汉中人, 现任陕西理工学院教授, 硕士学位, 主要从事药用植物研究工作。

液的制备方法平行制备 5 份供试品溶液,进样 20ml 测定。计算其马兜铃酸 A 含量的 RSD 值分别为 0.8% 和 3.7%。

2.10 回收率实验 采用加样回收率法,精密吸取质量浓度已知的马兜铃酸 A 样品及细辛、汉中防己供试液,将其等体积混合,然后注入高效液相色谱仪中分析,重复做 5 次,进行回收率测定。结果显示,细辛的平均回收率为 100.6%,RSD 值为 1.1%;汉中防己的平均回收率为 99.6%,RSD 值为 1.81%。

2.11 样品的测定 分别称取细辛 5 g 和汉中防己 1 g,按“2.4”方法制备供试品溶液,与对照品同样色谱条件下测定。色谱图见图 2~4。

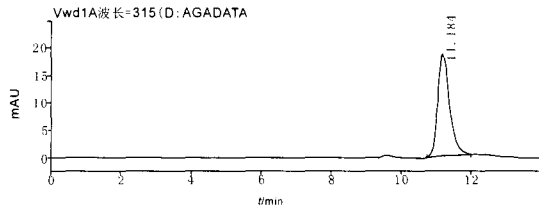


图 2 标准品的 HPLC 图谱

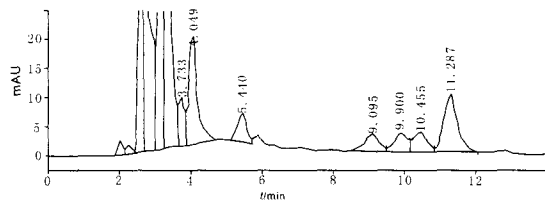


图 3 细辛样品的 HPLC 图谱

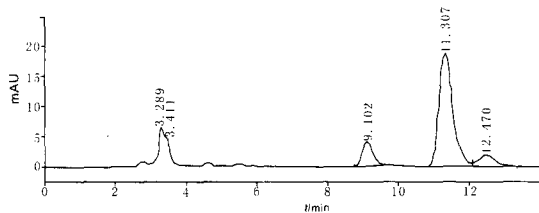


图 4 汉中防己样品的 HPLC 图谱

2.1.2 药材中马兜铃酸 A 的含量 经检测实验结果为:细辛中马兜铃酸 A 的平均含量为 74.1 $\mu\text{g/g}$,汉中防己中马兜铃酸 A 的平均含量为 2.14 mg/g 。结果见表 1。

表 1 细辛和汉中防己中马兜铃酸 A 的含量

细辛样品序号	含量	平均含量	汉中防己样品序号	含量	平均含量
	$C/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$			$C/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
1	74.3	74.1	1	2.22	2.14
2	73.8		2	2.08	
3	74.2		3	2.12	

n=3

在现有文献中,不同产地细辛中马兜铃酸 A 的含量变化较大。姜旭等^[7]报道其含量范围在 0~351 $\mu\text{g/g}$ 之间,其中华细辛平均含量为 145 $\mu\text{g/g}$ 。在李琳等^[2]的报道中,华细辛中的马兜

铃酸 A 含量为 0.178%。相比之下,本实验检测的产于秦巴山区的华细辛马兜铃酸 A 含量较低。

分析结果同时表明,产于秦巴山区的汉中防己中马兜铃酸 A 含量较高,其含量是华细辛中马兜铃酸 A 含量的 30 倍左右。

3 讨论

3.1 实验方法对含量测定的影响 细辛药材中只含有微量马兜铃酸 A,必须采用灵敏度高的方法才能检测到。文献中曾采用薄层色谱法,没有检测到马兜铃酸 A,可能是由于灵敏度较低的缘故。为了提高灵敏度,采用吸光度较高的波长是有利的,马兜铃酸 A 在紫外区的两个吸收峰,以 390 nm 为最灵敏,但是却存在较大的干扰,本实验兼顾灵敏度和专属性,选用 315 nm 为检测波长。

3.2 供试样品制备法对含量测定的影响 在制备细辛和汉中防己供试样品提取液时,由于药材中含有木兰碱、马兜铃内酰胺、青木香酸等多种杂质,会干扰实验结果,因此,我们根据马兜铃酸 A 可溶于碱的原理,在碱液中用乙醚萃取除去杂质后,分离效果较好。碱化时碱性要达到 pH=10,否则马兜铃酸 A 不能完全溶解,酸化时酸性要达到 pH=2,否则马兜铃酸 A 不能完全析出,萃取不完全。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005:159.
- [2] 李琳,王智民,高惠敏等. 含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):11.
- [3] 路军章,孙艳,魏锋. HPLC-MS 用于中药马兜铃中 6 种马兜铃酸类成分的检测[J]. 解放军药学报,2005,21(3):204.
- [4] 英锡相,袁昌鲁,曲贤广,等. 11 种中药材及 3 种中成药马兜铃酸的含量测定[J]. 辽宁中医杂志,2003,30(5):404.
- [5] 张兰桐,崔晓红,袁志芳,等. RP-HPLC 法测定中药材及其制剂中马兜铃酸 A 的含量[J]. 药物分析杂志,2003,23(3):215.
- [6] 赵辉,刘绣华. 马兜铃属药用植物研究概况[J]. 河南大学学报,2003,33(4):73.
- [7] 姜旭,王智民,由丽双,等. RP-HPLC 测定不同产地青木香和细辛中马兜铃酸 A 的含量[J]. 中国中药杂志,2004,29(5):408.
- [8] 高钧,李伟,魏峰. 高效液相色谱法测定华细辛中马兜铃酸 A 含量[J]. 中国药学杂志,2005,40(2):1579.
- [9] 郝旭亮,倪艳,李先荣. HPLC 测定不同产地和品种细辛药材中马兜铃酸的含量[J]. 中成药,2006,28(8):1209.
- [10] 何曙光,罗清,邵忙收,等. 细辛中马兜铃酸的含量测定研究[J]. 陕西中医学院学报,2006,29(2):60.
- [11] 吴艳蓉,贾凌云,高福坤,等. 不同产地辽细辛中马兜铃酸的痕量检测[J]. 中药研究与信息,2005,7(1):9.
- [12] 吴艳蓉,王宇杰,孙启时. 辽细辛果实中马兜铃酸 A 的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(5):288.
- [13] 徐玫,敬永升,李景华. 细辛中马兜铃酸含量测定[J]. 河南大学学报,2005,24(4):31.
- [14] 徐玫,李景华. 细辛不同部位的马兜铃酸及挥发油含量研究[J]. 药物研究,2007,16(10):29.
- [15] 黄顺旺. 北细辛中不含马兜铃酸的薄层色谱法鉴别[J]. 安徽医药,2003,7(4):299.