

高效液相色谱法测定马蹄香中马兜铃酸 A 含量

赵 桦, 江 海

(陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘 要: 用高效液相分析方法, 测定了马蹄香植物体不同部位中马兜铃酸 A 的含量。结果表明, 马兜铃酸 A 主要存在于马蹄香的地下根及根茎部分, 地上茎中含量极少, 叶中不含马兜铃酸 A。在根及根茎中马兜铃酸 A 的含量为 0.165%~0.198%, 茎中含量为 0.012%~0.023%。与马兜铃科其他植物比较, 马蹄香植物体中马兜铃酸 A 的含量较高。

关键词: 马蹄香; 马兜铃酸 A; HPLC

中图分类号: Q946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)04-0548-04

Determination of aristolochic acid A in *Saruma henryi* by HPLC

ZHAO Hua, JIANG Hai

(Shaanxi University of Technology, Bio-Resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China)

Abstract: Content of aristolochic acid A from *Saruma henryi* has been determined by HPLC. The result indicated that aristolochic acid A mainly exists in the root and the rhizome part of *S. henryi*. The stem had extremely few aristolochic acid A and there are not aristolochic acid A in the leaf. The content of aristolochic acid A in root and rhizome is 0.165%~0.198%, and 0.012%~0.023% in the stem. Comparing with other species of Aristolochiaceae, *S. henryi* had the higher content of aristolochic acid A.

Key words: *Saruma henryi*; Aristolochic acid A; HPLC

马蹄香(*Saruma henryi*)为马兜铃科马蹄香属植物,是我国特有单种属植物,广泛分布于陕西、四川、贵州、湖北、江西河南、甘肃等省(傅立国等, 2000)。马蹄香为多年生草本,其干燥的根及根茎在民间药用,习称马蹄香、冰水丹、高脚细辛、马头细辛。具有温中散寒,理气止痛之功效(江苏新医学院, 1986; 谢宗万等, 1996)。

马兜铃酸类化合物主要存在于马兜铃属与细辛属植物中。早期研究发现马兜铃酸类化合物具有抗肿瘤活性和增强机体白细胞的吞噬作用(何曙光等, 2006)。随着研究的深入,人们发现临床上大量和长期服用含马兜铃酸的药物可引起肾衰,被称为“马兜

铃酸肾病”(Aristolochis Acid Nephropathy, AAN)。近年来,已有不少因服用过量含马兜铃酸 A 的药物而导致肾衰竭的病例,引起了国内外医学界的广泛关注(王宁生, 2001)。彭强等(2005)曾经报道过在马蹄香植物体中含有马兜铃酸 A,但有关马兜铃酸 A 在马蹄香植物中的分布及含量变化至今未见报道。本文采用高效液相色谱分析法,首次测定了马蹄香植物的不同生长部位,即根及根茎、茎、叶中马兜铃酸 A 的含量,分析马蹄香植物不同生长部位中马兜铃酸 A 含量的变化。通过实验研究,为马蹄香的临床用药提供科学依据,以保证药效最好而毒效最低。

收稿日期: 2008-05-25 修回日期: 2008-11-18

基金项目: 陕西省教育厅专项基金(07JK214)[Supported by the Scientific Research Foundation of Education Department of Shaanxi Province (07JK214)]

作者简介: 赵桦(1957-),男,陕西汉中市人,教授,主要从事药用植物研究, (E-mail) zhaohuahz@sntu.edu.cn.

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 索氏提取器, SL202N 型电子天平(上海明桥精密科学仪器有限公司), FZ102 微型植物粉碎机(河北黄骅市中兴有限责任公司), PYX-DHS-35X40 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。马兜铃酸 A 对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 110746-200406)。乙腈为色谱纯, 甲醇、乙醚等其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

试验用马蹄香材料于 2004、2005、2006 年每年 6 月中旬, 分别采集于陕西省留坝县和镇巴县, 晾干备用。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS(4.6 mm×100 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-5% 的冰醋酸(60:40); 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L; 监测波长 315 nm。

2.2 检测波长的确定

取马兜铃酸 A 对照品储备液稀释浓度至 0.020 mg/mL, 在 200~400 nm 波长范围内扫描。扫描结果表明, 在 390 nm 和 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 为检测波长。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液制备 精确称取马兜铃酸 A 对照品 5 mg, 于 25 mL 的容量瓶中加入甲醇溶解定容, 得 200 μ g/mL 的储备液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精确称取经 60 $^{\circ}$ C 干燥的马蹄香植物不同部位(根及根茎、茎、叶)样品粉末 1.00 g, 置 100 mL 索氏提取器中, 加入 100 mL 甲醇溶液在恒温水浴锅提取 5 h, 再定容于 100 mL 容量瓶中。由于马蹄香茎、叶中含有较多叶绿素, 为了排除干扰将它们的提取液萃取分离。将提取液回收至干, 再用 15 mL 0.5% NaOH 溶液, 使其完全溶解, 转至分液漏斗中, 调至 pH10, 用乙醚萃取 2 次, 每次 15 mL。萃取后的碱液, 用 3.6% 的硫酸溶液调至 pH2, 用乙醚萃取 4 次, 每次 15 mL, 合并萃取液, 水浴蒸干, 用甲醇定容于 100 mL 容量瓶中备用

(刘燕等, 1990; 谭睿等, 2005)。

3 实验结果

3.1 方法学考察

3.1.1 线性关系考察 分别吸取浓度为 20 μ g/mL 的马兜铃酸 A 标准品溶液 5、10、15、20、25 μ L 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 $r=0.99958$, 表明马兜铃酸 A 在 0.1~0.5 μ g 范围内进样量和峰面积值呈现良好的线性关系。

3.1.2 精密度试验 精密吸取质量浓度为 20 μ g/mL 的马兜铃酸 A 的对照品溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪中分析, 连续进样 5 次, 马兜铃酸 A 峰面积的 RSD 值为 1.55%。

3.1.3 重现性试验 精密称取马蹄香根及根茎同一批号样品 5 份, 制备供试品溶液, 进样 20 μ L 测定, 测得马兜铃酸 A 的 RSD 值为 1.86%。

3.1.4 稳定性试验 取马蹄香根及根茎同一供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、12h 进样 20 μ L 测定, 样品在 12 h 内稳定。供试液的峰面积的 RSD 值为 1.58%。

3.1.5 回收率试验 采用加样回收率法, 精密吸取质量浓度已知的马兜铃酸 A 样品及马蹄香根及根茎供试液, 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, 平均回收率为 105%, RSD 值为 1.81%。

3.2 样品含量测定

分别取马蹄香供试样溶液过滤, 吸取 20 μ L 注入高效液相色谱仪分析。根及根茎分别取 3 年材料各 3 批、茎和叶分别取 3 年材料各 3 批的样品进行测定。结果表明, 马兜铃酸 A 主要分布于马蹄香植物的根及根茎部位, 地上部位茎中含量较低, 而叶中不含马兜铃酸 A。在根及根茎中马兜铃酸 A 的平均含量为 0.184%, 茎中平均含量为 0.018%。检测数据见表 1, 对照品和供试品的 HPLC 图见图 1~4。

4 讨论

通过实验得知, 马兜铃酸 A 主要存在于马蹄香植物的根及根茎部位, 平均含量为 0.184%, 在地上

表 1 马蹄香中马兜铃酸 A 的测定结果
Table 1 Content of aristolochic acid A in *Saruma henryi*

样品 Sample	浓度 Concentration (μg/mL)	含量 Content (%)	平均含量 Average content (%)
根及根茎 200401	19.051	0.191	0.188 (2004 年根及根茎)
根及根茎 200402	18.512	0.185	
根及根茎 200403	18.852	0.189	
根及根茎 200501	17.446	0.175	0.165 (2005 年根及根茎)
根及根茎 200502	16.432	0.164	
根及根茎 200503	15.574	0.156	
根及根茎 200601	19.950	0.199	0.198 (2006 年根及根茎)
根及根茎 200602	19.667	0.198	
根及根茎 200603	19.730	0.197	
根茎及根茎平均值: 0.184			
茎 200401	2.156	0.022	0.023 (2004 年茎)
茎 200402	2.419	0.024	
茎 200403	2.317	0.023	
茎 200501	1.853	0.019	0.018 (2005 年茎)
茎 200502	1.685	0.017	
茎 200503	1.795	0.018	
茎 200601	1.158	0.012	0.012 (2006 年茎)
茎 200602	1.143	0.011	
茎 200603	1.155	0.012	
茎平均值: 0.018			
叶 2004	—	—	
叶 2005	—	—	
叶 2006	—	—	

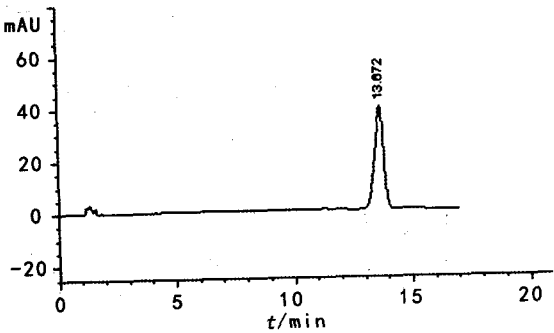


图 1 马兜铃酸 A 对照品的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of aristolochic acid A

部位茎中含量较低,平均含量为 0.018%,而在叶中不含马兜铃酸 A。马兜铃酸在马兜铃科植物体内的分布不尽相同,变化较大。在北马兜铃植物体中马兜铃酸 A 主要分布在的果实中(刘燕等,1990),在青木香中马兜铃酸 A 主要分布在的地下根部分(李琳等,2006),在天仙藤中马兜铃酸 A 主要分布在植物的茎中(刘燕等,1990;李琳等,2006)。在细心属

的华细辛中马兜铃酸 A 主要分布在根及根茎部位,在地上部位茎中含量较低,而叶中完全不含马兜铃酸 A(高钧等,2006;谢昭明等,2003;徐玫等,2005;何曙光等,2007)。

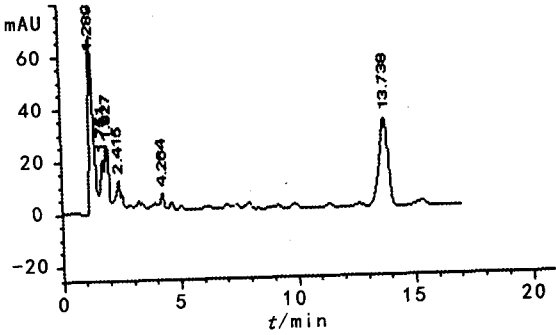


图 2 马蹄香根及根茎的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of the root and rhizome of *Saruma henryi*

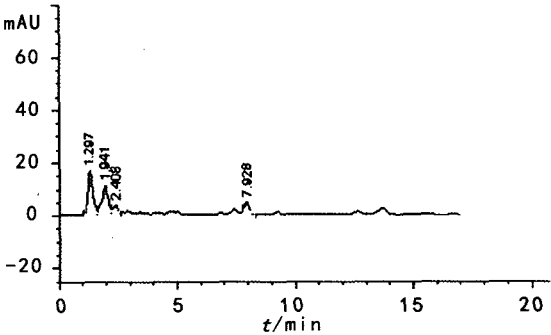


图 3 马蹄香茎的 HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms of the stem of *Saruma henryi*

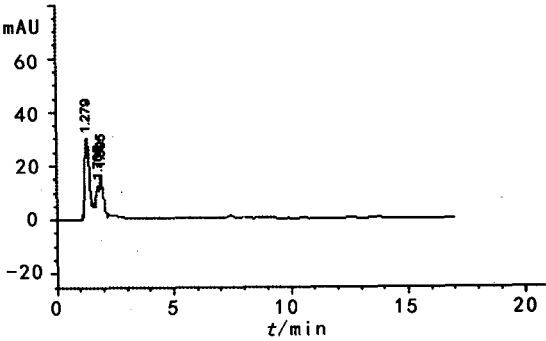


图 4 马蹄香叶的 HPLC 色谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms of the leaf of *Saruma henryi*

经高效液相测定分析,马兜铃酸 A 在马蹄香植物根在根中含量为 0.165%~0.198%,茎中含量为 0.012%~0.023%。与文献(刘燕等,1990;李琳等,2006;英锡相等,2003;高钧等,2006;何曙光等,2007)中记载的马兜铃科的其它植物中马兜铃酸 A 含量相比,马蹄香植物体中的马兜铃酸 A 含量偏高,见表 2。

表 2 部分中药材中马兜铃酸 A 的含量
Table 2 Contents of aristolochic acid A in
some traditional Chinese medicine

名称 Name	含量 Content (%)
马蹄香 <i>Radix Saruma henryi</i>	0.165~0.198
马兜铃 <i>Fructus Aristolochiae</i>	0.045~0.518
青木香 <i>Radix Aristolochiae</i>	0.0009~0.543
天仙藤 <i>Herba Aristolochiae</i>	0.0026~0.4030
关木通 <i>Caulis Aristolochia manshuriensis</i>	0.717~4.0106
汉中防己 <i>Radix Aristolochiae heterophylla</i>	0.503
广防己 <i>Radix Aristolochiae</i>	0.0068~0.4690
细辛 <i>Herba Asari</i>	0.0007~0.179

致谢 陕西理工学院生物科学与工程学院 2006 届学生张萍、李勇参加了本研究的部分实验工作,在此表示感谢!

参考文献:

傅立国,陈谭清,郎楷永,等. 2000. 中国高等植物(第三卷) [M]. 青岛:青岛出版社,337
江苏新医学院. 1986. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1 160
谢宗万,范催生,朱兆仪,等. 1996. 全国中草药汇编(下册) [M]. 第二版. 北京:人民卫生出版社,278
Gao J(高钧),Li W(李伟),Wei F(魏峰). 2005. Quantitative analysis of aristolochic acid A in *Asarum sieboldii* by HPLC(高效液相色谱法测定华细辛中马兜铃酸 A 含量)[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志),40(20):1 579—1 580
He SG(何曙光),Luo Q(罗清),Shao MS(邵忙收),et al. 2006.

Determination of aristolochic acid A contents in *Asarum*(细辛中马兜铃酸的含量测定研究)[J]. *Academic J of Shaanxi Chin Medicine*(陕西中医学院学报),29(2):60—62
Li L(李琳),Wang ZM(王智民),Gao HM(高惠敏),et al. 2006. Determination of total aristolochic acid in traditional medicines containing aristolochic acid by ultraviolet Spectrophotometry(含马兜铃酸类中药中马兜铃酸的含量)[J]. *Chin J Experimental Trad Med Formula*(中国实验方剂学杂志),12(2):11—13
Liu Y(刘燕),Wang BQ(王宝琴). 1990. Determination of aristolochic acid A contents in *Aristolochia* by HPLC(马兜铃中马兜铃酸 A 的 HPLC 测定)[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),21(6):15—16
Peng Q(彭强),Zhao H(赵桦),Zhang GZ(张国柱). 2005. Identification of the crude drugs of *Saruma henryi* Oliv. and differentiation from *Asarum sieboldii*(马蹄香的生药鉴定及其与华细辛的比较)[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),36(2):277—280
Tan R(谭睿),Shi XR(石雪蓉),Yang JM(杨金敏). 2005. Determination of aristolochic acid contents in the songshi capsule contenting 25 medicinal herbs by HPLC(HPLC 法测定二十五味松石胶囊中马兜铃酸的含量)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材),28(7):619—620
Xie ZM(谢昭明),Li SX(李顺祥),Liao HC(廖汉城). 2003. Determination of aristolochic acid A in *herba asari* by HPLC(HPLC 法测定细辛药材中马兜铃酸 A 的含量)[J]. *Central South Pharm*(中药学),1(3):38—40
Xu M(徐玫),Jing YS(敬永升),Li JH(李景华). 2005. Determination of aristolochic acid contents in different parts of *Asarum*(细辛中马兜铃酸含量测定)[J]. *Academic J Kaifeng Med Coll*(河南大学学报·医学版),24(4):31—33
Ying XX(英锡相),Yuan CL(袁昌鲁),QU XG(曲贤广),et al. 2003. Determination of aristolochic acid contents in 11 traditional Chinese medicines and 3 traditional Chinese patent medicines(11 种中药材及 3 种中成药马兜铃酸的含量测定)[J]. *Liaoning J Trad Chin Medi*(辽宁中医杂志),30(5):404
Wang NS(王宁生). 2001. The poisonous faction of aristolochic acid(马兜铃酸的毒性作用)[J]. *Trad Chin Drug Res Clinical Pharmacology*(中药新药与临床药理),12(6):394—395