

不同炮制方法对关木通减毒存效作用的比较

张春红^{1,2}, 曹蕊², 李虔全¹, 张娜¹, 张连学^{2*}, 李旻辉^{1*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014060; 2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

[摘要] 目的: 比较各种炮制方法对关木通减毒存效作用, 选择最佳的关木通炮制方法。方法: 以关木通生品及各炮制品中马兜铃酸 A、齐墩果酸及常春藤皂苷元含量为指标, 比较了 5 种炮制方法(醋炙、蜜炙、姜炙、碱制、盐炙)减毒存效效果。结果: 生品、醋炙品、蜜炙品、姜炙品、碱制品、盐炙品中马兜铃酸 A 含量分别为 0.27%, 0.13%, 0.15%, 0.20%, 0.14%, 0.18%; 齐墩果酸含量分别为 0.21%, 0.15%, 0.20%, 0.13%, 0.01%, 0.01%; 常春藤皂苷元含量分别为 0.11%, 0.08%, 0.09%, 0.07%, 0.01%, 0.01%。结论: 关木通最佳减毒存效炮制方法为蜜炙法。

[关键词] 炮制; 关木通; 减毒存效

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0149-04

Study on Toxicity Attenuation and Efficacy Reservation of Manchurian Dutchmanspipe Stem Following Different Processing Methods

ZHANG Chun-hong^{1,2}, CHAO Rui², LI Qian-quan¹, ZHANG Na¹, ZHANG Lian-xue^{2*}, LI Ming-hui^{1*}

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China;
2. Academy of Chinese Traditional Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** Study on toxicity attenuation and efficacy reservation of Manchurian Dutchmanspipe Stem following five different processing methods, and to collect best processing methods. **Method:** Five methods of processing herbs with vinegar, honey, ginger, alkali and salt were compared focusing on the optimal toxicity attenuation effect with content of aristolochic acid, hederagenin and oleanolic acid (OA) from Manchurian Dutchmanspipe Stem as evaluated index detected by RP-HPLC. **Result:** Content of aristolochic acid in raw herbs and the herbs processed with vinegar, honey, ginger, alkali and salt was as follows: 0.27%, 0.12%, 0.15%, 0.20%, 0.14%, 0.18%; content of oleanolic acid (OA) in raw herbs and the herbs processed with

[收稿日期] 2011-11-28

[基金项目] 吉林农业大学博士启动基金项目(2007011)

[第一作者] 张春红, 博士, 副教授, 从事中蒙药活性成分研究, Tel: 0472-7167795, E-mail: zchlhh@126.com

[通讯作者] * 张连学, 教授, 博士生导师, 从事 CAP 规范化种植及中药活性成分的研究, Tel: 0431-4533087, E-mail: zlxbooksea@163.com

* 李旻辉, 教授, 硕士生导师, Tel: 0472-7167795, E-mail: minhui@yahoo.cn

[2] 胡南, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(9): 1093.
[3] 赵亚南, 张卫明, 钱骅, 等. 栀子苷及其衍生物药理活性的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(1): 1.
[4] 孟宪波, 郑晖. HPLC 测定柴芍丸中芍药苷、栀子苷及丹皮酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 72.
[5] 孙丽荣, 曹雄, 侯凤青. 芍药苷研究进展[J]. 中国中药

杂志, 2008, 33(18): 2028.

[6] 肖琳, 李静, 孙文基. 毛细管电泳法测定青叶胆中獐牙菜苦苷和异牡荆素的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2040.

[7] 郑春英, 刘松梅, 李宏, 等. 毛细管电泳法同时检测刺五加叶中的芦丁和金丝桃苷含量[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 783.

[责任编辑 蔡仲德]

vinegar, honey, ginger, alkali and salt was: 0.21%, 0.15%, 0.20%, 0.13%, 0.01%, 0.01%; content of hederagenin in raw herbs and the herbs processed with vinegar, honey, ginger, alkali and salt was: 0.11%, 0.08%, 0.09%, 0.07%, 0.01%, 0.01% respectively. **Conclusion:** The honey processing was regarded as the optimal processing method for Manchurian Dutchmanspipe Stem.

[**Key words**] processing; Manchurian Dutchmanspipe Stem; toxicity attenuation and efficacy reservation

关木通具有泻热、降火作用,用于口舌生疮、小便短赤。主要含马兜铃酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元等成分,由于含马兜铃酸类中药引起马兜铃酸肾毒性问题近年来备受国内外医药界关注^[1-3]。

目前对关木通炮制减毒方面的报道较多,但炮制后有效成分的变化情况却未见报道。醋炙、蜜炙、姜炙、盐炙为中药常用的炮制方法,且有报道用于关木通炮制减毒^[4-5],碱制虽不是中药传统炮制方法,却能显著降低关木通中马兜铃酸从而起到减毒作用^[5],因此本文采用这 5 种炮制方法对关木通进行炮制,比较炮制前后毒性成分马兜铃酸 A,有效成分齐墩果酸和常春藤皂苷元变化情况^[3],从而探索关木通减毒存效的最佳炮制方法,为关木通及其制剂的安全使用提供参考。

1 材料

关木通购自长春市弘康医药药材有限公司,由吉林农业大学中药材学院张连学教授鉴定为马兜铃科植物东北马兜铃 *Aristolochia manshuriensis* Kom 的干燥藤茎;炮制品为同源关木通自制所得。

齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110709-200505),常春藤皂苷元对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111733-200502),马兜铃酸 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110746-200406)。色谱甲醇、冰醋酸和三乙胺,美国 Fisher 公司。

高效液相色谱仪(日本岛津),C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连江申分离科学技术公司),AUY220 型分析天平(中国余姚纪铭称重校验设备有限公司),KQ-250B 型超声清洗机(昆山超声仪器有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 炮制品的制备

2.1.1 醋炙品 精密称取关木通药材 50 g,取 20 mL 陈醋喷淋于药材表面,闷润至醋被药材吸尽(约 30 min),置沙锅内用文火炒至嗅得药材固有香味,冷却、干燥,捣碎备用。

2.1.2 蜜炙品 精密称取关木通药材 100 g,取炼

蜜 25 g,加适量开水稀释后淋入关木通药材饮片内拌匀,稍闷后置沙锅内用文火加热,炒至不粘手,表面深黄色,略具光泽,取出放凉,捣碎备用。

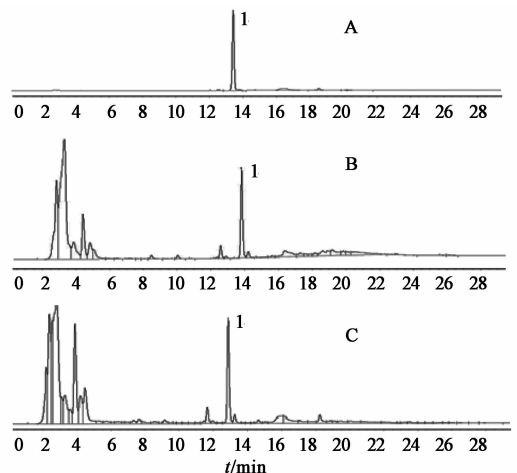
2.1.3 姜炙品 精密称取关木通药材 50 g,生姜片 10 g,加水搅匀,湿润,至沙锅内,加盖,添加水适量,用武火急煮至沸腾,沸后用文火缓煮,至干时,去火翻炒至汁吸尽,出锅晾干,除去姜片,干燥,捣碎备用。

2.1.4 碱制品 精密称取关木通药材 50 g,加入 0.01% NaHCO₃ 溶液充分拌匀,密闭,浸泡 3 次,每次 6 h,残渣置沙锅中用文火加热,炒至汁吸尽后,取出放凉,干燥,捣碎备用。

2.1.5 盐炙品 称取关木通药材 50 g,加入 12.5 g 粗盐,用适量清水(能够完全浸泡药材)溶化,与药物拌匀,闷润 5 min,置炒锅内用文火炒 5 min,取出冷却干燥,捣碎备用。

2.2 马兜铃酸 A 的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Century SIL C₁₈ BDS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 流动相甲醇 - 2% 冰醋酸进行梯度洗脱,甲醇在 15 min 内由 60% ~ 100%, UV 检测波长 319 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温室温,进样量 20 μL,见图 1。



A. 对照品; B. 生品; C. 蜜炙品; 1. 马兜铃酸 A

图 1 关木通炮制前后 HPLC

2.2.2 标准曲线的制备 精密称定马兜铃酸 A (AAI) 对照品 3.5 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定

容至刻度,得质量浓度为 $0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液,将其用甲醇稀释成 $0.014, 0.028, 0.056, 0.084, 0.112, 0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 6 个不同浓度,在 2.2.1 色谱条件下进样 $20 \mu\text{L}$ 。以峰面积为纵坐标 (Y),浓度为横坐标 (X),进行线性回归,得回归方程为 $Y = 5.44 \times 10^7 X - 1.79 \times 10^5$ ($r = 0.9995$),表明 AAI 在 $0.014 \sim 0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其峰面积呈良好线性关系。

2.2.3 稳定性试验 取关木通生品供试液,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进行测定,结果样品在 8 h 内稳定,马兜铃酸 A RSD 0.56%。

2.2.4 精密度试验 取关木通生品供试液,重复测定 5 次,结果马兜铃酸 A 的 RSD 0.68%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 加样回收率试验 取已知含量的关木通生品 0.5 g ,精密称定,加入适量马兜铃酸 A,按照供试品制备方法进行提取、测定,计算,结果马兜铃酸 A 的加样回收率为 99.75%,RSD 0.17%。见表 1。

表 1 关木通中马兜铃酸 A 加样回收率的测定

| No. | 称样量 /g | 样品含量 /mg | 加对照品 量/mg | 测得量 /mg | 加样回收 率/% | 平均加样 回收率 /% | RSD /% |
|-----|-----------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------------|-----------|
| 1 | 0.5006 | 1.362 | 1.00 | 2.359 | 99.78 | | |
| 2 | 0.5001 | 1.360 | 1.00 | 2.358 | 99.85 | | |
| 3 | 0.5009 | 1.362 | 1.00 | 2.355 | 99.49 | 99.75 | 0.17 |
| 4 | 0.5004 | 1.361 | 1.00 | 2.357 | 99.71 | | |
| 5 | 0.5005 | 1.361 | 1.00 | 2.360 | 99.93 | | |

2.2.6 样品中马兜铃酸 A 的测定 取样品粉末 1 g ,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇 20 mL ,浸泡 1 h ,超声处理 3 次,每次 15 min ,用甲醇定容至刻度,静置后取上清液,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过,取续滤液,在 2.2.1 色谱条件下,进样 $20 \mu\text{L}$,将峰面积代入回归方程计算其含量,见表 2。

表 2 炮制前后关木通中 AAI、OA 和 HED 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

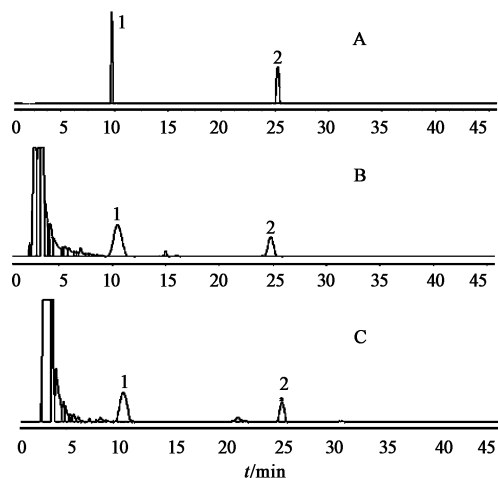
| 样品 | 马兜铃酸 A (AAI) | 齐墩果酸 OA | 常春藤皂苷元 HED |
|-----|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 生品 | 0.27 ± 0.0021 | 0.21 ± 0.0078 | 0.11 ± 0.00047 |
| 醋炙品 | $0.13 \pm 0.0014^{2)}$ | $0.15 \pm 0.0064^{1)}$ | 0.08 ± 0.0013 |
| 蜜炙品 | $0.15 \pm 0.0042^{2)}$ | 0.20 ± 0.0024 | 0.09 ± 0.0071 |
| 姜炙品 | $0.20 \pm 0.0036^{1)}$ | $0.13 \pm 0.0094^{1)}$ | $0.07 \pm 0.00037^{1)}$ |
| 碱制品 | $0.14 \pm 0.0014^{2)}$ | $0.01 \pm 0.0083^{2)}$ | $0.01 \pm 0.00092^{2)}$ |
| 盐炙品 | $0.18 \pm 0.0032^{1)}$ | $0.01 \pm 0.0072^{2)}$ | $0.01 \pm 0.00065^{2)}$ |

注:与生品的比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 齐墩果酸 (OA) 和常春藤皂苷元 (HED) 的

测定

2.3.1 色谱条件 Century SIL C₁₈ BDS 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 ($87:13:0.04:0.02$),UV 检测波长 210 nm 处,流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20 \mu\text{L}$ 。见图 2。



A. 对照品; B. 生品; C. 蜜炙品;

1. 齐墩果酸; 2. 长春藤皂苷元

图 2 关木通炮制前后的 HPLC 谱图

2.3.2 标准曲线的制备 精密称定 OA 对照品 8 mg 、HED 对照品 4 mg 于 25 mL 量瓶中,加色谱甲醇定容至刻度,分别吸取 $0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \text{ mL}$ 至 5 mL 量瓶,并用色谱甲醇定容,得 OA 对照品质量浓度分别为 $0.032, 0.064, 0.128, 0.16, 0.192, 0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;HED 对照品浓度分别为 $0.016, 0.032, 0.064, 0.096, 0.128, 0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 2.3.1 色谱条件下,分别进样 $20 \mu\text{L}$ 。以峰面积 (A) 为纵坐标 (Y),OA、HED 浓度 (C) 为横坐标 (X),进行线性回归,得到 OA 回归方程 $Y = 5268900X + 31420$ ($r = 0.9997$),表明 OA 含量在 $0.032 \sim 0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其峰面积呈良好线性关系,HED 回归方程 $Y = 4817200X + 33060$ ($r = 0.9998$),表明 HED 含量在 $0.016 \sim 0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其峰面积呈良好线性关系。

2.3.3 稳定性试验 取关木通生品供试液,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进行测定,结果样品在 8 h 内稳定,OA、HED 的 RSD 分别为 0.16%, 0.34%。

2.3.4 精密度试验 取关木通生品供试液,按 2.2.1 色谱条件重复测定 5 次,得其峰面积 A ,结果 OA、HED 的 RSD 0.14%, 0.19%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 加样回收率试验 取已知含量的关木通生品 0.5 g 和 1 g ,精密称定,加入适量 OA 和 HED,按

照供试品制备方法进行提取、测定,计算,结果 OA 的加样回收率为 99.25%, RSD 0.57%, HED 加样回收率为 99.61%, RSD 0.36。见表 3。

2.3.6 齐墩果酸、常春藤皂苷元含量测定 取样品 2 g,精密称定,加甲醇 50 mL,超声提取 30 min,滤过,回收溶剂至干,残渣加水 10 mL 溶解,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 10 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇 20 mL,盐酸 2 mL 加热水解 4 h,水解物加水 10 mL,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并萃取液,回收溶剂至干,残渣加甲醇定容于 10 mL,摇匀,用 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得供试液。在 2.3.1 色谱条件下,进样 20 μL,测得关样品中 OA、HED 峰面积,代入回归方程,计算含量,见表 2。

表 3 OA, HED 加样回收率的测定

| No. | 称样量 /g | 样品含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 加样回收率/% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----|--------|----------|---------|---------|---------|--------|--------|
| OA | 1 | 0.5009 | 1.049 | 1.00 | 2.039 | 99.05 | 99.25 |
| | 2 | 0.5004 | 1.048 | 1.00 | 2.041 | 99.33 | |
| | 3 | 0.5003 | 1.048 | 1.00 | 2.045 | 99.71 | |
| | 4 | 0.5007 | 1.048 | 1.00 | 2.047 | 99.90 | |
| | 5 | 0.5004 | 1.048 | 1.00 | 2.032 | 98.47 | |
| HED | 1 | 1.0000 | 1.065 | 1.00 | 2.060 | 99.53 | 99.61 |
| | 2 | 1.0007 | 1.066 | 1.00 | 2.058 | 99.25 | |
| | 3 | 1.0001 | 1.065 | 1.00 | 2.061 | 99.62 | |
| | 4 | 1.0003 | 1.065 | 1.00 | 2.067 | 100.21 | |
| | 5 | 1.0006 | 1.066 | 1.00 | 2.060 | 99.44 | |

3 结果

从表 3 可以看出①5 种炮制方法均能不同程度降低关木通中马兜铃酸的含量,其中醋炙法、蜜炙法和碱制法极显著减低关木通中马兜铃酸 A 的含量。②5 种炮制方法对有效成分齐墩果酸和常春藤皂苷元也均有不同程度的影响,其中蜜炙法对两者影响较小,与生品相比差异不显著。

4 结论

综合 5 种方法对关木通毒性成分的去除情况和对有效成分齐墩果酸和常春藤皂苷元的保留情况,初步可以得出 5 种炮制方法中对关木通减毒存效的最佳方法是蜜炙法。

[参考文献]

[1] 王勇,邓晓春. 马兜铃酸结构多样性及其复方毒性研究进展[J]. 中草药,2006,37(8):10003.

[2] 饶向荣,李深,李秀英,等. 对美国 FDA 关于含马兜铃酸中草药肾损害两个通告的分析[J]. 中国中医药信息杂志,2001,8(2):82.

[3] 王晔,陈建启,周刚. RP-HPLC 测定分清五淋丸中齐墩果酸和常春藤皂苷元的含量[J]. 中成药,2007,29(6):923.

[4] 曹小帅,潘金火. 关木通减毒方法的研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(1):73.

[5] 阳国平,袁洪,闫宏伟,等. 炮制及提取方法对关木通中马兜铃酸 A 含量的影响[J]. 中南大学学报:医学版,2005,30(4):477.

[责任编辑 蔡仲德]

欢迎订阅 2012 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn