

黄芪对广防己中马兜铃酸与粉防己中粉防己碱含量的影响研究

梁琦¹, 张艳霞², 许刚², 倪诚², 谢鸣^{2*}

(1. 山西中医学院国家中医药管理局重点学科方剂学, 太原 030024;

2. 北京中医药大学国家重点学科方剂学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**从化学角度探查黄芪对广、粉防己的影响机制。**方法:**采用 HPLC 法测定广防己及其配伍黄芪水提取物中马兜铃酸含量;粉防己及其配伍黄芪水提取物中粉防己碱的含量。**结果:**广防己和广防己配伍黄芪水提取物中马兜铃酸转移率分别为 86.21% ,51.86% ;粉防己和粉防己配伍黄芪水提取物中粉防己碱转移率分别为 56.45% ,63.03% 。**结论:**广防己中的马兜铃酸和粉防己中的粉防己碱在水提过程中均有损耗,其配伍黄芪则分别增加和减少马兜铃酸和粉防己碱的溶出率。该结果为黄芪与广、粉防己配伍的减毒、增效作用提供了一定的理解,提示复方汤药制备对药物不同成分溶出的影响是中药配伍机制的重要环节之一。

[关键词] 马兜铃酸;粉防己碱;广防己;粉防己;中药配伍

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0111-04

Astragali Radix Influence on the Content Changes of Aristolochic Acid in Aristolochiae Fangchi and Tet in Stephania Tetrandra

LIANG Qi¹, ZHANG Yan-xia², XU Gang², NI Cheng², XIE Ming^{2*}

(1. Department of Formulaology, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. Department of Formulaology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical mechanism of Astragali Radix influence on Aristolochiae Fangchi and Stephania Tetrandra. **Method:** Aristolochic acid (AA) in aqueous extract of Aristolochiae Fangchi combined with Astragali radix and Tet in the aqueous extract of Stephania Tetrandra combined with Astragali Radix were determined by the method of HPLC. **Result:** The transfer rate of AA was 86.21% and 51.86% separately in aqueous extract of Aristolochiae fangchi and combined with Astragali Radix. The transfer rate of Tet was 56.45% and 63.03% separately in aqueous extract of Stephania Tetrandra and combined with Astragali Radix. **Conclusion:** The AA and Tet were all lose in the process of water extract. Matching that Astragali radix could decrease the dissolution rate of AA and increase the dissolution rat of Tet.

[Key words] aristolochic acid; tetrandrine; aristolochia fangchi; Stephania Tetrandra; compatibility

中药是多成分的复杂体系,汤剂是其临床运用的主要形式,汤药制备中方药的成分会发生复杂的

变化从而引起复方配伍的效用。马兜铃酸作为广防己肾脏毒性的物质基础已被公认,而粉防己碱则被认为是粉防己主要的有效成分,黄芪则为临床常用与防己配伍的药物。本研究拟通过比较广、粉防己配伍黄芪前后的马兜铃酸、粉防己碱的含量变化,了解黄芪对马兜铃酸、粉防己碱含量煎出的影响,以从化学角度探讨黄芪与广、粉防己配伍的机制。

1 材料

1.1 药材 广防己购自广州市中药材批发市场;粉

[收稿日期] 2011-09-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572299);山西省教育厅科技项目(201011107)

[第一作者] 梁琦,讲师,博士,从事方药毒理学, E-mail: liangqi5277@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 谢鸣,教授,博士,从事方证效应物质基础及方证相关, E-mail: xieming603@263.net

防己购自北京同仁堂药材有限责任公司。HPLC 测得广防己中马兜铃酸含量 $0.457 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，粉防己中粉防己碱含量 $9.97 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。广、粉防己及其配伍黄芪水提物：水提过滤，广、粉防己水提物浓缩含生药 $0.81 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，广、粉防己配伍黄芪水提物浓缩至含生药 $0.91 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

1.2 试剂及仪器 马兜铃酸、粉防己碱对照品均购自中国药品生物制品检定所(批号分别为 11076-200406, 110711-200406)。HPLC 用的甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。高效液相色谱仪(日本岛津公司产品,配 LCT-20AT 泵、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20 A 检测器)。

2 方法及结果

2.1 广防己及其配伍黄芪水提物中马兜铃酸含量的测定

2.1.1 色谱条件 SHIMADZU VP-ODS C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相甲醇-水-醋酸(65:34:1),检测波长 310 nm,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.1.2 标准品溶液的制备 精密称取马兜铃酸标准品 6.15 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入适量色谱甲醇,超声 30 min 使溶解,冷却至 $20\text{ }^\circ\text{C}$,以甲醇定容至 25 mL,作为标准品溶液储备液,再精密吸取该溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,以甲醇定容至 10 mL,作为对照品溶液,质量浓度为 $0.0246 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取水提物 10

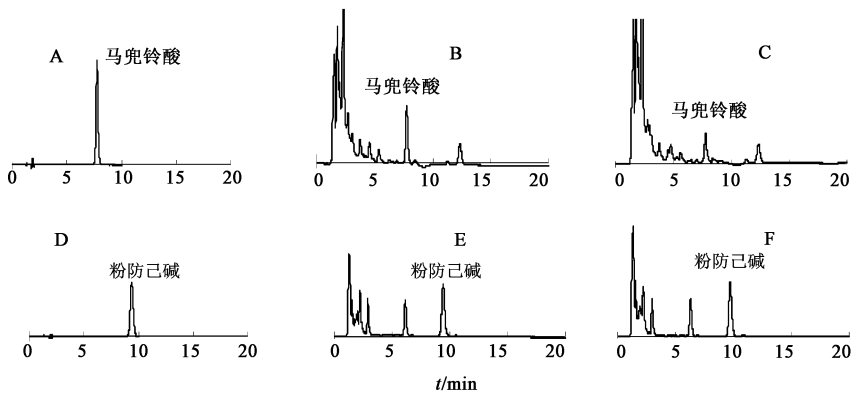
mL,置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度,充分混匀,精密吸取 10 mL,置于 50 mL 量瓶中,以甲醇定容至 50 mL,充分混匀,静置取上清。广防己水提物上清标记为 1 号样品;广防己配伍黄芪水提物上清标记为 2 号样品。用前均过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜。

2.1.4 线性范围 取马兜铃酸标准品溶液,在上述色谱条件下分析,分别进样 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL ,测定峰面积。以马兜铃酸进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1\ 945.9X - 21\ 911$, $r = 0.996\ 3$ 。结果显示,马兜铃酸在 49 ~ 295 ng 之间与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 广防己及其配伍黄芪水提物中马兜铃酸含量测定 取各供试品溶液,各精密吸取 10 μL ,上述色谱条件下进行分析,测定峰面积,代入上述标准曲线,计算各水提物中马兜铃酸含量,每个样品测定两次。见表 1,色谱图见图 1。

表 1 广防己及其配伍黄芪水提物中马兜铃酸含量

样品	进样量/ μL	峰面积	进样量/ ng	马兜铃酸含量/%	平均含量/%
1	10	180 820	104.183 7	0.321 555	0.319 305
	10	177 984	102.726 2	0.317 056	
2	10	96 147	60.670 13	0.187 253	0.191 995
	10	102 126	63.742 74	0.196 737	



A. 马兜铃酸对照品; B. 广防己水提物; C. 广防己配伍黄芪水提物; A. 马兜铃酸; D. 粉防己碱对照品; E. 粉防己水提物; F. 粉防己配伍黄芪水提物

图 1 广防己及其配伍黄芪水提物中马兜铃酸、粉防己碱含量测定 HPLC 色谱

综合以上结果与广防己及其配伍黄芪水提物中广防己生药的含量,可以得出广防己及其配伍黄芪水提物中马兜铃酸的提取量和转移率,见表 2。

2.2 粉防己及其配伍黄芪水提物中粉防己碱含量测定

2.2.1 色谱条件 SHIMADZU VP-ODS C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相含 0.06% 二乙胺的甲醇-乙腈-水(3:1:1),检测波长 283 nm,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取粉防己碱对

表2 广防己及其配伍黄芪水提取物(含1g广防己)中马兜铃酸的提取量和转移率

样品	提取量/mg	转移率/%
药材	0.457	-
广防己水提取物	0.394	86.21
广防己配伍黄芪水提取物	0.237	51.86

照品 5.23 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入流动相适量,超声 30 min 使溶解,冷却至 20 ℃,以流动相定容至 25 mL,作为标准品溶液,浓度为 0.209 2 g·L⁻¹。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取水提取物 10 mL,置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度,充分混匀,精密吸取 10 mL,置于 50 mL 量瓶中,以甲醇定容至 50 mL,充分混匀,静置取上清。粉防己水提取物上清标记为 3 号样品;粉防己配伍黄芪水提取物上清标记为 4 号样品。用前均过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.2.4 线性考察 取粉防己碱标准品溶液,在上述色谱条件下分析,分别进样 2,4,6,8,10,12 μL,测定峰面积。以粉防己碱进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 725.86X - 48\ 702$ ($r = 0.999\ 2$)。结果显示粉防己碱在 418 ~ 2 510 ng 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.5 粉防己及其配伍黄芪水提取物中粉防己碱含量测定 取各供试品溶液,精密吸取 10 μL,上述色谱条件下分析,测定峰面积并计算样品中粉防己碱含量,每个样品测定 2 次,见表 3。

表3 粉防己及其配伍黄芪水提取物中粉防己碱含量测定

样品	进样量/μL	峰面积	进样质量/ng	粉防己碱含量/%	平均含量/%
3号样品	10	465 578	708.511 3	4.373 526	4.558 713
	10	509 130	768.511 8	4.743 9	
4号样品	10	545 603	818.759 8	5.054 073	5.092 72
	10	554 692	831.281 5	5.131 367	

以上研究结果综合粉防己及其配伍黄芪水提取物中粉防己生药的含量,可以得出粉防己及其配伍黄芪水提取物中粉防己碱的提取量和转移率,见表 4。

表4 粉防己及其配伍黄芪水提取物(含1g粉防己)中粉防己碱含量及提取转移率

样品	提取量/mg	转移率/%
药材	9.970	-
粉防己水提取物	5.628	56.45
粉防己配伍黄芪水提取物	6.287	63.06

3 讨论

历代防己类药材品种来源复杂、名称混乱,存在同名异物和同物异名现象,但主要涉及马兜铃科和防己科两种科属。现代分别以广、粉防己为其药用名,其中广防己为马兜铃科植物广防己 *Aristolochia fangchi* Y. C. Wu ex L. D. Chou et M. Hwang 的干燥根,粉防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根^[1]。

广防己含有马兜铃酸 I, II, III, 马兜铃内酰胺, 尿囊素、木兰花碱和 β 谷甾醇等成分^[2-3],其中马兜铃酸 I 即马兜铃酸(AA)为公认有毒成分,故马兜铃酸含量的变化对广防己安全性的评价有重要意义。粉防己碱为粉防己的主要活性成分,其含量的高低与药理作用的强弱相关,因而是药典^[1]规定的主要检测成分。复方是中药临床运用的主要形式,通过药物配伍可达到增效或减毒目的。防己与黄芪配伍常见于一些经典古方中,也是历代临床治疗气虚停湿的常用药对,以广、粉防己与黄芪配伍运用最为多见。本文参考《金匱要略》中黄芪与防己的配伍比例,结合前期的有关实验结果^[4],以马兜铃酸和粉防己碱为毒效指标,探查 10 倍药典剂量的广、粉防己与黄芪配伍的水煎液中成分的变化,以探查黄芪对广、粉防己配伍的影响。

有关马兜铃酸的检测方法已有多篇文献报道,本实验选用常规 HPLC 对广防己中的马兜铃酸进行了检测,并在参考文献^[5]的基础上建立了粉防己碱的 HPLC 检测方法,结果显示马兜铃酸与粉防己碱分离良好,无杂质干扰。

实验发现,药材广防己及广防己配伍黄芪水提取物中马兜铃酸转移率分别为 86.21%,51.86%。广防己的水提取物中马兜铃酸含量减少,可能与马兜铃酸在水中溶出度小,且在煎煮过程中发生氧化、还原、分解等过程有关;广防己配伍黄芪水提取物中马兜铃酸含量低于等剂量广防己水提取物中马兜铃酸含量,表明广防己配伍黄芪后其马兜铃酸的转移率下降,提示水提过程中黄芪减少了广防己中马兜铃酸的溶出。实验还发现,粉防己及粉防己配伍黄芪水提取物中粉防己碱转移率分别为 56.45%,63.03%。已知粉防己碱为叔胺类双苄基异喹啉类生物碱,属脂溶性生物碱,难溶于水^[6],推测水提取物中粉防己碱含量的降低可能与此有关;而粉防己配伍黄芪水提取物中高于等剂量粉防己水提取物中的粉防己碱含量,提示黄芪可增加粉防己中粉防己碱在水提取物中的溶出。

大花红景天中草质素苷含量分析

李青, 宋志前, 曾林燕, 夏磊, 曹玉娜, 魏征, 刘振丽*
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:测定 11 个批次大花红景天样品中草质素苷的含量,为红景天质量标准的制订提供参考。方法:采用 HPLC 测定,Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相乙腈-0.2% 醋酸(22:78);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 332 nm;柱温 40 ℃。结果:11 个样品中草质素苷含量为 0.033%~0.765%。结论:大花红景天中草质素苷含量测定方法方便、准确。

[关键词] 红景天;草质素苷;含量

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0114-02

红景天为景天科植物大花红景天的干燥根和根茎^[1]。具有滋补强壮、扶本固正、活血止血、补肾、清热润肺等功效。主要化学成分包括醇及其苷类、黄酮类、酚类等。《中国药典》规定了红景天苷限量标准^[1]。另有测定其中酪醇、没食子酸^[2]含量的报道。未见国内文献测定其中黄酮类成分草质素苷含量的报道。本文对 11 个批次大花红景天中草质素苷含量进行了测定,为评价红景天质量提供科学基础。

1 材料

高效液相色谱仪 HP1100, G1379A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 恒温箱, G1315B DAD 检测器, HP 化学工作站。TCQ-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂); Sartorius CP

225D 电子天平;红景天饮片样品均经北京中医药大学刘春生教授通过显微鉴定和分子鉴定,确定为景天科大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥根和根茎。草质素苷(批号 85571-15-9)对照品购于上海笛柏化学品技术有限公司,经制备液相纯化,纯度≥98.0%。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),醋酸为分析纯(天津市福晨化学试剂厂),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,流动相乙腈-0.2% 醋酸(22:78),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 332 nm,柱温 40 ℃,见图 1。

2.2 对照品溶液制备 取草质素苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成 0.191 g·L⁻¹的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取各供试品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称

[收稿日期] 2011-09-26

[通讯作者] *刘振丽, Tel: 010-64014411-2503, E-mail: zhenli-liu@sina.com

黄芪与广、粉防己的配伍影响马兜铃酸、粉防己碱的溶出率,与黄芪中的皂苷、黄酮、多糖等复杂的化学成分相关机制有待进一步研究。但从化学与药理学角度来看,似乎可以推测黄芪配伍可使广防己的毒性作用减弱,使粉防己的药理作用增强。本结果为认识黄芪与广、粉防己的增效减毒作用提供了一定的化学上的依据,提示复方汤药制备中药物成分之间相互影响是引起方药配伍效用的重要环节之一。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:116.

[2] 仇良栋,陈志明. 广防己有效成分的分离鉴定[J]. 药学通报,1981,16(2):117.

[3] 肖培根. 新编中药志[M]. 第三卷. 北京:化学工业出版社,2002,131.

[4] 倪诚. 广防己和粉防己及其配伍黄芪的效毒研究[D]. 北京:北京中医药大学博士研究生学位论文,2007.

[5] 冯碧敏,叶云,张昊. 高效液相色谱法测定防己中粉防己碱含量[J]. 药物鉴定,2005,14(11):36.

[6] 吕翠平,郭亚健,张莹. 防己黄芪汤水煎液中二种防己生物碱煎出量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(12):30.

[责任编辑 蔡仲德]