

• 质量标准 •

# 含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸的含量

李琳<sup>1</sup>, 王智民<sup>1\*</sup>, 高慧敏<sup>1</sup>, 王冠<sup>2</sup>, 何希荣<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立马兜铃总酸的含量测定方法, 并测定不同地区市售青木香及其它八种含马兜铃酸类中药中马兜铃总酸的含量, 用于指导临床安全、合理用药。方法: 用紫外分光光度法分析, 检测波长为 390nm。结果: 马兜铃酸 A 在 0.047~0.235mg 范围内( $r=0.9992$ )有良好的线性关系; 平均加样回收率为 98.16%, RSD=2.04%。不同地区市售青木香中马兜铃总酸含量在 0.145%~0.567% 范围内, 其中以河北安国含量最高(0.567%), 重庆含量最低(0.145%); 八种含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸含量在 0.178%~0.717% 范围内, 其中以关木通含量最高(0.717%), 华细辛含量最低(0.178%)。结论: 本方法简便、准确, 可用于测定其它含有马兜铃酸类中药材及中成药中马兜铃总酸的含量。

[关键词] 马兜铃总酸; 紫外分光光度法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0011-03

## Determination of Total Aristolochic Acid in Traditional Chinese Medicines Containing Aristolochic Acid By Ultraviolet Spectrophotometry

LI Lin<sup>1</sup>, WANG Zhi-min<sup>1\*</sup>, GAO Hui-min<sup>1</sup>, WANG Guan<sup>2</sup>, HE Xi-rong<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a determination method of total aristolochic acid by ultraviolet spectrophotometry to ensure clinical safety and therapeutic efficacy. **Methods:** The samples were analyzed by ultraviolet spectrophotometry and detected at wave length of 390nm. **Results:** The calibration curve was linear ( $r=0.9992$ ) within the range of 0.047~0.235mg for aristolochic acid A. The average recovery was 98.16%. RSD=2.04%. **Conclusion:** The method with good linear relationship was convenient, quick, accurate, and suitable for the quality control of the total aristolochic acid in traditional Chinese medicines containing aristolochic acid.

[Key words] Total aristolochic acid; Ultraviolet spectrophotometry; Determination

马兜铃酸主要存在于马兜铃科植物中, 为一类含硝基的菲类有机酸, 具有一定的生理活性, 但它同时又是一种致病因素, 具有肝、肾毒性, 长期或过量服用易导致癌症或肾衰竭等。近年来国内外已有不少因服用过量马兜铃酸而导致肾衰竭的病例。因此在

应用时必须严格控制其用量在适宜范围之内, 以避免可能的毒副作用。迄今为止, 有关该类药材的有毒成分的测定主要集中在马兜铃酸 A、B 上, 而马兜铃总酸在该类药材中的分布情况不详, 因此, 为了更好地了解含马兜铃酸类中药材毒性成分的分布概况, 我们测定了其马兜铃总酸的含量。

文献中有关马兜铃总酸含量测定的方法有 UV 法<sup>[1]</sup>、薄层扫描法<sup>[2]</sup>。本文参阅文献用 UV 法, 优选了实验条件, 测定青木香及其它七种含有马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸的含量。

[收稿日期] 2005-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No: 30271612)

[通讯作者] 王智民, Tel/Fax: (010) 84014128; E-mail:

zhiminwang123@163.com

## 1 仪器与试药

752 型紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),检测波长 390nm;乙酸乙酯、无水乙醇、盐酸、氨水均为分析纯(北京化工厂);马兜铃酸 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0746-200103);所测青木香购于江苏等地,其它药材见表 1,均由中国中医科学院中药研究所生药室何希荣老师鉴定。

表 1 样品来源

药材	产地	来源	药用部位
华细辛	陕西西安	<i>Asarum sieboldii</i>	全草
辽细辛	东北	<i>A. heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i>	全草
天仙藤	陕西	<i>Aristolochia contorta</i>	地上部分
广防己	广西	<i>A. fangchi</i>	根
马兜铃	陕西西安	<i>A. contorta</i>	果实
青木香	江苏扬州	<i>A. debilis</i>	根
汉中防己	陕西汉中	<i>A. heterophylla</i>	根
关木通	吉林延边	<i>A. manshuriensis</i>	藤茎

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称定马兜铃酸 A 对照品 11.73mg,置于 10mL 容量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,得浓度为  $1.173\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的储备液。

**2.2 线性关系的考察** 将马兜铃酸 A 对照品储备液稀释,分别得到浓度为 0.0047, 0.0094, 0.0141, 0.0188,  $0.02353\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液,各取适量,用紫外分光光度计分别于 390nm 处测定其吸光度(A),其 A 值分别为 0.093, 0.186, 0.263, 0.355, 0.454。以马兜铃酸 A 浓度(C)为横坐标,以其吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $A = 18.95C + 0.0029$ ,  $r = 0.9992$ ,结果表明马兜铃酸 A 含量在 0.047~0.235mg 范围内与其吸光度呈良好线性关系。

**2.3 提取方法的正交考察** 为优化提取马兜铃总酸的条件,采用正交试验法,考察提取溶剂浓度、溶剂用量、提取方法 3 个因素,以马兜铃总酸含量为参考指标,选用  $L_9(3^4)$  正交试验表安排实验,见表 2。

**2.3.1 供试品溶液的制备** 取药材生品粉末(过四号筛)0.3g,精密称定,按表 2 加入相应溶剂适量,采用相应的提取方法,称重并补足重量,滤过,取续滤液 10mL,以  $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调 pH=2,加 10 mL 乙酸乙酯萃取 4 次,合并有机层,用 20mL 水洗至中性,回收溶剂,加无水乙醇溶解残渣并定容至 10mL,精密吸取 2mL 用无水乙醇定容至 5mL,供分析用。

**2.3.2 紫外分析结果及方差分析(见表 3、表 4)**

从表 3、表 4 可知,最佳条件以  $A_3B_3C_1$  最好,即 7.5% 的氨水 60mL,冷浸过夜。对马兜铃总酸含量影响最大的是提取方法,有极显著性差异,其次是溶剂用量,有显著性差异,溶剂浓度无显著性差异。重复实验  $A_3B_3C_1$ ,验证了实验的正确性。

表 2 马兜铃总酸提取方法的正交试验

水平	因素		
	溶剂浓度(A)	溶剂用量(B)	提取方法(C)
1	2.5% 氨水	40mL	冷浸过夜
2	5% 氨水	50mL	超声提取 15min
3	7.5% 氨水	60mL	超声提取 15min × 2

表 3 马兜铃总酸提取方法的正交试验结果

试验序号	列号				总酸含量 (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.486
2	1	2	2	2	0.438
3	1	3	3	3	0.508
4	2	1	2	3	0.437
5	2	2	3	1	0.488
6	2	3	1	2	0.541
7	3	1	3	1	0.484
8	3	2	1	2	0.518
9	3	3	2	1	0.475
K1	0.4773	0.4690	0.5150	0.4830	
K2	0.4887	0.4813	0.4500	0.4877	
K3	0.4923	0.5080	0.4933	0.4877	
R	0.0150	0.0390	0.0650	0.0047	

表 4 正交试验结果的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值
A	0.00037	2	0.0001	8.42
B	0.00238	2	0.00119	54.74 <sup>1)</sup>
C	0.00657	2	0.0032	150.89 <sup>2)</sup>
D(误差)	0.00004	2	0.00002	

注:  $F_{0.10}(2, 2) = 9.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ ,  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

**2.4 萃取过程中乙酸乙酯用量的单因素考察**

**2.4.1 供试品溶液的制备** 取青木香生品粉末(过四号筛)0.3g,精密称定,加入 7.5% 氨水 60mL,冷浸过夜,补足重量,滤过,取续滤液 10mL,以  $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调 pH=2,按表 5 分别加不同倍数的乙酸乙酯萃取 4 次,合并有机层,同“2.3.1”法制成供试品溶液。

**2.4.2 紫外分析结果及方差分析(见表 5、表 6)**  $F > F_{0.01}(2, 6)$ , 乙酸乙酯用量有显著性差异, 根据直观分析选择乙酸乙酯 1 倍量为最终方案。因此马兜铃总酸最佳的提取方法为: 取青木香生品粉末(过四号筛) 0.3g, 精密称定, 加入 7.5% 氨水 60mL, 冷浸过夜, 补足重量, 滤过, 取续滤液 10mL, 以  $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调  $\text{pH}=2$ , 加 10mL 乙酸乙酯萃取 4 次, 合并有机层, 用 20mL 水洗至中性, 回收溶剂, 残渣中加无水乙醇溶解并稀释至 10mL, 取 2mL 加无水乙醇并稀释至 5mL, 供分析用。

表 5 乙酸乙酯用量的单因素考察结果

乙酸乙酯用量	0.5 倍	1.5 倍	1 倍
	0.497	0.536	0.523
含量(%)	0.502	0.530	0.536
	0.509	0.522	0.533
平均含量(%)	0.503	0.529	0.531

表 6 实验结果的方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值
组间	0.0015	2	0.0008	16
组内	0.0003	6	0.00005	

注:  $F_{0.05}(2, 6) = 5.14$ ,  $F_{0.01}(2, 6) = 10.9$ 。

**2.5 加样回收率的测定** 取已知含量的青木香粉末(过四号筛, 含量为 0.543%) 0.3g, 精密称定, 共 9 份, 分成 3 组, 每组各加入马兜铃酸对照品 2mg, 1.6mg, 1mg。分别加入 7.5% 氨水 60mL, 冷浸过夜, 补足重量, 滤过, 取续滤液 10mL, 以  $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调  $\text{pH}=2$ , 加 10mL 乙酸乙酯萃取 4 次, 合并有机层, 同“2.3.1”法制成供试品溶液(结果见表 7)。

表 7 加样回收率的测定结果

试验编号	称样量(g)	样品含量(mg)	加对照品量(mg)	测得量(mg)	加样回收率(%)
1-1	0.3003	1.6306	2.04	3.579	95.51
1-2	0.3006	1.6323	2.01	3.606	98.20
1-3	0.3006	1.6323	2.02	3.646	99.71
2-1	0.2998	1.6279	1.61	3.189	96.96
2-2	0.3002	1.6301	1.65	3.310	101.81
2-3	0.3001	1.6295	1.64	3.202	95.90
3-1	0.3004	1.6312	1.05	2.664	98.38
3-2	0.3002	1.6301	1.02	2.624	97.42
3-3	0.3000	1.6290	1.08	2.705	99.59
平均值					98.16
RSD(%)					2.04

**2.6 稳定性试验** 取安国青木香供试品液在第 0、2、4、6、12、24h 测定其含量平均值为 0.567%,  $\text{RSD}=0.02\%$ 。说明其在 24h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取扬州青木香粉末(过四号筛) 6 份, 按含量测定方法测得其含量平均值为 0.544%,  $\text{RSD}=0.04\%$ 。

**2.8 精密度试验** 取岳西青木香供试品液, 按含量测定方法重复测定 5 次, 测得其含量平均值为 0.557%,  $\text{RSD}=0.002\%$ 。

**2.9 样品的含量测定结果(见表 8、表 9)**

表 8 不同地区市售青木香中马兜铃总酸含量测定结果

地区	含量(%)	地区	含量(%)
江苏江阴	0.315	河北安国	0.567
吉林松源	0.336	江苏扬州	0.543
河南信阳	0.425	安徽岳西	0.560
安徽潜山	0.434	云南丽江	0.293
上海	0.363	重庆	0.145

表 9 八种含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸含量测定结果

	产地	含量(%)
马兜铃	陕西西安	0.518
辽细辛	东北	0.179
天仙藤	陕西	0.403
青木香	江苏扬州	0.543
广防己	广西	0.469
关木通	吉林延边	0.717
汉中防己	陕西西安	0.503
华细辛	陕西西安	0.178

### 3 讨论

本试验用紫外分光光度法测定不同地区市售青木香及其它八种马兜铃科中药材中马兜铃总酸的含量, 不同地区市售青木香中马兜铃总酸含量在 0.145%~0.567% 范围内, 其中以河北安国含量最高(0.567%), 重庆含量最低(0.145%); 八种含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸含量在 0.178%~0.717% 范围内, 其中以关木通含量最高(0.717%), 华细辛含量最低(0.178%)。本方法简便、准确, 可用来测定其它含有马兜铃酸类中药材及中成药中马兜铃总酸的含量。

### [参考文献]

- [1] 尚明英, 李军, 胡波, 等. 中药关木通中总马兜铃酸的含量测定[J]. 中草药, 2000, 31(12): 899.
- [2] 陈玉英, 罗国安, 金春妹, 等. 冠心苏合丸中马兜铃总酸、桂皮酸及桂皮酸苯乙酯含量的测定[J]. 中成药, 1991, 13(4): 10.