

# 瑶药天钻的质量标准研究<sup>Δ</sup>

张亚洲<sup>1,2\*</sup>, 樊兰兰<sup>1</sup>, 覃山丁<sup>1</sup>, 李典鹏<sup>2#</sup> (1.广西壮族自治区药用植物园天然药物化学中心, 南宁 530023; 2.广西壮族自治区/中国科学院桂林植物研究所, 广西 桂林 541006)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1034-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.26

**摘要** 目的: 建立瑶药天钻药材的质量标准。方法: 分别对天钻药材进行显微鉴别和薄层色谱(TLC)鉴别; 按照《中国药典》方法进行水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物检查; 采用高效液相色谱法测定药材中马兜铃酸的含量; 色谱柱为 Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(含 0.34% 三乙胺、0.94% 乙酸, 梯度洗脱), 检测波长为 260 nm。结果: 天钻药材的显微特征明显; TLC 图中能清晰显现与马兜铃酸 A 对应的点; 马兜铃酸 A 的质量浓度在 1.703~109.000 μg/ml 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ ), 平均加样回收率分别为 97.54%、101.16%、101.15%, RSD 分别为 0.22%、0.63%、0.39% ( $n=3$ )。结论: 所建标准可用于天钻药材的质量控制。产自广西、云南的 11 批天钻药材在显微、外观等方面质量相对稳定, 但马兜铃酸 A 的含量差异较大。

**关键词** 天钻; 马兜铃酸 A; 质量标准; 瑶药

## Quality Study of Yao Medicine *Aristolochia kwangsiensis*

ZHANG Ya-zhou<sup>1,2</sup>, FAN Lan-lan<sup>1</sup>, QIN Shan-ding<sup>1</sup>, LI Dian-peng<sup>2</sup> (1. Natural Pharmaceutical Chemistry Center, Guangxi Zhuang Autonomous Region Medicinal Botanical Garden, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Guilin Botany Institute, Chinese Academy of Sciences, Guangxi Guilin 541006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish quality control of Yao medicine *Aristolochia kwangsiensis*. METHODS: The samples were identified by microscopic identification and TLC; according to the method of *Chinese Pharmacopoeia*, moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract were detected; the content of aristolochic acid was determined by HPLC. The separation was performed on Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (containing 0.34% triethylamine, 0.94% acetic acid, gradient elution) at detection wavelength of 260 nm. RESULTS: Microscopic characteristics of *A. kwangsiensis* were distinctive; TLC spots were clear; the linear range of aristolochic acid A were 1.703-109.000 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ) with average recoveries of 97.54% (RSD=0.22%,  $n=3$ ), 101.16% (RSD=0.63%,  $n=3$ ) and 101.15% (RSD=0.39%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality control of *A. kwangsiensis*. The microscopy and appearance of 11 batches of *A. kwangsiensis* from Guangxi and Yunnan province have kept stable, but there is great difference in the content of aristolochic acid A.

**KEYWORDS** *Aristolochia kwangsiensis*; Aristolochic acid A; Quality standards; Yao medicine

瑶药天钻是马兜铃科马兜铃属植物广西马兜铃 *Aristolochia kwangsiensis* Chun et How ex C. F. Liang 的块根<sup>[1]</sup>, 别名金银袋、大总管、萝卜防己、大青木香, 原植物主要分布于浙江、

福建、湖南、广东、广西、四川、贵州、云南等地的山谷林中<sup>[1-3]</sup>。文献研究显示, 从天钻中分离出了尿囊素、马兜铃酸、β-谷甾醇、6-甲氧基去硝基马兜铃酸甲酯、6-甲氧基马兜铃酸 A 甲酯

展[J]. 中草药, 2012, 43(3): 613.

- [5] Yang X, Zhang X, Yang SP, et al. Preliminary antibacterial evaluation of the chemical compositions in Herba pogostemonis oil[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2013, 26(6): 1 173.
- [6] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学学报, 2008, 43

(12): 1 211.

- [7] 王超群, 贾秀虹, 陈季, 等. 中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3 438.
- [8] Gao XY, Jiang Y, Lu JQ, et al. One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1 216(11): 2 118.
- [9] 张雪, 李隆云, 杨宪, 等. 不同产地的青蒿药用成分含量研究[J]. 中国药房, 2009, 20(15): 1 188.

(收稿日期: 2013-10-31 修回日期: 2014-01-04)

Δ 基金项目: 广西食品药品监督管理局瑶族习用药材质量评价与标准研究项目(No.MZY2012009)

\* 助理研究员, 博士。研究方向: 天然药物的活性成分和代谢。  
E-mail: yazhou\_zhang2009@163.com

# 通信作者: 研究员, 硕士研究生导师, 博士。研究方向: 药物资源功能物质开发。E-mail: ldp@gxib.cn

及木兰花碱<sup>[2-3]</sup>。药理研究发现:(1)其总生物碱具有解痉、镇痛作用<sup>[3-4]</sup>;(2)马兜铃酸主要有抗肿瘤、致突变与肾脏毒性作用<sup>[2-5]</sup>;(3)天钻提取物对临床各种疾患所致平滑肌痉挛性腹痛的止痛效果较好<sup>[6]</sup>。目前,天钻常作为抗肿瘤、止痛药物使用,但是其质量标准尚未见研究报道。鉴于此,笔者对天钻药材中可引起肾毒性的成分马兜铃酸A的薄层色谱(TLC)鉴别方法和高效液相色谱(HPLC)含量测定方法进行了研究,制定了其含量限度,并完成了其他检查项目,以期科学、有效地控制药材质量,保证其临床疗效和安全性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪,含紫外检测器等(美国Agilent公司);HD-1024A型超声仪(宁波市恒大超声设备有限公司,功率:1200W,频率:25~28kHz)。

### 1.2 试剂

马兜铃酸A对照品(笔者自制,经HPLC法测定纯度>98%);硅胶G(青岛海洋化工厂);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

天钻药材共11批(样品信息见表1),均经广西中医药研究院方鼎研究员鉴定其来源为广西马兜铃。完成样品收集后,将所有11批样品(约100g)进行粉碎处理,并统一过40目筛,备用。

表1 天钻药材样品信息

Tab 1 Information of *A. kwangsiensis* sample

编号	采集或购买(质量)	产地/采集地点	药用部位	样品状态
TZ-1	自采(0.299 kg)	云南文山州富宁县里达乡	块根	药材
TZ-2	自采(0.235 kg)	云南文山州广南县黑支果乡	块根	药材
TZ-3	自采(0.481 kg)	云南文山州广南县者兔乡	块根	药材
TZ-4	自采(0.192 kg)	云南文山州富宁县洞波乡	块根	药材
TZ-5	自采(0.192 kg)	云南文山州西畴县新街镇	块根	药材
TZ-6	自采(1.400 kg)	云南金平县境内	块根	药材
TZ-7	自采(0.410 kg)	广西药用植物园	块根	药材
TZ-8	自采(0.574 kg)	广西植物所桂林植物园	块根	药材
TZ-9	购买(0.690 kg)	广西桂林市荔浦县药材市场	块根	饮片
TZ-10	购买(0.524 kg)	广西梧州市藤县药材市场	块根	饮片
TZ-11	购买(4.550 kg)	广西桂林市六合路药材市场	块根	饮片

## 2 方法与结果

### 2.1 性状与显微、TLC鉴别

2.1.1 性状鉴别 天钻块根肥大,呈纺锤形,长30~60cm。表面棕褐色,有时有须根或须根痕。质坚而硬,断面类白色,木部宽广,淡黄或白色,气微香特异,味苦。

2.1.2 显微鉴别 ①块根横切面:木栓层由10余列长方形细胞组成,栓化并木化,皮层中有单个或数个成群散在的石细胞;韧皮部宽广,韧皮部薄壁细胞中含有大量的淀粉粒,形成层不明显;木质部宽广,射线宽1~3列细胞,导管大小不一,多单个呈径向排列。②本品粉末棕色;淀粉粒众多,类圆形、类球形或不规则,单粒或复粒,复粒由2~8个单粒组成,单粒直径为6~36 $\mu\text{m}$ ,层纹明显;石细胞众多,类方形或多角形,黄色,单个散在或多个成群,孔沟明显,直径20~60 $\mu\text{m}$ ;草酸钙簇晶常见,直径5~12 $\mu\text{m}$ ;木栓细胞类方形,内含棕色物,直径8~15 $\mu\text{m}$ ;具缘纹孔导管多破碎,直径20~40 $\mu\text{m}$ ;纤维束偶见,长40~200 $\mu\text{m}$ 。

显微鉴别要点:淀粉粒众多,黄色石细胞孔沟明显,单个

或聚集成群,可见草酸钙簇晶,这是其显微鉴别的主要特征。显微鉴别图见图1、图2。

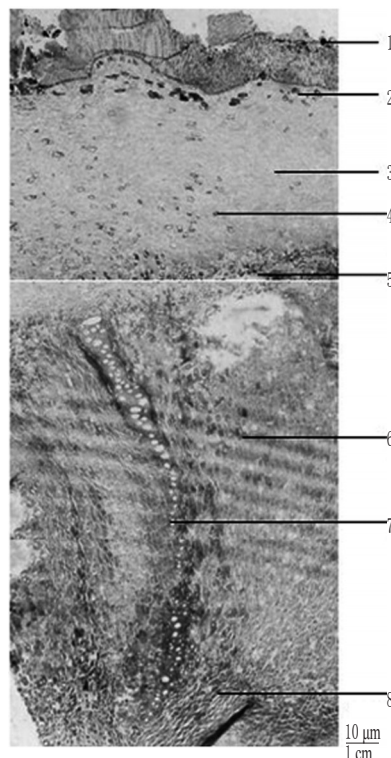


图1 天钻块根横切面的显微全貌图

1.木栓层;2.石细胞;3.韧皮部;4.淀粉粒;5.形成层;6.木质部;7.木射线;8.髓

Fig 1 Micrograph of the transaction of the roots of *A. kwangsiensis*

1. phellem layer; 2. lithocyte; 3. phloem; 4. starch grain; 5. cambium layer; 6. xylem; 7. xylem rays; 8. pith

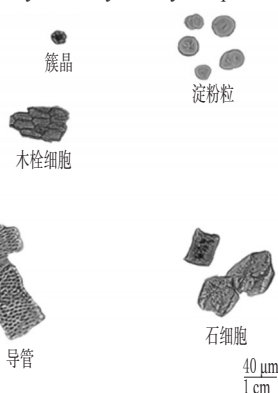


图2 天钻粉末的显微鉴别图

Fig 2 Micrograph of the powder of *A. kwangsiensis*

2.1.3 TLC鉴别 取本品粉末0.5g,加石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$ )50ml,超声提取30min,滤过,残渣加甲醇30ml,再超声提取30min,滤过,滤液浓缩至干,用甲醇2ml使溶解,作为供试品溶液。另取马兜铃酸A对照品,加甲醇制成每1ml含2mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法<sup>[7]</sup>试验,吸取上述两种溶液各2 $\mu\text{l}$ ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-乙酸(4:1:2滴)饱和8min为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品色谱

相应的位置上,显相同的蓝色荧光斑点。天钻的TLC图见图3。

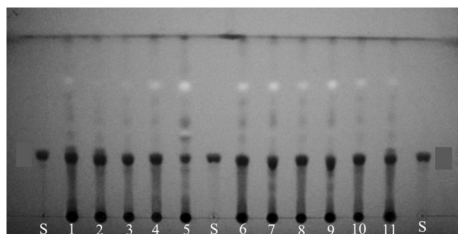


图3 天钻的TLC图

S. 马兜铃酸A对照品;1~11.天钻药材样品

Fig 3 TLC of *A. kwangsiensis*

S.aristolochic acid A control;1-11.*A. kwangsiensis* samples

## 2.2 检查

2.2.1 水分 照水分测定法<sup>[7]</sup>测定,可得11批样品的水分含量均在16.0%以下。考虑到该药材为南方所产,而南方气候较为湿润,因此将本品水分限度拟定为不得过16.0%。

2.2.2 总灰分 照灰分测定法<sup>[7]</sup>测定,可得11批样品的总灰分含量均在6.0%以下,故将本品总灰分限度拟定为不得过6.0%。

2.2.3 酸不溶性灰分 照灰分测定法<sup>[7]</sup>测定,可得11批样品的酸不溶性灰分含量均在2.0%以下,故将本品酸不溶性灰分限度拟定为不得过2.0%。

2.2.4 浸出物 查阅相关文献可知,天钻中的活性成分聚集在乙酸乙酯部位,且该成分为脂溶性成分<sup>[2-6]</sup>。因此,初步考虑采用醇溶性浸出物来考察天钻中所含的活性成分;而加热提取一方面有利于化学成分的溶出,另一方面又节省了试验时间,最终确定采用热浸法进行试验。预试验还比较了50%乙醇与95%乙醇作为提取溶剂的提取效果,结果表明,50%乙醇的提取效果较优(以TZ-1为供试品,前者浸出物含量为15.36%,后者浸出物含量为11.40%),故最终确定以50%乙醇为提取溶剂。照醇溶性浸出物测定法项下的热浸法<sup>[6]</sup>测定,可得本品11批浸出物的含量均在8.0%以上,故将本品浸出物含量限度拟定为不少于8.0%。

## 2.3 含量测定<sup>[8-9]</sup>

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Gemini C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(含0.34%三乙胺、0.94%乙酸),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1 ml/min;检测波长:260 nm;柱温:室温。色谱见图4。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution process

时间,min	乙腈,%	水,%	时间,min	乙腈,%	水,%
0	35	65	35	90	10
15	45	55	50	90	10
20	45	55	55	35	65
25	50	50	70	35	65

2.3.2 线性关系考察 精密称取马兜铃酸A对照品21.8 mg,置于100 ml量瓶中,用甲醇超声溶解后放至室温,再用甲醇稀释至刻度,得溶液①。取溶液①5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液②。取溶液①25 ml,置于100 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液③。取溶液③5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液④。取溶液④5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液⑤。

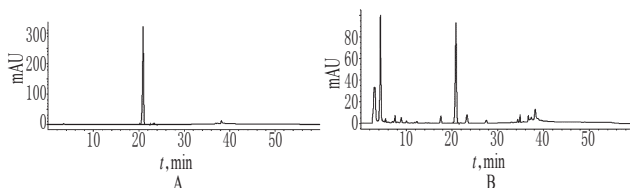


图4 高效液相色谱图

A. 马兜铃酸A对照品;B.天钻药材样品

Fig 4 HPLC chromatograms

A. aristolochic acid A control; B. *A. kwangsiensis* sample

⑤。取溶液⑤5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液⑥。取溶液⑥5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液⑦。取溶液⑦5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得溶液⑧。取以上②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧溶液各20 μl,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为横坐标,对照品质量浓度(x)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $x=0.0098y+0.0507$ ( $r=0.9999, n=7$ )。结果显示,马兜铃酸A的质量浓度在1.703~109.000 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取样品约0.5 g,置于50 ml量瓶中,用甲醇超声30 min溶解后放至室温,再用甲醇稀释至刻度,摇匀,以0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。取20 μl进样。

2.3.4 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(编号:TZ-6)0.23 g,平行9份,每3份为一组,分别加入已知样品中马兜铃酸A含量的125%、100%、75%的对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表3。

表3 马兜铃酸A的加样回收率试验结果(n=3)

Tab 3 Results of recovery tests of aristolochic acid A(n=3)

编号	称样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	226.6	0.1845	0.1308	0.3120	97.48		
2	228.1	0.1857	0.1308	0.3136	97.79	97.54	0.22
3	229.2	0.1866	0.1308	0.3139	97.36		
4	227.9	0.1855	0.1744	0.3619	101.16		
5	228.3	0.1858	0.1744	0.3611	100.52	101.16	0.63
6	230.5	0.1876	0.1744	0.3652	101.80		
7	232.9	0.1896	0.2180	0.4091	100.70		
8	231.2	0.1882	0.2180	0.4093	101.42	101.15	0.39
9	230.7	0.1878	0.2180	0.4087	101.34		

2.3.5 样品含量测定 取各批天钻药材粉末约0.5 g,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算样品中马兜铃酸A的含量,结果见表4。

表4 各批天钻药材中马兜铃酸A的含量测定结果(% ,n=3)

Tab 4 Results of content determination of aristolochic acid A in *A. kwangsiensis*(% ,n=3)

编号	马兜铃酸A含量	编号	马兜铃酸A含量
TZ-1	0.2056	TZ-7	0.1625
TZ-2	0.2064	TZ-8	0.0597
TZ-3	0.0639	TZ-9	0.0810
TZ-4	0.1748	TZ-10	0.0271
TZ-5	0.1537	TZ-11	0.0174
TZ-6	0.0814		

## 3 讨论

文献中用于马兜铃酸A含量测定的检测波长有387、304、

# 消肿接骨贴中苷类成分的定性定量研究

张金红<sup>1\*</sup>, 房德敏<sup>1#</sup>, 陈然<sup>2</sup>, 高颖<sup>1</sup>, 王巨存<sup>1</sup>, 郑榕<sup>1</sup>, 冯鑫<sup>1</sup>, 赵薇<sup>1</sup>, 虎冲<sup>2</sup>(1.天津市天津医院, 天津 300211; 2.天津医科大学临床医学院, 天津 300270)

中图分类号 R283.62<sup>†</sup>; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1037-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.27

**摘要** 目的:建立消肿接骨贴中苷类成分的定性定量方法。方法:应用薄层色谱(TLC)法对制剂中的续断和黄芪同时进行定性鉴别,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)的下层溶液为展开剂,10% (V/V)的硫酸乙醇溶液为显色剂。应用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的柚皮苷进行含量测定:色谱柱为Thermo C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(18:82, V/V),检测波长为283 nm。结果:续断和黄芪的TLC斑点清晰、分离良好,阴性对照无干扰。柚皮苷进样量在0.062 1~0.621 0 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999 7$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为99.31%, RSD=1.73% ( $n=9$ )。结论:本研究建立的方法专属性强、灵敏度高、简便、准确、重复性好,可以用于消肿接骨贴中苷类成分的定性定量研究。

**关键词** 消肿接骨贴; 苷类; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

## Qualitative and Quantitative Study of Glycosides in Xiaozhong Jiegu Plasters

ZHANG Jin-hong<sup>1</sup>, FANG De-min<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>2</sup>, GAO Ying<sup>1</sup>, WANG Ju-cun<sup>1</sup>, ZHENG Rong<sup>1</sup>, FENG Xin<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, HU Chong<sup>2</sup>(1.Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2.Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300270, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for qualitative and quantitative study of glycosides in Xiaozhong jiegou plaster. METHODS: *Dipsacus asper* and *Astragali Radix* were identified simultaneously by TLC using chloroform-methyl alcohol-water(13:7:2, V/V/V) as developing solvent and 10% (V/V) sulfuric acid ethanol as chromogenic agent. HPLC method was used to determine the content of naringin. The determination was performed on Thermo C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water(18:82, V/V) and the detection wavelength was set at 283 nm. RESULTS: TLC spots of *D. asper* and *Astragali Radix* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of naringin was 0.062 1-0.621 0 μg ( $r=0.999 7$ ) with an average recovery of 99.31% (RSD=1.73%,  $n=9$ ). RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive, simple, accurate and reproducible, and it is suitable for qualitative and quantitative identification of glycosides in Xiaozhong jiegou plasters.

**KEYWORDS** Xiaozhong jiegou plasters; Glycosides; TLC; HPLC

260 nm<sup>[7-9]</sup>,笔者通过对天钻药材的色谱图进行比较后,确定检测波长为260 nm。后又对色谱柱、流动相进行了筛选,最终确定文中色谱条件,且分离效果较好。

关于天钻中化学成分的研究较少,均完成于20世纪90年代以前,其有效成分至今尚未明确。本研究中,笔者选择天钻中含有肾毒性成分的马兜铃酸A作为指标进行含量测定,目的在于提示在天钻使用过程中应注意用药的安全性。本研究发现,购买的天钻药材中马兜铃酸A的质量分数均小于千分之一,这是否因放置时间太长或是受地域因素的影响,值得进一步研究。

综上所述,所建标准可用于天钻药材的质量控制。

## 参考文献

[1] 戴斌.中国现代瑶药[M].南宁:广西科学技术出版社,2009:79-81.

\* 药师, 硕士。研究方向:临床药学、中药制剂。电话:022-28322056。E-mail:15222836926@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:022-28317052。E-mail:fdm-wx@sohu.com

[2] 周法兴,梁培瑜,瞿赐荆,等.广西马兜铃的化学成分研究[J].药学学报,1981,16(8):638.

[3] 广西医药研究所化学室.圆叶马兜铃等三种中草药的镇痛有效部位研究[J].中草药通讯,1977,8(17):39.

[4] 广西医药研究所化学室.圆叶马兜铃等三种中草药的镇痛实验和临床观察小结[J].中草药通讯,1977,8(10):30.

[5] 洪庚辛,韦宝伟,贾文才,等.圆叶马兜铃总生物碱镇痛作用机制的研究[J].中国中药杂志,1985,10(1):38.

[6] 苟蓉,周莉,刘芳.马兜铃酸肾病发病机制的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):215.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34、附录52、附录53、附录62.

[8] 雷沛霖,李烧烧,黄兰岚.芫花药材质量标准研究[J].药物分析杂志,2008,28(5):834.

[9] 沈洁,徐向辉,徐军.贝母新咳合剂的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(31):2939.

(收稿日期:2013-10-31 修回日期:2014-01-26)