

表 3 发酵菌种与分离纯化菌种的 PCR 扩增结果

Table 3 Results of PCR amplification between fermented mycelia and pure *C. sinensis*

引物	发酵菌种标记数	分离纯化菌种的标记数	共有标记数
S7	9	8	8
S31	8	10	7
S33	13	11	11
S61	8	8	8
S80	16	16	14
总计	54	53	48
平均数	10.8	10.6	9.6
多态性/%			89.7

显的遗传分化,在一定数量引物的实验中,没有发现任何两个样本具有完全的 RAPD 标记,但亲缘关系较近的,则共有标记较多,而不同的标记能否作为不同来源样本的特征性鉴定条带,以供鉴定不同来源的虫草正在进一步的研究当中。

天然康定虫草与本院生产的人工虫草 RAPD 指纹有较大的相似之处,提示两者的药用或营养价

值可能相似。说明虫草的菌种相同,虫体也一致,且生长环境相近似时,天然冬虫夏草与人工虫草的分子水平相差不大;进一步比较天然虫草与发酵菌丝体的 DNA 指纹,相似率并不高。但分离纯化的菌丝与发酵菌丝体的 DNA 比较有较大的相似率(89.7%)。说明虫部的 DNA 差异是造成相似率差异的主要原因。提示进行 DNA 指纹比较时,材料来源部位一致性很重要。

References:

- [1] Zhang Y W, Chen Y J, Shen F R, *et al.* Study of genetic divergence in *Cordyceps sinensis* and *C. crassispora* from northwest of Yunnan Province by using RAPD [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1999, 18(2): 176-183.
- [2] Li Z Z, Huang B, Li R C, *et al.* Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis* (Berk.) SACC. I. Relation between *Hirsutella sinensis* and *C. sinensis* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19(1): 60-64.
- [3] Chen Y J, Wang W, Yang Y X, *et al.* The genetic divergence and RAPD in *Cordyceps sinensis* [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1997, 24(5): 410-416.

马蹄香的生药鉴定及其与华细辛的鉴别

彭 强¹, 赵 桦², 张国柱¹

(1. 汉中市药品检验所, 陕西 汉中 723000; 2. 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:目的 对马蹄香进行生药鉴定,并与易混品华细辛鉴别。方法 原植物特征和药材性状描述,显微镜观察,薄层色谱、高效液相色谱和荧光实验比较。结果 马蹄香和华细辛的原植物主要在是否有地上茎、叶柄是否被毛,花的类型、颜色和果实特征方面有所不同;药材性状在形状、颜色、质地、断面以及气味上存在差异;显微特征在是否检出油细胞或木纤维群以及横断面特征、淀粉粒形态上有区别;薄层、高效液相色谱和荧光特征也有明显差异,并在马蹄香中检出马兜铃酸 A。结论 为马蹄香的生药鉴定及其与华细辛鉴别提供了依据,并提示使用马蹄香应防止可能发生的马兜铃酸的毒性危害。

关键词:马蹄香;华细辛;生药鉴定;薄层色谱;高效液相色谱;马兜铃酸 A

中图分类号:R282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)02-0277-04

Pharmacognostic identification of *Saruma henryi* and differentiation of *Asarum siebodii*

PENG Qiang¹, ZHAO Hua², ZHANG Guo-zhu¹

(1. Hanzhong Institute for Drug Control, Hanzhong 723000, China; 2. Bio-Resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Key words: *Saruma henryi* Oliv.; *Asarum siebodii* Miq.; pharmacognostic identification; TLC; HPLC; aristolochic acids A

马兜铃科植物马蹄香 *Saruma henryi* Oliv. 为我国特有单种属植物,分布于陕西、四川、贵州、湖北、江西、河南、甘肃等省。其干燥的根及根茎在民间药用,习称马蹄香、冷水丹、高脚细辛、马头细辛。性

温,味辛、苦,有小毒,具温中散寒、理气镇痛功能,主治胃寒痛、心前区痛和关节痛等症^[1]。马蹄香的人药部位与陕西产的同科植物华细辛 *Asarum siebodii* Miq. 的人药部位相同,其名称与华细辛的别名白细

辛相近,加之细辛类药材的品种较多,药名中多有“细辛”二字,如毛细辛、铜钱细辛、马蹄细辛等,因而有将马蹄香误认作细辛的现象。在对马蹄香的检测中,发现本品含马兜铃酸,而马兜铃酸的肾毒性正引起人们的广泛关注^[2]。因此,对马蹄香进行生药学鉴定,并与华细辛的根及根茎比较,为鉴别提供依据。

1 实验材料、仪器与试剂

1.1 材料:马蹄香药材采自汉中镇巴,部分样品来源于民间药摊;华细辛药材来源于民间药摊,部分样品购于当地药材市场并取其根及根茎。两种药材样品的原植物均由笔者鉴定,分别为 *S. henryi* Oliv. 和 *A. siebodii* Miq.。

1.2 仪器:XSJ—1 型研究生物显微镜(重庆光学仪器厂)。SP8810 高效液相色谱仪,SP8450 检测器和 SP4290 积分仪(美国)。紫外分析仪(356 nm,上海科仪光学仪器厂)。

1.3 试剂:薄层色谱用硅胶 G(化学纯,青岛海洋化工有限公司)。马兜铃酸 A 对照品(批号:0746-9002,中国药品生物制品检定所)。实验用其他试剂除另有注明外,均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 马蹄香的原植物特征:多年生草本,根及根状茎鲜时为淡灰黄色,干后呈灰褐色至灰黑色,搓揉有芳香气。地上茎直立,通常高 45~65 cm,有时可达 1 m,表面被灰褐色短柔毛。叶多枚互生于茎,肾状心形或宽心形,长 6.5~14 cm,宽 7~15 cm,先端渐尖或短渐尖,叶两面均有短毛或表面无毛;叶柄长 2~8 cm,被细毛。花单生,花梗长 3~5 cm,被毛;花被 2 轮,辐射对称,萼筒基部与子房合生,顶端 3 裂片,宽心形,外面被毛;花瓣 3,黄绿色,圆肾形,长约 1 cm;雄蕊 12 枚,2 轮;子房半下位,心皮 6 枚,下部合生,上部分离。蒴果蓇葖状,成熟时沿腹缝线开裂。

华细辛原植物与马蹄香的主要区别是,根及根状茎干后呈灰黄棕色至灰黄白色,搓揉有辛香气。无地上茎,叶基生常 2 枚对生,叶柄光滑,长 6~14 cm。花梗无毛;花被 1 轮,下部合生成筒,上部 3 裂片,紫黑色或深紫色,无毛;合生的 6 枚心皮仅花柱部分离生。蒴果半球形似浆果状。

2.2 马蹄香的药材性状:根茎斜向横生,呈不规则圆柱形,长 4~7 cm,直径 4~6 mm,具多数长短不等的分枝;表面灰褐色,较粗糙,有环形的节,节间长 0.3~0.5 cm,分枝的顶端具茎残基或洞状凹陷茎痕;质硬脆,折断面不平坦,黄白色,中心空洞或呈枯朽状。根细密,生于根茎节上,多弯曲,长 7~13 cm,

直径 1~1.5 mm,表面棕褐色至灰黑色,平滑或具纵皱纹,有须根及须根痕;质脆,易折断,断面平坦,黄白色,周围边缘灰黑色。气香,味微辛、苦。

华细辛与马蹄香的主要区别是,根茎细长,长 5~15 cm,直径 1~2 mm;表面灰黄棕色,节间长 0.1~1 cm,分枝顶端有小碗状茎痕;质脆,折断面实。根长 10~20 cm,表面及断面均为黄白色至灰黄白色。气辛香,味辛辣、麻舌。

2.3 马蹄香的显微特征

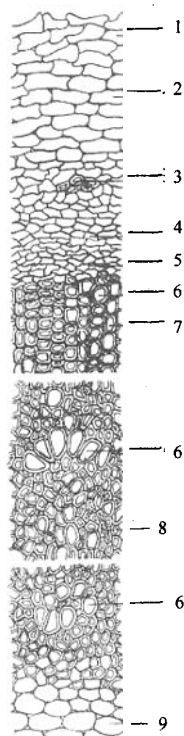
2.3.1 根茎横切面:最外为数层褐色栓质化细胞,皮层薄壁细胞 10 余层,细胞切向延长,细胞壁具多数扁狭纹孔,胞腔有的含草酸钙砂晶和不规则方晶。维管束 10 多个环列,韧皮部狭窄,幼嫩根茎的韧皮部外侧有时可见由 3~5 个纤维组成的纤维束。束中形成层明显。木质部较发达,木质部束厚度不均匀,形成宽窄不等的木质部区;木纤维成片。髓部外侧薄壁细胞类圆形至椭圆形,排列疏松,有的含草酸钙砂晶,中心部位常被毁或成空洞;髓射线在较老根茎中明显。薄壁细胞含淀粉粒(图 1)。

华细辛根茎横切面与马蹄香的主要区别是,最外为一层表皮细胞;表皮下方为 1~2 (3) 层厚角组织,含细小草酸钙砂晶;皮层细胞有的含细小草酸钙砂晶,偶含方晶,油细胞散在;维管束 6~7 个,形成层不明显,木质部无明显的木纤维群;髓部完整,具油细胞。

2.3.2 根横切面:最外为数层褐色至棕褐色栓质化细胞,偶见残存表皮。皮层由 10 余层略切向延长的薄壁细胞组成,有的含不规则草酸钙方晶和砂晶。内皮层细胞一层,较小,隐约可见凯氏点。中柱鞘细胞 2 层。韧皮部狭。形成层不明显。木质部轮廓类圆形,导管单个或 2 至数个相聚,呈径向排列,有木纤维群分布。薄壁细胞含淀粉粒(图 2)。

华细辛根横切面与马蹄香不同的是,残存表皮明显,下皮细胞含细小草酸钙砂晶,皮层发达,外侧细胞偶含草酸钙方晶,油细胞散在;内皮层和中柱鞘细胞均为 1 层;木质部无木纤维群。

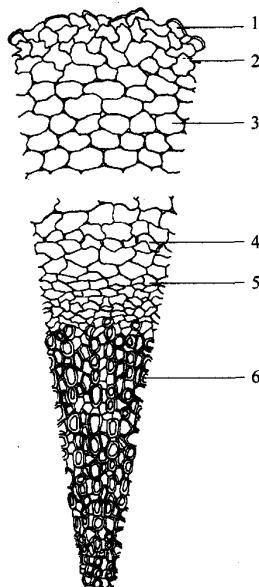
2.3.3 根粉末:浅灰色,气香,味微辛、苦。淀粉粒众多,其中较小的占大多数,直径在 2~8 μm ,单粒类球形和类多面体形,脐点点状、短缝状,复粒由 2~10 分粒组成;较大的形状不一,呈圆球状者直径 15~24 μm ,呈长球状、卵状、长圆三角体形者直径(长×宽) 20~48 μm ×16~32 μm ,呈类贝壳状者直径 16~18 μm ,脐点点状、短缝状、三叉状,少数有细密层纹。皮层薄壁细胞类长多角形,含草酸钙方晶及



1-栓化组织 2-皮层 3-初生韧皮纤维 4-韧皮薄壁组织 5-形成层 6-木质部导管 7-木射线 8-木纤维 9-髓细胞

图1 马蹄香根茎横切面

Fig. 1 Rhizome transection of *S. henryi*



1-残存表皮 2-栓化层 3-皮层 4-内皮层 5-韧皮部 6-木质部

图2 马蹄香根横切面

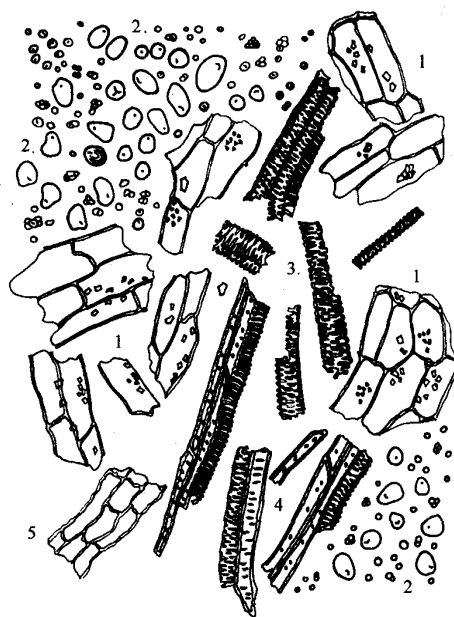
Fig. 2 Root transection of *S. henryi*

砂晶,方晶形状不规则,直径 $2\sim 12\mu\text{m}$,偶见由方晶簇集的晶体,直径约 $14\mu\text{m}$ 。木纤维多成束,单个直径 $14\sim 16\mu\text{m}$,先端短斜尖或钝,壁厚 $2\sim 4\mu\text{m}$,具少数单纹孔。导管为梯纹、网纹和环纹,少数为孔纹,直径 $8\sim 28\mu\text{m}$ 。可见淡棕黄色至棕黄色的栓化组织碎片(图3)。

华细辛根粉末与马蹄香不同的是,气辛香,味辛辣、麻舌;淀粉粒单粒类圆形或长圆形,直径 $2\sim 18\mu\text{m}$,复粒多至15分粒组成;草酸钙砂晶细小,无木纤维;另可检出类长方形且壁细波状弯曲的下皮细胞、油细胞和细胞界限不清晰的棕色表皮。

2.4 理化鉴别

2.4.1 取马蹄香和华细辛根及根茎粉末各 0.5g ,分别加石油醚($30\sim 60^\circ\text{C}$)超声处理3次,每次 10mL 、 10min ,滤过。取两种滤渣,挥尽石油醚,分别加乙醚超声处理3次,每次 10mL 、 10min ,滤过。取两



1-皮层薄壁细胞(含草酸钙晶体) 2-淀粉粒

3-导管 4-木纤维 5-栓化组织

1-dermal parenchyma cell (oxalate crystal) 2-starch

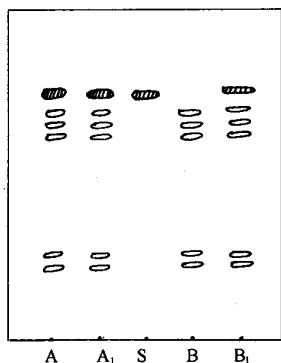
3-vessel 4-wood fiber 5-suberization

图3 马蹄香根粉末

Fig. 3 Powder of *S. henryi* root

种滤渣,挥尽乙醚,分别加甲醇回流2次,每次 10mL 、 15min ,滤过。合并各自甲醇液,分别浓缩至 1mL ,得2种供试液。另取马兜铃酸A对照品,加乙醇制成 0.5mg/mL 的对照品液。吸取2种供试液各 $10\mu\text{L}$ 、对照品液 $5\mu\text{L}$,分别点于同一硅胶GCMC薄层板上使成条状;另吸取2种供试液各 $10\mu\text{L}$,分别同法点样后,再吸取对照品液各 $5\mu\text{L}$ 加于2种供试品原点条斑上,以甲苯-醋酸乙酯-水-甲酸($20:10:1:1$)的上层展开,取出,晾干。分别在日光下和 365nm 紫外灯下检视。结果见图4。供试品马蹄香加点和未加点对照品的色谱在与马兜铃酸A对照品色谱相应位置上,日光下均各显一个相同的灰黄色条斑,紫外光下该条斑呈暗灰黄色(加点对照品的条斑系重合条斑,其色泽均较深),同时在紫外光下尚各显5个相同的荧光色斑。供试品华细辛加点对照品的色谱在与马兜铃酸A对照品色谱相应位置上,日光下和紫外光下均分别显一个相同颜色条斑,同时在紫外灯下检出与马蹄香色谱中其他5个荧光斑点相同的色斑;华细辛未加点对照品的色谱,日光下未检出任何斑点,紫外灯下只检出与马蹄香色谱中其他5个荧光斑点相同的色斑(图4)。

2.4.2 样品荧光特征比较:取定性滤纸条(宽 1



A-马蹄香 A₁-马蹄香加马兜铃酸 A
B-华细辛 B₁-华细辛加马兜铃酸 A S-马兜铃酸 A
A-S. henryi A₁-S. henryi and aristolochic acids A
B-A. sieboldii B₁-A. sieboldii and aristolochic acids A
S-aristolochic acids A

图 4 甲醇提取液 TLC 谱

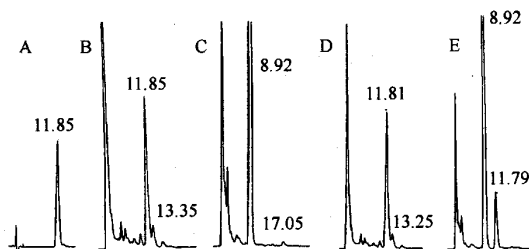
Fig. 4 TLC chromatograms of MeOH extract

cm) 蘸取 2 种供试液各少许, 挥干, 置 365 nm 紫外光下检视。结果马蹄香显黄绿色荧光, 华细辛显天蓝色荧光。

2.4.3 样品中马兜铃酸的 HPLC 检查: 取马蹄香和华细辛根及根茎粉末各 0.5 g (过 2 号筛), 加甲醇 15 mL, 水浴回流 1 h, 滤过。取滤液加甲醇至 10 mL, 混合均匀, 得 2 种甲醇液。取上述 2 种甲醇液各 1 mL, 加甲醇稀释至 10 mL, 混匀, 得 2 种供试品液。精密称取马兜铃酸 A 对照品 0.010 9 g, 加甲醇溶解使成 100 mL, 取 5 mL, 加甲醇稀释至 25 mL 作为对照品液。

色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸 (68 : 31 : 1); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 315 nm; 进样量: 2 种供试品液、对照液各 10 μL 分别进样; 2 种供试品液各 5 μL, 再分别加入对照品液 5 μL 进样。理论塔板数以马兜铃酸 A 计不低于 4 000。结果见图 5。供试品华细辛未加对照品的色谱在与马兜铃酸 A 对照品色谱相应出峰时间上未检出色谱峰, 而加对照品的色谱则检出马兜铃酸 A 色谱峰; 供试品马蹄香无论未加和加对照品的色谱均在与马兜铃

酸 A 对照品色谱相应出峰时间上检出色谱峰, 并且加对照品的色谱峰系重合峰 (图 5)。



A-马兜铃酸 A B-马蹄香 C-华细辛
D-马蹄香加马兜铃酸 A E-华细辛加马兜铃酸 A
A-aristolochic acids A B-S. henryi C-A. sieboldii
D-S. henryi and aristolochic acids A
E-A. sieboldii and aristolochic acids A

图 5 HPLC 谱

Fig. 5 HPLC chromatograms

3 讨论

3.1 已知含马兜铃酸的中药材有马兜铃、关木通、青木香、天仙藤、朱砂莲、广防己、汉中防己和寻骨风等。有关马蹄香根及根茎含马兜铃酸尚未见报道。本实验在对马蹄香与华细辛 (根及根茎) 生药鉴别中采用薄层和高效液相色谱方法, 并在 2 种样品中分别加入马兜铃酸 A 对照品进行验证, 确证在本实验条件下马蹄香中可检出马兜铃酸 A, 而在华细辛的根及根茎中未检出。显示是否检出马兜铃酸 A 是鉴别两者的一个重要依据; 同时提示使用马蹄香时应注意防止由马兜铃酸引起的毒害。

3.2 马蹄香与华细辛同属于马兜铃科, 药用部位相同, 药用别名容易混淆, 但可依据原植物是否有地上茎、各部分被毛情况、花果结构和色泽差异; 药材外形、颜色、质地、断面与气味上的差别; 根中是否有油细胞或木纤维群、淀粉粒形态以及横切面中维管束和根茎髓部的不同特点加以区别。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [2] Rao X R, Li S, Li X Y, et al. The analysis of two letters to FDA on Chinese herb nephropathy of Chinese herb containing aristolochic acid [J]. *Chin Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2001, 8(2): 82.