

- 业), 201, 22(4): 6.
- [9] Zhu H, Xu Z F, Li B G, et al. A discussion on the loss of biodiversity of tropical rain forest by *Amomum* planting underneath in south Yunnan [J]. *Guihaia* (广西植物), 2002, 22(1): 55-60.
- [10] Feng Y L, Feng Z L, Cao K F. The protective mechanisms against photoinhibitory damage in *Amomum villosum* Lour. [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 2001, 27(6): 483-488.
- [11] Zheng Z, Feng Z L, Gan J M. Impact of disturbance of planting *Amomum villosum* in tropical seasonal rain forest on forest net primary productivity in Xishuangbanna [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2003, 27(1): 103-110.
- [12] Sha L Q, Meng Y, Feng Z L, et al. Nitrification and NET N mineralization rate of soils under different tropical forests in Xishuangbanna, Southwest China [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2004, 24(2): 152-156.
- [13] Zhang P, Guo H J, Yang S X, et al. Ecological distribution and biochemical properties of soil microorganisms in Gaoligong Mountains [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 1999, 10(1): 74-78.
- [14] Yang X D, Liu H M, Zheng Z, et al. Effect of planting *Amomum* on soil arthropod communities in tropical seasonal rain forest in Xishuangbanna [J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 2003, 22(4): 10-15.
- [15] Gao L, Liu H M, Cui J Y, et al. Analysis on the sustainability of *Amomum villosum* under the tropical rain forest in Xishuangbanna [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2002, 13(3): 262-266.
- [16] Gao L, Liu H M. Restoration of tropical rain forest after removing *Amomum villosum* in Xishuangbanna [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2003, 27(3): 366-372.

## 马兜铃酸的测定方法现状分析

路金才<sup>1</sup>, 韩 娜<sup>1</sup>, 杜晓曦<sup>2</sup>, 周跃华<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

马兜铃酸是一类广泛存在于马兜铃科植物中的含有硝基的非类有机酸, 近年来, 国外不断有报道证明该成分有肾毒性, 可引起肾间质纤维化, 许多国家采取了禁止或限制使用马兜铃科中药的措施, 这使中药的安全性受到了很大质疑。马兜铃科药用植物在我国的使用广泛, 加之马兜铃科许多植物名称混淆, 药材混用现象严重, 为确保临床用药的安全有效, 对于那些可能含有马兜铃酸的药用植物及制剂必须进行严格的控制。为此, 选择既符合检出限度的要求又方便可行的马兜铃酸测定方法尤为重要, 马兜铃酸的测定方法很多, 不同方法对于马兜铃酸测定的结果有很大差别。为此, 本文对文献中报道过的马兜铃酸测定方法进行了整理、分析, 以便为实际应用时参考。

### 1 高效液相色谱(HPLC)

高效液相色谱法是目前马兜铃酸测定应用最多的方法, 该法比较灵敏、准确, 在实际应用中还有多种条件组合可供选择以适应不同的待测样品。

1.1 供试品溶液的制备: 在马兜铃酸测定时供试品溶液的制备是很重要的一步, 为了提高提取效率, 在有效提取之前一般可对待测样品进行浸泡, 在提取方法的选择上, 目前仍以甲醇索氏提取法、乙醇索氏提取法、甲醇超声提取法、5%氨水冷浸法为主。有文献采用振荡法, 并用该法对不同极性的溶剂提取率进行了比较, 以马兜铃酸 A 及马兜铃酸 B 为参考指标, 发现 70% 甲醇的提取率最高<sup>[1]</sup>。由于马兜铃酸是酸性物质, 提取时在有机溶剂中加入适量甲酸提取效果会更好, 利用这一原理, 选择了甲醇-10% 甲酸(80:20)进行提取; 刘燕等<sup>[2]</sup>也比较了乙醇、丙酮、含 10% 甲酸的二氯甲烷及含 10% 甲酸的丙酮的提取率, 以含 10% 甲酸的丙酮提取

率最高。

初步提取之后, 可以直接滤过、蒸干、溶解、定容, 也可以进一步进行纯化。纯化的主要办法是进行萃取, 这样有利于除去内酰胺、木兰碱等杂质成分<sup>[2]</sup>。萃取溶剂多以氯仿、乙醚为主, 利用 NaOH、HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等调节酸碱度, 当 pH=10 时, 有机酸大量成盐进入碱水层, 当 pH=2 时, 有机酸又会游离到有机相, 如此反复多次萃取, 最大限度的转移马兜铃酸。近年来, 受到美国食品药品监督管理局(Food and Drugs Administration, FDA)对马兜铃酸检测办法的影响, 超声后直接离心, 吸取上清液的办法也应用得越来越广泛。Lee 等<sup>[3]</sup>还报道了用 PHP-LH-20(1.5 cm×2 cm)柱, 25℃下以 30 mL/min 的体积流量先用 20 mL H<sub>2</sub>O 和 40 mL 甲醇, 再用 130 mL 含 10% 乙酸的甲醇液冲柱进行供试品溶液的制备。另见报道对粗提物也采用了固相纯化技术<sup>[4]</sup>。

1.2 对照品溶液的制备: 检测时所用对照品有马兜铃酸 A, 也有马兜铃酸 A 和马兜铃酸 B 的混合物, 多以甲醇溶解, 配成溶液后一般要进行超声脱气处理。

### 1.3 高效液相色谱-紫外分光光度法

1.3.1 紫外检测器: 现在使用的紫外检测器主要有可变波长紫外检测器、紫外-可见分光光度检测器、二极管矩阵检测器(DAD)。马兜铃酸 A 的最大吸收波长在 224、253、319、390 nm 处, 因此在紫外检测时, 检测波长的选择很多。Chang 等<sup>[5]</sup>选择 395 nm 作检测波长, 认为该波长下干扰峰最少。还有文献进一步报道, 在对含有马兜铃酸的成药进行分析时, 以马兜铃酸 B 为指标, 在 254 或 395 nm 作检测波长时均受干扰峰影响, 以马兜铃酸 A 为指标 254 nm 处易受干扰, 395 nm 检测时干扰小, 故选择 395 nm 作检测波长。应当考虑,

收稿日期: 2005-08-19

作者简介: 路金才(1971—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中药资源开发及中药材质量控制的教研科研工作。

Tel: (024)23986500 Fax: (024)23922065 E-mail: jincailu@yahoo.com.cn

390 nm 处的吸收系数很小,作为检测波长时,仪器的灵敏度可能会稍差,能否作为最佳的检测波长还有待商榷。目前,使用 HPLC-UV 对马兜铃酸进行质量检测的报道中,以信噪比 2:1 计,最低检测限为  $2.48 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ 。

1.3.2 色谱柱:固定相填料多为反相  $C_{18}$  填料,应用的色谱柱有  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 、 $6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ 、 $3 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 、 $5 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$  等多种规格。填料粒径多为  $5 \mu\text{m}$ ,也有  $10$ 、 $3.5 \mu\text{m}$  的报道。关于系统适应性实验的报道中,色谱柱理论塔板数至少在 2 000 以上。

1.3.3 流动相:常用的流动相系统为甲醇-水-醋酸,比例随实验条件差异而有所不同。Singh 等<sup>[6]</sup>对流动相进行了优化,通过比较不同的流动相乙腈-水-三氟乙酸、乙腈-水-醋酸、乙腈-水-醋酸-四氢吡喃及乙腈-水-三氟乙酸-四氢吡喃下峰的对称性、纯度、容量因子及理论塔板数,发现乙腈-水-三氟乙酸-四氢吡喃(50:50:1:1)为最优的溶剂系统。此外,其他的溶剂系统还有甲醇-四氢吡喃-0.025 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=3.8)<sup>[7]</sup>、乙腈-2.0%醋酸<sup>[5]</sup>、乙腈-0.3%碳酸铵(pH=7.5)<sup>[3]</sup>等,为保证良好的分离度,还可以采用梯度洗脱的办法,有报道采用乙腈-甲醇-0.1%三氟乙酸、乙腈-水-0.005%三氟乙酸<sup>[8]</sup>,不断调整比例以获得满意的分离效果。此外赵竟等<sup>[9]</sup>利用离子对色谱法适合分离有机酸类物质的原理,采用甲醇-1.28%四丁基氯化铵醋酸-pH=3.6 醋酸-醋酸钠缓冲液(2:1:1)作流动相,对马兜铃酸进行了测定,也取得了满意的结果。

目前,大多数 HPLC 法对马兜铃酸进行分析时保留时间一般在 15 min 左右,有时甚至能达到 40 min,不利于高通量的马兜铃酸检测,近期有报道解决了这一问题<sup>[10]</sup>,采用  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$  柱子,填料粒径为  $5 \mu\text{m}$ ,254 nm 作检测波长,对流动相进行了优化,确定最优的溶剂系统为甲醇-水(60:40),在该条件下马兜铃酸 A 与马兜铃酸 B 在 5 min 内得到了良好的基线分离。

1.3.4 柱温及体积流量:通常设在 1.0 mL/min,快者可达 1.2 mL/min,慢者在 0.5 mL/min。柱温一般设在室温,高者达 40 °C。

1.4 液相色谱-质谱(LC-MS):近年来,LC-MS 法有了很大发展,是目前比较灵敏的方法。LC-MS 法可以提供总离子流色谱图、质量色谱图及对应于每个色谱峰的物质质谱图,故可以进行定性、定量分析。近年来对于 LC-MS 法的报道已不再拘泥于简单的一液一质的串联,而是趋向于多个质谱串联,或与多元化的检测器进行串联。Jong 等<sup>[8]</sup>采用 LC-(+)APCI-MS-MS 技术,以消炎痛作为内标物,对 9 种细辛中马兜铃酸进行了定量分析。还有人采用 LC-UV-DAD-MS 对马兜铃酸进行了检测,图谱信息包括保留时间、质量碎片及各色谱峰的紫外吸收情况,可以简单的判断出峰的纯度,该报道采用(+)APCI 与离子阱质量分析,用选择离子检测模式得到的最低检测限是 2 ng,采用全扫描时最低检测限为 15 ng。

在 LC-MS 技术中,流量对分析的影响比较大,宜根据柱内径大小加以选择。如 2.1 mm 内径配 0.2 mL/min 体积

流量,3.0 mm 内径配 0.5 mL/min,4.6 mm 内径配 1.0 mL/min 体积流量等。离子扫描范围根据定性、定量要求不同加以选择。LC-MS 法是目前马兜铃酸含测最灵敏的方法,但由于仪器价格昂贵,短时间内难以推广。

## 2 薄层色谱法(TLC)

2.1 供试品溶液的制备:薄层色谱法供试品溶液的制备方法与 HPLC 供试品的制备方法相比较为简单,提取方法以乙醇回流或索氏提取为主,此外,还有甲醇回流提取、甲醇索氏提取或丙酮索氏提取法<sup>[11]</sup>等。一般不需要进行复杂的纯化,直接滤过、蒸干、定容即可。对照品多用马兜铃酸 A。

2.2 薄层板:目前报道中薄层色谱固定相主要采用硅胶 G 板和 GF<sub>254</sub> 板 2 种。

2.3 展开剂:有甲苯-醋酸乙酯-水-甲酸、苯-甲醇-36%醋酸、苯-丙酮-甲酸、甲苯-冰醋酸-水-甲酸、氯仿-甲醇-醋酸乙酯、氯仿-环己烷-醋酸乙酯-冰醋酸、石油醚-丙酮-冰醋酸、氯仿-甲醇-醋酸、苯-庚烷-氯仿-醋酸等。总体来看,展开剂极性不大,均加入适量醋酸以防止拖尾现象的产生。

2.4 斑点检测:一般马兜铃都是在日光下或紫外 365 nm 下检视,若使用 GF<sub>254</sub> 板,紫外 254 nm 下显示暗斑。黄顺旺等<sup>[12]</sup>报道了在紫外 365 nm 及日光下检视,马兜铃酸的最低检测限为 0.369  $\mu\text{g}$ 。有文献报道<sup>[4]</sup>,用含 0.5% 二苯胺的 60%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  显色,100 °C 下加热 10 min 后,日光下可见深蓝色或黑色斑点,最低检测限可达 1  $\mu\text{g}$ ;紫外 366 nm 下可见蓝色荧光斑点,最低检测限可达 0.2  $\mu\text{g}$ 。

2.5 扫描参数:薄层扫描法在早期马兜铃酸的检测中应用较多,但该法的检出限较高,灵敏度和仪器误差也较大。扫描方式主要有单波长反射法锯齿扫描、双波长反射法锯齿扫描、单波长反射法线性扫描。采用单波长扫描时,扫描波长一般设在 320 nm 处,若采用双波长扫描,扫描波长一般有以下几种设置: $\lambda_s = 395 \text{ nm}$ , $\lambda_R = 500 \text{ nm}$ ; $\lambda_s = 320 \text{ nm}$ , $\lambda_R = 370 \text{ nm}$ ; $\lambda_s = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_R = 370 \text{ nm}$  等。付桂香等<sup>[13]</sup>对线性化参数进行了考察,发现  $S_x = 3$  时线性最好,狭缝宽度主要有  $0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ 、 $0.4 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$ 、 $1.2 \text{ mm} \times 1.2 \text{ mm}$  等几种。

## 3 毛细管区带电泳法(CZE)

近年来,毛细管电泳法(CE)发展迅猛,无论从柱效、速度,还是从样品用量、成本来看,该法都显示了一定的优越性,通过改变操作模式及流动相的成分,CE 具有很大的选择性,将 CE 用于马兜铃酸的分析,也有了很大的发展,值得推广。有文献报道,采用 CZE 法对马兜铃酸进行质量分析<sup>[14]</sup>,选择未涂融合硅胶的毛细管柱( $48.5 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ ),10 °C 柱温,30 kV 电压,254 nm 检测波长,用优化流动相 120 mm 含 10 mol/L  $\beta\text{-CD}$  的磷酸盐缓冲液(pH=8.8)洗脱,4 min 内马兜铃酸 A 和马兜铃酸 B 得到良好分离,最低检测限可达 1.0  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 4 紫外分光光度法(UV)

紫外分光光度法用于对马兜铃酸的测定,操作及原理都比较简单,主要用于总酸类成分的测定。尚明英等<sup>[15]</sup>将检测波长设在 310 nm 处,用 UV 法对 20 批关木通中总马兜铃酸进行了测定,回收率可达 98.5%。此外,有文献采用二阶导

数分光光度法对血浆中的马兜铃酸进行了测定,消除血浆光谱的干扰,对于成分复杂的天然药物,该法有一定指导作用。

5 极谱法(polarography)

由于马兜铃酸的分子结构上有硝基基团,在滴汞电极上能产生还原波,利用这一性质可以用极谱法对马兜铃酸进行测定。张秀琴等<sup>[16]</sup>报道了在(25±1)℃,pH=8.5 Britton-Robinson 缓冲溶液做底液条件下测定朱砂莲中马兜铃酸的量,获得满意的回收率。目前报道的极谱法中最低检测限为 0.01 mg/L。极谱法专属性相对较差,应用的最少。

6 讨论

HPLC 法是目前应用比较广泛、比较好的检测方法。建议实际应用时采用 HPLC 法进行马兜铃酸的测定或限量检查,并进行系统的方法学研究,以客观、真实地反映药材及制剂中马兜铃酸的状况。在实际应用时应关注以下问题:(1)检测限是 HPLC 方法学考察的重要内容,应尽量降低检测限。一般以信噪比为 3:1 或 2:1 时相应浓度或注入仪器的量确定检测限。如果检测限过高,则应对检测方法或条件进行调整。(2)药材中所含成分较多,不同植物中所含成分也各不相同,相关中成药中的成分则更复杂,所以进行方法学研究时,应当关注方法的属性。(3)测定用样品的制备也会对测定结果产生很大影响。当供试样品的浓度较低时,会影响马兜铃酸的检出。应尽量提高供试样品的浓度。(4)马兜铃酸类成分有多种,总酸类成分大都具有毒性,目前的文献报道和药品注册申报的资料中都只是对马兜铃酸 A 进行了定量控制,有条件时,应当鼓励对其他的马兜铃酸类成分,或对总酸类成分进行研究。

马兜铃酸的测定方法很多,每种方法的方法学研究还不很完善,由于马兜铃酸的毒性作用大,所以十分有必要建立一个检测限度低,线性范围宽,重现性好的质量控制方法,这不仅关系到用药安全问题,也关系到我国的中药能否通过技术壁垒走向国际市场。马兜铃酸的控制办法还有待于深入研究。

References:

[1] Kite G C, Yule M A, Leon C, et al. Detecting aristolochic acids in herbal remedies by liquid chromatography/serial mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spect*, 2002, 16: 585-590.

[2] Liu Y, Wang B Q, Determination of aristolochic acid A in *Aristolochia Contorta* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Durgs* (中草药), 1990, 21(6): 15-16.  
[3] Lee T Y, Wu M L, Deng J F, et al. High-Performance liquid chromatographic determination for aristolochic acid in some medicinal plants and sliming products [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 766: 169-174.  
[4] Ioset J R, Raelison G R, Hosttettmann K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplement used as slimming regimes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(1): 29-36.  
[5] Chang Y S, Deng J S, Ku Y R. Determination of aristolochic acid in traditional Chinese prescriptions, containing *Radix Aristolochiae Fangchi* by HPLC [J]. *J Liquid Chromatogr Relat Technol*, 2002, 25(6): 961-975.  
[6] Singh D V, Singh B L, Verma R K, et al. Quantitation of aristolochic acid using high performance liquid chromatography with photodiode array detection [J]. *J Indian Chem Soc*, 2001, 78(9): 487-488.  
[7] Ye Z M, Zhang Y, Wang Y M. Determination of aristolochic acid A content in *Caulis Aristolochiae manshuriensis* and other four Aristolochic Chinese herb drugs by HPLC [J]. *Fudan Univ J: Med Sci* (复旦学报:医学版), 2003, 30(5): 491-493.  
[8] Jong T T, Lee M R, Hsiao S S. Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xixin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/atmosphere pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33: 831-837.  
[9] Zhao N, Lai J F, Bi K S. Determination of aristolochic acid A in *Radix Aristolochiae* by RP-HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18(2): 125-127.  
[10] Wei Li, Runkai Li, Tao Bo, Huwei Liu, et al. Rapid determination of aristolochic acid I and II in some medicinal plants by High-performance liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 2004, 59(3/4): 233-236.  
[11] Chen Y Y, Luo G A, Jin C S, et al. Determination of total aristolochic acid, cinnamic acid and cinnamic acid benzylethylester in Guanxinshuhe Pills [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1991, 13(4): 10.  
[12] Chen H A, Xu G J, Jin R L, et al. Determination of aristolochic acid I and total alkaloids in fangchi [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(6): 323-324.  
[13] Fu G X, Zhao S P, Chen W, et al. TLCS Determination of aristolochic acid in Longdanxiegan Pills [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(3): 171-173.  
[14] Li W, Gong S X, Wen D W, et al. Rapid determination of aristolochic acid I and II in *Aristolochia* plants from different regions by  $\beta$ -cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1049: 211-217.  
[15] Shang M Y, Li J, Hu B, et al. Determination of total aristolochic acid in stem of *Aristolochia manshuriensis* [J]. *Chin Tradit Herb Durgs* (中草药), 2000, 31(12): 899-890.  
[16] Zhang X Q, Xu L X. Determination of aristolochic acid in *Aristolochia tuberosa* C. F. Liang et S. M. Hwang Willd [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1982, 13(10): 448-451.

松龄血脉康胶囊治疗心脑血管疾病临床研究进展

张庆平

(义乌中医院,浙江义乌 322000)

心脑血管疾病是循环系统和神经系统的一大类严重疾病,是由动脉血管粥样硬化引起的心脏、脑缺血或出血的疾病。据世界卫生组织公布的数据显示,心脑血管疾病已经成为危害人类健康的第一杀手,目前,我国约有 1.1 亿人患有

高血压、动脉硬化等心脑血管疾病,6 000 万人患有冠心病,7 000 万人患有脑梗死或者脑溢血,40 岁以上的人中,约有 57% 的人患有不同程度的心脑血管疾病。心脑血管疾病以其发病率高,兼有高死亡率、高复发率、高致残率的特点,成为