

细辛中马兜铃酸 A 与黄樟醚的炮制减毒方法研究

严建业¹, 王元清², 王 炜¹, 王 智¹, 彭买姣¹, 朱承慧³, 席秀丽⁴, 廖端芳^{1*}, 罗 堃^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院 中药现代化重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院 生物技术与工程实验室, 湖南 长沙 410004

3. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

4. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究细辛中马兜铃酸 A 与黄樟醚炮制减毒方法。方法 采用 HPLC 法, 对细辛生品及各个炮制品中黄樟醚、马兜铃酸 A 的量进行检测, 以其量变化为评价指标比较不同炮制方法对毒性物质的去除效果。结果 黄樟醚进样量在 169.2~846.0 μg ($r=0.999\ 6$) 有良好线性关系, 平均回收率为 99.83%, RSD 为 1.67%; 马兜铃酸 A 进样量在 11.6~58.0 ng 有良好线性关系, 平均回收率为 101.43%, RSD 为 1.25%。黄樟醚的炮制去除效果的大小顺序为盐制>炒焦>米泔水制>碱制>甘草制>醋制>姜制>酒制>碱醋制>蜜制, 其中盐制与炒焦对细辛中黄樟醚的去除率达到 55%以上; 马兜铃酸 A 的炮制去除效果的大小顺序为炒焦>碱醋制>盐制>碱制>醋制>米泔水制>甘草制>酒制>蜜制>姜制, 其中炒焦对细辛中马兜铃酸 A 的去除率达到 60%以上。结论 细辛炮制后, 黄樟醚和马兜铃酸 A 的量都有不同程度的降低, 其中以炒焦炮制最优。

关键词: 细辛; 炮制; 黄樟醚; 马兜铃酸 A; 高效液相法; 炒焦

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0216-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.012

Research on reducing safrole and aristolochic acid A in *Asari Radix et Rhizoma* based on different processing techniques

YAN Jian-ye¹, WANG Yuan-qing², WANG Wei¹, WANG Zhi¹, PENG Mai-jiao¹, ZHU Cheng-hui³, XI Xiu-li⁴, LIAO Duan-fang¹, LUO Kun¹

1. Key Laboratory of Modernization of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Laboratory of Biotechnology and Engineering, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

3. School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

4. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the effect of processing techniques on reducing the contents of safrole and aristolochic acid A in *Asari Radix et Rhizoma*. **Methods** The contents of safrole and aristolochic acid A between raw herb and processed products were determined by HPLC, and the differences in the contents of toxic components between raw herb and processed products were used to evaluate the detoxification efficiency. **Results** The linear ranges of safrole and aristolochic acid A were 169.2—846.0 μg ($r = 0.999\ 6$) and 11.6—58.0 ng ($r = 0.999\ 6$), respectively. And the average recovery rates were 99.83% (RSD = 1.67%) and 101.43% (RSD = 1.25%). The removal rate of safrole in order was as follows: salt system > fried coke > rice water system > alkali > liquorice > vinegar > ginger > wine > alkali-vinegar > honey and the removal rate of aristolochic acid A was in order as: fried coke > alkali-vinegar >

收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 中药有毒物质防控技术湖南省工程实验室项目 (201304); 湖南省教育厅科研项目 (14C0863); 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心项目资助 (湘科计字 [2013] 83 号); 湖南省高校“中药新药创制与资源综合持续利用”科技创新团队资助 (湘教通 [2010] 212 号); 湖南省“中药学”重点学科资助 (湘教通 [2011] 76 号)

作者简介: 严建业 (1975—), 男, 博士, 副教授, 从事中药药剂的教学与科研工作。Tel: (0731)88458231 E-mail: yanjianye201@126.com

***通信作者** 廖端芳 Tel: (0731)88458002 E-mail: dfliao66@aliyun.com

罗 堃 Tel: (0731)88458229 E-mail: 23689818@qq.com

salt system > alkali > vinegar > rice water system > liquorice > wine > honey > ginger. The removal rate of aristolochic acid A in *Asari Radix et Rhizoma* by fried coke was over 60%. **Conclusion** The contents of saffrole and aristolochic acid A in *Asari Radix et Rhizoma* could be decreased to different extent by processing techniques. Among the processing methods, processing by fried coke is the best method.

Key words: *Asari Radix et Rhizoma*; processing techniques; saffrole; aristolochic acid A; HPLC; fried coke

细辛 *Asari Radix et Rhizoma* 为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 或华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎^[1]，具有祛风散寒、祛风止痛、通窍、温肺化饮之功效。细辛化学成分主要含有萜类（挥发油的主要成分）、植物甾醇类、苯丙基及其苷类（如甲基丁香酚、黄樟醚等）、木脂素类（如细辛脂素）、生物碱及酰胺类（如马兜铃内酰胺）、有机酸类及其酯类（如马兜铃酸）等^[2]。细辛除了有显著的临床功效外，同时还有小毒，“细辛不过钱，过钱命相连”的古训制约着细辛的临床应用，《中国药典》2010年版对其用量定为“1~3 g，散剂 0.5~1 g”。据文献报道^[3-5]，细辛中主要的毒性成分马兜铃酸 A 与黄樟醚分别具有较强的肾毒性与致癌作用。可见，采用合适的方法尽可能地去除细辛中的毒性物质，提高细辛临床应用的安全性是细辛现代研究的必然趋势与必然要求。

有关细辛减毒的炮制方法报道中，主要以马兜铃酸 A 为评价指标进行炮制减毒，而同时考虑马兜铃酸 A 与黄樟醚 2 种毒性成分的减毒炮制方法未见报道。本实验借鉴传统中药炮制经验与文献方法，对细辛根采用 10 种炮制方法进行炮制，以马兜铃酸 A 和黄樟醚的量变化为评价指标评价不同炮制方法的减毒效果，探究细辛炮制减毒的方法，为细辛加工炮制和临床应用提供参考。

1 仪器与材料

Agilent1200 型高效液相色谱仪，美国安捷伦公司；KQ5200DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

细辛购于高桥药材大市场，经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.；马兜铃酸 A 对照品，批号 10281-201303，质量分数 98%，购于南昌贝塔生物科技有限公司；黄樟醚对照品，批号 201403，质量分数 98%，购于四川香料厂；乙腈，色谱纯，美国 Tedia 公司；水为重蒸水，其他试剂

均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备^[6-7]

2.1.1 酒制 取细辛 25 g，加入 10 g 黄酒拌匀，闷润，待黄酒被吸尽后，干燥，备用。

2.1.2 醋制 取细辛 25 g，加入 20 g 米醋拌匀，闷润，待米醋被吸尽后，干燥，备用。

2.1.3 蜜制 取细辛 25 g，加入 6 g 炼蜜拌匀，闷润，待蜜汁被吸尽后，干燥，备用。

2.1.4 碱制 取细辛 25 g，加入 40 倍 0.01 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液浸泡 3 次，每次 24 h，浸泡过的细辛干燥，备用。

2.1.5 碱醋制 取细辛 25 g，加入 40 倍 0.01 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液浸泡 3 次，每次 24 h，浸泡过的细辛置烘箱中干燥至干；将 10 g 米醋稀释 2 倍后，用醋将碱制后的细辛拌匀，闷制，润透，干燥，备用。

2.1.6 盐炙 取细辛 25 g，加入 6 g 粗盐，用适量清水（能够完全浸泡药材）浸泡，与药物拌匀，闷润 5 min，置炒锅内用文火炒 5 min，取出，冷却，干燥，备用。

2.1.7 姜炙 取细辛 25 g，加入生姜汁 5 g，拌匀，充分闷润，待姜汁完全被吸尽后，再用文火炒干，取出，冷却，干燥，备用。

2.1.8 甘草制 取细辛 25 g，加入 25 mL 甘草汁拌匀，闷润，待甘草汁被吸尽后，干燥，备用。

2.1.9 炒焦 取细辛 25 g，置炒锅内用中火或武火炒，表面焦褐色，内部加深，焦香气，取出，冷却，备用。

2.1.10 米泔水制 取细辛 25 g，加入 25 mL 米泔水（第 2 次淘米水）拌匀，闷润，待米泔水被吸尽后，干燥，备用。

2.2 黄樟醚定量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 称取细辛生品及各炮制品粉末（过 3 号筛）约 0.5 g，置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声 30 min，定容，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄樟醚对照品 42.3 mg，分别置 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀

释至刻度, 摇匀, 再精密量取 2.0 mL 对照品溶液, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成含黄樟醚 84.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 285 nm; 流动相为乙腈-0.2%醋酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~15 min, 30%~35%乙腈; 15~25 min, 35%~42%乙腈; 25~30 min, 42%~45%乙腈; 30~40 min, 45%~90%乙腈; 40~45 min; 90%~30%乙腈。对照品及样品的色谱图见图 1。

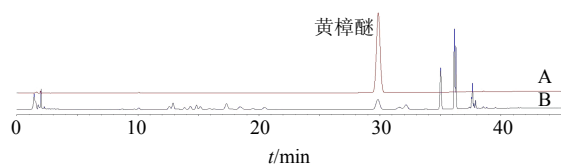


图1 黄樟醚对照品 (A) 与酒制样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of safrole reference substances (A) and wine-processed samples (B)

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 84.6 $\mu\text{g/mL}$ 的黄樟醚对照品储备溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 1.5 mL 的 EP 管中, 加甲醇使成 1.0 mL, 摇匀。分别吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=1.2314X-10.120$, $r=0.9996$, 结果表明黄樟醚在 169.2~846.0 μg 有良好的线性关系。

2.2.5 精密度考察 精密吸取同一供试品溶液 (细辛生品), 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 按“2.2.3”项下色谱条件测定, 黄樟醚峰面积的 RSD 为 1.69%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (细辛生品) 10 μL , 注入液相色谱仪, 分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 检测, 记录色谱图, 黄樟醚峰面积的 RSD 为 1.25%, 表明供试品溶液于 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取细辛粉末 (北细辛生品) 约 0.5 g, 共 6 份, 按照“2.2.1”制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 计算得黄樟醚质量分数的 RSD 为 1.69%, 表明该方法重复性好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定黄樟醚量的细辛粉末 (北细辛生品) 约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 准确加入适量黄樟醚对照品, 照定量测定项下操作,

测定其量, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.83%, RSD 为 1.67%。

2.2.9 生品与炮制品中黄樟醚的测定 按照“2.2.1”项方法将生品与各炮制品制备成供试品溶液, 在“2.2.3”项色谱条件下进行测定, 计算各样品中黄樟醚的量以及各炮制品中黄樟醚去除率, 结果见表 1。可知, 黄樟醚的炮制去除效果的大小顺序为盐制>炒焦>米泔水制>碱制>甘草制>醋制>姜制>酒制>碱醋制>蜜制, 其中盐制与炒焦对细辛中黄樟醚的去除率达到 55%以上, 可以有效减毒。

表1 各炮制品中黄樟醚的量及其去除率比较

Table 1 Comparison on contents and removal rates of safrole among different processed products

炮制方法	黄樟醚/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	去除率/%
生品	3.72	—
盐制	1.50	59.65
炒焦	1.65	55.73
米泔水制	2.28	38.71
碱制	2.48	33.43
甘草制	2.61	29.84
醋制	2.73	26.74
姜制	3.18	14.41
酒制	3.23	13.13
碱醋制	3.42	8.10
蜜制	3.58	3.76

2.3 马兜铃酸 A 定量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取细辛生品及各种炮制品粉末 (过 3 号筛) 约 6 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入 150 mL 甲醇 (含 2% 甲酸) 超声 40 min, 减压抽滤, 滤液蒸干, 回收甲醇, 残渣用甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取马兜铃酸 A 对照品 5.8 mg, 置于 10 mL 的量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 作为储备液备用。移取 500 μL 对照品储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 29 $\mu\text{g/mL}$ 的马兜铃酸 A 对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 检测波长 316 nm; 其余同“2.2.3”项。对照品及样品的色谱图见图 2。

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取 29 $\mu\text{g/mL}$ 的马兜铃酸 A 对照品溶液 40、80、120、160、200 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中, 加甲醇使成 1.0 mL, 摇匀。

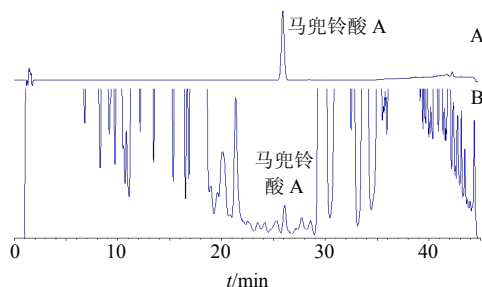


图 2 马兜铃酸 A 对照品 (A) 与酒制样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of aristolochic acid A reference substance (A) and wine-processed sample (B)

分别吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以进样量为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=2.3828X-3.360$, $r=0.9996$,结果表明马兜铃酸 A 进样量在 11.6~58 ng 有良好的线性关系。

2.3.5 精密度考察 精密吸取同一供试品溶液 (细辛生品),注入液相色谱仪,重复进样 6 次,按“2.3.3”项下色谱条件测定,马兜铃酸 A 的峰面积的 RSD 为 1.19%,表明仪器的精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (细辛生品) 10 μL ,注入液相色谱仪,分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 检测,记录色谱图,马兜铃酸 A 峰面积的 RSD 为 1.17%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取约 6.0 g 北细辛生品粉末共 6 份,制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 20 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,计算得马兜铃酸 A 质量分数的 RSD 为 1.29%,表明该方法重复性好。

2.3.8 加样回收率试验 取已测定马兜铃酸 A 量的细辛约 3.0 g,共 6 份,精密称定,准确加入适量对照品,照定量测定项下操作,测定其量,计算回收率,结果平均回收率为 101.43%,RSD 为 1.25%。

2.3.9 生品与炮制品中马兜铃酸 A 的测定 按照“2.3.1”项下方法将生品与各炮制品制备成供试品溶液,在“2.3.3”项下色谱条件下进行测定,计算各样品中马兜铃酸 A 的量以及各炮制品中马兜铃酸 A 去除率,结果见表 2。可知,马兜铃酸 A 的炮制去除效果的大小顺序为炒焦>碱醋制>盐制>碱制>醋制>米泔水制>甘草制>酒制>蜜制>姜制,其中炒焦对细辛中马兜铃酸 A 的去除率达到 60%以上,可以有效减毒。

表 2 各炮制品中马兜铃酸 A 的量及其去除率比较

Table 2 Comparison on contents and removal rates of aristolochic acid A among different processed products

炮制方法	马兜铃酸 A/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	去除率/%
生品	1.08	—
盐制	0.84	22.59
炒焦	0.39	63.00
米泔水制	0.99	7.56
碱制	0.87	19.23
甘草制	1.01	6.54
醋制	0.95	11.74
姜制	1.04	3.65
酒制	1.02	5.51
碱醋制	0.77	28.60
蜜制	1.03	4.32

3 讨论

文献报道^[8]马兜铃酸 A 的 UV 检测波长有 250、223、390 nm 等。本课题组对细辛生品及炮制品测定时,发现 250 nm 的吸收峰较大,但同时基线噪音大、干扰大。而有文献报道^[9]马兜铃酸 A 在 316 nm 处具有稳定、吸收强等特点,本实验选择 316 nm 时,马兜铃酸 A 附近的干扰较少,吸收较好,因而选择 316 nm 为马兜铃酸 A 检测波长。

马兜铃酸 A 的分析常用乙腈或甲醇与含少量酸的水作为流动相,乙腈的分离效果优于甲醇,在实验中,比较了乙腈-0.2%醋酸水溶液、乙腈-0.5%醋酸水溶液、乙腈-1%醋酸水溶液的分离效果,其中乙腈-0.2%醋酸水溶液分离效果较好。因此,选用乙腈-0.2%醋酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱,并在本实验的色谱条件下,可将马兜铃酸 A 与黄樟醚很好地分离。由于马兜铃酸 A 的量很低,与黄樟醚的样品处理方法不同,因而没有在同一色谱条件下同时测定,而是采用分别测定的方法。

测定马兜铃酸 A 的样品处理中,溶剂考察了甲醇与含 2%甲酸的甲醇,甲醇-2%甲酸溶液的提取效果较好,所含的马兜铃酸 A 的量较高,与文献报道一致。样品处理方面,由于样品中马兜铃酸 A 的量非常低,低于限量标准,参照《中国药典》2010 年版方法测定时马兜铃酸 A 的量达不到定量限,而采用本实验的样品处理方法处理样品可以较好地测定马兜铃酸 A 的量,且方法学考察合格。

本实验首次探讨 10 种炮制方法对细辛中 2 种毒性成分影响,发现 10 种炮制方法均能降低细辛中毒

性成分马兜铃酸 A 和黄樟醚的量,其中炒焦的炮制方法明显优于其他炮制方法。马兜铃酸 A 的量由 1.08 $\mu\text{g/g}$ (生品)降到 0.39 $\mu\text{g/g}$ (炒焦品),去除率达到 63%;黄樟醚的量由 3.72 mg/g (生品)降到 1.65 mg/g (炒焦品),去除率达到 56%。黄樟醚为较强的挥发性成分,在炒制过程中容易挥发散失而达到减毒的目的;而有关马兜铃酸 A 炒焦减毒的机制有待进一步研究。另外,课题组对马兜铃酸 B 的减毒效果也做了一定的研究,发现生品中马兜铃酸 B 的量很低,经炒焦炮制后未见到马兜铃酸 B 的色谱峰,表明炒焦炮制对毒性成分马兜铃酸 B 也有去除作用。由于炮制品中马兜铃酸 B 痕量而难达到检测限与定量限,所以未对其进行定量研究。有文献报道^[10]炒焦能较好地保留有效成分甲基丁香酚和细辛脂素,可见,细辛采用炒焦炮制既可以去除毒性成分又能较好地保留有效成分,达到很好地减毒存效的效果。这为《本草纲目拾遗》中“去叶节炒焦”“北细辛烘干”和《圣济总录》中“去苗叶炒”的传统理论提供了炮制减毒的现代科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨春澍,孙建宁,黄建梅. 细辛属和八角属中药研究与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [3] Zeng Y, Yang X, Wang J, *et al.* Aristolochic acid I induced autophagy extenuates cell apoptosis via ERK 1/2 pathway in renal tubular epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30312.
- [4] Jin M, Kijima A, Suzuki Y, *et al.* Comprehensive toxicity study of safole using a medium-term animal model with gpt delta rats [J]. *Toxicology*, 2011, 290(2/3): 312-321.
- [5] 王潇晗,张连学,郜玉钢,等. 含马兜铃酸中药减毒的研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3241-3244.
- [6] 刘雅婧. 细辛中马兜铃酸的炮制脱毒研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [7] 张春红,曹蕊,李虔全,等. 不同炮制方法对关木通减毒存效作用的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 149-151.
- [8] 袁金斌. 马兜铃酸类物质的液相色谱联用技术及应用 [D]. 长沙: 湖南大学, 2008.
- [9] Guo L, Yue H, Cai Z. A novel pre-column fluorescent derivatization method for the sensitive determination of aristolochic acids in medicinal herbs by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(1): 37-42.
- [10] 黄蛟,易进海,刘玉红,等. 炒制对细辛中黄樟醚、甲基丁香酚和细辛脂素含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 2709-2711.