

文章编号: 1673-1689(2010)02-0201-05

青木香发酵后总马兜铃酸和马兜铃酸 I 的含量测定

刘学湘, 潘扬*, 蒋亚平, 杨英, 蔡江涛

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘要: 以灵芝、槐耳等 20 个真菌为菌种、青木香药材为基质, 运用固体发酵技术, 在一定的条件下进行发酵试验, 筛选出 13 个菌种能在青木香药材上生长良好, 表明这些菌种能与药材形成较好的发酵组合形成发酵品。采用反相 HPLC 二元梯度洗脱法测定 13 种青木香发酵品中马兜铃酸 I (AA I) 的含量及紫外分光光度法 (UV) 测定这些发酵品中总马兜铃酸 (TAA) 含量。HPLC 测定表明, 13 种青木香发酵品主要肾毒性成分马兜铃酸 I 均有不同程度的下降, 其中有 6 种发酵品的马兜铃酸 I 的下降率在 50% 以上; UV 测定发现, 这些发酵品中总马兜铃酸含量均有所下降, 下降率最高者为 46.76%, 最低者为 7.61%; HPLC 和 UV 综合 (加权) 分析表明, 13 种真菌 (均以代号表示) 对青木香肾毒性成分的降解能力由大至小依次排列如下: F-1> F-2> F-5> F-6> F-8> F-13> F-4> F-11> F-3> F-9> F-10> F-12> F-7。提示不同真菌发酵可在不同程度上降低中药青木香中肾毒性成分马兜铃酸 I 和总马兜铃酸的含量。

关键词: 青木香; 真菌发酵; 总马兜铃酸; 马兜铃酸 I; 含量测定

中图分类号: R 282

文献标识码: A

Determination of Total Aristolochic Acids and Aristolochic Acid I in *Radix aristolochiae* after Fermentation

LIU Xue-xiang, PAN Yang*, JIANG Ya-ping, YANG Ying, CAI Jiang-tao

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: With *Radix aristolochiae* as substrate, twenty fungi was test and 13 different fungi were found to be grown on it. Compare with that of the control, the AA I content was decreased in those 13 fermentation product, and the AA I content in 6 fermentation product was lower than 50%, compared with that of the control. Similarly, the TAA contents were also detected to be decrease. Among of them, the highest and lowest rate of decline was 46.76% and 7.61%, respectively. After statistical analysis, the ability to decompose the nephrotoxic substances in *Radix aristolochiae* of the 13 fungi was illustrated as follows (from the strong to the weak): F-1> F-2> F-5> F-6> F-8> F-13> F-4> F-11> F-3> F-9> F-10> F-12> F-7 (the symbol of different fungi). Those results indicated that different fungi fermentation could efficient decrease

收稿日期: 2009-04-10

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金项目 (06 KJB360083); 江苏省“青蓝工程”项目 (2008)。

作者简介: 刘学湘 (1973-), 女, 江西南昌人, 讲师, 理学硕士, 主要从事中药生物技术研究。Email: cyg20020515@yahoo.com.cn

* 通信作者: 潘扬 (1964-), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 主要从事中药生物技术研究。

Email: y.pan2006@163.com

the nephrotoxic components in *Radix aristolochiae*.

Key words: *Radix aristolochiae*, fungi fermentation, total aristolochic acids, aristolochic acid I , determination

青木香为马兜铃科植物马兜铃的干燥根,具有平肝止痛,解毒消肿的作用,临床上用于眩晕头痛,胸腹胀痛,痈肿疔疮,蛇虫咬伤等。2004 年, SFDA 取消了青木香的药用标准, 处方和制剂中以土木香(菊科植物土木香或总状土木香的干燥根)代替。土木香为藏药,在植物来源、功能主治、化学成分、药理作用和临床应用等方面与青木香均有所不同,两者不应相互替代^[1]。有鉴于此, 如何去除青木香等含马兜铃酸类中药材中肾毒性成分并保持其原有的药效, 一直是近年来研究的热点问题。

目前对此类药物研究最多的为关木通, 使用的手段有炮制^[2]、复方配伍^[3]和改变入药形式^[4]等, 也有采用微生物发酵的方法^[5], 但对青木香的相关报道较少。作者前期研究以灵芝、槐耳等 20 个真菌为菌种、青木香药材为基质, 运用固体发酵技术, 在一定的条件下进行发酵试验, 筛选出 13 个菌种能在青木香药材上生长良好, 表明这些菌种能与药材形成较好的发酵组合形成发酵品(结果将另文发表)。作者建立反相高效液相法(HPLC)测定 13 种青木香发酵品中马兜铃酸 I 含量, 以及紫外分光光度法(UV)测定这些发酵品中总马兜铃酸含量, 观察不同真菌发酵对中药青木香中肾毒性成分马兜铃酸 I 和总马兜铃酸含量的影响, 旨在为探索发酵法对含马兜铃酸类中药材的“去毒存效”奠定良好的物质基础。

1 实验方法

1.1 仪器与材料

Shimadzu LG-10AT 高效液相色谱仪: 日本岛津公司产品; Waters 2695 高效液相色谱-质谱联用仪: 美国沃特斯公司产品; UV-2401 PC 紫外可见分光光度仪: 日本岛津公司产品; 立式压力蒸汽灭菌器 LDZX-50KB: 上海申安医疗器械厂产品; 超净工作台 403: 江苏无锡县空气净化设备厂产品; 隔水式电热培养箱 PYX-DHS: 上海医疗器械七厂产品; SYZ-A 石英亚沸高纯水蒸馏器: 江苏金坛国胜仪器厂产品; AE240 电子天平: METTLER 公司产品; 202 型电热恒温干燥箱: 上海索普仪器有限公司产品; FW80 型微型高速万能试样粉碎机: 齐家务科学仪器厂产品。

青木香药材, 购自南京鹿江中药饮片厂, 批号: 20070728, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为马兜铃科植物马兜铃(*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc)的干燥根; 马兜铃酸 I 对照品, 购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110746-200305, 纯度大于 98%; 乙腈为色谱纯(TEDIA), 自制重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

20 个真菌菌种均由南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所提供, 其中 13 个菌种的代号分别如下: F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、F-6、F-7、F-8、F-9、F-10、F-11、F-12 和 F-13。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵处理 按固体发酵的生产工艺进行操作^[6]。将青木香粉碎成粗粒(过 10 目筛), 加适量水湿润, pH 自然, 填装试管, 混合均匀, 扎口, 121℃高压灭菌 50 min, 冷却, 作为发酵基质用; 从菌种斜面上切取绿豆粒大小的一块菌丝体连同培养基, 移入发酵基质的表面(两者须有接触), 扎口, 置于培养箱中 28℃恒温培养, 定期观察并记录生长情况。发酵 30 d 后, 取出, 60℃下干燥 24 h, 备用。

1.2.2 HPLC 法测定马兜铃酸 I 含量 参照文献方法^[7], 自行确定了马兜铃酸 I 二元梯度洗脱 HPLC 定量分析条件。

(1) 系统适应性试验: 色谱柱为 Hanbon C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm); 流动相: 乙腈(A) - 体积分数 0~2% 醋酸水溶液(B) 进行梯度洗脱, 0~25 min, 15% A→30% A; 25~45 min, 30% A→50% A; 45~55 min, 50% A→60% A; 55~75 min, 60% A→80% A; 75~80 min, 80% A→15% A; 流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30℃; 运行时间: 80 min, 梯度平衡时间: 10 min。该条件下对照品峰与样品中其他色谱峰基本达到基线分离, 理论板数按马兜铃酸 I 峰计算不低于 15 000。

(2) 对照品溶液的制备: 称取马兜铃酸 I 对照品 4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇约 7 mL, 置水浴上微热使溶解, 冷却至室温, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(每 mL 含马兜铃酸 I 为 0.4 mg)。

(3) 线性关系的考察: 吸取对照品溶液 25、50、100、200 和 250 μL, 分别置 1 mL 量瓶中, 加甲醇至

刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 10、20、40、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马兜铃酸 I 溶液。照前述色谱条件分别进样 10 μL , 测定, 记录峰面积值。以峰面积为纵坐标(Y)、对照品质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标(X), 绘制标准曲线。结果表明: 回归方程为 $Y = 3.74 \times 10^6 X - 13\,916 (r = 0.999\,5)$, 马兜铃酸 I 在 10 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

(4) 供试品溶液的制备: 取干燥青木香发酵品(或药材) 2 g, 粉碎(过 60 目筛), 称重, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加体积分数 60% 甲醇 20 mL, 浸泡 30 min 后, 水浴回流 1 h, 过滤, 滤液蒸干, 残渣以甲醇定容至 50 mL, 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析。

1.2.3 紫外分光光度法测定总马兜铃酸含量

(1) 线性关系的考察: 量取马兜铃酸 I 对照品溶液(质量浓度为 0.4 mg/mL) 30, 60, 120, 150, 210 μL , 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀(质量浓度分别为 1.2, 2.4, 4.8, 6.0, 8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在 250 nm 波长处测定样品吸收度, 以对照品吸收度 A 为纵坐标、质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标 C , 绘制标准

曲线。结果表明: 回归方程为 $A = 0.1007C + 0.001 (r = 0.999\,2)$, 马兜铃酸 I 在 1.2~8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈现良好线性关系^[8]。

(2) 供试品溶液的测定: 吸取上述供试品溶液(2 g $\rightarrow$ 50 mL) 60 μL , 稀释并定容至 10 mL, 混匀, 以甲醇为参比溶液。在波长 250 nm 处测定样品吸光度值, 标准曲线法计算样品中总马兜铃酸的质量分数(%)。

2 实验结果

2.1 菌丝体生长情况

按 1.2.1 发酵条件得到的 13 种真菌在青木香药材上的发酵生长情况详见表 1。

2.2 发酵前后 HPLC 比较

发酵前后 HPLC 比较见图 1。

2.3 发酵前后样品中马兜铃酸类成分的含量变化
马兜铃酸 I 的 HPLC 测定结果和总马兜铃酸的 UV 测定结果详见表 1。

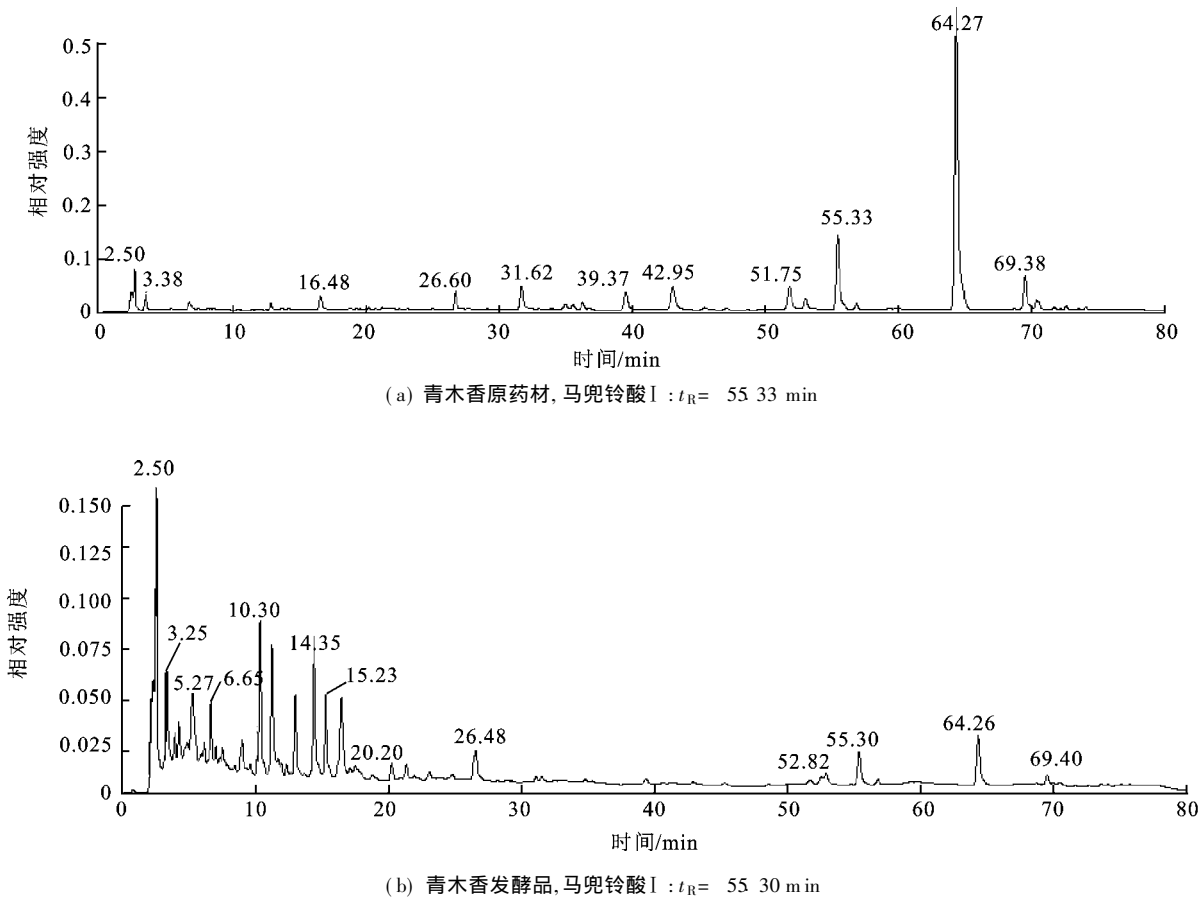


图 1 青木香发酵前后的 HPLC 比较图

Fig. 1 HPLC results of Radix aristolochiae after and before fermentation

表 1 青木香 13 种发酵品各指标变化情况表
Tab. 1 The parameters of the thirteen fermented products

菌种 代号	菌丝体 生长情况 ^①	发酵品 得率/% ^②	马兜铃酸 I 下降率/% ^③	总 马兜铃酸 下降率/% ^③	加权值/ % ^④
Raw ^⑤	-	-	-	-	-
F- 1	+	63.9	78.70	46.76	62.73
F- 2	+	70.8	68.62	37.05	52.84
F- 3	+	50.3	5.99	32.04	19.02
F- 4	+	61.7	26.10	40.32	33.21
F- 5	+	69.1	65.83	36.13	50.98
F- 6	+	58.1	71.97	22.99	47.48
F- 7	+	81.6	1.10	19.88	10.49
F- 8	+	74.8	80.15	7.61	43.88
F- 9	+	58.1	10.24	22.43	16.34
F- 10	+	58.8	8.31	20.59	14.45
F- 11	+	45.8	12.21	27.75	19.98
F- 12	+	84.8	0.76	23.35	12.06
F- 13	+	57.9	51.63	28.31	39.97

注: ① + + + + 表示生长极好, + + + 表示生长很好, + + 表示生长较好, + 表示生长一般; ② 发酵品得率(%) = 发酵品干重(g)/ 发酵前药材质量(g) × 100 ③ 马兜铃酸 I 下降率和总马兜铃酸下降率均是与原药材比较得出的结果; ④ 加权值(%) = (马兜铃酸 I 下降率 + 总马兜铃酸下降率) / 2; ⑤ Raw: 青木香原药材。

3 讨 论

体积分数选用甲醇- 醋酸水溶液、乙腈- 醋酸水溶液以及乙腈与 0 2%、0. 4%、0 6%、0 8%、1% 等 5 种不同体积分数的醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱测定。结果表明: 乙腈- 醋酸水溶液条件下的色谱峰分离度、峰形、柱效等参数优于甲醇- 醋酸水溶液系统; 且上述提及的 5 种不同体积分数的醋酸水溶液对色谱峰的影响并不大, 考虑到流动相 pH 值过低影响色谱柱的使用寿命, 故采用乙腈- 醋酸(体积分数 0 2%) 水溶液的二元梯度系统进行测定; 还比较了马兜铃酸 I 及其它组分在 315 nm 和 250 nm 两个波长处的吸收, 250 nm 处检测的灵敏度较高。

在同一发酵条件下, 通过约 30 d 对菌丝体生长情况的观察, 发现其中 13 种真菌在青木香基质上生长良好, 菌丝体发育正常, 表明这些菌种与青木香基质相适应。HPLC 测定表明, 这 13 种发酵品中青木香基质中肾毒性成分马兜铃酸 I 均有不同程度下降, 其中有 6 种发酵品马兜铃酸 I 的下降率在 50% 以上; 其 HPLC 的化学指纹谱亦有不同程度

的变化。通过 LG-MS 进一步分析, 发现这些发酵品除马兜铃酸 I 以外, 其他马兜铃酸类化合物如马兜铃酸 II、马兜铃酸 III 等含量等均有不同程度的变化, 且都出现原药材所没有的未知成分(结果将另文发表)。UV 测定显示, 13 种发酵品中总马兜铃酸含量均有所下降, 下降率最高者为 46 8%, 最低者为 7. 6%; HPLC 和 UV 综合(加权) 分析结果证明, 13 种真菌(代号) 对青木香药材中主要肾毒性成分的降解能力排列如下: F- 1> F- 2> F- 5> F- 6> F- 8> F- 13> F- 4> F- 11> F- 3> F- 9> F- 10> F- 12> F- 7。

发酵是利用真菌中的多种酶使底物(包括中药材) 进行各种各样的化学反应, 如氧化还原反应、脱羧反应、去硝基反应或甲基化反应等而发生转化。青木香中的主要毒性成分为马兜铃酸类化合物, 而主要有效成分是挥发油类物质^[9]。作者通过 13 种真菌的固态发酵使马兜铃酸类化合物发生了不同程度的降解或转化, 从而达到降低这类有毒成分含量的目的。至于青木香中挥发油类成分发酵前后的变化有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 高卫东, 李卫民, 高英, 等. 土木香能否代替青木香用药的探讨 [J]. 中国药房, 2006, 17 (7): 556– 557.
GAO Weidong, LI Weimin, GAO Ying, et al. Can Radix inulae replace Radix aristolochiae as medicinal material [J]. **Chinese Pharmacy**, 2006, 17 (7): 556–557. (in Chinese)
- [2] 王智民, 由丽双, 姜旭, 等. 利用炮制技术去除关木通毒性成分的方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(16): 1243– 1246.
WANG Zhimin, YOU Lishuang, JIANG Xu, et al. Methodological studies on selectively removing toxins in Aristolochiae manshuriensis by Chinese processing techniques [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2005, 30 (16): 1243–1246. (in Chinese)
- [3] 李春香, 丁里玉, 李国川, 等. 复方配伍减低关木通肾毒性的实验研究 [J]. 中医杂志, 2006, 47 (9): 694– 697.
LI Chunxiang, DING Liyu, LI Guochuan, et al. Experimental study on concerted application of complex prescription for reducing the renal toxicity of *Aristolochia manshuriensis* Kom [J]. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2006, 47 (9): 694– 697. (in Chinese)
- [4] 张翠英, 王璇, 尚明英, 等. 以关木通为例探讨不同入药形式对中药中有毒成分含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (11): 835– 839.
ZHANG Cuiying, WANG Xuan, SHANG Mingying, et al. Affection of different preparations on the content of toxic constituents in traditional Chinese medicines, exemplified with *Caulis Aristolochiae Manshuriensis* [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2005, 30 (11): 835– 839. (in Chinese)
- [5] 郭永超, 林哲绚, 罗文鸿. 短刺小克银汉霉菌对马兜铃酸 A 的代谢转化 [J]. 药物生物技术, 2006, 13 (6): 451– 455.
GUO Yongchao, LIN Zhexuan, LUO Wenhong. Microbial transformation of aristolochic acid I by *Cunninghamella blakesleana* [J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2006, 13 (6): 451– 455. (in Chinese)
- [6] 徐锦堂. 中国药用真菌学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 230– 232.
- [7] Jinbin Yuan, Qian Liu, Guobing Wei, et al. Characterization and determination of six aristolochic acids and three aristolactams in medicinal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry [J]. **Mass Spectrom**, 2007, 21(14): 2332– 2342.
- [8] 李琳, 王智民, 高慧敏, 等. 含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12 (2): 11– 13.
LI Lin, WANG Zhimin, GAO Huimin, et al. Determination of total aristolochic acid in traditional Chinese medicines containing aristolochic acid by ultraviolet spectrophotometry [J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2006, 12 (2): 11– 13. (in Chinese)
- [9] 秘琳, 王金华, 王智民, 等. 青木香挥发油药效学研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (21): 2324– 2325.
MI Lin, WANG Jinhua, WANG Zhimin, et al. Pharmacodynamic study on volatile oil in Radix aristolochiae [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2007, 32 (21): 2324– 2325. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)