

文章编号: 1006-2858(2011)10-0797-04

HPLC 法测定辽细辛不同药用部位 马兜铃酸 IVA 的含量

陈婧¹, 孙博航¹, 黄健¹, 高慧媛¹, 王建强², 吴立军¹

(1. 沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016;

2. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立辽细辛不同药用部位中马兜铃酸 IVA 的含量测定方法。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Shiseido C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸(体积比 55:44:1), 检测波长为 252 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果 马兜铃酸 IVA 质量浓度在 4.720 ~ 47.20 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r = 0.999\ 6$, $n = 6$), 辽细辛根、根茎和叶中马兜铃酸 IVA 的平均回收率分别为 99.6%、99.4%、98.9% ($n = 6$), RSD 均小于 2.8%。结论 方法简便、快速、准确, 可为辽细辛不同部位的质量控制提供参考依据。

关键词: 辽细辛; 马兜铃酸 IVA; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R 917; R 284.1

文献标志码: A

辽细辛 (*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt Var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.) 为马兜铃科细辛属植物细辛的主要品种之一, 我国主要分布于东北地区。细辛具有祛风散寒、通窍止痛、温肺化饮等功效, 常用于治疗风寒感冒、头痛、牙痛、鼻塞鼻渊等病症^[1]。近年来一些文献报道, 细辛、马兜铃、防己、关木通等药材中的马兜铃酸类化合物具有致癌及肝、肾损害作用^[2-3], 含有马兜铃酸类化合物的药品及药材被许多国家禁用。马兜铃酸为硝基菲酸类成分, 其中最为常见的为马兜铃酸 I, 目前报道细辛中马兜铃酸 I (化学结构式见图 1) 的含量测定方法的文献有很多, 但是很多批次的细辛药材中仅检出极其微量的马兜铃酸 I, 同时未见有关其他马兜铃酸类成分在细辛中含量测定的报道。作者所在课题组前期对辽细辛的地上、地下部分中的化学成分进行了较系统的研究^[4], 从中分离得到马兜铃酸 IVA (化学结构式见图 1)。因此, 作者建立马兜铃酸 IVA 的含量测定方法并探讨细辛不同药用部位该毒性成分的含量差异, 为此类药材及相关药材安全有效入药部位的确定提供参考依据。

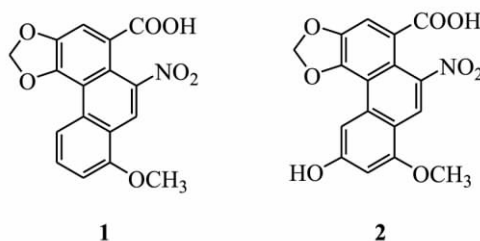


Fig. 1 Structures of aristolochic acid I (1) and aristolochic acid IVA (2)

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (L-7110 输液泵、L-7400 紫外可见检测器, 日本 Hitachi 公司), FL9500 工作站 (浙江福立分析仪器有限公司), Shiseido C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本资生堂公司), BS24S 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

马兜铃酸 IVA (自制, HPLC 峰面积归一化法纯度质量分数大于 98%), 纯净水 (杭州娃哈哈集团), 甲醇 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 冰醋酸 (分析纯, 天津百世化工有限公司), 其他所用试剂 (分析纯, 市售)。

辽细辛药材由辽宁省鑫泰药业有限公司提

收稿日期: 2011-03-28

基金项目: 国家十一五重大科技支持计划课题资助项目 (2006BAI06A00-06)

作者简介: 陈婧 (1985-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, E-mail cindy_1119@163.com; 吴立军 (1945-), 男 (汉族), 黑龙江肇东人, 教授, 博士, 主要从事中药、天然药物活性成分以及生物转化的研究, Tel. 024-23986481, E-mail wulijun_111@hotmail.com。

供,经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为辽细辛(*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt Var. *mandshuricum*(Maxim.) Kitag.)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Shiseido C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μ m); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(体积比 55:44:1); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 检测波长: 252 nm; 进样量: 10 μ L。

在上述色谱条件下,理论塔板数以马兜铃酸 IVA 计算不低于 3 000,马兜铃酸 IVA 与相邻峰的分离度大于 1.5,色谱图见图 2。

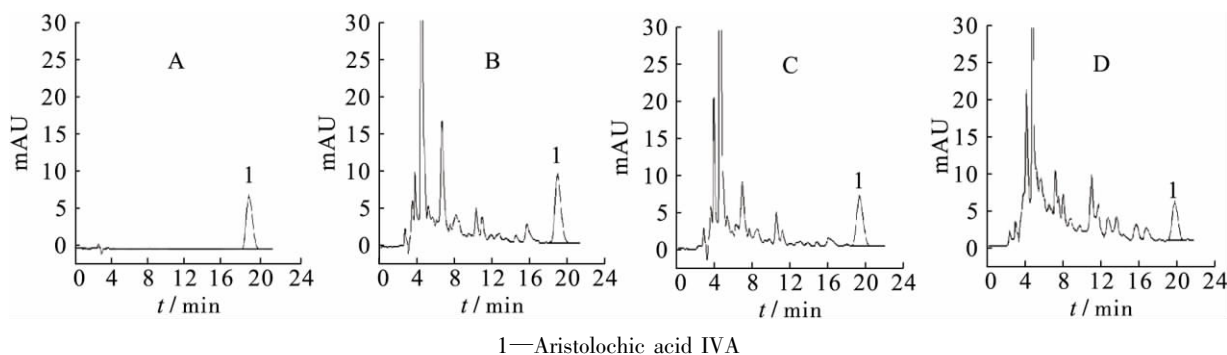


Fig. 2 Chromatograms of aristolochic acid IVA(A), and roots(B), rhizomes(C) and leaves of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt Var. *mandshuricum*(Maxim.) Kitag. (D)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照溶液的制备

精密称取马兜铃酸 IVA 5.9 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 47.2 mg·L⁻¹的马兜铃酸 IVA 溶液作为对照溶液。

2.2.2 供试溶液的制备

分别取辽细辛根 5 g、根茎 5 g 和叶 20 g,精密称定。置 1 L 圆底烧瓶中,分别加入体积分数为 75% 的乙醇溶液 150、150 和 600 mL,回流提取 75 min。取出,冷却至室温,滤过,并用体积分数为 75% 的乙醇溶液洗涤滤渣。合并滤液与洗液,减压浓缩后,用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠水溶液 50 mL,分次溶解并移至分液漏斗中,用三氯甲烷萃取 3 次,每次 50 mL,弃去三氯甲烷溶液,碱水溶液加 1.2 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至 2 后,用三氯甲烷萃取 3 次,每次 50 mL,合并三氯甲烷层溶液,水浴蒸干。残渣用甲醇分次溶解,并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得供试溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

分别量取“2.2.1”条对照溶液 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得一系列的对照溶液。分别吸取 10 μ L 注入

高效液相色谱仪,在“2.1”条色谱条件下测定。以对照溶液质量浓度(ρ ,mg·L⁻¹)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线。马兜铃酸 IVA 的回归方程为 $A = 1.85 \times 10^4 \rho - 1.64 \times 10^3$, $r = 0.9996$ ($n = 6$)。结果表明,马兜铃酸 IVA 质量浓度在 4.720 ~ 47.20 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验

精密吸取同一对照溶液 10 μ L,在“2.1”条色谱条件下重复进样 6 次,记录峰面积。马兜铃酸 IVA 峰面积的 RSD 为 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取同一批号辽细辛根、根茎及叶各 6 份(辽宁清原 1 号),按“2.2.2”条方法制备供试溶液,在“2.1”条色谱条件下进样分析。测得辽细辛根、根茎及叶中马兜铃酸 IVA 含量的 RSD 分别为 2.2%、1.7% 和 2.2%。表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

分别取辽细辛各部位的同一供试溶液(辽宁清原 1 号),在室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、12 h,按“2.1”条色谱条件进样分析,测得辽细辛根、根茎及叶中马兜铃酸 IVA 峰面积的 RSD 分别为 1.3%、2.0% 和 2.2%。表明各供试溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.3.5 回收率试验

分别称取已知含量的同一批辽细辛各部位样品 6 份(鑫泰药业),根 2.5 g、根茎 2.5 g、叶 10 g,

按“2.2.2”条方法制备供试溶液。分别精密加入适量对照溶液,平行制备 6 份,在“2.1”条色谱条件下进样分析,计算回收率,结果见表 1。

Table 1 Results of recovery test of aristolochic acid in different parts of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. (n=6)

	<i>m</i> _{sample} /mg	<i>m</i> _{added} /mg	<i>m</i> _{found} /mg	Recovery/%	Mean recovery/%	RSD/%
Root	0.103 2	0.084 0	0.189 5	102.7	99.6	2.8
	0.103 1	0.084 0	0.183 0	95.1		
	0.103 0	0.084 0	0.185 2	97.9		
	0.103 2	0.084 0	0.187 1	99.9		
	0.103 2	0.084 0	0.188 9	102.0		
	0.103 1	0.084 0	0.187 2	100.1		
Rhizome	0.083 9	0.084 0	0.170 7	103.3	99.4	2.7
	0.083 5	0.084 0	0.165 1	97.1		
	0.083 7	0.084 0	0.164 2	95.7		
	0.083 8	0.084 0	0.168 2	100.6		
	0.083 9	0.084 0	0.167 2	99.3		
	0.083 9	0.084 0	0.168 3	100.5		
Leave	0.045 0	0.084 0	0.126 7	97.3	98.9	2.7
	0.045 0	0.084 0	0.127 5	98.2		
	0.045 0	0.084 0	0.132 3	103.9		
	0.045 0	0.084 0	0.128 8	99.8		
	0.045 0	0.084 0	0.126 0	96.4		
	0.045 0	0.084 0	0.127 1	97.7		

2.4 供试品含量测定

取不同来源辽细辛药材,按“2.2.2”条方法制备供试溶液,在“2.1”条色谱条件下测定。每批样品测定 3 次,采用外标一点法计算辽细辛各部位马兜铃酸 IVA 的含量,结果见表 2。

Table 2 Results of content determination of aristolochic acid IVA (μg·g⁻¹) (n=3)

Origin	Roots	Rhizomes	Leaves
Liaoning Shenyang 1	51.73	29.64	7.053
Liaoning Shenyang 2	43.26	33.90	6.685
Liaoning Shenyang 3	35.26	27.14	4.922
Liaoning Shenyang 4	56.85	26.49	7.245
Liaoning Shenyang 5	39.08	32.33	6.971
Liaoning Qingyuan 1	41.53	33.47	4.474
Liaoning Qingyuan 2	42.91	37.81	6.271
Beijing Tongrentang	48.61	38.33	—

Note: The samples of Beijing Tongrentang are the roots and the rhizomes

3 讨论与结论

a. 细辛药材中只含有微量马兜铃酸 IVA,为了最大限度地提高细辛中马兜铃酸 IVA 的提取效率,作者根据马兜铃酸类成分的理化性质,采用正交试验,考察了不同提取方式、溶剂种类、提取时间、料液比对细辛中马兜铃酸 IVA 提取效率的影响。确定最佳提取工艺为:体积分数为 75% 乙醇回流提取 75 min,物料与提取溶剂的体积比为 1:30。

b. 通过对 8 个批次辽细辛中马兜铃酸 IVA 的检测可知:辽细辛根和根茎中马兜铃酸 IVA 的含量均高于叶中的含量,辽细辛全草中的马兜铃酸 IVA 主要存在于根和根茎中。通过与这 8 个批次的辽细辛马兜铃酸 I 的含量测定^[9]结果进行比较,辽细辛根和根茎中马兜铃酸 IVA 的含量均高于马兜铃酸 I 的含量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 214.
- [2] NORTIER J L, VANHERWEGHEM J L. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*) [J]. Toxicology, 2002, 181: 577 – 580.
- [3] LOSET J R, RAOELISON G E, HOSTETTMANN K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytochemicals and dietary supplements used as slimming regimens [J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41: 29 – 36.
- [4] HU Shi-lin, ZHANG Hong-qi, CHAN K, et al. Studies on the toxicity of *Aristolochia manshuriensis* (Guanmuton) [J]. Toxicology, 2004, 198: 195 – 201.
- [5] ARLT V M, PFOHL L A, COSYNS J, et al. Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy [J]. Mutat Res, 2001, 494: 143 – 150.
- [6] 吕帅, 吴迪, 吴兆华, 等. 辽细辛地下部分的化学成分 (II) [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27 (9): 707 – 710.
- [7] 陈婧. 辽细辛化学成分与质量控制方法研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.

Determination of aristolochic acid IVA in the different parts of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. by HPLC

CHEN Jing¹, SUN Bo-hang¹, HUANG Jian¹, GAO Hui-yuan¹, WANG Jian-qiang², WU Li-jun¹

(1. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for determination of aristolochic acid IVA in different parts of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt Var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. **Methods** The determination was performed on Shiseido C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid (V: V: V = 55: 44: 1). The detection wavelength was set at 252 nm and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Results** The calibration curve was linear for aristolochic acid IVA in the range of 4.720–47.20 mg · L⁻¹ with the correlation coefficient of 0.999 6 (n = 6). The average recoveries of the root, rhizome and leaves were 99.6%, 99.4% and 98.9% respectively, and relative standard deviations were less than 2.8%. **Conclusions** The method is simple, accurate and selectivity, and can be used for the quality control of different parts of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.

Key words: *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt Var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.; aristolochic acid IVA; HPLC; content determination