

HPLC-UV 法测定细辛不同部位中马兜铃酸 I 的含量

张振都, 邵郅伟, 郝丽珊, 王莹, 李君梅, 张奇, 宋志峰*

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/吉林省农业环境与农产品安全重点实验室, 长春 130033)

摘要: 采用 70% 甲醇溶液超声提取、HPLC-UV 法测定细辛中的马兜铃酸 I 的含量, 检出限为 0.20 ng, 回收率为 98.5%~103.5%。检测方法简单, 分离度好, 灵敏度高, 稳定性好。细辛根、茎中未检出马兜铃酸 I, 叶中含量为 0.031 3~0.087 3 mg/kg, 远低于药典限量要求 0.001%, 风险很低。

关键词: HPLC-UV 法; 细辛; 马兜铃酸 I

中图分类号: O657.7+2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)01-0105-03

Determination of Aristolochic Acid I in Different Parts of Asarum by HPLC-UV

ZHANG Zhendu, SHAO Zhiwei, HAO Lishan, WANG Ying, LI Junmei, ZHANG Qi, SONG Zhifeng*

(Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agri-products, Jilin Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Agricultural Environment and Agricultural Product Safety of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: The content of aristolochic acid I in asarum was determined by ultrasonic extraction with 70% methanol solution and HPLC-UV method. The detection limit was 0.20 ng. The recovery rate was 98.5%~103.5%. The detection method is simple, with good separation, high sensitivity, and good stability. Aristolochic acid I was not detected in the roots and stems of asarum, and the content in the leaves was 0.0313~0.0873 mg/kg, which was far below the pharmacopoeia limit of 0.001%, and the risk was very low.

Key words: HPLC-UV; Asarum; Aristolochic acid I

细辛(*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt)为马兜铃科药用植物, 分为北细辛、汉城细辛、华细辛, 具有散寒、止痛、镇咳等功效。马兜铃酸(aristolochic acids, AAs)广泛存在于细辛等马兜铃科植物中, 其为硝基菲甲酸类化合物, 具有很强的肾毒性、致癌性和致突变性^[1-2], 被列为 I 类致癌物, 主要致病成分为马兜铃酸 I (AA I) 和马兜铃酸 II (AA II), 其中马兜铃酸 I 毒性最强^[3-6]。目前, 马兜铃酸的检测技术主要有电泳法、极谱法、酶联免疫法、薄层色谱法、分光光度法、液相色谱法、液质联用法等^[7-8]。电泳法、极谱法、酶联免疫法、分光光度法的方法烦琐、灵敏度较低、选择性较差, 目前应用较少^[9-10]。薄层色谱法检出限较

高, 但是误差较大, 主要用于简单的定性判断。液质联用法灵敏度高、分离效果好, 但成本也较高, 且灵敏度并不比紫外检测法高^[11-12]。液相色谱法具有分离效能高、分析速度快、灵敏度高、重现性好等优点, 应用范围较广, 高效液相色谱法的分离鉴别能力更优, 根据检测器的不同, 高效液相色谱法分为高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)与高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD), HPLC-FLD 法需要经过衍生、净化等步骤, 增加了方法的复杂性^[13-14]。因此, 本试验采用 HPLC-UV 法测定细辛不同部位中马兜铃酸 I 的含量。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

细辛采自吉林省通化市, 纯水冲洗干净, 晾干, 分取根、茎、叶部位, 各 6 份样品, 粉碎过 100 目筛备用。

AA I 标准物质: 上海源叶生物科技有限公司

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 吉林省农业环境与农产品安全重点实验室建设项目 (YDZJ202102CXJD031)

作者简介: 张振都(1987-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事农产品质量安全检测及风险评估研究。

通讯作者: 宋志峰, 男, 硕士, 研究员, E-mail: mhsr@sina.com

生产;甲醇、乙腈、磷酸:Fisher Chemical 公司生产,色谱纯。孔径0.45 μm 有机滤膜。

1.2 仪器

高效液相色谱仪:Agilent 1260 II ,UV 检测器;分析天平:Mettler Toledo XSE105DU,分度值0.000 1 g;超声仪:昆山市超声仪器有限公司 KQ-500DE,功率500 W,频率40 kHz。

1.3 标液配制

准确称取0.010 0 g AA I 标准物质,用色谱纯甲醇定容至100 mL 容量瓶,配制成100 mg/L 的标准储备液,分别吸取储备液0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 定容至10 mL 容量瓶,配制成0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 mg/L 的标准系列工作液。

1.4 提取方法

分别准确称取细辛的根、茎、叶粉末样品约0.500 0 g,置于具塞锥形瓶中,吸量管吸取不同体积比甲醇-水溶液25 mL,加入锥形瓶后密塞,称定重量,超声,放冷,再称定重量,用甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,过0.45 μm 滤膜,滤液待上机。

1.5 色谱条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm×150 mm,4 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为0.05% 磷酸溶液,梯度洗脱程序见表1,流速为1.0 mL/min,检测波长为260 nm,柱温30 ℃,进样体积10 μL。理论塔板数按 AA I 峰计算应不低

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	30~34	70~66
10~18	34~35	66~65
18~20	35~45	65~55
20~30	45	55
30~35	45~100	55~0

于5 000。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂与提取方式优化

马兜铃酸在甲醇中溶解度好,提取效率高。试验提取液分别采用50%、60%、70%、80% 甲醇-水溶液,结果发现70% 甲醇-水溶液提取效果最佳。

细辛中AAI 的提取方式主要有回流法和超声法,超声法具有高效、省时、节约溶剂等优点。试验超声时间分别为30、40、50、60 min,结果发现超声40~60 min 效果好于30 min,但是超声40~60 min 差别不大,因此超声40 min 即可。

2.2 线性关系、检出限及定量限

按照色谱条件测定标准系列工作液,以峰面积为纵坐标,进样浓度为横坐标,建立线性回归方程,结果见表2。分别以3 倍信噪比、10 倍信噪比计算AA I 的检出限为0.20 ng、定量限为0.60 ng。

表2 AA I 的标准曲线回归方程

浓度/mg·L ⁻¹	0.002	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1
峰面积	93.040 7	185.638 1	357.485 9	693.729 6	1 583.334 2	3 262.126 5
回归方程	$y=315\ 232.819\ 2x+32.321\ 7$					
相关系数	$r^2=0.999\ 7$					

2.3 回收率、精密度及稳定性

取细辛叶部位样品进行添加回收试验,色图谱见图1。添加AA I 的浓度为0.02 mg/L,进行7 次平行试验,测得样品回收浓度分别为0.020 7、0.020 3、

0.020 6、0.019 8、0.020 1、0.019 7、0.020 1 mg/L,计算相对标准偏差RSD 为1.86%,回收率为98.5%~103.5%。24 h 后复测样品回收浓度分别为0.020 6、0.020 4、0.020 2、0.019 4、0.019 6、0.019 8、0.020 1

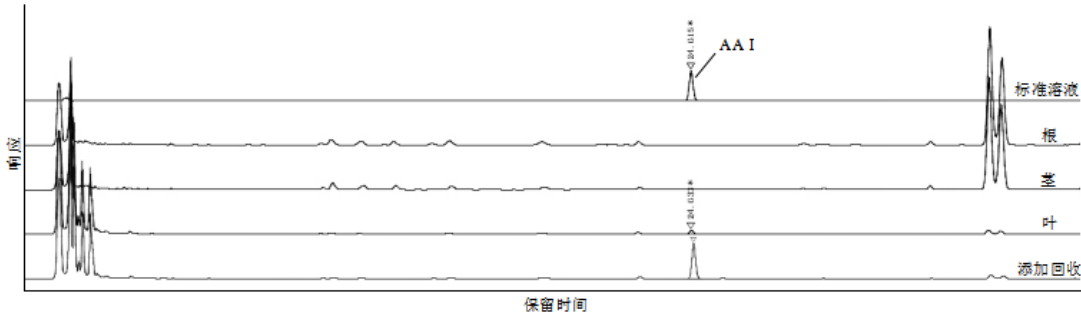


图1 不同处理样品中AAI 的色谱图

mg/L, 计算 RSD 为 2.17%, 24 h 相对相差为 0.48%~2.52%。该方法峰形分离度、精密度及稳定性良好, 满足测定需要。

2.4 细辛不同部位中 AA I 的含量

利用 HPLC-UV 法对 18 份细辛样品进行测定, 根、茎中未检出马兜铃酸 I, 叶中马兜铃酸 I 含量为 0.031 3~0.087 3 mg/kg (表 3), 远低于药典限量要求 0.001%, 中国药典自 2005 年已要求细辛的药用部位由全草改为根和根茎, 因此药用细辛中 AA I 风险很低。检测结果表明, 细辛地上部分 AA I 的含量明显高于地下部分, 与薛燕、侯帅红等研究结果一致^[15-16]。

表 3 细辛不同部位中 AA I 的含量 mg/kg

部位	含量
根(n=6)	未检出
茎(n=6)	未检出
叶(n=6)	0.031 3~0.087 3

3 讨 论

细辛在中草药中有不可替代的作用, 虽然其中含有马兜铃酸, 但细辛根、茎中未检出马兜铃酸 I, 叶中含量也较低, 远小于药典限量要求 0.001%, 风险很低, 但也应加强细辛药材中马兜铃酸的监测, 确保细辛用药安全。

采用 70% 甲醇溶液超声提取、HPLC-UV 法测定细辛药材中的马兜铃酸 I 的含量, 检出限与定量限分别为 0.20、0.60 ng, 回收率为 98.5%~103.5%。检测方法简单, 分离度好, 灵敏度高, 稳定性好。该方法可为进一步系统开展细辛中马兜铃酸的风险评估, 制定风险控制措施, 保障临床用药安全提供技术支撑。

参考文献:

[1] Michl J, Ingrouille M J, Simmonds M S, et al. Naturally occur-

ring aristolochic acid analogues and their toxicities[J]. Nature Product Reports, 2014, 31: 676-693.

[2] Kumar V, Poonam, Prasad A K, et al. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxaporphines and their biological activities[J]. Nature Product Reports, 2004, 20(6): 565-583.

[3] 朱哥瑞, 王 静, 刘成海, 等. 马兜铃酸 I 毒性机制研究进展[J]. 世界中医药, 2022, 17(1): 134-137.

[4] 刘 静, 郭日新, 戴 忠, 等. 马兜铃酸类成分研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(7): 1280-1286.

[5] 姜 峰, 岳丽君, 朱 丹. 马兜铃酸毒副作用研究概述[J]. 中国药物评价, 2021, 38(5): 405-408.

[6] 郑 浪. 含马兜铃酸中药的研究进展[J]. 中药与临床, 2020, 11(1): 74-80.

[7] 刘 静, 戴 忠, 程显隆, 等. 马兜铃酸类成分检测与分析研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1644-1650.

[8] 田 梦, 瞿俊勇, 马 慧, 等. 马兜铃酸检测技术的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(2): 147-149.

[9] 负凯祎, 徐志超, 宋经元. 含马兜铃酸中药及其检测研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(3): 238-249.

[10] 南铁贵, 何素平, 谭桂玉, 等. 中药致肾毒性成分马兜铃酸 A 单抗制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1206-1210.

[11] 魏春雁, 孟繁磊, 樊慧梅, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定粮油食品中 α -玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(4): 84-88.

[12] 王 璐, 苏钟壁, 张承明. 药品及食品中马兜铃酸分析方法综述[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(S1): 207-213.

[13] 张朝辉, 周娜姣, 刘 星, 等. 药品、环境和食品中马兜铃酸分析检测方法的研究进展[J]. 分析化学, 2021, 49(11): 1792-1803.

[14] Wang Y, Chan W. Determination of aristolochic acids by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5859-5864.

[15] 薛 燕, 童湘晖, 王 峰, 等. UPLC-UV 测定细辛地上和地下部位中的马兜铃酸 A[J]. 药学报, 2008(2): 221-223.

[16] 侯帅红, 李晶晶, 韩林涛, 等. 细辛不同药用部位马兜铃酸的含量测定[J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(6): 42-44.

(责任编辑: 王 昱)