

HPLC 法测定静态加压溶剂提取马兜铃属植物中马兜铃酸

梁庆优¹, 郑颖^{1*}, 唐海谊², 李绍平¹, 王一涛¹

(1. 澳门大学中华医药研究院, 中国澳门; 2. 澳门理工学院高等卫生学校, 中国澳门)

摘要: 目的 建立并优化从马兜铃药材中提取马兜铃酸 I 和 II 的静态加压溶剂提取方法, 考察各因素对提取效率的影响, 并测定马兜铃、关木通、青木香和广防己中两成分的量。方法 以马兜铃酸 I 和 II 的量为指标, 采取单因素考察的方法, 分别优化提取溶剂、药材粒径、提取温度、提取压力、提取时间、冲洗体积、循环数目、药材加入量等影响因素。结果 优化后的条件为: 甲醇提取, 药材粉末粒径 100~120 目, 提取温度 120℃, 提取压力 10.3 MPa, 静态提取时间 10 min, 冲洗体积 40%, 1 个循环, 药材加入量 1.00 g。结论 本法可一次将马兜铃酸 I 和 II 从马兜铃等 4 种药材中完全提取, 显示了良好的适用性。经比较, 该法比传统的超声和索氏提取方法提取效率更高, 节约溶剂, 省时省力; 静态加压溶剂法更适合于青木香中马兜铃酸的提取。

关键词: 马兜铃; 关木通; 青木香; 广防己; 马兜铃酸; 静态加压溶剂提取; 高效液相色谱

中图分类号: R 284.2; R 286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)03-0364-05

HPLC Determination of aristolochic acids in plants of *Aristolochia* L. by static pressurized liquid extraction

LIANG Qing-you¹, ZHENG Ying¹, TANG Hoi-ye², LI Shao-ping¹, WANG Yi-tao¹

(1. Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao, China; 2. School of Health Sciences, Macau Polytechnic Institute, Macao, China)

Abstract Objective To optimize static pressurized liquid extraction (PLE) method for the extraction of aristolochic acids I and II (AA I and AA II) from *Fructus Aristolochiae* and study the influences of related factors. **Methods** The univariate design was introduced. The operational parameters, such as the type of solvent, particle size of the sample powder, extraction temperature, pressure, static time, flush volume, the number of cycles, and the amount of sample were optimized. **Results** The optimized result employed methanol as extraction solvent, particle size of 100—120 meshes, extraction temperature of 120℃, extraction pressure of 10.3 MPa, static time of 10 min, flush volume of 40%, 1 cycle, and sample amount of 1.00 g. The method was applied for four species of traditional Chinese medicinal materials including *Fructus Aristolochiae*, *Caulis Aristolochiae M anshuriensis*, *Radix Aristolochiae*, and *Radix Aristolochiae Fangchi*. **Conclusion** This method can be used to completely extract AA I and AA II from *Fructus Aristolochiae* in once extraction. The comparison shows that this static PLE method is better than ultrasonication and Soxhlet methods with higher extraction efficiency and less time-consuming. It is also better than the dynamic one in the extraction of AAs from *Radix Aristolochiae*.

Key words: *Fructus Aristolochiae*; *Caulis Aristolochiae M anshuriensis*; *Radix Aristolochiae*; *Radix Aristolochiae Fangchi*; aristolochic acid; static pressurized liquid extraction; HPLC

马兜铃为马兜铃科植物北马兜铃 *Aristolochia contorta* Bunge 或马兜铃 *A. debilis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实, 具有清肺降气, 止咳平喘和清肠消痔等功效^[1]。马兜铃酸是马兜铃属植物中的主要成分之一, 为 3, 4-次甲二氧基-10-硝基-1-菲酸的衍生物, 其中尤以马兜铃酸 I (又名马兜铃酸 A) 和马兜铃酸 II (又名马兜铃酸 B) 分布广泛, 量较高。马兜铃

酸 (aristolochic acids) 具有肾毒性, 还有致癌、致突变的作用^[2, 3]。国外亦报道了多起马兜铃酸不良反应的案例^[4], 甚至形成了马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy) 的概念。因此中药材中马兜铃酸的检测应引起人们的重视。马兜铃酸的分析方法报道的比较, 如 TLC^[5]、LC-ESI/MS^[6]、UV^[7] 和 HPLC-DAD^[8] 等, 而提取则通常使用传统方法, 如

* 收稿日期: 2007-07-16

基金项目: 澳门科学技术发展基金资助项目 (049/2005/A-R1)

作者简介: 梁庆优 (1982—), 男, 河北省邯郸市人, 澳门大学中华医药研究院在读硕士研究生, 从事中药质量控制方向。

Tel: 853-3974690 Fax: 853-28841358 E-mail: njlqy@163.com

* 通讯作者 郑颖 Tel: 853-83974687 Fax: 853-28841358 E-mail: yzheng@um.ac.mo

加热回流^[1]、超声和索氏提取方法^[8-11]等。加压溶剂提取 (pressurized liquid extraction, PLE) 是近十几年发展起来的一个新方法, 它利用给提取溶剂施加高压大幅度地提高提取溶剂的沸点以进行高温提取^[12]。鉴于传统方法费时费力, 本实验拟采用静态加压溶剂提取法对样品进行提取, 选择马兜铃作为受试药材, 以高效液相色谱法定量, 建立并优化提取马兜铃酸的静态加压溶剂提取方法, 测定几种药材中马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II, 并与传统提取方法进行比较。

1 仪器、试药与材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 含四元泵, 自动进样器和紫外二极管阵列检测器, 数据处理采用 Chem station 工作站, A SE200 型加压溶剂提取仪 (Dionex, Sunnyvale, 美国), 氮气供压, Knifetec™ 1095 药材粉碎机 (Foss Tecator Company, 瑞典)。Trasonic TI-H-25 型超声仪 (Elma, 瑞典)。5415D 型离心机 (Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, 德国)。

马兜铃、青木香、关木通和广防己购自河北安国中美威中药材有限公司, 经本院李绍平博士鉴定分别为北马兜铃 *A. contorta* Bunge 的干燥成熟果实、马兜铃 *A. debilis* Sieb. et Zucc. 的干燥根、东北马兜铃 *A. manshuriensis* Kom. 的干燥藤茎和广防己 *A. fangchi* Y.C. Wu ex L.D. Chou et S.M. Hwang 的干燥根。药材于 50℃ 干燥 12 h 后打粉, 过筛备用。马兜铃酸对照品购自西格玛公司, 其中含马兜铃酸 I 27%, 马兜铃酸 II 65%。甲醇、乙腈、冰醋酸、醋酸乙酯均为色谱纯, 购自 Merck 公司。纯水采用 Milli Q-Plus 系统制备 (Millipore, Bedford, 美国)。

2 方法与结果

2.1 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: 安捷伦公司 Zorbax SB C-18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和预柱 (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm); 0.01 mol/L 醋酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相; 洗脱条件为: 0~24 min, B% 保持 30%; 24~25 min, B% 为 30%~42%; 25~50 min, B% 为 42~44%, 最后用 100%B 冲洗 5 min。进样量 10 μL; 根据全波长扫描和文献报道^[8] 选择 254 nm 作为检测波长; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温 25℃。通过与对照品比较保留时间和紫外吸收光谱的异同来确定样品中待测组分马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的峰位置。

2.1.2 线性范围、最低检测限与最低定量限的确定: 精密称取 7.23 mg 马兜铃酸对照品, 溶于 10 mL 甲醇中, 得对照品储备液 (含 195.21 μg/mL 马兜铃酸 I, 469.95 μg/mL 马兜铃酸 II), 保存于 -20℃ 冰箱中。将对照品储备液稀释, 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 分别取 5 个质量浓度进样, 用峰面积对质量浓度计算标准曲线。按信噪比 (S/N) 决定最低检测限 LOD (S/N = 3) 和最低定量限 LOQ (S/N = 10), 结果见表 1。

表 1 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的回归方程、线性范围 LOD 和 LOQ

Table 1 Regression equation, linearity range, LOD and LOQ of AA I and AA II

| 名称 | 回归方程 | r ² | 线性范围 /(μg · mL ⁻¹) | LOD /ng | LOQ /ng |
|---------|--------------------|----------------|-----------------------------------|------------|------------|
| 马兜铃酸 I | Y = 49.22 X - 8.21 | 0.999 8 | 3.00~48.02 | 0.488 | 0.976 |
| 马兜铃酸 II | Y = 64.46 X - 6.61 | 0.999 5 | 0.82~9.780 | 0.294 | 0.587 |

2.1.3 精密度与准确度试验: 将对照品储备液稀释, 分别在马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的线性范围内取高、中、低 3 个质量浓度, 进样测定。结果日内、日间 RSD < 1.5%, 准确度在 95.3%~103.9% (n = 3)。

2.1.4 稳定性、重现性与加样回收率试验: 取马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 对照品溶液, 0、2、4、8、12、24 h 分别进样 6 次, 峰面积的 RSD 均为 1.7%, 说明马兜铃酸 I 和 II 对照品溶液在常温下 1 d 之内稳定性良好。分别称取 0.5、1.0、1.5 g 马兜铃样品各 3 份, 提取并分析后, 结果峰面积的 RSD < 2% (n = 3), 表明该提取分析方法有良好的重复性。将高、中、低 3 个量的马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 对照品分别加入马兜铃样品中, 提取分析, 计算加样回收率, 结果在 94.4%~100.4%, RSD 在 0.45%~3.5% (n = 3), 显示整个提取分析方法稳定可靠。

2.2 加压溶剂提取各影响因素的考察

2.2.1 提取方法: 使用单因素考察的方法进行条件优化。将受试药材粉碎成适当目数后称取 1.00 g, 按质量比例 1:1 称取硅藻土, 混匀并装入提取罐, 采用预设条件进行提取, 其中提取压力 10.3 MPa, 温度 100℃, 提取时间 5 min, 置换体积 40%, 1 个循环, 药材粉末粒径 100~120 目 (0.125~0.154 mm), 甲醇提取。有关参数优化时, 只改变待考察的条件, 其他条件不变。提取完毕后, 将提取液转移至 25 mL 量瓶中用甲醇定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜后进样。

2.2.2 提取溶剂的影响: 分别选择纯水、甲醇-水 (1:1)、纯甲醇、甲醇-醋酸乙酯 (1:1) 进行试验, 结

果见表2。虽然甲醇-水(1:1)提取效率最高,但是从操作的简便性和定量的准确性的角度来考虑,最终选择纯甲醇作为提取溶剂。

表2 提取溶剂优化结果(n=3)

| 溶剂 | 马兜铃酸 I/(mg·g ⁻¹) | 马兜铃酸 II/(mg·g ⁻¹) |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| 纯水 | 0.707 9±0.008 7 | 0.127 0±0.000 9 |
| 甲醇-水(1:1) | 0.772 5±0.014 3 | 0.139 9±0.003 5 |
| 纯甲醇 | 0.757 7±0.008 1 | 0.019 1±0.002 5 |
| 甲醇-醋酸乙酯(1:1) | 0.724 2±0.032 20 | 0.121 7±0.005 2 |

2.2.3 药材粒径的影响:对药材粒径的优化结果见表3。可见随着药材粒径的减小,提取效率越来越高,但是由于100~120目和120~140目的提取效率之间没有显著性差异,故最终100~120目作为药材粒径。

表3 药材粒径优化结果(n=3)

| 粒径/目 | 马兜铃酸 I/(mg·g ⁻¹) | 马兜铃酸 II/(mg·g ⁻¹) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| 40~60 | 0.479 3±0.008 1 | 0.084 6±0.001 3 |
| 60~80 | 0.482 5±0.007 4 | 0.085 7±0.001 2 |
| 80~100 | 0.555 9±0.001 5 | 0.099 1±0.000 3 |
| 100~120 | 0.722 1±0.020 1 | 0.131 6±0.003 0 |
| 120~140 | 0.769 9±0.021 6 | 0.134 0±0.003 7 |

2.2.4 提取温度的影响:对提取温度的优化结果见表4。与药材粒径的优化相似,由于120与140的提取效率没有显著性差异,故最终选择120最为提取温度。

表4 提取温度优化结果(n=3)

| 温度/°C | 马兜铃酸 I/(mg·g ⁻¹) | 马兜铃酸 II/(mg·g ⁻¹) |
|-------|------------------------------|-------------------------------|
| 80 | 0.693 6±0.015 9 | 0.122 2±0.002 9 |
| 100 | 0.708 0±0.010 4 | 0.125 6±0.001 5 |
| 120 | 0.718 8±0.019 3 | 0.126 9±0.003 4 |
| 140 | 0.739 2±0.015 6 | 0.131 4±0.002 4 |

2.2.5 提取压力的影响:对提取压力的优化结果见表5。甲醇在120℃沸腾时的饱和蒸汽压约为6个大气压,约合0.6 MPa,因实验点均高于此值,故选择符合提取要求。由于10.3 MPa时的提取效率显著高于其他3者,故最终选择该压力作为提取压力。

表5 提取压力优化结果(n=3)

| 压力/MPa | 马兜铃酸 I/(mg·g ⁻¹) | 马兜铃酸 II/(mg·g ⁻¹) |
|--------|------------------------------|-------------------------------|
| 3.44 | 0.719 9±0.012 6 | 0.131 6±0.006 0 |
| 6.89 | 0.725 2±0.008 8 | 0.127 6±0.002 5 |
| 10.30 | 0.725 2±0.008 8 | 0.127 6±0.002 5 |
| 13.80 | 0.725 1±0.004 9 | 0.126 1±0.002 4 |

2.2.6 其他影响因素与最终优化结果:还考察了其

他因素的影响,如静态提取时间、冲洗体积(指每次提取后用新鲜溶剂置换出的提取罐中提取液的比例)、循环次数,样品加入量等,一般前3者对提取没有显著性影响($P > 0.05$)。虽然有些因素,如样品加入量等影响较大($P < 0.05$),但综合考虑提取效率和实验条件,最终确定的条件为:甲醇提取,药材粉末100~120目(0.125~0.154 mm) 1.00 g,提取压力10.3 MPa,提取温度120℃,静态提取时间10 min,冲洗体积40%,循环1次。

2.2.7 提取完全性:提取完全性是检验一个提取方法好坏的主要指标之一。加压溶剂提取的完全性常用回收率表示^[13],定义为在对同一份样品用同一种方法连续的几次提取中,第一次提取出的待测成分的量与连续几次提取出的待测成分的总量之比,即

$$\text{回收率} = \frac{A_1}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100\%$$

A_1 指提取出的待测成分的量(mg), i 指提取次数(通常到待测成分不再被检出为止)。

在使用优化条件从马兜铃中提取马兜铃酸时,马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的回收率分别为95.40%和97.94%(表6),表明本法对马兜铃酸 I 和 II 的提取较为完全。

2.2.8 方法适用性:为了考察本提取方法对其他药材中同类成分的提取效率,实验亦对关木通、青木香和广防己进行了加压溶剂提取,对马兜铃酸 I 和 II 的提取回收率做了考察,使用外标法的标准曲线回归方程计算药材中的马兜铃酸的量,结果见表6。结合马兜铃的回收率可见,该法对不同药材(来自不同植物或不同药用部位)一次提取的回收率都在95%以上,显示了良好的适用性。4种药材中马兜铃酸 I 和 II 的量见表7。各药材的色谱图见图1。

2.3 与其他方法的比较

2.3.1 超声提取方法:根据张翠英等^[8]的超声提取方法作适当修正。将马兜铃药材粉碎后称取1.00 g,装入50 mL具塞锥形瓶中,精密加入20.00 mL甲醇,超声提取15 min,超声功率1.8 kW。超声完毕冷却后补质量,取适量溶液离心(5 400 r/min, 5 min),过0.45 μm微孔滤膜后进样。

2.3.2 索氏提取方法:依据张兰桐等^[10]的报道,并结合实验的实际情况进行改进。将马兜铃药材粉碎后称取1.00 g,装入索氏提取仪中,用80 mL甲醇加热回流5 h。提取完毕后,将提取液定容至100 mL,过0.45 μm微孔滤膜后进样。

表6 关木通、青木香、广防己和马兜铃的加压溶剂提取回收率 (n= 3)

Table 6 PLE Recovery of *Caulis Aristolochiae Manshuriensis*, *Radix Aristolochiae*, *Radix Aristolochiae Fangchi*, and *Fructus Aristolochiae* (n= 3)

| 药材 | 药用部位 | 待测成分 | 回收率/% | | |
|-----|------|---------|--------------|-------------|-------------|
| | | | 第1次提取 | 第2次提取 | 第3次提取 |
| 关木通 | 藤茎 | 马兜铃酸 I | 99.15 ± 3.70 | 0.78 ± 0.15 | 0.07 ± 0.01 |
| | | 马兜铃酸 II | 98.96 ± 3.61 | 1.04 ± 0.13 | — |
| 青木香 | 根 | 马兜铃酸 I | 98.84 ± 2.40 | 1.16 ± 0.25 | — |
| | | 马兜铃酸 II | 98.13 ± 2.46 | 1.87 ± 0.38 | — |
| 广防己 | 根 | 马兜铃酸 I | 98.86 ± 1.33 | 1.14 ± 0.80 | — |
| | | 马兜铃酸 II | — | — | — |
| 马兜铃 | 果实 | 马兜铃酸 I | 97.94 ± 1.62 | 2.06 ± 0.74 | — |
| | | 马兜铃酸 II | 95.40 ± 3.11 | 4.60 ± 0.74 | — |

表7 关木通、青木香、广防己和马兜铃中马兜铃酸 I 和 II 的测定结果 (n= 3)

Table 7 Determination of AA I and AA II in *Caulis Aristolochiae Manshuriensis*, *Radix Aristolochiae*, *Radix Aristolochiae Fangchi*, and *Fructus Aristolochiae* (n= 3)

| 药材 | 马兜铃酸 I / (mg · g ⁻¹) | 马兜铃酸 II / (mg · g ⁻¹) |
|-----|----------------------------------|-----------------------------------|
| 关木通 | 2.730 7 ± 0.101 1 | 0.682 7 ± 0.024 9 |
| 青木香 | 0.963 7 ± 0.023 4 | 0.231 1 ± 0.005 8 |
| 广防己 | 0.081 19 ± 0.001 1 | — |
| 马兜铃 | 0.714 8 ± 0.011 8 | 0.128 7 ± 0.004 2 |

表8 加压溶剂提取与传统提取方法的对比 (n= 3)

Table 8 Comparison of extraction between PLE and traditional method (n= 3)

| 方法名称 | 提取时间/min | 一次操作时间/h | 消耗的溶剂/mL | 提取效率/(mg · g ⁻¹) | |
|------|----------|----------|----------|------------------------------|-------------------|
| | | | | 马兜铃酸 I | 马兜铃酸 II |
| 加压提取 | 10 | 0.8 | 18 | 0.714 8 ± 0.011 8 | 0.128 7 ± 0.004 2 |
| 超声提取 | 15 | 1 | 20 | 0.529 7 ± 0.005 5 | 0.092 4 ± 0.000 4 |
| 索氏提取 | 300 | 6 | 80 | 0.624 2 ± 0.011 6 | 0.106 5 ± 0.002 5 |

好,是常用溶剂,又因其极性较强,故对马兜铃酸有较好的提取能力。水对马兜铃酸的提取也较好,可能是因为水和甲醇的极性都与马兜铃酸相近的缘故。另一方面,由于水对药材基质有溶胀作用^[15],故水的加入对于提取有利,这也可能是甲醇-水(1:1)在实验中提取效率最高的原因之一。

药材粉末的目数,即粒度分布同样是影响提取效率的一个重要因素。通常药材粉末越细,提取效率越高。因为一方面当药材粒径减小时药材的比表面积增大,与溶剂接触更加充分;另一方面药材中的成分从基质扩散到表面的时间更短,因此一般来讲粒径的减小可以大幅度提高提取效率^[15]。

温度是静态加压溶剂提取中最关键的参数之一。一方面温度提高了溶质的溶解平衡,即提高了溶解度,另一方面也大大加快了溶质的传质过程,也就是提高了扩散速率。静态加压溶剂正是使提取溶剂获得了远高于正常沸点的“高温”,才获得了相当高

2.3.3 与传统提取方法的对比:结果见表8。可以看出,3种方法中,加压溶剂提取的效率显著高于其他两种传统方法,而且加压溶剂提取耗时短,有机溶剂用量少。

3 讨论

可以看出提取溶剂、药材粒径、提取温度和提取压力是影响静态加压溶剂提取的主要参数。提取溶剂是加压溶剂提取中的关键性因素^[14]。因马兜铃酸带有一个羧基,具有一定极性,故当使用极性较小的醋酸乙酯进行提取时,效率较低。甲醇的溶解性较

的提取效率。但是待测成分在提取温度下的稳定性是一个需要考虑的问题,不过马兜铃酸在高温(120℃)下稳定^[16],所以本法温度适合。压力也有显著性影响。在加压溶剂提取中施加高压是为了保证溶剂在高温下仍旧可以保持液态,同时,高压还有助于溶剂进入药材基质内部,打断被提取成分与基质之间的作用力,从而提高提取效率。

除了以上参数以外,提取方式也是一个需要注意的因素。Ong等^[16]用自行组装的动态加压溶剂提取设备对青木香中马兜铃酸 I 和 II 的提取条件进行了优化,但该法的提取时间需15~20 min,且为非自动化,操作相对复杂,故本实验中静态提取的方法优势较明显。当然由于动静态提取都在进一步发展中,孰优孰劣还需深入研究。

在静态加压溶剂提取条件下,提取溶剂种类、药材粒径、提取温度、提取压力、药材加入量对马兜铃酸 I 和 II 的提取效率影响显著,而提取时间、冲洗体积

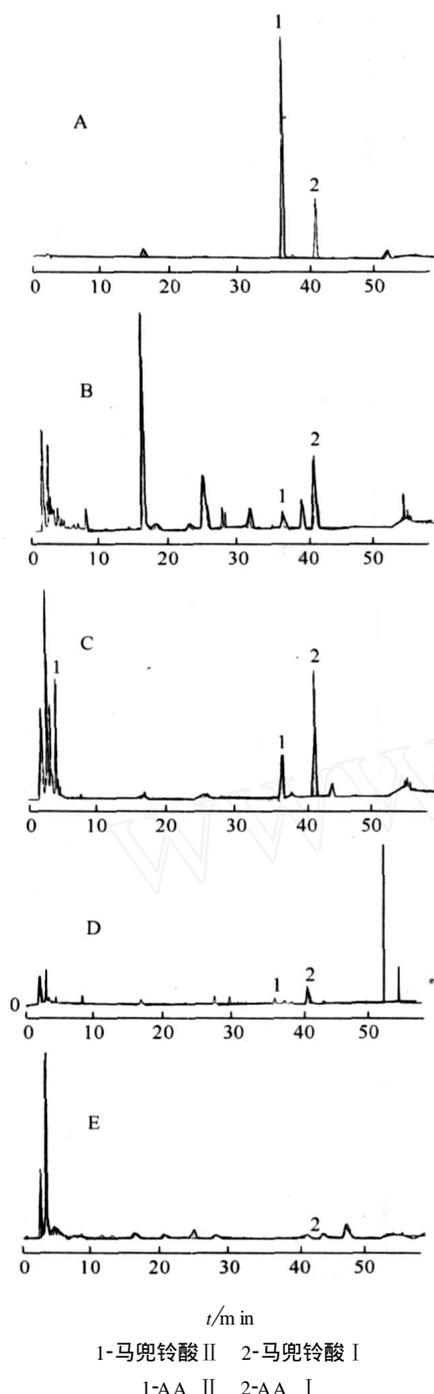


图1 马兜铃酸对照品(A)和马兜铃(B)、关木通(C)、青木香(D)和广防己(E)加压溶剂提取后样品的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of aristolochic acids (A), Fructus Aristolochiae (B), Caulis Aristolochiae Manshuriensis (C), Radix Aristolochiae (D), and Radix Aristolochiae Fangchi (E) by pressurized liquid extraction

和循环次数的影响较小。与传统的超声和索氏提取对比后,静态加压溶剂法显示了更高的提取效率,且操作简便,耗时短,重现性好,采用优化的方法一次可将

不同药材中的马兜铃酸提取完全,表明它不仅适用于马兜铃药材的提取,对于其他含马兜铃酸的药材中马兜铃酸类物质的提取也有很好的适用性。与动态加压溶剂提取的对比显示静态提取的方法耗时短,操作简便,因此在马兜铃酸的提取中更具优势。

致谢:感谢博士生杨丰庆、高建莉和李鹏对本研究的宝贵指导,实验室技术员黎畅明对本实验的大力支持,梁雪丹同学的重要帮助。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 董延清,候火明,朴志贤.马兜铃酸肾病的发病机制[J].国际泌尿系统杂志,2006,26(2):271-273.
- [2] Arlt V M, Stiborova M, Schmeiser H H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review [J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(4): 265-277.
- [4] Van Herweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. *Lancet*, 1993, 341: 387-391.
- [5] Loset J R, Raelison G E, Hostettmann K. An LC/DAD-UV/MS method for the rapid detection of aristolochic acid in plant preparations [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 856-858.
- [6] Chan S A, Chen M J, Liu T Y, et al. Determination of aristolochic acids in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-ion trap mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2003, 60: 679-685.
- [7] 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.
- [8] Zhang C Y, Wang X, Shang M Y, et al. Simultaneous determination of five aristolochic acids and two aristololactams in aristolochia plants by high-performance liquid chromatography [J]. *Biom ed Chrom atogr*, 2006, 20: 309-318.
- [9] 姜旭,王智民,由丽双,等.RP-HPLC测定不同产地青木香和细辛中马兜铃酸A的含量[J].中国中药杂志,2004,29(5):408-410.
- [10] 张兰桐,崔晓红,袁志芳,等.RP-HPLC法测定中药材及其制剂中马兜铃酸A的含量[J].药物分析杂志,2003,23(3):215-218.
- [11] 赵露,来剑峰,毕开顺.反相离子对色谱法测定青木香中马兜铃酸A的含量[J].沈阳药科大学学报,2001,18(2):125-127.
- [12] 李鹏,李绍平,付超美,等.加压溶剂提取技术在中药质量控制中的应用[J].中国中药杂志,2004,29(8):723-726.
- [13] Li P, Li S P, Lao S C, et al. Optimization of pressurized liquid extraction for Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide and ferulic acid in *Angelica sinensis* [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2006, 40.
- [14] Zhao J, Li S P, Yang F Q, et al. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography- evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction [J]. *J Chrom atogr A*, 2006, 1108: 188-194.
- [15] Mukhopadhyay S, Luthria D L, Robbins R J. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cim icifuga racenosa*) by pressurized liquid extraction [J]. *J Sci Food Agric*, 2006, 86: 156-162.
- [16] Ong E S, Woo S O, Yong Y L. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants [J]. *J Chrom atogr A*, 2000, 313: 57-64.