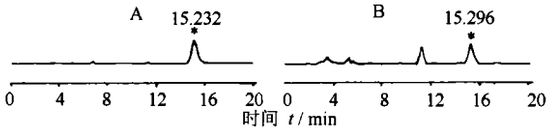


*-马兜铃酸 A

*-aristolochic acid A

图 1 马兜铃酸 A 对照品(A)和朱砂莲胶囊(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of aristolochic acid A (A) and Zhushalian Capsule (B)

分别精密吸取上述溶液 0.05、0.2、0.4、0.8、1.0 mL，置 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀。按上述色谱条件依法进样，测定峰面积。以峰面积为纵坐标，马兜铃酸 A 的质量浓度为横坐标绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 0.410\ 5\ X + 0.871\ 4$，$r = 0.999\ 5$。结果表明，马兜铃酸 A 质量浓度在 1.33～26.6 μg/mL 与峰面积有良好的线性关系。

2.6 最低检测限：在信噪比 S/N=3 时，最低检测限为 1.33 ng/mL。

2.7 重现性考察：取同一批(批号为 020106)样品 5 份，制备供试品溶液，注入液相色谱仪，依法测定，结果马兜铃酸 A 的 RSD 为 2.8%。

2.8 精密度试验：精密吸取供试品溶液 20 μL，重复进样 5 次，测定峰面积，结果马兜铃酸 A 的峰面积 RSD 为 1.8%。

2.9 稳定性试验：取供试品溶液，每隔 2 h 注入 20 μL，记录峰面积。结果表明，供试品溶液在 8 h 内基本稳定，马兜铃酸 A 峰面积 RSD 为 1.9% ($n=5$)。

2.10 回收率试验：采取加样回收法。精密量取批号为 0201066 的样品 0.5 g 5 份，分别加入马兜铃酸 A 对照品溶液适量，制备供试品溶液，进样，按上述色谱条件测定峰面积，计算回收率，结果马兜铃酸 A 的平均回收率为 98.6%，RSD=0.3% ($n=5$)。

2.11 样品测定：取朱砂莲胶囊(批号为 020106，020108，021123)，分别制备供试品溶液，按上述色谱条件进行分析，根据外标法计算马兜铃酸 A 的含量。3 批朱砂莲胶囊中马兜铃酸 A 的质量分数分别为 42.30、40.23、45.01 μg/g。

3 讨论

3.1 将马兜铃酸 A 溶于确定的流动相中，于分光光度计上进行光谱扫描，测定结果显示，马兜铃酸 A 在 315 nm 波长处有最大吸收，故选用此波长作为测定波长。

3.2 实验以甲醇-水为流动相，马兜铃酸 A 色谱峰易拖尾，对称度差，于流动相中加入适量的冰醋酸可抑制其拖尾，并可改变峰形。

3.3 本实验参考文献[2～5]，并结合实验，确定样品中甲醇索氏提取 8 h，马兜铃酸可以提取完全，且重现性良好。再经酸化，氯仿萃取，可消除其他物质对马兜铃酸 A 色谱峰的干扰。

3.4 美国 FDA 发布通告指出，所有含有或怀疑含有马兜铃酸 A 的天然药物均被禁止使用。虽然我国还没有作出相应的限制，但医务工作者不可掉以轻心。本实验确定的方法简便、快速，准确可靠，灵敏度高，可用于检测朱砂莲胶囊中马兜铃酸 A 的含量，以确保该药的安全、合理使用。

References:

[1] Li H, Youji S, Shingo M, *et al*. Constituents of *Aristolochia cinnabarina* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1995, 37(9): 745.

[2] Liu Y, Wang B Q. Determination of aristolochic acid A in *Aristolochia contorta* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(6): 15.

[3] Zhao N, Lai J F, Bi K S. Determination of aristolochic acid A in drugs from *Aristolochia* by RP-HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18(2): 56-57.

[4] Zhang Y P, Xun G J, Jin R L, *et al*. Determination of aristolochic acid A in *Aristolochia* by RP-HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1993, 18(2): 56-57.

[5] Zhao N, Lai J F, Bi K S. Determination of aristolochic acid A in *Radix Aristolochiae* by RP-HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18(2): 125-127.

肿节风注射液 HPLC 指纹图谱的研究

王钢力[1]，郑笑为[1]，陈道峰[2]，林瑞超[1]

(1. 中国药品生物制品检定所，北京 100050；2. 复旦大学药学院，上海 200032)

肿节风为金粟兰科草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株[1]，具有抗菌、消炎、止痛及肿瘤抑制作用。其主要化学成分为倍半萜、黄酮及香豆素类化合物[2]。肿节风注射液为肿节风药材

收稿日期：2003-12-18

经处理后制成的单味药注射剂[3]，具有清热解毒、消肿散结的功效，用于热毒壅盛所致肺炎、阑尾炎、蜂窝组织炎、菌痢、脓肿，与肿节风片联合用于消化道癌、胰腺癌、肝癌等的治疗。现行肿节风药材的质量标准的含量测定项采用 HPLC 法测定异秦皮啶的含量，而肿节风注射液则是采用 HPLC 法测定反丁烯二酸的含量，但两者之间缺乏相关性，难以全面、有效的控制药品的质量。中药的色谱指纹图谱能够提供大量有关化学成分的信息，反映组成中药的多种化学成分的整体面貌。本实验尝试采用中药指纹图谱相似度计算软件对肿节风注射液的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价，并采用 NTSYSpc 软件对指纹图谱进行分析，获得肿节风注射液原料、中间体和制剂之间的聚类关系。

1 仪器与材料

Agilent HP 1100 型高效液相色谱仪系统，DAD 紫外检测仪，Hpchem 色谱工作站。

乙腈为色谱纯，水为市售纯净水，乙醇、磷酸均为分析纯，反丁烯二酸、异秦皮啶对照品由中国药品生物制品检定所提供。

肿节风药材（9#，产地江西），生产中间体（10#）、肿节风注射剂（1#，批号：020327；2#，批号：020329）。肿节风注射剂（3#，批号：010711；4#，批号：010718；5#，批号：010803；6#，批号：010905；7#，批号：010926；8#，批号：010927）均由江西余江制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件：色谱柱：Zorbax Eclipse XDB-C_{18}色谱柱（150 mm × 3.9 mm，5 μm）；流动相：乙腈-B（5%乙腈 + 0.1%磷酸混合溶液），梯度洗脱：0～3 min，100% B，体积流量为 0.6 mL/min；3～8 min，100% B，体积流量变为 0.5 mL/min，以下洗脱均为 0.5 mL/min；8～30 min，5%乙腈-95% B；30～45 min，20%乙腈-80% B；45 min 以后，70%乙腈-30% B；柱温：40 ℃；检测波长：220 nm。

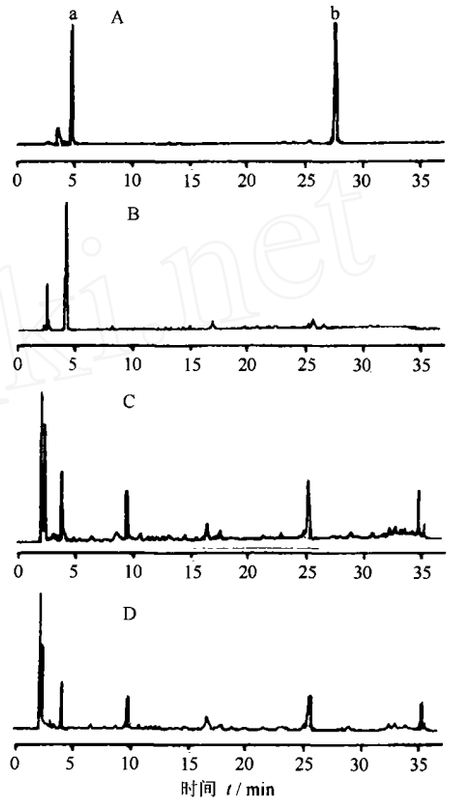
2.2 对照品溶液的制备：称取反丁烯二酸、异秦皮啶对照品各 1 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 药材供试品溶液的制备：取 9# 粗粉 0.5 g，加 15 mL 水煎煮 30 min，滤过，用水将滤液补足至 15 mL，加乙醇 35 mL，摇匀，置冰箱中冷藏过夜；取上清液 10 mL，离心 5 min（4 000 r/min），小心吸取上清液至蒸发皿中，蒸干，残渣加 1 mL B 溶解，离心 5 min（12 000 r/min），小心吸取上清液，即得。

2.4 中间体供试品溶液的制备：取 10# 5 μL，加 B 稀释至 1 mL，摇匀，离心 5 min（12 000 r/min），小心吸取上清液，即得。

2.5 注射剂供试品溶液的制备：取样品 100 μL，加 B 稀释至 1 mL，摇匀，即得。

2.6 测定结果：吸取上述溶液各 10 μL，分别注入液相色谱仪，测定，得各样品的液相色谱指纹图谱，见图 1。



a-反丁烯二酸 b-异秦皮啶

a-furmaric acid b-isofraxin

图 1 对照品（A）、肿节风原料（B）、注射液中间体（C）和肿节风注射液（D）的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of reference substances (A), raw material of *S. glabra* (B), injection intermediate (C) and *Injectio Sorcandra* (D)

采用中药指纹图谱相似度计算软件，对 10 个样本之间的相似度进行计算。以 10# 为对照模板，以反丁烯二酸和异秦皮淀的色谱峰作为特征标记峰，进行自动峰匹配。匹配后产生 47 个色谱峰（35 min 后出现的色谱峰为流动相的系统峰），色谱峰保留时间见表 1，色谱峰面积值见表 2。以色谱峰的相对保留时间和相对峰面积作为参数，计算每个样本的 HPLC 指纹图谱的平均相似度，结果见图 2。

采用NTSYSpc软件，对被测样本之间的聚类

表 1 样品的 HPLC 指纹图谱色谱峰保留时间

Table 1 Retention time of peaks of HPLC fingerprint in samples

峰号	保留时间/min									
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
1	4.45	4.45	4.47	4.47	4.44	4.46	4.46	4.47	4.59	4.46
2	5.07	5.07	5.10	5.11	5.06	5.08	5.1	5.12	5.16	5.10
3	5.45	5.46	5.43	5.47	5.47	5.44	5.51	5.50	5.72	5.49
4	5.90	5.92	5.94	5.97	5.93	5.95	5.94	5.99	6.27	5.93
5	6.50	6.50	6.30	6.33	6.49	6.49	6.53	6.57	6.73	6.54
6	7.12	7.13	7.13	7.16	7.11	7.11	7.14	7.16	7.44	7.14
7	7.76	7.77	7.76	7.85	7.77	7.76	7.79	7.81	7.76	7.79
8	8.32	8.36	8.50	8.54	8.45	8.44	8.47	8.55	8.08	8.37
9	8.87	8.87	8.87	8.87	8.88	8.87	8.87	8.87	8.86	8.87
10	9.56	9.56	9.55	9.58	9.56	9.55	9.55	9.61	9.82	9.55
11	10.65	10.66	10.66	10.68	10.65	10.64	10.66	10.67	10.99	10.66
12	11.70	11.71	11.70	11.74	11.70	11.69	11.71	11.73	11.85	11.72
13	12.36	12.36	12.37	12.4	12.36	12.36	12.37	12.39	12.36	12.38
14	12.78	12.79	12.76	12.77	12.77	12.77	12.76	12.77	12.59	12.76
15	13.22	13.22	13.22	13.25	13.21	13.21	13.21	13.22	13.43	13.23
16	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75	13.76	13.76	13.99	13.76
17	14.55	14.55	14.55	14.58	14.60	14.33	14.6	14.53	14.39	14.56
18	15.1	15.11	15.10	15.12	15.11	15.11	15.11	15.12	15.00	15.12
19	16.04	16.05	16.15	16.17	16.07	16.10	16.13	16.13	16.04	16.07
20	16.54	16.54	16.54	16.54	16.55	16.54	16.55	16.56	16.31	16.54
21	17.12	17.11	17.09	17.10	17.09	17.08	17.10	17.10	17.30	17.10
22	17.67	17.67	17.62	17.64	17.65	17.63	17.65	17.64	17.67	17.66
23	18.16	18.17	18.26	18.27	18.26	18.26	18.28	18.27	18.36	18.17
24	18.86	18.86	18.86	18.87	18.86	18.87	18.89	18.89	18.86	18.87
25	19.16	19.16	19.16	19.16	19.19	19.16	19.19	19.16	19.16	19.15
26	19.48	19.48	19.48	19.49	19.48	19.47	19.49	19.47	19.64	19.50
27	20.36	20.36	20.40	20.49	20.36	20.41	20.36	20.36	20.63	20.36
28	20.87	20.87	21.04	21.05	20.86	20.85	20.87	20.85	20.87	20.87
29	21.26	21.26	21.26	21.26	21.26	21.26	21.26	21.26	21.25	21.25
30	21.99	21.99	21.99	21.99	22.00	21.98	21.98	21.98	21.99	22.00
31	22.5	22.51	22.31	22.33	22.53	22.53	22.54	22.52	22.72	22.53
32	23.33	23.33	23.22	23.24	23.25	23.23	23.23	23.24	23.13	23.32
33	24.17	24.17	23.85	24.60	24.17	24.15	24.16	24.15	24.25	24.18
34	24.99	24.99	24.98	25.01	25.00	24.97	24.98	24.98	24.99	24.97
35	26.37	26.21	26.05	26.07	26.07	26.06	26.08	26.08	26.25	26.40
36	27.25	27.25	27.24	27.26	27.28	28.25	27.26	27.25	27.49	27.24
37	27.85	27.85	27.83	26.85	27.87	27.84	27.85	27.84	27.92	27.84
38	29.10	28.85	28.83	28.85	28.87	28.84	28.85	28.85	28.86	29.09
39	29.42	29.42	29.67	29.42	29.42	29.42	29.42	29.42	29.82	29.40
40	30.02	30.02	30.02	29.99	30.03	30.00	30.03	30.01	30.14	30.01
41	30.87	30.87	30.85	30.87	30.88	30.86	30.87	30.86	30.76	30.85
42	31.21	31.21	31.21	31.21	31.21	31.21	31.22	31.21	31.27	31.19
43	31.60	31.60	31.58	31.60	31.61	31.59	31.60	31.60	31.61	31.58
44	32.19	32.20	32.23	32.25	32.24	32.24	32.23	32.25	32.19	32.15
45	33.27	33.27	33.27	33.29	33.33	33.32	33.23	33.27	33.27	33.26
46	33.70	33.70	33.71	33.72	33.73	33.71	33.72	33.72	33.74	33.70
47	34.87	34.88	34.90	34.91	34.91	34.90	34.87	34.87	34.87	34.88

关系进行分析。在各色谱峰进行自动峰匹配后，产生 47 个色谱峰。取有峰者记为 1，无峰者（峰面积为 0）记为 0，建立 10 行 58 列矩阵，通过计算，获得各被测样本之间的聚类关系，结果见图 3。

3 讨论

3.1 从肿节风注射液原料、中间体和制剂的指纹图谱中可以看出：原料中主要成分反丁烯二酸、异秦皮啶在原料中的相对含量较低，通过工艺处理后，在中间体和制剂中的含量显著提高，说明制剂工艺比较合理。

3.2 从相似度评价结果可以看出：以 10# 为对照模板，计算出的各批注射剂的平均相似度在0.82～

表 2 样品 HPLC 指纹图谱色谱峰面积值

Table 2 Area value of peaks of HPLC fingerprint in samples

峰号	峰面积值									
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
1	3 137	1 574	1 063	1 600	2 259	745.0	2 473	1 115	15 751	5 705
2	264.5	75.19	19.1	32.57	53.92	21.21	157.6	33.9	186.4	283.5
3	153.2	35.88	27.66	30.38	53.7	25.87	128.4	35.23	129.4	417.9
4	236.0	64.16	50.5	76.17	71.97	23.87	157.0	53.29	61.59	211.4
5	126.6	34.83	61.25	83.7	28.86	24.03	140.4	26.86	47.66	352.0
6	462.5	189.8	47.57	75.94	114.7	44.67	205.8	75.03	38.47	752.7
7	44.59	9.41	0	5.8	8.53	0	41.11	8.96	0	34.61
8	340	184.5	532.5	832.7	337.8	152.0	555.9	254.1	122.0	691.8
9	0	0	0	0	72.81	20.05	0	0	574.8	0
10	514.5	237.7	479.1	717.9	217.3	86.41	716.1	189.4	278.3	1 637
11	3 363	1 664	578.3	883.0	1 153	533.0	1 835	933.1	607.0	7 536
12	617.5	262.8	133.4	214.5	209.4	70.97	361.7	148.6	408.5	1 049
13	451.9	207.6	318.1	519.8	218.1	102.1	508.7	238.7	0	808.4
14	351.7	147.3	68.67	115.0	118.12	47.7	201.72	90.8	660.9	739.1
15	566.7	261.0	204.3	322.2	287.1	123.8	469.5	232.2	744.0	1 040
16	476.8	205.8	0	0	91.24	36.44	179.3	79.81	622.2	868.2
17	726.0	339.7	140.7	207.7	187.	84.42	384.7	182.1	602.8	2 072
18	860.2	381.0	86.72	129.6	258.5	48.42	207.9	96.93	821.8	596.7
19	828.3	396.6	387.4	553.1	332.3	131.6	590.9	264.52	0	2 049
20	248.3	104.8	0	0	93.04	33.28	191.5	82.77	2 121	50.02
21	482.0	226.9	288.5	406.4	207.0	86.41	441.2	190.0	1 892	1 187
22	502.1	234	101.3	139.5	150.5	56.37	254.4	113.1	0	1 003
23	2 086	1 048	503.7	740.6	801.5	336.7	1 377	642.6	3 607	4 186
24	427.05	202.4	98.15	127.7	0	51.14	254.9	110.4	0	869.2
25	0	0	0	0	308.1	0	265.2	0	0	911.1
26	1 154	797.3	283.3	406.5	178.6	150.7	293.0	267.4	1 219	2 638
27	478.8	231.9	183.2	222.6	193.8	76.61	0	0	892.0	919.8
28	685.9	340.62	258.27	430	416.17	159.95	1 172	503.14	0	1 207
29	752.7	367.3	0	0	0	0	0	0	2 484	2 011
30	327.3	163.9	0	0	180.1	40.94	213.39	107.64	1 080	607.6
31	809.8	414.4	280.4	491.6	312.1	101.7	569.4	239.8	1 649	1 696
32	1 077	553.9	237.0	406.3	391.9	101.8	702.6	305.7	1 612	2 283
33	809.2	415.2	79.28	504.8	160.9	89.55	279.7	140.0	2 104	1 033
34	1 276	651.3	252.4	425.9	522.7	119.4	917.7	348.7	2 108	3 533
35	1 031	513.0	209.2	366.6	370.1	116.5	728.6	284.8	3 336	1 611
36	1 380	690.5	328.0	539.5	440.1	144.2	809.5	337.3	3 315	2 140
37	4 986	2 528	1 006	1 530	1 371	516.5	2 281	1 001	3 662	11 821
38	834.2	566.7	643.1	967.1	373.5	114.2	795.2	273.8	2 961	820.6
39	0	0	344.8	0	0	0	0	0	1 066	0
40	1 389	649.7	0	563.8	354.6	92.52	720.8	230.5	1 097	2 974
41	492.6	239.9	136.9	226.1	156.4	46.92	328.3	110.1	1 670	1 033
42	527.9	243.9	0	0	141.8	36.04	282.7	91.22	1 367	1 144
43	997.5	483.6	414.8	653.5	282.1	80.66	542.85	185.25	1 278	2 124
44	1 197	288.9	124.3	206.8	143.7	32.14	300.6	74.02	1 110	1 386
45	569.0	253.4	115.2	191.9	140.3	26.87	259.2	0	0	1 143
46	685.2	363.2	756.6	955.8	206.4	21.01	714.1	235.3	2 184	2 076
47	1 484	738.2	369.0	607.1	442.8	132.4	0	0	0	3 268

0.98，明显高于 9#（10# 的原料药材）的 0.58，说明不同原料在经过制剂生产工艺处理后，主要成分较为接近；在 8 批注射液中，又以 1# 和 2# 的与 10# 成分之间最为相似，这与 1# 与 2# 是由 10# 中间体生产而来的事实相符。此外，3# 和 4# 较为相似，5# 和 6# 较为相似，7# 和 8# 较为相似，这与前两者来源于同一批原料，后两者来源于同一批原料的事实相吻合。

3.3 聚类结果表明，中间体和所有的制剂聚为一支，原料药材为另一支，显示出原料与成品、中间体之间化学成分的差异较大；其中中间体（9#）与以其生产出的 2 批制剂聚为一小枝，说明中间体与相应

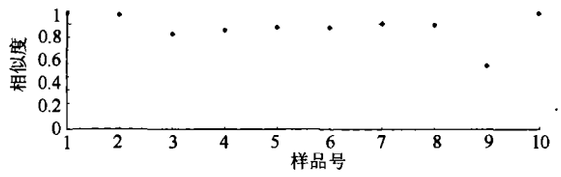


图 2 样品 HPLC 指纹图谱相似度计算结果

Fig. 2 Results of similarity evaluation of samples' HPLC fingerprint

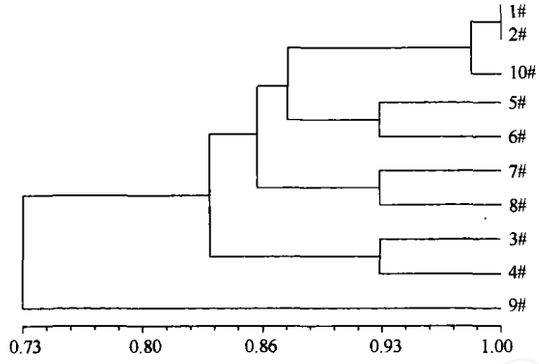


图 3 样本指纹图谱聚类分析结果

Fig. 3 Clustering result of samples' fingerprints

的制剂之间的化学成分比较接近，这与相似度计算得到的结果基本吻合；此外，5# 和 6# 聚为一小枝，7# 和 8# 聚为一小枝，3# 和 4# 聚为一小枝，而5# 和6# 来源于同一批原料，7# 和 8# 来源于同一批原料。

3.4 对于需测定指纹图谱的样品，其前处理应本着充分反映药材化学成分的原貌的原则；但通过对肿节风药材化学成分预试验发现，肿节风中含有大量的多糖，容易对色谱峰（尤其是反丁烯二酸的峰）产生干扰。而且注射液的生产工艺中采取了水提醇沉法去除杂质。因而对药材的前处理亦采取水提醇沉的方法。

3.5 中药色谱指纹图谱中包含大量有关组成中药的化学成分的信息，如何正确处理并合理利用指纹图谱提供的信息成为当前中药质量控制面临的难题。所以应当在大量实验数据积累的基础上，确定适合该种中药的测量参数、算法和指纹图谱整体相似度的限度值，从而建立其指纹图谱的标准。

References:

[1] *Ch P* (中国药典), Vol Ⅰ. 2000.

[2] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advances in chemical and quality control studies on *Herba Sarcandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(8): a-11-12.

[3] *Drug Standards Issued by the Ministry of Public Health, China: Chinese Traditional Patent Medicine* (中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂) [S]. WS_3-B-2729-97. 1997.

HPLC 法测定含川芎当归的常见煎剂中阿魏酸的含量

屈 扬，黄 熙*，任 平，张 莉，张珊红，杨喜忠

（第四军医大学西京医院，陕西 西安 710032）

川芎活血行气、祛风止痛，是活血化瘀的常用中药之一；当归补血活血、调经止痛润肠，为补血要药。两者主要成分之一阿魏酸具有抗凝、抗血小板聚集、扩张微血管、增加冠脉流量、解除血管痉挛、防止血压升高等作用。本实验采用 HPLC 法测定不同配伍和煎煮条件对含有川芎当归的常见汤剂中阿魏酸含量的影响，为含川芎当归复方的临床治疗药物监测[1]以及生物方剂分析[2]提供质量控制依据。

1 仪器与材料

贝克曼高效液相色谱仪，165 可变波长双通道紫外-可见检测器。

阿魏酸对照品购于中国药品生物制品检定所，纯度为 99.5%，批号：0773-9910；醋酸、甲醇均为 AR 级，水为自制三蒸水。川芎购自四川都江堰市医药公司石羊镇医药批发站，当归购自甘肃眠县，赤芍购自四川省中江市，人工种植品，为刮皮赤芍。均由西北大学生物解剖学教研室胡正海教授鉴定，分别为伞科植物川芎 *Ligusticum wachilli* Hort. 的干燥根茎，伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根，毛茛科川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根。其他药材均以饮片形式购于西安市药材公司。

收稿日期：2003-12-21

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30070912）

作者简介：屈 扬（1977—）女，陕西西安人，第四军医大学中西医结合临床硕士生，研究方向为中药复方药动学。

*通讯作者 E-mail: tcmwsh@fmmu.edu.cn Tel: (029) 3375955