

生血宝合剂的多成分 HPLC 指纹图谱

易小兰¹, 杨华¹, 张飞飞¹, 郭元满¹, 张妮瑜¹, 谢金华¹, 谭泽云¹, 胡高云^{2*}
(1. 湖南汉森医药研究有限公司, 长沙 410013; 2. 中南大学, 长沙 410013)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法对生血宝合剂的质量进行定性分析,实现对生血宝合剂的整体高精度的质量控制,建立生血宝合剂的多成分 HPLC 指纹图谱。方法:采用 Thermo Syncronis-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 2% A; 15~30 min, 2%~15% A; 30~50 min, 15%~25% A; 50~60 min, 25% A); 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C, 流速 0.8~1.0 mL·min⁻¹, 进样体积 5 μL, 分析时间 60 min。结果:在同一色谱条件下可同时检测出芍药苷等成分,确认了 14 个共有峰,方法学考察结果较好,10 批生血宝合剂指纹图谱的相似度均 > 0.9。结论:该方法简便、重复性好,为生血宝合剂的综合质量评价提供了科学依据。

[关键词] 生血宝合剂; 芍药苷; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0057-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010057

Multi-component Fingerprint Chromatogram of Shengxuebao Mixture by HPLC

YI Xiao-lan¹, YANG Hua¹, ZHANG Fei-fei¹, GUO Yuan-man¹,
ZHANG Ni-yu¹, XIE Jin-hua¹, TAN Ze-yun¹, HU Gao-yun^{2*}

(1. Hunan Hansen Medical Research Co. Ltd., Changsha 410013, China;
2. Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct a qualitative analysis for the quality of Shengxuebao mixture by HPLC, in order to achieve the quality control of the overall accuracy of Shengxuebao mixture, and establish a multi-component fingerprint chromatogram of Shengxuebao mixture by HPLC. **Method:** Thermo Syncronis-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was eluted with the mobile phase of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid (B) in a gradient mode (0-15 min, 2% A; 15-30 min, 2%-15% A; 30-50 min, 15%-25% A; 50-60 min, 25% A). Detection wavelength was set at 230 nm; column temperature was 30 °C; the flow rate was 0.8-1.0 mL·min⁻¹ and analytic time was 60 min. Injection volume was 5 μL. **Result:** Under the same chromatogram condition, paeoniflorin and other condittuents were determined, and 14 peaks were identified on the HPLC fingerprint. The methodological results were satisfactory. The similarity of the 10 batches of Shengxuebao mixture was above 0.9. **Conclusion:** The method is simple and highly reproducible, and can provide scientific basis for the quality control of Shengxuebao mixture.

[Key words] Shengxuebao mixture; paeoniflorin; fingerprint chromatogram; HPLC

生血宝合剂^[1]是经典名方开发而成的复方制剂,收载于中华人民共和国卫生部药品标准《中药成方制剂》第13册,由白芍、制何首乌、黄芪、桑椹、女贞子、墨旱莲、狗脊等中药制成。生血宝合剂能提

高干细胞分化池中干细胞的增殖能力,从而促进血细胞生成;减少外周血细胞破坏的程度,减少细胞破坏,消耗过多;调节循环池及边缘池的比例,进而调节细胞分布紊乱;科学组方,有效升高血液中白细胞

[收稿日期] 20150217(023)

[第一作者] 易小兰,工程师,从事制药技术和新药开发研究, Tel:0731-89793210, E-mail:528698398@qq.com

[通讯作者] * 胡高云,教授,从事创新药物开发研究, Tel:0731-82650371, E-mail:hugaoyun@yahoo.com.cn

和血红蛋白的含量。具有养肝肾,益气血之功效,用于恶性肿瘤放化疗所致白细胞减少及神疲乏力,腰膝酸软,头晕耳鸣,心悸,气短,失眠、咽干,食欲不振食少等^[2-3]。现有生血宝合剂的质量标准只要求做芍药苷检查,难以客观反映生血宝合剂的整体质量状况。本文根据国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[4]对生血宝合剂进行了多成分指纹图谱研究,并采用国家药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版本)进行相似度评价。以期为控制生血宝合剂的质量提供实验依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦),SB-5200D 型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技),BT125D 型电子天平(赛多利斯科学仪器)。芍药苷^[5]对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110738-201337),乙腈、甲醇均为色谱级,其余试剂均为分析纯,水为超纯水,生血宝合剂(批号为 110523,101116,1011206,110101,110202,110303,110304,110305,110306,110407,清华德人西安幸福制药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Synchronis-C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 2% A; 15 ~ 30 min, 2% ~ 15% A; 30 ~ 50 min, 15% ~ 25% A; 50 ~ 60 min, 25% A),检测波长 230 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样体积 5 μL,分析时间 60 min。

2.2 供试品溶液的制备 取生血宝合剂 1 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,回流处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得生血宝合剂供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 称取芍药苷对照品,置于量瓶中,加甲醇溶解并稀释制成 0.02 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一批生血宝合剂供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积的 RSD 均 < 5%,表明仪器精密度较好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批生血宝合剂供试液,分别在 0, 2, 4, 8, 16 h 进样,记录色谱图,结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积

RSD 均 < 5%,表明在 16 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 按 2.2 项下方法同时制备 6 份生血宝合剂供试品溶液,分别进样,记录色谱图,结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积 RSD 均 < 5%,表明该方法重复性较好。

2.4.4 专属性考察 按 2.2 项下方法同时制备 7 味药材单味药材供试品溶液、药材阴性供试品、生血宝合剂供试品溶液,分别进样,记录色谱图,依据所得的图谱,确定各特征峰的归属。结果见表 1,见图 1。

表 1 生血宝合剂中各特征峰图谱归属

Table 1 Comparison about characteristic peaks fingerprints of Shexuebao mixture

峰号	白芍	女贞子	狗脊	墨旱莲	制何首乌	黄芪	桑椹
1			✓	✓	✓		✓
2	✓	✓	✓	✓		✓	✓
3		✓		✓			✓
4	✓						
5			✓	✓			✓
6		✓					
7	✓						
8	✓						
9	✓						
10						✓	
11					✓		
12		✓					
13	✓						
14	✓						

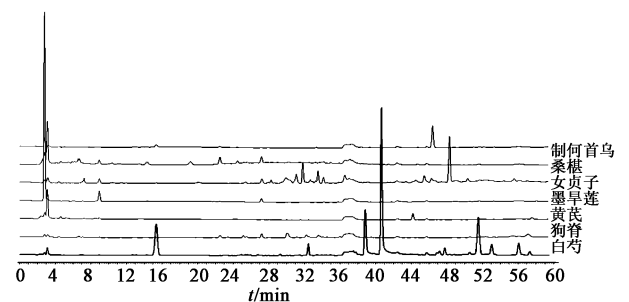


图 1 生血宝合剂中各成分 HPLC

Fig. 1 Fingerprint of crude drugs decoction by HPLC

3 指纹图谱的建立及分析

3.1 指纹图谱^[6]的建立和相似度分析 取 10 批生血宝合剂样品和对照品按上述方法制备,按色谱条件测定,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”

(2012.0 版) 进行评价, 以 S_1 为参照图谱, 选择时间窗宽度 0.5, 生成色谱的方法为平均值, 生成对照图谱 R, 确定了 14 个共有峰, 通过与对照品保留时间、紫外光谱以及质谱对比, 确定了 9 号峰为芍药苷 (参照峰), 见图 2~4。各批样品与对照指纹图谱比较相似度在 0.917~0.999, 见表 2。

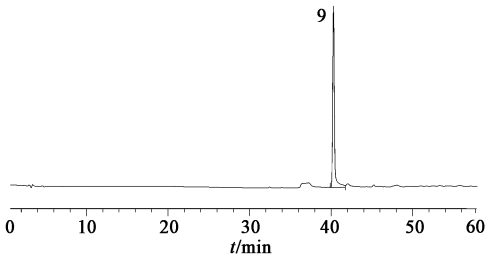


图 2 芍药苷对照品 HPLC

Fig. 2 Paeoniflorin reference substances by HPLC

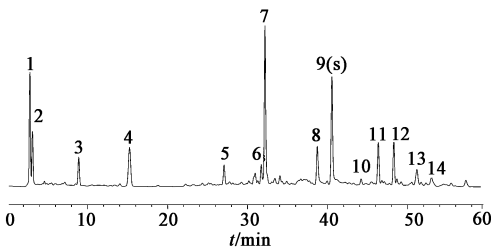


图 3 生血宝合剂的 HPLC 对照指纹谱

Fig. 3 Reference fingerprint of Shenxuebao mixture by HPLC

3.2 样品相似度结果 样品 1~10 号相似度分别为 0.946, 0.978, 0.975, 0.981, 0.961, 0.958, 0.982, 0.999, 0.999, 0.917。

3.3 共有指纹峰的相对保留时间^[7] 以分离度较好、峰面积较大、保留时间适中的桂皮醛为参照物, 计算各色谱峰的相对保留时间, 见表 2。

3.4 共有指纹峰的相对峰面积^[8] 将各色谱峰保

表 2 10 批样品指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention times of common peaks for fingerprints of Shenxuebao mixture

No.	4	5	7	8	10	12	13	14
1	0.382	0.671	0.803	0.955	1.088	1.188	1.262	1.304
2	0.382	0.671	0.803	0.955	1.089	1.188	1.262	1.304
3	0.382	0.671	0.803	0.955	1.089	1.188	1.263	1.304
4	0.383	0.671	0.803	0.955	1.089	1.188	1.263	1.304
5	0.383	0.671	0.803	0.956	1.089	1.188	1.263	1.304
6	0.383	0.672	0.803	0.956	1.089	1.188	1.263	1.304
7	0.383	0.672	0.804	0.956	1.089	1.188	1.263	1.304
8	0.384	0.672	0.804	0.956	1.089	1.189	1.263	1.304
9	0.384	0.672	0.804	0.956	1.089	1.189	1.263	1.304
10	0.384	0.672	0.804	0.956	1.089	1.189	1.263	1.305

注: 1, 2, 3, 6, S, 11 号峰的相对保留时间分别为 0.07, 0.077, 0.221, 0.784, 1.000, 1.143。

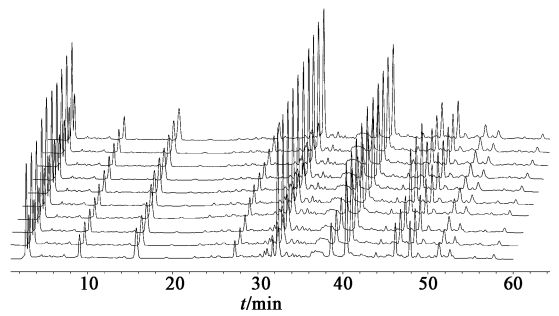


图 4 10 批生血宝合剂 HPLC 指纹谱

Fig. 4 Fingerprint of 10 batches of Shenxuebao mixture by HPLC

留时间与同一图谱中参照物的峰面积比较, 其比值为各色谱峰的相对峰面积, 见表 3。

4 小结与讨论

指纹图谱技术应用于中药复方的质量控制是一大热点也是一大难点, 由于复方成分复杂, 有效物质不够明确, 采用 1~2 种有效成分或指标成分来表征复方的指纹图谱, 无法代表其整体性, 也无法反映复方制剂真实的内在质量。

本文采用多指标成分^[9] 指纹图谱来表征生血宝合剂的质量, 建立了在同一色谱条件下检测芍药苷等多指标成分的 HPLC 指纹图谱方法, 既可在一定程度上反映所用药材的质量, 同时多成分指标分离测定还可以反映复方中药的配伍状况, 方法简单, 结果准确可靠, 适用于该制剂的质量控制。

经比较水、稀乙醇、乙醇、三氯甲烷、50% 甲醇、甲醇等多种提取溶剂, 结果以甲醇提取的供试品峰数多、总峰面积大。

采用二极管阵列 190~400 nm 扫描, 发现在 230 nm^[10] 处, 图谱基线平稳、色谱峰峰数多, 大部分

表 3 10 批样品指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks for fingerprints of Shenxuebao mixture

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14
1	0.638	0.235	0.244	0.495	0.174	0.125	1.21	0.445	0.056	0.349	0.352	0.225	0.122
2	0.623	0.254	0.134	0.574	0.164	0.124	0.306	0.344	0.065	0.227	0.193	0.667	0.097
3	0.617	0.268	0.122	0.595	0.176	0.101	0.338	0.325	0.071	0.631	0.330	0.824	0.104
4	0.849	0.321	0.137	0.68	0.173	0.124	0.692	0.407	0.079	0.572	0.338	0.656	0.129
5	0.508	0.157	0.136	0.336	0.125	0.078	0.378	0.217	0.043	0.484	0.215	0.166	0.074
6	0.566	0.268	0.139	0.591	0.147	0.097	0.405	0.392	0.061	0.372	0.290	0.596	0.102
7	0.884	0.363	0.201	0.805	0.225	0.179	1.216	0.547	0.093	0.487	0.451	0.313	0.138
8	0.976	0.315	0.244	0.787	0.194	0.168	1.147	0.557	0.061	0.677	0.52	0.379	0.144
9	0.895	0.329	0.108	0.735	0.182	0.225	0.472	0.518	0.097	0.425	1.213	0.403	0.138
10	0.584	0.217	0.133	0.544	0.156	0.098	1.221	0.420	0.060	0.636	0.228	0.143	0.138

注:S 峰的相对峰面积均为 1.000。

成分能在此波长检出且分离度较好,故选用 230 nm 作为指纹图谱检测波长。

经比较①Agilent ZORBAX XDB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), ②Thermo Synchronis-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), ③依利特 Hypersil ODS2-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), ④迪马 Diamonsil-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 4 种不同型号规格的色谱柱,结果表明,以上 4 种品牌的色谱柱均可达到实验要求,但②号色谱柱,分离度及基线最理想,因此我们选用该色谱柱。

本文通过专属性试验确定生血宝合剂的 HPLC 在 230 nm 的指纹图谱有 14 个共有峰,其中归属于白芍的共有峰为峰 2,4,7,8,9,13,14;归属于女贞子的共有峰为峰 2,3,6,12;归属于狗脊的共有峰为峰 1,2,5;归属于墨旱莲的共有峰为峰 1,3,5;归属于制何首乌的共有峰为峰 1,11;归属于黄芪的共有峰为峰 2,10;归属于桑椹的共有峰为峰 1,2,3,5。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:652-653.

[2] 邱赛红,耿强,汤淮波,等. 生血宝合剂对缺铁性贫血

模型大鼠治疗作用的实验研究[J]. 中国医药导刊, 2007,9(2):143-145.

[3] 李静. 生血宝配合常规西药治疗慢性肾衰患者贫血 15 例临床观察[J]. 中医药导报,2007,13(6):28-29.

[4] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究技术要求(暂行)[J]. 中成药,2000,22(10):671.

[5] 寇婉青,张爱琴. 生血宝合剂中何首乌苷的含量测定[J]. 安徽中医学院学报,2013,32(10):86-87.

[6] 刘正清,杨华,易跃能. 乌药药材水提液的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):127-129.

[7] 刘春海,张妮瑜,欧金秀,等. 五积散酒多指标成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国医药工业杂志,2010,41(8):607-609.

[8] 谷陟欣,张妮瑜,梁逸曾,等. 驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):81-82.

[9] 杨华,易小兰,谢金华,等. HPLC 同时测定四磨汤合剂中辛弗林、槟榔碱和去甲异波尔定的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):79-81.

[10] 刘春海,张妮瑜,欧金秀. HPLC 测定乌鸡白凤丸(水蜜丸)中芍药苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):13-14.

[责任编辑 顾雪竹]