

# 血畅宁组方有效部位总皂苷 HPLC 特征图谱研究

林辉, 饶剑花, 潘毅\*, 阳涛, 徐大量, 张鹏  
(广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:建立血畅宁组方有效部位总皂苷的 HPLC 特征图谱。方法:采用 HPLC 法,色谱条件 Synergi Fusion-RP C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水溶液,梯度洗脱进行色谱分离;检测波长 203 nm;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 (30 ± 5) °C。结果:12 批不同批次的血畅宁组方药材所得皂苷部位中,除 3 批外,其余 9 批与系统生成的对照特征图谱的相似度均在 0.9 以上;归纳出血畅宁组方皂苷部位有 19 个共有峰,不同批次样品中主要化学成分组成相似,但相对比例有明显的差异。结论:所建立的方法简单可行,能有效控制血畅宁组方有效部位总皂苷的质量。

**[关键词]** 血畅宁组方;有效部位;总皂苷;高效液相色谱;特征图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0127-04

## Studies of HPLC Characteristic Chromatogram of Saponins in Effective Parts of Xuechangning Formula

LIN Hui, RAO Jian-hua, PAN Yi\*, YANG Tao, XU Da-liang, ZHANG Peng  
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[收稿日期]** 20120924(006)

**[基金项目]** 广东省科技计划课题项目(2010B030700036);国家自然科学基金项目(81173181)

**[第一作者]** 林辉,研究员,硕士生导师,从事中药有效部位研究与新药开发,Tel:020-39358838,E-mail:linhuijw@126.com

**[通讯作者]** \*潘毅,教授,博士生导师,从事中药防治心脑血管病研究,Tel:13533718763,E-mail:panyi11111@126.com

- [3] 刘芳,罗跃娥.延胡索研究概况[J].天津中医学院学报,2005,24(4):240.
- [4] 常新全,丁丽霞.中药活性成分分析手册[M].北京:学苑出版社,2002:847
- [5] 王晓玲,郑振,洪战英,等.中药延胡索的化学成分与质量控制研究进展[J].时珍国医国药,2011,22(1):227.
- [6] 韩利文,陈锡强,袁延强,等.高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用[J].现代药物与临床,2010,25(4):241.
- [7] 陈欣霞,张丽艳,万金志,等.高速逆流色谱同时分离头花蓼中的没食子酸和短叶苏木酚酸[J].中国中药杂志,2010,35(15):1957.
- [8] 许有威,齐艳,韩旭,等.高速逆流色谱结合大孔树脂从龙胆中快速分离高纯度龙胆苦苷[J].中国中药杂志,2007,32(24):2595.
- [9] 王岱杰,刘建华,耿岩玲,等.夏天无生物碱的高速逆流色谱分离纯化[J].分析化学研究报告,2010,38(6):783.
- [10] 陈红英,李学刚,叶小利,等.黄连中胆碱的分离及其对小檗碱在 HepG<sub>2</sub> 细胞中糖代谢作用的影响[J].2012,37(12):1771.
- [11] 管仁军,王岱杰,于宗渊,等.高速逆流色谱分离纯化蔓荆子中的活性成分[J].色谱,2010,28(11):1043.
- [12] 许翔鸿,王峥涛,余国奠,等.延胡索中生物碱成分的研究[J].中国药科大学学报,2002,33(6):483.
- [13] 胡甜甜,张雪,马世中,等.延胡索中的生物碱成分[J].中国中药杂志,2009,34(15):1917.
- [14] 张晓丽,曲扬,侯家鸣,等.延胡索的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2008,25(7):537.
- [15] 王文蜀,肖巍,喻蓉,等.中药延胡索化学成分研究[J].中央民族大学学报,2007,16(1):80.
- [16] 吕子明,孙武兴,段绪红,等.胡索化学成分研究[J].中国中药杂志,2012,37(2):235.

[责任编辑 邹晓翠]

**[ Abstract ] Objective:** To study the characteristic chromatogram of saponins in effective parts of Xuechangning formula by HPLC. **Method:** The chromatographic condition of HPLC was as follows: Synergi Fusion-RP column  $C_{18}$  (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) at 30  $^{\circ}$ C, the mobile phase being acetonitrile with water, gradient elution in chromatographic separation, the detective wavelength being 203 nm, and flow rate being 1.0 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ . **Result:** Except for three batches of 12 batches of saponins in Xuechangning formula, the characteristic chromatogram similarity value of the other eight batches was above 0.9 as compared with system generation spectrum, and 19 common characteristic peaks were presented. The results showed that the main chemical constituents of medicinal materials were similar among samples from different habitats, but their relative ratios are significantly different. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducibility, and can be used for the quality control of Xuechangning formula.

**[ Key words ]** Xuechangning formula; effective parts; saponins; HPLC; characteristic chromatogram

血畅宁组方是临床上治疗高血压及其并发症的一个验方,由龟板、熟地黄、丹参、田七、钩藤、瓜蒌 6 味中药配伍而成<sup>[1-6]</sup>。通过对其治疗高血压的有效部位研究发现,组方中的总皂苷部位是其重要的有效部位。本研究采用 HPLC 建立血畅宁组方有效部位总皂苷的 HPLC 特征图谱,为血畅宁组方有效部位质量控制提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 2965 HPLC 系统 (Waters Corporation, Milford, MA, USA): 四元泵,在线真空脱气系统,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器,Empower3 工作站。Synergi Fusion-RP  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, 广州菲罗门科学仪器有限公司),德国赛多利斯 Sartorius 分析天平 (BP211D, BS210S 型,北京中仪有信科技有限公司);KQ-500 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司);EYELA N-1000 型旋转蒸发仪 (北京五洲东方科技发展有限公司)。

**1.2 材料** 12 批不同批次组方药材见表 1 (龟板、熟地黄、丹参、田七、钩藤、瓜蒌)经我校中药学院中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定依次分别为龟科 Testudinidae 动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的干燥背甲及腹甲;唇形科鼠尾草属植物丹参 *Savlia*

*miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎;五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* F. H. Chen 的块根;茜草科钩藤属 *Uncaria* 植物钩;葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 或双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟果实。

乙腈 (色谱纯,德国默克公司,批号 608-001-00-3),甲醇 (色谱纯 4 L,德国默克公司,批号 603-001-00-X),水为怡宝水,乙醇、正丁醇、石油醚等其余试剂为分析纯 (天津富宇精细化工有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备**<sup>[7-8]</sup> 称取龟板 120 g,熟地黄 100 g,丹参 60 g,田七 20 g,钩藤 48 g,瓜蒌 48 g,加蒸馏水浸泡过夜,回流提取 2 次 (第 1 次用 8 倍量蒸馏水提取 1 h,第 2 次 6 倍量提取 45 min),滤过,合并滤液并浓缩至含生药量 1 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ ;分别依次用等量的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,各萃取液浓缩,挥干溶剂,加蒸馏水加热溶解,得到含生药 9.9 g  $\cdot$  mL $^{-1}$  的各部位;母液部位挥干残留有机溶剂浓缩成含生药量 4.95 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ 。各萃取部位及母液水溶液 (含药材生药量 0.62 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ ),用于抗高血压有效部位药效学实验 (兔离体心主动脉张力实验)筛选有效部位,得正丁醇部位为最佳有效部位;故采用理化实验和薄层色谱法对正丁醇部位进行化学成分预试,得其主要成分为皂苷类成分。

取正丁醇萃取液 (相当于生药量 792 g),挥干溶剂,加少量无水乙醇溶解到 200 mL,湿法装入 500 g D101 大孔树脂柱;先用蒸馏水冲洗至无色,继用 30%,50%,70% 的乙醇依次洗脱,流速为 0.5 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ,每 50 mL 分段收集洗脱液。用薄层色谱识 (氯仿-甲醇-水 65:35:10 下层为展开剂),合并有皂苷斑点的洗脱液,富集得总皂苷成分溶液,减压浓缩后水浴蒸干,得组方有效部位总皂苷粉末,备用。精

表 1 12 批次药材来源

| 批次 | 来源             | 批次 | 来源          |
|----|----------------|----|-------------|
| 1  | 广州市至信药业有限公司    | 7  | 广州市康美中药饮片公司 |
| 2  | 广东金康药房连锁有限公司   | 8  | 广州国药医药美景分店  |
| 3  | 广州二天堂大药房       | 9  | 北京同仁堂广州市车陂店 |
| 4  | 广州中医药大学大药房养和药店 | 10 | 广州市健康大药房员村店 |
| 5  | 广州采芝林药业连锁店广中医店 | 11 | 广州大参林药店     |
| 6  | 广州清平中药材市场      | 12 | 广州一致药店      |

密称取各总皂苷粉末 10 mg 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀,过 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜,取续滤液,备用。

**2.2 色谱条件** Synergi Fusion-RP  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈(A)-水(B)溶液, 采用梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 20% ~ 35% A; 10 ~ 50 min, 35% ~ 65% A; 50 ~ 60 min, 65% ~ 95% A), 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 203 nm, 柱温 (30  $\pm$  5)  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 方法学考察<sup>[9]</sup>

**2.3.1 90 min 记录图** 取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪进行分析, 乙腈比例达到 95% 后, 保留 30 min, 结果表明: 60 ~ 90 min 以内没有出峰, 提示 60 min 以内各成分的色谱信号峰出现完全。

**2.3.2 精密度试验** 取同一批供试品溶液, 连续进样 6 次。结果各共有峰的相对保留时间 RSD < 2%, 表示仪器精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一批供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 h 按 2.2 项下色谱条件进样分析。结果各共有峰的相对保留时间 RSD < 2%, 相对峰面积 RSD < 3%, 表示供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批次皂苷部位粉末 5 份, 分别制备供试品溶液, 进样分析。结果各共有峰的相对保留时间 RSD < 3%, 相对峰面积 RSD < 3%, 表示重复性良好。

**2.4 样品的检测** 取 12 批次组方药材, 按 2.1 项下条件制备样品溶液。分别取样品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 结果见图 1 ~ 2。12 批次结果显示, 血畅宁组方皂苷部位主要有 19 个共有峰, 平均占总峰面积达 80% 以上, 且各样品共有峰的保留时间 RSD < 2%。其中共有指纹峰 10 号峰保留时间适中, 峰形良好, 其峰值也较大, 故以其为参照峰(S 峰), 计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 2。

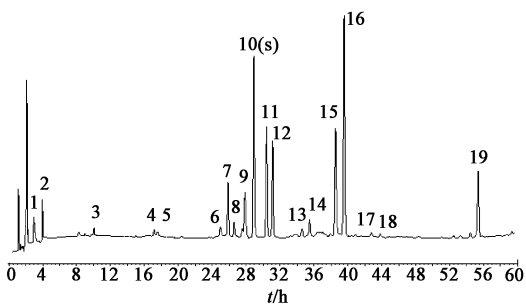


图1 血畅宁样品 HPLC

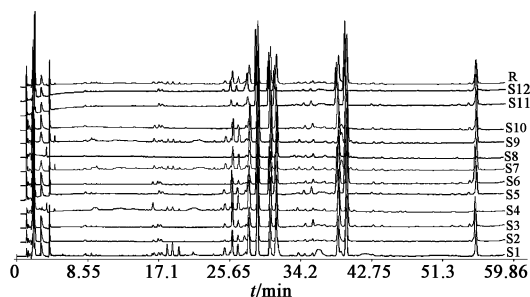


图2 12 批样品的相似度

**2.5 相似度评价** 将所得的 12 批样品的 HPLC 图谱 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》计算相似度。结果 12 个样品相似度分别为 0.92, 0.934, 0.97, 0.775, 0.96, 0.825, 0.965, 0.911, 0.956, 0.959, 0.954, 0.863。其中 3 批的相似度低于 0.9, 说明不同批次的血畅宁组方药材质量存在差异。

### 3 结果

12 批皂苷部位 HPLC 测定结果表明, 不同批次药材指纹图谱整体特征相似, 所标定的 19 个共有峰峰面积相似度在 0.775 ~ 0.97, 第 4, 6, 12 批相似度较低, 未达到 90%, 提示各批次药材之间虽然存在差异, 但其化学成分的种类与含量乃十分接近, 因此其色谱指纹图谱相似度仍然较高。组方总皂苷部位 HPLC 图谱的 19 个共有峰占总峰面积含量在 72.86% ~ 90.25%, 初步拟订为血畅宁组方有效部位总皂苷的指标成分群, 但是因其含量范围跨度大, 表明各批次药材成分含量差异较大, 市售药材质量良莠不齐。

直观上, 将整个 HPLC 谱图分为 I ~ III 3 个区, I 区: 1 ~ 5 号峰, 1, 2 号峰为较强吸收峰, 3 ~ 5 号峰为较弱吸收峰, 各峰值比例为 1 号峰  $\geq$  2 号峰 > 4 号峰  $\geq$  5 号峰 > 3 号峰; II 区: 6 ~ 14 号峰, 为峰值比例较稳定的峰群, 各峰值比例为 10 号峰 > 11 号峰 > 12 号峰  $\geq$  9 号峰 > 7 号峰 > 8 号峰 > 6 号峰 > 13 号峰  $\geq$  14 号峰; III 区: 15 ~ 19 号峰, 其峰值比例较稳定, 各峰值比例为 16 号峰 > 15 号峰  $\geq$  19 号峰 > 17 号峰  $\geq$  18 号峰, 其中 16 号峰为样品峰中的最强峰。

### 4 讨论

曾用不同比例甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水流动相进行梯度洗脱<sup>[10-12]</sup>, 考察流速, 结果流速 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 乙腈-水梯度洗脱, 分离效果较好。同时采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察, 根据 DAD 光谱图, 比较了在 203, 205, 210, 220 nm 的色谱图, 结果在 203 nm 下色谱峰峰数多, 基线比较平稳, 色

表 2 12 批次皂苷部位指纹图谱特征峰相对峰面积

| No. | 相对保留时间 | 相对峰面积 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | RSD<br>/% |
|-----|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
|     |        | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |           |
| 1   | 0.101  | 0.141 | 0.184 | 0.152 | 0.059 | 0.147 | 0.177 | 0.178 | 0.011 | 0.196 | 0.192 | 0.141 | 0.152 | 38.5      |
| 2   | 0.134  | 0.149 | 0.212 | 0.110 | 0.065 | 0.079 | 0.154 | 0.199 | 0.100 | 0.232 | 0.089 | 0.098 | 0.189 | 40.9      |
| 3   | 0.332  | 0.007 | 0.008 | 0.006 | 0.002 | 0.006 | 0.006 | 0.046 | 0.011 | 0.032 | 0.005 | 0.006 | 0.007 | 111.0     |
| 4   | 0.570  | 0.037 | 0.028 | 0.026 | 0.071 | 0.036 | 0.034 | 0.040 | 0.017 | 0.035 | 0.033 | 0.041 | 0.047 | 35.7      |
| 5   | 0.596  | 0.041 | 0.047 | 0.036 | 0.028 | 0.035 | 0.042 | 0.041 | 0.019 | 0.025 | 0.041 | 0.046 | 0.047 | 24.6      |
| 6   | 0.874  | 0.121 | 0.171 | 0.050 | 0.078 | 0.085 | 0.087 | 0.085 | 0.136 | 0.083 | 0.075 | 0.006 | 0.045 | 50.7      |
| 7   | 0.903  | 0.268 | 0.093 | 0.286 | 0.222 | 0.312 | 0.050 | 0.235 | 0.078 | 0.230 | 0.047 | 0.081 | 0.180 | 56.5      |
| 8   | 0.930  | 0.123 | 0.132 | 0.083 | 0.114 | 0.092 | 0.036 | 0.136 | 0.073 | 0.137 | 0.037 | 0.039 | 0.083 | 42.8      |
| 9   | 0.964  | 0.505 | 0.353 | 0.313 | 0.471 | 0.321 | 0.173 | 0.478 | 0.264 | 0.480 | 0.162 | 0.186 | 0.477 | 37.9      |
| 10  | 1.000  | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.000     |
| 11  | 1.052  | 0.493 | 0.486 | 0.595 | 0.516 | 0.587 | 0.756 | 0.520 | 0.998 | 0.524 | 0.732 | 0.739 | 0.489 | 25.4      |
| 12  | 1.077  | 0.720 | 0.333 | 0.541 | 0.318 | 0.541 | 0.578 | 0.365 | 1.189 | 0.367 | 0.566 | 0.573 | 0.347 | 45.2      |
| 13  | 1.184  | 0.053 | 0.027 | 0.063 | 0.036 | 0.060 | 0.043 | 0.043 | 0.067 | 0.043 | 0.050 | 0.046 | 0.035 | 25.6      |
| 14  | 1.226  | 0.033 | 0.036 | 0.099 | 0.029 | 0.112 | 0.060 | 0.050 | 0.141 | 0.047 | 0.066 | 0.088 | 0.043 | 52.9      |
| 15  | 1.334  | 0.399 | 0.549 | 0.844 | 0.482 | 0.750 | 0.839 | 0.390 | 0.847 | 0.399 | 0.736 | 0.744 | 0.472 | 30.4      |
| 16  | 1.369  | 0.598 | 0.829 | 1.402 | 0.630 | 1.388 | 1.374 | 0.616 | 1.555 | 0.615 | 1.338 | 1.385 | 0.836 | 36.9      |
| 17  | 1.483  | 0.011 | 0.020 | 0.025 | 0.015 | 0.024 | 0.028 | 0.018 | 0.024 | 0.018 | 0.028 | 0.027 | 0.019 | 25.7      |
| 18  | 1.518  | 0.011 | 0.019 | 0.024 | 0.012 | 0.018 | 0.022 | 0.026 | 0.043 | 0.028 | 0.023 | 0.024 | 0.017 | 37.6      |
| 19  | 1.908  | 0.351 | 0.595 | 0.442 | 0.020 | 0.431 | 0.618 | 0.392 | 0.051 | 0.388 | 0.618 | 0.640 | 0.625 | 49.6      |

谱信息最为丰富,因此选择该波长作为检测波长。

各批次样品以 19 个共有峰为指标,相对保留时间比较稳定,精密度、稳定性、重复性良好;但是,从上述结果看,4,6,12 批峰值比例与其余各组差异较大,因此,建立组方有效部位总皂苷的指纹图谱时考虑剔除 4,6,12 这 3 批药材,指纹图谱样品仍需仔细筛选和甄别。

初步确定以 9,10,11,12,15,16,19 号等最主要特征峰为组方有效部位总皂苷的质量评价指标;与本指纹图谱共有模式比较,相似度须达到 90% 以上,以此评价组方有效部位总皂苷的内在质量。

[参考文献]

[1] 潘毅,吴丽丽,严灿.活血祛痰法对自发性高血压大鼠心肌线粒体膜的影响[J].广州中医药大学学报,2001,18(1):60.  
 [2] 郑琴,彭常春,沈美兰,等.丹参和三七的配伍研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(2):83.  
 [3] 李建平,严灿,潘毅,等.活血祛痰方药预防自发性高血压大鼠心肌纤维化实验研究[J].中医杂志,2000,41(5):301.

[4] 谢仲德,郭建生.脑得生的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):279.  
 [5] 李剑,潘毅,严灿,等.滋补肝肾、活血祛痰方药对原发性高血压大鼠左心室肥厚的影响[J].山西中医,2003,19(2):54.  
 [6] 杨佳,秦彩玲.复方丹参方及丹参、三七对血小板功能影响的研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(2):59.  
 [7] 高增平,陆蕴如,王宝华.三七药材指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(1):11.  
 [8] 黎琼红,张国刚.三七药材的指纹图谱[J].沈阳药科大学学报,2006,23(4):229.  
 [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2000.  
 [10] 潘馨,郭素华.三七指纹图谱的研究[J].海峡药学,2002,14(5):47.  
 [11] 刘华钢,赖茂祥,梁秋云,等.三七含量测定方法的研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(5):14.  
 [12] 毕晓黎,胥爱丽,李养学.三七配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):54.

[责任编辑 邹晓翠]