

黄芪饮片-标准汤剂-配方颗粒 HPLC 指纹图谱相关性研究

孙岚萍¹, 顾志荣^{2*}, 马转霞¹, 马天翔¹, 吕鑫¹, 许爱霞², 葛斌^{2*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省人民医院 药剂科, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 建立黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 对其相关性进行评价。方法 采用 HPLC 法测定黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷含量, 以 HPLC 特征图谱为对照, 建立三者指纹图谱共有模式, 并进行相关性评价。结果 20 批黄芪饮片中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷平均质量分数分别为 0.097、0.482、0.142、0.237 mg/g; 标准汤剂中这 4 种指标成分的平均质量分数分别为 0.116、0.912、0.214、0.434 mg/g; 配方颗粒中这 4 种指标成分的平均质量分数分别为 0.088、0.623、0.160、0.289 mg/g, 20 批黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒指纹图谱均呈现 6 个共有特征峰, 黄芪配方颗粒与标准汤剂对照指纹图谱相似度为 0.980, 说明两者的成分差异很小。结论 建立黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒的指纹图谱, 全面反映黄芪饮片-标准汤剂-配方颗粒的多组分情况, 为黄芪配方颗粒的鉴定及质量控制提供参考价值。

关键词: 黄芪饮片; 配方颗粒; 标准汤剂; HPLC; 指纹图谱; 相关性; 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花苷; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2781-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.020

Correlation study on HPLC fingerprint chromatograms of *Astragali Radix* decoction pieces-standard decoction-dispensing granules

SUN Lan-ping¹, GU Zhi-rong², MA Zhuan-xia¹, MA Tian-xiang¹, LV Xin¹, XU Ai-xia², GE Bin²

1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint spectrum of for decoction pieces-, standard decoction- and dispensing granules of *Astragali Radix*, and evaluate the correlation among them. **Methods** HPLC method was used to determine the content of 7-hydroxy- 4'-methoxy isoflavone, calycosin-7-glucoside, calycosin, and ononin in decoction pieces-, standard decoction- and dispensing granules of *Astragali Radix*. The common pattern of the three fingerprints was established and the correlation was evaluated through the control fingerprint spectrum. **Results** The average contents of 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone, calycosin-7-glucoside, calycosin, and ononin in 20 batches of decoction pieces were 0.097, 0.482, 0.142, and 0.237 mg/g, respectively; The average content of these four index components in the standard decoction were 0.116, 0.912, 0.214, and 0.434 mg/g, respectively; The average content of these four index components in the dispensing granules were 0.088, 0.623, 0.160, and 0.289 mg/g, respectively. There were six common peaks in all fingerprint spectra of 20 batches of decoction pieces-, standard decoction- and dispensing granules of *Astragali Radix*. The similarity between dispensing granules and standard decoction was 0.980, indicating that the components difference between them was very small. **Conclusion** The study establishes an HPLC fingerprint spectrum, and it which reflects the whole picture of multi-component of decoction pieces-, standard decoction- and dispensing granules of *Astragali Radix*. It provides reference value for the identification and quality control of *Astragalus* dispensing granules of *Astragalus Radix*.

收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 甘肃省中医药管理局科研项目 (GZK-2019-41); 甘肃省人民医院研发攻关项目 (18GSSY2-3)

作者简介: 孙岚萍 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药制药工艺研究。Tel: 18419379106 E-mail: slpfyc2014@163.com

*通信作者 顾志荣 (1988—), 男, 主管药师, 从事中药质量控制研究。Tel: (0931)8281933 E-mail: guzr8817@163.com

葛斌 (1965—), 男, 主任药师, 从事中药制药工艺研究。Tel: (0931)8281745 E-mail: gjy0630@163.com

Key words: *Astragali Radix* decoction pieces; dispensing granules; standard decoction; HPLC; fingerprint; correlation; 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone; calycosin-7-glucoside; calycosin; ononin; quality control

黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1], 为常用补气药^[2], 味甘, 性微温, 归肺、脾经。具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌等功效^[3-4], 临床用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、便血崩漏等^[5]疾病的治疗。黄芪的化学成分十分复杂^[6], 研究表明黄芪化学成分主要有多糖、皂苷类、黄酮类等^[7], 具有多种药理作用, 如增强免疫功能、抗氧化、降压、保肝等^[8-13]。中药配方颗粒是以符合炮制规范的单味饮片为原料, 经水提、浓缩、干燥、制粒工艺制备而成^[14]。具有免煎煮、方便携带等优点, 已成为新兴产业, 但配方颗粒至今仍无统一的药品标准, 各厂家产品质量亦良莠不齐, 故加强配方颗粒生产过程管控, 统一质量标准显得尤为重要^[15]。目前, 关于黄芪的 HPLC 指纹图谱研究较多, 但都是单一研究药材、提取物、配方颗粒的指纹图谱^[16-17], 没有就黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒 HPLC 指纹图谱相关性做进一步研究。黄芪饮片经标准汤剂最终制成黄芪配方颗粒, 整个过程其化学成分如何进行传递, 至今尚无相关研究报道。本研究根据 2016 年 8 月国家药典委员会颁布的《中药配方颗粒管理办法(征求意见稿)》的原则, 制备黄芪配方颗粒, 利用 HPLC 法对 20 批黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒进行多指标含量测定并建立了指纹图谱, 比较了三者主要化学成分的差异, 不仅对配方颗粒的质量具有很好的可控性, 而且能表明配方颗粒制备工艺的稳定性, 为黄芪配方颗粒替代传统汤剂的可行性及临床研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-16 型高效液相色谱仪, 岛津仪器有限公司; AL204 型万分之一电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; BSA4202S-CW 型百万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; SB25-12DTD 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DD-5M 型低速大容量离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; DZF-6090 型真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; YC-1000 实验室喷雾制粒包衣机, 上海

雅程仪器设备有限公司; FDU-2110 冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 材料

7-羟基-4'-甲氧基异黄酮(批号 CHB151026, 质量分数≥98%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 CHB171102, 质量分数≥98%)、毛蕊异黄酮(批号 CHB171102, 质量分数≥98%)、芒柄花苷(批号 CHB171026, 质量分数≥98%)对照品均购于成都克洛玛生物科技有限公司; 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 天津大茂化学试剂厂; 超纯水, 甘肃省人民医院中药制剂室自制。20 批黄芪样品均经甘肃省人民医院药剂科郑修丽副主任中药师鉴定, 为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 购于甘肃陇脉药材有限公司, 产地均为甘肃省定西市安定区国家农业科技园区, 具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 WondaSil C₁₈-WR (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.3%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 15%~20%乙腈; 15~25 min, 20%~25%乙腈; 25~30 min, 25%乙腈; 30~40 min, 25%~37%乙腈; 40~50 min, 37%乙腈; 50~55 min, 37%~46%乙腈; 55~60 min, 46%~100%乙腈; 检测波长 254 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL; 柱温 35 °C。理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算不低于 3 000。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称定 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷对照品 1.35、10.0、1.58、3.25 mg, 加甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中, 得质量浓度分别为 0.054、0.400、0.063、0.140 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备^[18-19] 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》的原则制备同批号黄芪的标准汤剂, 编号为 B1~B20, 取黄芪饮片 100 g, 精密称定, 加 9 倍量水浸泡 30 min, 武火煮沸, 文火保持微沸 30 min, 趁热滤过; 药渣加 7 倍水煎煮, 武火煮沸, 文火保持微沸 30 min, 趁热滤过, 合并 2 次煎液, 减压浓缩, 冷冻

表 1 样品信息
Table 1 Sample information

编号	批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		7-羟基-4'-甲 氧基异黄酮	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	毛蕊异 黄酮	芒柄 花苷
S1	180601	0.090	0.473	0.122	0.264
S2	180602	0.097	0.449	0.134	0.258
S3	180603	0.095	0.485	0.164	0.216
S4	180604	0.096	0.437	0.139	0.247
S5	180605	0.095	0.492	0.146	0.224
S6	180606	0.108	0.511	0.173	0.235
S7	180501	0.094	0.472	0.128	0.235
S8	180502	0.096	0.512	0.148	0.214
S9	180503	0.093	0.507	0.149	0.219
S10	180504	0.102	0.489	0.130	0.241
S11	180505	0.105	0.446	0.133	0.257
S12	180401	0.097	0.464	0.145	0.241
S13	180402	0.097	0.458	0.133	0.223
S14	180301	0.094	0.451	0.129	0.242
S15	180302	0.096	0.477	0.131	0.236
S16	180303	0.097	0.514	0.165	0.226
S17	180304	0.106	0.478	0.148	0.241
S18	180902	0.098	0.506	0.136	0.238
S19	180903	0.094	0.497	0.126	0.246
S20	180904	0.095	0.528	0.154	0.232
平均值		0.097	0.482	0.142	0.237
RSD/%		4.717	5.418	9.983	5.838

干燥（每克标准汤剂相当于 2.5 g 饮片）。配方颗粒的制备：将上述所得煎液减压浓缩，喷雾干燥，制备同批号的配方颗粒（每克配方颗粒相当于 2 g 饮片），编号为 C1~C20。

分别称取 20 批黄芪饮片粗粉（过四号筛）2.0 g，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 10 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）60 min，放冷，用甲醇补足减失的质量，离心，定容于 25 mL 量瓶，以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得黄芪饮片供试品溶液；分别称取 20 批黄芪标准汤剂 1.0 g，按黄芪饮片制备方法制备标准汤剂供试品溶液；分别称取 20 批黄芪配方颗粒 1.0 g，置具塞锥形瓶中，按黄芪饮片制备方法制备配方颗粒供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 分别至于 10 mL 量瓶中，以甲醇定容至刻度，

摇匀，得系列对照品溶液。按“2.1.1”项色谱条件下测定，以混合对照品质量浓度为横坐标（X）、峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程，结果分别为 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮 $Y=4.242 \times 10^7 X-3.028 \times 10^4$ ， $r=0.999\ 7$ ，线性范围 0.5~16.2 μg/mL；毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=2.844 \times 10^7 X-1.505 \times 10^5$ ， $r=0.999\ 5$ ，线性范围 4.0~120.0 μg/mL；毛蕊异黄酮 $Y=4.760 \times 10^7 X-3.978 \times 10^4$ ， $r=0.999\ 5$ ，线性范围 0.6~18.9 μg/mL；芒柄花苷 $Y=3.639 \times 10^7 X-6.233 \times 10^4$ ， $r=0.999\ 6$ ，线性范围 1.3~39.0 μg/mL。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.3”项下同一供试品（编号 C1）溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定结果显示 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷峰面积的 RSD 分别为 1.76%、1.21%、1.48%、1.57%，各共有峰峰面积的 RSD 均小于 2%，表明仪器的精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批次黄芪配方颗粒（C1），按“2.1.3”项下方法分别平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，同法测定饮片（S1）和标准汤剂（B1）的供试品溶液。结果发现黄芪配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷质量分数的 RSD 分别为 2.67%、1.98%、2.17%、2.30%；饮片中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷质量分数的 RSD 分别 2.19%、1.22%、1.26%、1.51%；标准汤剂中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷质量分数的 RSD 分别 2.93%、2.12%、2.28%、2.63%。各成分质量分数的 RSD 均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下同一供试品（编号 C1）溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，同法测定饮片（S1）和标准汤剂（B1）的供试品溶液。结果发现黄芪配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷峰面积的 RSD 分别为 2.09%、1.93%、1.56%、1.95%；饮片中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷峰面积的 RSD 分别为 2.56%、2.07%、2.18%、2.67%；标准汤剂中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷

峰面积的 RSD 分别为 1.95%、1.17%、1.38%、1.64%。各共有峰峰面积的 RSD 均小于 3%，表明黄芪饮片、标准汤剂和配方颗粒溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取黄芪配方颗粒（编号 C1）样品 6 份，每份约 0.5 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷对照品适量，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率，同法测定并计算饮片（S1）和标准汤剂（B1）加样回收率。结果显示饮片中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷平均加样回收率分别为 99.78%、100.08%、100.59%、99.65%，RSD 为 1.07%、1.14%、1.21%、1.04%；标准汤剂中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒

柄花苷平均回收率分别为 100.91%、98.97%、99.56%、100.05%，RSD 为 1.42%、1.03%、1.17%、1.34%；配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷平均回收率分别为 100.09%、99.23%、100.17%、100.26%，RSD 为 1.32%、1.09%、1.38%、1.76%；说明该方法测定黄芪饮片、标准汤剂和配方颗粒的准确性良好。

2.1.9 样品含量测定 按“2.1.1”项下色谱条件进样，测定黄芪饮片、标准汤剂和配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷的含量，同时计算 20 批饮片至标准汤剂、饮片至配方颗粒中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷的平均转移率（转移率=制剂中指标成分含量/饮片中指标成分含量），结果见表 2，色谱图见图 1。黄芪标准

表 2 20 批黄芪标准汤剂、配方颗粒含量测定及转移率结果

Table 2 Content determination and transfer rate results of 20 batches of standard decoction- and dispensing granules of *Astragali Radix* content determination and transfer rate results

编号	标准汤剂							
	7-羟基-4'-甲氧基 异黄酮/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	毛蕊异黄酮葡萄糖 苷/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	毛蕊异黄酮/ (mg·g ⁻¹)	转移率/%	芒柄花苷/ (mg·g ⁻¹)	转移率/%
B1	0.125	55.56	0.967	81.78	0.204	66.89	0.403	61.06
B2	0.108	44.54	0.926	82.49	0.211	62.99	0.459	71.16
B3	0.108	45.47	0.883	72.82	0.215	52.44	0.416	77.04
B4	0.118	49.58	0.938	85.86	0.219	63.02	0.446	72.23
B5	0.110	46.32	0.876	71.22	0.217	59.45	0.409	73.04
B6	0.123	45.56	0.944	73.89	0.234	54.10	0.456	77.62
B7	0.108	45.96	0.985	83.47	0.215	67.19	0.456	77.62
B8	0.116	48.33	0.907	70.86	0.223	60.27	0.412	77.01
B9	0.111	47.74	0.935	73.77	0.207	55.57	0.424	77.44
B10	0.115	45.10	0.930	76.07	0.197	60.62	0.476	79.00
B11	0.112	42.67	0.892	80.00	0.222	66.77	0.426	66.30
B12	0.101	41.65	0.897	77.33	0.193	53.24	0.455	75.52
B13	0.113	47.01	0.883	77.12	0.214	64.36	0.426	76.41
B14	0.127	54.04	0.841	74.59	0.195	60.47	0.424	70.08
B15	0.124	51.67	0.917	76.90	0.217	66.26	0.437	73.76
B16	0.115	47.42	0.896	69.73	0.226	54.79	0.414	73.27
B17	0.117	44.15	0.871	72.89	0.242	65.41	0.429	71.20
B18	0.123	50.20	0.918	72.57	0.207	60.88	0.420	70.59
B19	0.128	54.47	0.887	71.39	0.210	66.67	0.450	73.17
B20	0.113	47.58	0.951	72.05	0.220	57.14	0.448	77.24
平均值	0.116	47.75	0.912	75.84	0.214	60.93	0.434	73.54
RSD/%	6.27	8.04	3.89	6.17	5.73	8.18	4.65	6.01

续表 2

编号	配方颗粒							
	7-羟基-4'-甲氧基 异黄酮/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	毛蕊异黄酮葡萄糖 苷/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	毛蕊异黄酮/ (mg·g ⁻¹)	转移率/%	芒柄花苷/ (mg·g ⁻¹)	转移率/%
C1	0.081	45.00	0.575	60.78	0.139	51.33	0.308	58.33
C2	0.091	46.91	0.607	67.59	0.146	50.80	0.304	58.91
C3	0.089	46.84	0.609	62.78	0.176	53.18	0.283	65.51
C4	0.085	44.27	0.603	68.99	0.152	49.91	0.297	60.12
C5	0.094	49.47	0.630	64.02	0.169	48.63	0.294	65.63
C6	0.091	42.13	0.623	60.96	0.179	59.84	0.289	61.49
C7	0.090	47.87	0.605	64.09	0.142	50.18	0.287	61.06
C8	0.092	47.92	0.632	61.72	0.178	47.32	0.276	64.49
C9	0.091	48.92	0.647	63.81	0.171	56.34	0.283	64.61
C10	0.089	43.63	0.621	63.50	0.151	53.25	0.289	59.96
C11	0.090	42.86	0.625	70.07	0.160	49.31	0.292	56.81
C12	0.084	43.30	0.600	64.66	0.155	55.43	0.302	62.66
C13	0.084	43.30	0.625	68.23	0.152	58.78	0.288	64.57
C14	0.083	44.15	0.568	62.97	0.151	54.87	0.279	57.64
C15	0.090	46.88	0.638	66.88	0.146	50.35	0.281	59.28
C16	0.090	46.39	0.680	66.15	0.176	49.67	0.286	63.27
C17	0.089	41.98	0.625	65.38	0.156	54.21	0.290	60.17
C18	0.089	45.41	0.661	65.32	0.154	52.19	0.281	59.03
C19	0.083	44.15	0.607	61.07	0.150	49.86	0.287	58.33
C20	0.093	48.95	0.678	64.20	0.187	51.20	0.283	60.99
平均值	0.088	45.52	0.623	64.65	0.160	52.33	0.289	61.14
RSD/%	4.19	5.20	4.65	4.15	8.80	6.43	2.95	4.51

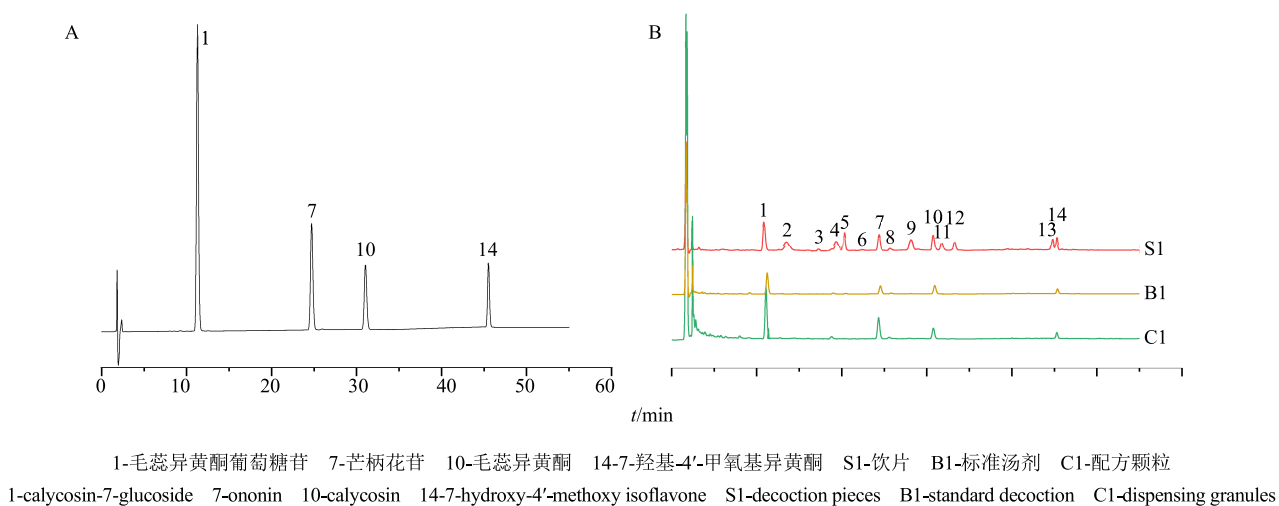


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A) and representative sample (B)

汤剂和配方颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数均 $\geq 0.020\%$, 符合《中国药典》2015 年版一部规定,

20 批标准汤剂中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷平均转移率

分别为 47.75%、75.84%、60.93%、73.54%，配方颗粒中 4 种指标性成分平均转移率分别为 45.52%、64.65%、52.33%、61.14%，表明本实验的制备工艺成熟、稳定。

2.2 黄芪饮片-标准汤剂-配方颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取“2.1.2”项下混合对照品溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 按“2.1.3”项供试品溶液制备方法制得黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒供试品溶液。

2.2.3 精密度试验 取“2.2.2”项下同一供试品（编号 C1）溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录各峰面积。测得各共有峰峰面积的 RSD 均在 2.0% 以内，表明仪器的精密度良好。

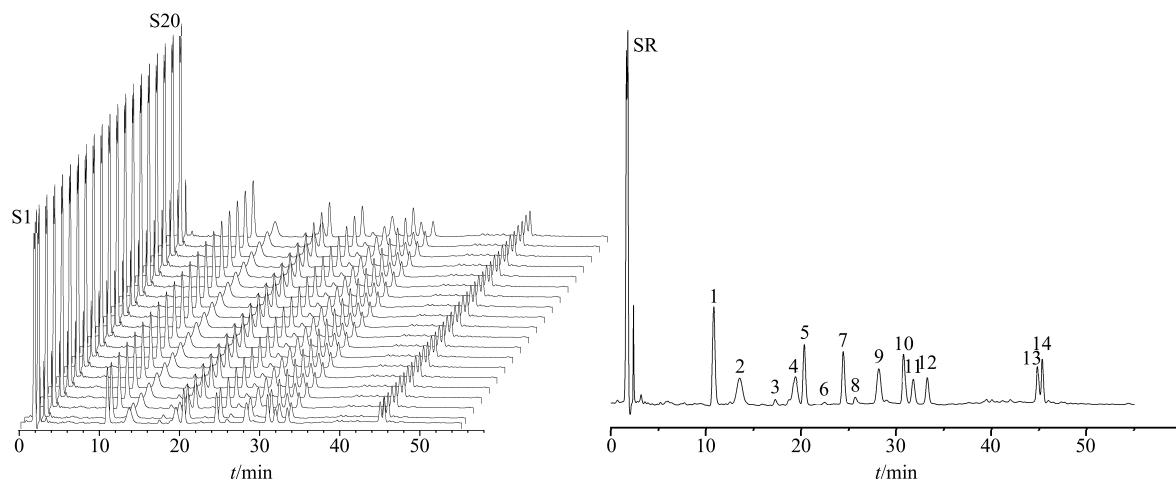


图 2 20 批黄芪饮片 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (SR)

Fig. 2 HPLC fingerprint spectra of 20 batches of decoction pieces of *Astragali Radix* and its reference fingerprint spectrum (SR)

2.2.7 相关性分析 将黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒、混合对照品 HPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版），经比较分析后确定黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒共有 6 个共有峰，黄芪配方颗粒的 HPLC 指纹图谱与标准汤剂基本一致。通过与对照品紫外吸收及保留时间进行对比，确认峰 1 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，峰 7 为芒柄花苷，峰 10 为毛蕊异黄酮，峰 14 为 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮。见图 5。

黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱相似度结果见表 3。从图 5 及表 3 可知，黄芪配方颗粒的 6 个共有特征峰在饮片、标准汤剂中

2.2.4 重复性试验 取同一批次黄芪配方颗粒（编号 C1），按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。测得各含测结果的 RSD 均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取“2.2.2”项下同一供试品（编号 C1）溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。测得各共有峰峰面积的 RSD 均小于 3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 样品的测定 按“2.1.1”项下色谱条件，分别测定 20 批黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 图谱，黄芪饮片共有 14 个色谱峰，标准汤剂有 7 个色谱峰，配方颗粒中有 6 个色谱峰，峰 2、3、6、9、11~13 在标准汤剂和配方颗粒中均未检测到，见图 2~4。

均有显示，黄芪配方颗粒与标准汤剂对照指纹图谱相似度为 0.980，说明两者的成分差异很小，为配方颗粒代替传统汤剂及黄芪颗粒生产全过程进行控制提供了可行性参考。

3 讨论

本研究综合考察了乙腈-水、乙腈-0.3%甲酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液几种流动相系统，结果以乙腈-0.3%甲酸水溶液系统分离效果比较好，在该条件下，各色谱峰分离度良好，保留时间适中；考察了不同波长下（254、280、300 nm）的指纹图谱，结果发现检测波长为 254 nm 时，基线平稳，各峰形较好。

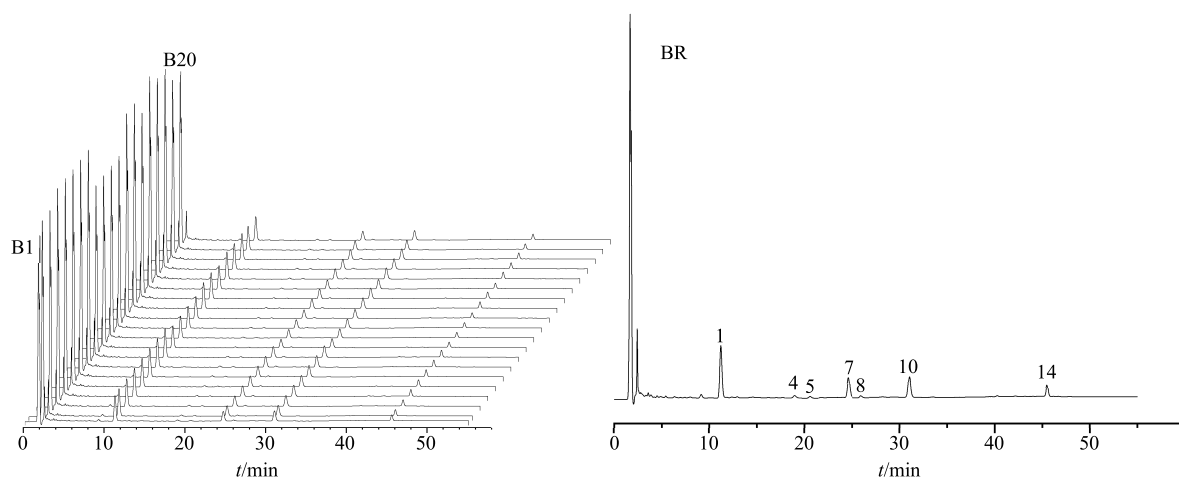


图 3 20 批黄芪标准汤剂指纹图谱及对照指纹图谱 (BR)

Fig. 3 HPLC fingerprint spectra of 20 batches of standard decoction of *Astragali Radix* and its reference fingerprint spectrum (BR)

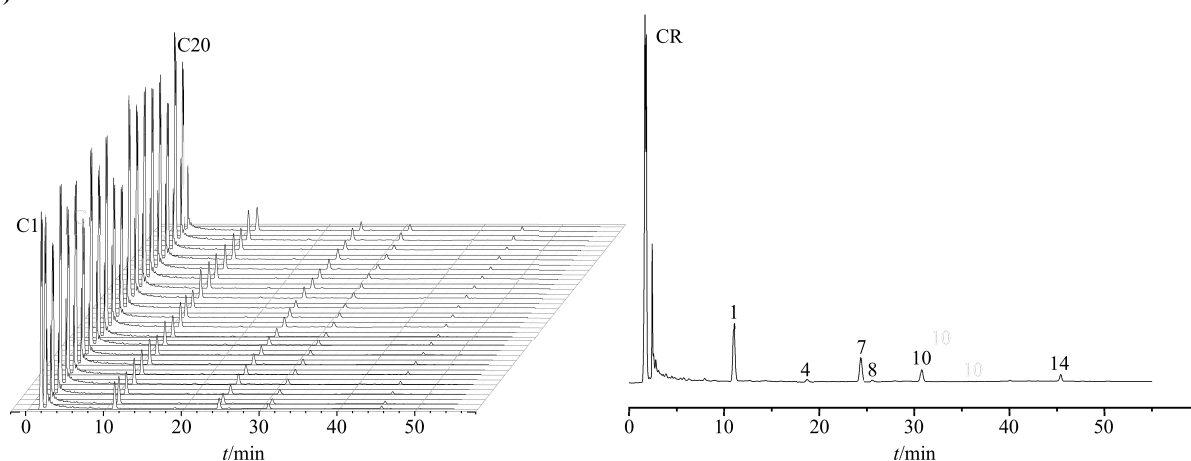
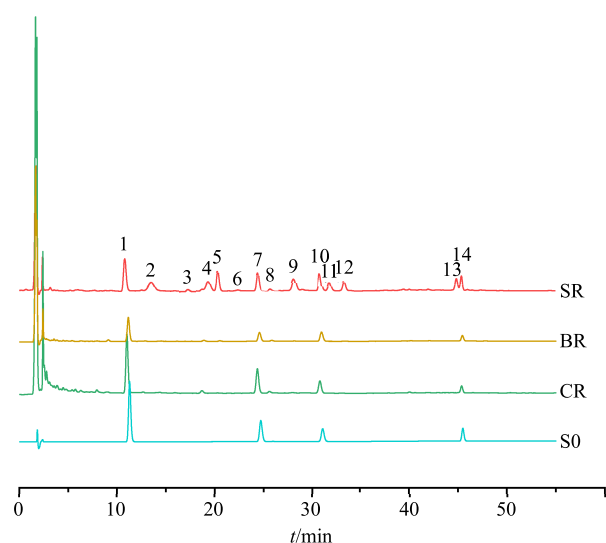


图 4 20 批黄芪配方颗粒指纹图谱及对照指纹图谱 (CR)

Fig. 4 HPLC fingerprint spectra of 20 batches of dispensing granules of *Astragali Radix* and its reference fingerprint spectrum (CR)

研究表明,黄芪甲苷、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷等是黄芪药材中已知主要活性成分^[20],《中国药典》2015 年版中以 HPLC-ELSD 和 HPLC-UV 分别检测黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,评价其质量的优劣,黄芪甲苷为皂苷类成分,基本无紫外吸收,采用通用型的 ELSD 检测,但本实验室现阶段实验条件缺乏,未对黄芪甲苷进行检测,后期将通过联合 ELSD 检测进行完善。本研究采用 HPLC 对黄芪饮片、标准汤剂和配方颗粒均进行了共同指标成分含量测定和特征图谱研究。结果发现,黄芪饮片-标准汤剂-配方颗粒中指标性成分含量差异较大,标准汤剂、配方颗粒的制备过程有统一的标准化操作,20 批标准汤剂中 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、毛蕊异

黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷平均转移率分别为 47.75%、75.84%、60.93%、73.54%,20 批配方颗粒中 4 种指标性成分的平均转移率分别为 45.52%、64.65%、52.33%、61.14%,表明本实验的制备工艺成熟、稳定;在特征图谱上,饮片和标准汤剂、配方颗粒图谱差异较大,饮片对照图谱与标准汤剂对照图谱、配方颗粒对照图谱相似度分别为 0.558、0.532,这可能与制备标准汤剂和配方颗粒过程中煎煮、浓缩使黄芪中某些化学成分损失、转化、相互作用等有关。标准汤剂对照图谱、配方颗粒对照图谱相似度为 0.980,说明黄芪标准汤剂和配方颗粒的指纹图谱非常相似,两者的成分差异很小,黄芪配方颗粒可以代替黄芪饮片的煎煮口服液体,为配方颗粒代替传统汤剂提供了可行性参考。



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 7-芒柄花苷 10-毛蕊异黄酮 14-7-羟基-4'-甲氧基异黄酮 S0-混合对照品 SR-饮片 BR-标准汤剂 CR-配方颗粒
2-calycosin-7-glucoside 7-ononin 10-calycosin 14-7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone S0-reference substance SR-decoction pieces BR-standard decoction CR-dispensing granules

图 5 混合对照品、黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 对照指纹图谱比较

Fig. 5 Comparison on HPLC reference fingerprint spectra of mix control, decoction pieces of *Astragali Radix* standard decoction, and dispensing granules

表 3 黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒相似度结果

Table 3 Similarity of HPLC fingerprint spectra of decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of *Astragali Radix*

样品	相似度		
	饮片 SR	标准汤剂 BR	配方颗粒 CR
饮片 SR	1.000		
标准汤剂 BR	0.558	1.000	
配方颗粒 CR	0.532	0.908	1.000

汤剂是我国医药史上应用最早、最广泛的剂型，随着中药剂型现代化的发展，又增加了配方颗粒剂、中药破壁饮片等剂型^[21]，其中中药配方颗粒很好地保留了传统汤剂中的主要成分，又避免了汤剂煎煮费时、不易携带等缺点。本实验通过对黄芪饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性研究，阐明了黄芪配方颗粒与饮片、标准汤剂在化学成分上的相关性，克服了单一成分信息量不全的缺点，能较全面地反映黄芪配方颗粒的内在质量，为黄芪配方颗粒替代传统汤剂提供了研究基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘洋, 杜婧, 沈颜红. 10 种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 231-243.
- [3] 顾志荣, 葛斌, 许爱霞, 等. 基于本草考证的黄芪功效主治及用药禁忌挖掘 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2524-2530.
- [4] 刘珂, 邱炳勋, 邹利, 等. 黄芪及其有效成分对内皮细胞及其连接的保护作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3912-3917.
- [5] 付娟, 杨世海, 黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中 6 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(11): 916-919.
- [6] 郭立忠. 中药黄芪化学成份与药理活性研究分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(31): 119-121.
- [7] 刘德利, 包华音, 刘杨, 等. 近 5 年黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2014, 16(1): 68-70.
- [8] Nguyen L T H, Nguyen U T, Kim Y H, et al. *Astragali Radix* and its compound formononetin ameliorate diesel particulate matter-induced skin barrier disruption by regulation of keratinocyte proliferation and apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 132-141.
- [9] Zhang W N, Li A P, Qi Y S, et al. Metabolomics coupled with system pharmacology reveal the protective effect of total flavonoids of *Astragali Radix* against adriamycin-induced rat nephropathy model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158: 128-136.
- [10] Luan Z Q, Zhao P L, Cao W F. Research status of *Astragali Radix* on nerve cells and nerve system diseases [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 271-275.
- [11] 舍雅莉, 刘永琦, 孙少伯, 等. 黄芪多糖对甲醛染毒人骨髓间充质干细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2928-2933.
- [12] 朱世杰, 张明阳, 秦源, 等. 黄芪多糖对蛛网膜下腔出血大鼠神经元凋亡因子及脑积水的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1509-1514.
- [13] 王敏. 黄芪注射液联合螺内酯治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(4): 898-902.
- [14] 冀艳花, 高晗, 常云凤, 等. 白鲜皮饮片-标准汤剂-配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 84-87.
- [15] 黄博, 姚力, 林燕翔, 等. 基于指纹图谱及多指标

- 成分定量分析的肿节风配方颗粒质量标准研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3058-3064.
- [16] 张 羽, 李云霞, 郑艳春, 等. 高效液相色谱法同时测定黄芪精颗粒中 3 种黄酮类成分及其指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(4): 561-566.
- [17] 牟佳佳, 陈 芳, 陈党辉, 等. 黄芪中 5 种黄酮类成分的含量测定及其指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(5): 900-906.
- [18] 方雯雯, 成守玲, 陈培胜, 等. 白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3211-3214.
- [19] 朱 敏, 魏惠珍, 金浩鑫, 等. 金银花配方颗粒、标准汤剂含量测定及指纹图谱研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 113-118.
- [20] 张 瑞, 曹庆伟, 李 科, 等. 黄芪药材等级与化学成分和抗疲劳药效的相关性分析 [J]. 药学学报, 2019, 54(6): 1092-1100.
- [21] 施之琪, 孟 鹤, 陈桂生, 等. 基于标准汤剂的酒女贞子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1882-1886.