

# 黄芪百合颗粒 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究

王继龙<sup>1,2</sup>, 魏舒畅<sup>1,2</sup>, 陈方圆<sup>3</sup>, 刘永琦<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃中医药大学 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室;

<sup>2</sup>敦煌医学与转化教育部重点实验室; <sup>3</sup>甘肃卫生职业学院, 兰州 730000

**摘要:**建立黄芪百合颗粒(HBG)的 HPLC 指纹图谱,并进行多指标成分定量测定,为其质量评价提供依据。采用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以 0.2% 甲酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 5%→10% B; 10~35 min, 10%→30% B; 35~40 min, 30% B; 40~50 min, 30%→60% B; 50~60 min, 60%→5% B),流速 1.0 mL/min, 250、260、290、330 nm 多波长切换,柱温 30 °C,建立了 HBG 的指纹图谱,共确定 28 个共有峰,10 批 HBG 指纹图谱中样品间相似度均大于 0.99。通过与对照品比较指认出其中 6 个共有峰并分别进行了定量分析,6 个共有峰分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(15 号峰)、橙皮苷(18 号峰)、芒柄花苷(21 号峰)、毛蕊异黄酮(23 号峰)、芒柄花素(25 号峰)、川陈皮素(26 号峰)。所建立的 HPLC 指纹图谱和含量测定分析方法可用于 HBG 的质量评价。

**关键词:**黄芪百合颗粒;指纹图谱;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;橙皮苷;芒柄花苷;毛蕊异黄酮;芒柄花素;川陈皮素

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.020

## Fingerprint and Multi-components Determination of Huangqi Baihe Granules by HPLC

WANG Ji-long<sup>1,2</sup>, WEI Shu-chang<sup>1,2</sup>, CHEN Fang-yuan<sup>3</sup>, LIU Yong-qi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education; <sup>3</sup>Gansu Health Vocational College, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** To establish the HPLC fingerprint and determine six components of Huangqi Baihe Granules (HBG), so as to provide a scientific basis for the quality evaluation. The analysis was performed on a Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of 0.2% formic acid (A) and acetonitrile (B) with gradient elution (0-10 min, 5%→10% B; 10-35 min, 10%→30% B; 35-40 min, 30% B; 40-50 min, 30%→60% B; 50-60 min, 60%→5% B) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 °C and the detection wavelengths were set at 250, 260, 290, and 330 nm. The fingerprint chromatography included 28 mutual peaks, and the similar degrees of 10 batches of HBG were above 0.99. Six components were identified and determined by comparison with the reference substances. They were calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside (peak 15), hesperidin (peak 18), ononin (peak 21), calycosin (peak 23), formononetin (peak 25) and nobiletin (peak 26) respectively. The established method could be used for the quality control of HBG.

**Key words:** Huangqi Baihe Granules; fingerprint; calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside; hesperidin; ononin; calycosin; formononetin; nobiletin

黄芪百合颗粒(Huangqi Baihe Granules, HBG)是在民间验方黄芪百合粥基础上化裁并结合现代制剂技术研制而成<sup>[1-3]</sup>,方中含黄芪、百合、红景天、黄

精、枸杞子、陈皮 6 种药味,共奏益气活血、健脾润肺、滋阴补肾之功,临床定位为用于治疗由高寒、低氧、干燥等因素诱发的以气虚兼夹血瘀、阴津不足为基本证候类型的急、慢性高原病及养生保健,研究表明 HBG 对高原低氧模型小鼠肠黏膜屏障、脑损伤具有良好的保护作用及抗高原肺水肿的作用<sup>[4-7]</sup>。

该复方颗粒剂目前尚处研发阶段,但其制备工

收稿日期:2018-02-26 接受日期:2018-06-22

基金项目:甘肃省科技支撑计划(120FKCA169);陇原青年创新人才扶持计划(2014-93-72);甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室开放基金(ZYFYZH-KJ-2015-001)

\*通信作者 Tel:86-931-8765600; E-mail:liuyongqi73@163.com



续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 Peak No.	相对峰面积 Relative areas							相对保留时间 Relative retention time						
	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
6	0.590	0.599	0.604	0.613	0.610	0.607	1.42	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	0.04
7	0.093	0.092	0.090	0.088	0.087	0.087	2.88	0.428	0.427	0.427	0.427	0.427	0.427	0.05
8	0.516	0.521	0.521	0.521	0.522	0.525	0.54	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.04
9	0.634	0.638	0.639	0.641	0.642	0.643	0.49	0.518	0.518	0.519	0.518	0.518	0.518	0.06
10	0.729	0.712	0.707	0.696	0.692	0.688	2.18	0.546	0.546	0.546	0.546	0.546	0.546	0.02
11	0.410	0.404	0.405	0.407	0.402	0.398	0.99	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.03
12	0.266	0.267	0.269	0.271	0.269	0.268	0.55	0.594	0.594	0.594	0.594	0.594	0.594	0.05
13	0.133	0.131	0.131	0.133	0.132	0.129	1.12	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.04
14	0.663	0.665	0.666	0.669	0.668	0.668	0.34	0.624	0.625	0.625	0.625	0.625	0.624	0.05
15	0.932	0.934	0.934	0.938	0.939	0.937	0.31	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.02
16	0.297	0.300	0.298	0.298	0.303	0.303	0.86	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.03
17	0.753	0.757	0.770	0.777	0.760	0.762	1.17	0.743	0.742	0.742	0.742	0.742	0.742	0.04
18	2.117	2.130	2.132	2.138	2.143	2.144	0.48	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.03
19	0.455	0.450	0.450	0.454	0.451	0.445	0.80	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.02
20	0.173	0.171	0.172	0.173	0.171	0.170	0.76	0.825	0.825	0.824	0.825	0.825	0.824	0.02
21	0.394	0.385	0.382	0.393	0.388	0.370	2.28	0.883	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882	0.02
22	0.471	0.476	0.477	0.477	0.478	0.481	0.71	0.974	0.974	0.974	0.974	0.974	0.974	0.01
23	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
24	0.183	0.180	0.180	0.177	0.174	0.176	1.76	1.127	1.127	1.128	1.127	1.128	1.127	0.03
25	0.425	0.426	0.432	0.442	0.434	0.426	1.47	1.267	1.267	1.267	1.267	1.267	1.268	0.05
26	0.175	0.176	0.176	0.176	0.176	0.177	0.42	1.336	1.337	1.337	1.337	1.337	1.339	0.06
27	0.220	0.221	0.221	0.222	0.222	0.222	0.33	1.367	1.368	1.368	1.368	1.368	1.369	0.06
28	0.079	0.084	0.078	0.078	0.079	0.079	2.67	1.386	1.387	1.387	1.387	1.387	1.388	0.05

## 2.2.3 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于制备后 0、6、12、18、24、36 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果各共有峰

的相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,表明样品在 36 h 内稳定(见表 2)。

表 2 稳定性试验结果

Table 2 Results of stability test

峰号 Peak No.	相对峰面积 Relative areas							相对保留时间 Relative retention time						
	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
1	1.226	1.240	1.231	1.230	1.237	1.233	0.39	0.200	0.200	0.201	0.200	0.200	0.200	0.16
2	0.086	0.089	0.092	0.091	0.090	0.091	2.37	0.221	0.221	0.222	0.221	0.221	0.221	0.21
3	0.187	0.188	0.182	0.188	0.190	0.189	1.42	0.271	0.271	0.272	0.271	0.271	0.272	0.15
4	0.320	0.325	0.321	0.323	0.323	0.323	0.53	0.290	0.290	0.291	0.290	0.290	0.290	0.11
5	0.218	0.216	0.210	0.213	0.215	0.214	1.24	0.366	0.366	0.367	0.366	0.366	0.366	0.15

续表 2(Continued Tab. 2)

峰号 Peak No.	相对峰面积 Relative areas							相对保留时间 Relative retention time						
	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
6	0.590	0.607	0.613	0.614	0.619	0.616	1.72	0.399	0.399	0.400	0.399	0.399	0.399	0.09
7	0.093	0.087	0.087	0.088	0.091	0.090	2.71	0.428	0.427	0.428	0.427	0.428	0.428	0.09
8	0.516	0.525	0.522	0.520	0.525	0.522	0.62	0.496	0.496	0.497	0.496	0.496	0.496	0.07
9	0.634	0.643	0.641	0.640	0.641	0.641	0.48	0.518	0.518	0.519	0.518	0.518	0.518	0.06
10	0.737	0.688	0.697	0.695	0.723	0.723	2.77	0.546	0.546	0.547	0.546	0.546	0.546	0.05
11	0.410	0.398	0.408	0.406	0.428	0.423	2.71	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.04
12	0.266	0.268	0.272	0.270	0.267	0.269	0.69	0.594	0.594	0.595	0.595	0.595	0.595	0.05
13	0.133	0.129	0.132	0.134	0.139	0.137	2.63	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.04
14	0.663	0.668	0.669	0.669	0.682	0.676	1.02	0.624	0.624	0.625	0.624	0.624	0.624	0.04
15	0.932	0.937	0.934	0.942	0.958	0.950	1.09	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.03
16	0.297	0.303	0.294	0.303	0.311	0.307	2.00	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.03
17	0.753	0.762	0.796	0.759	0.771	0.765	1.96	0.743	0.742	0.743	0.743	0.743	0.743	0.03
18	2.117	2.144	2.136	2.141	2.147	2.144	0.52	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.03
19	0.455	0.445	0.450	0.457	0.467	0.462	1.75	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.02
20	0.173	0.170	0.172	0.173	0.177	0.175	1.42	0.825	0.824	0.825	0.825	0.825	0.825	0.02
21	0.394	0.370	0.375	0.381	0.371	0.380	2.34	0.883	0.882	0.882	0.883	0.883	0.882	0.02
22	0.471	0.481	0.480	0.474	0.474	0.474	0.83	0.974	0.974	0.974	0.975	0.974	0.974	0.01
23	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
24	0.183	0.176	0.181	0.172	0.182	0.177	2.30	1.127	1.127	1.128	1.128	1.128	1.128	0.04
25	0.425	0.426	0.443	0.441	0.440	0.440	1.80	1.267	1.268	1.268	1.267	1.267	1.267	0.06
26	0.175	0.177	0.176	0.176	0.177	0.176	0.46	1.336	1.339	1.338	1.337	1.336	1.337	0.07
27	0.220	0.222	0.222	0.221	0.222	0.221	0.33	1.367	1.369	1.368	1.368	1.366	1.367	0.07
28	0.079	0.079	0.078	0.078	0.078	0.078	0.31	1.386	1.388	1.388	1.387	1.386	1.387	0.07

## 2.2.4 重现性试验

取同一 HBC 样品,按供试品制备方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结

果各共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,表明方法重现性良好(见表 3)。

表 3 重现性试验结果

Table 3 Results of repeatability test

峰号 Peak No.	相对峰面积 Relative areas							相对保留时间 Relative retention time						
	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
1	0.962	1.009	1.017	1.025	1.055	1.007	2.98	0.200	0.200	0.200	0.200	0.201	0.200	0.15
2	0.083	0.079	0.086	0.084	0.084	0.083	2.94	0.221	0.221	0.221	0.221	0.222	0.221	0.21
3	0.183	0.179	0.180	0.181	0.182	0.181	0.75	0.271	0.271	0.271	0.271	0.272	0.271	0.15
4	0.341	0.319	0.318	0.320	0.321	0.315	2.87	0.290	0.290	0.290	0.290	0.291	0.290	0.10
5	0.206	0.221	0.220	0.220	0.210	0.215	2.79	0.366	0.366	0.366	0.366	0.367	0.366	0.14

续表 3 (Continued Tab. 3)

峰号 Peak No.	相对峰面积 Relative areas							相对保留时间 Relative retention time						
	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
6	0.567	0.577	0.578	0.579	0.613	0.580	2.71	0.399	0.399	0.399	0.399	0.400	0.399	0.10
7	0.091	0.092	0.091	0.090	0.087	0.089	1.80	0.427	0.428	0.427	0.428	0.428	0.428	0.09
8	0.496	0.508	0.510	0.514	0.522	0.505	1.76	0.496	0.496	0.496	0.496	0.497	0.496	0.07
9	0.583	0.584	0.583	0.594	0.626	0.589	2.81	0.518	0.518	0.518	0.518	0.519	0.518	0.06
10	0.827	0.801	0.791	0.780	0.762	0.771	2.98	0.546	0.546	0.546	0.546	0.547	0.546	0.06
11	0.456	0.445	0.450	0.441	0.429	0.422	2.95	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.555	0.05
12	0.289	0.282	0.273	0.272	0.272	0.269	2.81	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	0.03
13	0.163	0.160	0.156	0.153	0.150	0.158	2.98	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.04
14	0.629	0.662	0.661	0.669	0.669	0.659	2.29	0.624	0.624	0.624	0.624	0.625	0.624	0.05
15	1.085	1.071	1.075	1.069	1.008	1.025	2.96	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.660	0.03
16	0.322	0.316	0.311	0.309	0.294	0.311	2.97	0.682	0.683	0.683	0.683	0.683	0.683	0.04
17	0.850	0.837	0.834	0.818	0.796	0.788	2.96	0.743	0.743	0.743	0.743	0.743	0.743	0.02
18	2.317	2.275	2.267	2.232	2.136	2.211	2.81	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.791	0.02
19	0.513	0.509	0.504	0.489	0.477	0.484	2.97	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.814	0.02
20	0.159	0.163	0.167	0.170	0.172	0.169	2.91	0.824	0.824	0.825	0.824	0.825	0.824	0.02
21	0.384	0.384	0.385	0.381	0.375	0.376	1.15	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882	0.01
22	0.504	0.505	0.504	0.498	0.480	0.490	2.01	0.975	0.974	0.974	0.974	0.974	0.974	0.00
23	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
24	0.182	0.174	0.184	0.175	0.181	0.171	2.84	1.128	1.128	1.127	1.127	1.128	1.128	0.02
25	0.419	0.428	0.428	0.434	0.443	0.428	1.88	1.268	1.268	1.268	1.268	1.268	1.268	0.02
26	0.176	0.175	0.175	0.176	0.176	0.174	0.45	1.338	1.338	1.338	1.338	1.338	1.338	0.02
27	0.224	0.222	0.221	0.221	0.222	0.219	0.71	1.368	1.368	1.368	1.368	1.368	1.368	0.02
28	0.077	0.077	0.077	0.077	0.078	0.077	0.63	1.387	1.388	1.388	1.388	1.388	1.387	0.03

### 2.2.5 指纹图谱建立与相似度分析

取 10 批 HBG(S1 ~ S10) 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 图谱采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012)”进行分析, 以 S1 为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1 min, 采用多点校正

后自动匹配, 以平均数法生成对照指纹图谱 R(见图 1), 计算各批样品图谱相似度。结果 10 批样品相似度均大于 0.99, 表明各批次样品的质量相对稳定(见表 4)。

表 4 10 批样品相似度评价结果

Table 4 Similarity evaluation of 10 samples

样品 Sample	相似度 Similarity										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.995	0.997	0.999	0.999	0.999	0.997	0.998	0.997	0.995	0.999
S2	0.995	1.000	0.999	0.997	0.997	0.995	0.994	0.990	0.999	1.000	0.998
S3	0.997	0.999	1.000	0.998	0.998	0.998	0.994	0.994	1.000	0.999	0.999
S4	0.999	0.997	0.998	1.000	1.000	0.999	0.997	0.997	0.998	0.997	1.000
S5	0.999	0.997	0.998	1.000	1.000	0.999	0.997	0.998	0.998	0.997	1.000

续表 4(Continued Tab. 4)

样品 Sample	相似度 Similarity										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S6	0.999	0.995	0.998	0.999	0.999	1.000	0.995	0.998	0.998	0.996	0.999
S7	0.997	0.994	0.994	0.997	0.997	0.995	1.000	0.994	0.994	0.994	0.997
S8	0.998	0.990	0.994	0.997	0.998	0.998	0.994	1.000	0.994	0.991	0.997
S9	0.997	0.999	1.000	0.998	0.998	0.998	0.994	0.994	1.000	0.999	0.999
S10	0.995	1.000	0.999	0.997	0.997	0.996	0.994	0.991	0.999	1.000	0.998

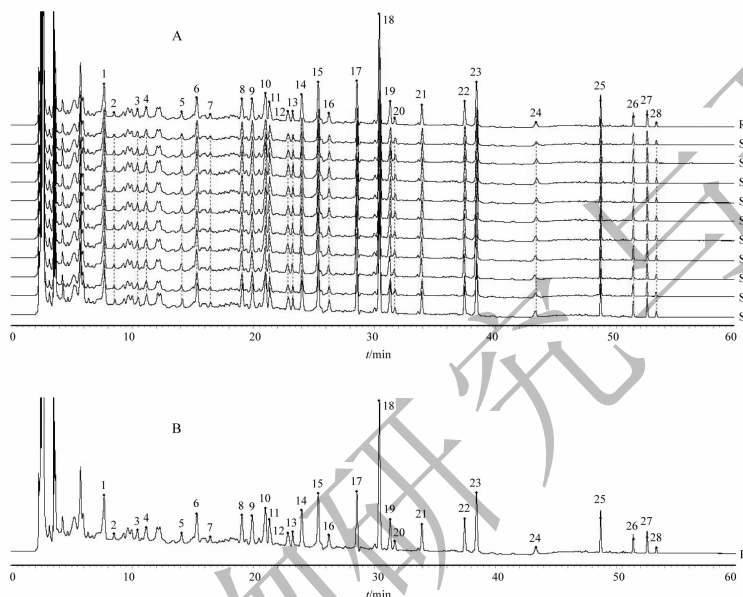


图 1 10 批 HBG 指纹图谱 (A) 及对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 Fingerprint for 10 batches of HBG (A) and reference fingerprint (B)

注:15-毛蕊异黄酮葡萄糖苷;18-橙皮苷;21-芒柄花苷;23-毛蕊异黄酮;25-芒柄花素;26-川陈皮素。

Note:15-calycosin7-O-β-D-glucopyranoside;18-hesperidin;21-ononin;23-calycosin;25-formononetin;26-nobiletin.

2.2.6 共有峰指认与相对峰面积计算

10 批 HBG 图谱中共确定 28 个共有峰,通过与混合对照品比对其指认出其中 6 个成分,即 15 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、18 号峰为橙皮苷、21 号峰

为芒柄花苷、23 号峰为毛蕊异黄酮、25 号峰为芒柄花素、26 号峰为川陈皮素。其中 23 号峰峰面积及保留时间适中,分离度及对称性均较好,因此选作参考峰(S),计算其他共有峰相对峰面积,计算结果见表 5。

表 5 10 批样品中共有峰的相对峰面积

Table 5 Relative peak areas of 28 common chromatographic peaks of 10 samples

样品 Sample	相对峰面积 Relative areas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S1	1.080	0.077	0.175	0.332	0.206	0.579	0.092	0.507	0.589	0.876	0.436	0.324	0.182	0.630
S2	1.226	0.086	0.187	0.320	0.218	0.590	0.096	0.516	0.634	0.737	0.410	0.266	0.133	0.663
S3	1.224	0.077	0.182	0.319	0.226	0.578	0.094	0.516	0.593	0.786	0.436	0.268	0.149	0.669
S4	1.021	0.074	0.182	0.323	0.222	0.576	0.092	0.513	0.590	0.742	0.428	0.273	0.159	0.659
S5	1.022	0.075	0.182	0.321	0.224	0.568	0.094	0.510	0.589	0.762	0.426	0.283	0.175	0.666
S6	1.005	0.075	0.179	0.314	0.215	0.577	0.092	0.508	0.579	0.802	0.453	0.272	0.154	0.649
S7	0.977	0.067	0.171	0.309	0.198	0.745	0.081	0.495	0.571	0.737	0.393	0.287	0.162	0.637
S8	0.888	0.073	0.184	0.344	0.206	0.574	0.091	0.495	0.581	0.867	0.463	0.313	0.194	0.633

续表5(Continued Tab. 5)

样品 Sample	相对峰面积 Relative areas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S9	1.195	0.094	0.176	0.310	0.210	0.581	0.089	0.502	0.581	0.778	0.444	0.264	0.150	0.657
S10	1.237	0.090	0.190	0.323	0.215	0.619	0.093	0.525	0.641	0.750	0.440	0.267	0.140	0.682

样品 Sample	相对峰面积 Relative areas													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
S1	1.010	0.329	0.906	2.372	0.592	0.114	0.385	0.511	1.000	0.173	0.426	0.179	0.226	0.078
S2	0.932	0.297	0.753	2.117	0.455	0.173	0.405	0.471	1.000	0.183	0.425	0.175	0.220	0.079
S3	1.063	0.309	0.825	2.242	0.482	0.170	0.380	0.502	1.000	0.188	0.426	0.175	0.220	0.077
S4	1.001	0.317	0.801	2.271	0.504	0.164	0.385	0.507	1.000	0.185	0.429	0.176	0.222	0.078
S5	1.008	0.319	0.800	2.276	0.516	0.126	0.384	0.507	1.000	0.181	0.418	0.177	0.224	0.077
S6	1.078	0.306	0.881	2.252	0.508	0.165	0.381	0.498	1.000	0.174	0.424	0.174	0.219	0.076
S7	0.798	0.328	0.864	2.253	0.521	0.142	0.383	0.496	1.000	0.182	0.412	0.171	0.217	0.075
S8	1.099	0.340	0.898	2.358	0.601	0.117	0.388	0.493	1.000	0.197	0.430	0.176	0.224	0.077
S9	1.059	0.310	0.784	2.198	0.490	0.170	0.373	0.482	1.000	0.177	0.423	0.172	0.216	0.076
S10	0.958	0.311	0.771	2.147	0.467	0.177	0.371	0.474	1.000	0.182	0.440	0.177	0.222	0.078

## 2.3 已指认共有成分的定量测定

### 2.3.1 色谱条件

检测波长为 260 nm,其他色谱条件同“2.2.1”。

### 2.3.2 系统适用性试验

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液及黄芪、陈皮阴性对照溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果显示,在与混合对照品色谱相同保留时间,供试品色谱有对应的峰,黄芪、陈皮阴性对照无干扰,理论塔板数以各成分计算均不低于 5 000,表明系统适用性较好,如图 2 所示。

### 2.3.3 线性关系考察

取混合对照品溶液为母液,用甲醇稀释至母液浓度的 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、90%。分别吸取稀释液和母液 10  $\mu$ L,按“2.3.1”项下色谱条件进样,以质量浓度为横坐标( $x$ ),峰面积为纵坐标( $y$ ),绘制标准曲线,得回归方程:毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $y = 31\,282x + 7.073\,3$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 1.95 ~ 19.52  $\mu$ g/mL;橙皮苷  $y = 3\,578.4x + 13.243$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 28.30 ~ 283.04  $\mu$ g/mL;芒柄花苷  $y = 2\,625.4x + 0.721$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 5.86 ~ 70.32  $\mu$ g/mL;毛蕊异黄酮  $y = 53\,697x + 5.256\,8$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 0.74 ~ 14.79  $\mu$ g/mL;芒柄花素  $y = 63\,921x + 2.636\,2$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 0.38 ~ 7.64  $\mu$ g/mL;川陈皮素  $y = 7\,448.2x + 0.821\,6$ ,  $r = 0.999\,9$ ,线性范围 1.25 ~ 24.91  $\mu$ g/mL。

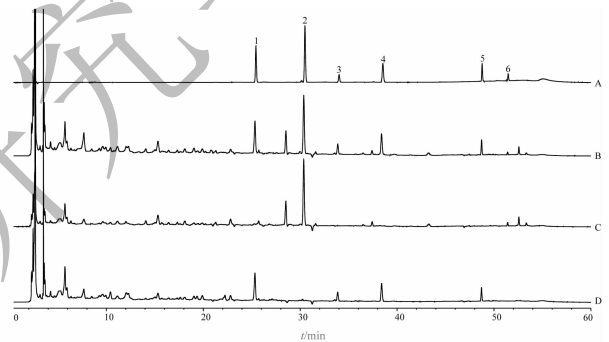


图 2 混合对照品 (A)、HBG (B)、黄芪阴性颗粒 (C) 和陈皮阴性颗粒 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A), HBG sample (B), negative sample without *Astragalus Radix* (C) and negative sample without *Citrus Reticulatae Pericarpium* (D)

注:1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷;2-橙皮苷;3-芒柄花苷;4-毛蕊异黄酮;5-芒柄花素;6-川陈皮素。

Note: 1-calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside; 2-hesperidin; 3-ononin; 4-calycosin; 5-formononetin; 6-nobiletin.

### 2.3.4 精密度试验

取同一混合对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件重复进样 6 次,分别计算各成分色谱峰面积 RSD 值。结果各成分峰面积的 RSD 值均小于 1.5%,表明仪器精密度良好。

### 2.3.5 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于制备后 0、6、12、18、24、36 h 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算各成分色谱峰面积 RSD 值。结果各成分峰面积的

RSD 值均小于 3%,表明样品在 36 h 内稳定。

### 2.3.6 重复性试验

取同一样品(S1)按供试品制备方法平行制备供试品溶液6份,按“2.3.1”项下色谱条件分别进样分析,根据峰面积计算各成分含量并进一步计算含量的RSD值。结果各成分含量的RSD值均小于3%,表明方法重复性良好。

### 2.3.7 加样回收率试验

精密称取6个成分的对照品适量,加甲醇制成每25 mL所含各成分占样品一半量的100%的混合

对照品溶液。精密称取已知含量的 HBG 样品细粉(S1)约0.95 g,共6份,置于具塞锥形瓶中,加入新配制的混合对照品溶液25 mL,按供试品溶液制备方法制备,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算各成分的回收率和RSD值。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和川陈皮素的平均回收率分别为98.42%、97.15%、97.77%、98.60%、99.58%、98.81%,其RSD值分别为1.66%、1.90%、2.28%、1.15%、0.93%、1.87%,表明样品回收率良好(见表6)。

表6 加样回收试验结果(n=6)  
Table 6 Results of recovery test (n=6)

成分 Component	样品量 Sample weight (g)	原有量 Original (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷 Calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside	0.950 2	0.124 1	0.124 0	0.247 9	99.82	98.42	1.66
	0.947 5	0.123 7	0.124 0	0.246 6	99.10		
	0.949 3	0.123 9	0.124 0	0.248 4	100.38		
	0.954 0	0.124 6	0.124 0	0.244 9	97.02		
	0.952 6	0.124 4	0.124 0	0.243 7	96.21		
	0.951 1	0.124 2	0.124 0	0.245 7	98.01		
橙皮苷 Hesperidin	0.950 2	1.858 0	1.857 7	3.659 6	96.98	97.15	1.90
	0.947 5	1.852 7	1.857 7	3.629 0	95.62		
	0.949 3	1.856 2	1.857 7	3.642 8	96.17		
	0.954 0	1.865 4	1.857 7	3.707 3	99.66		
	0.952 6	1.862 7	1.857 7	3.714 1	99.15		
	0.951 1	1.859 7	1.857 7	3.630 6	95.33		
芒柄花苷 Ononin	0.950 2	0.432 9	0.433 0	0.853 4	97.12	97.77	2.28
	0.947 5	0.431 7	0.433 0	0.869 7	101.16		
	0.949 3	0.432 5	0.433 0	0.853 0	97.10		
	0.954 0	0.434 7	0.433 0	0.850 5	96.03		
	0.952 6	0.434 0	0.433 0	0.866 0	99.78		
	0.951 1	0.433 3	0.433 0	0.846 5	95.44		
毛蕊异黄酮 Calycosin	0.950 2	0.047 9	0.048 0	0.096 0	100.14	98.60	1.15
	0.947 5	0.047 7	0.048 0	0.094 4	97.30		
	0.949 3	0.047 8	0.048 0	0.095 2	98.67		
	0.954 0	0.048 1	0.048 0	0.094 8	97.25		
	0.952 6	0.048 0	0.048 0	0.095 5	99.06		
	0.951 1	0.047 9	0.048 0	0.095 5	99.21		
芒柄花素 Formononetin	0.950 2	0.017 4	0.017 5	0.035 0	100.68	99.58	0.93
	0.947 5	0.017 3	0.017 5	0.034 7	99.36		
	0.949 3	0.017 4	0.017 5	0.034 9	99.78		



续表 6(Continued Tab. 6)

成分 Component	样品量 Sample weight (g)	原有量 Original (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
川陈皮素 Nobiletin	0.954 0	0.017 5	0.017 5	0.035 1	100.42	98.81	1.87
	0.952 6	0.017 4	0.017 5	0.034 6	98.17		
	0.951 1	0.017 4	0.017 5	0.034 7	99.06		
	0.950 2	0.025 9	0.026 1	0.051 9	99.65		
	0.947 5	0.025 9	0.026 1	0.051 4	97.51		
	0.949 3	0.025 9	0.026 1	0.051 2	96.93		
	0.954 0	0.026 0	0.026 1	0.051 4	97.28		
	0.952 6	0.026 0	0.026 1	0.052 1	99.98		
	0.951 1	0.026 0	0.026 1	0.052 5	101.52		

### 2.3.8 样品定量测定

按“2.1.2”项下方法对 S1 ~ S10 号样品进行处理,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算样品中各成分的含量。结果显示,10 批样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量范围在 0.109 5 ~ 0.139 4 mg/g,橙

皮苷在 1.643 6 ~ 2.293 9 mg/g,芒柄花苷在 0.416 5 ~ 0.489 5 mg/g,毛蕊异黄酮在 0.043 7 ~ 0.053 4 mg/g,芒柄花素在 0.016 5 ~ 0.019 0 mg/g,川陈皮素在 0.024 0 ~ 0.028 9 mg/g(见表 7)。

表 7 样品测定结果 (mg/g, n=3)

Table 7 Determination results of the samples (mg/g, n=3)

样品 Sample	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷 Calycosin7-O-β-D- Glucopyranoside	橙皮苷 Hesperidin	芒柄花苷 Ononin	毛蕊异黄酮 Calycosin	芒柄花素 Formononetin	川陈皮素 Nobiletin
S1	0.130 6	1.955 4	0.455 6	0.050 4	0.018 3	0.027 3
S2	0.109 5	1.643 6	0.416 5	0.043 7	0.016 5	0.024 0
S3	0.127 0	1.925 1	0.443 2	0.049 1	0.017 8	0.026 3
S4	0.122 1	1.822 2	0.427 8	0.047 2	0.017 1	0.025 3
S5	0.139 4	2.293 9	0.489 5	0.053 4	0.019 0	0.028 9
S6	0.132 1	1.977 5	0.464 6	0.051 1	0.018 5	0.027 4
S7	0.129 2	1.929 1	0.450 7	0.049 9	0.018 1	0.026 4
S8	0.121 3	1.788 9	0.423 1	0.047 0	0.017 0	0.024 9
S9	0.125 0	1.875 7	0.437 6	0.048 0	0.017 5	0.026 1
S10	0.128 4	1.966 3	0.453 6	0.050 2	0.018 2	0.026 8

## 3 讨论

本研究通过 DAD 检测器考察了不同波长下 (250、260、283、334 nm) 得到的色谱情况,结果发现在 260 nm 处色谱信息最为丰富,基线平稳,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和川陈皮素的分离度及信号响应均较好,故选取 260 nm 为 6 种化合物的定量检测波长。由于不

同波长下有新的非共有峰出现,可见单一波长下的色谱图无法较全面的反映样品的整体化学信息特征,故采用波长转换法建立 HBG 的指纹图谱,即 260 nm (0 ~ 17 min、27 ~ 32 min)、290 nm (17 ~ 27 min、36 ~ 38 min)、250 nm (32 ~ 36 min、38 ~ 50 min)、330 nm (50 ~ 60 min),该条件下指纹图谱出峰数目、强度及共有峰的整体分离度等评价图谱的信息均较好。

本研究分别考察了水-甲醇、水-乙腈和 0.2% 甲酸溶液-乙腈 3 种不同的流动相系统,结果 0.2% 甲酸溶液-乙腈流动相系统所得图谱中各色谱峰的分 离情况和峰形较好,且基线平稳,因此最终采用该系统作为流动相组成。

本研究通过采用化学指纹图谱、指标成分含量测定相结合的模式,从整体定性和指标成分定量的角度标定 HBG 的化学轮廓和质量标准,10 批 HBG 定量测定结果和指纹图谱显示,不同批次间样品质量较为稳定,制剂中指标成分量差异较小。

#### 参考文献

- 1 Wang JL(王继龙),Wei SC(魏舒畅),Liu YQ(刘永琦),*et al.* Optimization of extraction and purification technology for Huangqi Baihe Granules based on G1-entropy method and orthogonal design[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2018,49:596-603.
- 2 Wang JL(王继龙),LIU XX(刘晓霞),Wei SC(魏舒畅),*et al.* Prediction of critical flux and pressure of Enzymolysis extraction-ultrafiltration purification for fibrous rhizome herbs based on BP neural network[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2016,28:586-590.
- 3 Wang JL(王继龙),Wei SC(魏舒畅),Liu YQ(刘永琦),*et al.* Study on dry granulation technology for Huangqi Baihe Granules[J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2017,40:671-673.
- 4 Ren CZ(任春贞),Luo YL(骆亚莉),Liu YQ(刘永琦),*et al.* Effects of astragalus and lily particles on free radical metabolize and pathological changes of lung in mice under plateau hypoxia condition[J]. *J Chongqing Med Univ*(重庆医科大学学报),2017,42:1126-1130.
- 5 Li L(李玲),An FY(安方玉),Liu YQ(刘永琦),*et al.* Protective effects of Astragaluslily granules on intestinal mucosal barrier of mice in high altitude hypoxia[J]. *Med J Chin PLA*(解放军医学杂志),2016,41:773-778.
- 6 Lu ZW(卢志伟),An FY(安方玉),Luo YL(骆亚莉),*et al.* Protective effect of Astragalus lily granules on brain tissue of mice under high altitude hypoxia condition[J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学学报),2016,32:302-306.
- 7 Cheng XP(成新平),Su Y(苏韞),Yan CL(颜春鲁),*et al.* Protective effect of Astragalus lily granules on brain tissue of hypoxic mice under normal pressure[J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学学报),2017,33:425-428.
- 16 Nuncio-jáuregui N, Munera-picazo S, Calín-sánchez á,*et al.* Bioactive compound composition of pomegranate fruits removed during thinning[J]. *J Food Compos Anal*,2015,37:11-19.
- 17 Oliveira I, Baptista P, Malheiro R,*et al.* Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity[J]. *Food Res Int*,2011,44:1401-1407.
- 18 Todorovic V, Redovnikovic IR, Todorovic Z,*et al.* Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia[J]. *J Food Compos Anal*,2015,41:137-143.
- 19 Tauchen J, Marsik P, Kvasnicova M,*et al.* In vitro antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines[J]. *J Food Compos Anal*,2015,41:113-121.
- 20 Schaich K, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays[J]. *J Funct Foods*,2015,14:111-125.

(上接第 1585 页)