

基于一测多评法对注射用益气复脉（冻干）中9种成分的质量控制研究

褚延斌¹, 苏小琴^{2,3}, 李德坤^{2,3}, 周大铮^{2,3}, 余伯阳¹, 鞠爱春^{2,3*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009
2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402
3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402

摘要: 目的 建立用于测定注射用益气复脉（冻干）（YFI）中9种成分人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、Rg₁ (Rg₁)、Re (Re)、Rf (Rf)、Rc (Rc)、Ro (Ro)、Rb₂ (Rb₂)、Rd (Rd) 及五味子醇甲 (Sch) 的一测多评 (QAMS) 方法, 探讨 QAMS 法用于不同类型化学成分定量测定的准确性与可行性。方法 采用高效液相色谱法, Diamonsil[®] C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 °C, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 203 nm。建立 Rg₁、Re、Rf、Rc、Ro、Rb₂、Rd 及 Sch 与内参物 Rb₁ 的相对校正因子 (*f*), 通过 *f* 计算 YFI 中 8 种成分的量, 并在 25 批 YFI 中进行验证, 将该方法与外标法测定的结果进行对比分析, 以验证 QAMS 法的合理性、可行性和可重复性。结果 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 分别在进样量为 0.929~4.644、0.818~4.089、0.732~3.660、1.461~7.305、0.636~3.181、0.618~3.092、0.788~3.941、0.758~3.789、0.178~0.889 μg 线性关系良好, 加样回收率为 97.08%~100.94%; *f* 值分别为 $f_{Rg_1/Rb_1}=1.970$, $f_{Re/Rb_1}=0.929$, $f_{Rf/Rb_1}=1.196$, $f_{Rc/Rb_1}=0.870$, $f_{Ro/Rb_1}=0.830$, $f_{Rb_2/Rb_1}=0.786$, $f_{Rd/Rb_1}=0.906$, $f_{Sch/Rb_1}=12.082$, 且在不同条件下重复性良好; QAMS 法的计算结果与外标法的实测值之间无显著性差异, 实验所得的 *f* 值可信。结论 本实验建立的 QAMS 法可以作为一种简便准确的质量评价模式用于 YFI 中多种人参皂苷类成分和 Sch 的质量控制。

关键词: 一测多评; 注射用益气复脉 (冻干); 人参皂苷; 五味子醇甲; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3537-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.014

Quality control for nine components in Yiqi Fumai Injection based on quantitative analysis of multi-components with a single-marker

CHU Yan-bin¹, SU Xiao-qin^{2,3}, LI De-kun^{2,3}, ZHOU Da-zheng^{2,3}, YU Bo-yang¹, JU Ai-chun^{2,3}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China
2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China
3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method for the determination of nine components in Yiqi Fumai Injection (YFI). **Methods** Ginsenoside Rb₁ was used as internal reference substance. The relative correlation factors (*f*) of ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rc, Ro, Rb₂, Rd, and schisandrin were calculated and established by HPLC. The separation was performed on a Diamonsil[®] C₁₈ column (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid water for gradient elution. The column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was set at 203 nm, flow rate was 1 mL/min. The results were compared with those obtained by the external standard method in 25 batches of YFI. **Results** Ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rb₁, Rc, Ro, Rb₂, Rd, and schisandrin had good relations within the ranges of 0.929—4.644, 0.818—4.089, 0.732—3.660, 1.461—7.305, 0.636—3.181, 0.618—3.092, 0.788—3.941, 0.758—3.789, and 0.178—0.889 μg, respectively. The recovery rates were 97.08%—100.94%. The *f* values of ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rc, Ro, Rb₂, Rd, and schisandrin to ginsenoside Rb₁ were 1.970, 0.929, 1.196, 0.870, 0.830, 0.786, 0.906, and 12.082. The two methods did not show the significant difference in assay results. **Conclusion** The QAMS method is feasible and credible, and could be used to determine the

收稿日期: 2017-04-20

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX09402202)

作者简介: 褚延斌, 男, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。E-mail: chuybin@163.com

*通信作者 鞠爱春, 男, 高级工程师。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

multiple components in YFI.

Key words: quantitative analysis of multi-components with a single-marker; Yiqi Fumai Injection; ginsenosides; schisandrin; quality control

注射用益气复脉(冻干)(YFI)为天津天士力之骄药业有限公司独家生产的冻干粉针,其处方来源于古方生脉散,组方药材为红参、麦冬、五味子,辅料为甘露醇和葡甲胺。其具有益气复脉、养阴生津之功效,临床上主要用于冠心病心绞痛气阴两虚证^[1-2]、冠心病慢性心力衰竭气阴两虚证^[3-4]、扩张性心肌病^[5]、中晚期肝癌疼痛^[6]以及调节免疫^[7]等。YFI 中主要化学成分为人参皂苷、木脂素^[8-9]和糖类。目前关于人参皂苷和木脂素定量的研究已有多篇文献报道^[10-14],其主要采用 HPLC、UPLC-MS/MS 及近红外光谱法,对人参总皂苷、总木脂素及人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、Re (Re)、Rg₁ (Rg₁)、Rc (Rc)、Rd (Rd)、Rf (Rf)、Rg₃ (Rg₃)、F₂ (F₂)、三七皂苷 R₁ (R₁)、五味子醇甲 (schisandrin, Sch) 等进行了定量分析。但由于人参皂苷对照品紧缺、价格昂贵,使得上述方法在多指标成分质量控制中受到限制。

王智民等^[15-16]提出的一测多评(QAMS)法,实现了用 1 个对照品同步测定中药中多个成分的量。该方法自提出后,就成为中药药物分析领域的研究热点,被广泛地用于中药材、中药饮片、中药提取物及中药制剂等的多指标成分测定中^[17-20]。

本实验以 Rb₁ 为内参物,建立 Rg₁、Re、Rf、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 与 Rb₁ 的相对校正因子(*f*)。利用 *f* 计算 YFI 中各成分的量,并与外标法所得结果进行比较,以验证 QAMS 法的可行性和准确性。结果表明,该方法可以作为一种简便准确的质量评价模式用于 YFI 中多种人参皂苷类成分和 Sch 的质量控制。

1 材料与仪器

Waters Alliance 高效液相色谱仪,包括 2695 溶剂管理系统,2489 紫外检测器,Empower 3.0 色谱工作站,美国 Waters 公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪,Agilent ChemStation 工作站,美国 Agilent 公司;色谱柱:Diagramsil[®] C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;XS105 型 1/10 万天平,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;水为超纯水,Milli-Q 型超纯水系统,美国密理博公司;Agela Cleanert[®]

SPE 柱,500 mg/6 mL,天津博纳艾杰尔科技有限公司。甲醇、乙腈,色谱纯,德国 OMNI 公司;磷酸,色谱级,天津市华东试剂厂;其余试剂均为分析纯。

对照品 Rb₁ (批号 110704-201424,质量分数为 93.7%)、Re (批号 110754-201525,质量分数为 92.3%)、Rg₁ (批号 110703-201530,质量分数为 91.7%)、Rb₂ (批号 111715-201203,质量分数为 93.8%)、Rd (批号 111818-201302,质量分数为 94.2%)、Sch (批号 110857-201513,质量分数为 99.9%) 均购自中国食品药品检定研究院;对照品 Rf (批号 MUST-15020110,质量分数为 99.99%),购自中国科学院成都生物研究所;对照品 Rc (批号 11021-14-0)、Ro (批号 20121024) 购自天津一方科技有限公司,经 HPLC 面积归一化法测定,质量分数均>98%。麦冬提取物由天津天士力之骄药业有限公司提供。

25 批 YFI 批号分别为 20160201、20160301、20160302、20160303、20160304、20160305、20160306、20160307、20160308、20160309、20160310、20160311、20160312、20160313、20160314、20160315、20160316、20160317、20160401、20160402、20160403、20160404、20160405、20160406、20160407,均由天津天士力之骄药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Alliance 高效液相色谱仪,Diagramsil[®] C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~20 min,21%乙腈;20~30 min,21%~23%乙腈;30~35 min,23%~27%乙腈;35~90 min,27%~32%乙腈;90~100 min,32%~42%乙腈;100~110 min,42%~48%乙腈;110~116 min,48%~55%乙腈;116~120 min,55%~95%乙腈;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 203 nm;进样量 20 μL。理论板数按 Rg₁ 峰计算不低于 30 000。

在此条件下,YFI 中 9 种成分与其相邻峰均能达到很好地分离,色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 称取 Rb₁、Re、Rf、Rg₁、

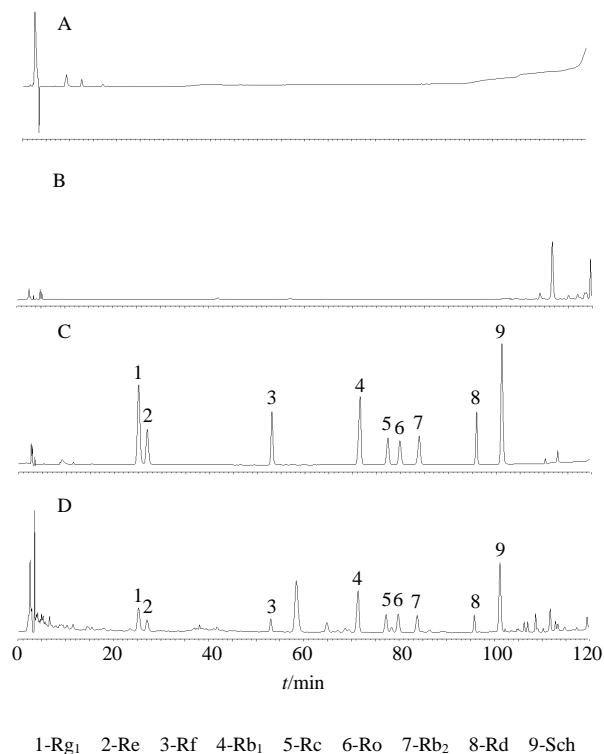


图 1 空白溶剂 (A)、阴性对照 (B)、混合对照品 (C) 及 YFI 供试品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank control (A), negative control (B), mixed reference substances (C), and YFI sample (D)

Rb₂、Rc、Rd、Ro、Sch 对照品适量，精密称定，加 50% 甲醇制成质量浓度分别为 389.8、221.5、204.1、253.2、210.1、188.5、201.1、200.7、223.3 μg/mL 的混合对照品溶液，备用。

2.2.2 供试品溶液 称取 YFI 约 1.3 g，精密称定，用 10 mL 纯化水充分溶解，上已处理好的 SPE 树脂柱，体积流量为 1.0 mL/min，弃去流出液，然后用 5 mL 0.5 mol/L NaOH 30% 甲醇溶液分 2 次冲洗，再用 5 mL 20% 甲醇冲洗，最后用 5 mL 纯甲醇洗脱，收集洗脱液于 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.2.3 阴性对照溶液 称取麦冬提取物 3.0 g，精密称定，其余制备方法同“2.2.2”项。

2.3 专属性试验

分别取空白溶剂（50% 甲醇）、阴性对照溶液、YFI 供试品溶液、混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果表明，Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 相互测定均无干扰，且空白溶剂对 9 个成分测定也无干扰峰的存在，结果见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、2、4、8、10、15 μL 注入高效液相色谱仪，平行 3 针，按“2.1”项下色谱条件测定，记录相应的色谱峰面积。以进样质量为横坐标 (X)，峰面积积分为纵坐标 (Y)，进行线性回归，得 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 的回归方程及线性范围。结果表明，8 种人参皂苷及 Sch 在相应质量浓度范围内线性关系良好，结果见表 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Linear relationship evaluation results

成分	回归方程	线性范围/μg	r
Rg ₁	Y=698 956 X-12 951	0.929~4.644	0.999
Re	Y=348 828 X-67 060	0.818~4.089	0.999
Rf	Y=437 141 X-53 404	0.732~3.660	0.999
Rb ₁	Y=370 209 X-97 486	1.461~7.305	0.999
Rc	Y=326 240 X-46 600	0.636~3.181	0.999
Ro	Y=314 565 X-49 136	0.618~3.092	0.999
Rb ₂	Y=293 561 X-53 513	0.788~3.941	0.999
Rd	Y=335 622 X-45 534	0.758~3.789	0.999
Sch	Y=4×10 ⁶ X-133 707	0.178~0.889	0.999

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，进样量 10 μL，记录各色谱峰峰面积，计算 RSD。结果 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 峰面积的 RSD 分别为 0.37%、0.47%、0.35%、0.43%、0.22%、0.47%、0.37%、0.30%、0.37%，表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一批 YFI（批号 20160402）约 1.3 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、3、6、9、24、36 h 进样，按“2.1”项下色谱条件测定，记录各色谱峰峰面积，计算 RSD。结果 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 峰面积的 RSD 分别为 1.48%、1.68%、1.65%、1.36%、1.45%、2.11%、2.63%、2.58%、1.84%，表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批 YFI（批号 20160402）约 1.3 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录各色谱峰峰面积，计算各分量及其 RSD。结果测得 YFI 中 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Ro、Rb₂、Rd、Sch 的

量分别为 0.441、0.430、0.299、1.364、0.661、0.725、0.727、0.423、0.181 mg/g, RSD 分别为 2.79%、1.68%、2.43%、1.11%、1.30%、1.25%、1.72%、1.28%、2.52%，表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批 YFI (批号 20160402) 约 0.65 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别按样品中各分量-对照品大致 1:1 的比例加入一定量的对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各色谱峰峰面积, 计算加样回收率及 RSD。结果 R_{g1}、R_e、R_f、R_{b1}、R_c、R_o、R_{b2}、R_d、Sch 平均加样回收率分别为 100.88%、97.08%、99.82%、99.86%、100.35%、98.95%、99.10%、98.06%、100.94%, RSD 分别为 1.65%、1.74%、1.50%、0.70%、1.69%、1.70%、1.05%、0.69%、1.73%, 表明该方法的准确度良好。

2.9 f 的确定

2.9.1 f 的测定 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 6、8、10、12、14、16、18、20 μL 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 平行 3 针, 记录相应的色谱峰面积。以 R_{b1} 为内参物, 计算 R_{g1}、R_e、R_f、R_c、R_o、R_{b2}、R_d、Sch 的 *f*, 以多个进样体积计算所得 *f* 的平均值, 作为最终的 *f*, 其计算公式^[15]为 $f_{k/s} = A_k C_s / (C_k A_s)$, 式中 A_s 为参照物峰面积, C_s 为参照物进样质量, A_k 为待测组分峰面积, C_k 为待测组分进样质量, 结果见表 2。

2.9.2 不同仪器、色谱柱对 f 的影响 本实验考察了 2 台高效液相色谱仪 (Waters Alliance、Agilent 1100), 2 种不同品牌的色谱柱 [Diamondsil® C₁₈ (2)、Waters Symmetry C₁₈] 对各 *f* 的影响, 结果各 *f* 的 RSD 依次为 0.53%、2.10%、1.20%、1.29%、1.65%、1.98%、0.95%、0.25%, 表明不同仪器、不同色谱柱对各成分的 *f* 无显著影响, 结果见表 3。

2.9.3 不同柱温对 f 的影响 本实验考察了不同柱温 (25、30、35 °C) 对各 *f* 的影响, 结果各 *f* 的 RSD 依次为 0.04%、0.10%、0.19%、0.16%、0.21%、0.45%、0.30%、0.19%, 表明不同柱温对各成分的 *f* 无显著影响, 结果见表 4。

2.9.4 不同体积流量对 f 的影响 本实验考察了不同体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min) 对各 *f* 的影响,

表 2 各成分的 *f*

Table 2 *f* of each component

V/μL	<i>f</i> _{Rg1/Rb1}	<i>f</i> _{Re/Rb1}	<i>f</i> _{Rf/Rb1}	<i>f</i> _{Rc/Rb1}	<i>f</i> _{Ro/Rb1}	<i>f</i> _{Rb2/Rb1}	<i>f</i> _{Rd/Rb1}	<i>f</i> _{Sch/Rb1}
6	1.965	0.900	1.187	0.851	0.801	0.767	0.907	12.117
8	1.969	0.913	1.192	0.861	0.817	0.769	0.910	12.114
10	1.970	0.922	1.191	0.867	0.823	0.775	0.909	12.111
12	1.970	0.923	1.190	0.867	0.826	0.778	0.909	12.095
14	1.969	0.928	1.187	0.872	0.831	0.778	0.907	12.087
16	1.968	0.926	1.187	0.872	0.833	0.780	0.909	12.068
18	1.971	0.931	1.182	0.871	0.834	0.781	0.905	12.067
20	1.974	0.932	1.183	0.872	0.839	0.790	0.905	12.075
平均值	1.969	0.922	1.187	0.867	0.826	0.777	0.908	12.092
RSD/%	0.13	1.17	0.33	0.84	1.46	0.92	0.19	0.17

表 3 不同仪器、不同色谱柱对 *f* 的影响

Table 3 Effects of different instruments and columns on *f* values

仪器	色谱柱	<i>f</i> _{Rg1/Rb1}	<i>f</i> _{Re/Rb1}	<i>f</i> _{Rf/Rb1}	<i>f</i> _{Rc/Rb1}	<i>f</i> _{Ro/Rb1}	<i>f</i> _{Rb2/Rb1}	<i>f</i> _{Rd/Rb1}	<i>f</i> _{Sch/Rb1}
Waters Alliance	Diamondsil C ₁₈	1.969	0.922	1.187	0.867	0.826	0.777	0.908	12.092
	Waters Symmetry C ₁₈	1.967	0.933	1.196	0.876	0.831	0.798	0.896	12.054
Agilent 1100	Diamondsil C ₁₈	1.959	0.968	1.217	0.886	0.857	0.810	0.917	12.090
	Waters Symmetry C ₁₈	1.984	0.946	1.214	0.893	0.843	0.811	0.909	12.128
平均值		1.970	0.942	1.204	0.881	0.839	0.799	0.908	12.091
RSD/%		0.53	2.10	1.20	1.29	1.65	1.98	0.95	0.25

表 4 不同柱温对 *f* 的影响

Table 4 Effects of different column temperature on *f* values

柱温/°C	<i>f</i> _{Rg1/Rb1}	<i>f</i> _{Re/Rb1}	<i>f</i> _{Rf/Rb1}	<i>f</i> _{Rc/Rb1}	<i>f</i> _{Ro/Rb1}	<i>f</i> _{Rb2/Rb1}	<i>f</i> _{Rd/Rb1}	<i>f</i> _{Sch/Rb1}
25	1.969	0.921	1.189	0.866	0.828	0.784	0.903	12.113
30	1.969	0.922	1.187	0.867	0.826	0.777	0.908	12.092
35	1.968	0.920	1.192	0.864	0.829	0.782	0.903	12.137
平均值	1.969	0.921	1.189	0.866	0.828	0.781	0.905	12.114
RSD/%	0.04	0.10	0.19	0.16	0.21	0.45	0.30	0.19

结果各 *f* 的 RSD 依次为 0.17%、0.85%、1.03%、0.27%、0.96%、1.40%、2.18%、1.17%, 表明不同体积流量对各成分的 *f* 无显著影响, 结果见表 5。

2.9.5 不同实验人员对 f 的影响 本实验考察了 3 名实验人员对各 *f* 的影响, 结果各 *f* 的 RSD 依次为 0.04%、0.23%、0.09%、0.12%、0.10%、0.13%、0.08%、0.01%, 表明不同实验人员所得各成分的 *f* 无显著差异, 结果见表 6。

表 5 不同体积流量对 f 的影响

Table 5 Effects of different flow rates on f values

体积流量/(mL·min ⁻¹)	$f_{R_{g1}/R_{b1}}$	$f_{R_e/R_{b1}}$	$f_{R_f/R_{b1}}$	$f_{R_c/R_{b1}}$	$f_{R_o/R_{b1}}$	$f_{R_{b2}/R_{b1}}$	$f_{R_d/R_{b1}}$	$f_{Sch/R_{b1}}$
0.8	1.976	0.935	1.212	0.862	0.829	0.795	0.918	12.130
1.0	1.969	0.922	1.187	0.867	0.826	0.777	0.908	12.092
1.2	1.973	0.921	1.201	0.865	0.814	0.775	0.880	11.869
平均值	1.973	0.926	1.200	0.865	0.823	0.782	0.902	12.029
RSD/%	0.17	0.85	1.03	0.27	0.96	1.40	2.18	1.17

表 6 不同实验人员对 f 的影响

Table 6 Effects of different testers on f values

实验人员	$f_{R_{g1}/R_{b1}}$	$f_{R_e/R_{b1}}$	$f_{R_f/R_{b1}}$	$f_{R_c/R_{b1}}$	$f_{R_o/R_{b1}}$	$f_{R_{b2}/R_{b1}}$	$f_{R_d/R_{b1}}$	$f_{Sch/R_{b1}}$
1	1.969	0.922	1.187	0.867	0.826	0.777	0.908	12.092
2	1.971	0.926	1.188	0.868	0.825	0.778	0.909	12.089
3	1.970	0.925	1.186	0.866	0.824	0.776	0.908	12.090
平均值	1.970	0.924	1.187	0.867	0.825	0.777	0.908	12.090
RSD/%	0.04	0.23	0.09	0.12	0.10	0.13	0.08	0.01

2.9.6 f 的确定 根据以上考察结果, 最终确定各成分间的 f 分别为 $f_{R_{g1}/R_{b1}}=1.971$, $f_{R_e/R_{b1}}=0.928$, $f_{R_f/R_{b1}}=1.195$, $f_{R_c/R_{b1}}=0.870$, $f_{R_o/R_{b1}}=0.829$, $f_{R_{b2}/R_{b1}}=0.785$, $f_{R_d/R_{b1}}=0.906$, $f_{Sch/R_{b1}}=12.081$, 结果见表 7。

2.10 待测组分色谱峰的定位

本研究采用相对保留时间进行待测组分色谱峰的定位, 即以各待测组分色谱峰与 R_{b1} 色谱峰的相对保留时间来确定。以 R_{b1} 为基准峰, 计算不同仪器和不同色谱柱条件下 R_{g1} 、 R_e 、 R_f 、 R_c 、 R_o 、 R_{b2} 、

R_d 、 Sch 峰相对保留时间, 结果分别为 $t_{R_{g1}/R_{b1}}=0.340$, $t_{R_e/R_{b1}}=0.359$, $t_{R_f/R_{b1}}=0.745$, $t_{R_c/R_{b1}}=1.084$, $t_{R_o/R_{b1}}=1.109$, $t_{R_{b2}/R_{b1}}=1.181$, $t_{R_d/R_{b1}}=1.359$, $t_{Sch/R_{b1}}=1.404$, RSD 分别为 1.51%、1.93%、1.55%、0.24%、0.77%、0.62%、1.43%、1.19%, 结果见表 8。

2.11 YFI 对照图谱

取 25 批 YFI, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 精密吸取供试品溶液各 20 μ L 注入高效液相色谱仪, 得到 25 批 YFI

表 7 各成分与 R_{b1} 间的 f

Table 7 f values between components on R_{b1}

考察项目	$f_{R_{g1}/R_{b1}}$	$f_{R_e/R_{b1}}$	$f_{R_f/R_{b1}}$	$f_{R_c/R_{b1}}$	$f_{R_o/R_{b1}}$	$f_{R_{b2}/R_{b1}}$	$f_{R_d/R_{b1}}$	$f_{Sch/R_{b1}}$
不同仪器、色谱柱	1.970	0.942	1.204	0.881	0.839	0.799	0.908	12.091
不同柱温	1.969	0.921	1.189	0.866	0.828	0.781	0.905	12.114
不同体积流量	1.973	0.926	1.200	0.865	0.823	0.782	0.902	12.029
不同实验人员	1.970	0.924	1.187	0.867	0.825	0.777	0.908	12.090
平均值	1.971	0.928	1.195	0.870	0.829	0.785	0.906	12.081
RSD/%	0.09	1.01	0.69	0.87	0.86	1.24	0.32	0.30

表 8 相对保留时间

Table 8 Relative retention time values

仪器	色谱柱	$t_{R_{g1}/R_{b1}}$	$t_{R_e/R_{b1}}$	$t_{R_f/R_{b1}}$	$t_{R_c/R_{b1}}$	$t_{R_o/R_{b1}}$	$t_{R_{b2}/R_{b1}}$	$t_{R_d/R_{b1}}$	$t_{Sch/R_{b1}}$
Waters 2695-2489	Diamonsil C ₁₈	0.345	0.367	0.742	1.081	1.117	1.173	1.341	1.415
	Waters Symmetry C ₁₈	0.337	0.355	0.753	1.082	1.105	1.185	1.375	1.421
Agilent 1100	Diamonsil C ₁₈	0.343	0.363	0.73	1.086	1.099	1.177	1.343	1.385
	Waters Symmetry C ₁₈	0.334	0.352	0.755	1.086	1.115	1.189	1.376	1.396
平均值		0.340	0.359	0.745	1.084	1.109	1.181	1.359	1.404
RSD/%		1.51	1.93	1.55	0.24	0.77	0.62	1.43	1.19

HPLC 图谱, 将其导入国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2.0 版), 进行色谱峰匹配, 所得对照指纹图谱作为 YFI QAMS 的对照图谱, 见图 2, 该对照图谱可用于 YFI QAMS 法中待测人参皂苷类成分色谱峰的辅助定位。

2.12 QAMS 法与外标法测定结果比较

取 25 批 YFI, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各色谱峰峰面积, 采用外标法对 8 种人参皂苷及 Sch 进行同步定量测定, 再用所建立的 QAMS 法进行定量

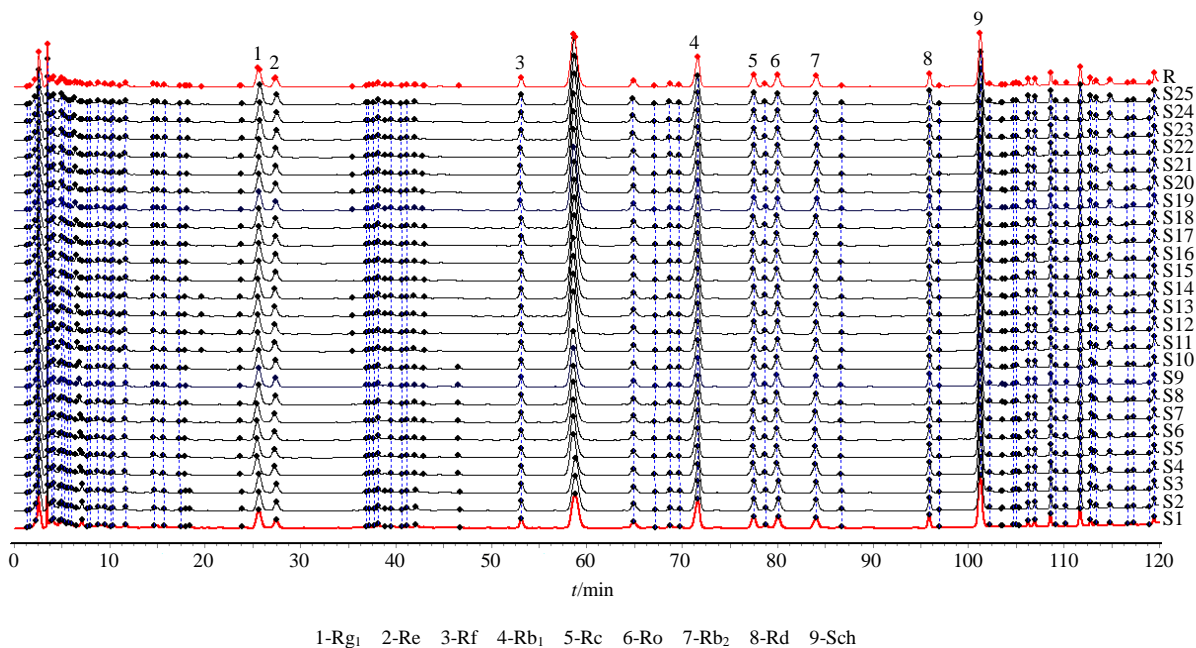


图 2 25 批 YFI 指纹图谱 (S1~S25) 及其对照图谱 (R)

Fig. 2 Fingerprint (S1—S25) and reference chromatogram (R) for 25 batches of YFI

计算, 以验证 QAMS 法用于 YFI 中多指标质量评价的准确性, 结果见表 9。结果 2 种方法测得的各种成分的量没有显著性差异, 相对偏差 (RD) < 5.0%, 表明建立的方法具有较好的可信度。

3 讨论

研究表明, 人参皂苷类成分在 203 nm 波长处的相对响应度最大^[21], 木脂素类成分在 217、254 nm 波长处的相对响应度较大^[22-23]。本实验是对 YFI 中这 2 类成分的量进行同时测定, 在其色谱条件的优化上, 比较了 3 个波长处各成分的反应度, 结果显示, 9 种成分在 203 nm 波长处的相对响应度最大, 故确定 203 nm 为本次实验的检测波长。本实验还分别以乙腈-水溶液、乙腈-0.01% 磷酸水溶液、乙腈-0.05% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.05% 磷酸水溶液作为流动相, 综合考察基线噪音、拖尾、分离度等因素, 最终选择乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相。同时, 也考察了梯度洗脱条件、色谱柱、柱温、体积流量、进样量等, 最终确定了上述色谱条件。

人参皂苷类成分的 QAMS 法研究中, 内参物一

般选择 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} ^[24-25], 本实验曾分别以 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 作为内参物, 建立 QAMS 法, 计算各成分的量, 结果选用 R_{b1} 作为内参物时, 与外标法的结果误差最小, 参照 QAMS 法建立的技术指南^[16], 内参物尽量选择出峰时间居中, 且量较高的有效成分, 故选择 R_{b1} 作为内参物。

由于 YFI 中待测成分较多, 部分品牌或型号的色谱柱无法实现各成分的良好分离, 尤其样品中 R_{g1} 与 R_e 、 R_f 与其相邻峰、 R_o 与 R_{b2} , 难以实现完全分离, 故对色谱柱品牌和型号有一定的限制。本研究中发现, 使用 Diamonsil C_{18} (2) 和 Waters Symmetry C_{18} 色谱柱时, YFI 中各成分均能实现良好分离。

待测组分数谱峰的准确定位是 QAMS 法成功应用的关键, 一般可以采用保留时间差或相对保留时间来定位待测组分数谱峰。本实验考察了相对保留时间和保留时间差在不同品牌色谱柱和不同仪器上的重现性, 结果保留时间差的波动较为明显, 不太适合作为待测组分数谱峰定位的依据, 相对保留时间的波动相对较小, 因此采用相对保留时间法进行 YFI 中各待测组分数谱峰的定位较为可靠。此外,

表 9 QAMS 法与外标法测定人参皂苷和 Sch 的结果 (n = 3)

Table 9 Determination of ginsenoside and schisandrin by QAMS and external standard methods (n = 3)

批次	Rg ₁ /(mg·g ⁻¹)		Re/(mg·g ⁻¹)		Rf/(mg·g ⁻¹)		Rc/(mg·g ⁻¹)		Rb ₁ /(mg·g ⁻¹)
	外标法	QAMS 法	外标法	QAMS 法	外标法	QAMS 法	外标法	QAMS 法	外标法
20160201	0.373	0.385	0.396	0.397	0.260	0.258	0.536	0.533	1.166
20160301	0.421	0.433	0.442	0.446	0.283	0.283	0.558	0.555	1.224
20160302	0.431	0.441	0.424	0.424	0.285	0.284	0.584	0.582	1.288
20160303	0.467	0.478	0.453	0.455	0.296	0.296	0.596	0.593	1.323
20160304	0.476	0.488	0.477	0.471	0.297	0.297	0.603	0.601	1.315
20160305	0.483	0.495	0.484	0.489	0.295	0.293	0.601	0.600	1.312
20160306	0.483	0.493	0.496	0.492	0.299	0.298	0.624	0.622	1.358
20130307	0.473	0.484	0.492	0.498	0.316	0.312	0.611	0.609	1.348
20160308	0.433	0.442	0.469	0.462	0.312	0.308	0.627	0.626	1.352
20160309	0.466	0.477	0.497	0.493	0.299	0.298	0.610	0.608	1.333
20160310	0.467	0.477	0.502	0.503	0.299	0.298	0.637	0.637	1.375
20160311	0.310	0.325	0.345	0.347	0.219	0.215	0.446	0.443	0.956
20160312	0.468	0.479	0.448	0.449	0.295	0.294	0.632	0.632	1.334
20160313	0.277	0.291	0.292	0.297	0.199	0.197	0.409	0.403	0.919
20160314	0.336	0.349	0.342	0.346	0.226	0.229	0.499	0.496	1.087
20160315	0.452	0.463	0.432	0.429	0.289	0.287	0.607	0.606	1.304
20160316	0.394	0.403	0.366	0.362	0.273	0.272	0.612	0.613	1.288
20160317	0.403	0.413	0.388	0.385	0.277	0.277	0.595	0.595	1.256
20160401	0.425	0.435	0.419	0.423	0.292	0.291	0.575	0.571	1.306
20160402	0.421	0.417	0.426	0.423	0.296	0.295	0.662	0.664	1.373
20160403	0.403	0.415	0.388	0.386	0.274	0.273	0.527	0.521	1.221
20160404	0.448	0.457	0.456	0.457	0.301	0.297	0.612	0.609	1.377
20160405	0.386	0.393	0.429	0.428	0.287	0.285	0.677	0.68	1.358
20160406	0.320	0.335	0.300	0.294	0.234	0.235	0.444	0.438	1.004
20160407	0.457	0.469	0.438	0.436	0.292	0.292	0.592	0.589	1.298

批次	Ro/(mg·g ⁻¹)		Rb ₂ /(mg·g ⁻¹)		Rd/(mg·g ⁻¹)		Sch/(mg·g ⁻¹)	
	外标法	QAMS 法	外标法	QAMS 法	外标法	— QAMS 法	外标法	QAMS 法
20160201	0.559	0.559	0.584	0.567	0.385	0.384	0.156	0.159
20160301	0.599	0.602	0.600	0.582	0.400	0.399	0.176	0.177
20160302	0.634	0.638	0.632	0.615	0.407	0.405	0.175	0.176
20160303	0.654	0.658	0.639	0.621	0.410	0.417	0.181	0.181
20160304	0.646	0.649	0.637	0.619	0.413	0.412	0.178	0.179
20160305	0.641	0.644	0.631	0.613	0.413	0.415	0.175	0.176
20160306	0.661	0.665	0.655	0.637	0.421	0.418	0.183	0.185
20130307	0.654	0.657	0.648	0.630	0.422	0.421	0.182	0.180
20160308	0.639	0.640	0.671	0.655	0.423	0.409	0.185	0.184
20160309	0.622	0.622	0.648	0.630	0.422	0.420	0.178	0.176
20160310	0.647	0.649	0.678	0.661	0.430	0.428	0.178	0.175
20160311	0.419	0.410	0.492	0.475	0.316	0.315	0.124	0.121
20160312	0.649	0.652	0.684	0.669	0.431	0.429	0.177	0.169
20160313	0.356	0.340	0.475	0.458	0.303	0.302	0.131	0.137
20160314	0.482	0.476	0.576	0.563	0.349	0.346	0.148	0.142
20160315	0.651	0.655	0.668	0.654	0.418	0.412	0.199	0.195
20160316	0.623	0.625	0.666	0.652	0.399	0.396	0.185	0.186
20160317	0.621	0.625	0.642	0.627	0.394	0.391	0.184	0.185
20160401	0.691	0.700	0.656	0.640	0.356	0.358	0.180	0.181
20160402	0.714	0.722	0.730	0.719	0.427	0.424	0.184	0.183
20160403	0.583	0.583	0.623	0.608	0.330	0.323	0.169	0.161
20160404	0.649	0.651	0.706	0.692	0.377	0.375	0.186	0.185
20160405	0.847	0.870	0.767	0.759	0.437	0.436	0.180	0.183
20160406	0.514	0.516	0.493	0.474	0.292	0.297	0.143	0.149
20160407	0.681	0.689	0.622	0.602	0.383	0.386	0.181	0.182

本实验还建立了 YFI QAMS 的对照图谱,可用于待测成分色谱峰的辅助定位。

本实验以 YFI 为例,通过方法学考察、方法的耐用性试验和系统适应性试验,对 QAMS 法应用于中药注射剂的技术适应性、可行性及不同类型化合物进行一测多评研究的准确性与可行性进行了初步探讨。结果表明,采用 QAMS 法计算的量结果与常规外标法计算的量结果没有显著性差异。通过易得的 Rb₁ 对照品与其他成分之间的 *f* 计算其他分量,实现同步测定中药注射剂多指标成分,为 YFI 多指标质量控制模式提供新方法。

参考文献

- [1] 张崇荣,牛昱光,李欣,等.注射用益气复脉治疗气阴两虚型冠心病心绞痛临床疗效观察[J].中国医药指南,2016,14(8):211-212.
- [2] 孙静,王凤,刘影哲,等.注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心绞痛136例[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(9):1034-1035.
- [3] 孙兰军,郑偕扣,郝长颖.注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心力衰竭的多中心临床研究[J].中国当代医药,2012,17(19):7-9.
- [4] 杨丽莉.注射用益气复脉(冻干)粉针对慢性心力衰竭患者心功能及血浆脑钠肽的影响[J].现代中西医结合杂志,2017,26(4):391-393.
- [5] 李广阔.注射用益气复脉(冻干)治疗扩张型心肌病的疗效观察[J].实用中西医结合临床,2014,14(3):76-77.
- [6] 顾宏韬.硫酸吗啡缓释片联合注射用益气复脉(冻干)治疗中晚期肝癌疼痛的疗效观察[J].现代药物与临床,2014,29(1):52-54.
- [7] 刘晓光,胡金芳,宋美珍,等.注射用益气复脉(冻干)对环磷酰胺诱导小鼠免疫低下的改善作用[J].药物评价研究,2016,39(6):962-965.
- [8] Li F, Tan Y S, Chen H L, *et al.* Identification of schisandrin as a vascular endothelium protective component in YiQiFuMai powder injection using HUVECs binding and HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 129(2): 1-8.
- [9] Liu C H, Ju A C, Zhou D Z, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple chemical constituents in YiQiFuMai Injection by ultra-fast liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 640-653.
- [10] 张奇,叶正良,王薇丹,等.HPLC-峰面积归一法测定注射用益气复脉(冻干)中总木脂素的含量[J].辽宁中医杂志,2011,38(11):2239-2241.
- [11] Zhou D D, Jiang S J, Tong L, *et al.* Quantitative determination of eight major constituents in the traditional Chinese medicinal Yi-Qi-Fu-Mai Preparation by LC[J]. *Chromatographia*, 2009, 70(5): 969-974.
- [12] 乔晓莉,肖学风,周大铮,等.UPLC-MS/MS法同时测定注射用益气复脉(冻干)中13种成分[J].中草药,2014,45(23):3402-3407.
- [13] 韩晓萍,李德坤,周大铮,等.近红外光谱法快速测定注射用益气复脉(冻干)中人参总皂苷的含量[J].光谱实验室,2011,28(4):1889-1891.
- [14] 韩晓萍,李德坤,周大铮,等.近红外光谱法测定注射用益气复脉(冻干)中的10种人参皂苷[J].中国中药杂志,2011,36(12):1603-1605.
- [15] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.
- [16] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):656-658.
- [17] 胡雪艳,李焕清,邓红,等.指纹图谱与一测多评法相结合评价荔枝多酚提取物[J].中草药,2017,48(3):490-498.
- [18] 程丽丽,许妍妍,Eric N,等.一测多评法测定乌头类药材中生物碱[J].现代药物与临床,2013,28(4):528-534.
- [19] 张亚非,王雪,毕宇安,等.一测多评法测定热毒宁注射液中9种成分[J].中草药,2013,44(22):3162-3169.
- [20] Sun J, Jiang Z Z, Yan R Q, *et al.* Quality evaluation of *Astragali Radix* products by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 272-279.
- [21] 郭冲,郜玉钢,臧埔,等.HPLC法同时测定人参及其制剂中16种人参皂苷[J].中草药,2014,45(14):2009-2013.
- [22] 胡俊扬,陆兔林,毛春芹,等.HPLC法同时测定不同产地五味子中8种木脂素类成分[J].中成药,2012,34(2):313-316.
- [23] 黄文倩,李丽,肖永庆,等.HPLC同时测定五味子中6种木脂素类成分[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):63-66.
- [24] 代百东,孙莉琼,李艳静,等.“一测多评”法测定腰痛通胶囊中5种皂苷类成分的含量[J].世界科学技术—中医药现代化,2014,16(10):2227-2232.
- [25] 张美玲,蔡广知,宋媛,等.基于一测多评法的人参叶药材、提取物及制剂中皂苷测定方法研究[J].药物分析杂志,2015,35(6):997-1001.