

一测多评法同时测定生脉注射液中 12 个成分

李佳寅¹, 张小平¹, 方梦婷², 张子雯², 叶春颖², 姬翔宇², 魏真真², 詹淑玉^{2*}

1. 嘉兴学院附属医院 心内科, 浙江 嘉兴 314001

2. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001

摘要: 目的 建立同时测定生脉注射液中 12 个成分含量的一测多评 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS) 方法。方法 采用 HPLC 法, 以人参皂苷 Rb₁ 为参照物, 建立其它 11 个成分人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙的相对校正因子 ($f_{k/s}$), 并对 $f_{k/s}$ 进行耐用性考察。采用外标法和 QAMS 法测定生脉注射液中 12 个成分含量, 比较两者的差异, 验证 QAMS 法的可行性和准确性。结果 各个成分的 $f_{k/s}$ 重复性良好, 对 14 份生脉注射液样品运用 QAMS 法和外标法得到的各成分含量无显著性差异 (RSD < 3%); 不同厂家、不同批号之间的成分含量差异较大。14 份样品中 12 个成分人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙的质量浓度分别为 83.3~141.9、85.9~183.2、34.6~64.4、137.0~316.4、47.2~99.1、84.6~235.0、60.9~147.9、9.5~28.7、32.2~117.2、17.4~34.7、9.8~23.9 和 2.0~8.7 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 所建立的 QAMS 法准确性高, 可用于生脉注射液多成分的同时定量分析, 为生脉注射液的全面质量控制提供方法参考。

关键词: 生脉注射液; 一测多评; 人参皂苷; 五味子醇甲; 五味子醇乙; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7484-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.010

Simultaneous quantitative determination of 12 components in Shengmai Injection by QAMS method

LI Jia-yin¹, ZHANG Xiao-ping¹, FANG Meng-ting², ZHANG Zi-wen², YE Chun-ying², JI Xiang-yu², WEI Zhen-zhen², ZHAN Shu-yu²

1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiaying University, Jiaying 314001, China

2. Medical College, Jiaying University, Jiaying 314001, China

Abstract: Objective To establish a new method of quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) for simultaneously determination of 12 components in Shengmai Injection (生脉注射液, SMI). **Methods** Ginsenoside Rb₁ was used as the reference to calculate the relative correction factors ($f_{k/s}$) of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rf, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rh₁, ginsenoside Rc, ginsenoside Rb₂, ginsenoside Rb₃, ginsenoside Rd, ginsenoside 20(S)-Rg₃, schisandrin and schisandrin B by HPLC, and then the durability of $f_{k/s}$ was investigated. The feasibility and accuracy of QAMS method were validated by comparing the determination of 12 components in SMI with the external standard method (ESM). **Results** The repeatability of $f_{k/s}$ for each component was good. There was no significant difference (RSD < 3%) between the measured values of QAMS method and ESM. There were significant difference in the components contents of SMI from different manufacturers and different batch numbers. The concentrations of ginsenoside Rg₁, Re, Rf, Rb₁, Rh₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd, 20(S)-Rg₃, schisandrin and schisandrin B in 14 SMI samples were 83.3—141.9, 85.9—183.2, 34.6—64.4, 137.0—316.4, 47.2—99.1, 84.6—235.0, 60.9—147.9, 9.5—28.7, 32.2—117.2, 17.4—34.7, 9.8—23.9 and 2.0—8.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** The established QAMS method has high accuracy and it can be used for the simultaneous quantitative determination of multiple components in SMI. This method will

收稿日期: 2021-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503338); 浙江省自然科学基金资助项目 (LGF22H280004); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY18H280011); 嘉兴市科技计划项目 (2018AD32102); 嘉兴学院重点 SRT 项目 (CD8517213303); 第二批嘉兴市省市共建医学重点学科—心血管病学 (2019-ss-xxgbx); 心肌缺血的基础与临床研究创新团队 (2018-xjqxctd)

作者简介: 李佳寅, 硕士, 主治医师。E-mail: 350830794@qq.com

*通信作者: 詹淑玉, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理学与中药药动学。Tel: (0573)83643865 E-mail: zhansy2000@163.com

provide a method reference for the comprehensive quality control of SMI.

Key words: Shengmai Injection; QAMS; ginsenoside; schisandrin; schisandrin B; quality control

生脉注射液 (Shengmai Injection, SMI) 是由红参、麦冬和五味子 3 味中药组成的复方制剂, 在临床上广泛用于治疗心肌梗塞、心源性休克、感染性休克等症, 也用于其它如抗肺疾病^[1]、癌症化疗^[2]等的辅助治疗。SMI 是一种确有疗效的中药复方注射剂, 为中药保护品种, 入选《国家基本药物目录》, 也是近期国家卫生健康委提出的治疗新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 的中成药之一^[3]。

中药复方多成分的定性、定量分析是中药质量控制的基础, 也是开展中药基础研究的重要内容。目前对于 SMI 的定性分析研究已经广泛开展^[4-5], 然而对于其多成分的定量研究还很有限, 现有方法主要基于 HPLC/UPLC, 采用常规外标法测定了 SMI 中少数几个含量较高、对照品易得且价廉的人参皂苷及木脂素类成分^[6-9], 但由于中药多成分的复杂性, 现有研究还无法用于全面控制 SMI 的质量, 特别是对于一些缺乏对照品或对照品难以获取、价格昂贵的成分, 对其进行定量分析还存在一定困难。因此, 迫切需要开发和应用新的技术方法以帮助提高 SMI 的质量控制水平。

一测多评 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS) 是近年来在中药研究领域内普遍认可、应用较广泛的中药质量控制模式, 它是利用中药各有效成分内在函数关系 (相对校正因子), 可以通过只测定某一典型组分的含量, 来实现多指标成分的同时测定^[10]。目前在中药质量控制中 QAMS 的研究方法体系日益完善, 其应用范围不断扩大^[11-17], 但基于 QAMS 法的 SMI 多指标成分同时分析的研究还未见报道。本研究采用 QAMS 法对 SMI 多成分进行定量分析, 以含量高、价廉易得的人参皂苷 Rb₁ (Rb₁) 为参照物, 求算 SMI 中其它 11 种成分人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、Re、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃、五味子醇甲和五味子醇乙的相对校正因子 ($f_{k/s}$), 并对 $f_{k/s}$ 进行耐用性考察。最后基于 QAMS 法对来自不同厂家、不同批号的多批次 SMI 进行 12 种成分的含量测定, 并与外标法的结果进行比较, 证明 QAMS 法的可行性。本研究首次采用 QAMS 法开展 SMI 的多指标定量分析, 以期为 SMI 的全面质量控制提供

技术手段和科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ThermoFisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; XS105DU 型电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; HC-1014 型高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 超纯水机, Millipore SAS 67120 Molsheim France。

1.2 试剂

对照品 Rg₁ (批号 8797, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Re (Re, 批号 5121, 质量分数 98.6%)、人参皂苷 Rf (Rf, 批号 7880, 质量分数 99.0%)、人参皂苷 Rh₁ (Rh₁, 批号 3148, 质量分数 98.5%)、人参皂苷 Rc (Rc, 批号 8180, 质量分数 99.0%)、人参皂苷 Rb₂ (Rb₂, 批号 2761, 质量分数 98.3%)、人参皂苷 Rb₃ (Rb₃, 批号 8886, 质量分数 98.2%)、人参皂苷 Rd (Rd, 批号 4899, 质量分数 98.7%)、人参皂苷 20(S)-Rg₃ (20(S)-Rg₃, 批号 6604, 质量分数 98.5%)、五味子醇甲 (批号 2329, 质量分数 99.0%) 和五味子醇乙 (批号 3249, 质量分数 98.3%) 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对照品 Rb₁ (批号 110704-202029, 质量分数 99.0%) 由中国食品药品检定研究院提供。甲醇、乙腈, 色谱纯, 河北百灵威超精细材料有限公司; 醋酸, 色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 水为超纯水。收集来自 2 个厂家、不同批次以及勾兑处理后的共 14 份 SMI 进行含量测定, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.02% 醋酸水溶液 (A) - 0.02% 醋酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~20 min, 20%~22% B; 20~30 min, 22%~24% B; 30~45 min, 24%~28% B; 45~70 min, 28%~42% B; 70~90 min, 42%~58% B; 90~105 min, 58%~69% B; 105~115 min, 69%~73% B; 115~125 min, 73%~87% B; 125~126 min, 87%~20% B, 平衡 20 min; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL, 色谱图见图 1。

表 1 SMI 样品信息
Table 1 Sources of SMI

编号	批号	生产厂家
S1	20030101002	华润三九(雅安)药业有限公司
S2	200704CU01	华润三九(雅安)药业有限公司
S3	200802CU02	华润三九(雅安)药业有限公司
S4	200802CU03	华润三九(雅安)药业有限公司
S5	16060604	江苏苏中药业集团股份有限公司
S6	17010402	江苏苏中药业集团股份有限公司
S7	20030502	江苏苏中药业集团股份有限公司
S8	S1、S2 各 50% 勾兑而成	
S9	S2、S3 各 50% 勾兑而成	
S10	S3、S4 各 50% 勾兑而成	
S11	S4、S5 各 50% 勾兑而成	
S12	S5、S6 各 50% 勾兑而成	
S13	S6、S7 各 50% 勾兑而成	
S14	S1、S7 各 50% 勾兑而成	

2.2 单一对照品储备液的制备

精密称取 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 4.11、3.92、1.15、4.00、1.21、1.15、1.14、4.10、1.21、1.26、1.14、1.14 mg/mL 的单一对照品储备液, 并于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取 SMI 或勾兑处理后的样品适量, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下各对照品储备液适量混合, 加 80% 甲醇制成 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙质量浓度分别为 328.8、301.8、283.0、392.0、298.9、136.1、228.3、411.6、196.1、132.3、32.2、28.5 μg/mL 的混合对照品溶液, 并采

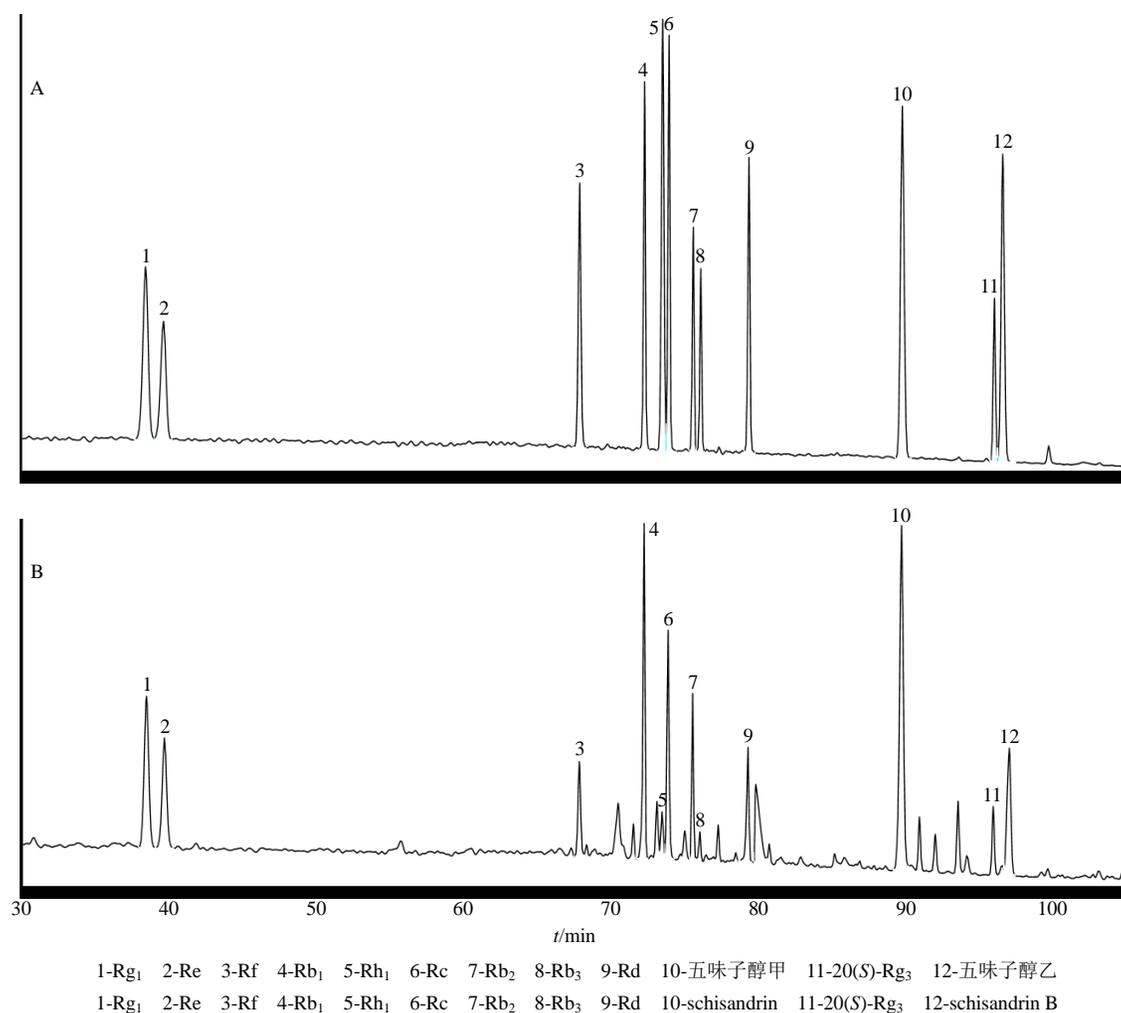


图 1 混合对照品 (A) 与 SMI 供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed references (A) and samples (B)

用 80% 甲醇逐级稀释，制得系列质量浓度的混合对照品溶液，稀释倍数依次为 1.25、2、2、2、2.5 倍，按“2.1”项色谱条件测定。以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，计算回归方程以及相关系数 (R^2)。根据信噪比 (S/N) 3 和 10 分别确定 12 个成分的检测限和定量限。结果 (表 2) 表明，12 个成分在相应的质量浓度范围内线性关系良好。

表 2 12 个成分的线性回归方程、检测限和定量限

Table 2 Linear regression equations, limit of detection and lower limit of quantification of twelve components

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
Rg ₁	$y=10.97x-4.82$	0.993 5	6.58~328.80	1.96	6.58
Re	$y=6.60x+105.93$	0.990 3	6.04~301.84	1.81	6.04
Rf	$y=7.94x+63.92$	0.990 4	5.66~283.02	1.70	5.66
Rb ₁	$y=8.35x+33.28$	0.999 6	7.84~392.00	2.34	7.84
Rh ₁	$y=11.23x+24.69$	0.994 8	5.98~298.87	1.79	5.98
Rc	$y=5.87x+10.27$	0.999 8	2.72~136.05	0.82	2.72
Rb ₂	$y=6.66x+12.28$	0.999 1	4.57~228.34	1.37	4.57
Rb ₃	$y=7.98x+45.39$	0.993 5	8.23~411.64	2.47	8.23
Rd	$y=7.37x+38.49$	0.999 5	3.92~196.14	1.18	3.92
20(S)-Rg ₃	$y=8.99x+28.80$	0.994 6	2.65~132.30	0.79	2.65
五味子醇甲	$y=114.08x+17.21$	0.994 6	0.64~32.15	0.19	0.64
五味子醇乙	$y=101.70x+6.45$	0.995 7	0.57~28.50	0.17	0.57

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S1) 适量，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，每次 20 μL ，记录峰面积，计算 RSD 值。结果 12 个成分 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙峰面积的 RSD 分别为 0.23%、2.05%、2.73%、0.58%、1.83%、2.05%、2.81%、1.89%、0.94%、2.23%、0.41%、2.78%，表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密吸取同一批号的 SMI(S1) 6 份，按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液，以“2.1”项下色谱条件进样分析，制作随行标准曲线求算 6 份样品的平均质量浓度及 RSD 值。结果 12 个成分 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙的平均质量浓度分别为 113.5、185.7、64.8、286.3、64.0、227.8、145.7、28.2、114.1、34.5、13.8、8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，RSD 值分别为 2.02%、2.22%、2.68%、1.33%、1.75%、0.95%、0.92%、2.81%、1.41%、1.17%、1.15%、1.10%，表明方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S1) 适量，分别于 0、2.5、5、7.5、8、15、24 h 以“2.1”项下色谱条件进样分析，记录各个测定时间点的峰面积，计算 RSD 值。结果 12 种成分 Rg₁、

Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙峰面积的 RSD 分别为 1.19%、1.82%、2.31%、0.97%、1.85%、2.06%、2.90%、2.45%、0.91%、3.00%、2.53%、2.83%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 精密吸取已测定各成分含量的同一批号 SMI (S1) 6 份，各精密加入 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙质量浓度分别为 111.0、203.8、73.6、232.0、79.9、293.3、159.6、16.4、154.9、40.3、19.4、11.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，以“2.1”项下色谱条件进样分析，测定各成分质量浓度，并计算加样回收率和 RSD 值。结果 12 种成分 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙的平均加样回收率分别为 102.4%、100.3%、96.8%、101.1%、101.1%、102.9%、101.0%、101.0%、101.0%、100.9%、105.1%、104.9%，RSD 分别为 3.71%、3.00%、2.19%、2.28%、2.22%、1.97%、2.23%、4.09%、4.06%、3.50%、2.57%、2.01%。

2.5 f_{kls} 测定

精密吸取混合对照品溶液 10、12、15、20、25、28、30 μL ，以“2.1”项下色谱条件进样分析，记

录各成分峰面积,以Rb₁为参照物,分别计算Rg₁、Re、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃及五味子醇甲和五味子醇乙的 $f_{k/s}$ (表3)。

$$f_{k/s} = f_k / f_s = C_k A_s / C_s A_k$$

C_k 为待测成分质量浓度, A_k 为待测成分峰面积, C_s 为参照物质量浓度, A_s 为参照物峰面积

表3 各成分的 $f_{k/s}$
Table 3 $f_{k/s}$ of each component

进样量/ μL	$f_{k/s}$ (Rb ₁ 为参照物)										
	Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	20(S)-Rg ₃	五味子醇甲	五味子醇乙
10	0.612 2	0.834 7	0.699 7	0.476 8	0.912 2	0.919 5	1.010 3	0.724 5	0.603 7	0.044 1	0.051 1
12	0.625 8	0.838 6	0.710 2	0.478 8	0.900 4	0.937 3	1.062 3	0.721 9	0.634 5	0.045 5	0.051 4
15	0.619 6	0.842 5	0.708 4	0.488 2	0.915 6	0.945 7	1.008 3	0.724 4	0.621 8	0.043 2	0.050 6
20	0.621 5	0.877 4	0.705 7	0.477 1	0.913 0	0.938 3	1.053 2	0.729 2	0.625 1	0.046 0	0.049 1
25	0.633 5	0.852 6	0.721 4	0.475 6	0.900 0	0.914 8	1.087 3	0.738 7	0.636 2	0.045 1	0.051 8
28	0.609 1	0.847 6	0.714 7	0.465 5	0.915 4	0.936 6	1.010 4	0.704 5	0.592 9	0.045 5	0.052 9
30	0.598 7	0.843 4	0.706 0	0.491 8	0.904 4	0.939 5	1.031 1	0.710 4	0.596 6	0.045 8	0.051 4
平均值	0.617 2	0.848 1	0.709 5	0.479 1	0.908 7	0.933 1	1.037 6	0.721 9	0.615 8	0.045 0	0.051 2
RSD/%	1.87	1.67	0.99	1.81	0.76	1.22	2.97	1.59	2.91	2.27	2.25

2.6 $f_{k/s}$ 的耐用性考察

2.6.1 不同仪器和不同色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响 分别考察了Agilent 1260和Thermo Fisher UltiMate 3000(UltiMate 3000)2台高效液相色谱仪及Agilent Zorbax EclipseXDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Welch Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Kromasil 100-5-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3根色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响,结果在不同仪器和不同色谱柱下各成分 $f_{k/s}$ 的RSD值均小于5%(表4),表明更换仪器或色谱柱对各成分的 $f_{k/s}$ 无显著影响,适用性良好。

2.6.2 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响 考察了3个体积流量(0.8、0.9、1.0 mL/min)对 $f_{k/s}$ 的影响,结果不同体积流量下各成分 $f_{k/s}$ 的RSD均小于3%(表

5),表明体流量的波动对各成分 $f_{k/s}$ 无显著影响。

2.6.3 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响 考察了5个柱温(25、28、30、32、35 °C)对 $f_{k/s}$ 的影响,结果不同柱温下各成分 $f_{k/s}$ 的RSD均小于3%(表6),表明不同柱温对各成分 $f_{k/s}$ 无显著影响。

2.7 待测成分色谱峰定位

本研究考察了采用不同仪器和不同色谱柱时,Rg₁、Re、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃、五味子醇甲、五味子醇乙和参照物Rb₁的相对保留时间,对各待测成分进行色谱峰定位,结果各成分相对保留时间的RSD均小于5%(表7),表明可利用相对保留时间对各成分进行定位。

2.8 QAMS法与外标法测定结果比较

对表1来自不同厂家、不同批号和勾兑处理的

表4 不同仪器、不同色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响

Table 4 Effects of different instruments and chromatographic columns on $f_{k/s}$

仪器	色谱柱	$f_{k/s}$										
		Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	20(S)-Rg ₃	五味子醇甲	五味子醇乙
Agilent 1260	Agilent C ₁₈	0.613 6	0.853 2	0.687 7	0.455 6	0.899 5	0.925 0	1.033 9	0.724 3	0.606 5	0.048 3	0.050 7
	Welch C ₁₈	0.614 9	0.878 4	0.701 2	0.481 3	0.895 6	0.928 7	1.015 3	0.713 0	0.605 2	0.047 7	0.051 3
	Kromasil C ₁₈	0.626 3	0.856 1	0.698 7	0.480 4	0.872 7	0.930 0	1.009 3	0.701 9	0.619 5	0.046 3	0.053 1
UltiMate 3000	Agilent C ₁₈	0.609 6	0.838 5	0.703 4	0.470 8	0.874 2	0.946 3	1.028 3	0.679 3	0.615 6	0.044 0	0.049 2
	Welch C ₁₈	0.625 9	0.853 8	0.708 4	0.485 8	0.907 7	0.974 6	1.070 6	0.730 5	0.640 4	0.045 4	0.050 4
	Kromasil C ₁₈	0.599 0	0.844 1	0.693 2	0.497 6	0.933 7	0.990 6	1.106 8	0.785 2	0.598 7	0.047 5	0.053 3
平均值		0.614 9	0.854 0	0.698 8	0.478 6	0.897 2	0.949 2	1.044 0	0.722 4	0.614 3	0.046 5	0.051 3
RSD/%		1.68	1.60	1.06	2.98	2.53	2.88	3.59	4.95	2.41	3.50	3.14

表5 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响
Table 5 Effects of different flow rates on $f_{k/s}$

体积流量/ (mL·min ⁻¹)	$f_{k/s}$										
	Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	20(S)-Rg ₃	五味子醇甲	五味子醇乙
0.8	0.616 5	0.850 9	0.705 0	0.457 0	0.903 0	0.942 7	1.039 2	0.720 5	0.611 2	0.046 4	0.053 0
0.9	0.611 3	0.855 0	0.685 6	0.480 0	0.937 9	0.931 6	1.050 2	0.719 5	0.630 9	0.046 0	0.052 1
1.0	0.615 4	0.849 7	0.702 0	0.476 3	0.888 0	0.946 6	1.035 0	0.710 6	0.602 0	0.045 6	0.051 4
平均值	0.614 4	0.851 9	0.697 6	0.471 1	0.909 6	0.940 3	1.041 5	0.716 9	0.614 7	0.046 0	0.052 1
RSD/%	0.45	0.33	1.50	2.62	2.81	0.83	0.75	0.76	2.41	0.96	1.52

表6 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响
Table 6 Effects of different column temperatures on $f_{k/s}$

柱温/°C	$f_{k/s}$										
	Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	20(S)-Rg ₃	五味子醇甲	五味子醇乙
25	0.629 7	0.841 9	0.722 4	0.485 4	0.896 4	0.932 2	1.050 9	0.725 6	0.625 3	0.045 8	0.049 4
28	0.616 5	0.841 7	0.717 3	0.476 3	0.908 7	0.944 4	1.053 3	0.691 3	0.623 7	0.045 5	0.051 8
30	0.613 6	0.853 2	0.687 7	0.455 6	0.899 5	0.925 0	1.033 9	0.724 3	0.606 5	0.048 3	0.050 7
32	0.611 7	0.846 4	0.702 3	0.472 4	0.913 1	0.912 5	1.005 2	0.715 6	0.626 9	0.047 4	0.049 1
35	0.620 2	0.860 2	0.721 7	0.480 8	0.925 6	0.930 6	0.988 6	0.718 2	0.617 1	0.048 0	0.048 7
平均值	0.618 3	0.848 7	0.710 3	0.474 1	0.908 7	0.928 9	1.026 4	0.715 0	0.619 9	0.047 0	0.050 0
RSD/%	1.15	0.94	2.12	2.41	1.28	1.25	2.78	1.94	1.35	2.71	2.61

表7 不同仪器、不同色谱柱对相对保留时间的影响
Table 7 Effects of different instruments and chromatographic columns on relative retention values

仪器	色谱柱	相对保留时间										
		Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	20(S)-Rg ₃	五味子醇甲	五味子醇乙
Agilent 1260	Agilent C ₁₈	0.505 3	0.519 3	0.926 1	1.017 7	1.026 6	1.053 0	1.060 9	1.112 6	1.378 1	1.301 2	1.414 2
	Welch C ₁₈	0.512 9	0.526 0	0.932 5	1.021 7	1.026 6	1.053 3	1.061 4	1.114 4	1.384 1	1.286 0	1.394 0
	Kromasil C ₁₈	0.471 6	0.475 2	0.920 4	1.013 3	1.026 9	1.053 4	1.061 5	1.113 8	1.384 9	1.282 1	1.391 6
UltiMate 3000	Agilent C ₁₈	0.496 9	0.511 6	0.912 0	1.007 7	1.024 0	1.047 3	1.054 6	1.098 7	1.337 4	1.261 0	1.365 9
	Welch C ₁₈	0.531 7	0.548 5	0.939 0	1.017 0	1.023 0	1.045 7	1.052 7	1.098 0	1.328 2	1.241 8	1.336 0
	Kromasil C ₁₈	0.502 4	0.520 9	0.929 4	1.009 9	1.022 8	1.045 4	1.052 2	1.096 6	1.327 5	1.237 9	1.333 4
平均值		0.503 5	0.516 9	0.926 6	1.014 6	1.025 0	1.049 7	1.057 2	1.105 7	1.356 7	1.268 3	1.372 5
RSD/%		3.92	4.64	1.02	0.52	0.19	0.38	0.43	0.79	2.10	2.01	2.41

14 份样品,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,分别采用外标法、QAMS 法计算含量,每种样品平行测定 3 份,求算平均含量。将 QAMS 法与外标法测定的含量采用 RSD 进行比较,结果 14 种样品中 12 个成分的 RSD 均小于 3% (表 8),表明 2 种方法含量测定结果无明显差异。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

SMI 是由 3 味中药组成的复方制剂,成分复杂,

特别是其中人参皂苷的种类较多。为了使多成分达到较好的分离效果,对流动相的组成进行了考察,比较了甲醇-水、乙腈-水和添加不同比例酸(甲酸、醋酸或磷酸)对梯度洗脱的分离效果,结果显示在有机相和水相中分别添加 0.02% 醋酸可以提高分离度、改善峰形;另外,对流动相比例梯度进行精细优化,综合考虑体积流量、分析时间和样品成分的复杂性,最终确定了在体积流量为 0.8 mL/min 条件下的最优梯度洗脱条件,该条件下 12 种成分在 100 min 内分离效果良好。

表8 外标法和 QAMS 法检测结果比较

Table 8 Comparison of determination of 12 components in SMI by ESM and QAMS

样品	Rg ₁ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Re/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rf/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rh ₁ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%
S1	113.5	113.0	0.29	188.3	183.2	1.96	64.3	65.9	1.69	64.8	65.7	1.06
S2	91.8	91.8	0.02	127.0	124.7	1.27	51.6	52.9	1.78	50.3	51.2	1.27
S3	93.4	93.3	0.04	90.5	89.9	0.42	40.8	41.9	1.89	62.5	63.4	1.08
S4	91.2	91.2	0.01	90.4	89.8	0.42	43.9	45.1	1.85	63.4	64.4	1.07
S5	83.3	83.5	0.13	86.3	85.9	0.28	34.6	35.6	1.98	48.5	49.4	1.31
S6	109.2	108.9	0.25	120.2	118.3	1.15	44.2	45.3	1.85	82.6	83.6	0.89
S7	141.9	140.9	0.53	124.1	121.9	1.22	64.4	66.0	1.69	98.0	99.1	0.80
S8	99.1	98.9	0.12	152.4	148.9	1.62	51.3	52.6	1.78	52.6	53.5	1.23
S9	93.7	93.6	0.05	113.4	111.8	1.01	42.5	43.7	1.87	49.9	50.9	1.28
S10	94.3	94.3	0.06	92.3	91.7	0.48	41.6	42.7	1.88	58.5	59.5	1.14
S11	87.7	87.8	0.05	87.8	87.4	0.33	36.1	37.1	1.96	46.3	47.2	1.36
S12	96.3	96.2	0.08	105.4	104.1	0.83	39.2	40.3	1.91	63.4	64.4	1.07
S13	128.7	127.9	0.43	126.4	124.2	1.26	50.9	52.2	1.78	88.9	90.0	0.85
S14	125.5	124.8	0.40	150.1	146.8	1.59	60.1	61.6	1.72	78.8	79.9	0.92
样品	Rc/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rb ₂ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rb ₃ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rd/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%
S1	228.5	235.0	2.00	146.3	147.9	0.78	28.5	28.7	0.52	114.8	117.2	1.50
S2	153.7	158.6	2.23	95.7	97.1	1.06	19.3	19.4	0.36	74.8	76.8	1.84
S3	81.3	84.6	2.86	63.2	64.5	1.47	12.2	12.2	0.07	41.1	42.6	2.64
S4	83.8	87.2	2.82	62.5	63.8	1.48	11.5	11.5	0.03	41.1	42.7	2.64
S5	92.1	95.7	2.70	59.6	60.9	1.54	10.0	10.0	0.10	30.8	32.2	3.22
S6	170.8	176.1	2.16	122.7	124.3	0.88	20.7	20.9	0.39	84.6	86.7	1.73
S7	193.4	199.2	2.09	125.3	126.8	0.87	20.1	20.3	0.38	61.2	63.0	2.06
S8	187.6	193.2	2.10	119.5	121.1	0.90	23.6	23.8	0.45	96.6	98.9	1.62
S9	107.6	111.5	2.53	78.5	79.9	1.23	15.5	15.6	0.24	57.7	59.4	2.13
S10	83.4	86.8	2.82	61.8	63.1	1.50	11.4	11.4	0.02	40.2	41.8	2.67
S11	85.9	89.3	2.78	59.9	61.2	1.54	9.5	9.5	0.15	34.7	36.1	2.96
S12	126.1	130.5	2.38	90.0	91.4	1.11	14.5	14.5	0.20	56.8	58.5	2.15
S13	170.6	175.9	2.16	121.0	122.5	0.89	19.7	19.8	0.37	65.9	67.8	1.97
S14	205.7	211.7	2.05	135.6	137.2	0.82	22.4	22.5	0.43	87.0	89.2	1.71
样品	20(S)-Rg ₃ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			五味子醇甲/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			五味子醇乙/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Rb ₁ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法		
S1	34.5	34.7	0.47	13.8	14.1	1.57	8.5	8.7	1.28	287.1		
S2	29.6	29.8	0.36	12.6	12.9	1.67	4.4	4.5	1.40	186.1		
S3	28.7	28.9	0.34	13.0	13.3	1.63	4.9	4.8	1.38	137.0		
S4	28.2	28.3	0.32	12.9	13.2	1.64	4.8	4.7	1.38	137.3		
S5	18.3	18.2	0.11	9.5	9.8	2.05	1.9	2.0	1.73	146.1		
S6	17.8	17.8	0.14	20.5	20.8	1.22	7.7	7.9	1.29	316.4		
S7	35.9	36.2	0.50	23.5	23.9	1.13	6.8	6.9	1.31	308.2		
S8	32.1	32.3	0.42	11.6	11.9	1.76	5.8	5.9	1.34	227.6		
S9	20.7	20.8	0.04	11.3	11.6	1.80	4.8	4.9	1.38	160.5		
S10	27.8	28.0	0.31	11.8	12.1	1.75	4.5	4.6	1.39	137.0		
S11	22.4	22.4	0.12	10.4	10.7	1.91	3.2	3.3	1.49	139.7		
S12	17.5	17.4	0.17	14.4	14.7	1.52	4.9	5.0	1.37	223.0		
S13	22.4	22.8	1.11	20.2	20.6	1.23	7.5	7.6	1.29	297.8		
S14	31.2	31.3	0.40	17.7	18.0	1.33	6.0	6.1	1.33	291.5		

3.2 指标成分和参照物的选择

多数研究表明, SMI 的主要物质组成包括来自红参的人参皂苷类成分和来自五味子的木脂素类成分, 这些成分构成 SMI 的药效物质基础^[18-19]。因此, 本研究选择了活性明确、含量较高的代表性成分作为 SMI 质量控制的指标性成分进行 QAMS 法的含量测定, 主要包括二醇型人参皂苷 Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃, 三醇型人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rh₁ 以及木脂素成分五味子醇甲和五味子醇乙。

从含量测定结果看, Rb₁ 在 12 个成分中含量最高, 与其它成分分开明显, 在谱图中最易识别, 其保留时间约为 72 min, 处于色谱图的中位, 利于其它成分色谱峰的相对保留时间计算和色谱峰的识别, 而且 Rb₁ 性质稳定、价廉易得, 因此, 本研究选择 Rb₁ 作为参照物, 其符合 QAMS 法中参照物选择的基本要求。

3.3 QAMS 法的准确性及含量测定结果

本研究在不同品牌仪器和色谱柱、不同柱温、不同体积流量等条件下考察了 QAMS 方法的重现性, 并通过对不同厂家、不同批次和勾兑处理的 SMI 的 12 个成分进行了含量测定, 结果 QAMS 法计算的含量结果与外标法无显著性差异, 证明了 QAMS 法的准确性。含量测定结果发现, 14 份样品中 11 个成分人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rh₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd、20(S)-Rg₃ 及五味子醇甲和五味子醇乙的质量浓度分别为 83.3~141.9、85.9~183.2、34.6~64.4、137.0~316.4、47.2~99.1、84.6~235.0、60.9~147.9、9.5~28.7、32.2~117.2、17.4~34.7、9.8~23.9、2.0~8.7 μg/mL, 不同厂家、不同批号 SMI 中 12 种成分含量存在较大差异, 这种差异可能与药材来源和质量、生产过程和工艺控制水平等诸多因素有关, 因此, 还应提高 SMI 的质量控制标准。

SMI 中化学成分众多, 以外标法测定各成分含量需要对照品的数量多, 部分对照品价格昂贵且难以获取, 采用 QAMS 法测定各成分含量, 能极大地减少对对照品使用数量, 节约成本, 使 SMI 多成分的同时检测更加便利、可行。本研究以 Rb₁ 为参照物, 可以在缺少其他对照品的情况下, 通过 $f_{k/s}$ 计算多种成分的含量, 为 SMI 的全面质量控制提供了新的方法参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Huang X, Duan X, Wang K, et al. Shengmai injection as

an adjunctive therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Complement Ther Med*, 2019, 43: 140-147.

[2] Duan B, Xie J, Rui Q, et al. Effects of Shengmai injection add-on therapy to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis [J]. *Support Care Cancer*, 2018, 26(7): 2103-2111.

[3] 宋如琚, 黄玉宇, 沈夕坤, 等. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案推荐中成药的合理使用探讨 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(7): 782-787.

[4] Zheng C, Hao H, Wang X, et al. Diagnostic fragmentation-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44(2): 230-244.

[5] Li F, Cheng T F, Dong X, et al. Global analysis of chemical constituents in Shengmai injection using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 61-72.

[6] 夏晶, 王钢力, 季申, 等. HPLC 测定生脉注射液中 4 种成分的含量 [J]. *中成药*, 2006, 28(1): 27-31.

[7] 陆娟, 李绪文, 魏巍, 等. RP-HPLC 测定生脉注射液中 7 个人参皂苷类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(12): 2302-2304.

[8] 王进, 张平, 唐海涛, 等. HPLC 法同时测定生脉注射液中 9 种成分 [J]. *中成药*, 2013, 35(3): 508-512.

[9] 董晓茜, 杨瑞, 唐思, 等. UPLC 法同时测定生脉注射液中 6 种指标性成分 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(4): 834-836.

[10] 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): 657-658.

[11] 刘颖新, 冯传平, 刘利利, 等. 一测多评法同时测定二至丸中 8 个成分 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(2): 210-218.

[12] 卢焘韬, 王雪莲, 穆成林, 等. 一测多评法结合指纹图谱在枳壳质量评价中的应用 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 558-566.

[13] 张龙, 李珊珊, 白雪, 等. 基于一测多评法的淫羊藿质量评价方法研究及验证 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2843-2851.

[14] 许海燕, 何春喜, 罗思旭, 等. 指纹图谱与一测多评法相结合测定积雪草中 5 种三萜类成分 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(3): 181-188.

- [15] Gao M, Han X, Huang J, *et al.* Simultaneous determination of multiple active 2-(2-phenylethyl) chromone analogues in agarwood by HPLC, QAMS, and UPLC-MS [J]. *Phytochem Anal*, 2021, 32(3): 412-422.
- [16] Su C, Li C, Sun K, *et al.* Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS [J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127180.
- [17] Stavrianidi A, Stekolshchikova E, Porotova A, *et al.* Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 132: 87-92.
- [18] Zhan S, Ding B, Ruan Y E, *et al.* A simple blood microdialysis in freely-moving rats for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling study of Shengmai injection with simultaneous determination of drug concentrations and efficacy levels in dialysate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 154: 23-30.
- [19] Zhang X, Zhang J, Ji X, *et al.* A quantitative serum proteomic analysis helps to explore the comprehensive mechanism and identify serum biomarkers of Shengmai Injection's effect on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 666429.

[责任编辑 郑礼胜]