

¹H-NMR 定量测定黄芪注射液中亲水性成分和疏水性成分

杨嘉誉¹, 徐绍静², 张琪², 应旭辉², 李文竹¹, 潘坚扬¹, 瞿海斌^{1*}

1. 浙江大学药学院, 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

2. 正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023

摘要: **目的** 建立黄芪注射液中亲水性成分和疏水性成分的 ¹H-NMR 定量分析方法。**方法** 以 10% 氘代水 (10% D₂O) 和氘代甲醇 (CD₃OD) 为氘代溶剂制备黄芪注射液亲水性成分和疏水性成分的 ¹H-NMR 样品。使用 Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪采集 ¹H-NMR 图谱, 具体实验参数如下: Noesygppr1D 脉冲序列; 温度为 298 K, 数据点 32 K, 采集时间 (AQ) 为 2.980 s, 脉冲宽度 (SW) 为 7 211.54 Hz, 弛豫延迟时间 (D1) 分别为 15.0 s 和 20.0 s, 频率偏移 (O1) 分别为 2 816.65 Hz 和 2 930.31 Hz, 接收器增益 (RG) 值为 57, 扫描次数 (NS) 32 次。**结果** 在 ¹H-NMR 图谱中归属出 33 种成分, 分别是异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、乳酸、焦谷氨酸、天冬酰胺、 γ -氨基丁酸、脯氨酸、甲酸、乙酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸、丙二酸、蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、尿苷、腺苷、胞苷、鸟苷、腺嘌呤、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷以及异黄烷苷。对其中 27 种化学成分 (异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、乳酸、焦谷氨酸、天冬酰胺、 γ -氨基丁酸、脯氨酸、甲酸、乙酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸、丙二酸、蔗糖、果糖、葡萄糖、胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、尿苷、腺苷、鸟苷、腺嘌呤、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷) 进行定量, 可定量的成分占注射液固含量 90% 以上。该方法的精密度、重复性、样品稳定性和耐用性良好, 各个成分线性关系良好, r^2 大于 0.999 0, 加样回收回收率为 98.19%~101.40%。**结论** 建立了一种简单、快速、可靠的 ¹H-NMR 定量方法用于测定黄芪注射液中的亲水性成分和疏水性成分, 为黄芪注射液的质量评价提供了新的分析手段。

关键词: 质子核磁共振; 黄芪注射液; 含量测定; 中药注射剂; 亲水性成分; 疏水性成分; ¹H-NMR 定量分析方法; 异亮氨酸; 缬氨酸; 丙氨酸; 乳酸; 焦谷氨酸; 天冬酰胺; γ -氨基丁酸; 脯氨酸; 甲酸; 乙酸; 富马酸; 苹果酸; 琥珀酸; 丙二酸; 蔗糖; 果糖; 葡萄糖; 胆碱; 甜菜碱; 葫芦巴碱; 尿苷; 腺苷; 鸟苷; 腺嘌呤; 黄芪皂苷 III; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3321-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.011

Quantitative determination of hydrophilic and hydrophobic components in *Astragalus* Injection based on ¹H-NMR

YANG Jiayu¹, XU Shaojing², ZHANG Qi², YING Xuhui², LI Wenzhu¹, PAN Jianyang¹, QU Haibin¹

1. Institute of Pharmaceutical Informatics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China

Abstract: Objective To establish a ¹H-NMR quantitative method for the hydrophilic and hydrophobic components in *Astragalus* Injection (黄芪注射液). **Methods** ¹H-NMR samples of hydrophilic and hydrophobic components in *Astragalus* Injection were prepared with 10% deuterated water (10% D₂O) and deuterated methanol (CD₃OD), respectively. Then Bruker Avance III 600 NMR spectrometer was used to collect ¹H-NMR spectra. The parameters were set up as follows: Noesygppr1D pulse sequence, temperature was 298 K, data point was 32 K, acquisition time (AQ) was 2.980 s, pulse width (SW) was 7 211.54 Hz, relaxation delay time (D1) was 15.0 s and 20.0 s, respectively, frequency offset (O1) were 2 816.65 Hz and 2 930.31 Hz, respectively, receiver gain (RG) was 57, and the number of scans (NS) was 32. **Results** A total of 33 components were assigned, namely isoleucine, leucine, valine, alanine, lactate, pyroglutamate, asparagine, γ -aminobutyric acid, proline, formate, acetate, fumaric acid, malic acid, succinic acid, malonic acid, sucrose, fructose, lactose, glucose, choline, betaine, trigonelline, uridine, adenosine, cytidine, guanosine, adenine, astragaloside III, astragaloside IV, ononin, calycosin-7-glucoside, 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-glucoside and isomucronulatol 7-O-glucoside.

收稿日期: 2023-11-17

作者简介: 杨嘉誉, 博士研究生, 研究方向为中药科学与工程学。E-mail: yangjy98@zju.edu.cn

*通信作者: 瞿海斌。Tel: (0571)88208428 E-mail: quhb@zju.edu.cn

Quantitative analysis was conducted for 27 chemical constituents, including isoleucine, valine, alanine, lactate, pyroglutamate, asparagine, γ -aminobutyric acid, proline, formate, acetate, fumaric acid, malic acid, succinic acid, malonic acid, sucrose, fructose, glucose, choline, betaine, trigonelline, uridine, adenosine, guanosine, adenine, astragaloside III, astragaloside IV and calycosin-7-glucoside. The components that can be quantified by this method account for more than 90% of the solid content in the injection. The methodological validation results showed that the method's precision, repeatability, sample stability, and robustness were good. The linear of each component was good, the correlation coefficient was more than 0.999 0, and the recovery rate ranged from 98.19% to 101.40%. **Conclusion** A simple, rapid and reliable ^1H -NMR quantitative method was established to determine hydrophilic and hydrophobic components in *Astragalus* Injection, which provided a new analytical method for the quality evaluation of *Astragalus* Injection.

Key words: proton nuclear magnetic resonance; *Astragalus* Injection; content determination; traditional Chinese medicine Injection; hydrophilic components; hydrophobic components; ^1H -NMR quantitative method; isoleucine; valine; alanine; lactate; pyroglutamate; asparagine; γ -aminobutyric acid; proline; formate; acetate; fumaric acid; malic acid; succinic acid; malonic acid; sucrose; fructose; glucose; choline; betaine; trigonelline; uridine; adenosine; guanosine; adenine; astragaloside III; astragaloside IV; calycosin-7-glucoside

黄芪注射液是黄芪经过提取、浓缩、纯化等步骤制备得到的中药注射剂,具有益气养元、扶正祛邪、养心通脉和健脾利湿等作用,临床上常用于心肌炎和糖尿病肾病的治疗^[1]。黄芪注射液中所含成分复杂,包括氨基酸、黄酮、皂苷、有机酸和核苷等多类成分^[2],目前,报道的定量分析方法主要针对黄芪注射液中的糖类和皂苷类成分,常用比色法或高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法分析。比色法用于测定注射液中总糖或者总皂苷的含量,在显色过程中需要用到浓硫酸或高氯酸等强酸试剂^[3-4];HPLC-ELSD方法相较于比色法有较强的特异性,可以测定注射液中少量几个糖或黄芪皂苷的含量^[5-6]。这2种方法都需要对样品进行柱色谱预处理。另外还有一些方法,包括固相萃取-高效液相色谱联用(RP-HPLC)、液相色谱-质谱联用(LC-MS-MS),可以对黄芪注射液中一些黄酮类成分定量^[7-8]。上述方法均仅针对黄芪注射液中一类成分或单一成分进行分析,大部分化学成分含量未能测得,因此难以全面评价其质量。质子核磁共振(proton nuclear magnetic resonance, ^1H -NMR)是具有高重现性的非特异性分析技术,在进行混合物分析时,可以采集到混合物中几乎所有含氢化学成分的信息,根据信号强度与对应氢原子数成正比关系, ^1H -NMR还可对化合物进行定量分析,具有检测速度快、无需随行标曲、非破坏性等优点,因此被广泛应用在新药研发、结构分析和药物质量控制中^[9-15]。目前,已有学者应用 ^1H -NMR结合全谱去卷积(global spectral decomposition, GSD)开发了黄芪注射液中8种初生代谢成分定量方法^[16]。该方法先将注射液冻干之后用氘代水复溶后进行 ^1H -NMR分

析,预处理简单,分析速度快,但是该方法仅针对注射液中的初生代谢成分进行分析,忽视了注射液中的次生代谢产物,分析并不全面。众所周知,中药的次生代谢物是中药有效成分的物质基础,也是质量控制中不可或缺的一部分^[17]。为了进一步提升黄芪注射液质量控制水平,本研究开发了一种基于 ^1H -NMR对黄芪注射液中27种成分定量的方法,该方法样品制备简单、实验用时短,可同时定量注射液中糖、核苷、生物碱和皂苷等多类成分,提高了分析效率,扩大了可分析成分范围,为黄芪注射液的质量控制提供了新方法。

1 仪器与材料

Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪(配 24 位自动进样器与 5 mm BBO 探头,Topspin 工作站)、Bruker Avance NEO 500 型核磁共振波谱仪(配 60 位自动进样器与 Cryoprobe 低温探头,Topspin 工作站),德国 Bruker 公司;AE 200 型电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;5425 型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;Labconco 型冷冻干燥机,美国 Labconco 公司。

13 批黄芪注射液(国药准字 Z33020179)由正大青春宝药业有限公司提供,批号分别为 2101022、2101033、2103271、2103283、2103302、2109163、2109172、2109191、2109193、2109202、2201173、2201182、2201192,编号分别为 B1~B13。3-(3-甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP,批号 SZBA83XV,质量分数 $\geq 99\%$)、氘代水(D_2O ,氘含量 $\geq 99\%$)、异亮氨酸(批号 P500099,质量分数 $\geq 99\%$)、对苯二甲酸二甲酯(DMT,批号 BCBF6171V,质量分数 $\geq 99\%$)、亮氨酸(批号 P500105,质量分数 $\geq 99\%$)、缬氨酸(批号 P500172,质量分数 $\geq 99\%$)、丙氨酸

(批号 P500110, 质量分数 $\geq 99\%$)、脯氨酸(批号 LRAA0931, 质量分数 $\geq 99\%$)、 γ -氨基丁酸(批号 BCCC4017, 质量分数 $\geq 99\%$)、焦谷氨酸(批号 BCCB9703, 质量分数 $\geq 99\%$)、甲酸钙(批号 200805, 质量分数 $\geq 98\%$)、乳酸(批号 SLCK7977, 质量分数 $\geq 99\%$)、醋酸钠(批号 S30210HHV, 质量分数 $\geq 99\%$)、天冬酰胺(BCBH4243V, 质量分数 $\geq 99\%$)、富马酸(批号 BCBF2132V, 质量分数 $\geq 99\%$)、蔗糖(批号 WXBD0906V, 质量分数 $\geq 99\%$)、苹果酸(批号 200603, 质量分数 $\geq 99\%$)、果糖(批号 WXBD8068V, 质量分数 $\geq 99\%$)、琥珀酸(批号 C4444685, 质量分数 $\geq 99\%$)、丙二酸(批号 200420, 质量分数 $\geq 99\%$)、半乳糖(批号 WXBD9902V, 质量分数 $\geq 99\%$)、葡萄糖(批号 WXBD7093V, 质量分数 $\geq 99.5\%$)、甜菜碱(批号 210125, 质量分数 $\geq 98\%$)、氯化胆碱(批号 210520, 质量分数 $\geq 98\%$)、盐酸葫芦巴碱(批号 211205, 质量分数 $\geq 98\%$)、尿苷(批号 SLCB8621, 质量分数 $\geq 99\%$)、腺嘌呤(批号 WXBD1877V, 质量分数 $\geq 99\%$)、黄芪皂苷 III(批号 200728, 质量分数 $\geq 98\%$)、黄芪甲苷(批号 200802, 质量分数 $\geq 98\%$)、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷(批号 200903, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮苷(批号 200923, 质量分数 $\geq 98\%$)、腺苷(批号 WXBD0809V, 质量分数 $\geq 99\%$)、芒柄花苷(批号 200921, 质量分数 $\geq 98\%$)、胞苷(批号 BCCB521, 质量分数 $\geq 99\%$)、异黄烷苷(批号 200326, 质量分数 $\geq 98\%$)、鸟苷(批号 BCCB9660, 质量分数 $\geq 98\%$)以及用于方法学考察的氨基酸、核苷类、糖类化学对照品以及 DMT、TSP 和富马酸购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 含 0.03% 四甲基硅烷(TMS)的氘代甲醇(CD_3OD , 氘含量 $\geq 99.8\%$)购自美国剑桥同位素实验室有限公司; 醋酸钠购自天津希恩思生化科技有限公司; 琥珀酸购自上海麦克林生化科技有限公司; 其余对照品均购自上海融禾医药科技有限公司; 去离子水由纯化水系统 Milli-Q Synthesis(美国 Millipore 公司)制备得到。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 亲水性成分 $^1\text{H-NMR}$ 样品的制备 准确量取 540 μL 黄芪注射液与 60 μL D_2O (含内标 TSP 0.29 mmol/L), 混合均匀后转移至 5 mm 标准核磁管, 以待分析。

2.1.2 疏水性成分 $^1\text{H-NMR}$ 样品的制备 准确量取

黄芪注射液 1 000 μL 冷冻干燥后, 加入 CD_3OD (含内标 DMT 1.0 mmol/L) 600 μL , 混合均匀后转移至 5 mm 标准核磁管, 以待分析。

2.2 $^1\text{H-NMR}$ 仪器参数

使用 Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪记录所有样品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 频率为 600.27 MHz。首先, 使用经典的溶剂压制脉冲 ZGPR 用于优化发射机频率偏移(O1)的参数, 使水信号压制达到最佳效果。优化结果为, 亲水性成分分析时 O1 为 2 816.65 Hz, 疏水性成分分析时 O1 为 2 930.31 Hz。之后采用 Noesygppr1D 脉冲序列获得 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 具体采集参数如下: 温度为 298 K, 数据点 32 K, 脉冲宽度(SW) 7 211.54 Hz, 采集时间(AQ) 2.980 s, 90° 脉冲宽度 14.75 μs , 混合时间 0.05 s, 为了使成分和内标的信号峰均弛豫完全, 分析亲水性成分和疏水性成分的弛豫延迟时间(D1)分别为 15.0 s 和 20.0 s; 接收器增益(RG)为 57, 扫描次数(NS) 32 次。

2.3 数据分析方法

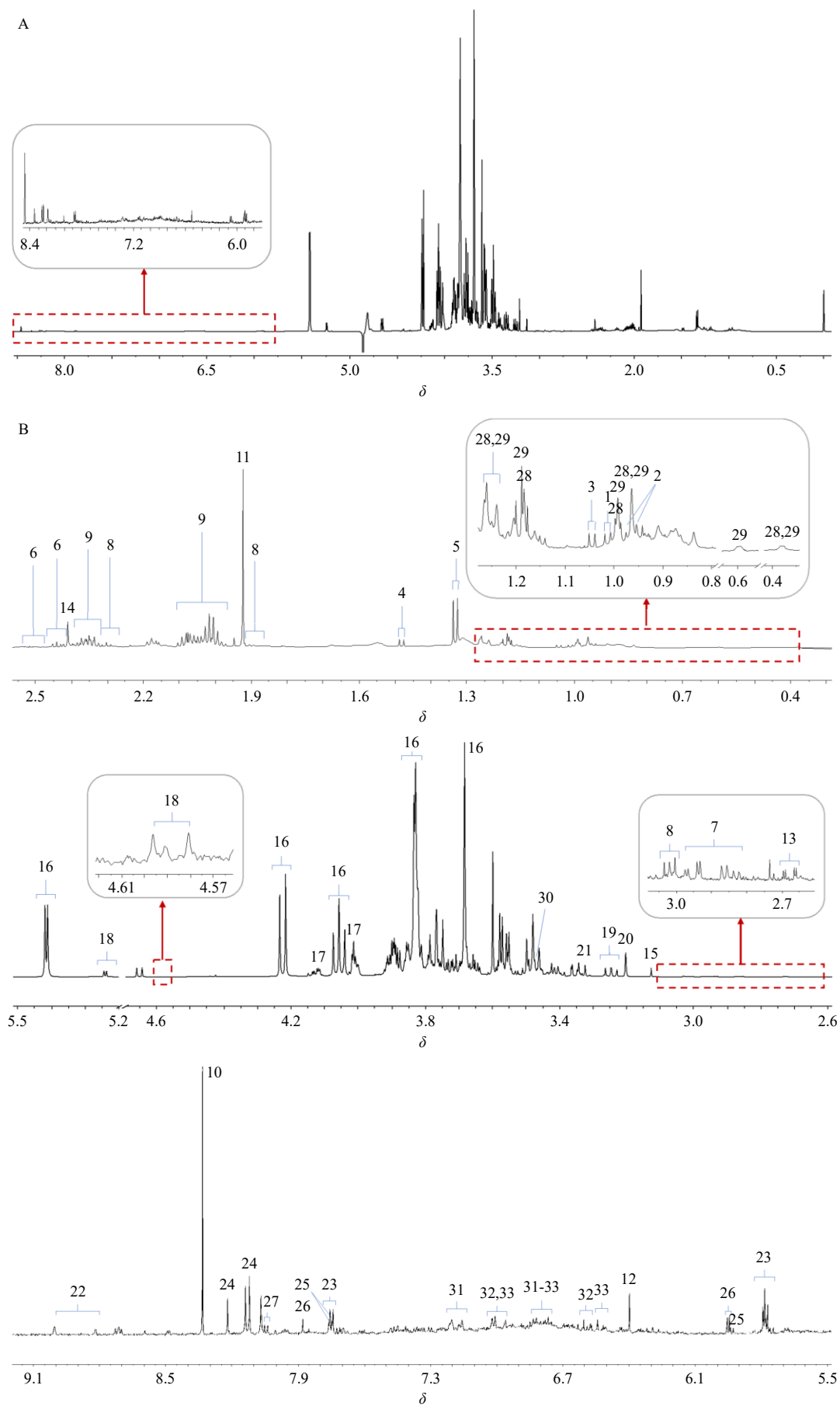
所有样品的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图在软件 MestReNova (version 14.2.1) 和 Bruker Topspin (version 4.1.4) 中进行处理。傅里叶变换之前, 以 0.30 Hz 的指数函数为的窗函数对原始数据进行处理。在 Bruker Topspin 软件中进行手动相位校正后, 以 TSP 信号(0.00)或 TMS 信号(0.00)为参考进行化学位移对齐处理。在进行化学成分特征峰归属之后, 使用 MestReNova 软件中的线性拟合模块进行半自动积分。最后, 应用内标法对各高于定量限的化学成分进行定量, 按式(1)进行计算。

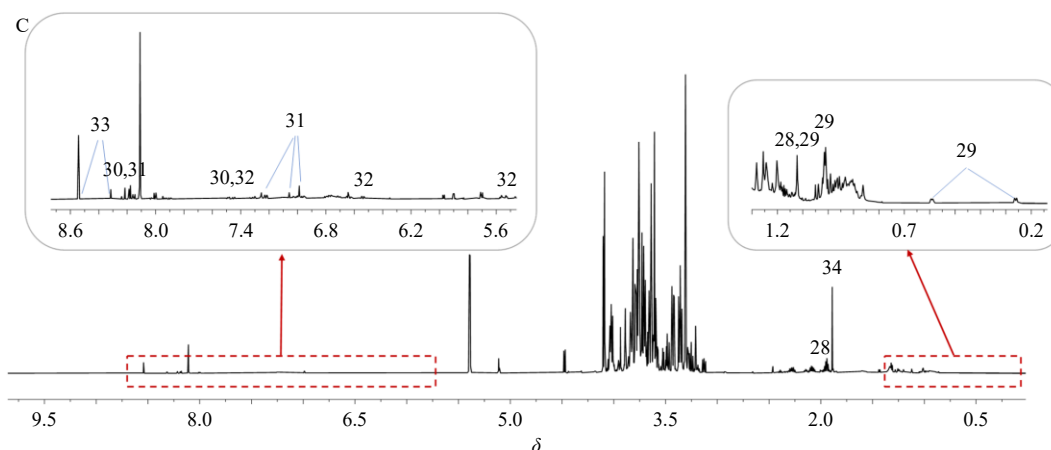
$$C_x = A_x N_s M_x C_s / A_s N_x M_s \quad (1)$$

C_x 和 C_s 分别是待测化学组分和内标的质量浓度, A_x 和 A_s 分别是待测化学组分和内标的特征峰面积, N_x 和 N_s 分别是待测化学组分和内标的特征峰质子数, M_x 和 M_s 分别是待测化学组分和内标的相对分子质量

2.4 $^1\text{H-NMR}$ 图谱信号归属与定量峰选择

利用上述的分析方法得到黄芪注射液的 $^1\text{H-NMR}$ 全谱, 通过文献检索注射液中可能存在的成分, 在比对待照品图谱之后加标验证的方法^[2,16,18], 从图谱中归属出 33 个成分, 归属结果如图 1 所示, 包括 7 种氨基酸(异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、焦谷氨酸、天冬酰胺、脯氨酸), 8 种小分子有机酸(乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸、丙二酸、 γ -氨基丁酸), 3 种生物碱(甜菜碱、





1-异亮氨酸; 2-亮氨酸; 3-缬氨酸; 4-丙氨酸; 5-乳酸; 6-焦谷氨酸; 7-天冬酰胺; 8-γ-氨基丁酸; 9-脯氨酸; 10-甲酸; 11-乙酸; 12-富马酸; 13-苹果酸; 14-琥珀酸; 15-丙二酸; 16-蔗糖; 17-果糖; 18-半乳糖; 19-葡萄糖; 20-胆碱; 21-甜菜碱; 22-葫芦巴碱; 23-尿苷; 24-腺苷; 25-胞苷; 26-鸟苷; 27-腺嘌呤; 28-黄芪皂苷 III; 29-黄芪甲苷; 30-芒柄花苷; 31-毛蕊异黄酮苷; 32-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷; 33-异黄烷苷。
1-isoleucine; 2-leucine; 3-valine; 4-alanine; 5-lactate; 6-pyrogutamate; 7-asparagine; 8-γ-aminobutyric acid; 9-proline; 10-formate; 11-acetate; 12-fumaric acid; 13-malic acid; 14-succinic acid; 15-malonic acid; 16-sucrose; 17-fructose; 18-lactose; 19-glucose; 20-choline; 21-betaine; 22-trigonelline; 23-uridine; 24-adenosine; 25-cytidine; 26-guanosine; 27-adenine; 28-astragaloside III; 29-astragaloside IV; 30-ononin; 31-calycosin-7-glucoside; 32-9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-glucoside; 33-isomucronulatol 7-O-glucoside.

图 1 黄芪注射液亲水性成分 $^1\text{H-NMR}$ 全谱 (A)、黄芪注射液亲水性成分归属 (B)、黄芪注射液疏水性成分 $^1\text{H-NMR}$ 全谱 (C) 及成分归属

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of hydrophilic components of *Astragalus* Injection (A), attribution of hydrophilic components of *Astragalus* Injection (B), $^1\text{H-NMR}$ spectrum and component attribution of hydrophobic components in *Astragalus* Injection (C)

胆碱、葫芦巴碱), 4 种糖 (蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖), 5 种核苷类成分 (尿苷、腺苷、胞苷、鸟苷、腺嘌呤) 以及 6 种黄芪皂苷/黄酮苷类成分 (黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、芒柄花苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮苷、异黄烷苷), 以上 24 种初级代谢产物和 9 种次级代谢产物均为黄芪药材中固有的成分或这些成分在生产过程中转化出来的成分^[19-20]。由于直接在注射液中加入 D_2O 制样时, 黄芪皂苷/黄酮苷类成分等疏水性成分的信号非常弱(图 1-B), 因此, 将注射液冻干后使用 CD_3OD 复溶再制样分析, 随着取样量增加, 疏水性成分的信号强度变大, 利于观察和后续进一步定量。

归属出的 33 个化学成分中, 有 7 个成分无法定量。其中, 亮氨酸信号重叠严重, 无可以积分的独立信号; 胞苷、半乳糖、芒柄花苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷、异黄烷苷信号较弱无法积分定量。如图 2 所示, 进行疏水性成分 $^1\text{H-NMR}$ 分析时, 发现注射液图谱中黄芪皂苷 III 的信号强度非常低, 基本淹没在噪声中; 黄芪甲苷在 δ_{H} 0.25 和 δ_{H} 0.59 处的信号, 信噪比较低, 在 δ_{H} 1.02 和 δ_{H} 4.30 处的信号存在重叠, 这些信号均无法用于定量。参考文献发现, 有学者使用人参皂苷类成分共有的信

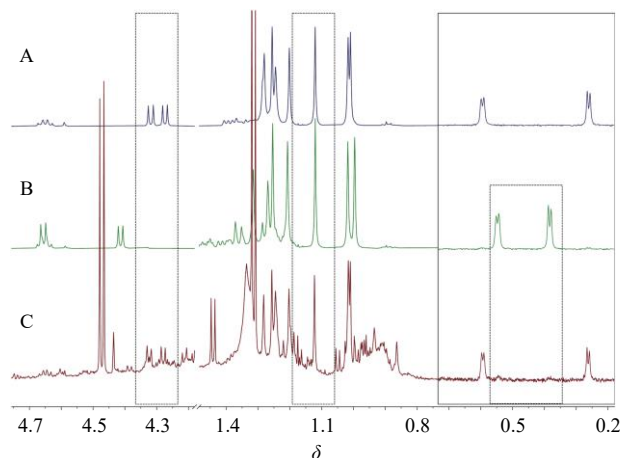


图 2 黄芪甲苷 (A)、黄芪皂苷 III (B) 和黄芪注射液疏水性成分 (C) 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (δ_{H} 0.20~4.75)

Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra (δ_{H} 0.20—4.75) of astragaloside IV (A), astragaloside III (B) and hydrophobic component of *Astragalus* Injection (C)

号峰对人参总皂苷进行定量^[13], 所以, 本研究选择黄芪甲苷和黄芪皂苷 III 在 δ_{H} 1.12 处的共有信号, 对该信号进行 3 次手动积分, 取平均值后计算二者的总物质的量。黄芪甲苷、黄芪皂苷 III 的相对分子质量均为 784.97, 因此, 开发的定量方法可以得到两者的总质量浓度。本研究开发的 $^1\text{H-NMR}$ 方法可

对黄芪注射液中的 27 个化学成分进行定量, 定量峰的选择结果如图 3 及表 1 所示。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一批次(批号 2109172)的

黄芪注射液, 按“2.1”项下的方法制备 1 份供试品溶液, 并按照“2.2”项中的条件连续分析 6 次, 精密度考察结果如表 2 所示, RSD 为 1.54%~2.93%, 这说明仪器精密度良好。

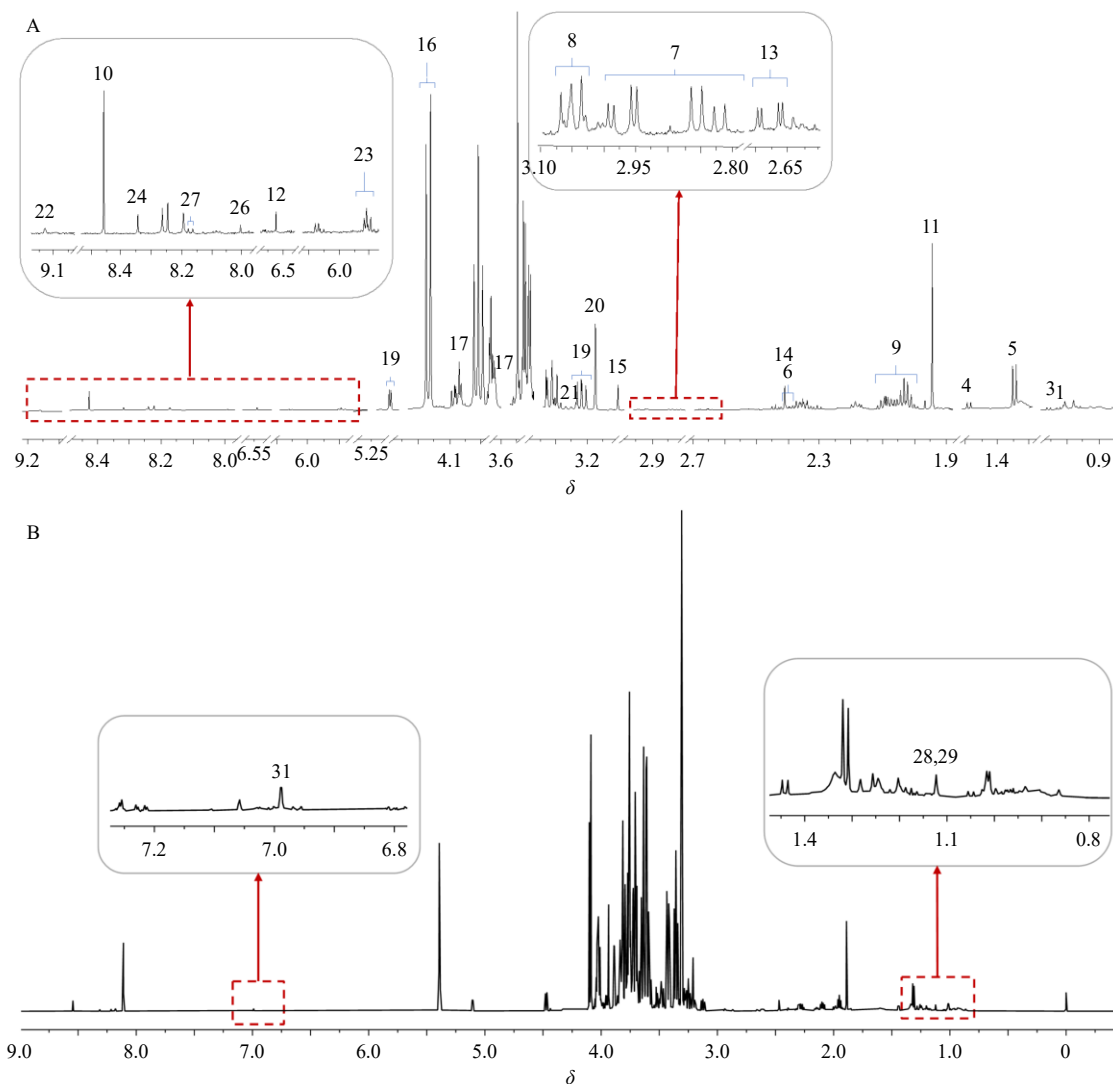


图 3 黄芪注射液亲水性成分 (A) 和疏水性成分 (B) 的定量峰

Fig. 3 Quantitative peaks of hydrophilic components (A) and hydrophobic components (B) in *Astragalus* Injection

2.5.2 重复性试验 取同一批次(批号 2109172)的黄芪注射液, 按“2.1”项下的方法制备 6 份供试品溶液, 并按照“2.2”项中的分析条件分析, 结果如表 2 所示, RSD 为 1.53%~3.15%, 这说明制样重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一批次(批号 2109172)的黄芪注射液, 按“2.1”项下的方法制备 1 份供试品溶液, 在 0、6、12、24、36、48 h 分别按照“2.2”项中的条件采集 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 结果如表 2 所示, RSD 为 0.88%~3.43%, 这说明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.4 耐用性试验 取同一批次(批号 2109172)的黄芪注射液, 按“2.1”项下的方法制备 1 份供试品溶液, 分别在 296.5、297.0、297.5、298.0、298.5、299.0 K 6 个温度点下, 按照“2.2”项中的条件进行分析, 结果如表 2 所示, RSD 为 1.50%~2.92%, 这说明方法的温度耐用性良好。

取同一批次(批号 2201091)的黄芪注射液, 按“2.1”项下的方法制备 1 份供试品溶液, 分别在 600 型和 500 型 2 台核磁共振谱仪下, 按照“2.2”项中的条件进行分析, 对 2 种方法的定量结果进行回归分析, 相关系数为 0.9999, 这说明在这 2 台不同型

表 1 黄芪注射液 ¹H-NMR 方法定量峰的选择结果 (600 MHz NMR)

Table 1 Quantitative peaks selection results of ¹ H-NMR method for Astragalus Injection (600 MHz NMR)									
峰号	名称	δ _H	峰号	名称	δ _H	峰号	名称	δ _H	
1	异亮氨酸	1.01 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, H-6)	12	富马酸	6.52 (s, H-2)	20	胆碱	3.20 (s, H-3, 4, 5)	
3	缬氨酸	1.04 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, H-3)	13	苹果酸	2.85 (dd, <i>J</i> = 16.8, 7.8 Hz, H-3)	21	甜菜碱	3.27 (s, H-3, 4, 5)	
4	丙氨酸	1.48 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-3)	14	琥珀酸	2.41 (s, H-2, 3)	22	葫芦巴碱	9.13 (s, H-3)	
5	乳酸	1.33 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, H-3)	15	丙二酸	3.13 (s, H-2)	23	尿苷	5.91 (m, H-2, 5')	
6	焦谷氨酸	2.43 (m, H-4)	16	蔗糖	4.22 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-4')	24	腺苷	8.34 (s, H-5)	
7	天冬酰胺	2.90 (m, H-3)	17	果糖	4.00 (m, Pyr-H-5β, Fur-H-4α), 4.03 (dd, <i>J</i> = 12.8, 1.4 Hz, Pyr-H-6β)	26	鸟苷	8.00 (s, H-5)	
8	γ-氨基丁酸	3.02 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, H-4)			4.12 (m, Fur-H-3/4β, Fur-H-3α)	27	腺嘌呤	8.26 (s, H-5)	
9	脯氨酸	2.12~1.96 (m, H-3, 4)	19	葡萄糖	3.25 (dd, <i>J</i> = 7.9, 9.6 Hz, Glu-H-5β), 5.24 (d, <i>J</i> = 3.8 Hz, Glu-H-6α)	28	黄芪皂苷 III	1.12 (s, H-28)	
10	甲酸	8.46 (s, H-1)				29	黄芪甲苷	1.12 (s, H-28)	
11	乙酸	1.92 (s, H-2)				31	毛蕊异黄酮苷	6.99 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, H-5')	

化合物 1~27 氘代溶剂为 10% D₂O; 化合物 28~31 氘代溶剂为 CD₃OD。
 The deuterated solvent for compounds 1 to 27 is 10% D₂O; the deuterated solvent for compounds 28 to 31 is CD₃OD.

表 2 黄芪注射液 ¹H-NMR 定量方法方法学考察结果

Table 2 Methodological investigation results of quantitative ¹ H-NMR method for Astragalus Injection									
成分	RSD/%				线性回归方程	<i>r</i> ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
	精密度	重复性	稳定性	耐用性					
异亮氨酸	2.67	2.86	2.18	2.65	<i>Y</i> = 0.021 0 <i>X</i> + 0.003 2	0.999 2	6.7~36.8	100.93	0.21
缬氨酸	2.81	2.03	1.38	2.67	<i>Y</i> = 0.023 6 <i>X</i> + 0.000 2	0.999 0	4.8~37.7	100.66	0.81
乳酸	2.91	1.98	2.63	2.60	<i>Y</i> = 0.189 9 <i>X</i> - 0.013 8	0.999 1	21.0~219.0	99.34	0.93
丙氨酸	1.98	2.88	2.63	1.50	<i>Y</i> = 0.047 2 <i>X</i> + 0.002 2	0.999 5	11.2~76.9	100.37	0.15
乙酸	2.77	2.30	1.74	2.87	<i>Y</i> = 0.167 6 <i>X</i> + 0.065 9	0.999 7	132.2~334.5	99.55	1.23
脯氨酸	2.62	1.72	2.42	2.46	<i>Y</i> = 0.839 4 <i>X</i> + 0.069 2	0.999 1	220.5~1 398.0	98.82	0.97
琥珀酸	2.26	2.70	2.81	1.65	<i>Y</i> = 0.055 7 <i>X</i> - 0.001 8	0.999 1	10.5~88.0	99.94	0.40
焦谷氨酸	2.52	2.70	1.68	1.26	<i>Y</i> = 0.138 5 <i>X</i> + 0.001 7	0.999 1	26.6~223.7	100.30	0.56
苹果酸	2.25	1.91	1.98	2.75	<i>Y</i> = 0.040 1 <i>X</i> + 0.000 5	0.999 8	16.3~64.6	100.28	0.97
天冬酰胺	2.22	2.82	0.88	1.89	<i>Y</i> = 0.087 7 <i>X</i> + 0.003 5	0.999 1	21.5~142.9	98.20	0.60
γ-氨基丁酸	2.57	2.25	2.48	2.57	<i>Y</i> = 0.059 9 <i>X</i> - 0.000 0	0.999 3	12.8~95.9	99.98	0.39
丙二酸	2.66	1.53	1.55	2.70	<i>Y</i> = 0.121 1 <i>X</i> + 0.003 0	0.999 2	27.0~194.8	100.80	0.43
胆碱	2.25	2.19	2.31	2.37	<i>Y</i> = 0.126 1 <i>X</i> + 0.005 4	0.999 0	27.7~205.3	101.40	0.60
葡萄糖	2.64	2.49	2.31	2.03	<i>Y</i> = 2.622 0 <i>X</i> + 0.083 8	0.999 8	593.6~4 252.0	101.10	1.04
甜菜碱	2.70	2.58	2.39	2.70	<i>Y</i> = 0.006 5 <i>X</i> + 0.002 1	0.999 0	3.3~12.5	100.25	1.07
果糖	2.93	2.65	1.91	2.62	<i>Y</i> = 5.073 8 <i>X</i> + 0.068 9	0.999 8	1 137.0~8 192.0	100.51	1.25
蔗糖	1.90	2.63	2.25	2.14	<i>Y</i> = 24.400 <i>X</i> - 0.044 5	0.999 5	5 195.0~39 050.0	100.25	0.75
尿苷	2.48	2.88	2.53	1.84	<i>Y</i> = 0.105 5 <i>X</i> + 0.009 2	0.999 4	29.2~176.6	100.27	0.92
富马酸	2.55	2.56	2.92	2.88	<i>Y</i> = 0.011 2 <i>X</i> - 0.001 1	0.999 2	1.2~16.8	100.44	0.54
鸟苷	2.20	3.15	3.35	3.17	<i>Y</i> = 0.030 3 <i>X</i> + 0.005 5	0.999 3	17.1~53.8	99.99	0.10
腺嘌呤	2.66	2.61	2.64	2.38	<i>Y</i> = 0.075 4 <i>X</i> - 0.004 5	0.999 3	11.6~115.9	99.07	0.31
腺苷	2.91	1.89	3.43	2.73	<i>Y</i> = 0.073 8 <i>X</i> + 0.005 1	0.999 1	19.3~123.9	100.66	1.31
甲酸	2.35	2.71	2.93	2.92	<i>Y</i> = 0.060 0 <i>X</i> + 0.002 8	0.999 4	15.1~98.1	98.19	0.87
葫芦巴碱	2.70	2.73	3.02	2.60	<i>Y</i> = 0.025 9 <i>X</i> + 0.003 5	0.999 7	13.7~45.0	99.98	1.08
毛蕊异黄酮苷	1.54	2.35	2.33	2.67	<i>Y</i> = 0.240 7 <i>X</i> - 0.011 7	0.999 1	40.0~371.4	99.90	1.16
黄芪皂苷 III/黄芪甲苷	2.67	1.83	2.43	2.80	<i>Y</i> = 0.503 9 <i>X</i> - 0.020 6	0.999 2	88.4~791.5	100.86	1.30

号的仪器分析结果一致。

2.5.5 线性关系考察 精密移取黄芪注射液（批号 2201091）200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 μL 各 2 份于安瓿瓶中，冷冻干燥挥干溶剂后，1 份加入 600 μL 的 D_2O （含内标 TSP 0.29 mmol/L），另 1 份加入 600 μL 的 CD_3OD （含内标 DMT 0.29 mmol/L），复溶后转移入 5 mm 核磁管，按“2.2”项下的方法进行分析，并计算质量浓度，以样品相对质量浓度为横坐标，计算得到的质量浓度为纵坐标进行线性回归，得到各成分的线性回归方程和线性范围，结果如表 2 所示，所有成分线性回归方程截距接近 0，相关系数（ r^2 ）为 0.999 0~0.999 8。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含量的黄芪注射液（批号 2201182），分高、中、低 3 个质量浓度组加入定量的对照品，而后按“2.1”项下的方法进行含量测定，并计算各化学组分的加样回收率，结果如表 2 所示，平均加样回收率在 98.19%~101.40%，RSD 小于 1.31%。

2.6 13 批样品测定结果

取 13 批黄芪注射液，按“2.1”项下的方法制备样品，并按照“2.2”项中的条件分析 27 种化学成分的含量，具体结果如表 3 所示，整体上看，无论是糖类成分、氨基酸、有机酸或是核苷类成分，B9 和 B11 这 2 批黄芪注射液中含量均显著高于其他批次，而

表 3 13 批黄芪注射液 $^1\text{H-NMR}$ 定量结果
Table 3 $^1\text{H-NMR}$ quantitative results of 13 batches of *Astragalus* Injection

样品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)													
	异亮氨酸	缬氨酸	乳酸	丙氨酸	乙酸	脯氨酸	琥珀酸	焦谷氨酸	苹果酸	天冬酰胺	γ-氨基丁酸	丙二酸	胆碱	葡萄糖
B1	16.181	15.069	148.611	34.231	173.210	610.272	37.537	66.008	18.888	81.252	8.800	70.045	122.925	1 677.214
B2	12.820	11.346	100.063	26.556	113.993	511.986	26.518	51.195	24.656	61.563	32.033	63.827	99.203	1 476.074
B3	16.383	13.256	71.907	28.631	153.339	551.284	21.197	57.831	22.550	51.180	34.809	67.073	115.654	1 666.098
B4	13.966	12.364	89.038	26.305	129.093	504.428	24.968	55.198	21.727	51.008	30.226	57.796	106.959	1 553.963
B5	10.907	9.917	107.741	20.190	101.525	377.213	25.126	42.234	23.238	35.561	25.661	47.451	77.619	1 124.894
B6	19.558	16.901	55.754	30.807	112.051	599.938	21.540	77.649	34.052	49.540	38.363	85.673	126.505	2 034.239
B7	14.123	12.774	31.978	21.994	110.453	426.973	18.304	57.094	26.597	34.958	27.759	67.517	101.210	1 641.202
B8	20.085	16.704	55.995	32.114	138.107	616.003	23.883	89.562	41.402	50.541	37.701	93.907	138.558	2 266.644
B9	22.616	19.737	71.436	36.994	167.393	726.678	28.654	103.032	44.912	58.690	44.521	107.942	158.966	2 623.681
B10	19.324	16.988	53.837	27.295	112.422	557.331	25.063	71.135	36.921	43.081	32.171	74.170	130.545	2 169.847
B11	25.042	20.768	43.651	37.569	195.799	742.207	23.354	96.765	42.402	95.130	51.351	98.821	151.656	2 216.825
B12	22.488	20.261	54.549	40.648	166.075	676.144	22.457	73.883	40.398	93.092	49.018	91.765	134.451	2 164.087
B13	18.291	15.199	57.935	33.478	150.969	571.554	23.440	64.213	36.946	77.754	41.399	71.657	114.654	1 670.699

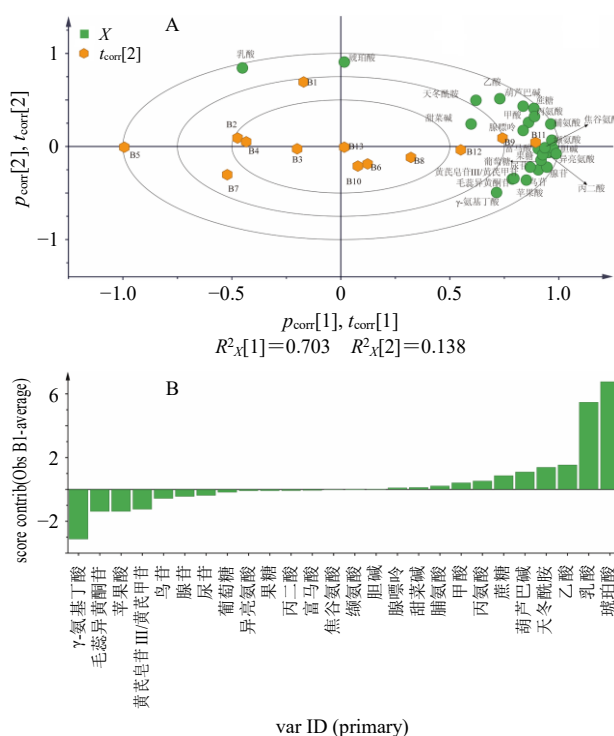
样品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)												黄芪皂苷 III/ 黄芪甲苷	毛蕊异 黄酮苷
	甜菜碱	果糖	蔗糖	尿苷	胞苷	富马酸	鸟苷	腺嘌呤	腺苷	甲酸	葫芦巴碱			
B1	6.414	3 005.994	16 139.764	65.865	10.948	6.426	20.631	25.727	40.993	38.647	22.203	181.423	56.891	
B2	6.782	2 618.752	12 577.813	55.493	12.669	6.996	21.866	16.243	37.901	28.497	16.720			
B3	5.584	3 002.519	13 886.018	71.633	10.270	5.607	24.650	29.115	47.620	34.927	15.279			
B4	5.401	2 667.466	12 560.527	64.652	11.942	5.935	20.392	21.803	41.838	34.479	15.664			
B5	5.276	1 971.863	9 341.319	50.044	8.703	4.637	13.736	15.972	26.315	22.891	11.906	166.880	62.727	
B6	6.137	3 642.755	14 464.252	83.584	13.433	8.013	26.178	24.428	59.324	33.205	17.133	262.760	136.578	
B7	5.324	2 684.059	9 730.393	61.851	9.689	4.878	22.858	16.916	40.704	31.619	14.478	253.767	94.604	
B8	6.813	3 970.462	15 015.337	96.739	14.989	7.545	29.345	24.906	59.306	38.155	18.516	265.205	139.715	
B9	7.728	4 487.670	17 455.894	104.971	20.110	8.752	33.673	31.491	62.612	41.972	23.307	271.947	121.473	
B10	5.920	3 715.866	12 040.576	110.796	22.563	8.408	33.379	24.872	58.118	31.424	15.909	246.607	99.448	
B11	8.799	4 105.030	18 046.208	103.438	22.338	9.722	33.084	29.007	65.938	47.382	24.629	345.634	184.755	
B12	4.805	3 460.779	16 619.323	93.238	15.457	8.377	32.710	30.751	60.379	39.571	22.641	338.329	156.723	
B13	5.461	2 857.207	14 233.127	66.086	11.625	7.868	23.372	27.674	45.995	29.941	21.712	281.265	137.995	

B5 和 B7 这 2 批黄芪注射液中各类成分的含量显著低于其他批次。黄芪注射液中含量较高的成分有蔗糖、果糖、葡萄糖、脯氨酸和黄芪甲苷，其中蔗糖含量最高可达 18.05 mg/mL，这 4 批黄芪注射液均为 2021 年 3 月至 2022 年 1 月之间生产，注射液生产时间较为接近，推测可能是药材差异引起的含量差异，也可能是工艺环节一致差，如醇沉工艺包裹沉淀量不同导致的批次间质量一致性差。

为了直观地观察到 13 批黄芪注射液样品的异同，以 27 个化学成分浓度为变量，以 13 个批次为观测值，应用主成分分析（principal component analysis, PCA）法从全面化学成分角度分析不同批次黄芪注射液的相似性与差异。PCA 模型中有 3 个主成分（PC1 70.3%、PC2 13.8%、PC3 6.7%）， R^2_X 为 0.903， Q^2 为 0.658。将 PCA 得分值和载荷值共同绘制成双标图（biplot），同时呈现了变量与观测值的分布，从而根据化合物浓度来解释样品批次的异同。位于样品批次附近的化学成分在这些样品中浓度较高，而在另一侧的成分在样品中浓度较低。靠近绘图原点的样品具有平均属性，接近绘图原点的变量对相关分数的形成没有贡献。

PCA 模型的双标图及得分贡献图如图 4 所示。大多数化学成分所对应的变量集中在中轴线的右侧，B9、B11 2 批黄芪注射液与这些变量的相对距离最近，说明在这 2 批黄芪注射液中这些成分的含量均较高，这与测定结果一致。乳酸、琥珀酸分布于图表的上端，距离这些变量较近的黄芪注射液批次为 B1，较远的批次为 B7，这说明 B1 批次黄芪注射液中这 2 个成分的含量相对于 B7 更高。而距离 B1 较远的一些变量所对应的成分为苹果酸、 γ -氨基丁酸，这 2 个成分在 B1 中含量较低。得分贡献图所展示的是不同成分对于样品间差异的贡献得分，其中贡献最大的是琥珀酸、乳酸和 γ -氨基丁酸，另外，黄芪皂苷和毛蕊异黄酮苷这些次级代谢产物对于样品差异也具有较大贡献。

为测试 $^1\text{H-NMR}$ 的分析能力，取一批黄芪注射液利用干燥恒重法测定了总固体含量，应用离子色谱法和电感耦合等离子体-质谱（inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS）法分别测定黄芪注射液中阴、阳离子的含量，应用 $^1\text{H-NMR}$ 测定黄芪注射液中各类成分含量，计算了每类成分在总固体中所占的比例（成分含量/总固体含量），结果见表 4。 $^1\text{H-NMR}$ 一次分析可对黄芪注射液中 90%



A-PCA 模型双标图；B-PCA 模型得分贡献图。

A-biplot of the PCA model; B-score contribution plot of the PCA model.

图 4 13 批黄芪注射液多变量数据分析结果

Fig. 4 Multivariate data analysis results of 13 batches of *Astragalus* Injection

表 4 黄芪注射液中各类成分在总固体中占比结果

Table 4 Proportion of various components in total solid of *Astragalus* Injection

成分	占比/%	成分	占比/%	成分	占比/%
氨基酸类	3.67	生物碱类	0.53	黄酮类	0.20
有机酸类	2.79	核苷类	1.03	离子	4.80
糖类	84.46	皂苷类	1.41	合计	98.88

以上的成分定量，加上离子所有可测成分的含量占总固体含量的比例超过 95%。

2.7 HPLC 和 $^1\text{H-NMR}$ 比较

为了进一步考察 $^1\text{H-NMR}$ 方法的准确性，将本研究开发方法与参考方法进行比较，目前文献中报道的关于黄芪注射液成分定量的方法多针对黄芪甲苷和毛蕊异黄酮苷，因此，本研究采用文献报道的 HPLC-UV-ELSD 方法^[21]分析了 5 批次黄芪注射液中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮苷的含量，与 $^1\text{H-NMR}$ 的测定值进行比较，结果如表 5 所示，对 2 种方法的定量结果进行回归分析，黄芪皂苷和毛蕊异黄酮苷结果的相关系数分别 0.998 9 和 0.997 3，这说明 2 种分析方法之间存在良好的一致性，这也进一步证实了 NMR 方法的准确性。

表 5 HPLC 和 $^1\text{H-NMR}$ 含量测定结果Table 5 HPLC and $^1\text{H-NMR}$ content determination results

批次	黄芪皂苷 III/IV/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		毛蕊异黄酮苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	HPLC	$^1\text{H-NMR}$	HPLC	$^1\text{H-NMR}$
1	140.955 $\pm$ 0.637	141.852 $\pm$ 1.647	43.102 $\pm$ 0.265	43.656 $\pm$ 3.929
2	130.139 $\pm$ 1.612	129.982 $\pm$ 4.831	48.107 $\pm$ 0.306	48.744 $\pm$ 0.709
3	206.514 $\pm$ 2.762	212.054 $\pm$ 1.464	95.280 $\pm$ 0.450	96.027 $\pm$ 3.215
4	214.897 $\pm$ 1.363	223.419 $\pm$ 15.821	93.838 $\pm$ 0.122	95.689 $\pm$ 3.846
5	220.866 $\pm$ 4.108	224.966 $\pm$ 6.619	100.121 $\pm$ 5.475	98.489 $\pm$ 7.721

3 讨论

本研究开发了一种基于 $^1\text{H-NMR}$ 对黄芪注射液化学成分定量的方法。该方法可以对黄芪注射液中 27 种成分进行定量, 包括 8 种小分子有机酸、6 种氨基酸、4 种核苷、3 种糖、3 种生物碱以及 3 种皂苷和黄酮类成分, 可定量的成分占总固体量 90% 以上。相较于传统的定量方法如比色法、HPLC 等, 预处理操作涉及强酸试剂^[22]或萃取^[23]等复杂步骤, 本研究开发的方法前处理操作仅包括冷冻干燥。此外, 该方法分析时间短, 仅需 15 min 即可完成一次分析, 且不需要随行标曲。本研究还成功将开发的方法应用到 13 批黄芪注射液中的化学成分定量分析中, 并全面展现批次间的差异。本研究开发的 $^1\text{H-NMR}$ 方法具有操作简单、分析快、结果可靠等优点, 为黄芪注射液质量控制提供了新的分析手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘宁宁. 黄芪注射液治疗病毒性心肌炎的药理作用及疗效观察 [J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(13): 168-170.
- [2] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液中化学成分分析 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 809-817.
- [3] 陈燕, 蒋志涛, 陈晓峰, 等. 苯酚-硫酸法测定黄芪口服液和注射液中多糖含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(5): 64-65.
- [4] 黄俊斌. 黄芪注射液中黄芪总皂苷的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(5): 394-395.
- [5] 巴晓雨, 郝福, 张纲, 等. HPLC-ELSD 法同时测定黄芪注射液中单糖和蔗糖含量 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(10): 25-8.
- [6] 王辰, 侯连兵, 刘婵. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 中药材, 2006, 29(6): 618-619.
- [7] 李宏, 李建北, 张东明, 等. 固相萃取-液相色谱法测定黄芪注射液 2 个黄烷类化合物的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(8): 1097-1099.

- [8] 储继红, 李长印, 戴国梁, 等. LC-MS-MS 法同时测定黄芪注射液和黄芪口服液中 5 种成分 [J]. 中成药, 2015, 37(12): 2647-2651.
- [9] Daus M, Wunnoo S, Voravuthikunchai S P, et al. Phloroglucinol-meroterpenoids from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh [J]. *Phytochemistry*, 2022, 200: 113179.
- [10] Li W Z, Zhao F, Yang J Y, et al. Development of a comprehensive method based on quantitative ^1H NMR for quality evaluation of traditional Chinese medicine injection: A case study of Danshen Injection [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(7): 1006-1016.
- [11] Pan J Y, Gong X C, Qu H B. Quantitative ^1H NMR method for hydrolytic kinetic investigation of salvianolic acid B [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85: 28-32.
- [12] Xu J Z, Zeng S S, Chen X Y, et al. Isolation and identification of degradation products of salvianolic acid A by NMR and LC-MS [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(2): 260-266.
- [13] 李文竹, 杨嘉誉, 赵芳, 等. 参麦注射液中人参总皂苷的 $^1\text{H-qNMR}$ 定量方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 587-592.
- [14] 潘坚扬, 赵芳, 李文竹, 等. 定量核磁共振技术及其在中药注射剂质量控制中的应用展望 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 569-574.
- [15] Yang J Y, Lu Y T, Pan Y F, et al. Pharmaceutical processomics for quality control of traditional Chinese medicine preparations: A $^1\text{H-qNMR}$ assisted case study of Guanxinling Injection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 238: 115793.
- [16] 陈燕燕, 李晓男, 王跃飞, 等. 解卷积定量核磁共振法测定黄芪注射液中 8 种初生代谢成分 [J]. 分析化学研究报告, 2015, 43(8): 1210-7.
- [17] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [18] 曲婷丽, 魏玉海, 李爱平, 等. 黄芪注射液 ^1H NMR 指纹图谱研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(5): 780-785.
- [19] 张艳霞, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及 Q-marker 预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410-419.
- [20] 方磊, 张新雪, 常听语, 等. 焦谷氨酰胺类生物活性肽的研究进展 [J]. 食品科技, 2023, 48(6): 224-229.
- [21] 罗雨, 李文龙, 黄文华, 等. HPLC-UV-ELSD 同时测定黄芪水提液与含醇提取物中 6 种成分 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 850-858.
- [22] 王继明, 陈丽娜, 杜芳, 等. 黄芪甲苷含量测定研究进展 [J]. 中医药学报, 2019, 47(2): 116-121.
- [23] 简龙海, 闻宏亮, 夏晶, 等. 黄芪注射液定性定量方法的改进 [J]. 中成药, 2011, 33(11): 2018-2020.

[责任编辑 郑礼胜]