

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.015

一测多评法测定参芪扶正注射液中苯丙素苷类和核苷类成分含量

何昌雄

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院,福建 福州 350000)

摘要:目的 建立同时测定参芪扶正注射液中4个苯丙素苷类成分(党参苷I、党参苷II、党参苷IV、丁香苷)和4个核苷类成分(胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷)含量的一测多评(QAMS)法。方法 以党参苷I和鸟苷为内标物,建立参芪扶正注射液中这2种成分与党参苷II、党参苷IV、丁香苷和胞苷、尿苷、腺苷间的相对校正因子;采用外标(ESM)法测定参芪扶正注射液中党参苷I和鸟苷的含量,通过相对校正因子计算参芪扶正注射液中其他6种成分的含量,并比较用QAMS法和ESM法测定的结果。结果 在一定线性范围内,党参苷I与党参苷II、党参苷IV、丁香苷的相对校正因子分别为0.931,1.007,0.982,鸟苷与胞苷、尿苷、腺苷的相对校正因子分别为0.538,0.876,0.979,且在不同试验条件下重现性良好;6批参芪扶正注射液的QAMS法计算值与ESM法测定值无显著差异($P>0.05$),所得校正因子可信。结论 该方法中所建立的校正因子重现性良好,QAMS法可用于参芪扶正注射液中多个组分的定量分析与质量评价。

关键词:一测多评法;参芪扶正注射液;相对校正因子;苯丙素苷类;核苷类;内标物;外标法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)19-0052-06

Content Determination of Shengqi Fuzheng Injection by Quantitative Analysis of Multi-Components by Single Marker

HE Changxiong

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) method for simultaneous determination of 4 phenylpropanoid glycosides(codonopsis I, codonopsis II, codonopsis IV, syringin) and 4 nucleosides(cytidine, guanosine, uridine) in Shengqi Fuzheng Injection. **Methods** Codonopsis I and guanosine were used as internal standards, the relative correction factors between these two components in Shengqi Fuzheng Injection and codonopsis II, codonopsis IV, syringin and cytidine, uridine and adenosine were established. The content of codonopsis I and guanosine in Shengqi Fuzheng Injection was determined by the external standard method(ESM), and the content of the other 6 components in Shengqi Fuzheng Injection was calculated by relative correction factors, and the results by QAMS method and ESM method were compared. **Results** Within a certain linear range, the relative correction factors of codonopsis I, codonopsis II, codonopsis IV, and syringin were 0.931, 1.007, and 0.982, respectively; the relative correction factors of guanosine and cytidine, uridine, and adenosine were 0.538, 0.876, and 0.979, respectively, and the reproducibility was good under different test conditions. There was no significant difference between the QAMS method and the ESM method for the six batches of Shengqi Fuzheng Injection($P>0.05$), indicating the obtained correction factor was credible. **Conclusion** The calibration factor established in this method has good reproducibility, and the QAMS method can be used for quantitative analysis and quality evaluation of multiple components in Shengqi Fuzheng Injection.

Key words: quantitative analysis of multi-components by single marker; Shengqi Fuzheng Injection; relative correction factor; phenylpropanoid glycosides; nucleosides; internal standard; external standard method

参芪扶正注射液是由党参和黄芪组方,2味中药材经水提取后与注射用氯化钠配制而成,具有益气扶正功效,用于肺脾气虚引起的神疲乏力、少气懒言、自汗眩晕、肺癌、胃癌见上述证候者的辅助治疗^[1]。其含有苯丙素苷类、核苷类、皂苷类、糖类等活性成分,苯丙素苷类和核苷类成分有较好的免疫调节作用,在抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳等方面有较好的药理作用^[2-4]。参考文献[5-7],考虑到多指标质量控制需要的对照品种类和量较大,本研究中以参芪扶正注射液中的党参苷I和鸟苷为内标物,分别建立2种成分与党参苷II、党参苷IV、丁香苷和胞苷、尿苷、腺苷间的相对校正因子,采用一测多评法(QAMS)同时测定参芪扶正注射液中8种成分的含量。

QAMS法是在多指标质量控制时,以药材中易得、价廉、稳定的对照品的典型有效成分为内标物,建立该有效成分与其他成分间的相对校正因子,再通过校正因子计算出其他成分的含量。在方法实施时,可在只有1个对照品而其余对照品不足的情况下,可实现多种组分的同步含量测定,弥补了中药制剂含量测定过程中需要对对照品种多且不易获得的缺陷,已广泛应用于多种药物活性成分的定量测定^[8-9]。本研究中考察了所建立的相对校正因子在不同仪器及不同试验条件下的重现性;采用相对保留时间定位法对各待测成分色谱峰进行定位;用 t 检验比较QAMS法和高效液相色谱(HPLC)外标(ESM)法测定的结果,对将QAMS应用于参芪扶正注射液多组

第一作者:何昌雄,大学本科,药师,研究方向为药品质量标准分析和临床药学,(电子信箱)hechangxiong07@163.com。

分的含量测定进行了较全面的考察。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Waters 2695 型高效液相色谱仪, 包括 2695 Alliance 四元梯度泵、2695 Alliance 自动进样器、Empower 3 色谱工作站、2998 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); 1260 Infinity 型高效液相色谱仪, 包括 G1311C 四元梯度泵、G1329B 自动进样器、Agilent EZchrom 色谱工作站、G4212B 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); AUW-220D 型电子天平(日本岛津公司, 精度为 0.01 mg); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司, 功率为 500 W, 频率为 40 kHz); Milli-Q Academic 超纯水系统(美国默克密理博公司)。

色谱柱: Shimadzu VP-ODS C₁₈ 液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Waters Sunfire ODS C₁₈ 液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Agilent Zorbax-C₁₈ 液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Hypersil ODS C₁₈ 液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

试剂: 参芪扶正注射液(丽珠集团利民制药厂, 批号分别为 1802115/1, 1803222/2, 1804105/1, 1805261/2, 1806162/1, 1809052/2, 规格为每瓶 250 mL); 党参苷 I 对照品(批号为 6257-45, 含量为 98%), 党参苷 II 对照品(批号为 6257-73, 含量为 96.8%), 党参苷 IV 对照品(批号为 6257-82, 含量为 97.6%), 丁香苷对照品(批号为 5124-11, 含量为 98.2%), 胞苷对照品(批号为 MUST-20151212, 含量为 98.5%), 均购自四川省成都曼思特公司; 尿苷对照品(批号为 110887-201803, 含量为 99.5%, 4℃ 冷藏保存), 腺苷对照品(批号为 110879-201703, 含量为 99.7%, 4℃ 冷藏保存), 鸟苷对照品(批号为 111977-201501, 含量为 93.6%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Merck 公司, 批号分别为 1910318, 191117); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

混合对照品溶液: 取党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成每 1 mL

含党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷 0.2156, 0.1707, 0.1558, 0.1003 mg 的对照品混合溶液, 即得苯丙素苷类成分混合对照品溶液。取胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷对照品适量, 精密称定, 分别加纯净水制成每 1 mL 含胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷 0.0904, 0.1486, 0.1184, 0.1203 mg 的对照品混合溶液, 即得核苷类成分混合对照品溶液。

供试品溶液: 精密量取样品 50 mL, 置 200 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇约 120 mL, 密塞, 置冰箱(2~10℃)中浸渍过夜。精密量取样品参芪扶正注射液 25 mL, 加在活化过的大孔树脂上, 用 30% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩至干, 残渣加流动相使溶解, 转移至 10 mL 棕色容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得苯丙素苷类成分供试品溶液。避光操作。精密量取样品 50 mL, 置 200 mL 容量瓶中, 加纯净水约 120 mL, 密塞, 超声处理(功率为 500 W, 频率为 40 kHz)40 min, 放冷, 加纯净水定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得核苷类成分供试品溶液。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[10-13]与系统适用性试验

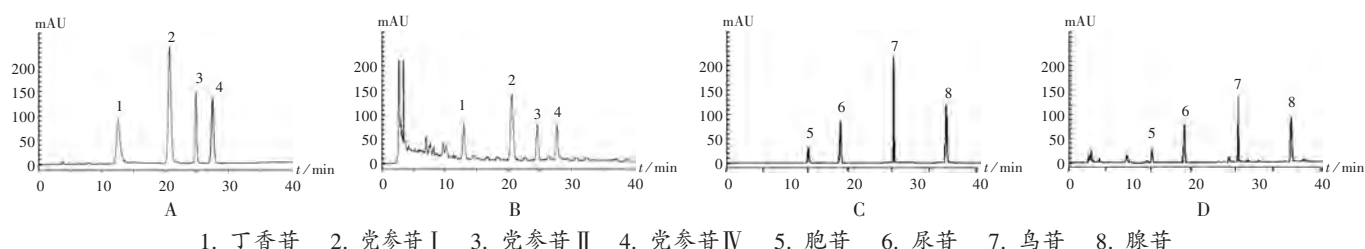
苯丙素苷类成分: 色谱柱为 Agilent Zorbax-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.3% 甲酸溶液(39:61, V/V); 流速为 1.0 mL/min; UV 检测器检测波长为 268 nm; 柱温为 35℃。

核苷类成分: 色谱柱为 Agilent Zorbax-C₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(65:35, V/V); 流速为 1.0 mL/min; UV 检测器检测波长为 260 nm; 柱温为 35℃。

取混合对照品溶液及供试品溶液各 10 μL, 按拟订色谱条件进样测定。色谱图见图 1。

2.2.2 方法学考察

线性关系考察: 精密量取苯丙素苷类及核苷类成分混合对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇及纯净水逐步稀释, 定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按拟订色谱条件进样 10 μL, 记录色谱图。以对照品质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得各组分回归方程及线性范围。结果表明, 各成分在各自线性范围内与峰面



A. 苯丙素苷类成分混合对照品溶液 B. 苯丙素苷类成分供试品溶液 C. 核苷类成分混合对照品溶液 D. 核苷类成分供试品溶液

图1 高效液相色谱图

积线性关系良好。取峰面积的信噪比(S/N)为 10 倍时的对照品质量浓度为定量限(LOQ)。结果见表 1。

表 1 各成分线性关系和定量限考察结果($n=6$)

成分	回归方程	相关系数(r)	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	定量限($\mu\text{g/mL}$)
党参苷 I	$Y=10.98X+8.662$	0.999 5	4.312~129.3	0.09
党参苷 II	$Y=16.64X-5.404$	0.999 7	3.414~102.4	0.07
党参苷 IV	$Y=21.17X-3.017$	0.999 4	3.116~93.48	0.06
丁香苷	$Y=13.75X+10.04$	0.999 5	2.006~60.18	0.03
胞苷	$Y=363.1X+21.09$	0.999 3	1.808~54.24	0.02
鸟苷	$Y=627.2X+56.36$	0.999 7	2.972~89.16	0.05
尿苷	$Y=532.2X-18.49$	0.999 6	2.368~71.04	0.04
腺苷	$Y=234.46X+71.43$	0.999 7	2.406~72.18	0.03

精密度试验:精密吸取苯丙素苷类和核苷类成分混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱峰峰面积。结果党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷和胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.91% , 0.65% , 0.73% , 0.82% 和 1.01% , 0.54% , 0.91% , 0.72% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 1806162/1),依法制备供试品溶液,分别于 0,3,6,9,12,20,24 h 时进样 10 μL ,按拟订色谱条件测定,记录色谱峰峰面积。结果党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷和胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 1.03% , 1.22% , 1.13% , 0.94% 和 0.85% , 0.91% , 1.12% , 1.04% ($n=6$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 1806162/1),依法平行制备 6 份供试品溶液,每份精密吸取 10 μL ,按拟订色谱条件进样测定。结果党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷和胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.96% , 0.73% , 0.62% , 0.51% 和 0.75% , 0.64% , 0.93% , 0.87% ($n=6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品(批号为 1806162/1)6 份,每份 25 mL,分别精密加入党参苷 I (0.215 6 mg/mL)、党参苷 II(0.170 7 mg/mL)、党参苷 IV (0.155 8 mg/mL)、丁香苷(0.100 3 mg/mL)混合对照品溶液各 2.0,2.5,3.0 mL,依法制备苯丙素苷类成分供试品溶液,精密吸取 10 μL ,按拟订色谱条件测定,计算加样回收率。结果见表 2。精密量取已知含量的样品(批号为 1806162/1)6 份,每份 25 mL,分别精密加入胞苷(0.215 6 mg/mL)、鸟苷(0.215 6 mg/mL)、尿苷(0.215 6 mg/mL)、腺苷(0.215 6 mg/mL)混合对照品溶液各 1.5,2.0,2.5 mL,依法制备核苷类成分供试品溶液,精密吸取 10 μL ,按拟订色谱条件测定,计算加样回收率。结果见表 3。

表 2 4 种苯丙素苷类成分加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量(mg)	加入量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
党参苷 I	0.544 7	0.431 2	0.976 3	100.09	99.95	0.14
	0.544 7	0.431 2	0.976 2	100.07		
	0.544 7	0.539 0	1.082 2	99.72		
	0.544 7	0.539 0	1.082 9	99.85		
	0.544 7	0.646 8	1.191 6	100.02		
党参苷 II	0.544 7	0.646 8	1.191 2	99.95	99.13	0.87
	0.426 7	0.341 4	0.763 5	98.65		
	0.426 7	0.341 4	0.762 3	98.30		
	0.426 7	0.426 8	0.854 3	100.19		
	0.426 7	0.426 8	0.854 4	100.21		
党参苷 IV	0.426 7	0.512 1	0.930 4	98.36	99.42	1.10
	0.426 7	0.512 1	0.934 0	99.06		
	0.389 5	0.311 6	0.704 3	101.03		
	0.389 5	0.311 6	0.701 5	100.13		
	0.389 5	0.389 5	0.776 5	99.36		
丁香苷	0.389 5	0.389 5	0.772 3	98.28	99.32	0.85
	0.389 5	0.467 4	0.854 9	99.57		
	0.389 5	0.467 4	0.848 3	98.16		
	0.250 8	0.200 6	0.451 6	100.10		
	0.250 8	0.200 6	0.451 5	100.05		

2.3 校正因子重现性考察及各组份色谱峰定位

校正因子的计算:以党参苷 I 和鸟苷为内标物,在 2 个不同的实验室分别对党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷和胞苷、尿苷、腺苷的校正因子按公式 $[f_{k/w} = f_k/f_w = (W_k \times A_m)/(W_m \times A_k)]$ 计算,式中 A_k 为内标物峰面积, W_k 为内标物浓度; A_m 为其他组分峰面积, W_m 为其他组分浓度)进行复核计算。结果表明,2 个实验室间的差异不明显($RSD < 0.50\%$)。详见表 4。

不同仪器及色谱柱的影响:考察了不同仪器和不同色谱柱对相对校正因子的影响,结果表明,所得相对校正因子差异不明显($RSD < 0.60\%$)。详见表 5。

不同柱温的影响:在不同的实验室,采用 Waters 2695 型高效液相色谱系统、Agilent Zorbax - C₁₈ 色谱柱进行试验,分别考察不同柱温对相对校正因子的影响,结果表明,柱温对相对校正因子的影响不显著($RSD < 0.50\%$)。详见表 6。

不同流速的影响:在同一实验室,采用 Waters 2695 型高效液相色谱系统、Agilent Zorbax - C₁₈ 色谱柱进行试验,分别考察不同流速对相对校正因子的影响,结果表明,流速对相对校正因子的影响不显著($RSD < 0.50\%$)。详见表 7。

表 3 4 种核苷类成分加样回收试验结果 ($n=6$)

组分	取样量(mg)	加入量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
鸟苷	0.339 0	0.222 9	0.562 2	100.13	99.83	0.54
	0.339 0	0.222 9	0.562 1	100.09		
	0.339 0	0.297 2	0.635 9	99.90		
	0.339 0	0.297 2	0.636 5	100.10		
	0.339 0	0.371 5	0.710 5	100.00		
	0.339 0	0.371 5	0.705 8	98.73		
胞苷	0.150 7	0.135 0	0.285 3	99.70	100.32	0.66
	0.150 7	0.135 6	0.286 6	100.23		
	0.150 7	0.180 8	0.332 2	100.39		
	0.150 7	0.180 8	0.331 5	100.00		
	0.150 7	0.226 0	0.376 8	100.04		
	0.150 7	0.226 0	0.380 3	101.59		
尿苷	0.298 2	0.177 6	0.478 2	101.35	100.57	1.19
	0.298 2	0.177 6	0.479 2	101.91		
	0.298 2	0.236 8	0.537 5	101.06		
	0.298 2	0.236 8	0.533 0	99.16		
	0.298 2	0.296 0	0.596 9	100.91		
	0.298 2	0.296 0	0.591 3	99.02		
腺苷	0.294 8	0.180 4	0.477 2	101.11	99.38	1.15
	0.294 8	0.180 4	0.475 8	100.33		
	0.294 8	0.240 6	0.533 9	99.38		
	0.294 8	0.240 6	0.530 9	98.13		
	0.294 8	0.300 8	0.591 4	98.60		
	0.294 8	0.300 8	0.591 7	98.70		

待测组分色谱峰定位:查阅文献[14-15],相对保留时间定位法优于保留时间差定位法,本试验中分别考察了采用不同色谱仪及色谱柱时,党参苷Ⅱ、党参苷Ⅳ、丁香苷色谱峰与党参苷Ⅰ色谱峰的相对保留时间及胞苷、尿苷、腺苷色谱峰与鸟苷色谱峰的相对保留时间。结果表明,不同色谱仪及色谱柱所测得的各组分相对保留时间无显著差异($RSD < 0.50\%$)。详见表 8。

2.4 QAMS 法与 ESM 法测定结果的比较

采用 QAMS 法和 ESM 法测定 6 批样品(批号分别

表 5 不同仪器及色谱柱相对校正因子耐用性考察结果

色谱仪	色谱柱	苯丙素苷类成分			核苷类成分		
		党参苷Ⅱ	党参苷Ⅳ	丁香苷	胞苷	尿苷	腺苷
Waters	Shimadzu VP- ODS	0.933	1.001	0.978	0.532	0.872	0.971
	Waters Sunfire ODS C ₁₈	0.932	1.005	0.980	0.535	0.871	0.975
	Agilent Zorbax C ₁₈	0.931	1.007	0.982	0.536	0.873	0.978
	Hypersil ODS C ₁₈	0.934	1.006	0.984	0.533	0.870	0.979
安捷伦 1260	Shimadzu VP- ODS	0.930	1.005	0.983	0.531	0.871	0.977
	Waters Sunfire ODS C ₁₈	0.931	1.000	0.987	0.532	0.872	0.980
	Agilent Zorbax C ₁₈	0.932	1.003	0.981	0.539	0.873	0.973
	Hypersil ODS C ₁₈	0.935	1.004	0.979	0.537	0.873	0.974
$\bar{X}$		0.932	1.004	0.982	0.534	0.872	0.976
$RSD(\%)$		0.18	0.24	0.30	0.53	0.13	0.32

表 6 不同柱温相对校正因子耐用性考察结果

试验地点	柱温	苯丙素苷类成分			核苷类成分		
		党参苷Ⅱ	党参苷Ⅳ	丁香苷	胞苷	尿苷	腺苷
1	30 ℃	0.927	1.002	0.976	0.530	0.873	0.972
	35 ℃	0.932	1.007	0.983	0.537	0.875	0.978
	40 ℃	0.929	1.004	0.979	0.534	0.870	0.969
2	30 ℃	0.926	1.003	0.980	0.535	0.871	0.971
	35 ℃	0.931	1.007	0.982	0.538	0.876	0.979
	40 ℃	0.924	1.002	0.980	0.531	0.871	0.974
$\bar{X}$		0.928	1.004	0.980	0.534	0.873	0.974
$RSD(\%)$		0.33	0.23	0.25	0.60	0.28	0.41

为1802115/1,1803222/2,1804105/1,1805261/2,1806162/1,1809052/2)含量。依法制备苯丙素苷类和核苷类成分供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,分别采用 ESM 法和 QAMS 法计算参芪扶正注射液中各成分的含量,并对测定结果行 t 检验。结果表明,2 种方法无显著差异,详见表 9。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

检测波长确定:本试验中在 190~400 nm 波长段分

表 4 苯丙素苷类与核苷类成分在不同实验室测得的相对校正因子

进样体积(μL)	苯丙素苷类成分						核苷类成分					
	党参苷Ⅱ		党参苷Ⅳ		丁香苷		胞苷		尿苷		腺苷	
	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2
2	0.928	0.930	1.004	1.002	0.978	0.979	0.531	0.531	0.870	0.868	0.971	0.970
5	0.929	0.928	1.004	1.003	0.980	0.980	0.535	0.535	0.871	0.872	0.975	0.973
10	0.931	0.931	1.000	1.001	0.982	0.981	0.538	0.538	0.876	0.877	0.979	0.978
12	0.930	0.935	1.009	1.001	0.983	0.985	0.536	0.536	0.872	0.871	0.982	0.977
15	0.933	0.933	1.006	1.005	0.984	0.986	0.530	0.530	0.873	0.872	0.985	0.976
18	0.931	0.932	1.002	1.003	0.985	0.987	0.532	0.532	0.874	0.873	0.978	0.979
20	0.934	0.930	1.003	1.004	0.981	0.982	0.541	0.541	0.875	0.874	0.977	0.980
$\bar{X}$	0.931	0.931	1.004	1.003	0.982	0.983	0.535	0.535	0.873	0.872	0.978	0.976
$RSD(\%)$	0.23	0.25	0.29	0.15	0.25	0.32	0.75	0.75	0.25	0.32	0.47	0.36

表 7 不同流速相对校正因子耐用性考察结果

流速 (mL/min)	苯丙素苷类成分			核苷类成分		
	党参苷 II	党参苷 IV	丁香苷	胞苷	尿苷	腺苷
0.8	0.925	1.001	0.978	0.532	0.870	0.970
0.9	0.927	1.003	0.979	0.535	0.873	0.976
1.0	0.931	1.007	0.982	0.538	0.876	0.981
1.1	0.924	1.005	0.980	0.533	0.871	0.970
1.2	0.932	1.006	0.981	0.534	0.874	0.971
平均值	0.928	1.004	0.980	0.534	0.873	0.974
RSD(%)	0.38	0.24	0.16	0.43	0.27	0.50

表 8 不同色谱仪及色谱柱相对保留时间比较

色谱仪	色谱柱	苯丙素苷类成分			核苷类成分		
		党参苷 II	党参苷 IV	丁香苷	胞苷	尿苷	腺苷
Waters	Shimadzu VP-ODS	1.243	1.394	0.646	0.454	0.707	1.338
	Waters Sunfire ODS C ₁₈	1.242	1.393	0.645	0.455	0.706	1.337
	Agilent Zorbax C ₁₈	1.240	1.395	0.643	0.452	0.705	1.335
	Hypersil ODS C ₁₈	1.241	1.392	0.642	0.453	0.704	1.339
安捷伦 1260	Shimadzu VP-ODS	1.243	1.393	0.641	0.451	0.708	1.336
	Waters Sunfire ODS C ₁₈	1.244	1.392	0.640	0.450	0.705	1.333
	Agilent Zorbax C ₁₈	1.242	1.396	0.644	0.456	0.707	1.335
	Hypersil ODS C ₁₈	1.245	1.392	0.643	0.453	0.703	1.334
平均值		1.243	1.393	0.643	0.453	0.706	1.336
RSD(%)		0.13	0.11	0.31	0.45	0.24	0.15

别扫描 8 种活性成分对照品溶液,结果党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷 4 种苯丙素苷类成分的最大吸收波长为 268 nm,胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷 4 种核苷类成分的最大吸收波长为 260 nm,为保证各成分都具有适宜的灵敏度和精密度,试验中采用 2 套光谱检测波长,保证均在最佳吸收波长处检测 8 种成分。

流动相选择:根据待测组分理化性质和结构的差异,本试验中分别采用 2 组流动相进行分离。由于核苷类成分(胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷)极性大,易溶于水,故采

用甲醇-水溶液、乙腈-水溶液等度洗脱,各色谱峰均可被检出,与相邻色谱峰分离效果较好,考虑乙腈较甲醇毒性大,易污染环境,且价格高,故选择甲醇-水溶液等度洗脱作为本试验的流动相检测核苷类成分。为使党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷 4 种苯丙素苷类成分得到良好分离,采用乙腈-0.3% 甲酸溶液(39:61, V/V)等度洗脱,优化洗脱条件,实现同时检测出 4 种活性成分,该色谱条件下系统适用性均符合要求。

3.2 QAMS 法内标物选择

党参苷 I 和鸟苷在参芪扶正注射液中含有较高,性质稳定,便宜,易得,是实验室常用对照品,符合 QAMS 法对参照物的要求,故分别以党参苷 I 和鸟苷作为内标物,经上述方法学考察,方法切实可行。

3.3 相对校正因子的重现性

考察了不同仪器、色谱柱、柱温及流速对相对校正因子的影响,结果表明,各校正因子在以上不同条件下重现性均良好,QAMS 法用于分析样品中各成分的通用性较好,可在不同实验室条件下进行含量检测。

3.4 QAMS 法色谱峰定位

中药成分复杂,在不同色谱系统中会出现不同的色谱峰,在同一色谱系统中,其色谱峰的出峰时间、数量等也会受到色谱柱、柱温等诸多因素的影响,因此待测成分色谱峰的定位至关重要。本试验中考察相对保留时间参数在不同品牌 HPLC 仪和不同品牌色谱柱中的重现性。结果表明,相对保留时间在不同色谱系统及色谱柱条件下波动相对较小,且重现性较好($RSD < 0.50\%$)。

3.5 方法评价

本研究中建立了测定参芪扶正注射液中苯丙素苷类成分(党参苷 I、党参苷 II、党参苷 IV、丁香苷)和核苷类成分(胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷)的有效成分含量的 QAMS 法,该方法结果准确、简便有效、重现性高,可用于参芪扶正注射液中有有效成分的含量测定。

表 9 外标法与一测多评法测定 8 种有效成分含量结果($n=6, \mu\text{g/mL}$)

批号	党参苷 I		党参苷 II		党参苷 IV		丁香苷		鸟苷		胞苷		尿苷		腺苷	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1802115/1	21.78	21.77	16.95	16.91	16.11	16.08	8.161	8.157	13.53	13.51	6.022	6.019	11.88	11.87	11.74	11.74
1803222/2	21.76	21.75	16.99	16.97	16.15	16.13	8.166	8.164	13.57	13.54	6.024	6.022	11.89	11.88	11.77	11.77
1804105/1	21.74	21.71	16.93	16.90	16.12	16.10	8.157	8.154	13.55	13.52	6.026	6.025	11.86	11.82	11.71	11.71
1805261/2	21.73	21.70	16.98	16.96	16.14	16.13	8.160	8.158	13.56	13.53	6.027	6.024	11.85	11.80	11.72	11.72
1806162/1	21.79	21.77	16.99	16.97	16.15	16.13	8.168	8.165	13.56	13.54	6.028	6.026	11.93	11.91	11.79	11.79
1809052/2	21.81	21.78	16.98	16.95	16.17	16.16	8.169	8.167	13.58	13.56	6.026	6.024	11.93	11.88	11.78	11.78
r	0.997 5	0.997 5	0.995 8	0.995 8	0.998 4	0.998 4	0.996 5	0.996 5	0.996 5	0.996 5	0.996 8	0.996 8	0.997 7	0.997 7	0.998 2	0.998 2
t 值	1.518	1.518	1.333	1.333	2.436	2.436	6.209	6.209	2.215	2.215	1.947	1.947	3.345	3.345	3.023	3.023
P 值	0.09	0.09	0.06	0.06	0.07	0.07	0.10	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.08

注:A 为 QAMS 法,B 为 ESM 法。