

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2020.01.015

超高效液相色谱-质谱法同时测定舒血宁注射剂中 20种黄酮醇苷与萜类内酯成分

金高娃^{1,2}, 宋春颖¹, 闫竞宇^{1,2}, 刘艳芳^{1,2}, 沈爱金^{1,2},
郭志谋^{1,2*}, 梁鑫森^{1,2}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院大连化学物理研究所-中国医药城生物医药创新研究院, 江苏 泰州 225300)

摘要:建立了舒血宁注射剂中16种黄酮及4种萜类内酯同时定量的超高效液相色谱-质谱分析方法,并采用所建立的方法同时测定了不同厂家舒血宁注射剂产品中上述20种化合物的含量。注射剂样品经甲醇-水(体积比1:1)稀释后,在Acquity UPLC BEH Shield RP18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱上分析,以0.1% (体积分数)甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱,以电喷雾离子源负离子多反应监测(MRM)模式进行质谱监测。结果表明:20种化合物可在10 min内完成色谱分离分析,检出限和定量下限分别为0.02~1.59 ng/mL和0.07~5.30 ng/mL,16种黄酮及4种萜类内酯在各自的线性范围内线性关系良好,在低、中、高3个加标水平下的回收率为85.9%~109%。该方法前处理简单、快速高效、准确性高,为舒血宁注射剂的质量控制提供了参考。

关键词:舒血宁注射剂;超高效液相色谱-串联质谱;黄酮苷类;萜类内酯;同时定量分析

中图分类号: O657.6; O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2020)01-0015-07

Simultaneous Determination of 20 Flavonoid Glycosides and Terpenoid Lactones in Shuxuening Injection by Ultra-high Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

JIN Gao-wa^{1,2}, SONG Chun-ying¹, YAN Jing-yu^{1,2}, LIU Yan-fang^{1,2},
SHEN Ai-jin^{1,2}, GUO Zhi-mou^{1,2*}, LIANG Xin-miao^{1,2}

(1. Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences - China Medical City Biomedical Innovation Research Institute, Taizhou 225300, China)

Abstract: A method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of 16 flavonoid glycosides and 4 terpenoid lactones in shuxuening injections. The samples were firstly diluted with methanol-water (1% 1, by volume), and then separated on an ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm) by gradient elution using acetonitrile - water containing 0.1% formic acid as mobile phases, finally detected by UPLC-MS/MS with ESI source in MRM mode. Results revealed that the 20 compounds could be analyzed within 10 min. There were good linear relationships for twenty compounds in a certain concentration range with their correlation coefficients (r^2) no less than 0.963 3. The limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) were in the ranges of 0.02 - 1.59 ng/mL and 0.07 - 5.30 ng/mL, respectively. And the recoveries at three levels were between 85.9 - 109%. This method was applied in the simultaneous detection of 16 flavonoid glycosides and 4 terpenoid lactones in different shuxuening injection products. With the advantages of simplicity, rapidness and good repeatability, the method is suitable for the quantitative analysis of 20 compounds in shuxuening injections, and provides a good strategy for further quality control of shuxu-

收稿日期: 2019-09-18; 修回日期: 2019-10-17

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U1508221)

*通讯作者: 郭志谋, 博士, 研究员, 研究方向: 色谱分离材料及方法, E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn

ening injections.

Key words: shuxuening injection; ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); flavonoid glycosides; terpenoid lactones; simultaneous quantitative analysis

舒血宁注射剂为银杏叶提取物制成的灭菌水溶液, 主要用于治疗缺血性心脑血管疾病、冠心病、心绞痛、脑栓塞、脑血管痉挛等^[1-2], 其中起作用的成分为黄酮和萜类内酯, 每类物质均包括多种化合物, 如黄酮类包括芦丁、槲皮苷、异槲皮苷、杨梅苷、山奈苷、异鼠李苷等; 萜类内酯包括银杏内酯 A、B、C、白果内酯等。目前其质量控制主要采用液相色谱法, 如中国药典 2015 版^[3]采用紫外检测法对银杏提取物中的黄酮类进行检测。但由于对照品的缺乏, 通常将黄酮苷类物质酸解为黄酮苷元后再进行总黄酮醇苷的换算。而对于内酯类化合物, 由于其无紫外吸收, 多采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 检测。已有检测方法中, 大都将黄酮和萜类内酯分开测定, 时间较长, 溶剂消耗也较大; 采用 ELSD 检测时灵敏度低、重复性差; 由于标准品缺乏, 中国药典 2015 版规定银杏提取物中总黄酮醇苷不得少于 24.0%, 萜类内酯不得少于 6.0%; 卫生部药品标准中药成方制剂中规定舒血宁注射剂 5 mL 规格含总黄酮醇苷 4.2 mg, 均规定的总量, 但这并不能全面代表注射剂的性质, 不同注射剂即使黄酮总量相近, 但各单个黄酮苷的含量可能差异较大。为避免添加某种黄酮苷元使产品质量符合国家标准, 发展舒血宁注射剂中多种有效成分同时测定的方法具有重要意义。

为解决黄酮和萜类内酯化合物同时检测的问题, 发展通用检测器如蒸发光散射 (ELSD)^[4]、电喷雾 (CAD)^[5]、质谱 (MS)^[6] 等方法是比较可行的途径。对于多种物质的同时定量, 采用 ELSD 及 CAD 等检测器时, 需达到基线分离才能准确定量。而采用质谱检测时, 对于保留时间相同的化合物, 只要定量离子对不同, 即可进行准确定量。目前已有采用液相色谱 – 质谱联用技术测定银杏提取物中化合物的文献报道, 如张兰桐等^[7]采用 HPLC – MS 法同时测定了舒血宁注射液中的 4 种萜类内酯和 3 种黄酮苷元; 丁宏等^[8]采用 UPLC – Q/Orbitrap – HRMS 鉴别和定量了含银杏叶提取物保健食品中的 5 种萜类内酯和 3 种黄酮醇, 但样品仍需酸解后再进行测定。除黄酮苷元的定量分析外, 胡蓉蓉等^[9]建立了 UPLC – MS/MS 测定银杏叶提取物中 10 个黄酮类成分的分析方法; 吴惠勤等^[10]建立了银杏保健茶中 16 种黄酮类物质的 LC – MS/MS 方法, 16 种黄酮类化合物均为黄酮苷元, 样品也需酸解后测定。除此之外, Bi 等^[11]发展了两步液液萃取的前处理方法, 采用 UPLC – MS/MS 研究了银杏制剂中的 3 种黄酮苷元和 4 种萜类内酯在小鼠血浆中的药代动力学。孙毓庆^[12]及苏薇薇^[13]等的研究表明, 银杏制剂中含有较多物质, 并采用 LC – MS 方法分别鉴定了银杏叶提取物中的 12 个黄酮醇苷和 30 个黄酮类化合物。对每个黄酮苷的定量更能反映出银杏制剂的质量, Cheng 等^[14]采用 UPLC – MS/MS 定量分析了银杏叶提取物中的 4 个黄酮醇苷、5 个黄酮苷元、5 个萜类内酯及 2 个银杏酸; Guo 等^[15]采用 UPLC – QTOF – MSE 测定了银杏叶提取物中包括 17 种黄酮醇苷和 5 种萜类内酯在内的 33 个化合物, 有利于更进一步的银杏叶提取物及制剂的质量研究。

因受限于黄酮醇苷类化合物对照品的缺乏, 对银杏制剂中黄酮醇苷的定量研究尚不深入, 本课题组前期自主制备得到了银杏叶提取物中的 16 种黄酮醇苷化合物和 4 种萜类内酯, 以这些物质为对照品, 建立了 UPLC – MS/MS 方法同时定量舒血宁注射液中 20 种黄酮醇苷和萜类内酯的分析方法。该方法前处理简单、快速灵敏且重复性好, 适用于舒血宁注射剂的质量研究。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Waters UPLC Acquity UPLC I – CLASS 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 配自动进样器、高压二元溶剂管理器、柱温箱和 Masslynx 工作站; 质谱仪为 Waters Xevo TQ – XS (美国 Waters 公司)。

甲酸 (色谱级, 北京百灵威科技有限公司); 乙腈和甲醇 (色谱纯, 上海迈瑞尔化学技术有限公司); 实验用水由 Milli-Q 超纯水机 (美国密理博有限公司) 制备。

槲皮素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、杨梅素-3-O-芸香糖苷、山奈酚-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、芦丁、山奈酚-3-O-对香豆酰基葡萄糖芸香

糖苷、万寿菊素-3-O-芸香糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-2"-葡萄糖基鼠李糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、丁香黄素-3-O-芸香糖苷、3', 5'-二甲氧基杨梅素-3-O-芸香糖苷、山奈酚-3-O-2"-葡萄糖基鼠李糖苷、槲皮素-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷、山奈酚-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯均为自主制备, HPLC 纯度 >95%。舒血宁注射剂购于大连沙河口星海湾富国社区卫生服务中心。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH Shield RP18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸, B 为乙腈, 梯度洗脱程序: 0~10 min, 12%~38% A; 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样体积为 5 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM)扫描模式, 毛细管电压 3.10 kV, 脱溶剂气温度 500 °C, 脱溶剂气流速 1 000 L/h, 进样锥气流速 150 L/h。选取 Q1 质量数为母离子, Q3 质量数为子离子进行定量分析。

1.3 标准溶液的制备

分别精密称取 16 种黄酮醇苷和 4 种萜类内酯标准品, 用 50% (体积分数) 甲醇水溶液配成质量浓度为 2 000 μg/mL 单标储备液。取各单标储备液适量于同一容量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液定容。使用时逐级稀释配成 0.005~40 μg/mL 的系列混合标准溶液。

1.4 样品前处理

各舒血宁注射剂采用体积分数 50% 甲醇水溶液稀释 20 倍, 定容、备用。

2 结果与讨论

2.1 实验条件优化

在电喷雾离子源正、负模式下均进行了舒血宁注射剂样品的分析。结果发现, 萜类内酯化合物在负模式下的响应较正模式强, 而黄酮类化合物在正、负模式下均有响应, 因此实验采用负离子模式进行 20 种化合物的质谱检测, 并通过 Masslynx 软件自动优化各化合物多反应监测(MRM)模式下的锥孔电压(CV)和碰撞能(CE)。流动相采用乙腈-水, 在水相中加入适量甲酸可改善黄酮醇苷类化合物的峰形^[14-16], 通过优化流动相比, 使各化合物定量时无干扰, 且保留时间相同的化合物具有不同的定量离子对, 并可在 10 min 内完成舒血宁样品中 20 种待测物的分析, 完全满足定量要求。优化条件下的 20 种黄酮和萜类内酯化合物质谱参数见表 1, MRM 谱图见图 1。

表 1 20 种目标化合物的保留时间(RT)、多反应监测(MRM)离子对、锥孔电压(CV)和碰撞能(CE)
Table 1 Retention times (RT), multiple-reaction monitoring (MRM) transitions, cone voltage (CV) and collision energies (CE) of 20 target compounds

| No. | Compound | Retention time/min | MRM transitions (m/z) | CV/V | CE/eV |
|-----|--|--------------------|-------------------------------|----------|--------|
| 1 | Quercetin-3-O-2", 6"-rhamnosyl glucoside (槲皮素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷) | 4.18 | 755.2 > 300.0*, 755.2 > 271.0 | 100, 100 | 44, 68 |
| 2 | Myricetin-3-O-rutinoside(杨梅素-3-O-芸香糖苷) | 4.20 | 625.2 > 316.1*, 625.2 > 271.0 | 100, 100 | 36, 56 |
| 3 | Kaempferol-3-O-2", 6"-rhamnosyl glucoside (山奈酚-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷) | 4.71 | 739.3 > 284.1*, 739.3 > 255.1 | 94, 94 | 42, 66 |
| 4 | Isorhamnetin-3-O-2", 6"-rhamnosyl glucoside (异鼠李素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷) | 4.75 | 769.3 > 314.2*, 769.3 > 299.1 | 100, 100 | 40, 56 |
| 5 | Rutin(芦丁) | 5.05 | 609.2 > 300.1*, 609.2 > 271.1 | 48, 48 | 40, 64 |
| 6 | Kaempferol-3-O-p-coumaric glucuronoside (山奈酚-3-O-对香豆酰基葡萄糖芸香糖苷) | 4.48 | 901.3 > 739.3*, 901.3 > 284.1 | 84, 84 | 30, 58 |
| 7 | Marigold-3-O-rutinoside(万寿菊素-3-O-芸香糖苷) | 4.99 | 639.2 > 330.2*, 639.2 > 315.1 | 98, 98 | 38, 48 |
| 8 | Quercetin-3-O-glucoside(槲皮素-3-O-葡萄糖苷) | 5.55 | 463.1 > 300.2*, 463.1 > 271.1 | 78, 78 | 26, 42 |
| 9 | Quercetin-3-O-2"-glucosyl rhamnoside (槲皮素-3-O-2"-葡萄糖基鼠李糖苷) | 5.74 | 609.2 > 300.1*, 609.2 > 271.1 | 48, 48 | 40, 64 |
| 10 | Kaempferol-3-O-rutinoside(山奈酚-3-O-芸香糖苷) | 5.84 | 593.2 > 284.9*, 593.2 > 255.1 | 100, 100 | 32, 56 |
| 11 | Isorhamnetin-3-O-rutinoside(异鼠李素-3-O-芸香糖苷) | 5.88 | 623.3 > 315.0*, 623.3 > 299.7 | 100, 100 | 30, 44 |
| 12 | Syringin-3-O-rutinoside(丁香黄素-3-O-芸香糖苷) | 5.72 | 653.3 > 345.1*, 653.3 > 329.4 | 82, 82 | 34, 46 |

(续表 1)

| No. | Compound | Retention time/min | MRM transitions (m/z) | CV/V | CE/eV |
|-----|--|--------------------|-------------------------------|----------|--------|
| 13 | 3', 5'-Dimethoxymyricetin-3-O-rutside (3', 5'-二甲氧基杨梅素-3-O-芸香糖苷) | 5.88 | 653.3 > 345.1*, 653.3 > 330.0 | 100, 100 | 40, 30 |
| 14 | Kaempferol-3-O-2''-glucosyl rhamnoside (山奈酚-3-O-2''-葡萄糖基鼠李糖苷) | 6.56 | 593.2 > 284.1*, 593.2 > 255.1 | 98, 98 | 34, 56 |
| 15 | Quercetin-3-O-p-coumaric glucosyl rhamnoside (槲皮素-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷) | 7.90 | 755.2 > 300.0*, 755.2 > 609.3 | 100, 100 | 44, 30 |
| 16 | Kaempferol-3-O-p-coumaric glucosyl rhamnoside (山奈酚-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷) | 8.66 | 739.3 > 284.1*, 739.3 > 593.3 | 100, 100 | 46, 30 |
| 17 | Ginkgolide A(银杏内酯 A) | 7.03 | 407.2 > 319.2*, 407.2 > 335.2 | 62, 62 | 14, 14 |
| 18 | Ginkgolide B(银杏内酯 B) | 7.09 | 423.2 > 367.2*, 423.2 > 125.0 | 28, 28 | 14, 28 |
| 19 | Ginkgolide C(银杏内酯 C) | 4.42 | 439.2 > 383.2*, 439.2 > 125.0 | 30, 30 | 14, 34 |
| 20 | Bilobalide(白果内酯) | 5.07 | 325.2 > 163.1*, 325.2 > 193.1 | 30, 30 | 20, 12 |

* : quantitative ion pair

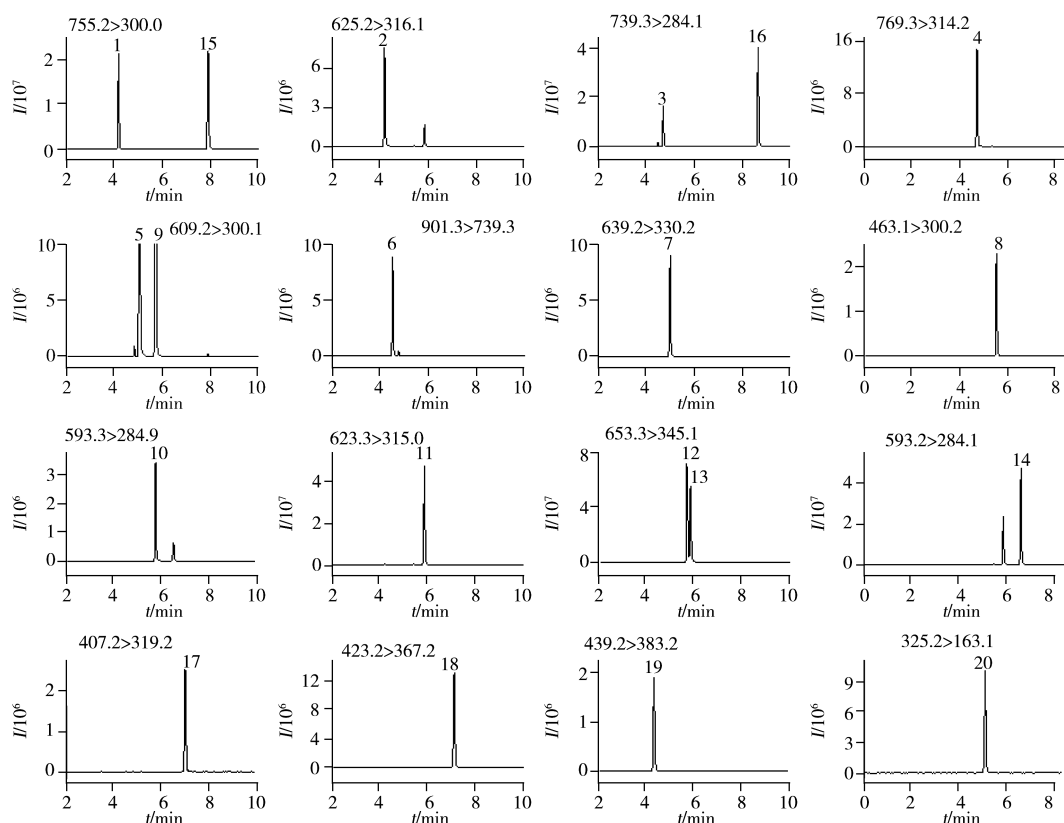


图 1 20 种化合物的 UPLC-MS/MS MRM 谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of 20 analytes
the numbers denoted 1-20 were the same as those in Table 1

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线、检出限及定量下限 配制 20 种化合物质量浓度为 0.005 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列混合标准工作溶液, 在优化条件下测定, 以各待测物的定量离子对峰面积(y)对其相应质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行线性回归, 以 3 倍信噪比($S/N = 3$)确定方法的检出限(LOD), 以 $S/N = 10$ 确定方法的定量下限(LOQ)。结果显示, 20 种待测物在一定质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r^2)不小于 0.963 3, LOD 为 0.02 ~ 1.59 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, LOQ 为 0.07 ~ 5.30 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。20 种待测物的线性方程、线性范围、相关系数、检出限及定量下限结果见表 2。

表2 20种待测物的线性范围、线性方程、相关系数、检出限及定量下限

Table 2 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients(r^2), LODs and LOQs for 20 target compounds

| Compound No. | Linear equation | Linear range/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | r^2 | LOD/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | LOQ/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ |
|--------------|--------------------------------|--|---------|---|---|
| 1 | $y = 916\ 794x + 15\ 660.2$ | 0.005 ~ 20 | 0.991 0 | 0.09 | 0.30 |
| 2 | $y = 315\ 751x + 2\ 120.73$ | 0.005 ~ 40 | 0.995 7 | 0.28 | 0.93 |
| 3 | $y = 846\ 174x + 14\ 494.6$ | 0.005 ~ 20 | 0.997 8 | 0.07 | 0.24 |
| 4 | $y = 670\ 564x + 11\ 508.2$ | 0.005 ~ 20 | 0.986 9 | 0.02 | 0.07 |
| 5 | $y = 598\ 817x + 8\ 236.14$ | 0.005 ~ 40 | 0.990 1 | 0.09 | 0.31 |
| 6 | $y = 550\ 492x + 1\ 172.89$ | 0.005 ~ 10 | 0.992 7 | 0.03 | 0.10 |
| 7 | $y = 549\ 316x + 8\ 770.98$ | 0.005 ~ 20 | 0.997 9 | 0.73 | 2.42 |
| 8 | $y = 973\ 190x + 25\ 200.3$ | 0.005 ~ 20 | 0.984 7 | 0.06 | 0.20 |
| 9 | $y = 433\ 728x + 2\ 203.84$ | 0.005 ~ 20 | 0.995 1 | 0.13 | 0.43 |
| 10 | $y = 1\ 318\ 710x + 47\ 029.8$ | 0.005 ~ 20 | 0.969 6 | 0.05 | 0.15 |
| 11 | $y = 1\ 663\ 080x + 64\ 069.1$ | 0.005 ~ 20 | 0.963 3 | 0.03 | 0.11 |
| 12 | $y = 330\ 578x + 2\ 845.6$ | 0.005 ~ 40 | 0.992 9 | 1.29 | 4.29 |
| 13 | $y = 199\ 083x + 4\ 997.93$ | 0.005 ~ 20 | 0.984 0 | 1.59 | 5.30 |
| 14 | $y = 382\ 912x + 7\ 937.47$ | 0.005 ~ 20 | 0.990 6 | 0.24 | 0.80 |
| 15 | $y = 1\ 355\ 180x + 38\ 975.3$ | 0.005 ~ 20 | 0.988 5 | 0.05 | 0.18 |
| 16 | $y = 1\ 508\ 620x + 48\ 055.4$ | 0.005 ~ 20 | 0.978 8 | 0.04 | 0.12 |
| 17 | $y = 133\ 192x + 3\ 830.24$ | 0.005 ~ 10 | 0.982 5 | 0.54 | 1.81 |
| 18 | $y = 717\ 971x + 16\ 272.4$ | 0.005 ~ 10 | 0.992 0 | 0.16 | 0.53 |
| 19 | $y = 972\ 580x + 24\ 433.3$ | 0.005 ~ 10 | 0.985 1 | 0.06 | 0.20 |
| 20 | $y = 542\ 892x + 8\ 465.57$ | 0.005 ~ 10 | 0.990 3 | 0.40 | 1.35 |

the numbers denoted were the same as those in Table 1

2.2.2 回收率及相对标准偏差 取舒血宁注射剂在稀释前分别加入一定量16种黄酮醇苷和4种萜类内酯标准溶液,配成低、中、高3个质量浓度的加标溶液,每个浓度平行3个,在优化条件下测定,计算方法的加标回收率和相对标准偏差(RSD)。结果显示,20种化合物的平均回收率为85.9%~109%,RSD不高于9.5%(表3),表明方法的结果可靠且符合分析要求。

表3 舒血宁注射剂中20个化合物的回收率及相对标准偏差($n=3$)Table 3 Recovery and relative standard deviations of the 20 target compounds in Shuxuening injections($n=3$)

| Compound No. | Background($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Added($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Found($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Average recovery/% | RSD/% |
|--------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|------------------|
| 1 | 2.56 | 1.60, 3.20, 4.80 | 4.32, 5.94, 7.56 | 104, 103, 103 | 3.8, 3.3, 1.6 |
| 2 | 0.99 | 0.40, 0.80, 1.20 | 1.38, 1.69, 2.08 | 99.3, 94.4, 95.0 | 3.9, 8.4, 5.3 |
| 3 | 6.10 | 3.00, 6.00, 9.00 | 9.48, 12.10, 14.98 | 104, 100, 99.2 | 0.36, 1.9, 1.7 |
| 4 | 2.93 | 1.60, 3.20, 4.80 | 4.76, 6.27, 7.76 | 105, 102, 100 | 2.3, 3.4, 1.5 |
| 5 | 9.65 | 5.00, 10.0, 15.0 | 14.29, 18.39, 22.81 | 97.5, 93.6, 92.5 | 0.92, 0.87, 1.1 |
| 6 | 1.04 | 0.60, 1.20, 1.80 | 1.67, 2.27, 2.95 | 102, 101, 104 | 6.2, 2.4, 1.5 |
| 7 | 2.69 | 1.60, 3.20, 4.80 | 4.46, 6.16, 8.10 | 104, 105, 108 | 1.8, 1.1, 1.1 |
| 8 | 1.43 | 0.80, 1.60, 2.40 | 2.25, 3.27, 4.07 | 101, 108, 106 | 2.2, 1.4, 0.82 |
| 9 | 10.55 | 5.00, 10.0, 15.0 | 15.70, 21.13, 25.98 | 101, 103, 102 | 2.2, 1.0, 0.64 |
| 10 | 6.16 | 3.00, 6.00, 9.00 | 8.98, 11.42, 13.97 | 98.0, 93.9, 92.2 | 1.9, 2.1, 1.2 |
| 11 | 4.31 | 2.40, 4.80, 7.20 | 7.20, 9.47, 11.57 | 107, 104, 100 | 0.28, 0.96, 1.7 |
| 12 | 1.62 | 1.60, 3.20, 4.80 | 3.38, 5.02, 6.44 | 105, 104, 100 | 4.4, 0.17, 2.9 |
| 13 | 1.14 | 0.80, 1.60, 2.40 | 2.12, 2.83, 3.70 | 109, 103, 104 | 4.8, 5.2, 3.0 |
| 14 | 3.85 | 2.40, 4.80, 7.20 | 6.39, 8.26, 10.29 | 102, 95.5, 93.1 | 3.2, 3.7, 0.50 |
| 15 | 5.16 | 3.00, 6.00, 9.00 | 8.05, 10.57, 13.15 | 98.7, 94.7, 92.9 | 1.4, 2.1, 1.6 |
| 16 | 3.41 | 2.00, 4.00, 6.00 | 5.53, 7.61, 9.37 | 102, 103, 99.6 | 1.4, 2.2, 1.6 |
| 17 | 7.14 | 5.00, 10.0, 15.0 | 12.37, 16.41, 19.01 | 102, 95.7, 85.9 | 0.62, 0.24, 0.99 |
| 18 | 7.90 | 5.00, 10.0, 15.0 | 12.87, 18.50, 21.70 | 99.8, 103, 94.8 | 2.5, 2.5, 4.0 |
| 19 | 5.20 | 3.00, 6.00, 9.00 | 8.62, 11.44, 13.65 | 105, 102, 96.1 | 1.3, 2.3, 1.2 |
| 20 | 0.00 | 0.40, 0.80, 1.20 | 0.40, 0.78, 1.11 | 100, 97.5, 92.5 | 9.5, 4.7, 6.7 |

* recovery = (found - background)/added \times 100%; the numbers denoted were the same as those in Table 1

2.2.3 精密性、重复性与稳定性 采用质量浓度均为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的20种待测物混合对照品溶液,采用本方法在优化条件下重复进样6次,分别计算20种化合物峰面积的相对标准偏差(RSD),并连续测定3d。结果显示,20种待测物的日内RSD($n=6$)及日间RSD($n=18$)分别为0.65%~4.8%和1.5%~6.5%,表明仪器性能良好,重现性高。取6份舒血宁注射剂样品分别稀释20倍后测定,计算得20种

化合物峰面积的 RSD 为 0.62%~4.6% (该样品中不含白果内酯), 表明方法的重复性良好。样品配制后, 分别在室温下放置 2、4、8、18、24 h 进行测定, 得 20 种目标物峰面积的 RSD 为 0.93%~8.6%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3 实际样品测定

采用本方法对 4 个厂家 (标记为 A~D) 的舒血宁注射剂样品进行测定, 结果见表 4。不同厂家的样品中各化合物的含量差异较大, A、B 厂家产品中的槲皮素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、山奈酚-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-2", 6"-二鼠李糖基葡萄糖苷、芦丁、山奈酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-芸香糖苷含量较 C、D 厂家稍高。C 厂家产品中槲皮素-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷、山奈酚-3-O-对香豆酰基葡萄糖基鼠李糖苷、银杏内酯 A、银杏内酯 B、白果内酯含量较高。A 厂家产品中不含白果内酯, B 厂家产品中白果内酯含量极低。A 和 D 厂家产品的总黄酮醇苷和总萜类内酯的含量相当, 但各化合物的含量存在明显差异, 因此有可能带来不同的疗效。由此可见, 对舒血宁产品中各化合物的定量分析可为其质量控制提供新思路。

表 4 不同厂家舒血宁注射剂样品中 20 个化合物的定量结果 ($n=3$)
Table 4 Contents of 20 compounds in different Shuxuening injections ($n=3$)

| Compound No. | A | | B | | C | | D | |
|-----------------------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| | Contents ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) | Contents ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) | Contents ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) | Contents ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) |
| 1 | 51.3 | -2.00 | 90.6 | -1.13 | 12.4 | -2.3 | 37.4 | -0.44 |
| 2 | 19.8 | -1.08 | 57.3 | -1.07 | 37.7 | -0.92 | 64.6 | -1.14 |
| 3 | 122.1 | -0.68 | 122.2 | -0.41 | 27.6 | -0.62 | 63.8 | -1.75 |
| 4 | 58.6 | -2.5 | 45.0 | -2.05 | 14.5 | -2.69 | 30.5 | -0.3 |
| 5 | 193.1 | -1.35 | 209.6 | -1.79 | 150.2 | -0.88 | 179.9 | -1.12 |
| 6 | 20.8 | -4.7 | 20.3 | -1.31 | 13.9 | -1.77 | 28.2 | -2.49 |
| 7 | 53.9 | -0.89 | 81.8 | -1.25 | 59.4 | -0.59 | 70.7 | -1.81 |
| 8 | 28.5 | -0.66 | 27.0 | -1.61 | 38.8 | -0.92 | 39.3 | -1.43 |
| 9 | 210.9 | -0.35 | 177.4 | -1.24 | 213.3 | -0.14 | 196 | -1.42 |
| 10 | 123.1 | -1.38 | 128.5 | -0.5 | 72.6 | -0.69 | 99.7 | -2.74 |
| 11 | 86.2 | -0.33 | 106.8 | -1.38 | 69.8 | -1.32 | 80.4 | -1.86 |
| 12 | 32.3 | -3.88 | 51.1 | -0.45 | 33.5 | -0.56 | 35.8 | -1.67 |
| 13 | 22.7 | -1.1 | 31.6 | -2.33 | 30.6 | -1.32 | 39.8 | -4.47 |
| 14 | 77.0 | -0.88 | 76.5 | -0.96 | 84.5 | -1 | 83.5 | -1.19 |
| 15 | 103.2 | -0.4 | 90.3 | -1.04 | 170.3 | -1.03 | 132.5 | -2.27 |
| 16 | 68.1 | -0.75 | 78.6 | -1.79 | 130.3 | -0.53 | 86.0 | -1.87 |
| Total flavonoids 1-16 | 1 271 | - | 1 395 | - | 1 159 | - | 1 268 | - |
| 17 | 142.7 | -1.44 | 98.2 | -1.79 | 147.8 | -0.24 | 137 | -0.77 |
| 18 | 157.9 | -1.41 | 128.5 | -1.32 | 166.4 | -0.94 | 125.6 | -1.87 |
| 19 | 104 | -3.07 | 83.3 | -1.24 | 82.7 | -2.81 | 89.0 | -2.14 |
| 20 | - | - | 0.45 | -2.58 | 140.2 | -0.25 | 65.2 | -3.57 |
| Total lactones 17-20 | 405 | - | 310 | - | 537 | - | 417 | - |

- : no data; the numbers denoted were the same as those in Table 1

3 结 论

本文建立了舒血宁注射剂中 16 个黄酮醇苷和 4 个萜类内酯同时定量的 UPLC-MS/MS 分析方法。相比传统酸解定量黄酮苷元及黄酮、内酯的方法, 本方法可在 10 min 内完成样品中 20 种化合物的同时测定, 方法简单快速、重现性好, 适于舒血宁注射剂中多种黄酮醇苷和萜类内酯的同时定量, 为其深入的质量研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Jia X, Wu F L, Qin X Y, Yang L S. *Chin. Remed. Clin.* (贾星, 吴凤莲, 秦雪莹, 杨利仕. 中国药物与临床), **2014**, 14(10): 1445-1447.
- [2] Ou Q, Zhang L Y, Qian Y X, Kang J C, He J. *J. Guizhou Univ. : Nat. Sci.* (欧琴, 张芦燕, 钱一鑫, 康冀川, 何珺. 贵州大学学报: 自然科学版), **2010**, 27(5): 34-37.

- [3] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: Chemical Industry Press(国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 化学工业出版社), **2015**: 316 - 317.
- [4] Deng H G, Cao Y Z. *Chin. J. Pharm. Anal.* (邓海根, 曹雨震. 药物分析杂志), **1994**, 14(3): 61 - 63.
- [5] Liu L Y, Liu X. *Mod. Sci. Instrum.* (刘立洋, 刘肖. 现代科学仪器), **2011**, 5(10): 141 - 145.
- [6] Gao Y, Li X, Wang B, Zhao L, Chai Y F. *J. Pharm. Prac.* (高越, 李翔, 王彬, 赵亮, 柴逸峰. 药学实践杂志), **2005**, 23(4): 193 - 195.
- [7] Ren Y P, Chang L, Cao L, Zhi X R, Zhang L T. *Chin. J. Pharm. Anal.* (任艳平, 常路, 曹亮, 支旭然, 张兰桐. 药物分析杂志), **2013**, 33(2): 220 - 224.
- [8] Niu Z R, Zheng T C, Cao J, Li M, Ding H. *Chin. J. Food Saf. Qual.* (钮正睿, 郑天驰, 曹进, 李珉, 丁宏. 食品安全质量检测学报), **2017**, 8(7): 2477 - 2485.
- [9] Hu R R, Yao X. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Form.*(胡蓉蓉, 姚鑫. 中国实验方剂学杂志), **2017**, 23(24): 90 - 95.
- [10] Jiang Y L, Huang F, Wu F H, Wu H Q, Huang X L, Deng X. *Chin. J. Chromatogr.* (蒋娅兰, 黄芳, 毋福海, 吴惠勤, 黄晓兰, 邓欣. 色谱), **2015**, 33(10): 1032 - 1039.
- [11] Xiao J, Wang T, Li P, Liu R, Li Q, Bi K. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1028: 33 - 41.
- [12] Ma X, Sun Y Q. *J. Shenyang Pharm. Univ.* (马欣, 孙毓庆. 沈阳药科大学学报), **2003**, 20(4): 275 - 279.
- [13] Li P L, Huang X, Yun S, Peng W, Wu Z, Su W W. *Central South Pharm.* (李泮霖, 黄昕, 云莎, 彭维, 吴忠, 苏薇薇. 中南药学), **2017**, 15(5): 573 - 579.
- [14] Wang Y, Liu Y, Wu Q, Yao X, Cheng Z. *J. Chromatogr. Sci.*, **2017**, 55(4): 459 - 464.
- [15] Zhao Y, Guo H, Chen Y, Fu X. *J. Chin. Pharm. Sci.*, **2017**, 26(11): 789 - 804.
- [16] Xia J, Zhao B, Zan J, Wang P, Chen L. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 175: 112734.

(责任编辑: 周启动)