

一测多评法测定六神丸中的 6 个蟾蜍二烯内酯类化合物*

丁梦磊^{1,2}, 张雯^{1,2}, 张越^{1,2}, 李俊松^{1,2}, 李全³, 王恒斌³,
李文⁴, 王洪兰^{1,2**}, 狄留庆^{1,2**}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 南京 210023;
3. 雷允上药业集团有限公司, 苏州 215003; 4. 南京中医药大学附属南京中医院, 南京 210001)

摘要 目的: 建立同时测定六神丸中 6 个蟾蜍二烯内酯类成分含量的一测多评法(QAMS), 并验证其准确性和可行性。方法: 采用高效液相色谱法, 使用 Waters Xbridge C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 296 nm。以华蟾酥毒基为内参物, 建立其与远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基 5 个成分的相对校正因子(RCF), 并进行含量计算, 实现一测多评; 同时采用外标法(ESM)测定六神丸中蟾酥的 6 个成分的含量, 比较一测多评法计算值与外标法实测值的差异。结果: 在一定线性范围内, 华蟾酥毒基与远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基的 RCF 值分别为 0.897、0.965、1.023、0.844、0.964, 且在不同实验条件下重现性良好(RSD < 5.0%), 一测多评法测得 15 批样品中华蟾酥毒基、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基的含量范围分别为 2.26~9.27 mg·g⁻¹、0.95~2.06 mg·g⁻¹、1.12~2.50 mg·g⁻¹、1.83~3.48 mg·g⁻¹、1.10~2.81 mg·g⁻¹、0.90~3.65 mg·g⁻¹, 与外标法实测值无显著性差异。结论: 所建立的同时测定六神丸中的 6 个蟾蜍二烯内酯类化合物的一测多评法准确可靠, 可用于六神丸中多个成分的定量分析质量评价。

关键词: 一测多评(QAMS); 相对校正因子(RCF); 六神丸; 华蟾酥毒基; 远华蟾毒精; 蟾毒它灵; 华蟾毒它灵; 蟾毒灵; 脂蟾毒配基

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2019)11-2003-07
doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.11

Simultaneous determination of six bufadienolides in Liushen pills by QAMS method*

DING Meng-lei^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, ZHANG Yue^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, LI Quan³,
WANG Heng-bin³, LI Wen⁴, WANG Hong-lan^{1,2**}, DI Liu-qing^{1,2**}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China; 3. Leiyunshang Pharmaceutical Co. Limited, Suzhou 215003, China;
4. The Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

Abstract Objective: To determine six bufadienolides in Liushen pills simultaneously with a quantitative analysis

* 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-30); 江苏省科技成果转化专项资金项目(BA2016104); 江苏省产学研合作项目(FZ20140109)

** 通信作者 王洪兰 Tel:(025)85811512; E-mail: honglanwang2004@163.com

狄留庆 Tel:(025)85811521; E-mail: diliuqing@126.com

第一作者 Tel: 18260028072; E-mail: 164782923@qq.com

of multi-components by single-marker (QAMS) and accuracy and validate feasibility of the method. **Methods:** A Waters Xbridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used in the high performance liquid chromatography (HPLC) assay. Acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution was employed as the mobile phase. The flow rate was 1 mL · min⁻¹, the column temperature was maintained at 30 °C and the detection wavelength was 296 nm. Cinobufagin was used as the internal reference substance to calculate the relative correction factors (RCFs) of elocinobufagin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin and resibufogenin and evaluate their contents accordingly. Moreover, the external standard method (ESM) was used to quantify the six components in Liushen pills. The results of the two methods were compared. **Results:** In certain linear range, RCFs of telocinobufagin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin and resibufogenin with reference to cinobufagin were 0.897, 0.965, 1.023, 0.844 and 0.964 respectively. The results were repeatable under different conditions with RSDs less than 5%. The content ranges of cinobufagin, telocinobufagin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin and resibufogenin by the QAMS method were 2.26~9.27 mg · g⁻¹, 0.95~2.06 mg · g⁻¹, 1.12~2.50 mg · g⁻¹, 1.83~3.48 mg · g⁻¹, 1.10~2.81 mg · g⁻¹, 0.90~3.65 mg · g⁻¹. Significant difference was not found between the the multi-evaluation method and the external standard method. **Conclusion:** The established QAMS can quantify six bufadienolides in Liushen pills accurately and reliably. This developed method can be used to determine multiple components in Liushen pills.

Keywords: quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS); relative correction factor (RCF); Liushen pills; cinobufagin; telocinobufagin; bufotalin; cinobufotalin; bufalin; resibufogenin

中药成分复杂多样,常采用多指标成分测定进行质量控制,但因所需对照品数量众多,费用较高,限制了其应用^[1-2]。一测多评(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)是以样品中1个典型成分(有对照品供应者)为内参物,建立该成分与其他成分的相对校正因子(RCF),通过RCF计算其他成分含量的方法^[3-7],测定多种成分的同时克服了对照品紧缺和检测成本高的困难。

六神丸由蟾酥、麝香等药物组成,具有清热解毒、消肿止痛之效,可用于治疗扁桃体炎、口舌糜烂、咽喉肿痛、牙周炎及疔疮疖等^[8],其中蟾酥的主要活性成分为蟾蜍二烯内酯类成分^[9-13]。本文以华蟾酥毒基为内参物,建立其与远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵和脂蟾毒配基的相对校正因子,实现一测多评,为六神丸的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, PDA 2998 检测器(Waters 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪, G1315D DAD 检测器(Agilent 公司); Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Agilent

ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 汉邦 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); FA1204B 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司), XP6 型微量分析天平(Mettler Toledo 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CL21 R 型高速离心机(Thermo Fisher 公司); Milli-Q 型超纯水系统(Millipore 公司)。

1.2 试药

对照品蟾毒灵(批号 111981-201501, 纯度 99.2%)、脂蟾毒配基(批号 110718-201809, 纯度 98.0%) 和华蟾酥毒基(批号 110803-201408, 纯度 99.6%) 均购自中国食品药品检定研究院, 供含量测定用; 对照品远华蟾毒精(批号 JBZ-1547, 纯度 ≥ 98%)、蟾毒它灵(批号 JBZ-0195, 纯度 ≥ 98%) 和华蟾毒它灵(批号 JBZ-0525, 纯度 ≥ 98%) 均购自南京金益柏生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。六神丸(雷允上药业有限公司, 规格: 每 1 000 粒重 3.125 g, 批号 QA18017C、QA18002B、QA18005B、QA18006A、QA18008B、QA18010A、QA18016B、QA18017A、QA18019A、QA18022A、QA18022B、QA18023B、PA18015B、PA18022B、PA18029B)。

2 方法与结果

2.1 混合溶液制备

2.1.1 对照品溶液 分别取远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的对照品适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 0.947 9、0.889 7、1.460 4、0.978 9、1.531 0、1.505 0 mg · mL⁻¹ 的单一对照品溶液;精密吸取上述对照品溶液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成质量浓度为远华蟾毒精 94.79 μg · mL⁻¹、蟾毒它灵 88.97 μg · mL⁻¹、华蟾毒它灵 146.04 μg · mL⁻¹、蟾毒灵 97.89 μg · mL⁻¹、脂蟾毒配基 153.10 μg · mL⁻¹ 和华蟾酥毒基 150.50 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取本品粉末(过 5 号筛)约 0.2 g,精密称定,精密加甲醇 10 mL,密塞,称量,超声(工作频率 40 kHz,功率 250 W)处理 1 h,用甲醇补足失去的量,摇匀,14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液即得。

2.1.3 阴性对照溶液 按照六神丸配方比例制备方法,制备缺蟾酥的阴性样品,按照“2.1.2”项下方法操作,制备缺蟾酥的阴性对照溶液。

2.2 液相色谱条件

Waters 2695 型高效液相色谱仪,Waters Empower 工作站。色谱柱:Waters Xbridge C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2% 磷酸水溶液,梯度洗

脱程序见表 1;流速:1 mL · min⁻¹;柱温:30 °C;检测波长:296 nm;进样量:10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

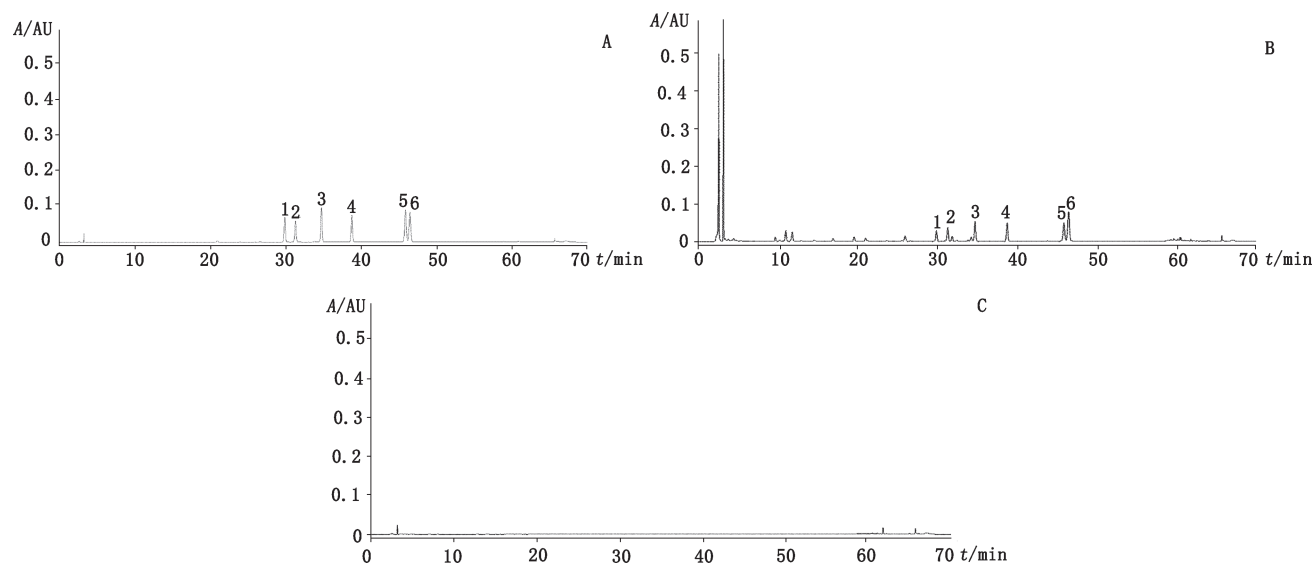
Tab. 1 Gradient elution procedures

时间 (time) / min	比例 (ratio) /%	
	乙腈 (acetonitrile)	0.2% 磷酸水溶液 (0.2% phosphoric acid solution)
0~15	20 → 25	80 → 75
15~25	25 → 30	75 → 70
25~40	30 → 40	70 → 60
40~55	40	60
55~57	40 → 100	60 → 0
57~62	100	0
62~64	100 → 20	0 → 80
64~70	20	80

按上述色谱条件,分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪进行测定,结果见图 1。各待测物色谱峰与其他干扰峰分离度良好,阴性对照溶液的色谱中,在与远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基相对应的保留时间处无干扰峰。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液适量,分别稀释 2、4、8、16、32、64 倍,



1. 远华蟾毒精 (telocinobufagin) 2. 蟾毒它灵 (bufotalin) 3. 华蟾毒它灵 (cinobufotalin) 4. 蟾毒灵 (bufalin) 5. 脂蟾毒配基 (resibufogenin) 6. 华蟾酥毒基 (cinobufagin)

图 1 混合对照品 (A)、样品 (B)、缺蟾酥阴性样品 (C) 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B) and negative sample without Bufonis Venenum (C)

进样 10 μL 进行测定,以对照品的进样量(X)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。取混合对照品溶液逐级稀释,以信噪

比为 10 考察各成分的定量下限。结果见表 2。在一定范围内,各成分进样量与峰面积有良好的线性关系。

表 2 6 个成分线性范围、回归方程和相关系数

Tab. 2 Linearity ranges, regression equations and correlation coefficients of 6 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	定量下限 (LOQ) / ng
远华蟾毒精 (telocinobufagin)	$Y=8\ 459.54X-3\ 455.56$	2.97~94.79	0.999 9	29.7
蟾毒它灵 (bufotalin)	$Y=7\ 894.50X-3\ 226.38$	2.79~88.97	0.999 9	27.9
华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	$Y=7\ 441.63X-4\ 933.09$	4.57~146.04	0.999 9	45.7
蟾毒灵 (bufalin)	$Y=8\ 996.08X-3\ 684.95$	3.06~97.89	0.999 9	30.6
脂蟾毒配基 (resibufogenin)	$Y=7\ 822.55X-3\ 957.00$	4.79~153.1	0.999 9	47.9
华蟾酥毒基 (cinobufagin)	$Y=7\ 543.95X-4\ 007.73$	4.71~150.5	0.999 9	47.1

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,连续进样 6 次测定,记录峰面积,计算远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基峰面积的 RSD 分别为 0.45%、0.63%、0.38%、0.41%、0.34%、0.34%,表明仪器的精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取六神丸(批号 PA18015B)粉末,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样测定,计算远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基峰面积的 RSD 分别为 2.6%、2.7%、2.6%、2.7%、2.6%、2.9%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取六神丸(批号 PA18015B)粉末 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,记录峰面积,计算六神丸中 6 个成分的含量,远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的平均含量分别为 1.15、1.14、1.82、1.1、0.94、2.26 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.7%、1.8%、1.6%、2.1%、1.8%、2.6%,表明该法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取上述 6 个对照品适量,精密称定,加甲醇配制成每 1 mL 含华蟾毒精 224.34 μg 、蟾毒它灵 225.54 μg 、华蟾毒它灵 397.55 μg 、蟾毒灵 206.56 μg 、脂蟾毒配基 199.34 μg 、华蟾酥毒基 443.35 μg 的混合对照品溶液;另取已测定含量的六神丸(批号 PA18015B)粉末 6 份,每份约 0.1 g,精密称定,分别加入上述混合对照品溶液 500 μL ,按

“2.1.2”项下方法制备供试溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积数据,计算远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的平均回收率($n=6$)分别为 102.3%、97.9%、108.2%、99.8%、104.0%、96.2%, RSD 分别为 2.4%、2.3%、2.9%、2.3%、1.6%、2.0%,符合回收率要求,表明测定方法准确可靠。

3 RCF 和相对保留时间的测定

3.1 RCF 的计算

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 1 mL,分别稀释 2、4、8、16、32、64 倍,按“2.2”项下色谱条件进样分析,以华蟾酥毒基为内参物,计算待测成分远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵和脂蟾毒配基的 RCF,得上述 4 个成分的 RCF 分别为 0.897、0.965、1.023、0.844、0.964, RSD 分别为 0.46%、1.1%、0.83%、0.66%、0.39%,符合要求。RCF 的计算公式为^[14]

$$f_{s/i} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{C_i \times A_s}{C_s \times A_i}$$

式中 A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物的浓度, A_i 为待测组分 i 的峰面积, C_i 为待测组分 i 的浓度。根据所测定的 RCF, 计算待测组分 i 的浓度, 计算公式为

$$C_i = f_{s/i} \times \frac{C_s \times A_i}{A_s}$$

式中 C_i 为待测组分 i 的浓度, $f_{s/i}$ 为待测组分 i 的 RCF, C_s 为内参物的浓度, A_s 为内参物的峰面积, A_i 为待测组分 i 的峰面积。

3.2 RCF 的重现性

取混合对照品溶液,按“2.2”项下液相色谱条件,分别考察 Waters 2695、Agilent 1200 高效液相色谱仪和 Waters Xbridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、汉邦 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对 RCF 的影响,结果见表 3。由表可知,不同高效液相色谱仪和不同品牌的色谱柱对 RCF 无显著影响。

表 3 不同高效液相色谱仪及色谱柱测定的 RCF

Tab. 3 RCFs determined by different HPLC instruments and columns

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	RCF				
		远华蟾毒精 (telocinobufagin)	蟾毒它灵 (bufotalin)	华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	蟾毒灵 (bufalin)	脂蟾毒配基 (resibufogenin)
Waters 2695	Waters Xbridge C ₁₈	0.897	0.965	1.023	0.844	0.964
	汉邦 (Hanbang) Kromasil C ₁₈	0.894	0.932	1.035	0.817	0.952
	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.930	0.991	1.072	0.868	0.990
Agilent 1200	Waters Xbridge C ₁₈	0.933	0.993	1.086	0.872	0.944
	汉邦 (Hanbang) Kromasil C ₁₈	0.853	0.903	0.988	0.788	0.913
	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.883	0.939	1.028	0.823	0.964
平均值 (mean)		0.898	0.954	1.039	0.835	0.954
RSD/%		3.3	3.7	3.4	3.9	2.7

3.3 待测组分色谱峰的定位

相对保留时间是 QAMS 法中待测色谱峰的定位方法之一。本次实验考察了在不同高效液相色谱仪和不同品牌色谱柱中待测组分的相对

保留时间的重现性,结果如表 4 所示。不同型号品牌的高效液相色谱仪和色谱柱对所测 6 个成分的相对保留时间值的影响较小 (RSD < 5.0%)。

表 4 不同高效液相色谱仪及色谱柱测定的相对保留时间值

Tab. 4 Relative retention time determined by different HPLC instruments and columns

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	相对保留时间 (relative retention time)				
		远华蟾毒精 (telocinobufagin)	蟾毒它灵 (bufotalin)	华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	蟾毒灵 (bufalin)	脂蟾毒配基 (resibufogenin)
Waters 2695	Waters Xbridge C ₁₈	0.660	0.687	0.751	0.833	0.987
	汉邦 (Hanbang) Kromasil C ₁₈	0.674	0.713	0.768	0.887	1.003
	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.628	0.662	0.724	0.815	1.006
Agilent 1200	Waters Xbridge C ₁₈	0.642	0.673	0.747	0.834	0.968
	汉邦 (Hanbang) Kromasil C ₁₈	0.629	0.669	0.726	0.824	1.003
	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.618	0.653	0.723	0.811	1.049
平均值 (mean)		0.641	0.676	0.740	0.834	1.003
RSD/%		3.3	3.1	2.5	3.3	2.7

3.4 QAMS 法与 ESM 测定结果的比较

取 15 批不同批号的六神丸粉末,按照“2.1.2”项所述方法制备供试品溶液;分别吸取供试品溶液 10 μL,按“2.2”项下色谱条件进样,记录峰面积。采用 ESM 和 QAMS 法计算六神丸粉末中远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵和脂蟾毒配基的含量,结果见表 5。结果表明 2 个含量测定方法没有显著差异,相对误差 (relative error, RE) 的绝对值

[RE=(QAMS 计算值-ESM 实测值)/ESM 实测值 × 100%] 均小于 3%,在可接受范围内。

4 讨论

4.1 内参物的选择及色谱峰的定位

《中华人民共和国药典》2015 年版规定蟾酥质量标准的指标性成分为脂蟾毒配基和华蟾毒配基^[9],两者在蟾酥中含量较高,活性较强,且对照品在市场流通性较高,易于获得,因此首先将

表 5 QAMS 法与 ESM 测得六神丸中蟾酥 6 个成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

Tab. 5 Determination of 6 active components in Liushen pills by QAMS method and ESM

批号 (lot No.)	华蟾酥毒基 (cinobufagin)			远华蟾毒精 (telocinobufagin)			蟾毒它灵 (bufotalin)			华蟾毒它灵 (cinobufotalin)			蟾毒灵 (bufalin)			脂蟾毒配基 (resibufogenin)		
	ESM	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%		
QA18017C	7.17	1.26	1.27	1.02	1.62	1.66	1.99	2.47	2.50	1.09	2.37	2.43	2.47	2.98	2.99	0.45		
QA18002B	2.73	1.90	1.94	2.12	1.45	1.48	2.33	2.44	2.48	1.56	1.44	1.47	2.48	1.27	1.27	-0.15		
QA18005B	2.71	1.72	1.76	2.00	1.43	1.46	2.33	2.41	2.45	1.55	1.38	1.42	2.44	1.08	1.07	-0.48		
QA18006A	2.48	1.49	1.52	1.87	1.30	1.33	2.27	2.18	2.21	1.52	1.25	1.28	2.38	0.95	0.94	-0.71		
QA18008B	2.55	1.35	1.37	1.68	1.33	1.36	2.27	2.15	2.19	1.47	1.25	1.28	2.36	0.90	0.90	-0.86		
QA18010A	2.91	1.50	1.53	1.76	1.48	1.52	2.33	2.57	2.61	1.57	1.44	1.48	2.44	1.04	1.03	-0.62		
QA18016B	9.27	0.97	0.95	-2.22	1.13	1.12	-1.27	2.00	1.97	-1.88	2.45	2.44	-0.26	2.15	2.10	-2.55		
QA18017A	6.76	1.29	1.30	1.07	1.65	1.69	2.03	2.46	2.49	1.10	2.35	2.41	2.48	3.09	3.11	0.49		
QA18019A	6.33	1.67	1.69	1.50	2.27	2.32	2.38	3.43	3.48	1.42	2.73	2.80	2.61	3.63	3.65	0.63		
QA18022A	5.95	1.67	1.70	1.53	2.44	2.50	2.46	3.06	3.10	1.35	2.74	2.81	2.63	2.85	2.86	0.47		
QA18022B	5.04	1.52	1.55	1.46	2.15	2.20	2.42	2.75	2.79	1.32	2.44	2.50	2.62	2.51	2.52	0.42		
QA18023B	5.27	1.64	1.66	1.55	2.30	2.36	2.46	2.98	3.02	1.37	2.55	2.62	2.63	2.74	2.75	0.48		
PA18015B	2.26	1.15	1.15	-0.08	1.14	1.15	0.39	1.82	1.83	0.25	1.10	1.10	-0.09	0.94	0.93	-1.59		
PA18022B	2.43	1.48	1.51	1.88	1.30	1.32	2.28	2.16	2.19	1.52	1.18	1.20	2.32	0.99	0.99	-0.57		
PA18029B	2.71	2.02	2.06	2.19	1.50	1.54	2.39	2.55	2.59	1.61	1.43	1.47	2.49	1.25	1.24	-0.18		

两者作为内参物的选择。此外,在对 RCF 的重现性考察过程中发现,两者因结构相似,因此保留时间也较为相近,但是会因不同品牌色谱柱的填料和性能差异而导致出峰顺序不同。考察中发现: Waters 品牌的色谱柱,脂蟾毒配基先出峰;而其他品牌的色谱柱,如 Agilent 和 Kromasil 填料的色谱柱,华蟾酥毒基先出峰。实验中发现,以华蟾酥毒基的保留时间为参考,更有利于其他 5 个峰的准确定位,因此最终选择华蟾酥毒基为内参物。

4.2 色谱峰的准确区分

本法通过相对保留时间来准确定位所需色谱峰,但在 2 号峰蟾毒它灵和 3 号峰华蟾毒它灵附近有保留时间相近的杂质峰。对比紫外吸收光谱发现,2 号峰的最大吸收波长为 297.1 nm,3 号峰的最大吸收波长为 295.9 nm,符合蟾蜍二烯内酯类成分的吸收特点,而 2 个杂质峰的紫外光谱图在此波长处未见明显的吸收峰,可以此区分。

4.3 供试品溶液制备方法、流动相和柱温的考察

本实验直接应用前期供试品溶液制备方法考察结果。为了降低检测成本,实现一测多评,本研究在实验室前期对于蟾酥多种活性成分同时测定^[15]的基础上,对方法进行了改良,考察了不同流动相的分离效果,发现乙腈-0.2% 磷酸水溶液洗脱分离效果好,并比较了不同柱温条件对分离效果的影响,结果发现当柱温为 30 °C 时,分离效果较好。

4.4 小结

采用 QAMS 测定六神丸中 6 个蟾蜍二烯内酯类成分的含量与常用的 ESM 测得的含量没有显著差异,表明通过 QAMS 实现对六神丸中蟾酥有效成分的含量测定准确可行。

参考文献

- [1] 王欣,覃瑶,王德江,等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395
WANG X, QIN Y, WANG DJ, et al. Progress in the application of

- QAMS in quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2016, 38(2): 395
- [2] 范成杰. “一测多评”法在中药质量评价和控制中的应用概况 [J]. *中药与临床*, 2013, 4(2): 18
FAN CJ. Application situation of multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation and control of Chinese herbal medicine [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2013, 4(2): 18
- [3] 李昕弦, 李蒙, 张志, 等. 一测多评法测定不同味连饮片中 6 个生物碱类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(7): 1132
LI TX, LI M, ZHANG Z, *et al.* Simultaneous determination of 6 alkaloids in prepared slides of *Coptis chinensis* Franch. by QAMS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(7): 1132
- [4] 成林, 谢巍, 朱斌, 等. 一测多评法测定白背叶中 3 个黄酮碳苷成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(7): 1152
CHENG L, XIE W, ZHU B, *et al.* Determination of three flavone C-glycosides in the leaves of *Mallotus apelta* by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(7): 1152
- [5] 翟宏宇, 单柏宇, 王海洋, 等. 一测多评法测定保心宁片中 6 个丹参类指标性成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(6): 973
ZHAI HY, SHAN BY, WANG HY, *et al.* Simultaneous determination of six index components in Baoxinling tablets by a single marker [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(6): 973
- [6] 王晓燕, 霍甜甜, 李振国. 一测多评法同时测定杞菊地黄口服液 中 4 种有效成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(2): 290
WANG XY, HUO TT, LI ZG. Simultaneous determination of 4 active components in Qiju Dihuang oral liquid by QAMS method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(2): 290
- [7] 李思阳, 孔庆新. 一测多评法同时测定复生康胶囊中 8 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(3): 518
LI SY, KONG QX. Simultaneous determination of eight components in Fushengkang capsule by QAMS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(3): 518
- [8] 裴迎霞, 郑琦, 侯炜, 等. 六神丸抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2018, 24(8): 40
PEI YX, ZHENG Q, HOU W, *et al.* Progress in anti-tumor effects of Liushen pills [J]. *Guide J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 24(8): 40
- [9] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 383
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 383
- [10] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3185
KOU GJ, QIN ZF, DENG YF, *et al.* Research progress on Bufonis Venenum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2014, 45(21): 3185
- [11] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2579
CHEN YL, HAO YY, GUO FJ, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Bufonis Venenum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(12): 2579
- [12] SHEN S, ZHANG Y, WANG Z, *et al.* Bufalin induces the interplay between apoptosis and autophagy in glioma cells through endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(2): 212
- [13] 孙崇峰, 范圣此, 罗毅, 等. 蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(13): 3183
SUN CF, FAN SC, LUO Y, *et al.* Research progress on chemical constituents and artificial synthesis of Bufonis Venenum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(13): 3183
- [14] 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
WANG ZM, QIAN ZZ, ZHANG QW, *et al.* Technical manual of QAMS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(6): 657
- [15] 李娟, 狄留庆, 李俊松, 等. HPLC-MS 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 700
LI J, DI LQ, LI JS, *et al.* Simultaneous determination of nine bufadienolides in Liushen pills by HPLC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(4): 700

(本文于 2019 年 3 月 4 日收到)