

金生源胶囊中 5 种化学成分 HPLC 及 HPLC-MS/MS 测定方法研究

张梦鹤^{1,2}, 于敏², 李蕾³, 沈爽¹, 张晶¹, 焦连庆^{1,2*} (1.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2.吉林省中医药科学院, 长春 130012; 3.吉林人参研究院, 长春 134001)

摘要: 目的 建立 HPLC 和 HPLC-MS/MS 测定金生源胶囊中甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基 5 种成分的方法。方法 采用 HPLC 测定甘草苷、甘草酸和丹酚酸 B, 采用岛津 C₁₈ ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测, 检测波长分别为 276, 250, 286 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。华蟾酥毒基和酯蟾毒配基测定, 采用 HPLC-MS/MS, ESI 源为离子源, 正离子多反应监测模式, ZORBAXSB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸(41:59), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果 甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基分别在 3.14~62.8, 4.18~83.6, 7.00~140.0, 0.495~9.90, 0.520~10.4 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.13%, 98.96%, 97.96%, 99.51%, 96.22%, RSD 分别为 1.43%, 2.76%, 1.68%, 2.54%, 1.39%。结论 该方法分离度好、准确可靠、灵敏度高, 可为复方中药中干蟾皮微量成分检测及质量控制提供实验依据。

关键词: 金生源胶囊; 高效液相色谱法; 高效液相色谱-串联质谱法; 甘草苷; 甘草酸; 丹酚酸 B; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)23-2868-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.23.009

引用本文: 张梦鹤, 于敏, 李蕾, 等. 金生源胶囊中 5 种化学成分 HPLC 及 HPLC-MS/MS 测定方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(23): 2868-2873.

Study on HPLC and HPLC-MS/MS Determination Methods of Five Chemical Components in Jinshengyuan Capsules

ZHANG Menghu^{1,2}, YU Min², LI Lei³, SHEN Shuang¹, ZHANG Jing¹, JIAO Lianqing^{1,2*} (1.College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2.Jilin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China; 3.Jilin Ginseng Research Institute, Changchun 134001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of five constituents(liquiritin, glycyrrhizic acid, salvianolic acid B, cinobufagin and resibufogenin) in Jinshengyuan capsules by HPLC and HPLC-MS/MS. **METHODS** HPLC was used for imultaneous determination of liquiritin, glycyrrhizic acid and salvianolic acid B. The analysis was performed on SHIMADZU C₁₈ ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile(A)-0.05% phosphoric acid(B) flowing at 1.0 mL·min⁻¹ in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 276, 250 and 286 nm by diode array detector. Cinobufagin and resibufogenin was analyzed by HPLC-MS/MS method, ESI source as ion source, positive ion multiple reaction monitoring mode, which performed on 30 ℃ thermostatic ZORBAXSB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile(A)-0.1% formic acid(B) flowing at 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The liner ranges of liquiritin, glycyrrhizic acid, salvianolic acid B, cinobufagin and resibufogenin were within 3.14–62.8, 4.18–83.6, 7.00–140.0, 0.495–9.90, 0.520–10.4 μg·mL⁻¹. The average recovery rates were 99.13%, 98.96%, 97.96%, 99.51% and 96.22% with the RSD of 1.43%, 2.76%, 1.68%, 2.54% and 1.39%. **CONCLUSION** The method has good separation, accuracy and reliability, high specificity and sensitivity, which can provide experimental basis for the detection and quality control of the trace components of dried toad skin in compound traditional Chinese medicine.

KEYWORDS: Jinshengyuan capsules; HPLC; HPLC-MS/MS; liquiritin; glycyrrhizic acid; salvianolic acid B; cinobufagin; resibufogenin

金生源胶囊由丹参、甘草、干蟾皮等 24 味中药组成, 直接粉碎入药, 具有祛瘀健脾、利水消

肿、清热利湿解毒、软坚散结等功效, 主治肝硬化腹水, 证属肝郁脾虚、水湿内停者。

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(201603047YY)

作者简介: 张梦鹤, 女, 硕士生 Tel: 15764380372 E-mail: 841823325@qq.com *通信作者: 焦连庆, 男, 博士, 研究员 Tel: 18686602593 E-mail: jiaolq2017@163.com

· 2868 · Chin J Mod Appl Pharm, 2020 December, Vol.37 No.23

中国现代应用药学 2020 年 12 月第 37 卷第 23 期

丹参主要有效成分为水溶性和脂溶性 2 大类, 其中丹酚酸 B 为最主要的活性成分^[1-2]。甘草化学成分主要是黄酮类、皂苷类和多糖类, 甘草酸和甘草苷为甘草含量测定的指标性成分^[3-4]。干蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑框蟾蜍的干燥皮, 最早记载于《本经逢原》^[5]。经定性检测确定华蟾酥毒基和酯蟾毒配基为干蟾皮中与蟾酥相同的毒性成分, 对 3 批市售药材进行检测, 结果显示其含量仅为蟾酥的 1/25~1/4, 目前干蟾皮收载于《江西省中药材标准》, 但并未建立其含量测定方法, 因此建立其含量测定方法尤为必要, 尤其是对复方中含量进行限量的测定^[6-10]。本实验建立 HPLC 和 HPLC-MS/MS 测定金生源胶囊中 5 种成分的含量, 并且对于影响测定的相关因素进行了系统考察, 以期为该制剂临床用药安全和质量控制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A SHIMADZU 高效液相色谱仪、SPD-M 20A 检测器、CBM-20A 色谱工作站(日本岛津公司); Agilent 1260LC- 6420MS 高效液相色谱质谱联用仪、masshunter 色谱工作站(美国 Agilent); BT25S 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

金生源胶囊(长春钻智制药有限公司, 批号: 20170101, 20170201, 20170301; 规格: 每粒 0.5 g); 甘草苷(批号: 111610-201607; 供含量测定用)、甘草酸(批号: 110731-201720; 供含量测定用)、丹酚酸 B(批号: 111562-201716; 供含量测定用)、华蟾酥毒基(批号: 110803-201807; 供含量测定用)、酯蟾毒配基(批号: 110718-201108; 供含量测定用)均购于中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 均购自 TEDIA; 磷酸、甲酸均为优级纯, 均购自北京化工厂; 去离子水, 经优普纯水系统制备; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B 色谱条件 色谱柱为岛津 C₁₈ ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~8 min, 19% A; 8~35 min, 19%→50% A; 35~36 min,

50%→100% A; 36~40 min, 100%→19% A。二极管阵列检测器检测, 甘草苷检测波长为 276 nm, 甘草酸检测波长为 250 nm, 丹酚酸 B 检测波长为 286 nm。流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

2.1.2 华蟾酥毒基、酯蟾毒配基色谱条件 色谱柱为 ZORBAXSB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B)(41 : 59), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL。串联质谱条件: 离子源为 ESI 源, 正离子模式, 扫描范围(*m/z*): 0~900; 氮气温度 350 °C, 氮气流速 12 L·min⁻¹, 雾化器压力 Nebulizer 241.3 kPa。华蟾酥毒基碎裂电压 160 V, 碰撞能 15 V, 酯蟾毒配基碎裂电压 130 V, 碰撞能 15 V。华蟾酥毒基母离子、子离子(*m/z*)分别为 443, 365; 酯蟾毒配基母离子、子离子(*m/z*)分别为 385, 366.9。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取丹酚酸 B、甘草苷、甘草酸对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 精密称定, 加 75%甲醇制成浓度分别为丹酚酸 B 140.0 μg·mL⁻¹、甘草苷 62.8 μg·mL⁻¹、甘草酸 83.6 μg·mL⁻¹的贮备液, 精密量取适量, 置于 5 mL 量瓶中, 用 75%甲醇定容, 摇匀, 制成每 1 mL 中分别含 70.0 μg, 31.4 μg 和 41.8 μg 的溶液, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 即得; 分别取华蟾酥毒基对照品、酯蟾毒配基对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 精密称定, 加甲醇制成浓度分别为华蟾酥毒基 9.90 μg·mL⁻¹、酯蟾毒配基 10.4 μg·mL⁻¹的贮备液, 精密量取适量, 置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 制成每 1 mL 中分别含 0.99 μg 和 1.04 μg 的溶液, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 ①甘草、丹参供试品溶液的制备: 取金生源胶囊内容物约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用 75%甲醇定容, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 1 h, 放冷, 加 75%甲醇定容, 摇匀, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 取续滤液, 即得。②干蟾皮供试品溶液的制备: 取金生源胶囊内容物约 2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 1 h, 放冷, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过。精密吸取续滤液 2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 即得。

2.3 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基检测质谱条件优化

在正离子电离模式下,考察了不同参数如碎裂电压、碰撞能对华蟾酥毒基和酯蟾毒配基测定的影响。对质谱信号影响最大的是碎裂电压,考察华蟾酥毒基 120~170 V,酯蟾毒配基 100~140 V 内碎裂电压对质谱信号的影响,结果见表 1。结果表明,华蟾酥毒基 160 V 左右响应值较高,酯蟾毒配基在 130 V 左右响应值较高。最终确定碎裂电压华蟾酥毒基为 160 V,酯蟾毒配基为 130 V。另一个对质谱信号影响大的因素是碰撞能,考察了 0~20 V 碰撞能对质谱信号的影响,结果见表 2。结果表明,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基碰撞能在 15 V 时,其子离子离子丰度最高,由于母离子在不同碰撞电压下离子丰度均很高,故以子离子丰度最高的碰撞能为考察依据。

表 1 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基碎裂电压优化

Tab. 1 Optimization of fragmentation voltage of cinobufagin and resibufogenin

华蟾酥毒基		酯蟾毒配基	
碎裂电压/V	响应值	碎裂电压/V	响应值
120	329 625.65	100	218 608.73
130	33 064.57	110	226 264.58
140	336 091.80	120	5 080 969.43
150	340 037.39	130	5 230 412.65
160	344 780.83	140	5 142 734.61
170	344 124.89	150	5 072 832.26

表 2 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基碰撞能优化

Tab. 2 Optimization of collision energy of cinobufagin and resibufogenin

碰撞能/V	华蟾酥毒基		酯蟾毒配基	
	母离子(443)	子离子(365)	母离子(385)	子离子(366.9)
0	-	-	-	-
5	93 510.20	-	7 716.37	1 068.92
10	78 252.30	3 289.72	64 088.07	4 046.12
15	49 131.30	6 373.68	41 162.30	6 838.32
20	25 529.95	4 407.06	18 182.74	4 476.46

注:“-”代表无离子相对丰度值。

Note:“-” represented the relative abundance value without ions.

m/z 443 为华蟾酥毒基分子离子峰,其他碎片离子包括 m/z 401, 365, 318.8, 346.9, 214.9, 202.9, 150.8, 148.9, 134.9。 m/z 385 为酯蟾毒配基分子离子峰,其碎片离子包括 m/z 366.9, 348.9, 254.8,

253, 160.8, 158.7, 146.8, 144.7, 106.8。根据不同碎裂电压及碰撞能华蟾酥毒基、酯蟾毒配基母离子及子离子响应值的大小,综合评定,选取母离子(m/z 443)、子离子(m/z 365)为华蟾酥毒基检测离子;母离子(m/z 385)、子离子(m/z 366.9)为酯蟾毒配基检测离子。

2.4 专属性试验

分别取除去甘草、丹参和干蟾皮的其他味药材,粉碎,按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法操作,制得甘草、丹参及干蟾皮的阴性供试品溶液,按“2.1”项下方法操作,测定。甘草、丹参阴性供试品溶液在甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B 对照品保留时间相应位置上无色谱峰,其他味药材对其含量测定无干扰,方法具有专属性。干蟾皮阴性供试品溶液在与华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的保留时间相应位置无色谱峰,方法具有专属性。结果见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下的对照品溶液,依次稀释浓度为甘草苷 3.14, 9.42, 15.7, 31.4, 47.1, 62.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,甘草酸 4.18, 12.5, 20.9, 41.8, 67.2, 83.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,丹酚酸 B 7.00, 21.0, 30.0, 70.0, 105.0, 140.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.1”项下方法操作,进样体积为 20 μL ,以溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程及相关系数,结果见表 3。

分别精密吸取“2.2.1”项下的对照品溶液,依次稀释浓度为华蟾酥毒基 0.495, 0.990, 1.98, 3.96, 5.94, 9.90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,酯蟾毒配基 0.520, 1.04, 2.08, 4.16, 6.24, 10.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。按“2.1”项下方法操作,进样体积为 2 μL ,以溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数,结果见表 3。

表 3 5 种成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab. 3 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of 5 components in Jinshengyuan capsules

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
甘草苷	$Y=40\ 987X-36\ 189$	0.999 8	3.14~62.8
甘草酸	$Y=19\ 417X-14\ 059$	0.999 8	4.18~83.6
丹酚酸 B	$Y=9\ 939\ 953X+26\ 489$	0.999 4	7.00~140.0
华蟾酥毒基	$Y=1\ 456.1X+47.923$	0.999 4	0.495~9.90
酯蟾毒配基	$Y=857.29X-214.96$	0.999 8	0.520~10.4

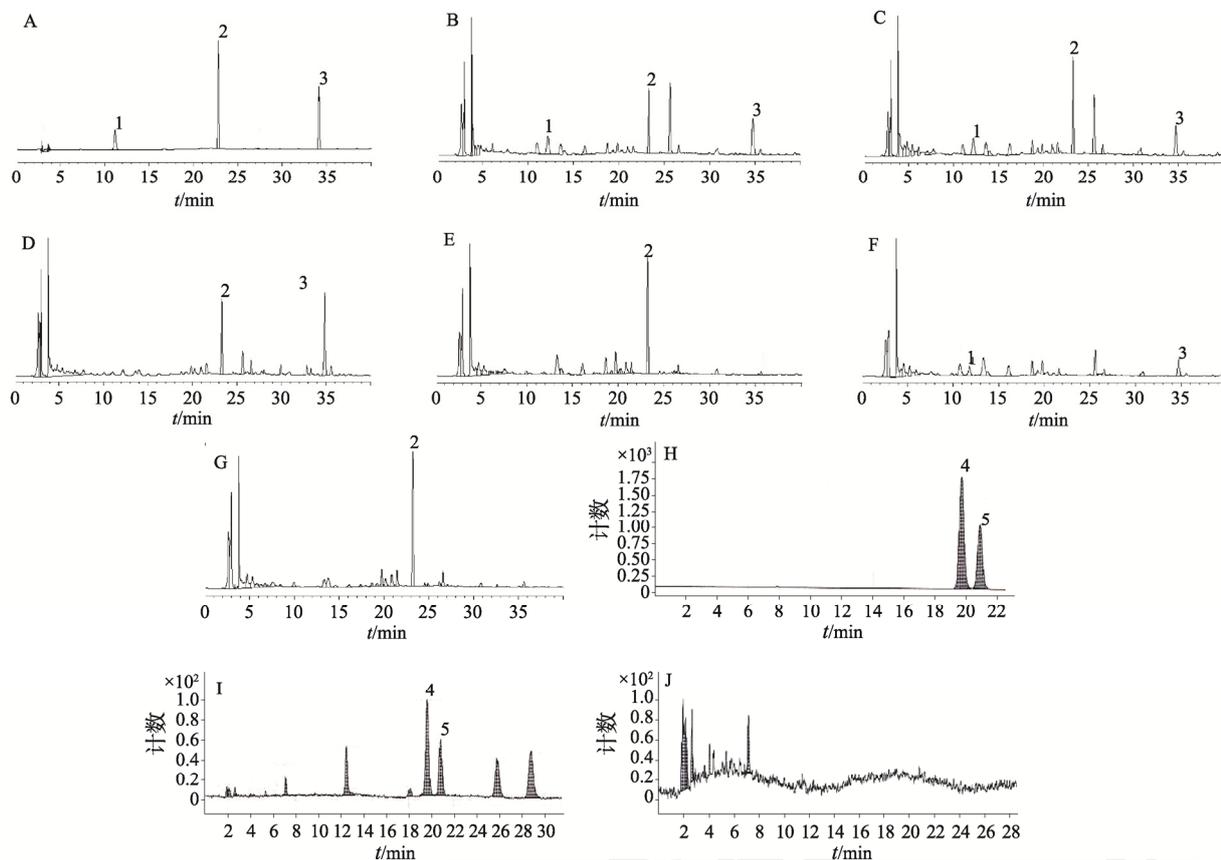


图 1 各成分色谱图

A-甘草苷、丹酚酸 B、甘草酸的混合对照品溶液；B-供试品溶液(276 nm)；C-供试品溶液(286 nm)；D-供试品溶液(250 nm)；E-缺甘草阴性样品溶液(276 nm)；F-缺丹参阴性样品溶液(286 nm)；G-缺甘草阴性样品(250 nm)；H-华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品溶液；I-供试品溶液；J-缺干蟾皮阴性样品溶液；1-甘草苷；2-丹酚酸 B；3-甘草酸；4-华蟾酥毒基；5-酯蟾毒配基。

Fig. 1 Chromatograms of various constituents

A-the mixed control solution of liquiritin, salvianolic acid B and glycyrrhizic acid; B-sample solution(276 nm); C-sample solution(286 nm); D-sample solution(250 nm); E-negative sample solution without Glycyrrhizae Radix et Rhizoma(276 nm); F-negative sample solution(286 nm) without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; G-negative sample solution without Glycyrrhizae Radix et Rhizoma(250 nm); H-the mixed control solution of cinobufagin and resibufogenin; I-sample solution; J-negative sample solution without dried toad skin; 1-liquiritin; 2-salvianolic acid B; 3-glycyrrhizic acid; 4-cinobufagin; 5-resibufogenin.

2.6 中间精密度试验

精密称取金生源胶囊(批号: 20170101)内容物适量, 按“2.2.2”项下不同时间不同分析人员制备甘草丹参、干蟾皮供试品溶液各 6 份, 按“2.1”项下分析方法操作, 结果显示, 甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的平均含量分别为每粒 0.273, 1.512, 1.471, 0.103, 0.104 mg; RSD 分别为 2.47%, 1.46%, 1.80%, 1.06%, 2.64%, 结果表明方法中间精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取“2.6”项下配制的甘草丹参、干蟾皮(批号: 20170101), 分别在 0, 2, 4, 6, 20, 24 h, 按“2.1”项下色谱及质谱条件进行分析。结果显示, 金生源胶囊中甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基不同时间峰面积积分值的 RSD 分别为 2.62%, 1.06%, 0.79%, 1.13%, 2.10%,

表明这 5 种成分在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

分别取同一批次金生源胶囊(批号: 20170101) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析。甘草苷、甘草酸、丹酚酸 B、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量的 RSD 分别为 0.81%, 0.91%, 2.03%, 1.72%, 2.77%, RSD 均 < 3%, 结果表明方法重复性良好。

2.9 回收率试验

采用加样回收率法。供试品溶液制备: 取金生源胶囊(批号: 20170101, 丹酚酸 B 含量每粒 1.471 mg、甘草苷含量每粒 0.273 mg、甘草酸含量每粒 1.512 mg)内容物约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 分别添加丹酚酸 B(0.825 mg·mL⁻¹)、甘草苷(0.171 mg·mL⁻¹)、甘草酸(1.150 mg·mL⁻¹)对照品溶液 1.0 mL, 按“2.2.2”项下方法操作, 制得回收

率试验供试品溶液。按“2.1”项下条件测定，结果见表 4。供试品溶液制备：取金生源胶囊(华蟾酥毒基含量每粒 0.104 mg，酯蟾毒配基含量每粒 0.102 mg)内容物约 1 g，共 6 份，精密称定，分别添加华蟾酥毒基(0.205 mg·mL⁻¹)、酯蟾毒配基(0.225 mg·mL⁻¹)混合对照品溶液 1.0 mL，按“2.2.2”项下方法操作，制得回收率试验供试品溶液。按“2.1”项下条件测定，结果见表 4。

2.10 样品含量测定

取 3 个不同批次的样品，按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液，用外标法按“2.1”项下色谱条件进行测定，计算样品中 5 种成分的含量。结果见表 5。

3 讨论

3.1 干蟾皮含量测定方法选择

由于干蟾皮在处方中仅占 3.8%，同时华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量又较低，采用紫外检测器检测时，供试品溶液制备方法考虑采用大取样量，小定容体积，以使单位体积中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量较高，但测定结果显示供试品中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的峰面积积分值均很小，阴性样品也有较大干扰；后期通过改变流动相的配比，更换色谱柱也无法有效消除干扰，故未能建立其紫外检测器含量测定方法。采用 HPLC-MS/MS 测定华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量，检测的样品浓度比紫外检测器法低 10 倍，进样量低 10 倍，由于其灵敏度高，专属性强，建立的含量测定方法能够满足金生源胶囊中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基检测要求。

3.2 质谱裂解碎片分析

华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的分子结构主要区别在于前者在 16 位的乙酸酯，其他结构相同。分子结构见图 2。华蟾酥毒基的质谱裂解数据表明，乙酸酯基首先断裂、脱水，形成碎片离子 [M+H-CH₃COOH-H₂O]⁺，*m/z* 365，是仅次于 *m/z*

表 4 各成分加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab. 4 Results of recovery tests for various constituents (*n*=6)

成分	样品取 样量/g	样品中 含量/mg	测出总 量/mg	添加量/ mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
甘草苷	0.254 9	0.140	0.311	0.171	100.00	99.13	1.43
	0.251 5	0.137	0.306	0.171	98.83		
	0.250 6	0.136	0.309	0.171	101.17		
	0.258 6	0.142	0.310	0.171	98.25		
	0.251 1	0.136	0.306	0.171	99.42		
	0.254 3	0.139	0.305	0.171	97.08		
甘草酸	0.254 9	0.772	1.887	1.150	96.96	98.96	2.76
	0.251 5	0.763	1.961	1.150	104.17		
	0.250 6	0.756	1.875	1.150	97.30		
	0.258 6	0.783	1.913	1.150	98.26		
	0.251 1	0.758	1.878	1.150	97.39		
	0.254 3	0.769	1.915	1.150	99.65		
丹酚酸 B	0.254 9	0.751	1.591	0.825	96.00	97.96	1.68
	0.251 5	0.739	1.616	0.825	100.23		
	0.250 6	0.735	1.577	0.825	96.23		
	0.258 6	0.759	1.614	0.825	97.71		
	0.251 1	0.738	1.603	0.825	98.86		
	0.254 3	0.749	1.613	0.825	98.74		
华蟾酥毒基	1.045 2	0.217	0.416	0.205	97.07	99.51	2.54
	1.025 4	0.213	0.425	0.205	103.41		
	1.011 5	0.210	0.408	0.205	96.59		
	1.133 4	0.236	0.442	0.205	100.49		
	0.980 4	0.204	0.407	0.205	99.02		
	1.134 0	0.236	0.442	0.205	100.49		
酯蟾毒配基	1.045 2	0.213	0.430	0.225	96.44	96.22	1.39
	1.025 4	0.209	0.423	0.225	95.11		
	1.011 5	0.206	0.428	0.225	98.67		
	1.133 4	0.231	0.445	0.225	95.11		
	0.980 4	0.200	0.417	0.225	96.44		
	1.134 0	0.231	0.446	0.225	95.56		

443 分子离子峰的第 2 高的碎片峰；[M+H-CH₃COOH-2H₂O]⁺，*m/z* 346.9 是 *m/z* 365 碎片离子进一步脱水的产物，也是主要的碎片离子，根据碎片离子丰度大小综合评定，选取母离子(*m/z* 443)、子离子(*m/z* 365)为检测离子。*m/z* 385 为酯

表 5 样品含量测定结果(*n*=2)

Tab. 5 Samples content determination results(*n*=2)

批次	甘草苷		甘草酸		丹酚酸 B		华蟾酥毒基		酯蟾毒配基	
	mg									
20170101	0.274	0.272	1.487	1.491	1.461	1.458	0.109	0.105	0.104	0.104
20170201	0.248	0.246	1.493	1.492	1.213	1.221	0.026	0.025	0.087	0.089
20170301	0.249	0.247	1.435	1.481	1.504	1.512	0.161	0.163	0.141	0.14
平均值	0.256		1.48		1.395		0.098 2		0.111	

蟾毒配基分子离子峰, 酯蟾毒配基裂解主要在不饱和内酯结构的一次、二次脱水及内酯结构的整体断裂, 其碎片离子包括 $[M+H-H_2O]^+$, m/z 366.9, $[M+H-2H_2O]^+$, m/z 348.9, $[M+H-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}]^+$, m/z 253, 根据离子丰度大小综合评定, 选取母离子(m/z 385)、子离子(m/z 366.9)为检测离子。

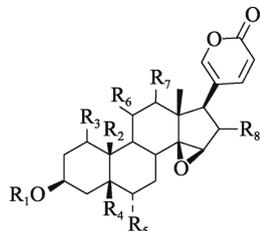


图2 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的分子结构
华蟾酥毒基- $R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H$, $R_2=CH_3$, $R_8=\beta\text{-OAc}$; 酯蟾毒配基- $R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H$, $R_2=CH_3$ 。

Fig. 2 Molecular structure of cinobufagin and resibufogenin
Cinobufagin- $R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H$, $R_2=CH_3$, $R_8=\beta\text{-OAc}$; Resibufogenin- $R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H$, $R_2=CH_3$ 。

3.3 提取溶剂方法的确定

对供试品溶液制备条件选择时, 首先依据药典方法进行回流提取, 同时与超声提取比较, 结果表明, 超声提取不但简单易行不损失样品, 而且提取效率高, 故采用超声提取法提取供试品溶液。同时考察了提取溶剂(75%甲醇、甲醇、70%乙醇)对样品含量的影响, 结果表明, 75%甲醇溶液对于金生源胶囊中丹酚酸 B、甘草苷和甘草酸提取率最高; 甲醇对于金生源胶囊干蟾皮中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的提取率最高, 故分别确定了提取溶剂。

REFERENCES

- [1] CHEN L. Quality standard for Shenmei Yangwei granules [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2016.
- [2] LU X G, CHEN X, LI J, et al. Simultaneous determination of tanshinol, protocatechualdehyde, salvianolic acid B, ferulic acid and puerarin in Tongmai particles by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(10): 1373-1376.
- [3] GENG J, NASHUNCHAOKETU, CONG L H, et al. Simultaneous determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Wuwei Shaji granules by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28(27): 3836-3838.
- [4] LIU Y C, CHEN Y G, WANG D, et al. Studies on chemical constituents on roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(07): 1251-1255.
- [5] 和燕, 施京红, 陈蓉, 等. 蟾蜍对肿瘤的治疗作用浅谈[J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2016, 16(7): 35-36.
- [6] HUANG Y Y, SONG X H. Research progress on the extraction, content determination and clinical application from the skin of *Bufo bufo* gargarizan [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2011, 29(7): 1636-1638.
- [7] 蒋涛. 内服蟾酥急性中毒致死 1 例报告[J]. 新疆中医药, 2002, 20(4): 17-18.
- [8] HE R R. Establishment of quality evaluation and draft quality standards for *Bufo venenum* [D]. Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2018.
- [9] YUAN M R, WANG R S. Study on UPLC fingerprints of Xiaoer Resuqing granules and determination of five constituents [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(12): 1517-1522.
- [10] JIA B H. Determination of the content of Compound Chanpi capsule of cinobufagin and resibufogenin [D]. Jilin University(吉林大学), 2014.

收稿日期: 2020-02-16

(本文责编: 曹粤锋)