

· 药学基础 ·

麝香保心丸中蟾酥的质量控制标准提升

石莉尧^{1,2}, 房蕴歌², 陈两绵², 王瑞¹, 王智民², 高慧敏^{2*}, 姜鹏³, 詹常森^{3*}

(1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619;

2. 中国中医科学院 中药研究所 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

3. 上海和黄药业有限公司, 上海 200201)

[摘要] 目的:建立麝香保心丸中蟾毒灵、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量测定的一测多评法,为完善麝香保心丸国家标准提供检测方法。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)建立麝香保心丸中3种蟾毒配基含量的同步测定方法,并进行方法学验证,色谱条件为Nucleosil 100-5 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸二氢钾水溶液(磷酸调节pH 3.2)(48:52),流速0.6 mL·min⁻¹,检测波长296 nm,柱温35℃;以华蟾酥毒基为内参物,建立其对蟾毒灵和脂蟾毒配基的相对校正因子,并对相对校正因子的关键影响因素进行考察,采用相对保留时间进行待测色谱峰定位,结合在线紫外光谱和超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱法(UPLC-QTOF/MS)提供的精确相对分子质量辅助识别待测色谱峰;采用外标法验证一测多评法测定结果的准确性。结果:建立了麝香保心丸中3种蟾毒配基的一测多评质量评价模式,华蟾酥毒基对蟾毒灵和脂蟾毒配基的相对校正因子分别为0.922和1.01;11批样品中三者总量范围33.7~36.0 μg/丸,外标法和一测多评法测定结果无显著性差异。结论:建立的方法可用于麝香保心丸中蟾毒灵、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的质量控制,建议麝香保心丸国家标准含量测定项下蟾酥药材的质量控制新增蟾毒灵,并以这3种成分总量制定含量限度值。

[关键词] 蟾酥; 麝香保心丸; 华蟾酥毒基; 蟾毒灵; 脂蟾毒配基; 一测多评法; 高效液相色谱法(HPLC)

[中图分类号] R22;R28;R914;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0159-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211646

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210510.1418.002.html>

[网络出版日期] 2021-05-10 17:09

Improvement of Quality Control Standard of Bufonis Venenum in Shexiang Baoxin Pills

SHI Li-yao^{1,2}, FANG Yun-ge², CHEN Liang-mian², WANG Rui¹, WANG Zhi-min²,

GAO Hui-min^{2*}, JIANG Peng³, ZHAN Chang-sen^{3*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Shanghai Hutchison Pharmaceuticals Co. Ltd., Shanghai 200201, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for determination of bufalin, cinobufagin and resibufogenin in Shexiang Baoxin pills, and to provide a method for improving the national standard of the pills. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) was developed for simultaneous determination of bufalin, cinobufagin and resibufogenin in Shexiang Baoxin pills and the methodology validation was carried out. The chromatographic separation was performed on a Nucleosil 100-5 C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile -0.1% potassium

[收稿日期] 20210407(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773897);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(QZPT004)

[第一作者] 石莉尧,在读硕士,从事中药化学与质量评价研究,E-mail:slyfeather@126.com

[通信作者] *高慧敏,博士,研究员,从事中药化学与质量评价研究,Tel/Fax:010-84014128,E-mail:hmgao@icmm.ac.cn;

*詹常森,博士,高级工程师,从事中药活性成分和质量标准研究,Tel:021-62509065,E-mail:zhanchangsen@shpl.com.cn

dihydrogen phosphate aqueous solution (pH adjusted to 3.2 with phosphoric acid) (48:52), and the flow rate was $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, the detection wavelength was set at 296 nm and the column temperature was 35°C . Taking cinobufagin as the internal standard, the relative correction factors (RCFs) of bufalin and resibufogenin were calculated, and the key influencing factors of RCFs were investigated. Relative retention time was used for the chromatographic peak location of the analyte, combining with the on-line ultraviolet spectroscopy and accurate relative molecular weight obtained by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS). The external standard method was used to verify the contents of three components obtained by QAMS. **Result:** QAMS was established for the determination of bufalin, cinobufagin and resibufogenin in the samples, and RCFs of cinobufagin to bufalin and resibufogenin were 0.922 and 1.01, respectively. The total content of the three marker compounds in 11 batches of Shexiang Baoxin pills was 33.7-36.0 μg per pill. There was no significant difference between the quantitative results of QAMS and external standard method. **Conclusion:** The established method can be used for the quality control of bufalin, cinobufagin and resibufogenin in Shexiang Baoxin pills. It is suggested that bufalin should be considered as one of three marker compounds, and the sum of bufalin, cinobufagin and resibufogenin should be used for the content limit of this preparation.

[Keywords] Bufonis Venenum; Shexiang Baoxin pills; cinobufagin; bufalin; resibufogenin; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); high performance liquid chromatography (HPLC)

麝香保心丸处方源自宋代《太平惠民和剂局方》的苏合香丸,由人工麝香、人参提取物、人工牛黄、肉桂、苏合香、蟾酥和冰片组成,具有芳香温通、益气强心的功效,用于气滞血瘀所致的胸痹,症见心前区疼痛、固定不移;心肌缺血所致的心绞痛、心肌梗死等^[1],是治疗卒心痛的首选良药,由上海和黄药业有限公司生产,属于国家中药保密品种。方中蟾酥来源于蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* 的干燥分泌物,具有解毒、止痛和开窍醒神的功效^[1]。蟾酥是国务院颁布的需要特殊管理的28种毒麻中药品种之一,其所含蟾蜍甙类物质具有高活性和高毒性,治疗窗窄^[2]。因此,含蟾酥成方制剂进行该药味的定量分析,并制定合理的含量限度,是保证临床用药安全、有效的前提。

麝香保心丸首次收载于1990年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)^[3],其中蟾酥的质量控制采用以脂蟾毒配基(RB)为对照的薄层色谱鉴别,2005年版《中国药典》增加了华蟾酥毒基(CB)和RB的含量测定方法,并规定两者总量不得少于18 $\mu\text{g}/\text{丸}$ ^[4],2010年版《中国药典》修订两者总量为18~56 $\mu\text{g}/\text{丸}$ ^[5],体现了其质量控制水平的提升。近年来关于麝香保心丸的质量评价研究除了针对指标成分CB和RB^[6-7]外,也有其他蟾毒配基类成分,如日蟾毒它灵^[8]、蟾毒它灵和蟾毒灵(BF)^[9]。

鉴于2020年版《中国药典》修订了蟾酥药材和饮片的含量测定方法,采用一测多评法(QAMS)检测BF,CB和RB的含量,三者总量不得少于7.0%。为了进一步提升中药大品种麝香保心丸中蟾酥的质量控制水平,并确保制剂与原料蟾酥成分检测的一致性,在2020年版《中国药典》所收载麝香保心丸质量标准中蟾酥含量测定方法的基础上进行优化,建立其中蟾酥来源的3种成分(BF,CB和RB)含量测定的QAMS。该方法既节约了对照物质成本,又可以避免RB对照品不稳定(需 -20°C 保存)给实际生产质检时带来的困扰;同时,本研究为实现原料蟾酥与产品质量控制指标的一致性提供了方法保障。

1 材料

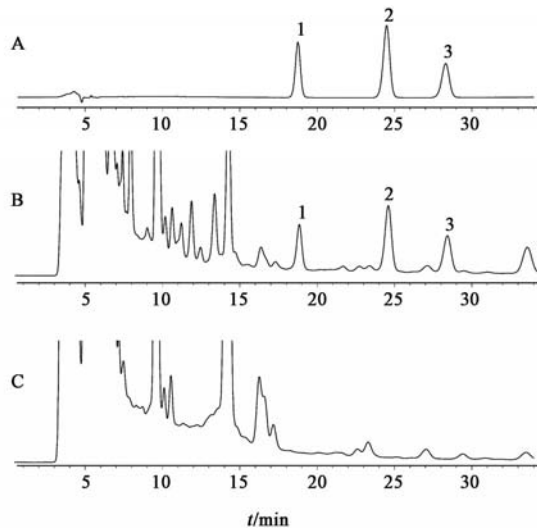
e2695型高效液相色谱仪(包括Empower 2色谱工作站),ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱和Xevo G2-S QTOF-四极杆高分辨飞行时间质谱仪(数据采集与处理采用MassLynx 4.1软件)均购自美国Waters公司;LC-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司),UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国Thermo公司),BSA 224S-CW型1/1万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],XSE 105DU型1/10万电子天平和S20型pH计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

BF,CB和RB对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111981-201501,110803-201807,

110718-201809,纯度分别为99.2%,99.6%,98.0%);水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。11批麝香保心丸(批号分别为191124,200613~200622)及缺蟾酥阴性样品均由上海和黄药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法(HPLC)检测条件 Nucleosil 100-5 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相选择乙腈-0.1%磷酸二氢钾水溶液(磷酸调pH 3.2)(48:52),流速0.6 mL·min⁻¹,波长296 nm,进样量10 μL,柱温设定35℃。理论板数以CB计应不低于1万,3种成分的分离度均>1.2,表明系统适用性良好。见图1。各待测成分的最大紫外吸收波长见表1。



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 缺蟾酥阴性样品;1. BF;2. CB;3. RB
图1 麝香保心丸的HPLC

Fig. 1 HPLC of Shexiang Baoxin pills

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取BF,CB和RB对照品适量,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为878,1 600,858 mg·L⁻¹的对照品储备液。取各对照品储备液适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,配成质量浓度分别为176,320,172 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。该对照品溶液加甲

醇稀释,得系列质量浓度的混合对照品溶液(BF,CB和RB质量浓度分别为176,320,172 mg·L⁻¹;87.8,160,85.8 mg·L⁻¹;43.9,80.0,42.9 mg·L⁻¹;22.0,40.0,21.5 mg·L⁻¹;11.0,20.0,10.8 mg·L⁻¹;5.50,10.0,5.40 mg·L⁻¹;2.75,5.00,2.70 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取本品80丸,研细(过五号筛,下同),取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率350 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液制备 取缺蟾酥阴性样品(过五号筛)约0.5 g,精密称定,按2.3项下方法制备,得阴性样品溶液。

2.5 专属性考察 由图1可知,缺蟾酥阴性样品在3种待测成分色谱峰处无干扰,为了进一步排除HPLC二极管阵列检测器进行色谱峰纯度检查的局限性,通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-QTOF/MS)对目标色谱峰的精确相对分子质量进行确认,各样品的基峰离子流图(BPI)见图2,待测成分质谱信息见表1。检测条件设定为Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相选择乙腈-0.1%甲酸水溶液(48:52),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL。采用正离子模式检测,电喷雾离子源(ESI),雾化气体为氮气,脱溶剂气流量800 L·h⁻¹,脱溶剂气温度600℃,气帘气流量50 L·h⁻¹,毛细管电压选择18 kV,锥孔电压40 V,补偿电压80 V,质谱扫描范围m/z 100~1 200。此条件下,3种待测成分色谱峰处无其他杂质干扰。

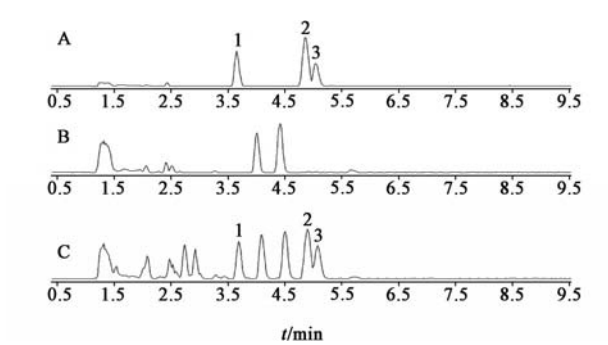
2.6 方法学验证

2.6.1 线性关系考察 精密吸取上述不同质量浓度的混合对照品溶液适量,按2.1项下条件测定,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得BF,CB和RB的回归方程分别为Y=1.42×10⁷X+2 210(r=0.999 9),Y=1.30×10⁷X+4 542(r=0.999 9),Y=1.32×10⁷X+422

表1 麝香保心丸待测成分的最大紫外吸收波长和质谱信息

Table 1 Maximum ultraviolet wavelength and mass spectrum information of analytes in Shexiang Baoxin pills

化合物	λ _{max} /nm	分子式	[M+H] ⁺ m/z		δ/ppm	碎片离子
			理论值	测定值		
BF	300	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	387.253 5	387.254 1	1.5	369.243 0,351.232 8,333.221 8,255.211 7
CB	294	C ₂₆ H ₃₄ O ₆	443.243 4	443.243 8	0.9	401.232 5,383.221 9,365.211 7,347.2011
RB	299	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	385.237 9	385.238 4	1.3	367.227 4,349.217 2,253.196 0



A. 混合对照品;B. 缺蛭酥阴性样品;C. 供试品;1. BF;2. CB;3. RB

图2 麝香保心丸的BPI

Fig. 2 BPI of Shexiang Baoxin pills

($r=0.999\ 9$)。分别以信噪比(S/N)为3和10的进样浓度确定检测限和定量限。结果表明BF,CB和RB分别在2.75~176,5.00~320,2.70~172 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系,三者检测限分别为0.178,0.265,0.309 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限分别为0.594,0.883,1.03 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 精密度试验 根据2020年版《中国药典》(四部)“分析方法验证指导原则”,精密度试验项下包括仪器精密度、重复性和中间精密度。①取同一混合对照品溶液适量,按2.1项下条件连续进样6次,记录各成分的色谱峰峰面积,计算BF,CB和RB峰面积的RSD依次为0.5%,0.09%和0.7%,表明仪器精密度良好。②取6份麝香保心丸样品(批号191124),按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下条件,记录各成分的色谱峰峰面积,计算BF,CB和RB的平均质量分数分别为0.035 3%,0.072 3%和0.045 6%,RSD分别为1.3%,1.5%和0.8%。③取同一混合对照品溶液,连续3 d按2.1项下条件测定,计算BF,CB和RB峰面积的RSD分别为0.7%,0.3%和1.0%,表明日间精密度良好。分别由3个不同的分析人员制备同一样品(批号191124)的供试品溶液,按2.1项下条件测定,计算BF,CB和RB含量的RSD分别为1.1%,0.9%和1.6%,说明不同操作人员的重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12,24,48,72 h按2.1项下条件测定,记录各成分的色谱峰峰面积,计算BF,CB和RB峰面积的RSD分别为1.3%,0.8%和1.9%,表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.6.4 加样回收试验 精密称取已知指标成分含量的麝香保心丸(批号191124)约0.25 g,共9份,按低、中、高3个比例分别精密加入一定量的BF,CB和RB对照品溶液,按2.3项下方法制备供试品溶

液,按2.1项下条件测定,计算3种成分的加样回收率,见表2。参照2020年版《中国药典》(四部)“分析方法验证指导原则”准确度项下,当待测成分含量为0.01%时加样回收率要求在85%~110%;当待测成分质量分数为0.1%时加样回收率要求在90%~108%^[10]。BF,CB和RB的加样回收率在90.2%~108.0%,由2.6.2项下可知,3种待测成分的质量分数均<0.1%,符合要求,见表2。

表2 麝香保心丸中BF,CB和RB含量测定的加样回收试验

Table 2 Recovery test for determination of BF, CB and RB in Shexiang Baoxin pills

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
BF	0.250 0	0.088 3	0.048 3	0.137	100.8	103.0	2.2
	0.249 9	0.088 2	0.048 3	0.139	105.2		
	0.250 0	0.088 3	0.048 3	0.138	102.9		
	0.250 0	0.088 3	0.096 5	0.183	98.1	98.1	2.1
	0.250 1	0.088 3	0.096 5	0.181	96.1		
	0.250 0	0.088 3	0.096 5	0.185	100.2		
	0.250 0	0.088 3	0.140 0	0.223	96.2	95.3	1.2
	0.250 1	0.088 3	0.140 0	0.222	95.5		
	0.250 0	0.088 3	0.140 0	0.220	94.1		
	0.250 0	0.181	0.088 0	0.274	105.7	106.1	1.7
CB	0.249 9	0.181	0.088 0	0.276	108.0		
	0.250 0	0.181	0.088 0	0.273	104.5		
	0.250 0	0.181	0.176 0	0.346	93.8	96.4	4.3
	0.250 1	0.181	0.176 0	0.359	101.1		
	0.250 0	0.181	0.176 0	0.347	94.3		
	0.250 0	0.181	0.272 0	0.458	101.8	97.3	4.1
	0.250 1	0.181	0.272 0	0.441	95.6		
	0.250 0	0.181	0.272 0	0.438	94.5		
	0.250 0	0.114	0.064 3	0.180	102.6	102.1	0.9
	0.249 9	0.114	0.064 3	0.180	102.6		
RB	0.250 0	0.114	0.064 3	0.179	101.1		
	0.250 0	0.114	0.112 0	0.215	90.2	93.2	4.7
	0.250 1	0.114	0.112 0	0.216	91.1		
	0.250 0	0.114	0.112 0	0.224	98.2		
	0.250 0	0.114	0.172 0	0.279	95.9	95.3	2.2
	0.250 1	0.114	0.172 0	0.274	93.0		
	0.250 0	0.114	0.172 0	0.281	97.1		
	0.250 0	0.114	0.172 0	0.281	97.1		

2.7 相对校正因子(RCF)的建立 精密吸取不同质量浓度的混合对照品溶液适量,按2.1项下条件测定,记录色谱图。根据相应公式^[11]计算RCF。

2.7.1 多点校正法 将混合对照品溶液质量浓度和峰面积导入公式 $f_{sx}=f_s/f_x=(A_s/C_s)/(A_x/C_x)$ 计算RCF,求平均值,式中 A_x 为待测成分峰面积, C_x 为待测成分质量浓度; A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物质

量浓度, f_{sx} 表示内参物与待测成分 RCF, f_s 表示内参物校正因子, f_x 表示待测成分校正因子。

2.7.2 斜率法 将混合对照品溶液的峰面积对质量浓度进行线性回归, 得各成分的回归方程和斜率。按公式 $f_{sx} = K_s/K_x$ 计算 RCF, 式中 K_s 为内参物标准曲线的斜率, K_x 为待测成分标准曲线的斜率。

2.7.3 不同对照品系列波长下计算 RCF 目前市售的蟾酥法定对照品有 BF, CB 和 RB, 其中 RB 对照品不稳定 (需 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存), 且 2020 年版《中国药典》中蟾酥药材标准建立过程中曾考察分别以 BF, CB 和 RB 为内参物的 RCF, 最终选择 CB 为内参物。故后续研究均以 CB 为内参物, 计算对其他 2 种成分的 RCF。通过同一实验室不同人员进行操作, 考察不

同操作人员对 RCF 的影响。称取内参物 CB 和其他待测成分的对照品各 3 份, 即 3 个系列, 各系列均按 2.2 项下方法配制 7 个质量浓度 (A1~A7) 的内参物与待测成分的混合对照品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 分别计算固定波长 296, (296 $\pm$ 1), (296 $\pm$ 2) nm 及各待测成分最大吸收波长处 CB 对其他 2 种成分的 RCF, 见表 3。结果发现采用 2 种方法计算时, 波长 (296 $\pm$ 1), (296 $\pm$ 2) nm 处 CB 对 BF 的 RCF($f_{c/ba}$) 和 CB 对 RB 的 RCF($f_{c/r}$) 无显著性差异, RSD 均 $<5.0\%$ 。参考 2020 年版《中国药典》蟾酥和麝香保心丸中蟾酥质量控制的检测波长, 结合不同波长下 RCF 的计算结果, 拟定检测波长 296 nm, $f_{c/ba}$ 和 $f_{c/r}$ 分别为 0.922 和 1.01, 用于样品中 2 种成分的含量测定。

表3 不同波长下CB对其他待测成分的RCF

Table 3 RCF of CB to other tested components at different detection wavelength

方法	系列	294 nm		295 nm		296 nm		297 nm		298 nm		最大吸收波长		不同波长的 $f_{c/ba}$		不同波长的 $f_{c/r}$	
		$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
多点校正	1	0.938	1.030	0.929	1.020	0.919	1.010	0.908	0.999	0.896	0.989	0.908	1.010	0.916	1.7	1.010	1.4
	2	0.930	0.982	0.920	0.972	0.904	0.965	0.894	0.950	0.885	0.938	0.904	0.961	0.906	1.8	0.961	1.6
	3	0.966	1.030	0.955	1.050	0.944	1.040	0.935	1.030	0.924	1.020	0.938	1.060	0.944	1.6	1.038	1.4
斜率	1	0.941	1.010	0.930	1.000	0.920	0.992	0.909	0.981	0.898	0.970	0.914	0.988	0.919	1.7	0.990	1.4
	2	0.925	0.963	0.914	0.953	0.903	0.954	0.894	0.932	0.881	0.922	0.899	0.939	0.903	1.7	0.944	1.6
	3	0.962	1.040	0.952	1.030	0.940	1.020	0.929	1.010	0.917	0.995	0.935	1.010	0.939	1.7	1.020	1.6

注: BF, CB 和 RB 的最大吸收波长分别为 300, 294, 299 nm。

2.7.4 RCF 的耐用性考察 通过对色谱条件考察, 发现 3 个成分仅在 Nucleosil 100-5 C_{18} 色谱柱上分离效果最好, 而且是在固定柱温和流速的前提下。因此, 在 RCF 耐用性考察时, 不再考察流速、柱温、色谱柱等色谱参数微调时对 RCF 的影响, 只考察固定色谱柱时不同品牌仪器对 RCF 的影响。取 2.7.3 项下系列 1 的混合对照品溶液, 分别在 LC-20A (3 台), e2695 和 UltiMate 3000 共 3 种品牌的 5 台 HPLC 仪上按 2.1 项下条件检测, 计算 $f_{c/ba}$ 和 $f_{c/r}$ 平均值分别为 0.928 和 1.01, RSD 分别为 0.8% 和 0.5%, 见表 4。表明 $f_{c/ba}$ 和 $f_{c/r}$ 在不同品牌 HPLC 仪上的耐用性较好。

2.7.5 待测色谱峰的定位方法 取系列 1 混合对照品溶液, 采用 Nucleosil 100-5 C_{18} 色谱柱, 在 LC-20A (3 台), e2695 和 UltiMate 3000 共 3 种品牌的 5 台 HPLC 仪上按 2.1 项下条件测定, 记录 BF, CB 和 RB 的保留时间, 计算 BF 和 RB 对 CB 的相对保留时间 $t_{ba/c}$ 和 $t_{r/c}$, 见表 5。结果发现 5 台仪器上 $t_{ba/c}$ 和 $t_{r/c}$ 的平均值分别为 0.777 和 1.15, RSD 分别为 1.1% 和 0.4%, 表明相对保留时间用于 BF 和 RB 色谱峰的定位具有可行性。必要时, 可参考待测色谱峰的在线

表4 麝香保心丸QAMS分析时RCF的耐用性考察

Table 4 Ruggedness test of RCF in QAMS of Shexiang Baoxin pills

系列	LC-20A-1		LC-20A-2		LC-20A-3		e2695		UltiMate 3000	
	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$	$f_{c/ba}$	$f_{c/r}$
A1	0.920	0.993	0.923	0.994	0.924	0.996	0.927	0.997	0.938	1.01
A2	0.920	0.993	0.925	0.996	0.927	0.997	0.929	1.000	0.940	1.01
A3	0.924	0.995	0.923	1.000	0.925	0.997	0.921	1.020	0.941	1.01
A4	0.919	0.999	0.931	1.010	0.927	1.000	0.931	1.040	0.944	1.01
A5	0.921	1.010	0.928	1.000	0.929	1.020	0.904	1.040	0.947	1.02
A6	0.916	1.030	0.920	1.030	0.932	1.030	0.947	0.990	0.943	1.03
A7	0.919	1.050	0.930	1.050	0.922	1.040	0.935	1.020	0.922	1.01

紫外吸收光谱和质谱信息辅助定位。

2.8 QAMS 与外标法 (ESM) 测定结果的比较 取不同批次的麝香保心丸约 0.5 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 采用 ESM 计算 3 种蟾毒配基的含量。QAMS 分析时按公式 $C_x = A_x/A_s \times C_s \times f_{sx}$ 计算 BF 和 RB 的含量。同时, 计算 QAMS 和 ESM 得到的 BF 和 RB 含量的相对偏差

表5 麝香保心丸QAMS分析时待测成分色谱峰的定位——相对保留值法

Table 5 Chromatographic peak localization of tested components in Shexiang Baoxin pills by relative retention time method

系列1	LC-20A-1		LC-20A-2		LC-20A-3		e2695		UltiMate 3000	
	$t_{ba/c}$	$t_{r/c}$	$t_{ba/c}$	$t_{r/c}$	$t_{ba/c}$	$t_{r/c}$	$t_{ba/c}$	$t_{r/c}$	$t_{ba/c}$	$t_{r/c}$
A1	0.764	1.15	0.783	1.15	0.773	1.15	0.784	1.15	0.778	1.15
A2	0.764	1.16	0.783	1.15	0.773	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15
A3	0.764	1.16	0.783	1.15	0.773	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15
A4	0.764	1.16	0.784	1.15	0.773	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15
A5	0.764	1.16	0.784	1.15	0.774	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15
A6	0.765	1.16	0.783	1.15	0.774	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15
A7	0.765	1.16	0.784	1.15	0.774	1.15	0.785	1.15	0.778	1.15

(RD),见表6。采用IBM SPSS Statistics 22.0软件对ESM和QAMS计算的BF和RB含量进行统计分析,两组BF数据呈非正态分布($P<0.05$),采用非参数检验,结果发现2种方法测定结果无差异性($P=0.579$);两组RB数据呈正态性分布,采用 t 检验,结果发现2种方法测定结果无差异性($P=0.889$)。表明建立的RCF可以用于麝香保心丸中BF和RB的含量计算。

表6 ESM和QAMS测定麝香保心丸中BF,CB和RB的含量($n=2$)

Table 6 Contents of BF,CB and RB in Shexiang Baoxin pills by external standard method and QAMS ($n=2$)

样品 批号	CB		BF				RB				CB+RB / $\mu\text{g}^{(1)}$	BF+CB +RB/ $\mu\text{g}^{(1)}$
	ESM / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	ESM / $\mu\text{g}^{(1)}$	ESM / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	QAMS / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	QAMS / $\mu\text{g}^{(1)}$	RD/%	ESM / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	QAMS / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	QAMS / $\mu\text{g}^{(1)}$	RD/%		
191124	0.723	16.3	0.353	0.355	7.99	0.27	0.456	0.466	10.5	1.10	26.8	34.8
200613	0.720	16.2	0.350	0.352	7.92	0.28	0.426	0.433	9.74	0.81	25.9	33.9
200614	0.724	16.3	0.334	0.336	7.56	0.30	0.431	0.438	9.86	0.81	26.1	33.7
200615	0.779	17.5	0.359	0.361	8.12	0.28	0.417	0.423	9.52	0.71	27.0	35.2
200616	0.753	16.9	0.344	0.346	7.79	0.29	0.402	0.408	9.18	0.74	26.1	33.9
200617	0.782	17.6	0.357	0.359	8.08	0.28	0.420	0.427	9.61	0.83	27.2	35.3
200618	0.761	17.1	0.354	0.356	8.01	0.28	0.409	0.416	9.36	0.85	26.5	34.5
200619	0.797	17.9	0.410	0.413	9.29	0.36	0.382	0.389	8.75	0.91	26.7	36.0
200620	0.798	18.0	0.409	0.411	9.25	0.24	0.381	0.387	8.71	0.78	26.7	35.9
200621	0.798	18.0	0.416	0.418	9.41	0.24	0.380	0.386	8.69	0.78	26.6	36.0
200622	0.792	17.8	0.415	0.417	9.38	0.24	0.379	0.385	8.66	0.79	26.5	35.9

注:¹⁾每丸中质量;RD指相应成分QAMS($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)和ESM($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)两者之间的相对偏差。

3 讨论

麝香保心丸为中药大品种,关于其蟾蜍甙类成分(日蟾毒它灵,蟾毒它灵,BF,CB和RB)的体内外分析方法已有报道^[6-9,12-14],但就产品质量评价而言,多集中于检测CB和RB,这可能与该品种国家标准中质量控制指标为这2个成分有关。鉴于制剂的原料药蟾酥的国家标准已经改变,为了保持制剂与原料质量控制指标成分的一致性,本研究建立了以CB为内参物,同步测定麝香保心丸中BF和RB含量的QAMS,以期为进一步提升制剂中蟾酥的质量控制水平,保证产品质量均一性和稳定性提供检测方法。

在色谱条件优化过程中,曾采用2020年版《中国药典》(一部)蟾酥含量测定项下的色谱条件^[1](乙腈-0.3%乙酸水溶液梯度洗脱)和麝香保心丸含量测定项下蟾酥的色谱条件^[1][乙腈-0.5%磷酸二氢钾

水溶液(50:50)]对样品进行分析,前者在RB色谱峰处,后者在BF色谱峰处不能达到完全分离。随后分别采用乙腈-甲酸/乙酸/磷酸水溶液或者甲醇-甲酸/乙酸/磷酸水溶液,均难以达到定量分析对待测成分分离度的要求。进一步在2020年版《中国药典》麝香保心丸含量测定项下蟾酥的色谱条件基础上进行优化,乙腈-0.5%/0.1%磷酸二氢钾水溶液(磷酸调节pH 3.2)(48:52)条件下待测峰均分离度良好,并且缺蟾酥阴性样品在相应保留时间处无杂质干扰。结合色谱柱的损耗考虑,最终选择0.1%磷酸二氢钾水溶液。此外,在色谱柱耐用性考察时,曾对10多种品牌的色谱柱分离效果进行对比,以Alltima™ C₁₈^[11,15-17]和Nucleosil 100-5 C₁₈色谱柱对样品中3种成分分离度最好,特别是对于CB和RB色谱峰的分离,远远优于其他品牌相同填料相同规格

的色谱柱。因此,最终确定色谱条件为乙腈-0.1%磷酸二氢钾水溶液(磷酸调节 pH 3.2)(48:52),流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,检测波长 296 nm。需要说明的是,在不同仪器上进行方法耐用性考察时,Waters 仪器上色谱峰出峰相对较快,样品待测色谱峰与前后杂质的保留时间差会稍有不同,用相对保留时间进行色谱峰定位时,若相对保留时间超出规定值的±5%时,可参考待测色谱峰的在线紫外吸收光谱和质谱信息进行辅助定位。

在供试品溶液制备方法确定的过程中,参考了2020年版《中国药典》麝香保心丸含量测定项下蟾酥的供试品溶液制备方法^[1](超声提取 30 min),鉴于蟾酥含量测定项下供试品溶液制备方法^[1]采用加热回流 1 h,因此,本研究比较了回流提取 30 min 和 60 min,以及超声提取 30 min 对 3 种待测成分含量的影响,结果显示 BF、CB 和 RB 的含量无明显差异。从提取方式的便利性考虑,选择供试品溶液的制备方法为超声提取 30 min。

以 CB 为内参物,建立 BF 和 RB 的 RCF 并在实验室内部进行不同操作人员之间的验证,最终确定 CB 对 BF 和 RB 的 RCF 分别为 0.922 和 1.01。采用该 RCF 进行 11 批样品中 BF 和 RB 的含量计算,采用 RD 和统计学分析表明含量与 ESM 测定结果无显著性差异。在 11 批样品中,CB 和 RB 之和处于 25.9~27.2 μg/丸(QAMS),均符合 2020 年版《中国药典》麝香保心丸质量标准项下要求。从不同批样品中 CB、BF 和 RB 含量来看,波动范围相对较小,提示麝香保心丸批间一致性良好。综上所述,建议基于本研究建立的 QAMS,积累更多批次样品中 BF、CB 和 RB 的含量数据,制定与原料蟾酥检测成分一致的质量控制指标及合理的含量限度,以完善产品质量标准,提升质量控制水平。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:401-402,1891-1893.
- [2] 李宗云,曲婷,王鹏飞,等. 毒性中药蟾酥质量研究现状及关键影响因素分析[J]. 中国中药杂志,2017,42(5):863-869.
- [3] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,化学工业出版社,1990:534-535.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:664-665.

- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:1241-1242.
- [6] 李志东,朱士春,葛朝晖. HPLC法测定不同批次麝香保心丸中华蟾酥毒基与脂蟾毒配基的含量[J]. 海峡药学,2017,29(12):72-74.
- [7] 刘一兵,杨艳. HPLC法同时测定麝香保心丸中五种成分的含量[J]. 解放军药学学报,2017,33(1):44-47.
- [8] 姜鹏,詹常森. 麝香保心丸中九种有效成分的含量测定[J]. 海峡药学,2017,29(6):45-48.
- [9] LYU C, CHEN L Q, FU P, et al. Simultaneous quantification of 11 active constituents in Shexiang Baoxin pill by ultraperformance convergence chromatography combined with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2017, 1052: 135-141.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
- [11] 房蕴歌,王鹏飞,朱厚达,等. 蟾酥药材和饮片(蟾酥粉)的质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(8):1726-1733.
- [12] WANG S P, PENG C C, JING P, et al. Simultaneous determination of seven bufadienolides in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin pill by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B, 2014, 967:255-263.
- [13] HUANG H M, YANG Y G, LYU C, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of five bufadienolides from the Shexiang Baoxin pill following oral administration to mice [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 161:175-185.
- [14] TAO J F, MAO L, ZHOU B L, et al. Simultaneous determination of ginsenosides and bufadienolides in rat plasma after the oral administration of Shexiang Baoxin pill for pharmacokinetic study by liquid chromatography tandem mass spectrometry following solid phase extraction[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(3):e3816.
- [15] 曲婷,高慧敏,陈两绵,等. 蟾蜍类药材中吲哚生物碱和蟾毒配基类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(20):3086-3091.
- [16] 曲婷,陈两绵,高慧敏,等. 产地加工和炮制对蟾酥药材及饮片质量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):63-67.
- [17] 王鹏飞,房蕴歌,李宗云,等. 基于特征图谱和一测多评法的蟾酥药材质量控制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(14):2863-2871.

【责任编辑 刘德文】