

HPLC-MS 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物

李娟^{1,2,3}, 狄留庆^{1,2,3*}, 李俊松^{1,2,3}, 钱静^{1,2,3}, 王恒斌⁴, 李全⁴

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023
2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023
3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023
4. 雷允上药业有限公司, 江苏 苏州 215009

摘要: 目的 建立 HPLC-MS 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物(和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基)的方法。方法 采用 ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.15%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 40 ℃, 检测波长 296 nm。HPLC-MS 联用的色谱条件与 HPLC 分离基本条件一致, 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液。通过电喷雾离子源, 正离子模式扫描, 对六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物进行分析鉴别。结果 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物均得到良好分离, 线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 6$)。加样回收率均在 92%~105%, RSD<5%。应用建立的 HPLC-MS 方法测定了 10 批六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物的量, 分别为和蟾蜍他灵 0.40~0.88 mg/g, 沙蟾毒精 0.32~0.83 mg/g, 远华蟾毒精 0.61~2.11 mg/g, 去乙酰华蟾毒它灵 0.15~0.32 mg/g, 蟾毒它灵 0.84~1.85 mg/g, 华蟾毒它灵 25.76~62.14 mg/g, 蟾毒灵 0.96~2.06 mg/g, 华蟾酥毒基 2.30~4.75 mg/g, 脂蟾毒配基 1.20~2.61 mg/g。结论 所建立的定量测定方法简便、快速、准确可靠, 专属性强, 可用于六神丸的质量控制。

关键词: 六神丸; 蟾酥; 蟾蜍二烯内酯; HPLC; 和蟾蜍他灵; 沙蟾毒精; 远华蟾毒精; 去乙酰华蟾毒它灵; 蟾毒它灵; 华蟾毒它灵; 蟾毒灵; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0700-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.014

Simultaneous determination of nine bufadienolides in Liushen Pill by HPLC-MS

LI Juan^{1,2,3}, DI Liu-qing^{1,2,3}, LI Jun-song^{1,2,3}, QIAN Jing^{1,2,3}, WANG Heng-bin⁴, LI Quan⁴

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China
3. Nanjing Engineering and Technology Research Center for TCM Pellets, Nanjing 210023, China
4. Suzhou Leiyunshang Pharmaceutical Co. Limited, Suzhou 215009, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-MS method for determining nine bufadienolides (gamabufotalin, arenobufagin, telocinobufagin, desacetylcinobufotalin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin, cinobufagin, and resibufogenin) in *Bufonis Venenum* and Liushen Pill. **Methods** HPLC analysis was performed on ODS-2 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase made up of acetonitrile and 0.15% phosphoric in water. Flow rate was set at 1 mL/min and column temperature was 40 ℃. The detection wavelength was 296 nm. Nine bufadienolides were determined by HPLC-ESI-TOF-MS with the mobile phase made up of acetonitrile and 0.2% formic acid in water. Eletspray ionization source was applied and operated in the positive ion mode. **Results** Nine bufadienolides were separated at baseline with good linearity ($r \geq 0.999\ 6$). The recovery rates were 92%—105% (RSD < 5%). **Conclusion** The method established is rapid, simple, and accurate, which is helpful to control the quality of Liushen Pill.

Key words: Liushen Pill; *Bufonis Venenum*; bufadienolides; HPLC; gamabufotalin; arenobufagin; telocinobufagin; desacetylcinobufotalin; bufotalin; cinobufotalin; bufalin; cinobufagin; resibufogenin

收稿日期: 2016-10-19

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-30); 江苏省科技成果转化项目 (BA2016104); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 李娟 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药剂学研究。Tel: (025)85811230 E-mail: lj199100@163.com

*通信作者 狄留庆, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药剂学研究。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing@hotmail.com

六神丸由麝香、蟾酥、雄黄等6味药组成,具清凉解毒、消炎止痛等功效,常用于烂喉丹痧、咽喉肿痛^[1]、单双乳蛾、小儿热疳等病症。其中蟾酥 *Bufois Venenum* 为蟾蜍科蟾蜍属动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的干燥分泌物,其主要活性成分为蟾蜍二烯内酯类化合物^[2-3],具有显著的洋地黄样作用,能够升压、兴奋呼吸和抗肿瘤^[3-6]。蟾蜍二烯内酯类亦含一定心脏毒性,可引起心律失常、心功能障碍等^[7-10]。因此,六神丸中蟾蜍二烯内酯类成分的定量测定对于六神丸质量控制具有重要的意义^[11]。

文献报道中蟾酥的定量测定采用的方法有紫外分光光度法^[12]、薄层色谱法^[13]、二阶导数光谱法^[14]、HPLC 法^[15-16]等,未见 HPLC 法对和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵等9种蟾蜍二烯内酯类化合物同时测定的报道。因此,本研究建立 HPLC-MS 法同时测定该9种蟾蜍二烯内酯类化合物量的方法,为六神丸的质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

高效液相色谱系统,美国 Waters e2695,包括在线脱气机,自动进样器 Prominence SIL-20A, 2998 紫外可见光检测器和柱温箱 CTO-20A; Q-TOF5600 质谱仪,配电喷雾离子源(ESI),美国 AB 公司; 汉邦 ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Anke TGL-16C 高速离心机,上海安亭科学仪器厂; FA1204B 电子分析天平,上海精密科学有限公司; CPA225D 电子天平,德国 Sartorius 公司; Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪,美国密理博公司; KQ-500DE 超声机,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与试药

乙腈,色谱纯,美国 TEDIA 试剂公司; 甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技有限公司; 重蒸水,由 Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪制得; 和蟾蜍他灵(gamabufotalin, 批号 465-11-2)、沙蟾毒精(arenobufagin, 批号 464-74-4)、远华蟾毒精(telocinobufagin, 批号 472-26-4)、去乙酰华蟾毒它灵(desacetylcinobufotalin, 批号 4099-30-3)、蟾毒它灵(bufotalin, 批号 471-95-4)、华蟾毒它灵(cinobufotalin, 批号 1108-68-5)、蟾毒灵(bufalin, 批号 11981-201501)对照品均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司,经面积归一化法测定,质量分数均

大于 98.0%; 华蟾酥毒基(cinobufagin, 批号 110803-201406, 供定量测定用,质量分数 99.6%)、脂蟾毒配基(resibufogenin, 批号 110718-201108, 供定量测定用,质量分数 98.9%)购自中国食品药品检定研究院。

1.3 样品

六神丸,雷允上药业有限公司,批号分别为 NA18003A、NA18008B、NA18018A、NA18021B、OA18019A、OA10005B、OA18025B、OA18009C、OA18004B、LA18012C。缺蟾酥阴性制剂(1批)由上海雷允上药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

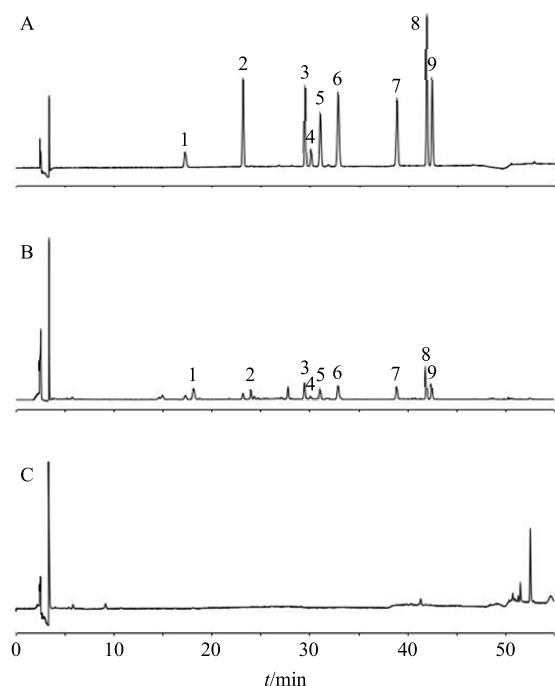
色谱柱为 ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈-0.15%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~15 min, 20%~25%乙腈; 15~25 min, 25%~40%乙腈; 25~35 min, 40%乙腈; 35~37 min, 40%~55%乙腈; 37~45 min, 55%乙腈; 45~47 min, 55%~100%乙腈; 47~52 min, 100%乙腈; 52~54 min, 100%~20%乙腈; 54~55 min, 20%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 296 nm; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL。对照品、六神丸样品与阴性样品的 HPLC 色谱图见图 1。

2.2 HPLC-MS 条件

HPLC-MS 联用的色谱条件与“2.1”项 HPLC 分离基本条件一致,流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液,梯度洗脱。ESI 离子源,正离子模式; 扫描范围 m/z : 50~1 500; 喷雾电压(IS): 5 500 V; 去簇电压(DP): 100 V; 碰撞能量(CE): 35 V; 辅助加热温度 550 °C; 雾化器压强 379 kPa; 辅助加热气压强 379 kPa; 气帘气压强 241 kPa。实验数据采用 PeakView 1.2 软件处理。对照品、样品总离子流图见图 2。蟾蜍二烯内酯类化合物的鉴定结果见表 1 和 2。

2.3 对照品溶液的制备

分别取和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品适量,精密称定,以甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为蟾毒配基 70.39 μg/mL、沙蟾毒精 257.78 μg/mL、远华蟾毒精 261.89 μg/mL、去乙酰华蟾毒它灵 42.96 μg/mL、蟾毒它灵 214.73 μg/mL、华蟾毒它灵 366.44 μg/mL、蟾毒灵 241.56 μg/mL、华蟾酥毒基 468.11 μg/mL、脂蟾毒配基 331.56 μg/mL 的混合对照品储备液。



1-和蟾蜍他灵 2-沙蟾毒精 3-远华蟾毒精 4-去乙酰华蟾毒它灵 5-蟾毒它灵 6-华蟾毒它灵 7-蟾毒灵 8-华蟾酥毒基 9-脂蟾毒配基, 图2同

1-gamabufotalin 2-arenobufagin 3-telocinobufagin 4-desacetylcinobufotalin 5-bufotalin 6-cinobufotalin 7-bufalin 8-cinobufagin 9-resibufogenin, same as Fig. 2

图1 对照品溶液 (A)、六神丸供试品溶液 (B)、阴性样品溶液 (C) 的 HPLC

Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A), sample solution of Liushen Pill (B), and negative sample solution without toad venom (C)

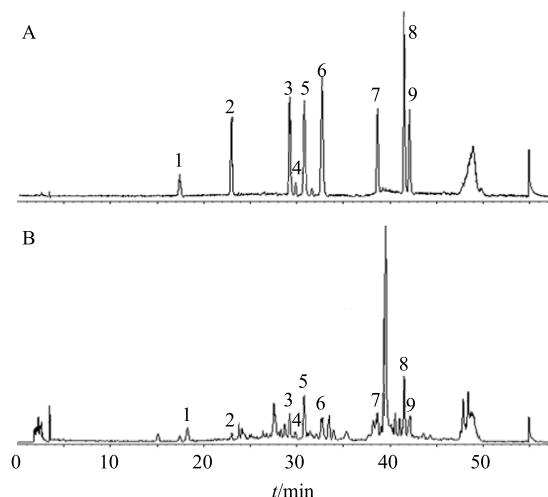


图2 混合对照品溶液 (A) 和六神丸供试品溶液 (B) 的总离子流图

Fig. 2 HPLC-MS total ion chromatograms of mixed reference solution (A) and test sample solution of Liushen Pill (B)

2.4 供试品溶液的制备

取六神丸粉末约 0.2 g, 精密称定, 精密加入甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声 (工作频率 50 kHz, 功率 250 W) 处理 60 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 取上清液进样分析。

2.5 阴性供试品溶液的制备

取缺蟾酥的阴性样品, 按供试品溶液制备法制备, 进样测定。

表1 9种蟾蜍二烯内酯类化合物对照品 HPLC-MS 鉴定结果

Table 1 Identification results of nine bufadienolides in reference solution by HPLC-MS

峰号	t_R/min	分子离子	分子式	相对分子质量		误差/ $(\times 10^{-6})$	化合物
				实测值	理论值		
1	17.445	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_5$	403.247 2	403.247 9	-1.7	和蟾蜍他灵
2	22.964	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_6$	417.226 3	417.227 2	-2.1	沙蟾毒精
3	29.250	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_5$	403.247 5	403.247 9	-1.0	远华蟾毒精
4	29.873	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_5$	401.232 1	401.232 3	-0.4	去乙酰华蟾毒它灵
5	30.806	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_6$	445.257 9	445.258 5	-1.3	蟾毒它灵
6	32.671	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_7$	459.237 4	459.237 7	-0.7	华蟾毒它灵
7	38.661	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_4$	387.252 9	387.253 0	-0.2	蟾毒灵
8	41.534	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_6$	443.242 0	443.242 8	-1.8	华蟾酥毒基
9	42.105	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4$	385.237 5	385.237 3	0.4	脂蟾毒配基

表 2 六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物 HPLC-MS 鉴定结果
Table 2 Identification results of nine bufadienolides in Liushen Pill by HPLC-MS

峰号	t_R/min	分子离子	分子式	相对分子质量		误差/ $(\times 10^{-6})$	化合物
				实测值	理论值		
1	17.438	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_5$	403.247 4	403.247 9	-1.2	和蟾蜍他灵
2	22.975	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_6$	417.226 6	417.227 2	-1.4	沙蟾毒精
3	29.253	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_5$	403.247 2	403.247 9	-1.7	远华蟾毒精
4	29.857	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_5$	401.231 5	401.232 3	-1.9	去乙酰华蟾毒它灵
5	30.775	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_6$	445.257 6	445.258 5	-1.9	蟾毒它灵
6	33.439	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_7$	459.236 9	459.237 7	-1.8	华蟾毒它灵
7	38.638	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_4$	387.252 1	387.253 0	-2.3	蟾毒灵
8	41.514	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_6$	443.241 0	443.242 8	-4.1	华蟾酥毒基
9	42.119	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4$	385.236 2	385.237 3	-2.9	脂蟾毒配基

2.6 线性关系考察

精密吸取“2.3”项下对照品储备液，依次稀释 2、4、8、16、32、64 倍，制备包括母液在内的 7 份溶液。分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液 10 μL ，注入高效液相色谱仪，记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，

绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程见表 3。

2.7 检测限和定量限

在选定的色谱条件下，当信噪比为 3 时，测得和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的检测限分别为 2.7、2.1、5.1、

表 3 蟾蜍二烯内酯类成分的回归方程

Table 3 Regression equations with correlation coefficients of nine bufadienolides

成分	t_R/min	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
和蟾蜍他灵	17.270	$Y=9\ 403.5\ X-5\ 732.2$	0.999 6	1.10~70.39
沙蟾毒精	23.180	$Y=9\ 585.4\ X-3\ 300.8$	1.000 0	4.03~257.78
远华蟾毒精	29.533	$Y=8\ 300.6\ X-3\ 149.1$	1.000 0	4.09~261.89
去乙酰华蟾毒它灵	30.131	$Y=11\ 524\ X-709.03$	0.999 9	0.67~42.96
蟾毒它灵	31.063	$Y=8\ 263.9\ X-2\ 728.8$	0.999 9	3.36~214.73
华蟾毒它灵	32.890	$Y=7\ 672.7\ X-4\ 691.1$	1.000 0	5.73~366.44
蟾毒灵	38.888	$Y=9\ 337.9\ X+177.01$	0.999 9	3.77~241.56
华蟾酥毒基	41.989	$Y=8\ 073.2\ X-3\ 395$	0.999 9	7.31~468.11
脂蟾毒配基	42.483	$Y=7\ 319.1\ X-2\ 590.4$	1.000 0	5.18~331.56

1.7、4.2、7.2、4.7、9.1、13.0 ng；当信噪比为 10 时，测得和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的检测限分别为 11.0、8.5、10.2、3.4、8.4、14.3、9.4、36.6、25.9 ng。

2.8 精密度试验

按照“2.1”项下色谱条件，分别取对照品溶液 10 μL ，重复进样 6 次，和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒

它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 1.36%、1.25%、1.44%、1.07%、1.08%、1.21%、1.20%、1.16%、1.11%，RSD 均 < 3%，结果表明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

取六神丸样品溶液，按“2.1”项色谱条件，在 0、2、4、8、10、12、16、24 h 进样 10 μL ，六神丸中和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华

蟾酥毒基、脂蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 1.70%、1.60%、1.80%、2.37%、1.83%、1.87%、1.93%、1.71%、1.75%，RSD 均 < 3%，结果表明六神丸溶液在 24 h 内稳定。

2.10 重复性试验

取同一批六神丸样品，按供试品溶液的制备方法制备 6 份，分别进样 10 μ L，六神丸中和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基质量分数的 RSD 分别为 2.06%、2.28%、2.47%、2.09%、2.44%、2.36%、2.47%、2.45%、2.45%，RSD 均 < 3%，结果表明方法重复性良好。

2.11 回收率试验

精密称取同一批蟾六神丸样品各 6 份，分别准确加入一定量的蟾酥二烯内酯类化合物，按供试品溶液的制备方法处理后，按“2.1”项色谱条件测定，

计算回收率及 RSD，结果和蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的平均回收率分别为 101.7%、101.1%、97.7%、98.8%、98.2%、96.6%、99.4%、97.5%、95.9%，RSD 分别为 3.81%、3.81%、2.81%、3.40%、3.54%、3.88%、4.02%、3.77%、4.21%。

2.12 样品测定

取六神丸按“2.4”项方法制成供试品溶液，按“2.1”项色谱条件进样分析，根据线性回归方程计算 9 种蟾酥二烯内酯类成分的质量分数见表 4。

定量测定结果表明，不同批次样品中 9 种蟾酥二烯内酯类化合物的质量分数存在一定的差异，这可能与原药材的选取差异有关，这也与文献报道的不同产地蟾酥所含成分的种类和质量分数差异较大相一致^[17-18]。

表 4 六神丸中 9 种蟾酥二烯内酯类成分的质量分数 ($n=3$)

Table 4 Contents of nine bufadienolides in toad venom and Liushen Pill ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	和蟾蜍他灵	沙蟾毒精	远华蟾毒精	去乙酰华蟾毒它灵	蟾毒它灵	华蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾酥毒基	脂蟾毒配基
NA18003A	0.40	0.32	0.62	0.15	0.84	25.76	0.96	2.30	1.43
NA18008B	0.88	0.69	1.75	0.32	1.85	62.14	2.06	4.75	2.61
NA18018A	0.62	0.59	1.87	0.21	1.35	50.60	1.47	3.10	1.95
NA18021B	0.51	0.45	1.43	0.18	1.12	41.07	1.22	2.72	1.69
OA18019A	0.73	0.83	2.11	0.23	1.61	55.28	1.75	3.26	2.33
OA10005B	0.61	0.64	1.71	0.21	1.34	48.46	1.48	3.04	1.99
OA18025B	0.72	0.79	2.01	0.22	1.58	54.00	1.67	3.28	2.06
OA18009C	0.44	0.18	0.61	0.16	0.89	25.97	1.05	2.64	1.64
OA18004B	0.58	0.61	1.63	0.20	1.23	45.89	1.39	2.97	2.04
LA18012C	0.75	0.55	1.38	0.28	1.56	53.78	1.48	3.35	1.20

3 讨论

取适量 9 种对照品以甲醇溶解，并稀释至适当质量浓度，经紫外光谱扫描测定，发现各对照品在 296 nm 处均接近最大吸收，故选择 296 nm 作为测定波长。

本实验对提取方法（超声提取、回流提取）、提取溶剂（甲醇、90%甲醇、80%甲醇、70%甲醇、乙醇）、超声时间（30、60、90、120 min）、料液比等单因素进行考察，筛选以甲醇作为六神丸的提取溶剂，料液比为 1:50，50 kHz 频率下超声 60 min，提取率最高。

本实验采用 HPLC 方法，同时测定六神丸中和

蟾蜍他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基量，通过对方法学考察，结果表明，所建立的检测方法精密度、稳定性、重复性良好，加样回收率试验结果符合定量分析的要求，方法简便易行，可为六神丸质量标准的建立和完善提供科学依据。

蟾酥二烯内酯类化合物具有显著的洋地黄样作用、升压、呼吸兴奋和抗肿瘤作用^[19]，亦含一定心脏毒性，可引起心律失常、心功能障碍等。应用中要注意其有效剂量和安全范围，相关的药理学、毒理学和中毒机制等是进一步研究的方向。

参考文献

- [1] 张慧. 六神丸联合放疗治疗食管癌的临床观察及对食管癌炎症微环境与血管生成的作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [2] Steyn P S, van Heerden F R. Bufadienolides of plant and animal origin [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(4): 397-413.
- [3] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3185-3189.
- [4] Yeh J Y, Huang W J, Kan S F, *et al.* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2003, 54(2): 112-124.
- [5] Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na⁺/K⁺-ATPase to combat chemoresistant cancers [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(5): 627-646.
- [6] Kim J S, Jeong T Y, Cho C K, *et al.* Anitumor effect of skin of *Venenum Bufonis* in a NCI-H460 tumor regression model [J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2009, 2(3): 210-217.
- [7] Xie J T, Dey L, Wu J A, *et al.* Cardiac toxicity of resibufogenin: electrophysiological evidence [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(4): 289-297.
- [8] Ma H Y, Zhang J F, Jiang J J, *et al.* Bilirubin attenuates bufadienolide-induced ventricular arrhythmias and cardiac dysfunction in guinea-pigs by reducing elevated intracellular Na⁺ levels [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2013, 12(1): 83-89.
- [9] Ma H Y, Zhou J, Jiang J J, *et al.* The novel antidote *Bezoar Bovis* prevents the cardiotoxicity of Toad (*Bufo* *bufo gargarizans* Canto) Venom in mice [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(5): 417-423.
- [10] Bick R, Poindexter B J, Sweney R R, *et al.* Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: Cardiotoxicity due to more than Na, K-ATPase blocking [J]. *Life Sci*, 2002, 72(6): 699-709.
- [11] 陈建新, 邓洁薇, 陈红, 等. 高效液相色谱-静电场轨道阱质谱鉴定大鼠血浆中蟾蜍二烯内酯及其代谢物 [J]. 分析化学, 2011, 39(12): 1858-1863.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [13] 徐红辉, 谢红艳. 薄层扫描法测定强痛宁制剂中酯蟾毒配基的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(6): 502-504.
- [14] 王晓平, 廖工铁, 侯世祥. 六神丸中蟾毒内酯和冰片的含量测定方法 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 25-27.
- [15] 曹阳, 周诗怡, 罗国安, 等. 六神丸中蟾蜍二烯内酯类成分的含量测定 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 64-67.
- [16] 坞瑾丽, 祁海宏. HPLC 法测定六神丸中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量 [J]. 中国临床药学杂志, 2007, 16(1): 49-50.
- [17] 刘小英, 刘昕, 陈笑天, 等. HPLC 法同时测定不同产地蟾酥中的 5 种活性成分 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 760-762.
- [18] Gao H M, Zehl M, Leitner A, *et al.* Comparison of toad venoms from different *Bufo* species by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 368-376.
- [19] 李晓龙. 蟾蜍皮抗癌活性成分的正交分离纯化研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2014.