

高效液相色谱-串联质谱法测定干蟾皮中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基

焦安妮^{1,2}, 于敏², 李蕾³, 焦连庆^{2*}, 刘忠英^{1*}

1. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

2. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012

3. 吉林人参研究院, 吉林 长春 130012

摘要: **目的** 建立快速、简便、灵敏、准确的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)测定干蟾皮中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量方法。**方法** 采用HPLC-MS正离子多反应监测模式测定, Zorbax SB-C₁₈液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(41:59), 体积流量200 μL/min, 柱温30℃。质谱条件: 氮气温度350℃, 氮气体积流量12 L/min, 雾化器压力为101.316 kPa(35 psi)。华蟾酥毒基碎裂电压160 V, 碰撞能15 eV, 母离子、子离子分别为 m/z 443.2、364.8; 酯蟾毒配基碎裂电压130 V, 碰撞能15 eV, 母离子、子离子分别为 m/z 385.2、366.9。**结果** 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基分别在0.99~7.92 μg/mL和1.04~8.32 μg/mL内线性关系良好。检测限($S/N \geq 3$)均为0.3 ng/g。华蟾酥毒基、酯蟾毒配基回收率分别为97.96%~103.7%、96.86%~102.4%。日内及日间精密度RSD均小于3%。**结论** 所建方法灵敏、可靠, 能满足干蟾皮有毒物质分析的需要。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 干蟾皮; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基; 质谱条件

中图分类号: R282.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)15-3687-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.026

Determination of cinobufagin and resibufogenin in *Bufo Corium* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

JIAO An-ni^{1,2}, YU Min², LI Lei³, JIAO Lian-qing², LIU Zhong-ying¹

1. College of Pharmacy Jilin University, Changchun 130021, China

2. Jilin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China

3. Jilin Ginseng Research Institute, Changchun 130012, China

Abstract: **Objective** To develop a rapid, simple, sensitive, and accurate high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) method for determining the contents of cinobufagin and resibufogenin from *Bufo Corium*. **Methods** The contents were determined by Zorbax SB-C₁₈ column and tested in positive electrospray ionization with multiple reaction monitoring of HPLC-MS. The mobile phase was composed with the mixture of acetonitrile-0.1 mol/L formic acid water solution (41:59), flow rate 200 μL/min, column temperature 30℃. Mass spectrometry conditions: nitrogen temperature 350℃, nitrogen flow rate 12 L/min, nebulizer pressure 101.316 kPa (35 psi). The shredded voltage of cinobufagin was 160 V, the collision energy was 15, the parent ion and the daughter ion were 443.2 and 364.8 respectively; The fragmentation voltage of resibufogenin was 130 V, the collision energy was 15, and the parent ion and the daughter ion were 385.2 and 366.9 respectively. **Results** There was good linearity in the range of 0.99—7.92 μg/mL and 1.04—8.32 μg/mL for the cinobufagin and resibufogenin. The detection limit ($S/N \geq 3$) was 0.3 ng/g. The recoveries of cinobufagin and resibufogenin ranged from 97.96% to 103.7% and 96.86% to 102.4%, respectively. The intraday and daytime precisions were both less than 3%. **Conclusion** The results showed that the method was sensitive and reliable, which can meet the needs of analysis of toxic substances in *B. Corium*.

Key words: HPLC-MS; *Bufo bufogargarizans* Cantor; cinobufagin; resibufogenin; mass spectrometry conditions

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 2016年度吉林省医药健康专项(201603047YY); 2016年度吉林省医药健康专项(20160204016YY)

作者简介: 焦安妮(1994—), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究。E-mail: 644852917@qq.com

*通信作者 焦连庆, 男, 博士, 教授, 主要从事中药分析教学及科研工作。E-mail: jiaolq2017@163.com

刘忠英, 女, 博士, 教授, 主要从事中药分析教学及科研工作。E-mail: liuzhy@jlu.edu.cn

干蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮^[1], 始载于《本草纲目拾遗》虫部^[2]。蟾素片(口服液、注射液)、鹤蟾片、季德胜蛇药片等临床应用较广泛的中成药中均含有该药。华蟾酥毒基和酯蟾毒配基为蟾酥、干蟾皮毒基类的主要毒性成分, 治疗量和致死量相近, 安全系数低, 且中毒症状出现时间短。

干蟾皮已在《江苏省中药材标准(1989 年版)》《江西省中药材标准(1996 年版)》等地方标准中收载, 但是没有建立华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量测定方法。市场流通干蟾皮药材中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基总量相差较大, 建立适合干蟾皮药材中微量华蟾酥毒基和酯蟾毒配基测定方法尤为必要。

文献报道复方制剂中有高效液相色谱法^[3-10]、高效液相色谱-质谱联用法^[11]测定干蟾皮中蟾酥毒基类成分。由于蟾酥中毒剂量小, 不同药材含量差别较大, 紫外检测器检测灵敏度低, 专属性不强, 需要建立专属性强、灵敏度更高的检测方法, 本研究建立高效液相色谱-串联质谱法检测干蟾皮中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量方法。

1 材料与仪器

1.1 材料

干蟾皮经吉林省中医药科学院徐国经研究员鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮, 产地云南 3 批(批号 160901、160902、160903), 河北 2 批(批号 160801、160802), 安徽 1 批(批号 161001); 华蟾酥毒基(批号 110803-200605) 和 酯蟾毒配基(批号 110718-200507) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%。

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱质谱联用仪安捷伦 1260LC-6420MS; mMasshunter 色谱工作站; BT25S 型十万分之一电子天平(Sartorius 公司, 德国); AS5150A 型超声仪(奥特莱斯机器有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯), 去离子水经优普纯水系统制备; 所用试剂均为色谱纯或分析纯。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(41:59), 体积流量 200 μL/min, 柱温 30 ℃, 进样量为 2 μL。

2.2 串联质谱条件

氮气温度 350 ℃, 氮气体积流量 12 L/min, 雾化器压力为 101.316 kPa (35 psi)。华蟾酥毒基碎裂电压 160 V, 碰撞能 15 eV, 母离子、子离子分别为 m/z 443.2、364.8; 酯蟾毒配基碎裂电压 130 V, 碰撞能 15 eV, 母离子、子离子分别为 m/z 385.2、366.9。理论板数按华蟾酥毒基酯蟾毒配基峰计算不低于 5 000。选取正离子模式监测, 以 $[M+H]^+$ 为母离子, 选取离子丰度最强的碎片为子离子, 通过优化碎裂电压、碰撞能量等参数, 信号强度明显改善。华蟾酥毒基和酯蟾毒配基在 6 min 内可实现良好分离, 混合对照品溶液及样品的色谱图见图 1、2。

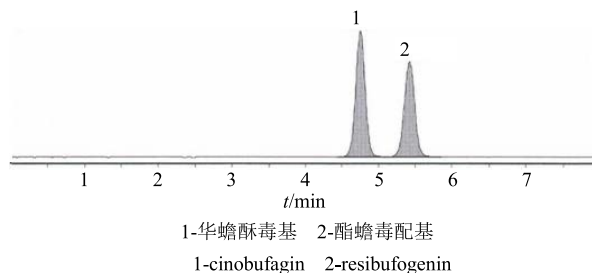


图 1 混合对照品溶液色谱

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference solution

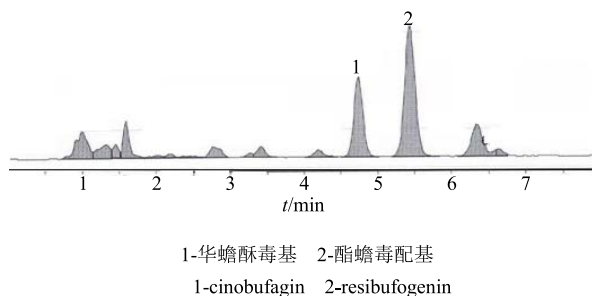


图 2 样品色谱

Fig. 2 Sample chromatogram

2.3 对照品溶液的制备

取华蟾酥毒基对照品、酯蟾毒配基对照品适量, 精密称定, 加色谱甲醇分别制成各含华蟾酥毒基、酯蟾毒配基 1 mg/mL 的溶液, 精密吸取 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加色谱甲醇至刻度, 制成含华蟾酥毒基、酯蟾毒配基约 1 μg/mL 的溶液, 即得。

2.4 供试品溶液的制备

取干蟾皮细粉约 30 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇超声提取 1 h, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系、检出限及定量限 分别配制 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,在优化的 HPLC-MS/MS 条件下进样检测,以目标物峰面积 (Y) 对对照品溶液进样量 (X) 进行线性回归,蟾酥毒基、酯蟾毒配基回归方程分别为 $Y=728.05 X+47.923$ 和 $Y=428.64 X-214.96$ 。华蟾酥毒基、酯蟾毒配基分别在 0.99~7.92 ng ($r=0.999\ 4$), 1.04~8.32 ng ($r=0.999\ 1$) 间呈良好的线性关系。

2.5.2 重复性试验 取同一批次(批号 160901)样品,按“2.4”项供试品溶液制备方法操作,制备重复性供试品溶液 6 个,注入液相色谱仪,华蟾酥毒基平均质量分数 0.572%, RSD 为 1.21%;酯蟾毒配基平均质量分数 0.584%, RSD 为 1.16%,方法重复性良好。

2.5.3 精密度试验 取供试品溶液(批号 160901)注入液相色谱仪,进行分析,共测定 6 次,华蟾酥毒基平均质量分数为 0.556%, RSD 为 1.56%;酯蟾毒配基平均质量分数为 0.576%, RSD 为 1.39%,方法中间精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 160901),每隔 3 h 测定 1 次,测定 5 次,共测定 24 h。华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的稳定性试验 RSD 分别为 2.51%, 3.31%。

2.5.5 加样回收率试验 取已测定样品(批号 160901,含华蟾酥毒基 0.572%,酯蟾毒配基 0.584%)内容物约 50 mg,精密称定,分别添加华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品溶液 1 mL(质量浓度为 0.205 mg/mL),按“2.4”项供试品溶液制备方法操作,制得回收率试验供试品溶液,华蟾酥毒基加样回收率为 97.96%~103.7%, RSD 为 1.89%;酯蟾毒配基为 96.86%~102.4%, RSD 为 2.13%,方法准确度良好,可以满足实际样品的测定需要。

2.6 样品测定

测定 6 批药材,每个样品重复测定 2 次,总量(华蟾酥毒基与酯蟾毒配基含量之和)分别为云南第 1 批(批号 160901) 0.744%(华蟾酥毒基 0.188%、酯蟾毒配基 0.556%),云南第 2 批(批号 160902) 1.992%(华蟾酥毒基 1.108%、酯蟾毒配基 0.884%),云南第 3 批(批号 160903) 1.876%(华蟾酥毒基 1.012%、酯蟾毒配基 0.864%);安徽 1 批(批号 161001) 为 0.774%(含华蟾酥毒基 0.392%、酯蟾毒配基 0.382%);河北

第 1 批(批号 160801) 0.958%(华蟾酥毒基 0.137%、酯蟾毒配基 0.658%),河北第 2 批(批号 160802) 0.911%(华蟾酥毒基 0.129%、酯蟾毒配基 0.782%)。不同产地、不同批次干蟾皮药材中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基总量差别较大,其中含量最低的和最高的均为云南产地的药材,分别为 0.744%、1.992%。云南的第 1 批(批号 160901)和河北的 2 批(批号 160802)华蟾酥毒基和酯蟾毒配基也相差较大,酯蟾毒配基含量分别是华蟾酥毒基含量约 3.0、4.8、6.0 倍。

3 讨论

3.1 前处理方法及检测条件

与前期报道中定量分析方法相比,本法前处理采用超声提取,微孔滤膜过滤后直接进样,由于同时检测母离子及子离子,方法专属性强,与紫外检测器分析方法比较检出限低,能够适应极低样品测定的要求。

3.2 流动相及色谱柱

在已报道的文献中多采用磷酸二氢钠缓冲溶液,盐酸调节 pH 值,梯度洗脱,较为繁琐。本实验采用 Zorbax SB-C₁₈ 液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),分析时间短;流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(41:59),无需梯度洗脱,操作简便,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基在 6 min 内可实现良好分离,重复性好。

3.3 流动相及色谱柱的选择

在高效液相色谱条件中流动相的选择至关重要。考察了甲醇-水、乙腈-水及乙腈-甲酸水溶液作为流动相的分离效果。结果表明,乙腈-甲酸水溶液体系获得较好分离,峰形和分离度基能够达到要求。因此,本研究选择乙腈-甲酸水溶液体系为流动相。通过改变流动相配比(乙腈-0.1%甲酸水溶液 45:55、43:57、41:59),发现乙腈-0.1%甲酸水溶液(41:59)分离度最好。

3.4 加酸量的考察

反相色谱柱填料表面由于存在残余的羟基,具有一定的酸性。由于酸性环境能够抑制硅羟基的电离,流动相中添加少量酸,可改善峰形。为了获得准确的定量分析结果,考察了酸添加量的影响。采用甲酸调节流动相的酸性。对比了在水相中加入 0.2%、0.1%、0.05%和 0.01%甲酸的出峰情况发现,在水相中加入 0.1%甲酸,分离效果最好,保留时间适中。

3.5 体积流量和进样量选择

体积流量和进样量对提高目标化合物的分离效果非常重要。考察了体积流量为 200、300、400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的分离效果, 体积流量 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 分离效果最佳; 考察了进样量分别为 1、2、10 μL 的分离效果, 当进样量为 2 μL , 目标物出峰情况良好, 未出现前沿峰和拖尾峰。因此, 本研究的体积流量选定 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 进样量为 2 μL 。

参考文献

- [1] 李家明, 马兹河. 口服煎熬蟾酥中毒致死 1 例 [J]. 中国司法鉴定, 2009(5): S11-S12.
- [2] 王良周, 罗友杰. 食用蟾酥中毒 1 例调查 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(32): 144-145.
- [3] Ye M, Guo H, Guo H, *et al.* Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2006, 838(2): 86-95.
- [4] 吴毅, 许妍, 赵雯, 等. HPLC 法同时检查华蟾素片中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基限量和测定蟾蜍噻吩的含量 [J]. 中国药事, 2012, 26(1): 53-56.
- [5] 王捧英, 陈琳, 侯芳洁, 等. HPLC 同时测定人参强心滴丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 802-805.
- [6] 曲静, 王艳春, 丛培玮. HPLC 法同时测定救心丸中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(10): 64-65.
- [7] Gao H, 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.
- [8] 王朝虹, 侯小平, 何毅, 等. 高效液相色谱法测定肝组织中 4 种蟾蜍二烯内酯类化合物 [J]. 中国法医学杂志, 2003, 18(6): 323-325.
- [9] 陈伟. 干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量测定 [J]. 药品检验, 2013, 17(10): 116-118.
- [10] 周谧, 傅兴圣, 朱琳, 等. 干蟾皮药材质量标准研究 [J]. 药学与临床研究, 2017, 25(3): 209-212.
- [11] 王薇, 刘明东, 颜有仪, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定肝组织中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基 [J]. 中国法医学杂志, 2013, 8(4): 268-272.