

HPLC 法测定仙蟾胶囊中土的宁、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基

陈莹, 袁丹*, 孔令锋, 马斌, 潘英妮

(沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立仙蟾胶囊中土的宁、脂蟾毒配基与华蟾酥毒基的高效液相色谱法测定。方法 土的宁: 采用 Intersil-ODS3 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.01 mol/L 十二烷基磺酸钠-0.01 mol/L 磷酸二氢钾(40:30:30, 冰醋酸调节 pH 值 4.0); 检测波长: 254 nm; 体积流量: 1.2 mL/min; 柱温: 室温; 脂蟾毒配基与华蟾酥毒基: 采用 Hypersil C18 色谱柱; 流动相: 0.5% 醋酸铵-乙腈(50:50, 氨水调节 pH 值 7.0); 检测波长: 296 nm; 体积流量: 0.6 mL/min; 柱温: 40 °C。结果 土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基分别在 4.2~41.6、10.8~108.0、9.4~94.0 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积的线性关系良好。加样回收率分别为 101.8%、97.6%、98.4%, RSD 均小于 2%。结论 本方法操作简便, 灵敏度高, 结果准确, 重现性好, 为仙蟾胶囊的质量控制提供了较全面的定量分析方法。

关键词: 仙蟾胶囊; 土的宁; 脂蟾毒配基; 华蟾酥毒基; 高效液相色谱

中图分类号: R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0058-03

仙蟾胶囊是在《国家中成药标准汇编——口腔肿瘤儿科分册》^[1] 记载的仙蟾片的基础上改制的胶囊剂, 由马钱子粉、人参、蟾酥等 9 味中药提取精制而成, 具有化痰散结、益气止痛等功效, 用于治疗食道癌、肺癌、胃癌、肠癌等症。方中马钱子粉含有以土的宁为代表的生物碱类物质, 具有通络止痛、消肿散结等功效^[2,3], 蟾酥含有以脂蟾毒配基和华蟾酥毒基为代表的蟾酥毒素类物质, 具有解毒止痛、开窍醒神等功效^[4,5], 它们既是主要活性成分, 又具有较强的毒性。如过量使用马钱子粉可引起肌肉强直性痉挛, 呼吸中枢抑制, 甚至可因窒息或呼吸中枢麻痹而死亡^[6]。过量使用蟾酥可引起胸闷、心悸、血压下降、休克, 甚至心脏骤停而死亡^[7]。因此, 建立了 HPLC 法测定仙蟾胶囊中土的宁、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基 3 个成分的方法, 为该制剂的质量标准化研究提供参考。

1 仪器与试剂

UV-2201 紫外-可见分光光度计(Shimadzu 公司); Shimadzu LC-6A 液相色谱仪, SPD-10A vp 紫外-可见检测器, CTO-6A 型柱温箱(Shimadzu 公司); AG-245 电子分析天平(Mettler Toledo 公司); pH-S-2C 型酸度计(上海虹益仪器厂)。

土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基对照品(质量分数均大于 98%, 中国药品生物制品检定所), 仙蟾胶囊、缺马钱子粉和蟾酥的阴性样品均为本研究室自制; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均

为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验: 土的宁: 色谱柱为 Intersil-ODS3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.01 mol/L 十二烷基磺酸钠-0.01 mol/L 磷酸二氢钾(40:30:30, 冰醋酸调节 pH 值 4.0); 体积流量: 1.2 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL 。理论板数按土的宁峰计算大于 8 000, 土的宁峰与相邻色谱峰分离度大于 1.5。

脂蟾毒配基与华蟾酥毒基: 色谱柱为 Hypersil C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.5% 醋酸铵-乙腈(50:50, 氨水调节 pH 值 7.0); 体积流量: 0.6 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 296 nm; 进样量: 10 μL 。理论板数按脂蟾毒配基与华蟾酥毒基峰计算均大于 10 000, 各组分之间分离度大于 1.5。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取土的宁对照品 1.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得储备液。精密吸取储备液 1.0、2.5、5.0、7.5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为各质量浓度土的宁对照品溶液。

精密称取脂蟾毒配基、华蟾酥毒基对照品各 5.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得储备液。精密吸取储备液 1.0、2.5、5.0、7.5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为各质量浓度脂蟾毒配基、华蟾酥毒基对照品溶液。

* 收稿日期: 2007-03-04

作者简介: 陈莹(1982—), 女, 辽宁沈阳人, 在读硕士, 主要从事中药质量标准化研究。E-mail: chy_1982@sina.com

* 通讯作者 袁丹 Tel: ((024) 23986502 E-mail: yuandan_kampo@163.com

2.3 供试品溶液的制备: 取本品装量差异项下的内容物, 研细, 取约0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加氢氧化钠试液2 mL, 混匀, 放置30 min, 加氯仿20 mL, 加热回流1 h, 滤过, 残渣用少量氯仿洗涤, 合并滤液与洗液, 减压浓缩至干, 加甲醇定容至25 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为土的宁测定的供试品溶液。

另取研细的胶囊内容物约0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加甲醇20 mL, 加热回流1 h, 滤过, 残渣用少量甲醇洗涤, 合并滤液与洗液, 减压浓缩至干, 加甲醇定容至10 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为脂蟾毒配基、华蟾酥毒基测定的供试品溶液。

2.4 阴性样品溶液的制备: 取缺马钱子粉或蟾酥的阴性样品, 分别按供试品溶液的制备方法制备阴性样品溶液。

2.5 干扰试验: 精密吸取各对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液, 进样分析, 记录色谱图。在土的宁供试品溶液色谱图中, 与对照品色谱图相应位置上, 确认了土的宁吸收峰($t_R = 14.4$ min), 而阴性样品溶液色谱图无干扰色谱峰(图1)。在华蟾酥毒基与脂蟾毒配基供试品溶液色谱图中, 与对照品色谱图相应位置上, 确认了华蟾酥毒基与脂蟾毒配基吸收峰($t_R = 12.6, 14.0$ min), 而阴性样品溶液色谱图无干扰色谱峰(图2)。

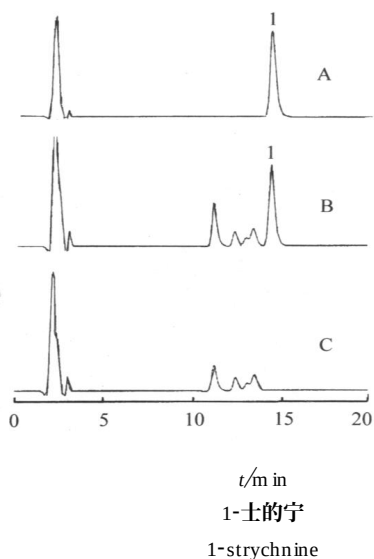


图1 土的宁对照品(A)、仙蟾胶囊(B)和阴性样品(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of strychnine reference substance (A), Xianchan Capsula (B), and negative sample (C)

2.6 线性关系考察: 精密吸取各质量浓度对照品溶液10 μ L, 进样分析。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到各成分的回归方程和线

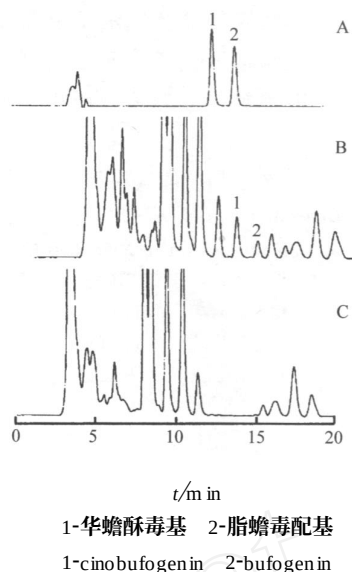


图2 对照品(A)、仙蟾胶囊(B)和阴性样品(C)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of reference substances (A), Xianchan Capsula (B), and negative sample (C)

性范围。土的宁: $Y = 1.018 \times 10^6 X - 2.185 \times 10^3$, $r = 0.9995$, 线性范围: 4.2~41.6 mg/mL; 华蟾酥毒基: $Y = 6.014 \times 10^6 X - 863 \times 10^3$, $r = 0.9998$, 线性范围: 10.8~108.0 mg/mL; 脂蟾毒配基: $Y = 6.634 \times 10^6 X + 4.587 \times 10^3$, $r = 0.9998$, 线性范围: 9.4~94.0 μ g/mL。

2.7 稳定性试验: 取批号040802样品制备的供试品溶液, 室温放置, 于0、2、4、6、8 h进样分析, 测定, 计算得供试品中土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基峰面积值的RSD分别为1.6%、0.8%、0.6%。结果表明, 各供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.8 精密度试验: 精密吸取批号040802样品制备的供试品溶液, 重复进样分析5次, 计算得土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基峰面积值RSD分别为1.1%、0.6%、0.9%。

2.9 重现性试验: 取批号040802样品5份, 制备各供试品溶液, 进样分析, 测定土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的峰面积, 计算质量分数, 结果各成分质量分数的RSD分别为2.9%、1.6%和1.9%。

2.10 回收率试验: 取批号040802样品约0.25 g, 分别添加3 mL 0.097 mg/mL土的宁、0.108 mg/mL脂蟾毒配基、0.094 mg/mL华蟾酥毒基对照品溶液, 制备各自的供试品溶液, 依法测定, 计算回收率。结果回收率分别为101.8%、97.6%、98.4%, RSD分别为1.1%、1.4%、1.1% ($n = 5$)。

2.11 样品测定:精密吸取各供试品溶液 10 μL , 进样分析, 每个样品测定 3 次峰面积, 根据回归方程计算样品中土的宁、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的质量分数, 结果见表 1。

表1 仙蟾胶囊中土的宁、脂蟾毒配基与华蟾酥毒基的测定

Table 1 Determination of strychnine, bufogenin, and cinobufogenin in Xianchan Capsula

批号	土的宁/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	脂蟾毒配基/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	华蟾酥毒基/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	脂蟾毒配基+ 华蟾酥毒基/ ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)
040802	0.293	0.319	0.283	0.602
040805	0.285	0.317	0.293	0.610
040808	0.274	0.329	0.308	0.637

《中国药典》2005 年版一部规定, 蟾酥药材中脂蟾毒配基与华蟾酥毒基总量不得少于 6.0%, 仙蟾制剂中蟾酥药材为粉末直接入药, 如果按生产时药材粉碎和制剂过程中蟾酥损失率不超过 10%, 并综合考虑蟾酥药材的来源、加工炮制、制剂生产、储藏等因素及本实验的测定结果, 建议仙蟾胶囊的质量规格下限暂定为脂蟾毒配基与华蟾酥毒基总量不少于 0.54 $\text{mg}/\text{粒}$ 。

3 讨论

由土的宁、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基对照品溶液

紫外扫描图谱, 可见各成分最大吸收波长分别为 254、298、294 nm , 从检测灵敏度和分离度考虑, 选取 254 nm 作为土的宁的定量检测波长, 296 nm 作为脂蟾毒配基与华蟾酥毒基的定量检测波长。

原仙蟾片质量标准中采用薄层扫描法测定土的宁, 供试品溶液的制备采用多次萃取法, 方法操作繁琐、重现性差、准确度较低。本研究参照《中国药典》2005 年版一部马钱子项下土的宁的测定法, 采用反相离子对色谱法测定, 并且供试品溶液的制备采用碱化后加热回流法, 操作简便, 杂质干扰少, 分离度佳, 结果准确, 重现性好。此外, 流动相以十二烷基磺酸钠代替《中国药典》2005 年版马钱子药材中土的宁测定法采用的价格昂贵的庚烷磺酸钠。

参考文献

- [1] 国家中成药标准汇编 [S]. 口腔肿瘤儿科分册, 2002.
- [2] 中国药典 [S]. 一部, 2005.
- [3] 黄喜茹, 曹东. 马钱子研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(1): 62-64.
- [4] 程国华. 蟾酥质量研究及其药理临床应用进展 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 184-186.
- [5] 赵强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): j004-j007.
- [6] 赵珍东, 黄兆胜. 马钱子毒副作用研究进展 [J]. 国医论坛, 2003, 18(1): 50-51.
- [7] 梁秀兰, 许廷生, 黄新, 等. 蟾酥及其成方制剂的合理应用 [J]. 中国药物与临床, 2004, 4(3): 217.

野菊花中绿原酸的微波辅助萃取研究

凌仁怡¹, 王娟², 沈平^{2*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 研究微波辅助萃取野菊花中绿原酸的提取工艺。方法 以产品得率和绿原酸质量分数为指标, 均匀设计 4.0 软件设计的 $U_{10}(10^8)$ 均匀试验表对野菊花的微波辅助萃取工艺参数进行优化。结果 优化出的最佳工艺: 微波功率 340 W、辐射时间 20 min、溶剂乙醇体积分数 60%、乙醇用量为 9 倍, 浸泡时间 30 min。与传统加热回流野菊花产品得率和绿原酸质量分数(分别为 16.8%、0.889%)比较, 优化的微波辅助萃取野菊花所得相应指标分别为 18.3%、1.212%。**结论** 微波辅助萃取野菊花中绿原酸具有萃取时间短、溶剂用量少、目标组分得率高等优点。

关键词: 野菊花; 微波辅助萃取; 绿原酸; 均匀设计

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0060-03

野菊花又名山菊花、苦蕒、疟疾草, 为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 具有清热解毒、疏风平肝的功效。野菊花具有广谱抗菌、抗病毒等作用^[1], 其中绿原酸是主要活性成分。由于传统的加热回流方式存在提取时间长、溶剂用

量多、能耗大、生产成本高等缺陷, 一些新型的提取工艺应运而生, 如超临界萃取、微波辅助萃取、超声萃取等, 其中微波辅助萃取工艺在中药制药领域中的应用研究越趋活跃。因此本实验采用微波辅助萃取方法, 借助微波“体加热”的方式对野菊花中的绿

* 收稿日期: 2007-05-19

基金项目: “十五”国家科技攻关项目(2004BA 721A 40)

作者简介: 凌仁怡(1981—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药研究与开发。Tel: (021) 50805522 E-mail: lzy.1981@hotmail.com