

RP-HPLC法测定干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量

王毅刚, 谷淑玲*

(徐州医学院药理学教研室, 徐州 221004)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量。方法: 采用 Phenomenex Gemini-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (48:52), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 296 nm, 柱温为 35℃。结果: 华蟾酥毒基浓度在 19.6~174.6 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好 ($r=0.9999$); 平均加样回收率 ($n=6$) 为 99.9%, RSD 为 1.4%; 不同批号的干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量为 1.12%~1.16%。结论: 本方法简便、准确, 重复性好, 适用于干蟾皮药材的质量控制研究。

关键词: 华蟾酥毒基; 干蟾皮; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1172-03

RP-HPLC determination of cinobufotalin in Bufo gargarizans

WANG Yi-gang GU Shu-ling*

(Xuzhou Medical College Department of Pharmacology, Xuzhou 221004, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for determination of cinobufotalin in Bufo gargarizans. **Methods** A Phenomenex Gemini-C₁₈ ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with acetonitrile-water (48:52) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, and detected at 296 nm. **Results** The curve was linear in the range of 19.6-174.6 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$); The average recovery was 99.9% and RSD was 1.4%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and reproducible for the quantitative analysis of cinobufotalin in Bufo gargarizans and can be used for the quality control of the crude drug.

Key words Cinobufotalin, Bufo gargarizans, RP-HPLC

干蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥外皮。药理研究表明有强心、抗休克、抗肿瘤等作用^[1]。以其为主药的华蟾素注射液是中华人民共和国卫生部中药部颁标准^[2]收录的品种, 该品种在市场上使用多年, 疗效较好, 无明显毒副作用。但随着我国传统医药事业以及中药现代化进程的不断发 展, 对药品检测方法的要求也越来越高, 其原有的质量控制方法已不能满足质量控制的要求。迄今为止对于干蟾皮药材的含测方法还停留在紫外分光光度法上。该法灵敏度低、重现性差已不能满足中药现代化进程的要求。目前作者未见用 RP-HPLC 法测定干蟾皮药材中华蟾酥毒基 (cinobufotalin) 含量的文献报道。因此, 本研究采用 RP-HPLC 法测定干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量, 为干蟾皮药材的质量控制建立一个新的方法,

并提供重要的参考依据。

1 仪器与试剂

岛津 SPD-10AVP 高效液相色谱仪; 浙大 N2000 色谱工作站, 岛津 CS 色谱工作站。

华蟾酥毒基对照品, 批号 110803-200504 中国药品生物制品检定所。3 批干蟾皮药材源于陕西西安, 由我室秦伟主管技师对其进行了鉴定, 证实为中华大蟾蜍的干燥外皮。

乙腈为色谱纯 (Honeywell 批号为 060809), 规格 3000 mL/瓶装; 水为纯净水; 甲醇等其它试剂均为国产市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取华蟾酥毒基对照品 9.8 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻

* 通讯作者, Tel: (0516) 82771510 E-mail: gushuling@163.com

度, 摇匀, 即得浓度为 $0.196 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取剪碎的干蟾皮药材约 2.0 g 精密称定, 加甲醇 50 mL, 浸渍 1 h 超声 (120 W, 40 kHz) 处理 30 min, 加入 0.5 g 活性炭超声 (120 W, 40 kHz) 5 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加适量甲醇溶解并转移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件 采用 Phenomenex Gemini- C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (48:52), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 296 nm^[3], 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。按上述色谱条件测定, 华蟾酥毒基与相邻峰的分度大于 1.5 理论塔板数以华蟾酥毒基峰计算不低于 7000 保留时间 17.3 min, 色谱图见图 1。

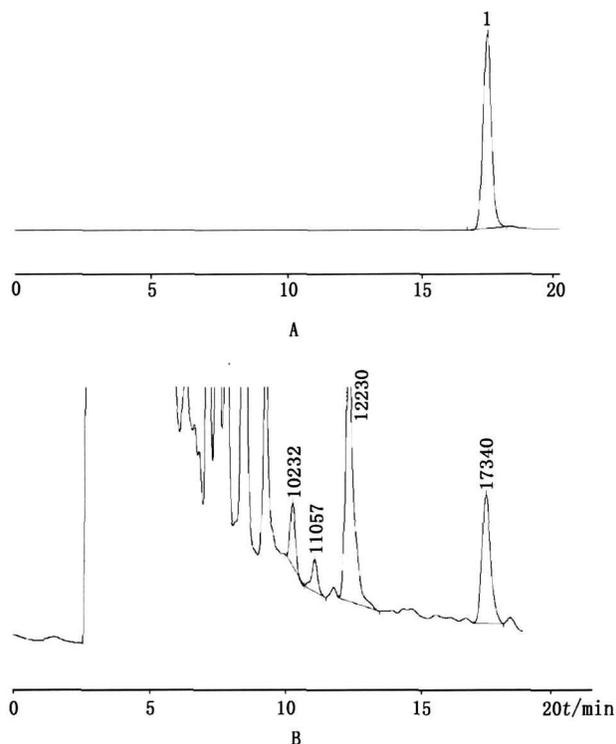


图 1 对照品 (A) 与干蟾皮药材样品 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample on 28 Mar. of 2007 (B)

1 华蟾酥毒基 (cinobufalin)

2.3 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下的对照品溶液 1, 2, 5, 7, 9 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样 10 μL , 进行 HPLC 分析。以对照品峰面积 Y 为纵坐标, 以对照品溶液的浓度 $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明: 华蟾酥毒基在 $19.6 \sim 176.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积积分值呈良好的线性关系。回归方程为:

$$Y = 5.982 \times 10^3 X - 3.911 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

2.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL , 按上述色谱条件重复进样测定 6 次, 结果峰面积的 RSD 为 0.81%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL , 分别在 0, 3, 6, 12, 24, 36 h 按样品测定方法进行测定, 计算华蟾酥毒基的平均含量为 1.0%, RSD 为 1.3%, 表明供试品溶液在 36 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一批次干蟾皮药材 2.0 g 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样 20 μL , 记录色谱图, 结果干蟾皮中华蟾酥毒基含量平均值为 $11.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.6%, 说明本法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 取已知华蟾酥毒基含量为 1.1% 的同一批干蟾皮药材约 1.0 g 共 6 份, 精密称定, 每份分别精密加入华蟾酥毒基对照品约 0.01 g 按“2.1.2”项下方法制成供试溶液, 进样测定华蟾酥毒基含量, 计算回收率。结果华蟾酥毒基的平均回收率 ($n = 6$) 为 99.9%, RSD 为 1.4%, 表明该方法的准确度较好。

2.8 样品测定 将各不同批次的干蟾皮药材分别按“2.1.2”项下方法制备成样品溶液, 各进样 2 次取均值后, 按外标法计算华蟾酥毒基的含量, 结果 3 批干蟾皮药材中华蟾酥毒基含量分别为 11.12, 11.35, 11.68 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 应用双光束紫外检测器在 190~600 nm 范围内对华蟾酥毒基进行光谱扫描, 结果表明华蟾酥毒基在 295 nm 处有最大吸收峰, 结合有关文献^[3], 本文选择 296 nm 为检测波长。实验结果表明, 干蟾皮中其他成分在此波长下干扰较小, 且与杂质峰分离效果较好。

3.2 色谱柱及流动相的选择 结合 2005 年版中国药典^[3] 有关蟾酥含量测定方法项选择 Phenomenex Gemini- C_{18} 色谱柱。参考相关文献^[4-10] 对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸二氢钾水溶液的不同浓度组合及柱温和流速进行了比较, 结果表明在使用乙腈-水 (48:52), 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时能够取得较好的分离效果, 峰形对称, 既能达到基线分离的要求, 又有适宜的保留时间。

3.3 供试品溶液制备方法的选择 对不同提取溶剂 (甲醇, 氯仿, 乙醇)、不同提取方法 (冷浸, 加热回流, 超声提取) 和不同超声时间 (10, 20, 30, 60 min)

对华蟾酥毒基提取率的影响进行了考察。试验结果表明: 氯仿和甲醇超声提取率相当, 且均高于乙醇, 考虑到样品要用甲醇定容, 故选择甲醇为提取溶剂; 超声 30 min 和 60 min 提取率相当且明显高于 10 min 和 20 min, 考虑到节约时间和能源, 选择超声时间为 30 min。在试验中由于样品颜色较深不宜进样, 故对样品进行活性炭脱色处理, 考察结果表明脱色对提取率没有影响。

3.4 小结 含量测定结果可以看出, 本实验中不同批次干蟾皮药材中华蟾酥毒基含量基本没有差异, 由于本实验中干蟾皮均由同一家供应商提供, 故尚不能保证不同产地干蟾皮中华蟾酥毒基含量没有差异。但本实验所建立的干蟾皮中华蟾酥毒基含量测定方法简便易行, 准确, 重复性好, 可用于干蟾皮药材的质量控制等相关研究。

参考文献

- 1 ZHAO Qiang(赵强), MENG Fan-jing(孟凡静), LIU An-xi(刘安西), *et al* Advances in study on Venenum Bufonis(蟾酥的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35(10): 4
- 2 Chinese Health Department Drug Standard(中华人民共和国卫生部药品标准). *Chin Herb Med*(中药成方制剂), 1992(16): 17
- 3 ChP(中国药典). 2005 Vol1 (一部): 265
- 4 XIONG Wei(熊蔚), CHEN Wei-Kang(陈伟康). HPLC Determination of Resbufogenin and Cinobufagin in Nihuang Xiaoyan Tablets(HPLC法测定牛黄消炎片中脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的含

量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005 25(2): 233

- 5 ZHANG-Ping(张萍), WANG Feng(王峰), LIN Rui-Chao(林瑞超). Quantitative determination of venenum Bufonis in Qiangli Jiuxin Dripping Pills by HPLC(液相色谱法测定强力救心滴丸中蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(4): 436
- 6 BAI Xu(白雪), ZHANG Li(张莉), QI Gang(齐刚). Identification Checks and Determination Method for Chansu(蟾酥的鉴别检查和含量测定方法). *Lishi Zhen Med And Medica Res*时珍国医国药, 2004 15(4): 226
- 7 XU Chun-Bo(徐春波), WEN Yan(温艳), YAN Mei-Xia(闫美霞). Quality standard for Chansu Tongbi Ointment(蟾酥通痹软膏的质量标准研究). *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2006, 28(11): 1584
- 8 GAO Xiang-Xiang(高祥祥), ZHANG Wen-Ting(张文婷), LI Xi-Ling(李秀玲). Determination of cinobufagin and resbufogenin in Delisheng Injections by HPLC(HPLC测定得力生注射液中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量). *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2006, 28(11): 1709
- 9 LI Shu-Ying(李淑盈), DONG Hai-Lin(董海林), LIANG Xiao(梁晓). Determination of cinobufagin and resbufogenin in Xinkejing Capsules by HPLC(HPLC测定心可宁胶囊中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量). *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2006, 28(6): 812
- 10 ZHANG Dian-Guang(张电光), ZENG Fan(曾凡). Determination of cinobufagin and resbufogenin in Xinli Pills by HPLC(HPLC法测定“心力丸”中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量). *J Guang Dong College Pharm*(广东药学院学报), 2006 22(2): 150

(本文于 2009年 3月 17日修改回)