

反相高效液相色谱法测定蟾酥中的3种蟾毒内酯

刘吉华, 王静蓉, 余伯阳

(中国药科大学中药学院中药复方研究室, 江苏 南京 210009)

摘要:建立了采用反相高效液相色谱同时测定药材蟾酥中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基和蟾毒灵含量的方法。采用反相 C_{18} 色谱柱,以乙腈-0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.2) (体积比为 50:50) 为流动相,流速 0.8 mL/min,在 299 nm 波长下检测。华蟾酥毒基、酯蟾毒配基和蟾毒灵的线性范围分别为 0.25 ~ 0.875 μg ($r = 0.999\ 0$), 0.25 ~ 0.875 μg ($r = 0.999\ 1$) 和 0.15 ~ 0.525 μg ($r = 0.999\ 0$); 平均加样回收率分别为 100.3%、100.0% 和 98.0%。结果表明所建方法简便可靠。对不同来源的 10 批样品中的 3 种蟾毒内酯含量的检测结果显示,不同来源或批次的蟾酥药材中 3 种蟾毒内酯总含量差异较大。

关键词:反相高效液相色谱法;华蟾酥毒基;酯蟾毒配基;蟾毒灵;蟾酥

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2008)02-0186-03 栏目类别:中药质量控制专栏

Determination of three bufogenins in toad venom using reversed-phase high performance liquid chromatography

LIU Jihua, WANG Jingrong, YU Boyang

(Department of Traditional Chinese Prescription, School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantitative determination of three bufogenins in toad venom was established. An Alltech Alltima C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1 mol/L acetate buffer (pH 3.2) (50:50, v/v), and the flow rate was 0.8 mL/min. The detection wavelength was set at 299 nm. The method has good linearity in the ranges of 0.25 - 0.875 μg for cinobufagin ($r = 0.999\ 0$), 0.25 - 0.875 μg for resibufogenin ($r = 0.999\ 1$), and 0.15 - 0.525 μg for bufalin ($r = 0.999\ 0$). The average recoveries were 100.3%, 100.0% and 98.0% for cinobufagin, resibufogenin, and bufalin, respectively. The results indicate that the method is simple, accurate, reproducible, and can be used for the quality control of bufogenins in toad venom.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); cinobufagin; resibufogenin; bufalin; toad venom

蟾酥由蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo garzians* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 耳后腺及皮肤腺所分泌的白色浆液经加工干燥制成^[1]。蟾酥味甘,辛温,有毒,入胃经。具有解毒消肿、止痛、开窍醒神、抗肿瘤等功效^[1,2],是常用中成药六神丸、牛黄消炎丸、麝香保心丸、熊胆救心丹等的重要组成成分。蟾酥为有毒中药,华蟾酥毒基、酯蟾毒配基和蟾毒灵是蟾酥中的主要活性成分。目前对六神丸、牛黄消炎丸、麝香保心丸等中成药中蟾酥成分的测定均为测定其中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量^[3-6],尚未见对以上中成药中蟾

毒灵的含量同时测定的报道。蟾毒灵的毒性较强(半致死量(LD₅₀)为 2.2 mg/kg)^[7],建立同时测定蟾酥中蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量测定方法,监控不同来源蟾酥及含有蟾酥中成药的质量,对安全合理使用蟾酥及含有该类成分的中药具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10AD 高效液相色谱仪,SPD-10A UV-VIS 检测器,N2000 色谱工作站。H66MC 超声

波仪(无锡超声设备有限公司)。乙腈(Merck KGaA),其他化学试剂均为国产分析纯试剂。蟾毒灵(bufoalin)对照品为本研究室分离纯化,经高效液相色谱(HPLC)归一法测定其纯度大于 98%;华蟾酥毒基(cinobufagins)对照品(中国药品生物制品检定所,批号 803-9202);酯蟾毒配基(resibufogenins)对照品(中国药品生物制品检定所,批号 718-8702);10 批蟾酥样品分别购自山东临沂、安徽亳州及白洋湾。

1.2 色谱条件

色谱柱:Alltech Alltima C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液(醋酸调 pH 3.2)(体积比为 50:50);流速:0.8 mL/min;检测波长 299 nm;进样量 20 μL。

1.3 溶液的制备

混合对照品溶液的制备:精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品各 10 mg,分别置于 3 个 50 mL 容量瓶中,制成含蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基均为 0.2 mg/mL 的甲醇溶液,摇匀,即得单一对照品贮备液。精密吸取蟾毒灵对照品贮备液 1.5 mL、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基对照品贮备液各 2.5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,即得蟾毒灵质量浓度为 0.03 mg/mL、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基质量浓度均为 0.05 mg/mL 的对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得混合对照品溶液。

蟾酥样品溶液的制备:精密称取蟾酥样品约 15 mg,置于 25 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇约 10 mL,于 30 °C 下超声波提取 50 min,冷却,过滤,洗涤残渣及滤纸,合并过滤液及洗涤液,于 50 °C 下浓缩至小体积,转移至 25 mL 容量瓶中,以甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得蟾酥样品溶液。

2 结果与讨论

2.1 分析条件的确定

现有研究显示,采用高效液相色谱法测定蟾毒内酯含量所用的流动相系统主要有甲醇-水、乙腈-水、乙腈-缓冲盐 3 种^[4-7]。其中前两种流动相系统对蟾毒内酯的分离效果不好,采用乙腈-缓冲盐系统能得到较好的分离效果。我们以乙腈-磷酸盐缓冲液为流动相获得了较好的分离效果,但由于磷酸盐在流动相中溶解度较小,容易造成色谱仪的管路系统堵塞,因此我们将缓冲系统换成醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 3.2)。考察了不同的乙腈-醋酸盐缓冲液体积比和不同 pH 值的缓冲溶液为流动相的分离效

果,结果表明,以乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 3.2)(体积比为 50:50)为流动相,在流速 0.8 mL/min 条件下,蟾酥中 3 种蟾毒内酯得到很好的分离(见图 1)。

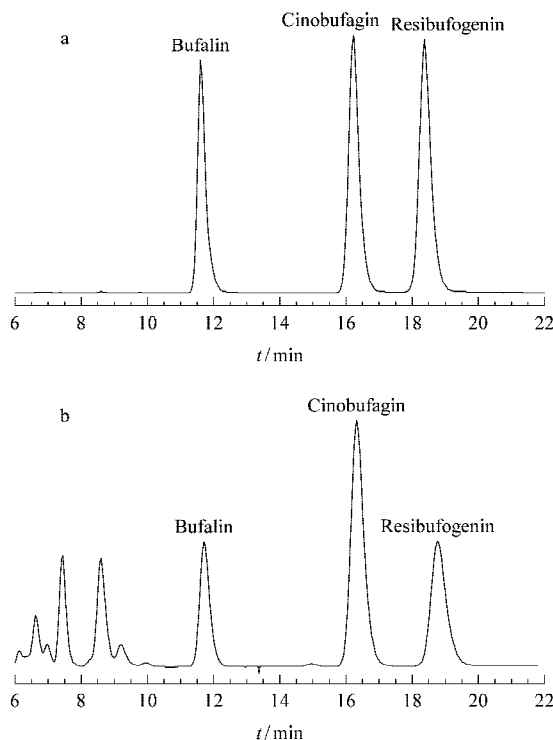


图 1 (a)蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基混合对照品溶液及(b)蟾酥样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) mixed standards of bufoalin, cinobufagin and resibufogenin and (b) a toad venom sample

2.2 线性方程及线性范围

分别精密吸取 3 种蟾毒内酯对照品溶液 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 μL,按上述色谱条件测定。以进样量 C (μg) 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标绘制标准曲线,蟾毒灵的线性回归方程为 $A = 99\,253C + 109.3$ ($r = 0.999\,0$),华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的回归方程分别为 $A = 84\,581C + 1\,911.5$ ($r = 0.999\,0$) 和 $A = 91\,209C + 2\,395.9$ ($r = 0.999\,1$),华蟾酥毒基、酯蟾毒配基和蟾毒灵的线性范围分别在 0.25 ~ 0.875 μg、0.25 ~ 0.875 μg 和 0.15 ~ 0.525 μg。

2.3 精密度试验

取蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基质量浓度分别为 0.033, 0.035 和 0.042 μg/mL 的混合对照品溶液重复进样 5 次,蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基质量浓度测定值的相对标准偏差(RSD)分别为 0.86%, 0.71% 和 0.54%。

2.4 稳定性试验

取蟾酥样品溶液,在 1 d 内每隔 1 h 进样测定 1

次,蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基在 8 h 之内峰面积的 RSD 值分别为 1.36%、1.52% 和 2.40%,表明样品液在 8 h 内稳定。

2.5 重现性试验

精密称取蟾酥样品 15 mg,共 5 份,按前述方法制备蟾酥样品溶液,平行操作,测定 3 种蟾毒内酯的含量,蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量测定值的 RSD 分别为 1.10%、1.30% 和 1.44%。

2.6 加样回收试验

精密称取蟾酥样品 15 mg,共 6 份,分别加入蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基对照品适量,按前述方法制备样品溶液,按上述色谱条件测定。结果显示,蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的平均加样回收率分别为 98.0% (RSD = 2.51%)、100.3% (RSD = 2.43%) 和 100.0% (RSD = 1.85%)。

2.7 样品测定

按照前述样品制备方法,分别制备不同来源的 10 批蟾酥样品溶液,按前述方法测定蟾酥样品中 3 种蟾毒内酯的含量,结果见表 1。

表 1 结果显示,不同产地的蟾酥中 3 种蟾毒内酯的总含量差异较大,最低为来源于安徽亳州的 8 号样品(10.35%),最高为来自山东临沂的 4 号样品(14.61%),总内酯含量相差近 30%。不同产地和批次的蟾酥样品中蟾毒灵的含量为 2.00% ~ 2.81%,差异较小,但华蟾酥毒基的含量为 3.40% ~ 6.85%,酯蟾毒配基的含量为 3.13% ~ 6.98%,差异很大,是不同蟾酥样品总内酯含量差异的主要来源。

由于蟾酥为有毒性的中药,蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基既是其活性成分,也是其毒性成分,其中蟾毒灵的毒性作用较华蟾酥毒基和酯蟾毒配基强,因此在使用蟾酥时监测其中蟾毒灵的含量

是必要的;不同产地、批次的蟾酥中总蟾毒内酯含量差异很大,导致其活性和毒性也有很大的差异。因此在蟾酥的使用过程中,应根据蟾酥药材中主要活性成分的含量调整其实际用量,从而保证毒性中药蟾酥的用药安全和疗效。

表 1 10 批蟾酥样品中蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量测定结果(n = 3)

Table 1 Determination results of three bufogenins in ten toad venom samples (n = 3) %

No.	Origin	Bufalin	Cinobufagin	Resibufogenin	Total bufogenins
1	Linyi, Shandong	2.81	4.99	5.07	12.87
2	Linyi, Shandong	2.00	5.44	3.13	10.57
3	Linyi, Shandong	2.16	6.85	3.64	12.65
4	Linyi, Shandong	2.36	5.35	6.90	14.61
5	Bozhou, Anhui	2.65	4.61	6.98	14.24
6	Bozhou, Anhui	2.60	4.17	5.93	12.70
7	Baiyangwan, Anhui	2.45	4.17	6.76	13.38
8	Bozhou, Anhui	2.14	3.40	4.81	10.35
9	Bozhou, Anhui	2.54	4.69	6.44	13.67
10	Bozhou, Anhui	2.30	4.46	6.76	13.52

参考文献:

[1] Zhao Q, Meng F J, Liu A X. Chinese Traditional and Herbal Drugs (赵强, 孟凡静, 刘安西. 中草药), 2004, 35(10): i004

[2] Cheng G H. Chinese Traditional and Herbal Drugs (程国华. 中草药), 2001, 32(2): 184

[3] Li S Y, Dong H L, Liang X. Chinese Traditional Patent Medicine (李淑盈, 董海林, 梁晓. 中成药), 2006, 28(6): 812

[4] Ding D M, Tan M J. Chinese Traditional Patent Medicine (丁冬梅, 谭妙娟. 中成药), 2006, 28(1): 149

[5] Wu J L, Qi H H. Chinese Journal of Clinical Pharmacy (邬瑾丽, 祁海宏. 中国临床药学杂志), 2007, 16(1): 49

[6] Xiong W, Chen W K. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (熊蔚, 陈伟康. 药物分析杂志), 2005, 25(2): 233

[7] Dasgupta A, Datta P. Ther Drug Monit, 1998, 20(1): 104