

高效液相色谱法测定救心滴丸中的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基

裴月梅

安徽省药品检验研究院, 安徽 合肥 230051

摘要: 目的 建立救心滴丸中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的定量方法。方法 采用高效液相色谱法, 以 C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 0.5%磷酸二氢钾溶液-乙腈 (50:50) (用磷酸调 pH 值为 3.2) 为流动相; 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 296 nm。结果 华蟾酥毒基在 0.092~1.472 μ g 呈良好的线性关系, $r=0.9997$ 。平均回收率为 101.4%, RSD 值为 1.0%。脂蟾毒配基在 0.102~1.632 μ g 呈良好的线性关系, $r=0.9998$ 。平均回收率为 98.4%, RSD 值为 0.31%。结论 该方法简单、灵敏度高, 可用于救心滴丸中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的定量测定。

关键词: 救心滴丸; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2014) 06 - 0526 - 03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.011

Determination of cinobufagin and resibufogenin in Jiuxin Dropping Pills by HPLC

PEI Yue-mei

Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the determination of cinobufagin and resibufogenin in Jiuxin Dropping Pills.

Methods The C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) was used with 0.5% potassium dihydrogen phosphate-acetonitrile (pH=3.2) (50:50) as a mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The detecting wavelength was 296 nm. **Results** Cinobufagin: the linear range of ferulic acid was 0.092—1.472 μ g, $r=0.9997$, the average recovery rate was 101.4%. Resibufogenin: The linear range of ferulic acid was 0.102—1.632 μ g, $r=0.9998$. The average recovery rate was 98.4%. **Conclusion** The method is simple, rapid, and accurate for the determination of cinobufagin and resibufogenin in Jiuxin Dropping Pills.

Key Words: Jiuxin Dropping Pills; cinobufagin; resibufogenin; HPLC

救心滴丸由人参、三七、冰片、蟾酥等组成, 具有益气活血、化痰通脉之功效。用于气血痰浊痹阻心脉的胸痹心痛、胸闷、短气、心悸、怔忡等。为有效地控制产品质量, 根据方中成分, 选择其主药蟾酥中的华蟾酥毒基、脂蟾毒配基作为含量控制的指标并制定含量限度, 采用高效液相色谱法测定制剂中的华蟾酥毒基、脂蟾毒配基, 方法可靠, 灵敏, 快速。

1 仪器与试药

LC-10AT 高效液相色谱仪, SPD 紫外检测器 (日本岛津), N-2000 色谱工作站 (浙江大学智能工程研究所)。AS3120B 超声提取器。

华蟾酥毒基 (含量测定用, 批号 110803-2005040)、脂蟾毒配基对照品 (含量测定用, 批号

718-9306), 购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯; 水为亚沸重蒸水; 其他试剂均为分析纯。救心滴丸, 自制, 批号 051020、051022、051025。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1]

Waters C_{18} BDS 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.5%磷酸二氢钾溶液-乙腈 (50:50) (用磷酸调 pH 值为 3.2); 检测波长为 296 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取华蟾酥毒基对照品、脂蟾毒配基对照品适量, 加甲醇制成含华蟾酥毒基对照品、脂蟾毒配基对照品各 50 μ g/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

收稿日期: 2014-07-15

作者简介: 裴月梅 Tel:(0551)63358112 E-mail: pymahyjs@163.com

2.3 供试品溶液的制备

取本品约 0.8 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性溶液的制备

按处方组成, 取除蟾酥外的其余药材, 按制备工艺要求制成不含蟾酥的对照样品, 按供试品制备项下的方法制备阴性溶液。

2.5 专属性试验

分别吸取对照品溶液、阴性溶液与供试品 10 μL 注入液相色谱仪, 结果表明, 在上述色谱条件下华蟾酥毒基、脂蟾毒配基与其他成分分离良好, 且空白溶液无干扰, 见图 1。

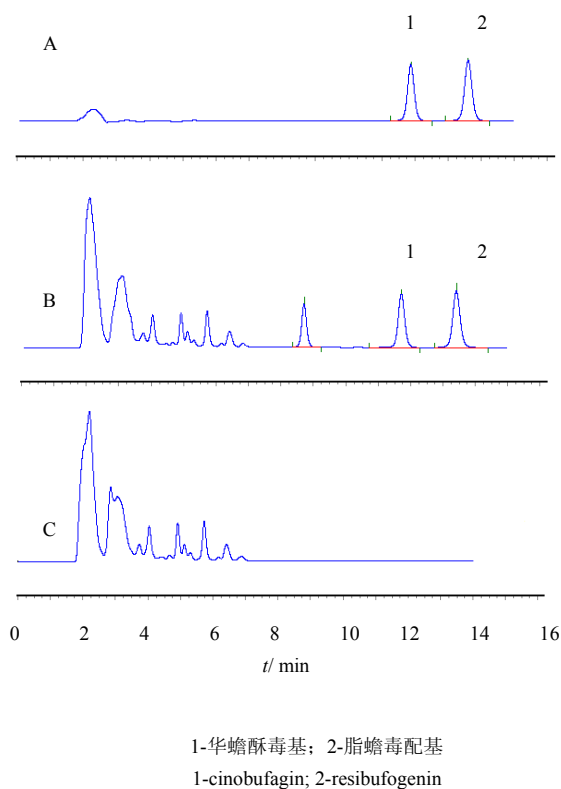


图1 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基对照品(A)、救心滴丸供试品(B)、阴性样品(C) HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC of cinobufagin and resibufogenin (A), Jiuxin Dropping Pills (B), and negative sample (C)

2.6 线性关系考察

精密吸取为含华蟾酥毒基对照品 0.368 mg/mL、脂蟾毒配基对照品 0.408 mg/mL 的混合对照品溶液 0.25、0.5、1 mL 置 10 mL 量瓶中; 再分别精密吸取 1、1.5、2 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述各溶液 10 μL,

按上述色谱条件注入液相色谱仪, 记录峰面积, 分别以峰面积积分为纵坐标, 华蟾酥毒基、脂蟾毒配基进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程分别为: 华蟾酥毒基 $A=4.934 \times 10^5 C-3.836 \times 10^3$, $r=0.9997$; 脂蟾毒配基 $A=5.214 \times 10^5 C+5.030 \times 10^2$, $r=0.9998$, 表明华蟾酥毒基在 0.092~1.472 μg, 脂蟾毒配基在 0.102~1.632 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

精密吸取华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 计算峰面积 RSD 值分别为 1.22%、1.16%。

2.8 重复性试验

按上述供试品溶液制备方法, 称取同批号样品(批号 051020) 5 份, 分别进行测定。得华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的平均质量分数分别为 63.8、71.7 μg/粒, RSD 值分别为 1.27%、1.37%。

2.9 供试品稳定性试验

取同一供试品溶液(批号 051020), 分别于配制后 0、1、2、4、8、12 h 依法测定, 华蟾酥毒基、脂蟾毒配基峰面积 RSD 值分别为 0.81%、0.79%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 回收率试验

采取加样回收法(按 1:1 加入), 精密称取同一批号样品(051020) 0.4 g 共 6 份置具塞锥形瓶中, 分别精密加入质量浓度为 0.046 mg/mL 的华蟾酥毒基、0.051 mg/mL 脂蟾毒配基的混合对照品溶液 10 mL, 加甲醇 19 mL, 混合均匀, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 同法测定。计算华蟾酥毒基平均回收率为 101.4%, RSD 值为 1.00%; 脂蟾毒配基平均回收率为 98.4%, RSD 值为 0.31%。

2.11 样品测定

取 3 个批号的样品, 每个批号 3 个样本, 按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 另取华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加甲醇制成含华蟾酥毒基、脂蟾毒配基 50 μg/mL 的溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 计算含量。结果 3 个批号样品的华蟾酥毒基、脂蟾毒配基质量分数分别是 110.4、109.1、111.4 μg/粒。

3 讨论

华蟾酥毒基、脂蟾毒配基为蟾酥的主要有效成

分^[2], 也为蟾酥的毒性成分, 在制剂中蟾酥是直接粉碎入药的。参考 2010 年版《中国药典》所收载蟾酥项下方法及文献提取方法^[3-5], 分别考察了甲醇超声处理、甲醇回流提取和氯仿回流提取 3 种方法, 结果显示甲醇回流提取 1 h 操作简便, 可使制剂中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基有效提出。

蟾酥为有毒药材, 应对其含量规定上、下限, 《中国药典》2010 年版一部中规定蟾酥药材的每日服用量为 0.015~0.030 g 生药, 即每日服用量最大不得超过 0.030 g, 折合成华蟾酥毒基 ($C_{26}H_{34}O_6$) 和脂蟾毒配基 ($C_{24}H_{32}O_4$) 的总量为 1.8 mg, 即华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的每日服用量不得超过 1.8 mg。本品每日服用 2 粒, 根据样品含量测定结果, 每日服用华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的量分别为 220.8、218.2 μg , 低于药典规定的最大日服用量。

综上, 本法能够测定救心滴丸中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量并规定了含量限度, 可作为控制该产品质量的方法, 保证和产品的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 刘冬, 杜守颖, 何秀峰, 等. 蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 734-738.
- [3] 罗虹, 李文, 孙丽燕. PHLC 法测定蟾麝救心丸中华蟾酥的含量 [J]. 光谱实验室, 2005, 22(3): 544-546.
- [4] 张萍, 王峰, 林瑞超. 液相色谱法测定强力救心滴丸中华蟾酥的华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 436-438.
- [5] 刘东辉, 李军, 黄意甜. 高效液相色谱法测定心可宁胶囊中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6): 26-28.