

HPLC 法同时测定不同产地蟾酥中的 5 种活性成分

刘小英, 刘 昕, 陈笑天, 刘 波, 王少军, 赖学文, 李 斌*

江西中医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 建立了同时测定蟾酥中活性成分的 HPLC 方法, 并对 5 个不同产地的药材中 5 种活性成分进行测定。方法 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 Hypersil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 25 μm), 流动相为醇-水 (50:50), 检测波长 296 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 并在此色谱条件下测定不同产地经 60% 甲醇回流提取的蟾酥样品中活性成分的量。结果 各成分的质量浓度和峰面积具有良好的线性关系, 且有很好的分离度。日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基平均回收率为 99.9%、99.6%、97.9%、96.7%、99.5%, RSD 为 2.8%、3.2%、1.9%、1.0%、3.4%。不同产地蟾酥样品的 HPLC 色谱图差别明显, 所含成分的种类和质量分数差异较大。结论 本方法简便、灵敏度高, 具有实用性, 可作为蟾酥药材的质量控制方法。

关键词: 蟾酥; 高效液相色谱; 日蟾毒它灵; 蟾毒灵; 沙毒精; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基

中图分类号: R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)06-0760-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.024

Determination of five active components in *Venenum Bufonis* from different habitats by HPLC

LIU Xiao-ying, LIU Xin, CHEN Xiao-tian, LIU Bo, WANG Shao-jun, LAI Xue-wen, LI Bin

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330004, China

Key words: *Venenum Bufonis*; HPLC; gamabufalin; bufalin; arenobufagin; cinobufagin; resibufogenin

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的干燥分泌物, 其活性成分有甾体化合物、吲哚系生物碱等, 具有解毒、止痛、开窍醒神的功能, 是传统中药材^[1]。现代研究表明, 生物碱具有抗肿瘤作用, 对结肠癌、肝癌、胰腺癌等多种癌症有抑制作用, 多用于中药成方制剂中。近些年, 已有学者采用紫外分光光度法^[1]、薄层色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3-4]对蟾酥定量分析, 但未见报道采用高效液相色谱法同时测定蟾酥药材中日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 5 种活性成分的方法, 本实验建立了同时测定该 5 种活性成分的 HPLC 方法, 并比较了安徽等 5 个不同产地蟾酥样品中各成分量的差异。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 25 μm) 色谱柱; 日蟾毒它灵、

蟾毒灵和沙毒精购自江西本草天工科技有限公司, 质量分数≥98%, 批号分别为 1057-100527、1044-100412、0928-10029; 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基对照品购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110803-200605、110718-0925; 黑眶蟾蜍 *Bufo Melanostictus* Schneider 样品产自安徽, 北京, 江苏, 山东济南、临沂, 由江西中医学院赖学文副教授鉴定; 甲醇为色谱纯; 超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 25 μm), 流动相为甲醇-水 (50:50), 柱温 30 ℃, 检测波长 296 nm, 体积流量 1 mL/min。日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基之间分离度以及与其他成分的分离度均大于 1.5。理论塔板数均大于 3 000。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取日蟾毒它

收稿日期: 2012-06-14

作者简介: 刘小英 (1988—), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 从事中药活性成分研究。Tel: 15970489511 E-mail: yingzi8768@sina.com

*通信作者 李 斌 Tel: (0791)87118825 E-mail: libin7077@hotmail.com

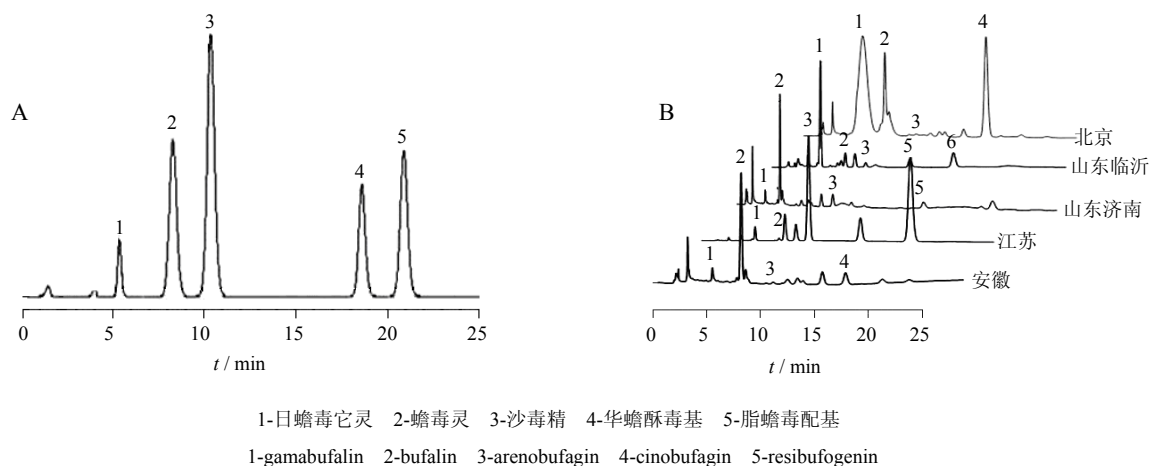


图1 对照品 (A) 和不同产地蟾酥样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and *Venenum Bufonis* samples from different habitats (B)

灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基 5 个对照品适量，加甲醇制成质量浓度均为 0.1 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取购买的蟾酥成品细粉约 25 mg，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加甲醇 20 mL，称定质量，置水浴上加热回流提取 1 h，放冷，补足甲醇减少的质量，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 0.109 mg/mL 日蟾毒它灵、0.108 mg/mL 蟾毒灵、0.101 mg/mL 沙毒精、0.114 mg/mL 华蟾酥毒基、0.112 mg/mL 脂蟾毒配基的对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释到刻度，摇匀，分别精密吸取 10 μ L，注入高效液相色谱仪，测定。分别以对照品进样量为横坐标 (X)，峰面积积分值为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线。回归方程：日蟾毒它灵 $Y=456.62 X-283.94$ ， $r=0.999 0$ ；蟾毒灵 $Y=161.81 X+17.65$ ， $r=0.999 5$ ；沙毒精 $Y=436.34 X-34.16$ ， $r=0.999 2$ ；华蟾酥毒基 $Y=1 025.6 X-5.14$ ， $r=0.999 8$ ；脂蟾毒配基 $Y=415.93 X-76.81$ ， $r=0.999 1$ 。结果表明，日蟾毒它灵在 0.218~1.090 μ g，蟾毒灵在 0.216~1.080 μ g，沙毒精在 0.202~1.010 μ g，华蟾酥毒基在 0.228~1.140 μ g，脂蟾毒配基在 0.224~1.120 μ g 线性关系良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取“2.1.3”项下的同一样品溶液，室温下分别在 0、2、4、8、10、24 h 进样 10 μ L，测定日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的峰面积的 RSD，均小于 1.50%，结果表明处理后的样品溶液在 24 h 内基本

稳定。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件，重复进样 5 次，每次 10 μ L，在色谱峰保留时间稳定情况下，分别计算 5 个峰面积的 RSD，日蟾毒它灵为 1.34%、蟾毒灵为 1.14%、沙毒精为 0.99%、华蟾酥毒基为 0.82%、脂蟾毒配基为 0.94%，表明精密度良好。

2.1.7 重复性试验 称取同一批样品，平行制备 5 份，按“2.1.3”项下的方法制备样品溶液，依法测定日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基得其 RSD 分别为 1.98%、1.07%、2.35%、3.22%、2.89%。测得其和的平均质量分数的 RSD 为 3.11%，表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已测定的同一蟾酥样品约 30 mg，分别精密称定。各加入约 1 倍的日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 5 个对照品，按“2.1.3”项下的方法制备样品溶液，进样 10 μ L。测得 5 个对照品的回收率分别为 99.9%、99.6%、97.9%、96.7%、99.5%，RSD 分别为 2.8%、3.2%、1.9%、1.0%、3.4%，结果见表 1。

2.2 样品测定 取不同产地药材制备供试品溶液，依法测定，用外标法计算日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙毒精、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的质量分数，结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取适量 5 种对照品分别加流动相使溶解，并稀释至适当浓度，经紫外光谱扫描测定，在 296 nm 处 5 者均接近最大吸收，故选择 296 nm 作为测定吸收波长。

表1 蟾酥样品中活性成分的测定结果

Table 1 Determination of active components in *Venenum Bufonis*

编号	来源	性状	质量分数 / %					合计
			日蟾毒它灵	蟾毒灵	沙毒精	华蟾酥毒	脂蟾毒配基	
1	安徽	块, 棕色	4.803	35.098	0.268	7.608	—	47.777
2	江苏	块, 棕色	2.393	6.374	30.804	—	44.791	84.362
3	北京	块, 棕褐色	50.228	12.728	0.274	20.238	—	83.468
4	山东济南	块, 棕黄色	2.827	22.993	0.190	5.243	1.993	33.246
5	山东临沂	块, 棕黄色	32.941	6.396	2.607	—	13.327	55.271

“—” 未检出

“—” undetected

3.2 提取方法及溶剂的选择

精密称取样品 0.5 g 分别用 50 mL 甲醇、60% 甲醇回流提取 1 h; 甲醇、60% 甲醇超声提取 30 min。经比较最后选用 60% 甲醇回流提取 1 h。

采用不同比例的流动相, 如甲醇-水 (60:40) 未得到满意的分离效果, 经比较, 本实验所采用的流动相可以使蟾酥样品在“2.1.1”项色谱条件下可基线分离, 达到定量测定的要求。

市场上蟾酥样品中所含成分和种类的量差异很大。对 5 批蟾酥样品进行定量测定结果表明, 安徽和山东济南 2 批样品中蟾毒灵量较高, 北京和山东临沂样品中日蟾毒它灵量较高, 而江苏样品中脂蟾

毒配基量较高。江苏和北京 2 批样品总量较其他产地高, 质量优, 而另外 3 批样品较低, 质量较差。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 赵 强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 4-附 7.
- [3] 董玮玮, 周 伟, 李顺旭, 等. 高效液相色谱法测定蟾酥药材中脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的含量 [J]. 中南药学, 2010, 8(10): 721-724.
- [4] 陈 莹, 袁 丹, 孔令锋, 等. HPLC 法测定仙蟾胶囊中土的宁、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 58-60.