

心可宁胶囊中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的 HPLC 法含量测定

郭增光, 罗晓倩, 王丽娟, 陈仁燕(翔宇药业股份有限公司, 临沂 276023)

摘要 目的:建立 HPLC 法测定心可宁胶囊中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量测定方法,以更好的控制其质量。**方法:**采用 Thermo C₁₈ 色谱柱,以 0.5% 磷酸二氢钾溶液-乙腈(50:50)为流动相,用磷酸调 pH 至 3.2,检测波长为 296 nm。**结果:**华蟾酥毒基在 30.72~71.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系($r=1.0000$),酯蟾毒配基在 30.78~71.82 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系($r=0.9999$),华蟾酥毒基和酯蟾毒配基平均回收率分别为 99.76% 和 99.88%,RSD 分别为 1.29% 和 0.62%;测定 3 批样品,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基总量分别为 0.053、0.053、0.054 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$,RSD 为 1.09%。**结论:**本方法准确、有效,可以作为该类产品的质控检测方法。

关键词:心可宁胶囊;HPLC;华蟾酥毒基;酯蟾毒配基

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2017)-6-0000-0

Study on Determination of Cinobufagin and Resibufogenin in Xinkening Capsules by HPLC

Guo Zengguang, Luo Xiaoqian, Wang Lijuan, Chen Renyan (Sunhover Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276023)

Abstract Objective: A HPLC method for determination of cinobufagin and resibufogenin in Xinkening capsules was established to control the drug quality. **Methods:** The determination was carried out using an Thermo C₁₈ column with the mobile phase of 0.5% potassium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (50:50) [adjusting pH as 3.2 with phosphoric acid] The detection wavelength was 296 nm. **Results:** The linear ranges of cinobufagin and resibufogenin were 30.72-71.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=1.0000$) and 30.78-71.82 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$) respectively. The average recoveries of cinobufagin and resibufogenin were 99.76% and 99.88% with the RSDs as 1.29% and 0.62% respectively of 3 batches samples, The total contents of cinobufagin and resibufogenin in 3 batches of samples were 0.053, 0.053 and 0.054 mg per capsule with RSD as 1.09%. **Conclusion:** This method is accurate and reliable. It can be applicable to the quality control of Xinkening Capsules.

Key words: Xinkening Capsules; HPLC; cinobufagin; resibufogenin

心可宁胶囊是由丹参、三七、冰片、水牛角浓缩粉、蟾酥等八味中药组成,具有活血化瘀、开窍止痛的功效,临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛、胸痛、心悸、眩晕^[1],而在治疗病毒性心肌炎的研究方面也取得了重大突破^[2-4]。蟾酥为毒性药材,相对安全剂量范围较窄,临床应用中屡有中毒、过敏等报道^[5]。为控制产品质量,保证用药安全,本文建立了采用高效液相色谱法测定心可宁胶囊中华蟾酥毒

基和酯蟾毒配基的含量测定方法,并提出了相应的含量限度。实验表明,该方法简单易行,重复性好,精密度高,可以为心可宁胶囊的质量控制提供有效的参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(紫外检测器,型号:G1314F,美国安捷伦公司)。华蟾酥毒基(批号:

110803-201406)、酯蟾毒配基(批号:110718-201108)对照品均来源于中国食品药品检定研究院,甲醇、乙腈为色谱纯(美国天地有限公司),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。心可宁胶囊样品来源于翔宇药业股份有限公司,批号 160101、160102、160103。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为 0.5% 磷酸二氢钾溶液-乙腈(50:50)(用磷酸调 pH = 3.2),检测波长 296 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温为室温 25 °C,进样量为 20 μL。理论板数按华蟾酥毒基、酯蟾毒配基计算应分别不低于 4 000,华蟾酥毒基峰与酯蟾毒配基峰的分度度大于 1.50。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品 8 粒(0.4 g · 粒⁻¹)的内容物,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷适量,回流 6 h,提取液回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取五氧化二磷减压干燥 24 h 的华蟾酥毒基对照品、酯蟾毒配基对照品各 10 mg,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。分别精密量取上述溶液各 5 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液 制备不含蟾酥药材的阴性样品,按照供试品溶液的制法,制成阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别精密量取对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪中测定。如图 1,结果表明理论塔板数按华蟾酥毒基峰、酯蟾毒配基峰计算均大于 4 000,华蟾酥毒基与酯蟾毒配基分离度大于 1.5,阴性供试品溶液及溶剂对两主峰检测均无干扰,表明该方法专属性良好。

2.4 线性试验

精密吸取对照品储备液 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,分别吸取 20 μL,注入高效液相色谱仪测定。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。线性方程分别为:

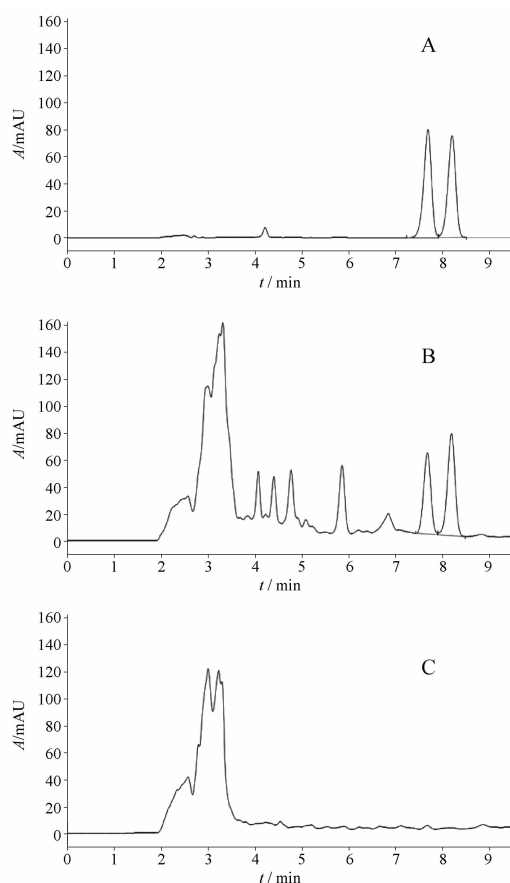


图 1 对照品溶液(A)、供试品溶液(B)和阴性样品(C)色谱图

Fig. 1 The chromatogram of standard solution(A), test solution(B) and negative sample solution(C)

$$A = 16.814C + 6.362 \quad r = 1.0000$$

$$A = 15.287C + 6.564 \quad r = 0.9999$$

华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的浓度分别在 30.72 ~ 71.68 μg · mL⁻¹ 和 30.78 ~ 71.82 μg · mL⁻¹ 的浓度范围内,峰面积和浓度均呈现良好线性关系,

2.5 检测限与定量限

取对照品溶液加甲醇稀释至华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的信噪比约为 10:1 和 3:1 分别作为定量限溶液和检测限溶液,吸取 20 μL,注入高效液相色谱仪测定。由试验结果可知,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基定量限(LOQ)分别为 2.45 和 2.43 ng;华蟾酥毒基和酯蟾毒配基检测限(LOD)分别为 0.74 ng 和 0.73 ng,可以精密检测蟾酥含量。

2.6 精密度试验

取对照品溶液重复进样 5 次,测得峰面积如表 1。结果表明:华蟾酥毒基峰面积的 RSD 值为 0.15%,酯蟾毒配基峰面积的 RSD 值为 0.17%,表明该方法的系统精密度良好。

2.7 稳定性试验

将供试品溶液(批号:160101),分别于 0、1、2、4、6、8、10 h 进样测定。结果表明,在室温条件下放置 10 h 内,所得华蟾酥毒基峰面积的相对标准偏差值为 0.58%;酯蟾毒配基峰面积的相对标准偏差值为 0.67%,结果表明,供试品溶液在 10 h 内稳定性良好,心可宁胶囊的蟾酥含量为 0.053 mg·粒⁻¹。

2.8 回收率试验

取已知含量的供试品(批号:160101)4 粒的

量,同时取阴性样品 4 粒的量,精密称定 9 份,置于索氏提取器中,分为 3 组,第一组加上述对照品溶液 1.7 mL,第二组加上述对照品溶液 2.1 mL,第三组加上述对照品溶液 2.5 mL,再分别加三氯甲烷适量,回流 6 h,同供试品溶液制备方法操作,即得。同法测定,回收率测定结果见表 1、表 2。

2.9 样品含量测定

取心可宁胶囊 3 批,按上述方法分别测定华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量。结果见表 3。

表 1 心可宁胶囊华蟾酥毒基回收率试验结果(n=9)

Tab.1 The recovery of cinobufagin in Xinkening capsule

序号 (No.)	样品含量 (sample amount)/mg	加入量 (added amount)/mg	测得量 (tested amount)/mg	回收率 (recovery)/%	平均值 (average)/%	RSD /%
1	0.0941	0.08704	0.182	100.99	99.76	1.29
2	0.0977	0.08704	0.186	101.45		
3	0.0930	0.08704	0.179	98.81		
4	0.0905	0.1075	0.197	99.07		
5	0.0926	0.1075	0.202	101.77		
6	0.0912	0.1075	0.198	99.35		
7	0.0920	0.1280	0.218	98.44		
8	0.0919	0.1280	0.218	98.52		
9	0.0927	0.1280	0.220	99.45		

表 2 心可宁胶囊酯蟾毒配基回收率试验结果(n=9)

Tab.2 The recovery of resibufogenin in Xinkening capsule

序号 (No.)	样品含量 (sample amount)/mg	加入量 (added amount)/mg	测得量 (tested amount)/mg	回收率 (recovery)/%	平均值 (average)/%	RSD /%
1	0.1217	0.08721	0.209	100.1	99.88	0.62
2	0.1184	0.08721	0.205	99.30		
3	0.1179	0.08721	0.206	101.02		
4	0.1174	0.1077	0.225	99.91		
5	0.12	0.1077	0.228	100.28		
6	0.1171	0.1077	0.224	99.26		
7	0.1215	0.1283	0.250	100.16		
8	0.121	0.1283	0.248	98.99		
9	0.1218	0.1283	0.250	99.92		

表 3 心可宁胶囊样品蟾酥含量测定结果

Tab.3 Test results of venenum bufonis in Xinkening capsule

批号 (number)	华蟾酥毒基含量 (content of cinobufagin) /(mg·粒 ⁻¹)	酯蟾毒配基含量 (content of resibufogenin) (mg·粒 ⁻¹)	总量 (total contents) /(mg·粒 ⁻¹)	RSD /%
160101	0.0226	0.0304	0.053	1.09
160102	0.0227	0.0301	0.053	
160103	0.0233	0.0306	0.054	

3 讨论

3.1 柱温

在 20 °C、25 °C 和 30 °C 柱温条件下,分别测定含量。结果表明,柱温在 20 °C ~ 30 °C 之间变化时,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0215 mg · 粒⁻¹和 0.0311 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 1.88% 和 0.37%,柱温变化对测定结果无明显的影响。

3.2 流速

在流速为 0.9、1.0 和 1.1 mL · min⁻¹条件下,分别测定含量。结果表明,流速在 0.9 ~ 1.1 mL · min⁻¹之间变化时,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0213 mg · 粒⁻¹和 0.0312 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 0.27% 和 1.13%,流速对测定结果无明显的影响。

3.3 流动相比例

流动相磷酸二氢钾与乙腈的比例为 52:48、50:50、48:52 条件下,分别测定含量。结果表明,流动相比例在 52:48 ~ 48:52 之间变化时,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0218 mg · 粒⁻¹和 0.0306 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 2.10% 和 3.49%,流动相比例变化对测定结果的影响较小。

3.4 流动相 pH 值

在流动相 pH 值为 3.0、3.2、3.4 条件下,分别测定含量。结果表明,pH 值在 3.0 ~ 3.4 之间变化时,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0212 mg · 粒⁻¹和 0.0313 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 1.91% 和 0.37%,流动相 pH 值对测定结果的影响较小。

3.5 检测波长

在检测波长为 291、296、301 nm 条件下,分别测定含量。结果表明,检测波长在 291 ~ 301 nm 之间变化时,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0215 mg · 粒⁻¹和 0.0309 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 0.97% 和 1.14%,检测波长耐用性较好。

3.6 色谱柱

采用 Thermo C₁₈ 柱 (Lot: 12243)、Thermo C₁₈ 柱

(Lot: 12294)、Cosmosil C₁₈ 色谱柱,分别测定含量。结果表明,使用不同型号的色谱柱,华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量分别为 0.0213 mg · 粒⁻¹和 0.0311 mg · 粒⁻¹,RSD 分别为 0.72% 和 0.74%,色谱柱的耐用性较好。

3.7 小结

本文建立了一种准确检测蟾酥含量的方法,并对其进行了专属性、线性、检测限和定量限、精密度、稳定性、回收率及耐用性方法学验证,试验表明该色谱法专属性强、准确度高、检测限度低、稳定可靠,可以广泛用于各种产品中蟾酥含量的测定,为检测蟾酥质量提供了有力的依据。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准·中药成方制剂[S]. 第九册:48
Drug Specification Promulgated by the Ministry of Health. P. R. China.
Traditional Chinese medicine drugs preparation[S]. Vol IX:48
- [2] 董军. 心可宁胶囊治疗病毒性心肌炎的临床疗效及安全性[J]. 中国医药指南, 2013,11(17):284
Dong Jun. Clinical efficacy and safety of xinkening capsules in the treatment of viral myocarditis [J]. ? Guide China Med, 2013,11(17):284
- [3] 魏惠芳. 60 例心可宁胶囊治疗病毒性心肌炎的临床体会[J]. 中国保健营养(中旬刊), 2013(12):631
Wei Huifang. Clinical experience of 60 viral myocarditis cases treatment with xinkening capsules [J]. China Health Care Nutrit, 2013(12): 631
- [4] 王志永, 于磊, 王雪艳. 心可宁胶囊治疗病毒性心肌炎 53 例[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(4):482
Wang Zhiyong, Yu Lei, Wang Xueyan. 53 viral myocarditis cases treatment with Xinkening Capsules[J]. ? Shaanxi Med J, 2009, 38(4): 482
- [5] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(21):3185
Kou Guanjun, Qin Zifan, Deng Yafang, et al. Research progress of venenum bufonis[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(21): 3185

(收稿日期:2017-07-19)