蟾皮缓释滴丸质量标准及初步稳定性研究

何锦晶，黄绳武*(浙江中医药大学，杭州 310053)

摘要：目的 确立蟾皮缓释滴丸的质量标准。**方法** 采用 TLC 鉴定各成分，HPLC 分别测定华蟾素毒基及酯蟾毒配基的含量，X 衍射及扫描电镜观察药物存在状态，考察该制剂初步稳定性。**结果** TLC 鉴别能从样品中检出相应斑点，华蟾酥毒基和酯蟾毒配基线性范围分别是 0.002 12~0.012 72 g·L^{-1} 和 0.000 44~0.002 64 g·L^{-1}，重复性好，回收率符合要求；药物可能是以无定形状态均匀分散于基质中；稳定性较好。**结论** 该质量评价方法专属性良好、准确、可靠，能有效控制蟾皮缓释滴丸的质量。

关键词：蟾皮缓释滴丸；质量评价；初步稳定性
中图分类号：R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2016)05-0557-05
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.009

Quality Standard and Preliminary Stability of Toad Skin Sustained-release Dropping Pills

HE Jinjing, HUANG Shengwu*(*Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310052, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard of toad skin sustained-release dropping pills(TSSDP). **METHODS** TLC testing was used to identify agents in various medicinal materials. The content of cinobufagin and resibufogenin were determined by HPLC. X-ray diffraction and SEM techniques wrer used to study drug statu，and preliminary stability testing were taken. **RESULTS** Corresponding spots were detected from the sample. The linear range of cinobufagin was 0.002 12–0.012 72 g·L^{-1} and resibufogenin was 0.000 44–0.002 64 g·L^{-1}. They had a good linear relationship, reproducibility and recovery. The drug was possibly dispersed in the matrix with an amorphous state by X-ray diffraction and SEM techniques. The pills had good stability. **CONCLUSION** This method of quality evaluation is specific, accurate and reliable. It can effectively control the quality of the toad skin sustained-release dropping pills.
KEY WORDS: toad skin sustained-release dropping pills; quality standards; preliminary stability

蟾皮是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans cantor* 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus schneider* 的干燥表皮，具有良好的抗肿瘤活性。目前，蟾皮提取物被开发成多种上市产品，如华蟾素注射液[1]、华蟾素片[2]、华蟾素口服液及华蟾素胶囊[3]等，效果显著。另外，也有其他剂型的研究报道，如干蟾皮提取液微球栓塞剂、华蟾素滴丸、华蟾素分散片、华蟾素注射乳剂[4]等。滴丸是具有载药量高、服用次数少、利用度高且有缓释效果的制剂。X 衍射技术是一种研究物质的物相和晶体结构的分析方法[5]，被广泛应用于固体分散体相关制剂的鉴别、分析及质量标准的建立[6]，其通过对药物和制剂的衍射图谱的比较，判断是否有药物晶体的衍射特征峰存在，从而判断药物在制剂中的分散状态。扫描电子显微镜(scanning electron microscope，SEM)集成了最新的光学、电子和计算机技术，高度自动化和人性化设计，具有分辨率高、图像三维效果好等特点[7]，对于较粗的分散系统可应用显微镜法。本课题组制备的蟾皮缓释滴丸处方为蟾皮提取物 11.2 g，PEG4000 4.2 g，硬脂酸 12.6 g，每批 1 000 丸。本研究采用多指标评价蟾皮缓释滴丸，以期建立可靠、合理、科学的质量标准。

1 仪器与试剂

HPLC 工作站(德国 LUMTECH 制备型高效液相色谱仪系统，LUMTECH 化学工作站，K501 泵，K2501 紫外检测器)；HN101-2 电热鼓风干燥箱(南通沪南科学仪器有限公司)；JA20SH 电子天平(常州市幸运电子设备有限公司)；KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；UV7595 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)；HH-4 数显恒温水浴锅(上海江星仪器有限公司)；RC-8D 溶出度测定仪(天津市国铭医药设备有限公司)；XRD-7000 X-衍射机(日本岛津公司)；

基金项目：浙江省自然科学基金资助项目(LY16H280010)
作者简介：何锦晶，女，硕士生　Tel: 15868483649　E-mail: 501210517@qq.com　*通信作者：黄绳武，男，教授　Tel: (0571)86613524　E-mail: hsw55@163.com

S3000N 扫描电子显微镜(日本日立公司)；E1010 离子溅射仪(日本日立公司)；LRH-400-YG 药物稳定性试验箱(上海银泽仪器设备有限公司)。

蟾皮缓释滴丸(自制)；华蟾酥毒基对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110803-200605，纯度≥99.6%)；酯蟾毒配基对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110718-200507，纯度≥98%)；甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

取 3 批蟾皮缓释滴丸和空白滴丸数粒，研碎，每批约 0.2 g，加 80%乙醇 20 mL，加热回流 2 次，每次 1 h，滤过，滤液置 50 mL 量瓶中，用 80%乙醇稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液和空白对照溶液。精密称取酯蟾毒配基 1.21 mg 和华蟾酥毒基对照品 6.11 mg，加甲醇溶解并稀释定容于 25 mL 量瓶中，作为混合对照品溶液。按中国药典 2015 年版第四部 0502 薄层色谱法试验，吸取上述 5 种溶液各 20 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷-三氯甲烷-丙酮(4∶3∶3)为展开剂，展开，取出，晾干，喷 10%硫酸乙醇溶液，加热至斑点显色清晰，置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点，且斑点大小适中，分离度好，见图 1。

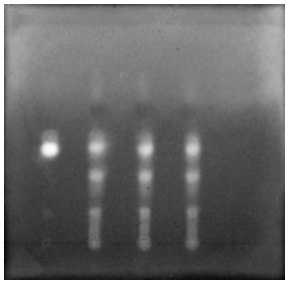


图 1 蟾皮缓释滴丸薄层鉴别试验

S−混合对照品；1−蟾皮缓释滴丸(批号：20131031)；2−蟾皮缓释滴丸(批号：2031125)；3−蟾皮缓释滴丸(批号：20131213)；4−空白基质。

Fig. 1 The TLC test of toad skin sustained-release dropping pills

S−mixed reference; 1−toad skin sustained-release dropping pills(batch No. 20131031); 2−toad skin sustained-release dropping pills(batch No. 2031125); 3−toad skin sustained-release dropping pills(batch No. 20131213); 4−blank matrix.

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱：KromasiL C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，检测波长：295 nm，流动相：乙腈-水(50∶50)，流速：1 mL·min^{-1}，进样量：20 μL，柱温：30 ℃。

2.2.2 对照品溶液配制 分别精密称取华蟾素毒基 5.31 mg、酯蟾毒配基 5.51 mg 置于 25 mL 量瓶中，加甲醇适量溶解并稀释至刻度，作为对照品储备液。因供试品溶液中酯蟾毒配基的含量明显低于华蟾酥毒基，所以酯蟾毒配基对照品需要进一步稀释：精密移取酯蟾毒配基对照品储备液 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶，用甲醇稀释至刻度，摇匀，作为酯蟾毒配基对照品储备液。精密移取华蟾酥毒基对照品储备液 0.2 mL、酯蟾毒配基对照品储备液 0.4 mL 置于同一 5 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为稀释后混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液配制 精密称取蟾皮缓释滴丸约 0.2 g，加 80%乙醇 20 mL，加热回流 2 次，每次 1 h，滤过，滤液置 50 mL 量瓶中，用 80%乙醇稀释至刻度，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 测定方法 取“2.2.3”项下供试品溶液、混合对照品溶液及甲醇做空白溶剂各 20 μL 进样，按“2.2.1”项下色谱条件测定。结果显示，在此色谱条件下，溶剂不干扰药物的测定，色谱图见图 2。

2.2.5 标准曲线的绘制 分别精密移取华蟾酥毒基对照品储备液和酯蟾毒配基对照品储备液适量置于同一 5 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，华蟾

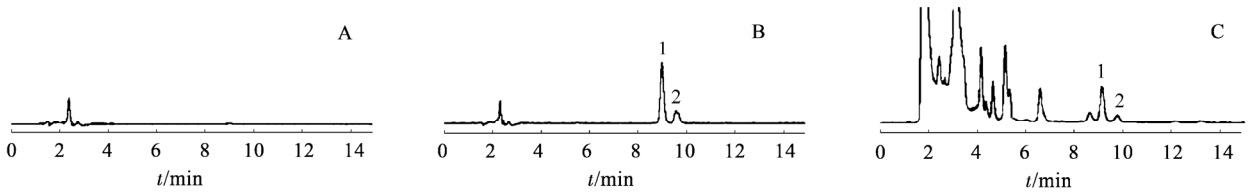


图 2 蟾皮缓释滴丸高效液相色谱图

A−空白对照溶液；B−混合对照品溶液；C−供试液；1−华蟾素毒基；2−酯蟾毒配基。

Fig. 2 HPLC spectrogram of toad skin sustained-release dropping pills

A−blank reference solution; B−mixed reference solution; C−sample solution; 1−cinobufagin; 2−resibufogenin.

酥毒基对照品储备液移取量分别为0.05，0.1，0.15，0.2，0.25，0.3 mL，酯蟾毒配基对照品储备液移取量分别为0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6 mL，制备成编号为1~6的混合对照品溶液，0.45 μm微孔滤膜过滤，进样20 μL。以样品浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，华蟾酥毒基线性回归方程 Y=14 249X–1.412 9，R^2=0.999 8，酯蟾毒配基线性回归方程 Y=15 383X–1.488 4，R^2=0.999 3。华蟾酥毒基和酯蟾毒配基分别在0.002 12~0.012 72，0.000 44~0.002 64 g·L^{-1}内，峰面积与浓度存在良好的线性关系。

2.2.6 仪器精密度试验 分别精密移取华蟾酥毒基对照品储备液0.15 mL，酯蟾毒配基对照品储备液0.4 mL置于5 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，0.45 μm微孔滤膜过滤，进样20 μL，连续进样6次，华蟾酥毒基和酯蟾毒配基峰面积RSD分别为1.7%和1.3%，表明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批蟾皮缓释滴丸(批号：20131213)0.2 g，平行6份，按“2.2.3”项下供试品制备方法制备，所得样品按“2.2.1”项下色谱条件连续测定，分别以外标法测定华蟾酥毒基和酯蟾毒配基平均含量分别为1.38 mg·g^{-1}和0.26 mg·g^{-1}，RSD分别2.0%和1.7%，表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 称取蟾皮缓释滴丸(批号：20131213)约0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在0，4，8，12，24 h分别进样20 μL，以外标法测定供试品溶液中酯蟾毒配基和华蟾毒配基的含量RSD分别为1.2%和1.3%，表明供试品溶液至少在24 h内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 称取蟾皮缓释滴丸(批号：20131213)6份，各约0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，测定含量后分别加入浓度为0.212 4 mg·mL^{-1}的华蟾酥毒基对照品0.6 mL和浓度为0.022 04 mg·mL^{-1}的酯蟾毒配基对照品 1.0 mL，按“2.2.1”项下色谱条件，以外标法测定华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量，计算回收率，结果见表1。酯蟾毒配基和华蟾毒配基浓度RSD均<2%，表明该方法准确度良好。

2.2.10 蟾皮缓释滴丸含量测定 取3批蟾皮缓释滴丸，按“2.2.3”项下进行制备，按“2.2.1”项下色谱条件进样20 μL，测定峰面积，以外标法计算蟾皮缓释滴丸中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量，结果见表2。每批蟾皮缓释滴丸所含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量分别≥1.3 mg和0.2 mg，两者总量≥1.5 mg。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 The result of average recovery of cinobufagin (n=6)

编号	华蟾酥毒基						酯蟾毒配基					
	原有量/mg	加入量/mg	实测量/mg	回收量/mg	回收率/%	RSD/%	原有量/mg	加入量/mg	实测量/mg	回收量/mg	回收率/%	RSD/%
1	0.260 0	0.127 4	0.382 7	0.122 7	96.3		0.040 0	0.022 0	0.061 5	0.021 5	97.5	
2	0.261 7	0.127 4	0.386 1	0.124 3	97.6		0.040 3	0.022 0	0.062 1	0.021 8	98.9	
3	0.265 6	0.127 4	0.388 5	0.122 9	96.5	0.7	0.040 9	0.022 0	0.062 0	0.021 1	95.7	1.3
4	0.265 5	0.127 4	0.387 0	0.121 4	95.3		0.040 6	0.022 0	0.062 0	0.021 4	97.1	
5	0.260 3	0.127 4	0.384 9	0.124 5	97.8		0.040 0	0.022 0	0.061 7	0.021 7	98.5	
6	0.260 7	0.127 4	0.383 3	0.122 7	96.3		0.040 1	0.022 0	0.061 2	0.021 1	95.7	

表2 蟾皮缓释滴丸含量测定(n=3)

Tab. 2 The content of toad skin sustained-release dropping pills(n=3)

批号	华蟾酥毒基/mg·g^{-1}	酯蟾毒配基/mg·g^{-1}
20131031	1.382 2	0.267 9
20131125	1.402 6	0.302 4
20131213	1.379 0	0.264 3

2.3 蟾皮缓释滴丸释放度考察

药物释放度参照中国药典2015年版四部9013中缓释、控释和迟释制剂指导原则的规定，用转篮法测定蟾皮缓释滴丸的释放度，精密称取样品适量，量取pH 1.2的盐酸溶出介质500 mL注入溶出杯中，转速为100 r·min^{-1}，温度为(37±0.5)℃，分别于1，2，4，6，8，10，12 h取样，同时补充同体积同温度的溶出介质，经0.45 μm微孔滤膜过滤后，以外标法测定有效成分的含量，计算累积释放量[8]，绘制体外时间-浓度曲线，见图3。

2.4 蟾皮缓释滴丸的X衍射

本研究分别对蟾皮提取物、基质粉末、蟾皮缓释滴丸粉末及蟾皮提取物和基质粉末的物理混合物进行了测试，X衍射图见图4。

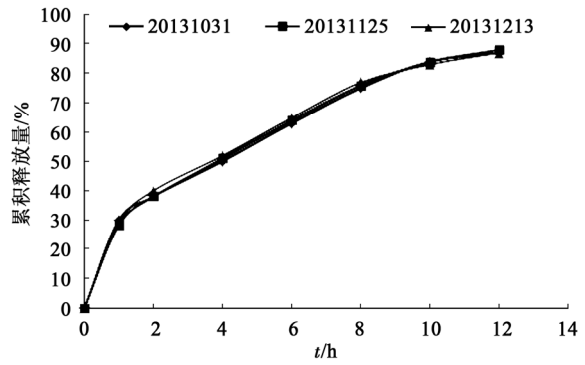


图 3 蟾皮缓释滴丸溶出曲线

Fig. 3 The stripping curve of toad skin sustained-release dropping pills

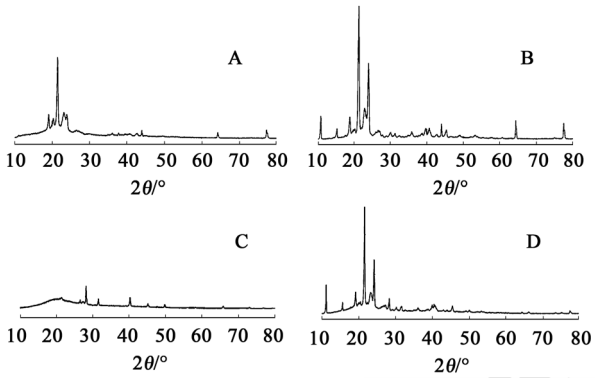


图 4 X 衍射图

A–蟾皮提取物；B–基质粉末；C–蟾皮缓释滴丸粉末；D–蟾皮提取物和基质粉末的物理混合物。

Fig. 4 X-ray diffraction diagram

A–toad skin extract; B–matrix power; C–power of toad skin sustained-release dropping pills; D–physical mixture of A and B.

由图 4 可知，在 θ 为 10.0°~80.0°，基质有数个衍射峰，其中 18.0°~25.0°之间的衍射峰较强；在 25.0°~70.0°之间药物有数个衍射峰，强度不大；在 15.0°~80.0°之间滴丸有数个特征峰，其中 18.0°~25.0°之间的衍射峰较强。滴丸和物理混合物的 X 衍射图谱相比有明显不同，说明滴丸制剂不同于普通的物理混合物；药物和滴丸的 X 衍射图谱相比，药物大部分特征峰在滴丸制剂的图谱中特征峰消失或是强度降低，初步推测药物在滴丸基质中是以无定形状态存在的。

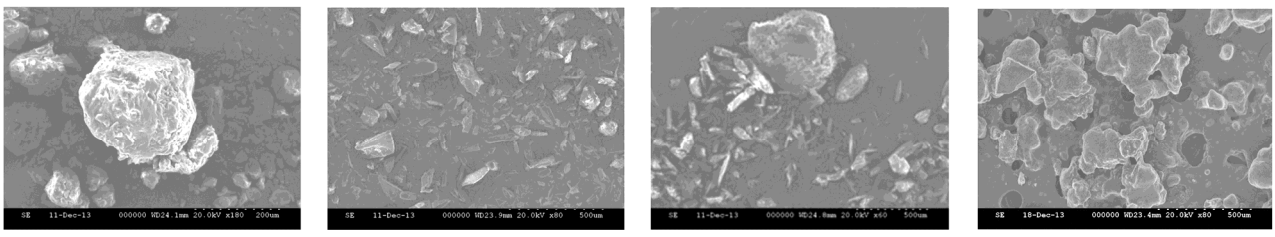
2.5 蟾皮缓释滴丸在制剂中的分散状态

采用 SEM 观察药物在制剂中的分散状态。分别对蟾皮提取物、基质粉末、蟾皮缓释滴丸粉末及蟾皮提取物和基质粉末的物理混合物进行了测试，结果见图 5。

由图 5 可知，基质结晶形态明显，有立体感；药物表面粗糙，性状不规则；在物理混合物的扫描电镜图像中，可以看到药物及基质的形态，基质晶型大小无变化；滴丸的扫描电镜图像中可以看出，药物均匀的分散于基质中，没有观察到药物的晶体状态存在。

2.6 初步稳定性试验

2.6.1 影响因素实验 ①高温试验：取 3 批不同批号的蟾皮缓释滴丸置于表面皿中，置于 40 ℃和 60 ℃药物稳定性试验箱中放置 10 d。分别于第 0，5，10 天取样，观察蟾皮缓释滴丸的外观，测定缓释滴丸中指标成分含量及释放度。因本缓释滴丸所用的辅料熔点较低，在 60 ℃条件下放置一段时间后熔化变形，故设置考察温度为 40 ℃。结果表明，蟾皮缓释滴丸在 40 ℃下的外观性状、含量及体外累计释放均未发生显著性变化。②高湿试验：取 3 批不同批号的蟾皮缓释滴丸置于表面皿中，放置 10 d。分别于第 0，5，10 天取样，分别观察蟾皮缓释滴丸的外观，测定缓释滴丸中指标成分含量及释放度；测定缓释滴丸的吸湿率，以考察其吸湿潮解性能，实验中发现滴丸在相对湿度为置于恒温恒湿箱中，在温度为(25±5)℃，相对湿度分别为(95±5)%，(75±5)%，(55±5)%条件下(95±5)%及(75±5)%条件下均有明显增重(>5%)，且颜色变浅，滴丸之间出现黏连，故设置考察相



蟾皮提取物　　基质粉末　　蟾皮提取物和基质粉末的物理混合物　　蟾皮缓释滴丸粉末

图 5 SEM 图

Fig. 5 SEM images

对湿度(55±5)%。结果表明，在相对湿度(55±5)%条件下，滴丸外观性状影响不大，但指标成分含量有所下降，见表 3。体外累计释放度测定表明，到第 10 天，溶出略有加快。

表 3 高湿实验结果(n=3)

Tab. 3 The result of humidity(n=3)

批号	时间/d	性状	华蟾酥毒基含量/ $mg \cdot g^{-1}$	酯蟾毒配基含量/ $mg \cdot g^{-1}$
20131111	0	棕褐色滴丸	1.387 9	0.278 2
	5	棕褐色滴丸	1.246 8	0.242 4
	10	棕褐色滴丸	1.144 3	0.198 0
20131121	0	棕褐色滴丸	1.364 5	0.264 4
	5	棕褐色滴丸	1.253 5	0.236 7
	10	棕褐色滴丸	1.134 4	0.189 0
20131125	0	棕褐色滴丸	1.396 7	0.263 5
	5	棕褐色滴丸	1.237 8	0.240 6
	10	棕褐色滴丸	1.140 8	0.196 6

③光照试验：取 3 批不同批号的蟾皮缓释滴丸置于表面皿中，置于光照仪样品架上，光照度为(4 500±500)Lx，温度为(25±2)℃，光照 10 d。于第 0，5，10 天取样。分别观察蟾皮缓释滴丸的外观，测定缓释滴丸中指表成分含量及释放度。结果表明，外观性状、指标含量及体外溶出释放基本无显著变化。

2.6.2 加速试验 采用拟上市包装(密封包装)的 3 批样品蟾皮缓释滴丸在(40±2)℃、相对湿度(60±5)%条件下，放置 3 个月，在试验期间第 0，1，2，3 个月取样 1 次，分别观察蟾皮缓释滴丸的外观，测定缓释滴丸中指表成分含量及释放度，结果表明各指标无明显变化。

3 讨论

TLC 鉴别华蟾酥毒基和酯蟾毒配基，采用环己烷-三氯甲烷-丙酮(4∶3∶3)展开，喷 10%硫酸乙醇溶液，紫外 365 nm 处显色，阴性无干扰。采用 HPLC 测定制剂中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量，测得每粒蟾皮缓释滴丸所含华蟾酥毒基和酯蟾毒配基含量分别≥1.3 mg 和 0.2 mg，两者总量≥1.5 mg，该测定方法简便易行，精密度、重复性良好。通过 X 衍射技术和 SEM [9]对蟾皮缓释滴丸进行研究发现，药物可能以无定形状态均匀分散于基质中。

通过影响因素试验、加速试验获得药物稳定性等相关信息，并对其进行系统全面分析，确定蟾皮缓释滴丸包装形式，贮存条件及最终有效期。蟾皮缓释滴丸组成包括水溶性基质 PEG4000，对湿度比较敏感，高的相对湿度的条件下容易吸水脱色、黏连，指标成分含量也有所降低，溶出速率有加快的趋势；缓释滴丸基质熔点较低，高温容易熔融变形，所以温度对滴丸形态有影响；光照对该制剂稳定性影响不显著。故该制剂应密封保存，环境温度<40 ℃。

REFERENCES

[1] LUO C, GAO B, BIAN B L, et al. Systematic review of cinobufacini injection for esophageal cancer [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(14): 181-185.

[2] YU B, YU H, SU Z X, et al. Observe on the clinical curative of cinbufotalin tablet in the standardized treatment of cancer pain [J]. Mod J Int Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2015, 24(36): 3997-3999.

[3] LI H M, CHEN L, AN N, et al. Study on cinobufacini capsules combined with zoledronic acid for treating bone metastases pain in malignant tumor [J]. Lab Med Clin(检验医学与临床), 2015, 12(16): 2331-2335.

[4] DONG Y, LUO M, JIANG T Y, et al. Preparation of Huachansu parenteral emulsion and studies on the quality of preparation [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2009, 26(1): 6-10.

[5] ZHU L Y, XIE J F, KONG Z M, et al. Fingerprint of X-ray diffraction of Tibetan medicine dairy Nanhanshuishi and its application in processing by microwave [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(10): 1948-1952.

[6] LI X M, SHAO A J, CHEN M, et al. Studies on gypsum fibrosum and G. F. praeparatum by X-ray powder diffraction [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(17): 75-78

[7] 张大同. 扫描电镜与能谱仪分析技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2009: 2-12.

[8] LI Y Y, LIU B Y, HUANG S W. Quality standard of venenum bufonis sustained-release pellets [J].Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(11): 1324-1329.

[9] JIANG S S, LI Y S,TU Y Q, et al. Preparation of venenum bufonis sustained-release pellets and its release mechanism *in vitro* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1103-1106.

收稿日期：2015-12-23