

HPLC 同时测定通窍益心丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量

林晓辉,张雪原,池浩波,陈洁莹,朱吉士(广东省潮州市药品检验所,广东 潮州 521000)

摘要:目的 建立测定通窍益心丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量的反相高效液相色谱法。方法 采用 Elite SinoChrom ODS2 色谱柱,以 0.5% 磷酸二氢钾溶液(pH 3.2)-乙腈(52:48)为流动相,流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:296 nm。结果 华蟾酥毒基回收率 99.77%,RSD=0.49%;脂蟾毒配基回收率 99.39%,RSD=0.60%。结论 本法简便准确,专属性强,可用于控制该制剂质量。

关键词:通窍益心丸;华蟾酥毒基;脂蟾毒配基;高效液相色谱法

中图分类号:R917.101;R284.1

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2009)04-0315-03

Determination of Cinobufagin and Recibufogenin in Tongqiao Yixin Pill by HPLC

LIN Xiaohui, ZHANG Xueyuan, CHI Haobo, CHEN Jieying, ZHU Jishi (Chaozhou Institute for Drug Control, Chaozhou 521000, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of cinobufagin and recibufogenin in Tongqiao Yixin pill. **METHODS** The analysis was performed on a SinoChrom ODS2 column. The mobile phase consisted of 0.5% potassium phosphate(pH 3.2)-acetonitrile (52:48), and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 296 nm. **RESULTS**

The average recovery and RSD were 99.77% and 0.49% for cinobufagin, 99.39% and 0.60% for recibufogenin, respectively.

CONCLUSION This method is simple and reliable for the quality control of Tongqiao Yixin pills.

KEY WORDS: Tongqiao Yixin pills; cinobufagin; recibufogenin; HPLC

通窍益心丸是广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂独家生产的中成药,由人工麝香、人工牛黄、蟾酥、珍珠、冰片、三七、人参、水牛角干浸膏、胆酸钠等组成,具有活血化瘀,益气强心,通窍止痛的功效,是治疗气滞血瘀,胸痹心痛,心悸气短,冠心病引起的心绞痛、心功能不全、心律失常的心脏良药。原标准收载于《卫生部药品标准中药成方制剂第二十册》,该标准没有含量测定项,本实验采用 HPLC 测定通窍益心丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量,结果准确,重复性好,专属性强,可用于通窍益心丸的质量控制。

1 实验材料

1.1 药品和试剂

通窍益心丸(广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂生产,10个批号),通窍益心丸缺蟾酥阴性制剂(广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂提供);华蟾酥毒基对照品(中国药品生物制品检定所,110803-200504,供含量测定用);脂蟾毒配基对照品(中国药品生物制品检定所,0718-9306,供含量测定用);乙腈为色谱纯(Merck);甲醇、磷酸为分析纯

(广州化学试剂厂);磷酸二氢钾为分析纯(天津市化学试剂一厂);水为重蒸水。

1.2 仪器

Agilent 1200 液相色谱仪(包括 GA1311A 四元泵、G1314B 可变波长检测器、G1316A 柱温箱、G1329A 自动控温进样器、ChemStation 工作站);Shimadzu UV-2201 紫外分光光度计;METTLER TOLEDO AL204 电子分析天平(万分之一);METTLER TOLEDO XS205 电子分析天平(十万分之一);SY 3200D 超声波清洗器(上海声源超声波仪器设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件

Elite SinoChrom ODS2(4.6 mm×200 mm,5 μm);0.5% 磷酸二氢钾溶液(pH 3.2)-乙腈(52:48)为流动相;流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长 296 nm,柱温:30℃,理论板数按华蟾酥毒基峰、脂蟾毒配基峰计算应分别不低于 4 000^[1],分离度大于 1.5。

2.2 供试品溶液的制备

取本品 80 丸,精密称定,研细,取约 0.5 g,精密

称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定重量,密塞,超声处理(功率 150 W,频率 55 kHz)60 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥 12 h 以上的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 各含华蟾酥毒基、脂蟾毒配基 0.1 mg 的溶液,作为对照品母液。分别精密量取对照品母液 3

mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

取缺蟾酥的阴性对照样品 0.5 g,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪。结果阴性对照溶液无干扰。见图 1。

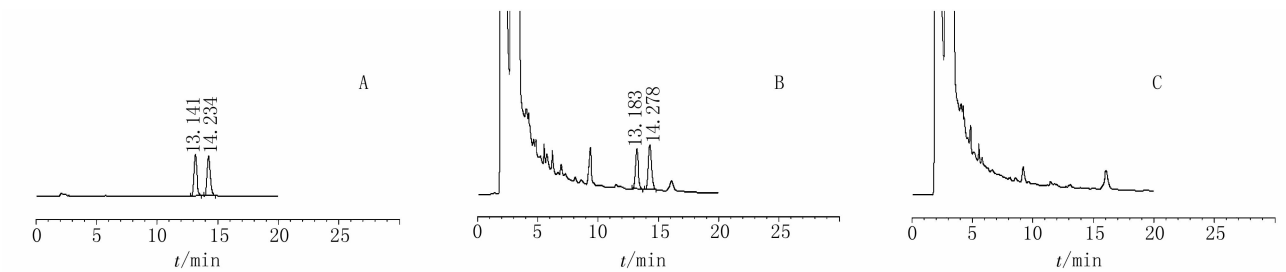


图 1 高效液相色谱图
A - 对照品(华蟾酥毒基, $t_R = 13.141$ min, $n = 16\ 740$; 脂蟾毒配基, $t_R = 14.234$ min, $n = 16\ 804$); B - 样品; C - 阴性对照溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

A - reference substance(cinobufagin, $t_R = 13.14$ min, $n = 16\ 740$; recibufogenin, $t_R = 14.234$ min, $n = 16\ 804$); B - sample; C - negative control sample

2.6 标准曲线的制备

分别精密量取对照品母液 3 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。精密量取对照品溶液 1,4,8,10,15,20,25,30 μL,分别注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标。华蟾酥毒基在 0.030 57 ~ 0.917 1 μg 内,得回归方程为 $Y = 986.57X - 2.875\ 3$ ($r = 0.999\ 9$);脂蟾毒配基在 0.030 51 ~ 0.915 3 μg 内,得回归方程为 $Y = 1\ 022.6X - 10.327$ ($r = 0.999\ 6$)。结果表明华蟾酥毒基对照品在 0.030 57 ~ 0.917 1 μg 之间与其峰面积呈良好的线性关系;脂蟾毒配基对照品浓度在 0.030 51 ~ 0.915 3 μg 之间与其峰面积呈良好的线性关系。

2.7 仪器精密度试验

精密吸取同一对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件测定,重复进样 5 次,分别记录华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的峰面积,结果 RSD 分别为 0.4% 和 0.2%。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批号(批号:060903)样品 6 份(含华蟾酥毒基 0.577 0 mg · g⁻¹;脂蟾毒配基 0.685 1 mg · g⁻¹),每份约 0.25 g,分别精密加入上述对照品母液(含华蟾酥毒基对照品 0.101 9 mg · mL⁻¹、脂蟾毒配基对照品 0.101 7 mg · mL⁻¹) 1.5 mL,按“2.2”项下方法制备,进样测定,计算回

收率。结果见表 1、表 2。

表 1 华蟾酥毒基回收率试验结果($n = 6$)

Tab 1 The results of the recovery test for cinobufagin($n = 6$)						
取样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.250 4	0.144 5	0.152 8	0.295 0	99.23	99.77	0.49
0.251 6	0.145 2	0.152 8	0.298 5	100.17		
0.250 9	0.144 8	0.152 8	0.297 4	99.93		
0.251 4	0.145 1	0.152 8	0.295 3	99.13		
0.252 4	0.145 6	0.152 8	0.297 9	99.83		
0.251 8	0.145 3	0.152 8	0.299 1	100.34		

表 2 脂蟾毒配基回收率试验结果($n = 6$)

Tab 2 The results of the recovery test for recibufogenin($n = 6$)						
取样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.250 4	0.171 5	0.152 6	0.320 3	98.83	99.39	0.60
0.251 6	0.172 4	0.152 6	0.324 6	99.88		
0.250 9	0.171 9	0.152 6	0.322 2	99.29		
0.251 4	0.172 2	0.152 6	0.320 6	98.71		
0.252 4	0.172 9	0.152 6	0.323 5	99.39		
0.251 8	0.172 5	0.152 6	0.325 9	100.25		

结果表明,通窍益心丸丸中华蟾酥毒基平均回收率为 99.77% (RSD 为 0.49%, $n = 6$),脂蟾毒配基平均回收率为 99.39% (RSD 为 0.60%, $n = 6$)。

2.9 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,在 0,3,6,9,12,15,18,21,24 h 进行测定,所得华蟾酥毒基峰面积 RSD 为 0.4%,脂蟾毒配基峰面积的 RSD 为 0.5%。结

果表明华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 24 h 内基本稳定。

2.10 重复性试验

取同一批号样品(批号:060903)6份,按“2.2”项下方法制备供试液,按上述色谱条件测定,结果华蟾酥毒基含量为 0.577 5 mg · g⁻¹,RSD 为 0.81%;脂蟾毒配基含量为 0.685 2 mg · g⁻¹,RSD 为 0.73%。

2.11 样品含量测定结果

按含量测定方法测定 10 批样品的含量(以华蟾酥基和脂蟾毒配基总量计),结果见表 3。

表 3 含量测定结果(n=2)

Tab 3 Determination of samples(n=2)

批号	含量/μg · 丸 ⁻¹
060401	25.37
060902	25.59
060903	24.66
061004	24.92
061005	25.11
061006	24.98
061007	24.83
061008	24.94
061009	25.09
061110	25.30

3 讨论

3.1 蟾酥为有毒中药,在含有蟾酥的中药制剂中,对蟾酥进行含量测定对保证药品的使用安全和有效是必要的。根据以上 10 批样品的含量测定结果

(平均含量为 25.08 μg · 丸⁻¹,RSD = 1.2%),参考有关文献^[1],按平均含量的 80% 和 120% 计算,暂定本品每丸含蟾酥以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量计为 20 ~ 30 μg。

3.2 在 190 ~ 400 nm 波长范围内对华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品进行紫外扫描测定,结果华蟾酥毒基在 295 nm 处有最大吸收,脂蟾毒配基在 297 nm 处有最大吸收,根据中国药典^{[1]265-266}和本试验结果,在 296 nm 处,辅料基本没有干扰,故选用 296 nm 波长来测定,结果灵敏、准确。

3.3 本实验对提取溶剂及提取时间均进行优化试验,结果显示:用甲醇提取效果优于 50% 甲醇和乙醇,加热回流提取效果与超声提取 60 min 比较无显著性差异,故选择超声提取 60 min 作为本实验的提取条件。

3.4 含量测定中流动相采用 0.5% 磷酸二氢钾溶液(pH 3.2)-乙腈(52:48)比例时华蟾酥毒基峰和脂蟾毒配基峰能达到基线分离,分离效果最佳。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 265-266,664-665.

收稿日期:2008-01-24