

HPLC 法同时测定华佗救心丸中 8 种蟾蜍二烯内酯

周文莉¹, 祝宇龙¹, 李龙飞², 赵冰², 彭灿^{1*}, 阚家义^{3*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012; 2. 华佗国药股份有限公司, 安徽 亳州 236800; 3. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定华佗救心丸(蟾酥、人工牛黄、冰片等)中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、蟾毒它灵、远华蟾毒精、华蟾毒它灵的含量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Thermo Scientific C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 296 nm。**结果** 8 种蟾蜍二烯内酯在各自范围线性关系良好($r \geq 0.999\ 5$), 平均加样回收率 95.07%~102.59%, RSD 1.42%~2.81%。**结论** 该方法快速、简便、稳定, 可用于华佗救心丸的质量控制。

关键词: 华佗救心丸; 蟾蜍二烯内酯; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)05-1135-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.006

Simultaneous determination of eight bufadienolides in Huatuo Jiuxin Pills by HPLC

ZHOU Wen-li¹, ZHU Yu-long¹, LI Long-fei², ZHAO Bing², PENG Can^{1*}, KAN Jia-yi^{3*}

(1. Anhui Provincial Key Laboratory for Chinese Medicinal Formula; College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Huatuo Medicines Co., Ltd., Bozhou 236800, China; 3. Anhui Provincial Institutes for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of cinobufotalin, resibufogenin, gamabufotalin, bufalin, arenobufagin, bufotalin, telocinobufagin and cinobufotalin in Huatuo Jiuxin Pills (*Bufonis Venenum, Bovis Calculus Artificatus, Borneolum Syntheticum, etc.*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Thermo Scientific C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 0.6 mL/min in a gradient manner, and the detection wavelength was set at 296 nm. **RESULTS** Eight bufadienolides showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 5$), whose average recoveries were 95.07%–102.59% with the RSDs of 1.42%–2.81%. **CONCLUSION** This rapid, simple and stable method can be used for the quality control of Huatuo Jiuxin Pills.

KEY WORDS: Huatuo Jiuxin Pills; bufadienolides; HPLC

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑框蟾蜍耳后腺及表皮腺体的分泌物, 白色乳状液体或浅黄色浆液^[1], 是我国常用的一味传统名贵中药, 主要含有蟾蜍二烯羟酸内酯类^[2-3]、蟾毒色胺类、甾醇类

等成分, 以蟾蜍二烯内酯类为主。现代药理学研究表明^[4-7], 蟾酥有增强心肌收缩力、麻醉、降压、抗炎、抗肿瘤、抗辐射、抑制血小板聚集、增加冠状动脉血流等药理活性, 但其毒性也大, 用药不当

收稿日期: 2019-12-21

基金项目: 安徽省科技重大专项 (18030801117); 安徽省企业联合发展基金项目 (RD19200008)

作者简介: 周文莉 (1993—), 女, 硕士, 研究方向为药物分析学。Tel: 13605609154, E-mail: 1549248742@qq.com

* 通信作者: 彭 灿 (1983—), 男, 副教授, 研究方向为药剂学和药物分析学。Tel: (0551) 65378258, 18956024270, E-mail: pengcankang@hotmail.com

阚家义 (1969—), 男, 主任药师, 研究方向为药物分析学。Tel: 13965046611, E-mail: 1487835386@qq.com

会出现严重不良反应^[8-10]，故对其服用剂量有严格要求。

华佗救心丸由蟾酥、人参茎叶总皂苷、牛胆膏粉、人工麝香、珍珠、人工牛黄、冰片、三七膏粉组成^[11-13]，其执行标准收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂》第十九册（标准文号 WS3-B-3675-98），但目前大多以单一或几种成分含量为指标来表征其质量^[14-16]，存在操作繁琐、时间长、检测不全面、成本高等缺点，故有必要研究开发一种简便快捷、全面准确的含量测定方法。因此，本实验建立 HPLC 法同时测定华佗救心丸中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、蟾毒它灵、远华蟾毒精、华蟾毒它灵的含量，以期对该制剂质量进行有效控制。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2489 高效液相系统（美国 Waters 公司）；YL-060S 超声波清洗器（深圳市语路清洗设备有限公司，360 W，40 kHz）；电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；离心机（常州市万丰仪器制造有限公司）。

1.2 试剂与药物 酯蟾毒配基、华蟾酥毒基、日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、蟾毒它灵、远华蟾毒精、华蟾毒它灵对照品（纯度≥98%），均购于成都克洛玛生物科技有限公司。华佗救心丸（批号 201901、201902、201903、201904、201905），由华佗国药股份有限公司提供。乙腈购于西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；甲醇购于北京百灵威科技有限公司；乙醇购于上海润捷化学试剂有限公司；水为超纯水（美国 Pall 公司纯水机制备）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Scientific C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~2 min，20%~38% B；2~5 min，38%~56% B；5~19 min，56%~66% B；19~19.1 min，66%~20% B；19.1~20 min，20% B）；体积流量 0.6 mL/min；检测波长 296 nm；柱温 30℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取远华蟾毒精、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵对照品适量，甲醇制成 1 mg/mL 贮备液，吸取适量，甲醇稀释，即得（0.1 mg/mL）。

2.2.2 供试品溶液 取 5 批丸剂，研细，每批取约 0.3 g，精密称定，精密加入 20 mL 甲醇，室温下超声处理 20 min 后取出，冷却，甲醇补足减失的质量，振荡摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密量取“2.2”项下对照品、供试品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰与其前后峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数以蟾毒灵峰计为 3 000，其他成分对测定无干扰。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下贮备液适量于量瓶中，甲醇稀释至刻度，振荡摇匀，制成质量浓度为 5、10、25、50、100 μg/mL 的系列溶液，精密吸取适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），溶液质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

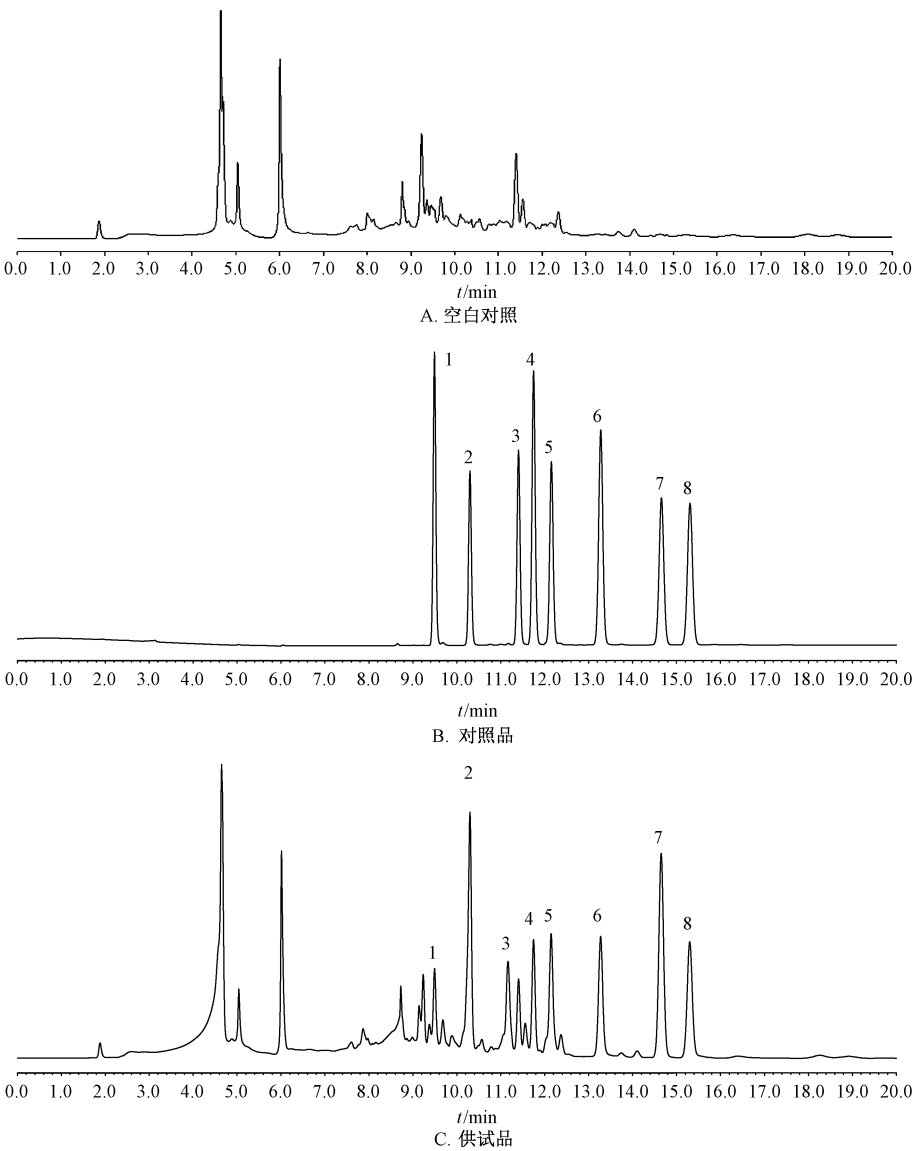
表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	
日蟾毒他灵	<i>Y</i> =12 456 <i>X</i> +1 275.3	0.999 5	5~100	
沙蟾毒精	<i>Y</i> =8 716.6 <i>X</i> +15 331	0.999 9	5~100	
远华蟾毒精	<i>Y</i> =11 021 <i>X</i> +5 727.1	0.999 6	5~100	
蟾毒它灵	<i>Y</i> =16 480 <i>X</i> +10 447	0.999 6	5~100	
华蟾毒他灵	<i>Y</i> =11 639 <i>X</i> +5 340.8	0.999 7	5~100	
蟾毒灵	<i>Y</i> =16 538 <i>X</i> +8 757.9	0.999 7	5~100	
华蟾酥毒基	<i>Y</i> =12 967 <i>X</i> +2 357.1	0.999 7	5~100	
酯蟾毒配基	<i>Y</i> =13 345 <i>X</i> +2 421.8	0.999 8	5~100	

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得日蟾毒他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒他灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积 RSD 分别为 0.41%、0.43%、0.42%、0.43%、0.41%、0.44%、0.52%、0.51%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号 201901）适量，于 2、4、6、12、24、48 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得日蟾毒他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒他灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积 RSD 分别为 0.54%、0.52%、0.45%、0.58%、0.46%、0.60%、0.65%、0.61%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取丸剂（批号 201901）适量，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶



1. 日蟾毒它灵 2. 沙蟾毒精 3. 远华蟾毒精 4. 蟾毒它灵 5. 华蟾毒它灵 6. 蟾毒灵 7. 华蟾酥毒基 8. 酯蟾毒配基
1. gamabufotalin 2. arenobufagin 3. telocinobufagin 4. bufotalin 5. cinobufotalin 6. bufalin 7. cinobufagin 8. resibufogenin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得日蟾毒他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒他灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积RSD 分别为 2.35%、3.47%、3.59%、2.84%、1.46%、1.67%、0.27%、0.49%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取丸剂（批号 201901）适量，共 6 份，加入“2.2.1”项下贮备液适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，日蟾毒他灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒他灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基平均加样回收

率 分 别 为 98.54%、95.07%、97.45%、99.58%、100.46%、102.59%、98.65%、97.61%，RSD 分别为 2.75%、2.46%、1.53%、2.81%、1.42%、1.60%、2.03%、2.19%。

2.3.7 样品含有量测定 取 5 批丸剂，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取溶剂、提取时间筛选 本实验考察了不同提取溶剂（甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇）、提取时间（10、20、40、60 min）对提取效果的影响，发现以甲醇为提取溶剂超声提取 20 min 时，

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

成分	批号				
	201901	201902	201903	201904	201905
日蟾毒它灵	1.73	1.67	2.21	2.38	2.15
沙蟾毒精	10.78	10.40	9.93	12.68	10.44
远华蟾毒精	1.55	1.48	1.47	1.89	1.65
蟾毒它灵	3.50	3.52	3.49	4.31	3.46
华蟾毒它灵	5.00	4.80	4.79	6.00	4.93
蟾毒灵	3.62	3.47	3.40	4.27	3.38
华蟾酥毒基	8.42	8.38	8.59	10.15	8.26
酯蟾毒配基	5.13	5.07	5.13	6.16	4.84

蟾蜍二烯内酯类成分提取效率最高。

3.2 色谱条件筛选 本实验考察了 Unitary C₁₈、Thermo Scientific C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 的分离效果, 发现后者更理想。然后, 考察了不同柱温 (25、30、35、40 ℃), 发现 30 ℃ 时分离效果最佳。

3.3 流动相筛选 本实验考察了 0.15% 磷酸-乙腈、0.5% 甲酸-乙腈、水-乙腈的分离效果, 发现以水-乙腈为流动相时色谱峰峰形较好, 并且为非酸性溶液, 对仪器损害较小, 并按“2.1”项下比例梯度洗脱, 此时各成分色谱峰分离度均大于 1.5, 而且峰形完整。

4 结论

本实验所采用的 HPLC 法具有简便、快速、稳定、精密度和重复性良好的优点, 能在同一色谱条件下同时测定华佗救心丸中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、日蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、蟾毒它灵、远华蟾毒精、华蟾毒它灵的含有量, 不仅能有效鉴别该制剂中蟾酥微量成分的有无, 也可对其含有量进行全面准确的检测, 以期对相关质量控制提供重要保障^[17-19]。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 277.

[2] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展[J]. 中草

药, 2014, 45(21): 3185-3189.

[3] 赵彦敏, 左其艳, 李振麟, 等. 蟾酥的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 65-69.

[4] 刘彦彦. 蟾酥药理作用研究进展[J]. 河南农业, 2014 (18): 59-60.

[5] 曲 静, 王艳春, 丛培玮. HPLC 法同时测定救心丸中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8 (10): 64-65.

[6] 张鹏伟, 江仁望, 叶文才, 等. 中华大蟾蜍蟾酥中蟾毒内酯类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 841-845.

[7] Ma H Y, Zhou J, Jiang J J, et al. The novel antidote Bezoar Bovis prevents the cardiotoxicity of toad (*Bufo bufo gargarizans* Canto) venom in mice[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(5): 417-423.

[8] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.

[9] 巩仔鹏, 陈 涛, 邓李蓉, 等. 华蟾素治疗癌痛的临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 268-271.

[10] 季 申, 王 柯, 胡 青, 等. 基于有效性和安全性相关的中药质量控制方法的建立[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2014, 16(3): 502-505.

[11] 曾万玲, 宋杰云, 曲莉莎, 等. 速效救心丸镇痛解痉的药理作用[J]. 中国社区医师, 2011, 27(41): 15.

[12] 谢大昌, 沈建平. 速效救心丸治疗冠心病心绞痛的临床研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(6): 891-893.

[13] 付 莹. 速效救心丸治疗冠心病心绞痛的研究进展[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 101-102.

[14] 陈 婷. HPLC 法同时测定蟾酥药材中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(6): 690-693.

[15] 汪元符. HPLC 同时测定干蟾皮中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基成分的含量[J]. 中国执业药师, 2015, 12(12): 25-30.

[16] 王捧英, 陈 琳, 侯芳洁, 等. HPLC 同时测定人参强心滴丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 802-805.

[17] 张 宁, 秦昆明, 金俊杰, 等. HPLC 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28 (21): 3000-3003.

[18] 刘小英, 刘 昕, 陈笑天, 等. HPLC 法同时测定不同产地蟾酥中的 5 种活性成分[J]. 中草药, 2013, 44(6): 760-762.

[19] 陈建新, 邓洁薇, 陈 红, 等. 高效液相色谱-静电场轨道阱质谱鉴定大鼠血浆中蟾蜍二烯内酯及其代谢物[J]. 分析化学, 2011, 39(12): 1858-1863.