

# 华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量测定

杨立新<sup>1</sup>, 赵海誉<sup>1</sup>, 袁圣芬<sup>2</sup>, 李亚军<sup>2</sup>, 边宝林<sup>1</sup>, 王宏洁<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 安徽金蟾生化药业有限公司, 安徽 淮北 235000)

**[摘要]** 目的: 建立华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量测定方法。方法与结果: 采用紫外分光光度法测定了华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量。测定结果为酯蟾毒配基在 6.4 ~ 32  $\mu\text{g}$  线性良好, 其回归方程为  $Y = 0.005\ 66X + 0.027\ 6$  ( $r = 0.999\ 9$ )。5 批华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量 4.62 ~ 5.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 方法简便, 重复性好, 可以作为华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分含量测定的质控方法之一。

**[关键词]** 华蟾素注射液; 总蟾毒配基; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0087-03

## Determination of Total Bufadienolides in Cinobufotalin Injection Using Ultraviolet Spectrophotometry

YANG Li-xin<sup>1</sup>, ZHAO Hai-yu<sup>1</sup>, YUAN Sheng-fen<sup>2</sup>, LI Ya-jun<sup>2</sup>, BIAN Bao-lin<sup>1</sup>, WANG Hong-jie<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Anhui Jinchan Biochemistry Company Ltd., HuaiBei 235000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To set up the determination of total bufadienolides content in cinobufotalin injection by UV. **Method:** A rapid and validated method was established for the determination of total bufadienolides in cinobufotalin injection using ultraviolet spectrophotometry. **Result:** Total bufadienolides in cinobufotalin injection were analyzed with acceptable linear regression relationship from 6.4 to 32  $\mu\text{g}$ . The regression equation was  $Y = 0.005\ 66X + 0.027\ 6$  ( $r = 0.999\ 9$ ). Five batches of cinobufotalin injection were included in the analysis. The content of total bufadienolides was from 4.62 to 5.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** A simple method with good repeatability was established, which was benefit for the quality control of total bufadienolides in cinobufotalin injection.

**[Key words]** Cinobufotalin injection; total bufadienolides; determination

华蟾素注射液系传统中药中华大蟾蜍皮经提取、精制而成, 已广泛应用于临床并被列入国家级中药保护品种。在临床上主要用于中晚期肿瘤、慢性乙型肝炎, 具有抗病毒、止痛、促进骨髓增生、增强机体免疫力等作用<sup>[1-3]</sup>。其化学成分主要含有蟾毒

配基类、蟾蜍毒素类、蟾毒色胺类、多肽类、核酸类、氨基酸类等成分。蟾毒配基类成分为华蟾素注射液的主要抗肿瘤活性成分<sup>[4-5]</sup>。多篇文献报道高效液相色谱测定华蟾素毒基及酯蟾毒配基成分的方法<sup>[6-9]</sup>, 但因华蟾素注射液中单一成分含量很低, 很难检测出, 故本文采用紫外分光光度法建立了华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量测定方法。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** T6 型新世纪紫外-可见分光光度仪(北京普析通用), METTLER TOLEDO XS 205 型天平(德国), EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

**1.2 药品** 二氯甲烷分析纯(北京化工厂), 氢氧

**[收稿日期]** 20121101(584)

**[基金项目]** 重大新药创制项目(2009ZX09103-404); 中国中医科学院自主课题(Z02063)

**[第一作者]** 杨立新, 副主任技师, 从事中药质量标准的研究, Tel: 010-64021008, E-mail: ayblcx@126.com

**[通讯作者]** \* 王宏洁, 副研究员, 从事中药质量标准的研究, Tel: 010-64011008, E-mail: wang66397@yahoo.com.cn

化钠、无水硫酸钠均为分析级(北京化工厂);蒸馏水;甲醇:色谱级 DikmaPure;华蟾素注射液:安徽金蟾生化股份有限公司提供;酯蟾毒配基对照品:供含量测定用(resibufogenin 110718-200507),由中国药品生物制品检定所提供。

## 2 方法和结果

**2.1 检测波长的优化** 华蟾素注射液中所含有的蟾毒配基类化合物,属于乙型强心苷元类化合物,其母核具有乙型强心苷元类化合物理化特性,与碱性溶液反应时,内酯环易被皂化裂解,进而生成甲酯。其紫外最大吸收波长也发生相应的红移,实验证明,酯蟾毒配基加碱后,紫外波长红移了 67 nm。华蟾素注射液加碱后,紫外波长红移了 68 nm。因此,实验结果表明,华蟾素注射液中含有乙型强心苷元类成分,并且可以该使用方法对此类成分含量进行测定。由于华蟾素注射液中的成分较复杂,因此,选定华蟾素注射液加碱后的最大吸收波长 332 nm 为检测波长。

**2.2 加碱量的优化** 取华蟾素注射液 20 mL,用二氯甲烷萃取 5 次,每次 25 mL,合并萃取液,加适量无水硫酸钠脱水,蒸干,残渣分别加入含 3% 氢氧化钠的 70% 甲醇溶液 3,4,5 mL,定量转移至 5 mL 量瓶中,并用 70% 甲醇稀释至刻度,以 70% 甲醇溶液作为空白,在 332 nm 的波长处测定,吸光度值分别为 0.560,0.572,0.569。结果表明加碱量为 4 mL 时吸光度最大,故选择加入含 3% 氢氧化钠的 70% 甲醇溶液 4 mL。

**2.3 萃取次数的优化** 取华蟾素注射液 20 mL,用二氯甲烷分别萃取 3,4,5,6 次,以含 3% 氢氧化钠的 70% 甲醇溶液作为空白,测波长为 332 nm,所测定吸光度值分别为 0.457,0.481,0.571,0.561。测定结果表明萃取次数为 5 次时,提取效率较高,故萃取 5 次。

**2.4 对照品溶液的制备和线性关系考察** 取干燥至恒重的酯蟾毒配基对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 3.20 mg 的溶液。分别精密吸取 10,20,30,40,50  $\mu\text{L}$ ,置 5 mL 量瓶中,加含 3% 氢氧化钠的 70% 甲醇溶液 4 mL,以 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,于 332 nm 的波长处测定吸光度,以对照品浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,酯蟾毒配基在 6.4 ~ 32  $\mu\text{g}$  线性良好。其回归方程为  $Y = 0.00566X + 0.0276 (r = 0.9999)$ 。

**2.5 样品测定法** 精密量取华蟾素注射液 20 mL,置分液漏斗中,用二氯甲烷萃取 5 次,每次用 25 mL。

合并二氯甲烷萃取液,无水硫酸钠 5 g 脱水,滤过,用 5 mL 二氯甲烷洗涤 3 次,滤液与洗液合并,减压回收至干。残渣含 3% 氢氧化钠 70% 甲醇溶液 4 mL 溶解,并转移置 5 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液,测定吸光度,由标准曲线计算供试品中酯蟾毒配基的量。

**2.6 稳定性试验** 取同一批样品按 2.5 项下方法制成供试品溶液,分别于配制后 0,10,20,30,60,90,120,180,240 min 时进行测定,结果的 RSD 为 0.50%,实验表明供试品溶液在 4 h 内稳定。

**2.7 精密度试验** 取同一批样品按 2.5 项下供试品溶液制备方法制备,重复测定 5 次,吸光度值 RSD 0.00%。

**2.8 重复性试验** 取同一批样品按 2.5 项下的方法平行制备样品 6 份,在所确定的测定条件下进行测定,测定结果的 RSD 2.57% < 3%,说明方法重复性良好。

**2.10 加样回收率试验** 精密量取 6 份已知含量同一批号的样品(5.25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 10 mL,分别精密加入酯蟾毒配基对照品的 70% 甲醇溶液(54  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1 mL,按 2.5 项下的方法制备及按上述条件测定,计算回收率,见表 1。

表 1 酯蟾毒配基加样回收率试验

No	样品中含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测出量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	52.59	54	105.45	97.89		
2	52.59	54	105.63	98.22		
3	52.59	54	106.35	99.56		
4	52.59	54	105.26	97.55	98.45	1.58
5	52.59	54	107.08	100.91		
6	52.59	54	104.72	96.54		

**2.11 华蟾素注射液不同批号样品测定** 按 2.5 项下法测定不同批号的华蟾素注射液中总蟾毒配基类的含量,5 批注射液样品中总蟾毒配基含量范围在 4.62 ~ 5.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,表明华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分含量差异较小。见表 2。

## 3 讨论

结果显示,华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量:4.62 ~ 5.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,按照人均临床最大剂量 20  $\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$  计算,临床每人每日总蟾毒配基类成分最大摄入量为 92 ~ 116  $\mu\text{g}$ ,远低于该类化合物的毒性剂量<sup>[14-15]</sup>。

华蟾素注射液中所含有的蟾毒配基类化合物,

表2 不同批号的华蟾素注射液样品测定  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 

批号	总蟾毒配基含量	平均值
100611	6.07	5.80
	5.53	
100612	5.23	5.07
	4.91	
100613	5.15	5.05
	4.96	
100804	4.93	4.82
	4.71	
100910	4.53	4.62
	4.72	

属于乙型强心苷元类化合物,利用化合物母核与碱性溶液反应时发生相应的红移理化特性,对其注射液中的总蟾毒配基类成分含量进行研究,系统考察了加碱用量、萃取次数等影响因素,研究数据为该类药物总含量的研究提供了有益的参考。

华蟾素注射液是以中华大蟾蜍阴干全皮为主要原料而制成的中药制剂。其中脂溶性蟾毒配基类成分是广泛认可的抗肿瘤活性成分。但研究发现该类化合物也有一定的毒性,以心脏毒性最为严重<sup>[10-13]</sup>。因此,在多种蟾毒配基类化合物对照品较难获得的现实情况下,建立一种简便快捷的总蟾毒配基类的含量测定方法对于提升华蟾注射液的质量控制具有一定的实际意义。

#### [参考文献]

- [1] 韩鸿彬,陈嘉勇.华蟾素抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2005,12(2):160.
- [2] 张婷素,山广志.华蟾素持续动脉灌注联合栓塞治疗原发性肝癌32例[J].肿瘤学杂志,2011,17(7):557.
- [3] 王双双,翟笑枫,李柏.华蟾素注射液对不同体质荷瘤大鼠肿瘤生长的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(8):1101.
- [4] 徐瑞成,陈小义,陈莉,等.蟾蜍灵诱导白血病HL-60细胞分化及相关基因表达[J].中草药,2002,33(2):151.

- [5] 彭贝,巩仔鹏,陈涛.华蟾素注射液治疗肝癌的基础和临床研究进展[J].药物评价研究,2011,32(1):63.
- [6] 王卫锋,罗红锁,李捷.高效液相色谱法测定华蟾素片中蟾毒配基和脂蟾毒配基含量[J].中国药业,2010,19(10):36.
- [7] 刘丹,祝林,奉建芳.蟾酥中蟾毒配基类成分的分离纯化及其体外抗肿瘤活性的研究[J].中成药,2010,32(6):940.
- [8] 杨世高,汪维云.华蟾素分散片质量标准研究[J].安徽农业大学学报,2009,36(4):598.
- [9] 张振海,王晋艳,陈彦.不同品种及产地蟾皮中抗肿瘤活性成分含量比较[J].中华中医药杂志,2011,26(11):2698.
- [10] 于垂亮,侯惠民.蟾毒它灵体内外抗肿瘤作用的研究第卷第[J].中草药,2010,41(10):1683.
- [11] Kamano Y, Kotake A, Hashima H, et al. Structure-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides [J]. Bioorgan Med Chem, 1998, 6(7), 1103.
- [12] Bick R J, Poindexter B J, Sweney R R, et al. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than Na, K-ATPase blocking [J]. Life Sci, 2002, 72(6), 699.
- [13] Barrueto F, Kirrane B M, Cotter B W, et al. A Systematic Review of Cardioactive Steroid Poisoning [J]. J Med Toxicol, 2006, 2(4), 152.
- [14] Min Ye, Hui Guo, Hongzhu Guo, et al. Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. J Chromatography B, 838(2006)86.
- [15] 马宏跃,段金殿,周婧,等.基于人体等效剂量的蟾酥量-效关系探讨[J].中国临床药理学与治疗学,2009,(6):655.

[责任编辑 顾雪竹]