

HPLC 测定不同种蟾皮药材中不同部位蟾蜍噻啉的含量

王宏洁, 赵海誉, 司南, 边宝林, 杨立新*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对不同种蟾皮不同部位中蟾蜍噻啉的含量进行了比较研究。方法: 采用高效液相色谱法测定了不同种蟾皮中不同部位蟾蜍噻啉的含量。样品中蟾蜍噻啉峰通过与对照品进行 HPLC-DAD 3D 及 HPLC-MS-MS 比对分析进行了确定。提取方法通过正交试验确定为 50 倍量 50% 甲醇超声 60 min。样品分析选用了 Wondsil™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (6:94) 为流动相, 检测波长 226 nm。结果: 该方法具有良好的线性 ($r = 0.9997$)、精密性 (RSD, 0.59%)、稳定性 (RSD, 0.72%) 和重复性 (RSD, 1.56%); 平均加样回收率为 98.57%, RSD 为 2.03%, 表明该方法准确可靠。经测定, 中华大蟾蜍与黑框蟾蜍不同部位均含有蟾蜍噻啉成分, 含量为 0.07% ~ 0.17%。结论: 蟾蜍噻啉在不同种蟾皮药材中的不同部位含量差异不大。

[关键词] 中华大蟾蜍; 黑框蟾蜍; 蟾蜍噻啉; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0066-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.017 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1706.017.html>

Determination of Bufothionine in Different Parts from Two Species of Toad Skin Using HPLC

WANG Hong-jie, ZHAO Hai-yu, SI Nan, BIAN Bao-lin, YANG Li-xin*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To determine bufothionine in different parts of the dried toad skin from two species. **Method:** A quantification method was developed by HPLC with photodiode array (PDA) detection. Bufothionine was identified unambiguously by HPLC-DAD 3D and HPLC-MS-MS analysis in comparison with reference standard. The extraction method was optimized as 50 times 50% MeOH ultrasonic 60 min. The analysis was performed on Wondsil™ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with ACN-H₂O (6:94) as mobile phase and detection wavelength was at 226 nm. **Result:** The samples were analyzed with good linear regression relationship ($r = 0.9997$), precisions (RSD, 0.59%), repeatability (RSD, 1.56%), stability (RSD, 0.73%) and recovery (98.57%; RSD, 2.03%). Bufothionine was detected in different parts of toad skin from *Bufo gargarizans cantor* and *Bufo melanostictus* Schneider. The contents were from 0.07% to 0.17%. **Conclusion:** The content of bufothionine revealed no significant differences among the different parts in these two species of toad skin.

[Key words] bufothionine; HPLC; quantification; toad skin

[收稿日期] 2012-02-06

[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] 王宏洁, 副研究员, Tel: 010-64021008, E-mail: wang66397@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 杨立新, 副主任技师, Tel: 010-64011008, E-mail: ayblex@126.com

蟾皮具有清热解毒、利水消胀之功效, 主要含有多种化学成分^[1-3], 如脂溶性蟾毒配基类成分、生物碱类、氨基酸类等。目前, 对蟾皮药效作用研究多于化学成分的研究。本文采用高效液相色谱法, 对中华大蟾蜍、黑框蟾蜍蟾皮不同部位中活性成分蟾蜍噻啉的含量进行比较, 为临床合理用药提供可靠研究依据。

1 材料

安捷伦 1100 HPLC 色谱仪, Agilent 6410 液相色谱质谱联用仪, KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), T6 新世纪紫外扫描仪(北京普析通用仪器公司), 蟾蜍噻啉对照品(含量 98% 以上, 自制), 中华大蟾蜍皮样品(金蟾生化药业有限公司提供), 黑框蟾蜍皮样品(市售)。乙腈、甲醇(DikmaPure), 高纯水(自制)。药材经中国中医科学院中药研究所李军德副研究员鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* Cantor. 和黑框蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider. 的干燥全皮。

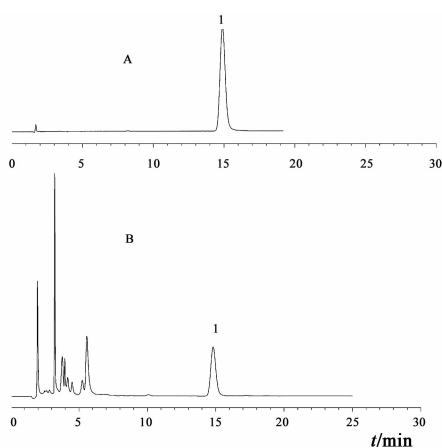
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Wondsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(6:94)为流动相, 检测波长为 226 nm, 柱温 35 °C, 理论板数按蟾蜍噻啉峰计算不低于 5 000。

2.2 干蟾皮中被测成分的确定

2.2.1 对照品紫外最大吸收波长的确定 蟾蜍噻啉对照品用 50% 甲醇溶解, 使用 HPLC-DAD 对蟾蜍噻啉对照品 200~400 nm 扫描, 结果显示 226 nm 为最大吸收, 因此选定 226 nm 为测定波长。

2.2.2 HPLC-DAD 方法确定 经 HPLC-DAD 分析, 在紫外波长 226 nm 检测条件下, 样品色谱图中的被测峰, 与蟾蜍噻啉对照品的出峰时间相同。且对照品与样品中蟾蜍噻啉峰的 3D 光谱相同, 因此, 初步确定样品中所测定的化学成分即为蟾蜍噻啉, 见图 1。



1. 蟾蜍噻啉

图1 对照品(A)及蟾皮药材(B)HPLC图

2.2.3 HPLC-MS-MS 方法的确定 经过 HPLC-MS-MS 分析, 在紫外波长 226 nm 检测条件下, 样品色谱图中的被测峰, 与蟾蜍噻啉对照品的出峰时间相同, 且其相对分子量与蟾蜍噻啉对照品相同。再将被测

峰进行二级质谱检测, 发现样品中被测峰裂解的分子离子碎片与蟾蜍噻啉对照品裂解的分子离子碎片相同, 因此, 确定样品中所测定的化学成分即为蟾蜍噻啉。

2.3 供试品溶液制备方法考察

2.3.1 样品提取方法的选择 根据文献报道及噻啉化学成分的理化特性, 提取方法选择了加热提取与超声提取两种方法, 结果分别为 0.068%, 0.069%, 由于试验数据相差不大, 且超声提取较加热提取方法快捷, 并可以减少操作步骤, 提高试验的准确性, 因此最终选定超声提取的方法提取样品。

2.3.2 样品提取条件的正交设计 根据噻啉对照品为水溶性的理化特性, 提取溶媒选用水、20% 甲醇、50% 甲醇, 提取时间进行了 30, 45, 60 min, 对溶剂使用倍数 25, 50, 100 倍等提取条件进行了正交试验设计进行了考察。正交试验设计见表 1。

表1 正交试验设计

水平	A 提取溶剂	B t/min	C 溶剂/倍
1	水	30	25
2	20% 甲醇	45	50
3	50% 甲醇	60	100

正交试验结果显示, 样品的提取率以 A₃B₃C₁ 的条件最佳, 其中 C₁ 与 C₂ 的提取率也相差不大, 为了保证测定的完全、准确。最终选定提取条件为 A₃B₃C₂。即以 50% 甲醇为提取溶媒, 提取使用倍数为 50 倍, 超声提取 60 min。

2.4 样品的提取处理方法 精密称取本品细粉约 1.0 g, 置 100 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 60 min, 放至室温, 补充减失质量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过即得。

2.5 线性关系考察 精密称取蟾蜍噻啉对照品, 用 50% 甲醇配制成质量浓度为 1.6 g·L⁻¹ 的浓溶液, 摇匀。精密吸取 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取 5 μL 注入高效液相色谱仪, 测定, 回归方程 Y = 6 945.3X + 82.3 (r = 0.999 4), 线性范围 0.041 2 ~ 0.824 0 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 重复测定 5 次, 进行精密度试验, 结果 RSD 0.59%。

2.7 稳定性试验 按供试品溶液方法制备, 室温下自然放置, 于 0, 2, 4, 6, 20, 24 h 测定, RSD 0.72%。可见样品溶液中蟾蜍噻啉的含量至少在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 分别精密称取 6 份,按照上述样品的提取处理方法,对样品进行提取处理,结果表明 RSD 1.56%,该方法有良好的重复性。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取已知含量同一批号的样品 6 份,分别精密加入对照品溶液(7.60 mg · L⁻¹)50 mL,按正文供试品溶液的制备方法制备及上述色谱条件,测定,按下式计算回收率,结果平均回收率为 98.57%,RSD 2.03%,见表 2。

表 2 蟾皮中蟾蜍噻啉的加样回收率试验

No.	称样量 /g	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.358 3	0.380 0	0.743 6	101.38		
2	0.354 8	0.380 0	0.730 7	98.92		
3	0.355 6	0.380 0	0.733 3	99.40		
4	0.356 4	0.380 0	0.733 4	99.23	98.57	2.03
5	0.352 9	0.380 0	0.719 0	96.34		
6	0.349 9	0.380 0	0.715 2	96.13		

2.10 不同种干蟾皮中蟾蜍噻啉的含量 按样品的提取处理方法测定不同种干蟾皮的含量见表 3。

表 3 干蟾皮中蟾蜍噻啉测定 %

药材	不同部位	蟾蜍噻啉 %
中华大蟾蜍	后腿	0.17
	背部	0.16
	腹部	0.15
	前腿	0.15
黑框蟾蜍	后腿	0.10
	背部	0.08
	腹部	0.07
	前腿	0.08

3 讨论

蟾蜍噻啉属水溶性成分,根据其极性较大理化特性,本文在提取时优选了水、20%、50% 甲醇 3 种溶媒进行了提取条件的正交试验,根据实验结果选定提取条件 A₃B₃C₂ 为最佳提取条件。即以 50% 甲醇为提取溶媒,提取使用倍数为 50 倍,超声提取 60 min。

根据有关文献报道,蟾皮中水溶性成分主要为生物碱类、氨基酸类及肽类等,通过对蟾皮中生物碱蟾蜍噻啉的含量测定显示,蟾蜍噻啉在蟾皮中的质量分数为 0.17% ~ 0.07%,以中华大蟾蜍中的含量较高,黑框蟾蜍中较低。

文献报道蟾蜍噻啉体外抗肿瘤试验抑制率为 87.06%^[4-5]。为蟾皮中极性较大的活性成分。根据以上实验数据表明,中华大蟾蜍、黑框蟾蜍药材中均含有蟾蜍噻啉成分,且蟾蜍噻啉均匀分布在药材蟾皮中的各个部位。

[参考文献]

- [1] 曹徐涛,王东,王娜,等. 蟾皮中蟾毒配基类成分的分
离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(10):778.
- [2] 代丽萍,高慧敏,王智民,等. 蟾皮化学成分的分
离与结构鉴定[J]. 药学学报,2007,42(8):858.
- [3] 杨立宏,张豁中,张冰. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究
[J]. 药学学报,1992,27(9):679.
- [4] 曾洋,张爱军,文筱. 干蟾皮的研究进展[J]. 中国医
药科学,2011,1(15):29.
- [5] 代丽萍,王智民,高慧敏. 蟾皮和华蟾素注射液中蟾
蜍噻啉含量测定[J]. 中国中药杂志,2007,32
(3):222.

[责任编辑 蔡仲德]