

正交法优化蟾酥酒炮制工艺

袁旭江¹, 袁梦泓¹, 沈嘉茵², 裘建社^{3*}

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 深圳市妇幼保健院, 广东 深圳 518000;
3. 广东博罗先锋药业集团, 广东 惠州 516100)

〔摘要〕 目的: 对蟾酥进行酒炮制工艺研究, 筛选最佳炮制工艺。方法: 采用正交法进行酒炮制工艺研究, 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总保留率为指标, 运用高效液相色谱指纹图谱法进行含量分析。结果: 各因素对酒制工艺影响大小顺序为炮制时间 > 炮制温度 > 药辅质量比例, 炮制时间具有显著影响, 且蟾酥经酒炮制后化学成分存在降低现象。蟾酥酒炮制最佳工艺为: 乙醇浓度为 55%, 药辅比为 1:2, 在 60 ℃ 下炮制 12 h。结论: 本方法稳定, 操作简便, 为进一步制订蟾酥酒炮制规范化工艺提供依据和基础。

〔关键词〕 蟾酥; 高效液相色谱法; 正交设计; 炮制

〔中图分类号〕 R 283.6 〔文献标识码〕 B 〔文章编号〕 1005-9903(2010)06-0046-04

Wine-processed Techniques of Venenum Bufonis by Orthogonal Designed Method

YUAN Xu-jiang¹, YUAN Meng-hong¹, SHEN Jia-yin², QIU Jian-she^{3*}

(1. Chinese Materia Medica R&D Institute of of Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 510006, China;
2. Shenzhen MCH hospital, Shengzhen 518000, China;
3. Guangdong Boluo Pioneer Medicinal Group Co., LTD, Huizhou 516100, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the wine-processed techniques of venenum bufonis and screen out the optimum processing technique. **Method:** The orthogonal test was applied to study the wine-processed techniques. HPLC fingerprint was used to determine the total retention rate of cinobufagin and resibufogenin. **Result:** Relative importance of factors affecting wine-processed techniques were as follow: processing time > processing temperature > ratio of botanical and auxiliary materials. The processing time had a remarkable effect. Chemical compositions decreased after venenum bufonis was processed by wine. The optimum processing technique was that venenum bufonis was processed at 60 ℃ by 55% ethanol and ratio of 1:2 for 12 h. **Conclusion:** The method is steady with a simple operation and can provide a basis to set up a standardized wine-processed technique of venenum bufonis.

〔Key words〕 Venenum Bufonis; HPLC; orthogonal design; processing

蟾酥的应用始载于唐代的《药性论》, 在《中华人民共和国药典》2005 年版一部中明确记载了蟾酥

为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥而成^[1]。蟾酥具有明显的强心、止痛、解毒、抗肿瘤等作用, 早已引起国内外的广泛关注, 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基既是有毒成分^[2-4] 又是活性成分^[5-6], 近年来多将其作为蟾酥质量控制的主要指标。由于蟾酥生品有毒, 入药需经炮制, 蟾酥传统炮制品有酒制、乳制、滑石粉煨制等多个品种^[7-8], 而现代应用最多的蟾酥炮制方法为酒制, 《中华人民共和国药典》规定酒制及其炮制

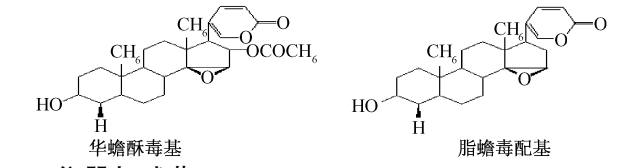
〔收稿日期〕 20100128(006)

〔基金项目〕 广东省中医药管理局(1060042)

〔第一作者〕 袁旭江, 助理研究员, 医学硕士, 从事中药新药及其质量研究, Tel: (020) 35392540, E-mail: xjyuan.xj@163.com

〔通讯作者〕 * 裘建社, 高级工程师, 从事中药制剂研究, Tel: (0752) 6317886, E-mail: qiujs888@126.com

比例^[1],但鲜见系统全面蟾酥酒炮制工艺报道,缺乏具体规范的酒炮制工艺。为此,笔者采用正交设计法,以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基主要成分总保留率为指标,对蟾酥进行细致全面的酒炮制工艺研究,优选蟾酥酒炮制工艺,为蟾酥酒炮制工艺的规范化提供基础和依据。



1 仪器与试剂

BS124S 电子分析天平(德国 Sartorius),BP211 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius),电动恒温水浴锅(上海一恒电子仪器厂),Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国)。华蟾酥毒基对照品(中国药品生物制品检定所,批号 803-9202)、脂蟾毒配基对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110718-200507);乙醇、磷酸为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,水为三蒸水。蟾酥药材收集了 4 批,经鉴别均为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *B. gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液。

2 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基检测方法建立

本实验采用高效液相色谱法,以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总保留率为检测指标,对蟾酥酒炮制前后样品进行分析检测,并计算。计算公式:总保留率% = 炮制后总含量/炮制前总含量 × 100%。

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈 - 0.01% H₃PO₄ 溶液(55:45),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 296 nm。

2.2 对照品的制备 对照品经五氧化二磷低温真空干燥 24 h 后,精密称取适量,用甲醇溶解定容,分别制成华蟾酥毒基浓度为 0.024 2 mg·mL⁻¹、脂蟾毒配基浓度为 0.026 6 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 2,4,6,8,10,15,20 μL,分别注入高效液相色谱仪,以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得华蟾酥毒基的回归方程为 $Y = 6.36 \times 10^2 X + 1.14$, $r = 0.999\ 9$,在 0.048 4 ~ 0.484 μg 线性关系良好;脂蟾毒配基的回归方程为 $Y = 8.26 \times 10^2 X - 0.69$, $r = 0.9999$,在 0.0532 ~ 0.532 μg 线性

关系良好。

2.4 供试品溶液的制备 取样品粉末约 25 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 20 mL,称重,置水浴锅上加热回流提取 1 h,放冷,称重,补足甲醇

2.5 系统适用性试验 按 2.1 项下的色谱条件进行测定,华蟾酥毒基和脂蟾毒配基色谱峰的理论塔板数均不低于 6 600,对称因子均大于 0.96,色谱峰分离度达到 1.2 以上,各成分紫外吸收光谱一致。供试品和对照品高效液相色谱图见图 1。

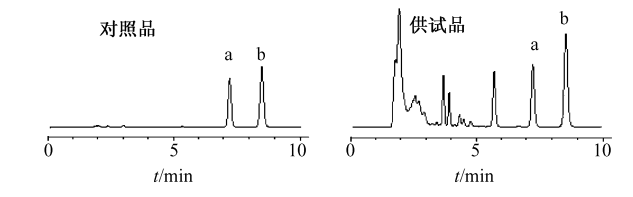


图 1 供试品和对照品高效液相测定色谱图
a. 华蟾酥毒基;b. 脂蟾毒配基

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液连续进样测定 6 次,结果显示华蟾酥毒基峰面积及脂蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 0.20% 和 0.22%,表明精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2,4,6,12,24 h 进样测定,结果显示华蟾酥毒基和脂蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 0.35% 和 0.36%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品 6 份,按供试品制备方法进行制备样品溶液,进样,分析,结果显示,华蟾酥毒基峰面积及脂蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 0.46% 和 0.76%,表明重现性良好。

2.9 回收率试验 称取已知含量的同一批蟾酥样品 6 份,每份约 5.0 mg,精密称定,分别精密加入华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品溶液适量,按供试品溶液制备方法进行提取,测定,分析。结果见表 1。

3 蟾酥炮制工艺

3.1 正交因素水平设计 本实验先用 55% 乙醇为酒炮制辅料进行炮制研究。由于蟾酥酒炮制工艺影响因素较多,根据预试结果,选用最主要的影响因素:药辅比例、炮制时间(h)、炮制温度(℃)3 个因素进行工艺考察,并设计各因素水平。见表 2。

3.2 正交试验考察 根据正交设计因素表,按正交法表进行设计和试验,见表 3。

炮制方法:按正交设计表分别取蟾酥(产地河北)粉末,每份约 10 g,按比例加入 55% 乙醇,拌匀,

在设定温度下水浴加热炮制,不断搅拌,炮制至规定时间后取出,干燥,粉碎,置干燥器中,备用。

表 1 加样回收实验 (n = 6)

成分	样品含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 /%	RSD /%
华蟾酥	0.279 0	0.311 0	0.592 5	100.8		
毒基	0.243 7	0.311 0	0.560 0	101.7		
	0.244 7	0.311 0	0.557 8	100.7	101.2	0.77
	0.244 2	0.311 0	0.562 1	102.2		
	0.250 6	0.311 0	0.562 1	100.2		
	0.251 6	0.311 0	0.568 0	101.7		
脂蟾毒	0.191 6	0.190 0	0.383 5	101.0		
配基	0.167 4	0.240 0	0.411 9	101.9		
	0.168 1	0.240 0	0.413 1	102.1		
	0.167 8	0.240 0	0.413 4	102.3	102.0	0.92
	0.172 1	0.240 0	0.414 3	100.9		
	0.172 8	0.240 0	0.420 7	103.3		

表 2 蟾酥炮制正交试验因素水平

水平	A 药辅质量比例	B 炮制时间/h	C 炮制温度/℃
1	1:3	12	25
2	1:2	24	60
3	1:1.25	48	85

表 3 蟾酥炮制正交试验设计

No.	A	B	C	D	华蟾酥毒 基/%	脂蟾毒 配基/%	总保留 率/%
1	1	1	1	1	92.31	81.14	88.76
2	1	2	2	2	89.16	78.72	85.84
3	1	3	3	3	84.75	66.91	79.08
4	2	1	2	3	92.74	81.74	89.24
5	2	2	3	1	89.29	77.54	85.55
6	2	3	1	2	85.25	74.31	81.77
7	3	1	3	2	89.03	78.24	85.60
8	3	2	1	3	84.15	73.77	80.85
9	3	3	2	1	91.20	79.71	87.55
K ₁	84.56	87.87	83.79	87.29			
K ₂	85.52	84.08	87.54	84.40			
K ₃	84.67	82.8	83.41	83.06			
R	0.96	5.07	4.13	4.22			

3.3 正交试验结果及分析 分别对正交试验制得的蟾酥炮制品进行含量测定,计算总保留率,并进行方差分析(结果见表 3,4)。结果显示,各因素对酒制工艺影响顺序为 $B > C > A$,其中因素 B 具有显著影响。由表 3 可知,蟾酥酒炮制最佳工艺为 $A_2B_1C_2$,即加入 2 倍于蟾酥质量的 55% 乙醇,在 60 ℃ 下炮制 12 h,即得。

表 4 蟾酥酒炮制正交试验方差分析

因素	SS	f	F	P
A	1.661	2	1.000	<0.05
B	41.648	2	25.074	
C	31.294	2	18.840	
误差	1.66	2		

$F_{0.05} = (2, 2) = 19$

3.4 最佳炮制工艺优化 根据工艺简单、低成本原则,进一步对影响较大的炮制时间进行优化研究,同时也进一步优化乙醇浓度的影响情况。

3.4.1 炮制时间优化 进一步对最佳炮制工艺中的炮制时间进行单因素优化比较。取蟾酥药材适量,按药辅比 1:2 加入 55% 乙醇,在 60 ℃ 下分别炮制 6,9,12,13,14 h。对炮制品进行测定分析,结果可知,炮制时间越久,总保留率越高,当炮制时间达 12 h 后,总保留率呈下降趋势,表明蟾酥的最佳炮制时间是 12 h,见表 5。

表 5 炮制时间优化 (n = 3)

炮制时间 /h	华蟾酥毒基保留率 /%	脂蟾毒配基保留率 /%	总保留率 /%
6	84.04	77.26	81.88
9	88.64	79.98	85.89
12	91.32	80.30	87.82
13	89.99	79.35	86.61
14	88.01	78.94	85.12

3.4.2 乙醇浓度优化 进一步对炮制用乙醇浓度进行优化。取蟾酥药材适量,分别按药辅比 1:2 加入不同浓度(25%,38%,55%,60%,75%)的乙醇,在 60 ℃ 下进行炮制 12 h。对炮制品进行测定分析,结果表明仍以 55% 乙醇炮制所得总保留率最高,见表 6。

表 6 乙醇体积分数优化 %

乙醇	华蟾酥毒基保留率	脂蟾毒配基保留率	总保留率
25	77.54	69.06	74.84
38	83.76	74.80	80.92
55	85.84	75.08	82.42
60	75.75	67.41	73.10
75	80.90	71.76	78.00

3.5 最佳试验验证 通过对工艺优化可知,蟾酥最佳酒炮制工艺为加入 2 倍于蟾酥质量的 55% 乙醇,在 60 ℃ 下炮制 12 h。为了进一步验证工艺的稳定性,分别取 4 批药材(产地分别为河北、山东、河南、山东临沂)进行酒炮制工艺重现性验证,按照优选的最佳工艺进行炮制,每个平行操作 3 份。结果显示,4 批蟾酥炮制后华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总保留率平均值分别 82.28% (河北),80.56% (山东 1),81.52% (山东 2),78.49% (河南)。可见,蟾酥酒炮制最佳工艺具有良好的稳定性和重现性。同时提示蟾酥经最佳酒炮制工艺炮制后,蟾酥中有效成分保留率均有所下降,降低率在 20% 左右。

4 结论与讨论

由于蟾酥毒性较大,临床用药必先炮制,其炮制方法很多^[6],2005 年版药典规定用酒炮制,药辅比例为 1:2,但对于乙醇浓度、炮制温度和炮制时间没有具体的规定。前期试验表明^[9],乙醇浓度对蟾酥有效成分具有一定的影响,由于市售白酒乙醇浓度在 55 度左右,故本研究先以 55% 乙醇为辅料进行研究,筛选出最佳的蟾酥酒炮制工艺,并进一步优化乙醇浓度和炮制时间。结果显示,蟾酥酒炮制最佳工艺为加入 2 倍量 55% 乙醇于 60 ℃ 下炮制 12 h。可见,工艺中药辅重量比例为 1:2,与《中国药典》蟾酥炮制项下的药辅比例要求一致。并近一步对最佳工艺进行 4 批药材验证,结果表明,该炮制工艺具有良好的稳定性和重现性。曾用 2005 年版《中国药典》中蟾酥含量测定项下流动相进行测定,由于缓冲盐溶液对色谱柱伤害较大,不利于色谱柱的长时间稳定测定,故对流动相进行优化,采用乙腈-0.01% H₃PO₄ 溶液进行检测,样品中色谱峰塔板数高,无干扰,分离效果较好,且色谱峰保留时间稳定性较好。评价指标选择方面,华蟾酥毒基和脂蟾毒配基是蟾酥药材所含成分中含量最大的 2 个,既是有效成分,

也是有毒副作用的成分^[2,4],且《中国药典》评价蟾酥质量^[1]也是以此 2 个成分为主,故本研究以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基最为评价指标具有一定的代表性。

曾分别以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基成分含量作单指标直观分析,以华蟾酥毒基保留率进行方差分析,因素 B (即炮制时间)对蟾酥酒炮制工艺由显著性影响 ($P < 0.05$),以脂蟾毒配基保留率进行方差分析,则各因素未见显著差异。以 2 个有效成分含量总保留率进行方差分析,结果显示因素 B 对蟾酥酒炮制工艺具有显著影响。由于华蟾酥毒基和脂蟾毒配基均为蟾酥的主要活性成分,含量最高,以 2 个成分含量总保留率进行评价应比单一成分保留率评价更为可信,因此,本试验以两有效成分总保留率作为指标进行评价。

本研究结果还提示,蟾酥经酒炮制后 2 个有效成分含量均呈现减低趋势(约降低 10% ~ 20%),这是否与蟾酥酒炮制减毒机制有关有待进一步研究。本实验方法稳定,重复性好,易于控制,为蟾酥酒炮制工艺的规范化提供基础和依据,也为进一步探讨蟾酥炮制减毒机制奠定基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 265.

[2] 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1992: 311.

[3] 钱伟平. 蟾酥对实验动物循环系统毒副作用的研究[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(6): 46.

[4] 龚岳亭. 生物活性肽[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 161.

[5] 付兰, 何树芸, 潘德敏. 蟾酥不同炮制品蟾毒内酯的含量测定[J]. 中药材, 1990, 13(2): 25.

[6] 郝继亨. 蟾酥现代药理研究进展[J]. 中国医药报, 2004, 9: 23.

[7] 杨祖山, 王宁. 蟾蛤的药用和炮制[J]. 基层中药杂志, 1995, 9(4): 11.

[8] 王志巍, 王力, 李玉山, 等. 蟾酥的炮制方法探讨[J]. 中医药学报, 1994, 1: 43.

[9] 袁旭江, 沈嘉茵, 朱盛山. 不同提取方法对蟾酥有效成分的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(65): 66.

[责任编辑 顾雪竹]