

· 化学与分析 ·

产地加工和炮制对蟾酥药材及饮片质量的影响

曲婷^{1,2,3}, 陈两绵^{1,2}, 高慧敏^{1,2*}, 王智民^{1,2}, 张启伟^{1,2}, 程翼宇³

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;
3. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 评价不同干燥和炮制方法对蟾酥药材及饮片质量的影响。方法: 每 20 g 鲜蟾酥分别采用下列干燥方法处理: 105 °C 烘干, 80 °C 烘干, 60 °C 烘干, 60 °C 减压干燥, 冷冻干燥; 同一干蟾酥药材采用酒制和乳制两种炮制方法制备相应饮片; HPLC 法测定干蟾酥及其炮制品中 5 种吲哚生物碱和 5 种蟾毒配基的含量。结果: 不同干燥方法得到的蟾酥 5 种生物碱总含量依次为 17.57% ± 0.15%, 20.01% ± 0.45%, 19.99% ± 0.68%, 19.85% ± 0.25%, 20.12% ± 0.27%; 5 种蟾毒配基的总含量依次为 19.91% ± 0.17%, 20.20% ± 0.17%, 19.96% ± 0.06%, 20.24% ± 0.17%, 21.05% ± 0.13%。炮制前、酒制和乳制后蟾酥中吲哚生物碱总含量分别为 15.62% ± 0.29%, 15.77% ± 0.24%, 15.78% ± 0.27%; 蟾毒配基总含量分别为 20.69% ± 0.17%, 20.74% ± 0.09%, 22.12% ± 0.21%。结论: 根据成分含量和样品外观色泽, 冷冻干燥是最优的干燥方式; 但综合考虑产地加工的相关因素(时间、成本和操作便利性等), 60 ~ 80 °C 烘干也是一种经济实用的选择; 酒制和乳制对蟾酥中 5 种吲哚生物碱和 5 种蟾毒配基类成分的含量基本无影响。

[关键词] 蟾酥; 高效液相色谱法; 吲哚生物碱; 蟾毒配基; 干燥; 炮制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0063-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1738.017.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:38

Effect of Drying and Processing Methods on the Quality of Toad Venom

QU Ting^{1,2,3}, CHEN Liang-mian^{1,2}, GAO Hui-min^{1,2}, WANG Zhi-min^{1,2}, ZHANG Qi-wei^{1,2}, CHENG Yi-yu³

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines,
Beijing 100700, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the influence on the quality of toad venom processed by different drying and processing methods. **Method:** Toad venom collected in Nantong, Jiangsu Province, was dried as follows: heated at 105 °C, heated at 80 °C, heated at 60 °C, heated at 60 °C under the reduced pressure, freeze-dried. The dried toad venom was processed with wine and milk. The content of five indole alkaloids and five bufadienolides was determined by HPLC in the different samples in order to evaluate the best drying method and compare the difference between the crude and processed toad venom. **Result:** The total content of five indole alkaloids in the samples obtained by different dryness methods was as follows: 17.57% ± 0.15%, 20.01% ± 0.45%, 19.99% ± 0.68%, 19.85% ± 0.25%, 20.12% ± 0.27%, respectively. The total content of five bufadienolides in the samples obtained by different dryness methods was as follows: 19.91% ± 0.17%, 20.20% ±

[收稿日期] 20120416(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801512); 科技部重大新药创制项目(2009ZX09308-003)和(2009ZX09301-005); 中国中医科学院自选课题(Z02073)

[第一作者] 曲婷, 天津中医药大学 2009 级硕士研究生

[通讯作者] * 高慧敏, 副研究员, 从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: huimin_gao@126.com

0.17% , 19.96% ± 0.06% , 20.24% ± 0.17% , 21.05% ± 0.13% , respectively. The total content of five alkaloids in the toad venom and its processed products with wine and milk was 15.62% ± 0.29% , 15.77% ± 0.24% , 15.78% ± 0.27% and the total content of five bufadienolides was 20.69% ± 0.17% , 20.74% ± 0.09% , 22.12% ± 0.21% , respectively. **Conclusion:** According to the total content of five indole alkaloids and five bufadienolides as well as the appearance of the sample, the freeze-dryness was regarded as the best method, however, comprehensively considering the dryness time and cost, as well as the feasibility of the operation in the production area, heating at 60-80 °C for several hours is also an alternative drying method. Processing with wine and milk has no obvious influence on the content of five indole alkaloids and five bufadienolides in toad venom.

[**Key words**] toad venom; HPLC; indole alkaloid; bufadienolide; drying method; process method

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍的干燥分泌物,为我国传统名贵中药材^[1]。蟾酥具有高活性、高毒性的特点,临床用药不当易导致中毒反应的发生。由于基源动物、产地和加工方式不同对蟾酥化学组成的影响不同^[2],系统评价鲜浆采收后的产地加工和炮制方法对蟾酥药材及饮片质量的影响至关重要。曾有学者对于干燥温度、干燥时间以及干燥介质(铜、玻璃、丙烯酸树脂、铝和不锈钢)对蟾酥中蟾毒配基类成分的影响进行评价^[3-4],但不同干燥方式对药材质量的影响尚未报道。蟾酥的传统炮制方法有酒浸、乳汁制、滑石粉烫等,已有研究表明不同炮制方法对其中蟾毒配基类成分的含量有升高或降低的改变,结论尚不统一^[5]。本实验以蟾酥中两类有效成分吲哚生物碱和蟾毒配基类为指标,采用 HPLC 进行不同干燥方法制备的干蟾酥及其炮制品中 10 种成分的含量测定,综合评价产地加工和炮制方法对蟾酥药材及饮片质量的影响。

1 仪器和试剂

Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪,包括 LC-20AT 型溶液传输单元, SIL-20A 型自动进样器, SPD-M20A 型二极管阵列检测器, LC Solution 色谱工作站(日本岛津公司);色谱甲醇和乙腈(Fisher 公司),其他试剂为分析纯,娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),红星二锅头(20110408, 56 度,北京红星股份有限公司)、三元特品鲜牛奶(20110728B, 北京三元食品有限公司)。

五羟色胺盐酸盐[阿法埃莎(天津)化学有限公司,纯度为 99%], *N*-甲基五羟色胺、*N,N*-二甲基五羟色胺、*N,N,N*-三甲基五羟色胺、日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵为鲜蟾酥中分离制备,蟾蜍噻啉为干蟾皮中分离得到,面积归一化法测定纯度(*N,N*-二甲基五羟色胺、蟾蜍噻啉、蟾毒它灵和蟾毒灵 > 98%, *N*-甲基五羟色胺 96.5%, *N,N,N*-三甲基五羟色胺 96.3%, 日蟾毒它灵 92.9%), 华蟾酥毒基(批号

110803-200605) 和酯蟾毒配基(批号 110718-200507) 购于中国药品生物制品检定所。

鲜蟾酥样品于 2009 年 8 月采于江苏南通地区,为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 耳后腺和皮肤腺分泌的白色浆液。

2 方法与结果

2.1 不同干燥方式蟾酥样品的制备 在蟾酥产地加工调研和文献分析的基础上,采用以下 5 种干燥方式处理鲜蟾酥样品。每 20 g 鲜蟾酥加适量水稀释后,过 40 目铜筛,平铺在干净的玻璃板上,分别干燥:105 °C 烘干 4 h, 80 °C 烘干 6 h, 60 °C 烘干 10 h, 60 °C 减压干燥 12 h, 冷冻干燥 42 h。每种干燥方式平行制备 3 份样品,干蟾酥得率及其外观色泽见表 1。

2.2 酒制、乳汁蟾酥样品的制备 酒制^[1]:取干蟾酥样品(80 °C 烘干)5 g,精密称定,分别加入 10 g 白酒拌匀,常温下不断搅拌至稠膏状,均匀铺在玻璃板上,放入烘箱,80 °C 干燥至固体状,研碎后过 60 目筛,放入干燥器内干燥至恒重。平行制作 2 份,酒制后干蟾酥质量为 4.16 g,得率 83.2%。

乳制^[5]:取干蟾酥样品(80 °C 烘干)5 g,精密称定,分别加入 10 g 鲜牛奶拌匀,常温下不断搅拌至稠膏状,均匀铺在玻璃板上,放入烘箱,80 °C 干燥至固体状,研碎后过 60 目筛,称重。平行制作 2 份,乳制后干蟾酥的质量为 5.38 g,得率 107.6%,扣除辅料牛奶在乳制品中所占比例之后干蟾酥的得率为 77.3%(辅料牛奶中的干物质相当于对蟾酥有一定程度的稀释作用)。

2.3 不同样品中 5 种吲哚生物碱类成分的含量 采用文献建立的 HPLC^[6]测定不同干燥方式处理的蟾酥药材及其炮制品中 5 种吲哚生物碱的含量,对照品和典型样品的 HPLC 图见图 1,不同干燥方式制备蟾酥样品中 5 种生物碱的含量见表 2,炮制前后蟾酥样品中 5 种生物碱的含量见表 3。

表 1 不同干燥方法制备的干蟾酥样品得率和外观色泽($\bar{x} \pm s, n=3$)

干燥方式	湿重/g	干重/g	干蟾酥得率/%	平均得率/%	干燥前	干燥后
105 °C 烘干	20.17	5.33	26.43	26.31 ± 0.76	白色	深黄色
	21.04	5.68	27.00			
	21.65	5.52	25.50			
80 °C 烘干	20.43	5.03	24.62	23.72 ± 1.30	白色	黄色
	20.70	5.03	24.30			
	20.29	4.51	22.23			
60 °C 烘干	20.21	5.44	26.92	26.34 ± 0.59	白色	黄色
	20.08	5.17	25.75			
	20.03	5.28	26.36			
减压干燥	20.49	5.96	29.09	28.66 ± 1.92	白色	浅黄色
	20.08	6.09	30.33			
	20.25	5.38	26.57			
冷冻干燥	20.36	5.70	28.00	27.43 ± 0.97	白色	白色
	20.11	5.63	28.00			
	20.45	5.38	26.31			

表 2 不同干燥方法制备蟾酥样品中 5 种吲哚生物碱的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

干燥方式	五羟色胺	N-甲基 五羟色胺	N,N-二甲 基五羟色胺	N,N,N-三甲 基五羟色胺	蟾蜍噻啉	总含量
105 °C 烘干	4.76 ± 0.05	3.72 ± 0.09	2.47 ± 0.10	6.62 ± 0.08	-	17.57 ± 0.15
80 °C 烘干	5.88 ± 0.06	4.18 ± 0.09	2.90 ± 0.19	7.05 ± 0.23	-	20.01 ± 0.45
60 °C 烘干	6.04 ± 0.14	4.22 ± 0.23	2.81 ± 0.18	6.91 ± 0.19	-	19.99 ± 0.68
60 °C 减压	5.97 ± 0.07	4.78 ± 0.07	2.58 ± 0.09	6.52 ± 0.09	-	19.85 ± 0.25
冷冻干燥	6.08 ± 0.08	4.82 ± 0.09	2.58 ± 0.06	6.64 ± 0.11	-	20.12 ± 0.27

注: - 表示低于定量限(表 3 同)。

表 3 干蟾酥炮制前后样品中 5 种吲哚生物碱的含量($\bar{x} \pm s, n=2$)

样品	五羟色胺	N-甲基 五羟色胺	N,N-二甲 基五羟色胺	N,N,N-三甲 基五羟色胺	蟾蜍噻啉	总含量	折合含量
炮制前	4.31 ± 0.04	3.49 ± 0.06	1.79 ± 0.07	6.03 ± 0.15	-	15.62 ± 0.29	/
酒制	4.25 ± 0.08	3.57 ± 0.11	1.73 ± 0.03	6.22 ± 0.06	-	15.77 ± 0.24	/
乳制	3.06 ± 0.04	2.99 ± 0.06	1.31 ± 0.03	4.84 ± 0.12	-	12.20 ± 0.21	15.78 ± 0.27

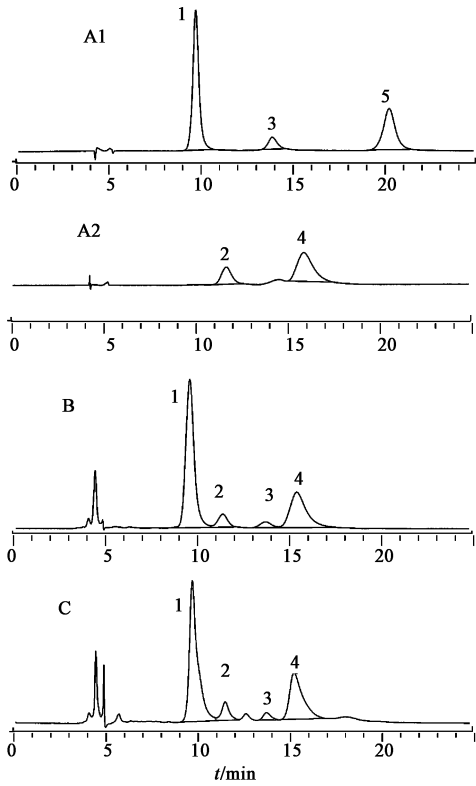
注:折合含量表示扣除了乳制品中辅料牛奶对蟾酥的稀释作用之后的各成分总含量(表 5 同)。

色谱条件 Nucleosil C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Macherey-Nagel),流动相乙腈-0.5% 磷酸二氢钾水溶液(6:94,磷酸调 pH 3.2),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 275 nm,柱温 30 °C。

对照品溶液的制备 精密称取五羟色胺、N-甲基五羟色胺、N,N-二甲基五羟色胺、N,N,N-三甲基五羟色胺和蟾蜍噻啉适量,甲醇溶解、稀释、定容得质量浓度依次为 39.8,38.9,37.2,41.0,33.6 mg·L⁻¹的对照品溶液。

供试品溶液的制备 取样品粉末(60 目筛)约 25 mg,精密称定,置锥形瓶中,加入 50% 乙醇 20 mL,称重,超声提取 20 min,取出,放冷,再称重,50% 乙醇补足减失的质量,提取液离心 15 min(4 000 r·min⁻¹),上清液过 0.22 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.4 不同样品中 5 种蟾毒配基类成分的含量 采用文献建立的 HPLC^[6]测定不同干燥方式处理的蟾酥药材及其炮制品中 5 种蟾毒配基类成分的含量,

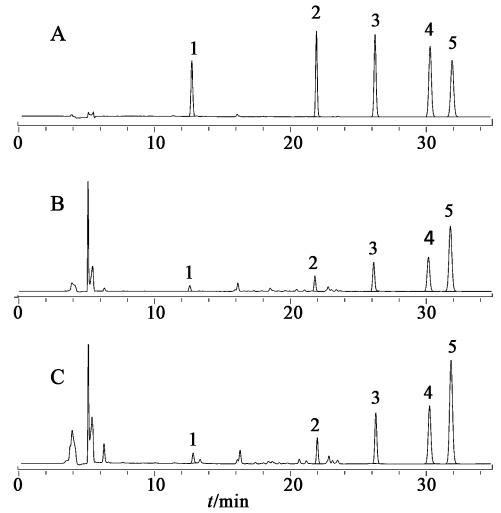


A1, A2. 对照品; B. 80 °C 烘干样品; C. 乳制样品;
1. 五羟色胺; 2. *N*-甲基五羟色胺; 3. *N,N*-二甲基五羟色胺;
4. *N,N,N*-三甲基五羟色胺; 5. 蟾蜍噻吩

图 1 对照品和典型样品的 HPLC

对照品和典型样品的 HPLC 图见图 2, 不同干燥方式制备蟾酥样品中 5 种蟾毒配基的含量见表 4, 炮制前后蟾酥样品中 5 种蟾毒配基的含量见表 5。

色谱条件 Alltima C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, GRACE), 流动相乙腈 (A) - 0.3% 乙酸水



A. 对照品; B. 80 °C 烘干样品; C. 乳制样品;
1. 日蟾毒它灵; 2. 蟾毒它灵; 3. 蟾毒灵;
4. 华蟾酥毒基; 5. 酯蟾毒配基

图 2 对照品和典型样品的 HPLC

溶液 (B), 梯度洗脱 (洗脱程序 0 ~ 15 min, 28% ~ 54% A, 15 ~ 35 min, 54% A), 流速 0.6 mL · min⁻¹, 检测波长 296 nm, 柱温 30 °C。

对照品溶液的制备 精密称取日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基和酯蟾毒配基对照品适量, 甲醇溶解、稀释、定容得质量浓度分别为 30.7, 50.3, 50.8, 62.0, 61.0 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液的制备 称取样品粉末 (60 目筛) 约 25 mg, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 回流提取 1 h, 放冷, 再称定质量, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 上清液离心 5 min (14 800 r · min⁻¹), 即得。

表 4 不同干燥方法制备蟾酥样品中 5 种蟾毒配基的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

干燥方法	日蟾毒它灵	蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾酥毒基	酯蟾毒配基	总含量
105 °C 烘干	0.50 ± 0.01	1.45 ± 0.03	2.84 ± 0.04	4.75 ± 0.09	10.37 ± 0.09	19.91 ± 0.17
80 °C 烘干	0.48 ± 0.01	1.39 ± 0.01	2.87 ± 0.02	4.66 ± 0.08	10.80 ± 0.08	20.20 ± 0.17
60 °C 烘干	0.55 ± 0.00	1.50 ± 0.05	2.87 ± 0.05	4.65 ± 0.05	10.39 ± 0.05	19.96 ± 0.06
60 °C 减压	0.53 ± 0.02	1.43 ± 0.04	2.96 ± 0.03	4.66 ± 0.07	10.66 ± 0.18	20.24 ± 0.17
冷冻干燥	0.54 ± 0.01	1.42 ± 0.03	3.05 ± 0.03	4.91 ± 0.04	11.13 ± 0.11	21.05 ± 0.13

表 5 干蟾酥炮制前后样品中 5 种蟾毒配基的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

样品	日蟾毒它灵	蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾酥毒基	酯蟾毒配基	总含量	折合含量
炮制前	0.58 ± 0.01	1.51 ± 0.01	3.01 ± 0.02	4.88 ± 0.04	10.71 ± 0.09	20.69 ± 0.17	/
酒制	0.52 ± 0.03	1.51 ± 0.01	3.03 ± 0.01	4.93 ± 0.02	10.75 ± 0.05	20.74 ± 0.09	/
乳制	0.46 ± 0.01	1.25 ± 0.01	2.50 ± 0.04	4.06 ± 0.03	8.83 ± 0.07	17.10 ± 0.16	22.12 ± 0.21

3 讨论

根据主产区调研,鲜蟾酥采集后直接冷冻,待药农统一收购后进行加工处理,多以小作坊形式进行干燥。本实验根据产地加工流程,结合文献报道的处理方法,对江苏产鲜蟾酥进行解冻、稀释、过筛、干燥处理,不同温度(105, 80, 60 ℃)烘干、减压干燥(60 ℃)和冷冻干燥的干蟾酥得率为23.72%~28.66%,说明鲜蟾酥中含大量水分,约在70%左右。干蟾酥的颜色依次为深黄色、黄色、黄色、浅黄色、白色,只有冷冻干燥样品颜色保持白色不变,其他干燥方法均使蟾酥颜色有不同程度的加深。除了蛋白质类成分受热容易变性外,在鲜蟾酥中水溶性吲哚生物碱分离制备的过程中观察到,该类成分受到温度的影响也会使颜色加深,是否与干燥蟾酥样品外观色泽的变化有关,有待进一步研究。

本研究通过前期建立的吲哚类生物碱和蟾毒配基类的多指标评价体系,综合评价了烘干(105 ℃烘干4 h、80 ℃烘干6 h、60 ℃烘干10 h)、减压干燥(60 ℃干燥12 h)和冷冻干燥(冻干42 h)等不同干燥方法对蟾酥药材质量的影响。结果表明,105 ℃烘干样品中吲哚生物碱类总含量最低(总含量17.57%),其他4种干燥方式样品中吲哚类生物碱总含量没有明显差异(总含量19.85%~20.12%);所有5种干燥方法对测定的5种蟾毒配基类成分总含量没有显著影响(总含量19.91%~21.05%),这与文献所述的105 ℃烘干对蟾酥中蟾毒配基类成分影响不大是一致的^[3]。根据两类成分的总含量和样品外观色泽,冷冻干燥是最优的干燥方式;但综合考虑产地加工的相关因素(时间、成本和操作便利性等),60~80 ℃烘干也是一种经济实用的选择,这

与产地调研结果(干燥方法一般用烘箱处理,温度控制在60~80 ℃)也相吻合,为传统产地加工方法提供了科学依据。

已有文献表明蟾酥酒制、乳制前后蟾毒配基类成分有升高或降低的变化,但结论不尽统一^[5]。本研究对不同炮制方法制备的蟾酥饮片中两类成分的含量分析结果表明,酒制品中吲哚类生物碱和蟾毒配基类成分含量基本没变化;乳制品中两类成分的总含量直观测定结果有所降低,但考虑到辅料牛奶对乳制品各成分含量有一定的稀释作用,通过实际得率计算,得到两类成分实际含量分别为15.78%,22.12%,相当于乳制对蟾酥中5种吲哚生物碱和5种蟾毒配基类成分含量也基本无影响。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:360.
- [2] Gao H M, Zehl M, Leitner A, et al. Comparison of toad venoms from different Bufo species by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131: 368.
- [3] Kawahara K, Mikage M. Studies on toad venom (2): Examination of the drying processing method [J]. Yakugaku Zasshi, 2000, 120(11):1217.
- [4] Kawahara K, Mikage M. Studies on toad venom (3): Effect of metals on the quality of toad venom torrefied on a metal plate [J]. Yakugaku Zasshi, 2002, 122(1):117.
- [5] 沈嘉茵,袁旭江,刘波,等.蟾酥的采集加工及炮制研究概况[J].时珍国医国药,2008,19(2):275.
- [6] 曲婷.产地加炮制对蟾酥质量的影响[D].天津:2012,天津中医药大学.

[责任编辑 顾雪竹]