

蟾酥中 3 种脂溶性有效成分提取工艺及含量测定方法

刘冬^{1,2}, 杜守颖^{1*}, 何秀峰², 乐大勇², 李娜²

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;
2. 中国医学科学院药物研究所 北京协和药厂, 北京 100050)

[摘要] 目的: 优化蟾酥中脂溶性成分蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的提取工艺, 并建立了测定蟾酥提取物中上述 3 种成分含量的 HPLC 方法。方法: 以蟾酥中脂溶性成分蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基含量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对蟾酥提取工艺进行了优化; 建立的 HPLC 法, Diamonsil- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-水(55:45), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 296 nm。结果: 最佳提取工艺条件为 $A_2 B_3 C_3 D_2$, 即 75 倍量 95% 乙醇 80 提取 120 min; 所建立的 HPLC 方法蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基均得到很好的分离, 且重现性、精密度、线性关系良好, 最小检测限分别为 14.6, 9.0, 11.8 ng·mL⁻¹。结论: 确定了蟾酥最佳提取条件, HPLC 能准确测定蟾酥提取物中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的含量, 方法简便, 结果准确。

[关键词] 蟾酥; 正交试验; 蟾毒灵; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基; 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(2011)03-0069-04

Study on Extraction and Determination Method of Three Liposoluble Effective Constituents in Bufons Venenum

LIU Dong^{1,2}, DU Shou-ying^{1*}, HE Xiu-feng², YUE Da-yong², LI Na²

(1. School of Chinese Pharmacy Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Sciences Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** Study on extract method of liposoluble constituent bufalin, cinobufagin and resibufogenin in Bufons Venenum by orthogonal experiment design and established HPLC method for determination the assay of three effective constituents above. **Method:** An orthogonal test was adopted in this study. The content of bufalin, cinobufagin and resibufogenin was used as index for optimizing the extraction condition. In established HPLC method, the column: Diamonsil- C_{18} column(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), mobile phase: acetonitrile-water (55 45), the flow rate: 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength 296 nm. **Result:** The best extraction technology was to extract for 120 min with 75 times 95% ethanol in 80. The calibration curves of bufalin, cinobufagin, resibufogenin were linear and LOD were 14.6, 9.0, 11.8 ng·mL⁻¹ respectively. The repeatability and precision of the HPLC method was good. **Conclusion:** Confirmed the best extract method and established HPLC method to determine the assay of three constituents in Bufons Venenum extraction was simple and accurate.

[Key words] Bufons Venenum; orthogonal experiment design; bufalin; cinobufagin; resibufogenin; HPLC

[收稿日期] 20100727(001)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008); “中药生产技术与过程控制技术标准平台”(2009ZX09308-003); 教育部博士点基金(20090013110007)

[第一作者] 刘冬, 助理研究员, 研究方向: 药物分析与制剂, Tel: 010-83165745, E-mail: imldd@ yahoo. com. cn

[通讯作者] * 杜守颖, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药新剂型与制剂关键新技术, Tel: 010-84738615, E-mail: dushouying@ 263. net

蟾酥(*Bufo Venenum*)为中华大蟾蜍*Bufo garizans* Cantor 或黑眶蟾蜍*Bufo melanostictus*的耳后腺分泌的白色浆液,经加工干燥制成^[1]。现代研究发现,蟾酥的有效成分多为脂溶性成分,其中蟾毒灵(bufoalin, BL)、华蟾酥毒基(cinobufagin, CBG)、酯蟾毒配基(resibufogenin, RBG)等占较大比重,其对于心血管系统、肿瘤细胞均有显著的药理活性,经试验证实其通过多种抗肿瘤途径与机制,具有显著的抗肿瘤作用^[2-3]。其中, BL 抗肿瘤活性及作用机理已引起国内外的广泛关注^[4-5]。蟾酥毒性较大,《中国药典》2010 年版规定使用前用酒炮制,我们参考相关文献^[6-7],以蟾酥中脂溶性成分 BL, CBG, RBG 含量为指标,通过采用提取溶剂的单因素考察,以及 L₉(3⁴) 正交试验对蟾酥提取工艺进行了优化,得到了最佳提取条件。同时,考虑到 BL 的药理活性,参照《中国药典》2010 年版蟾酥质量标准中测定 CBG, RBG 为指标 HPLC 测定方法,建立了同时测定 BL, CBG, RBG 3 种脂溶性成分的 HPLC 测定法。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱系统(二极管阵列检测器);色谱柱:Dimosail-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(迪马公司);Millipore Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);BüCHI 旋转蒸发仪(德国);岛津 AW120 电子分析天平(日本)。

乙腈为 HPLC 级(美国 Fisher 公司),乙酸乙酯、氯仿、甲醇、乙醇均为分析纯(北京化工厂),水为超纯水;CBG 对照品、RBG 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110803-200605, 1108718-200507),BL 对照品(天津马克生物有限责任公司,批号为 20100517),蟾酥药材中粉(北京闫村蟾蜍养殖基地,经粉碎后过 65 目筛)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 预柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm)(Agilent 公司), Dimosail-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(迪马公司);流动相为乙腈-水(55:45),流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 296 nm,柱温为 30℃,进样量为 20 μL。理论塔板数按 BL, CBG, RBG 计均不低于 6 000,见图 1。

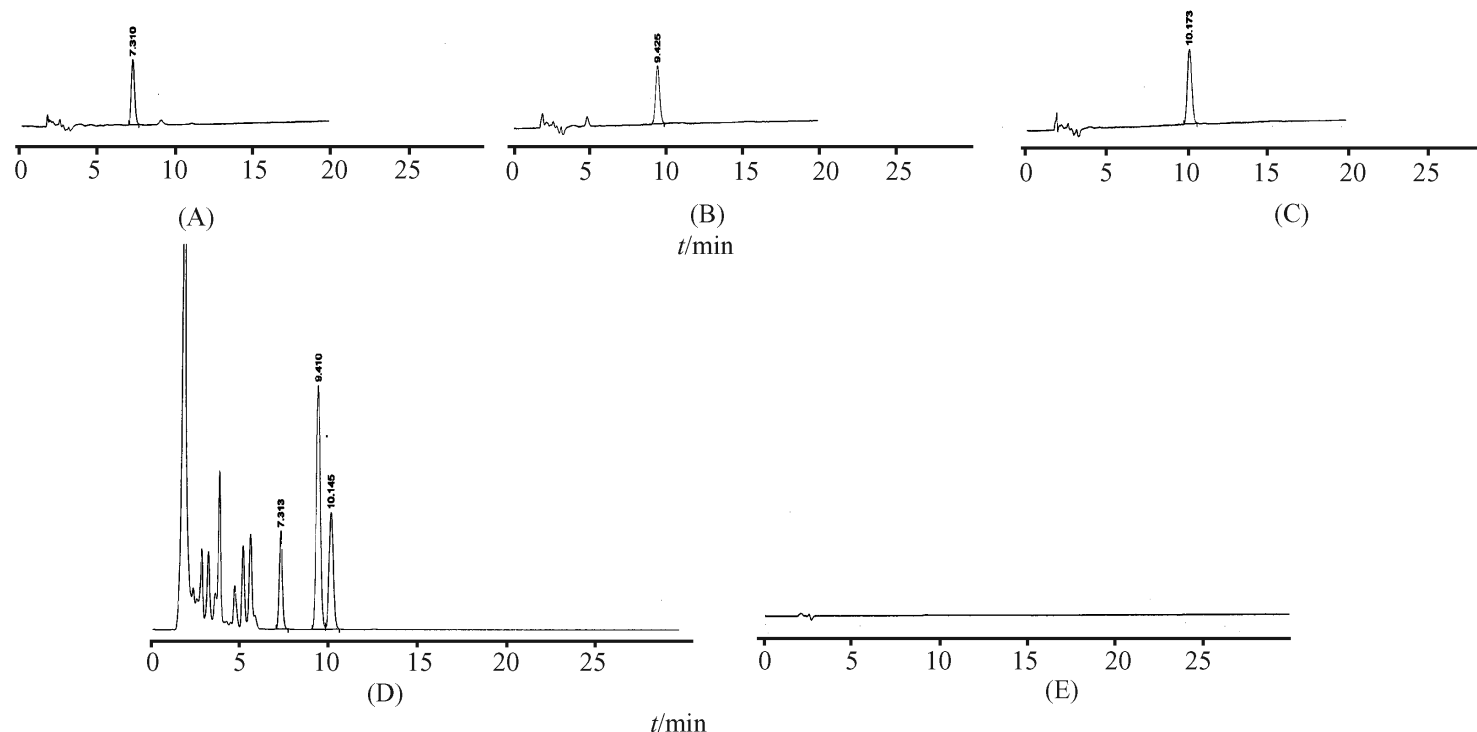


图 1 各对照品溶液、样品溶液及空白乙醇溶液 HPLC

A. BL 对照品溶液; B. CBG 对照品溶液; C. RBG 对照品溶液; D. 蟾酥乙醇提取物样品溶液; E. 空白乙醇提取液

2.2 BL, CBG, RBG 对照品溶液的制备 分别取 BL, CBG, RBG 对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含 BL, CBG, RBG 各 50 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备方法研究

2.3.1 蟾酥《中国药典》方法供试品溶液的制备 取蟾酥中粉(过 65 目筛)约 25 mg,精密称定,置 50 mL 茄形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,加热回流 60 min,放至常温,再次称量,用甲醇补足减失质

量,摇匀,以 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3.2 不同溶剂提取蟾酥脂溶性成分单因素考察

称取同一批次蟾酥药材中粉 8 份,每份 0.5 g,精密称定,分别加入 60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯及氯仿 25 mL,称定质量,85℃ 条件下回流提取 90 min,放至常温,再次称定,用相应溶剂补足质量,摇匀,以 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液用甲醇稀释 20 倍,摇匀,即得不同溶剂单因素考察供试品溶液。照 2.1 项下方法测

定各供试品溶液中 BL, CBG, RBG 的含量, 见表 1。

表 1 不同溶剂提取蟾酥中脂溶性成分含量测定 %

溶剂	BL	CBG	RBG	含量总和
药典方法	2.35	5.31	2.42	10.09
60% 乙醇	1.85	4.43	1.99	8.29
70% 乙醇	2.22	5.32	2.40	9.95
80% 乙醇	2.36	5.67	2.58	10.62
90% 乙醇	2.32	5.57	2.46	10.35
无水乙醇	2.30	5.48	2.48	10.26
甲醇	2.20	5.20	2.36	9.76
乙酸乙酯	1.53	3.43	1.52	6.48
氯仿	1.85	4.48	2.02	8.35

由表 1 可知, 采用 80%, 90% 乙醇及无水乙醇提取蟾酥提取液中的 BL, CBG, RBG 均较 2010 年版《中国药典》蟾酥含量测定项中提取方法的提取率更高。

2.3.3 正交试验供试品溶液制备 根据 2.3.2 提取溶剂单因素考察结果, 设计正交试验 $L_9(3^4)$ 试验因素水平表, 采用对应提取方法, 得到不同提取条件下的提取溶液, 使用相应浓度乙醇溶液补足质量损失、摇匀, 以 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液用甲醇稀释 20 倍, 摇匀, 即得正交试验供试品溶液。照 2.1 项下方法测定各正交试验供试品溶液中 BL, CBG, RBG 的含量, 因素水平表以及结果分析见表 2~4。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交因素水平 ($n=2$)

水平	因素			
	A(溶剂量/倍)	B(乙醇浓度/%)	C(时间/min)	D(温度/)
1	1 50	65	60	70
2	1 75	80	90	80
3	1 100	95	120	90

表 3 正交实验安排

No.	A	B	C	D	BL, CBG, RBG
					含量总和 / %
1	1	1	1	1	6.26
2	1	2	2	2	10.21
3	1	3	3	3	10.16
4	2	1	2	3	9.78
5	2	2	3	1	9.72
6	2	3	1	2	10.11
7	3	1	3	2	9.86
8	3	2	1	3	9.65
9	3	3	2	1	9.56
K_1	26.63	25.90	26.02	25.54	
K_2	29.61	29.58	29.55	30.18	
K_3	29.07	29.83	29.74	29.59	
R	2.98	3.93	3.72	4.64	

表 4 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	3.3574	2	1.6786	6.49	<0.05
B	6.4215	2	3.2108	12.42	<0.01
C	5.8781	2	2.9390	11.37	<0.01
D	8.5142	2	4.2571	16.47	<0.01

2.4 BL, CBG, RBG 标准曲线的建立 分别精密称取 BL, CBG, RBG 对照品 9.4, 9.4, 10.2 mg, 置 3 个 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为标准曲线储备液。分别精密量取上述 3 种溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取各标准系列溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积。以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得线性回归方程, 结果表明 3 种成分线性关系良好, 见表 5。

表 5 BL, CBG, RBG 线性回归方程及相关系数

名称	线性回归方程	相关系数	浓度范围 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
BL	$Y=11.30X-0.0872$	$r=0.9999$	0.188~18.8
CBG	$Y=14.85X+0.3414$	$r=0.9998$	0.188~18.8
RBG	$Y=16.10X-0.4844$	$r=0.9999$	0.204~20.4

2.5 日内精密度考察 选取 BL, CBG, RBG 对照品溶液高、中、低 3 个浓度, 每一浓度连续进样 6 次, 以峰面积考察其日内精密度, 结果表明 3 种成分日内精密度良好, 见表 6。

表 6 BL, CBG, RBG 日内精密度 ($n=6$)

名称	浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %
BL	0.376	0.94
	3.76	0.56
	18.8	0.22
CBG	0.376	1.47
	3.76	0.32
	18.8	0.35
RBG	0.204	1.66
	4.08	0.06
	20.4	0.13

2.6 日间精密度及溶液稳定性考察 选取 BL, CBG, RBG 对照品溶液高、中、低 3 个浓度, 每一浓度于第 1, 2, 3, 5, 7 天进样测定, 以峰面积考察其日间精密度, 结果表明 3 种成分日间精密度及溶液稳定性良好, 见表 7。

2.7 最小检测限 $S/N > 3$, 本方法中 BL, CBG, RBG 的最小检测限分别为 14.6, 9.0, 11.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 7 BL, CBG, RBG 日间精密度 ($n = 5$)

名称	浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %
BL	0.376	1.97
	3.76	0.95
	18.8	0.66
CBG	0.376	2.87
	3.76	1.62
	18.8	0.95
RBG	0.204	1.89
	4.08	0.78
	20.4	0.53

2.8 回收率实验 精密称取已知含量的蟾酥中粉 9 份, 每份 25 mg, 分别加入 80%, 100% 及 120% 的 3 种对照品, 按照 2.3.1 项下方法制备供试品溶液。按照上述 HPLC 方法测定, 计算得 BL, CBG, RBG 的平均回收率分别为 100.4%, 99.7%, 98.6%, RSD 分别为 1.06%, 0.98%, 1.73%。

2.9 正交试验提取蟾酥中 3 种脂溶性成分的工艺优化 分别称取蟾酥药材中粉 18 份, 每份 0.5 g, 参照下述正交试验因素水平表分别加入 25, 37.5, 50 mL 不同浓度的乙醇溶液, 在对应温度下提取相应时间, 每次试验平行操作 2 次; 稀释及测定过程详见 2.3.3, 取相同条件提取实验测定结果的平均值作为测定结果, 见表 3。

由表 3 可知, 各因素影响次序为 $D > B > C > A$, 即几个因素对提取结果均有较大影响; 从方差分析结果来看, 因素 D (提取温度) 以及因素 B (乙醇浓度) 对 3 成分的提取率影响最为明显, 正交试验筛选出的结果为 $A_2 B_3 C_3 D_2$ 。确定最佳提取条件, 即 75 倍量 95% 乙醇 80 回流提取 120 min。

2.10 最佳工艺验证实验 称取同一批蟾酥药材中粉 3 份, 每份 10.0 g, 分别置于 3 个回流瓶中, 分别加入 750 mL 95% 乙醇溶液, 80 回流提取 120 min, 照 2.1 项下方法测定各提取液中 BL, CBG, RBG 的含量, 结果见表 8。

表 8 最佳工艺验证实验结果 %

	BL	CBG	RBG	三者之和
1	2.36	5.40	2.41	10.17
2	2.36	5.41	2.42	10.19
3	2.35	5.40	2.41	10.16
RSD	0.245	0.107	0.239	0.150

3 讨论

3.1 关于不同乙醇浓度提取溶液的澄清度与颜色 试验中采用 60%, 70%, 80%, 90% 乙醇及无水乙醇作为提取溶剂, 溶液的颜色随着醇浓度的降低而

变深, 溶液的澄清度也随着乙醇浓度降低而逐渐变得浑浊。分析其原因为随着乙醇浓度的降低, 将蟾酥中水溶性成分也同时提取出来, 使溶液变得浑浊。

3.2 关于提取次数 本文在确定因素水平表前, 对提取次数进行了考察, 加热回流 120 min 已提取出蟾酥中脂溶性成分 BL, CBG, RBG 达 99% 以上, 第二次提取溶液中上述 3 种物质的比例均低于 1%, 且与《中国药典》2010 年版蟾酥含量测定提取方法对比, 已高于其含量测定结果, 故未将提取次数列为考察因素。

3.3 关于提取条件的对比 本实验筛选出中药蟾酥中脂溶性成分 BL, CBG, RBG 3 个有效成分的最佳提取方法为 75 倍量 95% 乙醇 80 条件下回流 120 min。与药典中的含量测定提取方法相比, 该方法对上述 3 种有效成分的提取率较高, 溶剂的用量更少, 且采用的提取溶剂乙醇毒性较甲醇小。经放大实验表明, 本提取工艺稳定性、重复性良好, 为蟾酥产业化生产提供了依据, 也为蟾酥的炮制与质量标准研究提供了可行的方法。

3.4 与相关参考文献的结果对比 蟾酥提取参考文献^[6-7]方法均以 CBG, RBG 为指标, 确定了其最佳提取条件分别为 50 倍量 80% 乙醇 70 条件下提取 2 次, 每次 90 min 以及 20 倍量 50% 乙醇提取 60 min。与本实验过程中也曾按照上述条件进行提取, 但所测定得 3 种成分提取率均不及所建立的提取方法。

《中国药典》蟾酥 HPLC 含量测定方法中仅以 CBG, RBG 为含量测定指标。经与药典方法对比, 本文所建立的 HPLC 法理论塔板数、分离度均优于药典方法, 且灵敏、准确、重现性好, 操作简便, 可同时测定蟾酥提取液中 BL, CBG, RBG 的含量。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 376.
- [2] 赵强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 4.
- [3] 杨琳, 段鹏飞, 王琼, 等. 蟾酥脂溶性提取物的分离分析及其镇痛、抗肿瘤作用研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 29(1): 64.
- [4] 张宁, 凌昌全. 蟾毒灵诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 1(17): 126.
- [5] 王旭, 殷佩浩, 陈腾. 蟾毒灵抗肿瘤作用研究及其研究进展[J]. 中国医药指南, 2008, 17(6): 54.
- [6] 沈嘉茵, 袁旭江, 朱盛山, 等. 正交法对蟾酥提取工艺影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 27.
- [7] 李妍, 王四旺, 孙纪元, 等. 正交试验法优选蟾酥脂溶性成分提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2006, 22(3): 112.

[责任编辑 顾雪竹]