

正交法对蟾酥提取工艺影响研究

沈嘉茵, 袁旭江*, 朱盛山, 刘波, 谢凯, 聂阳
(广东药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的: 采用正交法探索蟾酥最佳提取工艺。方法: 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基为指标成分, 考察乙醇浓度、提取时间、提取次数、提取温度对提取效果的影响。结果: 各因素影响大小为: 乙醇浓度 A > 提取次数 C > 提取时间 B > 提取温度 D, 乙醇浓度影响最大, 温度影响最小。确定蟾酥最佳醇提工艺为用 80% 乙醇在 70 °C 下提取 2 次、每次 90 min。结论: 乙醇浓度、提取次数、提取时间、提取温度对蟾酥醇提工艺存在一定的影响, 特别是乙醇浓度, 为蟾酥乙醇炮制工艺的深入研究提供依据和良好的基础。

[关键词] 蟾酥; 正交试验; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)02-0027-02

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 bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo 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]。蟾酥性味甘辛、温, 有毒, 具有解毒、消肿、醒神、开窍、强心和止痛等作用。其药理活性较强, 作用广泛, 早已引起国内外的广泛关注。由于蟾酥毒性较大, 临床用药必先炮制, 其炮制方法很多^[2,3], 2005 版药典规定用酒炮制, 但仍不够深入, 且酒炮制后仍存在一些不溶性物质。为了更好地研究蟾酥炮制工艺, 去粗取精, 笔者对蟾酥醇提工艺进行了初步研究, 并以华蟾酥毒基及脂蟾毒配基为指标, 运用 $L_9(3^4)$ 正交试验法考察不同乙醇浓度对蟾酥提取工艺的影响, 为蟾酥酒炮制工艺的深入系统研究提供依据和良好的实验基础。

1 实验材料与仪器

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); 乙腈为色谱纯; 水为高纯水; 甲醇、乙醇、磷酸二氢钾、磷酸均为分析

纯; 高效液相色谱仪(Agilent 1100), 电热恒温水浴锅(上海仪表供销公司, 型号 H·S·G·II B-4), BS124S sartorius 电子天平。蟾酥药材由广东药学院中药开发研究所提供, 产地为山东, 经广东药学院中药开发研究所朱盛山教授鉴定为中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor) 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液加工干燥而成的。

2 实验方法及结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 HPLC 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm), 流动相 0.5% KH₂PO₄(调 pH 至 3.2 ± 0.05)-CH₃CN(50:50), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 296 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 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, 分别制成浓度为 0.048 4 mg·mL⁻¹ 的华蟾酥毒基对照品溶液及 0.053 2 mg·mL⁻¹ 的脂蟾毒配基对照品溶液, 备用。

2.1.3 标准曲线制备 分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按上述色谱条件测定对照品溶液的峰面积积分值, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得华蟾酥毒基的回归方程 $Y = 695.25X - 3.26$, 相关系数 $r = 0.9997$, 在 (0.096 8~0.484) μg 范围内线性关系良好; 脂蟾毒配基的回归方程为 $Y = 657.42X - 4.89$, 相关系数 $r = 0.9996$, 在 (0.106 4~0.532 0) μg 范围内线性关系良好。

2.1.4 蟾酥药材含量测定 按照中国药典 2005 年版中蟾酥项下含量测定方法对蟾酥药材进行含量测

[收稿日期] 2004-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30672670); 国家科技支撑计划(2006BAI09B08-02); 广东省中医药管理局(1060042)

[通讯作者] * 袁旭江, Tel: (020) 35392540; E-mail: xjyuan_xj@163.com

定,结果华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总含量为 0.116 18 mg/g。

2.2 正交实验设计方法 对蟾酥进行醇提工艺研究,以乙醇浓度、提取时间、提取次数和提取温度为考察因素,并以华蟾酥毒基及脂蟾毒配基为指标,进行因素水平设计(见表 1)。采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,分别称取蟾酥药材 9 份,每份 0.2 g,按正交设计表(见表 2)进行提取;若提取 1 次,用 10 mL 溶剂进行提取;若提取 2 次的,分别用 10 mL 溶剂进行提取;若提取 3 次的,前 2 次用 10 mL 溶剂,第 3 次用 5 mL 溶剂进行提取。每个提取的溶液分别过滤合并,各定容至 25 mL,备用。

表 1 因素水平表

水平	A(乙醇浓度%)	B(提取时间 min)	C(提取次数)	D(提取温度 °C)
1	95	30	1	70
2	90	60	2	80
3	80	90	3	90

2.3 正交实验分析与结果 分别精密吸取正交样品溶液各 10 mL,按高效液相色谱条件进行测定分析,以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总提取量与药材中该成分的总含量进行比较,计算提取率并进行方差分析,结果见表 2~3。

表 2 正交试验安排及结果

因素 试验号	A	B	C	D	提取率 %
1	1	1	1	1	90.79
2	1	2	2	2	96.14
3	1	3	3	3	111.96
4	2	1	2	3	110.97
5	2	2	3	1	112.60
6	2	3	1	2	106.84
7	3	1	3	2	116.29
8	3	2	1	3	107.47
9	3	3	2	1	121.36
K_1	99.630	106.017	101.700	108.250	
K_2	110.137	105.403	109.490	106.423	
K_3	115.040	113.387	113.317	110.133	
R	15.410	7.984	11.917	3.72	

表 3 正交实验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	P 值
A	371.901	2	185.951	18.011	9.000	< 0.10
B	118.427	2	59.214	5.736	9.000	
C	219.720	2	109.86	10.641	9.000	< 0.10
D(误差)	20.648	2	10.324	1.000	9.000	

各因素影响次序是乙醇浓度 A> 提取次数 C> 提取时间 B> 提取温度 D。根据表 3 的方差分析来

看,A、C 因素影响较显著($P < 0.10$),即乙醇浓度和提取次数明显影响蟾酥中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的提取,而提取时间和提取温度相对影响较小。结果表明最佳提取工艺是 $A_3B_3C_3D_3$,即用 80% 乙醇在 90 °C 下提取 3 次,每次 90 min。由于提取温度是影响最小的因素,因此笔者还考察了 80% 乙醇在 80 °C 下提取 3 次、每次 90 min 及 70 °C 下提取 2 次、每次 90 min,两提取结果接近。综上所述,蟾酥的优选提取工艺为 80% 乙醇在 70 °C 下提取 2 次,每次 90 min。

2.4 最佳工艺验证 称取 0.2 g 蟾酥粉末,加入 10 mL 80% 乙醇在 70 °C 下提取 90 min,共提取 2 次,过滤合并提取液,定容至 25 mL。重复 3 次实验,结果提取率分别为:122.02%,120.26%,121.50%;平均为 121.26%,RSD 为 0.75%。

2.5 工艺的放大试验 在确立了蟾酥的最佳实验室提取工艺后,将优选的提取工艺进行放大试验。称取 10 g 蟾酥粉末,加入 500 mL 80% 乙醇在 70 °C 下提取 90 min,提取 2 次,合并滤液,定容至 1 000 mL。重复 2 次试验,提取率分别是 117.87%,118.46%。

3 讨论

由验证结果与放大试验结果表明,本试验的最佳提取工艺是 80% 乙醇在 70 °C 下提取 2 次,每次 90 min,并且表明该提取工艺稳定性良好。

本实验曾对加醇量(1:25,1:50,1:75),以及乙醇浓度、提取次数、提取时间为因素进行正交实验,但所得的正交试验结果均没有显著性差异,对加醇量的单因素考察表明 50 倍量与 75 倍量提取 2 次的效果相差不大,但明显比 25 倍量提取 2 次的结果高,因此考虑到成本问题而选用 50 倍量的乙醇量进行提取。

本实验结果表明乙醇浓度对蟾酥成分的提取率具有较明显的影响,这为蟾酥酒炮制工艺的深入系统研究提供依据和良好的实验基础。

[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:化工出版社,2005.265-266.
- [2] 王志巍,王力,李玉山,等. 蟾酥的炮制方法探讨. 中医药学报[J]. 1994,1:43.
- [3] 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.