

干蟾皮中蟾毒内酯类成分的提取工艺研究

咎日增¹, 胡万杨², 黄玉叶², 余跃², 宋霄宏^{2*}

1. 武警浙江省总队杭州医院, 浙江 杭州 310051

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 探讨干蟾皮中蟾毒内酯类成分的最佳提取工艺。**方法** 通过正交试验法考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数对干蟾皮中蟾毒内酯类成分提取效果的影响, 并以酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的总量—总毒基量为考察指标, 采用超高效高压液相色谱-紫外检测器检测。**结果** 最佳提取工艺为以 10 倍量 80%乙醇提取 2 次, 每次 2 h。**结论** 所优选出的提取工艺方法可行、稳定、合理。

关键词: 干蟾皮; 酯蟾毒配基; 华蟾酥毒基; 提取工艺; 超高效高压液相色谱-紫外检测

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)07-1330-04

Extracting technology of bufadienolides in *Bufo Corium*

ZAN Ri-zeng¹, HU Wan-yang², HUANG Yu-ye², YU Yue², SONG Xiao-hong²

1. Hangzhou Hospital of Zhejiang General Team of Armed Police, Hangzhou 310051, China

2. Pharmaceutical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

Key words: *Bufo Corium*; resibufogenin; cinobufagin; extracting technology; UPLC-ELSD

干蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮, 研究表明其具有清热解毒、利水消胀之功效, 主治痈疽、肿毒、瘰癧、肿瘤等^[1]。干蟾皮中化学成分种类繁多, 据报道含有 30 种以上的甾体化合物, 生理活性物质主要是蟾蜍毒素 (bufotoxin) 及水解产物蟾毒配基, 其中以蟾毒内酯类、蟾毒色胺类为主^[2-5], 干蟾皮提取的华蟾素为我国自行研发的二类新药, 可有效缓解癌痛症状^[6]。本实验采用正交试验法, 以酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的总量为考察指标, 用超高效高压液相色谱-紫外检测器进行检测, 优选最佳提取工艺, 为进一步制备现代制剂提供原料。

1 仪器与材料

电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); AB135—S 分析天平 (梅特勒-托利多); RE—5205 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); DK—S22 型电热恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限公司); Waters Acquity 超高效高压液相色谱仪-紫外检测器

(美国 Waters 公司)。

酯蟾毒配基对照品 (批号 110718-200507)、华蟾酥毒基对照品 (批号 110803-200504) 购于中国药品生物制品检定所。干蟾皮 (批号 20100526) 产地江苏, 购于亳州药材市场, 经浙江中医药大学资源鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥皮。

甲醇、乙腈为色谱纯; 95%乙醇、环己烷、丙酮、氯仿均为分析纯; 100~200 目柱色谱硅胶 (试剂级, 青岛海洋化工厂分厂); 0.22 μm 针筒式微孔滤膜过滤器 (上海兴亚净化材料厂)。

2 方法与结果

2.1 蟾毒配基类成分的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 BEH Phenyl (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水 (30:70), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 296 nm。酯蟾毒配基与华蟾酥毒基峰以及两者与其他成分峰的分度均大于 1.5。理论塔板数按酯蟾毒配

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: 浙江省科技厅资助项目 (2007C33048)

作者简介: 咎日增 (1954—), 男, 主任药师, 浙江中医药大学客座教授, 主要研究方向为中药新制剂。

Tel: (0571)87135053 E-mail: zanrizeng@163.com

*通讯作者 宋霄宏 Tel: (0571)86613524 E-mail: songxiaohong999@163.com

基、华蟾酥毒基峰计算均不低于 16 000。

2.1.2 对照品溶液的制备^[7-8] 分别精密称取减压干燥至恒定质量的酯蟾毒配基对照品 4.23 mg、华蟾酥毒基对照品 4.24 mg，甲醇定容至 10 mL 棕色量瓶中，摇匀；从上述对照品溶液中分别精密吸取 0.2 mL，加甲醇定容至 5 mL 量瓶中，摇匀，即得含酯蟾毒配基 16.92 μg/mL、华蟾酥毒基 16.96 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取干蟾皮粗粉（过 2 号筛）50 g，用 10 倍量 80%乙醇溶液提取 2 次，每次 1.5 h，滤过，合并提取液，浓缩，定容至 50 mL 量瓶中。移取 9 mL 提取液，水浴蒸干，加 2 g 硅胶，研磨均匀，60 ℃烘 1 h。粉末以 100~200 目硅胶 15 g 装柱，环己烷-氯仿-丙酮（4：3：3）洗脱，收集洗脱液 150 mL，蒸干，残渣用甲醇定容至 10 mL 量瓶中，精密吸取 1 mL，甲醇定容至 5 mL 量瓶中，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液，作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μL 进样，以对照品进样量为横坐标，峰面积积分值为纵坐标进行线性回归，得回归方程：酯蟾毒配基 $Y=2\,524\,633.246X-327.553$ ， $r=1.000\,0$ ；华蟾酥毒基 $Y=2\,775\,844.533X-747.688$ ， $r=1.000\,0$ ；表明酯蟾毒配基在 8.46~84.6 ng、华蟾酥毒基在 8.48~84.8 μg 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL，连续进样 6 次，计算得酯蟾毒配基和华蟾酥毒基峰面积的 RSD 分别为 0.79%、0.84%。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取按“2.1.3”项下处理得到的供试品溶液 3 μL，按上述色谱条件，分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，计算得酯蟾毒配基、华蟾酥毒基峰面积的 RSD 分别 1.29%、2.15%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重现性试验 分别称取干蟾皮粗粉 6 份，按“2.1.3”项下操作，依法测定，外标法计算得酯蟾毒配基和华蟾素毒基质量分数的 RSD 分别为 2.38%、2.08%。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取干蟾皮粗粉 6 份，分别加入酯蟾毒配基对照品 465.30 μg、华蟾酥毒基对照品 848.00 μg，制备供试品溶液，进样测定，计算得酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的平均回收率分别为 100.80%、99.54%，RSD 分别为 1.36%、2.35%。

2.1.9 样品测定 取不同工艺制备的样品，制备供

试品溶液，依法测定，计算酯蟾毒配基和华蟾素毒基的量。色谱图见图 1。

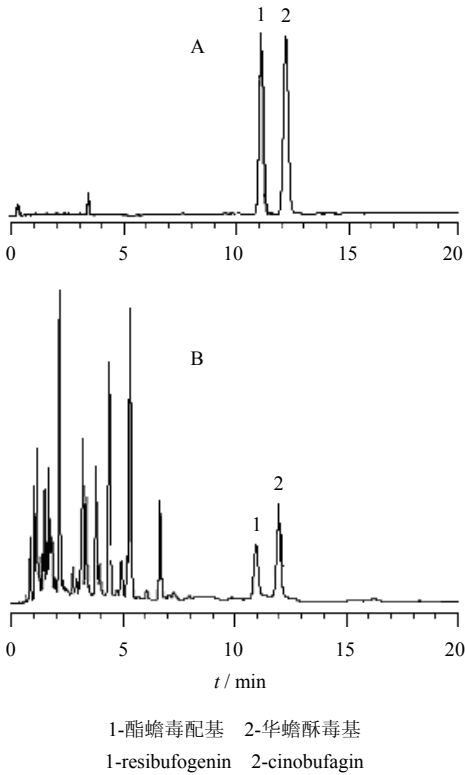


图 1 对照品 (A) 和供试品 (B) 的 UPLC 图谱
Fig. 1 UPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.2 干蟾皮提取工艺的考察

2.2.1 提取溶媒的选择 称取干蟾皮粗粉 3 份，每份 50 g，分别以水和 50%、70%乙醇溶液为溶媒，用药材 10 倍量溶媒提取 2 次，每次 1.5 h，滤过，合并 2 次提取液，回收浓缩，定容至 50 mL 量瓶中。按“2.1.3”项下处理得供试品溶液，依法测定，外标法计算酯蟾毒配基和华蟾素毒基的量。结果见表 1。采用 70%乙醇溶液为提取溶媒效果较好。

2.2.2 正交试验 根据醇提单因素考察结果并参考相关文献报道^[9-10]，以酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的总量——总毒基量为指标，考察乙醇体积分数 (A)、

表 1 提取溶媒的考察
Table 1 Investigation of solvent extraction

溶 媒	酯蟾毒配基/ (μg·g ⁻¹)	华蟾酥毒基/ (μg·g ⁻¹)	总毒基/ (μg·g ⁻¹)
水	28.96	65.01	93.97
50%乙醇	46.43	60.25	106.68
70%乙醇	54.22	68.95	123.17

乙醇用量 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 对提取效果的影响。

称取干蟾皮粗粉 50 g, 共 9 份, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 进行提取, 合并提取液, 回收乙

醇, 浓缩液定容至 50 mL 棕色量瓶中。按“2.1.3”项下操作, 依法测定, 外标法计算酯蟾毒配基、华蟾素毒基的量以及总毒基量。正交试验设计及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果
Table 2 $L_9(3^4)$ Orthogonal test and results

试验号	A/%	B/倍	C/h	D/次	酯蟾毒配基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	华蟾酥毒基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	总毒基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	70 (1)	8 (1)	1 (1)	1 (1)	38.99	57.28	96.27
2	70 (1)	10 (2)	1.5 (2)	2 (2)	55.19	71.35	126.54
3	70 (1)	12 (3)	2 (3)	3 (3)	61.45	63.63	125.08
4	80 (2)	8 (1)	1.5 (2)	3 (3)	50.20	58.89	109.09
5	80 (2)	10 (2)	2 (3)	1 (1)	59.72	76.79	136.51
6	80 (2)	12 (3)	1 (1)	2 (2)	62.87	54.16	117.03
7	90 (3)	8 (1)	2 (3)	2 (2)	65.01	66.11	131.12
8	90 (3)	10 (2)	1 (1)	3 (3)	59.29	60.97	120.26
9	90 (3)	12 (3)	1.5 (2)	1 (1)	47.89	56.66	104.55
K_1	347.89	336.48	333.55	337.33			
K_2	362.62	383.31	340.18	374.68			
K_3	355.93	346.65	392.71	354.43			
R	4.92	15.61	19.72	12.45			

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	36.28	2	18.14	1.00	
B	404.47	2	202.24	11.12	
C	700.32	2	350.16	19.26	$P<0.05$
D	233.09	2	116.55	6.41	

根据直观分析和方差分析可知, 各因素对提取工艺的影响程度依次为 $C>B>D>A$, 即提取时间 $>$ 乙醇用量 $>$ 提取次数 $>$ 乙醇体积分数; 且仅有提取时间对工艺的影响显著 ($P<0.05$)。以总毒基提取率为指标确定的最佳醇提工艺为 $A_2B_2C_3D_2$, 即以 10 倍量 80%乙醇溶液提取 2 次, 每次 2.0 h。

2.2.3 验证试验 称取干蟾皮粗粉 50 g, 共 3 份, 按最佳提取工艺条件进行平行试验。结果见表 4。表明所采用的提取工艺简便、稳定, 方法可行。

3 讨论

干蟾皮的活性成分与蟾酥基本一致^[11], 其蟾毒内酯类成分具有杀伤和抑制肿瘤细胞生长的作用^[5]。《中国药典》2010 年版以酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的总毒基量为蟾酥的质控指标。由于《中国药典》中未收载干蟾皮, 故本实验选择酯蟾毒配基和华蟾

表 4 验证试验
Table 4 Verification tests

试验号	酯蟾毒配基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	华蟾酥毒基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	总毒基/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	54.30	92.30	146.60
2	54.83	93.08	147.91
3	54.69	93.92	148.61
平均值	54.61	93.10	147.71

酥毒基的总毒基量为干蟾皮的考察指标, 并对提取工艺进行优化, 结果表明采用醇提所得的总毒基量明显高于水提所得的总毒基的量。

由于干蟾皮含有油脂性成分且与酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的化学性质极为相似, 本实验曾采用石油醚、氯仿等有机溶剂萃取法对供试品进行处理, 但这种液-液萃取法所得到的供试品中 2 个组分的主峰之间出现拖尾现象, 分离效果不佳, 且杂质峰干扰较大, 对定量分析带来一定的影响。因此, 本实验采用硅胶柱色谱法对干蟾皮提取液进行纯化处理^[12-14], 以环己烷-丙酮-氯仿 (4:3:3) 为洗脱液, 使 2 种蟾毒配基能较完全地与其他成分分离。经验证, 该处理方法准确、有效, 重现性好。

对 HPLC 法与 UPLC 法测定结果进行比较, 结

果显示 HPLC 法中酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的出峰时间较长,一般在 30~40 min,而 UPLC 法中 2 个组分的出峰时间明显缩短,仅为 12 min 左右;采用 HPLC 法测定蟾毒配基类成分所用的流动相系统主要有甲醇-水、乙腈-水、乙腈-缓冲盐 3 种^[15-17],其中甲醇-水系统需要的甲醇量较大,供试品的分析时间较长;乙腈-水系统大大减少了有机溶剂的用量并且有效地缩短了供试品的分析时间;乙腈-缓冲盐虽能获得较好的分析效果,但由于磷酸盐在流动相中的溶解度相对较小,易造成色谱仪的管路系统堵塞。综合以上分析,本实验选择乙腈-水系统,并考察不同流动相配比和不同体积流量条件下酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的分离效果。结果表明,以乙腈-水(30:70)为流动相,体积流量 0.3 mL/min,干蟾皮中酯蟾毒配基和华蟾酥毒基能得到很好的分离。表明该分析方法操作简便、灵敏度高。

参考文献

- [1] 江苏省卫生厅. 江苏省中药材标准 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989.
- [2] 张英. 蟾酥和蟾皮活性成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [3] 李维熙, 孙辉, 李茜, 等. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 183-185.
- [4] 杨立宏, 张豁中, 张冰. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究 [J]. 药学报, 1992, 27(9): 679-683.
- [5] 张英, 邱鹰昆, 刘珂. 中华大蟾蜍的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1905-1908.
- [6] 巩仔鹏, 陈涛, 邓李蓉, 等. 华蟾素治疗癌痛的临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 268-271.
- [7] 刘吉华, 王静蓉, 余伯阳. 反相高效色谱法测定蟾酥中的 3 种蟾毒内酯 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 186-188.
- [8] 丁冬梅, 谭妙娟. HPLC 测定心力丸中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(1): 149-150.
- [9] 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, 2008, 14(2): 27-28.
- [10] 朱金芳, 尚北城, 伍茂福. 蟾酥有效成分提取 [J]. 中草药, 1992, 23(4): 183-184.
- [11] 赵大洲, 陈继勇, 秦勇, 等. 中华大蟾蜍蟾酥与蟾皮化学成分的比较分析 [J]. 天津药学, 2006, 18(4): 21-24.
- [12] 赵大洲, 邱鹰昆, 陈继永, 等. 大孔树脂富集蟾皮总二烯内酯的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1991-1992.
- [13] 杨世高, 汪维云. 华蟾素分散片质量标准研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 598-602.
- [14] 葛勤, 康钦树. 蟾酥的化学及质量研究近况 [J]. 中成药, 1998, 20(1): 38-40.
- [15] 罗兴平, 王兰霞, 王峰, 等. HPLC 测定强力救心丸中华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的含量 [J]. 中成药, 2001, 23(7): 482-484.
- [16] 代丽萍, 王智民, 高慧敏, 等. 蟾皮和华蟾素注射液中华蟾酥毒基含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 224-226.
- [17] 王毅刚, 谷淑玲. RP-HPLC 法测定干蟾皮药材中华蟾酥毒基的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1172-1174.