

## 蟾酥中蟾毒配基类成分的提取纯化工艺研究

孙爱萍<sup>1</sup>, 孙萍<sup>2\*</sup>, 李娜<sup>1</sup>

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

**摘要:** 目的 优化蟾酥中脂溶性成分华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的提取及纯化工艺。方法 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量为考察指标, 以乙醇浓度、溶剂倍量、提取时间为考察因素, 采用正交试验确定最佳提取工艺参数; 通过单因素考察并结合 Box-Behnken 响应面法, 以展开剂比例、柱高与直径比、吸附剂与上样量的比值为考察因素, 筛选并确定最佳纯化工艺。结果 确定最佳提取工艺为加入 10 倍量 85% 的乙醇提取 90 min; 最佳纯化工艺为展开剂环己烷-氯仿-丙酮 (4:3:3), 柱高与直径比为 7:1, 吸附剂-上样量为 5.5:1, 2 种蟾毒配基纯化后的总量可达 66.51%。通过 3 批放大工艺验证, 表明模型拟合度良好, 采用硅胶柱色谱分离纯化蟾毒配基, 具有操作简便、分离速度快、分离效果好等优点。结论 所选工艺合理、可行, 为以后该产品的产业化应用提供技术参考和依据。

**关键词:** 蟾酥; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基; 正交试验; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0611-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.012

## Extraction and purification of components from *Bufois Venenum*

SUN Ai-ping<sup>1</sup>, SUN Ping<sup>2</sup>, LI Na<sup>1</sup>

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction and purification technology of liposoluble constituents from *Bufois Venenum*. **Methods** The total content of cinobufagin and resibufogenin was taken as the index, and the ethanol potency, solvent multiplication and extraction time were taken as the investigation factors. The optimum extraction process parameters was determined by orthogonal test. Through single factor investigation experiment combined with Box-Behnken response surface method, taking the expansion agent ratio, ratio of diameter to height, adsorbent and sample quantity as the investigation factors, the optimum purification process was selected and determined. **Results** It was determined that the optimum extraction process for the addition was 10 times 85% ethanol for 90 minutes' extraction, the best purification process for the expansion agent cyclohexane-chloroform-acetone was 4:3:3, column height and diameter was 7:1, adsorbent and sample volume was 5.5:1. The content of two kinds of toad poison base purified was up to 66.51%. Through the verification of three batches of amplification process, it was shown that the model fit well, and the separation and purification of toad poison ligand by silicone column chromatography had the advantages of simple operation, fast separation speed, and good separation effect. **Conclusion** The selected process is reasonable and feasible, which provides technical reference and basis for the industrialization application of the product in the future.

**Key words:** *Bufois Venenum*; cinobufagin; resibufogenin; orthogonal test; Box-Behnken response surface methodology

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 的耳后及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工

干燥制成, 是我国常用的一味传统名贵中药。其性温、味辛, 有毒, 具有解毒、消肿、止痛、开窍醒神之功效<sup>[1-5]</sup>。近 10 余年来, 对于蟾酥有效成分的

收稿日期: 2018-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373660)

作者简介: 孙爱萍 (1991—), 女, 中药学硕士研究生, 主要研究方向为靶向制剂、药物新剂型、新技术研究。

Tel: 18364164770 E-mail: 1072532443@qq.com

\*通信作者 孙萍 (1966—), 女, 教授, 主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向靶向制剂、药物新剂型、新技术研究。

研究不断深入, 现代药学和临床医学研究显示蟾酥对肝癌、肺癌、胃癌、肠癌等多种恶性肿瘤均有非常好的疗效<sup>[6-9]</sup>。蟾酥中抗肿瘤活性成分主要为蟾毒配基类和吲哚生物碱类<sup>[10-11]</sup>, 其中蟾毒配基类主要包含华蟾酥毒基、脂蟾毒配基等成分, 关于其化学性质和药理作用已进行了很多研究。

星点设计属于多因素 5 水平的试验设计, 模型的预测性好, 并可通过三维效应面直观分析最优条件<sup>[12-13]</sup>。因此本研究选择华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 2 种蟾毒配基总量为指标成分, 通过正交试验优化蟾毒配基的提取工艺, 以 Box-Behnken 响应面分析法优化华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的纯化工艺, 旨在为其制剂工艺或质量安全等方面提供参考, 为后续制剂发展与研究奠定基础, 具有一定的应用价值。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; CP2250 分析天平, 奥豪斯国际贸易有限公司; KQ-500E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 0.22 μm 微孔滤膜, 天津市色谱科学技术公司。

### 1.2 试药

对照品华蟾酥毒基(批号 W16M9Z56140)、脂蟾毒配基(批号 C30S8G45143), 质量分数均 ≥98%, 上海源叶生物科技有限公司; 蟾酥, 购自山东中医药大学附属医院, 经山东中医药大学附属医院张学顺主任药师鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 耳后腺和皮肤腺分泌的白色浆液加工、干燥而成; 柱色谱用硅胶, 200~300 目, 青岛海洋化工有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 美国 Tedia 试剂公司; 实验用水为娃哈哈纯净水, 其余化学试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的 HPLC 定量测定

**2.1.1 色谱条件<sup>[14-15]</sup>** 色谱柱为 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(250 mm×460 mm, 5 μm); 以乙腈-0.5%磷酸二氢钾(50:50, 用磷酸调节 pH 值 3.2)为流动相; 检测波长 296 nm; 柱温 26 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 理论板数按华蟾酥毒基峰、脂蟾毒配基峰计算均不低于 4 000。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取华蟾酥毒基 2.84 mg、脂蟾毒配基 2.80 mg, 加甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 分别制成质量浓度为 113.6、112.0 μg/mL

的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 称取蟾酥原药材中粉适量, 按照实验设计的方法进行提取、纯化、干燥。精密称取提取纯化干燥后粉末 5.34 mg 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 称定质量, 超声至溶解, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

**2.1.4 专属性考察** 分别精密量取甲醇溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的保留时间分别为 8.3、9.7 min, 阴性无杂质峰干扰, 专属性好。结果见图 1。

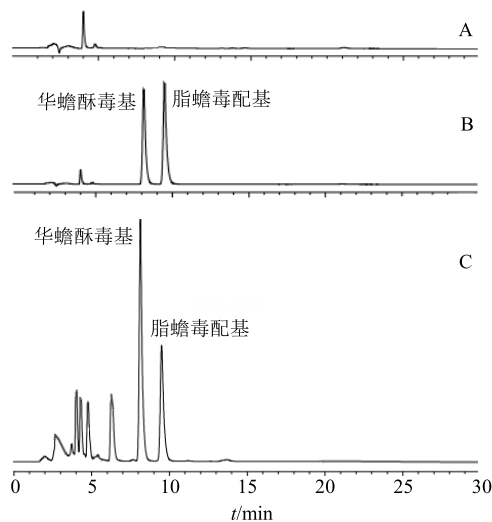


图 1 空白液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solution (A), mixed reference substances solution (B), and solution for test products (C)

**2.1.5 线性关系考察** 精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成一系列质量浓度的对照品溶液。精密吸取上述溶液分别进样, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 求得线性回归方程为华蟾酥毒基  $Y=14.13X+13.442$ ,  $r^2=0.9998$ , 脂蟾毒配基  $Y=15.466X-2.6466$ ,  $r^2=0.9998$ 。结果表明华蟾酥毒基在 113.6~113.60 μg/mL、脂蟾毒配基在 112.0~112.00 μg/mL 线性关系良好。

**2.1.6 精密度试验** 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 20 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 所测得的华蟾酥毒基峰面积的 RSD 为 0.14% ( $n=6$ ), 脂蟾毒配基对照品相应峰面积的 RSD 为 0.20% ( $n=6$ ), 表明仪器精密

度良好。

**2.1.7 稳定性试验** 精密吸取“2.1.3”项下的供试品溶液 20  $\mu$ L, 在 0、2、4、6、8、12、24 h 分别进样测定, 结果供试品溶液中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的 RSD 分别为 0.46%、0.33%, 结果表明供试品溶液在至少 24 h 内稳定性良好。

**2.1.8 重复性试验** 精密称取 6 份同一蟾酥提取纯化物样品, 每份 4.75 mg, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的 RSD 分别为 1.21%、0.92%, 表明方法重复性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 精密称取 6 份已测定的蟾酥纯化物粉末, 每份 0.10 mg, 分别精密加入与样品中含有量相当的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 结果华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的平均加样回收率为 98.92%~101.05%, RSD 分别为 1.37%、1.03%, 结果表明, 此色谱条件下 2 种蟾毒配基成分的加样回收率符合方法学要求。

## 2.2 单因素实验考察蟾毒配基提取工艺

影响加热回流提取工艺的主要因素有乙醇体积分数、溶剂倍数、提取时间和提取次数等<sup>[16-17]</sup>, 本研究以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量作为考察指标, 分别选取乙醇体积分数、溶剂倍数、提取时间、提取次数 4 个因素, 分别考察其对提取工艺的影响。

**2.2.1 乙醇体积分数考察** 称取蟾酥原料药中粉 20 mg, 分别加入 10 倍量不同体积分数(65%、75%、85%、95%、100%) 的乙醇, 提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 按“2.1”项下方法测定, 分别计算华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总量。结果分别为 9.41%、10.29%、11.55%、11.32%、11.26%。

**2.2.2 溶剂倍数考察** 称取蟾酥原料药中粉 20 mg, 分别加入不同倍量(6、8、10、12、15) 体积分数为 85% 的乙醇, 提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 按“2.1”项下方法测定, 分别计算华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总量。结果分别为 9.59%、10.32%、11.61%、11.65%、11.50%。结果显示, 10 倍量乙醇基本将蟾毒配基提取完全, 12 倍量与 10 倍量乙醇相比, 差距不明显。

**2.2.3 提取时间考察** 称取蟾酥原料药中粉 20 mg, 分别加入 10 倍量体积分数为 85% 的乙醇, 提取 2 次, 时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 h, 合并提取液, 按“2.1”项下方法测定, 分别计算华蟾酥毒

基和脂蟾毒配基的总量。结果分别为 10.03%、11.72%、12.79%、12.84%。

**2.2.4 提取次数考察** 称取蟾酥原料药中粉 20 mg, 分别加入 10 倍量体积分数为 85% 的乙醇, 提取不同次数(1、2、3), 每次 1 h, 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总量分别为 11.68%、12.91%、13.06%。结果显示, 提取 2 次比提取 1 次含量显著提高, 提取 3 次与提取 2 次相比, 含量提高并不显著, 从节约经济成本和时间角度考虑, 将提取次数定为 2 次。

## 2.3 正交试验优化蟾毒配基提取工艺

根据单因素实验考察结果, 选取乙醇体积分数(A)、溶剂倍数(B)、提取时间(C) 3 种因素作为自变量, 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总量作为因变量。在平行操作条件下, 按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 优选蟾酥醇提最佳工艺条件, 试验设计及分析结果见表 1、2。根据表 1、2 结果分析可知, A、B、C 3 个因素对蟾酥提取工艺的影响大小即为  $A > C > B$ , 即乙醇体积分数影响最大, 其次是提取时间, 而料液比的影响最小, 即最佳醇提工艺为  $A_2B_2C_3$ , 方差分析表明乙醇体积分数对试验结果具有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 其他 3 个因素对结果影响不显著, 考虑到工业化实际生产, 节约经济成本, 选择工艺为  $A_2B_1C_3$ , 即加入 10 倍量 85% 的乙醇, 提取 90 min。

## 2.4 单因素考察蟾毒配基的纯化工艺

参考文献报道可知<sup>[18-19]</sup>, 展开剂比例、柱高与直径比、上样量、体积流量对硅胶柱色谱纯化工艺有很大影响。本实验选取主要影响纯化工艺结果的展开剂比例(A)、柱高与直径比(B)、硅胶量(C) 为考察因素, 通过单因素考察并结合 Box-Behnken 响应面法, 优选出蟾毒配基的最佳纯化工艺。

**2.4.1 洗脱剂比例对纯化工艺的影响** 参照《中国药典》2015 年版选取环己烷-氯仿-丙酮作为洗脱剂, 取硅胶 5 份, 湿法装柱, 柱高与直径比 2:12, 按照吸附剂与上样量比为 5:1 称取拌样硅胶, 干法上样, 以环己烷-氯仿-丙酮 4:3:1、4:3:2、4:3:3、4:3:4、4:3:5 分别进行洗脱, 洗脱体积流量为 2.5 mL/min, 收集洗脱液, 蒸干, 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量分别为 49.32%、54.71%、57.33%、55.85%、50.82%。结果表明, 当丙酮用量逐渐增加时, 测得的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量是升高的, 但丙酮的用量超过一定比例时, 蟾毒配基总量会有所降低。

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Orthogonal test arrangement and results

试验号	A/%	B/倍	C/min	D(空白)	华蟾酥毒基/%	脂蟾毒配基/%	总量/%
1	75 (1)	10 (1)	30 (1)	(1)	5.57	3.41	8.98
2	75 (1)	12 (2)	60 (2)	(2)	5.93	3.72	9.65
3	75 (1)	15 (3)	90 (3)	(3)	6.46	4.32	10.78
4	85 (2)	10 (1)	60 (2)	(3)	6.82	4.71	11.53
5	85 (2)	12 (2)	90 (3)	(1)	7.56	5.33	12.89
6	85 (2)	15 (3)	30 (1)	(2)	6.33	5.65	11.98
7	95 (3)	10 (1)	90 (3)	(2)	6.99	5.17	12.16
8	95 (3)	12 (2)	30 (1)	(3)	6.27	4.77	11.04
9	95 (3)	15 (3)	60 (2)	(1)	6.25	4.44	10.69
$K_1$	29.41	32.67	32.00	32.56			
$K_2$	36.40	33.58	31.87	33.79			
$K_3$	33.89	33.45	35.83	33.35			
$R$	6.99	0.91	3.96	1.23			

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	$F$ 值	显著性
A	8.359 0	2	32.274 1	$P < 0.05$
B	0.161 5	2	0.623 6	
C	3.374 2	2	13.027 8	
D(空白)	0.259 0	2		

$$F_{0.05(2, 2)}=19.00 \quad F_{0.01(2, 2)}=99.00$$

**2.4.2 柱高与直径比对纯化工工艺的影响** 取硅胶 5 份, 湿法装柱, 柱高与直径比分别为 4:1、5:1、6:1、7:1、8:1。按吸附剂与上样量的比值为 5:1 称取拌样硅胶, 干法上样, 以环己烷-氯仿-丙酮(4:3:3)洗脱, 洗脱体积流量为 2.5 mL/min, 收集洗脱液, 蒸干, 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量分别为 55.32%、57.71%、60.55%、63.85%、64.02%。结果表明, 柱高与直径比越大, 相当于理论塔板数越高, 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基被吸附、解析的次数越多, 测得的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量是逐渐升高的, 分离效果越好。但柱高与直径比过大会造成溶剂耗费增加, 且耗时长, 因此考虑到综合消费比及实际生产问题, 选择柱高与直径比为 7:1 的柱子进行洗脱。

**2.4.3 上样量对纯化工工艺的影响** 取硅胶 5 份, 湿法装柱, 柱高与直径比为 2:14。按吸附剂与上样量的比值为 3:1、5:1、7:1、9:1、11:1, 称取拌样硅胶, 干法上样。以环己烷-氯仿-丙酮(4:3:3)洗脱, 洗脱体积流量为 2.5 mL/min, 收集洗

脱液, 蒸干, 甲醇定容, 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的总量分别为 57.13%、63.26%、65.64%、63.94%、60.34%。结果表明, 不同的上样量, 通过硅胶柱色谱所得的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的纯化产物总量不同, 当上样量与吸附剂的比值为 3:1~7:1 时, 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量显著增加, 但吸附剂与上样量比值超过 7:1 时, 测得蟾毒配基总量有所降低。

## 2.5 Box-Behnken 设计优化蟾毒配基的纯化工工艺

在单因素实验基础上, 以展开剂比例(丙酮占环己烷-氯仿-丙酮体系的比例, A)、柱高与直径比(B)、吸附剂与上样量的比值(C)作为自变量, 采用 Box-Behnken 响应面法设计对蟾酥中蟾毒配基纯化工工艺进行优化, 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量为响应值, 并绘制二维等高线图和三维效应面图。通过回归方程分析各工艺参数与响应值之间的关系, 并由此预测最佳的纯化工工艺条件。Box-Behnken 试验因素水平设计见表 3, Box-Behnken 试验设计及结果见表 3, 分析及回归模型系数显著性检验结果见表 4。

**2.5.1 Box-Behnken 试验结果分析** 利用 Design Expert 8.0 软件对表 3 的试验结果进行二次多元回归拟合, 得二次多项回归模型方程  $Y=66.32+0.46A-0.31B+1.19C+1.14AB+1.00AC+0.22BC-2.58A^2-2.67B^2-2.47C^2$ ,  $r^2=0.9852$ 。模型的  $R^2$  接近于 1, 说明通过二次回归得到的模型与试验拟合较好。同时, 响应面二次回归方程方差分析结果

表 3 蟾毒配基纯化工艺优化 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Design and results of optimized Box-Behnken test for purification process of toad venom ligand

试验号	A/%	B	C	蟾毒配基总量/%	试验号	A/%	B	C	蟾毒配基总量/%
1	3 (0)	14 : 2 (0)	5 : 1 (0)	66.57	10	3 (0)	14 : 2 (0)	5 : 1 (0)	66.73
2	4 (1)	14 : 2 (0)	7 : 1 (1)	64.32	11	3 (0)	14 : 2 (0)	5 : 1 (0)	66.28
3	3 (0)	12 : 2 (-1)	7 : 1 (1)	62.18	12	4 (1)	12 : 2 (-1)	5 : 1 (0)	60.57
4	2 (-1)	14 : 2 (0)	7 : 1 (1)	61.37	13	2 (-1)	12 : 2 (-1)	5 : 1 (0)	61.98
5	3 (0)	14 : 2 (0)	5 : 1 (0)	66.03	14	3 (0)	12 : 2 (-1)	3 : 1 (-1)	61.02
6	3 (0)	16 : 2 (1)	3 : 1 (-1)	59.75	15	4 (1)	14 : 2 (0)	3 : 1 (-1)	59.17
7	4 (1)	16 : 2 (1)	5 : 1 (0)	62.43	16	3 (0)	16 : 2 (1)	7 : 1 (1)	61.77
8	3 (0)	14 : 2 (0)	5 : 1 (0)	65.97	17	2 (-1)	16 : 2 (1)	5 : 1 (0)	59.28
9	2 (-1)	14 : 2 (0)	3 : 1 (-1)	60.21					

表 4 分析及回归模型系数显著性检验结果

Table 4 Analysis and regression model coefficient significant test results

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	116.60	9	12.96	51.67	<0.000 1	A <sup>2</sup>	28.06	1	28.06	111.93	<0.000 1
A	1.67	1	1.67	6.64	0.036 6	B <sup>2</sup>	30.00	1	30.00	119.65	<0.000 1
B	0.79	1	0.79	3.17	0.118 4	C <sup>2</sup>	25.62	1	25.62	102.18	<0.000 1
C	11.26	1	11.26	44.90	0.000 3	残差	1.76	7	0.25		
AB	5.20	1	5.20	20.73	0.002 6	失拟项	1.32	3	0.44	4.00	0.106 9
AC	3.98	1	3.98	15.87	0.005 3	纯误差	0.44	4	0.11		
BC	0.18	1	0.18	0.74	0.418 9	总值	118.35	16			

显示, 模型  $F=51.67$ ,  $P<0.000 1$ , 表示采用的二次模型具有极显著性差异, 预测性高<sup>[20-21]</sup>。失拟项  $P=0.106 9$  ( $P>0.05$ ), 不显著, 因此二次模型成立。

**2.5.2 影响蟾酥纯化的主要因素分析** 蟾毒配基总量模型 ( $Y$ ) 回归方程的方差分析表明, C、AB、AC、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 项达极显著水平 ( $P<0.01$ ), A 项达显著水平 ( $P<0.05$ ), B 项和 BC 和的  $P$  分别为 0.118 4 和 0.418 9, 均大于 0.05, 所以 B 项和 BC 项对纯化华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的工艺没有显著性影响。由  $F$  值大小可以推断, 在所选择的实验范围内, 3 个因素对蟾酥纯化工艺影响的排序为吸附剂与上样量的比值 (C) > 展开剂比例 (A) > 柱高与直径比 (B), 响应面所对应的二维等高线图及三维效应图分别见图 2。

**2.5.3 响应面预测与工艺验证** 应用 Design-Expert 8.0 软件设计考察指标华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量 ( $Y$ ) 最大, 经软件优化后得到的最佳纯化工艺为丙酮所占比例为 3.14, 柱高与直径比为 6.98, 吸附剂与上样量的比为 5.53。综合考虑实际生产条件需要, 确定最佳工艺为环己烷-氯仿-丙酮 4 : 3 :

3、柱高与直径比为 7 : 1, 吸附剂与上样量比值为 5.5 : 1。为了进一步验证纯化工艺稳定性和可行性, 按上述最佳条件进行 3 次验证试验, 具体结果见表 5。由结果可知测定值与预测值接近, RSD 为 0.98%, 表明模型合理可靠, 预测性好, 可以采用此工艺对华蟾酥毒基和脂蟾毒配基。

### 3 讨论

本研究采用 HPLC 法对华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量进行测定, 在色谱条件中柱温选择 26 °C, 而《中国药典》2015 年版规定柱温为 40 °C。经过前期的多次预试验, 柱温设定 40 °C 的条件下, 色谱峰之间分离度不好, 且杂峰较多。经过多次摸索, 最终选择柱温为 26 °C 实验条件下, 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的色谱峰分离度较好, 且峰形良好。

华蟾酥毒基和脂蟾毒配基成分属于脂溶性物质难溶于水, 可溶于有机溶剂, 预试验中考察不同提取溶剂 (甲醇、乙醇) 和提取方法 (加热回流提取、超声波提取、浸提法), 结果乙醇为提取溶剂进行加热回流提取效果最佳。另外, 药材经过多次提取之后所得含量逐渐减少, 一般 2~3 次, 考虑到实际生

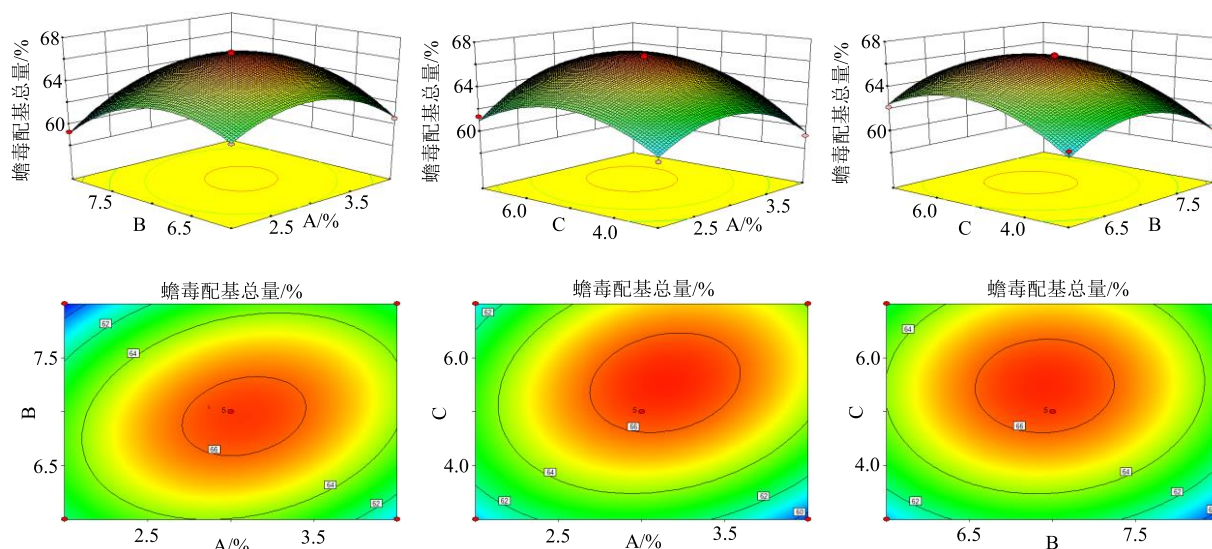


图 2 蟾毒配基纯化工艺优化三维响应面图和二维等高线图

Fig. 2 Optimization of three-dimensional response surface and contour plots for purification process of toad poison ligand

表 5 验证试验结果 (n = 3)

Table 5 Validation test results (n = 3)

编号	预测值/%	测定值/%	偏差/%	RSD/%
1	66.51	65.76	0.75	
2	66.51	66.13	0.38	0.98
3	66.51	67.02	0.51	

产及经济成本, 选择提取 2 次为宜。因此, 本实验固定对蟾酥原料药提取 2 次, 确定影响提取华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量的考察因素分别为乙醇体积分数、溶剂倍量和提取时间, 以提取液中华蟾毒配基和脂蟾毒配基总量为指标进行正交试验, 最终确定最佳提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, 即加入 10 倍量 85% 的乙醇, 提取时间为 90 min。本实验结果表明乙醇体积分数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。

蟾酥经醇提所得的醇提液成分复杂、杂质较多, 而蟾酥中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量则相对较低, 因此对蟾酥提取液中有效成分进行纯化尤为关键<sup>[19]</sup>。本研究采用 Box-Behnken 响应面法, 对蟾酥中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的硅胶柱色谱纯化工艺进行优化, 得到最优工艺: 环己烷-氯仿-丙酮 4 : 3 : 3、柱高与直径比为 7 : 1, 吸附剂-上样量为 5.5 : 1, 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基总量为 66.30%, 与预测值 66.51% 接近, 表明模型拟合度良好。并且采用硅胶柱色谱分离纯化脂蟾毒配基, 具有操作简

便、分离速度快、分离效果好、封闭操作有机溶剂挥发少等优点, 易于实现工业化生产<sup>[21]</sup>。

参考文献

- [1] Liang Y, Liu A, Qin S, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetics of five bufadienolides in rat plasma after oral administration of Chansu extract by SPE-HPLC method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 442-448.
- [2] Kim J S, Jeong T Y, Cho C K, *et al.* Antitumor effect of skin of *Venenum bufonis* in a NCI-H460 tumor regression model [J]. *J Acupunct Merid Study*, 2010, 3(3): 181-187.
- [3] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3185-3189.
- [4] 袁旭江, 袁梦泓, 沈嘉茵, 等. 正交法优化蟾酥酒炮制工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(6): 46-49.
- [5] 刘冬, 杜守颖, 何秀峰, 等. 蟾酥中 3 种脂溶性有效成分提取工艺及含量测定方法 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(3): 69-72.
- [6] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [7] 张振海, 王晋艳, 陈彦, 等. 不同品种及产地蟾皮中抗肿瘤活性成分含量比较 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(11): 2698-2701.
- [8] 王佳宝, 徐忠伟, 王志美, 等. 蟾酥活性成分下调极光激酶表达并促进肝癌细胞周期阻滞的机制研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3796-3801.
- [9] 陈瀛澜, 郭夫江, 卞雪莲, 等. 蟾酥干燥炮制前后化学成分和药效学变化考察 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1816-1822.
- [10] 左其艳, 赵彦敏, 李振麟, 等. 中药蟾酥的研究概况

- [J]. 人参研究, 2017, 13(11): 48-51.
- [11] 马 丽, 陈家仪, 陈 稚, 等. 星点设计-响应面法优选枳实总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 33-36.
- [12] 张素娟, 张永太, 申利娜, 等. 蟾酥提取工艺优化与提取物体外抗肿瘤活性研究 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(5): 93-97.
- [13] 王 博, 李洪起, 连潇嫣, 等. 星点设计-效应面法优化阿德福韦- $\beta$ -环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.
- [14] 裴月梅. 高效液相色谱法测定救心滴丸中的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 526-528.
- [15] 刘小英, 刘 昕, 陈笑天, 等. HPLC 法同时测定不同产地蟾酥中的 5 种活性成分 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 760-762.
- [16] 潘 晴, 孙京海, 李卫国, 等. 响应面法优化女贞子三萜酸的提取工艺 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(13): 1093-1097.
- [17] 杜会茹, 黄文杰, 蒋翠岚, 等. 厚朴酚中压硅胶柱层析纯化工艺的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 835-837.
- [18] 唐晓霞, 贾燕丽, 田 港, 等. 干蟾皮中酯蟾毒配基和华蟾酥毒基的纯化及其体外抗结肠癌活性的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(9): 2243-2245.
- [19] Arshadi M, Mousavi S M. Enhancement of simultaneous gold and copper extraction from computer printed circuit boards using *Bacillus megaterium* [J]. *Biores Technol*, 2015, 175(1): 315-324.
- [20] 李 颖, 纪 莎, 高锦娟, 等. 星点设计-效应面法优化复方巴戟天生骨颗粒提取工艺 [J]. 中药材, 2014, 37(10): 1863-1867.
- [21] 姜瑞清, 周 琳, 黎继烈, 等. 硅胶柱层析纯化花生根中白藜芦醇工艺研究 [J]. 食品科技, 2010, 35(1): 199-202.