

· 中药工业 ·

响应面法优化干蟾皮的提取工艺[△]

赵旭*, 汪坤, 王楠斐

(河南省中医院, 河南 郑州 450002)

[摘要] 目的: 优选干蟾皮的提取工艺条件。方法: 采用回流提取法提取干蟾皮, 以华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的总量为考察指标, 运用响应面法的设计, 考察乙醇浓度、液料比、提取时间对提取工艺的影响。结果: 优化的提取工艺条件为乙醇浓度为 88.64%, 液料比为 12:1, 提取时间为 1.49 h, 在该优化条件下, 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基的总量为 2.24 mg。结论: 该优化工艺简便、预测性良好, 可以为干蟾皮的开发提供参考。

[关键词] 干蟾皮; 响应面法; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基

Optimization of Extraction Craft Bufo Corium by Using Box-Behnken Response Surface Method

ZHAO Xu*, WANG Kun, WANG Nanfei

(He Nan Province Hospital of TCM, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction process of craft bufo. **Methods:** The refluxing process was applied, the amount of cinobufagin and resibufogenin was used as response value, box-Behnken response surface method was employed to investigate the influence of ethanol concentration, extraction time and the amount of alcohol added on the extraction process of craft bufo. **Results:** The optimized extraction technology was: extracted 2 times with 12 times the amount of 88.64% ethanol; 1.49 hours per time. Under the optimized conditions, the total amount of cinobufagin and resibufogenin was 2.24 mg. **Conclusion:** The optimized extraction process is simple and predictable, can provide a reference basis for production.

[Keywords] Bufo curium; Box-Behnken Response Surface Method; cinobufagin; resibufogenin

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.020

干蟾皮为蟾蜍科动物中华蟾蜍 *Bufo gargarizans Cantor* 的干燥皮, 具有清热解毒、利尿消肿的功能, 适用于痈疽肿毒、痞积腹胀、瘰疬肿瘤等症^[1]。近年来干蟾皮用于多种癌症或配合化疗, 可以减轻癌性疼痛, 改善血常规, 作用显著。

研究表明, 干蟾皮中主要含有蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物及蟾毒色胺类及甾醇类, 生理活性物质主要是蟾蜍毒素及水解产物蟾毒配基^[2]。目前干蟾皮的主要提取方法有超声提取法^[3]、加热回流提取法^[4]、室温浸渍法等, 提取工艺的设计主要为单因素试验法和正交设计试验法^[5]。响应面试验法是目前中药制剂生产工艺研究常用的方法之一, 尤其适宜多指标、复杂成分提取工艺的优选^[6-7]。本研究运用响应面法进行试验设计, 优选干蟾皮加热回流提取工艺, 为开发利用干蟾皮提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Aglient-1260 高效液相色谱仪; AE240 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药

干蟾皮购于亳州药材市场, 经河南省中医院黄小敏副主任中药师鉴定为蟾蜍科动物中华蟾蜍 *Bufo gargarizans Cantor* 的干燥皮。华蟾酥毒基对照品、酯蟾毒配基对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110803-200605, 110718-201108); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为娃哈哈饮用纯净水。

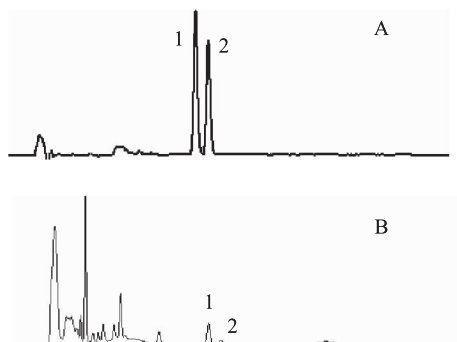
[△] [基金项目] 河南省科技公共计划项目(132102310243)

* [通信作者] 赵旭, 副主任中药师, 研究方向: 医院制剂研究; Tel: (0371)60908883, E-mail: 13592533250@139.com

2 方法与结果

2.1 华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量测定方法

2.1.1 色谱条件 AgilentTC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液 (50:50); 检测波长为 293 nm; 柱温为 40 ℃; 流速为 1 mL·min⁻¹。理论塔板数以华蟾酥毒基计算 > 2000。标准品溶液、供试品溶液色谱图如图 1。



注: A. 标准品; B. 供试品; 1. 华蟾酥毒基;
2. 酯蟾毒配基。

图 1 干蟾皮 HPLC 图

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取华蟾酥毒基、酯蟾毒配基标准品置于 10 mL 容量瓶中, 加色谱甲醇定容, 华蟾酥毒基质量浓度为 53 μg·mL⁻¹, 酯蟾毒配基质量浓度为 54 μg·mL⁻¹。精密量取华蟾酥毒基对照品溶液 4 mL, 酯蟾毒配基对照品溶液 1 mL, 混匀即为混合标准品溶液。

2.1.3 供试品溶液配制 称取干蟾皮 2 g, 按照正交试验设计的条件加热回流提取, 滤纸过滤, 收集提取液, 水浴挥干后用色谱甲醇定容至 50 mL 容量瓶中, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 摇匀, 即得。

2.1.4 方法学考察 标准曲线的制备: 进样华蟾酥毒基、酯蟾毒配基混合对照品 2、4、6、8、10、12 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得华蟾酥毒基回归方程: $Y = 513.47X - 0.0607 (r = 0.0999)$, 线性范围为 0.085 ~ 0.509 μg; 酯蟾毒配基回归方程: $Y = 422.91X - 0.3187 (r = 0.9992)$, 线性范围为 0.022 ~ 0.1309 μg。

精密度试验: 取华蟾酥毒基、酯蟾毒配基混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 1.88%、1.07%, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 称取干蟾皮 2 g, 按照供试品溶液制备方法制备样品 (10 倍量 90% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h), 分别放置 0、2、4、6、8 h 后进样, 进样量 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积的 RSD 分别为 2.14%、2.37%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

重复性试验: 称取干蟾皮 6 份, 每份 2 g, 按照供试品溶液制备方法制备样品 (10 倍量 90% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h), 分别进样 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量平均数分别为 1.650、0.468 μg, 总量平均数为 2.12 μg, RSD 值为 2.96%, 表明该方法重复性良好。

加样回收率试验: 称取干蟾皮 6 份, 每份 0.5 g, 分别加入华蟾酥毒基对照品溶液 (0.55 mg·mL⁻¹) 3 mL、酯蟾毒配基对照溶液 (0.23 mg·mL⁻¹) 2 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量测定的加样回收率试验 ($n = 6$)

成分	样品重量/g	样品中含量/mg	加入标准品量/mg	测得量/mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
华蟾酥	2.001	1.651	1.65	3.296	99.7		
毒基	2.008	1.657	1.65	3.323	101		
酯蟾毒	2.002	1.652	1.65	3.287	99.1	98.43	1.97
配基	2.006	1.655	1.65	3.275	98.2		
	2.013	1.661	1.65	3.265	97.2		
	2.005	1.654	1.65	3.228	95.4		
酯蟾毒	2.001	0.468	0.46	0.911	96.3		
配基	2.008	0.470	0.46	0.911	95.9		
毒基	2.002	0.468	0.46	0.923	98.8	98.93	2.49
	2.006	0.469	0.46	0.940	102.3		
	2.013	0.471	0.46	0.929	99.6		
	2.005	0.469	0.46	0.932	100.7		

2.2 提取工艺优选

在预实验的基础上, 固定提取次数为 2 次, 选择乙醇浓度、液料比、提取时间为自变量, 以华蟾酥毒基、酯蟾毒配基总量为响应值, 设计三因素三水平中心复合试验, 因素水平表见表 2。称取干蟾

皮,按照设计方案提取,按 2.1.3 项下制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量,试验安排及结果见表 3。采用 Design Expert 8.06 软件对所得的数据进行回归分析,结果见表 4。

表 2 提取工艺中心复合试验因素水平

水平	A 乙醇浓度(%)	B 提取时间/h	C 液料比
-1	85	1	8:1
0	90	1.5	10:1
1	95	2	12:1

表 3 响应面试验方案及分析结果

编号	A (%)	B/h	C	华蟾酥毒基提取量/mg	酯蟾毒基提取量/mg	总量/mg
1	85	1	10:1	1.32	0.32	1.64
2	95	1	10:1	1.36	0.40	1.76
3	85	2	10:1	1.51	0.34	1.85
4	95	2	10:1	1.27	0.35	1.66
5	85	1.5	8:1	1.59	0.40	1.99
6	95	1.5	8:1	1.43	0.38	1.81
7	85	1.5	12:1	1.68	0.50	2.18
8	95	1.5	12:1	1.50	0.31	1.81
9	90	1	8:1	1.54	0.28	1.82
10	90	2	8:1	1.41	0.51	1.92
11	90	1	12:1	1.51	0.57	2.08
12	90	2	12:1	1.47	0.43	2.00
13	90	1.5	10:1	1.62	0.62	2.24
14	90	1.5	10:1	1.66	0.41	2.07
15	90	1.5	10:1	1.69	0.44	2.13
16	90	1.5	10:1	1.62	0.47	2.09
17	90	1.5	10:1	1.66	0.49	2.15

经 Design Expert 8.06 软件拟合得总评分 Y 对提取时间、提取次数、加水量的二次多项回归方程:
 $Y = 2.14 - 0.078A + 0.016B + 0.066C - 0.078AB - 0.048AC - 0.045BC - 0.21A^2 - 0.20^2 + 0.020C^2$ 。

由表 4 可知模型回归 P 值为 0.006 7,说明模型回归显著可靠;失拟误差 P 值为 0.200 2 > 0.05,失拟度不明显,说明该方程拟合度较高,该模型可以预测干蟾皮提取工艺过程。

表 4 回归系数的显著性检验

方差来源	SS	df	MS	F	P
Model	0.500	9	0.055	7.72	0.006 7
A	0.048	1	0.048	6.71	0.036 0
B	0.002	1	0.002	0.26	0.604 0
C	0.035	1	0.035	4.90	0.042 4
AB	0.024	1	0.024	3.35	0.109 7
AC	0.009	1	0.009	1.26	0.298 7
BC	0.008	1	0.008	1.13	0.322 9
A ²	0.180	1	0.180	25.43	0.001 5
B ²	0.170	1	0.170	23.63	0.001 8
C ²	0.001	1	0.001	0.22	0.650 8
残差	0.050	7	0.007		
失拟误差	0.033	3	0.011	2.48	0.200 2
纯误差	0.018	4	0.004		
总合	0.550	16			

乙醇浓度、液料比、乙醇浓度的平方、提取时间的平方对综合评分的影响较显著($P < 0.05$),在三个因素之间,乙醇浓度对试验结果的影响最大。

根据二次多项式方程,分别绘制各指标与响应值交互项的响应曲面图,用来确定各因素对干蟾皮提取工艺的影响,结果见图 2~4。

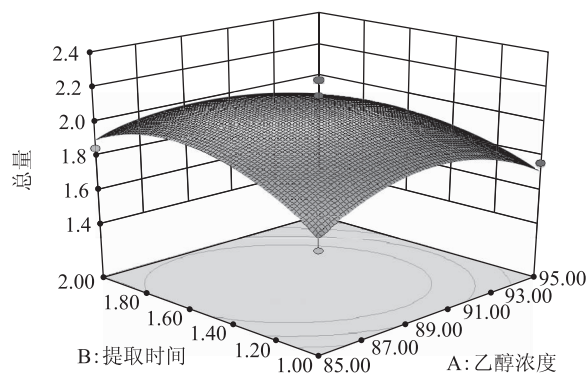


图 2 提取时间与乙醇浓度交互作用的响应面图

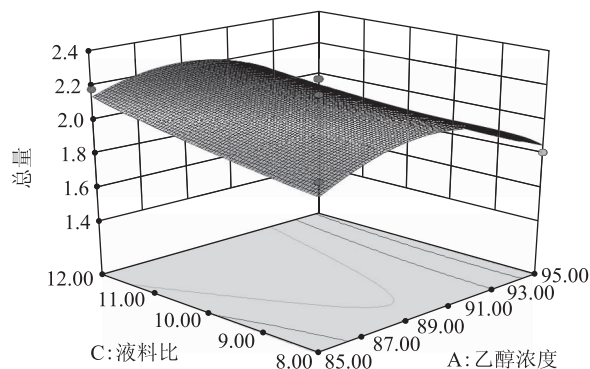


图 3 液料比与乙醇浓度交互作用的响应面图

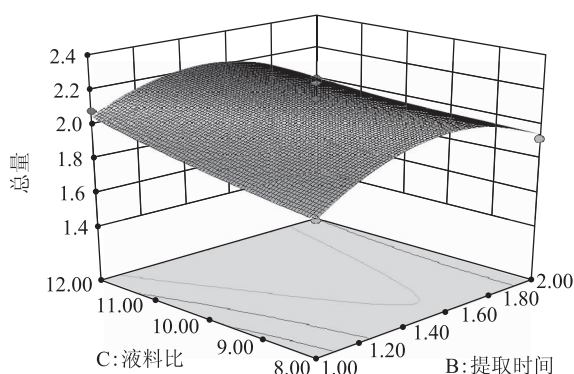


图4 液料比与提取时间交互作用的响应面图

通过 Design Expert 8.06 软件计算并分析得到的各因素的最优条件: 88.64% 的乙醇提取 2 次, 每次 1.49 h, 液料比为 12:1, 预测华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量总量为 2.24 mg。

2.3 验证性试验

取同一批干蟾皮, 精密称取 3 份, 每份 2 g, 按照优选的提取工艺进行提取, 计算华蟾酥毒基、酯蟾毒配基平均含量总量为 2.28 mg, RSD 值为 2.13%, 与预测值偏差较小, 说明优选的提取工艺稳定可靠。

3 讨论

干蟾皮具有明确的抗癌作用, 对其药效成分进行有效提取并开发利用具有实用价值。响应面法目前广泛应用于中药提取工艺研究^[8-10], 其分析方法直观、精密度高、预测性好。

本研究在预实验的基础上首先固定提取次数为 2 次, 通过响应面法分析乙醇浓度、提取时间、液料比 3 个因素对干蟾皮提取工艺的影响, 模拟的二

次项方程通过回归和检验分析都具有很好的拟合性和有效性, 表明此方程具有可预测性, 最终确定干蟾皮提取工艺的条件为 88.64% 的乙醇提取 2 次, 每次 1.49 h, 液料比为 12:1。该研究可以为干蟾皮的提取开发提供参考。

参考文献

- [1] 黄玉叶, 宋霄宏. 干蟾皮的提取和含量测定及临床应用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1636-1638.
- [2] 王元清, 严建业, 喻林华. 干蟾皮的化学成分与临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1213-1214.
- [3] 张国平, 张晓萍, 张晓媛, 等. 干蟾皮中蟾蜍毒素的超声提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1904-1905.
- [4] 咎日增, 胡万杨, 黄玉叶, 等. 干蟾皮中蟾毒内酯类成分的提取工艺研究[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1330-1333.
- [5] 严子平, 彭国宇, 张莉, 等. 多指标综合评价优选干蟾皮脂溶性成分提取工艺[J]. 解放军药学学报, 2012, 28(5): 400-403.
- [6] 吴秋月, 陈鹏, 仲月明, 等. 响应面法优化提取银杏雄株叶片聚戊烯醇的工艺研究[J]. 中成药, 2013, 35(2): 267-272.
- [7] 黄聪华, 丁利君, 马源源, 等. 芒莢总皂苷提取的响应面优化[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 54-56.
- [8] 符少莲, 冯翠娟, 李沙. 星点设计-效应面法优化脂溶性丹参提取物速释滴丸处方工艺[J]. 中成药, 2013, 35(4): 690-695.
- [9] 李玄, 沙跃, 张宇燕, 等. 响应面分析法优化脑络安胶囊提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 11.
- [10] 白璐, 贺文娟, 崔春利, 等. Box - Behnken 响应面法优化延胡索配方颗粒的提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(1): 1-4.

(收稿日期 2016-04-05)