

# 正交试验优选蕲蛇煎煮工艺

柴士伟\*,董改英,瞿晶田,王 然(天津中医药大学第一附属医院药学部,天津 300193)

中图分类号 R283;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3569-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.37

**摘要** 目的:对蕲蛇的水煎煮工艺进行优化。方法:采用柱前衍生化反相高效液相色谱法。以蕲蛇中4种主要氨基酸的总含量为指标,对蕲蛇的水煎煮工艺(煎煮次数、加热时间、加水量、药材粉碎粒度)进行正交试验优化并进行验证。结果:蕲蛇水煎煮的最优工艺为煎煮次数3次、加热时间60 min、0.90 g药材加水量50 ml、粉末过6号筛。验证试验结果表明,该工艺条件下4种氨基酸的总提取量为72.68 mg/g(RSD=3.77%, $n=3$ )。结论:该工艺稳定、可行,可用于蕲蛇的煎煮。

**关键词** 蕲蛇;氨基酸;反相高效液相色谱法;柱前衍生化;水煎煮;工艺优化;正交试验

## Optimization of Decoction Process of Agkistrodon by Orthogonal Experiment

CHAI Shi-wei, DONG Gai-ying, QU Jing-tian, WANG Ran (Dept. of Pharmacy, the First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the decoction process of agkistrodon. METHODS: RP-HPLC with pre-column derivatization was adopted. With the contents of 4 main amino acids in agkistrodon as index, the decoction process (decocting times, heating time, water quantity and medicinal material crushing granularity) was optimized by orthogonal tests and verified. RESULTS: The optimal technology of the decoction process of agkistrodon was as 3 times of decoction, 60 min of heating time, 50 ml of water consumption for 0.90 g medicinal material and No.6 sieve. The results of verification test showed the total extraction of 4 kinds of amino acids was 72.68 mg/g (RSD=3.77%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The decoction technology can be used for the decoction process of agkistrodon, and it is stable and feasible.

**KEYWORDS** Agkistrodon; Amino acids; RP-HPLC; Pre-column derivatization; Water decoction; Technology optimization; Orthogonal experiment

蕲蛇之名首见于李时珍的《本草纲目》中,为蝮科动物五步蛇 *Agkistrodon acutus* (Güenther) 的干燥体,性甘,味咸,有毒,归肝经;具有祛风、通络、止痉的功效,用于治疗风湿顽痹、麻木拘挛、中风、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风、疥癣等<sup>[1]</sup>。蕲蛇是我国传统名贵中药材之一,药用资源短缺,价格较高。2010年版《中国药典》采用聚合酶链式反应法作为其鉴别方法,但对含量测定方法尚未涉及。笔者在本文中采用酸水解柱前异硫氰酸苯酯(PITC)衍生化的方法,建立蕲蛇中4种主要氨基酸的反相高液相色谱检测方法,并以这4种氨基酸的总含量为指标,对蕲蛇水煎煮工艺进行优化,以期较大程度地提取蕲蛇中有效成分,使这一宝贵的资源得到更合理的应用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪、G1314B型紫外-可见检测器(美国安捷伦科技有限公司);超声清洗器(杭州汇尔仪器设备有限公司);AL104型电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团有限公司);氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);优普超纯水系统(西安优普仪器设备有限公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

蕲蛇样品[河北美威药业股份有限公司提供,批号:140201,产地:浙江;经我院主管药师李明老师鉴定为蕲蛇 *Agkistrodon acutus* (Güenther)];天冬氨酸对照品(批号:140624-200805,纯度:100%)、谷氨酸对照品(批号:140624-200805,纯

\*主管药师,硕士。研究方向:临床中药学。电话:022-27432768。E-mail:chaishiwei791109@sina.com

度:99.5%)、L-羟脯氨酸对照品(批号:111578-200201,纯度:99.5%)、甘氨酸对照品(批号:140624-200805,纯度:100%)均来自于中国食品药品检定研究院;水为超纯水,甲醇和乙腈为色谱纯,PITC及其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:以0.1 mol/L醋酸钠溶液-乙腈(97:3)为流动相A(用冰醋酸调节pH至6.5),以乙腈-水(4:1)为流动相B,梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:43 ℃;进样量:10 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution programme

时间, min	流动相A, %	流动相B, %	时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0→11	100→93	0→7	14→29	85→66	15→34
11→13.9	93→88	7→12	29→30	66→0	34→100
13.9→14	88→85	12→15	30→45	0	100

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 4种氨基酸对照品贮备液的制备 精密量取4种氨基酸对照品置于量瓶中,用0.1 mol/L盐酸溶液制备成每1 ml分别含天冬氨酸212 μg、谷氨酸288 μg、L-羟脯氨酸332 μg、甘氨酸636 μg的混合对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取蕲蛇原药材,粉碎,精密称定,置于100 ml圆底烧瓶中,加水,称定质量,回流提取加热(煎煮)一定时间,放冷,称质量,用水补足减失质量,重复煎煮1~

3次。精密量取提取液5 ml,置于10 ml高温水解管中,加入6 mol/L盐酸5 ml,混匀,充入氮气后密封,于150 ℃水解1 h,放冷,移入蒸发皿中,用10 ml水分次洗涤水解管,洗液并入蒸发皿中,水浴蒸干。残渣加0.1 mol/L盐酸溶解,转移至10 ml量瓶中,加0.1 mol/L盐酸稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 空白溶液制备 精密量取水5 ml,置于10 ml高温水解管中,取6 mol/L盐酸溶液5 ml,按“2.2.2”项下方法自“充入氮气后密封,于150 ℃水解1h”起操作,即得。

2.2.4 PITC衍生物的制备 取上述空白溶液、4种氨基酸混合对照品贮备液和供试品溶液各0.4 ml,分别置于1.5 ml离心管中,加入0.1 mol/L PITC的乙腈溶液0.2 ml、1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液0.2 ml,漩涡混合30 s,室温放置1 h后,加入0.8 ml正己烷,涡旋混合30 s后,放置10 min,取下层溶液,滤过,即得。

### 2.3 系统适用性试验

在选定的色谱条件下分析,结果4种氨基酸衍生物峰与其他相邻峰分离度均大于1.5;按L-羟脯氨酸衍生物峰计算,理论板数均在4 000以上。空白溶液、4种氨基酸对照品和正交试验9号供试品衍生物的高效液相色谱图见图1。

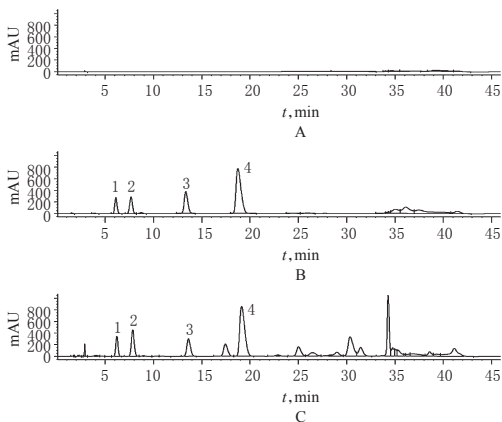


图1 高效液相色谱图

A.空白溶液;B.4种氨基酸对照品衍生溶液;C.供试品衍生溶液;1.天冬氨酸;2.谷氨酸;3.L-羟脯氨酸;4.甘氨酸

Fig 1 HPLC chromatogram

A. blank solution; B. reference solution of 4 kinds of amino acids by derivation; C. test solution by derivation; 1.aspartic acid; 2.glutamate; 3. L-hydroxyproline; 4.glycine

### 2.4 线性关系考察及氨基酸含量测定方法

分别精密吸取天冬氨酸等4种氨基酸对照品贮备液0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5 ml,分别置于10 ml量瓶中,加0.1 mol/L盐酸至刻度,摇匀。按“2.2.4”项下衍生化方法处理后,分别吸取上述溶液10 μl注入液相色谱仪中,测定峰面积,以4种氨基酸对照品质量浓度( $x$ , μg/ml)为横坐标、相应峰面积( $y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得到4种氨基酸的回归方程、相关系数及线性范围。而后按“2.2.4”项下衍生化方法对蕲蛇供试品溶液进行处理,测定各氨基酸衍生化峰面积,依据4种氨基酸的回归方程,计算各氨基酸的含量。线性关系考察结果见表2。

### 2.5 精密度试验

取蕲蛇原药材,粉碎,过3号筛,精密称定0.30 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每次进样10 μl,重复进样6次,测定天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸、甘氨酸的峰面积,结果RSD分别为0.29%、0.20%、0.41%、0.86%( $n=6$ ),表明本方法精密度

良好。

表2 4种氨基酸的线性关系考察

Tab 2 Linear relationship of 4 kinds of amino acids

对照品	回归方程	$r$	线性范围, μg/ml
天冬氨酸	$y=29.030x-5.2498$	1.0000	2.12~159
谷氨酸	$y=27.102x-44.902$	0.9998	2.88~216
L-羟脯氨酸	$y=39.214x+11.433$	1.0000	3.32~249
甘氨酸	$y=58.493x-77.451$	1.0000	6.36~477

### 2.6 稳定性试验

取蕲蛇原药材,粉碎,过3号筛,精密称定0.30 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别放置0、8、16、24、32、48 h时对供试品溶液进行衍生化,进样10 μl,测定天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸的峰面积,其RSD分别为1.80%、1.13%、0.48%、0.68%( $n=6$ ),表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

### 2.7 重复性试验

取蕲蛇原药材,粉碎,过3号筛,精密称定0.30 g,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定样品中天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸含量,结果分别为0.61%、1.05%、0.61%、1.72%,RSD分别为0.50%、0.81%、0.77%、1.06%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.8 回收率试验

取蕲蛇原药材,粉碎,过3号筛,精密称定0.15 g,共6份,加入4种氨基酸对照品贮备液5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,经衍生化后测定各氨基酸的含量,计算回收率。结果,天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸的平均回收率分别为94.42%、93.62%、98.13%、96.18%,RSD分别为3.27%、2.13%、2.20%、5.02%( $n=6$ )。结果表明,本方法准确度较好。

### 2.9 蕲蛇水煎煮工艺的优化

取蕲蛇原药材,粉碎,精密称定0.90 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别测定原药材中4种氨基酸的含量。以4种氨基酸的总含量为指标,对蕲蛇水煎煮工艺进行优化。根据预试验结果,选择煎煮次数、加热时间、加水量和药材粉碎粒度为4因素,各取3水平进行正交试验。因素与水平见表3,试验安排与结果见表4,方差分析见表5。

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素			
	A(煎煮次数)	B(加热时间),min	C(加水量),ml	D(粉碎粒度)
1	1	20	30	饮片
2	2	40	50	3号筛
3	3	60	70	6号筛

通过上述正交试验结果及方差分析可以看出,煎煮次数、加热时间、加水量和粉碎粒度对4种氨基酸的煎出总量都有非常显著的影响。但是当加水量由50 ml增加到70 ml时,4种氨基酸的煎出总量却降低。因此,蕲蛇水煎煮的最优工艺为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即煎煮次数为3次、加热时间为60 min、加水量为50 ml、粉碎粒度为过6号筛。

据此,进行了蕲蛇水煎煮工艺验证试验。取蕲蛇样品,过6号筛,精密称定9.00 g,共3份,煎煮3次,加热时间为60 min,加水量为500 ml。按“2.2.2”项下方法自“补足减失质量”起操作制备供试品溶液。按此条件测得蕲蛇水煎煮液中天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸的平均提取含量分别为14.70、25.14、8.47、24.37 mg/g,提取总含量为72.68 mg/g,RSD

表4 正交试验安排与结果( $n=3, \text{mg/g}$ )Tab 4 Arrangement and results of orthogonal tests ( $n=3, \text{mg/g}$ )

序号	A	B	C	D	天冬氨酸 含量	谷氨酸 含量	L-羟脯氨酸 含量	甘氨酸 含量	总含量
1	1	1	1	1	2.57	5.37	1.50	5.62	15.06
2	1	2	2	2	9.41	17.02	7.31	20.04	53.78
3	1	3	3	3	11.72	20.91	7.20	20.43	60.25
4	2	1	2	3	11.48	20.63	7.40	20.43	59.94
5	2	2	3	1	5.71	10.51	5.50	15.73	37.45
6	2	3	1	2	11.73	20.64	9.50	24.30	66.18
7	3	1	3	2	8.81	15.84	7.40	19.92	51.97
8	3	2	1	3	12.61	23.03	8.67	23.13	67.44
9	3	3	2	1	11.62	19.19	15.22	37.88	83.91
$\bar{K}_1$	43.03	42.32	49.56	45.47					
$\bar{K}_2$	54.52	52.89	65.88	57.31					
$\bar{K}_3$	67.77	70.11	49.89	62.54					
R	24.74	27.79	16.32	17.07					

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

变异因素	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	2 759.469	2	1 379.734	16 031.69	显著
B	3 542.045	2	1 771.023	20 578.22	显著
C	1 565.977	2	782.988 4	9 097.855	显著
D	1 376.209	2	688.104 3	7 995.36	显著
误差	1.549 133	18	0.086 063		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00, F_{0.01}(2, 2)=99.00$ Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00, F_{0.01}(2, 2)=99.00$ 

为3.77% ( $n=3$ )。3次验证试验提取出的4种氨基酸的总含量均较高,并且3次试验结果无显著性差异、重现性较好。

### 3 讨论

蕲蛇为蝮科动物五步蛇 *Agkistrodon acutus* (Guenther) 的干燥体,具有祛风除湿、治疗风湿痹痛的药理作用<sup>[1]</sup>。现代药理学证明,蕲蛇具有抗炎镇痛的药理作用,能够缓解胶原诱导性关节炎模型大鼠的关节炎症状<sup>[2-3]</sup>,其作用机制为抑制肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ 、升高细胞白细胞介素(IL)10水平<sup>[4]</sup>。丁兴红<sup>[5]</sup>将核苷类物质(尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤和尿苷)作为指标进行检测,但未有文献报道此类物质具有抗炎镇痛的药理作用。进一步研究发现,蕲蛇发挥作用的有效成分为II型胶原蛋白类成分<sup>[6]</sup>。2010年版《中国药典》中没有收录蕲蛇含量测定的方法。笔者考虑到蕲蛇与阿胶中主要成分均为胶原蛋白,其水解后所得氨基酸相似<sup>[7-9]</sup>,因此参考了2010年版《中国药典》(一部)阿胶项下的测定方法——柱前衍生法,并参考文献[10-11]对该方法进行了部分优化。结果表明,建立的方法用于检测蕲蛇中水解氨基酸的准确度和重复性均较好,可作为蕲蛇质量控制的方法。

笔者针对蕲蛇样品的特点,应用加热回流的方法对蕲蛇进行提取,能够更好地模拟日常煎煮药材的过程;并在此基础上对蕲蛇水煎煮工艺进行了优化,使所得结果更具有实用价值。

目前医院销售的中药多为饮片,但目前有部分医院针对一些特殊患者(如儿童、老人)推出了煮散剂(粉末),此剂型可节省药材、方便患者。但药材粉碎后对有效成分的溶出有何影响?煎煮工艺如何变化?药液质量如何评价等?都需要加以比较及系统研究。因此,笔者在此研究思路下选取蕲蛇作为研究对象,拟在下一步研究中比较蕲蛇块和蕲蛇粉末煎煮后药液质量差异,以此来优选蕲蛇的最优煎煮工艺,以指导临床使用。故本试验结果主要是用于指导医院日常中药处方的煎煮,以节约药材、保证疗效,尚不涉及中药大生产。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 350.
- [2] 蒋福升, 马哲龙, 陈金印, 等. 蕲蛇提取物抗炎镇痛药理作用的研究[J]. 蛇志, 2013, 25(2): 97.
- [3] 谷恒存, 丁兴红, 马哲龙, 等. 蕲蛇水提液对佐剂性关节炎大鼠的免疫调节作用[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2 676.
- [4] 张纪达, 范永升, 温成平, 等. 蕲蛇水提取物对胶原诱导性关节炎大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-10的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1 407.
- [5] 丁兴红. HPLC法测定蕲蛇中核苷类成分的研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(6): 906.
- [6] 谷恒存, 胡金波, 丁志山, 等. 蕲蛇II型胶原蛋白对CIA大鼠的治疗作用[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(10): 2 207.
- [7] 胡军影, 程显隆, 肖新月, 等. 阿胶的化学成分及质量评价方法研究进展[J]. 中国药事, 2012, 21(3): 193.
- [8] 丁兴红, 丁志山, 范永升. 人工饲养蕲蛇与野生蕲蛇中重金属元素及氨基酸含量的比较研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(1): 51.
- [9] 赵洁, 左华丽. RP-HPLC法测定不同厂家阿胶中核苷类化合物的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(32): 3 050.
- [10] 谢谊, 易艳, 刘阳, 等. 柱前衍生HPLC测定阿胶中17种水解氨基酸含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(5): 46.
- [11] 程显隆, 肖新月, 邹秦文, 等. 柱前衍生HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 1 997.

(收稿日期: 2014-12-08 修回日期: 2015-03-12)

(编辑: 刘 萍)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅