

不同产地中华大蟾蜍浆液中蟾毒配基类成分含量对比研究

毛佩芝¹, 曹月婷², 崔可可², 卢正玉³, 梁立章⁴, 王龙虎²(1.宁波市妇女儿童医院, 浙江 宁波 315000; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058; 3.江苏京蟾生物资源开发有限公司, 江苏 盱眙 211700; 4.中国中药控股有限公司, 广东 佛山 528303)

摘要: 目的 调研不同产地中华大蟾蜍浆液有效成分含量差异, 分析蟾酥药材的区域特征性。方法 采用 HPLC 测定不同产地的蟾蜍浆液中 7 种主要活性成分含量, 并采用层次聚类分析和雷达图探究样本的产地规律。结果 不同产地蟾酥浆液中蟾毒配基类成分含量差异显著, 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基为华东地区蟾酥原料的主导成分, 2 种成分含量之和在 6.95%~11.15%, 而华中和西南地区 2 种成分含量之和在 0.17%~4.17%; 远华蟾蜍精和华蟾毒它灵为华中和西南地区的主导成分, 2 种成分含量之和在 5.66%~11.37%, 而华东地区 2 种成分含量之和在 1.22%~2.26%。结论 蟾酥原料质量主要受产地因素影响, 该调研结果为完善蟾酥药材的质量控制提供参考。

关键词: 蟾酥; 产地差异; 蟾毒配基; 层次聚类分析; 质量控制

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1080-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.011

引用本文: 毛佩芝, 曹月婷, 崔可可, 等. 不同产地中华大蟾蜍浆液中蟾毒配基类成分含量对比研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1080-1084.

Contrast Study on Content of Bufogenin Constituents in Toad Venom of *Bufo Bufo Gargarizans* from Different Geographic Locations

MAO Peizhi¹, CAO Yueting², CUI Keke², LU Zhengyu³, LIANG Lizhang⁴, WANG Longhu²(1.Ningbo Women & Children's Hospital, Ningbo 315000, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3.Jiangsu Jingchan Biological Resources Development Co., Ltd., Xuyi 211700, China; 4.China Traditional Chinese Medicine Holding Co., Ltd., Foshan 528303, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the difference in the content of active ingredients in toad venom of *Bufo bufo gargarizans* from different geographic locations, and analyze the regional characteristics of the Bufonis Venenum. **METHODS** The contents of 7 main active compounds were determined by HPLC, and the geographic location discipline of the samples were analyzed by hierarchical cluster analysis and radar chart. **RESULTS** The contents of bufogenin in different geographic locations was significant different. The dominant ingredients of the Bufonis Venenum from Eastern were the cinobufagin and resibufogenin, the total content ranged from 6.95% to 11.15%, while the contents in Central and Southwestern China ranged from 0.17% to 4.17%. The dominant ingredients of the Bufonis Venenum from Central and Southwestern China were the telocinobufagin and cinobufotalin, the total content ranged from 5.66% to 11.37%, while the contents in Eastern ranged from 1.22% to 2.26%. **CONCLUSION** The quality of Bufonis Venenum raw materials is mainly affected by the factors of geographic location. The results provide an important reference for improving the quality control of Bufonis Venenum.

KEYWORDS: Bufonis Venenum; regional differences; bufogenin; hierarchical cluster analysis; quality control

蟾酥(Bufonis Venenum)为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 或黑框蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 等的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥而成, 是我国传统的名贵药材之一^[1]。蟾酥性味甘辛、温、有毒, 归心经, 具有解毒、消肿、止痛、开窍醒神之功效, 主要用于治疗痈疽疔疮、咽喉肿痛、痧胀腹痛和神昏吐泻。

蟾毒配基类成分是中药蟾酥的主要药效物质, 在抗肿瘤及防治心血管疾病等方面有显著疗效^[2-3]。现有的蟾酥标准, 无论是中国或者日本与韩国, 都以主要的蟾毒配基含量之和为评价指标, 其中, 中国是华蟾酥毒基(cinobufagin, CBG)和酯蟾毒配基(resibufogenin, RBG)的含量之和, 日本与韩国是蟾毒灵(bufalin, BL)、CBG 和 RBG 含量之和。多项研究表明, 蟾酥中多种蟾毒配基类成

基金项目: 智能制造专项(SQ2018ZX091726)

作者简介: 毛佩芝, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 15825558863

E-mail: maopeizhi@163.com

分的药理活性显著且含量丰富,而且这类成分疗效和毒性相对接近。所以,用多种蟾毒配基类成分的含量之和控制蟾酥质量,对于临床精准用药和毒性控制更为合理^[4-7]。

近年来,由于滥捕滥杀、农药使用以及环境污染等原因,蟾蜍资源大大减少,造成蟾酥药源的紧缺^[8-9]。而蟾酥的需求量一直在递增,导致蟾酥药材供不应求,价格逐渐攀升,掺杂使假现象日益严重^[10-12]。为了建立一种更全面的蟾酥质量评价方法,以提高药材质量稳定性,保障临床用药安全有效,本研究收集国内多个蟾酥产地的蟾酥原料——蟾蜍浆液,定量分析各产地蟾蜍浆液中7种蟾毒配基类成分的含量,调研各地蟾酥原料的质量状况,深入研究道地药材的区域特征,为药典蟾酥质量标准的修改和完善提供基础研究资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(Agilent 公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DK-S26 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); TDZ4-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); FA2004B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品日蟾蜍他灵(gamabufotalin, GB, 批号: P28A9F60182)、远华蟾蜍精(telocinobufagin, TBG, 批号: P28A9F60236)、蟾毒它灵(bufotalin, BFL, 批号: P12O7F22619)、华蟾毒它灵(cinobufotalin, CFL, 批号: Y28A9Y60181)、BL(批号: Y26M8H36925)、CBG(批号: W16M9Z56140)和 RBG(批号: C30S8G45143)均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均>98%;色谱级甲醇和乙腈(百灵威科技有限公司);色谱级磷酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水磷酸二氢钾(天津永大化学试剂有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 样本信息

10 个产地来源的中华大蟾蜍浆液由江苏京蟾生物资源开发有限公司提供,经浙江大学徐娟华副教授鉴定,为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 的新鲜分泌物冷冻样品。样本信息见表 1。

表 1 蟾酥浆液样本收集地信息

Tab. 1 Location information of toad venom samples

编号	产地	分布	采收日期
S1	河南南阳	华中	2018.05.09
S2	湖南张家界	华中	2018.04.20
S3	湖北宜昌	华中	2018.04.18
S4	重庆武隆	西南	2018.04.15
S5	云南大理	西南	2018.05.13
S6	贵州安顺	西南	2018.04.22
S7	山东济南	华东	2018.04.18
S8	江苏南通	华东	2018.04.13
S9	江苏镇江	华东	2018.05.23
S10	江西上饶	华东	2018.04.14

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 采用之前建立的色谱条件^[13]进行实验,具体如下:色谱柱为 XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)-水(含有 0.5% 磷酸二氢钾和 0.05% 磷酸)为流动相,梯度洗脱: 0~7 min, 5%→34%A; 7~11 min, 34%→35%A; 11~18 min, 35%→40%A; 18~24 min, 40%→45%A; 24~30 min, 45%→48%A; 30~35 min, 48%→5%A; 35~40 min, 5%A。总共运行 40 min; 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 296 nm; 进样量 10 μL。7 种成分的分度良好,理论板数>4 000,各色谱峰均为单一峰,对称性良好。色谱图见图 1。

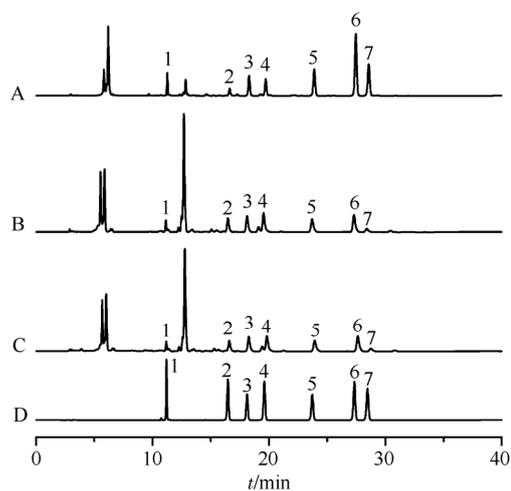


图 1 高效液相色谱图

A—华东地区样品; B—西南地区样品; C—华中地区样品; D—混合对照品; 1—日蟾蜍他灵; 2—远华蟾毒精; 3—蟾毒它灵; 4—华蟾毒它灵; 5—蟾毒灵; 6—华蟾酥毒基; 7—酯蟾毒配基。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—sample from Eastern China; B—sample from Southwestern China; C—sample from Central China; D—reference substances; 1—gamabufotalin; 2—telocinobufagin; 3—bufotalin; 4—cinobufotalin; 5—bufalin; 6—cinobufagin; 7—resibufogenin.

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取 7 种蟾毒配基化合物对照品, 置于 20 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 制成储备液; 通过用甲醇稀释储备液以获得一系列不同浓度的对照品溶液。所有溶液均储存在 4 °C 冰箱中备用。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取样品 0.2 g, 放置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇溶液 20 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 待溶液冷却至室温后, 用甲醇补足失重。混匀溶液取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤用于 HPLC 分析。

2.1.4 线性范围确定 分别精密吸取不同浓度的对照品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以对照品浓度为横坐标, 相应峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 求回归方程, 确定线性范围。在测试范围内, 所有标准曲线均表现出良好的线性($R^2 \geq 0.9998$)。

2.1.5 仪器精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液按“2.1.1”项色谱条件重复进样 6 次, 分别计算对照品中 7 种成分峰面积 RSD, 7 种成分峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S8), 分别在 0, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样, 按“2.1.1”项色谱条件测定并记录峰面积, 测得 7 种成分色谱峰峰面积 RSD 均 < 2%, 表明样品 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批次样本 (S2) 6 份, 分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进行含量测定, 测得各色谱峰峰面积

RSD 均 < 3%, 表明样品重复性好。

2.2 样品含量测定

测定不同产地蟾蜍浆液中 GB、TBG、BFL、CFL、BL、CBG、RBG 的含量, 结果见表 2。

表 2 不同产地蟾毒配基的含量

编号	GB	TBG	BFL	CFL	BL	CBG	RBG
S1	0.26	1.25	1.96	4.41	1.25	1.32	1.05
S2	0.52	6.91	1.01	4.46	0.41	0.44	0.00
S3	0.23	2.57	2.27	4.15	0.88	0.15	0.02
S4	0.55	3.56	1.61	4.04	1.47	0.88	0.19
S5	0.81	2.63	2.07	3.49	1.55	2.14	0.66
S6	0.43	5.16	1.02	3.97	1.82	3.28	0.89
S7	1.01	0.58	1.63	1.51	1.65	5.14	1.81
S8	1.01	0.35	1.93	0.87	2.17	6.33	4.33
S9	0.41	0.38	2.26	1.26	2.77	6.83	4.32
S10	0.32	0.32	1.66	1.94	2.18	5.01	5.12
RSD	52.53	95.99	25.90	47.78	42.07	79.81	107.92
加样回收率	102.15	103.10	101.31	101.15	99.02	98.96	98.79

2.3 中华大蟾蜍浆液中 7 种蟾毒配基类成分结构式
中华大蟾蜍浆液中 7 种蟾毒配基类成分结构式见图 2。

2.4 不同产地样本含量差异分析

运用 SPSS 20.0 软件进行层次聚类分析, 采用 Ward 法, 以蟾蜍浆液中 7 种指标性成分的含量为变量, 对不同产地蟾蜍浆液样本进行聚类分析, 见图 3。

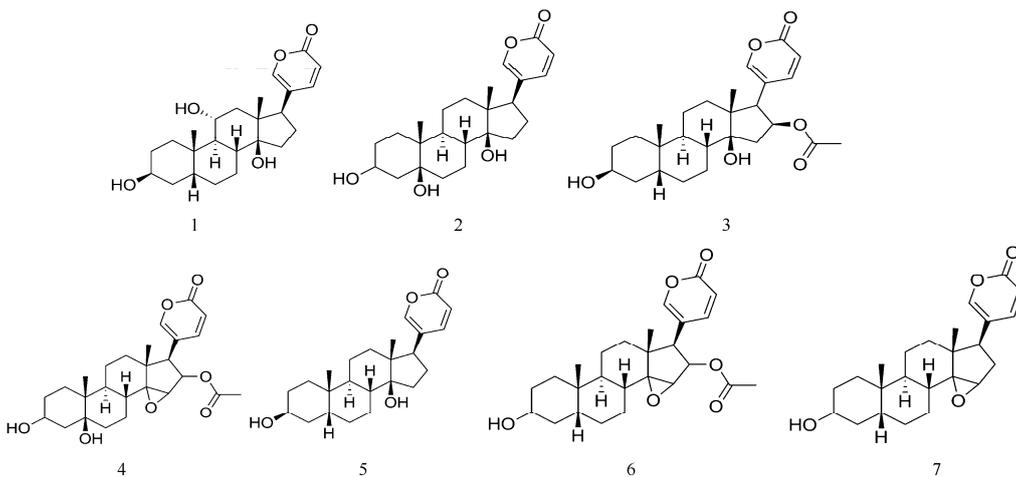


图 2 中华大蟾蜍浆液中 7 种蟾毒配基类成分结构式

1-日蟾蜍他灵; 2-远华蟾毒精; 3-蟾毒它灵; 4-华蟾毒它灵; 5-蟾毒灵; 6-华蟾酥毒基; 7-酯蟾毒配基。

Fig. 2 Chemical structure of seven main bufogenin components in toad venom of *Bufo bufo gargarizans*

1-gamabufotalin; 2-telocinobufagin; 3-bufotalin; 4-cinobufotalin; 5-bufalin; 6-cinobufagin; 7-resibufogenin.

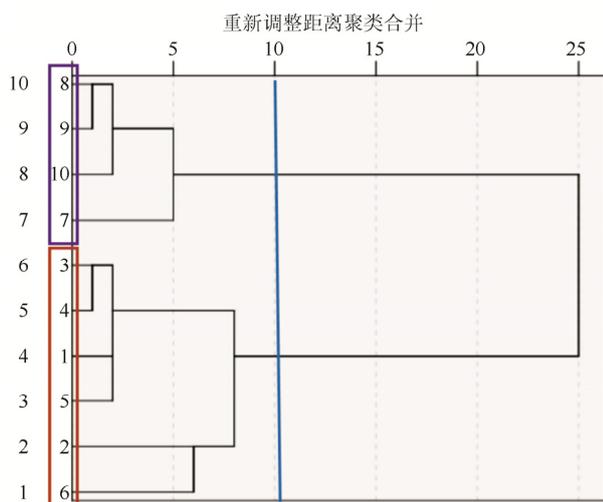


图3 不同产地蟾毒配基类成分含量聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of the contents of bufogenin constituents from different geographic locations

10个产地的样本被聚成2类,其中,S1~S6样本为第1类,样本来源于华中和西南地区;S7~S10样本为第2类,样本来源于华东地区。为探究不同产地样本中各蟾毒配基成分的含量差异,进一步对测定的数据结果作雷达图。

结果显示,10个产地中7种蟾毒配基类成分含量差异悬殊。其中,GB在所有样本中含量均较低;TBG和CFL在S1~S6样本中含量相对较高,在S7~S10样本中含量极低;而CBG和RBG在S7~S10产地含量极高,在S1~S6产地含量相对较低。而且CBG和RBG含量较低的蟾酥浆液中,TBG和CFL的含量则相对较高,见图4。

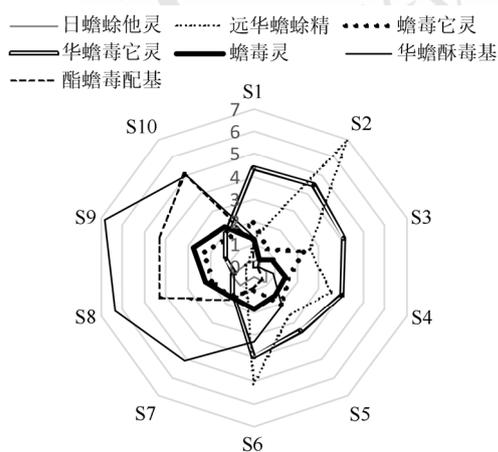


图4 不同产地蟾毒配基成分雷达图
Fig. 4 Radar map of bufogenin constituents from different geographic locations

3 讨论

与多数研究蟾酥的文献不同,本研究直接收集原始样本,以避免蟾酥原料混合、中间掺杂等过程对成分的影响。研究发现,10个产地的蟾酥浆液中主要蟾毒配基类成分含量差异悬殊。CBG和RBG为华东地区蟾酥原料的主导成分,2种成分含量之和在6.95%~11.15%,而华中和西南地区2种成分含量之和在0.17%~4.17%;TBG和CFL为华中和西南地区的主导成分,2种成分含量之和在5.66%~11.37%,而华东地区2种成分含量之和在1.22%~2.26%。研究数据显示,原料产地是造成蟾酥质量差异的关键因素,其原因可能是不同地区的气候因素差异导致蟾毒配基成分生物合成的变化。另一方面,TBG、CFL、CBG和RBG这4种成分可作为蟾酥产地初步鉴别的特征性成分。

在分析不同产地的蟾毒配基类成分含量的同时,本研究与中国药典2015年版所规定的蟾酥指标进行对比,发现二者之间相关性较弱。CBG和RBG含量低的样本,蟾毒配基类成分总含量并不低。例如,贵州安顺样本中(S6),CBG和RBG含量之和只有4.17%,而7种成分含量总和达到16.57%。相反地,山东济南样本(S7)中CBG和RBG之和达到6.95%,超过药典标准,而7种蟾毒配基含量总和却只有13.33%。现有质量标准局限性较为突出,如果CBG和RBG含量之和<6.0%,就会视为不合格药材。这种评价标准难以区分优质药源,不仅造成了资源的浪费,而且临床上也难以真正反映其质量与疗效的关系。现代药理学研究表明,蟾酥具有抗肿瘤、强心、镇痛和抗炎等多种生物活性,蟾酥在我国分布广泛,10个产地的蟾酥浆液中主要蟾毒配基类成分含量差异悬殊,必然引起药效学上的差异。蟾毒配基类成分有确切的抗肿瘤活性,BL、CBG和RBG等成分均是有效抗肿瘤单体。此外,CBG还具有血管收缩、抗菌、抗病毒作用,BL对正常细胞具有一定的细胞毒性,TBG具有强心作用^[14]。因此,不同产地的蟾酥适合不同疾病的治疗,本研究建议修订蟾酥药材标准时,应结合这些成分含量考虑其药效活性与毒性,以完善定量测定指标,建立更加科学、合理的蟾酥质量评价体系,以保证临床用药安全有效。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 383.
- [2] CHEN Y L, HAO Y Y, GUO F J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Bufo venenosus* Venenum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48(12): 2579-2588.
- [3] KOU G J, QIN Z F, DENG Y F, et al. Research progress on *Bufo venenosus* Venenum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45(21): 3185-3189.
- [4] SHENG P, ZHU X D, WU J J. UPLC-ELSD fingerprints of *fritillariae pallidiflorae* bulbos of wild growing and cultivated species from different habitats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(11): 1660-1664.
- [5] LI W, MA J X, YU X Y. HPLC fingerprints analysis of *Cynomorium songaricum* rupestris. From different areas and content determination of two flavonoids [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 1025-1030.
- [6] LIU X Y, LIU X, CHEN X T, et al. Determination of five active components in *Bufo venenosus* Venenum from different habitats by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44(6): 760-762.
- [7] HU Y M, YU Z L, YANG Z J, et al. Comprehensive chemical analysis of *Bufo venenosus* Venenum by using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(2): 210-220.
- [8] JI C, XIE Y Y, WANG Y M, et al. Systematic quality evaluation of *venenum bufonis* on Chinese market [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(19): 1466-1470.
- [9] LI Y Y, LIU B Y, HUANG S W. Quality standard of *venenum bufonis* sustained-release pellets [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(11): 1324-1329.
- [10] WANG Z Y, WANG H L, ZHOU J, et al. Comparison of chemical composition between fresh and processed *Bufo venenosus* Venenum by UPLC-TQ-MS [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40(20): 3967-3973.
- [11] DONG W W, ZHOU W, LI S X, et al. Determination of *recibufogen* and *cinobufagin* in *Venenum Bufo* by HPLC [J]. *Central South Pharm*(中南药学), 2010, 8(10): 721-724.
- [12] QU T, CHEN L M, GAO H M, et al. Effect of drying and processing methods on the quality of Toad Venom [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(17): 63-67.
- [13] CAO Y T, CUI K K, PAN H Y, et al. Correlative study of *bufogenin* constituents in venom of *Bufo venenosus* Cantor [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(9): 1850-1856.
- [14] LI Z Y, QU T, WANG P F, et al. Advance on quality control of toad venom and its key influence factors [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42(5): 863-869.

收稿日期: 2019-04-19

(本文责编: 李艳芳)