

特征图谱法测定蟾皮药材中沙蟾毒精等4种活性成分的含量

高波¹, 周严严², 赵海誉², 司南², 边宝林², 杨健², 袁圣芬¹, 王宏洁^{2*}

(1. 安徽华润金蟾药业股份有限公司, 安徽 淮北 235000; 2. 中国中医科学院
中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**采用特征图谱法对不同产地的蟾皮药材进行了分析,并建立了同时测定沙蟾毒精等4种蟾毒配基类成分的含量的方法,为其质量控制和药材鉴定提供依据。**方法:**采用特征图谱法对不同产地的多批蟾皮药材进行了沙蟾毒精等4种蟾毒配基类成分的含量测定。采用菲罗门 Phenomenex Gemini 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 10%~45% A; 30~45 min, 45%~60% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35℃,检测波长 296 nm。**结果:**四川产地蟾皮的沙蟾毒精含量较高(大花皮、中黑皮、超大皮、棕褐色皮、小黑皮质量分数分别是 0.252 4%, 0.158 4%, 0.181 1%, 0.125 8%, 0.108 8%),其次是江苏产地的黑皮(0.227 5%)。四川大花皮中华蟾毒它灵含量较高(0.214 3%),其次是江苏黑皮(0.147 8%)。四川小黑皮中蟾毒灵(0.051 0%)和山东小花皮中华蟾酥毒基(0.136 1%)含量较其他产地和品种中较高。总体来说,四川产地的蟾皮4种配基类含量较高,尤其是四川大花皮品种。**结论:**该文采用特征图谱法对不同产地蟾皮中沙蟾毒精进行了测定,并对其他3种蟾毒配基类成分进行了标定,该方法准确可靠,可用于蟾皮的鉴别和质量控制。不同产地和品种蟾皮中4种蟾毒配基类成分含量不尽相同。

[关键词] 蟾皮; 沙蟾毒精; 华蟾毒它灵; 蟾毒灵; 华蟾酥毒基; 特征图谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0057-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230057

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1445.058.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:45

Determination of Four Kinds of Active Ingredients in Toad Skins by Characteristic Map Method

GAO Bo¹, ZHOU Yan-yan², ZHAO Hai-yu², SI Nan², BIAN Bao-lin², YANG Jian²,
YUAN Sheng-fen¹, WANG Hong-jie^{2*}

(1. Anhui Jinchan Biochemistry Company Ltd., Huaibei 235000, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the characteristic map method for simultaneous determination of four kinds of active ingredients including arenobufagin in toad skins from different areas, and provide the basis for its quality control and medicinal material identification. **Method:** A Phenomenex Gemini (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase consisting of acetonitrile (A)-water (B) (0-30 min, 10%-45% A; 30-45 min, 45%-60% A); flow rate 1.0 mL·min⁻¹; column oven temperature was 35℃; detection wavelength was 296 nm. The characteristic map method was used to determine the contents of four bufogenin constituents such as arenobufagin. **Result:** The content of arenobufagin in the toad skin from Sichuan province was highest (0.252 4%, 0.158 4%, 0.181 1%, 0.125 8% and 0.108 8% respectively for large flowered skin, middle black skin, super large skin, brown skin and small black skin), followed by the black skin from Jiangsu

[收稿日期] 20170613(018)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-AH-01)

[第一作者] 高波,高级工程师,从事生产质量研究, Tel:0561-3152518, E-mail: gaobo@ahjc999.com

[通讯作者] *王宏洁, 硕士, 研究员, 从事中药化学研究, Tel:010-64087424, E-mail: wang66397@sina.com

province (0.227 5%)。The content of cinobufotalin was highest in large flowered skin from Sichuan province (0.214 3%), followed by black skin from Jiangsu province (0.147 8%)。The contents of cinobufagin in the small black skin from Sichuan province (0.051 0%) and small flowered skin from Shandong province (0.136 1%) were higher than those from other areas and varieties。In general, the contents of four kinds of active ingredients in Sichuan province were higher, especially the large flowered skin from Sichuan Province。

Conclusion: The characteristic map method was accurate and reliable in determining the contents of these four bufogenin constituents, which can be used for identification and quality control of told skins。In addition, the contents of the four bufogenin constituents in different areas and varieties were significantly different。

[**Key words**] Toad skin; arenobufagin; cinobufotalin; bufalin; cinobufagin; characteristic map method

蟾皮为蟾蜍科动物中华大蟾蜍、黑框蟾蜍的干燥全皮。《神农本草经集注》,《本草纲目》等医药专著均有记载。蟾皮性凉,味甘、辛、有小毒。功效清热解毒、利水消胀、消肿止痛,适用于肿瘤、腹胀等症^[1-2]。现代医学研究证明蟾皮中主要含有蟾毒配基类、蟾蜍毒素类、蟾毒色胺类及其他化合物^[3-4]。蟾毒配基类化合物主要脂沙蟾毒精、蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒它灵等^[5-6]。大量的实验研究表明蟾毒配基类化合物对白血病、结肠癌、肝癌、胰腺癌等恶性肿瘤,有明显抗肿瘤作^[7-9]。实验证明沙蟾毒精是通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导凋亡及自噬而发挥抗肝癌作用^[10]。目前市场上以蟾皮为原料的药品如华蟾素注射液等制剂被广泛应用,不同产地和品种的蟾皮药材有效成分含量均有差异,产品的质量受到一定的影响。目前文献报道^[11-12]只是对蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量,但未见报道采用特征图谱法测定蟾皮药材中沙蟾毒精的含量。因此,笔者从蟾皮分离出沙蟾毒精,并采用特征图谱法测定不同产地蟾皮药材中沙蟾毒精,并对其他 3 种蟾毒配基类成分进行了标定,为完善蟾皮药材质量控制提供可控指标,并为临床合理用药提供可靠研究参考数据。

1 材料

Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪(含自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机、低压四元梯度泵、PDA 检测器)和 LTQ Orbitrap velos pro 质谱仪(高分辨静电场轨道阱质谱,ESI 源)购自美国 Thermo Fisher 公司;LC-20AT 型高效液相色谱仪(四元梯度泵,在线真空脱气机,紫外检测器)购自日本岛津公司;KQ-250B 型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司。

沙蟾毒精,华蟾毒它灵,蟾毒灵,华蟾酥毒基对照品(自制,经薄层色谱及高效液相色谱法测定,纯

度均 >98%);中华大蟾蜍皮样品(金蟾生化药业有限公司)。乙腈、甲醇(美国 Fisher 公司);高纯水(屈臣氏饮用水)。

蟾皮药材经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* 的干燥皮。10 批蟾皮药材样品信息见表 1。

表 1 10 批蟾皮药材样品信息

Table 1 Table 1 Information of 10 batches of toad skin samples

No.	类型及产地	No.	类型及产地
1	中花皮(安徽)	6	小花皮(江苏)
2	大花皮(四川)	7	棕褐色皮(四川)
3	小黑皮(四川)	8	超大皮(四川)
4	小花皮(山东)	9	小皮(山东)
5	黑皮(江苏)	10	中黑皮(四川)

2 方法与结果

2.1 测定条件 采用菲罗门 Phenomenex Gemini 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 供液相分析, BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 2.4 μm) 供 LC-MS/MS 分析;流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 10% ~ 45% A; 30 ~ 45 min, 45% ~ 60% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 296 nm。

质谱条件:正离子模式,毛细管温度 350 °C,毛细管电压 35 V,喷雾电压 3.5 kV,鞘气(N₂)流速 275.79 kPa,辅助气(N₂)流速 68.95 kPa;样品一级质谱在 FT 模式下进行全扫描(分辨率 R 为 30 000, m/z 扫描范围 50 ~ 1 000),二级及三级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan)。数据采集和分析采用 Xcalibur, Networks 和 Mass Frontier 7.0 软件。

2.2 沙蟾毒精的提取分离 取大小适中的蟾皮 1 kg 用剪刀剪至大小为 1 ~ 1.5 cm 的块状,加 8 倍量甲醇,分别加热提取 2 次(2, 1 h)。合并提取液蒸至

小体积,拌入硅胶 H,挥干溶剂,干法上柱,用不同比例的甲醇-三氯甲烷溶剂洗脱,收集 30% 甲醇洗脱部分经反复重结晶,得沙蟾毒精纯品。经 UV,NMR-C,NMR-H 数据确证为沙蟾毒精。

2.3 对照品溶液的制备 精密量取各对照品粉末 1.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取蟾皮药材粉末(过 10 目筛)约 0.5 g,精密称定,精密加甲醇 25 mL,称定质量,回流提取 90 min,放至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 沙蟾毒精标准曲线的绘制 精密称取沙蟾毒精对照品 4.15 mg,至 2 mL 量瓶中,加甲醇溶解,摇匀,作为储备溶液。精密吸取储备溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mL 至 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别取 10 μL 注入高效液相色谱仪,以对照品峰面积的为纵坐标,以对照品进样量为横坐标。回归方程为 $Y = 1.32811 \times 10^{-6} X - 0.0165303$ ($r = 0.9999$);线性范围 0.51875 ~ 8.300 μg。

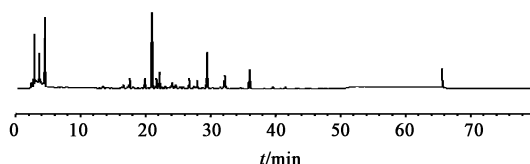
2.5.2 精密密度试验 按照 2.4 项下的方法制备供试品溶液。按照 2.1 项下的色谱条件,平行测定 6 次,进行精密密度试验,经测定其精密密度 RSD 分别为 0.05%, 0.03%, 0.04%, 0.03%, 说明仪器精密密度良好,符合特征图谱测定的要求。

2.5.3 重复性试验 取蟾皮药材粉末约 0.5 g,精密称定,按照 2.4 项下方法制备供试品溶液。按照 2.1 项下条件测定,结果沙蟾毒精、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基 4 个峰 RSD 分别为 0.05%, 0.03%, 0.04%, 0.03%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取蟾皮药材粉末约 0.5 g,精密称定,按照 2.4 项下的方法制备供试品溶液,室温下放置,于 0, 2.5, 5.5, 8, 15, 24 h,结果显示 4 个峰的 RSD 分别为 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.04%, 表明供试品溶液中被测成分的含量在 24 h 内基本稳定。

2.6 准确性考察 为保证测定的准确性,对制备的供试品溶液在 0 ~ 80 min 内进行 0 ~ 100% 甲醇梯度检查。紫外波长 296 nm。样品在 40 min 内基本洗脱出来,样品检测色谱图见图 1。

2.7 特征性有效成分 HPLC 和 LC-MS/MS 测定 HPLC 色谱图中所显示的色谱峰进行紫外全波长扫描,结果显示 1 号峰(S 峰)为沙蟾毒精,2 号峰为华



1. 沙蟾毒精;2. 华蟾毒它灵;3. 蟾毒灵;4. 华蟾酥毒基(图 2,3 同)
图 1 样品 0 ~ 100% 甲醇梯度洗脱 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC of sample using 0-100% methanol gradient elution

蟾毒它灵,3 号峰为蟾毒灵,4 号峰为华蟾酥毒基,保留时间 17 ~ 35 min 所显示的均为配基类成分。见图 2。

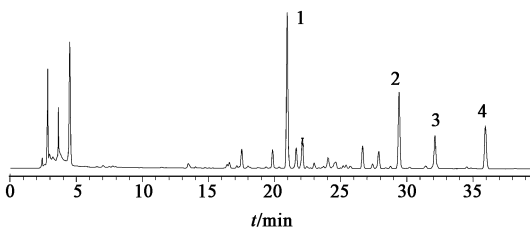
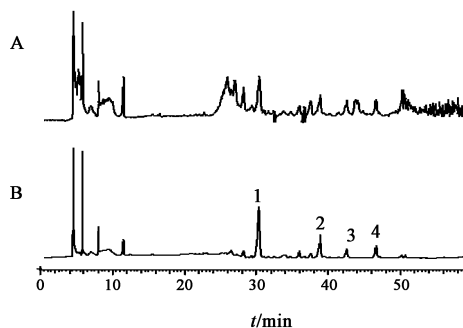


图 2 蟾皮样品的 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC of toad skin sample

由于 4 个特征性成分是自制的,本文采用 LC-MS/MS 对样品的 4 个特征性成分和相应单一成分进行一级质谱分子量以及二级质谱分子离子碎片峰与对照品及相关文献分析推断比对,结果显示 1 号峰(S 峰)为沙蟾毒精,2 号峰为华蟾毒它灵,3 号峰为蟾毒灵,4 号峰为华蟾酥毒基,见图 3。



A. 一级质谱;B. 二级质谱

图 3 蟾皮样品 LC-MS/MS 总离子流

Fig. 3 Total ion chromatogram of toad skin sample

2.8 样品的测定 将 10 批蟾皮样品按照 2.4 项下方法进行处理,进行 HPLC 测定,计算各特征峰与 s 的相对保留时间,其相对保留时间应在规定值的 ± 10% 之内。规定值相对保留时间 1.000(峰 s),1.40(峰 2),1.53(峰 3),1.72(峰 4),结果见表 2。10 批蟾皮药材的 HPLC 特征图谱见图 4。不同产地蟾皮药材中 4 中蟾毒配基类成分含量测定结果见表 3。

由含量结果可知,四川产地的沙蟾毒精含量较

表 2 10 批蟾皮样品中各峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of each peak in 10 batches of toad skin samples

No.	峰 2	峰 3	峰 4
1	1.402 5	1.533 1	1.714 7
2	1.403 0	1.533 4	1.715 3
3	1.403 3	1.533 3	1.715 0
4	1.401 4	1.533 2	1.717 9
5	1.403 0	1.533 3	1.714 7
6	1.402 5	1.533 0	1.714 0
7	1.401 9	1.532 6	1.713 3
8	1.402 9	1.533 2	1.714 4
9	1.402 6	1.533 2	1.715 3
10	1.403 0	1.533 4	1.715 1

注: S 峰相对保留时间均为 1.000 0。

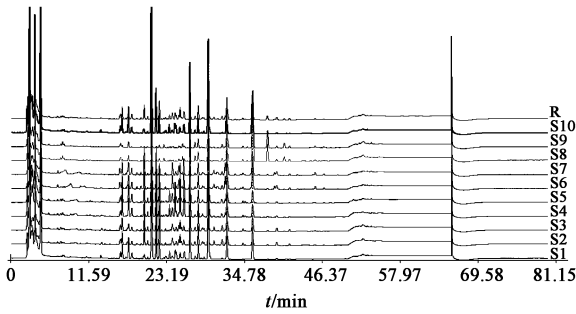


图 4 10 批蟾皮药材的 HPLC 特征谱

Fig. 4 HPLC characteristic chromatogram of 10 batches of toad skin samples

高(大花皮,中黑皮,超大皮,棕褐色皮,小黑皮分别是 0.252 4%, 0.158 4%, 0.181 1%, 0.125 8%, 0.108 8%),其次是江苏产地的黑皮(0.227 5%)。四川大花皮中华蟾毒它灵含量较高(0.2143%),

表 4 使用不同色谱柱型号各峰分离度

Table 4 Resolution of each peak using different columns

No.	色谱柱品牌	柱子序号	分离度			
			峰 S	峰 2	峰 3	峰 4
1	Phenomenex Gemini C ₁₈	759050-27	5.056	6.140	10.590	13.641
2	Phenomenex Gemini C ₁₈	711899-19	3.909	27.116	8.536	10.961
3	Phenomenex Gemini C ₁₈	H16-352021	5.392	33.436	10.207	13.306
4	Industries Epic Polar C ₁₈	013-17-88114	4.067	4.800	5.916	9.728
5	岛津 6L Wondasil	008702-10	2.862	6.563	1.281	1.321
6	TSK C ₁₈	00001	3.320	2.856	0.831	0.581
7	Thermo BDS Hypersil	10245165	1.093	1.965	7.968	8.690
8	YMC C ₁₈	130IA60157	1.067	1.049	1.087	1.110

3.2 高效液相色谱仪的选择 使用不同品牌高效

表 3 10 批蟾皮样品中 3 种成分的含量测定

Table 3 Contents of three components of 10 batches of toad skin samples

No.	沙蟾毒精	华蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾酥毒基
1	0.072 7	0.061 3	0.037 2	0.027 7
2	0.252 4	0.214 3	0.038 9	0.026 5
3	0.108 8	0.025 4	0.051 0	0.049 8
4	0.012 4	0.021 1	0.041 1	0.136 1
5	0.227 5	0.147 8	0.037 2	0.058 1
6	0.052 3	0.036 9	0.032 2	0.044 0
7	0.125 8	0.117 9	0.017 5	0.018 0
8	0.181 1	0.113 4	0.030 3	0.046 2
9	0.029 0	0.039 7	0.040 5	0.041 7
10	0.158 4	0.116 9	0.024 1	0.026 5

其次是江苏黑皮(0.147 8%),四川棕褐色皮(0.117 9%),中黑皮(0.116 9%)和超大皮(0.113 4%)。四川小黑皮中蟾毒灵(0.051 0%)和山东小花皮中华蟾酥毒基(0.136 1%)含量较其他产地和品种中的较高。总体来说,四川产地的蟾皮 4 种配基类含量较高,尤其是四川大花皮品种。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 色谱柱在含量测定中对化学成分的分度有一定的影响,因此本文中使用了相同品牌、相同型号色谱柱以及不同品牌的多根色谱柱对同一样品进行测定以考察适合蟾毒配基类成分的色谱柱。结果见表 4,根据拖尾因子结果表明 Phenomenex Gemini 型号的色谱柱分离蟾毒配基类成分较好。

液相色谱仪(岛津 LC-20AT, Agilent 1260),相同色

谱柱(Phenomenex Gemini C₁₈, S/N 759050-27)对同一样品进行测定,观察测定的分离情况。岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪分离度较好且各色谱峰峰型较好,因此确定高效液相色谱仪的型号为岛津 LC-20AT。

已有文献只是对蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量测定进行研究,但未见采用特征图谱法测定蟾皮药材中沙蟾毒精的含量。本文采用特征图谱法对不同产地蟾皮药材中沙蟾毒精进行了测定,并对其他 3 种蟾毒配基类成分进行了标定。特征图谱可从整体上实现质量控制,具有整体性与模糊性。从 10 批蟾皮药材特征图谱结果可以看出,不同产地蟾皮药材 4 种蟾毒配基类相对保留时间相似,说明各产地药材主要成分构成基本类似,但是通过含量测定,可以看出四川产地大花皮品种中沙蟾毒精(0.252 4%)和蟾毒它灵(0.214 3%)含量都较高,其次是江苏产地的黑皮中沙蟾毒精(0.227 5%)和蟾毒它灵(0.147 8%)。四川小黑皮中蟾毒灵(0.051 0%)和山东小花皮中华蟾酥毒基(0.136 1%)含量较其他产地和品种中的较高,但是差异不明显。总体来说,四川产地的蟾皮中沙蟾毒精等 4 种配基类含量较高,尤其是四川大花皮品种。说明上述方法可用于蟾皮的鉴别和质量控制,为进一步探讨中药蟾皮的物质基础及作用机制提供了依据,也为以蟾皮为原料的产品质量得到相应保障。

[参考文献]

[1] 王元清,严建业,喻林华. 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.

[2] 曾洋,张爱军,文筱. 干蟾皮的研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(15): 29-31.
[3] 辛少鲲,司南,王宏洁,等. 蟾皮中亲水性成分的化学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3767-3772.
[4] 代丽萍,高慧敏,王智民,等. 蟾皮化学成分的分离与鉴定[J]. 药学学报, 2007, 42(8): 858-861.
[5] 王晓东,严子平,张莉,等. 蟾皮提取分离方法及有效成分的研究进展[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(12): 1009-1016.
[6] 王叶. 蟾酥中强心苷类化学成分的研究[D]. 长春:吉林大学, 2015.
[7] 李强. 蟾酥中蟾毒配基类化合物的抗肿瘤研究进展[J]. 实用药物与临床, 2009, 12(2): 132-134.
[8] 曹伟,刘聪燕,陈彦,等. 蟾皮活性组分的分离与体外抗肿瘤活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 17-20.
[9] 贾小晴,孙萍. 华蟾素抗肿瘤成分及作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 215-217.
[10] 刘俊珊,张冬梅,田海妍,等. 沙蟾毒精靶向 PI3K/Akt/mTOR 调控肝癌细胞自噬和凋亡的相互作用// [C]中国化学会. 中国化学会第 28 届学术年会第 3 分会场摘要集, 2012.
[11] 曲婷,高慧敏,陈两绵,等. 蟾蜍类药材中吲哚生物碱和蟾毒配基类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3086-3091.
[12] 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.

[责任编辑 顾雪竹]