

产地对蟾酥药材质量的影响

袁旭江^{1*}, 沈嘉茵², 吴燕红¹

(1. 广东药学院中药开发研究所, 广州 510006; 2. 深圳市妇幼保健院, 广东 深圳 518000)

[摘要] 目的: 建立蟾酥药材质量分析方法, 并分析产地对其有效成分的影响。方法: 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基为对照, 采用薄层色谱法和高效液相色谱法进行分析和含量测定。结果: 不同产地蟾酥药材所含成分类型基本相似, 但在成分含量上存在明显的差异, 以脂蟾毒配基含量变化最为明显, 其中产地山东的蟾酥的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量基本最高; 成分差异在薄层色谱图谱中主要表现在斑点 2(脂蟾毒配基)、斑点 3(华蟾酥毒基)、斑点 4、斑点 6 和斑点 9 上, 在高效液相图谱中表现在 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15 号峰上, 且还可以看出 7, 8 号峰的含量与 14 号(华蟾酥毒基)、15 号(脂蟾毒配基) 峰含量可能存在相关性。结论: 不同产地蟾酥药材存在明显质量差异; 本文方法稳定可行, 重现性和专属性好, 可用于蟾酥鉴别及质量分析。

[关键词] 蟾酥; 质量; 高效液相色谱; 薄层色谱

[中图分类号] [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0075-04

Influence of different producing area on quality of Venenum bufonis

YUAN Xu-jiang^{1*}, SHEN Jia-yin², WU Yan-hong¹

(1. Chinese Materia Medica R&D Institute of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Shenzhen MCH Hospital, Shengzhen 518000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quality analysis method for Venenum Bufonis and to study influence of different producing area on active composition. **Method:** TLC and HPLC were applied with analysis and determination of the content of cinobufagin and resibufogenin. **Result:** Venenum Bufonis from different producing area had the similar compositions. But the content of compositions was significantly different especially for resibufogenin in that the Venenum Bufonis produced in Shandong had the highest content of cinobufagin and resibufogenin. The difference of compositions displayed majorly in spot 2(resibufogenin), spot 3(cinobufagin), spot 4, spot 6 and spot 9 in TLC chromatogram and peak 3, peak 4, peak 6, peak 7, peak 8, peak 9, peak 14 and peak 15 in HPLC chromatogram. The HPLC chromatogram could also see that the content of peak 7, peak 8 and the content of peak 14(cinobufagin), peak 15(resibufogenin) had possible relationship. **Conclusion:** The quality of Venenum Bufonis from different producing area has significant difference. The established method is stable, feasible with a good reproducibility and specificity, and suitable for identification and quantitative analysis of Venenum Bufonis.

[Key words] venenum bufonis; quality; HPLC; TLC

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 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加

工干燥而成^[1]。蟾酥性味甘辛、温, 有毒, 具有解毒、消肿、醒神、开窍、强心和止痛等作用; 药理活性较强, 作用广泛, 早已引起国内外的广泛关注。由于蟾酥产地繁多, 质量差异较大, 但现有文献未曾更为细致的从化学成分角度对其质量差异进行定性和定量比较分析。笔者收集不同产地蟾酥药材, 以华蟾酥毒基和脂蟾毒配基^[2-3]为指标, 运用薄层色谱法和高效液相色谱法^[4], 对不同产地蟾酥药材进行定性和定量分析, 从多个化学成分含量角度上反映不同蟾

[收稿日期] 2010-01-11

[基金项目] 广东省中医药管理局(1060042)

[第一作者] * 袁旭江, 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药与质量标准研究, Tel: (020) 39352540; E-mail: xjyuan.xj@163.com

酥的质量差异,为蟾酥的鉴别和质量分析提供依据。

1 仪器与试药

BS124S 电子分析天平(德国 Sartorius),电动恒温水浴锅(上海一恒电子仪器厂),Agilent 1100 高效液相色谱仪。硅胶预制板(浙江台州);定量毛细管(DrummondUSA);CAMAGREPROSTAR3 薄层摄影仪、半自动点样器(瑞士)。华蟾酥毒基对照品(中国药品生物制品检定所,批号 803-9202)、脂蟾毒配基对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110718-200507);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸等均为分析纯,水为三蒸水。

收集了 12 批不同产地的蟾酥药材,经鉴别均为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液。见表 1。

表 1 12 批药材来源

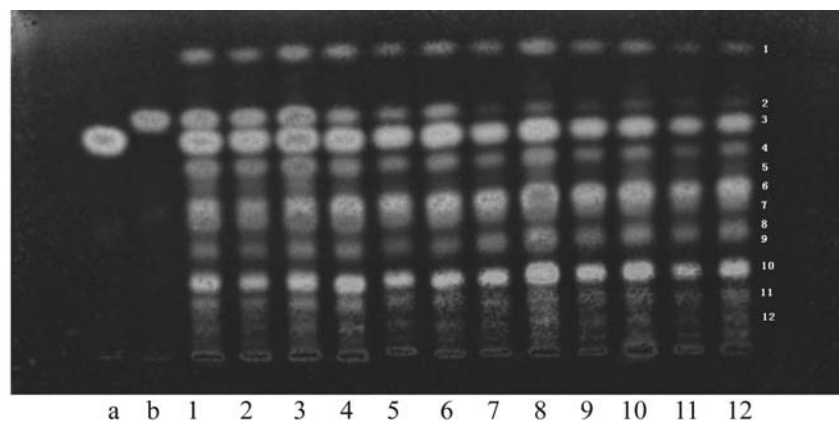
No.	产地及来源	形状	采集时间
1	河南	块状	2007—03
2	四川	块状	2007—04
3	河南	块状	2006—11
4	河北	片状	2006—11
5	山东	片状	2007—03
6	湖北	片状	2007—03
7	辽宁	块状	2007—04
8	湖南	块状	2007—04
9	湖南	块状	2007—04
10	河北	块状	2007—03
11	山东	块状	2006—08
12	山东临沂	块状	2006—10

2 方法与结果

2.1 薄层色谱分析 取蟾酥药材 0.2 g,精密称定,加乙醇 5 mL,水浴加热回流 30 min,滤过,得供试品溶液。

取华蟾酥毒基对照品和脂蟾毒配基对照品适量,精密称定,分别用乙醇溶解制备成均为 1 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取上述制备的样品和对照品溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 预制板上,用环己烷-二氯甲烷-丙酮(2:1:1)展开系统进行展开,取出,晾干,再进行第 2 次展开,每次展距约 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯 365 nm 下检视,可观察到 12 个斑点,斑点分离度较好,显色清晰。不同产地的蟾酥斑点数目基本相同,而斑点颜色的深浅度和斑点大

小因产地的不同而各有差异,主要表现在斑点 2,3,4,6 和 9 上,特别是斑点 2(脂蟾毒配基)。可见,不同产地的蟾酥的组分基本相同,但各成分的含量因产地不同而存在明显差异。12 批样品中以脂蟾毒配基斑点大小进行排序,分别为山东临沂 > 山东 > 河北 > 湖南 > 湖南 > 辽宁 > 湖北 > 山东 > 河北 > 河南 > 四川 > 河南。



注: a 华蟾酥毒基对照品; b 脂蟾毒配基对照品; 1. 山东 ; 2. 河北 ; 3. 山东临沂; 4. 湖南 ; 5. 辽宁; 6. 湖南 ; 7. 河南 ; 8. 湖北; 9. 河北 ; 10. 山东 ; 11. 河南 ; 12. 四川。

图 1 12 个蟾酥药材薄层

2.2 高效液相色谱分析

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.01% H₃PO₄ 溶液,梯度洗脱,柱温 25 $^{\circ}$ C,检测波长 296 nm,流速 1 mL \cdot min⁻¹,进样量 10 μ L。

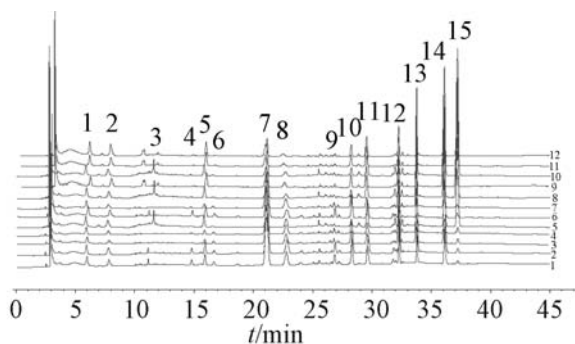
2.2.2 对照品溶液制备 取经五氧化二磷低温真空干燥 24 h 的华蟾酥毒基对照品和脂蟾毒配基对照品适量,精密称定,用甲醇溶解定容,制成 0.048 4 mg \cdot mL⁻¹ 的华蟾酥毒基和 0.053 2 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品制备 药材进行干燥粉碎后,称取药材粉末 0.2 g,精密称定,加 80% 乙醇于 70 $^{\circ}$ C 水浴加热回流 90 min,提取 2 次,每次 50 mL,滤过,合并滤液,并定容至 500 mL,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,备用。

2.2.4 HPLC 梯度分析方法考察 对蟾酥 HPLC 梯度分析方法进行了方法学考察,包括精密度、重复性、稳定性试验,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%,符合 HPLC 图谱技术分析要求。

2.2.5 不同产地蟾酥 HPLC 图谱梯度分析成分比较 分别取 12 批蟾酥药材,按照 2.2.3 项下方法制备蟾酥样品的供试品溶液并按照 2.2.1 色谱条件项下测定,记录 45 min 图。通过比较各样品色谱图,

并标示出 15 个共有峰作为构成液相色谱稳定的特征峰, 其中 14 号峰为华蟾酥毒基, 15 号峰为脂蟾毒配基, 12 批蟾酥药材 HPLC 图谱见图 2。



注: 1. 河南 ; 2. 四川 ; 3. 河南 ; 4. 河北 ; 5. 山东 ; 6. 湖北 ; 7. 辽宁 ; 8. 湖南 ; 9. 湖南 ; 10. 河北 ; 11. 山东 ; 12. 山东临沂。

图 2 12 个产地蟾酥药材高效液相色谱

2.2.6 结果 从图 2 可见, 12 批不同产地蟾酥药材具有相似的高效液相色谱峰貌, 不同产地蟾酥之间具有一致的特征性, 反映蟾酥所含化学成分基本类似。但所含成分含量存在明显差异, 表现在 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14 号(华蟾酥毒基)、15 号(脂蟾毒配基)峰上, 特别是在 7, 8 和 14 号(华蟾酥毒基)、15 号峰(脂蟾毒配基)上, 产地不同其含量差异明显, 且 7, 8 号峰的含量与 1, 15 号峰的含量基本呈相反趋势, 14 和 15 号峰含量越高 7 号和 8 号峰含量就越低, 反之亦然。从脂蟾毒配基和华蟾酥毒基的含量看, 12 批样品含量依次为: 山东临沂 > 山东 > 河北 > 湖南 > 湖南 > 辽宁 > 湖北 > 山东 > 河北 > 河南 > 四川 > 河南。

2.3 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基有效成分含量测定比较 按照 2005 年版《中国药典》一部蟾酥项下含量测定色谱条件^[1]进行测定。

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 0.5% KH₂PO₄ (调 pH 至 3.2 ± 0.05) 溶液-乙腈(50:50), 流速 1 mL/min, 检测波长 296 nm。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.2 项下的对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定峰面积积分值, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得华蟾酥毒基在 0.048 4 ~ 0.484 μg 线性关系良好, 其回归方程为 $Y = 6.95 \times 10^2 X - 3.26$, $r = 0.999 3$; 脂蟾毒配基在 0.053 2 ~ 0.532 0 μg 线性关系良好, 其回归方程为 $Y = 6.57 \times 10^2 X - 4.89$, $r = 0.999 8$ 。

2.3.3 含量测定和结果 分别精密吸取 2.2.3 项下的供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按

2.3.1 项下 色谱条件采用外标法进行测定, 计算, 结果见表 2。

表 2 12 批次蟾酥药材华蟾酥毒基和脂蟾毒配基测定 %

No.	样品产地	华蟾酥毒基	脂蟾毒配基
1	河南	0.943	0.198
2	四川	0.940	0.201
3	河南	0.937	0.203
4	河北	2.430	0.275
5	山东	2.420	0.291
6	湖北	2.410	0.307
7	辽宁	4.890	0.672
8	湖南	3.940	1.810
9	湖南	4.000	1.860
10	河北	4.060	1.916
11	山东	4.950	6.670
12	山东临沂	6.520	7.550

由表 2 可见, 12 个不同来源的蟾酥药材的测定结果表明, 不同产地药材中均含有华蟾酥毒基和脂蟾毒配基两种成分, 但含量差异较大, 以产自山东临沂和山东的蟾酥有效成分含量均较高, 河北、湖南、次之, 河南、与四川的含量较低。

3 讨论

曾用《中国药典》(2005 年版一部) 蟾酥项下的薄层鉴别方法, 用环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:4:3) 展开系统进行一次展开并显色后, 结果斑点分离不佳, 且显色不清晰。故对展开剂比例进行调整, 且由于三氯甲烷毒性较大, 替换为二氯甲烷, 最后以环己烷-二氯甲烷-丙酮(2:1:1) 比例展开 2 次, 显色, 斑点分离清晰, 分离度较好。薄层色谱方法采用 2 次展开方式, 有效地将多种成分较好地分离, 更好地反映样品中所含组分的情况, 可用于蟾酥药材的快速鉴别和质量分析。

对乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸液、甲醇-磷酸液等的不同比例进行比较分析, 以乙腈-0.01% H₃PO₄ 溶液为流动相洗脱最佳, 且梯度洗脱能够较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多, 基线较平, 同时避免缓冲盐对色谱柱的伤害。对 C₈ 和 C₁₈ 色谱柱进行过比较, 以 C₁₈ 色谱柱的分离度高, 峰型也较为对称。曾对蟾酥采用不同乙醇浓度和甲醇^[5-6] 进行提取比较, 结果以 80% 乙醇提取蟾酥结果最佳, 因此, 作者采用了 80% 乙醇对不同产地蟾酥进行了研究分析。

薄层色谱和高效液相色谱研究结果表明, 不同

产地蟾酥药材质量所含成分类型基本相似,但也存在明显的差异,其中以脂蟾毒配基含量变化最为明显。从高效液相色谱图还可以看出其他成分存在的明显差异,主要表现在 7 号、8 号峰的含量与 14 号(华蟾酥毒基)、15 号(脂蟾毒配基)峰,其含量显示一定的相反趋势,提示可能存在一定相关性。由研究结果可知,蟾酥质量差异明显,蟾酥在制剂应用中应明确产地并做深层的质量跟踪控制,确保制剂疗效。

通过比较 12 批次蟾酥药材中的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量,以产自山东临沂和山东 的蟾酥有效成分含量均较高,河北 、湖南 、 次之,河南 、 与四川的含量较低,可见不同产地蟾酥质量参差不齐。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化工出版社, 2005: 265.
- [2] 付兰, 何树芸, 潘德敏. 蟾酥不同炮制品蟾毒内酯的含量测定[J]. 中药材, 1990, 13(2): 25.
- [3] 杜立颖, 王爱民, 王玺, 等. HPLC 法测定蟾酥内华蟾毒精和脂蟾毒配基[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(1): 33.
- [4] 袁旭江, 霍务贞, 朱盛山, 等. 广藿香 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(3): 195.
- [5] 袁旭江, 沈嘉茵, 朱盛山. 不同提取方法对蟾酥有效成分的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(65): 66.
- [6] 沈嘉茵, 袁旭江, 朱盛山, 等. 正交法对蟾酥提取工艺影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 27.

欢迎订阅 2010 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》是经中国科技部批准,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物。已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊);“中国中文核心期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊;“中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊(光盘版)优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月。本着以提高与普及相结合的办刊方针。主要设置:制剂工艺、化学与分析、药理、临床、综述、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量分析、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。

《中国实验方剂学杂志》现为月刊,16 开本,130 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 10 元,全年 120 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部。邮编:100700,联系人:何希荣,联系电话:(010) 84076882 或 64014411 转 2849;E-mail: czd@ vip. sina. com