

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.11.009

曹桂云, 宁波, 向阳, 等. 基于高效液相色谱法特征图谱和一测多评的蟾酥质量评价 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(11): 81-95.

基于高效液相色谱法特征图谱和一测多评的蟾酥质量评价

曹桂云¹, 宁波¹, 向阳¹, 张永清², 刘兴村¹,
庄雪松¹, 孟兆青¹, 黄蒙蒙¹, 张风超¹

1. 山东宏济堂制药集团股份有限公司中药研究院 济南市专家工作站, 济南 250103;

2. 山东中医药大学 药学院, 济南 250355

摘要: 为了对不同产地蟾酥质量进行对比研究, 利用 24 批蟾酥建立了 HPLC 特征图谱, 比较不同产地蟾酥特征图谱相似度, 进行聚类分析和主成分分析, 针对特征图谱中的日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基 5 个共有峰建立 HPLC 一测多评方法, 测定 24 批蟾酥中 5 个成分的含量。结果发现: 建立蟾酥特征图谱, 确定 9 个共有峰, 指认其中 5 个共有峰, 指纹图谱相似度范围是 0.136~0.996, 四川样本与其他各省样品相似度最低。相似度分析、聚类分析和主成分分析结果表明, 蟾酥样品化学成分具有一定的地域规律性。不同省份蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量相差较大, 东北三省及河北、山东、江苏 3 个东部省份蟾酥样品蟾毒内酯类含量较高, 河南、四川省蟾毒内酯类含量较低。不同批次蟾酥 5 种蟾毒内酯类化合物含量比例差别较大, 未体现出明显的地域特性。研究建立了蟾酥特征图谱检测方法及含量一测多评检测方法, 为蟾酥药材质量评价研究提供依据。蟾酥中蟾毒内酯类成分的积累具有一定的地域性, 对于蟾蜍的养殖及蟾酥药材资源的合理开发应用具有重要指导意义。

关键词: 蟾酥; 高效液相; 特征图谱; 聚类分析; 主成分分析;
一测多评; 质量评价

中图分类号: Q956; R917

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2023)11-0081-15

Quality Evaluation of Bufonis Venenum Based on HPLC Specific Chromatograms Combined with QAMS

CAO Guiyun¹, NING Bo¹, XIANG Yang¹,
ZHANG Yongqing², LIU Xingcun¹, ZHUANG Xuesong¹,
MENG Zhaoqing¹, HUANG Mengmeng¹, ZHANG Fengchao¹

收稿日期: 2023-06-26

基金项目: 山东省重点研发计划重大科技创新性工程项目(2020CXGC010505)。

作者简介: 曹桂云, 博士, 高级工程师, 主要从事中药研发工作。

通信作者: 孟兆青, 博士, 高级工程师。

1. Academy of traditional Chinese Medicine, Jinan Expert Workstation, Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Co. Ltd., Jinan 250103, China;
2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: To compare and evaluate the quality of *Bufois Venenum* from different origins. The high performance liquid chromatography (HPLC) specific chromatograms were established using 24 batches of *Bufois Venenum*. The similarity evaluation, cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) were carried out. A quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) was established to determine the content of main chemical components in *Bufois Venenum*. The specific chromatograms of *Bufois Venenum* were established, a total of 9 common peaks were calibrated and 5 of them were identified. The specific chromatograms similarities ranged from 0.136 to 0.996. The samples from Sichuan had the lowest similarity with those from other provinces. The results of similarity evaluation, HCA and PCA showed that the quality of *Bufois Venenum* was mainly affected by the factor of geographic location. The contents of gamabufalin, bufotalin, bufalin, cinobufagin, resibufogenin in *Bufois Venenum* from different geographical origins were quite different, higher in the samples from Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Hebei, Shandong, Jiangsu, lower in those from Henan, Sichuan. The proportions of these five bufadienolides compounds in different batches of *Bufois Venenum* were also quite different, with no regularity in their origins. The HPLC specific chromatogram method and multi-evaluation method established provide the basis for the research on the quality of *Bufois Venenum*. The research showed that the accumulation of bufadienolides had certain regional regularity which is of great significance for the breeding of toads and the rational development of the medicinal resources of *Bufois Venenum*.

Key words: *Bufois Venenum*; high performance liquid chromatography (HPLC); specific chromatograms; cluster analysis (HCA); principal component analysis (PCA); quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); quality evaluation

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)的干燥分泌物,多于夏、秋二季捕捉蟾蜍,洗净,挤取耳后腺和皮肤腺的白色浆液,加工、干燥,即得蟾酥的功能为解毒、止痛、开窍醒神,常用于痈疽疔疮、咽喉肿痛、中暑神昏以及痧胀腹痛吐泻的治疗^[1]。现代药理研究表明,蟾酥具有抗肿瘤、强心、局部麻醉、镇痛、抗炎等多种作用,近年被用于治疗急性心力衰竭、慢性支气管炎、坐骨神经痛等^[2-9]。

目前市场上蟾酥质量差异较大,一方面所控制成分含量差异较大,另一方面成分之间的组成比例相差较大^[10],究其原因可能与产地、加工方法、种质等因素有关^[11]。地理环境因素对产地蟾酥的质量虽有一定报道,但由于产地溯源问题、样本量问题及检验标准低的问题,导致数据不完善甚至存在相互矛盾的地方^[12-19]。为此,本试验建立特征图谱和多成分一测多评方法^[20],从源头出发,比较不同产地蟾酥特征图谱的相似度,进行聚类分析和主成分分析^[20-24],并检测日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量,分析蟾酥药材的品质和产地的关系,更全面地了解我国蟾酥药材资源特点,并为蟾蜍养殖提供依据。

1 试验材料

试验所需的仪器主要有:Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司);DZF-6090 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);XS105 电子天平(METTLER TOLEDO);KDM 型可控温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司)。

试验样品及试剂:华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒灵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110803-201807,110718-201809,111981-201501,纯度分别为 99.6%,98.0%,99.2%),日蟾毒它灵对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号为 170913,纯度 $\geq 98\%$),蟾毒它灵对照品(上海诗丹德生物技术有

限公司, 批号为 3425, 纯度 $\geq 98\%$). 乙腈为色谱纯, 水为屈臣氏纯净水, 其他试剂为分析级. 蟾酥由本司到吉林、辽宁、黑龙江、江苏、四川、河南、山东、河北实地采集得到, 所有样品均由山东中医药大学药学院张永清教授鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor)或黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus* Schneider)的干燥分泌物. 样品信息见表 1.

表 1 蟾酥产地信息

序号	编号	产品批号	产地	序号	编号	产品批号	产地
S1	HLJ1	21041302	黑龙江	S13	SD3	21042201	山东
S2	HLJ2	21052503	黑龙江	S14	SD4	21042204	山东
S3	JL1	21051204	吉林	S15	SD5	21051201	山东
S4	JL2	21060401	吉林	S16	SD6	21052502	山东
S5	JL3	21060403	吉林	S17	HB1	21052801	河北
S6	LN1	21041301	辽宁	S18	HN1	21050701	河南
S7	LN2	21051202	辽宁	S19	HN2	21060405	河南
S8	LN3	21051203	辽宁	S20	JS1	21042202	江苏
S9	LN4	21060402	辽宁	S21	JS2	21050702	江苏
S10	LN5	21060404	辽宁	S22	SC1	21042203	四川
S11	SD1	21041303	山东	S23	SC2	21052501	四川
S12	SD2	21041304	山东	S24	SC3	21052802	四川

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 对照品溶液的制备

分别精密称取日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基对照品适量, 加甲醇稀释, 制成浓度分别为 51.597 0, 102.508 0, 87.198 0, 97.020 0, 51.793 0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液.

2.1.2 供试品溶液的制备

分别对提取方式、提取溶剂、提取时间和称样量等进行考察, 确定供试品制备方式如下: 取本品细粉约 25 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得.

2.2 色谱条件与系统适用性

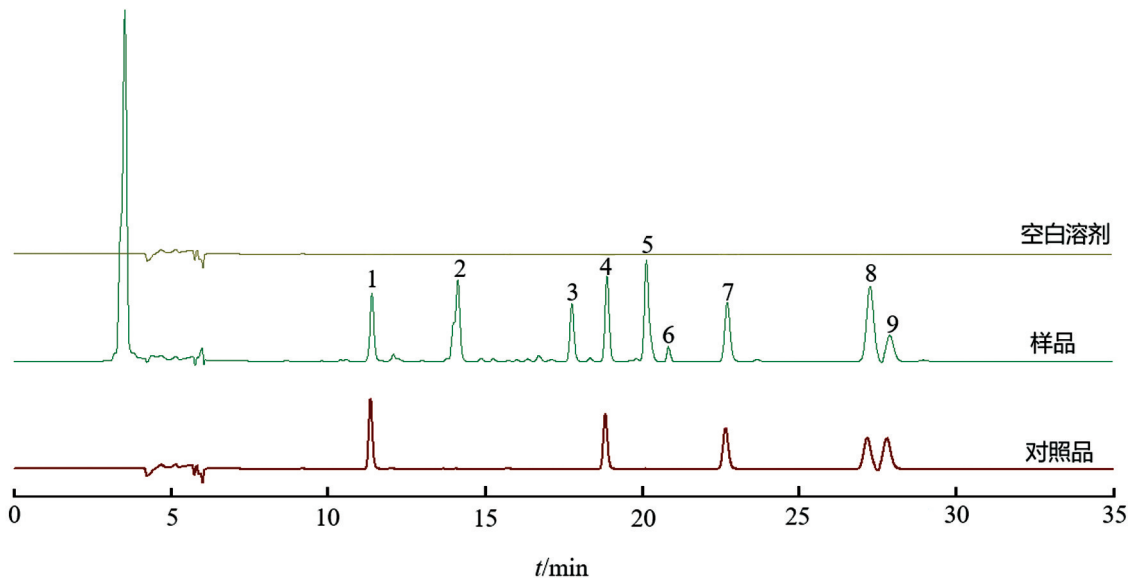
以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为 250 mm, 内径为 4.6 mm, 粒径为 5 μm); 以乙腈-0.3% 乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~15 min, 28%~54%乙腈; 15~35 min, 54%乙腈; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速为每分钟 0.6 mL; 检测波长 296 nm. 理论板数按华蟾酥毒基峰计算应不低于 10 000. 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得.

2.3 HPLC 特征图谱研究

2.3.1 方法学考察

取蟾酥供试品溶液、空白溶剂按“2.2”项下的色谱条件注入色谱仪进行测定, 结果表明, 阴性样无干扰, 方法专属性良好(图 1). 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图. 以峰 8 为参照峰, 各标识峰相对保留时间 RSD(相对标准差)为 0.16%~0.41%, 相对峰面积的 RSD 为 0.07%~0.84%, 表明该方法重复性良好. 不同分析人员在不同时间利用另一台高效液相色谱仪, 再次进行重复性试验. 分析两次重复性试验结果, 各标识峰相对保留时间 RSD 为 0.16%~0.95%, 相对峰面积的 RSD 为 0.10%~1.02%, 表明该方法中间精密度良好. 分别在 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 测定同一供试品溶液. 以峰 8 为参照峰, 各标识峰相对保留时间 RSD 为 0.47%~1.82%, 相对峰面积的 RSD 为 0.15%~2.03%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好. 采用 Agilent 1260 和 waters e2695 两种高效液相色谱系统, 4 根色谱柱测定同一供试品溶液, 各标识峰相对保留时间 RSD 为 0.96%~1.46%, 相对峰面积的 RSD 为 1.99%~2.57%; 采用不同流速和不同柱温测定同一供试品溶

液,各标识峰相对保留时间 RSD 为 1.87%~2.05%,峰面积的 RSD 为 0.98%~1.85%。以上结果表明方法耐用性良好。



1. 日蟾毒它灵; 4. 蟾毒它灵; 7. 蟾毒灵; 8. 华蟾酥毒基; 9. 脂蟾毒配基.

图 1 专属性色谱图

2.3.2 特征图谱的建立及检测

将 24 批蟾酥样品以“2.2”项下色谱条件分析,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”叠加色谱图见图 2,对照特征图谱见图 3. 选择出峰稳定、峰形和分离度较好的 9 个共有峰作为特征峰,经对照品对照,确定峰 1 为日蟾毒它灵,峰 4 为蟾毒它灵,峰 7~9 为蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基。

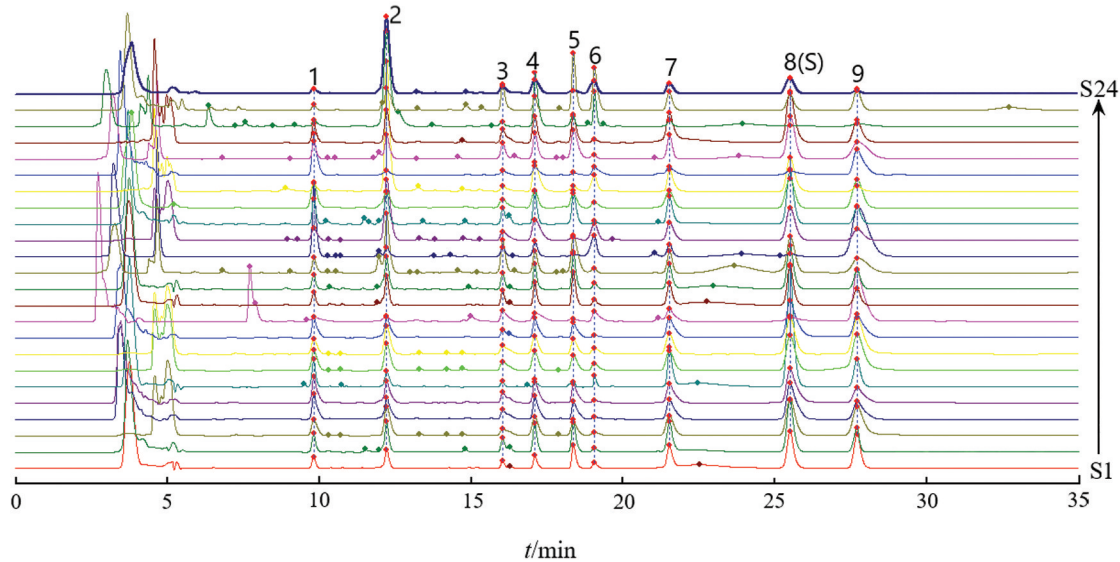
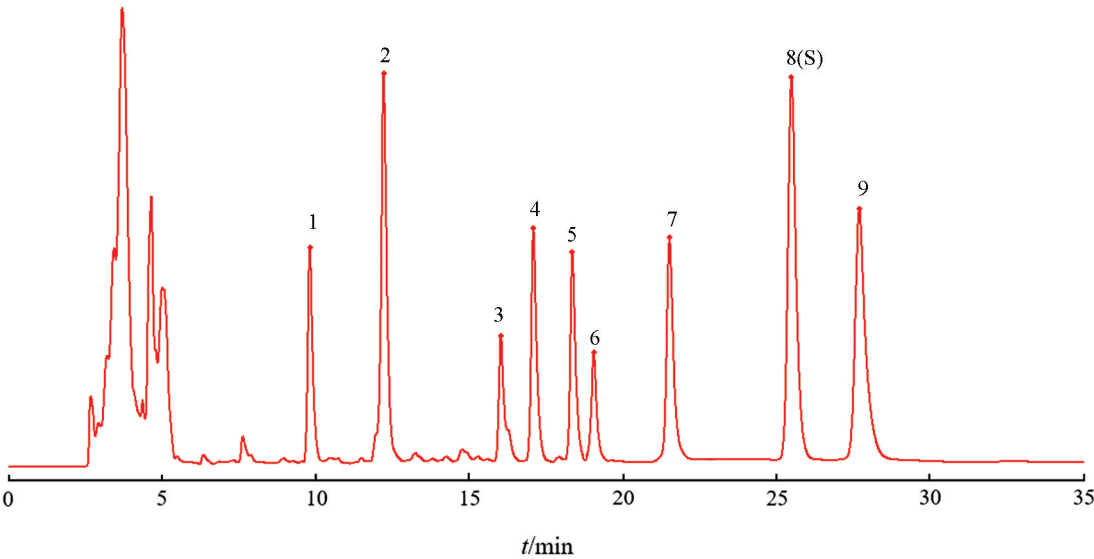


图 2 24 批蟾酥特征图谱

采用多点校正后对共有峰进行 Mark 匹配并进行相似度分析,24 批次蟾酥样品特征图谱相似度为 0.136~0.996,四川样本与其他各省样品相似度最低。对相同产地样品特征图谱进行比较:HLJ1 和 HLJ2,特征图谱相似度>0.9;JL1-JL3,特征图谱相似度>0.9;LN1 和 LN5 与其他辽宁批次蟾酥特征图谱相似度小,LN2,LN3,LN5 批次相似度>0.9;SD4 与其他山东批次特征图谱相似度较小,其余山东批次相似度>0.8;HN1 和 HN2 特征图谱相似度较小,为 0.300;JS1 和 JS2 特征图谱相似度>0.9;SC1 和 SC3 特征图谱相似度为 0.86,SC2 和 SC1 和 SC3 特征图谱相似度较小,分别为 0.535 和 0.539。对不同产地样品特征图谱进行比较:不同省份样品差异性较大,但 1 批河南样品(HN1)、1 批四川样品

(SC3)、1 批山东样本(SD5)特征图谱相似度大于 0.9。以上结果表明, 不同产地蟾酥样品成分差异较大, 相同产地蟾酥样品相似性相对较好, 但也有同一省份的蟾酥样品差异性较大的情况(表 2)。说明蟾酥作为动物来源药材质量不可控性因素复杂, 除地域因素外, 可能受药材基原、动物个体间差异及蟾酥产地加工等影响较大^[7, 13-14]。



1. 日蟾毒它灵; 4. 蟾毒它灵; 7. 蟾毒灵; 8(S). 华蟾酥毒基; 9. 脂蟾毒配基。

图 3 对照特征图谱

表 2 24 批蟾酥样品特征图谱相似度评价结果

编号	HLJ1	HLJ2	JL1	JL2	JL3	LN1	LN2	LN3	LN4	LN5	SD1	SD2	SD3	SD4	SD5	SD6	HB1	HN1	HN2	JS1	JS2	SC1	SC2	SC3
HLJ1	1.000	0.912	0.946	0.910	0.887	0.827	0.940	0.949	0.932	0.699	0.850	0.858	0.785	0.646	0.717	0.861	0.455	0.527	0.745	0.868	0.891	0.316	0.717	0.463
HLJ2	0.912	1.000	0.949	0.988	0.986	0.871	0.893	0.921	0.978	0.522	0.946	0.956	0.908	0.513	0.834	0.989	0.456	0.660	0.635	0.972	0.969	0.427	0.743	0.588
JL1	0.946	0.949	1.000	0.963	0.941	0.809	0.985	0.995	0.976	0.707	0.887	0.896	0.846	0.690	0.824	0.904	0.479	0.648	0.792	0.900	0.922	0.433	0.717	0.587
JL2	0.910	0.988	0.963	1.000	0.997	0.871	0.916	0.937	0.986	0.552	0.928	0.937	0.888	0.595	0.838	0.975	0.470	0.651	0.714	0.962	0.965	0.423	0.705	0.579
JL3	0.887	0.986	0.941	0.997	1.000	0.879	0.884	0.909	0.977	0.497	0.928	0.937	0.893	0.556	0.841	0.983	0.461	0.658	0.677	0.966	0.961	0.425	0.692	0.585
LN1	0.827	0.871	0.809	0.871	0.879	1.000	0.738	0.773	0.902	0.381	0.784	0.794	0.703	0.348	0.693	0.864	0.383	0.484	0.486	0.868	0.856	0.136	0.472	0.390
LN2	0.940	0.893	0.985	0.916	0.884	0.738	1.000	0.996	0.937	0.792	0.830	0.838	0.777	0.778	0.745	0.832	0.476	0.556	0.862	0.838	0.862	0.382	0.718	0.504
LN3	0.949	0.921	0.995	0.937	0.909	0.773	0.996	1.000	0.956	0.760	0.860	0.868	0.812	0.730	0.784	0.865	0.477	0.600	0.823	0.869	0.893	0.406	0.729	0.544
LN4	0.932	0.978	0.976	0.986	0.977	0.902	0.937	0.956	1.000	0.604	0.904	0.914	0.844	0.599	0.810	0.951	0.469	0.614	0.720	0.945	0.946	0.356	0.666	0.536
LN5	0.699	0.522	0.707	0.552	0.497	0.381	0.792	0.760	0.604	1.000	0.467	0.473	0.394	0.757	0.364	0.422	0.343	0.195	0.780	0.460	0.504	0.161	0.512	0.173
SD1	0.850	0.946	0.887	0.928	0.928	0.784	0.830	0.860	0.904	0.467	1.000	0.999	0.901	0.466	0.817	0.941	0.427	0.675	0.576	0.920	0.919	0.475	0.761	0.617
SD2	0.858	0.956	0.896	0.937	0.937	0.794	0.838	0.868	0.914	0.473	0.999	1.000	0.910	0.468	0.825	0.951	0.431	0.682	0.580	0.929	0.926	0.478	0.767	0.623
SD3	0.785	0.908	0.846	0.888	0.893	0.703	0.777	0.812	0.844	0.394	0.901	0.910	1.000	0.414	0.884	0.915	0.403	0.798	0.510	0.919	0.882	0.594	0.780	0.764
SD4	0.646	0.513	0.690	0.595	0.556	0.348	0.778	0.730	0.599	0.757	0.466	0.468	0.414	1.000	0.413	0.452	0.373	0.237	0.972	0.466	0.500	0.270	0.519	0.227
SD5	0.717	0.834	0.824	0.838	0.841	0.693	0.745	0.784	0.810	0.364	0.817	0.825	0.884	0.413	1.000	0.840	0.380	0.946	0.499	0.796	0.830	0.751	0.659	0.913
SD6	0.861	0.989	0.904	0.975	0.983	0.864	0.832	0.865	0.951	0.422	0.941	0.951	0.915	0.452	0.840	1.000	0.438	0.680	0.576	0.970	0.959	0.446	0.717	0.607
HB1	0.455	0.456	0.479	0.470	0.461	0.383	0.476	0.477	0.469	0.343	0.427	0.431	0.403	0.373	0.380	0.438	1.000	0.283	0.419	0.437	0.445	0.194	0.356	0.255
HN1	0.527	0.660	0.648	0.651	0.658	0.484	0.556	0.600	0.614	0.195	0.675	0.682	0.798	0.237	0.946	0.680	0.283	1.000	0.300	0.617	0.656	0.837	0.540	0.990
HN2	0.745	0.635	0.792	0.714	0.677	0.486	0.862	0.823	0.720	0.780	0.576	0.580	0.510	0.972	0.499	0.576	0.419	0.300	1.000	0.588	0.620	0.248	0.560	0.275
JS1	0.868	0.972	0.900	0.962	0.966	0.868	0.838	0.869	0.945	0.460	0.920	0.929	0.919	0.466	0.796	0.970	0.437	0.617	0.588	1.000	0.950	0.382	0.708	0.542
JS2	0.891	0.969	0.922	0.965	0.961	0.856	0.862	0.893	0.946	0.504	0.919	0.926	0.882	0.500	0.830	0.959	0.445	0.656	0.620	0.950	1.000	0.405	0.703	0.583
SC1	0.316	0.427	0.433	0.423	0.425	0.136	0.382	0.406	0.356	0.161	0.475	0.478	0.594	0.270	0.751	0.446	0.194	0.837	0.248	0.382	0.405	1.000	0.535	0.860
SC2	0.717	0.743	0.717	0.705	0.692	0.472	0.718	0.729	0.666	0.512	0.761	0.767	0.780	0.519	0.659	0.717	0.356	0.540	0.560	0.708	0.703	0.535	1.000	0.539
SC3	0.463	0.588	0.587	0.579	0.585	0.390	0.504	0.544	0.536	0.173	0.617	0.623	0.764	0.227	0.913	0.607	0.255	0.990	0.275	0.542	0.583	0.860	0.539	1.000
R	0.922	0.966	0.978	0.973	0.962	0.808	0.942	0.961	0.964	0.62	0.926	0.934	0.911	0.641	0.891	0.941	0.540	0.736	0.738	0.929	0.943	0.539	0.771	0.681

以峰 8 为参照峰(S)，各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.00%~2.62%，9 个特征峰相对保留时间差异较小，均在平均值±10%范围内，选择相对保留时间的平均值作为规定值. 规定值为：0.38(峰 1)、0.48(峰 2)、0.63(峰 3)、0.67(峰 4)、0.73(峰 5)、0.75(峰 6)、0.84(峰 7)、1.09(峰 9)，允许误差±10%. 峰 1 至峰 7、峰 9 的相对峰面积分别为 0.133~13.116，0.314~89.607，0.114~52.354，0.241~11.359，0.028~35.626，0.271~7.640，0.183~17.895；相对峰面积 RSD 分别为 231.63%，404.85%，426.12%，234.93%，385.20%，189.72%，164.88%，190.05%. 不同批次蟾酥样品共有峰相对峰面积差别较大，其中 LN5,SD4,SC1 批与其他批次比例差异最大(表 3).

表 3 24 批蟾酥样品特征图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积

编号	峰 1		峰 2		峰 3		峰 4		峰 5		峰 6		峰 7		峰 8(S)		峰 9	
	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对	相对保	相对
	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积	留时间	峰面积
HLJ1	0.367	0.183	0.470	0.350	0.624	0.131	0.672	0.241	0.732	0.419	0.760	0.100	0.849	0.535	1.000	1.000	1.091	1.098
HLJ2	0.374	0.203	0.475	0.398	0.634	0.162	0.677	0.354	0.735	0.429	0.764	0.053	0.852	0.418	1.000	1.000	1.093	0.543
JL1	0.386	0.279	0.483	0.547	0.640	0.174	0.677	0.356	0.732	0.258	0.759	0.078	0.845	0.439	1.000	1.000	1.088	1.063
JL2	0.373	0.364	0.473	0.391	0.631	0.199	0.674	0.391	0.732	0.310	0.760	0.047	0.847	0.419	1.000	1.000	1.094	0.602
JL3	0.373	0.375	0.475	0.378	0.632	0.204	0.675	0.385	0.733	0.312	0.761	0.043	0.847	0.387	1.000	1.000	1.094	0.487
LN1	0.366	0.133	0.468	0.087	0.634	0.028	0.671	0.050	0.731	0.028	0.759	0.061	0.848	0.271	1.000	1.000	1.091	0.269
LN2	0.385	0.373	0.481	0.524	0.639	0.218	0.676	0.380	0.731	0.302	0.758	0.144	0.844	0.455	1.000	1.000	1.088	1.514
LN3	0.385	0.273	0.482	0.535	0.639	0.204	0.676	0.353	0.731	0.288	0.758	0.131	0.844	0.459	1.000	1.000	1.089	1.295
LN4	0.373	0.257	0.475	0.325	0.633	0.091	0.675	0.277	0.733	0.219	0.762	0.040	0.848	0.347	1.000	1.000	1.094	0.676
LN5	0.373	3.099	0.474	0.346	0.632	0.375	0.674	0.776	0.733	0.200	0.761	0.769	0.847	1.151	1.000	1.000	1.094	7.203
SD1	0.368	0.202	0.470	0.542	0.625	0.238	0.672	0.389	0.732	0.579	0.760	0.100	0.849	0.470	1.000	1.000	1.091	0.526
SD2	0.368	0.195	0.470	0.539	0.626	0.237	0.673	0.378	0.732	0.571	0.760	0.097	0.849	0.451	1.000	1.000	1.091	0.522
SD3	0.396	0.229	0.488	0.970	0.623	0.512	0.661	0.355	0.704	0.648	0.720	0.073	0.830	0.472	1.000	1.000	1.067	0.446
SD4	0.396	13.116	0.487	1.768	0.623	1.767	0.661	2.843	0.705	0.429	0.720	4.358	0.830	3.116	1.000	1.000	1.067	17.895
SD5	0.385	0.237	0.482	1.285	0.639	0.216	0.677	0.445	0.732	0.057	0.758	0.528	0.844	0.468	1.000	1.000	1.087	0.389
SD6	0.374	0.263	0.470	0.413	0.635	0.173	0.676	0.377	0.736	0.440	0.765	0.037	0.851	0.409	1.000	1.000	1.094	0.362
HB1	0.375	0.570	0.473	0.446	0.629	0.249	0.671	0.406	0.728	0.350	0.756	0.134	0.844	0.491	1.000	1.000	1.095	1.121
HN1	0.385	0.141	0.485	2.390	0.645	0.114	0.684	0.551	0.718	0.096	0.739	0.344	0.852	0.498	1.000	1.000	1.086	0.183
HN2	0.373	2.922	0.474	0.445	0.632	0.437	0.674	0.751	0.733	0.207	0.761	0.725	0.847	0.886	1.000	1.000	1.094	4.106
JS1	0.396	0.220	0.488	0.314	0.623	0.209	0.661	0.342	0.704	0.407	0.720	0.052	0.830	0.432	1.000	1.000	1.067	0.425
JS2	0.385	0.223	0.484	0.417	0.645	0.203	0.683	0.330	0.739	0.340	0.766	0.051	0.852	0.786	1.000	1.000	1.086	0.525
SC1	0.396	4.548	0.478	89.607	0.623	52.354	0.661	11.359	0.705	35.626	0.720	2.159	0.831	7.640	1.000	1.000	1.067	4.887
SC2	0.373	0.200	0.474	1.157	0.633	1.011	0.677	0.527	0.734	2.210	0.763	1.697	0.852	0.814	1.000	1.000	1.093	1.515
SC3	0.375	0.200	0.474	3.406	0.630	0.344	0.672	0.609	0.709	0.146	0.729	0.576	0.845	0.540	1.000	1.000	1.095	0.204
平均值	0.38	1.20	0.48	4.48	0.63	2.49	0.67	0.97	0.73	1.87	0.75	0.52	0.84	0.93	1.00	1.00	1.09	1.99
RSD/%	2.62	231.63	1.30	404.85	1.08	426.12	0.95	234.93	1.59	385.20	2.19	189.72	0.84	164.88	0.00	0.00	0.89	190.05

2.4 聚类分析

以 24 批蟾酥特征图谱中 9 个共有峰峰面积为变量，利用 SPSS 20.0 软件进行聚类分析，结果见图 4. 当刻度距离为 15 时，可分为 3 类，HLJ1,HLJ2,JL1,JL2,JL3,LN2,LN3,SD1,SD2,SD3,SD6,HB1,JS1,JS2,SC2 聚为一类，LN5,SD4,HN2 聚为一类，HN1,SC3,SD5,SC1,LN1 聚为一类，说明蟾酥中二次代谢产物的积累受一定地域因素影响，但同一产地蟾酥质量也存在差异性，不同产地蟾酥质量亦具有相似性. 聚类分析与相似度评价结果基本类似.

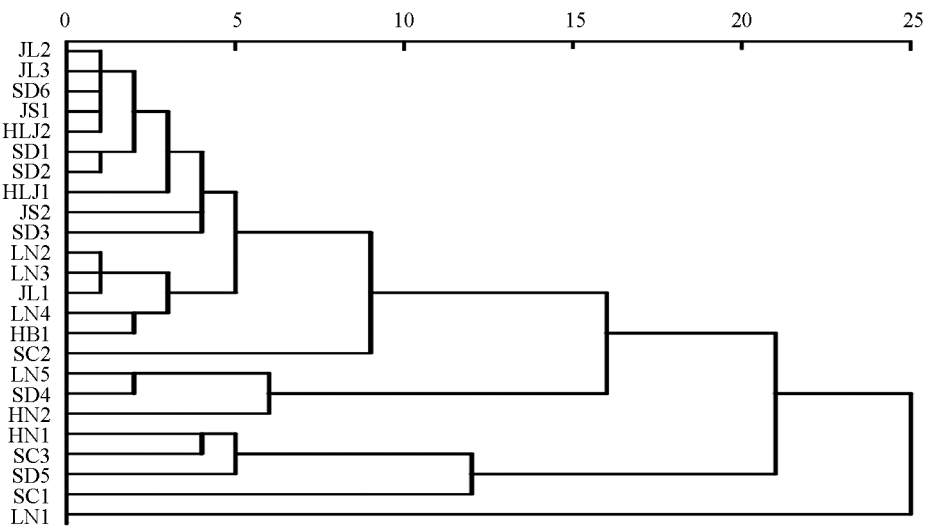


图 4 不同产地蟾酥聚类分析图

2.5 主成分分析

以 24 批蟾酥特征图谱中 9 个共有峰峰面积为变量, 利用 SPSS 20.0 软件进行主成分分析, 以特征值 >1 为提取标准得到 3 个主成分, 累计方差贡献率为 72.961%, 可以代表蟾酥中 9 个共有峰成分的大部分信息. 碎石图见图 5, 特征值及方差贡献率见表 4, 各主成分得分见表 5、图 6. 由图 6 可知, 24 批蟾酥样品可分为 4 类, HLJ1, HLJ2, JL1, JL2, JL3, LN1, LN2, LN3, LN4, SD1, SD2, SD3, SD6, HB1, JS1, JS2, SC2 为一类, LN5, SD4, HN2 为一类, HN1, SC3, SD5 为一类, SC1 为一类, 主成分分析与聚类分析结果基本相似.

表 4 蟾酥主成分分析特征值及方差贡献率

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	2.845	31.612	31.612
2	2.318	25.754	57.366
3	1.403	15.594	72.961

表 5 24 批蟾酥主成分分析得分系数矩阵

序号	批次	主成分 1	主成分 2	主成分 3
S1	HLJ1	-0.19	-0.09	-0.43
S2	HLJ2	0.20	0.40	-0.34
S3	JL1	-0.13	0.35	-0.02
S4	JL2	0.03	0.43	-0.18
S5	JL3	0.07	0.41	-0.19
S6	LN1	-0.42	0.96	0.27
S7	LN2	-0.31	0.29	-0.18
S8	LN3	-0.18	0.30	-0.10
S9	LN4	-0.15	0.52	-0.05
S10	LN5	-1.30	-0.55	-0.30
S11	SD1	0.22	-0.06	-0.39
S12	SD2	0.28	0.05	-0.43

续表 5

序号	批次	主成分 1	主成分 2	主成分 3
S13	SD3	0.75	−0.02	−0.81
S14	SD4	−1.37	−0.87	0.12
S15	SD5	0.20	−0.23	2.00
S16	SD6	0.30	0.51	−0.33
S17	HB1	−0.27	0.11	−0.26
S18	HN1	0.59	−0.09	2.47
S19	HN2	−0.88	−0.75	−0.11
S20	JS1	0.28	0.52	−0.46
S21	JS2	0.29	1.26	−0.22
S22	SC1	1.21	−1.56	−1.21
S23	SC2	0.39	−1.11	−0.49
S24	SC3	0.38	−0.76	1.64

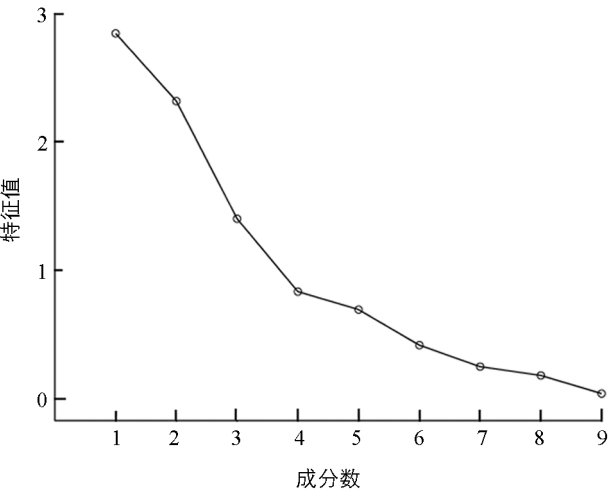


图 5 蟾酥碎石图

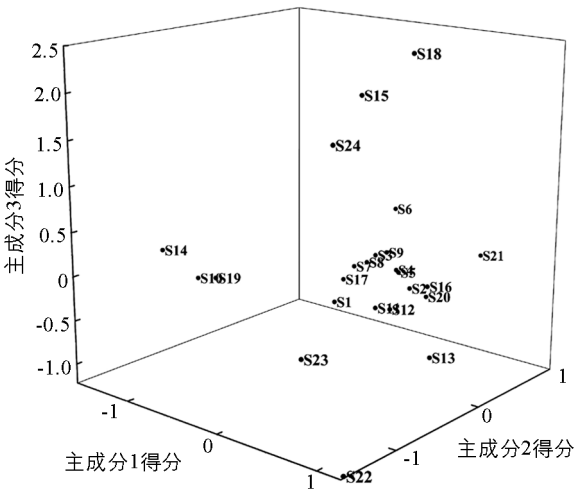


图 6 蟾酥主成分分析得分图

2.6 一测多评方法建立

2.6.1 方法学考察

取蟾酥供试品溶液、空白溶剂按“2.2”项下的色谱条件注入色谱仪进行测定，结果表明，阴性样无干扰，方法专属性良好。精密量取混合对照品溶液，采用倍数稀释法分别稀释 2,4,8,16 倍，按“2.2”项下色谱条件测定。以对照品溶液的浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归并绘制标准曲线，计算回归方程及线性范围，结果显示各成分在一定浓度范围内线性关系良好(表 6)。取蟾酥样品 6 份按“2.1”项方法进行制备，按“2.2”项下的色谱条件注入色谱仪进行测定，日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量的 RSD 分别为 1.44%，2.08%，1.52%，1.51%，1.50%，表明该方法重复性良好。不同分析人员在不同时间利用不同仪器进行重复性试验，综合分析 2 次重复性试验的结果，蟾酥样品中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量的 RSD 分别为 1.50%，1.72%，1.43%，1.44%，1.47%，表明方法中间精密度良好。取 6 份蟾酥粉末约 15 mg，精密称定，加入对照品溶液适量，按“2.2”项下进行含量测定，测定 5 种成分的含量，并计算回收率，日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基回收率分别为 96.98%~100.13%，99.20%~101.66%，96.91%~99.82%，99.91%~100.82%，100.02%~100.99%，符合分析要求。取同一供试品溶液，按“2.2”项下的色谱条件于 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h 进样测定，日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量的 RSD 分

别为 0.31%,0.22%,0.25%,0.27%,0.21%,表明供试品在 24 h 内稳定性良好.

表 6 线性方程及线性范围结果

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
日蟾毒它灵	Y=14.044X-3.301 5	0.999 9	3.22~51.60
蟾毒它灵	Y=12.616X-5.601 2	0.999 8	6.41~102.51
蟾毒灵	Y=14.291X-4.137	0.999 7	5.45~87.20
华蟾酥毒基	Y=13.244X-7.866 8	0.999 9	6.06~97.02
脂蟾毒配基	Y=13.792X-5.241 7	0.999 9	3.24~51.79

2.6.2 相对校正因子计算

根据“2.4”项下的线性考察结果,以华蟾酥毒基为内参物,按照公式计算相对校正因子 $f[f=(A_s/C_s)/(A_i/C_i)(A_s$ 为内标峰面积, C_s 为内标浓度; A_i 为待测物峰面积, C_i 为待测物浓度)].日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基的相对校正因子分别为 0.93,1.04,0.92,1.00(表 7).

表 7 相对校正因子

序号	<i>f</i> 华蟾酥毒基/日蟾毒它灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/蟾毒它灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/蟾毒灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/脂蟾毒配基
1	0.94	1.04	0.95	0.98
2	0.92	1.00	0.92	1.00
3	0.93	1.05	0.93	1.01
4	0.92	1.05	0.89	1.01
5	0.92	1.05	0.93	1.01
平均值	0.93	1.04	0.92	1.00
RSD/%	0.80	1.94	2.06	1.23

2.6.3 校正因子的耐用性

采用 Agilent 1260 和 Waters e2695 两种高效液相色谱系统,3 根色谱柱考察仪器和色谱柱对相对校正因子的影响,结果见表 8,相对校正因子 RSD 值为 0.55%~1.11%,表明各待测组分相对校正因子在不同仪器和不同色谱柱之间耐用性良好.设置不同流速及柱温对相对校正因子进行测定,结果见表 9,相对校正因子 RSD 值为 0.56%~1.23%,不同流速及柱温条件下,各待测组分相对校正因子耐用性较好.

表 8 不同仪器和色谱柱测得相对校正因子

仪器	色谱柱	<i>f</i> 华蟾酥毒基/ 日蟾毒它灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/ 蟾毒它灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/ 蟾毒灵	<i>f</i> 华蟾酥毒基/ 脂蟾毒配基
Agilent 1260 LC-09	Kromasil 100-5-C18, SN: H210074	0.93	1.04	0.92	1.00
	Waters Atlantis T3, SN: 01893110314030	0.93	1.04	0.92	1.03
	Inertsil ODS-3, SN: 21D0201379	0.91	1.03	0.91	1.02
Agilent 1260 LC-12	Kromasil 100-5-C18, SN: H210074	0.92	1.03	0.92	1.01
	Waters Atlantis T3, SN: 01893110314030	0.93	1.03	0.92	1.02
	Inertsil ODS-3, SN: 21D0201379	0.92	1.03	0.92	1.03
Waters e2695	Kromasil 100-5-C18, SN: H210074	0.91	1.01	0.91	1.00
	Waters Atlantis T3, SN: 01893110314030	0.91	1.02	0.91	1.01
	Inertsil ODS-3, SN: 21D0201379	0.92	1.01	0.92	1.02
	平均值	0.92	1.03	0.92	1.02
	RSD/%	0.94	1.09	0.55	1.11

表 9 不同流速及不同柱温测得相对校正因子

流速/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	柱温/ $^{\circ}\text{C}$	f 华蟾酥毒基/ 日蟾毒它灵	f 华蟾酥毒基/ 蟾毒它灵	f 华蟾酥毒基/ 蟾毒灵	f 华蟾酥毒基/ 脂蟾毒配基
0.5	30	0.92	1.03	0.92	1.02
0.6	30	0.93	1.04	0.92	1.03
0.7	30	0.91	1.02	0.91	1.01
0.6	29	0.93	1.04	0.92	1.03
0.6	30	0.93	1.04	0.92	1.03
0.6	31	0.92	1.01	0.91	1.02
RSD/%		0.88	1.23	0.56	0.80

2.6.4 待测组分色谱峰的定位

分别计算各待测组分与内参物华蟾酥毒基的相对保留时间(t_i/s)与保留时间差($\Delta t_i/s$),并考察其在不同仪器和不同色谱柱之间的重现性,结果见表 10,相对保留时间波动较小,最终选择不同仪器和不同色谱柱中各待测成分的相对保留时间值的平均值作为峰定位依据.

表 10 不同仪器和色谱柱中各目标成分的相对保留时间及相对保留时间差

仪器	色谱柱		t 日蟾毒	Δt 日蟾毒	t 蟾毒它	Δt 蟾毒它	t 蟾毒灵/	Δt 蟾毒	t 脂蟾毒	Δt 脂蟾毒
			它灵/华蟾	它灵/华蟾	灵/华蟾	灵/华蟾	华蟾酥	灵/华蟾	配基/华	配基/华
			酥毒基	酥毒基	酥毒基	酥毒基	毒基	酥毒基	蟾酥毒基	蟾酥毒基
Agilent 1260 LC-09	Kromasil 100-5-C18	SN:	0.40	-15.03	0.69	-7.70	0.84	-4.09	1.03	0.66
	H210074									
	Waters Atlantis T3	SN:	0.42	-15.90	0.69	-8.40	0.83	-4.57	1.02	0.62
	01893110314030									
	Inertsil ODS-3	SN:	0.41	-16.31	0.68	-8.75	0.83	-4.71	1.03	0.91
	21D0201379									
Agilent 1260 LC-10	Kromasil 100-5-C18	SN:	0.40	-14.95	0.69	-7.61	0.84	-4.01	1.03	0.66
	H210074									
	Waters Atlantis T3	SN:	0.43	-15.70	0.69	-8.35	0.84	-4.49	1.02	0.64
	01893110314030									
	Inertsil ODS-3	SN:	0.42	-16.26	0.69	-8.75	0.83	-4.66	1.03	0.98
	21D0201379									
Waters e2695	Kromasil 100-5-C18	SN:	0.42	-16.47	0.69	-8.81	0.83	-4.74	1.03	0.89
	H210074									
	Waters Atlantis T3	SN:	0.42	-16.89	0.70	-8.91	0.80	-5.89	1.04	1.19
	01893110314030									
	Inertsil ODS-3	SN:	0.42	-17.19	0.69	-9.21	0.80	-6.07	1.03	1.00
	21D0201379									
	平均值		0.41	-16.08	0.69	-8.50	0.83	-4.80	1.03	0.84
	RSD/%		2.58	-4.76	0.52	-6.37	1.98	-14.93	0.57	23.97

2.6.5 一测多评法与外标法测定结果的比较

分别采用一测多评法和外标法计算待测成分的含量, 结果见表 11. 外标法与一测多评法计算的含量经 t 检验比较, p 远大于 0.05, 表明两种方法测得的含量无明显差异, 且两组含量之间相对误差 $\leq 3\%$, 表明所建立的一测多评方法准确性良好, 可用于蟾酥的含量测定.

表 11 ESM 与 QAMS 测定不同产地蟾酥中 5 种成分含量的比较

批号	华蟾酥毒基/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	日蟾毒它灵			蟾毒它灵			蟾毒灵			脂蟾毒配基		
		QAMS/	ESM/	RE/	QAMS/	ESM/	RE/	QAMS/	ESM/	RE/	QAMS/	ESM/	RE/
		($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	%	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	%	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	%	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	%
HLJ1	33.54	5.65	5.70	-0.88	8.33	8.50	-2.00	16.50	16.61	-0.66	37.56	37.25	0.83
HLJ2	48.81	9.09	9.18	-0.98	17.79	18.17	-2.09	18.78	18.90	-0.63	27.01	26.79	0.82
JL1	45.19	11.60	11.70	-0.85	16.55	16.91	-2.13	18.27	18.39	-0.65	49.00	48.60	0.82
JL2	50.60	16.29	16.44	-0.91	19.56	19.98	-2.10	19.12	19.25	-0.68	31.07	30.81	0.84
JL3	52.73	17.51	17.66	-0.85	20.11	20.53	-2.05	18.76	18.89	-0.69	26.19	25.97	0.85
LN1	100.03	12.29	12.40	-0.89	5.17	5.28	-2.08	24.90	25.07	-0.68	27.42	27.19	0.85
LN2	45.05	15.47	15.61	-0.90	17.62	18.00	-2.11	19.23	19.36	-0.67	69.56	68.98	0.84
LN3	47.42	11.69	11.80	-0.93	16.90	17.26	-2.09	19.78	19.91	-0.65	62.66	62.14	0.84
LN4	60.22	13.70	13.82	-0.87	16.50	16.85	-2.08	19.22	19.35	-0.67	41.51	41.17	0.83
LN5	11.21	31.96	32.25	-0.90	8.96	9.15	-2.08	12.33	12.42	-0.72	82.38	81.69	0.84
SD1	38.43	7.15	7.22	-0.97	15.41	15.73	-2.03	16.61	16.72	-0.66	20.60	20.43	0.83
SD2	38.13	6.84	6.90	-0.87	14.85	15.17	-2.11	15.80	15.91	-0.69	20.28	20.11	0.85
SD3	44.47	9.02	9.10	-0.88	15.63	15.96	-2.07	18.60	18.72	-0.64	20.21	20.05	0.80
SD4	2.80	43.99	44.38	-0.88	10.67	10.90	-2.11	10.45	10.52	-0.67	67.81	67.25	0.83
SD5	43.39	9.48	9.56	-0.84	19.90	20.32	-2.07	18.69	18.82	-0.69	17.23	17.09	0.82
SD6	53.29	12.55	12.66	-0.87	20.12	20.55	-2.09	19.52	19.65	-0.66	19.68	19.52	0.82
HB1	39.46	20.19	20.37	-0.88	16.09	16.44	-2.13	17.41	17.53	-0.68	45.10	44.73	0.83
HN1	37.71	4.89	4.94	-1.01	21.41	21.86	-2.06	17.29	17.40	-0.63	7.05	6.99	0.86
HN2	10.99	28.49	28.74	-0.87	8.20	8.37	-2.03	8.63	8.69	-0.69	46.80	46.41	0.84
JS1	51.46	10.66	10.75	-0.84	18.51	18.91	-2.12	20.87	21.01	-0.67	22.33	22.14	0.86
JS2	55.62	11.39	11.49	-0.87	18.90	19.30	-2.07	40.23	40.51	-0.69	29.79	29.54	0.85
SC1	0.36	2.93	2.96	-1.01	8.20	8.37	-2.03	4.93	4.96	-0.60	3.58	3.55	0.85
SC2	15.92	2.93	2.96	-1.01	8.64	8.82	-2.04	12.26	12.34	-0.65	24.59	24.39	0.82
SC3	20.51	3.78	3.81	-0.79	12.87	13.15	-2.13	10.18	10.25	-0.68	4.27	4.23	0.95

2.7 含量测定结果分析

由含量测结果可以看出, 日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 5 种蟾毒内酯类化合物总含量范围分别为 2.93~43.99 mg/kg, 5.17~21.41 mg/kg, 4.93~40.23 mg/kg, 3.58~82.38 mg/kg, 0.36~100.03 mg/g, 不同批次样品含量差别非常大, 充分体现了动物源性药材质量影响因素的复杂性. 《中华人民共和国药典》2020 年版对蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的总量建立了质量控制标准, 24 个样本中, 蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 3 种蟾毒内酯类化合物总含量范围为 8.87~152.35 mg/g, 不同批次含量由高到低依次为 LN1, LN2, LN3, JS2, LN4, JL1, LN5, HB1, JL2, JL3, JS1, HLJ2, SD6, HLJ1, SD3, SD4, SD5, SD1, SD2, HN2, HN1, SC2, SC3, SC1. 日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 5 种蟾毒内酯类化合物总含量范围为 20.00~169.81 mg/g. 不同批次含量由高到低依次为 LN1, LN2, LN3, JS2, LN4, LN5, JL1, HB1, JL2, SD4, JL3, SD6, JS1, HLJ2, SD5, SD3, HN2,

HLJ1, SD1, SD2, HN1, SC2, SC3, SC1(表 11). 由结果可以看出, 吉林和辽宁省所收集蟾酥中蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的总量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的总量最高, 黑龙江、山东和江苏省批次相应蟾毒内酯类含量稍低, 但均能符合《中华人民共和国药典》2020 年版要求. 《中华人民共和国药典》2020 年版规定: “本品按干燥品计算, 含蟾毒灵($C_{24}H_{34}O_4$)、脂蟾毒配基($C_{26}H_{34}O_6$)、华蟾酥毒基($C_{24}H_{32}O_4$)的总量不少于 7.0%”. 河南、四川所收集蟾酥中蟾毒内酯的含量最低, 无法达到药典限度要求, 说明蟾毒内酯类化合物的含量与地理环境有关, 蟾蜍的栖息地条件在一定程度上影响蟾毒内酯类化合物的生物合成. 结果详见表 12、图 7. 为了进一步考察不同产地样本中蟾毒内酯类化合物的组成比例是否有明显差别, 对 5 种化合物的含量数据做百分比堆积柱形图, 如图 8 所示, 不同批次样本中各成分组成比例差别较大, 但未表现出明显的地域特征. 计算蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 3 种蟾毒内酯类化合物在日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基中的占比, 结果为 44.35%~89.72%, 不同批次蟾酥药材占比有一定差别, 说明《中华人民共和国药典》2020 年版采用 3 种蟾毒内酯类化合物总量进行质量控制具有一定的局限性.

表 12 日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基含量组成比例

编号	C+D+E/ (mg · g ⁻¹)	A+B+C+D+E/ (mg · g ⁻¹)	(C+D+E)/ (A+B+C+D+E)/%	C : D : E	A : B : C : D : E
HLJ1	87.60	101.58	86.24	0.44 : 0.89 : 1	0.15 : 0.22 : 0.44 : 0.89 : 1
HLJ2	94.60	121.48	77.87	0.70 : 1.81 : 1	0.34 : 0.66 : 0.70 : 1.81 : 1
JL1	112.46	140.61	79.98	0.37 : 0.92 : 1	0.24 : 0.34 : 0.37 : 0.92 : 1
JL2	100.79	136.64	73.76	0.62 : 1.63 : 1	0.52 : 0.63 : 0.62 : 1.63 : 1
JL3	97.68	135.30	72.20	0.72 : 2.01 : 1	0.67 : 0.77 : 0.72 : 2.01 : 1
LN1	152.35	169.81	89.72	0.91 : 3.65 : 1	0.45 : 0.19 : 0.91 : 3.65 : 1
LN2	133.84	166.93	80.18	0.28 : 0.65 : 1	0.22 : 0.25 : 0.28 : 0.65 : 1
LN3	129.86	158.45	81.96	0.32 : 0.76 : 1	0.19 : 0.27 : 0.32 : 0.76 : 1
LN4	120.95	151.15	80.02	0.46 : 1.45 : 1	0.33 : 0.40 : 0.46 : 1.45 : 1
LN5	105.92	146.84	72.13	0.15 : 0.14 : 1	0.39 : 0.11 : 0.15 : 0.14 : 1
SD1	75.64	98.20	77.03	0.81 : 1.87 : 1	0.35 : 0.75 : 0.81 : 1.87 : 1
SD2	74.21	95.90	77.38	0.78 : 1.88 : 1	0.34 : 0.73 : 0.78 : 1.88 : 1
SD3	83.28	107.93	77.16	0.92 : 2.20 : 1	0.45 : 0.77 : 0.92 : 2.20 : 1
SD4	81.06	135.72	59.73	0.15 : 0.04 : 1	0.65 : 0.16 : 0.15 : 0.04 : 1
SD5	79.31	108.69	72.97	1.08 : 2.52 : 1	0.55 : 1.15 : 1.08 : 2.52 : 1
SD6	92.49	125.16	73.90	0.99 : 2.71 : 1	0.64 : 1.02 : 0.99 : 2.71 : 1
HB1	101.97	138.25	73.76	0.39 : 0.87 : 1	0.45 : 0.36 : 0.39 : 0.87 : 1
HN1	62.05	88.35	70.23	2.45 : 5.35 : 1	0.69 : 3.04 : 2.45 : 5.35 : 1
HN2	66.42	103.11	64.42	0.18 : 0.23 : 1	0.61 : 0.18 : 0.18 : 0.23 : 1
JS1	94.66	123.83	76.44	0.93 : 2.30 : 1	0.48 : 0.83 : 0.93 : 2.30 : 1
JS2	125.64	155.93	80.57	1.35 : 1.87 : 1	0.38 : 0.63 : 1.35 : 1.87 : 1
SC1	8.87	20.00	44.35	1.38 : 0.10 : 1	0.82 : 2.29 : 1.38 : 0.10 : 1
SC2	52.77	64.34	82.02	0.50 : 0.65 : 1	0.12 : 0.35 : 0.50 : 0.65 : 1
SC3	34.96	51.61	67.74	2.38 : 4.80 : 1	0.89 : 3.01 : 2.38 : 4.80 : 1

注: A 为日蟾毒它灵, B 为蟾毒它灵, C 为蟾毒灵, D 为华蟾酥毒基, E 为脂蟾毒配基.

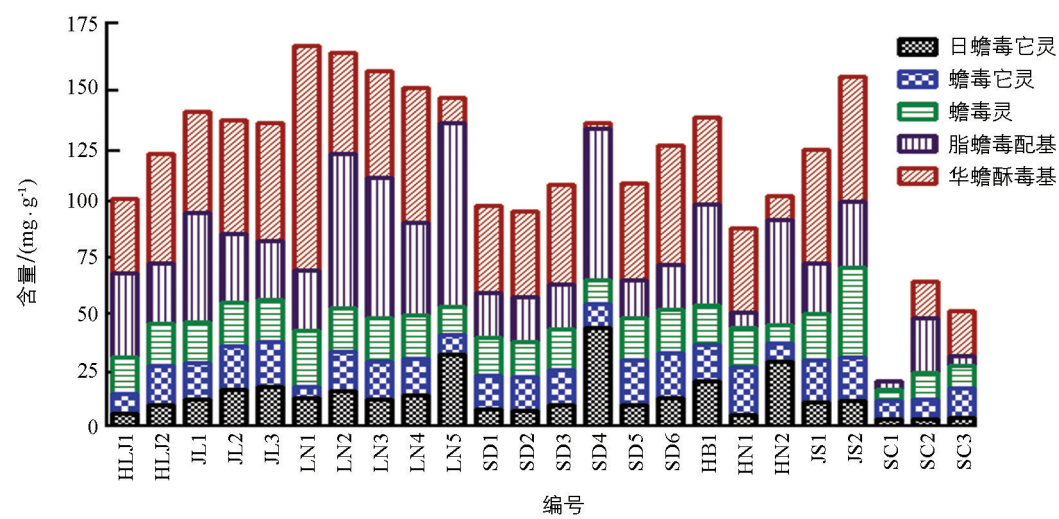


图 7 不同产地蟾毒配基堆积柱状图

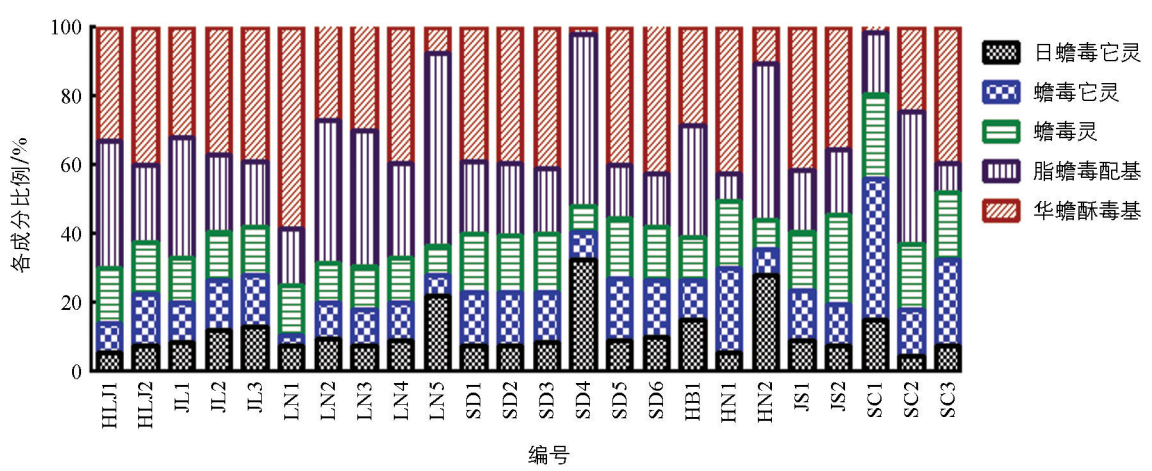


图 8 不同产地蟾毒配基含量比例堆积柱状图

3 结论与讨论

蟾酥具有抗肿瘤、强心等多种药理活性，我国应用蟾酥防病治病已有 2 000 多年的历史，很多急救或常用中成药如麝香保心丸、六神丸、熊胆救心丸等都以蟾酥为原料^[2]。蟾酥的需求量不断增长，2020 年国内蟾酥使用量已经超过 5 t。而蟾酥市场供应量急剧减少，每千克药材价格自 2010 年 2 200 元一路上扬，2019 年增长至 30 000 元，2022 年达到药典标准的蟾酥价格快速上涨至近 90 000 元。野生蟾酥资源趋近枯竭，蟾酥仿生、半仿生养殖关键技术亟待突破，摸清蟾酥品质和地理环境的关系至关重要。

蟾酥中的化学成分主要包括括蟾毒内酯类、吲哚类生物碱、甾醇类及其他类化合物，其中蟾毒内酯类研究最多。蟾毒内酯类化合物具有强心、升压、增加冠脉血流量、抗肿瘤等多种药理活性，是蟾酥中的主要有效成分^[2-4]。本文针对蟾毒内酯类化合物构建指纹图谱检测方法确认 9 个特征峰，并指认其中 5 个峰的分别为日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基，进行相似度分析，聚类分析和主成分分析。四川蟾酥样品与其他省份差异较大，相同产地蟾酥样品相似性相对较好，也有一些来源于同一省份的蟾酥样品相似度较小，说明蟾酥药材质量影响因素较多，除具有一定地域规律性外，可能受药材基原、动物个体间差异、蟾酥产地加工等影响也较大^[11, 25]。

针对特征图谱中的 5 种有效成分建立含量一测多评检测方法,以廉价、易得的华蟾酥毒基为内参物,实现多个蟾蜍内酯类成分的同步测定,降低检测成本同时解决了对照品不足的问题。利用所建立的方法对 24 批蟾酥含量进行测定,不同批次产品中 5 种蟾毒内酯类化合物含量差异非常大,黑龙江、吉林、辽宁、河北、山东、江苏省所收集蟾酥中蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的总量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基的总量均较高,且均能符合《中华人民共和国药典》2020 年版要求,河南、四川所收集蟾酥中蟾素内酯的含量较低,无法达到药典限度要求,说明蟾毒内酯类化合物的含量与地理环境有关,蟾蜍的栖息地条件在一定程度上影响蟾毒内酯类化合物的生物合成。另外,不同蟾酥批次样本中各成分组成比例差别较大,但未表现出明显的地域特征。蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 3 种蟾毒内酯类化合物在日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基中的占比为 44.35%~89.72%,不同批次蟾酥药材占比有一定差别,说明《中华人民共和国药典》2020 年版采用蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基 3 种蟾毒内酯类化合物总量进行质量控制具有一定的局限性,可能造成蟾酥资源的浪费及临床用药风险。本研究建立了蟾酥指纹图谱检测方法 & 含量一测多评检测方法,该方法在《中华人民共和国药典》2020 年版基础上增加特征峰数量及含量测定指标的数量,方法极其简便,在不增加工作量及检测成本的基础上进一步提高蟾酥质控水平,具有推广价值,可以为蟾酥药材真伪判断、质量评价研究提供依据。在蟾酥样品收集方面,课题组深入到蟾酥产地采集 8 个省份的 24 批蟾酥样品,避免购买不同产地原料混合加工品,样品具有代表性。对蟾酥样品进行检测及化学计量学分析研究结果表明,蟾酥中主要有效成分蟾毒内酯的积累具有一定的地域性,对于蟾蜍药材产地特征研究、仿生及半仿生养殖及蟾酥药材资源的合理开发应用具有重要意义。下一步课题组将针对濒危名贵道地药材蟾酥规模化生产的痛点为研究内容,重点突破规模化生产中的关键技术,并进行产业化研究,从而实现蟾酥药材产业化、保证以蟾酥为原料中成药和临床蟾酥用药需求夯实基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 379-380.
- [2] WEI W L, HOU J J, WANG X, et al. Venenum Bufonis: An Overview of Its Traditional Use, Natural Product Chemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 237: 215-235.
- [3] 应金琴, 杨明, 张普照, 等. 蟾酥的炮制历史沿革、化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3529-3539.
- [4] 邓莎, 李梦园, 武小玲, 等. 蟾酥化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(3): 884-890.
- [5] XU L S, WANG S Z, SHEN H, et al. Analgesic and Toxic Effects of *venenum Bufonis* and Its Constituent Compound Cinobufagin: A Comparative Study [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2019, 73: 49-53.
- [6] 赖慧, 赖洪林, 陈立, 等. 蟾酥注射液对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(4): 69-73.
- [7] 喻昌燕, 孟令杰, 姜念, 等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1206-1220.
- [8] 阙钧, 周瑞生, 侯雪楠, 等. 沙蟾毒精抗肿瘤作用研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(24): 98-101.
- [9] 邬晓宇, 丁海花, 朱学军. 抗肿瘤药物蟾毒灵的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 139-143.
- [10] 万德光. 中药品种品质与药效 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 58-58.
- [11] 高子阳, 姜鹏, 詹常森. 物种基原、体质量和性别对蟾酥药材质量影响的评价 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6034-6041.
- [12] 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.

[13] 成小兰, 庞中化, 王志刚, 等. 不同产地蟾酥药材 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1262-1266.

[14] 唐哲栋, 吴世福, 林桂涛. 产地对蟾酥鲜浆成分组成影响的研究 [J]. 山东中医杂志, 2014, 33(6): 488-491.

[15] CAO Y T, CUI K K, PAN H Y, et al. The Impact of Multiple Climatic and Geographic Factors on the Chemical Defences of Asian Toads (*Bufo gargarizans* Cantor) [J]. Scientific Reports, 2019, 9: 17236.

[16] 姜鹏, 高子阳, 詹常森. 基于蟾酥品质评价的我国中华大蟾蜍资源分布特征 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(11): 2924-2931.

[17] 曹月婷, 崔可可, 吴纪恒, 等. 中华大蟾蜍毒液中蟾毒配基类成分的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1850-1856.

[18] 丁梦磊, 张雯, 张越, 等. 一测多评法测定六神丸中的 6 个蟾蜍二烯内酯类化合物 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 2003-2009.

[19] 房蕴歌, 王鹏飞, 朱厚达, 等. 蟾酥药材和饮片(蟾酥粉)的质量标准研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1726-1733.

[20] 高喜梅, 池玉梅, 张雯, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2548-2556.

[21] 符海郊, 张倩睿, 熊蕊, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展 [J]. 中国药师, 2022, 25(5): 861-867.

[22] 刘紫璇, 吴样明, 蒋鑫铖, 等. 基于指纹图谱及一测多评法的芍药甘草汤物质基准质量评价研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(11): 2384-2389.

[23] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.

[24] 钟民勇, 乔日发, 罗涛, 等. 基于指纹图谱定性、多指标成分定量与化学计量学的枳壳质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 138-145.

[25] 陈瀛澜, 郭夫江, 卞雪莲, 等. 蟾酥干燥炮制前后化学成分和药效学变化考察 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1816-1822.

责任编辑 王新娟