

基于指纹图谱结合多成分定量分析的 蟾酥药材质量评价研究

周成美¹, 胡晶红^{1,2*}, 任鑫¹, 闫庆康³, 杨东杰³, 张永清^{1,2}

¹山东中医药大学药学院; ²山东省质量控制与中药全产业链建设协同创新中心, 济南 250355;

³山东康源堂中药饮片股份有限公司, 济宁 277600

摘要:建立蟾酥药材 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定方法。选用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 3 mm, 2.7 μm), 流动相为 0.1% 乙酸水 (A) - 乙腈 (B), 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 296 nm, 进样量 5 μL。40 批蟾酥药材指纹图谱相似度 0.779 ~ 0.991, 表明不同批次蟾酥药材的差异性较大; 共标定了 21 个共有峰, 指认了伪异沙蟾毒精、日蟾毒它灵、沙蟾毒精、蟾蜍它里定、远华蟾蜍精、蟾毒它灵、脂蟾毒精、南美蟾毒精、蟾毒灵、脂蟾毒配基以及华蟾酥毒基, 质量分数分别为 0.019% ~ 0.163%、0.528% ~ 1.608%、0.943% ~ 5.413%、0.204% ~ 0.815%、0.474% ~ 1.825%、1.115% ~ 2.019%、0.030% ~ 0.249%、0.148% ~ 1.661%、1.206% ~ 2.752%、0.345% ~ 3.287%、1.426% ~ 5.875%。聚类分析将 40 批样品分为 3 类, 主成分分析筛选出了 4 个主成分, 累计方差贡献率为 91.122%, 说明主成分能够综合蟾酥药材成分的大部分信息, 偏最小二乘判别分析标记出药材中 12 个差异性成分。此方法可以为蟾酥成分的品质控制及其评价工作提供参考。

关键词:蟾酥; 指纹图谱; 多成分定量; 质量评价; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)11-1846-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.11.005

Quality evaluation of Bufonis Venenum based on HPLC fingerprint and multicomponent quantitative analysis

ZHOU Cheng-mei¹, HU Jing-hong^{1,2*},

REN Xin¹, YAN Qing-kang³, YANG Dong-jie³, ZHANG Yong-qing^{1,2}

¹College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine; ²Shandong Provincial

Collaborative Innovation Center for Quality Control and Construction of the Whole Industrial Chain of Traditional Chinese

Medicine, Jinan 250355, China; ³Shandong Kangyuantang Chinese Herbal Medicine Co., Ltd., Jining 277600, China

Abstract: In this study, the high performance liquid chromatography (HPLC) was used to establish fingerprint and multi-component determination method of Bufonis Venenum. The analysis was performed on Agilent EC-C₁₈ column (150 mm × 3 mm, 2.7 μm) with 0.1% acetic acid water (A) - acetonitrile (B) as mobile phase in a gradient elution mode. The flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was set at 296 nm and the injection volume was 5 μL. The similarity of 40 batches of Bufonis Venenum ranged from 0.779 to 0.991, indicating that there was difference between batches of Bufonis Venenum. There were 21 common peaks in the HPLC chromatogram of 40 batches of Bufonis Venenum, among which the percentages of bufarenogin, gamabufotalin, arenobufagin, bufotalidin, telocinobufagin, bufotalin, resibufagin, marinobufagin, bufalin, resibufogenin and cinobufagin were as follows: 0.01% - 0.163%, 0.528% - 1.608%, 0.943% - 5.413%, 0.204% - 0.815%, 0.474% - 1.825%, 1.115% - 2.019%, 0.030% - 0.249%, 0.148% - 1.661%, 1.206% - 2.752%, 0.345% - 3.287%, 1.426% - 5.875%. According to the cluster analysis, the 40 batches of Bufonis Venenum were classified into three categories; principal component analysis screened out four principal components, with the cumulative vari-

收稿日期: 2022-06-15 接受日期: 2022-09-20

基金项目: 国家中医药管理局国家中药资源调查专项 (GZY-KJS-2018-004); 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心子课题 (CYLXTCX2021-10)

* 通信作者 Tel: 86-015065311227; E-mail: hujinghong97@126.com

ance contribution rate of 91.122%, indicating that the principal components contained most information of original data. Partial least squares discriminant analysis marked 12 differential components in the medicinal materials. This method can provide reference for the quality control and evaluation of Bufonis Venenum.

Key words: Bufonis Venenum; fingerprint; multi-component quantitative analysis; quality evaluation; cluster analysis; principal component analysis

蟾酥作为我国传统名贵中药,主要包含生物碱、蟾毒内酯类等多种化学成分^[1],发挥抗肿瘤、抗心肌缺血等药理活性,但其也有一定毒性,需要严格控制用量^[2]。山东作为蟾酥药材的道地产区,在市场上价格昂贵,质量差异较大,甚至部分药材具有掺入蟾皮、腺体的现象,且对蟾酥的采集和初加工环节监管不够,缺乏对源头药材的质量评价。近年来,HPLC 指纹图谱和多成分含量测定多用于中药质量研究,2020 版《中国药典》规定华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒灵三种成分的总量的质量分数应不少于 7.0%。然而,现存的研究缺乏多指标成分和多分析手段系统性评价研究,且至今为止文献报道蟾酥质量评价成分不够全面。本研究在此基础上新增 8 种成分,以沙蟾毒精、蟾毒灵等 11 种主要成分作为评价蟾酥质量的综合指标,通过指纹图谱对 40 批次蟾酥样品进行检测,结合相似性分析、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法判别分析结果对其质量进行全面评价^[3-9]。

1 仪器与材料

Aglient 1260 HPLC 色谱仪(美国 Agilent 公司); KQ-500DE 型超声仪(昆山市仪器有限公司);万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

甲醇、乙酸和乙腈为色谱级(美国赛默飞公司);纯净水(杭州娃哈哈有限公司)。

伪异沙蟾毒精(批号 Y18O9Y72597)、日蟾毒它灵(批号 P17O9F72594)、沙蟾毒精(批号 Y03D9Y76566)、蟾蜍它里定(批号 P14J11S118458)、远华蟾蜍精(批号 Y13A9Y67875)、华蟾酥毒基(批号 W27M10Z84297)、蟾毒灵(批号 P27F10F81703)、脂蟾毒配基(批号 C30S8G45143)、蟾毒它灵(批号 P28M10F84299)、脂蟾毒精(批号 P14J11S118459)、南美蟾毒精(批号 C25F10G81502),纯度均大于 98.0%,均购于上海源叶生物有限公司。

40 批次蟾酥药材经山东中医药大学药学院张永清教授鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 和黑框蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥分泌物,药材具体信息见表 1。

表 1 蟾酥样品的基本信息

Table 1 Sample information of Bufonis Venenum

编号 No.	产地 Produce area	批号 Batch number	编号 No.	产地 Produce area	批号 Batch number
S1	济南历城	CS210625	S21	日照莒县	CS161109
S2	济南历城	CS211020	S22	日照莒县	CS151013
S3	济南历城	CS211008	S23	济宁微山	CS140418
S4	德州平原	CS201110	S24	济宁微山	CS141014
S5	德州平原	CS201030	S25	济宁微山	CS130126
S6	德州平原	CS200401	S26	济宁微山	CS130306
S7	临沂费县	CS200328	S27	枣庄山亭	CS130623
S8	临沂费县	CS200320	S28	枣庄山亭	CS131012
S9	临沂费县	CS200105	S29	四川简阳	CS151019
S10	临沂费县	CS191016	S30	四川简阳	CS150614
S11	烟台蓬莱	CS191113	S31	四川简阳	CS150605
S12	烟台蓬莱	CS181002	S32	四川资阳	CS130327
S13	烟台蓬莱	CS181026	S33	四川资阳	CS130604
S14	菏泽郓城	CS181124	S34	四川资阳	CS130618
S15	菏泽郓城	CS171018	S35	湖南娄底	CS220123
S16	菏泽郓城	CS160125	S36	湖南娄底	CS220309

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	产地 Produce area	批号 Batch number	编号 No.	产地 Produce area	批号 Batch number
S17	日照莒县	CS160310	S37	湖南娄底	CS220318
S18	日照莒县	CS160324	S38	江苏常州	CS220303
S19	日照莒县	CS160608	S39	江苏常州	CS220325
S20	日照莒县	CS161013	S40	江苏常州	CS220328

2 方法与结果

2.1 色谱条件

安捷伦 InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm × 3 mm, 2.7 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1% 乙酸水(A)-乙腈(B) 进行梯度洗脱(0 ~ 15 min, 85% → 72% A; 15 ~ 35 min, 72% → 71% A; 35 ~ 40 min, 71% → 65% A; 40 ~ 50 min, 65% → 60% A), 柱温 30 °C, 检测波长 296 nm, 流速 0.5 mL/min, 进样量 5 μL, 自动进样。

2.2 供试品溶液的制备

取 40 批蟾酥药材粉末(过 3 号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置于具塞离心管中, 加入甲醇 10 mL 密封, 称重后超声(40 kHz, 100 W, 60 °C) 提取 60 min, 放至室温后补足失重, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取伪异沙蟾毒精、沙蟾毒精、蟾蜍它里定、华蟾酥毒基、远华蟾蜍精、脂蟾毒配基、蟾毒它灵、脂蟾毒精、日蟾毒它灵、南美蟾毒精、蟾毒灵 11 种对照品适量, 加甲醇溶解得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液, 摇匀即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验

取蟾酥供试液(S₄), 按“2.1”项确立的色谱方法连续进样 6 次, 以华蟾酥毒基为参照峰, 分别记录

其色谱结果。结果表明各共有峰的相对峰面积 RSD 为 0.910% ~ 2.230%, 相对保留时间 RSD 为 0.002% ~ 0.143%, 均小于 5%。表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验

取蟾酥供试液(S₄), 按“2.1”项确立的色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 不同时间点进样, 分别记录结果, 得到各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.890% ~ 3.905%, 相对保留时间 RSD 为 0.014% ~ 0.714%, 均小于 5%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验

取蟾酥样品 6 份(S₄), 分别按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 根据“2.1”项下条件进行检测, 结果表明各共有峰相对峰面积 RSD 为 1.060% ~ 4.780%, 相对保留时间 RSD 为 0.002% ~ 0.174%, 均小于 5%。表明方法的重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 样品指纹图谱及共有峰指认

取供试液(S₁ ~ S₄₀) 进样, 分别测得其色谱图, 将结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》, 设置 S₁ 为参考图谱, 采用平均数法以及时间宽度为 0.1 进行多点校正和全谱峰匹配分析, 得到 40 批蟾酥指纹图谱共有模式及对照图谱(见图 1)。在 40 批次蟾酥药材的对照指纹图谱中

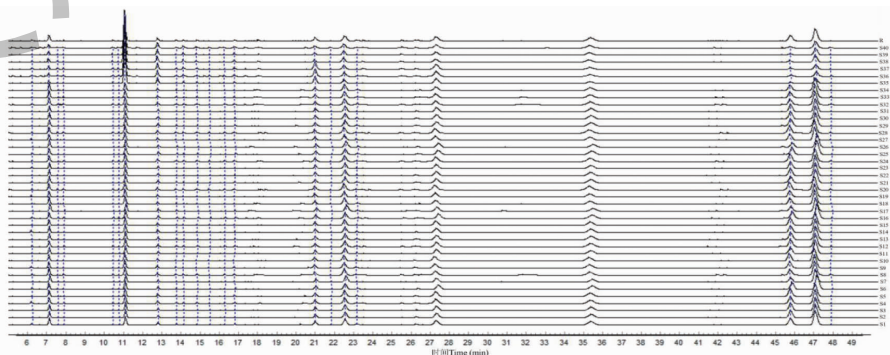


图 1 40 批次蟾酥样品的 HPLC 叠加指纹图谱

Fig. 1 Overlapping HPLC fingerprints of 40 batches of Bufonis Venenum samples

共标记 21 个共有峰,通过与混合对照品图谱比对、查阅文献资料共指认出 11 个色谱峰(见图 2)。

2.5.2 相似性分析

采用相似度评价系统(2012 版),通过参照对照图谱对蟾酥指纹图谱进行相关系数计算,对样本的

相似性和差异性进行分类,用相关系数评价相似度^[10,11]。将蟾酥的指纹图谱与对照图谱对比,相似度在 0.779~0.991 之间(见表 2),表示不同批次蟾酥存在品质差异。

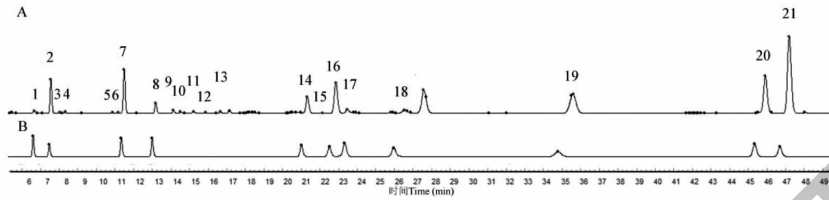


图 2 蟾酥的 HPLC 对照指纹图谱(A)和混合对照品溶液的 HPLC 图(B)

Fig. 2 HPLC comparison fingerprint (A) and mixed reference substances (B) of Bufonis Venenum

注:1-伪异沙蟾毒精;2-日蟾毒它灵;7-沙蟾毒精;8-蟾蜍它里定;14-远华蟾蜍精;16-蟾毒它灵;17-脂蟾毒精;18-南美蟾毒精;19-蟾毒灵;20-脂蟾毒配基;21-华蟾酥毒基。Note:1-Bufarenogin;2-Gamabufotalin;7-Arenobufagin;8-Bufotalidin;14-Telocinobufagin;16-Bufotalin;17-Resibufagin;18-Marinobufagin;19-Bufalin;20-Resibufogenin;21-Cinobufagin.

表 2 40 批次蟾酥样品的指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of 40 batches of Bufonis Venenum samples

样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity
S1	0.991	S15	0.984	S29	0.991
S2	0.991	S16	0.959	S30	0.991
S3	0.990	S17	0.987	S31	0.991
S4	0.991	S18	0.988	S32	0.985
S5	0.990	S19	0.961	S33	0.985
S6	0.961	S20	0.964	S34	0.985
S7	0.978	S21	0.991	S35	0.804
S8	0.983	S22	0.990	S36	0.803
S9	0.966	S23	0.986	S37	0.802
S10	0.961	S24	0.990	S38	0.782
S11	0.991	S25	0.961	S39	0.779
S12	0.987	S26	0.944	S40	0.781
S13	0.991	S27	0.991		
S14	0.991	S28	0.958		

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 聚类分析(HCA)

聚类分析是为了消除药材数据中的不对称信息,以划分重要性为前提,将关系更接近的研究对象整合为一类^[12],实质是将多维空间中不同位置的样本,用多种方法测量样本之间的距离,建立分类^[13,14]。本研究运用 SIMCA 13.0 软件,以 40 批药材的共有峰峰面积为变量进行聚类。聚类分析可以将不同批次蟾酥药材进行区分,结果如图 3 所示,一类包括 S35~S40,一类包括 S29~S34,其余 28 批药

材为一类。

2.6.2 主成分分析(PCA)

利用 SPSS 22.0 软件以蟾酥共有峰的相对峰面积为指标,对数据标准化后进行主成分分析,以特征值大于 1 和贡献率大于 85% 为标准,提取出 4 个主成分,其累计方差贡献率为 91.122%,表明这 4 个主成分包含了 21 个共有成分的 91.122% 的信息,符合主成分分析条件(见表 3)。结果显示蟾酥主成分 1 特征值为 13.012,方差贡献率为 61.961%,对应的载荷量较大成分有 8 号、7 号和 5 号色谱峰,表

明主成分1受这几种成分影响较大,为蟾酥药材质量评价提供依据;主成分2的特征值为2.921,方差贡献率为13.912%,15、12和18号色谱峰载荷较大,说明主成分2受这3个成分影响较大;主成分3和主成分4的特征值分别为1.662和1.540,方差贡献率为7.915%和7.334%,说明4个主成分代表了

原始数据的绝大部分信息,碎石图显示排名前4的成分直线较陡峭(见图4),有助于解释变量,能够综合蟾酥成分的大部分信息。通过分析得到40批次蟾酥样品中21种成分的得分图(见图4)和载荷图(见图5)。结合图4、5来看可以将40批药材分为3类,与聚类分析结果一致。

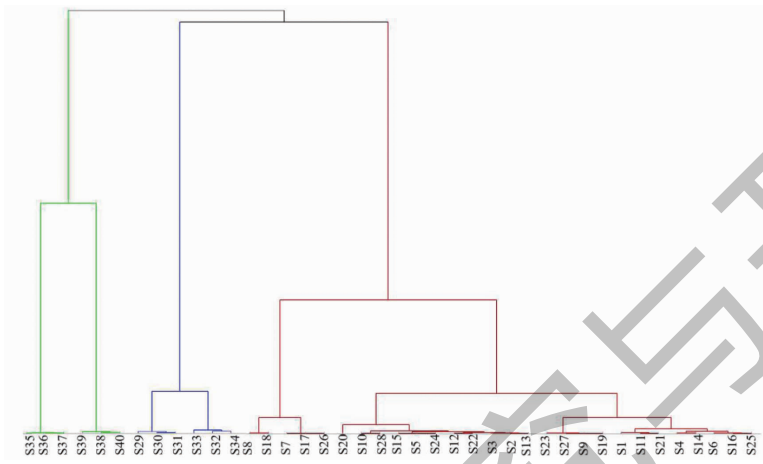


图3 蟾酥样品的聚类树状图

Fig. 3 Cluster analysis of Bufonis Venenum samples

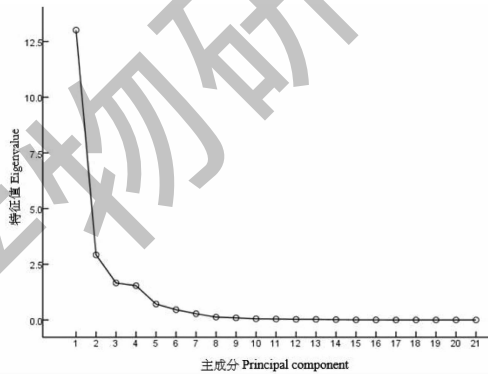


图4 主成分分析碎石图

Fig. 4 PCA scree plot of Bufonis Venenum

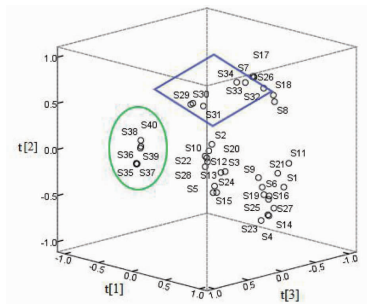


图5 主成分分析 (PCA) 得分图

Fig. 5 PCA score plot of Bufonis Venenum

表3 蟾酥药材主成分分析特征值及方差贡献率

Table 3 Principal component eigenvalues and cumulative variance contribution rate of Bufonis Venenum

主成分编号 Principal component number	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Contribution rate(%)	累计方差贡献率 Accumulative contribution rate(%)
1	13.012	61.961	61.961
2	2.921	13.912	75.872
3	1.662	7.915	83.787
4	1.540	7.334	91.122

2.6.3 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)

为进一步区分不同采集时期样品,本研究采用偏最小二乘法判别分析建立数据模型。运用 SIM-CA 13.0 软件对 40 批蟾酥 21 种共有成分含量进行模式识别,将标准化的共有峰峰面积导入系统进行 PLS-DA。模型验证参数结果显示,解释率参数为 $R^2X=0.752$,模型区分参数为 $R^2Y=0.999$,模型预测参数为 $Q^2=0.999$,表明建立的模型合理并能做出较好的预测。分析得到 PLS-DA 分析得分图(见图 6),结果显示与主成分分析和聚类分析结果一致。为确定贡献程度最大的成分,变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)体现成分对

数据模型的整体贡献程度,值越大表明成分的贡献越大,一般认为 $VIP > 1$ 的化合物发挥了重要作用^[15],通过 VIP 图(见图 7)分析筛选出 12 个变量,影响大小依次为峰 7、8、5、11、10、6、3、12、20、21、2 和 16,以上成分也是区分蟾酥药材质量的重要成分。

2.7 多成分含量测定

2.7.1 系统适应性

分别取混合对照品和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,伪异沙蟾毒精等 11 种成分与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05(见图 1 和 2)。

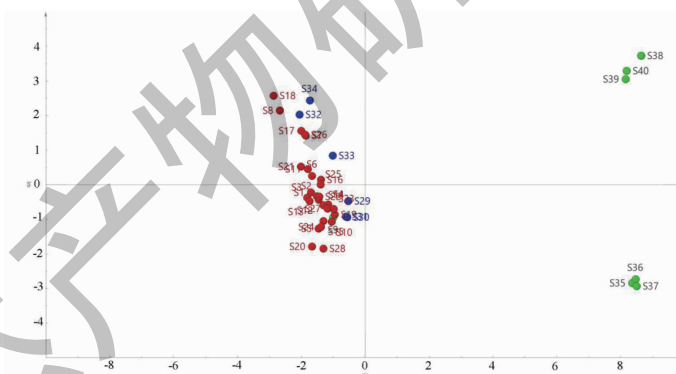


图6 40批蟾酥药材偏最小二乘法判别分析得分图

Fig. 6 PLS-DA score plot for 40 batches of Bufonis Venenum

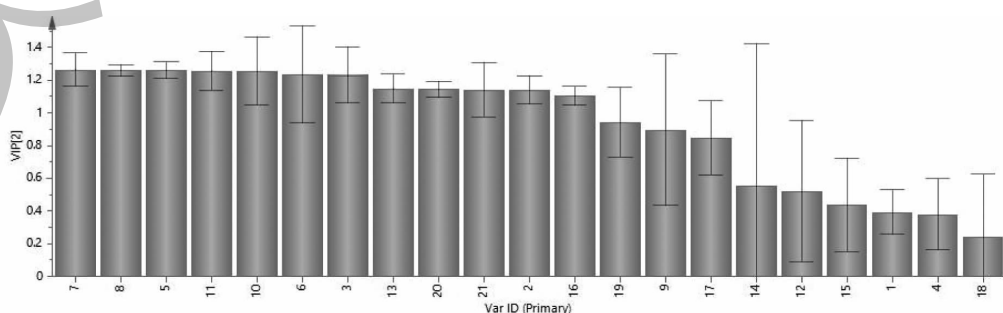


图7 40批蟾酥 PLS-DA 模型中 11 个色谱峰的 VIP 图

Fig. 7 VIP of 21 chromatographic peaks in PLS-DA model of Bufonis Venenum

2.7.2 线性关系考察

溶液,按照倍数稀释法最终得出 11 种成分的线性回

分别精密取适量的“2.2.2”项下的混合对照品

归方程,结果见表 4。

表 4 回归方程及相关系数

Table 4 Linear equation and correlation coefficient

成分 Ingredient	线性回归方程 Equation of linear regression	R^2
伪异沙蟾毒精 Bufarenogin	$Y = 12.504X - 13.541$	0.999 9
日蟾毒它灵 Gamabufotalin	$Y = 5.967 4X + 26.133$	0.999 4
沙蟾毒精 Arenobufagin	$Y = 11.185X + 7.0121$	0.999 9
蟾蜍它里定 Bufotalidin	$Y = 9.939 6X + 22.418$	0.999 8
远华蟾蜍精 Telocinobufagin	$Y = 8.273 4X + 31.458$	0.999 4
蟾毒它灵 Bufotalin	$Y = 7.777 6X + 37.826$	0.999 2
脂蟾毒精 Resibufagin	$Y = 12.767X + 58.879$	0.999 4
南美蟾毒精 Marinobufagin	$Y = 10.412X + 16.061$	0.999 9
蟾毒灵 Bufalin	$Y = 6.608 8X + 29.935$	0.999 3
脂蟾毒配基 Resibufogenin	$Y = 7.319 7X + 28.277$	0.999 4
华蟾酥毒基 Cinobufagin	$Y = 8.302 3X + 43.218$	0.999 0

2.7.3 精密度考察

取蟾酥供试液(S4),按“2.1”项下方法进样,连续进样 6 次,计算 11 种成分的峰面积的 RSD。结果伪异沙蟾毒精等 11 种成分峰面积 RSD 分别为 0.30%、0.23%、0.22%、0.12%、0.31%、1.28%、0.29%、0.45%、0.24%、0.28%、0.82%,表明仪器精密度良好。

2.7.4 稳定性考察

取蟾酥供试液(S4),按“2.1”项下方法分别在 0、2、4、8、12、24h,计算 11 种成分的峰面积的 RSD。结果伪异沙蟾毒精等 11 种成分峰面积 RSD 分别为 0.58%、0.31%、0.25%、0.12%、0.41%、1.46%、3.34%、0.85%、0.48%、0.30%、0.81%,表明样品

在 24h 内稳定。

2.7.5 重复性考察

取蟾酥样品(S4)6 份,分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,计算 11 种成分含量 RSD。结果伪异沙蟾毒精等 11 种成分含量 RSD 分别为 2.26%、1.32%、1.33%、1.33%、1.43%、1.48%、1.96%、1.78%、1.57%、1.38%、1.10%,表明方法重复性良好。

2.7.6 加样回收率考察

取蟾酥样品(S4)6 份,约 0.1g,分别按精密加入适量对照品溶液,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,计算加样回收率,结果见表 5,结果表明该方法的回收率良好。

表 5 蟾酥回收率试验结果($n = 6$)Table 5 The results of recovery test of Bufonis Venenum ($n = 6$)

成分 Ingredient	取样量 Sampling amount (g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
伪异沙蟾毒精 Bufarenogin	0.100 1	0.169 2	0.170 0	0.341 0	101.071 4	99.797 0	1.47
	0.100 0	0.169 7	0.170 0	0.335 0	97.212 7		
	0.100 2	0.170 2	0.170 0	0.339 0	99.283 3		
	0.100 2	0.170 5	0.170 0	0.341 0	100.271 6		
	0.100 1	0.170 9	0.170 0	0.343 0	101.212 9		
	0.100 1	0.168 5	0.170 0	0.338 0	99.730 1		
日蟾毒它灵 Gamabufotalin	0.100 1	1.301 5	1.300 0	2.587 0	98.883 3	98.590 2	2.43

续表 5 (Continued Tab. 5)

成分 Ingredient	取样量 Sampling amount (g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
日蟾毒它灵 Gamabufotalin	0.100 0	1.303 4	1.300 0	2.631 0	102.126 2		
	0.100 2	1.308 6	1.300 0	2.547 0	95.265 0		
	0.100 2	1.309 4	1.300 0	2.569 0	96.892 9		
	0.100 1	1.309 7	1.300 0	2.610 0	100.020 9		
	0.100 1	1.312 4	1.300 0	2.591 0	98.353 1		
沙蟾毒精 Arenobufagin	0.100 1	1.091 3	1.100 0	2.189 0	99.793 4	100.105 7	0.22
	0.100 0	1.093 5	1.100 0	2.196 0	100.226 6		
	0.100 2	1.097 2	1.100 0	2.198 0	100.075 2		
	0.100 2	1.096 9	1.100 0	2.201 0	100.372 3		
	0.100 1	1.098 8	1.100 0	2.198 0	99.928 9		
蟾毒它里定 Bufotalidin	0.100 1	1.095 4	1.100 0	2.198 0	100.237 7		
	0.100 1	0.289 2	0.290 0	0.589 0	103.369 3	104.954 7	2.64
	0.100 0	0.289 2	0.290 0	0.585 0	101.990 0		
	0.100 2	0.290 0	0.290 0	0.601 0	107.229 7		
	0.100 2	0.290 0	0.290 0	0.587 0	102.402 1		
远华蟾蜍精 Telocinobufagin	0.100 1	0.289 7	0.290 0	0.605 0	108.713 1		
	0.100 1	0.289 5	0.290 0	0.597 0	106.023 9		
	0.100 1	0.792 7	0.800 0	1.578 0	98.161 1	99.210 8	1.02
	0.100 0	0.796 3	0.800 0	1.603 0	100.832 8		
	0.100 2	0.799 6	0.800 0	1.592 0	99.049 9		
蟾毒它灵 Bufotalin	0.100 2	0.799 1	0.800 0	1.586 0	98.360 3		
	0.100 1	0.802 4	0.800 0	1.602 0	99.952 4		
	0.100 1	0.795 7	0.800 0	1.587 0	98.908 3		
	0.100 1	1.680 8	1.700 0	3.402 0	101.245 9	99.926 8	1.96
	0.100 0	1.684 3	1.700 0	3.345 0	97.688 8		
脂蟾毒精 Resibufagin	0.100 2	1.689 8	1.700 0	3.433 0	102.540 0		
	0.100 2	1.689 2	1.700 0	3.408 0	101.107 3		
	0.100 1	1.742 3	1.700 0	3.412 0	98.219 0		
	0.100 1	1.726 1	1.700 0	3.405 0	98.760 1		
	0.100 1	0.102 8	0.100 0	0.204 0	101.155 9	98.450 3	2.52
南美蟾毒精 Marinobufagin	0.100 0	0.109 5	0.100 0	0.207 0	97.474 7		
	0.100 2	0.109 0	0.100 0	0.203 1	94.083 8		
	0.100 2	0.108 2	0.100 0	0.207 0	98.782 7		
	0.100 1	0.106 6	0.100 0	0.205 6	98.972 8		
	0.100 1	0.109 8	0.100 0	0.210 0	100.231 8		
南美蟾毒精 Marinobufagin	0.100 1	0.231 6	0.230 0	0.461 0	99.740 3	99.624 1	2.67
	0.100 0	0.228 3	0.230 0	0.461 0	101.160 1		
	0.100 2	0.229 5	0.230 0	0.456 0	98.485 1		
	0.100 2	0.230 4	0.230 0	0.465 0	101.980 6		

续表 5 (Continued Tab. 5)

成分 Ingredient	取样量 Sampling amount (g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
南美蟾毒精 Marinobufagin	0.100 1	0.233 8	0.230 0	0.452 0	94.866 9		
	0.100 1	0.228 5	0.230 0	0.462 0	101.511 4		
蟾毒灵 Bufalin	0.100 1	2.518 3	2.500 0	4.989 0	98.829 7	98.874 2	3.00
	0.100 0	2.524 6	2.500 0	4.968 0	97.735 4		
	0.100 2	2.533 7	2.500 0	4.896 0	94.492 2		
	0.100 2	2.532 6	2.500 0	5.004 0	98.854 6		
	0.100 1	2.532 8	2.500 0	5.124 0	103.648 6		
	0.100 1	2.554 9	2.500 0	5.047 0	99.684 8		
酯蟾毒配基 Resibufogenin	0.100 1	2.611 3	2.600 0	5.198 0	99.486 9	99.173 3	2.94
	0.100 0	2.619 5	2.600 0	5.213 0	99.748 6		
	0.100 2	2.629 4	2.600 0	5.192 0	98.562 5		
	0.100 2	2.628 3	2.600 0	5.236 0	100.296 9		
	0.100 1	2.632 4	2.600 0	5.308 0	102.908 5		
	0.100 1	2.630 1	2.600 0	5.075 0	94.036 3		
华蟾酥毒基 Cinobufagin	0.100 1	4.915 4	4.900 0	9.857 0	100.849 7	100.946 6	1.56
	0.100 0	4.929 9	4.900 0	9.902 0	101.470 7		
	0.100 2	4.859 8	4.900 0	9.941 0	103.697 2		
	0.100 2	4.853 1	4.900 0	9.706 0	99.039 0		
	0.100 1	4.852 5	4.900 0	9.758 0	100.112 5		
	0.100 1	4.935 0	4.900 0	9.860 0	100.510 3		

2.7.7 含量测定

精密称定 40 批次不同采收期的蟾酥药材粉末约 0.1 g,按“2.2”项下样品处理方法制备供试品溶液,在“2.1”项中的条件进行检测,采用外标法计算各批次样品中 11 种化合物的含量百分数(见表 6)。对比不同批次蟾酥各成分的含量百分数结果可知,11 种成分中相差较大的是伪异沙蟾毒精,平均含量

百分数为 0.063%,且该成分的 RSD 值大于 50%,作者推测是因为该成分峰面积较小(检测限和定量限分别为 1.399 和 2.138 $\mu\text{g}/\text{mL}$),S5 批次中该成分浓度低于定量限浓度,不同批次之间含量误差较大。此外,山东省内蟾毒灵等 3 种药典规定成分总含量在 7.100% ~ 11.000% 之间,均大于规定的 7.0%,符合 2020 版《中国药典》要求。

表 6 40 批次蟾酥药材多成分含量测定

Table 6 Content determination results of 40 batches of Bufonis Venenum

样品 Sample	含量 Content (%)										
	伪异沙蟾 毒精 Bufarenogin	日蟾毒 它灵 Gamab- ufotalin	沙蟾毒精 Arenobufagin	蟾蜍 它里定 Bufotalidin	远华 蟾蜍精 Telocino- bufagin	蟾毒它灵 Bufotalin	脂蟾毒精 Resibufagin	南美 蟾毒精 Marinob- ufagin	蟾毒灵 Bufalin	脂蟾 毒配基 Resibuf- ogenin	华蟾 酥毒基 Cinobufagin
S1	0.093	1.404	1.023	0.264	0.796	1.669	0.113	0.149	2.424	2.605	4.714
S2	0.033	1.220	1.030	0.245	0.716	1.693	0.080	0.245	2.470	2.829	4.484
S3	0.033	1.224	1.037	0.246	0.731	1.688	0.091	0.243	2.474	2.957	4.491
S4	0.163	1.260	1.062	0.276	0.776	1.635	0.103	0.164	2.478	2.636	4.788
S5	0.021	1.224	1.041	0.250	0.750	1.695	0.060	0.177	2.475	2.972	4.499
S6	0.087	1.264	1.090	0.285	0.784	1.652	0.112	0.225	2.556	2.679	4.901

续表 6(Continued Tab. 6)

样品 Sample	含量 Content(%)										
	伪异沙蟾 毒精 Bufarenogin	日蟾毒 它灵 Gamab- ufotalin	沙蟾毒精 Arenobu- fagin	蟾蜍 它里定 Bufotalidin	远华 蟾蜍精 Telocino- bufagin	蟾毒它灵 Bufotalin	脂蟾毒精 Resibufagin	南美 蟾毒精 Marinob- ufagin	蟾毒灵 Bufalin	脂蟾 毒配基 Resibuf- ogenin	华蟾 酥毒基 Cinobufagin
S7	0.044	1.546	0.947	0.243	0.707	1.990	0.103	0.227	2.016	1.796	4.457
S8	0.033	1.584	1.003	0.210	0.674	1.838	0.243	0.178	2.111	2.179	4.729
S9	0.089	1.209	1.012	0.246	0.765	1.543	0.099	0.154	2.294	2.415	4.494
S10	0.027	1.201	1.010	0.245	0.831	1.667	0.058	0.177	2.410	2.774	4.419
S11	0.094	1.385	1.002	0.257	0.783	1.643	0.118	0.228	2.661	3.062	4.878
S12	0.031	1.201	1.021	0.242	0.706	1.681	0.068	0.236	2.642	2.782	5.176
S13	0.032	1.216	1.030	0.245	0.721	1.681	0.087	0.240	2.528	2.609	5.663
S14	0.162	1.225	1.041	0.270	0.761	1.603	0.108	0.161	2.633	2.346	5.821
S15	0.029	1.202	1.023	0.247	0.733	1.669	0.053	0.175	2.723	2.854	5.222
S16	0.093	1.254	1.068	0.274	0.764	1.614	0.108	0.219	2.662	3.197	4.840
S17	0.047	1.556	0.960	0.240	0.709	2.019	0.121	0.240	2.678	2.848	5.174
S18	0.035	1.608	1.016	0.214	0.692	1.861	0.249	0.225	2.668	3.189	4.843
S19	0.102	1.199	1.007	0.242	0.745	1.539	0.094	0.152	2.727	3.123	4.950
S20	0.029	1.305	1.092	0.259	0.910	1.800	0.076	0.193	2.662	2.860	5.177
S21	0.093	1.370	1.001	0.258	0.783	1.644	0.121	0.233	2.711	3.120	4.970
S22	0.032	1.202	1.021	0.245	0.703	1.692	0.067	0.244	2.692	2.834	5.274
S23	0.152	1.169	0.996	0.257	0.725	1.533	0.088	0.155	2.657	2.368	5.875
S24	0.030	1.218	1.037	0.250	0.737	1.688	0.060	0.177	2.749	2.881	5.270
S25	0.088	1.260	1.070	0.277	0.767	1.620	0.107	0.215	2.737	3.287	4.976
S26	0.045	1.560	0.960	0.239	0.722	1.983	0.120	0.224	2.678	2.848	5.174
S27	0.086	1.193	1.005	0.242	0.730	1.539	0.100	0.148	2.752	3.152	4.996
S28	0.027	1.193	1.006	0.242	0.819	1.657	0.062	0.177	2.687	2.887	5.226
S29	0.033	1.218	1.030	0.244	0.716	1.625	0.048	0.243	1.709	1.764	3.827
S30	0.019	1.361	0.992	0.340	0.817	1.735	0.030	0.202	1.706	1.760	3.885
S31	0.021	1.375	0.980	0.322	0.826	1.649	0.074	0.187	1.690	1.764	3.860
S32	0.028	1.551	0.980	0.204	0.657	1.795	0.234	0.213	1.770	2.116	3.214
S33	0.020	1.359	0.986	0.327	0.831	1.664	0.068	0.200	1.790	2.110	3.210
S34	0.048	1.571	0.943	0.239	0.784	1.835	0.110	0.338	1.780	2.118	3.188
S35	0.100	0.528	4.701	0.791	1.747	1.115	0.049	1.604	1.206	0.345	1.426
S36	0.102	0.544	4.766	0.803	1.809	1.133	0.051	1.640	1.231	0.358	1.458
S37	0.103	0.544	4.826	0.814	1.825	1.140	0.049	1.661	1.231	0.350	1.456
S38	0.079	0.681	5.413	0.807	0.488	1.246	0.075	1.013	1.659	0.489	2.316
S39	0.080	0.625	5.240	0.790	0.474	1.199	0.065	0.985	1.600	0.469	2.234
S40	0.081	0.642	5.370	0.815	0.494	1.233	0.068	1.014	1.653	0.479	2.282

3 讨论与结论

山东省为蟾酥的道地产区,据调查山东省内蟾蜍养殖户总数多达 127 户,除东营市以外各市均有分布。因养殖规模差异,蟾酥质量参差不齐,指纹图谱与多成分定量分析相结合能准确判别出蟾酥样品之间的质量差异,可初步作为考察商品药材优劣的判断标准。本研究基于蟾酥样品中 11 种化学成分

建立 HPLC 指纹图谱,主要针对蟾酥药材中的强心苷蟾蜍二烯羟酸内酯类成分,现代药理学实验研究表明这些成分具有抗肿瘤,免疫调节活性和衰减癌症衍生疼痛的功效。

此外,对色谱峰进行相似性分析,结果显示山东省内不同批次的蟾酥相似度大于 0.900,表明山东省内不同批次的蟾酥特征成分相似度良好,但省外

6 批样品相似度与其他批次相比差距较大,尤其是湖南和江苏 6 批样品相似度在 0.779~0.802 之间。

为进一步分析不同批次蟾酥药材中共有峰的差异,对 40 批次蟾酥进行聚类、主成分和偏最小二乘法判别分析并对样本进行有效区分,40 批样品可以分为 3 类,分类结果一致,不同批次之间蟾酥的质量存在差异,且偏最小二乘法判别分析的 VIP 分析得到贡献程度最大的 12 个成分包含沙蟾毒精、蟾蜍它里定、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基、日蟾毒它灵和蟾毒它灵这 6 种成分。

通过含量测定不同批次的 40 批蟾酥药材,发现药典规定的蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基含量最高的是济宁微山的蟾酥,此外所有成分总含量排名最高的样品为日照莒县的蟾酥。山东省内的蟾酥样品在药典规定三种成分含量之和以及所有测量成分含量之和两方面均高于省外蟾酥样品,且湖南和江苏的蟾酥样品不符合药典规定,由此结果可以表明山东蟾酥在质量方面有一定的优势。山东省内蟾酥含量分析结果显示,济宁微山和日照莒县的蟾酥不仅在主成分分析中得分较高,药典规定的蟾毒灵、脂蟾毒配基和华蟾酥毒基含量较高的样品,且此样本所含成分总量在全部批次中也是较高的,因此笔者认为这批样品蟾酥的综合质量最佳,造成这一结果可能与这两地气候条件和地理位置有关,为该地区大力发展蟾蜍养殖提供理论依据。

综上,本研究不仅建立同时测定蟾酥中 11 种成分指纹图谱,还与蟾酥质量鉴定和品质评价有一定的相关性,综合评价蟾酥的质量,为蟾酥生产过程中质量控制提供科学依据。在对蟾蜍的养殖过程中,应充分考虑蟾蜍的生存条件,采用科学严谨的质量控制指标,建立更为合理科学的驯养基地,提高产地经济效益。

参考文献

- Zhao YM. Study on chemical constituents and anti-tumor activities of *Bufo venenum* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2017.
- Chen YL, Hao YY, Guo FJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Bufo venenum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 2579-2588.
- Ji C, Guo WZ. Study on the high performance liquid chromatography fingerprint of *Venenum Bufonis* [J]. *Guangming J Chin Med* (光明中医), 2016, 31: 1727-1729.
- Liu YL. Research on the quality evaluation of toad crisp commercial medicinal materials [D]. Liaoning: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学), 2017.
- He RR. Establishment of quality evaluation and draft quality standards for *Bufo venenum* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (辽宁中医药大学), 2019.
- Cheng XL, Pang ZH, Wang ZG, et al. HPLC fingerprint analysis and pattern recognition of dried *Venenum Bufonis* from different origin [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2019, 21: 1262-1266.
- Li ZY, Qu T, Wang PF, 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: 863-869.
- Zhu LY, Qian DW, Duan JA, et al. HPLC fingerprint of *Venenum Bufonis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2008, 30: 625-628.
- Zhang DH, Jin HH, Liu XY, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Bufo venenum* pulp and determination of eight components [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51: 490-495.
- Wang YQ, Fan GR. Quality evaluation of *Psoralea corylifolia* by using chromatographic profiles combined with chemometric methods [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 1143-1150.
- Lin L, Yu FR, Xu LH, et al. HPLC fingerprint, cluster analysis and principal component analysis of *Nüjin Pills* [J]. *China Pharm* (中国药房), 2019, 30: 1339-1343.
- Gao FY, Xu ZH, Wang WZ, et al. A comprehensive strategy using chromatographic profiles combined with chemometric methods: application to quality control of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1466: 67-75.
- Long LM, Song SS, Cao XL. Discriminant analysis and similarity evaluation of gas chromatography-mass spectrometry fingerprints of aroma components in green tea grading [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2019, 37: 325-330.
- Wu HN, Tan SH, Wang YQ, et al. Establishment and application of chemical fingerprint and pattern recognition for *Panax japonicus Rhizoma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50: 217-224.
- Li C, Zeng J, Long YQ, et al. Evaluation of the quality of *Aurantii Fructus* by HPLC fingerprint combined with multi-mode chemometrics [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 665-676.