

· 基础研究 ·

不同产地蟾酥药材 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[△]

成小兰, 庞中化, 王志刚, 胡春萍, 吕章明, 曹鹏*

江苏省中医药研究院/南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

[摘要] 目的: 建立不同产地蟾酥的 HPLC 指纹图谱, 并进行聚类分析和主成分分析, 为蟾酥及混伪品鉴定提供快速可靠的分析方法。方法: 收集 10 批不同产地的蟾酥样品, 采用 Waters MS C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 纯水-0.1% 三氟乙酸(TFA)乙腈溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 296 nm。结果: 提取 10 个色谱峰为指纹图谱共有峰, 并采用对照品指认了 3 个主要色谱峰, 其中以对照品蟾毒灵为参照峰, 采用指纹图谱相似度评价软件、SIMCA 软件进行相似度分析和主成分分析。方法学考察实验表明, 所建立的指纹图谱方法重复性良好, 简便可靠。不同来源的蟾酥药材相似度大于 0.92。结论: 本研究所建立的蟾酥药材指纹图谱方法快速准确, 灵敏度高, 可为不同产地蟾酥质量控制和混伪品鉴别提供有效的手段。

[关键词] 蟾酥; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度分析; 主成分分析

[中图分类号] R282.74; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1262-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190331001

HPLC Fingerprint Analysis and Pattern Recognition of Dried Venenum Bufonis from Different Origin

CHENG Xiao-lan, PANG Zhong-hua, WANG Zhi-gang, HU Chun-ping, LYU Zhang-ming, CAO Peng*

Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint profiles of dried Venenum Bufonis from different producing areas, and provide a fast and reliable method for Venenum Bufonis identification. **Methods:** A total of 10 dried Venenum Bufonis samples from different origins were collected. The samples were analyzed with Waters MS C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), and gradient eluted by water-0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) acetonitrile solution at 1.0 ml/min. The column temperature was set at 30 °C, and detect wavelength was 296 nm. **Result:** Ten chromatographic peaks were extracted as the common peaks of fingerprints, and three main chromatographic peaks were identified by reference, of which bufalin was used as the reference peak. Softwares such as fingerprint similarity evaluation, SIMCA were applied for similarity analysis and principal component analysis. The methodology study results showed that the established HPLC fingerprint method was simple and reliable. The similarity of Venenum Bufonis samples from different sources was greater than 0.92. **Conclusion:** The method established in this experiment is accurate and sensitive, can be used for quality control and identification of dried Venenum Bufonis.

[Keywords] Venenum Bufonis; HPLC; fingerprint; similarity analysis; principal component analysis

蟾酥为蟾蜍科动物中华蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺和皮肤腺干燥分泌物, 主产于河北、山东、四川等地。蟾酥味甘、辛, 性温, 有毒, 具有开窍醒神、解毒、止痛等功效, 主治恶疮、瘰疬、癌肿、咽喉肿痛、牙痛等局部结肿及其引发的疼痛^[1]。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^[1-2]。现代药理学研究表明, 蟾酥具有抗肿瘤、强心、局部麻醉、镇痛、抗炎等多种作用^[3]。最新研究显示, 蟾酥可增强去甲肾上腺素所引起的大鼠输精管的收缩, 并呈剂量依赖性收缩反应。此外, 蟾酥还具有镇咳、利尿、兴奋肠道平滑肌以及促进糖元抑制乳酸生成的胰岛素样作用^[4]。蟾酥含有大量蟾蜍毒素类物质, 尚含有酯蟾毒配基-3-单辛二酸

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002); 国家自然科学基金项目(81622048)

* [通信作者] 曹鹏, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 中药药理; Tel: (025)85608666, E-mail: njpcao@126.com

脂、蟾毒灵-3-单辛二酸酯、华蟾毒精-3-单辛二酸酯、胆固醇、吡啶系碱类等成分,其中蟾毒毒素类成分是蟾酥的主要有效成分^[5-7]。蟾酥是临床常用的名贵动物药之一,应用广泛,疗效确切。众多成方制剂如六神丸、麝香保心丸、蟾酥注射液等均含有该药材。由于蟾蜍基原动物的多样化,加之中药大品种的技术升级以及蟾酥资源需求量的增加,蟾酥价格不断高涨,不法商贩在蟾酥中掺假以谋取暴利,导致市场商品蟾酥品种混杂、掺杂、掺假现象严重,常见掺伪品主要包括:淀粉、泥沙、蛋白、松香粉、牙膏、肥皂、猪油等杂质^[8]。混伪品导致蟾酥质量差异较大,不能保证用药的有效性和安全性。因此建立有效可靠的蟾酥药材鉴定方法,用于严格控制蟾酥药材及饮片的质量显得尤为重要。

蟾酥常用的传统真伪鉴别方法包括外观形状鉴别和理化鉴别。但由于蟾酥经过初加工后,缺乏基原动物的外观形态,传统鉴别法存在一定的局限性。近年来,随着DNA分子鉴定技术的发展,基于COI基因条形码技术的药材分子鉴定为动物药材的鉴别提供了全新而有效的辅助手段^[9]。但由于蟾蜍是两栖类动物,且该两栖类物种基因组受环境影响较大,基因组存在较大的变异性,单纯依靠COI测序难以对蟾蜍进行鉴定。此外,在蟾酥加工过程中,DNA受到较大破坏,因此难以从蟾酥中提取线粒体DNA,更增加了通过条形码鉴定混伪品的难度。中药色谱指纹图谱是一种综合的、整体的鉴定手段,可较全面地反映药材/饮片的化学成分以及特征峰面积的相对比例。在对药材/饮片指纹图谱分析的基础上,采用不同的统计处理方法进行化学模式识别,可在药材/饮片质量、产地、种属、真伪的判别中克服人工鉴定的主观因素,从而更加准确地对药材进行真伪鉴别和质量评价,应用广泛^[10-11]。本研究采用HPLC梯度洗脱法构建不同产地蟾酥药材指纹图谱,并对10批样品进行相似度评价、聚类分析和主成分分析,旨在为蟾酥的质量控制和鉴别研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱系统, Waters2996 型二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司), METTLER AB204-S 万分之一电子天平, METTLER AG285 十万分之一电子天平, Milli-Q

纯水器(美国 Millipore 公司)

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司);水为超纯水;其他试剂为分析纯。

1.3 对照品

蟾毒它灵、蟾毒灵以及华蟾毒精对照品由江苏省中医药研究院化学研究室提供,纯度 >98%。

1.4 实验样品采集及鉴定

本研究所用蟾酥样品详见表 1。所有样品均由江苏省中药研究院中药资源实验室钱士辉研究员鉴定。

表 1 蟾酥样品信息

编号	样品	产地	采集时间
S1	蟾酥	山东省沂水	2017年8月
S2	蟾酥	四川青城山	2017年8月
S3	蟾酥	浙江省台州	2017年8月
S4	蟾酥	福建福州	2017年8月
S5	蟾酥	广西河池	2017年8月
S6	蟾酥	湖南郴州	2017年8月
S7	蟾酥	江西九江	2017年8月
S8	蟾酥	安徽黄山	2017年8月
S9	蟾酥	湖北鄂州	2017年8月
S10	蟾酥	江苏南京	2017年8月

2 实验方法

2.1 色谱条件

利用高效液相色谱法,采用 Waters MS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:纯水和 0.1% TFA 乙腈溶液(梯度洗脱);检测波长:296 nm;柱温:30 °C;流速:1.0 mL·min⁻¹,进样体积 30 μL。

表 2 纯水(A)-0.1% TFA 乙腈(B)梯度洗脱

t/min	流量/mL·min ⁻¹	溶剂 A%	溶剂 B%
0	1	98	2
10	1	92	8
30	1	70	30
45	1	60	40
60	1	50	50
65	1	50	50
70	1	98	2

2.2 对照品溶液的制备

精密称取蟾毒它灵、蟾毒灵以及华蟾毒精对照品适量,分别用甲醇溶解得对照品溶液。精密吸取各对照品溶液1 mL,置10 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取蟾酥细粉约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入50 mL甲醇称质量,加热回流提取1 h,放冷,加甲醇补足损失质量,摇匀,静置,上清液经0.45 μm微孔滤膜滤过,续滤液作为供试品溶液。

3 实验结果

3.1 方法学验证

3.1.1 精密度试验 取蟾酥供试品溶液(S1),按2.1项下色谱条件连续进样6次,采用《中药色谱特征图谱相似度评价系统(2012版)》分析,以蟾毒灵为参照物,各共有峰相对保留时间RSD为0.096 0%~0.156 9%,相对峰面积RSD为0.840 6%~3.349 3%,均小于5%,符合指纹图谱检测要求。

3.1.2 稳定性试验 取蟾酥供试品溶液(S1)分别在0、2、4、12、24 h进行HPLC检测,以蟾毒灵为参照物,各共有峰的相对保留时间RSD值为0.263 6%~0.521 2%,相对峰面积RSD为2.414 0%~3.666 3%,表明供试液24 h内稳定。

3.1.3 重复性试验 取同一份蟾酥样品(S1)6份,按2.3项下方法制备样品溶液,按2.1项下色谱条件进样,采用《中药色谱特征图谱相似度评价系统(2012版)》分析,以蟾毒灵为参照物,各共有峰相对保留时间RSD为0.063 9%~0.439 0%,相对峰面积RSD为0.659 2%~4.952 0%,表明重复性良好。

3.2 不同产地蟾酥指纹图谱的建立与分析

3.2.1 HPLC 指纹图谱测定 取不同产地10批蟾酥样品,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图,结果见图1。

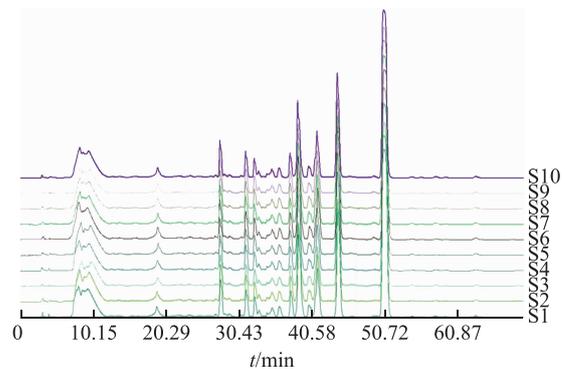


图1 蟾酥HPLC特征图(S1~S10)

3.2.2 对照指纹图谱的建立和共有峰的标定 将3.2.1条件下测定的色谱图数据导入相似度评价系统软件,以S1样品为参考图谱,时间窗宽度设为0.1 s,中位数法生成对照指纹图谱(图2)。蟾酥色谱指纹图谱以保留时间为44.079 6 min的9号峰作为参照峰S,对不同蟾酥药材的指纹图谱进行考察,共确定了10个共有峰,各共有峰面积见表3。

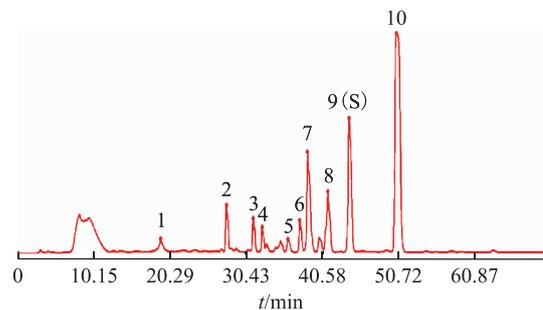


图2 蟾酥对照指纹图谱

表3 不同产地10批蟾酥药材共有峰面积

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	3 753.581	8 256.184	6 031.034	3 997.643	2 904.669	5 917.396	24 219.370	15 334.500	31 142.330	77 586.870
S2	3 814.406	7 808.077	5 686.771	3 742.681	2 754.313	5 605.565	22 972.240	14 543.810	29 595.560	75 250.600
S3	3 024.644	6 502.341	4 668.194	3 161.814	2 236.009	4 693.928	19 268.09	12 238.750	25 092.850	69 411.270
S4	3 840.938	5 665.811	4 398.941	3 783.450	2 637.916	5 508.881	22 540.160	14 333.130	29 495.730	76 465.910
S5	4 157.332	4 782.346	4 283.268	3 899.275	2 696.089	5 707.267	23 401.570	14 800.940	30 329.800	77 000.100
S6	4 873.676	8 574.360	6 085.866	4 251.845	2 915.211	6 140.097	25 291.740	16 000.130	32 836.870	79 212.120
S7	5 120.339	6 567.908	6 282.374	4 152.636	2 993.979	5 994.401	24 627.870	15 467.250	31 616.420	79 581.540
S8	4 745.784	8 123.553	5 936.897	3 914.659	2 792.668	5 689.422	23 586.410	14 821.910	30 359.150	77 769.370
S9	3 775.465	6 972.222	4 991.988	3 367.521	2 342.794	4 906.871	20 347.130	12 862.330	26 447.470	71 718.460
S10	3 951.181	7 782.304	5 600.362	3 786.721	2 629.921	5 510.876	22 759.400	14 404.420	29 670.790	75 682.950
R	4 105.735	7 103.510	5 396.570	3 805.825	2 690.357	5 567.570	22 901.397	14 480.716	29 658.699	75 967.919
RSD/%	15.43	17.31	13.82	8.71	9.08	8.2	8.11	7.94	7.81	4.22

3.2.3 指纹图谱分析 由图1可知,蟾酥化学成分复杂,不同产地蟾酥化学组成基本相似,但含量差别较大,其共有峰面积RSD为4.22%~17.31%,在10批次样品图中9号色谱峰(蟾毒灵)的分离度良好,所有样品共有且为蟾酥主要成分之一,因此将其确定为参照峰S。

3.2.4 相似度评价 使用《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件(2012版)》对10批蟾酥药材色谱数据进行分析,以S1样品色谱图谱作为参照图谱,采用“中位数”法生成对照图谱,得到10批蟾酥药材特征图谱及相似度。结果10批不同产地蟾酥药材各色谱图相似度在0.920~0.967,表明10批药材相似度较好。

表4 不同产地蟾酥 HPLC 指纹图谱相似度计算结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.935	S6	0.920
S2	0.958	S7	0.962
S3	0.937	S8	0.966
S4	0.939	S9	0.967
S5	0.956	S10	0.966

3.3 主成分分析

以蟾酥指纹图谱中标定的共有峰相对峰面积为变量,用SPSS17.0统计分析软件的因子分析进行主成分分析,以主成分的特征根及贡献率作为选择主成分的依据。主成分个数提取原则是取主成分对应的特征值大于1的前2个主成分,其累计贡献可以达到87.558%,即包括了大部分信息。其中第一主成分特征值为5.977,方差贡献率为59.769%;第二个主成分特征值为2.779,方差贡献率为27.789%。分别以第一、第二主成分来建立坐标系,得到所有样本PCA二维投影图(图4),图中每一个点对应一个产地,10个产地可分为3类。

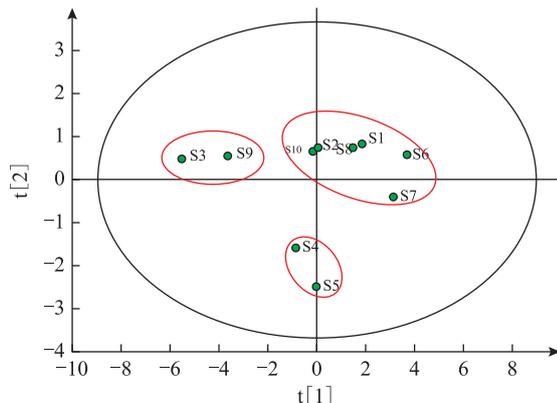
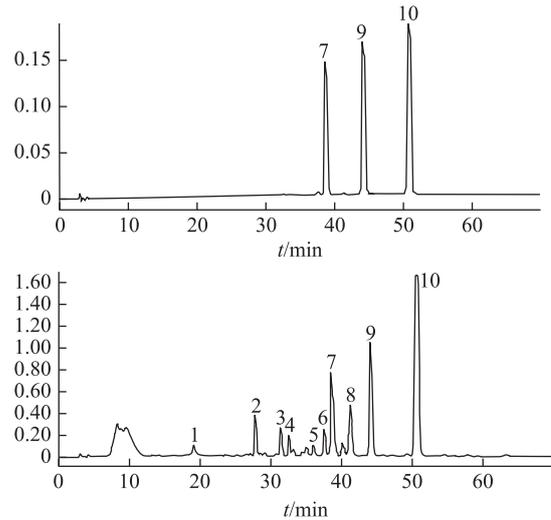


图3 不同产地蟾酥药材 PCA 图

3.4 共有峰确认

本研究对10批蟾酥供试品溶液进行指纹图谱检测,确定了10个共有峰,并通过与对照品溶液比对,指认了其中3个色谱峰,分别为7号(蟾毒它灵)、9号(蟾毒灵)、10号(华蟾毒精)。结果见图4。



注: A. 对照品; B. 蟾酥样品; 7. 蟾毒它灵; 9. 蟾毒灵; 10. 华蟾毒精。

图4 对照品和蟾酥样品 HPLC 图

4 结论

蟾酥为蟾蜍科动物中华蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺和皮肤腺干燥分泌物。我国分布的蟾蜍科蟾蜍属动物品种众多,达十余种之多。分布最广的是中华大蟾蜍、花背蟾蜍 *Bufo raddei* Strauch、黑眶蟾蜍和华西蟾蜍 *Bufo bufo Andrewsii*。有研究表明,不同基原动物蟾酥成分差异显著。不同品种蟾蜍地理上交叉分布,加上捕捉者缺乏动物品种的准确辨识,易导致蟾酥品种混杂现象以及蟾酥药材质量的参差不齐,从而严重影响药材疗效及安全性,增加临床用药的安全风险。

本研究收集了10批不同产地的蟾酥药材,优化色谱条件,建立了蟾酥的HPLC指纹图谱。在10个共有峰中,有3个色谱峰经与对照品溶液比对,分别指认为蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾毒精。使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析不同批次蟾酥样品的相似度为0.920~0.967,表明10批药材相似度较高。利用PCA方法对蟾酥药材的HPLC指纹图谱进行分析。聚类分析结果表明,10批样品可分成

3类,样品S1、S2、S6、S7、S8、S10聚为一类,样品S3、S9聚为一类,样品S4、S5聚为一类,与相似度结果一致。

本研究建立了蟾酥的HPLC指纹图谱,共确定了10个共有峰。中药指纹图谱可以全面反映蟾酥药材的化学成分以及各特征性有效成分间峰面积的相对比例,进而反映蟾酥药材的内在质量,为蟾酥药材判断真伪、评价优劣、考察稳定性和一致性提供依据。本实验采用指纹图谱结合PCA对不同产地蟾酥进行质量评价,所建立的测定方法快速准确,灵敏度高,可为蟾酥药材的质量控制和质量鉴别提供有效手段。

参考文献

- [1] 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]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 215-223.
- [2] 周钜, 杨届. 蟾蜍的药用价值研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(11): 203-204.
- [3] XU L, WANG S, 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.
- [4] 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]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 215-235.
- [5] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 48(12): 2579-2588.
- [6] 贺晶, 李艳, 司南, 等. 应用UPLC-Orbitrap质谱分析鲜蟾酥与干蟾酥化学成分差异[J]. 药学报, 2014, 49(10): 1446-1450.
- [7] 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.
- [8] 李宗云, 曲婷, 王鹏飞, 等. 毒性中药蟾酥质量研究现状及关键影响因素分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 863-869.
- [9] 王孟虎, 许亮, 康廷国, 等. 动物类中药DNA条形码鉴定研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 227-234.
- [10] PENG Y, DONG M, ZOU J, et al. Analysis of the HPLC Fingerprint and QAMS for Sanhuang Gypsum Soup [J]. J Anal Methods Chem, 2018, 2018: 5890973.
- [11] ZHOU Q, WANG Y, ZHANG J, et al. Fingerprint analysis of Huolingshengji Formula and its neuroprotective effects in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1668.
- [8] CHEN J, CHENG X L, WEI F, et al. Detection of gelatin adulteration in traditional Chinese medicine: analysis of deer-horn glue by rapid-resolution liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Anal Methods Chem, 2015, 2015: 1-9.
- [9] 叶茂. 肽图结合质谱筛选名贵中药阿胶的特异性肽段与鉴定研究[D]. 成都: 成都中医药大学. 2016.
- [10] KRUGER N. The Bradford method for protein quantitation [J]. Methods Mol Biol, 1988, 32(32): 9-15.
- [11] 乔琰. 动物皮中脂溶性成分的指纹图谱研究[D]. 天津: 天津大学, 2015.
- [12] 王晓坤, 程秀民, 于海英, 等. 阿胶水溶性成分HPLC指纹图谱研究[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(2): 66-69.
- [13] 科林根. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 6-10.

(收稿日期: 2019-03-31 编辑: 王笑辉)

(上接第1261页)

(收稿日期: 2019-03-20 编辑: 戴玮)