

毒性中药蟾酥质量检测方法研究

王兆基¹, 栗晓黎², 刘秋铭¹, 林瑞超^{2*}, 郑秀云³, 冯国培³

(1. 香港特别行政区政府化验所, 香港; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 3. 香港中文大学, 香港)

摘要 目的: 建立蟾酥中多种药效及毒性成分蟾酥毒素的定性定量检测方法。**方法:** 采用液相色谱-质谱/质谱联用方法检测蟾酥中多种蟾酥毒素成分。**结果:** 建立了华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基及脂蟾毒配基的 LC-MS/MS 检测方法。比较了蟾酥样本的液相色谱-质谱/质谱联用分析数据。对 4 个不同来源中华大蟾蜍及黑眶蟾蜍的蟾酥样本进行检测, 检出华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基及脂蟾毒配基的含量范围为 0.05% ~ 5.12% (w/w)。**结论:** 液相色谱-质谱/质谱联用方法可用于蟾酥定性定量检测, 并为质量评价提供参考。

关键词: 中药材; 蟾酥; 蟾酥毒素; 华蟾毒它灵; 蟾蜍灵; 脂蟾毒配基; 华蟾毒配基; 液相色谱-质谱/质谱联用

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1027-04

Study on quality control method for Venenum Bufonis

WONG Siu-kay¹, SU Xiao-li², LAU Chau-ming¹, LIN Rui-chao²,
CHENG Sau-wan³, FUNG Kwok-pui³

(1. Government Laboratory, HKSAR, Hongkong, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 3. The Chinese University of Hong Kong, Hongkong, China)

Abstract Objective: To establish quality control method for Venenum Bufonis (Chansu) which was secretion material obtained from *Bufo gargarizans* Cantor or *Bufo melanostictus* Schneider. Chansu contains bufadienolide steroids with both therapeutic properties and toxicity. **Method:** Using LC-MS/MS technique to establish quality control method for Chansu by determining the bufadienolide steroids. **Results:** Established LC-MS/MS method was used to determine 4 bufadienolide steroids viz. cinobufotalin, bufalin, resibufagenin and cinobufagin that could be found in Chansu. Chansu samples from four different sources of *Bufo gargarizans* Cantor or *Bufo melanostictus* Schneider were analysed and the determined content of the 4 different bufadienolide steroids ranged from 0.05% to 5.12% (w/w). **Conclusion:** This paper developed an LC-MS/MS method for qualitative and quantitative analysis of Chansu, which can be applied to assessing the quality of the herb.

Key words: traditional Chinese medicine; Venenum Bufonis; bufadienolide steroids; cinobufotalin; bufalin; resibufagenin; cinobufagin; LC-MS/MS

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺和皮肤腺的干燥分泌物。蟾酥主要解毒、止痛, 用于咽喉肿痛、中暑吐泻、腹痛神昏^[1]。蟾酥所含成分复杂, 主要含有蟾毒配基类、蟾蜍毒素类、蟾毒色胺类等^[2]。为多种脂溶性羟基甾类化合物(总称蟾蜍毒素)及其衍生物, 包括华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基等^[3]。这些成分亦为蟾酥的有效成分^[4]。蟾酥亦含一定的毒性。中毒

症状有心率缓慢, 恶心呕吐, 头痛, 头晕, 四肢麻木, 严重者有呼吸衰竭、脱水、心力衰竭而死亡^[5]。中国药典采用薄层析法和高效液相色谱法仅对脂蟾毒配基及华蟾毒基进行定性定量检测^[6]。本文建立液相色谱-质谱/质谱联用同时测定多种成分的方法, 并报道鉴别图谱, 可为蟾蜍鉴别和多种成分(图1)检测提供更多方法, 亦为其质量标准提高提供参考。

* 通讯作者 Tel: (010) 67095307; E-mail: linrch@nicpbp.org.cn

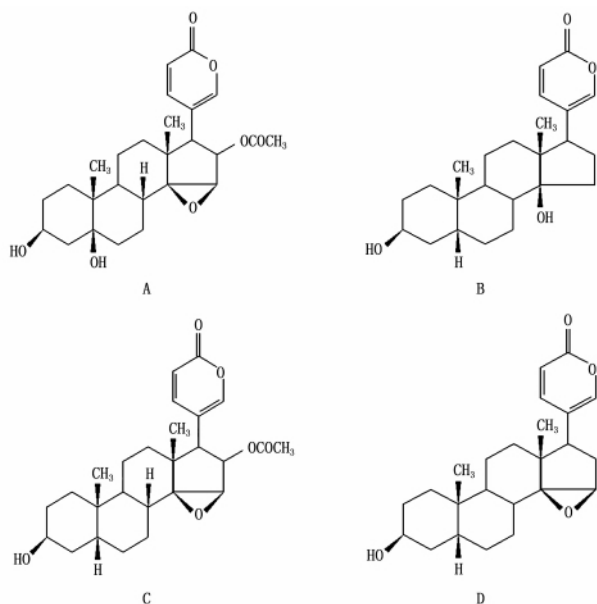


图1 蟾酥主要成分化学结构图

Fig 1 Chemical structure of major active compounds in Chansu

A. 华蟾毒它灵(cinobufotalin) B. 蟾蜍灵(bufalin) C. 华蟾毒配基(cinobufagin) D. 脂蟾毒配基(resibufagenin)

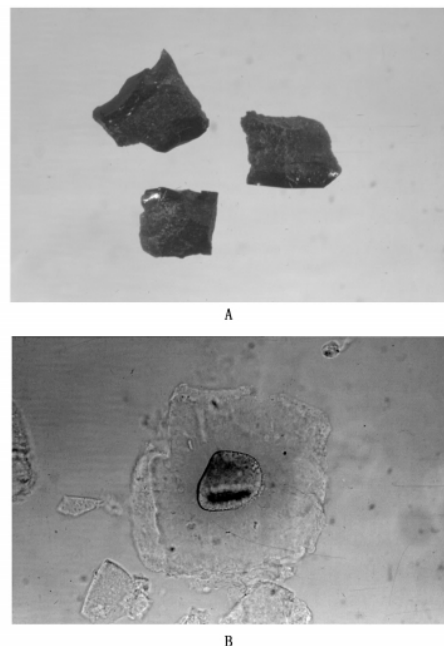


图2 蟾酥药材性状特征(A)及显微鉴别(B)

Fig 2 Appearance characteristic (A) and microscopic characteristic (B) of Chansu

1 仪器与试药

PE-SCIEX API-300 液相色谱-质谱/质谱联用仪。Leica 显微镜型号 020-518.500 DM/LS。

对照品华蟾毒它灵、蟾蜍灵、脂蟾毒配基、华蟾毒配基由中国药品生物制品检定所提供。中华大蟾蜍样品, 采自黑龙江、陕西、山西、山东; 黑眶蟾蜍样品采自浙江、贵州、云南、海南。样品经中国药品生物制品检定所药材专家鉴定。甲醇、醋酸、醋酸甘油、水合氯醛试液等试剂为分析纯。

2 液相色谱-质谱/质谱联用分析条件

色谱柱: C_{18} (5 μm , 2.1 mm $\times$ 250 mm); 流动相: 甲醇(含 0.1% 醋酸) - 0.1% 醋酸 (55:45); 流速: 200 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; 分流比率: 9:1; 进样量: 10 μL ; 扫描设定: 华蟾毒它灵 - 正离子对 m/z 459/363、蟾蜍灵 - 正离子对 m/z 387/351、脂蟾毒配基 - 正离子对 m/z 385/367、华蟾毒配基 - 正离子对 m/z 443/365。

3 鉴别试验

3.1 性状 药材为蟾酥分泌物加工而成的部分, 呈扁圆形团块或片状。棕褐色或红褐色。团块状者质坚, 不易折断, 断面棕褐色, 角质状, 微有光泽; 片状者质脆, 易碎, 断面红棕色, 半透明。气微辛, 味初甜而后有持久的麻辣感, 粉末嗅之作嚏(图2-A)。

3.2 显微鉴别 显微镜下粉末呈颗粒状团块, 在水、醋酸甘油试液或水合氯醛试液中迅速溶解(图2-B)。

3.3 理化鉴别

利用华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒

配基的液相色谱保留时间及其特征质谱/质谱图作定性分析。

样品溶液的提取步骤: 取生药粉末 1 g, 加氯仿 20 mL, 水浴回流提取 1 h。过滤, 滤液蒸干, 残渣溶于 10 mL 甲醇作为供试液。按“2”项下条件进样分析。测得液相色谱保留时间(图3): 华蟾毒它灵 12 min, m/z 459, $[M+H]^+$; 蟾蜍灵 21 min, m/z 387, $[M+H]^+$; 脂蟾毒配基 28 min, m/z 385, $[M+H]^+$; 华蟾毒配基 29 min, m/z 443, $[M+H]^+$ 。质谱/质谱数据: 华蟾毒它灵 m/z 459 的碎片离子包括 m/z 363, 381, 283 等。蟾蜍灵 m/z 387 的碎片离子包括 m/z 369, 351, 255 等。脂蟾毒配基 m/z 385 的碎片离子包括 m/z 367, 349, 223 等; 华蟾毒配基 m/z 443 的碎片离子包括 m/z 365, 347, 203 等(图4)。

4 含量测定

4.1 对照品混合溶液的制备 分别精密称取对照品华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基适量, 加甲醇制成每 1 mL 中各自含约 0.5 mg 华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基的对照品溶液, 再用甲醇稀释至 0.5, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 个不同浓度对照品混合溶液。

4.2 供试品溶液的制备 精密称取蟾蜍生药粉末 0.5 g, 加氯仿 25 mL, 高速均化提取 5 min。离心分离后, 过滤。用氯仿 2 $\times$ 20 mL 重复提取。合并滤液, 真空加热(30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$) 挥掉溶剂, 残渣溶于 10 mL 甲醇, 用 0.45 μm 滤膜器过滤, 即得。

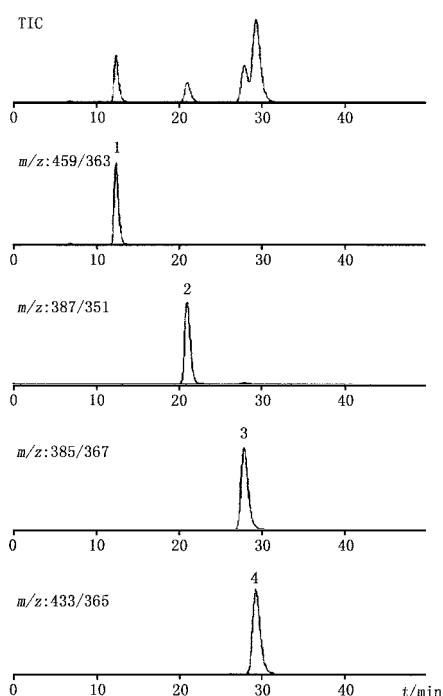


图3 蟾酥提取物液相色谱-质谱/质谱离子流图

Fig 3 LC-MS/MS chromatograms of major active chemicals in Chansu
1. 华蟾毒它灵(cinobufotalin) 2. 蟾蜍灵(bufalin) 3. 脂蟾毒配基(cinobufagin) 4. 华蟾毒配基(resibufagenin)

4.3 方法确认

利用液相色谱-质谱/质谱联用仪的多反应监测扫描方式方法,对样本中蟾酥的4个化学成分进行分析。定量扫描设定: 华蟾毒它灵正离子对 m/z 459/363、蟾蜍灵正离子对 m/z 387/351、脂蟾毒配基正离子对 m/z 385/367、华蟾毒配基正离子对 m/z 443/365。

4.3.1 线性关系考察 分别将不同浓度对照品混合溶液注入液相色谱仪,按上述条件分别测定华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基的对应离子对峰面积,以对照品混合溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,进行回归处理,结果在 $0.5 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,混合溶液浓度与峰面积积分值之间线性关系良好(表1)。

4.3.2 检测限试验 用最低浓度的对照品混合溶液,重复进样7次,计算各华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基的峰面积积分值之标准偏差,乘以3得对应仪器检测限,再转换成样品检测限(表1)。

4.3.3 重复性试验 取同一批样本,制备5份供试品溶液,按前述方法重复平行测定,得华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基4种成分含量分别为0.57%,0.78%,1.9%,1.4%,RSD为2.4%~4.5%范围内(表1)。

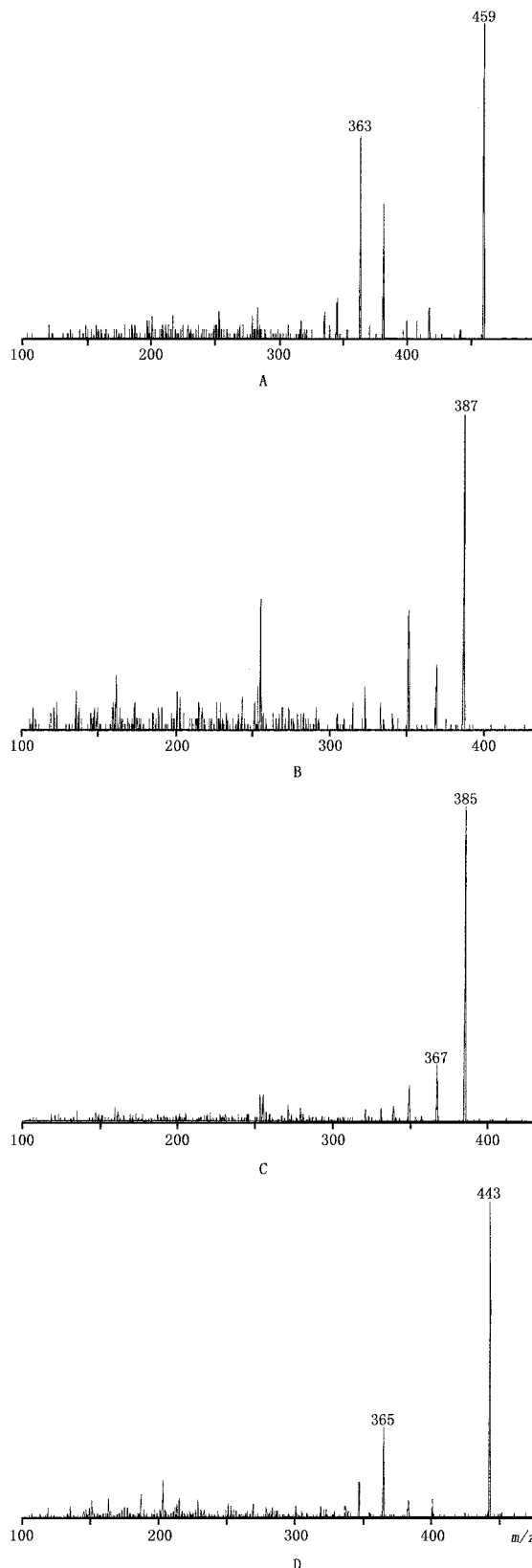


图4 分子离子质谱/质谱图

Fig 4 MS/MS spectra

A. 华蟾毒它灵(cinobufotalin) B. 蟾蜍灵(bufalin) C. 脂蟾毒配基(cinobufagin) D. 华蟾毒配基(resibufagenin)

4.3.4 回收率试验 取已知含量的样品,称取 0.5 g,精密加入适量对照品混合溶液(令最后供试溶液为 0.5 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内),以下按供试溶液制

备方法操作,制成加样供试溶液,分别计算回收率。重复 5 次得平均回收率在 99.7% ~ 101.1% 范围内(表 1)。

表 1 含量测定方法确认数据
Tab 1 Data of content determination

	华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	蟾蜍灵 (bufalin)	华蟾毒配基 (cinobufagin)	脂蟾毒配基 (resibufagenin)
线性范围(提取液 [linearity range (extract)] / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.5 ~ 20	0.5 ~ 20	0.5 ~ 20	0.5 ~ 20
工作曲线截距(intercept)	-2481	3139	7310	4047
工作曲线斜率(slope)	129812	38230	32790	31413
r	0.999	0.998	0.997	0.999
检测限(limit of detection) / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	0.12	0.30	0.32	0.14
平均回收率(average recovery) / % ($n=5$)	101.1	99.7	100.4	100.8
方法重复性 RSD(repeatability) / % ($n=5$)	4.5	3.5	2.4	3.9

4.4 样品测定 按“2”项下条件,取对照品及样品溶液 10 μL 进样测得各样品含量。4 个不同产地来源中华大蟾蜍及黑眶蟾蜍所得的蟾酥样本进行化验,检出华蟾毒它灵、蟾蜍灵、华蟾毒配基及脂蟾毒配基的含量分别见表 2、表 3。

表 2 中华大蟾蜍样品测定结果(% ,w/w)
Tab 2 Results of determination for *Bufo gargarizans* Cantor samples

产地 (source)	华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	蟾蜍灵 (bufalin)	华蟾毒配基 (cinobufagin)	脂蟾毒配基 (resibufagenin)
黑龙江 (Heilongjiang)	0.81	1.07	3.03	2.15
陕西(Shaanxi)	0.29	0.46	1.19	0.94
山西(Shanxi)	0.87	1.05	2.85	1.71
山东(Shandong)	0.57	0.78	1.87	1.44

表 3 黑眶蟾蜍样品测定结果(% ,w/w)
Tab 3 Results of determination for *Bufo melanostictus* Schneider samples

产地 (source)	华蟾毒它灵 (cinobufotalin)	蟾蜍灵 (bufalin)	华蟾毒配基 (cinobufagin)	脂蟾毒配基 (resibufagenin)
浙江(Zhejiang)	0.65	1.11	2.65	2.39
贵州(Guizhou)	1.14	1.71	5.12	2.82
云南(Yunnan)	0.40	1.57	2.63	3.69
海南(Hainan)	0.05	0.08	0.19	0.12

5 讨论

5.1 利用液相色谱-质谱/质谱联用仪的多反应监测扫描方式方法,对样本中蟾酥的 4 个化学成分进行分析。此法有干扰少、专属性强等优点,尤其适用于样本中只含微量以上成分或其基体较为复杂的情况。

5.2 利用液相色谱-质谱/质谱联用技术作定量分析,一般需要比较高的液相色谱分辨率(R 值须大于 1)。否则在离子化过程中,干扰物会对待测物造成

抑压作用,影响定量结果的可靠性^[9]。所以,液相色谱的工作条件包括流动相的选择必须先经优化,确保待测物的色谱峰能与其他干扰物分开。

5.3 由于乙腈的黏度比较低,一般液相色谱的流动相多采用乙腈作为有机溶剂部分。但在分析蟾蜍毒素的时候,作者发现甲醇会较为适合,因为甲醇与蟾蜍毒素可产生极性作用,从而提供较窄的色谱峰,提高色谱分辨率。在流动相中加入醋酸是要提高离子化效率,经优化的流动相曾应用于较复杂的基体如分析含蟾蜍的中成药样本^[9]。

参考文献

- ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 360
- WANG Jia-lian(王加连). Study on manpower cultivate and drug merit of *Bufo venenum* (蟾蜍的药用价值及人工养殖研究). *Jiangsu Agr Sci* (江苏农业科学), 2009(1): 240
- MA Xiao-chi(马晓驰), ZHANG Bao-jing(张宝璟), DENG Chuan(邓川), et al. Chemical constituents of bufadienolides from traditional Chinese medicine *Veneum bufonis* (中药蟾酥中蟾蜍甾烯类成分研究). *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2009, 18(9): 3519
- JIN Xiang-qun(金向群). Progress in studies on chemistry and pharmacology of *Bufo venenum* (蟾蜍化学与药理作用的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 27(4): 246
- LIANG Hua-long(梁华龙). Toxicity and Side Effect of Chinese Traditional Drug and Dispose (中药毒副作用及其处理). Henan(河南): Henan Technology Press(河南科学技术出版社), 1994. 416
- Lagerwerf F, Van Dongen W, Steenvoorden R, et al. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS/MS. *Trends Anal Chem*, 2000, 19: 418
- Wong SK, Tsui SK, Kwan SY. Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30: 161

(本文于 2010 年 4 月 26 日收到)