

## 蟾酥干燥炮制前后化学成分和药效学变化考察

陈瀛澜<sup>1</sup>, 郭夫江<sup>1</sup>, 卞雪莲<sup>2</sup>, 董志颖<sup>1</sup>, 吴迎春<sup>1\*</sup>, 李医明<sup>1\*</sup>

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 上海金蟾健康科技有限公司, 上海 201900

**摘要:** 目的 考察蟾酥 *Bufonis venenum* 鲜浆干燥炮制加工(日晒干燥、50℃真空干燥、50℃鼓风干燥、80℃鼓风干燥、冷冻干燥)前后化学成分及药效变化。方法 HPLC 法和 TLC 法研究蟾酥不同干燥方式炮制前后化学成分的变化, MTT 法测试不同炮制干燥品抑制 5 种不同肿瘤细胞株增殖的效果。结果 5 种不同加工炮制方法所得蟾酥, 性状有较大差异; 化学成分的种类及含量没有明显差异; 华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量之和都符合《中国药典》2015 年版标准, 大于 6%; 50℃和 80℃鼓风干燥所得蟾酥具有比其他干燥方法更强的肿瘤细胞抑制效果。结论 日晒及 50℃鼓风干燥法所得蟾酥符合《中国药典》要求的外观性状。真空干燥和冷冻干燥虽然颜色不符合《中国药典》的规定, 但主要有效成分并未发生较大变化。

**关键词:** 蟾酥; 炮制; 干燥; 沙蟾毒精; 远华蟾毒精; 蟾毒它灵; 华蟾毒它灵; 蟾毒灵; 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1816-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.012

## Study on chemical constituents and pharmacodynamic changes of *Bufonis Venenum* with different drying methods

CHEN Ying-lan<sup>1</sup>, GUO Fu-jiang<sup>1</sup>, BIAN Xue-lian<sup>2</sup>, DONG Zhi-ying<sup>1</sup>, WU Ying-chun<sup>1</sup>, LI Yi-ming<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Jinchan Health Technology Co., Ltd., Shanghai 201900, China

**Abstract:** **Objective** To study the changes of chemical constituents and pharmacodynamics with different drying methods (sun-drying, 50℃ vacuum-drying, 50℃ and 80℃ heat-drying, freeze drying method) in *Bufonis Venenum*. **Methods** HPLC method and TLC method was established for studying the changes of chemical constituents from *B. Venenum* before and after being dried, and determine the inhibitory effect of dried samples on five different tumor cell lines proliferation by MTT assay. **Results** The *B. Venenum* processed by five different methods were different in character, while no significant differences in the types and content of chemical constituents; The total content of resibufogenin and cinobufagin was more than 6%, which was consistent with the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia; 50℃ and 80℃ heat-drying of *B. Venenum* showed more effective inhibitory effect than other dry methods. **Conclusion** The appearance of *B. Venenum* met the criterion of pharmacopoeia by sun-drying and 50℃ heat-drying method. Although the color of *B. Venenum* under the vacuum-drying and freeze drying method did not meet the requirements of Chinese Pharmacopoeia, the main effective components have a few changes.

**Key words:** *Bufonis Venenum*; process method; drying method; arenobufagin; telocinobufagin; bufotalin; cinobufotalin; bufalin; cinobufagin; resibufogenin

蟾酥 *Bufonis venenum* 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, 为我国传统名贵中药, 具有很高的医疗价值。《中国药典》2015

年版对蟾酥性状的规定是“呈扁圆形团块状或片状, 棕褐色或红棕色, 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”<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2017-11-23

基金项目: 中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目; 上海市自然科学基金项目(15ZR1441500); 上海市教委预算内项目(2016YSN09)

作者简介: 陈瀛澜(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (021)51322451 E-mail: cyl88669@163.com

\*通信作者 吴迎春(1982—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (021)51322207 E-mail: wuyingchun2013@163.com

李医明(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (021)51322191 E-mail: ymliu@163.com

药典中所规定的颜色是蟾酥鲜浆在日晒干燥下 5~8 d 左右, 蛋白质变性后才能达到的颜色。然而蟾酥鲜浆的采收季节都是在春夏季节, 气温较高, 加上南方多雨季节, 空气潮湿, 蟾酥鲜浆长时间放置很容易就会长霉变质, 蟾酥鲜浆从采集到加工, 原则上是干燥时间间隔越短越好<sup>[2]</sup>, 因而此方法不适合大批量蟾酥的加工干燥。

随着现代科技的发展, 对于中药材的干燥方法也在不断地改进, 如鼓风干燥、真空干燥、冷冻干燥等<sup>[3]</sup>。这些干燥方法能够在短时间内、较低温度下将新鲜的中药材干燥成饮片, 能够保证药材中的原有药效成分不被破坏。此外《中国药典》《日本药典》<sup>[4]</sup>及《韩国药典》<sup>[5]</sup>对蟾酥指标成分的规定也不一样, 《中国药典》规定脂蟾毒配基和华蟾酥毒基二者之和不低于 6.0%, 而日、韩药典规定脂蟾毒配基、华蟾酥毒基及蟾毒灵三者之和不低于 5.8%。这些标准并不一致, 国内仅注重华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量, 而日本、韩国更注重多种蟾毒配基成分的含量, 这提示在衡量蟾酥品质时有必要考察多种蟾毒配基的含量及比例。

通过前期研究<sup>[6]</sup>和文献调研<sup>[7-13]</sup>后发现, 蟾酥中很多的蟾毒配基类成分药理活性丰富且突出, 对其蟾毒配基类成分进行系统评价尤为重要。基于以上原因有必要对蟾酥鲜浆现代化加工干燥炮制而成的蟾酥中蟾毒配基类成分的变化情况以及药效学进行考察。本实验选择日晒干燥鲜浆, 与其他不同干燥温度做对比, 以蟾酥中有效的蟾毒配基类成分为指标, 采用 HPLC 法和 TLC 法, 对不同干燥条件制备的蟾酥中 7 种蟾毒配基类成分的含量进行测定, 并对不同干燥条件制得的蟾酥进行药效考察, 综合评价不同干燥方式对蟾酥药材及饮片质量的影响。有助于改进蟾酥炮制加工方法, 规范蟾酥加工工艺, 并为蟾酥在关于强心、抗肿瘤等方面的制剂开发和临床应用提供依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 Infinity 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; BT125D 电子天平, 德国赛多利斯公司; SK5200H 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; HEPA CLASS100 CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Thermo 公司; Delta series 生物安全柜, 美国 Labconco 公司; Eppendorf Centrifuge5810R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; IX 71 倒置显微镜,

日本 Olympus 公司; Spectra MAX190 酶标仪, 美国 MD 公司; QB-9006 恒温微孔板快速振荡器, 海口市其林贝尔仪器有限公司; XDS-500C 细胞计数仪, 上海蔡康光学仪器有限公司。

### 1.2 试剂

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、人神经胶质瘤 U87 细胞、人黑色素瘤 A375 细胞、人肺癌 A549 细胞、人卵巢癌 SKOV3 细胞均购自美国 ATCC 公司; 胎牛血清购自美国 HyClone 公司; RPMI-1640 培养基干粉购自美国 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Life Technologies 公司; 甲醇、乙醇、丙酮为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈为色谱纯, 购自德国默克公司。蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、沙蟾毒精、远华蟾毒精、华蟾毒它灵为鲜蟾酥中分离制备得到, 面积归一化法测定质量分数 (华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒它灵和华蟾毒它灵 > 98%, 沙蟾毒精 96.1%, 蟾毒灵 91.3%, 远华蟾毒精 94%), 鲜蟾酥样品于 2017 年 8 月采于上海崇明地区, 经上海中医药大学中药学院郭夫江教授鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufogargarizans* Cantor 耳后腺和皮肤腺分泌的白色浆液。

## 2 方法和结果

### 2.1 不同干燥方式蟾酥样品的制备

在蟾酥产地加工调研和文献分析的基础上, 采用以下 5 种干燥方式处理鲜蟾酥样品。每 100 克鲜蟾酥搅拌均匀后, 过 40 目铜筛, 平铺在干净的玻璃板上, 使其长 5 cm, 宽 5 cm, 高 1 cm, 为片状酥外观。分别干燥: ①日晒烘干 80 h, ② 80 °C 烘干 40 h, ③ 50 °C 烘干 60 h, ④ 50 °C 真空干燥 30 h, ⑤ 冷冻干燥 24 h。不同炮制干燥后的蟾酥外观见图 1。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液制备** 精密称取华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、华蟾毒它灵 12.5 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 精密吸取 1 mL 液体, 于 10 mL 量瓶中定容, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。最后对照品华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、蟾毒它灵、蟾毒灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、华蟾毒它灵溶液质量浓度为 0.05 mg/mL。再取适量对照品溶液配制成 0.005、0.01、0.025、0.05、0.10、0.25、0.50、1.0 mg/mL 系列质量浓度的溶液, 备用。

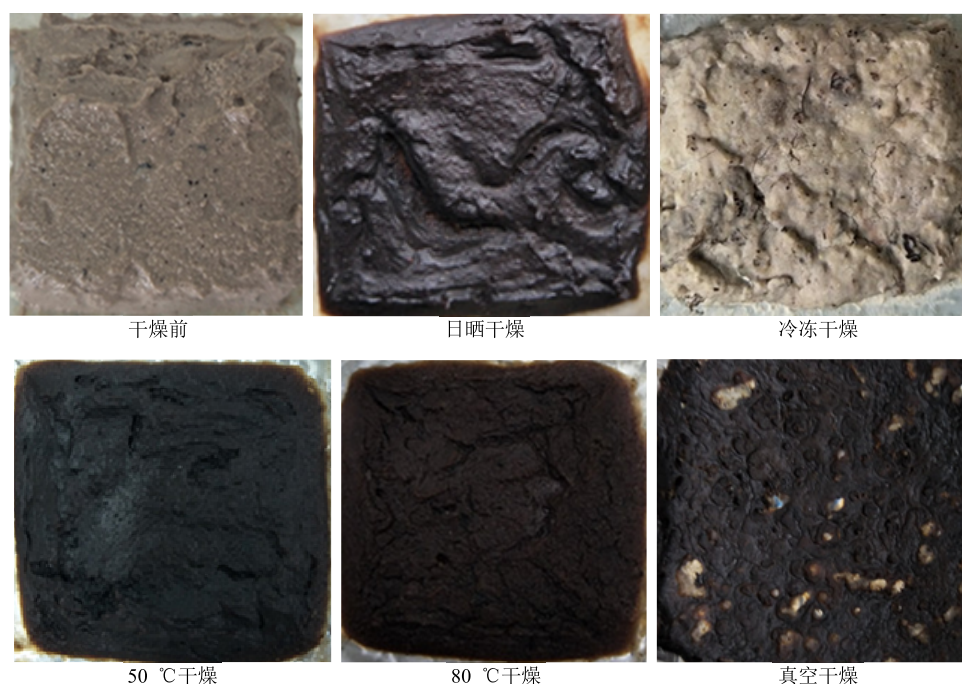


图 1 不同炮制干燥后的蟾酥外观

Fig. 1 Appearance of *B. Venenum* through different drying methods

**2.2.2 供试品溶液的制备** 分别精密称取蟾酥不同干燥品（日晒干燥品、50 °C 烘干品、80 °C 烘干品、50 °C 真空干燥烘干品、冷冻干燥品）细粉各  $(25.00 \pm 0.05)$  mg，置于具塞圆底烧瓶中，精密加入甲醇 20 mL，密塞，称定质量，置于水浴锅中，待甲醇微沸后，连续回流 60 min，放冷，甲醇补足减失质量，精密吸取上清液 1 mL 入内，0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过，即得。

### 2.3 不同干燥品中 7 种蟾毒配基类成分的测定

**2.3.1 测定华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量的液相色谱条件**<sup>[14]</sup> 色谱柱 Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)；流动相为乙腈-0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液；等度洗脱：0~20 min，50%乙腈；柱温为 40 °C；体积流量为 1 mL/min；进样量为 20  $\mu$ L。

**2.3.2 测定其他蟾毒配基类成分含量的液相色谱条件** 色谱柱 Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)；流动相乙腈-0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液；梯度洗脱：0~10 min，30%~35%乙腈；10~30 min，35%~40%乙腈；30~40 min，40%乙腈；柱温为 40 °C；体积流量为 1 mL/min，进样量为 20  $\mu$ L。

**2.3.3 方法学考察** 将“2.2.1”项下的不同质量浓度对照品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样 20  $\mu$ L，以样品质量浓度为横坐标 ( $X$ )，峰面积为纵坐标 ( $Y$ ) 进行线性回归，得沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它

灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基回归方程分别为  $Y=15\,711 X+7.973$ ,  $r=0.999\,8$ ;  $Y=7\,536 X+2.426$ ,  $r=0.999\,4$ ;  $Y=16\,429 X+18.11$ ,  $r=0.999\,2$ ;  $Y=12\,536 X-90.59$ ,  $r=0.999\,2$ ;  $Y=10\,754 X-9.102$ ,  $r=0.999\,1$ ;  $Y=12\,276 X-141.6$ ,  $r=0.999\,3$ ;  $Y=10\,603 X+104.34$ ,  $r=0.999\,1$ ; 7 种成分均在 0.005~1.0 mg/mL 线性关系良好。

将“2.2.1”项下的对照品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样 6 次，进样量 20  $\mu$ L，测得沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基峰面积 RSD 分别为 0.3%、0.3%、0.4%、1.2%、0.5%、0.7%、0.4%，表明仪器精密度良好。

精密称取同一样品（日晒干燥品）6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样，测得沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基质量分数 RSD 分别为 1.6%、2.4%、1.2%、0.6%、1.7%、2.7%、1.3%，表明该方法重复性良好。

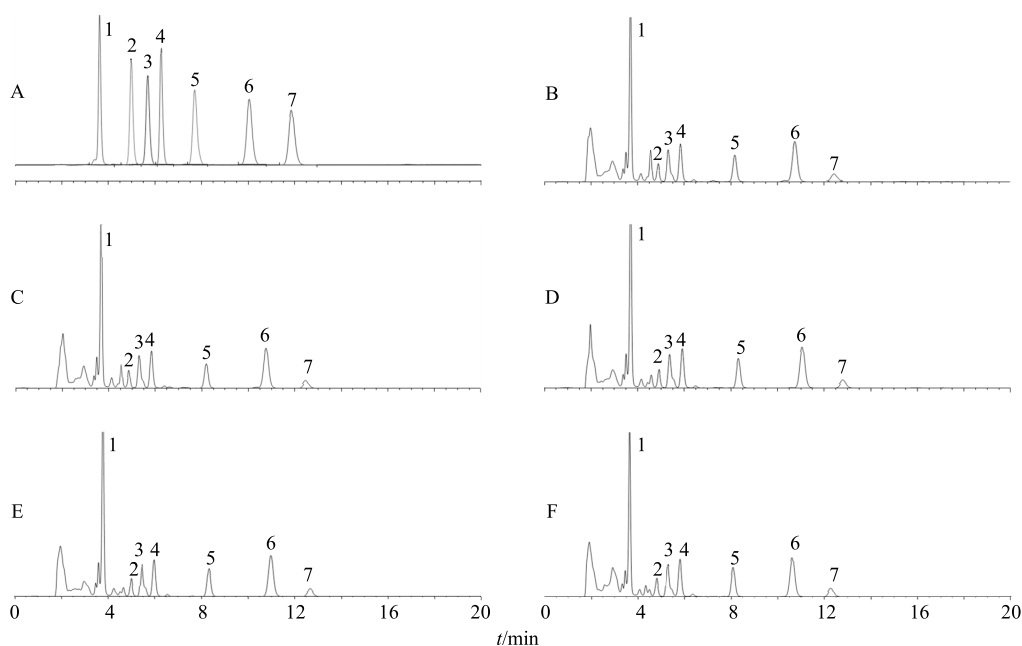
按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液（日晒干燥品）于 0、2、4、8、24 h 在“2.3.2”项色谱条件下测定，测得沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基峰面积 RSD 分别为 0.5%、0.4%、0.6%、1.6%、1.2%、

2.8%、0.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

取含量已知的日晒干燥品 50 mg，加入沙蟾毒精(115.10、76.74、38.37  $\mu\text{g/mL}$ )、远华蟾毒精(23.91、15.94、7.97  $\mu\text{g/mL}$ )、蟾毒它灵(23.95、15.97、7.98  $\mu\text{g/mL}$ )、华蟾毒它灵(35.71、23.81、11.91  $\mu\text{g/mL}$ )、蟾毒灵(37.24、24.83、12.41  $\mu\text{g/mL}$ )、华蟾酥毒基(76.70、51.13、25.56  $\mu\text{g/mL}$ )、脂蟾毒配基(19.36、9.68、4.84  $\mu\text{g/mL}$ )对照品溶液各 1 mL，在“2.3.2”项色谱条件下进样，测得沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基平均加样回收率分别为 100.25%、98.35%、102.11%、100.56%、101.73%、103.96%、98.56%，RSD 分别为 1.24%、2.04%、1.16%、2.41%、2.20%、2.70%、2.89%。

**2.3.4 蟾毒配基类成分含量 HPLC 分析** 分别采用《中国药典》2015 年版蟾酥含量测定方法和“2.3.2”项下方法测定蟾酥中 7 种蟾毒配基类成分含量(图 2、3)。从 2 种分析方法得到的结果来看现行的药典方法对华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的分离度较好，易于考察这 2 个成分的含量，而“2.3.2”项中的方法对于蟾酥中多种蟾毒配基类成分同时考察较好。采用“2.3.2”项方法测定不同干燥方式制备蟾酥样品中 7 种蟾毒配基的质量分数见表 1。由表 1 可以看出，单一比较华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量，冷冻干燥所得量最高，真空干燥所得量最低；比较总体蟾毒配基类成分含量，50  $^{\circ}\text{C}$  干燥所得量最高，80  $^{\circ}\text{C}$  干燥所得量最低。

**2.3.5 蟾毒配基类成分含量 TLC 分析** 采用《中国



A-混合对照品 B-日晒干燥 C-冷冻干燥 D-50  $^{\circ}\text{C}$  干燥 E-80  $^{\circ}\text{C}$  干燥 F-50  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥 1-沙蟾毒精 2-远华蟾毒精 3-蟾毒它灵 4-华蟾毒它灵 5-蟾毒灵 6-华蟾酥毒基 7-脂蟾毒配基，下图同  
A-bufadienolide standards B-sunshine dried C-freeze dried D-heated at 50  $^{\circ}\text{C}$  E-heated at 80  $^{\circ}\text{C}$  F-heated at 50  $^{\circ}\text{C}$  under the reduced pressure  
1-arenobufagin 2-telocinobufagin 3-bufotalin 4-cinobufotalin 5-bufalin 6-cinobufagin 7-resibufogenin, same as below

图 2 混合对照品和蟾酥炮制样品的 HPLC 图谱 (《中国药典》2015 年版方法)

Fig. 2 HPLC (Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition) spectrogram of *B. Venenum* prepared by different drying methods

药典》2015 年版中 TLC 法(附录 VI B)实验，吸取上述 12 种溶液(干燥炮制品 5 种，蟾毒配基类成分对照品 7 种)各 10  $\mu\text{L}$ ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:3:3)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，加热至斑点显色清晰。对照品和样品的 TLC 色谱图见图 4。

**2.4 MTT 法考察不同干燥品对不同肿瘤细胞增殖能力的影响**

**2.4.1 细胞培养** MDA-MB-231、U87、A375、A549、SKOV3 细胞培养于添加了 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中，置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中饱和湿度的条件下培养。稳定传 2~3 代后，选择处于对数生长期细胞用于后续实验。

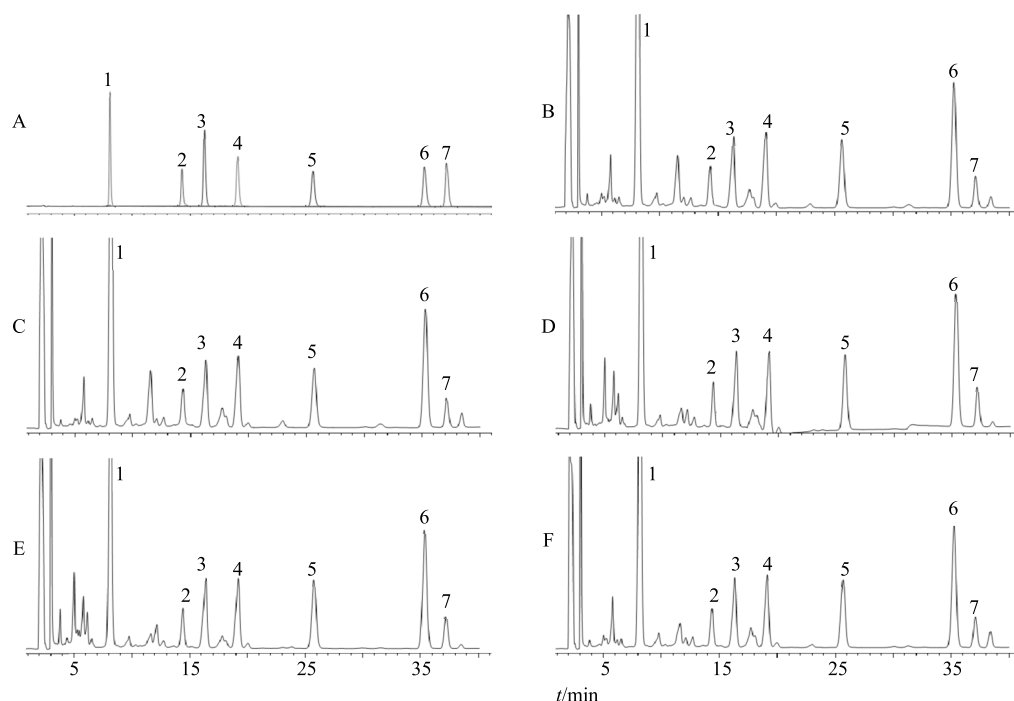


图 3 混合对照品和蟾酥炮制样品的 HPLC 图谱 (“2.3.2” 项方法)

Fig. 3 HPLC (“2.3.2” method) spectrogram of *B. Venenum* prepared by different drying methods

表 1 不同干燥方法制备蟾酥样品中 7 种蟾毒配基的质量分数

Table 1 Content of seven species of bufogenins of toad venom prepared by different drying methods

| 干燥方法       | 质量分数/% |       |       |       |       |       |       | 总含量    |
|------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|            | 华蟾酥毒基  | 脂蟾毒配基 | 蟾毒灵   | 蟾毒它灵  | 华蟾毒它灵 | 沙蟾毒精  | 远华蟾毒精 |        |
| 日晒干燥       | 5.113  | 0.968 | 2.483 | 1.597 | 2.381 | 7.674 | 1.594 | 21.810 |
| 冷冻干燥       | 5.515  | 1.329 | 2.808 | 1.609 | 2.242 | 8.760 | 1.876 | 24.139 |
| 50 °C 干燥   | 5.512  | 0.997 | 3.076 | 1.693 | 2.542 | 8.731 | 1.909 | 24.460 |
| 80 °C 干燥   | 5.168  | 1.047 | 2.957 | 1.534 | 2.231 | 7.157 | 1.242 | 21.336 |
| 50 °C 真空干燥 | 5.083  | 0.941 | 2.877 | 1.588 | 2.293 | 9.140 | 1.770 | 23.692 |

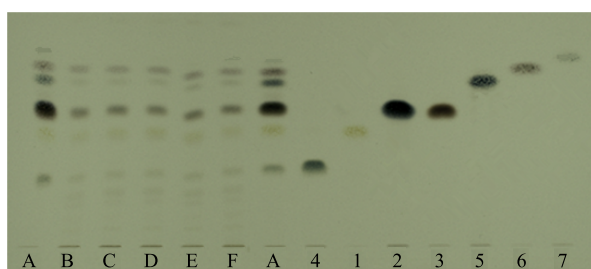


图 4 不同炮制干燥样品和对照品 TLC 图

Fig. 4 TLC of *B. Venenum* prepared by different drying methods

**2.4.2 样品处理** 称取蟾酥不同干燥品(日晒干燥品、50 °C 烘干品、80 °C 烘干品、50 °C 真空干燥烘干品、冷冻干燥品)细粉(100 mg),置于具塞圆底烧瓶中,加入甲醇 20 mL,密塞,置于水浴锅

中,待甲醇微沸后,连续回流 60 min,抽滤,滤液旋干,即得不同干燥蟾酥提取物。

**2.4.3 MTT 法考察不同炮制干燥的蟾酥提取物对 5 种肿瘤细胞增殖的影响** 肿瘤细胞悬液调节成密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,每孔接种 100  $\mu$ L 于 96 孔板中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜。选择 MTT 检测时间为 72 h。不同干燥蟾酥提取物以 1、2、5、10、20 ng/mL 剂量处理不同肿瘤细胞,孵育 72 h 后,每孔加入 5 g/L MTT (1×PBS 为溶剂)溶液 20  $\mu$ L,继续避光培养 4 h,弃上清,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,37 °C 摇床振摇 5~10 min 至其充分溶解,于酶标仪测得在 490 nm 波长下的吸光度(A),计算用不同蟾酥提取物不同质量浓度处理的各组细胞的细胞存活率。由表 2 可以看出,50 °C 和 80 °C 鼓风干燥所得的蟾酥提

表 2 不同干燥方法制备蟾酥样品对 5 种不同肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 值Table 2 IC<sub>50</sub> of five different tumor cells of *B. Venenum* prepared by different drying methods

| 干燥方法       | IC <sub>50</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> ) |      |       |       |       |
|------------|------------------------------------------|------|-------|-------|-------|
|            | MDA-MB-231                               | U87  | A375  | A549  | SKOV3 |
| 日晒干燥       | >100                                     | 9.22 | 16.10 | 4.93  | 13.22 |
| 冷冻干燥       | >100                                     | 5.97 | 20.20 | 10.02 | 16.89 |
| 50 °C 干燥   | 35.24                                    | 1.15 | 13.55 | 4.63  | 14.30 |
| 80 °C 干燥   | 29.65                                    | 2.78 | 12.94 | 3.84  | 12.30 |
| 50 °C 真空干燥 | >100                                     | 14.7 | 21.23 | 9.08  | 13.11 |

取物对 MDA-MB-231、U87、A375、A549 及 SKOV3 细胞的抑制效果相对其他干燥所得的蟾酥而言效果增强。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 3 讨论

蟾酥具有良好的强心作用和抗肿瘤活性，作为生产麝香保心丸、六神丸、蟾酥注射液等中成药的重要原料。目前蟾酥每年全国用量较大，年总需求量达到 5 t 多，而作为其来源的蟾蜍资源正日益减少。由于很多产地所产出的蟾酥达不到药典规定的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基之和不小于 6% 的要求，只能被作为不合格产品而废弃，种种原因导致蟾酥价格在逐年增长，制约了很多重要中成药的生产和临床使用。蟾酥鲜浆炮制加工成蟾酥成品过程中，如果方法不当、工艺不规范，则很有可能导致蟾酥发霉变质而造成严重的经济损失。

本实验选用上海崇明地区所产的蟾酥鲜浆，过筛处理后涂在玻璃板上，用传统的日晒方法与现代的鼓风干燥、真空干燥及冷冻干燥方法进行比较。从外观性状方面看，除冷冻干燥和 80 °C 鼓风干燥外，其他的干燥方法所制得的蟾酥颜色均符合药典的标准。冷冻干燥所得的蟾酥由于蛋白质未发生变性，所以保持了蟾酥鲜浆原有的白色；而 80 °C 鼓风干燥所得的蟾酥因为温度高、干燥速度快的原因，蛋白质变化不完全，所以呈淡褐色。

对不同干燥炮制方法制得的蟾酥中主要的 7 种蟾毒配基类成分进行了 HPLC 和 TLC 分析，发现现代的干燥炮制方法和传统的日晒干燥方法对这 7 种蟾毒配基类成分的影响不是很大，其中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基含量之和均大于 6%，符合《中国药典》2015 年版规定，而值得注意的是通过冷冻干燥

的蟾酥这两者之和大于其他的干燥方法。在 HPLC 分析过程中发现沙蟾毒精在蟾酥中所占比例要远大于其他的蟾毒配基类成分，认为对于蟾酥的质量评价不应该只局限于华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的考量，应将其他药效较好、含量较大的成分，如蟾毒灵、沙蟾毒精等蟾毒配基类成分一起综合考量<sup>[15-17]</sup>。通过 HPLC 可以看出，不同加工干燥的蟾酥中的某些微量不稳定的蟾毒配基类成分在保留时间为 5~10 min 有些变化，这些变化也能对蟾酥的临床药效产生一定的影响。TLC 检测方法中多个蟾毒配基类成分分离度良好，可以作为不同干燥方法和不同批次蟾酥的快速定性检测方法。

对于不同干燥炮制的蟾酥药效变化的考察发现，50 °C 和 80 °C 鼓风干燥的蟾酥对多种肿瘤细胞株具有较强的增殖抑制活性，而通过日晒和冷冻干燥方法所得的蟾酥对肿瘤细胞的抑制效果则有所降低，反过来说这些干燥方法所得的蟾酥细胞毒性也有所降低。蟾毒配基类成分中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基在其结构的 14、15 位之间含有 1 个三元含氧环，而该结构不稳定受热后容易开环生成对应的蟾毒它灵和蟾毒灵，有大量文献报道<sup>[18-22]</sup>蟾毒配基类成分蟾毒它灵和蟾毒灵的细胞毒性要远大于华蟾酥毒基和脂蟾毒配基。蟾酥目前在临床上主要的两大药效为强心和抗肿瘤作用<sup>[13,23]</sup>，那么对于不同的用药途径，蟾酥的炮制干燥方法也应有所选择，如用于生产麝香保心丸和六神丸这类强心的药物时，需要降低其细胞毒性，应选择日晒和冷冻干燥的炮制方法；如生产蟾酥注射液等抗肿瘤药物时，需保留其细胞毒性，应选择温度较高的鼓风干燥的方法。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 沈嘉茵, 袁旭江, 刘 波, 等. 蟾酥的采集加工及炮制研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 275-277.
- [3] 曲 婷, 陈两绵, 高慧敏, 等. 产地加工和炮制对蟾酥药材及饮片质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 63-67.
- [4] 日本药典 (药局方) [S]. 16 版. 2016.
- [5] 韩国药典, 第 10 版 (第 2 部分) [S]. 2002.
- [6] 陈瀛澜, 郭夫江, 吴迎春, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [7] 赵彦敏. 蟾酥化学成分及抗肿瘤活性筛选研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [8] 王浩天. 蟾酥中有效成分的提取分离及抗肿瘤效果的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.

- [9] 王 剑, 马宏跃, 丁安伟, 等. 10 种蟾蜍甾烯类化合物对宫颈癌细胞 Hela 的细胞毒性及构效关系分析 [J]. 中医药信息, 2012, 29(2): 8-12.
- [10] Ye M, Guo H, Guo H, *et al.* Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 838(2): 86-95.
- [11] Li B J, Tian H Y, Zhang D M, *et al.* Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufo* gargarizans [J]. *Fitoterapia*, 2015, 105(1): 7-15.
- [12] Toshihiko N, Yoshiaki K, Ayano Y A, *et al.* Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Chan Su [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(9): 1148-1152.
- [13] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3185-3189.
- [14] 裴月梅. 高效液相色谱法测定救心滴丸中的华蟾酥毒基和脂蟾毒配基 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 526-528.
- [15] Yue Q, Zhen H, Huang M, *et al.* Proteasome inhibition contributed to the cytotoxicity of arenobufagin after its binding with Na, K-ATPase in human cervical carcinoma hela cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159034.
- [16] Qiu D Z, Zhang Z J, Wu W Z, *et al.* Bufalin, a component in Chansu, inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *BMC Complem Altern Med*, 2013, 13(1): 185-196.
- [17] Shen S, Yi Z, Zhen W, *et al.* Bufalin induces the interplay between apoptosis and autophagy in glioma cells through endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(2): 212-224.
- [18] Gu W, Liu L, Fang F F, *et al.* Reversal effect of bufalin on multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma BEL-7402/5-FU cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(1): 216-222.
- [19] Han L, Wang H, Nan S, *et al.* Metabolites profiling of 10 bufadienolides in human liver microsomes and their cytotoxicity variation in HepG2 cell [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(10): 2485-2495.
- [20] Chu Q, Xu H, Gao M, *et al.* Liver-targeting resibufogenin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-*d*- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles for liver cancer therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11(1): 449-463.
- [21] Zhang D M, Liu J S, Tang M K, *et al.* Bufotalin from *Venenum Bufonis* inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 692(1/3): 19-28.
- [22] Dong Y, Yin S, Li J, *et al.* Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(4): 394-403.
- [23] 蒋洁君, 周 婧, 马宏跃, 等. 蟾酥对豚鼠离体心脏的毒性作用和物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 233-237.