

蟾酥抗肿瘤有效成分的活性追踪分离及急性毒性研究

于垂亮, 侯惠民*

上海医药工业研究院 药物制剂国家工程研究中心, 上海 201203

摘要: **目的** 从传统中药蟾酥中寻找抗肿瘤活性强而毒性低的化合物。**方法** 采用追踪分离的方式, 以体外肿瘤细胞生长抑制强度为活性指标, 同时结合小鼠急性毒性实验, 对蟾酥的主要化学成分进行初步研究。**结果** 采用活性追踪分离方式, 从蟾酥中分离得到具有抑制肿瘤细胞生长活性同时对小鼠急性毒性较低的化合物蟾毒它灵, 其对人非小细胞肺癌 A549 细胞具有较好的生长抑制作用, 小鼠 iv 给药的 LD₅₀ 约为蟾毒灵的 4 倍, 而且稳定性较好。**结论** 综合化合物的活性、毒性及稳定性等因素, 初步判断蟾毒它灵较其他同类化合物具有更好的抗肿瘤药物开发前景。

关键词: 蟾酥; 蟾毒它灵; 抗肿瘤; 急性毒性; 蟾毒灵

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0307-05

Bioassay-guided separation and acute toxicity evaluation of antitumor ingredient in *Bufo venenum*

YU Chui-liang HOU Hui-min

National Pharmaceutical Engineering and Research Center, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To obtain antitumor active compounds with lower toxicity from main ingredients of Chinese materia medica *Bufo venenum*. **Methods** Taking inhibition of *in vitro* tumor cells as active indexes, a bioassay-guided separation and toxicity evaluation in mice of ingredients in *Bufo venenum* were applied. **Results** Bufotalin was separated from *Bufo venenum* with significant inhibition and lower acute toxicity by active tracking method. The inhibitory effect on the proliferation of A549 was better, LD₅₀ of bufotalin by iv administration to mice is about four times of bufalin, and bufotalin is stable. **Conclusion** Integrated the activity, toxicity, and stability factors of the compounds, bufotalin from *Bufo venenum* will deserve further research than any other similar compounds in potential antitumor activity.

Key words: *Bufo venenum*; bufotalin; antitumor; acute toxicity; bufalin

蟾酥 *Bufo venenum* 为中华大蟾蜍 *Bufo bufo-gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 耳后腺分泌的白色浆液加工干燥而成的固体^[1], 蟾蜍及蟾酥在我国有着悠久的药用历史。蟾酥性温, 味甘、辛, 有毒, 具有解毒、止痛、抗肿瘤等多种功效^[2]。临床用于治疗恶性肿瘤、白细胞减少症、周围性面神经麻痹, 可用于止痛、麻醉、抗感染等。蟾酥用于治疗各种癌症, 有一定的攻毒抗癌、消肿止痛作用, 可用于肝癌、肠癌、白血病、皮肤癌等的治疗^[3-4]。

近年来, 关于蟾酥对肿瘤的治疗作用的报道屡见不鲜, 对蟾蜍及蟾酥抗肿瘤有效成分的研究主要

集中在两方面: 一方面是其水溶性成分, 主要为吡啶类生物碱; 另一方面主要为脂溶性成分, 主要是蟾蜍毒素及蟾毒配基等^[5]。从蟾酥中已分离并鉴定了数十种化合物, 并发现蟾毒灵对肿瘤细胞的生长抑制活性最强^[6]。在本实验室开展的相关研究中发现, 蟾毒灵的活性很强, 但是毒性也很大, 从蟾酥中寻找潜在的抗肿瘤候选化合物宜从活性、毒性等多方面综合考虑。

在天然活性化合物的分离研究中, 往往是分离和活性分两个阶段进行, 即在分离得到纯品后再进行活性测试, 存在易丢失活性成分及效率低等诸多弊端。而采用活性追踪分离的方法, 在分离的每一

收稿日期: 2010-06-21

基金项目: 国家重大科技专项 (2009ZX09103-385)

作者简介: 于垂亮 (1978—), 男, 山东青岛人, 助理研究员, 博士, 从事天然药物及药剂研究。Tel: (021)51320211 E-mail: yucl@nperc.com.cn

*通讯作者 侯惠民 院士 Tel: (021)51320211 E-mail: houhm@nperc.com.cn

个阶段对分离所得的各个部分进行活性评估,追踪其中活性最强的部分,这对于天然活性化合物的分离来说,是一种较好的方法^[7]。本研究主要结合肿瘤细胞生长抑制活性试验及小鼠急性毒性试验,开展对蟾酥的提取方法及活性部位的研究,并结合细胞生长抑制活性及小鼠急性毒性结果筛选具有开发应用前景的候选化合物,为其深入开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

岛津制备型高效液相(LC—8A 型泵,SPD—M10VAP 检测器,SCL—10VAP 控制器,SIL—10AP 自动进样器,FRC—10A 分步接收器);Shim-pack PREP-ODS(L)柱;岛津分析型高效液相,LC-20AT 泵,SPD-20A 紫外检测器,Class-vp 操作系统;Diamondsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);旋转薄膜蒸发器(上海申顺科技有限公司);Napco—6100 全自动 CO₂ 孵箱(杜邦公司);DG3022 型酶标仪(美国 Beckman 公司);Quattro Premier XE VA 液质联用仪(美国 Waters 公司);NMR System 500 核磁共振仪(美国 Varian 公司);FT-IR Spectrometer Spectrum 100 傅里叶红外光谱(美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.2 试剂

RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)(美国 Sigma 公司);蟾酥(批号 AK0605, 山东临沂爱康药业有限公司);蟾毒灵、蟾毒它灵(Sigma 公司);Cremophor EL(德国 BASF 公司),水为灭菌注射用水;其他试剂均为分析纯或色谱纯。

1.3 细胞

人非小细胞肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 BEL-7402、人胃癌细胞 SGC-7901(中国科学院上海细胞库)。

1.4 动物

昆明种小鼠,中国科学院上海实验动物中心提供,许可证号:SCXK(2004)-0015,体质量 18~22 g。

2 方法与结果

2.1 肿瘤细胞活性测定

采用 SRB 法^[8-9]。取对数生长期肿瘤细胞,用新鲜的 RPMI 1640 培养基配制成一定浓度的细胞悬液,按每孔 200 μL 接种于 96 孔板中,每孔加入 2 μL 不同质量浓度的样品溶液,37 °C 培养 72 h。离心弃

去上清。每孔细胞中加入预冷的 80%三氯醋酸 50 μL,置于 4 °C 固定 1 h,用水冲洗 5 次并空气干燥,每孔加入含 0.4%SRB 的 1%醋酸溶液 50 μL,并在室温静置 30 min,用 1%醋酸水清洗 4 次,除去未结合的游离 SRB 染料。每孔加入 150 μL Tris 溶液(10 mmol/L, pH 10.5)溶解蛋白结合染料,用酶标仪测定每孔在 520 nm 处的吸光度(A)值。各样品设置 3 个复孔,另设 3 个孔作为空白对照。计算抑制率^[10-11]。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白对照}} \times 100\%$$

2.2 蟾酥不同提取部位体外抗肿瘤活性

将蟾酥粉碎后,过 20 目筛,分别精密称取细粉 3 份,每份 15 g,分别按如下工艺提取:

(1)加 450 mL 去离子水,加热回流 1 h,滤过,滤渣再加去离子水 450 mL,加热回流 1 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至干,固形物得率 56.39%,编号 CS-1。

(2)加入 95%乙醇 150 mL,加热回流 1 h,滤过,滤渣再加 95%乙醇 150 mL,加热回流 1 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至干,固形物得率 43.46%,编号 CS-2。

(3)加入 95%乙醇 150 mL,同(2)操作;滤渣再加去离子水 450 mL,同(1)操作,合并乙醇提取液和水提取液,减压浓缩至干,固形物得率 76.11%,编号 CS-3。

上述 3 份提取物分别用水、50%甲醇、甲醇进行溶解试验,结果表明 CS-1 能溶于水,CS-2 溶于甲醇,CS-3 溶于 50%甲醇。对 3 种提取物进行 HPLC 分析,结果表明 CS-1 中主要为大极性成分,另含少量蟾毒灵等小极性成分;CS-2 既包含有 CS-1 的大极性成分,同时含有大量小极性成分。3 种样品分别用可溶溶剂配制样品溶液,考察各样品对 A549 细胞活性的影响,结果见图 1。3 种提取方法获得的样品对 A549 细胞活性均有较好的抑制作用,CS-2 活性最强。

2.3 CS-2 样品的初步分离与体外抗肿瘤活性及急性毒性考察

2.3.1 CS-2 样品的初步分离 将蟾酥药材用粉碎机粉碎成细小颗粒,称取 300 g 置 5 L 圆底烧瓶中,加入 3 L 95%乙醇,水浴加热回流 1 h,提取液滤过;滤渣再加 3 L 95%乙醇同上操作,共提取 3 次,合并滤液,40 °C 水浴旋转浓缩至约 50 mL,转移至 1 000 mL 梨形瓶中,再加入 400 mL 纯水、500 mL

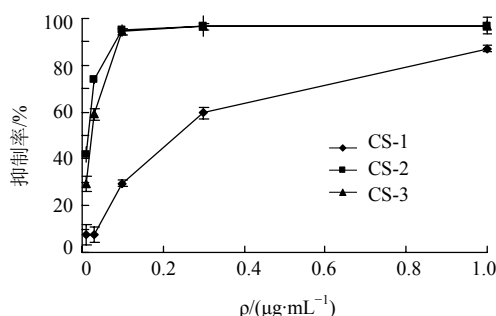


图 1 蟾酥不同提取部位对 A549 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of different extract fractions from *Bufonis Venenum* on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

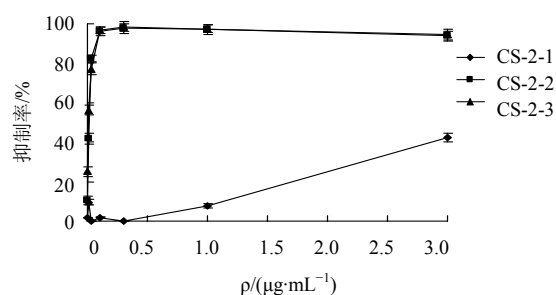


图 2 CS-2 不同分离部位体外对 A-549 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 *In vitro* inhibition of CS-2 different extract fractions on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

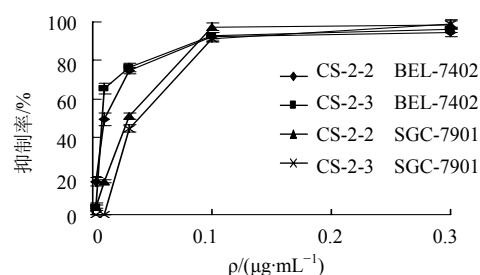


图 3 CS-2 不同分离部位体外对 BEL-7402 和 SGC-7901 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 *In vitro* inhibition of CS-2 different extract fractions on proliferation of BEL-7402 and SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

氯仿，盖塞振摇并超声 2 h，放置过夜分层，分取氯仿层；剩余水层再加入氯仿同上操作，共萃取 3 次。合并氯仿层减压浓缩至干，即得，固形物得率 30.8%。将萃取后的水层浓缩，固形物得率 13.21%，编号为 CS-2-1。将氯仿萃取层经制备液相以 75% 甲醇为流动相分离为两段，其中脂蟾毒配基、华蟾酥毒基和蟾毒灵 3 个化合物收集为一个流份，编号为 CS-2-3，固形物得率 17.12%。其余主要峰合并收集为 CS-2-2，固形物得率 13.5%。

2.3.2 CS-2 不同分离部位的肿瘤细胞生长抑制活性 经初步试验，CS-2-1 可溶于水，CS-2-2、CS-2-3 可溶于甲醇，因此分别用可溶溶剂将样品配成溶液进行 A549 人肺癌细胞株抗肿瘤活性测试，见图 2。结果表明 CS-2-2、CS-2-3 对 A549 细胞活性具有很好的抑制作用，为进一步考察其活性，用人肝癌细胞株 BEL-7402 和人胃癌细胞株 SGC-7901 进行活性测试，结果见图 3。

结果表明，CS-2-2、CS-2-3 对于不同的实体瘤细胞均具有较好的细胞生长抑制活性，在 100 ng/mL 时对细胞生长的抑制率均大于 90%；在 300 ng/mL 时 CS-2-2 对 2 种肿瘤细胞的抑制率均在 50% 以上，除对 SGC-7901 细胞的抑制率为 44.6% 外，CS-2-3 (300 ng/mL) 对其他两种细胞的抑制率也在 50% 以上；在 100 ng/mL 时 CS-2-2、CS-2-3 对 A549 和 BEL-7402 细胞的抑制率均达到 40% 以上。

2.3.3 CS-2 不同部位小鼠急性毒性试验 CS-2-2、CS-2-3 溶于适量表面活性剂 Cremophor EL 及乙醇，以生理盐水配成 1 mg/mL 溶液，0.2 μm 微孔滤膜滤过，控制 Cremophor EL 及乙醇在最终溶液中的量不超过 10 mg/mL。

分别以不同剂量将上述溶液尾 iv 给予小鼠，寻找最大耐受剂量。CS-2-2 以 5 mg/kg 给药，10 只小鼠（雌雄各半）给药后 10~20 min 出现扭体、呼吸困难等毒性反应，约 1 h 后完全恢复正常，连续观察两周均正常存活。在此剂量下每天给药 1 次，连续 1 周，每次给药均见上述毒性反应，但均存活且状态正常。

CS-2-3 以 2 mg/kg 给药，10 只小鼠（雌雄各半）给药后 10~20 min 出现扭体、呼吸困难、四肢痉挛等毒性反应，在给药 1 h 内死亡 4 只，其余在 2~3 h 完全恢复正常，连续观察两周均正常存活。降低 CS-2-3 剂量至 1.5 mg/kg，每天给药 1 次，连续 1 周，每次给药均出现扭体、呼吸困难等毒性反应，但均存活且状态正常。

上述初步试验结果表明 CS-2-2、CS-2-3 小鼠体内毒性存在较大差异，CS-2-2 的小鼠尾 iv 给药毒性明显小于 CS-2-3，两者体外肿瘤细胞生长抑制活性相当，因此选择 CS-2-2 进行深入研究。

2.4 CS-2-2 样品的分离制备、抗肿瘤活性试验及急性毒性试验

2.4.1 CS-2-2 样品的分离制备 以不同比例甲醇-水为流动相进行分离条件摸索, 结果表明以甲醇-水 (56:44) 为流动相, CS-2-2 各峰可实现较好分离, 按出峰先后分别收集, 流份分别减压浓缩至干。HPLC 分析结果表明编号 CS-2-2-2、CS-2-2-3、CS-2-2-6、CS-2-2-7 流份均为单一化合物, 质量分数在 95% 以上。其中 CS-2-2-7 在甲醇中可以析出针状结晶。以上 4 个化合物在甲醇中均可溶解。

2.4.2 各化合物对 A549 细胞的生长抑制活性 将 CS-2-2-2、CS-2-2-3、CS-2-2-6、CS-2-2-7 分别用甲醇配成适当质量浓度, 进行 A549 细胞活性测试, 见图 4。结果表明从 CS-2-2 中分离得到的 4 个化合物在 0.02、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 时均能较好抑制 A549 肿瘤细胞的生长。

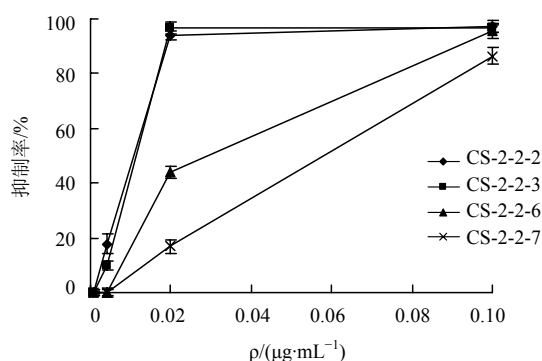


图 4 CS-2-2 中各化合物对人肺癌 A-549 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Inhibition of different compounds from CS-2-2 on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.3 CS-2-2 中各化合物的小鼠体内急性毒性试验 CS-2-2-2、CS-2-2-3、CS-2-2-6、CS-2-2-7 及蟾毒灵溶于适量表面活性剂 Cremophor EL 及乙醇, 以生理盐水配成 1 mg/mL 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 控制 Cremophor EL 及乙醇在最终溶液中的量不超过 10 mg/mL。

取 200 只小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 分成 20 组, 每组 10 只。根据预试验结果, 每个化合物设定 5 个剂量, 尾 iv 给药后观察 2 周, 利用 Bliss 计算软件计算化合物的半数致死剂量 (LD_{50})。结果见表 1。各化合物给药后, 随剂量增加, 小鼠即时产生活动减少、行动迟缓、呼吸急促、行走蹒跚等表现, 死亡最快可在给药后 2~3 min, 0.5 h 内

为死亡高峰。存活动物在 4 h 内完全恢复正常, 给药第 2 天及之后很少出现动物死亡。

表 1 CS-2-2 中各化合物小鼠尾 iv 给药的急性毒性
Table 1 Acute toxicity of compounds from CS-2-2 by iv administration to tail of mice

化合物	$\text{LD}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	95%置信区间/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
蟾毒灵	2.256	1.924~2.495
CS-2-2-2	7.858	6.959~8.540
CS-2-2-3	9.221	8.159~10.35
CS-2-2-6	8.684	7.718~9.582
CS-2-2-7	11.494	11.061~12.009

2.4.4 化合物 CS-2-2-6 的结构确证 综合活性试验结果和急性毒性试验结果, 化合物 CS-2-2-6 活性强、毒性低, 故对其进行结构鉴定。

化合物 CS-2-2-6: 白色粉末, ESI-MS m/z : 445, 提示相对分子质量为 444, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定其分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$ 。IR 显示 1 700 cm^{-1} 附近有吸收峰, 提示存在羰基, 3 500 cm^{-1} 提示存在羟基。 $^1\text{H-NMR}$ δ : 8.06 (1H, br d, H-31), 7.26 (1H, br s, H-27), 6.19 (1H, d, H-30), 5.52 (1H, t, H-16), 4.14 (1H, br s, H-2), 2.88 (1H, d, H-15), 1.87 (3H, s, H-34), 0.94 (3H, s, H-22), 0.76 (3H, s, H-20)。 $^{13}\text{C-NMR}$: 170.32 (C-33), 162.30 (C-29), 151.09 (C-27), 149.56 (C-31), 117.18 (C-18), 113.11 (C-30), 84.46 (C-11), 73.79 (C-16), 66.83 (C-2), 57.25 (C-15), 49.56 (C-12), 42.33 (C-9), 40.88 (C-13), 40.51 (C-17), 36.01 (C-4), 35.65 (C-10), 35.45 (C-5), 33.47 (C-3), 29.70 (C-6), 27.99 (C-1), 26.53 (C-7), 23.86 (C-22), 21.25 (C-8), 21.19 (C-14), 21.10 (C-34), 16.63 (C-20)。由 $^1\text{H-NMR}$ 上 δ_{H} 8.06, 7.26, 6.19 这 3 个烯氢信号, δ_{C} 162.3 的内酯羰基碳信号, δ_{C} 131.1、149.6、117.2、151.1 这 4 个不饱和碳信号, 可知化合物中有 α -吡喃酮结构。由 HMBC 知 C₂₇、C₃₁ 与 H₁₅ 有相关信号, C₁₅ 与 H₂₇、H₃₁ 有相关信号, C₁₈ 与 H₁₆ 有相关信号, 提示 α -吡喃酮结构连接在 15 位。结合质谱数据及 $^{13}\text{C-NMR}$ 给出的碳个数 26 个, 不饱和度为 9, 提示化合物为蟾毒配基类化合物。 δ_{H} 0.94, 0.76 分别为 22、20 号甲基氢信号, 由 HMBC 知 H₂₂ 与 C₄、C₆、C₁₀ 有相关信号, 提示 22 号甲基连接在 C₅ 上, H₂₀ 与 C₁₁、C₁₃、C₁₅ 有相关信号, 提示 20 号甲基连接在 C₁₂。 δ_{C} 170.3 的羰基碳信号以及 δ_{H} 1.87 的甲基氢信号提示分子中有乙酰氧基取代基, δ_{C} 73.8 提示 C₁₆ 连氧。

由 DEPT 知 δ_{C} 66.4 为连羟基碳原子, δ_{C} 84.5 为连羟基季碳信号, 提示该化合物 2 位和 11 位被羟基取代, 由以上数据推测该化合物为蟾毒它灵, 与已知文献报道的蟾毒它灵数据基本一致^[12], 故鉴定该化合物为蟾毒它灵。

3 讨论

本研究主要以对肿瘤细胞生长抑制作用为活性指标, 通过活性追踪方式寻找并分离蟾酥中活性化合物。由于蟾酥中所含化合物具有较大的毒性, 因此需从中筛选活性好、毒性低的化合物进行研究开发。经实验发现 CS-2-2 系列化合物均具有较好的肿瘤细胞生长抑制活性, 与文献报道的蟾毒灵活性相当^[13], 且小鼠单次尾 iv 给药的毒性比蟾毒灵低, 因此具有更大的开发优势和前景。

本研究测得蟾毒灵的 LD_{50} 为 2.256 mg/kg, 与文献报道^[14-15]基本相当。而将蟾毒它灵溶解在 50% 丙二醇的灭菌水溶液中, 经小鼠尾 iv 给药, 测得蟾毒它灵的 LD_{50} 为 4.13 (3.77~4.52) mg/kg^[14], 与本研究结果差异较大, 可能是所使用的溶剂不同而导致毒性差异。

在研究中发现, 化合物 CS-2-2-2、CS-2-2-3 在制备过程中存在不同程度的不稳定现象, 具体影响因素有待进一步研究确证和规避。本研究意在寻找和发现新的药物候选物, 因此在体外细胞生长抑制测试的基础上, 还需要考察其在动物体内的状况, 由于这类化合物具有较大的毒性, 考察其急性毒性大小的差异具有重大价值。本研究综合考虑了化合物的肿瘤细胞生长抑制活性、小鼠单次尾 iv 给药的急性毒性及稳定性等方面因素, 初步判断化合物蟾毒它灵较其他同类化合物活性强、毒性低, 更值得深入研究。

对蟾酥的抗癌成分的研究众多, 蟾毒它灵也很早就被发现, 有关蟾毒它灵对部分肿瘤细胞的生长抑制作用也有报道, 但是以往的研究多数认为蟾毒灵更值得开发, 通过本课题组的相关研究发现蟾毒它灵更值得关注。在蟾毒它灵的动物体内分布及体内外抗肿瘤药效评价^[16]中均显示了较理想结果。

本研究结合肿瘤细胞生长抑制活性测试方法追踪分离活性化合物, 这种模式与传统的天然产物研究先分离化合物再进行活性筛选的模式相比, 减少了盲目性, 提高了命中率, 可以快速、准确地获得

抗肿瘤活性化合物。同时细胞水平的活性测试方法快速、准确、灵敏、用量少、操作简便, 因此结合细胞活性测试的活性追踪分离活性化合物的方法是寻找相关活性化合物行之有效的好方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [2] 赵强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 4-附 7.
- [3] 程国华. 蟾酥质量研究及其药理临床应用进展 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 90-92.
- [4] 巩仔鹏, 陈涛, 邓李蓉, 等. 华蟾素治疗癌痛的临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 268-271.
- [5] 刘俊珊, 张冬梅, 栗原博, 等. 蟾酥及其活性成分抗肿瘤作用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 115-120.
- [6] Ye M, Qu G, Guo H, *et al.* Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 91(1/2): 87-98.
- [7] 姚新生. 天然药物化学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [8] 王兴旺, 胥彬. 抗癌药物筛选模型与筛选方法的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28(1): 39-43.
- [9] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [10] 黄银久, 宋宝安, 金林红, 等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [11] 王斌, 姜登钊, 李国强, 等. 桉柳抗肿瘤萜类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 697-701.
- [12] Verpoorte R, Phan Quoc K, Svendsen A B. Chemical constituents of Vietnamese toad venom collected from *Bufo melanostictus* Schneider. Part II. The bufadienolides [J]. *J Nat Prod*, 1980, 43(3): 347-352.
- [13] 张英. 蟾酥和蟾皮活性成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [14] 张莉, 白雪, 齐刚, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血清中蟾蜍灵浓度 [J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 523-525.
- [15] Yoshida S, Kamano Y, Sakai T. Studies on the surface anesthetic activity of bufadienolides isolated from Chan Su [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24(8): 1714-1717.
- [16] 于垂亮, 侯惠民. 蟾毒它灵体内外抗肿瘤作用的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1683-1686.