

学杂志, 2023, 43(6): 607-611.

[16] 刘匡一, 张凌云, 杨秀婷, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定关黄母颗粒中 12 种成分的含量[J]. 中成药, 2024, 46(5): 1430-1434.

[17] 何成军, 王 颖, 陈芳毅, 等. UPLC-MS/MS 法测定再造丸中的 4 种马兜铃酸类成分[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(4): 456-459.

[18] 杨 帅, 郑 林, 迟明艳, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定

阿胶中 18 种核苷、游离氨基酸的含量[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2140-2146.

[19] 李均艳, 李舒琪, 刘 辉, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定排石合剂中 10 个特征成分含量[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(12): 2090-2097.

[20] 曾 艳, 康宁芳, 唐 超, 等. UPLC-MS/MS 同时测定舒肝宁注射液中 10 个成分的含量[J]. 中药材, 2023, 46(10): 2523-2527.

野生中华大蟾蜍所产蟾酥中强心甙含量与其年龄、体质量的关系研究

沈丹萍, 姜 鹏, 詹常森*
(上海和黄药业有限公司 & 上海中药固体制剂创新工程技术研究中心, 上海 201401)

摘要: **目的** 考察野生中华大蟾蜍所产蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量与其年龄、体质量的关系。**方法** 动物鉴定年龄后按体质量和年龄分组, 制成蟾酥。HPLC-Q-TOF-MS 法分析蟾酥物质基础, 并对其进行主成分分析和正交偏最小二乘判别分析, HPLC 法测定强心甙含量。**结果** 2~3 龄动物所产蟾酥物质基础与其他年龄动物所产的存在差异, 日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基是其差异性成分。在体质量 40~60 g 范围内, 3 龄动物所产蟾酥中 2020 年版《中国药典》指标成分(蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基)总含量最高, 2~4 龄动物所产蟾酥中 5 种强心甙总含量最高, 而日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量分别在>100 g 5 龄、>100 g 4 龄动物所产蟾酥中最高。**结论** 本实验揭示了野生中华大蟾蜍体质量、年龄与强心甙含量的关系, 为提高蟾酥质量提供了参考, 也为其他两栖类动物的养殖与推广提供了思路。

关键词: 野生中华大蟾蜍; 蟾酥; 强心甙; 年龄; 体质量; 物质基础

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2344-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2025. 07. 034

蟾酥具有解毒、止痛、开窍醒神功效^[1], 广泛应用于一百余种中成药, 临床上可用于宫颈癌、食管癌、肝癌、肺癌等疾病的治疗^[2-8], 它含有蟾蜍内酯类、吲哚类生物碱、甾醇类成分^[9-11]。其中, 抗恶性肿瘤的主要活性物质是强心甙, 以日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、远华蟾蜍精、华蟾毒他灵为代表^[12-16]。

蟾酥最主要的基原为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor, 国家林业和草原局发布了《关于规范禁食野生动物分类管理范围的通知》^[17]、《全国林下经济发展指南(2021—2030 年)》和《林草中药材产业发展指南》^[18], 明确允许以药用为目的发展其野生抚育养殖模式。本实验以野生中华大蟾蜍为对象, 固定采收时间、地点和加工方式, 采用跖骨年龄测定法判定年龄后制成蟾酥, 考察其所含强心甙(日蟾蜍他灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基)含量与其年龄、体质量的关系, 以期确定为该动物野生抚育模式生长周期和最佳采收期提供依据, 同

时也为其他两栖类动物的人工抚育和人工养殖提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent G6530 Q-TOF 高分辨四级杆-飞行时间质谱仪、Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B. 07.00 软件(美国 Agilent 公司); SK7200H 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); ML204T/02、XSR205DU 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂 蟾毒灵(批号 111981-201501, 纯度 99.2%)、华蟾酥毒基(批号 110803-201807, 纯度 99.6%)、脂蟾毒配基(批号 110718-201809, 纯度 98.0%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 日蟾蜍他灵(批号 8882, 纯度≥98.0%)、蟾毒它灵(批号 8881, 纯度≥98.0%)对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。色谱纯乙腈(德国默克公司); 色谱纯磷酸、甲酸及分析纯甲醇(国药集

收稿日期: 2025-02-08

作者简介: 沈丹萍(1984—), 女, 硕士, 高级工程师, 从事质量标准研究。E-mail: dpshen2019@163.com

* 通信作者: 詹常森(1968—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事新药开发及其活性成分质量标准研究。E-mail: zhanchangsen@shpl.com.cn

团化学试剂有限公司)；超纯水（由 Milli-Q 超纯水处理系统制备）。

1.3 药材 蟾酥均来源于中华大蟾蜍（产地江苏徐州，雄性），经南京师范大学计翔教授鉴定为正品。参照文献

[19] 报道鉴定年龄后，按体质量和年龄分组，每个样本选择同龄同体质量范围 20~25 只动物，取其耳后腺白色浆液，置于同一块光滑塑料板上阴干，即得 2 mm 左右的蟾酥，共制备 26 批，具体见表 1。

表 1 蟾酥信息

野生中华 大蟾蜍 体质量/g	野生中华 大蟾蜍 年龄/年	编号	含量/%						2020 年版《中国药典》 指标成分总量
			日蟾毒它灵	蟾毒它灵	蟾毒灵	华蟾酥毒基	脂蟾毒配基	5 种强心甙总量	
40~60	1	S1	1.20	1.71	1.93	5.09	2.50	12.44	9.52
		S2	1.91	2.40	2.05	5.11	2.18	13.66	9.35
	2	S3	1.66	1.88	2.57	7.02	2.92	16.06	12.52
		S4	1.39	1.62	2.43	7.72	3.32	16.49	13.48
	3	S5	1.30	1.76	2.75	7.04	4.01	16.87	13.81
		S6	1.23	1.56	2.59	7.30	3.60	16.28	13.49
	4	S7	1.28	1.89	2.53	6.37	3.65	15.72	12.55
	5	S8	2.05	1.62	2.22	6.34	2.65	14.87	11.21
	平均含量/%		1.50	1.81	2.38	6.50	3.10	15.30	11.99
60~80	1	S9	1.46	2.03	2.30	6.13	1.96	13.88	10.39
	2	S10	1.72	2.26	2.36	6.51	2.21	15.07	11.09
		S11	1.70	2.43	2.51	6.58	2.10	15.31	11.19
	3	S12	1.54	2.15	2.45	6.50	2.96	15.59	11.90
		S13	1.76	2.40	2.45	7.16	2.47	16.24	12.08
	4	S14	2.09	2.04	2.62	6.89	3.16	16.81	12.68
		S15	1.75	2.54	2.60	7.25	2.28	16.41	12.12
	5	S16	1.44	1.24	2.39	7.46	2.28	14.81	12.13
	平均含量/%		1.68	2.14	2.46	6.81	2.43	15.52	11.70
80~100	2	S17	1.87	2.37	2.46	7.08	1.88	15.66	11.42
		S18	2.04	2.35	2.62	7.65	1.81	16.46	12.07
	3	S19	1.57	2.96	2.55	6.54	2.15	15.77	11.24
	4	S20	1.66	1.68	2.77	7.46	2.17	15.74	12.40
	平均含量/%		1.79	2.34	2.60	7.18	2.00	15.91	11.78
>100	2	S21	1.76	2.77	2.31	6.11	1.44	14.39	9.86
	3	S22	1.99	2.80	2.38	6.31	1.43	14.90	10.12
	4	S23	1.51	3.50	2.88	6.38	2.46	16.74	11.73
	5	S24	2.36	1.44	2.42	7.06	1.89	15.17	11.37
	6	S25	1.14	2.12	2.49	7.07	2.63	15.45	12.19
	7	S26	1.17	1.91	2.43	7.29	2.37	15.16	12.09
	平均含量/%		1.66	2.42	2.49	6.70	2.04	15.30	11.23

2 方法

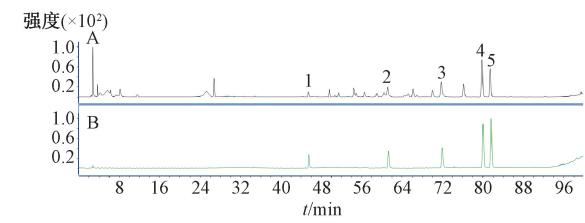
2.1 物质基础分析 HPLC-Q-TOF-MS 分析条件、对照品溶液制备、供试品溶液制备参照文献 [20] 报道，采用 Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B. 07.00 软件在正离子模式下对 26 批质谱数据进行处理，Agilent MassHunter Profinder B. 06.00 软件进行提取，并生成检测到的离子表格，包括保留时间、相对分子质量及离子强度。离子筛选过滤参数为保留时间 2~100 min；相对分子质量 m/z 100~1 000。

2.2 含量测定 色谱条件、对照品溶液制备、供试品溶液制备参照文献 [21] 报道，外标法计算 26 批药材中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量。

3 结果

3.1 多元统计分析 正离子模式下总离子流质谱图见图 1。采用 SIMCA 13.0 软件，以 26 批药材离子强度为变量，UV 进行数据归一化处理后自动拟合模型，进行主成分分析，得分图见图 2，可知各批药材分为 3 类，第 1 类 S1、S2、S9，第 2 类 S3~S6、S10~S14、S17~S19、S21、S22，第 3 类 S7、S8、S15、S16、S23~S26，并且第 1 类全部为 1 龄蟾蜍，第 2 类全部为 2、3 龄蟾蜍，第 3 类为 4~7 龄蟾蜍，表明 2、3 龄动物所产蟾酥的聚集度较高，其他年龄动物所产者较分散。

在主成分分析基础上，将 2、3 龄动物作为一组，其他年龄动物作为另一组，采用 SIMCA 13.0 软件进行正交偏最小二乘判别分析，结果见图 3，可知 2 组区分情况良好。再



注：A 为供试品，B 为对照品。

1. 日蟾毒它灵 2. 蟾毒它灵 3. 蟾毒灵 4. 华蟾酥毒基
5. 脂蟾毒配基

图 1 蟾酥 HPLC-Q-TOF/MS 总离子流色谱图 (正离子模式)

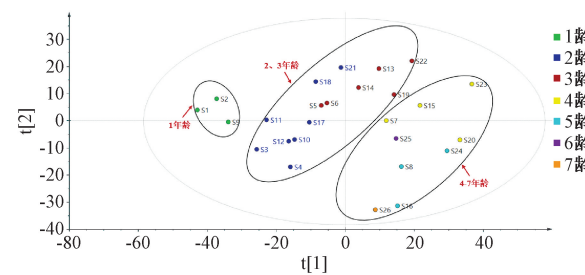
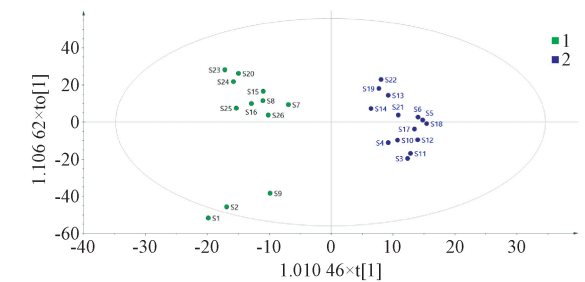


图 2 26 批蟾酥主成分分析得分图

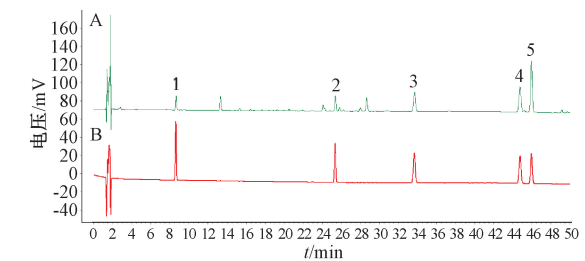
以变量重要性投影值 (VIP 值) >1 为标准, 结合对照品比对, 发现日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基为差异性成分, 其 VIP 值分别为 2.40、2.56、1.58、1.63、2.58。



注：绿色为 1、4~7 龄蟾蜍，蓝色为 2~3 龄蟾蜍。

图 3 26 批蟾酥正交偏最小二乘判别分析得分图

3.2 含量测定 结果见表 1、图 4。



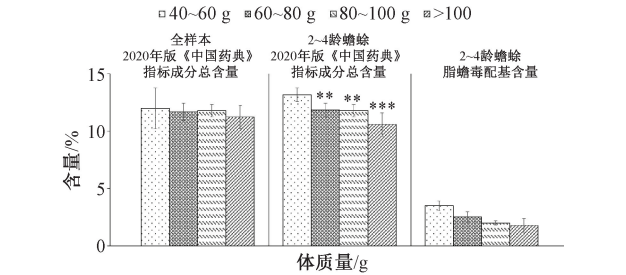
注：A 为供试品，B 为对照品。

1. 日蟾毒它灵 2. 蟾毒它灵 3. 蟾毒灵 4. 华蟾酥毒基
5. 脂蟾毒配基

图 4 各强心甙 HPLC 色谱图

3.2.1 变化规律

3.2.1.1 体质量 蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基为 2020 年版《中国药典》指标成分, 考察动物体质量与三者总含量的关系, 结果见图 5。由此可知, 40~60 g 体质量动物所产蟾酥中总含量最高, 为 (11.99±1.78)%, 其中 2~4 龄的达 (13.17±0.59)%, 并且整体上呈现体质量越高而总含量越低的趋势。



注：与 40~60 g 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 野生中华大蟾蜍体质量与 2020 年版《中国药典》指标成分总含量的关系

3.2.1.2 年龄 考察同一体质量范围动物年龄与 2020 年版《中国药典》指标成分总含量的关系, 结果见图 6。由此可知, 40~60 g 3 龄动物所产蟾酥中总含量最高, 平均值为 13.65%, 并且在 40~60、60~80 g 体质量范围内均呈现 1~3 龄逐渐升高、3~5 龄逐渐降低的趋势, 见图 6。

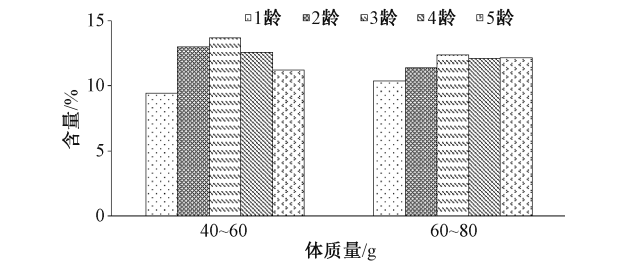


图 6 野生中华大蟾蜍年龄与 2020 年版《中国药典》指标成分总含量的关系

另外, 不同年龄范围动物与单个 2020 年版《中国药典》指标成分含量之间也存在一定规律, 见图 7。由图 7A 可知, 在 40~60 g 动物所产蟾酥中蟾毒灵、脂蟾毒配基含量均呈现 1~3 龄升高、3~5 龄降低的趋势, 而华蟾酥毒基含量在 2 龄动物所产蟾酥中最高, 之后随着年龄增加而降低。由图 7B 可知, 在 60~80 g 动物所产蟾酥中华蟾酥毒基含量随着年龄增加而升高, 脂蟾毒配基含量呈现 1~3 龄升高、3~5 龄降低的趋势, 蟾毒灵含量呈现 1~4 龄升高、5 龄降低的趋势。由图 7C 可知, 在 >100 g 动物所产蟾酥中, 蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量在 2~4 龄中均呈现随着年龄增加而升高的趋势。

3.2.2 强心甙总含量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量 考察动物体质量与强心甙总含量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量的关系, 结果见图 8。由图 8A 可知, 40~60 g 2~4 龄动物所产蟾酥中强心甙总含量最高, 为 (16.28±0.43)%, 并且

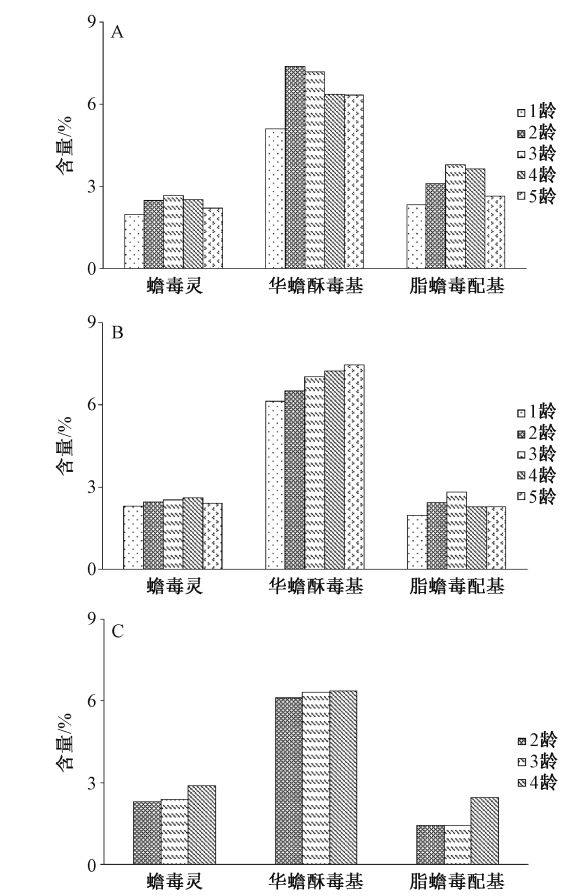


图 7 野生中华大蟾蜍年龄与单个 2020 年版《中国药典》指标成分含量的关系

总体上呈现随着体质量增加而降低的趋势。由图 8B 可知，日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量在 2~4 龄动物中均随着体质量增加而升高。

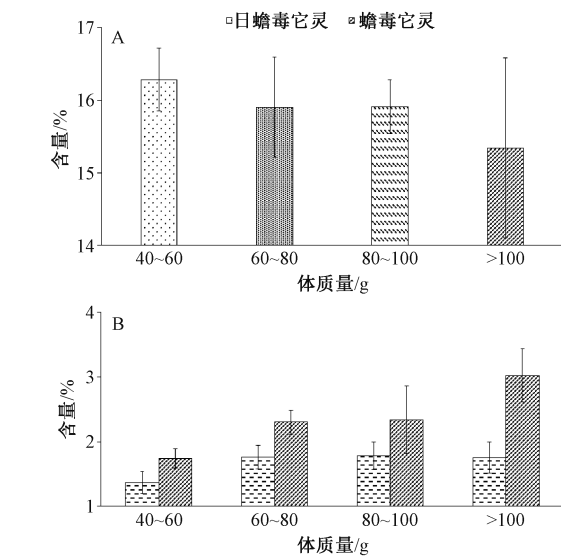


图 8 野生中华大蟾蜍体质量与强心甙总含量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量的关系

再考察同一体质量范围动物年龄与强心甙总含量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量的关系，见图 9。由图 9A 可知，

40~60、60~80 g 3 龄动物所产蟾酥中强心甙总含量最高，并且均呈现 1~3 龄升高、3~5 龄降低的趋势。由图 9B 可知，在 40~60 g 1~3 龄动物所产蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量均随着年龄增加而降低，而在 60~80 g 1~3 龄动物所产蟾酥中降低。

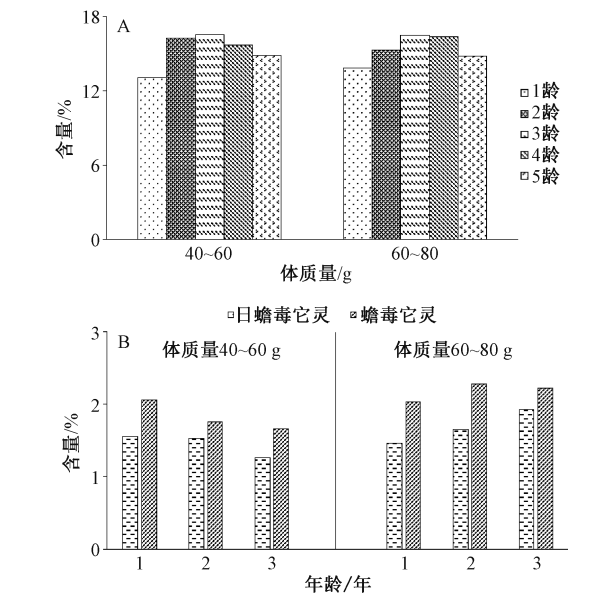


图 9 野生中华大蟾蜍年龄与强心甙总含量及日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量的关系

另外，日蟾毒它灵含量的最大值出现在>100 g 5 龄动物中，为 2.36%；蟾毒它灵含量的最大值出现在>100 g 4 龄动物中，为 3.50%，见表 1。

4 讨论与结论

HPLC-Q-TOF-MS 分析结果显示，2、3 龄野生中华大蟾蜍物质基础与其他年龄的存在差异，日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基这 5 种强心甙是其差异性化合物。

含量测定结果显示，2~4 龄野生中华大蟾蜍所产蟾酥中 2020 年版《中国药典》指标成分（蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基）总含量随着其体质量增加而降低；40~60、60~80 g 动物所产者在 1~3 龄升高，4 龄开始呈现降低趋势，而 40~60 g 3 龄动物所产者最高，表明它在自然生长过程中，上述指标成分总含量不随着其体质量和年龄增加而升高。在 40~60 g 2~4 龄动物所产蟾酥中，5 种强心甙总含量最高，并且总体上呈现随着其体质量增加而降低的趋势；日蟾毒它灵、蟾毒它灵含量均随着其体质量增加而升高，而脂蟾毒配基含量恰好相反。另外，在不同体质量范围内动物所产蟾酥中日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基含量随着其年龄的变化规律不一致。

综上所述，本实验阐明了野生中华大蟾蜍体质量和年龄与其所产蟾酥中强心甙的关系，一方面为该动物野生抚育产出高质量药材提供了基础，为优化其养殖提供了新方向；另一方面，为其他两栖类动物的养殖与推广提供了新思路。

参考文献:

[1]

国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020; 401.

[2]

田 园, 杨沛刚, 檀碧波, 等. 蟾酥注射液联合阿帕替尼治疗晚期胃癌患者的疗效[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(18): 2583-2586.

[3]

李换男. 基于 AKT 通路研究蟾酥内酯对宫颈癌细胞的影响及其分子机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.

[4]

Ma X C, Ding H Q, Shi J D, *et al.* Cinobufacini from the skin of *Bufo bufo gargarizans* induces apoptosis, possibly *via* activation of the Wnt/ β -catenin pathway, in human osteosarcoma cells[J]. *Nat Prod Commun*, 2018, 13 (2): 201-204.

[5]

王志美, 徐忠伟, 王佳宝, 等. 蟾酥活性成分协调索拉非尼通过下调 Akt/NF- κ B 信号途径抑制肝癌 HepG2 细胞生长[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(11): 1510-1516.

[6]

Ren W, Luo Z Q, Pan F L, *et al.* Integrated network pharmacology and molecular docking approaches to reveal the synergistic mechanism of multiple components in *Venenum Bufonis* for ameliorating heart failure[J]. *Peer J*, 2020, 8: e10107.

[7]

Tian L N, Li Y Z, Xu Y L, *et al.* Cinobufagin, a bufadienolide from traditional Chinese medicine *Bufo bufo gargarizans* CANTOR, inhibits PC3 cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2019, 6(2): 175-183.

[8]

王海娟, 刘 青, 陈文星. 蟾酥注射液治疗鲍曼不动杆菌重症肺炎的临床疗效[J]. 中国药物经济学, 2023, 18(5): 65-68.

[9]

应金琴, 杨 明, 张普照, 等. 蟾酥的炮制历史沿革、化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3529-3539.

[10]

黄东宇, 杨璐铭, 钟映琪, 等. 蟾酥活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40 (1): 124-136.

[11]

邓 莎, 李梦园, 武小玲, 等. 蟾酥化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(3): 884-890.

[12]

喻昌燕, 孟令杰, 姜 念, 等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1206-1220.

[13]

历帅帅, 李鹏飞, 任萃姣, 等. 网络药理学结合指纹图谱与多元统计分析预测蟾皮质量标志物[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1272-1278.

[14]

Zhan X, Wu H, Wu H, *et al.* Metabolites from *Bufo gargarizans* (Cantor, 1842): A review of traditional uses, pharmacological activity, toxicity and quality control[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112178.

[15]

Qi J, Zulfiker A H M, Li C, *et al.* The development of toad toxins as potential therapeutic agents[J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(8): 336.

[16]

李时超, 陈 腾, 秦凤凤, 等. 基于网络药理学和分子对接研究华蟾素治疗胃癌的作用机制[J]. 中成药, 2023, 45(10): 3475-3482.

[17]

国家林业和草原局. 关于印发《全国林下经济发展指南(2021-2030 年)》的通知: 林改发 [2021] 108 号[A/OL]. (2021-11-30) [2024-10-09]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengce-ku/2021-12/04/content_5655829.htm.

[18]

国家林业和草原局办公室. 关于印发《林草中药材产业发展指南》的通知: 办改字 [2022] 7 号[A/OL]. (2022-02-24) [2024-10-09]. <https://www.forestry.gov.cn/main/4461/20220613/160734957932829.html>.

[19]

梁晖辉, 姜 鹏, 高子阳, 等. 野生中华大蟾蜍种群年龄结构及体重变化规律研究[J]. 中药材, 2024, 47 (10): 2415-2420.

[20]

姜 鹏, 高子阳, 詹常森. 基于蟾酥品质评价的我国中华大蟾蜍资源分布特征[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (11): 2924-2931.

[21]

周成美, 胡晶红, 任 鑫, 等. 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[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(11): 1846-1856.