

牛黄及代用品中胆汁酸类成分指纹图谱及含量测定研究^{*}

胡晓茹¹, 孙磊¹, 傅欣彤², 王明娟¹, 戴忠^{1**}, 马双成^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京市药品检验所, 北京 102206)

摘要 目的: 建立牛黄及代用品中胆汁酸类成分的指纹图谱, 并对甘氨酸、牛磺胆酸、胆酸和去氧胆酸进行定量研究。**方法:** 采用 HPLC-ELSD 联用技术, 使用 Symmetryshield™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 以 0.2% 甲酸水溶液 (含 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵) 为流动相 B, 梯度洗脱 (0~5 min, 2%A → 35%A; 5~12 min, 35%A → 37%A; 12~23 min, 37%A; 23~45 min, 37%A → 50%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, ELSD 漂移管温度 102 °C, 氮气 1.9 mL · min⁻¹, 进行指纹图谱分析和上述甘氨酸等 4 个成分的含量测定; 采用电喷雾离子源进行正离子模式扫描, 对牛黄指纹图谱中 8 个特征峰进行指认; 并利用 Chrompattern 软件对测试所得到的色谱数据进行主成分分析, 利用国家药典委员会相似度评价软件进行相似度评价。**结果:** 建立了牛黄及代用品的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 并指认了甘氨酸、牛磺胆酸、胆酸、甘氨酸去氧胆酸、牛磺去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸 8 个特征峰; 牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄中胆汁酸类成分基本相同, 但含量存在差异; 指纹图谱经相似度和主成分分析, 均可用于区分牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄。**结论:** 本法可为牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄的质量控制提供有效的技术支持。**关键词:** 牛黄; 体外培育牛黄; 人工牛黄; 指纹图谱; 甘氨酸; 牛磺胆酸; 胆酸; 去氧胆酸

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 04-0648-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.04.13

Study on fingerprint and quantitative analysis of Calculus Bovis and its substitutes^{*}

HU Xiao-ru¹, SUN Lei¹, FU Xin-tong², WANG Ming-juan¹,
DAI Zhong^{1**}, MA Shuang-cheng^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

Abstract Objective: To establish the fingerprints of Calculus Bovis and its substitutes by HPLC-ELSD and simultaneously perform the quantitative analysis of glycocholic acid, taurocholic acid, cholic acid, and deoxycholic acid. **Methods:** The characteristic fingerprints and quantitative analysis were performed by HPLC-ELSD. The characteristic peaks were identified by LC-MS. The samples were separated on a Symmetryshield™ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and eluted with acetonitrile (A) and the solution containing 10 mmol · L⁻¹ ammonium

* 质检总局“双打”中药品检验检测技术方法研究子课题 (No.2012104008-04); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金 (No.2014-A1)

** 通信作者 戴忠 Tel: (010) 67095150; E-mail: daizhong@nifda.org.cn

马双成 Tel: (010) 67095887; E-mail: masc@nifda.org.cn

第一作者 Tel: (010) 67095150; E-mail: huxru2008@126.com

acetate and 0.2% formic acid (B) in a gradient elution (0–5 min, 2%A → 35%A; 5–12 min, 35%A → 37%A; 12–23 min, 37%A; 23–45 min, 37%A → 50%A) at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The temperature of drift tube was 102°C and the gas flow rate was $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Eight characteristic peaks in the fingerprints were identified by MS with electrospray ionization (ESI) source in the positive ion mode. The HPLC–ELSD fingerprints of Calculus Bovis and its substitutes were compared by principal component analysis and similarity analysis. **Results:** The characteristic fingerprints of Calculus Bovis and its substitutes were established. Eight characteristic peaks in the fingerprints were identified as glycocholic acid, taurocholic acid, cholic acid, glycochenodeoxycholic acid, taurodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid. The fingerprint analysis result showed that Calculus Bovis and its substitutes had almost the same ingredients but with different content. Calculus Bovis and its substitutes were obviously distinguished by principal component analysis and similarity analysis. **Conclusion:** The established fingerprint can be served as an effective approach for quality control of Calculus Bovis and its substitutes.

Keywords: Calculus Bovis; *in vitro* cultivated Calculus Bovis; artificial Calculus Bovis; fingerprint; glycocholic acid; taurocholic acid; cholic acid; deoxycholic acid

牛黄为牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的干燥胆结石,是一种常用的名贵中药,具有清心、开窍、凉肝、豁痰的功效^[1]。由于牛黄功效显著,在中药成方制剂中被广泛应用,有 650 多种制剂含有牛黄,其中临床急重症病用药品种就有 43 种,包括安宫牛黄丸、牛黄清心丸、大活络丸等^[2]。由于牛黄的需求量较大且资源紧缺,为了缓解临床用药需求,解决人民用药问题,出现了人工牛黄、体外培育牛黄和培植牛黄 3 种代用品。由于培植牛黄制备困难,目前几乎已无企业生产。

牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄的质量标准均收载于《中华人民共和国药典》2015 年版一部。牛黄及体外培育牛黄功能主治一致,但人工牛黄与之区别明显,且牛黄价格较高,不同牛黄间价格差距也较大,使得市场上出现以次充好甚至造假情况^[3],给临床使用带来风险和隐患。鉴于市场上牛黄的使用问题,2004 年国家食品药品监督管理局“关于牛黄及其代用品使用问题的通知”(国食药监注[2004]21 号)中对牛黄的使用进行严格规定,“对于国家药品标准处方中含牛黄的临床急重症用药品和国家药品监督管理部门批准的含牛黄的新药,可以将处方中的牛黄以培植牛黄、体外培育牛黄代替牛黄等量投料使用,但不得以人工牛黄代替。”

为解决目前牛黄及其代用品的质量问题,学者们进行了大量研究,主要有薄层色谱、高效液相色谱、近红外漫反射光谱技术和液质联用等^[4–7],但

由于牛黄及代用品成分相似,研究难度较大。目前关于牛黄及代用品研究主要集中在牛黄、人工牛黄、体外培育牛黄中胆汁酸类成分及胆红素的含量测定研究^[8–12],未能进行更深一步研究。本文通过高效液相色谱–蒸发光散射(HPLC–ELSD)联用技术,对牛黄及代用品中胆汁酸类成分进行分析,研究建立了牛黄及代用品的特征图谱,结合多元统计分析和相似度评价的方法对所得到的特征图谱进行分析;采用液质(LC–MS)联用的技术对特征图谱主要的特征峰进行指认,结合液质指认的结果,对牛黄及代用品中共有的主要胆汁酸类成分进行含量测定,包括牛磺胆酸、甘氨酸胆酸 2 个结合类胆汁酸成分及胆酸和去氧胆酸 2 个游离类胆汁酸成分,从主要共有成分的含量和含量比例上对牛黄及代用品进行对比,从而揭示牛黄及代用品成分比例上的差异。所建立的方法为牛黄及代用品的质量控制提供了有效的技术支持,可用于牛黄及代用品质量控制。

1 仪器、试剂及样品

Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 公司,包括四元低压梯度泵、在线脱气机、柱温箱和自动进样器、Empower 2 色谱工作站),Alltech 2000ES 型蒸发光检测器(奥泰公司),Agilent 6320 Ion Trap LC/MS(Agilent 公司,包括二元高压梯度泵、在线脱气机、柱温箱和自动进样器),Mettler XS105DU 电子天平(梅特勒公司),Millipore 纯水机(密理博

公司)。

乙腈和醋酸铵均为色谱纯(Fisher公司),甲酸为质谱级(Fisher公司),水为超纯水(Millipore超纯水系统制备)。

对照物质:牛黄对照药材(中国食品药品检定研究院,批号121328-201302),体外培育牛黄(武汉健民大鹏药业有限公司,批号120702),人工牛黄(中国食品药品检定研究院,批号121197-201204);对照品:甘氨酸胆酸钠(Sigma G7132,含量以97%计),牛磺胆酸钠(中国食品药品检定研究院,批号110815-201308,含量以88.9%计),胆酸(批号100078-200414,含量以100%计),去氧胆酸(批号0724-200207,含量以100%计)。

样品:牛黄及其代用品体外培育牛黄及人工牛黄均为市售,其中牛黄12批,编号为CB13~CB23, CB38;体外培育牛黄13批, CB1~CB11, CB30, CB32;人工牛黄11批,编号为CB25~CB29, CB33~CB37, CB31。

2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液

取甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠、胆酸和去氧胆酸的对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.4 mg的混合溶液,即得。

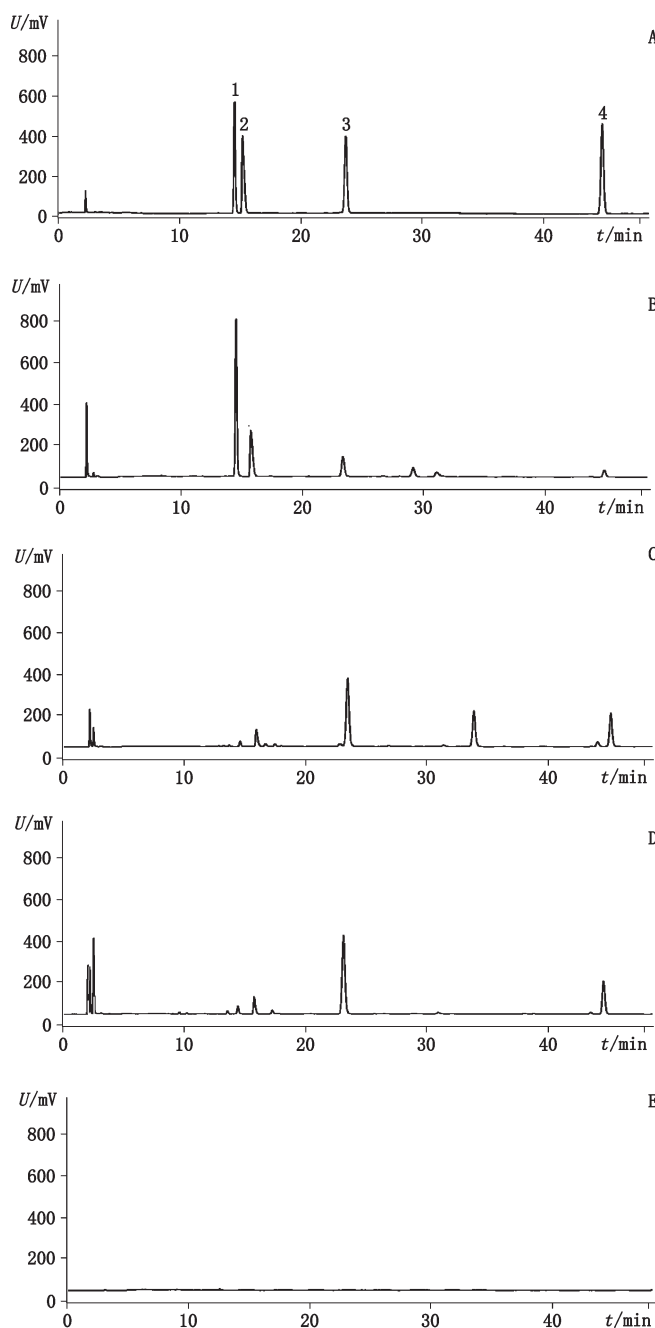
2.2 供试品溶液

取牛黄、体外培育牛黄及人工牛黄各约0.1 g,分别加甲醇10 mL,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放冷,滤过,取续滤液,作为供试品溶液I。取牛黄对照药材、体外培育牛黄(批号120702)及人工牛黄对照药材各约0.05 g,分别加甲醇25 mL,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放冷,滤过,取续滤液,作为供试品溶液II。

3 试验条件

3.1 HPLC-ELSD 条件

采用Waters Symmetryshield™ C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈为流动相A, 0.2%甲酸溶液(含10 mmol·L⁻¹醋酸铵)为流动相B,梯度洗脱(0~5 min, 2%A→35%A; 5~12 min, 35%A→37%A; 12~23 min, 37%A; 23~45 min, 37%A→50%A),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温为35℃;蒸发光检测器检测,漂移管温度102℃,氮气1.9 mL·min⁻¹。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液I和甲醇(作为空白)各10 μL,注入液相色谱中进行测定,色谱图见图1。



1. 甘氨酸胆酸(glycocholic acid) 2. 牛磺胆酸(taurocholic acid) 3. 胆酸(cholic acid) 4. 去氧胆酸(deoxycholic acid)

图1 对照品(A)、CB13号牛黄(B)、人工牛黄对照药材(C)、120702号体外培育牛黄(D)和空白(E)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference standards(A), Calculus Bovis No. CB13(B), reference material of artificial Calculus Bovis(C), *in vitro* cultivated Calculus Bovis No. 120702(D) and blank(E)

3.2 LC-MS 条件

LC条件:色谱柱、流动相组成及流动相梯度洗脱程序、流速、柱温同“3.1”项;MS条件:采用电喷

雾离子源正离子模式 (ESI⁺), 全扫描模式, 扫描范围 m/z 50~1 000, 雾化器压力 0.17 MPa, 脱溶剂气流速 $9.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (氮气); 脱溶剂气温度 325°C (氮气), 裂解电压 0.8 V, 分流比 1:6。精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 的

供试品溶液 II 注入液质联用仪器进行测定, 牛黄、体外牛黄和人工牛黄特征图谱一级质谱总离子流图见图 2。

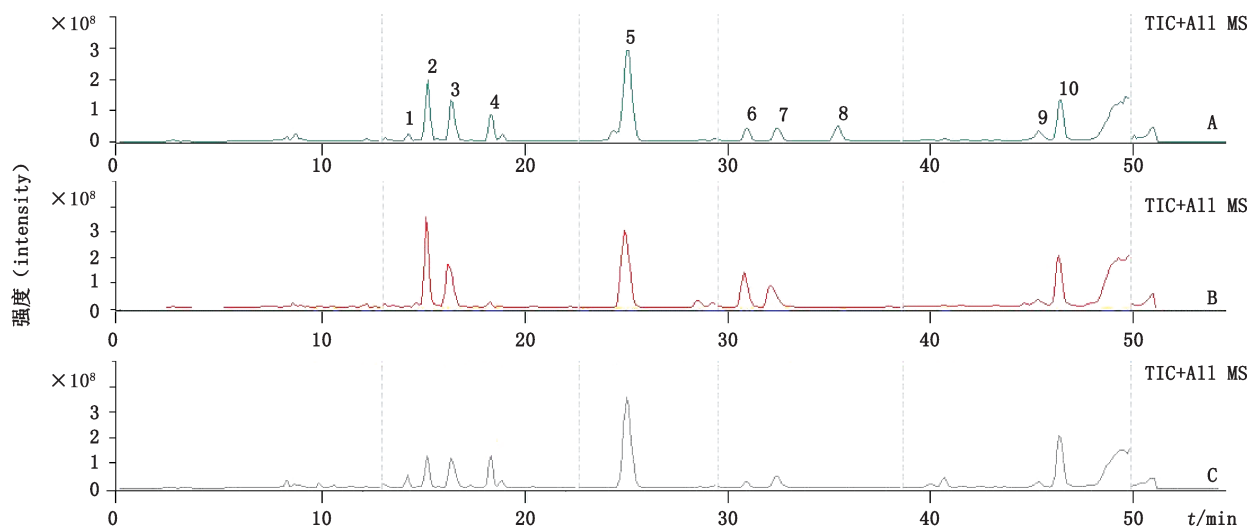


图2 人工牛黄(A)、牛黄(B)和体外培育牛黄(C)一级质谱总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms (TICs) of artificial Calculus Bovis (A), Calculus Bovis (B) and *in vitro* cultivated Calculus Bovis (C)

4 指纹图谱建立及特征峰指认

4.1 指纹图谱方法学

4.1.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液 I $10 \mu\text{L}$, 按 HPLC-ELSD 条件连续进样 6 次, 记录色谱图。采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2008 版 (以下简称相似度评价系统) 对所得的色谱图进行数据分析处理。结果显示, 所得色谱图的相似度不低于 0.99, 表明仪器精密度良好。

4.1.2 重复性试验 取牛黄 (CB13 号样品), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 I 共 5 份, 按 HPLC-ELSD 条件进样 $10 \mu\text{L}$ 进行检测, 记录色谱图。采用相似度评价系统对所得的色谱图进行数据分析处理, 结果显示, 所得色谱图的相似度不低于 0.99, 表明该方法重复性良好。

4.1.3 稳定性试验 精密吸取按“2.2”项下方法制得的同一供试品溶液 I $10 \mu\text{L}$, 按 HPLC-ELSD 条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 依次进样, 记录色谱图。采用相似度评价系统对所得的色谱图进行数据分析处理, 结果显示, 所得色谱图的相似度不低于 0.98, 表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

4.2 指纹图谱建立

取收集到的 36 个批次牛黄及代用品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 I, 按 HPLC-ELSD 条件进样 $10 \mu\text{L}$ 进行指纹图谱测定, 采用相似度评价系统生成牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄对照指纹图谱, 如图 3 所示。采用相似度评价系统, 分别对不同牛黄采用不同的对照谱图计算相似度, 相似度结果主要分布在 0.85 以上, 见表 1。相似度结果表明, 所建立的指纹图谱可用于对牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄进行质量控制和鉴别, 可采用相似度进行评价。

4.3 特征峰指认

精密吸取供试品溶液 II $10 \mu\text{L}$, 按 LC-MS 条件进样, 对上述指纹图谱中特征峰进行指认。通过与对照品保留时间、准分子离子峰和质谱裂解碎片比较, 确定峰 2、3、5、8、9 和 10 分别为甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸; 结合胆酸类成分质谱裂解过程具有连续脱水分子, 且 17 位侧链丢失的规律, 通过准分子离子峰和质谱裂解碎片, 推断峰 6 和 7 分别为甘氨酸鹅去氧胆酸和牛磺去氧胆酸。结果见表 2, 结构式见图 4。

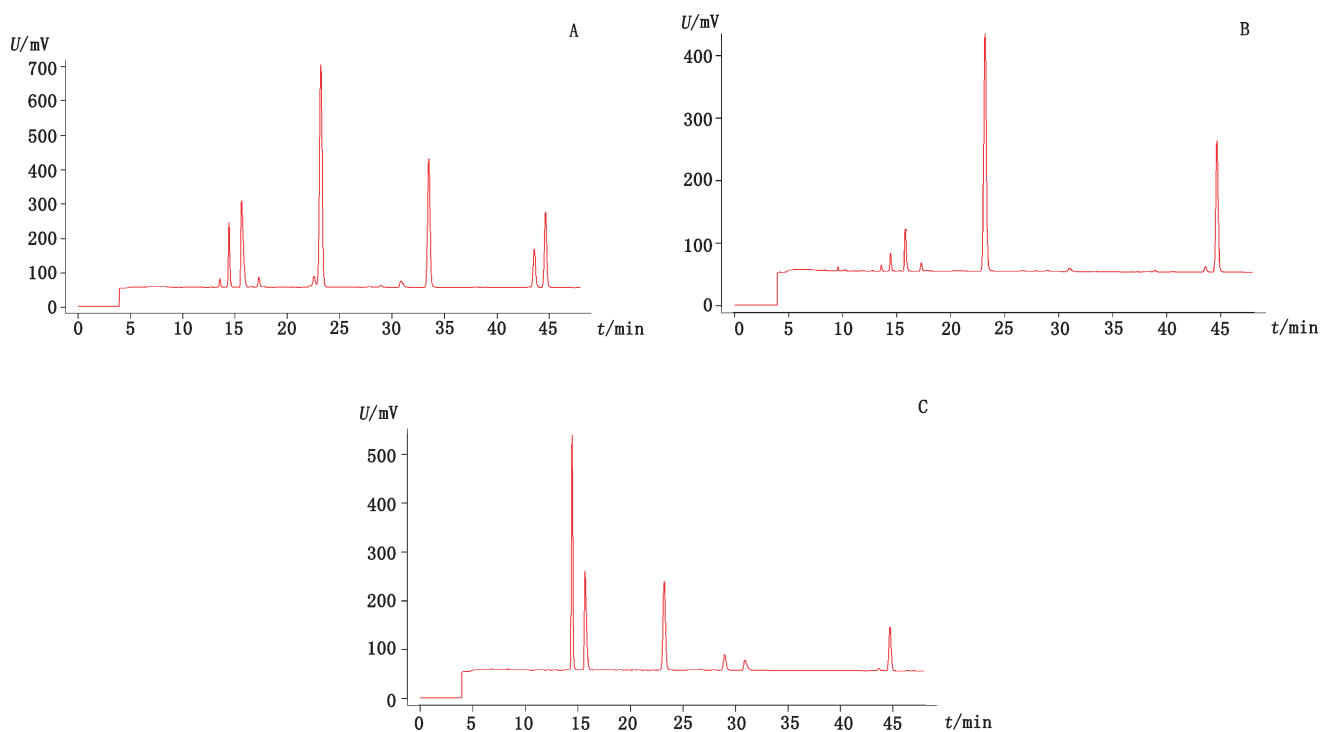


图3 牛黄(A)、体外培育牛黄(B)和人工牛黄(C)对照指纹图谱

Fig. 3 Reference fingerprints of Calculus Bovis (A), *in vitro* cultured Calculus Bovis (B) and artificial Calculus Bovis (C)

表1 相似度计算结果

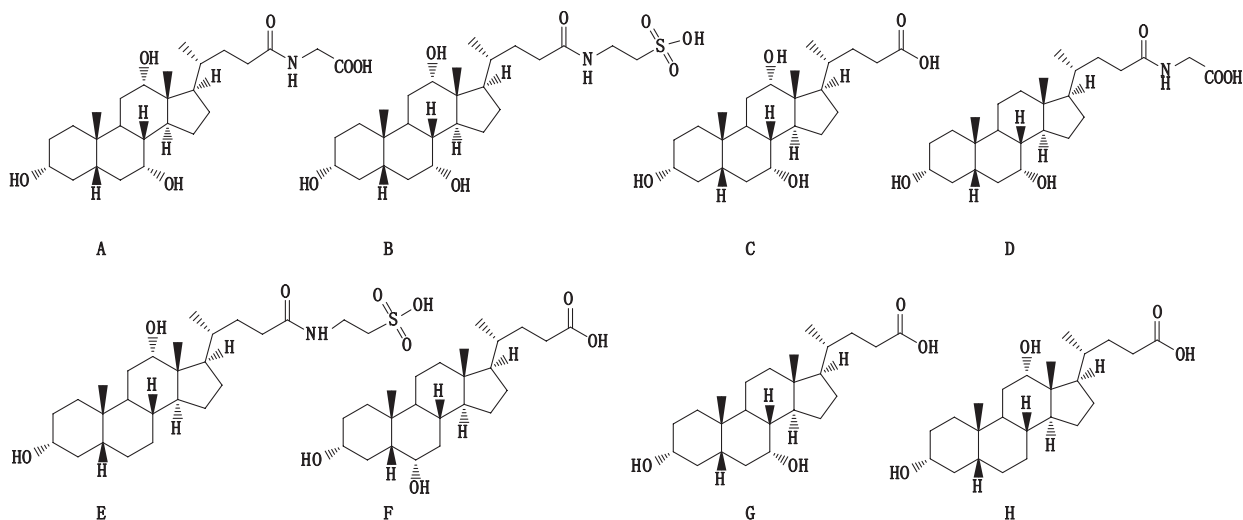
Tab. 1 The similarity result

体外培育牛黄 (参照图谱为体外培育牛黄标准图谱) [<i>in vitro</i> cultivated Calculus Bovis (reference fingerprints of <i>in vitro</i> cultured Calculus Bovis)]		牛黄 (参照图谱为牛黄标准图谱) [Calculus Bovis (reference fingerprints of Calculus Bovis)]		人工牛黄 (参照图谱为人工牛黄标准图谱) [artificial Calculus Bovis (reference fingerprints of artificial Calculus Bovis)]	
编号 (sample No.)	相似度 (similarity)	编号 (sample No.)	相似度 (similarity)	编号 (sample No.)	相似度 (similarity)
CB1	0.994	CB13	0.963	CB25	0.978
CB2	0.999	CB14	0.957	CB26	0.795
CB3	0.999	CB15	0.908	CB27	0.947
CB4	1.000	CB16	0.982	CB28	0.907
CB5	1.000	CB17	0.978	CB29	0.927
CB6	0.999	CB18	0.979	CB31	0.956
CB7	0.999	CB19	0.980	CB33	0.965
CB8	0.998	CB20	0.997	CB34	0.871
CB9	1.000	CB21	0.885	CB35	0.884
CB10	0.999	CB22	0.998	CB36	0.968
CB11	0.961	CB23	0.931	CB37	0.976
CB30	0.861	CB38	0.857		
CB32	0.983				

表 2 牛黄及代用品指纹图谱色谱峰指认

Tab. 2 Identified compounds in HPLC fingerprints

峰号 (peak No.)	t_R/min	化合物 (compound)	M_r	准分子离子峰 (quasi-molecular ion peak) m/z	主要质谱碎片 (main fragments ions) m/z
2	15.3	甘氨酸 (glycocholic acid)	465	$466.3 [M+H]^+$	448.3, 430.3, 412.3, 337.3, 319.2
3	16.6	牛磺胆酸 (taurocholic acid)	515	$516.3 [M+H]^+$, $533.3 [M+NH_4]^+$	498.5, 480.6, 462.7, 337.3, 319.2
5	25.2	胆酸 (cholic acid)	408	$426 [M+NH_4]^+$	391.3, 373.3, 355.3, 337.6
6	31.0	甘氨酸鹅去氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid)	449	$450.3 [M+H]^+$, $508.4 [M+CH_3COOH+H]^+$	432.3, 414.4, 339.5, 321.5
7	32.4	牛磺去氧胆酸 (taurodeoxycholic acid)	499	$500.4 [M+H]^+$, $999.7 [2M+H]^+$	482.3, 464.5, 382.3, 339.3, 321.5, 229.3
8	35.5	猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid)	392	$415.2 [M+Na]^+$	357.2, 339.2, 321.2, 275.1, 220.9, 203.0, 174.9, 160.9
9	45.4	鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)	392	$415.2 [M+Na]^+$	375.3, 339.2, 321.2, 275.0, 247.1, 221.0, 174.9
10	46.4	去氧胆酸 (deoxycholic acid)	392	$807.7 [2M+Na]^+$, $415.3 [M+Na]^+$	375.1, 357.3, 339.3, 321.3



A. 峰 2 (peak 2), 甘氨酸胆酸 (glycocholic acid) B. 峰 3 (peak 3), 牛磺胆酸 (taurocholate acid) C. 峰 5 (peak 5), 胆酸 (cholic acid) D. 峰 6 (peak 6), 甘氨酸鹅去氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid) E. 峰 7 (peak 7), 牛磺去氧胆酸 (taurodeoxycholic acid) F. 峰 8 (peak 8), 猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid) G. 峰 9 (peak 9), 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid) H. 峰 10 (peak 10), 去氧胆酸 (deoxycholic acid)

图 4 牛黄及代用品指纹图谱中胆汁酸类成分的结构式

Fig. 4 Structures of bile acids in fingerprint chromatography of Calculus Bovis and its substitutes

5 含量测定

5.1 含量测定方法学

5.1.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL , 按 HPLC-ELSD 条件进样测定。分别以进样量 (μg) 的常用对数值 (X) 为横坐标, 峰面积的常用对数值 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 结果甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、胆酸和去氧胆酸回归方程分别为:

$$Y=1.5886X+5.7448 \quad r=0.9996$$

$$Y=1.5303X+5.7828 \quad r=0.9993$$

$$Y=1.5769X+5.7211 \quad r=0.9994$$

$$Y=1.5204X+5.8730 \quad r=0.9998$$

线性范围分别为 0.420~8.392、0.477~9.544、0.442~8.840 和 0.447~8.952 μg 。

5.1.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL , 按照 HPLC-ELSD 条件连续进样 6 次, 计算甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、胆酸和去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.8%、1.3%、1.2% 和 2.3%, 表明仪器精密度良好。

5.1.3 重复性试验 取同一批次牛黄 (CB13 号样品), 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液 I 6 份, 按

照 HPLC-ELSD 条件进样 10 μL 进行分析,计算含量及其 RSD。结果甘氨酸、牛磺胆酸、胆酸和去氧胆酸平均含量分别为 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD=2.3%), $26.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD=1.1%), $20.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD=2.1%) 和 $10.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD=1.9%),表明该方法重复性良好。

5.1.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 I 10 μL ,按 HPLC-ELSD 条件,分别于 0、4、8、12、24 h 进样,计算峰面积,结果甘氨酸、牛磺胆酸、胆酸和

去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.8%、1.9%、1.5% 和 2.0%。结果表明,供试品溶液 I 在 24 h 内稳定性良好。

5.1.5 回收率试验 取牛黄(CB13 号样品)粉末 6 份,每份约 0.05 g,精密称定,按样品含量的 100% 加入对照品,按照“2.2”项下供试品溶液 I 的制备方法制备供试溶液,按 HPLC-ELSD 条件进样 10 μL ,计算回收率,结果表明方法回收率良好,见表 3。

表 3 回收率结果

Tab. 3 Recoveries

成分 (compound)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/mg	平均 (average)/mg	RSD/%
甘氨酸(glycocholic acid)	1.897	1.741	3.612	98.5	98.5	2.6
	1.868		3.569	97.7		
	1.876		3.662	102.6		
	1.902		3.586	96.7		
	1.874		3.615	100.0		
	1.893		3.552	95.3		
牛磺胆酸(taurocholic acid)	1.319	1.333	2.572	93.9	96.1	2.7
	1.299		2.578	94.4		
	1.304		2.653	100.0		
	1.322		2.570	93.8		
	1.303		2.632	98.4		
	1.316		2.604	96.3		
胆酸(cholic acid)	1.040	0.978 4	1.994	97.5	97.5	3.4
	1.024		1.997	99.4		
	1.028		1.945	93.7		
	1.042		1.962	94.0		
	1.027		1.984	97.8		
	1.037		2.040	102.5		
去氧胆酸(deoxycholic acid)	0.517	0.509 2	1.023	99.4	100.0	3.2
	0.509		1.019	100.2		
	0.511		1.021	100.2		
	0.518		0.999	94.5		
	0.510		1.025	101.1		
	0.515		1.047	104.4		

5.2 含量测定结果

取牛黄及其代用品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液 I,按 HPLC-ELSD 条件进样 10 μL 进行测定,以外标法计算含量,牛黄及其代用品含量的测定结果见图 5。

6 讨论

6.1 指纹图谱多元统计分析结果与讨论

本文采用 HPLC-ELSD 指纹图谱对收集到的 36 个批次牛黄、体培牛黄和人工牛黄中主要的胆酸类成分进行了研究。结果表明牛黄、体外培育牛黄和人工

牛黄胆汁酸类成分类型基本一致,但色谱峰比例上存在较大差异。采用 Champattern 软件进行主成分分析,结果表明人工牛黄、牛黄和体外培育牛黄分别分布在 3 个较为独立的空间,反映出同种类型牛黄成分较为一致,但 3 种牛黄之间化学成分的含量差异较大。同时在甘氨酸、牛磺胆酸的维度上牛黄所占比例较大,在鹅去氧胆酸和胆酸的维度上体外培育牛黄和人工牛黄所占比例较大,见图 6。上述分析显示,牛黄与体外培育牛黄、人工牛黄在胆汁酸类成分上存在较大差异,主要表现在结合胆酸和游离胆酸的比例上。

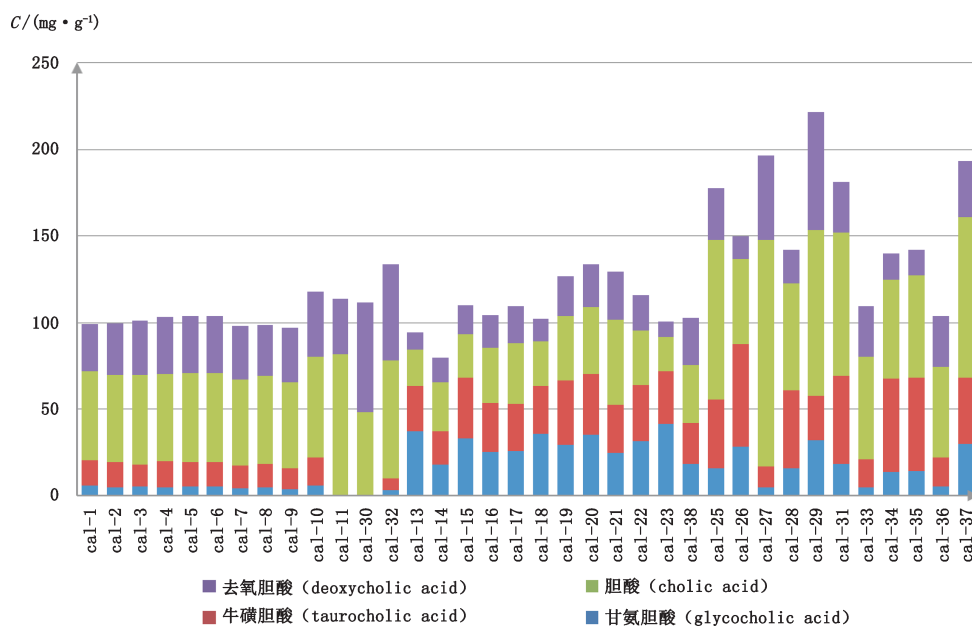


图5 牛黄及代用品含量测定结果柱状图

Fig. 5 The bar graph of Calculus Bovis and its substitutes assay results

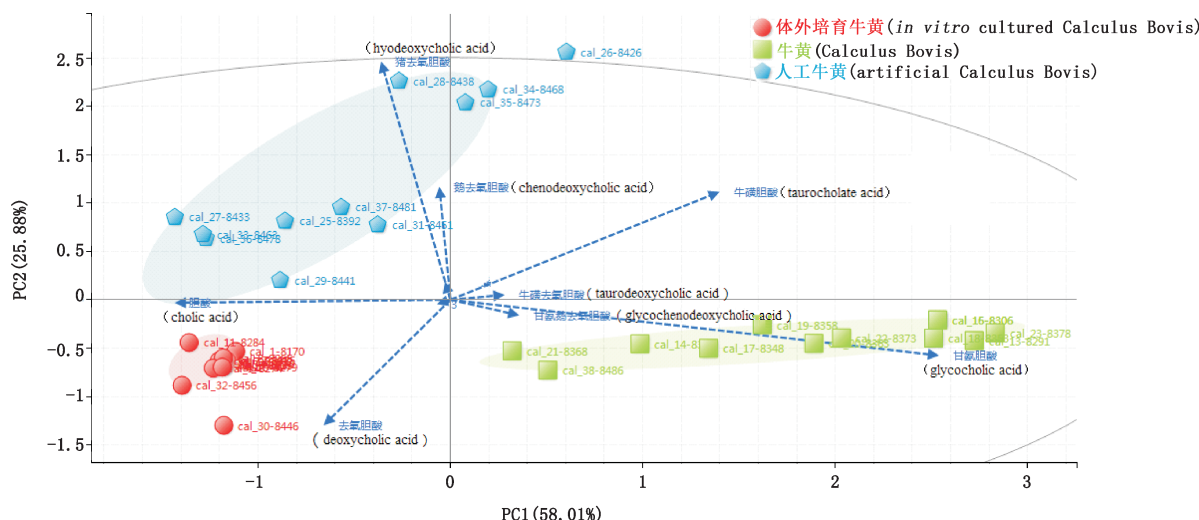


图6 牛黄及代用品指纹图谱主成分分析结果

Fig. 6 Principal component analysis results of Calculus Bovis and its substitutes

6.2 含量测定结果讨论

通过 LC-MS 技术,对牛黄及代用品的特征图谱进行指认,结果表明牛黄、体外培育牛黄、人工牛黄所含的胆汁酸类成分类型基本一致,均含有甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸;但人工牛黄中含有猪去氧胆酸,牛黄和体外培育牛黄中不含猪去氧胆酸。由于甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、胆酸和去氧胆酸为牛黄、人工牛黄和体外培育牛黄共有成分,且成分含量较高,故选择此 4 个成分作为含量测定指标。从整体上讲,人工牛黄中 4 个胆酸

成分的总量最高,牛黄与体外培育牛黄总量几乎相当。从单个胆酸成分的含量上分析,甘氨酸胆酸、牛磺胆酸在体外培育牛黄中含量较低,但在牛黄和人工牛黄中含量较高;胆酸在体外培育牛黄和人工牛黄中含量较高,在牛黄中含量较低;去氧胆酸在体外培育牛黄中含量较高,而在牛黄中含量低,人工牛黄中去氧胆酸含量规律性不强。这个结果与文献报道^[13]的结果存在较大差异,这也可能是由于样本的问题,所以目前仍要增大样品的收集,从而对结果进行确证。从同类型不同批次的胆汁酸类成分看,体外培育牛黄在批间一致性方

面明显优于牛黄,其作为牛黄的代用品使用具有质量更易控制的优势。而牛黄与人工牛黄批间差异较大,牛黄可能是由于牛黄来源地域不同而存在差异,而人工牛黄可能是由于企业使用牛胆粉质量参差不齐而存在差异^[14]。

本次研究结果表明,牛黄与体外培育牛黄在胆汁酸类成分总量大体相当,与文献报道^[15]一致。但牛黄中甘氨胆酸与牛磺胆酸含量明显高于体外培育牛黄,牛黄中胆酸和去氧胆酸含量明显低于体外培育牛黄。文献报道甘氨胆酸具有明显的抗氧化、抗炎、免疫调节等作用,牛磺胆酸具有显著的解热镇痛作用。尤其值得探讨的是在心肌细胞保护作用方面,牛磺胆酸具有心肌细胞保护作用,而胆酸、去氧胆酸具有损伤心肌细胞的作用^[16]。这些成分含量的差异是否会造成牛黄与体外培育牛黄在某些方面药理药效作用的差异,甚至导致相关制剂药理药效的差异,需要进一步研究。根据2004年国家食品药品监督管理局“关于牛黄及其代用品使用问题的通知”(国食药监注[2004]21号)中的规定,在中药成方制剂中牛黄可以与体外培育牛黄等同使用。初步推测可能是牛黄与体外培育牛黄中所含除结合胆酸之外的成分,如牛磺酸、胆固醇、胆红素等,成分之间存在协同作用,促使两者药理药效作用相当。鉴于本次研究发现的问题,建议体外培育牛黄生产企业能够更进一步提高产品的质量,开展相应的药理药效比较研究,以保证牛黄制剂的质量,降低人民用药的风险。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 70
ChP 2015. Vol 1 [S]. 2015: 70
- [2] 骆小梅, 杜伟, 张火春, 等. 含牛黄品种质量标准及监管的分析和探讨[J]. 中成药, 2009, 31(3): 444
LUO XM, DU W, ZHANG HC, *et al.* Analysis and discussion on standards and supervision of preparations containing Calculus Bovis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2009, 31(3): 444
- [3] 王慧春. 名贵药材天然牛黄及其伪品的鉴别[J]. 青海医药杂志, 2005, 35(6): 52
WANG HC. Identification of Calculus Bovis and its adulterant [J]. Qinghai Med J, 2005, 35(6): 52
- [4] KONG WJ, XING XY, XIAO XH, *et al.* Multi-component analysis of bile acids in natural Calculus Bovis and its substitutes by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and UPLC-ELSD [J]. Analyst, 2012, 137(24): 5845
- [5] PENG C, TIAN JX, LV MY, *et al.* Development and validation of a sensitive LC-MS-MS method for the simultaneous determination of multicomponent contents in artificial Calculus Bovis [J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52(2): 128
- [6] 林培英, 王洪, 董昕, 等. 近红外漫反射光谱法测定天然牛黄粉中人工牛黄粉的掺入量[J]. 中药材, 2005, 28(3): 177
LIN PY, WANG H, DONG X, *et al.* Determination of the artificial bezoar powder in the bezoar powder by near-infrared diffuse reflectance spectrometry [J]. J Chin Med Mater, 2005, 28(3): 177
- [7] 常增荣, 邸峰, 周富荣. 薄层扫描法测定天然牛黄中胆酸含量的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(11): 684
CHANG ZR, DI F, ZHOU FR. Quantitative determination of cholic acid in Calculus Bovis [J]. China J Chin Mater Med, 1999, 24(11): 684
- [8] KONG WJ, WANG JB, ZENG QC, *et al.* Fingerprint-efficacy study of artificial Calculus Bovis in quality control of Chinese material medica [J]. Food Chem, 2011, 127(3): 1342
- [9] ZANG QC, WANG JB, KONG WJ, *et al.* Searching for the main anti-bacterial components in artificial Calculus Bovis using UPLC and microcalorimetry coupled with multi-linear regression analysis [J]. J Sep Sci, 2011, 34(23): 3330
- [10] KONG WJ, JIN Ch, LIU W, *et al.* Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five bile derivatives in Calculus Bovis and its medicinal preparations [J]. Food Chem, 2010, 120(4): 1193
- [11] 李珂, 高允生, 李炳龙, 等. 天然牛黄与酶促牛黄 HPLC-ELSD 特征图谱比较[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 616
LI K, GAO YS, LI BL, *et al.* HPLC-ELSD comparison of specific chromatogram of natural Calculus Bovis and Calculus Bovis cultivated by glucuronidase [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(4): 616
- [12] 李珂, 王唯红, 齐永秀, 等. 6 种胆酸类成分的 HPLC-ELSD 测定法及在两种牛黄中的含量比较[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(8): 626
LI K, WANG WH, QI YX, *et al.* Determination and comparison of six cholic acid derivatives in two kinds of Calculus Bovis by HPLC-ELSD assay [J]. Chin Pharm J, 2010, 45(8): 626
- [13] FENG CY, LI XP, ZHANG CL, *et al.* Development of a rapid and simple LC-MS/MS method for identification and quality control of natural Calculus Bovis and Calculus Bovis Sativus [J]. Anal Methods, 2015, 7(18): 7606
- [14] 石岩, 郑天骄, 魏锋, 等. 牛胆粉指纹图谱模式识别及多组分测定研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2487
SHI Y, ZHENG TJ, WEI F, *et al.* Studies of pattern recognition of fingerprint profile of cattle bile powder and the determination of multi-component in it [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(13): 2487
- [15] 蔡红娇, 裘法祖, 刘仁则. 体外培育牛黄的药学研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 335
CAI HJ, QIU FZ, LIU RZ. Studies on the pharmacy of *in-vitro* cultivated Calculus Bovis [J]. Chin J Nat Med, 2004, 2(6): 335
- [16] TAKAHASHI K, AZUMA Y, SHIMADA K, *et al.* Quality and safety issues related to traditional animal medicine: role of taurine [J]. J Biomed Sci, 2010, 17(Suppl 1): S44

(本文于 2017 年 5 月 22 日收到)