

·质量分析研究·

的

3 种牛黄中胆汁酸类成分含量测定与比较

张宇静^{1,2}, 夏晶², 曹帅², 仇佳思², 季申² (1. 中国医药工业研究总院 上海医药工业研究院, 上海 200040; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-蒸发光散射检测器(UPLC-ELSD)法同时测定天然牛黄、人工牛黄、体外培育牛黄中 10 种胆汁酸以及胆固醇, 并比较 3 种牛黄中胆汁酸类成分的异同。**方法** 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(pH=3.5)为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C, ELSD 检测器漂移管温度 65 °C。**结果** 所建立的方法可有效分离 10 种胆汁酸以及胆固醇, 各项方法学考察均符合要求, 测定结果显示 3 种牛黄的胆汁酸类成分在种类和含量上存在一定差异。**结论** 本方法简便、准确、重复性好, 可用于牛黄类药材中胆汁酸类成分的质量控制, 并为其他胆酸类药物的测定提供参考。

关键词: 牛黄; 胆汁酸; 含量测定; 质量控制; 超高效液相色谱-蒸发光散射检测器法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04

Determination and comparison of multiple kinds of bile acids in three kinds of Calculus Bovis

ZHANG Yu-jing^{1, 2}, XIA Jing², QIU Jia-si², JI Shen² (1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To establish an UPLC-ELSD method for simultaneous determination and comparison of ten bile acids and cholesterol in natural, artificial and in-vitro cultured Calculus Bovis. **Methods** The separation was achieved on Acquity HSS T3 column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) with gradient eluent consisting of methanol and 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate buffer, and the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. The column temperature was 35 °C. The temperature of the drift tube was 65 °C. **Results** The established method can separate 10 bile acids and cholesterol effectively, which investigations of methodology meet all requirements. The results of determination show that three kinds of Calculus Bovis differ in types and contents of bile acids. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, providing a basis for controlling the quality of bile acids in Calculus Bovis and giving a reference for determination of other bile acids drugs.

Key words: Calculus Bovis; bile acids; determination; quality control; UPLC-ELSD method

牛黄是牛科动物牛的干燥胆结石, 是我国常用名贵中药, 具有清心解毒、凉肝息风、豁痰开窍等功效^[1]。天然牛黄自然发生率低, 其常用代用品为人工

牛黄和体外培育牛黄。天然牛黄疗效最佳, 其价格远高于其代用品。市场上牛黄质量参差不齐, 含牛黄中成药中牛黄存在投料混乱的情况。本研究旨在通过深入

收稿日期: 2016-03-08

作者简介: 张宇静, 女, 硕士研究生。研究方向: 中药质量控制研究。Email: zhang_yu_jing@163.com。通信作者: 季申, 女, 博士生导师, 主任药师, 研究方向: 中药质量标准及中药安全性研究。Email: jishen2013@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81473347); 上海市科学技术委员会项目(15DZ0502700); 国家药典委员会人工牛黄质量标准专项研究。

研究不同牛黄的成分,解决牛黄质量控制的这一难点。

天然牛黄的主要活性成分为胆红素和胆汁酸,同时也是牛黄中含量最高的成分^[2]。经过多年研究及技术改进,在胆红素的含量和构成类型上体外培育牛黄已经接近天然牛黄^[3-5],而在胆汁酸的种类及含量上仍有差异^[6-8],对胆汁酸的研究将成为牛黄及其代用品质量研究的关键。其中,结合胆汁酸牛磺胆酸(TCA)、甘氨酸胆酸(GCA)和游离胆汁酸胆酸(CA)、去氧胆酸(DCA)、鹅去氧胆酸(CDCA)等常作为控制牛黄质量的重要指标成分。有文献报道^[9],天然牛黄含大量结合胆汁酸,而人工牛黄主要含游离胆汁酸。对牛黄中结合胆汁酸和游离胆汁酸同时进行定量分析的报道并不多,所涉及胆汁酸的种类研究也较少,主要集中于胆酸、去氧胆酸和以胆酸计的总胆汁酸含量。故本文采用超高效液相色谱-蒸发光散射检测器(UPLC-ELSD)法同时测定天然牛黄、人工牛黄及体外培育牛黄中 10 种胆汁酸成分及胆固醇的含量,通过探究天然牛黄、人工牛黄和体外培育牛黄在胆汁酸类成分种类及含量上的异同,为评价牛黄及其代用品质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity UPLC(美国 waters 公司),配四元泵、自动进样器、柱温箱、ELSD 检测器;BRANSON B9500S-DTH 超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司);Sartorius BS 2202S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药 牛磺胆酸钠(批号:SLBL1190V)、熊去氧胆酸(批号:SLBD2630V)、猪去氧胆酸(批号:SLBB1583V)、胆酸(批号:SLBG3376V)、鹅去氧胆酸(批号:MKBS2816V)、去氧胆酸(批号:SLBD2455V)、石胆酸(批号:BCBH4721V)、石胆酸甲酯(批号:115H5019)、胆固醇(批号:SLBK9675V),美国 SIGMA 公司;牛磺熊去氧胆酸钠(批号:PM6ZE-EL)、甘氨酸胆酸钠(批号:COJYM-CF),日本东京化成工业株式会社;甲酸铵,分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;甲醇,色谱纯,德国默克公司;水为超纯水。共收集了 22 批天然牛黄、13 批体外培育牛黄、5 批人工牛黄,为国家评价抽验样品,见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[10-11] 色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3

表 1 样品来源

Table 1 Sample sources

编号	批号	牛黄类型	编号	批号	牛黄类型
1	YNH0015A1	天然牛黄	21	YNH0015A11	天然牛黄
2	YNH0015A2	天然牛黄	22	YNH0015A12	天然牛黄
3	20130302	天然牛黄	23	YRG0015C1	人工牛黄
4	YNH0015A3	天然牛黄	24	121119	人工牛黄
5	NK-1	天然牛黄	25	YRG0015C2	人工牛黄
6	GY-2	天然牛黄	26	YRG0015C3	人工牛黄
7	KL-1	天然牛黄	27	141204	人工牛黄
8	KL-2	天然牛黄	28	YTP0015B1	体外培育牛黄
9	KL-3	天然牛黄	29	YTP0015B2	体外培育牛黄
10	KL-4	天然牛黄	30	YTP0015B3	体外培育牛黄
11	YNH0015A4	天然牛黄	31	YTP0015B4	体外培育牛黄
12	JG100784001	天然牛黄	32	YTP0015B5	体外培育牛黄
13	JG1008604001	天然牛黄	33	120702	体外培育牛黄
14	JNH10012003	天然牛黄	34	120301	体外培育牛黄
15	YNH0015A5	天然牛黄	35	YTP0015B6	体外培育牛黄
16	YNH0015A6	天然牛黄	36	121202	体外培育牛黄
17	YNH0015A7	天然牛黄	37	130102	体外培育牛黄
18	YNH0015A8	天然牛黄	38	130201	体外培育牛黄
19	YNH0015A9	天然牛黄	39	130301	体外培育牛黄
20	YNH0015A10	天然牛黄	40	130401	体外培育牛黄

(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 柱温: 35 ℃, 流速: 0.3 mL·min⁻¹; ELSD 检测器漂移管温度: 65 ℃; 喷雾器冷却模式; 载气压力: 40 psi; 流动相 A 为 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液(pH=3.5), B 为甲醇, 梯度洗脱(0~3 min, 30 %B→65 %B; 3~13 min, 65 %B→72 %B; 13~23 min, 72 %B→98 %B; 23~26 min; 98 %B→98 %B; 26~30 min, 98 %B→30 %B)。

2.2 溶液的制备

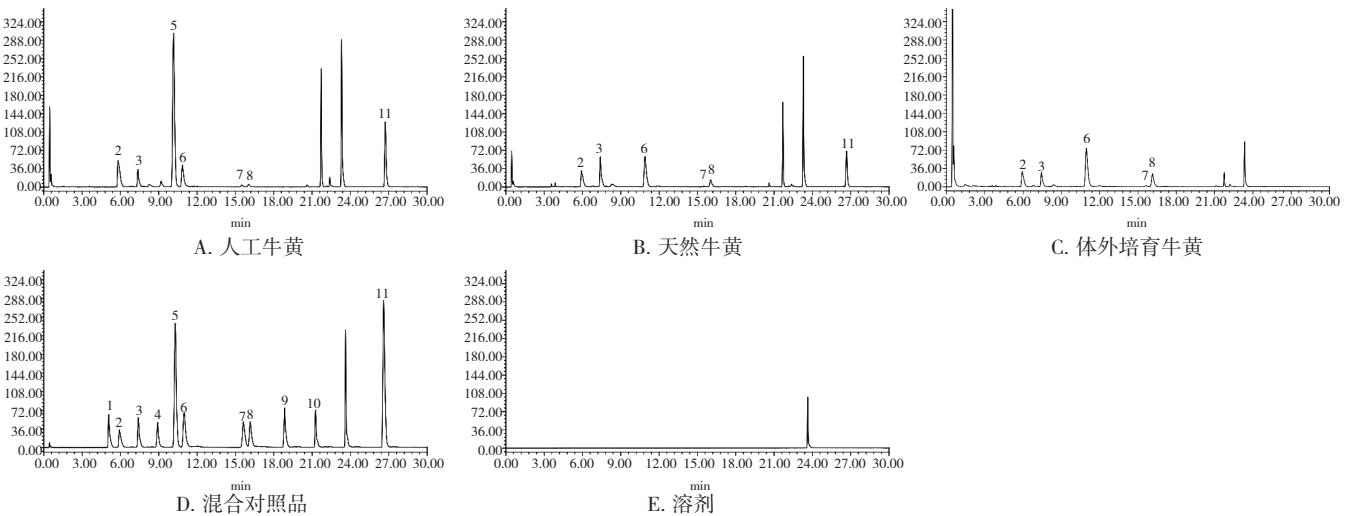
2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称定牛磺熊去氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、石胆酸、石胆酸甲酯、胆固醇对照品适量置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含牛磺熊去氧胆酸钠 0.87 mg·mL⁻¹、牛磺胆酸钠 1.15 mg·mL⁻¹、甘氨酸胆酸钠 0.98 mg·mL⁻¹、熊去氧胆酸 0.97 mg·mL⁻¹、猪去氧胆酸 1.05 mg·mL⁻¹、胆酸 1.22 mg·mL⁻¹、鹅去氧胆酸 0.22 mg·mL⁻¹、去氧胆酸 1.78 mg·mL⁻¹、石胆酸 0.20 mg·mL⁻¹、石胆酸甲酯 0.20 mg·mL⁻¹、胆固醇 0.57 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。精密量取上述对照品储备液适量,置于量瓶中,加甲醇溶液稀释并定容至刻度,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取适量样品粉末约 50 mg,精密称定,精密加入甲醇溶液 10 mL,称定质量,超

声提取 1 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足损失的质量，摇匀，滤过，取续滤液即为供试品溶液。

2.3 系统适应性试验 分别精密吸取混合对照品溶液 2 μL 及供试品溶液 4 μL，按 2.1 项下色谱条件进样

分析。分离度均大于 1.5，理论塔板数以各色谱峰计均在 10000 以上，各样品在待测成分色谱峰处均无干扰，见图 1。



1. 牛磺熊去氧胆酸钠；2. 牛磺胆酸钠；3. 甘氨酸胆酸钠；4. 熊去氧胆酸；5. 猪去氧胆酸；6. 胆酸；7. 鹅去氧胆酸；8. 去氧胆酸；9. 石胆酸；10. 石胆酸甲酯；11. 胆固醇

图 1 人工牛黄(A)、天然牛黄(B)、体外培育牛黄(C)、混合对照品(D)和溶剂(E)的 UPLC-ELSD 色谱图

Figure 1 UPLC-ELSD chromatograms of artificial Calculus Bovis (A), natural Calculus Bovis (B), in-vitro cultured Calculus Bovis(C), mixed standards(D) and solvent(E)

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液适量，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶液定容至刻度，摇匀，制成 5 个不同浓度的系列混合对照品溶液。精密吸取各浓度的混合对照品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样分析，记录峰面积。以对照品质量 (mg) 的对数值 X 为横坐标，峰面积的对数值 Y 为纵坐标，绘制标准曲线，进行回归分析，得各组分回归方程、相关系数及线性范围，见表 2。结果表明各对照品在各自质量浓度范围内线性关系均良好。

2.5 精密度考察 精密吸取混合对照品溶液 2 μL，连续进样 6 次，以峰面积的对数值进行计算，牛磺熊去氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、石胆酸、石胆酸甲酯、胆固醇峰面积对数的 RSD 分别为 0.18 %、0.11 %、0.36 %、0.31 %、0.09 %、0.20 %、0.10 %、0.22 %、0.14 %、0.18 %、0.10 %，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性考察 取 3 种牛黄的供试品溶液适量，分别于制备后 0，2，4，6，8，10，12，24 h 进样，计算各峰面积对数的 RSD，天然牛黄中牛磺胆酸钠 0.37 %、甘氨酸胆酸钠 0.42 %、胆酸 0.79 %、鹅去氧

表 2 线性关系考察

Table 2 Inspection of linear range

成分	回归方程	r	线性范围 / μg
牛磺熊去氧胆酸钠	$Y=1.41X+5.77$	0.9998	0.09~1.73
牛磺胆酸钠	$Y=1.37X+5.63$	0.9997	0.11~2.30
甘氨酸胆酸钠	$Y=1.49X+5.76$	0.9997	0.10~1.96
熊去氧胆酸	$Y=1.13X+6.07$	0.9994	0.10~1.93
猪去氧胆酸	$Y=1.59X+6.34$	0.9994	0.10~2.10
胆酸	$Y=1.52X+5.82$	0.9997	0.12~2.44
鹅去氧胆酸	$Y=1.28X+5.63$	0.9995	0.02~0.45
去氧胆酸	$Y=1.54X+5.86$	0.9990	0.18~3.55
石胆酸	$Y=1.07X+5.94$	0.9992	0.02~0.40
石胆酸甲酯	$Y=1.80X+5.54$	0.9991	0.02~0.40
胆固醇	$Y=1.75X+7.04$	0.9992	0.06~1.13

胆酸 0.38 %、去氧胆酸 0.97 %、胆固醇 1.56 %；体外培育牛黄中牛磺胆酸钠 0.21 %、甘氨酸胆酸钠 0.49 %、胆酸 0.18 %、鹅去氧胆酸 1.54 %、去氧胆酸 0.38 %；人工牛黄中牛磺胆酸钠 0.15 %、甘氨酸胆酸钠 0.25 %、猪去氧胆酸 0.07 %、胆酸 0.72 %、鹅去氧胆酸 0.98 %、去氧胆酸 0.92 %、胆固醇 1.03 %，表明 3 种牛黄的供试品溶液在 24 h 内均较稳定。

2.7 重复性试验 取 3 种牛黄样品，按 2.2.2 项下方

法各制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定 11 种成分的质量浓度,计算其质量分数的 RSD,天然牛黄中牛磺胆酸钠 0.67 %、甘氨酸胆酸钠 1.16 %、胆酸 0.44 %、鹅去氧胆酸 2.87 %、去氧胆酸 2.20 %、胆固醇 2.52 %;体外培育牛黄中牛磺胆酸钠 0.94 %、甘氨酸胆酸钠 1.71 %、胆酸 0.38 %、鹅去氧胆酸 1.50 %、去氧胆酸 1.61 %;人工牛黄中牛磺胆酸钠 2.31 %、甘氨酸胆酸钠 0.77 %、猪去氧胆酸 0.57 %、胆酸

3.13 %、鹅去氧胆酸 2.01 %、去氧胆酸 3.74 %、胆固醇 1.16 %,结果表明 3 种牛黄的重复性均较好。

2.8 加样回收率试验 取已知各胆汁酸及胆固醇含量的牛黄样品约 25 mg,精密称定,各平行 9 份,分别精密加入不同浓度的胆汁酸混合对照品溶液,制成高、中、低 3 个浓度水平,每个浓度水平制备 3 份供试品溶液进样测定,计算加样回收率。天然牛黄中各成分的回收率在 96.815 %~102.02 %之间,RSD 在

表 3 样品测定结果

Table 3 Determination results of samples

编号	质量分数/mg·g ⁻¹										
	牛磺胆酸钠	牛磺熊去氧胆酸钠	甘氨酸胆酸钠	熊去氧胆酸	猪去氧胆酸	胆酸	鹅去氧胆酸	去氧胆酸	石胆酸	石胆酸甲酯	胆固醇
1	23.72	0.00	30.04	0.00	0.00	35.45	3.45	11.43	0.00	0.00	0.00
2	6.02	0.00	6.83	0.00	2.55	89.80	4.09	58.10	0.00	0.00	0.00
3	3.93	0.00	4.73	0.00	3.65	92.19	4.57	63.42	0.00	0.00	0.00
4	9.88	0.00	10.22	0.00	0.00	83.85	5.70	35.36	0.00	2.28	0.00
5	10.20	0.00	9.66	0.00	3.20	34.37	3.43	24.74	2.35	0.00	11.28
6	20.49	0.00	47.52	0.00	0.00	22.78	0.00	3.89	0.00	0.00	0.00
7	22.61	0.00	47.02	0.00	0.00	15.44	0.00	0.00	0.00	0.00	2.30
8	6.07	0.00	5.09	0.00	0.00	53.91	5.19	23.04	0.00	0.00	0.00
9	20.55	0.00	12.92	0.00	0.00	37.25	2.84	12.73	0.00	0.00	0.00
10	11.58	0.00	9.91	0.00	0.00	41.72	3.87	18.08	0.00	0.00	0.00
11	28.55	0.00	26.55	0.00	0.00	36.51	3.34	13.68	0.00	0.00	1.97
12	33.35	0.00	33.31	0.00	0.00	30.97	0.00	11.96	0.00	0.00	8.44
13	25.68	0.00	23.28	0.00	0.00	34.44	3.06	15.84	0.00	0.00	0.00
14	35.46	0.00	41.18	0.00	0.00	32.21	0.00	8.33	0.00	0.00	0.00
15	29.10	0.00	29.42	0.00	0.00	31.89	3.08	12.83	0.00	0.00	12.78
16	30.84	0.00	33.77	0.00	0.00	32.17	0.00	15.49	0.00	0.00	16.31
17	24.47	0.00	28.93	0.00	0.00	35.14	0.00	14.79	0.00	0.00	19.88
18	8.53	0.00	0.00	0.00	0.00	35.85	3.95	22.23	0.00	0.00	21.37
19	12.30	0.00	17.41	0.00	0.00	61.11	5.01	26.40	0.00	2.50	3.02
20	19.42	0.00	19.88	0.00	0.00	33.36	0.00	14.79	0.00	0.00	12.56
21	17.13	0.00	23.26	0.00	0.00	42.26	0.00	23.43	0.00	0.00	19.66
22	18.56	0.00	26.82	0.00	0.00	44.53	3.87	24.30	0.00	0.00	11.11
23	35.83	0.00	8.64	0.00	2.17	85.58	5.37	175.79	0.00	0.00	0.00
24	64.89	0.00	27.98	0.00	62.98	40.34	9.12	8.98	0.00	0.00	8.78
25	44.88	0.00	29.11	0.00	73.99	67.73	8.45	16.60	0.00	0.00	2.10
26	25.41	0.00	15.66	0.00	23.06	82.02	6.74	53.30	0.00	1.17	1.38
27	40.00	0.00	23.59	0.00	59.02	72.20	6.36	24.00	0.00	0.00	2.77
28	0.00	0.00	0.00	0.00	3.20	74.10	4.77	49.24	0.00	0.00	0.00
29	0.00	0.00	0.00	0.00	5.26	74.95	4.01	74.18	1.94	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	11.06	97.86	5.28	64.57	1.18	2.78	0.00
31	0.00	0.00	0.00	0.00	2.13	50.32	0.00	49.21	1.59	3.01	0.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00	2.46	74.64	4.22	51.53	1.21	0.00	0.00
33	0.00	0.00	0.00	0.00	2.94	89.27	4.91	53.02	0.86	0.00	0.00
34	0.00	0.00	0.00	0.00	3.11	63.89	4.31	46.97	0.74	1.98	0.00
35	0.00	0.00	0.00	0.00	3.17	79.24	5.07	59.64	1.08	0.00	0.00
36	9.12	0.00	7.17	0.00	0.00	65.12	3.21	34.90	0.84	2.41	0.00
37	8.88	0.00	7.09	0.00	0.00	66.90	3.14	34.51	1.20	2.44	0.00
38	9.61	0.00	7.23	0.00	0.00	65.37	2.94	36.00	0.89	3.63	0.00
39	8.80	0.00	6.87	0.00	0.00	66.95	0.00	35.14	0.78	2.38	0.00
40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	67.03	4.21	26.32	0.00	2.91	0.00

1.29 % ~ 3.35 % 之间；体外培育牛黄中回收率在 98.02 % ~ 100.08 % 之间，RSD 在 0.59 % ~ 2.09 % 之间；人工牛黄中回收率在 96.33 % ~ 99.71 % 之间，RSD 在 0.62 % ~ 4.31 % 之间，表明方法的准确度较好。

2.9 样品含量测定 取各牛黄样品粉末约 50 mg，精密称定，按照 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液。精密吸取混合对照品溶液 2 μ L 和供试品溶液各 4 μ L，注入高效液相色谱仪，按照 2.1 项下色谱条件分别测定，采用外标法分别计算各样品中各个组分的含量，其中样品 1 ~ 22 号为天然牛黄、23 ~ 27 号为人工牛黄、28 ~ 40 为体外培育牛黄，见表 3。

3 数据分析与讨论

3.1 3 种牛黄胆酸类成分的主成分分析 将样品含量测定结果数据导入 Simca-p 11.0 (Umetrics, umea, Sweden) 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)^[12] (见图 2)。提取出的第一主成分解释能力 42.5 %，对第一主成分贡献值最大的为甘氨酸胆酸钠、胆酸、牛磺胆酸钠；第二主成分解释能力 26.0 %，对其贡献值最大的是猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸，两个主成分的累计解释能力达 68.5 %。体外培育牛黄和天然牛黄在一定的差异，说明其批间和批次性，因而可看出猪去氧胆酸相对含量差异较大，分布相对较散；人工牛黄样品与天然牛黄样品相距甚远，差异显著。

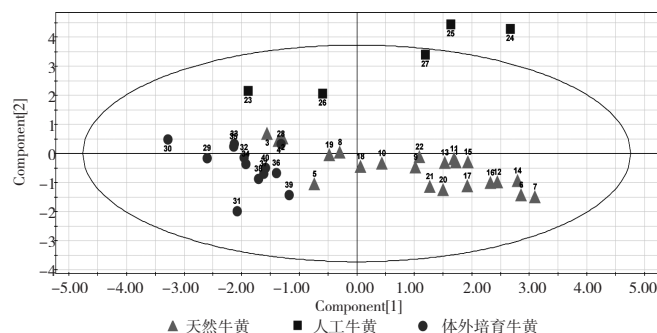


图 2 主成分分析散点图

Figure 2 Principal component analysis scatter plot

3.2 3 种牛黄胆汁酸成分的比较 牛磺熊去氧胆酸钠、熊去氧胆酸均未检出，说明 3 种牛黄可能不具备形成这 2 种成分的条件。猪去氧胆酸为人工牛黄特有成分，天然牛黄和体外培育牛黄中不应检出。表 3 中有部分天然牛黄和体外培育牛黄中检出少量的猪去氧

胆酸，待测样品可能掺有少量人工牛黄；样品 28 ~ 35 抽样年份较早，实验结果显示均不含牛磺胆酸钠与甘氨酸胆酸钠，是否为体外培育牛黄的真实存疑，故在进行 3 种牛黄中胆汁酸差异研究时，剔除这些批次的的数据。以 3 种牛黄的 10 种胆汁酸的平均值，做百分堆积条形图 (见图 3)。人工牛黄因含有大量猪去氧胆酸可区别于另外两种牛黄；体外培育牛黄中胆酸和去氧胆酸含量丰富，牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠含量相对较低；天然牛黄中胆酸、甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠、去氧胆酸四种胆汁酸含量丰富。以牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠之和为结合胆汁酸，其余为游离胆汁酸，做 3 种牛黄中不同类型胆汁酸的柱状图 (见图 4)。从总胆汁酸的含量上看，人工牛黄 > 体外培育牛黄 > 天然牛黄，尽管天然牛黄在临床上被认为疗效最佳，但其总胆汁酸含量却是 3 种牛黄中最少的。从结合胆汁酸含量比例来看，天然牛黄 > 人工牛黄 > 体外培育牛黄，天然牛黄的胆汁酸类成分中结合胆汁酸密度最高，通过相关文献^[13-14]报道，推测结合胆汁酸药理作用在某些方面优于游离胆汁酸，提示我们牛黄中结合胆汁酸含量可能与牛黄的某些疗效成正相关。

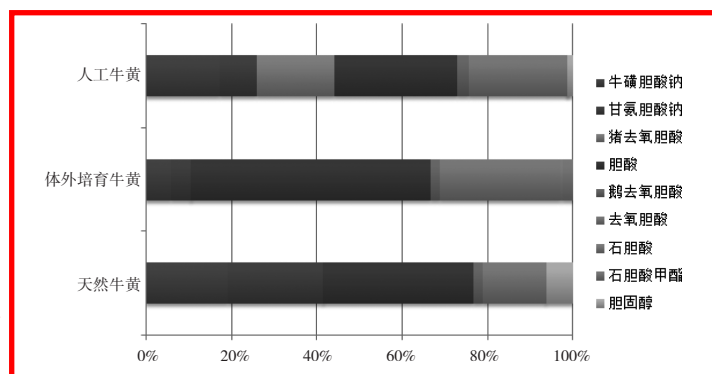


图 3 3 种牛黄中各胆汁酸含量比例条形图

Figure 3 The bar chart of the ratio of natural, artificial and in-vitro cultured Calculus Bovis

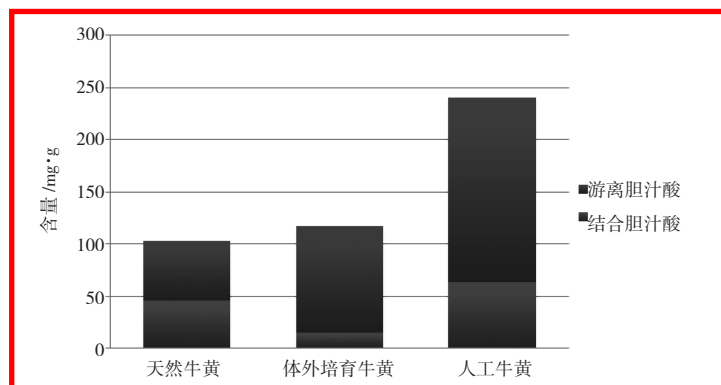


图 4 结合胆汁酸、游离胆汁酸、总胆汁酸的含量对比图

Figure 4 The comparison of the contents of conjugated, free and total bile acids

本方法可在 30 min 内有效分离 11 种成分,达到牛黄中结合胆汁酸和游离胆汁酸同时测定的目的,节约了分析时间,为控制牛黄质量提供了必要的手段。本研究显示不同种牛黄间胆汁酸的构成和含量差异较大,天然牛黄和人工牛黄的不同来源、不同批次间也有明显的差异,其中天然牛黄作为自然形成的产物,质量存在差异在所难免,但作为大生产所得的人工牛黄,其质量差异应在可控范围内。本研究结果提示当前亟需对其质量进行控制。本文所建立的方法涉及胆汁酸成分较多,属于较为通用的方法,也为其他胆汁酸类药物的分析提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 65-66、5-6、162.
- [2] 贾静, 孙佳明, 臧浩, 等. 天然牛黄化学成分及药理活性研究进展[J]. 吉林中医药, 2013, 33(3): 271-274.
- [3] 曹帅, 夏晶, 杨新华, 等. 3 种牛黄及安宫牛黄丸中总胆红素含量测定方法的优化[J]. 药物分析杂志, 2014(2): 329-334. 2014(2): 329-334.
- [4] 王利娜, 夏晶, 曹帅, 等. UV-VIS 与 HPLC 对牛黄类药材中胆红素含量的测定方法及影响因素分析[J]. 上海中医药大学学报, 2015(1): 70-74.
- [5] 曹帅, 夏, 钟吉强, 等. 牛黄及安宫牛黄丸中游离胆红素的 RP-HPLC 测定方法改进[J]. 中成药, 2014, 36(3): 536-540.
- [6] 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): 626-629.
- [7] 石岩, 孙冬梅, 魏锋, 等. 体外培育牛黄中主要胆酸类成分的测定[J]. 药物分析杂志, 2013(06): 1045-1047.
- [8] 邹秦文, 石岩, 刘薇, 等. 牛黄类药材各类成分定量检测研究方法概况[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 8-15.
- [9] 张启明, 李大勇, 严克东, 等. 培植牛黄与天然牛黄的化学成分比较研究 II、游离和结合胆汁酸的薄层定性和比较[J]. 生化药物杂志, 1991, 02: 50-52.
- [10] Qiao X, Ye M, Pan DL, et al. Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone: Simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(1): 107-117.
- [11] Kong WJ, Wang JB, Zang QC, et al. A novel "target constituent knock-out" strategy coupled with TLC, UPLC-ELSD and microcalorimetry for preliminary screening of antibacterial constituents in Calculus bovis [J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(30): 3565-3573.
- [12] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学中国药理学会, 2010, 15(5): 481-489.
- [13] 王冠, 许敏, 周华峰, 等. RP-HPLC 法测定蛇胆、鸡胆、猪胆的胆汁酸成分及其抑菌作用的研究[J]. 现代科学仪器, 2008, (3): 50-52.
- [14] 胡霞敏, 石朝周. 牛磺结合及其游离胆汁酸在小鼠镇咳祛痰抗炎模型上的作用比较[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 10(2): 85-88.

(编辑: 梁进权)

HPLC 法同时测定广东紫珠中 5 种有效成分的含量

郭殷锐, 苏雪芬, 张广唱, 王 剑(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立同时测定广东紫珠中连翘酯苷 B、金石蚕苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷及木犀草素的 HPLC 法; **方法** 采用 ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%乙酸水(20:80), 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 35℃。 **结果** 连翘酯苷 B、金石蚕苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷及木犀草素分别在 46.42~928.5 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$)、38.32~766.5 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$)、14.05~281.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$)、3.22~64.5 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$) 及 8.85~177.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$) 范围内线性关系良好, 加样回收率为 98.5%~100.9%。 **结论** 所建立的 HPLC 法简便快速、重复性好、结果准确可靠, 可作为广东紫珠药材质量标准控制的方法。

关键词: 广东紫珠; 高效液相色谱法; 紫珠中连翘酯苷 B; 金石蚕苷; 毛蕊花糖苷; 木犀草苷; 木犀草素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)04-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2016.04

收稿日期: 2015-10-15

作者简介: 郭殷锐, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药延缓衰老研究。Email: 75706868@qq.com。通信作者: 王剑, 博士, 硕士生导师。研究方向: 中医药延缓衰老研究。Email: zswj@gzucm.edu.cn。

基金项目: