

体外培育牛黄与天然牛黄指纹图谱的比较研究

丁 岗^{1*}, 盛龙生², 李明慧¹, 张 弦¹, 蔡宝昌¹

¹江苏中康药物科技有限公司, 南京 211100;

²中国药科大学分析测试中心, 南京 210009

【摘要】目的:研究、比较体外培育牛黄与天然牛黄的指纹图谱。方法:利用 TOFMS、HPLC/MS 技术研究、比较体外培育牛黄与天然牛黄中肽类、胆汁酸类和胆红素类 3 类成分的指纹图谱。结果:体外培育牛黄与天然牛黄 3 类成分的指纹基本一致,但各成分间的相对含量有差异。结论:10 批体外培育牛黄的指纹图谱有较好的一致性,说明体外培育牛黄的质量稳定。4 批天然牛黄的指纹图谱,尤其是胆汁酸类成分的指纹图谱差异明显,说明天然牛黄由于来源不同,导致质量不够稳定。

【关键词】 体外培育牛黄;天然牛黄;肽类;胆汁酸类;胆红素类;指纹图谱

【中图分类号】 TQ460.7+2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2004)05-0309-04

天然牛黄是名贵稀少中药材,加之疯牛病的困扰,其来源、产量均非常有限,已远不能满足社会需求。体外培育牛黄是模拟体内胆结石形成的原理和生化过程,在体外用牛胆汁培育的牛胆红素钙结石,为天然牛黄代用品,是具有自主知识产权的国家一类新药,研究表明其性状、结构、成分及其含量、药理、临床疗效与优质天然牛黄基本一致^[1-4]。

已知牛黄主要含有胆汁酸类、胆红素类及肽类、蛋白质类等成分^[5,6]。为较全面地比较体外培育牛黄与天然牛黄化学成分的异同,本文拟重点对体外培育牛黄和天然牛黄中上述 3 类成分的指纹图谱进行研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪, DAD 及 ESI/MSD 检测器,含在线脱气、二元高压泵、自动进样器、柱温箱(美国安捷伦公司)。LCT(TOFMS)高分辨质谱仪(英国 Micromass 公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯,醋酸铵、甲酸、磷酸、二甲亚砜为分析纯,水为超纯水。

1.3 药品

10 批体外培育牛黄、4 批天然牛黄(包括国产天然牛黄、西牛黄、巴西牛黄和印度牛黄)均由武汉大鹏药业有限公司提供。胆酸(cholic acid, 10078-0013)、去氧胆酸(deoxycholic acid, 0724-9305)对照品购自中国药品生物制品检定所,胆红素对照品购自美国 Sigma 公司。

2 试验方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取牛黄细粉约 50 mg,加 1%甲酸水溶液 10 ml 超声提取 30 min,离心,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过,用于检测氨基酸、肽类成分;残渣加 1%甲酸水溶液与甲醇的混合溶液(5:95, v/v) 10 ml 超声提取 30 min,离心,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过,用于检测胆汁酸类成分;残渣用 1%甲酸水溶液与甲醇的混合溶液(5:95, v/v)洗至无色后,加二甲亚砜 10 ml 超声提取 30 min,离心,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过,用于检测胆红素类成分。

2.2 对照品溶液的制备

取胆酸(cholic acid)和去氧胆酸(deoxycholic acid)对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,分别制成浓度为 1mg/ml 的对照品溶液。取胆红素(bilirubin)对照品适量,精密称定,加二甲亚砜适量,制成浓度为 0.5 mg/ml 的胆红素对照品溶液。

2.3 TOF-MS 分析条件

输注进样, ESI 正离子模式, 扫描范围 50 ~

【收稿日期】 2004-05-19

【*通讯作者】 丁岗, 副研究员, 江苏中康药物科技有限公司技术总监, Tel: 025-52127479, E-mail: dingg2000@mail.china.com

2 000,毛细管电压 3 000 V,离子源温度 100 ,去溶剂温度 150 ,干燥气(氮)流速 400 L/h。

2.4 HPLC(/MS)分析条件

2.4.1 酸水提取液的 HPLC/MS 分析条件 色谱柱:Zorbax 300SB C₈ 5 μm,4.6 mm ×12.5 mm(预柱) + Zorbax 300SB C₁₈ 2.1 mm ×150 mm(分析柱);柱温 30 ;流动相:A 为 0.1 %甲酸水,B 为含 0.1 %甲酸的乙腈,25 %B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 50 %B (10 min),流速 0.25 ml/min。质谱条件:扫描范围 100 ~ 1 000,干燥气流速 9 L/min,干燥气温度 350 ,雾化气压 35 Pa,传输电压 70 V,毛细管电压:正离子为 4 000 V,负离子为 3 500 V。进样 10 μl,记录时间 25 min。

2.4.2 酸醇提取液中有紫外吸收成分的 HPLC 分析条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈ 5 μm,4.6 mm × 12.5 mm(预柱) + Zorbax SB C₁₈ 5 μm,4.6 mm × 150 mm(分析柱);柱温 30 ;流动相:A 为 0.1 %磷酸水溶液,B 为甲醇/四氢呋喃 = 10/1,50 %B 等度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长:203,210,254,300,400 nm。进样 10 μl,记录时间 65 min。

2.4.3 酸醇提取液的 HPLC/MS 分析条件 除梯度调整为 30 %B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 50 %B (10 min),记录时间延长至 60 min,柱后分流 0.4 ml/min 外,其他条件与“2.4.1”项相同。

2.4.4 二甲亚砷提取液的 HPLC 分析条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈ 5 μm,4.6 mm ×12.5 mm(预柱) + Zorbax Eclipse XDB-C₈ 5 μm,4.6 mm ×150 mm(分析柱);柱温 30 ;流动相:A 为 0.1 %醋酸铵水,B 为乙腈/二甲亚砷 = 4/7,52 %B 等度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长 451 nm。进样 1 μl,记录 15 min。

2.4.5 二甲亚砷提取液的 HPLC/MS 分析条件 除流动相调整为 50 %B 等度洗脱,记录时间延长至 36 min 外,其他色谱条件与“2.4.4”项相同。质谱条件:柱后分流 0.4 ml/min,扫描范围 100 ~ 1 000,干燥气流速 9 L/min,干燥气温度 350 ,雾化气压 35 Pa,传输电压 70 V,毛细管电压:负离子为 3 500 V。

3 结果

3.1 酸水提取液的 TOFMS 分析

从 TOFMS 质谱图(见图 1、2)来看,体外培育牛黄酸水提取液中含有大量胆酸(cholic acid,M = 408,[M + Na]⁺ = 431,[M + K]⁺ = 447,[2M + Na]⁺ = 839,[2M + K]⁺ = 855)、少量牛磺胆酸(tauro-

cholic acid,M = 515,[M + Na]⁺ = 538,[M + K]⁺ = 554)和甘氨酸胆酸(glycocholic acid,M = 465,[M + Na]⁺ = 488,[M + K]⁺ = 504),以及微量带双电荷的分子量在 1 000 ~ 1 800 左右的寡肽,基本不含游离氨基酸。这与天然牛黄基本一致^[7]。

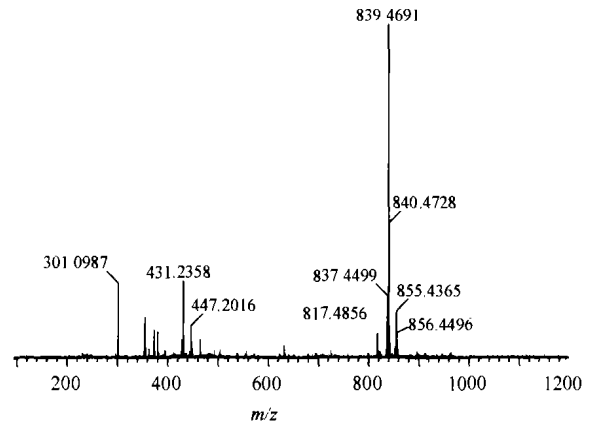


Fig 1 ESI (+) MS spectrum of acid aqueous extract of cultured Calculus Bovis (conditions see item“2.3”)

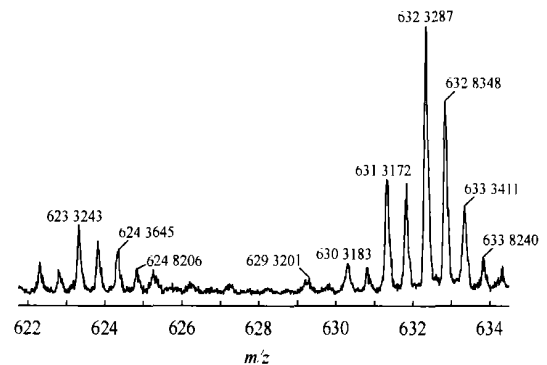


Fig 2 Partially magnified Fig 1

3.2 酸水提取液的 HPLC/MS 分析

体外培育牛黄酸水提取液主要含有结合型胆汁酸等水溶性成分(见图 3)。10 批体外培育牛黄酸水提取液 HPLC/MS TIC 叠加图见图 4。

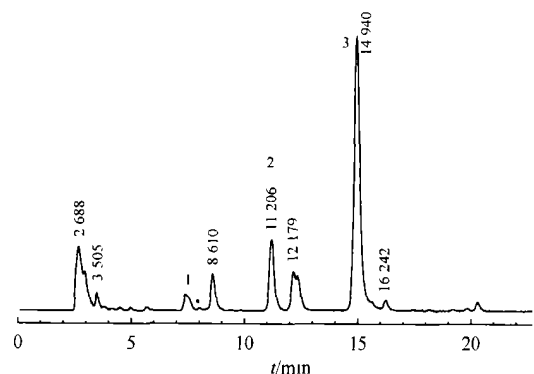


Fig 3 HPLC/MS TIC fingerprint of acid aqueous extract of cultured Calculus Bovis (conditions see item“2.4.1”)

1. taurocholic acid; 2. glycocholic acid; 3. cholic acid

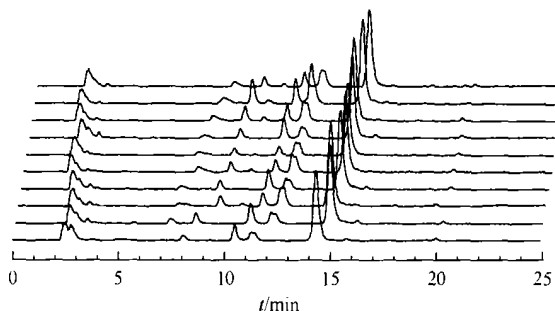


Fig 4 HPLC/MS TIC fingerprints overlapping plot of acid aqueous extracts of 10 batches cultured Calculus Bovis (conditions see item "2.4.1")

3.3 酸醇提取液中紫外吸收成分的 HPLC 分析

比较 203, 210, 254, 300 和 400 nm 5 个检测波长的 HPLC 图谱, 203, 210 nm 处信号很强, 但色谱峰较少; 300, 400 nm 处信号很弱, 且色谱峰不多; 254 nm 处色谱峰较多, 且信号强度适中。10 批体外培育牛黄酸醇提取液 HPLC 叠加图谱见图 5, 4 批天然牛黄与 1 批体外培育牛黄酸醇提取液的 HPLC 叠加图谱见图 6。显然, 体外培育牛黄与天然牛黄酸醇提取液中紫外吸收成分基本一致。

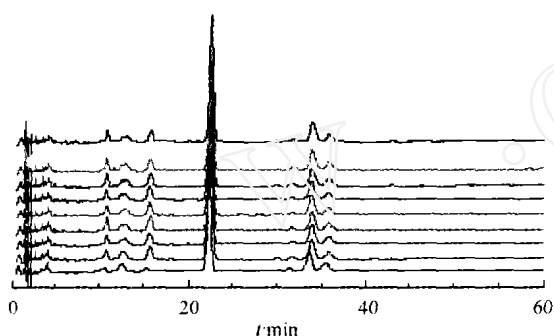


Fig 5 254 nm HPLC fingerprints overlapping plot of acid methanol extracts of 10 batches cultured Calculus Bovis (conditions see item "2.4.2")

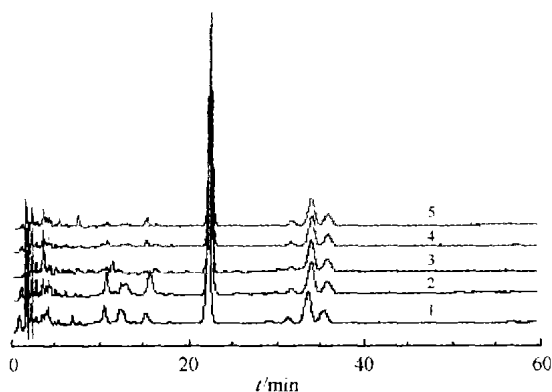


Fig 6 254 nm HPLC fingerprints overlapping plot of acid methanol extracts of 4 batches natural Calculus Bovis and 1 batch cultured Calculus Bovis (conditions see item "2.4.2")

1. domestic natural Calculus Bovis; 2. Cultured Calculus Bovis; 3. western Calculus Bovis; 4. Brazil Calculus Bovis; 5. India Calculus Bovis

3.4 酸醇提取液的 HPLC/MS 分析

酸醇提取液中主要含各种胆汁酸, 尤其是游离型胆汁酸类成分 (见图 7)。国产天然牛黄与体外培育牛黄酸醇提取液 HPLC/MS TIC 叠加图谱见图 8。

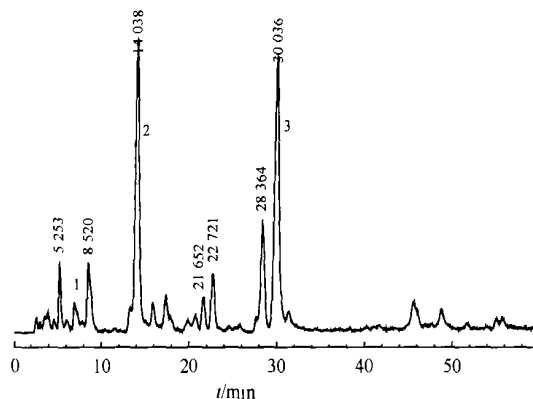


Fig 7 HPLC/MS TIC fingerprint of acid methanol extract of cultured Calculus Bovis (conditions see item "2.4.3")

1. glycocholic acid; 2. cholic acid; 3. deoxycholic acid

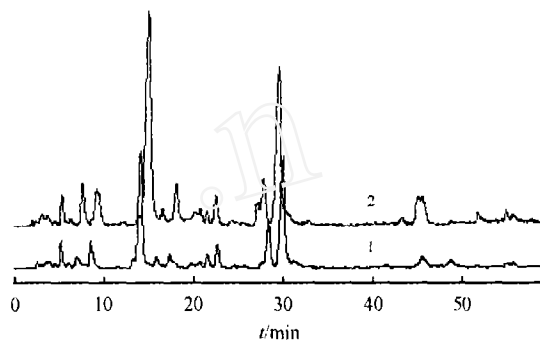


Fig 8 HPLC/MS TIC fingerprint comparison of acid methanol extract of domestic natural Calculus Bovis (1) and cultured Calculus Bovis (2) (conditions see item "2.4.3")

3.5 二甲亚砜提取液的 HPLC/MS 分析

10 批体外培育牛黄二甲亚砜提取液 HPLC 叠加图谱见图 9, 4 批天然牛黄与 1 批体外培育牛黄二甲亚砜提取液 HPLC 叠加图谱见图 10。显然, 体外培育牛黄与天然牛黄胆红素类成分的 HPLC 指纹图谱没有明显区别, 主要含胆红素及其各种异构体^[8,9] (HPLC/MS 图谱略)。

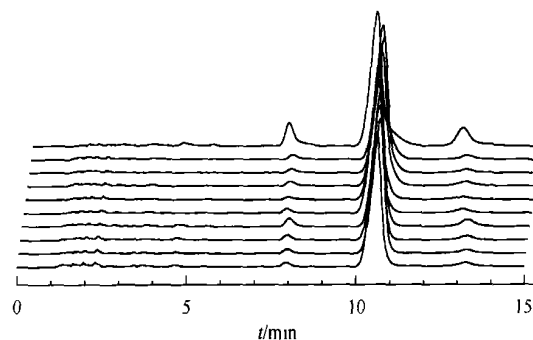


Fig 9 HPLC fingerprints overlapping plot of dimethylsulfoxide extracts of 10 batches cultured Calculus Bovis (conditions see item "2.4.4")

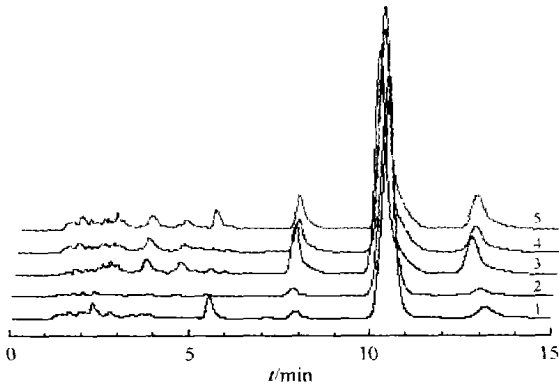


Fig 10 HPLC fingerprints overlapping plot of dimethylsulfoxide extracts of 4 batches natural Calculus Bovis and 1 batch cultured Calculus Bovis(conditions see item“2.4.4”)

1. domestic natural Calculus Bovis; 2. Cultured Calculus Bovis; 3. Brazil Calculus Bovis; 4. western Calculus Bovis; 5. India Calculus Bovis

4 讨论

1) 体外培育牛黄与天然牛黄三个提取部位(包括酸水、酸醇和二甲亚砷提取液)的肽类、胆汁酸类、胆红素类等成分,均基本一致,但相对含量有差异。

2) 10批体外培育牛黄三个提取部位(包括酸水、酸醇和二甲亚砷提取液)的 HPLC 指纹图谱有较好的一致性,说明体外培育牛黄的工艺是稳定的。

3) 酸水提取时,大部分游离型去氧胆酸类成分未能提取出来,直接用酸醇可以提取出各种胆汁酸。由于胆汁酸类成分的紫外吸收极弱,可用蒸发光散射器(ELSD)检测该类成分。4批天然牛黄之间胆汁酸类成分的相对含量有明显差异,因此胆汁酸类成分的 ELSD-HPLC 指纹图谱可以作为区别体外培育牛黄与天然牛黄、人工牛黄的有效手段^[10,11]。

4) 已发现酸水提取液中含有肽类成分,他们的一级结构等有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杜佐华(Du ZH),蔡红娇(Cai HJ),杨荣光(Yang RG),等.体外培育牛黄抗炎作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理(*Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol*),1996,7(1):27-29.
- [2] 徐以平(Xu YP),宋瑞琨(Song RK),石年(Shi N),等.体外培育牛黄的诱变性研究[J]. 癌变·畸变·突变(*Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*),2003,15(1):35-37.
- [3] 蔡红娇(Cai HJ),汪世元(Wang SY),刘烈刚(Liu LG),等.体外培育牛黄耐缺氧和清除自由基作用的研究[J]. 中药药理与临床(*Pharmacol Clin Chin Mater Med*),2003,19(6):20-22.
- [4] 蔡红娇(Cai HJ),汪世元(Wang SY),张渝候(Zhang YH),等.体外培育牛黄治疗流行性乙型脑炎的临床研究[J]. 华中科技大学学报(医学版)[*J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci)*],32(6):604-606.
- [5] 郝满良(Hao ML).我国牛黄研究进展[J]. 河北农业大学学报(*J Hebei Agric Univ*),1994,17(2):83-87.
- [6] 张启明(Zhang QM).天然牛黄的成分研究[J]. 中国生化药物杂志(*Chin J Biochem Pharm*),1995,16(1):27-30.
- [7] 张启明(Zhang QM),严克东(Yan KD),田颂九(Tian SJ),等.培植牛黄与天然牛黄化学成分比较研究.游离和总氨基酸的测定及比较[J]. 中药材(*J Chin Med Mater*),1990,14(9):15-17.
- [8] 尹华(Yin H),吴健敏(Wu JM),梁文藻(Liang WZ).胆红素异构体相对含量的 RP-HPLC 测定[J]. 药物分析杂志(*J Pharm Anal*),1992,12(6):338-339.
- [9] 尹华(Yin H),梁文藻(Liang WZ).高效液相色谱法研究牛黄中胆红素的存在形式[J]. 药物分析杂志(*J Pharm Anal*),1993,13(3):200-201.
- [10] Aldo R,Carolina C,Patrizia S, et al. Determination of free and amidated bile acids by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering mass detection[J]. *J Lipid Res*,1992,33:1393-1402.
- [11] 冯芳(Feng F),马永建(Ma Y),陈明(Chen M),等.反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定人工牛黄中多组分含量[J]. 药学学报(*Acta Pharm Sin*),2000,35(3):216-219.

Comparative Study on Fingerprints of Cultured and Natural Calculus Bovis

DING Gang^{1*}, SHENG Long-Sheng², LI Ming-Hui¹, ZHANG Xian¹, CAI Bao-Chang¹

¹Jiangsu Zhongkang Pharmaceutical Sci and Tech Inc., Nanjing 211100;

²Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【ABSTRACT】 AIM: To study the fingerprints of cultured and natural Calculus Bovis. METHOD: Analysis and comparison were made for the fingerprints of peptides, bile acids and bilirubins of cultured and natural Calculus Bovis by using TOFMS and HPLC/MS techniques. RESULT: The fingerprints of peptides, bile acids and bilirubins of cultured Calculus Bovis were similar to those of natural Calculus Bovis, but differences exist in the relative content of each constituent. CONCLUSION: The fingerprint repeatability of 10 batches cultured Calculus Bovis indicated that the quality of cultured Calculus Bovis was constant. The fingerprints of 4 batches natural Calculus Bovis, especially the fingerprints of bile acids revealed that the quality of natural Calculus Bovis was not constant because of different origins.

【KEY WORDS】 Cultured Calculus Bovis; Natural Calculus Bovis; Peptides; Bile acids; Bilirubins; Fingerprints