

# 体外培育牛黄的药学研究

蔡红娇\*, 裘法祖, 刘仁则

华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030

**【摘要】** 目的:解决牛黄原料匮乏问题,为民族医药工业发展提供充足的优质牛黄原料药。方法:根据胆红素钙结石体内形成的原理和生物化学过程,应用现代生物工程技术,在体外牛胆囊胆汁内培育牛胆红素钙结石(体外培育牛黄);采用电镜扫描、红外光谱法、紫外分光光度法等检测体外培育牛黄的性状、结构、成分和主要成分含量。结果:体外培育牛黄呈类球形,棕黄色;有同心层纹状结构,扫描电镜下见呈网状结构,网架富集胆红素钙颗粒;含胆红素、胆酸、胆固醇、磷脂、去氧胆酸、牛磺酸、糖蛋白、18种氨基酸及21种微量元素;在避光、密封、防潮条件下存放三年稳定。结论:体外培育牛黄的性状、结构、成分、含量与天然牛黄相似。

**【关键词】** 体外培育牛黄;成石胆汁;促发因素

**【中图分类号】** R282 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2004)06-0335-04

牛黄是牛胆结石,是传统的珍贵中药材,具有清心、豁痰、开窍、凉肝、息风、解毒功能,用于治疗高热神昏、惊厥抽搐、中风痰迷、癫痫发狂、咽喉肿瘤、口舌生疮、痈肿疔疮等疾病<sup>[1]</sup>。牛黄是我国600多种中成药的主要原料,然而牛体内自然成石率仅为1%~2%。因此,药源匮乏、价格昂贵。为了解决这一矛盾,本文作者在历经十多年研究人类胆结石形成机理的基础上,模拟胆红素钙结石在体内形成的原理和生物化学过程,应用现代生物工程技术,在体外牛胆囊胆汁内培育牛胆红素钙结石研究。

## 1 材料、仪器与试剂

### 1.1 材 料

新鲜牛胆汁,98%胆红素,氢氧化钙(分析纯),大肠杆菌(从天然牛黄核心培养而得)。

### 1.2 仪 器

**【收稿日期】** 2004-04-27

**【基金项目】** 国家863计划与星火计划资助项目

**【获奖项目】**“体外培育牛黄”项目,1993年获国家发明专利,1997年获国家一类中药新药证书,2002年获国家科技发明奖二等奖。(2004年1月SFDA批准体外培育牛黄正式可与天然牛黄等量投料使用)

**【通讯作者】** 蔡红娇,同济医科大学附属同济医院教授,2003年荣获中国药学会发展奖中药类, Tel:027-83663421

牛黄培育机(自行研制、专利产品),傅立叶变换红外光谱仪 NICOIET-170S、红外吸收光谱(IR)日本岛津 IR-440型红外分光光度计、紫外分光光度计扫描电镜、日立835-50型氨基酸分析仪等。

### 1.3 试 剂

胆红素、胆酸、去氧胆酸标准品(中国药品生物制品检定所提供);盐酸、冰醋酸、硫酸锌、硫酸镁均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 体外培育牛黄(ICCB)培育工艺

2.1.1 制备成石牛胆汁 在室温20~30℃条件下,将新鲜牛胆汁内(无菌)内加入1%大肠杆菌,培养3~5d后加入氢氧化钙饱和溶液,加热至沸。应用生物的、化学的、物理的方法,利用细菌酶的作用,消除胆汁内拮抗结石形成的因素,打破胆汁胶体平衡状态,改变牛胆汁的理化性质,使之成为成石牛胆汁,由正常胆汁到成石胆汁的变化如下:

结合胆红素 胆酸、去氧胆酸 胆酸钙;结合胆红素 游离胆红素 胆红素钙;卵磷脂 脂肪酸 脂肪酸钙;胆汁白蛋白含量由1.4 g/L增至2.0 g/L;胆汁电导率由4.80 s/m增至8.84 s/m。

2.1.2 促发胆结石核心形成 成石牛胆汁,通过促发物5%醋酸锌的作用,促使胆结石的核心形成。

2.1.3 分层培育过程 胆结石核心形成之后,将成石牛胆汁的容器,置于三维转动的牛黄培育机上,缓慢转动,用稀盐酸调节pH 6.8以下。棕红色球形物。分层逐渐增大,静置培育4 h以上。将棕红色球状物取出干燥即得牛胆红素钙结石(体外培育牛黄)。

## 2.2 体外培育牛黄性状和结构检测

2.2.1 性状 ICCB 呈球形或类球形,大小不一,直径0.5~3 cm。表面棕黄色,有的具龟裂纹,体轻,质松脆,断面金黄色,有同心层纹,气香,味苦而后甘,有清凉感,嚼之易碎不粘牙(见图1)。

### 2.2.2 结构

2.2.2.1 光学显微镜(10倍)观察 取少许粉末加50%甘油乙醇液装片,镜下见絮状、团絮状棕红色胆红素钙颗粒(见图2)。



Fig 1 The properties of in vitro cultivated Calculus bovis (1) and Natural Calculus bovis (2)

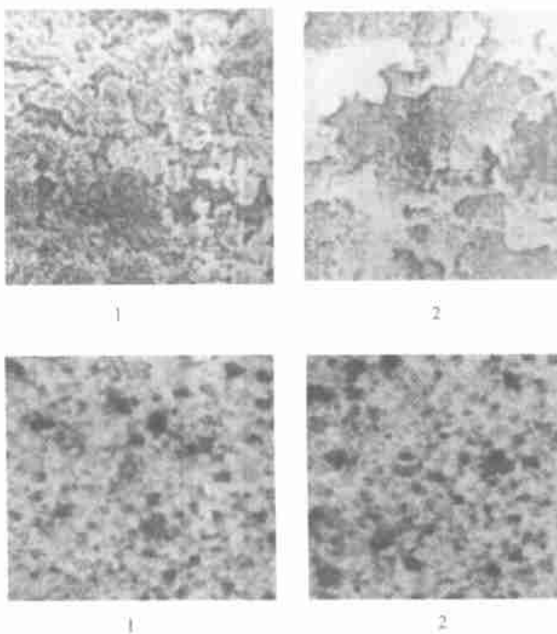


Fig 2 The structures of in vitro cultivated Calculus bovis (1) and natural Calculus bovis (2)

2.2.2.2 扫描电镜观察 见牛黄呈网状结构,网孔7~350 μm。

## 2.3 ICCB的主要有效基团分析 应用红外吸收

光谱(IR)分析(日本岛津 IR-440型红外分光光度计),参照红外分光光度法(《中国药典2000年版》一部附录VC),取体外培育牛黄及天然牛黄各少许,研磨,溴化钾压片,透射光谱法测定。红外吸收光谱中1730~1350 cm<sup>-1</sup>区间系列组峰为胆红素盐类及胆色素高聚物质的特征峰<sup>[2]</sup>,另外1690 cm<sup>-1</sup>为羧酸类,1629~1565 cm<sup>-1</sup>为酰胺类,1404 cm<sup>-1</sup>为羟基类,1044 cm<sup>-1</sup>为磷酸根(牛磺酸类)特征吸收峰。

## 2.4 主要成分含量测定

### 2.4.1 胆红素

2.4.1.1 对照品溶液的制备 取胆红素对照品约10 mg,精密称定,置100 ml棕色量瓶中,加氯仿溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5 ml于50 ml棕色量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀即得(每毫升中含胆红素0.01 mg)。

2.4.1.2 标准曲线制备 精密量取对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 ml置具塞试管中,分别加乙醇稀释至9 ml,各精密加重氮化溶液1 ml,摇匀,于15~20℃暗处放置1 h,以相应试剂作为空白,照分光光度法(《中国药典2000年版》一部附录VB),在533 nm的波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2.4.1.3 测定法 取体外培育牛黄细粉10 mg,精密称定,置锥形瓶中,加氯仿和乙醇(7:3)的混合溶液60 ml,盐酸1滴,摇匀,置水浴上回流加热30 min,放冷,移至100 ml棕色量瓶中。容器用少量混合溶剂洗涤,并入量瓶中用上述混合溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取3 ml,置具塞试管中,照标准曲线的制备项下的方法自“加乙醇稀释至9 ml”起,依法测定吸收度,从标准曲线中读出供试品溶液中的胆红素含量,即得。本品按干燥品计算,含胆红素(C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)不能少于35.0%。

2.4.2 游离胆红素 取本品细粉10 mg,加氯仿使成5 ml,微温、振摇、滤过、弃去初滤液,取续滤液。照分光光度法(中国药典2000年版一部附录VB)在453 nm波长处测定吸收度。本品吸收度不得过0.70。

2.4.3 胆酸 取本品适量,研细,取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,密塞,称定重量,超声处理30 min,放冷,再稳定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 ml,蒸干,残渣加20%氢氧化钠溶液10 ml,

加热回流 2 h,冷却,加稀盐酸 19 ml 调节 pH 至酸性,用醋酸乙酯振摇提取 4 次(25,25,20,20 ml),每次的醋酸乙酯提取液用同一铺有少量无水硫酸钠的脱脂棉滤过,滤液合并,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取 105 干燥至恒重的胆酸对照品适量,精密测定,加甲醇制成每毫升含 0.48 mg 的溶液,作为对照品溶液。按薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VIB)试验,精密吸取供试品溶液 2  $\mu$ l,对照品溶液 1  $\mu$ l 与 3  $\mu$ l,分别交叉点于同一硅胶 G 薄层板上,以异辛烷-醋酸丁酯-冰醋酸-甲酸(8:4:2:1)为展开剂,展距 14~17 cm,取出,晾干,喷以 30% 硫酸乙醇溶液,在 105 加热至斑点显色清晰,放冷,在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板,周围用胶布固定,照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VIB 薄层扫描法)进行扫描,波长  $\lambda_s = 380$  nm,  $\lambda_R = 650$  nm,测量供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值,计算,即得。本品按干燥品计算,含胆酸(C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>)不少于 6.0%。

2.4.4 胆固醇 乙醚加入胆石粉末中,胆固醇可以从胆石中被乙醚提出,蒸干乙醚后,加无水乙醇溶液,加入磷钼铁显色剂,使胆固醇呈紫红色,用已知标准对照液做对照,求其含量。方法:硫酸—高铁法,最后用 721 型分光光度计于 560 nm 波长处比色,测定吸收度,计算结果。本品含胆固醇 0.8%~3.0%。(采用 1980 年全国胆石胆汁分析班推荐方法。)

2.4.5 磷脂 胆汁及胆石中磷脂经乙醇加温提取后,用过氯酸消化,使磷从类脂性物质中分离,加入钼硫酸试剂使之结合成磷钼酸,异氯化亚锡还原成钼蓝,测出无机磷含量,然后再换成磷脂含量。用分光光度计于 640 nm 的波长处比色,以空白调零,测定吸收度值。本品卵磷脂含量为 1.75%~3.0%。(1980 年全国胆石胆汁分析班资料。)

2.4.6 去氧胆酸 用硫酸显色分光光度法测定。取体外培育牛黄粉末 50 mg,精密称定,用氢氧化钠液(0.01 mol/L)溶解,置 10 ml 量瓶中,并加至刻度。取其上清液 0.2 ml 加氢氧化钠液(0.01 mol/L)至 1 ml,加 65% 硫酸 5 ml,摇匀,置 60 水浴中保温 15 min,取出放入冷水浴中,冷却 20 min,在 389 nm 的波长处测定吸收度。本品含去氧胆酸(C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>)5.0%~7.0%。本法回收率为 103%。

2.4.7 氨基酸 精密称取体外培育牛黄粉末 100 mg,加盐酸液(0.01 mol/L)1 ml,进行水解,取上清液作为供试液,用日立 835~50 型氨基酸分析仪测定即得。本品含 18 种氨基酸。

2.4.8 牛磺酸 精密称取体外培育牛黄粉末 2 g,置 100 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,用滤纸过滤,弃去初滤液,精密量取续滤液 50 ml,加甲醛溶液 5 ml,摇匀,加酚酞指示剂 3 滴,用氢氧化钠液(0.01 mol/L)滴定,并将滴定的结果用空白试验校正,即得[每毫升氢氧化钠液(0.01 mol/L)相当于 12.3 mg 的 C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S]。本法回收率 101%。

2.4.9 微量元素测定 用等离子体直读光谱仪(法国 JY3848 型)测定。结果本品含 Ca、Fe、Zn 等 21 种元素。

2.4.10 糖蛋白 应用 Mentte M 和 Allen A 的 PAS 染色法和修典荣的改良 PAS 染色法进行二次平行测定,以美国 Sigma 公司提供的牛下颌腺糖蛋白对照品。本品糖蛋白含量为 1.8%~2.5%。

2.4.11 稳定性 通过热加速、光加速试验、温室试验和室温下存放三年半观察的结果表明 ICCB 在避光、密封、防潮的条件下存放三年是稳定的。

## 4 讨论

牛黄是牛科动物牛胆结石。应用现代生物工程技术,模拟体内胆红素钙结石形成的生化过程,在体外牛胆胆汁内培育的牛黄(牛胆红素钙结石)其性状、结构、微观结构、成份、含量均与优质天然牛黄一致,质量稳定、可控,不含猪去氧胆酸,能进行工业化生产,正好弥补了天然牛黄之不足。体外培育牛黄的成石过程是生物化学过程,是各种有效成分、有效基团自然组合的过程。正常胆汁到成石胆汁改变,为结石形成打下了物质基础,还需要促发因素,使胆汁中的蛋白凝固变性,去氧胆酸等物质形成络合物,有机和无机离组成混合配体络合分子簇,共同形成核心,红外光谱显示主要基团为羰基主峰 1680~1700 cm<sup>-1</sup>(C=O),有机和无机电解质的静电吸引(电导率说明),线性有机高分子物的吸附功能,和疏水亲脂作用的驱动<sup>[4]</sup>,互相靠近并形成分子簇集体。使成石胆汁内的胆红素钙、胆红素脂颗粒,向核心呈网状层层沉附、增大。使其达到优质天然牛黄相同的性状、结构、微观结构、成份、含量。国家批准正式生产,

并等同天然牛黄使用。工业化生产牛黄,解决了我国牛黄资源缺乏的问题,为我国民族医药工业的发展,提升含牛黄中成药的质量,发挥作用。

#### 参考文献

[1] 中华人民共和国药典(1990年版).一部[Z].1990:44.  
[2] 曾繁清(Zeng FQ).海 汇(Hai H),金利凡(Jin LF).人体胆结

石红外光谱的比较分析[J].光谱学与光谱分析(*Spectrosc Spectral Anal*),2001,26(6):314-316.  
[3] 蒋锡夔(Jiang XK),许国桢(Xu GZ).疏水亲脂作驱动的有机分子的簇集和自卷[J].化学学报(*Acta Pham Sin*),2000,58(6):601.  
[4] 梁文平(Liang WP),杨俊林(Yang JL).新世纪的物理化学学科前沿与展望[M].北京:科学出版社,2004.14-19.

## Studies on the Pharmacy of in-vitro Cultivated Calculus bovis (ICCB)

CAI Hong-Jiao ,QIU Fa-Zu ,LIU Ren-Ze

(Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical School of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**【ABSTRACT】** AIM:In order to resolve the shortage raw material of *Calculus bovis*. **METHOD** :ICCB(*in vitro* cultivated *Calculus bovis*) is prepared in ox bile by simulating the biochemical process of bilirubin calcium calculus formation and by employing bioengineering techniques. By chemical and instrumental analysis of that its properties ,structure ,components and content of ICCB. **RESULT** :ICCB is a round , brownish red color compound of net structure. Its main components include bilirulim ,cholic acid ,deoxycholic acid ,taurine ,protein ,lecithin ,amino acid *et al*. **CONCLUSION** :ICCB has same quality as that of natural *Calculus bovis* in terms of properties ,structure ,component and content.

**【KEY WORDS】** ICCB(*in vitro* cultivated *Calculus bovis*) ;Bile of forming calculus ;Simulating factors

**【Foundation Item】** This project was supported by the National 863 project.

### 行业动态

#### 绿叶集团重视天然药物国际专利保护

专利制度是目前国际通用的一种利用法律和经济手段鼓励发明创造、保护发明成果、推动科技进步的管理制度。专利制度的建立与完善对鼓励发明创造、繁荣科技、促进国际医药交流具有重要作用。绿叶集团非常重视利用高新技术并对开发的成果进行国内、国际专利保护。集团公司成立十年来不断加大科技投入,研发投入平均达年销售收入的6%。绿叶集团先后就七叶皂苷、匙羹藤、当归苯肽等项目研究开发成果申报了国内、国际专利,经过国内国外专利局的严格审查,已先后发出了给予这些产品发明专利的授权公告。其中,七叶皂苷钠于1999年、2002年和2004年先后获得中国和美国发明专利权,从而使绿叶集团以专利技术品质巩固了七叶皂苷钠在市场上的领导地位。采用高新技术对匙羹藤成分进行研究分析,获得多个新的活性化学成分并申请了多项国内专利和国际专利,于2003年先后获得中国、英国、德国、瑞士、法国五个国家的发明专利权。天然药物当归苯肽项目于2003年和2004年先后获得中国和美国发明专利的授权。

这些专利权的获得标志着绿叶集团的科技创新活动已取得成效,它们必将为企业在激烈的市场竞争中起到良好的保护和支撑作用,从而形成企业的核心竞争力。