

犀角及羚羊角替代资源的寻找与评价研究(II)

王斐¹, 段金赓^{2*}, 钱大玮³, 李友宾³(¹江苏省苏州市中医医院药剂科, 江苏 苏州 215003; ²南京中医药大学, 江苏 南京 210046; ³江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028)

摘要:目的 犀角及羚羊角替代资源的寻找与评价。方法 运用高效液相色谱法测定对八种角中牛磺酸及胆固醇进行分析, 运用分光光度法对其中的氨基己糖及游离蛋白进行了分析。结果 对角类药材中牛磺酸、胆固醇、氨基己糖、蛋白质进行了分析。结论 结果准确可靠、快速、灵敏、重现性好。研究结果提示, 牛磺酸可能是角类药材的活性物质之一; 不同种类角中的小分子成分组成相似, 但含量相差较大。

关键词:角类; 牛磺酸; 胆固醇; 氨基己糖; 蛋白质; 犀角; 羚羊角; 替代资源

中图分类号: R282.740.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-5005(2007)01-0036-04

动物的角同属皮肤衍化物的组织, 其结构和成分相似, 均由角质细胞组成。作者已对犀角 *Cornu Rhinoceri Asiatici*、广角 *Cornu Rhinoceri Africani*、羚羊角 *Cornu Saigae Tataricae*、藏羚羊角 *Cornu Pantholopsis Hodgsoni*、水牛角 *Cornu Bubali* 及黑、花、白 3 种牦牛角(yak horn) 中宏微量元素及氨基酸进行了报道^[1], 本文对上述不同来源角类药材中的牛磺酸、胆固醇、氨基己糖等成分进行分析。

1 实验材料

1.1 仪器

Waters-2695 型液相色谱仪(四元泵系统, 自动进样、在线脱气系统, 996 型检测器), Waters 高效液相仪, Alltech ELSO 2000 蒸发光散射检测器, Empower 色谱工作站, Millipore-Q 纯水器, Beckman DU-640 型紫外分光光度计(美国), Mettler Toledo 十万分之一电子天平, Mettler Toledo 万分之一电子天平, WH-3 微型漩涡混合仪, TDL-5-A 离心机。

1.2 试剂

牛磺酸对照品(上海化学有限公司, 纯度 $\geq 99\%$); 胆固醇(AR, 上海惠兴生化试剂有限公司); 氨基己糖对照品(sigma 公司); 牛血清白蛋白对照品(国药集团化学试剂有限公司)。甲醇为色

谱纯, 邻苯二甲醛、巯基乙醇、乙酰丙酮、对二甲氨基苯甲醛、考马斯亮蓝 G-250 为化学纯。0.4 mol/L 硼酸缓冲液: 称取硼酸 2.48 g 和氢氧化钠 1.14 g, 水溶解定容至 100 mL。

OPA 衍生剂: 称取 OPA 0.1 g, 用 10 mL 甲醇溶解, 加入巯基乙醇 0.1 mL, 用 0.4 mol/L 硼酸缓冲液定容至 100 mL, 临用现配。

乙酰丙酮试剂: 将乙酰丙酮 3 mL 溶解于 50 mL 的 0.5 mol/L NaCO₃ 溶液中, 临用现配。

对二甲氨基苯甲醛显色剂: 将对二甲氨基苯甲醛 0.8 g 溶解于 30 mL 50% 乙醇溶液和 30 mL 浓盐酸中。溶液保存在 -10℃。

考马斯亮蓝显色剂: 取考马斯亮蓝 100 mg 溶于 95% 乙醇 50 mL, 加蒸馏水约 800 mL, 再加 85% 磷酸 100 mL, 最后加水补足到 1 000 mL。

2 方法与结果

2.1 牛磺酸成分分析

牛磺酸测定可采用比色法、氨基酸自动分析法、衍生化高效液相色谱法^[2-4]等, 衍生化方法有邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生法、OPA 柱后衍生法、2, 4-二硝基氟苯(DNFB)柱前衍生法。本文采用 OPA 柱前衍生法, 首次对角类药材中的牛磺酸进行了测定分析。

2.1.1 样品处理

分别取角粉 1.0 g,置于锥形瓶内精密称定,加入蒸馏水 10 mL,精密称定。充分混匀,于水浴 100℃下提取 3 h,取出冷却后补足失重。将样品溶液在 3 600 r/min 下离心 15 min。取上清液备用。

2.1.2 对照品溶液的配制

精密称取牛磺酸对照品 7.26 mg,置 10 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度。再精密吸取该溶液 1 mL,用水稀释至 10 mL,配成浓度为 72.6 μg/mL 的牛磺酸标准溶液。

2.1.3 色谱条件

色谱柱 Alltima C₁₈ 柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm),柱温 30℃,流动相 A 为甲醇,流动相 B 为醋酸钠缓冲液(取醋酸钠 2.72 g,三乙胺 0.2 mL,加水至适量使溶解,用冰醋酸调节 pH 至 7.3 后,加水至 1 000 mL),A :B(32 :68),流速 1.0 mL/min;检

表 1 不同种类角中牛磺酸含量测定结果

动物角	犀角	广角	羚羊角	藏羚羊角	水牛角	白牦牛角	花牦牛角	黑牦牛角
牛磺酸含量/μg·g ⁻¹	8.73	7.21	56.86	22.15	8.46	24.32	32.82	36.38

2.2 胆固醇成分分析

胆固醇测定可采用比色法、高效液相色谱法、气相色谱法^[5-7]。刘建国^[8]曾运用紫外分光光度对鹅喉羚羊角、黄羊角、山羊角和绵羊角中的胆固醇进行了测定。本实验首次建立了动物角中胆固醇的 HPLC-ELSD 分析方法。

2.2.1 样品制备

2.2.1.1 总胆固醇提取

取各角粉约 0.6 g,精密称定。再分别加 30% 氢氧化钾溶液和 95% 乙醇各 3 mL,水浴 60℃加热 4 h,取出冷却,静置 12 h。用石油醚 80 mL 分 4 次萃取,萃取液用 30 mL 水洗 2 次。将石油醚挥干,再用甲醇定容至 5 mL。

2.2.1.2 游离胆固醇提取

取各角粉约 0.6 g,精密称定。再加入甲醇 5 mL,精密称定,静置 24 h 后补足失重。将样品溶液在 3 600 r/min 下离心 15 min,吸取上清液,滤过(膜孔径 0.45 μm),备用。

2.2.2 对照品溶液的配制

精密称取胆固醇对照品 24.24 mg,置 10 mL

测波长 327 nm。

2.1.4 衍生化反应

吸取样品液 2 mL 于 5 mL 磨口试管中,准确加入 OPA 衍生剂 2 mL,充分摇匀经水膜过滤后,迅速进样。所有样品及对照品从反应至进样的时间保持一致,并控制在 2 min 以内。

2.1.5 标准曲线的制备

取上述对照品溶液分别进样 1、2、3、5、15 μL,以上述 HPLC 色谱条件测定,以含量为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得牛磺酸的回归方程为 $Y=1.28 \times 10^6 X - 3.02 \times 10^4$, $r=0.999 8$,结果表明牛磺酸在 0.073 ~ 1.089 μg 范围内呈良好线性关系。

2.1.6 样品测定

取各角粉按上述制备方法制得供试品溶液,在上述 HPLC 色谱条件下进 20 μL 测定,各角中牛磺酸含量结果见表 1。

量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度。再精密吸取该溶液 1 mL,用甲醇稀释至 10 mL,得浓度为 0.242 4 mg/mL 的胆固醇对照品溶液。

2.2.3 色谱条件

μ-Bondpak C₁₈ 柱(10 μm, 300 mm×3.9 mm);流动相:甲醇—水(92 :8);流速:1 mL/min;柱温:35℃;ELSD 漂移管温度:80℃;气流量:1.8 L/min;进样量:10 μL。

2.2.4 标准曲线的制备

取上述对照品溶液分别进样 1、5、10、15、20、30 μL,以上述 HPLC 色谱条件测定,以进样量的常用对数为横坐标,以峰面积的常用对数为纵坐标,绘制标准曲线,得胆固醇的回归方程为 $\lg Y=1.53 \lg X+5.36$, $r=0.999 9$,结果表明胆固醇在 0.242 4 ~ 7.272 μg 范围内呈良好线性关系。

2.2.5 样品测定

取各角粉按上述制备方法制得供试品溶液,在上述 HPLC 色谱条件下进 10 μL 测定样品,测定结果见表 2。

表 2 不同种类角中胆固醇含量测定结果

样品	黑牦牛角	花牦牛角	白牦牛角	水牛角	藏羚羊角	羚羊角	广角	犀角
游离胆固醇含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	3.612 4	3.727 2	3.773 6	2.848 2	2.403 6	2.396 8	2.840 4	3.101 5
总胆固醇含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	3.626 8	3.964 1	3.890 2	2.979 7	2.410 5	2.608 4	3.050 4	3.479 2

2.3 氨基己糖成分分析

运用分光光度法对动物角中的氨基己糖进行了分析,首次建立了动物角中的氨基己糖分析方法。

2.3.1 样品制备

取各角粉 0.4 g,精密称定,各加入 6 mol/L HCl 3 mL,在 80 °C 水浴中水解 2 h,取出冷却,静置 12 h。用 6 mol/L NaOH 调至中性,过滤,滤液在沸水浴中蒸至近干,加水定容至 10 mL。

2.3.2 对照品溶液的配制

氨基己糖对照品:将 68.36 mg 氨基葡萄糖溶解于 100 mL 蒸馏水中,配成浓度为 683.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.3.3 检测波长的确定

按照 Elson-Morgan 法^[9],精密吸取氨基己糖对照品溶液 1 mL,分别加水补足至 2 mL。各加入 1 mL 乙酰丙酮试剂,置于沸水浴中 25 min,取出冷

却,加无水乙醇 3 mL 和对二氨基苯甲醛显色剂 1 mL,60 °C 水浴中保温 90 min,在 450 ~ 600 nm 处进行波长扫描,在 527 nm 有最大吸收。

2.3.4 标准曲线的制备

精密吸取氨基己糖对照品 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mL,分别加水补足至 2 mL。方法同 2.3 项下,在 527 nm 处测定吸光度。将浓度和吸光度进行回归,得回归方程: $Y = 0.003 1X + 0.151 6$, $r = 0.995$ 。

2.3.5 样品测定

吸取样品液 2 mL,方法同“2.3 项”下,测定。

2.3.6 样品空白测定

吸取样品液 2 mL,方法同“2.3 项”下,测定。

2.3.7 样品测定结果

取各角粉按上述制备方法制备供试品溶液及空白样品溶液。在 527 nm 处测定吸光度,测定结果见表 3。

表 3 不同种类角中氨基己糖含量测定结果

样品	黑牦牛角	花牦牛角	白牦牛角	水牛角	藏羚羊角	羚羊角	广角	犀角
氨基己糖/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	1.923	1.899	1.932	1.940	1.955	1.925	1.915	1.915

2.4 蛋白质

动物角的化学成分主为角蛋白(keratin),角蛋白是一种不溶于水、乙醇,不被胃蛋白酶、胰蛋白酶水解的一种蛋白质。除角蛋白之外,动物角中还含有可溶性蛋白,它们可以通过提取获得。蛋白定量分析有凯氏法、双缩脲法、考马斯亮蓝法等,本实验采用考马斯亮蓝法对角中水溶性蛋白类成分进行了分析测定。

2.4.1 样品制备

分别取各角粉约 1.0 g,精密称定。加水 10 mL,充分混匀,在 100 °C 水浴中放置 3 h,取出冷却,补足失重,再于 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,备用。

2.4.2 对照品液的配制

牛血清白蛋白对照品:称取 51.73 mg 牛血清蛋白于 10 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。再精密吸取 1 mL,加水稀释至 10 mL,配制成浓度为 0.517 3 mg/mL 对照品溶液。

2.4.3 标准曲线的制备

精密吸取标准液 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mL,分别加水补足 0.5 mL。各加入 5 mL 考马斯亮蓝显色剂,充分混匀,于 595 nm 处测定吸光值。将浓度和吸光度进行回归,得回归方程: $Y = 5.426 9X + 0.095 2$, $r = 0.995$ 。

2.4.4 样品游离总蛋白测定结果

吸取各样品液 0.3 mL,加水补足 0.5 mL,再加入考马斯亮蓝显色剂 5 mL,充分混匀,于 595 nm 处测定吸光度。结果见表 4。

表 4 不同种类角中水溶性蛋白类成分测定结果

样品名称	牦牛角	水牛角	藏羚羊角	羚羊角	广角	犀角
游离蛋白含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	4.61	3.28	7.72	7.74	5.69	6.70

3 讨论

(1) 羚羊角中的牛磺酸含量最高;3 种牦牛角

中的牛磺酸含量接近;水牛角中牛磺酸含量较低,但它与犀角、广角中牛磺酸含量较为接近。牛磺

酸具有消炎镇痛等作用,对婴儿大脑发育、神经传导以及钙的吸收有良好的作用^[10]。这些作用与犀(广)角镇静安神作用及羚羊角解痉作用极为相似。牛磺酸本身无紫外吸收,需经衍生才能产生紫外吸收,衍生物经 C₁₈柱分离后,在 327 nm 处有最大吸收,且此波长无干扰峰影响。

(2)表 2 显示各角游离胆固醇与总胆固醇含量相近,说明角中的胆固醇以游离态存在。3 种牦牛角及水牛角的胆固醇与犀(广)角接近,藏羚羊角与羚羊角中胆固醇的含量相近。

胆固醇属于甾醇,用薄层及比色法分离测定,容易产生干扰。应用蒸发光散射检测器,建立 HPLC 法测定胆固醇含量,可消除末端吸收的影响。

(3)本文建立了首次对犀广角、羚羊角等动物角中氨基己糖进行分析,各角氨基己糖含量相近,都在 1.9 μg/g 左右。

(4)表 4 显示藏羚羊角与羚羊角游离蛋白含量最高(约为 7.7 mg/g),其次是犀角、广角及牦牛角,最低的为水牛角,含量不足羚羊角的一半。

(5)分别对牛磺酸、胆固醇、氨基己糖分析方法进行的部分方法学考察,结果表明方法稳定可靠。

参考文献:

- [1] 王斐,段金廛,钱大玮,等. 犀角及羚羊角替代资源的寻找与评价研究(I)[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 2(3): 163.
- [2] 黄果,郭玲. 牛磺酸片含量测定方法的研究[J]. 药品监督, 2001, 10(5): 34.
- [3] 陈丹,孙晓秋. 梅花鹿茸和马鹿茸中的牛磺酸的测定[J]. 经济动物学报, 1998, 2(4): 24.
- [4] 杨祖英,张平伟. 高效液相色谱法测定食品中的牛磺酸[J]. 卫生研究, 1998, 27, (3): 192.
- [5] 曹勤松. 两种测定鸡蛋胆固醇方法的比较[J]. 食品科学, 1996, 17(9): 48.
- [6] Iwata T, Yamaguchi H, Nakamura M. Highly Sensitive and Simple Determination of Cholesterol and Cholestanol in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection[J]. J. Chromatog, 1987, 421: 43.
- [7] 张启明,严克东,钱丽华. 气相色谱法测定牛黄中的胆固醇的含量[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(7): 426.
- [8] 刘建国. 羚羊角代用品——鹅喉羚羊角、黄羊角、山羊角和绵羊角的胆固醇分离和测定[J]. 北京中医学院学报, 1982, (3): 42.
- [9] 张豁中,温玉麟. 动物活性成分化学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1995. 1033.
- [10] 陆淳,田富春,苏海龙,等. 食品中牛磺酸的测定[J]. 食品工业, 2001, 29(5): 29.

(编辑:李伟东)

Searching for Substitutes for Cornu Rhinoceri Asiatici and Cornu Saigae Tataricae and Evaluation (II)

WANG Fei¹, DUAN Jinao², QIAN Da-wei³, LI You-bin³

(¹Pharmaceutical Department of Suzhou Municipal TCM Hospital, Suzhou, Jiangsu, 215003, China; ²Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210029, China; ³TCM Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu, 210028, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To search for the substitutes for Cornu Rhinoceri Asiatici and Cornu Saigae Tataricae and make evaluations. **METHOD** HPLC method was used to analyze aminoethylsulfonic acid and cholesterol, and spectrophotometry was used to analyze aminohexose and free protein in eight kinds of horns. **RESULT** Analyses were made on aminoethylsulfonic acid, cholesterol, spectrophotometry, aminohexose and protein. **CONCLUSION** The method was accurate, speedy and sensitive, with good reproducibility. The result shows that aminoethylsulfonic acid might be one of the active substances in medicated horns, with similar constituents in the micromolecules of different kinds of horns but different contents.

KEY WORDS: horns; aminoethylsulfonic acid; cholesterol; aminohexose; protein; Cornu Rhinoceri Asiatici; Cornu Saigae Tataricae; substitutes

·征订·

《南京中医药大学学报(社会科学版)》1999年创刊(季刊),由江苏省教育厅主管、南京中医药大学主办,国内外公开发行人。设有中医文化、哲学、史学、文献研究、人物、教育研究等专栏,刊登中医文化、哲学、经济、中医学史、中医文献、医学心理、医学伦理、中医海内外教育等方面的学术论文。读者对象为高等中医药院校、科研单位的教学、科研人员,以及广大传统文化、中医药学的爱好者。每期62页,定价5.00元,全年定价20.00元。逢3、6、9、12月18日出版。国际标准刊号 ISSN1009-3222,国内统一刊号 CN32-1561/C。可向编辑部直接购买,请与张秀春老师联系。地址:南京仙林大学城仙林大道138号南京中医药大学42号信箱;邮编:210046;电话:(025)85811935; E-mail: sb@njutcm.edu.cn。