

牛黄及其代用品胆酸类物质分析方法研究进展

彭 灿¹, 吕蒙莹¹, 李 耕¹, 田稷馨¹, 田 媛¹, 张尊建^{1,2*}

1. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

2. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

摘 要: 复杂的化学成分是中药发挥预防、治疗疾病的物质基础, 作为牛黄及其代用品中的重要活性成分之一, 胆酸类物质一直是关注的焦点。综述了近年来牛黄及其代用品中胆酸类物质分析方法的研究概况, 为牛黄及其代用品的质量标准、物质基础和体内代谢研究提供了方法和依据。

关键词: 牛黄; 胆酸; 薄层扫描法; 毛细管电泳法; 物质基础

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)05-0632-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.026

Research progress in analytical methods of cholic acids in *Bovis Calculus* and its substitutes

PENG Can¹, LV Meng-ying¹, LI Geng¹, TIAN Ji-xin¹, TIAN Yuan¹, ZHANG Zun-jian^{1,2}

1. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Key words: *Bovis Calculus*; cholic acids; TLC scanning method; capillary electrophoresis; material basis

牛黄 *Bovis Calculus* 为牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的干燥胆结石, 始载于《神农本草经》, 作为名贵中药已有两千多年的历史, 其味苦, 性凉, 具有清心、开窍、凉肝、熄风等功效。现代药理学研究已证明牛黄具有解热、镇痛、止咳、祛痰、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等功效^[1-5], 目前已和其他药物组成众多中成药制剂, 广泛用于中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统疾病的治疗。由于天然牛黄具有极高的药用价值, 国内外学者长期以来致力于寻找天然牛黄的代用品(人工牛黄、培植牛黄、体外培育牛黄等), 以期缓解天然牛黄来源有限的难题。

牛黄及其代用品主要活性成分研究已有大量报道, 定量研究主要集中于胆酸类物质、胆红素、牛磺酸、胆固醇、氨基酸及微量金属元素等, 胆酸类物质是牛黄的主要活性成分之一, 也是评价牛黄及其代用品品质的重要指标之一。牛黄及其代用品中主要含有胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸等游离型胆酸以及甘氨酸胆酸、牛磺胆酸等结合型胆酸, 胆酸

类物质决定了牛黄及其代用品的抗炎、抗过敏、抗病毒等功效^[6]。《中国药典》2010年版采用薄层色谱法及紫外-可见分光光度法分别测定牛黄及人工牛黄中总胆酸的量, 规定其质量分数不应低于13%和4%。本文着重就牛黄及其代用品中胆酸类物质现有的分析方法进行综述。

1 薄层扫描法

薄层扫描(TLCS)法具有分离度高的优点, 适用于成分复杂的中药定量测定, 主要包括单波长扫描法和双波长扫描法。TLCS法作为传统分析方法已长期用于牛黄及其代用品中的胆酸类物质定量分析, 郝美玲等^[7]采用单波长扫描法($\lambda=380\text{ nm}$), 以乙酸-硫酸-醋酸酐(10:1:1)为显色体系, 测定蒙药给旺-13和古日古木-13中胆酸的量, 均取得较为满意的结果; 常增荣等^[8]应用薄层扫描反射锯齿法系统比较了不同的溶剂展开系统, 成功测定了天然牛黄中胆酸的量; 张兰珍等^[9]采用TLCS法就牛黄制剂中胆酸类成分的提取溶剂、提取方法、净

收稿日期: 2012-09-19

基金项目: 中央高校基础研究基金(JKY2011037); 先声药业研究生创新基金(CX11B-003XS)

作者简介: 彭 灿, 男, 博士研究生, 主要从事药物现代仪器分析及代谢组学研究。Tel: (025)83271185 E-mail: pecan@vip.qq.com

*通信作者 张尊建, 男, 教授, 博士生导师。Tel: (025)83271185 E-mail: zjzhang99@sina.com

化方法以及色谱条件等进行了系统研究,最终确定了采用经盐酸酸化的醋酸乙酯溶液超声提取为最佳提取、净化方法,环己烷-醋酸乙酯-冰醋酸(4:4:1)或异辛烷-醋酸乙酯-冰醋酸(15:7:5)为最佳溶剂展开系统,5%磷钼酸为显色剂,测定波长 λ_s 为 680 nm, λ_R 为 495 nm。

2 紫外-可见分光光度法

2.1 糠醛比色法

由于胆酸类物质为甾体类化合物,没有共轭结构,导致此类物质无紫外吸收,《中国药典》2010年版采用糠醛比色法测定人工牛黄及其制剂中胆酸类物质的量。刘姗姗等^[10]通过增设糠醛空白液,基本上消除了糠醛和硫酸反应过程中产生的颜色干扰。王维礼等^[11]利用经活性炭脱色的糠醛溶液测定样品中胆酸类物质的量,彻底消除了颜色所导致的误差。此外,在此方法的基础上还做了更进一步的探索,诸如一阶导数光谱法^[12]、二阶导数光谱法^[13]等的应用,消除了其他因素的干扰,一定程度上提高了此法的准确性和专属性。

2.2 紫外-可见分光光度法

由于胆酸类物质的甾醇类结构,导致使用紫外检测需进行衍生化处理,一定程度上限制了此法的应用。赵中杰等^[14]以硫酸溶液为提取显色试剂,在对其实验条件和方法进行了较为系统的考察后,最终建立了一套用于测定天然牛黄、培植牛黄及人工牛黄中胆酸的紫外分光光度法,并将实验结果与《中国药典》规定的糠醛比色法进行比较,证实该方法具有良好的准确性和适用性,可用于牛黄及其代用品中胆酸类物质的测定。在此基础上,刘立丰^[15]采用紫外分光光度法较为准确地测定了牛黄消炎片胆酸类物质的量;鄢海燕等^[16]采用紫外分光光度法测定熊胆粉、猪胆粉、牛胆粉及鸡胆粉中总胆酸的量并对其抑菌效果进行了评价,该方法分别以胆酸和熊去氧胆酸为对照品,以硫酸-水(50:50)为显色试剂,于 388 nm 波长处测定各物质中总胆酸的量,为牛黄及其代用品体外质控方法提供了很好的借鉴。但是,该方法利用胆酸类物质与硫酸发生脱水反应后形成共轭双键所产生的紫外吸收峰对胆酸类物质进行定量^[17],测定结果受实验条件(水浴温度、水浴时间、振摇时间)的影响较大;且该方法仅仅以胆酸和熊去氧胆酸为对照品对不同品种来源样品中的胆酸类物质进行定量分析,方法的准确性和全面性仍有待商榷。

3 毛细管电泳法

随着研究的不断深入,发现不同类型的胆酸具有不同的药理活性^[18-21],因此对此类物质的定量分析提出了更高的要求,而糠醛比色法、TLCS 和紫外-可见分光光度法只能测定以胆酸为指标的胆酸类物质的总量,无法对每种胆酸成分进行准确的定量分析,且样品前处理方法较为复杂,极大地影响了上述方法的便捷性和准确度。近年来,具有高分辨率、高灵敏度、高分离效率的毛细管电泳法越来越多地应用于复杂成分的检测分离^[22]。Rodriguez 等^[23]将胶束电动色谱法(MEKC)成功应用于去氧胆酸、熊去氧胆酸和猪去氧胆酸固体制剂分析,并做了完整的方法学验证;郑建新等^[24]采用十二烷基硫酸钠、磷酸氢二钠溶液体系,结合二极管阵列检测器,建立了测定胆酸的毛细管电泳法,并成功应用于人工牛黄中胆酸的测定;Zhen 等^[25]建立了人工牛黄及其 4 种制剂中胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的 MEKC 分析方法,在 11 min 内即实现了良好的分离和检测,为牛黄及其他含有胆酸类的药物制剂的质量控制提供了新的途径。

4 高效液相色谱法

高效液相色谱(HPLC)因其具有广泛的溶剂系统选择性和优秀的分离能力,已被广泛用于药物尤其是有效成分复杂中药的定性、定量分析,超高效液相色谱技术(UPLC)的诞生更是极大地缩短了分析时间和提高了分离效果,促进了该分析方法的进一步发展。由于胆酸类物质缺乏相应的生色团,导致最为常用的 HPLC-UV 系统应用于此类成分的分析时需经过衍生化处理^[26],而高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用技术(HPLC-ELSD)、高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)的应用,显著改善了胆酸类物质分离检测的准确度和灵敏度,为 HPLC 应用于此类成分的研究奠定了基础。

4.1 HPLC-ELSD 联用技术

ELSD 是一种质量型通用检测器,可用于多组分的同时分离分析,与紫外检测器只对具有共轭基团物质才有响应的特点相比,具有更为广泛的适用性。此外,该检测器对不同物质有近似相同的响应因子,有利于不同比例混合物的定量分析,对于中药多组分的同时测定具有显著优势。近年来,利用 HPLC-ELSD 联用技术分析牛黄及其复方制剂中胆酸类物质的研究屡见报道。冯芳等^[27]利用 HPLC-ELSD 联用技术同时测定了人工牛黄中 4 种胆酸类

物质(胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸)和胆固醇的量,各物质色谱峰面积与浓度呈良好线性关系,最低检出量在 0.05~0.106 μg 。李珂等^[28]利用建立的 HPLC-ELSD 法比较分析了酶促牛黄和天然牛黄中胆酸、去氧胆酸、石胆酸等 6 种胆酸类成分,为评价牛黄替代品——酶促牛黄的质量和实用价值提供了参考。Kong 等^[29-30]以 0.2%甲酸水溶液-乙腈为流动相建立了 UPLC-ELSD 方法,于 11 min 内成功分离检测牛黄及其制剂中 5 种胆酸衍生物,分析时间明显缩短,检测限低至 2.0 ng/mL,极大地提高了检测胆酸类物质的灵敏度,并结合主成分分析法比较分析了 20 批牛黄及其代用品中主要胆酸类成分及胆固醇的量,进一步完善了牛黄及其代用品的质量控制标准。此外, Kong 等^[31]采用 UPLC-ELSD 结合指纹图谱技术,对 10 批不同来源的人工牛黄进行相似性分析和聚类分析,同时利用微量热法对 10 批样品中的抗菌成分进行多线性回归分析,结果表明药物的产地和来源对人工牛黄的化学指纹图谱和抗菌能力具有重要影响,认为胆酸、牛磺胆酸钠、猪去氧胆酸和一种未知的化合物是人工牛黄的主要活性成分,应作为该药物的质控指标。

4.2 HPLC-MS 联用技术

近年来, HPLC-MS 联用技术因其所具有的高灵敏度和高选择性的特点越来越广泛的应用于药物的体内外定性、定量分析,尤其是三重四级杆质谱的选择性反应监测(SRM)模式具有更高的灵敏度和质量分辨率。迄今为止,已有大量文献报道采用 HPLC-MS 联用技术对动物及人体内尿液、血浆、组织内胆酸类成分进行了系统研究^[32-34],然而此项技术用于牛黄及其代用品的胆酸类成分分析却鲜有报道。Qiao 等^[35]采用 HPLC-MS/MS 联用技术同时定性、定量分析了 6 种游离胆酸(胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、石胆酸)及甘氨酸和牛磺酸结合胆酸等 18 种胆酸成分,并进一步应用于分析鉴别熊胆、蛇胆、牛胆、猪胆、牛黄及天然牛黄 6 种来源于动物胆汁的中药及其复方制剂。该方法采用 Atlantis d C₁₈ 色谱柱,选用负离子多反应监测模式,以去氢胆酸为内标,甲醇-乙腈-醋酸铵水溶液为洗脱溶剂,所有 18 种胆酸待测物均显示出良好的线性关系($r^2 > 0.993$)。赵艳红等^[36]利用 HPLC-MS 联用技术测定了小鼠血浆和组织中 10 种胆酸类物质的量,并成功应用于比较研究天然

牛黄和安宫牛黄丸中 4 种胆酸类物质(胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸及牛磺鹅去氧胆酸)在小鼠体内的药动学过程,从药动学角度阐释了安宫牛黄丸和天然牛黄间药理学差异的原因,证实安宫牛黄丸中的非牛黄成分有效促进了胆酸类物质在体内的吸收和分布,该方法具有较高的灵敏度和特异性,为牛黄及其代用品中胆酸类物质的体内药动学研究提供了参考。

5 其他

除胆酸类成分外,牛黄中尚含有牛磺酸、胆红素、氨基酸等其他活性成分,这些成分共同决定了牛黄的药效物质基础^[37-39]。但是由于结构和化学性质的差异,为同时测定这些活性成分带来了巨大的困难,也成为牛黄及其代用品药理作用机制研究难以突破的瓶颈。夏晶等^[40]对含有牛黄的复方制剂局方至宝散中猪去氧胆酸、胆酸及胆红素的质量控制方法进行了研究,分别采用薄层法、TLCS 法和 HPLC 法对牛黄中的猪去氧胆酸、胆酸和胆红素进行了测定,为牛黄中多种活性成分的同时检测提供了参考。Yan 等^[41]针对胆红素和胆酸的物理化学性质,通过 ELSD 和 UV 检测器联用技术,同时测定了 21 批牛黄及其代用品中胆红素和 5 种胆酸成分的量,为牛黄活性成分的同时测定进行了有益尝试。丁岗等^[42]利用 TOF-MS、HPLC-MS 联用技术较为系统地研究了牛黄与体外培育牛黄中肽类、胆酸类及胆红素类 3 类主要活性成分的指纹图谱,并对各成分间的相对量进行了比较,为牛黄及其代用品的质量方法的建立提供了较好的思路。Wan 等^[43]通过一系列测定方法系统地比较了天然牛黄及人工培育豚黄中胆红素类、胆酸类、脂肪酸类、氨基酸类及矿物质类成分的量,结果显示天然牛黄及人工培育豚黄的主要成分为胆酸和去氧胆酸,天然牛黄中含有更为丰富的胆红素及必需氨基酸,各类物质在其药理活性中所发挥的作用值得进一步研究和探讨。

6 结语

目前已有多种方法测定牛黄中胆酸类物质的报道,其中 HPLC-ELSD、HPLC-MS 联用技术因其出色的分离能力和高灵敏度,逐渐得到广泛应用。与化学药不同,中药所含有的复杂活性成分共同决定了其发挥药效的物质基础^[44],除胆酸类成分外,胆红素、牛磺酸、氨基酸等均被认为是牛黄的活性成分, HPLC-MS、TOF-MS、GC-MS 等现代分析技术和手段的引入使多种活性成分的同时测定成为可

能,进一步丰富和完善了牛黄及其代用品的质控方法,同时也为牛黄及其代用品的物质基础和体内代谢研究提供了基础。

参考文献

- [1] Li Y W, Zhu X Y, But P P H, *et al.* Ethnopharmacology of bear gall-bladder: I [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 47(1): 27-31.
- [2] Li T, Zhen Y, Cai H J, *et al.* Effects of *in vitro* cultivated *Calculus Bovis* compound on pulmonary lesions in rabbits with schistosomiasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(6): 749-754.
- [3] 梁洁芳, 胡景鑫, 杨彬源, 等. 人工牛黄对实验性惊厥大鼠脑内海马及门区神经元丢失的抑制和 GAD 免疫反应阳性细胞的保护作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2414-2417.
- [4] 邵昌松, 王振宇, 贾光, 等. 牛黄及制剂对正己烷致小鼠肝、肾脂质过氧化的保护作用研究 [J]. 中国职业医学, 2006, 33(6): 417-419.
- [5] 吴志远, 李芳芳, 张昆, 等. 人工牛黄对小鼠乳腺癌肺转移的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2013-2016.
- [6] 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): 335-338.
- [7] 郝美玲, 乌云娜. 2 种蒙成药中胆酸的薄层扫描含量测定 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 34-35.
- [8] 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): 684-685.
- [9] 张兰珍, 王晓强. 牛黄制剂中胆酸质控方法的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(1): 42-43.
- [10] 刘珊珊, 崔艳萍, 谭新保. 人工牛黄中胆酸含量糠醛比色测定法的改进 [J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(1): 20-22.
- [11] 王维礼, 唐秀忠. 糠醛溶液的活性炭脱色测定药品中胆酸的含量 [J]. 中成药, 1994, 16(3): 15-16.
- [12] 周雪梅, 林燕, 郝美玲, 等. 一阶导数光谱法测定蒙成药图喜木勒-3 中胆酸含量 [J]. 中成药, 1996, 18(11): 17-18.
- [13] 赵英, 红梅, 佟皎薇. 药物定性定量研究二阶导数光谱法测定蒙成药给旺-9 中的胆酸含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7(1): 38-39.
- [14] 赵中杰, 江佩芬, 罗金明, 等. 紫外分光光度法测定牛黄中胆酸的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(1): 24-29.
- [15] 刘力丰. 紫外分光光度法测定牛黄消炎片中胆酸的含量 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(23): 6-7.
- [16] 鄢海燕, 邹纯才. 熊胆粉、猪胆粉、牛胆粉及鸡胆粉中总胆酸的含量测定及其抑菌作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(3): 175-179.
- [17] 李先端, 钟银燕, 游修琪, 等. 中药炮制辅料牛胆汁中总胆酸含量测定 [J]. 中药材, 2008, 31(5): 654-656.
- [18] Kong W J, Wang J B, Zang Q C, *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]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(30): 3565-3573.
- [19] Chen X, Yang D, Shen W, *et al.* Characterization of chenodeoxycholic acid as an endogenous antagonist of the G-coupled formyl peptide receptors [J]. *Inflamm Res*, 2000, 49(12): 744-755.
- [20] Chen X, Mellon R D, Yang L, *et al.* Regulatory effects of deoxycholic acid, a component of the anti-inflammatory traditional Chinese medicine Niu Huang, on human leukocyte response to chemoattractants [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(3): 533-541.
- [21] 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.
- [22] Zhao Y, Cao Q, Liu H, *et al.* Determination of baicalin, chlorogenic acid and caffeic acid in traditional Chinese medicinal preparations by capillary zone electrophoresis [J]. *Chromatographia*, 2000, 51(7): 483-486.
- [23] Rodriguez V G, Lucangioli S E, Fernández Otero G C, *et al.* Determination of bile acids in pharmaceutical formulations using micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23(2/3): 375-381.
- [24] 郑建新, 邹登峰. 毛细管电泳法测定人工牛黄中胆酸的含量 [J]. 中国药房, 2006, 17(23): 1817-1818.
- [25] Hu Z, He L C, Zhang J, *et al.* Determination of three bile acids in artificial *Calculus Bovis* and its medicinal preparations by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 837(1/2): 11-17.
- [26] 倪坤仪, 王建, 陈健, 等. 反相高效液相色谱法测定牛黄类中成药中胆汁酸的含量 [J]. 药学学报, 1994, 29(8): 629-633.
- [27] 冯芳, 马永建, 陈明, 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, 2000, 35(3): 216-219.
- [28] 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.
- [29] Kong W J, Jin C, Liu W, *et al.* Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five bile acid derivatives in *Calculus Bovis* and its medicinal preparations [J]. *Food Chem*,

- 2010, 120(4): 1193-1200.
- [30] Kong W J, Jin C, Xiao X H, *et al.* Determination of multicomponent contents in *Calculus Bovis* by ultra-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and its application for quality control [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(10): 1518-1527.
- [31] Kong W J, Wang J, Zang Q, *et al.* Fingerprint-efficacy study of artificial *Calculus Bovis* in quality control of Chinese materia medica [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1342-1347.
- [32] Alnouti Y, Csanaky I L, Klaassen C D. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873(2): 209-217.
- [33] Bobeldijk I, Hekman M, de Vries-van der Weij J, *et al.* Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FF-MS: Compound class targeting in a metabolomics workflow [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871(2): 306-313.
- [34] Sergi M, Montesano C, Napoletano S, *et al.* Analysis of bile acids profile in human serum by ultrafiltration clean-up and LC-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2012, 75(9/10): 479-489.
- [35] Qiao X, Ye M, Pan D L, *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]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(1): 107-117.
- [36] 赵艳红, 孔爱英, 张振清, 等. 天然牛黄和安宫牛黄丸中胆汁酸的药代动力学研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(5): 344-348.
- [37] 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): 44.
- [38] Qin X F. Bilirubin would be the indispensable component for some of the most important therapeutic effects of *Calculus Bovis* (Niu Huang) [J]. *Chin Med J*, 2008, 121(5): 480-480.
- [39] Zang Q C, Wang J B, Kong W J, *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): 3330-3338.
- [40] 夏 晶, 王伟毅, 沙祎炜, 等. 局方至宝散中牛黄质量控制方法的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1872-1874.
- [41] Yan S K, Wu Y W, Liu R H, *et al.* Comparative study on major bioactive components in natural, artificial and in-vitro cultured *Calculus Bovis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(1): 128-132.
- [42] 丁 岗, 盛龙生, 李明慧, 等. 体外培育牛黄与天然牛黄指纹图谱的比较研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 309-312.
- [43] Wan T C, Cheng F Y, Liu Y T, *et al.* Study on bioactive compounds of *in vitro* cultured *Calculus Suis* and natural *Calculus Bovis* [J]. *Animal Sci J*, 2009, 80(6): 697-704.
- [44] 贾晓斌, 陈 彦, 李 霞, 等. 中药复方物质基础研究新思路和方法 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 420-425.