

# 基于UHPLC-ELSD指纹图谱及多成分含量测定比较不同产地羊胆汁质量及抗氧化活性

周旭香<sup>a</sup>, 朱芊芊<sup>a</sup>, 张丹丹<sup>a</sup>, 罗心遥<sup>a</sup>, 刘丹<sup>a</sup>, 章敏<sup>b\*</sup>, 叶晓川<sup>a\*</sup>(湖北中医药大学, a.药学院, 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, b.中医药实验中心, 武汉 430065)

**摘要:** 目的 建立UHPLC-ELSD指纹图谱与多成分含量测定方法, 比较不同产地羊胆汁的差异, 并进行抗氧化活性研究, 为羊胆汁的深入开发利用提供依据。方法 采用UHPLC-ELSD建立21批不同产地羊胆汁指纹图谱并进行相似度分析; 测定6个成分含量、DPPH及ABTS自由基清除能力、铁离子还原能力, 并进行熵权TOPSIS及灰色关联度分析。结果 21批羊胆汁指纹图谱共确定11个共有峰, 通过与对照品比对指出牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、牛磺脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TDCA)、甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA)、胆酸(cholic acid, CA)6个成分, 除4批样品外, 指纹图谱相似度均>0.90, 21批羊胆汁冻干粉中6个成分的总含量范围为55.34%~86.08%, 含量最高的TCA含量范围为34.74%~60.86%, 显示6个成分含量在不同产地样品中存在较大差异; 不同产地羊胆汁均具有抗氧化活性, 同样也存在一定差异。以6个成分含量为变量的熵权TOPSIS分析结果显示, 得分排名位于前十的为S2、S18、S16、S9、S8、S21、S1、S10、S20、S15, 表明其质量较好, 且来自北方地区绵羊的羊胆汁质量略优; 对6个成分含量与3个抗氧化指标的灰色关联度分析结果显示, 6个成分与各抗氧化指标均具有关联性, 且TCA、TDCA、TCDCA关联度最高, 可能是羊胆汁发挥抗氧化作用的重要成分。结论 采用熵权TOPSIS及灰色关联度分析方法能有效分析不同产地羊胆汁的质量差异及抗氧化活性成分, 为其质量评价提供科学依据。

**关键词:** 羊胆汁; 指纹图谱; 含量测定; 抗氧化活性; 熵权TOPSIS; 灰色关联度; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)08-1066-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232863

引用本文: 周旭香, 朱芊芊, 张丹丹, 等. 基于UHPLC-ELSD指纹图谱及多成分含量测定比较不同产地羊胆汁质量及抗氧化活性[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(8): 1066-1074.

## Comparison of the Quality of Sheep Bile from Different Regions Based on UHPLC-ELSD Fingerprint and Multi-component Content Determination Combined with Antioxidant Activity

ZHOU Xuxiang<sup>a</sup>, ZHU Qianqian<sup>a</sup>, ZHANG Dandan<sup>a</sup>, LUO Xinyao<sup>a</sup>, LIU Dan<sup>a</sup>, ZHANG Min<sup>b\*</sup>, YE Xiaochuan<sup>a\*</sup>  
(Hubei University of Traditional Chinese Medicine, a.Hubei Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Traditional Chinese Medicine Chemistry at School of Pharmacy, b.Traditional Chinese Medicine Experimental Center, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish UHPLC-ELSD fingerprint and multi-component content determination methods, compare the differences in sheep bile from different regions, and conduct antioxidant activity research to provide a basis for the in-depth development and utilization of sheep bile. **METHODS** Used UHPLC-ELSD method to establish 21 batches of bile fingerprints of sheep from different origins and conduct similarity analysis. Measured the content of 6 components, DPPH and ABTS free radical scavenging ability, iron ion reduction ability, and conducted entropy weighted TOPSIS and grey correlation analysis. **RESULTS** A total of 11 common peaks were identified in the fingerprint spectra of 21 batches of sheep bile. Through comparison with the control sample, 6 components were identified, including taurocholic acid(TCA), glycocholic acid(GCA), taurochenodeoxycholic acid(TCDCA), tauroursodeoxycholic acid(TDCA), glycodeoxycholic acid(GDCA), and cholic acid(CA). Except for 4 batches of samples, the similarity of the fingerprint spectra was greater than 0.90. The total content range of 6 components in the freeze-dried powder of 21 batches of sheep bile was 55.34% to 86.08%. The highest content of taurocholic acid ranged from 34.74% to 60.86%, indicating significant differences in the content of the six components in samples from different regions. Sheep bile from different regions had antioxidant activity, and there were also certain differences. The results of entropy weighted TOPSIS analysis using six component contents as variables showed that the top ten scoring groups were S2, S18, S16, S9,

作者简介: 周旭香, 女, 硕士生 E-mail: 2072049726@qq.com \*通信作者: 叶晓川, 女, 博士, 教授, 博导 E-mail: yxxc1965@163.com 章敏, 女, 博士, 高级实验师 E-mail: w149403938@163.com

S8, S21, S1, S10, S20, and S15, indicating good quality and slightly better bile quality from sheep in the northern region. The grey correlation analysis results between the content of 6 components and 3 antioxidant indicators showed that all 6 components were correlated with each antioxidant indicator, and TCA, TDCA, and TCDCA had the highest correlation, which might be important components for sheep bile to exert antioxidant effects. **CONCLUSION** The use of entropy weighted TOPSIS and grey correlation analysis methods can effectively analyze the quality differences and antioxidant active components of sheep bile from different regions, providing scientific basis for its quality evaluation.

**KEYWORDS:** sheep bile; fingerprint; content determination; antioxidant activity; entropy weight TOPSIS; grey correlation analysis; quality control

羊胆汁首载于梁代陶弘景《本草经集注》，为牛科动物山羊 *Capra hircus* L.或绵羊 *Ovisaries* L.的胆囊胆汁，含胆汁酸、胆色素、胆甾醇、卵磷脂、黏蛋白及碳酸氢钠等化学成分<sup>[1-5]</sup>，具清热解毒，清肝明目退翳之功效，在民间被广泛应用于治疗痰热咳嗽、热毒疮痍、肺结核等疾病<sup>[6-8]</sup>。现代药理研究显示，羊胆汁具有抗炎抑菌、镇咳祛痰、降低血压、促进消化等药理作用<sup>[9-12]</sup>。羊胆作为与牛胆同科动物药材，二者胆汁的基础物质成分存在某种程度上的一致性，因此羊胆汁成为由牛胆粉、胆酸、牛磺酸等加工制成的人工牛黄的胆酸原料来源之一<sup>[13]</sup>。此外，羊胆汁也是重要的中药炮制辅料，可降低中药毒性或燥性，或改变药性<sup>[14-15]</sup>，如中国药典 2020 年版规定胆南星由天南星与牛、羊或猪胆汁加工而成<sup>[13]</sup>，有文献报道，牛、羊胆汁制胆南星对脂多糖诱发急性肺损伤大鼠的保护作用明显优于猪胆汁制胆南星<sup>[16]</sup>。

由于羊胆在我国来源广泛，价格低廉，人们对羊胆汁药用价值的关注度越来越高，其品质的优劣将对其应用产生直接影响。目前对羊胆汁中所含成分的检测研究有少量报道，但对不同产地羊胆汁质量进行系统的研究尚未见报道，对其抗氧化活性研究也未见报道。已有文献显示，胆汁酸为羊胆汁的主要成分，占总固体量 50% 以上，其中所含的牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA)、牛磺脱氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid, TDCA)、甘氨酸胆酸 (glycocholic acid, GCA) 有抗炎抑菌及促进脂肪分解、代谢等作用，胆酸 (cholic acid, CA) 具有利胆、镇咳等作用<sup>[17]</sup>；牛磺鹅脱氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA) 具有抗炎、免疫调节等作用<sup>[18]</sup>。因此，本研究拟通过羊胆汁 UHPLC-ELSD 指纹图谱、6 个主要胆汁酸成分的含量及体外抗氧化活性研究，结合熵权 TOPSIS 及灰色关联度的分析方法，对 21 批不同产地山羊、绵羊胆汁质量进行综合评价及抗氧化活性成分探讨，旨在为羊胆汁进一步开发其药用价值及作为

提取胆酸的原料提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

1290 型超高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); Milli-Q 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司); BSA224S-CW 型万分之一分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; BSA224S-CW 型十万分之一分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; Scientz-10N 型冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Spark 10M 型酶标仪 (瑞士 Tecan)。

### 1.2 试剂

TCDCA (批号: RFS-N01811812016; 纯度 > 98%)、TDCA (批号: RFS-N04002002018; 纯度 > 98%) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; CA 对照品 (成都普思生物科技股份有限公司, 批号: PS020335; 纯度 > 98%); TCA 对照品 (批号: B15J11J118403, 纯度 > 95%)、GCA (批号: Y08A9E57765; 纯度 > 97%)、甘氨酸胆酸 (glycodeoxycholic acid, GDCA, 批号: Y27M9E56969, 纯度 > 98%) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司; 2,2-联苯基-1-苦基肼基 DPPH (批号: C10233374)、抗坏血酸 Vc (批号: C1313579) 均购自麦克林生物科技有限公司; 2,2-联氮-双 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (批号: S19198)、2,4,6-三吡啶基三嗪 (批号: S30632) 均购自源叶生物科技有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 均购自默克; 乙酸铵为色谱纯, 购自赛默飞; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

21 批羊胆汁 (编号 S1~S21) 为 2020 年 12 月—2021 年 1 月在不同地点的屠宰场直接采集含羊胆汁的胆囊, 立即冷链邮寄接收后, 割破胆囊取汁, 滤布过滤除絮状物获取滤液, 冷冻干燥, 用研钵研成细粉, -20 °C 避光保存, 备用<sup>[19]</sup>, 样品信息见表 1。

表 1 羊胆汁样品来源信息

Tab. 1 Source information of sheep bile samples

编号	来源	品种	编号	来源	品种
S1	湖北省襄阳市南漳县	山羊	S12	湖南省长沙市宁乡县(1)	山羊
S2	甘肃省张掖市肃南裕固自治县	绵羊	S13	湖南省长沙市宁乡县(2)	山羊
S3	湖北省黄冈市英山县	山羊	S14	陕西省西安市	山羊
S4	湖北省荆门市	山羊	S15	河南省南阳市唐河县	山羊
S5	湖北省襄阳市	山羊	S16	河南省南阳市唐河县	绵羊
S6	湖北省襄阳市	绵羊	S17	内蒙古自治区	山羊
S7	山东省菏泽市	山羊	S18	四川省自贡市	山羊
S8	甘肃省兰州市	绵羊	S19	山东省潍坊市	山羊
S9	湖北省宜昌市长阳县	山羊	S20	宁夏回族自治区银川市	绵羊
S10	湖北省宜昌市五峰县	绵羊	S21	贵州省铜仁市	山羊
S11	湖北省宜昌市宜都市	山羊			

## 2 方法与结果

### 2.1 UHPLC 指纹图谱的建立

**2.1.1 供试品溶液的制备** 取羊胆汁样品粉末约 50 mg, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放置室温后称重, 用 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别取 TCA、GCA、GDCA、CA、TCDCA、TDCA 对照品适量, 精密称定, 制成含 TCA、GCA、GDCA、CA、TCDCA、TDCA 对照品浓度分别为 4.00、0.96、0.32、0.48、2.40、1.60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 采用 2 倍稀释法得到不同质量浓度的混合对照品工作液。

**2.1.3 色谱条件** ZOBAX SB-C<sub>18</sub>(150 mm $\times$ 3 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相组成为甲酸调节 pH 4.0 的 0.03  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液 (A)、乙腈 (B)、甲醇 (C), 梯度洗脱 (0~5 min, 34% A, 11% B; 5~7 min, 34% $\rightarrow$ 17%A, 11% $\rightarrow$ 28%B; 7~16 min, 17% $\rightarrow$ 10% A, 28% $\rightarrow$ 35% B; 16~18 min, 10% $\rightarrow$ 7%A, 35% $\rightarrow$ 38%B; 18~20 min, 7% $\rightarrow$ 0%A, 38% $\rightarrow$ 60%B); 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; ELSD 检测器氮气流速 2.1  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 漂移管温度 115  $^{\circ}\text{C}$ ; 增益值 4, 不分流。

### 2.1.4 方法学考察

**2.1.4.1 仪器精密度试验** 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg, 精密称定, 按“2.1.1”项下方法制备供试

品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 针, 记录色谱图, 以保留时间适中, 峰型较好, 与其他色谱峰分离较好的 5 号峰为参照峰, 计算得各共有峰的相对保留时间 (relative retention time, RRT) 和相对峰面积 (relative peak area, RPA) 的相对标准偏差 (RSD) 值均 $<3\%$ , 表明仪器精密度良好。

**2.1.4.2 稳定性试验** 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg, 精密称定, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样, 记录色谱图, 以 5 号峰为参照峰, 计算得各共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 均 $<3\%$ , 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

**2.1.4.3 重复性试验** 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg, 精密称定, 按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 以“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以 5 号峰为参照峰, 计算各共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD $<3\%$ ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

**2.1.5 指纹图谱的建立及共有峰指认** 取 21 批羊胆汁样品粉末, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进行色谱分析, 记录色谱图。将 21 批不同产地羊胆汁样品色谱图依次导入国家药典委员会规定的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 软件进行分析, 以 S1 号样品图谱为参照图谱, 选取中位数法、时间宽度 0.1 min 对色谱峰多点校正后自动匹配,

建立 21 批羊胆汁样品 UHPLC-ELSD 指纹图谱及对照指纹图谱 (图 1), 共确定 11 个共有峰, 采用与对照品比对的方法对色谱峰进行指认 (图 2), 确定 2 号峰为 TCA, 3 号峰为 GCA, 4 号峰为 TCDCA, 5 号峰为 TDCA, 6 号峰为 GDCA, 7 号峰为 CA。

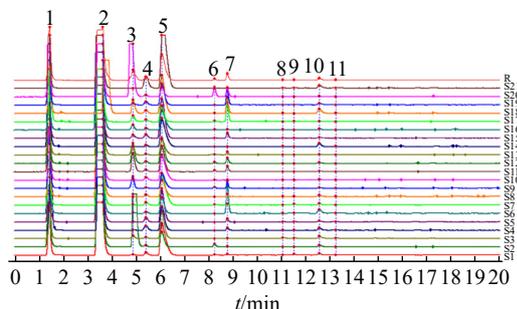


图 1 21 批羊胆汁样品 UHPLC-ELSD 指纹图谱 (S1~S21) 和对照指纹图谱 (R)  
Fig. 1 UHPLC-ELSD fingerprints of 21 batches of sheep bile samples (S1~S21) and control fingerprint (R)

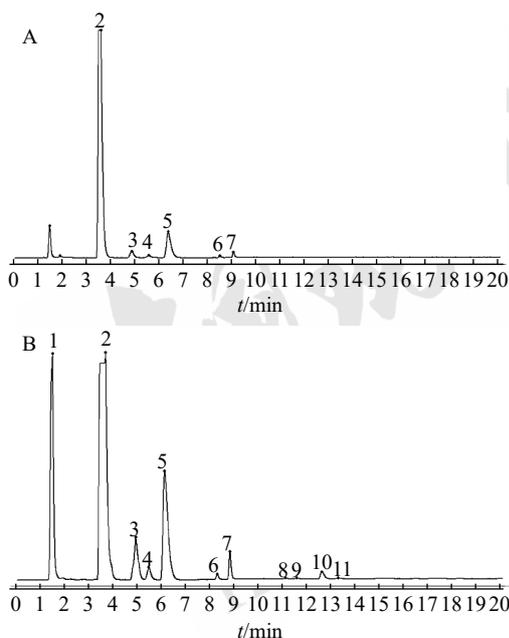


图 2 混合对照品 (A) 及对照指纹图谱 (B) 的 UHPLC-ELSD 色谱图  
2-牛磺胆酸; 3-甘氨酸; 4-牛磺鹅脱氧胆酸; 5-牛磺脱氧胆酸; 6-甘氨酸脱氧胆酸; 7-胆酸。  
Fig. 2 UHPLC-ELSD chromatograms of mixed reference substance (A) and control fingerprint (B)  
2-taurocholic acid; 3-glycocholic acid; 4-taurochenodeoxycholic acid; 5-tauroursodeoxycholic acid; 6-glycodeoxycholic acid; 7-cholic acid.

将 21 批羊胆汁样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 进行相似度评价。结果见表 2, 与对照指纹图谱相比, S2、S6、

S17、S20 相似度较低, 其中 S2、S20 均 < 0.50; 其余样品相似度均 > 0.90, 表明此 17 批样品间有较好的一致性。

表 2 羊胆汁样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度分析  
Tab. 2 Similarity analysis between fingerprints of sheep bile samples and control fingerprint

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.972	S8	0.971	S15	0.982
S2	0.453	S9	0.980	S16	0.994
S3	0.972	S10	0.971	S17	0.889
S4	0.971	S11	0.972	S18	0.993
S5	0.970	S12	0.976	S19	0.936
S6	0.711	S13	0.976	S20	0.384
S7	0.991	S14	0.966	S21	0.966

## 2.2 多成分含量测定

2.2.1 色谱条件 在“2.1.3”所确定色谱条件基础上, 进样量为 10  $\mu$ L 时, 由于 2 号峰 (TCA) 和 5 号峰 (TDCA) 峰面积过大, 超出线性范围, 且色谱峰出现平头现象, 实验研究表明进样量降低时, 3 号峰 (GCA)、4 号峰 (TCDCA)、6 号峰 (GDCA)、7 号峰 (CA) 峰面积低于检测限, 为更准确测定多成分含量, 实验样品均分别以 2、10  $\mu$ L 进样分析, 以进样量 2  $\mu$ L 的色谱图峰面积结果计算样品中 TCA 和 TDCA 成分含量, 以进样量 10  $\mu$ L 的色谱图峰面积结果计算样品中 GCA、TCDCA、GDCA、CA 含量。

2.2.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下不同对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定并记录色谱峰面积。以峰面积的对数值为纵坐标 (Y), 以对照品进样量 (ng) 对数值为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得各成分回归方程、相关系数 (r) 及线性范围, 将对照品逐级稀释后进样分析, 各成分以信噪比  $S/N=3$  时的质量浓度为检测限, 以  $S/N=10$  时的质量浓度为定量限, 结果见表 3。

## 2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 仪器精密度试验 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg, 精密称定, 以“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 以“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 针, 记录色谱图中各化合物峰面积, 计算得 TCA、GCA、TCDCA、TDCA、GDCA、CA 峰面积 RSD 值分别为 0.39%、2.36%、1.37%、0.82%、

表 3 6 个成分的线性回归方程及检测限和定量限结果

Tab. 3 Results of linear regression equation, detection limit and quantification limit for 6 components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·mL <sup>-1</sup>	检测限/mg·mL <sup>-1</sup>	定量限/mg·mL <sup>-1</sup>
TCA	$Y=1.5199X-1.2222$	0.9997	0.0625~4.0000	0.0312	0.0625
GCA	$Y=1.6056X-1.4501$	0.9999	0.0616~0.9850	0.0307	0.0616
TCDCa	$Y=1.572X-1.6218$	0.9997	0.0750~2.4000	0.0375	0.0750
TDCA	$Y=1.7264X-1.9979$	0.9999	0.1006~1.6100	0.0503	0.1006
GDCA	$Y=1.4039X-0.5262$	0.9998	0.0230~0.7375	0.0115	0.0230
CA	$Y=1.741X-1.4992$	0.9993	0.0300~0.4750	0.0148	0.0300

2.37%、2.57%，表明仪器精密度良好。

**2.2.3.2 稳定性试验** 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg，精密称定，以“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，以“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样，记录色谱图中各化合物峰面积，计算 TCA、GCA、TCDCa、TDCA、GDCA、CA 峰面积 RSD 值分别为 0.39%、2.43%、1.32%、0.74%、1.24%、2.42%，表明供试品在室温下 24 h 内稳定性良好。

**2.2.3.3 重复性试验** 取 S1 羊胆汁样品粉末约 50 mg，精密称定，按“2.1.1”项下所确定的方法平行制备供试品溶液 6 份，以“2.2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图中各化合物峰面积，计算 TCA、GCA、TCDCa、TDCA、GDCA、CA 含量 RSD 值分别为 0.72%、1.83%、1.59%、1.05%、1.28%、1.26%，表明本方法重复性良好。

**2.2.3.4 加样回收率试验** 取已知含量的羊胆汁 S1 样品粉末约 25 mg，精密称定，平行 6 份，分别加入对照品 TCA、GCA、TCDCa、TDCA、GDCA、CA 混合溶液适量，按“2.1.1”项下所确定的方法制备供试品溶液，以“2.2.1”项下色谱条件进行色谱分析，记录峰面积，以进样体积为 2 μL 的色谱图峰面积结果计算样品中 TCA 和 TDCA 加样回收率为 97.54%、99.23%，RSD 值为 2.45%、1.67%，以进样体积为 10 μL 的色谱图峰面积结果计算样品中 GCA、TCDCa、GDCA、CA 加样回收率为 103.57%、99.90%、97.26%、99.10%，RSD 值为 1.13%、2.62%、1.28%、1.88%，结果表明所建立的含量测定方法准确性良好。

**2.2.4 样品含量测定** 取不同产地羊胆汁样品粉末约 50 mg，精密称定，按“2.1.1”项下方法平行制备 21 批供试品溶液各 3 份，以“2.2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，以进样体积为

2 μL 色谱图峰面积结果计算样品中 TCA 和 TDCA 含量均值，以进样体积为 10 μL 色谱图峰面积结果计算样品中 GCA、TCDCa、GDCA、CA 含量均值，结果见表 4，结果显示不同地区羊胆汁 6 个成分含量存在一定差异。

**2.2.5 熵权 TOPSIS 分析<sup>[20-21]</sup>** 熵权 TOPSIS 分析法是熵权法与逼近理想排序法结合的一种综合评价分析方法。熵权法用一种客观赋权的思维来确定指标权重，增强各指标的分辨性，减少了主观性影响，显现了对数据结果的客观反映；TOPSIS 分析法借助多目标决策问题的“正理想解”和“负理想解”对目标进行排序，是一种常用的多目标决策分析方法，能很好刻画多个影响指标的综合影响力。

羊胆汁中 6 个胆汁酸成分总含量为 55.34%~86.08%，均值高达 69.24%，已占羊胆汁大部分质量，故 6 个成分含量差异可以从定量角度评价羊胆汁质量好坏。研究以羊胆汁中 6 个成分含量为原始数据，进行标准化处理后进行熵权 TOPSIS 数据分析比较不同产地质量差异，结果见表 5。结果表明综合得分指数位于前十的样品为 S2、S18、S16、S9、S8、S21、S1、S10、S20、S15，显示以 6 个成分含量评估羊胆汁质量时此 10 批产地羊胆汁质量较好。

## 2.3 体外抗氧化活性

**2.3.1 DPPH 自由基清除率** 配制不同浓度的 21 批羊胆汁样品水溶液 (10、8、6、4、2、1 mg·mL<sup>-1</sup>)，取各浓度样品溶液 100 μL，加入 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DPPH 乙醇溶液 100 μL，混匀后室温避光反应 20 min，在 517 nm 波长下测定吸光度 A。自由基清除率按  $I(\%) = [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100$  计算，其中  $A_2$  为不同浓度下样品组吸光度值， $A_1$  为对应不同浓度下对照组吸光度值， $A_0$  为空白组吸光度值，

表 4 21 批羊胆汁样品 6 个化合物含量测定结果

批号	TCA	TDCA	GCA	TCDCa	GDCA	CA	总含量
S1	49.39±0.77	19.56±0.33	1.44±0.03	3.82±0.03	0.34±0.01	0.83±0.02	75.38
S2	45.87±0.14	8.11±0.23	17.90±0.05	1.71±0.03	1.13±0.02	0.52±0.01	75.24
S3	41.15±0.24	9.54±0.13	1.98±0.01	2.08±0.03	0.26±0.00	0.33±0.00	55.34
S4	40.78±0.58	10.95±0.22	0.82±0.02	3.99±0.05	0.16±0.00	1.24±0.03	57.94
S5	50.99±0.27	12.26±0.06	0.54±0.01	3.39±0.02	0.12±0.00	1.30±0.02	68.60
S6	45.42±0.21	6.94±0.06	0.84±0.01	2.16±0.03	0.23±0.00	4.21±0.03	59.80
S7	51.31±0.97	12.52±0.23	2.31±0.05	2.21±0.06	0.18±0.01	0.54±0.00	69.07
S8	56.51±0.47	12.16±0.30	0.56±0.01	3.10±0.03	0.12±0.00	0.95±0.01	73.40
S9	57.59±0.75	14.35±0.13	2.17±0.01	4.62±0.06	0.18±0.00	0.30±0.03	79.21
S10	48.05±0.57	18.25±0.17	1.24±0.02	4.94±0.07	0.51±0.00	0.26±0.00	73.25
S11	40.61±0.99	10.85±0.05	5.85±0.08	2.26±0.06	0.70±0.01	1.92±0.00	62.19
S12	49.78±0.28	11.37±0.27	5.70±0.02	2.20±0.03	0.42±0.01	1.18±0.01	70.65
S13	47.62±0.75	11.33±0.33	1.38±0.02	1.72±0.03	0.14±0.00	0.32±0.01	62.51
S14	46.92±0.40	16.07±0.09	0.40±0.00	2.62±0.06	0.23±0.01	0.20±0.00	66.44
S15	46.99±0.05	18.05±0.09	2.71±0.02	3.28±0.03	0.39±0.00	1.88±0.01	73.30
S16	60.86±0.40	13.36±0.01	3.48±0.01	2.79±0.00	0.37±0.01	0.48±0.02	81.34
S17	44.67±0.45	11.25±0.14	3.72±0.05	2.99±0.04	0.65±0.01	4.16±0.06	67.44
S18	58.22±0.29	16.00±0.05	5.15±0.04	2.96±0.03	0.30±0.00	3.45±0.04	86.08
S19	46.77±0.28	8.25±0.17	1.47±0.01	3.45±0.02	0.29±0.01	2.82±0.02	63.05
S20	34.74±0.97	4.83±0.05	13.88±0.11	2.25±0.12	2.80±0.07	1.98±0.85	60.48
S21	41.02±0.06	24.03±0.55	0.36±0.01	7.21±0.21	0.44±0.00	0.33±0.01	73.39

表 5 羊胆汁 6 种成分含量熵权 TOPSIS 评价结果

Tab. 5 Evaluation results of entropy weighted TOPSIS for the content of 6 components in sheep bile

样品编号	正理想解	负理想解	综合得分指数	排序结果
S1	5.809 389	3.374 748	0.367 454	7
S2	4.901 556	5.207 009	0.515 109	1
S3	7.205 439	1.031 578	0.125 237	21
S4	7.128 076	1.139 438	0.137 821	20
S5	6.266 723	2.789 576	0.308 026	12
S6	6.983 250	1.839 635	0.208 507	18
S7	6.208 148	2.852 983	0.314 859	11
S8	6.006 813	3.867 541	0.391 675	5
S9	5.689 221	4.218 819	0.425 798	4
S10	5.967 925	3.005 755	0.334 952	8
S11	6.836 686	1.190 084	0.148 264	19
S12	6.077 643	2.565 868	0.296 855	13
S13	6.604 242	2.134 001	0.244 214	15
S14	6.310 005	2.462 172	0.280 680	14
S15	6.034 938	2.796 071	0.316 620	10
S16	5.692 135	4.859 247	0.460 532	3
S17	6.620 724	1.863 569	0.219 649	17
S18	5.246 905	4.485 583	0.460 888	2
S19	6.778 661	1.938 686	0.222 394	16
S20	6.494 449	3.089 777	0.322 381	9
S21	6.348 632	4.049 318	0.389 434	6

以样品浓度为横坐标  $X$ ，自由基清除率为纵坐标  $Y$ ，进行拟合后得到拟合方程，根据方程计算出相对半数清除率 ( $IC_{50}$ )，测定结果采用 Z-score 标准化处理，结果见图 3~4。

**2.3.2 ABTS 自由基清除率** 配制不同浓度的 21 批羊胆汁样品水溶液 (10、8、6、4、2、1  $mg \cdot mL^{-1}$ ) 与 ABTS 溶液 [ $7 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  2,2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐乙醇溶液与  $2.45 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  的过硫酸钾乙醇溶液 1:1 均匀混合，室温避光反应 12 h，无水乙醇稀释 30 倍]，取各浓度样品溶液各  $50 \mu L$ ，加入 ABTS 溶液  $250 \mu L$ ，混匀后避光反应 25 min，立即在 752 nm 波长下测定吸光度  $A$ 。自由基清除率按  $I(\%) = [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100$  计算，其中  $A_2$  为不同浓度下样品组吸光度值， $A_1$  为对应不同浓度下对照组吸光度值， $A_0$  为空白组吸光度值，以样品浓度为横坐标  $X$ ，自由基清除率为纵坐标  $Y$ ，进行拟合后得到拟合方程，根据方程计算出相对半数清除率 ( $IC_{50}$ )，测定结果采用 Z-score 标准化处理，结果见图 3~4。

**2.3.3 铁离子还原能力**  $FeSO_4$  标准曲线的绘制：

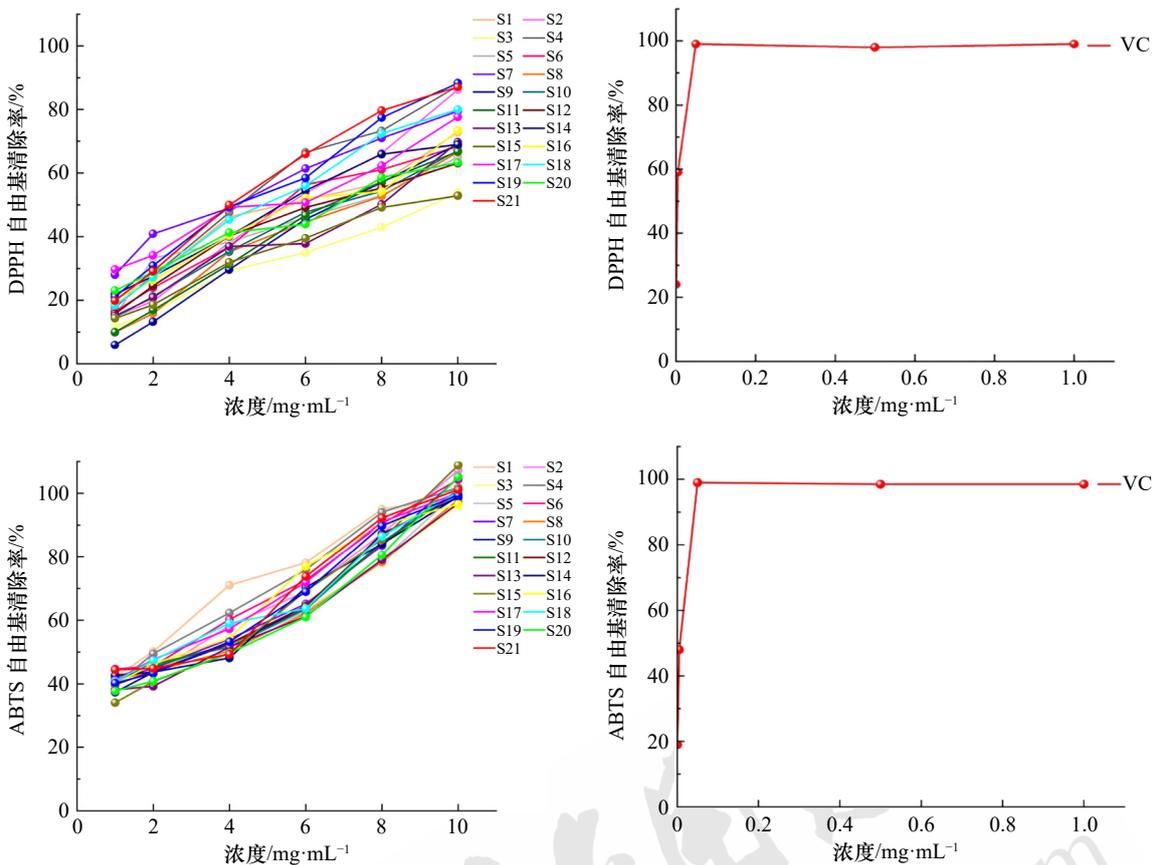


图3 羊胆汁及Vc的自由基清除能力  
Fig. 3 Free radical scavenging ability of sheep bile and Vc

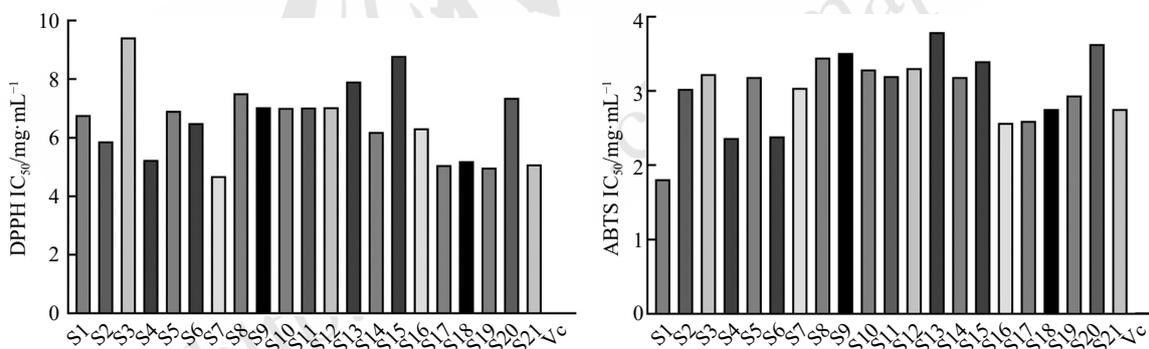


图4 羊胆汁及Vc自由基清除能力IC<sub>50</sub>值  
Fig. 4 IC<sub>50</sub> value of sheep bile and Vc free radical scavenging ability

配制不同浓度的FeSO<sub>4</sub>溶液及FRAP溶液(pH=3.6的醋酸盐缓冲液、10 mmol·L<sup>-1</sup>的2,4,6-三吡啶基三嗪溶液、10 mmol·L<sup>-1</sup>的FeCl<sub>3</sub>溶液按10:1:1比例混合,现配现用),取FeSO<sub>4</sub>溶液5 μL,FRAP溶液180 μL,混匀,37 °C反应5 min,并于593 nm处测定吸光度A,以FeSO<sub>4</sub>溶液浓度为横坐标X,吸光度A为纵坐标Y,绘制标准曲线,得线性方程为Y=3.269 5X-0.318 9, R<sup>2</sup> = 0.999 6。

取浓度为10 mg·mL<sup>-1</sup>的21批羊胆汁样品水

溶液各5 μL,加入FRAP溶液180 μL,混匀,37 °C反应5 min,并于593 nm处测定吸光度A。代入FeSO<sub>4</sub>标准曲线计算样品的铁离子还原能力,测定结果采用Z-score标准化处理,结果见图5。

#### 2.4 6个成分含量与抗氧化作用的灰色关联度分析

分别以3个抗氧化指标数据为母序列,以6个成分含量数据为子序列,利用SPSSPRO软件进行灰色关联度分析,并计算各序列间的关联度

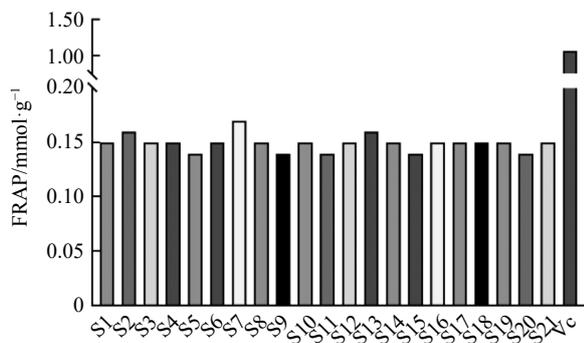


图5 羊胆汁及Vc铁离子还原能力  
Fig. 5 Iron ion reduction ability of sheep bile and Vc

与关联序。由表6可知, 6个成分与3个抗氧化指标关联度均>0.6, 表示6个成分与3个抗氧化指标均有关联性, 且TCA、TDCA、TCDCA与抗氧化能力关联度均>0.8, 关联序均位于前3, 表示该3个成分可能是羊胆汁发挥抗氧化作用的主要活性成分。

表6 6个成分与抗氧化指标的关联度及关联序  
Tab. 6 Correlation degree and order of 6 components with antioxidant indicators

关联序	DPPH		ABTS		FRAP	
	关联度	成分	关联度	成分	关联度	成分
1	0.924	TCA	0.930	TCA	0.952	TCA
2	0.874	TDCA	0.866	TDCA	0.879	TDCA
3	0.856	TCDCA	0.860	TCDCA	0.876	TCDCA
4	0.797	GDCA	0.781	GDCA	0.790	GDCA
5	0.748	CA	0.742	CA	0.746	GCA
6	0.739	GCA	0.741	GCA	0.741	CA

### 3 讨论

已有文献报道采用紫外检测(200 nm)建立羊胆汁HPLC指纹图谱的方法<sup>[3]</sup>。考虑到胆汁酸类成分缺少共轭结构, 紫外吸收较弱, 蒸发光检测器为通用型检测器, 可以检测紫外无吸收物质, 故本研究采用UHPLC-ELSD建立21批羊胆汁指纹图谱, 确定了11个共有峰, 通过与对照品比对指认出TCA、TDCA、GCA、GDCA、TCDCA、CA 6个成分, 并建立了同时检测被指认的6个成分含量测定方法。收集的16个产地21批样品含量测定结果显示, 羊胆汁冻干粉中6个成分总含量范围为55.34%~86.08%, TCA、TDCA的含量均较高, 占药材冻干粉质量的39.57%~74.22%, 可知羊胆汁中胆汁酸主要以结合型胆汁酸的形式存在, 且TCA、TDCA为其最主要成分, 与文献报

道一致<sup>[22]</sup>。

熵权TOPSIS分析方法采用客观的评价方法, 排除主观因素干扰, 能更全面、准确评价药材质量。本文采用熵权TOPSIS分析方法对羊胆汁6个胆汁酸类成分含量进行不同产地样品质量分析, 结果显示综合得分排名前10的为S2、S18、S16、S9、S8、S21、S1、S10、S20、S15, 表明这些样品质量较好。21批样品中来自北方地区的9批样品大多数得分较高, 其中甘肃及河南的样品(S2、S8、S16、S15)均排名前十, 位于前五有3批(S2、S16、S8, 排名1、3、5); 21批样品中的6批绵羊的羊胆汁排名前十的有S2、S8、S10、S16、S20共5批样品, 且排名前5的有S2、S8、S16共3批样品, 表明产于北方地区绵羊胆汁质量较好。抗氧化试验研究表明不同产地羊胆汁的作用效果虽不及VC显著, 但也具有良好的DPPH、ABTS自由基清除能力和铁离子还原能力, 以6个成分含量及3个抗氧化数据为变量进行灰色关联度分析, 结果表明6个成分与3个抗氧化能力指标均具有一定关联性, 且TCA、TDCA、TCDCA 3个成分与抗氧化能力关联性均>0.8, 推测其可能是发挥抗氧化作用的重要指标成分。对熵权TOPSIS分析排名前10样品的6个成分总含量进行分析发现, 除S20外, 其余9个样品的6个成分总含量均较高, TCA、TDCA、TCDCA 3个成分的总量除S2、S20外其余8个也较高, 但S2(甘肃)、S20(宁夏)2个样品(均为绵羊)的GCA含量却远高于其他19个样品, 提示羊胆汁抗氧化能力除了与活性成分含量有关外, 可能还与各活性成分之间的比例相关。指纹图谱分析结果也显示S2、S20与对照指纹图谱的相似度均<0.50, 与其他样品差异较大。

目前中国对动物胆汁的应用尚不完善, 导致羊胆汁等大部分动物胆汁被浪费。羊与牛为同科动物, 羊胆汁中TCA、GCA、TCDCA、TDCA、GDCA、CA均为与牛胆汁共有的成分<sup>[3,23]</sup>, 中国药典2020年版人工牛黄项下显示, 胆酸为其组成原料之一, 来源为“主要由牛、羊胆汁或胆膏经提取、加工制成”。TCA、GCA可解离得到游离型胆酸, 计算21批样品中TCA、GCA、CA 3个成分总含量均>40%, 以收集样品数≥2个的5个省份的数据进行分析, 湖北(8个)、湖南(2个)的羊胆汁各有一半样品中3个成分总含量>50%, 而

甘肃、山东、河南的样品 TCA、GCA、CA 3 个成分总含量均>50%，提示以羊胆汁为原料提取制备人工牛黄所需的胆酸时可优先考虑来自这 3 个省份的羊胆汁。

本研究通过指纹图谱、含量测定及抗氧化药效学实验结合熵权 TOPSIS 及灰色关联度分析方法，对羊胆汁质量进行评价，在已有文献报道的药效作用基础上，探究了羊胆汁抗氧化能力，更进一步表明羊胆汁作为天然动物药材具有很好药用前景。

## REFERENCES

- [1] ZHANG Y J, XIA J, QIU J S, et al. Research progress in pharmacological effects and quantitative methods for biles acids in *Calculus Bovis*[J]. *J Int Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2016, 43(2): 268-274.
- [2] XIONG J, ZHENG T J, SHI Y, et al. Analysis of the fingerprint profile of bioactive constituents of traditional Chinese medicinal materials derived from animal bile using the HPLC-ELSD and chemometric methods: An application of a reference scaleplate[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 50-56.
- [3] LI Y, YU H L, WANG W, et al. HPLC fingerprints of pig, cattle and sheep biles[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2018, 43(12): 2580-2585.
- [4] SHI Y, SUN D M, XIONG J, et al. Study on determination of cholic acid and glycocholic acid from *Capra ovis* fellis pulvis by HPLC-ELSD[J]. *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2013, 27(9): 935-937.
- [5] LIU Z M. A pilot test studies on extraction of cholic acid from bovine and ovine bile and establishment of HPLC-MS/MS for determination of cholic acid[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University(内蒙古农业大学), 2017.
- [6] 赵文静, 蒋蕾, 旺建伟. 羊胆汁对炎症介质含量影响的实验研究[J]. *四川中医*, 2010, 28(1): 32-33.
- [7] 黄曼夷, 徐辉光. 羊胆治疗肺结核 28 例的初步经验介绍[J]. *中医杂志*, 1956(7): 361-363.
- [8] WANG X, CHEN X, WANG X, et al. Research progress on synthesis, determination and pharmacological effects of animal bile and bile acids[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2020, 48(18): 36-43.
- [9] 季晓明, 卢冬梅. 中药对常见病原菌效果分析[J]. *北方牧业*, 2010(6): 28.
- [10] 赵文静, 蒋蕾, 旺建伟. 羊胆汁与其主要成分抗炎作用的比较研究[J]. *中医药学报*, 2009, 37(4): 20-22.
- [11] 赵文静, 蒋蕾, 旺建伟. 羊胆汁抗急性炎症作用与 PGE<sub>2</sub> 含量变化相关的实验研究[J]. *中医药信息*, 2009, 26(5): 50-52.
- [12] 李宁, 蒋响轩, 魏凯. 羊胆汁酸在畜禽生产中的应用前景[J]. *山东畜牧兽医*, 2022, 43(12): 23-27.
- [13] 中国药典. 一部[S]. 2020: 5-9.
- [14] 白宗利, 任玉珍, 陈彦琳, 等. 胆南星的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2010, 12(4): 15-18.
- [15] 崔亚晨, 单丽倩, 单国顺, 等. 猪牛羊胆汁及其制成的胆南星药效作用对比研究[J]. *中药材*, 2021, 44(3): 586-592.
- [16] CUI Y C, SHAN L Q, LIU X F, et al. Investigation of protective effect of different bile and their *Arisaema* cum bile on acute lung injury rats induced by LPS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(1): 125-132.
- [17] ZHOU X X, LIU D, YE X C. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of sheep bile[J]. *China Herbiv Sci*(中国草食动物科学), 2021, 41(4): 42-45.
- [18] BAO L G, ZHOU L, HE X L, et al. Activating effects of taurochenodeoxycholic acid on glucocorticoid receptor[J]. *Chin J Vet Sci*(中国兽医学报), 2019, 39(2): 286-291, 322.
- [19] XIN Y T, LI W M, GAO Y. Effect of pretreatment methods on content of cholic acid of sheep bile[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(20): 30-32.
- [20] CHEN J M, WANG T, GUO Q S, et al. Comprehensive antioxidant and anti-inflammatory activity of alcohol extracts from *Chrysanthemum indicum* in different areas based on entropy weight and TOPSIS methodology[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2021, 46(4): 907-914.
- [21] CUI T, LI W Y, WEN S, et al. Comprehensive quality evaluation of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* from different producing areas based on OPLS-DA combined with entropy weight TOPSIS method[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2022, 24(8): 1561-1567.
- [22] YAO L W, SHI Y, WEI F, et al. Investigation, determination and discussion on bile acids in sheep bile[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2021, 41(10): 1718-1723.
- [23] 张能荣. 牛羊胆汁质量的研究[J]. *中草药*, 1983, 14(7): 15-17.

收稿日期: 2023-09-28

(本文责编: 沈倩)