

HPLC-MS/MS 法测定体外培育牛黄与天然牛黄中 26 种胆汁酸成分

雷 凯, 刘雅楠, 张程亮, 向 东, 李喜平, 任秀华, 刘 东*

华中科技大学同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030

摘要:目的 建立 HPLC-MS/MS 法同时测定体外培育牛黄 *Calculus Bovis Sativus* (CBS) 和天然牛黄 *Calculus Bovis* (CB) 中 26 种胆汁酸成分。方法 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 流动相为水 (0.1%甲酸+10 mmol/L 乙酸铵)-甲醇 (0.1%甲酸+10 mmol/L 乙酸铵), 体积流量 0.15 mL/min, 梯度洗脱, 进样量为 10 μL。质谱采用电喷雾离子源, 负离子模式监测, 喷射电压-4 500 V, 离子源温度 350 °C, 采用多反应监测模式 (MRM)。结果 牛黄中 26 种胆汁酸在线性范围内峰面积与摩尔浓度均呈良好的线性关系 ($r \geq 0.9914$), 加样回收率为 98.2%~102.3%, 精密度 RSD 值小于 0.95%, CBS 和 CB 的胆汁酸类成分在种类和含量上存在一定差异。结论 该法灵敏度高、专属性好、结果可靠, 适用于牛黄中胆汁酸成分的测定。

关键词: 体外培育牛黄; 天然牛黄; 液质联用; 胆汁酸; 多反应监测模式

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2447-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.029

Simultaneous quantification of 26 bile acids in *Calculus Bovis Sativus* and *Calculus Bovis* by HPLC-MS/MS

LEI Kai, LIU Ya-nan, ZHANG Cheng-liang, XIANG Dong, LI Xi-ping, REN Xiu-hua, LIU Dong

Department of Pharmacy of Tongji Hospital, Tongji Medical School, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 26 bile acids in *Calculus Bovis Sativus* (CBS) and *Calculus Bovis* (CB). **Methods** Chromatographic separation was performed on a Symmetry C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) with linear gradient elution of water (0.1% formic acid + 10 mmol/L ammonium acetate) and methanol (0.1% formic acid + 10 mmol/L ammonium acetate) at a flow rate of 0.15 mL/min, and the injection volume was 10 μL. Switching electrospray ion source polarity in negative mode. The ion spray voltage was set at -4 500 V, the turbo spray temperature was maintained at 350 °C, and multiple-reaction monitoring (MRM) was employed. **Results** The 26 bile acids showed good linearity within the linear ranges ($r \geq 0.9914$). The average recoveries of the bile acids ranged from 98.2% to 102.3%. The precisions (RSD) for the investigated components were less than 0.95%. There are some differences in variety and chemical components between CBS and CB. **Conclusion** The proposed method is reliable and has high sensitivity and good specificity, which allows the determination of various bile acids in CB.

Key words: *Calculus Bovis Sativus*; *Calculus Bovis*; HPLC-MS/MS; bile acids; MRM

牛黄 *Calculus Bovis* (CB) 为我国传统名贵药材, 又名“土精”“丑宝”。CB 来源于牛科动物的干燥肝胆结石, 始载于《神农本草经》^[1], 主治热病神昏、癫痫发狂、咽喉肿痛、惊厥抽搐等病症^[2]。CB 还是多种中成药的重要配方, 但天然 CB 药源紧缺且价格高昂, 难以满足临床用药需求。体外培育

牛黄 *Calculus Bovis Sativus* (CBS) 因其与 CB 有相似的化学成分和药理作用, 被认为是 CB 的理想替代品^[3]。CBS 与 CB 的主要活性成分均为胆红素和胆汁酸, 经过多年研究, 胆红素的含量和类型两药已经接近^[4], 但在胆汁酸的种类及含量上仍有差异^[5-6]。因此对胆汁酸成分进行定量研究将成为提

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573788, 81503225)

作者简介: 雷 凯 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为临床药学和药物分析。Tel: 15327121308 E-mail: lk502319233@163.com

*通信作者 刘 东 (1969—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为临床药学。Tel: (027)83663643 E-mail: ld2069@outlook.com

高牛黄类药材质量标准和保障其药物稳定性的关键。本研究旨在深入研究 CBS 和 CB 的胆汁酸成分,解决牛黄类药材质量控制的难题。

目前,虽然已有文献报道将液质联用法应用于 CBS 和 CB 的测定^[6-7],但是测定胆汁酸种类少,且未对胆汁酸含量差异做可视化的模式识别分析。故本研究采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法同时测定 CBS 和 CB 中 26 种胆汁酸成分,通过探究 CBS 和 CB 在胆汁酸类成分种类及含量上的差异,为牛黄类药材的质量控制及开发应用提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪,配有 SIL-20ACHT 自动进样器和 CTO-20AC 柱温箱(日本岛津公司);4000 plus 型质谱仪,含三重四级杆离子阱质量分析器,电雾化离子源和 Analyst 1.6.1 数据系统(美国 AB Sciex 公司);Multifuge X3R 型高速冷冻离心机(赛默飞世尔有限公司);MS105DU 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);VORTEX-GENE 2 型涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司);KQ-600KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PURELAB flex 纯水仪(英国 ELGA 公司)。

1.2 试药

26 种胆汁酸对照品:石胆酸(LCA,批号 C1420-000)、鹅去氧胆酸(CDCA,批号 C0985-000)、熊去氧胆酸(UDCA,批号 C1020-000)、猪去氧胆酸(HDCA,批号 C0860-000)、去氧胆酸(DCA,批号 C1150-000)、脱氢胆酸(DHCA,批号 C2000-000)、鼠胆酸(MCA,批号 C1895-000)、胆酸(CA,批号 C1960-000)、猪胆酸(HCA,批号: C1850-000)、甘氨石胆酸(GLCA,批号 C1435-000)、甘氨脱氢胆酸(GDHCA,批号 C2020-000)、甘氨脱氧胆酸钠(GDCA-Na,批号 C0867-000)、甘氨猪去氧胆酸钠(GHDCA-Na,批号 C0867-000)、甘氨鹅去氧胆酸钠(GCDCA-Na,批号 C0962-000)、甘氨熊去氧胆酸(GUDCA,批号 C1025-000)、甘氨胆酸钠(GCA,批号 C1927-000)、甘氨猪胆酸钠(GHCA-Na,批号 C1860-000)、牛磺石胆酸(TLCA,批号 C1470-000)、牛磺脱氧胆酸钠(TDCA-Na,批号 C0892-000)、牛磺猪去氧胆酸(THDCA,批号 C0890-000)、牛磺熊去氧胆酸钠(TUDCA-Na,批号 C1052-000)、牛磺鹅

去氧胆酸钠(TCDCA-Na,批号 C0992-000)、牛磺脱氢胆酸(TDHCA-Na,批号 C2047-000)、牛磺猪胆酸钠(THCA-Na,批号 C1887-000)、牛磺鼠胆酸钠(TMCA-Na,批号 C1899-000)、牛磺胆酸钠(TCA-Na,批号 C1967-000)均购自 Steraloids 公司,以上对照品经面积归一法测定,质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(美国 Fisher 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯;CBS 10 个批次和 CB 中 5 个批次(CB 1~5)购于武汉健民大鹏药业有限公司,CB 中 2 个批次(CB 6、7)购于安国市达欣药材行,见表 1。

表 1 体外培育牛黄和天然牛黄样品来源

Table 1 Sample sources of CBS and CB

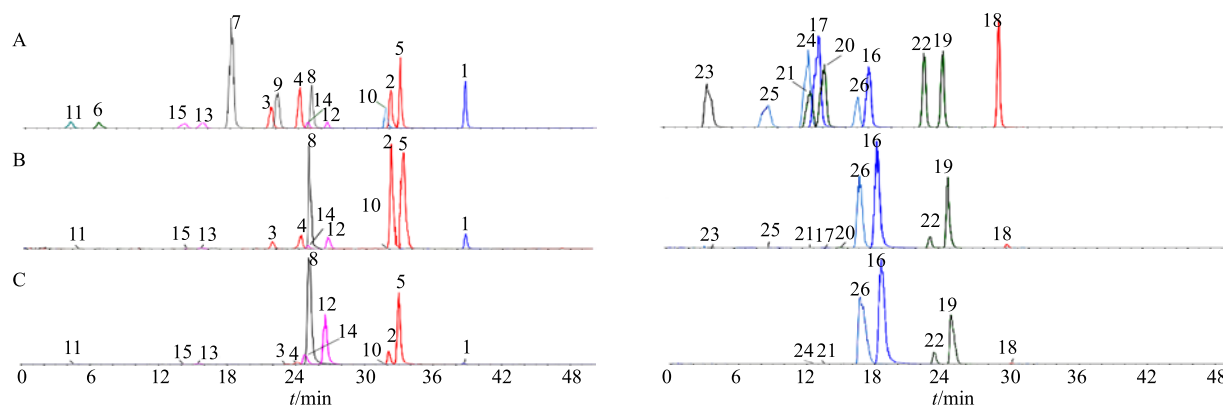
编号	批号	牛黄种类
CBS1	150203	体外培育牛黄
CBS2	150201	体外培育牛黄
CBS3	150202	体外培育牛黄
CBS4	150301	体外培育牛黄
CBS5	150303	体外培育牛黄
CBS6	150402	体外培育牛黄
CBS7	150403	体外培育牛黄
CBS8	150501	体外培育牛黄
CBS9	150502	体外培育牛黄
CBS10	150602	体外培育牛黄
CB1	140801	天然牛黄
CB2	150201	天然牛黄
CB3	150202	天然牛黄
CB4	150203	天然牛黄
CB5	150204	天然牛黄
CB6	XD0015A1	天然牛黄
CB7	XD0015A2	天然牛黄

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm),流动相为水(0.1%甲酸+10 mmol/L 乙酸铵)(A)-甲醇(0.1%甲酸+10 mmol/L 乙酸铵)(B),梯度洗脱(0~2 min, 60%B; 2~4 min, 60%~90% B; 40~45 min, 95% B; 45~50 min, 60% B),体积流量为 0.15 mL/min;进样量 10 μL;柱温 40 °C。对照品和样品色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化源(ESI);定量分析采用多反应离子监测(MRM);监测模式为负离子监测模式;离子源喷射电压(IS)为-45 000 V;雾化温度为 350 °C;雾化气(GS1)和辅助气(GS2)为氮气,GS1 为 275.8 kPa,GS2 为 275.8 kPa,气帘气为 137.9 kPa。对照品、CBS 和 CB 样品溶液 MRM 提取离子流谱图见图 1,化合物离子对,优化后的去簇电压(DP)和碰撞能(CE)等信息见表 2。



1-石胆酸 2-鹅去氧胆酸 3-熊去氧胆酸 4-猪去氧胆酸 5-去氧胆酸 6-脱氢胆酸 7-鼠胆酸 8-胆酸 9-猪胆酸 10-甘氨石胆酸 11-甘氨脱氢胆酸 12-甘氨鹅去氧胆酸钠 13-甘氨猪去氧胆酸钠 14-甘氨熊去氧胆酸钠 15-甘氨去氧胆酸 16-甘氨酸胆酸 17-甘氨酸猪胆酸 18-牛磺胆酸 19-牛磺鹅去氧胆酸钠 20-牛磺猪去氧胆酸 21-牛磺熊去氧胆酸钠 22-牛磺去氧胆酸 23-牛磺脱氢胆酸钠 24-牛磺猪胆酸钠 25-牛磺鼠胆酸 26-牛磺胆酸

1-LCA 2-CDCA 3-UDCA 4-HDCA 5-DCA 6-DHCA 7-MCA 8-CA 9-HCA 10-GLCA 11-GDHCA 12-GDCA-Na 13-GHDCA-Na 14-GCDCA-Na 15-GUDCA-Na 16-GCA 17-GHCA 18-TLCA 19-TDCA-Na 20-THDCA 21-TUDCA-Na 22-TCDCa-Na 23-TDHCA-Na 24-THCA-Na 25-TMCA-Na 26-TCA-Na

图 1 混合对照品溶液 (A)、CBS 样品溶液 (B) 和 CB (C) 的 MRM 提取离子流图

Fig. 1 MRM chromatograms of mixed reference solution (A), CBS sample solution (B), and CB sample solution (C)

表 2 26 种胆汁酸质谱参数

Table 2 Optimized MS parameters for 26 bile acids

峰号	成分	相对分子质量	t_R/min	$MS^1 (m/z)$	$MS^2 (m/z)$	DP/V	CE/eV
1	LCA	376.57	38.45	375.2	375.2	-150	-10
2	CDCA	392.57	31.67	391.3	391.3	-145	-10
3	UDCA	392.57	21.25	391.3	391.3	-155	-10
4	HDCA	392.57	23.74	391.3	391.3	-150	-10
5	DCA	392.57	32.54	391.3	391.3	-145	-10
6	DHCA	402.52	6.60	401.1	249.2	-120	-40
7	MCA	408.57	17.90	407.3	407.3	-160	-10
8	CA	408.57	24.87	407.3	407.3	-160	-10
9	HCA	408.57	21.88	407.3	407.3	-150	-10
10	GLCA	433.62	31.54	432.4	74.1	-120	-68
11	GDHCA	459.58	4.10	458.2	74.1	-130	-65
12	GDCA-Na	471.61	26.19	448.3	74.1	-125	-78
13	GHDCA-Na	471.61	15.39	448.2	74.1	-130	-68
14	GCDCA-Na	471.61	24.45	448.2	74.1	-125	-62
15	GUDCA	449.62	13.77	448.2	74.1	-120	-65
16	GCA	465.63	18.60	464.3	74.1	-125	-78
17	GHCA-Na	487.60	14.06	464.3	74.1	-110	-70
18	TLCA	483.71	29.80	482.3	80.0	-150	-110
19	TDCA-Na	521.69	24.57	498.3	80.0	-140	-105
20	THDCA	499.70	13.93	498.2	80.0	-150	-107
21	TUDCA-Na	521.69	12.70	498.3	80.0	-120	-75
22	TCDCa-Na	521.69	22.89	498.3	80.0	-130	-115
23	TDHCA-Na	531.64	3.93	508.2	80.0	-140	-120
24	THCA-Na	537.69	12.41	514.3	80.0	-140	-108
25	TMCA-Na	537.69	8.28	514.3	80.0	-145	-120
26	TCA-Na	537.68	16.87	514.3	80.0	-150	-110

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别称取各胆汁酸对照品适量,精密称定,加 50%甲醇配制成对照品溶液。分别量取各对照品溶液适量,加入 50%甲醇适量,摇匀,即得 LCA、CDCA、UDCA、HDCA、DCA、DHCA、MCA、CA、HCA、GLCA、GDHCA、GDCA-Na、GHDCA-Na、GCDCA-Na、GUDCA、GCA、GHCA-Na、TLCA、TDCA-Na、THDCA、TUDCA-Na、TCDCA-Na、TDHCA-Na、THCA-Na、TMCA-Na 和 TCA-Na 的混合对照品溶液,浓度分别为 0.51、10.09、0.51、0.52、10.12、0.55、0.52、100.21、0.53、0.51、0.52、100.12、0.51、10.19、0.52、100.20、0.55、0.51、100.21、0.54、0.54、10.21、0.52、0.55、0.49、100.56 $\mu\text{mol/L}$ 。所有操作均在避光条件下进行。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 CBS 或 CB 粉末(过 5 号筛) 0.05 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密

加入配制好的溶剂(1%甲酸水-甲醇 5:95) 10 mL,密塞,称定质量,冰浴超声(功率为 250 W) 1 h,放冷,再称定质量,用溶剂补足减少的质量,混匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得到供试品溶液。所有操作均在避光条件下进行。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、检测限(LOD) 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,采用倍数稀释法分别稀释,按照上述色谱和质谱条件进行分析,记录色谱峰面积。以对照品的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行线性回归。将混合对照品溶液逐步稀释并进行测定,分别以信噪比(S/N)=3 时各对照品的量作为 LOD。结果 26 种待测组分的浓度和峰面积的 r 值均大于 0.991 4,表明该方法的线性关系良好,各组分的回归方程、线性范围、LOD 见表 3。

表 3 26 种胆汁酸的回归方程、相关系数、线性范围、LOD

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, and LOD of 26 bile acids

峰号	成分	标准曲线方程	r	线性范围/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
1	LCA	$Y=1.72\times 10^6 X-1.05\times 10^4$	0.997 5	0.051~10.200	0.004
2	CDCA	$Y=1.35\times 10^6 X+4.55\times 10^5$	0.991 4	1.009~50.450	0.055
3	UDCA	$Y=1.74\times 10^6 X-1.06\times 10^4$	0.997 2	0.051~10.200	0.007
4	HDCA	$Y=2.41\times 10^6 X-1.06\times 10^4$	0.992 4	0.052~10.400	0.005
5	DCA	$Y=1.70\times 10^6 X+8.48\times 10^5$	0.992 5	1.012~50.600	0.024
6	DHCA	$Y=8.76\times 10^4 X-901$	0.996 3	0.055~11.000	0.006
7	MCA	$Y=2.41\times 10^6 X-9.81\times 10^3$	0.996 3	0.052~10.400	0.005
8	CA	$Y=1.34\times 10^6 X+5.71\times 10^6$	0.996 5	10.021~501.050	0.130
9	HCA	$Y=2.39\times 10^6 X-3.13\times 10^3$	0.992 7	0.053~10.600	0.001
10	GLCA	$Y=8.12\times 10^5 X-7.42\times 10^3$	0.998 3	0.051~10.200	0.005
11	GDHCA	$Y=1.90\times 10^4 X-186$	0.997 9	0.052~10.400	0.002
12	GDCA-Na	$Y=2.85\times 10^5 X+4.47\times 10^4$	0.998 3	10.012~500.600	0.058
13	GHDCA-Na	$Y=4.91\times 10^5 X-5.58\times 10^3$	0.996 7	0.051~10.200	0.004
14	GCDCA-Na	$Y=3.88\times 10^5 X-5.44\times 10^3$	0.997 6	1.019~50.950	0.015
15	GUDCA	$Y=4.58\times 10^5 X-6.30\times 10^3$	0.997 3	0.052~10.400	0.004
16	GCA	$Y=3.42\times 10^5 X+3.69\times 10^5$	0.996 9	10.020~501.000	0.225
17	GHCA-Na	$Y=5.51\times 10^5 X-7.53\times 10^3$	0.998 0	0.055~11.000	0.002
18	TLCA	$Y=8.12\times 10^5 X-7.42\times 10^3$	0.998 3	0.051~10.200	0.008
19	TDCA-Na	$Y=2.12\times 10^5 X+5.82\times 10^4$	0.994 3	10.021~501.050	0.155
20	THDCA	$Y=4.44\times 10^5 X-7.18\times 10^3$	0.995 7	0.054~10.800	0.004
21	TUDCA-Na	$Y=1.94\times 10^5 X-3.22\times 10^3$	0.998 5	0.054~10.800	0.004
22	TCDCA-Na	$Y=2.00\times 10^5 X-1.91\times 10^3$	0.996 8	1.021~51.050	0.025
23	TDHCA-Na	$Y=3.71\times 10^5 X-5.99\times 10^3$	0.998 2	0.052~10.400	0.005
24	THCA-Na	$Y=3.54\times 10^5 X-4.78\times 10^3$	0.997 4	0.055~11.000	0.004
25	TMCA-Na	$Y=2.14\times 10^5 X-2.92\times 10^3$	0.998 0	0.049~9.800	0.005
26	TCA-Na	$Y=1.98\times 10^5 X-6.31\times 10^3$	0.997 0	10.056~502.800	0.265

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,记录峰面积,结果显示 RSD 值均小于 0.95%,表明该方法精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一 CBS 供试品溶液(批号 150202),分别于 0、4、8、12、24 h 进样分析测定,

记录峰面积,考察供试品溶液的稳定性。结果显示被测物峰面积 RSD<2.85%,符合药典规定,表明样品稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批号的 CBS 样品(批号 150202) 0.05 g,精密称取 6 份,按“2.1”项下分

析条件记录 26 种胆汁酸的峰面积, 计算质量分数的 RSD, 考察样品的稳定性, 结果 26 种胆汁酸的 RSD 值均小于 2.09%, 说明本方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已测定的 CBS (批号 150202) 样品 0.05 g, 分别精密加入高、中、低水平的对照品溶液, 每个浓度 3 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液。在“2.1”项分析条件下测定 26 个胆汁酸的峰面积, 计算回收率和 RSD 值。结果 26 种胆汁酸的平均回收率为 98.2%~102.3%, RSD 为 0.24%~1.17%, 符合药典要求。

2.4 样品测定

分别取 10 批 CBS 和 7 批 CB 样品 0.05 g,

精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品液溶液, 按“2.1”项下分析条件进行测定, 记录不同胆汁酸相应峰面积, 按照外标法将 26 个待测物的峰面积带入相应的回归方程, 计算其质量分数, 结果见表 4。由表 4 数据可知, CBS 中含量最多的是 CA, 而 CB 中含量最多的是 TCA, CBS 和 CB 样品中均不含 DHCA、MCA 和 HCA。另外, CBS 样品中含有 GHCA、GHCA、THDCA 和 TDHCA, 而 CB 样品中却不含; CB 样品中含有 GDHCA 和 THCA, 而 CBS 样品中却不含。这些 CBS 和 CB 各自独有的胆汁酸可作为潜在的鉴别 CBS 和 CB 的化合物。

表 4 CBS 和 CB 中 26 种胆汁酸的质量分数 ($n=3$)

Table 4 Contents of 26 bile acids in CBS and CB samples ($n=3$)

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)													
	LCA	CDCA	UDCA	HDCA	DCA	DHCA	MCA	CA	HCA	GLCA	GDHCA	GDCA	GHCA	GHCA
CBS1	1.94	5.35	0.45	0.45	21.94	ND	ND	40.25	ND	0.53	ND	23.55	0.16	
CBS2	1.83	6.25	0.25	0.57	25.27	ND	ND	55.21	ND	0.52	ND	25.51	0.21	
CBS3	1.72	5.32	0.31	0.64	19.15	0.01	BL	36.21	BL	0.56	BL	22.13	0.15	
CBS4	1.52	6.32	0.54	0.24	24.15	ND	ND	36.43	BL	0.46	ND	29.32	0.20	
CBS5	1.62	6.51	0.24	0.35	25.25	0.02	BL	52.54	ND	0.58	BL	22.04	0.15	
CBS6	1.32	4.58	0.46	0.45	38.14	ND	ND	56.51	ND	0.62	ND	18.21	0.08	
CBS7	1.59	5.21	0.48	0.61	25.75	ND	ND	29.64	ND	0.45	ND	12.35	0.18	
CBS8	1.68	6.21	0.61	0.55	21.45	ND	ND	46.31	ND	0.65	ND	14.51	0.33	
CBS9	1.72	6.45	0.45	0.38	17.14	ND	ND	30.59	ND	0.61	ND	20.51	0.41	
CBS10	1.54	7.12	0.52	0.42	21.24	ND	ND	40.23	ND	0.62	ND	45.21	0.24	
CB1	0.94	2.51	0.03	ND	16.15	ND	ND	19.00	ND	0.35	0.04	56.51	ND	
CB2	1.52	4.28	BL	0.04	21.94	ND	ND	20.45	ND	0.38	0.01	58.20	ND	
CB3	0.08	3.15	0.02	0.01	11.45	ND	ND	15.21	ND	0.12	0.02	44.60	ND	
CB4	0.10	1.52	0.04	0.09	16.45	ND	ND	5.52	ND	0.24	BL	39.54	ND	
CB5	0.02	1.07	0.10	ND	5.14	ND	ND	28.20	ND	0.10	BL	20.51	ND	
CB6	0.18	1.15	0.02	0.11	3.45	ND	ND	6.21	ND	0.12	0.02	24.60	ND	
CB7	0.14	2.31	0.03	ND	6.15	ND	ND	15.00	ND	0.25	0.04	29.51	ND	

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)													
	GCDCA	GUDCA	GCA	GHCA	TLCA	TDCA	THDCA	TUDCA	TCDCA	TDHCA	THCA	TMCA	TCA	
CBS1	3.52	BL	7.52	0.05	1.82	10.52	0.06	BL	4.62	0.02	ND	BL	20.62	
CBS2	3.65	BL	5.69	0.03	1.60	5.62	0.02	BL	3.60	0.06	ND	BL	36.60	
CBS3	5.21	BL	6.51	BL	0.95	12.20	0.05	BL	2.20	0.01	ND	BL	40.21	
CBS4	4.61	BL	4.68	BL	1.92	19.13	BL	BL	1.83	0.04	ND	BL	21.62	
CBS5	2.61	BL	8.61	0.01	1.92	10.98	0.02	0.01	3.98	BL	ND	BL	18.98	
CBS6	2.50	BL	8.83	0.12	1.42	6.83	BL	BL	4.83	0.04	ND	BL	22.83	
CBS7	3.94	BL	4.68	0.06	1.20	8.68	0.01	BL	2.68	BL	ND	BL	30.68	
CBS8	3.82	BL	4.53	0.03	1.53	2.53	0.13	BL	1.53	0.03	ND	BL	26.53	
CBS9	2.68	BL	3.38	0.01	1.08	2.38	0.08	BL	4.38	0.08	ND	BL	20.38	
CBS10	3.02	BL	4.23	0.04	0.95	8.23	0.13	BL	15.62	0.03	ND	BL	30.13	
CB1	12.54	0.18	35.69	ND	0.88	20.68	ND	0.08	6.52	ND	BL	0.08	75.62	
CB2	10.65	0.09	45.62	ND	0.91	32.02	ND	0.19	9.62	ND	0.09	0.02	82.56	
CB3	16.50	0.16	53.21	ND	0.01	12.02	ND	0.29	5.84	ND	0.02	0.22	22.77	
CB4	6.51	0.02	32.61	ND	0.07	6.02	ND	0.05	20.62	ND	BL	BL	92.26	
CB5	2.51	0.19	19.65	ND	0.99	35.05	ND	0.09	15.15	ND	BL	0.15	72.27	
CB6	8.50	0.26	23.21	ND	0.05	5.02	ND	0.19	2.84	ND	0.08	0.12	50.77	
CB7	8.54	0.08	35.2	ND	0.52	10.68	ND	0.18	2.52	ND	BL	0.08	80.62	

ND 表示未检测到, BL 表示在 LOD 以下

ND means not detected, BL means below LOD

2.5 CBS 和 CB 差异成分分析

采用 SIMCA-P 13.0 软件对 CBS 和 CB 的胆汁酸成分含量进行分析^[8]。在主成分分析 (principal component analysis, PCA) 得分图 (图 2) 上每个点代表一个样品, CBS 和 CB 样品分别聚集为 2 组, 说明得分图可区分 CBS 和 CB 样品的结果差异可视化, 进一步验证定量测定的分析结果。CBS 和 CB 样品的 PCA 载荷图 (图 3) 的每个点代表一个胆汁酸成分, 点距离原点越远权重越大, 在区分样品中的作用越大。由图 3 可知, DHCA、GDHCA 这两种胆汁酸对 CBS 和 CB 的区分作用不大。LCA 等其余胆汁酸对区别 CBS 和 CB 样品贡献较大, 这与表 4 测得的数据相吻合, 可作为鉴别 CBS 和 CB 的标志化合物, 另外也可为解释 CBS 和 CB 的药理作

用提供物质基础。

3 讨论

3.1 样品提取方法的选择

由于牛黄类中药中物质成分复杂, 胆汁酸种类繁多, 为了使所有胆汁酸都具有良好的溶解性, 本实验分别考察了多种提取溶剂 (甲醇、50% 甲醇、1% 甲酸水-甲醇 5:95) 和超声时间 (20、40、60、120 min) 对 CBS 和 CB 中提取胆汁酸成分的影响^[5,9]。结果显示, 选择 1% 甲酸水-甲醇 5:95 作为提取溶剂, 避光超声提取 60 min 作为提取条件时, 提取效率最高。

3.2 色谱条件的优化

检测的胆汁酸种类较多, 且化学结构相似, 其中部分胆汁酸是同分异构体^[10], 同分异构体胆汁酸

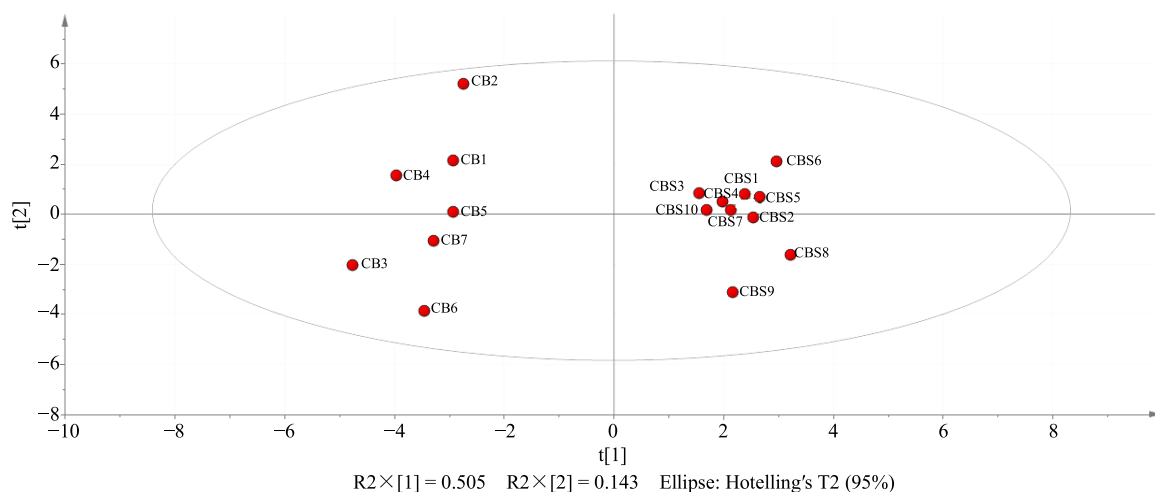


图 2 CBS 和 CB 样品中胆汁酸成分的 PCA 得分散点图

Fig. 2 PCA score scatter plot of bile acids in CBS and CB

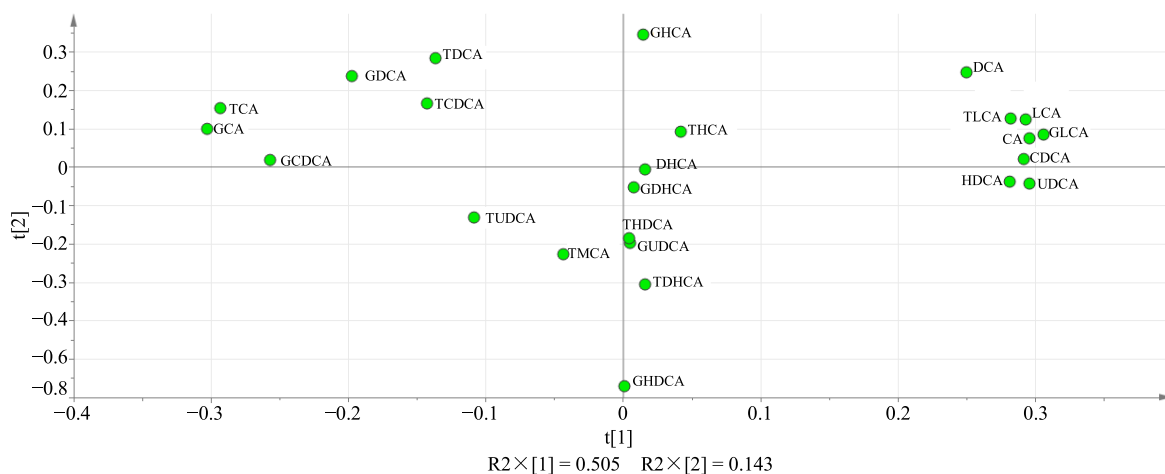


图 3 CBS 和 CB 样品中胆汁酸成分的 PCA 载荷散点图

Fig. 3 PCA loading scatter diagrams of bile acids in CBS and CB

检测离子对相同, 质谱无法进行识别。因此, 这些胆汁酸必须在液相部分完全分离才能定性、定量。

实验中考察了 Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Symmetry C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 3.5 μm)、Symmetry C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 根据分离度和峰形, Symmetry C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm) 对分离胆汁酸, 尤其是同分异构体效率较高, 且峰形较好, 因此选择此色谱柱。由于胆汁酸类成分显弱酸性, 因此流动相中加入少量酸能改善被测胆汁酸的色谱保留行为。实验中考察了水-甲醇、水 (0.05% 甲酸) - 甲醇、水 (0.1% 甲酸) - 甲醇、水 (0.1% 甲酸 + 10 mmol/L 乙酸铵) - 甲醇、水 (0.1% 甲酸 + 10 mmol/L 乙酸铵) - 甲醇 (0.1% 甲酸 + 10 mmol/L 乙酸铵) 不同的流动相, 发现随着甲酸浓度增加, 胆汁酸成分响应降低。加入乙酸铵后, 峰形变好, 且在水相和有机相中均加入甲酸和乙酸铵时出峰时间更稳定, 综合考虑最终选择水 (0.1% 甲酸 + 10 mmol/L 乙酸铵) - 甲醇 (0.1% 甲酸 + 10 mmol/L 乙酸铵) 为流动相, 经过多次优化, 得到上述梯度洗脱程序, 此条件下各成分达到理想的分离效果。

3.3 小结

本方法可有效分离 26 种成分, 达到了牛黄中各种胆汁酸同时测定的目的, 是目前牛黄类药材中测定化合物最多的检测方法, 为控制 CBS 和 CB 质量提供了必要的手段。牛黄及其代用品之间胆汁酸类成分的相对含量有明显差异, 因此胆汁酸类成分可以作为区别 CBS 与 CB 的有效手段^[9,11]。本研究显示 CBS 和 CB 之间胆汁酸的构成和含量有较大差异, 虽然 CB 中的总胆汁酸含量少于 CBS, 但 CB 中的结合型胆汁酸多于 CBS, 结合相关文献报道^[6,12], 推测牛黄类药物中结合型胆汁酸含量可能与牛黄类药物的某些疗效成呈相关。CB 的不同批次间也有明显的差异, 因为 CB 作为自然形成的产物, 质量难免存在差异。而作为大批量生产所得的 CBS, 其质量差异应在控制范围内。本实验建立的 HPLC-MS/MS 法测定的胆汁酸种类较全面, 样品处理方法简单, 分析效率高, 可应用于 CBS 和 CB 药材中胆汁酸成分的测定分析, 也为其他含胆汁酸成分的药物的分析提供参考。

参考文献

- [1] 贾 静, 孙佳明, 臧 浩, 等. 天然牛黄化学成分及药理活性研究进展 [J]. 吉林中医药, 2013, 33(3): 271-274.
- [2] Kong W, 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.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 曹 帅, 夏 晶, 杨新华, 等. 3 种牛黄及安宫牛黄丸中总胆红素含量测定方法的优化 [J]. 药物分析杂志, 2014(2): 329-334.
- [5] 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]. 中国药学杂志, 2010, 45(8): 626-629.
- [6] Feng C, Li X, Zhang C, *et al.* Development of a rapid and simple LC-MS/MS method for identification and quality control of natural *Calculus Bovis* and *Calculus Bovis Sativus* [J]. *Anal Methods*, 2015, 7(18): 7606-7617.
- [7] Liu Y, Tan P, Liu S, *et al.* A new method for identification of natural, artificial and in vitro cultured *Calculus bovis* using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(42): 304-310.
- [8] Speicher N K, Pfeifer N. Towards multiple kernel principal component analysis for integrative analysis of tumor samples [J]. *J Integr Bioinform*, 2017, doi: <https://doi.org/10.1515/jib-2017-0019>.
- [9] 张宇静, 夏 晶, 曹 帅, 等. 3 种牛黄中胆汁酸类成分的含量测定与比较 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(4): 546-551.
- [10] Kong W, Jin C, Xiao X, *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.
- [11] 彭 灿, 吕蒙莹, 李 耕, 等. 牛黄及其代用品胆酸类物质分析方法研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 632-636.
- [12] Staley C, Weingarden A R, Khoruts A, *et al.* Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2017, 101(1): 47-64.