

基于 $^1\text{H-NMR}$ 结合 LC-MS 技术分析熊胆粉及常见胆类中药中的胆酸类成分

曹 妍¹, 张佩杰¹, 李 婷¹, 许 霞¹, 常安琪¹, 李 军^{1,2}, 刘地发³, 屠鹏飞¹, 宋月林^{1,2*}

1. 北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 100029

3. 江西青峰药业有限公司 创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室, 江西 赣州 341000

摘要: 目的 建立基于核磁共振氢谱技术 ($^1\text{H-NMR}$) 结合液质联用技术 (LC-MS) 的分析方法, 阐明熊胆粉中胆酸类成分组成, 找出熊胆粉与其他常见胆类中药中的差异性成分。方法 利用 $^1\text{H-NMR}$ 非靶标分析熊胆粉及其他常见胆类中药的化学成分组, 通过信号归属表征熊胆粉中胆酸类成分组成, 以 $^1\text{H-NMR}$ 图谱分段积分后峰面积为变量进行多元统计分析。利用 LC-MS 对熊胆粉及其他常见胆类中药中 10 个胆酸类成分 (胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨酸熊去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸) 进行含量测定, 并以含量为变量进行多元统计分析。结果 基于 $^1\text{H-NMR}$ 图谱及多元统计分析发现胆酸类成分为胆类中药的主要成分, 也是熊胆粉与其他常见胆类中药的主要差异性成分。结合文献及对照品比对, 从熊胆粉中初步鉴定出 7 个胆酸类成分。进一步结合 LC-MS 含量测定结果和多元统计分析验证熊胆粉与其他常见胆类中药的主要差异性胆酸类成分为熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸。结论 熊胆粉与其他常见胆类中药的胆酸类成分存在显著差异。与其他胆类中药相比, 熊胆粉中熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸及其牛磺型结合胆酸含量较高。 $^1\text{H-NMR}$ 技术具有对化学成分组全面、快速分析的优势, 可与 LC-MS 检测相互补充, 共同应用于中药复杂体系成分分析和代谢组学的深入研究。

关键词: $^1\text{H-NMR}$; LC-MS; 熊胆粉; 常见胆类中药; 胆酸类成分; 多元统计分析; 熊去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 牛磺熊去氧胆酸; 牛磺鹅去氧胆酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)17-5283-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.004

Analysis of bile acid profiles in bear bile powder and other medicinal bile using $^1\text{H-NMR}$ and LC-MS

CAO Yan¹, ZHANG Pei-jie¹, LI Ting¹, XU Xia¹, CHANG An-qi¹, LI Jun^{1,2}, LIU Di-fa³, TU Peng-fei¹, SONG Yue-lin^{1,2}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Meteria Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. State Key Laboratory of Innovative Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine Injections, Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co., Ltd., Ganzhou 341000, China

Abstract: Objective To establish an analysis method based on $^1\text{H-NMR}$ combined with LC-MS technology to clarify the bile acid profiles in bear bile powder, and find out the differences between bear bile powder and other medicinal bile. **Methods** The $^1\text{H-NMR}$ spectra of each medicinal bile was recorded in parallel, the bile acid profiles of bear bile powder were characterized by signal attribution, and the datasets of piecewise integration were introduced for multiple statistical analysis to find the potential biomarkers. Then, the content of 10 bile acids [cholic acid (CA), ursodeoxycholic acid (UDCA), hyodeoxycholic acid (HDCA),

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773832); 创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室开放课题 (QFSKL2018002); 中国科协青年人才托举工程 (2017QNRC001)

作者简介: 曹 妍, 博士研究生, 研究方向为中药质量评价和药效物质基础。E-mail: cyan199409@163.com

*通信作者: 宋月林, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药质量评价和药效物质基础。E-mail: syltwc2005@163.com

chenodeoxycholic acid (CDCA), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), glycyrsodeoxycholic acid (GUDCA), glycohyodeoxycholic acid (GHDCA), taurocholic acid (TCA), glycocholic acid (GCA)] were determined using LC-MS, and then the content was used as variables for multivariate statistical analysis. **Results** Based on $^1\text{H-NMR}$ spectrum and multivariate statistical analysis results, it was found that bile acid profiles were the main components of medicinal bile and the main differences between bear bile powder and other medicinal bile. With the assistance of literature and reference compounds, seven bile acids were tentatively identified from the representative spectrum of bear bile powder. Combined with LC-MS results, it was found that UDCA, CDCA, TUDCA and TCDCA contributed to primary differences. **Conclusion** The bile acid profiles in bear bile powder is significantly different from that in other medicinal bile, UDCA, CDCA, TUDCA and TCDCA have the potential to be the biomarkers. Furthermore, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy can provide comprehensively qualitative and quantitative information for TCMs, and it should be an eligible tool as well as LC-MS for the quality evaluation of TCMs.

Key words: $^1\text{H-NMR}$; LC-MS; bear bile powder; other medicinal bile; bile acid profiles, multivariate statistical analysis; hyodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; tauroursodeoxycholic acid; taurochenodeoxycholic acid

胆类中药是我国传统中药的重要组成部分,如熊胆、蛇胆、猪胆、牛胆、羊胆、牛黄等,具有悠久的临床使用历史。其中熊胆粉是熊科动物黑熊 *Selenarctos thibetanus* Cuvier 或棕熊 *Ursus arctos* L. 经胆囊手术引流胆汁并干燥而得到的粉末。其性寒味苦,具有封脉窍、止腐、生肌、明目之功效,主治热病燥渴、风热目赤、黄疸等症^[1]。现代临床研究表明熊胆中所含的牛磺熊去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸等几十种胆汁酸成分及胆固醇、氨基酸等对治疗肝胆疾病及因肝胆失调引起的相关疾病具有显著疗效^[2-4]。目前以熊胆粉为原料的中成药已上市 150 多种,如熊胆胶囊、熊胆救心丸、熊胆痔灵膏等^[5]。随着熊胆粉药用需求的增大和野生动物捕猎的禁止,市场上熊胆资源紧缺,经常有不法分子将猪、牛、羊胆通过黄柏或者黄连浸汁等方式进行混伪后销售^[6]。因此,亟需建立快速、高效的胆类中药分析方法从而阐明熊胆粉化学成分组,进一步找出熊胆粉与其他常见胆类中药的差异性成分,推进熊胆粉替代资源开发工作,保证临床用药安全与有效。

核磁共振(NMR)及液质联用技术(LC-MS)作为最常用的代谢组学分析技术,经常用于中药复杂体系的分析^[7-9]。其中核磁共振氢谱技术($^1\text{H-NMR}$)无需复杂的样品前处理,如分离和衍生化,无需预知目标化合物的结构类型,无需绘制标准曲线,即可在短时间内获得样品中化学成分组的定性、定量信息,非常适合非靶标整体代谢轮廓分析。并且实验后样品可再次回收使用,尤其适用于分析熊胆这类来源稀缺、价格昂贵的样品。NMR 的主要缺陷是不具备色谱分离功能,并且灵敏度低。而 LC-MS 可以同时弥补这 2 个缺陷,对样品中的

目标化合物进行更加准确地定性定量分析。目前, $^1\text{H-NMR}$ 及 LC-MS 相结合的技术已经应用于代谢组学研究中,并且为化学成分组的分析提供了更多的信息^[10-12]。前期课题组将二者结合的技术初步应用于蛇胆中化学成分分析,不仅可以通过 $^1\text{H-NMR}$ 快速了解蛇胆整体代谢轮廓谱,还进一步结合 LC-MS 提供的高分辨数据鉴定出 57 个胆酸类成分,基本阐明了蛇胆中胆酸类成分组成^[12]。因此,本实验将通过利用 $^1\text{H-NMR}$ 对熊胆粉及常见胆类中药中化学成分组进行非靶标性轮廓分析,阐明熊胆粉中的主要胆酸类成分,结合多元统计分析找出熊胆粉及其他常见胆类中药的差异性成分。然后利用 LC-MS 对主要胆酸类成分进行绝对定量分析,找出更加精准的差异性成分,为建立熊胆粉及常见胆类中药的质量标准提供依据。同时探讨 $^1\text{H-NMR}$ 与 LC-MS 联合应用于胆类中药质量快速评价的可能性和科学价值,为中药化学成分的分析提供新思路。

1 材料

1.1 仪器

Varian Unity-500 型核磁共振波谱仪,配备 TCI 冷冻探头及 Z 方向脉冲梯度场,美国 Varian 公司;Mettler ME204 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;超声波辅助仪,美国 Danbury 公司;HPLC 液相色谱仪,配备 LC-20ADXR 泵、SIL-20AC 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、DGU-20A 脱气机、CBM-20A 控制器,日本岛津公司,连接 5500Qtrap 三重四级杆串联线性离子阱质谱仪,美国 ABSciex 公司;Milli-Q 超纯水净化系统,美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

分析级甲醇(批号 20189526)、磷酸二氢钾(批号 20183642)、磷酸氢二钠(批号 20183642)均购

自北京化工厂; LC-MS 级甲醇(批号 186273)、甲酸(批号 186204)均购自美国 Thermo-Fisher 公司, 水为实验室自制 Milli-Q 超纯水。氘代甲醇(批号 189773)及重水(批号 189826)购自美国 CIL 公司; sodium 3-trimethylsilyl[2,2,3,3- d_4] propionate (TSP- d_4 , 批号 T175296) 购自美国阿法埃莎(Alfa Aesar)化学有限公司; 胆汁酸对照品包括去氧胆酸(DCA, 批号 B21032)、熊去氧胆酸(UDCA, 批号 B21405)、猪去氧胆酸(HDCA, 批号 B21152)、鹅去氧胆酸(CDCA, 批号 B20347)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA, 批号 B21642)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA, 批号 B20624)、甘氨酸熊去氧胆酸(GUDCA, 批号 B21091)、胆酸(CA, 批号 B20274)、牛磺胆酸(TCA, 批号 B21318)、甘氨酸胆酸(GCA, 批号 B22379)、甘氨酸猪去氧胆酸(GHDCA, 批号 B21825)、人参皂苷 Rb₂ (ginsenoside Rb₂, 批号 111715) 均购自上海源叶生物科技有限公司。经 HPLC-ELSD 检测, 各对照品质量分数均大于 98%。

1.3 样品

熊胆粉(XD1~7, 批号分别为 20181101、20180103、20181201、20180101、20180701、20180401、20180801)均购自黑龙江黑宝药业股份有限公司, XD8(批号 2-131)购自吉林省延边州第一养殖场义城有限公司, XD9(Z01097289)购自吉林白头山制药有限公司; 熊胆(XD10, 批号 Z20183143)购自中国药材公司; 蛇胆(SD)、鸡胆(JD)、鸭胆(YAD)、鹅胆(ED)、牛胆(ND)、牦牛胆(MND)、羊胆(YD)、猪胆(ZD)、牛蛙胆(NWD)、狗胆(GD)、兔胆(TD)、鲤鱼胆(LYD)、白鲢鱼胆(BLYD)、武昌鱼胆(WCYD)、草鱼胆(CYD)从当地屠宰场购得, 人工牛黄(RGNH, 批号 20183253)和天然牛黄(TRNH, 批号 20188223)均购自北京同仁堂药店。所有样品均经过北京大学屠鹏飞教授鉴定为正品, 标本存放于北京中医药大学中药学院中药现代研究中心。

2 方法与结果

2.1 利用 $^1\text{H-NMR}$ 非靶标性分析熊胆粉及其他常见胆类中药

2.1.1 氘代磷酸缓冲液(PBS)的制备 精密称取氯化钠 200.00 mg、磷酸二氢钾 89.50 mg、氯化钾 5.00 mg、磷酸氢二钾 6.75 mg 于烧杯中, 用重水充分溶解。另外精密称取一定量的 TSP- d_4 固体粉末, 配制成含 0.03% TSP- d_4 的 10 mmol/L 磷酸盐重水缓

冲溶液, 与氘代甲醇等体积混合, 即得混合氘代溶剂, 待用。

2.1.2 核磁共振测试供试样品和对照样品的制备 所有胆类中药样品均在 40 °C 烘箱中干燥处理 3 d, 粉碎后过 40 目筛, 精密称取粉末 20 mg, 加入 50 倍量甲醇, 超声提取 30 min, 加入甲醇补足失重, 取混悬液置于干净离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至另一个干净离心管中, 减压浓缩后置于真空干燥箱, 30 °C 环境中干燥处理 2 h, 用 0.5 mL 混合氘代溶剂复溶残渣, 并迅速转移至 5 mm 核磁管中, 即得供试样品。取“1.2”项下对照品各 2.0 mg, 用 0.5 mL 混合氘代溶剂溶解, 并迅速转移至 5 mm 核磁管中, 即得对照品。

另精密称取各批次熊胆粉各 20 mg, 混合均匀后, 称取 120 mg, 一式 6 份平行制备, 作为质控样品, 采集 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, 通过图谱叠加判断整个分析系统的重现性。

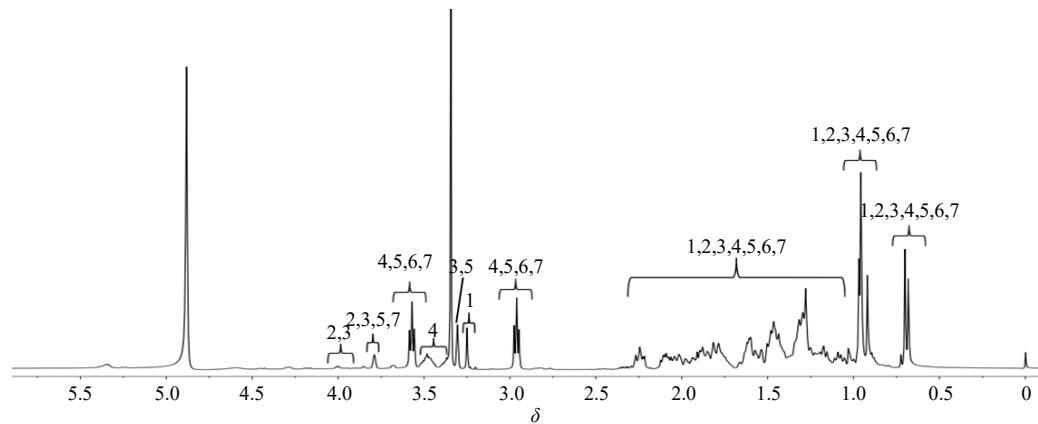
2.1.3 样品 $^1\text{H-NMR}$ 测定条件 各样品的 $^1\text{H-NMR}$ 测定条件为样品在 298 K 于 500 MHz 核磁共振仪上测定, 测定频率为 499.91 MHz, 信号累积 256 次, 弛豫时间(d_1) 2 s, 谱宽 8 012.6 Hz (-1.0~16.0), 采集时间为 2.044 7 s, 脉冲角度 90° (11.05 μs), LB 为 0.3 Hz。峰的对称性、基线与定标峰校正均为人工手动进行, 利用 TSP- d_4 定标, CD₃OD 进行锁场。

2.1.4 $^1\text{H-NMR}$ 数据处理 各批次样品的 $^1\text{H-NMR}$ 数据转成 ASCII 格式, 进一步用 MestReNova 软件 (Version 11.0.4, 西班牙 Mestrelab Research 公司) 处理数据。对核磁数据进行分段积分、归一化和尺度标准化等处理, 使数据结构标准化。以 0.02 积分段对 δ 0.5~10.0 进行分段积分, 并将数据转换为 .csv 格式, 导入 SIMCA-P 软件 (Version 14.0, 瑞典 Umetrics 公司) 进行多元统计学分析。

2.1.5 基于 $^1\text{H-NMR}$ 图谱分析熊胆粉及常见胆类中药中的胆酸类成分 中药 $^1\text{H-NMR}$ 图谱是其各组分质子信号的叠加, 图谱的信号往往来源于主要成分。熊胆粉的典型 $^1\text{H-NMR}$ 图谱如图 1 所示。将图谱分为 2 个区域, 芳香区(δ 5.0~9.0)及脂肪区(δ 0.5~4.5), 可以直观发现信号峰集中在脂肪区, 其中亚甲基和次甲基的出峰位置处(δ 1.2~2.4)信号重叠较为严重, 表明熊胆中主要成分为胆酸类成分。通过与对照品(如 UDCA、CDCA、TUDCA、TCDCA、DCA 等)比对, 并结合文献的报道及开源数据库, 如 HMDB(www.hmdb.ca)、BMRB(<http://www.bmrbl>

wisc.edu/ref_info/)等,对各主要信号进行结构归属。在高场区,可以明显地观察到 C-18、C-19、C-21 角甲基在 δ 0.67~0.69 和 δ 0.85~1.00 处出现裂分的信号峰。对照品 UDCA 在 δ 0.68 (3H, s, 18-CH₃)、0.94 (3H, s, 19-CH₃) 和 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, 21-CH₃) 出峰, CDCA 的角甲基信号出现在 δ 0.67 (3H, s, 18-CH₃)、0.92 (3H, s, 19-CH₃) 和 0.95 (3H, d, J = 4.5 Hz, 21-CH₃), 而 CA 的角甲基信号出现在 δ 0.73 (3H, s, 18-CH₃)、0.92 (3H, s, 19-CH₃) 和 1.02

(3H, d, J = 6.5 Hz, 21-CH₃)。这些信号在熊胆的 ¹H-NMR 图谱中均可以找到对应的信号峰。图 1 中也可以明显看到牛磺酸结合型胆酸的牛磺酸残基特征性信号 δ 3.57 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-25) 和 3.08 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-26), 由此推测熊胆中可能含有 UDCA、CDCA、CA 及其牛磺酸结合型胆酸, 与文献报道一致^[13]。结合文献报道^[14], 熊胆中还含有牛磺熊去氧胆酸, 在该图谱中也可以归属其信号 (表 1)。



数字编号与表 1 相同
the numeric numbers are the same as in table 1

图 1 熊胆粉典型的 ¹H-NMR 图谱
Fig. 1 Representative ¹H-NMR spectrum of bear bile powder

表 1 熊胆粉 ¹H-NMR 谱化学位移归属 (氘代甲醇-重水 1 : 1)
Table 1 Signal assignment for ¹H-NMR spectrum of bear bile powder (CD₃OD-D₂O 1 : 1)

编号	化合物	化学位移 (δ)	文献
1	UDCA*	0.68 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.36 (1H, s)	15-16
2	CDCA*	0.67 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.95 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.77 (1H, m), 4.01 (1H, m)	15-18
3	CA*	0.73 (3H, s), 0.92 (3H, s), 1.02 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.37 (1H, m), 3.79 (1H, m), 3.97 (1H, m)	15-18
4	TUDCA*	0.65 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.92 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.41 (1H, m), 3.43 (1H, m), 3.46 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.97 (2H, t, J = 6.5 Hz)	18
5	TCDCA*	0.69 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.95 (3H, d, J = 6.5 Hz), 2.95 (2H, t, J = 6.5 Hz), 3.55 (2H, t, J = 6.5 Hz), 3.35 (1H, m), 3.88 (1H, m)	18
6	TCA*	0.58 (3H, s), 0.80 (3H, s), 0.84 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.28 (2H, t, J = 6.5 Hz), 3.60 (2H, t, J = 6.5 Hz)	18
7	牛磺熊去氧胆酸	0.67 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.92 (3H, d, J = 6.5 Hz), 3.79 (1H, m), 3.53 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.92 (2H, t, J = 6.5 Hz)	19

*对照品指认
*identities were confirmed with authentic compounds.

熊胆、鸡胆、鹅胆等 10 余种常见胆类中药提取后,平行采集 ¹H-NMR 图谱 (图 2),可以明显看出不同胆类中药的 ¹H-NMR 图谱存在一定差异。在人工牛黄、羊胆、牛胆、牦牛胆、熊胆、狗胆、兔胆、蛇胆、鹅胆、鸡胆、鸭胆的图谱中都出现了牛磺酸残基的特征性信号 δ 3.57 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-25) 和 3.08 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-26), 表明这些胆类中药

均含有丰富的牛磺型胆酸。在猪胆、牛胆、牦牛胆的 ¹H-NMR 图谱中可以观察到甘氨酸型胆酸的甘氨酸残基特征性信号 δ 3.74 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-25), 表明它们富含甘氨酸型结合胆酸。收集到的 4 种鱼胆的 ¹H-NMR 图谱轮廓与其他胆类中药明显不同, 既没有牛磺酸残基的特征信号也没有甘氨酸残基的特征信号, 其主要成分为游离型胆酸。因此, 通过从

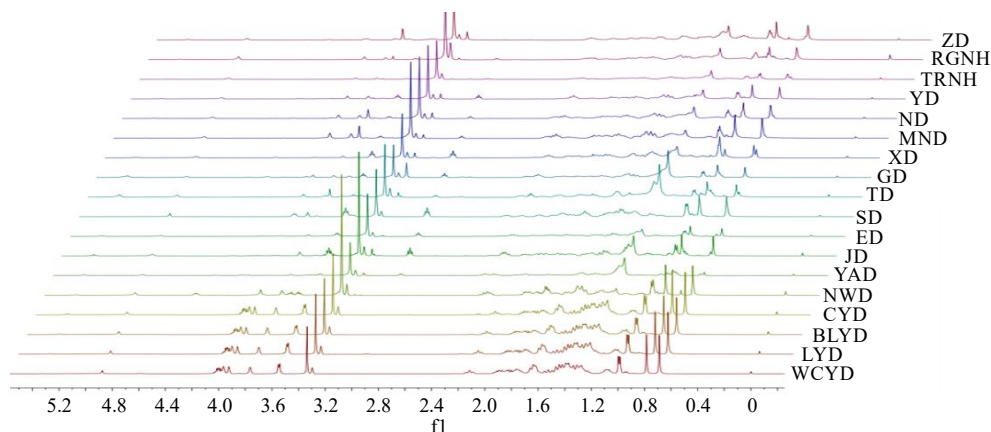


图 2 熊胆粉及其他常见胆类中药的 ^1H -NMR 图谱

Fig. 2 Overlaid ^1H -NMR spectra of bear bile powder and other medicinal bile

^1H -NMR 图谱可以快速了解胆类中药中主要胆酸类成分的结构类型。天然牛黄的 ^1H -NMR 图谱相对简单，与对照品比对后发现天然牛黄中主要含有 CA 和 TCA。由于天然牛黄来源稀缺，供不应求，人工牛黄就是人们在研究牛黄的化学成分基础上，采用成分配制的方式制作的替代品。根据《中国药典》2020 年版^[20]对人工牛黄的记载，“本品由牛胆粉、胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工而成”，其中猪去氧胆酸是由猪胆汁提取加工制成，胆固醇是由牛、猪、羊脑经提取加工制成，所以人工牛黄与猪胆、牛胆和羊胆 ^1H -NMR 图谱都有相似之处，在人工牛黄中也可以看到猪胆的特征性成分 HDCA 的特征信号 δ 0.83 (3H, s, 18-CH₃)^[21-22]。牦牛胆和牛胆的 ^1H -NMR 图谱相似度较高，主要成分均为牛磺型胆酸，尤其是 TCDCA 含量较高^[23]。蛇胆和兔胆的 ^1H -NMR 图谱中信号相对较少，与对照品比对

后发现蛇胆的 ^1H -NMR 图谱与 TCA 对照品的图谱几乎一致，而兔胆与 DCA 对照品图谱非常相似，表明 TCA 和 DCA 分别是蛇胆和兔胆的主要成分，与文献中利用 LC-MS 技术测得结果一致^[12,24-25]。

2.1.6 胆类中药 ^1H -NMR 测定结果的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 为了更全面地比较熊胆粉与其他常见胆类中药中化学成分组的差异，将所有批次样品的数据转成 ASCII 格式，并利用 MestReNova 软件分段积分后，获得定量数据矩阵。将 10 批熊胆粉归为一组，17 批其他胆类中药样品归为一组，进一步采用多元统计分析软件 SIMCA-P 进行无监督性的 PCA。各批次样品经过 PCA 后的得分图 (score plot) 和载荷图 (loading scatter plot) 分别如图 3-A 和图 3-B 所示。

所有的样品都分布在 95% 的置信区域内，2 组具有明显的分离趋势，表明熊胆粉与其他胆类中药

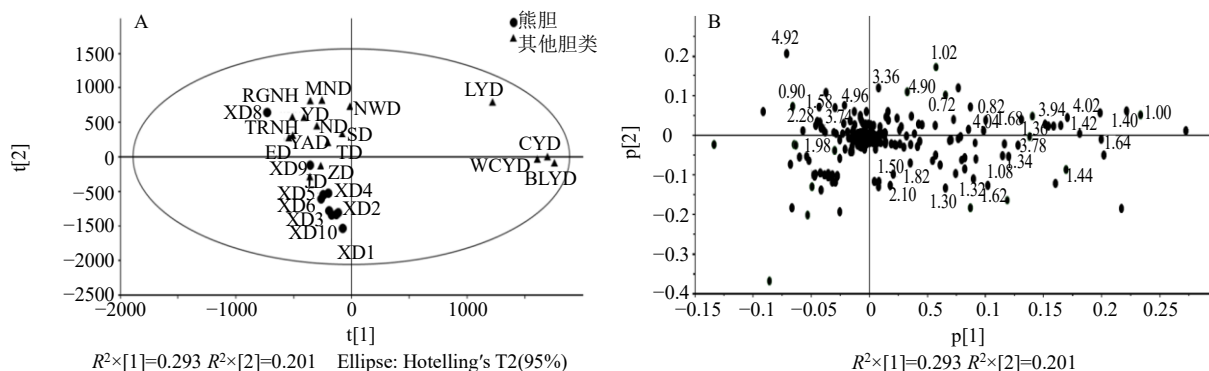


图 3 熊胆粉与其他常见胆类中药的 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 3 Score scattering (A) and loading scattering plots (B) for principal component analysis of ^1H -NMR dataset of bear bile powder and other medicinal bile

的化学成分组存在一定差异。如得分图(图 3-A)所示, 4 种鱼胆样品分布在右侧, 而非鱼胆类样品都分布在左侧, 进一步证实鱼胆样品与其他胆类中药化学成分组存在差异。另外, 载荷图(图 3-B)显示分布在第 1、4 象限的差异性信号大部分化学位移隶属于脂肪区, 例如脂肪酸的特征信号 δ 1.30、1.32、1.38, 表明鱼胆中脂肪酸含量较高。除 XD8(购自吉林义城)外, 大多数熊胆粉样品分布在第 3 象限, 并且 XD9 与 XD1~XD7 及 XD10 相距较远, 结合载荷图分析发现不同产地和厂家的熊胆粉在胆酸类成分含量上也存在差异。在第 3 象限可以看到 UDCA 特征信号 δ 0.68、0.94、0.96, CDCA 的特征信号 δ 0.92 和牛磺酸残基特征信号 δ 2.97、3.46 等, 表明与其他胆类中药相比, 熊胆粉中 UDCA、CDCA 及其牛磺型结合胆酸含量较高。

2.2 利用 LC-MS 靶向性分析熊胆粉及常见胆类中药的胆酸类成分

2.2.1 LC-MS 测试对照样品和供试品溶液的制备

¹H-NMR 测定结束后, 将“2.1.2”项下配制的核磁

供试样品和对照样品进行回收。然后取各对照品适量, 精密称定, 分别用 DMSO 配制成 10 mmol/L 的对照品储备液, 4 °C 保存, 待用。取内标物人参皂苷 Rb₂ (IS) 适量, 用 DMSO 配制成 10 mmol/L 的内标储备液, 再用 50% 甲醇稀释 20 倍, 配制成 500 μ mol/L 的内标溶液, 即得对照样品。精密称取回收后的各批次胆类中药粉末 10 mg, 分别用 1 mL 的 70% 甲醇水溶液复溶, 涡旋后经 12 000 r/min 离心 10 min, 取 97 μ L 上清液, 加入 3 μ L 内标溶液, 涡旋 1 min, 即得 LC-MS 供试品溶液。

2.2.2 LC-MS 测定条件

液相条件、质谱基本参数设置同文献所述^[12]。所测胆酸类成分的定量离子对、保留时间及其他质谱参数(脱簇电压和碰撞能)见表 2。

2.2.3 LC-MS 测定方法学考察

吸取适量各对照品的储备液, 混合, 并用 50% 甲醇水稀释至 1.0 mL, 配制成 CA、HDCA、TUDCA、TCA、GHDCA、GUDCA、CDCA、TCDCA、UDCA、GCA 质量浓度分别为 1450、1400、1780、1840、1600、714、

表 2 10 种胆酸类成分及内标物的保留时间、离子对、脱簇电压和碰撞能

Table 2 Retention time, ion transition, declustering potential, and collision energy of each bile acid and internal standard (IS)

化合物	<i>t_R</i> /min	离子对	驻留时间/ms	脱簇电压/V	碰撞能/eV
TUDCA	8.18	498.3>80.0	50	-100	-130
TCA	8.65	514.3>80.0	50	-100	-130
GUDCA	12.58	448.3>74.0	50	-100	-80
GCA	12.73	464.3>74.0	50	-100	-80
GHDCA	12.95	448.3>74.0	50	-100	-80
TCDCA	13.29	498.3>80.0	50	-100	-130
人参皂苷Rb ₂ (IS)	13.31	1 123.3>1 077.3	50	-100	-30
CA	19.92	407.3>407.3	50	-100	-60
UDCA	21.55	391.3>391.3	50	-100	-15
HDCA	22.43	391.3>391.3	50	-100	-15
CDCA	24.77	391.3>391.3	50	-100	-15

1400、1780、836、714 μ g/mL 的混合对照品储备液。经 50% 甲醇水梯度稀释后, 加入等量的内标溶液, 按照“2.2.2”项条件进行测定。以各胆酸类成分峰面积与内标峰面积的比值作为纵坐标 (*y*), 各胆酸类成分质量浓度作为横坐标 (*x*), 绘制标准曲线, 计算线性回归方程及相关系数 (*r*)。同时对检测限 (LOD)、定量下限 (LLOQ)、回收率、精密度、重复性和稳定性进行考察^[26]。10 个待测成分的线性回归方程、线性范围、*r*、LOD 和 LLOQ 见表 3。考察回收率、精密度、重复性和稳定性, 各对照品

成分质量分数的 RSD 均小于 15%, 均符合方法学的要求。

2.2.4 熊胆粉及常见胆类中药中主要胆酸类成分含量测定及 PCA

将制备好的各胆类中药的 LC-MS 测试供试品溶液注入 LC-QqQ 系统, 按照“2.2.2”项条件进行样品测定, 重复 3 次。将所得峰面积代入标准曲线, 计算各供试品溶液中胆酸类成分的含量。如表 4 所示, 不同胆类中药中胆酸类成分含量存在差异, 收集的 10 批熊胆粉中胆酸类成分含量也存在一定个体差异。各胆类中药中含量较高的胆酸

表 3 10 个胆酸类成分的线性方程、相关系数、线性范围、定量下限和检测限

Table 3 Linear regression data, correlation index, lower limits of quantification (LLOQ) and limits of determination (LOD) for 10 bile acids

分析物	线性方程	r	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	LOD/ (ng·mL ⁻¹)	LLOQ/ (ng·mL ⁻¹)
TCA	$y=0.065\ 2\ x+1.06$	0.999 8	1.47~1840	0.15	0.525
GCA	$y=0.007\ 09\ x+0.006\ 56$	0.999 8	0.57~714	0.05	0.263
CA	$y=0.373\ x+7.86$	0.998 2	1.16~1450	0.02	0.100
GUDCA	$y=0.177\ x+0.061\ 6$	0.999 6	0.57~714	0.05	0.253
GHDCA	$y=0.079\ 2\ x+0.052\ 6$	0.999 6	1.28~1600	0.05	0.640
TUDCA	$y=0.183\ x+4.17$	0.999 6	1.42~1780	0.15	0.535
TCDCa	$y=0.002\ 11\ x+2.07$	0.996 8	1.42~1780	0.15	0.523
UDCA	$y=0.003\ 68\ x+2.41$	0.998 0	1.34~836	0.05	0.167
HDCA	$y=0.113\ x+17.7$	0.999 0	1.12~1400	0.05	0.153
CDCA	$y=0.107\ x+37.5$	0.998 3	1.12~1400	0.05	0.175

表 4 熊胆粉及其他常见胆类中 10 个胆酸类成分含量测定结果 ($n=3$)

Table 4 Determination results of 10 bile acids in bear bile powder and other medicinal bile ($n=3$)

样品	含量/(nmol·mg ⁻¹)									
	GHDCA	GUDCA	CA	TCA	GCA	TUDCA	TCDCa	UDCA	HDCA	CDCA
MND	0.35	ND	12.99	248.72	445.40	84.84	388.78	BL	BL	1.45
ND	1.38	0.63	19.36	413.77	510.23	BL	411.82	BL	BL	1.79
RGNH	BL	ND	22.92	36.07	119.58	BL	76.35	ND	104.22	3.86
ZD	518.01	ND	1.32	2.78	38.59	BL	11.72	BL	4.53	BL
TRNH	BL	BL	18.38	45.72	134.59	BL	2.48	BL	BL	BL
YD	BL	BL	8.26	52.12	23.81	61.01	220.44	ND	ND	2.02
SD	ND	ND	0.56	1 892.80	1.01	BL	104.21	ND	BL	BL
JD	ND	ND	1.43	89.15	0.69	BL	889.80	ND	BL	7.99
YAD	ND	ND	BL	103.43	0.42	82.83	118.24	ND	BL	8.82
ED	ND	ND	1.19	51.66	BL	BL	193.39	ND	BL	11.90
GD	BL	ND	1.54	404.16	3.40	59.24	365.73	ND	BL	1.08
TD	BL	ND	0.16	53.49	18.35	56.73	72.59	ND	BL	1.99
NWD	BL	ND	0.63	1.67	BL	23.44	0.07	ND	BL	BL
CYD	BL	ND	9.53	6.03	BL	BL	0.05	ND	BL	0.62
WCYD	BL	ND	BL	7.91	BL	BL	0.04	ND	BL	BL
LYD	BL	ND	3.54	29.12	BL	BL	0.34	ND	BL	BL
BLYD	BL	ND	1.89	3.72	BL	BL	0.02	ND	BL	BL
XD1	BL	ND	BL	9.37	BL	792.17	198.40	7.59	ND	27.49
XD2	BL	ND	4.99	18.93	BL	990.97	231.46	28.67	ND	41.05
XD3	BL	BL	2.43	27.48	BL	347.39	292.59	21.36	ND	35.87
XD4	BL	BL	1.96	14.22	BL	547.19	371.74	7.26	ND	13.05
XD5	BL	BL	6.48	31.14	BL	492.97	383.77	30.66	ND	39.58
XD6	BL	0.10	1.21	21.79	BL	600.65	310.39	21.04	ND	23.13
XD7	BL	BL	1.15	21.78	BL	411.96	209.33	9.39	ND	19.23
XD8	BL	BL	5.12	18.69	BL	296.46	302.03	19.03	ND	28.02
XD9	BL	0.57	21.81	61.27	30.51	687.75	242.04	23.10	ND	43.99
XD10	BL	ND	2.03	20.16	BL	517.54	284.39	31.18	ND	19.33

ND-未检出 BL-低于检测限

ND-not detected BL-below limit of detection.

类成分与前期 $^1\text{H-NMR}$ 测试分析结果一致。熊胆粉中 TUDCA 和 TCDCA 的含量最高, 二者的含量占比高达 90% 以上。其中 TUDCA 含量在 296~990 nmol/mg, 远高于其他胆类中药, TCDCA 含量在 198~383 nmol/mg。熊胆粉中甘氨酸型胆酸含量较少, GCA、GUDCA 及 GCDCA 含量均低于 50 nmol/mg。另外, 只有熊胆粉中 UDCA 含量在定量限以上, 含量为 7.59~31.18 nmol/mg, 是熊胆粉的特征性成分, 与文献报道一致^[27-29]。HDCA 及其结合型胆酸是猪胆的特征性成分, 在猪胆中含量较高。由于人工牛黄的配方中加入了 HDCA, 因此在人工牛黄中也存在大量 HDCA, 然而在天然牛黄中并没有检测到该成分。同时, 牛胆中的 TCA 和 GCA 含量远高于天然牛黄, 表明胆汁和结石中的胆酸类成分可能存在一定差异。所测定的 10 个胆酸类成分在鱼类胆汁中含量较少, 仅有少量 CA、TCA 和 TCDCA 存在。

为了进一步比较熊胆粉与其他常见胆类中药中所测定的 10 个胆酸类成分含量差异, 将含量测定结果导入 SIMCA-P 软件进行 PCA。得分图 (图 4-A) 显示, 除了 SD, 所有样品均分布 95% 置信区间内。并且以 10 个胆酸类成分含量为变量, 2 组具有明显的分离趋势, 表明所测定的 10 个胆酸类成分在熊胆粉与其他常见胆类中药中含量具有显著差异。熊胆粉样品全部分布在得分图的第 2 象限, 而载荷图 (图 4-B) 中第 2 象限距离原点较远的分别是 TUDCA、TCDCA、UDCA 和 CDCA, 即表示引起熊胆与其他常见胆类差异的胆酸类成分主要是 TUDCA、TCDCA、UDCA 和 CDCA, 与“2.1.6”项结果一致。因此, 将这 4 个成分含量作为熊胆粉质量控制的重点指标性成分较为合理。另外, 结合载荷图分析发现蛇胆分布在 95% 的置信区域外是由于 TCA 含量非常高, 鸡胆样品距离熊胆粉组比较近是由于 TCDCA 含量较高。

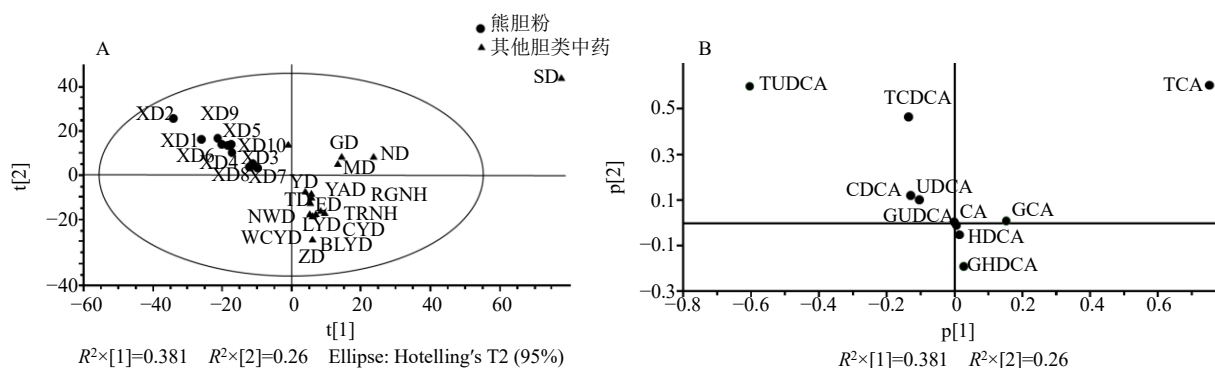


图 4 熊胆粉与其他常见胆类中药中 10 个胆酸类成分含量的 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 4 Score scattering (A) and loading scattering plots (B) for principal component analysis of LC-MS dataset of bear bile powder and other medicinal bile

3 讨论

3.1 提取条件的考察

实验前期通过对使用 20%、50%、70% 甲醇水和甲醇提取的熊胆粉提取物进行比较, 发现在甲醇熊胆粉提取物中检测到的化合物数量最多、峰形和分离度最好。并且由于胆酸类成分遇水振摇后会产生大量泡沫, 在中药提取液浓缩时容易喷出而难以控制平行操作, 所以本实验采用纯甲醇作为提取溶剂。另外, 课题组前期^[10]发现将样品溶于缓冲盐溶液可以有效缓解利用 $^1\text{H-NMR}$ 批量检测时产生的化学位移漂移问题。本实验中 6 批质控样品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱可以完全重叠, 其化学位移值和峰强度均一致, 表明检测系统重现性良好。

3.2 $^1\text{H-NMR}$ 非靶标检测及 LC-MS 靶标检测在胆类中药化学成分分析中的应用

$^1\text{H-NMR}$ 最大的优势在于可以对样品中所有化学成分进行无结构、无极性偏向性地检测。因此, 利用 $^1\text{H-NMR}$ 分析熊胆粉及常见胆类中药可以同时实现氨基酸、脂肪酸及胆汁酸等成分的检出, 通过分段积分即可获得所有成分的相对定量数据, 从而可以对整体代谢轮廓进行初步分析和比较。然而在使用 LC-MS 检测时, 胆酸类成分通常在 C_{18} 柱保留效果更好, 负离子模式下响应较好; 而像氨基酸这种大极性成分在 C_{18} 柱上几乎不保留, 通常使用 Amide 柱实现色谱分离后于正离子模式下检测, 所以需要构建联柱系统并且在正、负离子切换模式下

才可以实现样品中的胆汁酸、氨基酸等成分的同时检测^[8-9]。但是 $^1\text{H-NMR}$ 不具备分离功能,胆酸类成分结构十分相似导致信号堆叠严重,给差异性成分的鉴定和微量胆酸类成分的检出带来很多困难。因此,在对中药复杂体系整体轮廓初步分析比较时, $^1\text{H-NMR}$ 具有一定优势;需要对化学成分进行准确定性定量分析时,LC-MS 选择性更高。先利用 $^1\text{H-NMR}$ 非靶标性分析,将样品回收后进一步利用 LC-MS 靶标性分析,既可以实现优势互补,也符合了“绿色化学”的理念。因此, $^1\text{H-NMR}$ 与 LC-MS 等检测平台信息的相互补充可以为中药复杂体系分析提供更加全面、准确的定性定量信息,为分析胆类中药和建立质量标准提供更可靠的参考依据。

3.3 小结

本研究基于 $^1\text{H-NMR}$ 结合 LC-MS 技术比较研究熊胆粉及常见胆类中药的胆酸类成分,基于 $^1\text{H-NMR}$ 图谱从熊胆粉中初步鉴定出 7 个胆酸类成分,利用 LC-MS 对 10 个胆酸类成分进行准确定量,初步阐明熊胆粉中胆酸类成分组成。基于熊胆粉与其他常见胆类中药的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱分段积分数据和 10 个胆酸类成分的准确定量结果,结合多元统计分析发现熊胆与其他常见胆类中药的胆酸类成分存在显著差异,差异性成分主要是 UDCA、CDCA、TUDCA 和 TCDCA,为建立熊胆粉质量标准和分析常见胆类中药奠定基础。今后,本课题组将收集更多的胆类中药样品,对常见胆类中药的胆酸类成分组成进行全面分析。

基于本研究结果,验证了 $^1\text{H-NMR}$ 在化学成分轮廓分析中应用的可行性,有望实现中药等复杂体系不依赖于对照品的定性定量分析。同时,为珍贵的中药样本以及临床样本分析提供了思路,先利用 $^1\text{H-NMR}$ 非靶标性分析,再结合 LC-MS 对目标性成分准确分析,可以基于有限的样品量提供更加全面、准确的定性和定量信息,推动中药复杂体系及临床代谢组学的发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宇妥·云丹贡布. 四部医典 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1997: 49-50.
- [2] Wang N, Feng Y, Cheung F, *et al.* A comparative study on the hepatoprotective action of bear bile and *Coptidis Rhizoma* aqueous extract on experimental liver fibrosis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 239.

- [3] 熊敏琪, 贾成林, 崔金刚, 等. 熊胆粉在麝香通心滴丸抗动脉粥样硬化中的作用机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9): 1083-1089.
- [4] 雷云霞, 张慧田, 刘新. 清肝宁胃汤联合熊去氧胆酸对原发性胆汁反流性胃炎患者疗效分析 [J]. 世界中医药, 2019, 14(12): 3265-3268.
- [5] 巫秀美, 李成功, 郑园园, 等. 熊胆产品的研究进展 [J]. 大理学院学报, 2014, 13(10): 28-31.
- [6] 张晓晔. 熊胆的伪品鉴别 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(16): 47.
- [7] 赵芳, 李文竹, 潘坚扬, 等. 基于核磁共振氢谱的组学技术在中药制药过程研究中的应用与展望 [J]. 世界中医药, 2021, 16(23): 3414-3418.
- [8] Song Q Q, Liu W J, Yan Y, *et al.* Polarity-extended quantitative analysis of bear bile and its analogues using serially coupled reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography-tailored multiple reaction monitoring [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(83): 52822-52831.
- [9] Song Q Q, Liu W J, Chen X J, *et al.* Serially coupled reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography-tailored multiple reaction monitoring, a fit-for-purpose tool for large-scale targeted metabolomics of medicinal bile [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1037: 119-129.
- [10] Liu W J, Song Q Q, Cao Y, *et al.* From ^1H NMR-based non-targeted to LC-MS-based targeted metabolomics strategy for in-depth chemome comparisons among four *Cistanche* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 162: 16-27.
- [11] 田鹤. 基于 LC-MS 与 ^1H NMR 方法的热应激奶牛代谢组学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [12] 曹妍, 李婷, 常安琪, 等. 蛇胆中胆汁酸类化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 130-138.
- [13] 袁丹, 金凤, 于山川, 等. FT-IR 法定性鉴别熊胆粉等常见动物胆类药材 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(1): 30-32.
- [14] Bi D, Chai X Y, Song Y L, *et al.* Novel bile acids from bear bile powder and bile of geese [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(5): 528-531.
- [15] Shoda M. Ursodesoxycholic acid in the bile of bears and its physiological action [J]. *J Biochem*, 1927, 7: 505-506.
- [16] Miyaji S. Glycylursodesoxycholic acid from bear bile [J]. *Z Physiol Chem*, 1937, 250: 34-35.
- [17] Hammarsten O. Investigations on biles of some polar animals: On the bile of the polar bear; II [J]. *Z Physiol Chem*, 1902, 36: 525-526.
- [18] Yamaguchi S, Qian Z Z, Nohara T. Bile acids of fel ursi [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(10): 1653-1655.
- [19] 张许, 王达祺, 刘买利. 牛磺熊去氧胆酸分子结构的

- ^1H 、 ^{13}C NMR 研究 [J]. 波谱学杂志, 1999, 16(1): 33-39.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 5.
- [21] 赵艳红, 阮金秀. 牛黄及其代用品的药理作用及临床应用 [J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(2): 175-178.
- [22] 游元元, 万德光. 动物胆汁药用研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(4): 58-61.
- [23] 曹妍, 宋青青, 李军, 等. 牦牛胆中胆汁酸类化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2538-2543.
- [24] 谭文敏, 任东波, 何忠梅. 兔胆化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(1): 39-40.
- [25] Zhang J, Fan Y, Gong Y, *et al.* Simultaneous determination of nine kinds of dominating bile acids in various snake bile by ultrahigh-performance liquid chromatography with triple quadrupole linear iontrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1068/1069: 245-252.
- [26] Liu Y, Song Q Q, Zheng J, *et al.* Sensitive profiling of phenols, bile acids, sterols, and eicosanoids in mammalian urine by large volume direct injection-online solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-polarity switching tandem mass spectrometry [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(85): 81826-81837.
- [27] 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.
- [28] 萨茹拉, 温都苏毕力格, 朝格巴达日呼, 等. 熊胆在蒙医药学中的应用 [J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(1): 53-55.
- [29] 王杰, 熊爱珍, 程绒绒, 等. 不同来源引流熊胆粉的化学成分系统分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2326-2332.

[责任编辑 王文倩]