

基于 UPLC-MS 对牛黄解毒片中胆酸类成分定量测定及化学模式识别研究

林诗铃¹, 林逸凡¹, 陈涛¹, 林思荣², 林晨², 郑燕芳^{1*}, 黄鸣清^{1*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建省食品药品质量检验研究院, 福建 福州 350001

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联四级杆-静电轨道阱高分辨质谱技术 (UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS/MS) 同时测定牛黄解毒片 (Niu Huang Jie Du Tablets, NJT) 中牛磺胆酸、7-酮-3 α ,12- α -羟基胆烷酸、甘氨酸猪去氧胆酸、12-脱氢胆酸、甘氨酸胆酸、3-酮-7 α ,12 α -二羟基-5 β -胆烷酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、7-酮基胆石酸、猪胆酸、牛磺脱氧胆酸钠、12-酮脱氧胆酸、猪去氧胆酸、胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺石胆酸钠、甘氨酸石胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、石胆酸 21 种胆酸类成分含量的方法, 并对不同批次的 NJT 进行质量评价。**方法** 采用 Thermo Bremen Hypersil Gold 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m), 以含 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 质谱采用加热型电喷雾离子源 (HESI), 在负离子平行反应监测模式下进行含量测定, 采用 SIGMA 14.0 软件对定量结果进行化学计量学分析。**结果** 21 种胆酸成分在线性范围内呈良好的线性关系 ($r^2 \geq 0.9989$), 其精密度、重复性、稳定性 RSD 均小于 6.7%, 平均回收率为 95.1%~102.5% (RSD \leq 4.5%), 在正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 与层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 中, 样品在 95% 置信区间内被分为 3 类, 变量重要性排序值 (variable importance in projection values, VIP) 显示猪胆酸、牛磺胆酸、7-酮基胆石酸、甘氨酸胆酸、胆酸为样品间的主要差异成分。**结论** 所建立方法具有高效、灵敏的特点, 能够快速实现对 NJT 中 21 种胆酸类成分的含量测定, 可为其质量控制提供理论依据。

关键词: 牛黄解毒片; 中成药; UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS/MS; 质量控制; 猪胆酸; 牛磺胆酸; 7-酮基胆石酸; 甘氨酸胆酸; 胆酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2750-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.007

Study on content determination and chemical pattern recognition of cholic acids in Niu Huang Jie Du Tablets based on UPLC-MS

LIN Shi-ling¹, LIN Yi-fan¹, CHEN Tao¹, LIN Si-rong², LIN Chen², ZHENG Yan-fang¹, HUANG Ming-qing¹

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To develop a ultra high performance liquid chromatography in tandem with quadrupole electrostatic orbital hydrazine high resolution mass spectrometry (UPLC-Q Exactive-OrbitrapMS/MS) method for the content determination of 21 cholic acids in Niu Huang Jie Du Tablets (牛黄解毒片, NJT), including taurocholic acid, 7-ketodeoxycholic acid, glycohyodeoxycholic acid, 12-oxochenodeoxycholic acid, glycocholic acid, 3-oxocholic acid, taurochenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, 7-oxolithocholic acid, hyocholic acid, taurodeoxycholic acid sodium salt hydrate, 12-ketolithocholic acid, hyodeoxycholic acid, cholic acid, glycochenodeoxycholic acid, glycodesoxycholic acid, tauroolithocholic acid sodium salt, glycolithocholic acid, ghenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid, and to evaluate the quality of NJT from different batches. **Methods** The Thermo Bremen Hypersil Gold column (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m) was employed to gradient elution with mobile phase consisting of 0.1% formic acid solution-

收稿日期: 2022-12-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973437); 国家自然科学基金面上项目 (82274080); 福厦泉国家自主创新示范区协同创新平台专项 (2021FX02)

作者简介: 林诗铃, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: fjtcmll@163.com

*通信作者: 郑燕芳 (1978—), 女, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究。E-mail: yfzheng@fjtc.edu.cn

黄鸣清 (1980—), 男, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: hmq1115@126.com

methanol at a flow rate of was 0.2 mL/min, and the column temperature was 40 °C. The mass spectrum monitoring was performed by heating electrospray ion source, and using parallel reaction monitoring in negative ion mode for quantitative analysis. SIGMA 14.0 software was employed to perform the chemometrics analysis for the content determination results. **Results** The calibration curves for 21 bile acids had good linearity in their linear range ($r^2 \geq 0.9989$), the RSDs of precision, repeatability, stability were all less than 6.7%, the average recoveries were ranged from 95.1% to 102.5% (RSD $\leq 4.5\%$), in the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and hierarchical cluster analysis (HCA), the samples were classified into three categories within 95% confidence interval. The variable importance in projection values (VIP) showed that, hyocholic acid, taurocholic acid, 7-oxolithocholic acid, glycocholic acid and cholic acid were the main differential components among the samples. **Conclusion** The method developed in this study was efficient and sensitive, which can quickly achieve quantify 21 bile acids in NJT, and provides theoretical basis for the quality control of NJT.

Key words: Niu Huang Jiedu Tablets; Chinese patent medicine; UPLC-Q Exactive-OrbitrapMS/MS; quality control; hyocholic acid; taurocholic acid; 7-OLCA; glycocholic acid; cholic acid

牛黄解毒片 (Niu Huang Jiedu Tablets, NJT) 为我国清热解毒剂的传统名方, 源于《咽喉脉证通论》, 由人工牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草 8 味中药材制备而成, 具清热解毒之功效, 常用于火热内盛、咽喉肿痛、牙龈肿痛、口舌生疮与目赤肿痛^[1-2]。据文献报道^[3], NJT 中含蒽醌、胆酸、黄酮等成分, 人工牛黄为其君药, 主要由胆汁酸、牛磺酸、胆红素等加工制成^[4], 其中胆汁酸作为人工牛黄的主要药效物质之一, 具有解热镇痛、降压、抗炎、抗氧化及提高免疫力等多种药理作用^[5-10], 因而有必要对其予以关注。

该组方自 1977 年起, 收录于历代《中国药典》, 现行《中国药典》2020 年版中仍仅以黄芩苷作为含量测定项的指标性成分, 其标准中的质控指标过于单一, 无法全面反映该制剂产品的整体质量。此外, 虽有学者采用 HPLC-CAD 法测定 NJT 中的胆酸类成分, 不过也仅限于猪去氧胆酸、胆酸、去氧胆酸等个别胆汁酸的检测^[11]。胆汁酸是以环戊烷骈多氢菲为母核的一类化合物, 采用 HPLC-UV 或 HPLC-ELSD 法存在灵敏度及专属性不佳、线性范围窄等问题^[12-18], 干扰了其检测。而质谱检测器具有高灵敏度、高选择性等特点, 目前, 已有将其应用于胆汁酸的分析研究^[19-21], 但未见其对 NJT 中胆酸类成分的报道。因此, 本实验建立一种 UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS/MS 同时测定 NJT 中 21 种胆酸类成分含量的分析方法, 并结合化学计量学对多个厂家不同批次的 NJT 进行质量评价, 为其质量控制提供试验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Dionex Ultimate 3000 型超高效液相色谱系统,

美国 Thermo Fisher 公司; Q Exactive Plus-Orbitrap 型四级杆-静电轨道阱质谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; Milli-Q Direct 16 型超纯水制备仪, 美国 Millipore 公司; CPA225D 型十万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司; XM-400 UHP 型小美静音超声仪, 昆山小美超声仪器有限公司。

1.2 材料与试剂

对照品甘氨酸猪去氧胆酸 (glycohyodeoxycholic acid, GHDA, 批号 Y23N9K75826)、甘氨酸胆酸 (批号 Y08A9E57765)、3-酮-7 α ,12 α -二羟基-5 β -胆烷酸 (3-oxocholic acid, 3-OCA, 批号 N07GY167164)、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA, 批号 Y16J7C17898)、7-酮基胆石酸 (7-oxolithocholic acid, 7-OLCA, 批号 N30GB169735)、牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDA, 批号 Y09S8K43540)、胆酸 (批号 T16J8Q28663)、甘氨酸鹅脱氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA, 批号 Y29M9K57235)、猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA, 批号 S27M8I36899)、鹅去氧胆酸 (ghenodeoxycholic acid, CDCA, 批号 Z01011LA14)、甘氨酸胆酸水合物 (glycodesoxycholic acid, GDCA, 批号 Y27M9E56969)、7-酮-3 α ,12- α -羟基胆烷酸 (7-ketodeoxycholic acid, 7-KDCA, 批号 N30GB169735)、去氧胆酸 (批号 S05N6I5476)、甘氨酸石胆酸 (glycolithocholic acid, GLCA, 批号 B29J11K119775)、石胆酸 (批号 B24S10J98701)、脱氢胆酸 (批号 S30J9I64022)、牛磺胆酸 (批号 B15J11J118403)、牛磺石胆酸钠 (tauroolithocholic acid sodium salt, TLCA, 批号 Y06N9K74072) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品 12-脱氢胆酸 (12-oxochenodeoxycholic acid, 12-OCDA, 批号

0000080453)、牛磺脱氧胆酸钠水合物(taurodeoxycholic acid sodium salt hydrate, TDCA-NA, 批号 B26J9J53831)、12-酮脱氧胆酸(12-ketolithocholic acid, 12-KLCA, 批号 6837PHB010)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;对照品猪胆酸(批号 A1110816)购自美国 Cayman 公司;以上对照品均经 HPLC 测定,质量分数均大于 95%。质谱级甲醇购自美国 Thermo Fisher 公司,色谱级甲酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,其余试剂均为分析纯。15 批 NJT 分别由葵花药业集团股份有限公司(批号依次为 220303、220105、220202, 编号 S1~S3)、太极集团四川绵阳制药有限公司(批号依次为 2103003、2112010, 编号 S4、S5)、昆明中药厂(批号依次为 420011、400542, 编号 S6、S7)、中国北京同仁堂有限责任公司(批号依次为 21123144、20121778、21123107, 编号 S8~S10)、云南腾药制药股份有限公司(批号依次为 20211263、20210442、20210612, 编号 S11~S13)、河北唐威药业有限公司(批号依次为 D08034、D08032, 编号 S14、S15)生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Thermo Bremen Hypersil Gold 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm),以含 0.1%甲酸水溶液-甲醇为流动相,梯度洗脱:0~0.5 min, 20%甲醇;0.5~1.5 min, 20%~70%甲醇;1.5~7.0 min, 70%~61%甲醇;7.0~8.0 min, 61%甲醇;8.0~14.0 min, 61%~80%甲醇;14.0~15.0 min, 80%~85%甲醇;15.0~16.0 min, 85%~90%甲醇;16.0~17.5 min, 90%~20%甲醇;17.5~19.0 min, 20%甲醇;体积流量 0.2 mL/min;柱温为 40 °C;进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

采用加热电喷雾离子源(HESI)负离子模式:喷雾电压:−3.0 kV,毛细管温度 325 °C,辅助气加热温度 350 °C,鞘气流速 45 arb,辅助气流速 10 arb,吹扫气流速 1 arb,采用平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)模式进行数据采集,各待测成分及内标物的质谱优化参数见表 1。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液及内标溶液的配制 分别精密称取 21 种胆酸对照品粉末,用甲醇超声溶解,分别配制成 2 mg/mL 的单一对照品母液。

分别精密量取各对照品母液适量,用甲醇稀释,

表 1 各化合物及内标物质谱优化参数

Table 1 Optimized MS parameters of targeted compounds and internal standards

化合物	<i>t_R</i> /min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞 能量/eV	电离 模式
牛磺胆酸	7.72	514.28	79.56	124	ES ⁻
7-KDCA	7.92	405.26	123.08	45	ES ⁻
GHDC	8.02	448.30	74.02	40	ES ⁻
12-OCDC	8.45	405.26	69.03	45	ES ⁻
甘氨酸	9.85	464.30	74.02	41	ES ⁻
3-OCA	11.11	405.26	271.10	45	ES ⁻
TCDC	12.33	498.28	79.96	100	ES ⁻
UDCA	12.50	391.28	391.28	10	ES ⁻
7-OLCA	12.79	389.26	389.26	10	ES ⁻
猪胆酸	12.90	407.28	407.28	10	ES ⁻
TDCA-NA	13.44	498.29	79.96	100	ES ⁻
12-KLCA	13.66	389.26	389.26	10	ES ⁻
HDCA	14.06	391.28	391.28	10	ES ⁻
胆酸	14.38	407.28	407.28	10	ES ⁻
GDC	14.45	448.30	74.02	40	ES ⁻
GDCA	15.14	448.30	74.02	40	ES ⁻
TLCA-NA	16.04	482.29	79.96	96	ES ⁻
GLCA	17.02	432.31	74.02	36	ES ⁻
CDCA	17.04	391.28	391.28	10	ES ⁻
去氧胆酸	17.28	391.28	391.28	10	ES ⁻
石胆酸	18.69	375.29	375.29	10	ES ⁻
脱氢胆酸	5.29	401.23	249.15	36	ES ⁻

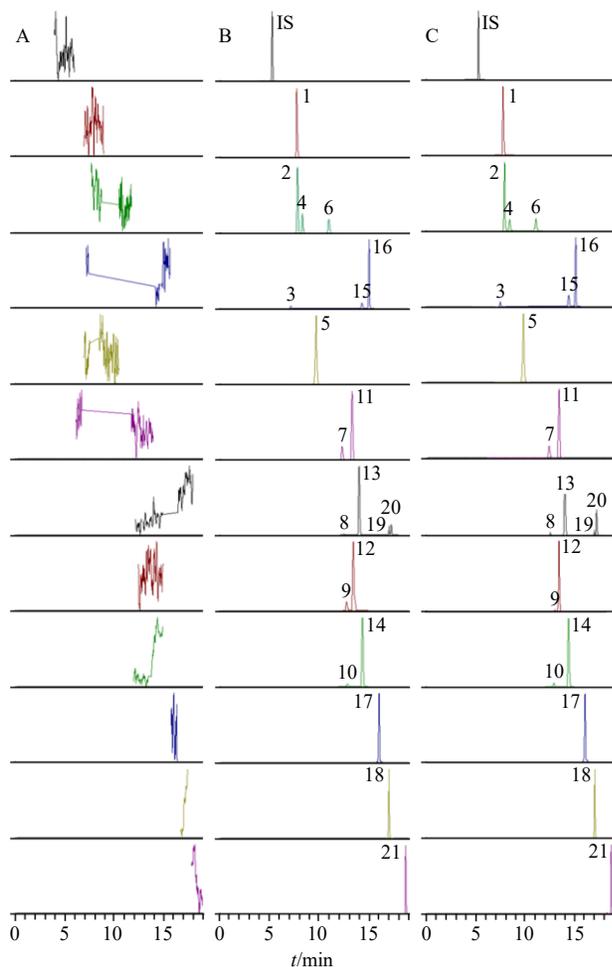
即得混合对照品溶液。

精密称取脱氢胆酸对照品,用甲醇溶解,配制成 2 mg/mL 的对照品母液,将其母液用甲醇逐步稀释得到 20 ng/mL 的内标溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 NJT, 去除包衣,磨成细粉(过 24 目筛),精密称取样品粉末 0.1 g,置于三角锥形瓶中,加入 10 mL 甲醇,称定质量,超声提取 30 min 后再次称定质量,加入甲醇补足减失的质量,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。取续滤液适量,置于棕色进样瓶中,按 1:1 比例加入内标溶液后进样分析。

2.3.3 阴性溶液的制备 取除人工牛黄外的其他药材粉末,按“2.3.2”项同法制备阴性样品溶液。

分别精密称取上述混合对照品溶液和供试品溶液适量,按 1:1 比例加入内标溶液,同时以甲醇作为空白溶液进样测定,其 PRM 色谱图见图 1。



1-牛磺胆酸 2-7-酮-3 α ,12- α -羟基胆烷酸 3-甘氨酸猪去氧胆酸 4-12-脱氢胆酸 5-甘氨酸 6-3-酮-7 α ,12 α -二羟基-5 β -胆烷酸 7-牛磺鹅去氧胆酸 8-熊去氧胆酸 9-7-酮基胆石酸 10-猪胆酸 11-牛磺脱氧胆酸钠 12-12-酮脱氧胆酸 13-猪去氧胆酸 14-胆酸 15-甘氨酸鹅去氧胆酸 16-甘氨酸脱氧胆酸 17-牛磺石胆酸钠 18-甘氨酸石胆酸 19-鹅去氧胆酸 20-去氧胆酸 21-石胆酸 IS-脱氢胆酸
1-taurocholic acid 2-7-KDCA 3-GHDCA 4-12-OCDCa 5-gycocholic acid 6-3-OCA 7-TCDCa 8-UDCa 9-7-OLCA 10-hyocholic acid 11-TDCA-NA 12-12-KLCA 13-HDCa 14-cholic acid 15-GCDCa 16-GDCa 17-TLCA 18-glycolithocholic acid 19-CDCA 20-deoxycholic acid 21-lithocholic acid IS-dehydrocholic acid

图 1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 及供试品溶液 (C) 的 PRM 色谱图

Fig. 1 PRM chromatograms of blank solution (A), mixed reference substance solution (B), and samples solution (C)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性回归方程及定量限考察 精密量取“2.3.1”项下的混合对照品溶液，用甲醇逐级稀释，按 1:1 体积比加入内标溶液，即得系列不同质量浓度梯度的标准溶液。以目标成分与内标峰面积的比值为纵坐标 (Y)，目标成分质量浓度为横坐标

(X)，进行线性回归。分别以信噪比 (S/N) 为 3 和 10 计算方法的检测限和定量限，结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取混合对照品母液，配制为低、中、高 3 个质量浓度，当天连续进样 6 次测定其日内精密度；连测 3 d，考察其日间精密度。结果见表 3，其 RSD 均小于 5.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品 (S1)，精密称定 6 份，分别按“2.3.2”项方法下制备供试品溶液，进样测定，记录待测成分及内标峰面积比值，并计算各成分平均含量及 RSD。结果见表 2，其 RSD 均小于 4.0%，表明本方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密称定样品 (S1)，按“2.3.2”项方法制备供试品溶液，于制备后的 0、2、4、6、8、12、24、48 h 注入仪器测定，记录各成分峰面积并计算其 RSD，结果显示牛磺胆酸、7-KDCA、GHDCA、12-OCDCa、甘氨酸胆酸、3-OCA、TCDCa、UDCa、7-OLCA、猪胆酸、TDCA-NA、12-KLCA、HDCA、胆酸、GCDCa、GDCA、TLCA、GLCA、CDCA、去氧胆酸、石胆酸峰面积的 RSD 别为 2.5%、2.8%、4.1%、6.7%、2.5%、2.6%、2.5%、2.8%、3.3%、5.6%、2.8%、2.9%、2.3%、5.5%、2.5%、2.6%、3.3%、2.0%、1.7%、2.5%、2.4%，表明供试品溶液 48 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 称取已测定各成分含量的样品 0.050 g，精密称定，分别加入相当于样品中各成分含量 50%、100%、150% 的混合对照品溶液，每组平行 3 份，分别按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积并计算平均回收率及其 RSD，结果见表 2。

2.5 样品含量测定

分别精密称取不同批次样品，按“2.3.2”项项法制备供试品溶液，在“2.1”项条件下进样测定，根据内标法计算各批次样品中 21 种胆酸成分的含量，结果见表 4。

2.6 多元统计分析

为了更直观地比较不同厂家不同批次 NJT 产品质量之间存在的差异，明确使其质量产生差异的因素，采用 SIMCA 14.1 软件对 15 批的 NJT 中的 21 种胆酸成分含量进行了正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)、层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)。结果显示，OPLS-DA 所建模型的解释率 (R^2) 为 99.6%，预测率 (Q^2) 为 99.5%，

表2 各检测成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients, linear ranges, limit of detection and limit of quantitation of targeted compounds

化合物	回归方程	r^2	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	检测限/ (ng·mL ⁻¹)	定量限/ (ng·mL ⁻¹)	重复性		加样回收率/%	
						平均质量分数/ (μg·g ⁻¹)	RSD/%	平均值	RSD
牛磺胆酸	$Y=0.3943X+6.8801$	0.9998	78.24~5696.21	0.17	0.51	1196.54	2.8	99.5	3.5
7-KDCA	$Y=0.1480X-0.0306$	0.9992	2.54~110.45	0.72	2.16	42.29	2.2	101.3	4.5
GHDCA	$Y=0.8760X-0.1650$	0.9992	1.35~50.88	0.34	1.03	2.44	1.9	101.2	4.4
12-OCDCA	$Y=0.0335X+0.0063$	0.9993	10.10~49.43	3.33	10.00	10.73	3.4	100.3	2.4
甘氨酸	$Y=0.6870X+2.3100$	0.9994	9.97~1302.87	0.17	0.50	407.64	1.9	99.2	3.0
3-OCA	$Y=0.2010X-0.0102$	0.9991	1.14~115.70	0.36	1.07	26.52	2.2	99.5	4.0
TCDCA	$Y=0.5510X-0.0184$	0.9991	5.05~340.17	0.17	0.51	42.66	2.1	100.5	3.6
UDCA	$Y=1.1000X+0.0575$	0.9995	1.21~49.56	0.17	0.52	0.85	3.5	95.1	1.8
7-OLCA	$Y=0.0055X+0.0428$	0.9992	19.15~2467.12	2.41	7.23	782.33	0.8	101.3	3.8
猪胆酸	$Y=0.0030X+0.0393$	0.9996	29.07~2302.57	3.00	9.01	699.31	1.5	97.4	2.1
TDCA-NA	$Y=0.8130X-3.1000$	0.9992	9.48~648.25	0.67	2.01	143.35	2.2	97.5	1.4
12-KLCA	$Y=2.4000X+2.3500$	0.9995	3.10~94.33	0.67	2.02	0.47	4.0	100.2	4.3
HDCA	$Y=2.5600X+6.5700$	0.9989	15.03~866.31	1.03	3.08	437.73	2.8	101.4	2.6
胆酸	$Y=0.1110X+2.6200$	0.9991	6.03~2472.09	1.06	3.17	1168.74	1.5	99.5	3.9
GCDCA	$Y=0.9160X-0.0941$	0.9993	0.76~52.82	0.17	0.52	22.75	1.9	99.4	4.3
GDCA	$Y=0.9130X+0.8190$	0.9995	4.90~598.62	0.07	0.20	86.26	2.2	101.2	3.7
TLCA	$Y=0.9400X-0.1160$	0.9992	0.66~52.24	0.09	0.26	1.79	2.4	99.4	2.6
GLCA	$Y=1.5000X-0.4160$	0.9990	0.75~53.40	0.07	0.20	0.64	2.8	100.1	3.2
CDCA	$Y=1.4000X+2.7700$	0.9992	0.52~162.15	0.17	0.52	22.10	2.2	102.5	1.9
去氧胆酸	$Y=4.6000X+1.8000$	0.9991	0.21~50.55	0.07	0.21	31.66	2.1	100.4	3.9
石胆酸	$Y=1.0500X+0.3740$	0.9991	0.30~52.07	0.07	0.22	1.33	1.7	100.3	3.5

表3 精密度试验结果

Table 3 Results of precision test

化合物	日内精密度 RSD/%			日间精密度 RSD/%			化合物	日内精密度 RSD/%			日间精密度 RSD/%		
	低质量 浓度	中质量 浓度	高质量 浓度	低质量 浓度	中质量 浓度	高质量 浓度		低质量 浓度	中质量 浓度	高质量 浓度	低质量 浓度	中质量 浓度	高质量 浓度
牛磺胆酸	3.0	3.8	2.8	1.8	5.0	3.4	12-KLCA	2.5	1.6	2.2	2.2	2.0	0.8
7-KDCA	2.9	3.0	2.3	3.9	1.6	3.6	HDCA	2.7	2.4	2.7	2.5	2.7	3.3
GHDCA	2.7	3.0	1.5	3.8	0.9	1.3	胆酸	2.5	2.1	2.5	2.6	2.2	2.1
12-OCDCA	2.9	2.5	2.9	2.1	2.4	0.6	GCDCA	2.8	1.5	3.0	4.3	1.0	4.0
甘氨酸	2.2	1.9	1.6	2.9	2.0	1.3	GDCA	2.3	3.0	1.6	2.2	2.6	1.8
3-OCA	2.6	2.6	2.9	3.7	3.2	2.4	TLCA	2.1	2.1	2.1	2.8	1.5	1.8
TCDCA	2.8	1.4	2.7	2.7	1.5	2.6	GLCA	1.5	2.8	1.3	2.2	1.7	1.2
UDCA	1.6	2.6	2.8	1.6	1.7	3.7	CDCA	2.7	2.2	1.7	2.2	1.4	2.4
7-OLCA	2.8	2.8	2.1	3.8	2.9	2.6	去氧胆酸	2.9	2.4	2.3	3.6	2.1	1.5
猪胆酸	2.8	2.7	2.9	2.7	2.3	3.6	石胆酸	2.1	2.5	2.6	0.7	0.9	1.5
TDCA-NA	2.5	2.4	2.2	3.8	2.7	1.5							

表 4 不同批次 NJT 中 21 种胆酸类成分含量测定结果 (n = 3)

Table 4 Determination results of 21 kinds of bile acid components in different batches of NJT (n = 3)

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	牛磺胆酸	7-KDCA	GHDCA	12-OCDCA	甘氨酸胆酸	3-OCA	TCDCa	UDCA	7-OLCA	猪胆酸	TDCA-NA
S1	1 196.54	42.29	2.44	10.73	407.64	26.52	42.66	0.85	782.33	699.31	143.35
S2	1 175.13	49.44	2.29	12.93	471.20	30.24	50.34	0.92	798.78	760.52	168.37
S3	1 337.97	49.15	2.61	13.50	452.21	31.58	48.11	1.00	872.34	769.83	158.91
S4	749.87	33.75	—	10.78	261.56	15.78	33.35	0.58	243.07	814.08	125.12
S5	598.97	37.81	1.55	8.57	223.44	6.67	34.22	1.25	518.01	783.00	120.48
S6	2 176.38	7.75	1.31	—	546.58	1.64	67.70	0.50	773.28	1 109.90	274.14
S7	1 034.99	29.10	10.39	8.74	493.22	4.87	62.34	0.96	817.61	792.30	179.36
S8	856.42	24.75	4.03	5.52	606.99	3.02	46.60	0.86	399.79	809.21	141.48
S9	870.34	24.32	2.46	5.62	602.23	4.76	44.08	0.89	565.86	909.02	132.39
S10	768.31	28.61	3.94	6.17	320.82	11.54	37.11	1.00	588.73	1 192.02	117.86
S11	872.08	19.40	2.48	6.25	532.30	3.07	44.97	1.26	1 089.84	1 585.69	149.48
S12	911.04	42.91	1.22	9.21	259.71	3.24	50.24	2.50	740.67	1 225.97	162.14
S13	1 251.91	20.78	5.73	0.00	530.59	3.74	51.16	1.09	626.14	2 224.40	180.83
S14	703.99	30.92	1.03	6.84	271.51	12.84	30.67	0.66	247.87	847.33	120.92
S15	846.97	32.82	1.10	7.55	297.83	15.20	33.66	0.80	286.97	952.02	129.70

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	12-KLCA	HDCA	胆酸	GCDCA	GDCA	TLCA	GLCA	CDCA	去氧胆酸	石胆酸	总量
S1	—	437.73	1 168.74	22.75	86.26	1.79	0.64	22.10	31.66	1.33	5 127.65
S2	—	367.13	911.93	22.65	87.35	2.03	0.72	22.25	36.69	1.52	4 972.43
S3	—	378.07	998.75	25.97	104.59	1.98	0.75	24.63	34.81	1.49	5 308.25
S4	—	357.43	804.11	18.61	82.48	2.08	0.70	22.73	50.70	0.75	3 627.52
S5	—	303.60	809.81	16.93	70.43	2.22	0.76	34.19	45.56	1.74	3 619.21
S6	3.86	452.79	745.63	15.33	89.70	1.34	0.35	50.06	5.19	4.25	6 327.67
S7	1.51	424.57	1 206.12	24.50	127.87	2.74	1.13	72.02	23.54	2.83	5 320.70
S8	—	366.14	905.03	37.39	143.18	2.66	1.16	23.98	44.86	0.60	4 423.66
S9	—	363.29	892.15	36.30	149.80	2.49	1.09	28.05	46.90	0.73	4 682.76
S10	—	335.28	901.63	24.49	91.06	2.06	0.83	34.30	35.34	1.24	4 502.33
S11	2.26	386.44	1 169.79	100.37	209.89	3.30	1.72	69.63	73.75	2.79	6 326.78
S12	—	315.65	1 234.30	23.80	84.09	3.17	0.88	40.03	50.34	2.41	5 163.52
S13	—	165.22	1 178.88	9.89	132.35	2.48	0.94	54.93	18.05	1.41	6 460.52
S14	—	341.90	734.55	16.98	74.74	2.17	0.68	22.78	59.45	0.84	3 528.68
S15	—	382.45	844.08	90.58	1.97	0.75	26.58	87.86	43.77	0.92	4 083.58

二者均大于 50%，说明该模型稳定且具备良好的预测能力。

如图 2 所示，不同厂家间样品在空间上呈分散状，根据其散点距离，主要可分为 3 组，其中 S4、S5、S8~S10、S14、S15 归为 I 组，S1~S3、S6、S7 归为 II 组，S11~S13 单独归为 III 组，与 HCA 结果（图 3）一致，说明不同厂家间的产品质量存

在差异性。此外，变量重要性投影（variable importance projection, VIP）值可以反映出区别样品的主要指标，结果如图 4 所示，猪胆酸、牛磺胆酸、7-OLCA、甘氨酸胆酸、胆酸的 VIP 值均大于 1，为贡献率较高的成分，提示各批次样品间的差异主要取决于这 5 种胆酸的含量，可作为区分其产品质量的关键指标。

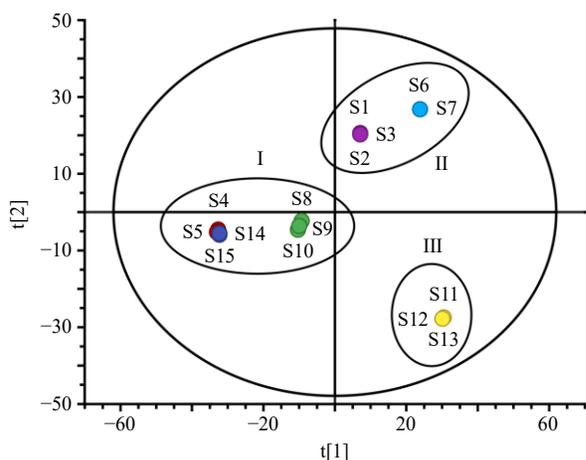


图2 15批 NJT 的 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 OPLS-DA score chart of 15 batches of NJT

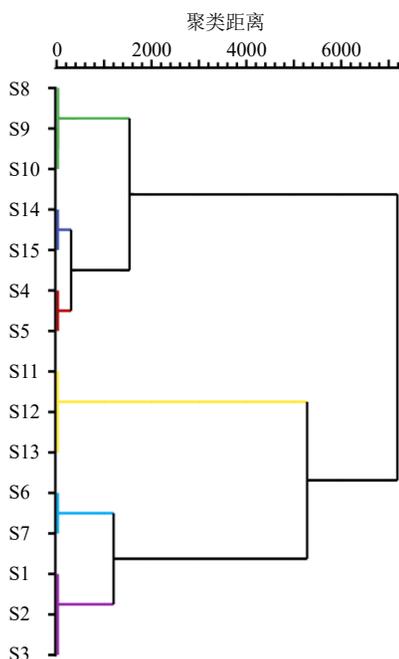


图3 15批 NJT 的 HCA

Fig. 3 HCA of 15 batches of NJT

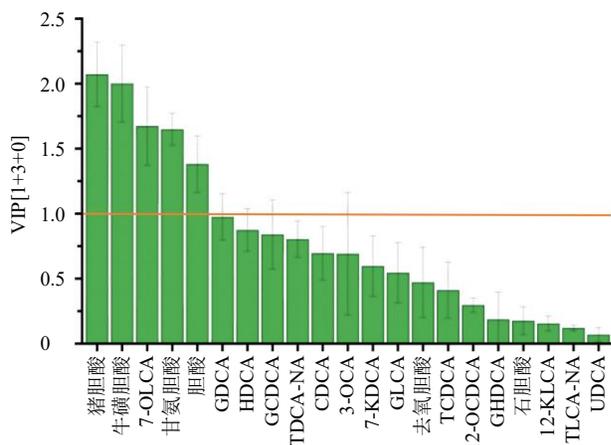


图4 各成分指标 VIP 图

Fig. 4 VIP diagram of each component index

3 讨论

3.1 检测模式的选择

为了快速、有效的实现各组分的分离，前期考察了 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Thermo Bremen Hypersil Gold (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 等不同规格的色谱柱，发现 Thermo Bremen Hypersil Gold C₁₈ 柱对样品分离效果最佳，峰型尖锐，对称性好，适用于本样品体系的测定。另一方面，比较了甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液等不同流动相体系的洗脱效果，发现在甲醇-水和乙腈-水的流动相体系下，色谱峰存在拖尾现象，洗脱效果不佳，而加入适当浓度的甲酸，可减少拖尾，改善峰型，促进离子化，故选用 0.1%甲酸水-甲醇溶液作为流动相。此外，本实验还考察了正、负离子两种扫描方式对待测成分的响应值的影响，结果发现 21 种胆酸类化合物均可在负离子模式下检测到较高的丰度，且在高选择性的 PRM 模式下，通过高能碰撞解离 (HCD)，获取各成分的二级质谱信息，筛选出响应最高且背景干扰最小的碎片离子作为定量离子 (表 1)。

3.2 样品含量分析

统计分析结果显示同一厂家的产品均一性较高，而不同厂家间的产品质量存在显著差异，其中太极集团四川绵阳制药有限公司 (S4、S5)、北京同仁堂有限责任公司 (S8~S10) 及河北唐威药业有限公司 (S14、S15) 3 个厂家的 NJT 产品质量较接近，葵花药业集团股份有限公司 (S1~S3) 与昆明中药厂 (S6、S7) 的产品相似度高，云南腾药制药股份有限公司 (S11~S13) 与其他厂家之间的差距明显，VIP 值显示猪胆酸、牛磺胆酸、7-OLCA、甘氨酸、胆酸的含量水平是产生差异的主要指标，且研究表明上述胆汁酸具有利胆、抗炎、抗菌等活性^[22-23]，提示这些成分可视为 NJT 的潜在质量标志物。此外，定量结果显示，各组分含量在单批样品中的差异较大，其中含量较高的仍为牛磺胆酸、甘氨酸、7-OLCA、猪胆酸和胆酸，占总量的 80% 以上，其质量分数分别为 598.97~2 176.38、223.44~606.99、247.87~1 089.84、699.31~2 224.24、734.55~1 234.30 μg/g，依据本研究中所测的市售产品，若本品每片含人工牛黄分别以牛磺胆酸、甘氨酸、7-OLCA、猪胆酸和胆酸总量计，则含量范围为 0.7~1.3 mg。

另一方面，根据制剂生产原料与制备工艺推测

造成其质量差异的原因可能是由于人工牛黄制备时的温度、球磨参数及匀质过程的不稳定性而导致牛黄粉中的成分未能均匀分布,或者是在制剂生产过程中,因环境温湿度、机器性能的不同,产生物料混合不均、成分降解等不良因素,进而导致各厂家的产品中各成分含量存在区别,提示药企在生产过程中应重点关注原料药材来源及质量,并严格控制生产环境条件与工艺参数,建立以差异性指标为主的质量控制体系,确保产品质量的均一性,最终达到疗效的一致性。

3.3 小结

综上所述,本研究所建方法专属性强、灵敏度高,分析时间短,能够在 19 min 内快速实现对目标成分的测定,其重复性、稳定性及准确度良好,可用于 NJT 的质量评价,为其质量标准提升及质量控制研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 694.

[2] 宋立人. 现代中药学大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1865-1869.

[3] 范亚刚, 左文松, 杨琰. 高效液相色谱法测定牛黄解毒片中黄芩苷、大黄素的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(5): 80-81.

[4] 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 837(1/2): 11-17.

[5] 周德方. 牛磺鹅去氧胆酸对抗地塞米松致小鼠脑损伤的组织病理学影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.

[6] Song M, Yang Q, Zhang F, et al. Hyodeoxycholic acid (HDCA) suppresses intestinal epithelial cell proliferation through FXR-PI3K/AKT pathway, accompanied by alteration of bile acids metabolism profiles induced by gut bacteria [J]. *FASEB J*, 2020, 34(5): 7103-7117.

[7] 胡志娟, 任路平, 王超, 等. 鹅去氧胆酸对高果糖喂养致大鼠脂质肾毒性、中纤维化、炎症和氧化应激的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3088-3091.

[8] 尹兵. 猪胆粉结合型总胆酸对支气管哮喘小鼠气道炎症的治疗作用研究 [D]. 西安: 西北大学, 2019.

[9] 赵红霞. 鹅去氧胆酸的提纯及其免疫、镇咳、化痰、平

喘作用研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2002.

[10] 王彩云, 邵春格, 刘明强. 牛磺胆酸对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(4): 19-24.

[11] 林楚慧, 柴瑞平, 张璐, 等. 高效液相色谱-电雾式检测器测定牛黄解毒片中的 6 种胆汁酸 [J]. 分析化学, 2022, 50(5): 764-771.

[12] 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.

[13] 姚令文, 石岩, 魏锋, 等. 羊胆中胆汁酸类成分的考察、测定与探讨 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1718-1723.

[14] 石岩, 耿颖, 郑天骄, 等. 猪胆粉 HPLC-ELSD 全轮廓谱图主要胆汁酸测定及化学计量学分析 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 283-289.

[15] 石岩, 郑天骄, 魏锋, 等. 牛胆粉指纹图谱模式识别及多组分测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2487-2492.

[16] 石岩, 魏锋, 吕宝俊, 等. HPLC-ELSD 测定培植牛黄中主要胆汁酸类成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(10): 790-793.

[17] 王利敏. HPLC-ELSD 法测定猪胆粉中的甘氨酸去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸的含量 [J]. 中国药师, 2017, 20(8): 1480-1482.

[18] 曹帅, 夏晶, 付泽晓, 等. 基于胆酸类成分的牛胆粉质量控制与掺伪检测研究 [J]. 中国药学杂志, 2020, 55(5): 383-388.

[19] 石岩, 熊婧, 魏锋, 等. 常用胆汁类动物药中特征离子的探索研究及应用 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 651-658.

[20] 雷凯, 刘雅楠, 张程亮, 等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2447-2453.

[21] Zhang J, Peng J, Chen X, et al. Rapid identification of bile acids in snake bile using ultrahigh-performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1036/1037: 157-169.

[22] 高永红, 袁拯忠, 牛福玲, 等. 猪胆酸对体外缺血再灌注大鼠脑微血管内皮细胞 ICAM-1 的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007(10): 670-673.

[23] 刘欣媛, 李培锋. 牛磺胆酸研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2010, 26(4): 134-135.

[责任编辑 郑礼胜]