

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)02-0049-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.02.011



4种牛黄解毒制剂中胆汁酸类成分分析

王倩倩¹, 柴晓钰¹, 王新宇¹, 易紫容¹, 周柏霖², 刘洋^{1△}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075)

摘要:目的 分析牛黄解毒制剂中胆汁酸类成分。方法 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF/MS)法对不同牛黄解毒制剂(11批, 包括丸、片、胶囊、软胶囊4种剂型)中胆汁酸进行定量分析, 采用聚类分析及主成分分析对样品进行聚类, 使用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)筛选关键胆汁酸(VIP>1, 且变化倍数>2), 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法对制剂中关键胆汁酸进行定量分析。结果 制剂中共鉴定出240种胆汁酸类成分, 可分为游离胆汁酸、甘氨酸结合胆汁酸和牛磺酸结合胆汁酸3类。聚类分析显示, 牛黄解毒丸与其他3种剂型能较好地区分, 并得到16种关键胆汁酸。不同剂型制剂总胆汁酸含量为1.74~4.84 mg/g, 且不同剂型间关键胆汁酸含量存在差异。相较丸剂, 其他3种剂型胆汁酸含量较高, 但不同厂家制剂中胆汁酸含量波动较大; 相比于其他剂型, 不同厂家牛黄解毒丸在胆汁酸类成分上的一致性更好。结论 不同剂型牛黄解毒制剂在胆汁酸种类和含量上存在差异。该研究可为提高牛黄解毒制剂质量标准提供参考。

关键词:牛黄解毒制剂; 胆汁酸; 超高效液相色谱-飞行时间质谱法; 超高效液相色谱串联质谱法

Analysis of Bile Acids in Four Niu Huang Jie Du Preparations

WANG Qianqian¹, CHAI Xiaoyu¹, WANG Xinyu¹, YI Zirong¹, ZHOU Bolin², LIU Yang¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 102488; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, China 610075)

Abstract: Objective To analyze the bile acids in Niu Huang Jie Du Preparations. **Methods** The ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF/MS) method was used for the quantitative analysis of bile acids in different Niu Huang Jie Du Preparations (11 batches, including pills, tablets, capsules, soft capsules). The cluster analysis and principal component analysis were used for clustering. The orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) method was used to screen for key bile acids (variable importance in projection > 1 and fold change > 2). The ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was used for the quantitative analysis of

第一作者: 王倩倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物代谢与药靶结合, (电子信箱)20220935121@bucm.edu.cn。

△通信作者: 刘洋, 男, 博士, 教授, 研究方向为药物代谢与药靶结合, (电子信箱)liuyang@bucm.edu.cn。

2015, 7(2): 999-1020.

[20] YANG F, DONG X, YIN X, et al. Radix Bupleuri: A Review of Traditional Uses, Botany, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 7597596.

[21] JIANG H, YANG L, HOU A, et al. Botany, traditional uses, phytochemistry, analytical methods, processing, pharmacology and pharmacokinetics of Bupleuri Radix: A systematic review[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110679.

[22] WANG JB, WANG YX, LI F, et al. The efficacy of Da Chaihu decoction combined with metformin tablets for type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis [J]. Complementary Therapies in Medicine, 2022, 71: 102894.

[23] INAMI Y, YAMASHINA S, IZUMI K, et al. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 412(4): 618-625.

[24] ZHONG CC, ZHAO T, HOGSTRAND C, et al. Copper (Cu) induced changes of lipid metabolism through oxidative stress-mediated autophagy and Nrf2/PPARγ pathways [J]. J Nutr Biochem, 2022, 100: 108883.

[25] PARK HS, SONG JW, PARK JH, et al. TXNIP / VDUP1 attenuates steatohepatitis via autophagy and fatty acid oxidation [J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2549-2564.

[26] LI CQY, ZHANG CQ, ZHU CY, et al. Inflammation aggravated the hepatotoxicity of triptolide by oxidative stress, lipid metabolism disorder, autophagy, and apoptosis in zebrafish [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 949312.

[27] WANG Q, LIU SD, ZHAI AH, et al. AMPK-Mediated Regulation of Lipid Metabolism by Phosphorylation [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(7): 985-993.

[28] MARCONDES-DE-CASTRO IA, REIS-BARBOSA PH, MARINHO TS, et al. AMPK / mTOR pathway significance in healthy liver and non-alcoholic fatty liver disease and its progression [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2023, 38 (11): 1868-1876.

[29] HONMA K, KIRIHARA S, NAKAYAMA H, et al. Selective autophagy associated with iron overload aggravates non-alcoholic steatohepatitis via ferroptosis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2023, 248(13): 1112-1123.

(收稿日期: 2023-11-20; 修回日期: 2024-07-19)

key bile acids in the preparations. **Results** A total of 240 bile acids were identified in the preparations, which can be divided into three categories, including free bile acids, glycine - bound bile acids and taurine - bound bile acids. The cluster analysis showed that Niuhuang Jiedu Pills could be well distinguished from the other three formulations, and 16 key bile acids were obtained. The total bile acid content was in the range of 1.74 to 4.84 mg / g in different dosage forms, and in which the key bile acid content was different. Compared with that in pills, the bile acid content in other three formulations was higher, while that in the preparations from different manufacturers showed obvious fluctuations; compared with that in other preparations, the bile acids in Niuhuang Jiedu Pills from different manufacturers were more consistent. **Conclusion** There are differences in the types and contents of bile acids in different dosage forms of Niuhuang Jiedu Preparations. This study can provide a reference for improving the quality standard of Niuhuang Jiedu Preparations.

Key words: Niuhuang Jiedu Preparation; bile acid; UPLC - TOF / MS; UPLC - MS / MS

牛黄是牛的干燥胆结石^{[1]72-73}, 作为名贵中药应用已达两千年。因其来源稀缺, 作为其替代品的人工牛黄应用日渐广泛。人工牛黄由牛胆粉、胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成^{[1]5-6, [2]}, 目前已在 600 余种中成药中应用^[3]。牛黄解毒制剂是最经典的以人工牛黄为君药的中成药, 有清热解毒的功效, 临床常用于火热内盛、咽喉肿痛、牙龈肿痛、口舌生疮及目赤肿痛等症的治疗, 常见的剂型有片、丸、胶囊和软胶囊等。胆汁酸是人工牛黄中重要活性成分, 与牛黄的降压、抗炎、保肝、利胆、抗菌与抗病毒等多种药理作用密切相关^[4-6], 也是 2020 年版《中国药典》中评价人工牛黄品质优劣的主要依据, 故测定牛黄解毒制剂中胆汁酸的种类和含量对于药品质量控制具有重要意义。胆汁酸为类固醇的混合物, 在动物体内通常以钠盐或钾盐的形式存在^[7]。目前文献报道已鉴别的胆汁酸高达数百种^[8-10], 精确定量的胆汁酸分析方法也越来越多^[11-13]。同时, 一些微量胆汁酸的重要作用也逐渐被发现, 如牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)和甘氨酸熊去氧胆酸(GUDCA)可能与二甲双胍和茶褐素的降糖、调脂作用有关^[14-15]。猪胆酸(HCA)与糖尿病缓解和非酒精性脂肪性肝病的治疗密切相关^[16-17]。可见, 对这些胆汁酸进行定性定量分析十分重要。目前, 由于化学结构多样、同分异构体广泛存在、信号响应较低及基质效应等原因, 对胆汁酸的测定仍存在一些阻碍^[18]。对牛黄解毒片中部分胆汁酸的含量定量研究主要集中于几种含量较高的胆汁酸, 缺乏对制剂胆汁酸轮廓的系统描绘, 且仅针对牛黄解毒片, 缺少对其他剂型的测定和对比^[15, 19-20]。基于此, 本研究中综合采用超高效液相 - 飞行时间质谱(UPLC - TOF / MS)及超高效液相串联质谱(UPLC - MS / MS)技术的定性和定量检测能力, 对市售常见的牛黄解毒制剂中的胆汁酸谱进行定性描述, 同时对其中关键胆汁酸的含量进行定量测定。以期为提高牛黄解毒制剂标准及进一步挖掘药效成分提供参考。现报道如下。

1 试剂与方法

1.1 仪器

LC MS - 8050 型超高效液相串联三重四极杆质谱

仪, 包括 LC - 30A 型液相系统和 8050 型三重四极杆质谱仪(日本 Shimadzu 公司); LC - SCIEX 5600 型超高效液相串联飞行时间质谱仪, 包括岛津 LC - 30A 型液相系统和 AB SCIEX Triple TOF 5600 型飞行时间质谱仪(美国 AB 公司); 1 - 15PK 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); BT25S 型电子天平(德国 Sartorius 公司, 精度为 0.01 mg); KQ5200E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品胆酸(CA, 批号为 A313A025), 牛磺胆酸(TCA, 批号为 A711A025), 均购自北京索莱宝科技有限公司(含量 $\geq 98\%$); 牛磺脱氧胆酸(TDCA, 批号为 L820S84, 含量 97%), 购自北京百灵威科技有限公司; 甘氨酸胆酸(GCA, 批号为 H1520042), 脱氧胆酸(DCA, 批号为 K1912135), 鹅去氧胆酸(CDCA, 批号为 D1809125), 甘氨酸脱氧胆酸(GDCA, 批号为 G1804163), 石胆酸(LCA, 批号为 I1920124), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(含量 $\geq 97\%$); 牛磺石胆酸(TLCA, 批号为 Z22S11H125507), 购自上海源叶生物科技有限公司(含量 $\geq 97\%$); 甘氨酸石胆酸(GLCA, 批号为 GC437781), 购自 GlpBio Technology 公司(含量 $\geq 98\%$); 猪胆酸(HCA, 批号为 700159P - 5MG - D - 010), 购自 Sigma - Aldrich 公司(含量 $\geq 98\%$); 牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA, 批号为 80678), 甘氨酸鹅去氧胆酸(GCDCA, 批号为 29837), 猪去氧胆酸(HDCA, 批号为 46046), 均购自 MedChemExpress 公司(含量 $\geq 98\%$); 5 - β - cholanolic acid - 3 α - ol - 6 - one(6 - KLCA, 批号为 2 - HPA - 68 - 2)、3 - oxocholic Acid(3 - KCA, 批号为 056552805)、胆酸 - d₄(d₄ - CA, 批号为 0595961 - 2), 均购自 Cayman Chemical 公司(含量 $\geq 95\%$); 甲醇、乙腈均为质谱级, 其余试剂均为分析纯或色谱纯, 水为超纯水。本研究所用牛黄解毒制剂均购于药店(样品信息见表 1)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: ACE EXCEL 1.7 C₁₈ 柱(100 mm \times 2.1 mm,

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

名称	编号	批号	生产厂家
牛黄解毒丸	S1	21013426	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂
	S2	20230103	山西华康药业股份有限公司
	S3	210011	国药集团冯了性(佛山)药业有限公司
	S4	4020016	天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂
	S5	20220102	九芝堂股份有限公司
牛黄解毒片	S6	21122450	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂
	S7	20230301	葵花药业集团(伊春)有限公司
	S8	2304004	太极集团四川绵阳制药有限公司
	S9	230311	亚宝药业集团股份有限公司
牛黄解毒胶囊	S10	20220203	贵州济生制药有限公司
牛黄解毒软胶囊	S11	20220102	北京康而福药业有限责任公司

1.7 μm);流动相:0.05%甲酸-水(A)-0.05%甲酸-乙腈(B),梯度洗脱(LC-TOF/MS分析,0~1 min时17%B,1~7 min时17%B→26%B,7~9 min时26%B→32%B,9~13 min时32%B→48%B,13~19 min时48%B→98%B,19~22 min,98%B;LC-MS/MS分析,0~1.5 min时17%B,1.5~3 min时17%B→32%B,3~8 min时32%B→48%B,8~10 min时48%B→60%B,10~12.5 min时60%B→98%B,12.5~15 min时98%B);流速:0.25 mL/min;柱温:45℃;进样量:10 μL 。

2.1.2 质谱条件

AB SCIEX 5600 飞行时间质谱(定性鉴定),电喷雾离子源(ESI),负离子模式采集。母离子扫描范围为100~800 Da,子离子扫描方式为IDA数据依赖采集,扫描范围为100~800 Da。离子源气体1,2气压分别为40,50 psi,帘气气压为30 psi,离子源温度为500℃,离子喷雾电压为-4 500 V。Shimadzu 8050 三重四极杆质谱(定量分析),ESI,负离子模式采集。雾化气流量为2 L/min,干燥气流量为10 L/min,加热气流量为10 L/min,接口温度为300℃,脱溶剂温度为500℃,脱溶剂(DL)管温度为250℃,加热块温度为400℃。多反应监测(MRM)模式。胆汁酸具体参数见表2。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取各胆汁酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度均为1 mg/mL的对照品母液;各取适量,涡旋混匀,加甲醇连续稀释,得质量浓度分别为600,200,60,20,6,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列混合对照品贮备液。各取适量,用含内标(终质量浓度10 ng/mL)的50%甲醇稀释200倍,分别得3 000,1 000,300,100,30,10 ng/mL的系列混合对照品溶液。

内标溶液:取 d_4 -CA(内标)对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的内标母液,用

表2 16个胆汁酸与内标的离子对信息

Tab. 2 Information of ion pairs of 16 bile acids and internal standard

胆汁酸	母离子(Da)	子离子(Da)	电离电压(V)	胆汁酸	母离子(Da)	子离子(Da)	电离电压(V)
TCA	514.1	124.05	50	HCA	407.2	407.20	21
CA	407.2	407.20	15	GLCA	432.1	432.10	18
GCA	464.2	74.15	35	6-KLCA	389.2	389.20	20
CDCA	391.2	391.20	21	3-KCA	405.2	405.20	20
DCA	391.2	345.20	32	GCDCa	448.2	74.10	35
GDCA	448.2	448.20	15	TCDCa	498.0	498.00	23
TDCA	498.2	498.20	22	HDCA	391.2	391.20	20
LCA	375.1	375.10	19	d_4 -CA	411.3	411.30	18
TLCA	482.2	482.20	25				

50%甲醇稀释至质量浓度为10 ng/mL,即得。

供试品溶液:取样品(胶囊内容物研细,过100目筛;片剂除去包衣,研细后过100目筛;丸剂剪块,每丸20~30块;软胶囊取内容物)0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入含内标的50%甲醇4 mL,密塞,称定质量,超声(功率200 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀后用滤纸滤过,12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

空白溶液:用甲醇将含有内标的50%甲醇稀释200倍,4℃下,12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

2.3 定性分析

使用Analyst 1.7软件对胆汁酸进行定性鉴别。取空白溶液、3 000 ng/mL混合对照品溶液和供试品溶液,按2.1项下试验条件进样分析,每隔3个样本加入校准溶液用于质量轴校正。有对照品的胆汁酸,依赖对照品鉴定;无对照品的胆汁酸,根据精确分子量,相对保留时间和裂解规律,结合文献[8]鉴定。

供试品(S1)溶液总离子流图见图1。共鉴别出胆汁酸类化合物240种,分为游离胆汁酸(109种)、甘氨酸结合胆汁酸(52种)和牛磺酸结合胆汁酸(79种),信号强度见图2。

使用SIMCA软件对数据进行归一化处理,随后进行主成分(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-

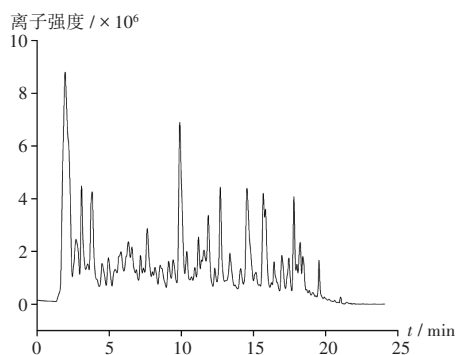


图1 供试品(S1)溶液总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of test sample (S1)

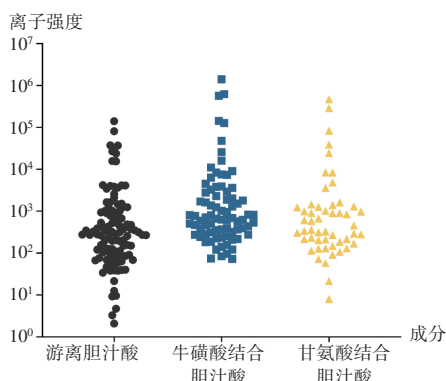


图2 不同类型胆汁酸信号强度

Fig. 2 Signal intensity of different types of bile acids

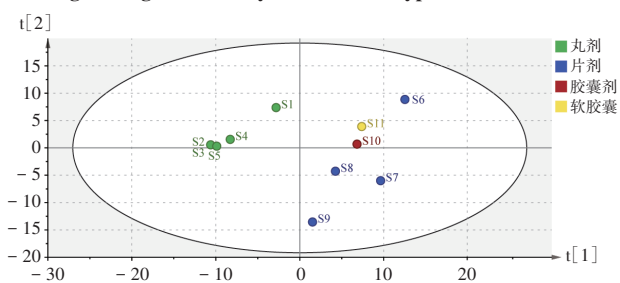


图3 PCA得分图

Fig. 3 PCA scoring plot

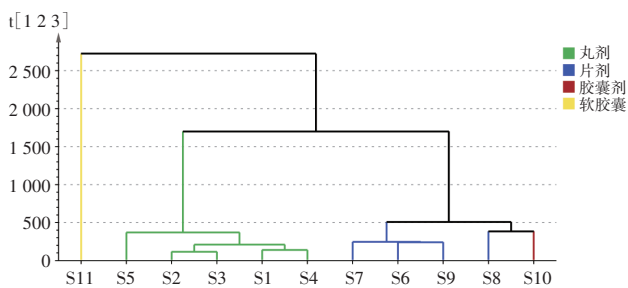


图4 聚类分析结果

Fig. 4 Results of the cluster analysis

DA)和聚类分析。PCA结果见图3,可见,不同厂家牛黄解毒丸中胆汁酸的分布差异不大,同时能与其他剂型较好区分;不同厂家牛黄解毒片胆汁酸组成差异较大,且与胶囊剂或软胶囊剂无法区分,表明其在胆汁酸组成和含量上具有一定的一致性。聚类分析结果见图4。可见,丸剂和片剂仍能成功聚类,胶囊剂与片剂仍难以区分。

基于上述结果,牛黄解毒胶囊、软胶囊和牛黄解毒片拥有类似的胆汁酸组成和离子强度,因此后续将其作为一组,并与牛黄解毒丸进行OPLS-DA分析(见图5)。可见,两组能较好地地区分。同时,相比于其他剂型,不同厂家牛黄解毒丸在胆汁酸类成分上的一致性更好。

采用S plot软件对关键差异胆汁酸进行分析(见图6)。选择VIP值大于1.0,具有显著差异($P < 0.05$),同时以变化倍数大于2的化合物作为目标。共筛选得到12个胆汁酸类化合物(见表3),经筛选及查阅文献。最

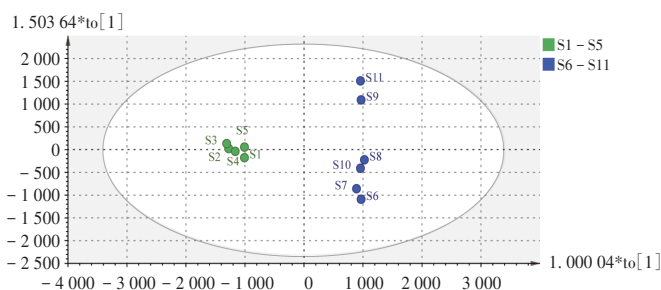


图5 OPLS-DA得分图

Fig. 5 OPLS-DA scoring plot

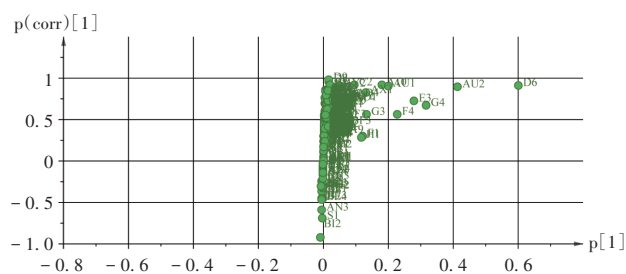


图6 S plot得分图

Fig. 6 S plot scoring plot

表3 不同剂型牛黄解毒剂差异性胆汁酸信息

Tab. 3 Information on differential bile acids in different dosage forms of Niu Huang Jie Du Preparations

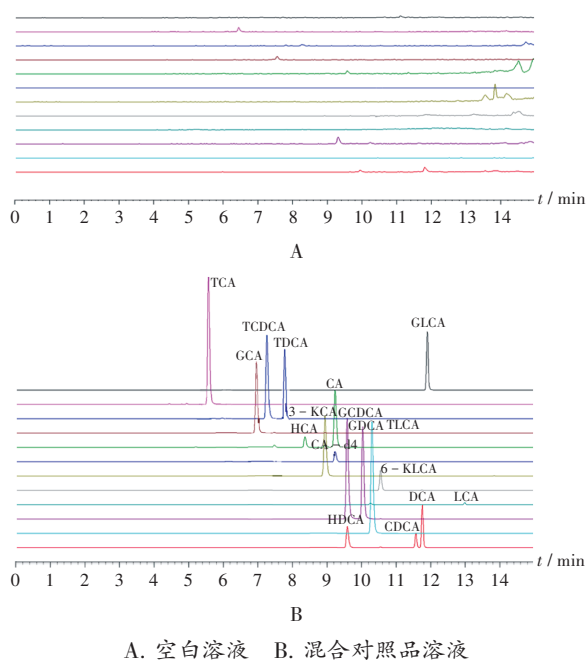
名称	分子式	$m/z [M-H]^-$	VIP值	P值	Fold Change
TCA	$C_{26}H_{45}NO_7S$	514.2844	9.319	0.004	2.310
$N-(1\alpha, 3\alpha-Dihydroxy-5\beta-cholan-24-oyl)-taurine-isomer$	$C_{26}H_{45}NO_7S$	498.2895	6.390	0.004	2.535
CA	$C_{24}H_{40}O_5$	407.2803	2.791	0.004	2.012
$N-(6\alpha, 7\alpha-Dihydroxy-3-oxo-5\beta-cholan-24-oyl)-taurine-isomer$	$C_{26}H_{43}NO_7S$	512.2687	2.044	0.004	5.281
3-KCA	$C_{23}H_{42}O_4$	405.3010	1.804	0.030	956.031
HDCA	$C_{24}H_{40}O_4$	391.2854	1.463	0.004	2.090
$3\alpha, 7\alpha, 12\alpha-trihydroxy-5\beta-cholestan-26-oic acid isomer$	$C_{27}H_{46}O_5$	449.3272	1.354	0.004	3.125
$N-(6\alpha, 7\alpha-Dihydroxy-3-oxo-5\beta-cholan-24-oyl)-glycine isomer$	$C_{26}H_{41}NO_6$	462.2860	1.260	0.009	3.181
DCA	$C_{24}H_{40}O_4$	391.2854	1.174	0.017	2.112
$N-(24-nor-3\alpha, 7\alpha, 12\alpha-trihydroxy-5\beta-cholan-23-oyl)-taurine-isomer$	$C_{25}H_{43}NO_7S$	500.2687	1.097	0.004	4.752
6-KLCA	$C_{24}H_{38}O_4$	389.2697	1.028	0.009	3.769
Allo-CA	$C_{24}H_{40}O_5$	407.2803	1.016	0.009	14.276

终纳入前述16种胆汁酸作为定量研究目标。

2.4 含量测定

2.4.1 方法学考察

专属性试验:分别取100 ng/mL混合对照品溶液,



A. 空白溶液 B. 混合对照品溶液

图7 16种胆汁酸及内标MRM图

A. Blank solution B. Mixed reference solution

Fig. 7 MRM chromatograms of 16 bile acids and internal standard
以及空白溶液和供试品溶液(S1),按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果,空白溶液在各胆汁酸出峰位置未见信号峰,表明该方法的专属性良好。详见图7。

线性关系考察:取系列混合对照品溶液各适量,4℃下12 000 r/min离心10 min,取上清液,按2.1项下试验条件进样测定,以各胆汁酸与内标峰面积的比值为纵坐标(Y)、各胆汁酸质量浓度(X, ng/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表4。

精密度试验:取10 ng/mL混合对照品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,计算各胆汁酸与内标峰面积的比值。结果的RSD为1.14%~4.92%(n=6),表明日内精密度良好;在不同的日期、由不同操作人员取同一批次样品(S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算各胆汁酸含量。结果的RSD为1.59%~3.77%(n=6),表明中间精密度良好。

稳定性试验:取供试品(S1)溶液适量,于4℃下放置6,12,24,48 h时,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.64%~8.82%(n=5),表明供试品溶液4℃下放置48 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(S1)适量,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算供试品中各胆汁酸含量。结果平均含量为0.022~0.442 ng/g, RSD为1.49%~3.96%(n=6),表明方法重复性良好。

表4 线性范围考察结果

Tab. 4 Results of the linear relation test

胆汁酸	回归方程	R ²	线性范围(ng/mL)
TCA	$Y_1 = 0.0599X_1 + 0.6298$	0.9946	10~3000
CA	$Y_2 = 0.0515X_2 - 3.5272$	0.9929	10~3000
GCA	$Y_3 = 0.0471X_3 - 2.6119$	0.9928	10~3000
CDCA	$Y_4 = 0.0128X_4 - 0.2959$	0.9971	10~3000
DCA	$Y_5 = 0.0343X_5 - 0.48$	0.9919	10~3000
GDCA	$Y_6 = 0.0592X_6 - 4.3991$	0.9943	10~3000
TDCA	$Y_7 = 0.0583X_7 - 3.858$	0.9922	10~3000
LCA	$Y_8 = 0.0025X_8 - 0.0002$	0.9939	10~3000
TLCA	$Y_9 = 0.0698X_9 - 2.6593$	0.9981	10~3000
HCA	$Y_{10} = 0.0094X_{10} - 0.3089$	0.9970	10~3000
GLCA	$Y_{11} = 0.0375X_{11} - 1.6011$	0.9947	10~3000
6-KLCA	$Y_{12} = 0.0156X_{12} - 0.382$	0.9946	10~3000
3-KCA	$Y_{13} = 0.0419X_{13} - 2.1284$	0.9977	10~3000
GCDCA	$Y_{14} = 0.0658X_{14} - 2.0771$	0.9974	10~3000
TCDCA	$Y_{15} = 0.0529X_{15} - 0.019$	0.9963	10~3000
HDCA	$Y_{16} = 0.0173X_{16} - 0.1857$	0.9913	10~3000

加样回收试验:取样品(S1)约0.05 g,分别加入各胆汁酸含量的50%,100%和150%的胆汁酸对照品,按2.2项下方法制备供试品溶液,均平行3份,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算供试品中各胆汁酸质量浓度,计算回收率。结果见表5。

表5 加样回收试验结果

Tab. 5 Results of the recovery test

胆汁酸	\bar{X} (%)	RSD(%)	胆汁酸	\bar{X} (%)	RSD(%)
TCA	99.57	3.44	TLCA	102.57	8.33
CA	98.40	5.08	HCA	98.23	6.31
GCA	101.83	5.70	GLCA	92.33	5.54
CDCA	97.67	6.62	6-KLCA	98.63	5.53
DCA	95.07	5.05	3-KCA	96.63	5.26
GDCA	99.97	7.82	GCDCA	101.83	7.24
TDCA	99.53	3.45	TCDCA	99.77	7.03
LCA	94.27	6.22	HDCA	103.17	4.96

2.4.2 样品含量测定

取11批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量(如供试品中胆汁酸浓度高于定量上限,则使用空白溶液适当稀释再次进样分析)。结果见表6。

为更清晰展示不同剂型中胆汁酸的分布规律,对总胆酸和HDCA(工人牛黄的标志性胆汁酸)进行绘图(见图8)。可见,不同厂家丸剂的2种成分含量差异不大,其他胆汁酸也显示出类似趋势,这与高分辨质谱的结果基本一致。片剂中总胆酸和HDCA则明显升高,同

表6 样品含量测定结果(mg/g)

Tab. 6 Results of content determination of 16 bile acids in samples (mg/g)

样品编号	TCA	CA	GCA	CDCA	DCA	GDCA	TDCA	LCA	TLCA	HCA	GLCA	6-KLCA	3-KCA	GCDCA	TCDCA	HDCA
S1	0.168	0.303	0.201	0.095	0.198	0.061	0.131	0.124	0.028	0.040	0.028	0.037	0.025	0.026	0.033	0.460
S2	0.191	0.220	0.196	0.121	0.079	0.054	0.121	0.145	0.024	0.058	0.024	0.063	0.014	0.023	0.027	0.394
S3	0.126	0.297	0.091	0.109	0.234	0.043	0.114	0.172	0.026	0.043	0.026	0.034	0.032	0.020	0.027	0.413
S4	0.177	0.230	0.143	0.102	0.187	0.047	0.123	0.142	0.025	0.038	0.026	0.057	0.024	0.022	0.030	0.364
S5	0.282	0.210	0.156	0.112	0.035	0.034	0.160	0.182	0.021	0.039	0.020	0.085	0.011	0.018	0.030	0.388
S6	0.601	0.646	0.646	0.156	0.311	0.167	0.345	0.175	0.044	0.106	0.043	0.103	0.056	0.050	0.075	0.859
S7	0.592	0.745	0.516	0.272	0.321	0.140	0.403	0.376	0.052	0.100	0.043	0.232	0.113	0.036	0.068	0.829
S8	0.394	0.557	0.163	0.290	0.207	0.051	0.231	0.187	0.031	0.345	0.027	0.080	0.047	0.023	0.044	0.550
S9	0.329	0.900	0.209	0.410	0.260	0.070	0.230	0.307	0.035	0.127	0.031	0.188	0.099	0.031	0.050	1.141
S10	0.701	0.671	0.425	0.241	0.339	0.112	0.354	0.265	0.040	0.136	0.037	0.174	0.075	0.034	0.072	0.927
S11	0.552	0.705	0.504	0.204	0.349	0.114	0.291	0.211	0.046	0.113	0.046	0.083	0.062	0.046	0.025	1.123

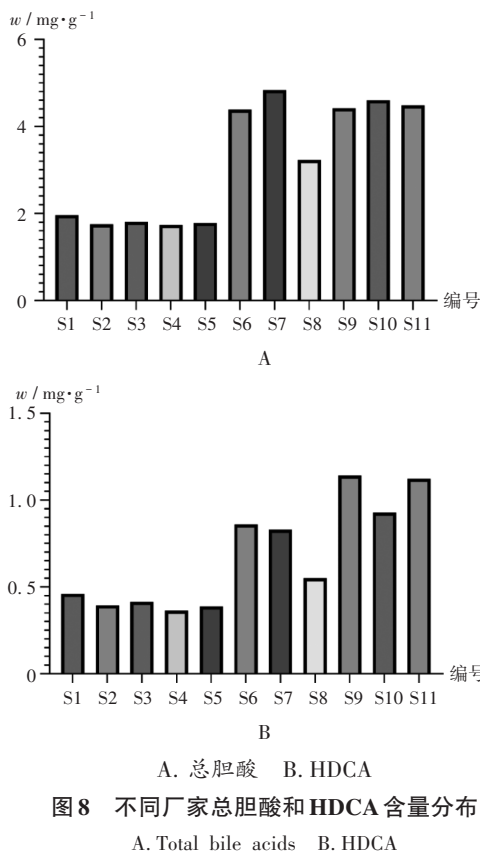


图8 不同厂家总胆酸和HDCA含量分布
A. Total bile acids B. HDCA

Fig. 8 Distribution of total bile acids and HDCA content in Niu Huang Jie Du Preparations from different manufacturers

时不同厂家制剂存在一定波动。胶囊剂和片剂表现出了类似的特征,且总体含量和片剂在同一水平。

3 讨论

3.1 样品及数据采集模式选择

收集中国药典上与牛黄解毒复方相关的4种制剂,即片剂、丸剂、胶囊剂、软胶囊剂,综合选取并最终确定11种较具代表性的产品进行胆汁酸含量测定。可见,目前市售牛黄解毒制剂以丸剂和片剂为主,但也有部分

胶囊剂或软胶囊。不同厂家,不同剂型和制剂工艺可能带来胆汁酸组成和含量的差异,进而带来药效和安全性上的区别,因此有必要对其胆汁酸进行定性定量评估。同时在前期试验中,分别考察了正离子和负离子模式下化合物峰的数量和强度,后者信号更强,分离更好,故选择。

3.2 定量分析

胆汁酸类成分同分异构体较多、相对峰面积较低且缺乏合适的标准品来进行后续定量研究,考虑到以上问题及研究的实际情况,综合选择相对峰面积较高且文献报道具有潜在药理活性的胆汁酸进行定量分析。此外,一些虽然无法同时满足以上条件,但也具有较明显差异且含量较高的胆汁酸也被纳入后续定量分析。本研究最终纳入上述16种胆汁酸作为定量研究目标。

使用内标法对目标胆汁酸进行定量分析,牛黄解毒制剂含有多种中药成分,这些成分及辅料可能会干扰对胆汁酸的提取和质谱响应,内标法能补偿样品在制备和进样过程中的误差,减少基质效应带来的影响。选择氘代胆酸同位素内标进行定量,由于其具有类似的化学结构,且与目标胆汁酸成分具有类似的色谱保留行为和电离特征,因此能更有效地减少保留时间漂移、信号波动等带来的影响。在此基础上分别对流动相组成、梯度条件、色谱柱等分析条件进行优化,以保证同分异构体的分离,其中色谱柱分别考察了ACE EXCEL 1.7 C₁₈柱、Shim-pack GIST Amide柱和Inert Core C₁₈柱,发现ACE EXCEL 1.7 C₁₈柱在同分异构体的分离上更有优势;流动相分别考察了甲醇-水体系和乙腈-水体系,发现后者峰形和分离度更好;还优化了梯度洗脱条件,以保证所有化合物均能实现基线分离。最终建立了16种胆汁酸的定量分析方法,在现有分析条件下,

16种胆汁酸能达到基线分离,同时线性范围能满足样品中胆汁酸定量分析的要求。

本研究结果提示,不同厂家、不同剂型的牛黄解毒制剂在胆汁酸组成和含量上存在差异,可能原因如下:1)不同厂家及不同剂型的制备工艺存在较大差异,制备人工牛黄时的温度、球磨参数及匀质过程的不稳定性会导致牛黄粉中成分分布不均匀;2)不同厂家人工牛黄原料、辅料各不相同,且在制剂生产过程中,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,也会导致胆汁酸分布的差异;3)缺乏全面对胆汁酸组成和含量进行质量控制的标准,导致不同厂家间产品波动性较大。因此,对人工牛黄原料进行源头控制及建立牛黄解毒制剂多种关键胆汁酸的质量控制标准,对于保证产品质量的均一性和药效的一致性至关重要。

3.3 方法评价

本研究中应用高分辨质谱描绘了不同剂型胆汁酸的分布特征,同时对16种人工牛黄中含量较高的胆汁酸进行了定量分析。结果表明,不同剂型人工牛黄制剂之间的胆汁酸分布存在明显差异,相对于丸剂,片剂和胶囊剂中胆汁酸更多。本研究所得结果有助于提高人工牛黄相关中成药的质量标准,优化和改进牛黄解毒制剂的生产和应用,并可对相关中成药的活性成分的研究提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 黄漠然, 赵文靖, 李晋生, 等. 牛黄及其代用品化学成分、分析方法和药理作用研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1116 - 1123.

[3] 胡晓茹, 刘晶晶, 马双成, 等. 含牛黄中成药的质量控制现状[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1374 - 1379.

[4] YU ZJ, XU Y, PENG W, et al. Calculus bovis: A review of the traditional usages, origin, chemistry, pharmacological activities and toxicology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 254: 112649.

[5] 林楚慧, 柴瑞平, 张璐, 等. 高效液相色谱-电喷雾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.

[6] 张宇静, 夏晶, 季申, 等. 牛黄中胆汁酸的药理作用及定量分析方法研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(2): 268 - 274.

[7] 王鑫, 陈晓, 时海波, 等. 动物胆汁及胆汁酸的合成、测定及药理作用的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 36 - 43.

[8] LIN M, CHEN X, WANG Z, et al. Global profiling and identification of bile acids by multi-dimensional data mining

to reveal a way of eliminating abnormal bile acids[J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1132: 74 - 82.

[9] MA Y, CAO Y, SONG X, et al. BAFinder: A software for unknown bile acid identification using accurate mass LC - MS / MS in positive and negative modes [J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(16): 6242 - 6250.

[10] SARAFIAN MH, LEWIS MR, PECHLIVANIS A, et al. Bile acid profiling and quantification in biofluids using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(19): 9662 - 9670.

[11] GÓMEZ C, STÜCHELI S, KRATSCHEMAR DV, et al. Development and validation of a highly sensitive LC - MS / MS method for the analysis of bile acids in serum, plasma, and liver tissue Samples [J]. Metabolites, 2020, 10(7): 282.

[12] QIAO X, YE M, LIU CF, et al. A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers [J]. Steroids, 2012, 77(3): 204 - 211.

[13] FU X, XIAO Y, GOLDEN J, et al. Serum bile acids profiling by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC - MS / MS) and its application on pediatric liver and intestinal diseases [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2020, 58(5): 787 - 797.

[14] HUANG F, ZHENG X, MA X, et al. Theabrownin from Pu - erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4971.

[15] SUN L, XIE C, WANG G, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin [J]. Nature Medicine, 2018, 24(12): 1919 - 1929.

[16] ZHENG X, CHEN T, ZHAO A, et al. Hyocholic acid species as novel biomarkers for metabolic disorders [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1487.

[17] KUANG J, WANG J, LI Y, et al. Hyodeoxycholic acid alleviates non - alcoholic fatty liver disease through modulating the gut - liver axis [J]. Cell Metabolism, 2023, 35(10): 1752 - 1766.

[18] BATHENA SP, MUKHERJEE S, OLIVERA M, et al. The profile of bile acids and their sulfate metabolites in human urine and serum [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 942 - 943: 53 - 62.

[19] 林诗铃, 林逸凡, 陈涛, 等. 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[J]. 中草药, 2023, 54(9): 2750 - 2757.

[20] 陈小红, 陈广云. 高效液相色谱法测定牛黄解毒片中胆酸和猪去氧胆酸的含量及其质量分析[J]. 化学分析计量, 2022, 31(4): 45 - 49.

(收稿日期: 2024 - 03 - 08; 修回日期: 2024 - 11 - 19)