

# UPLC-MS/MS法同时测定同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸的含量<sup>Δ</sup>

陈雪婷\*, 林诗铃, 陈涛, 林逸凡, 黄鸣清, 郑燕芳<sup>#</sup>(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)17-2074-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.17.05



**摘要** **目的** 建立同时测定同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分含量的方法,并采用该法测定15批样品的含量。**方法** 以脱氢胆酸为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术进行测定。色谱柱为Hypersil GOLD C<sub>18</sub>,以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为0.2 mL/min,柱温为40 °C,进样量为2 μL;采用加热型电喷雾离子源,在负离子模式下进行平行反应监测模式扫描。采用SPSS 24.0软件对含量测定结果进行化学模式识别分析。**结果** 15个胆汁酸成分在各自检测质量浓度范围内与峰面积线性关系良好( $R^2$ 均不小于0.998 9),精密度、重复性、稳定性均良好(RSD均不大于5.49%),平均加样回收率为93.8%~105.7%(RSD为0.5%~5.8%)。牛磺胆酸、7-酮-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -羟基胆烷酸、12-脱氢胆酸、甘氨酸胆酸、3-oxo-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid、牛磺鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-7-氧代-5 $\beta$ -胆烷酸、猪胆酸、牛磺脱氧胆酸钠、猪脱氧胆酸、胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸的含量分别为670.56、25.97、10.54、280.12、4.04、29.81、182.98、813.55、120.95、220.31、797.37、18.37、68.59、30.13、59.82 μg/g。聚类分析和主成分分析均将15批同仁牛黄清心丸分为2类,其中S1~S12为一类,S13~S15为另一类。**结论** 所建方法准确、灵敏度高、专属性强,且测定胆汁酸种类较多,能快速实现对同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的定量分析,适用于该药的质量控制。

**关键词** 同仁牛黄清心丸;超高效液相色谱-串联质谱法;胆汁酸;含量测定;化学模式识别分析

## Simultaneous determination of 15 bile acids in Tongren niuhuang qingxin pills by UPLC-MS/MS

CHEN Xueting, LIN Shiling, CHEN Tao, LIN Yifan, HUANG Mingqing, ZHENG Yanfang (College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish a method for simultaneous determination of 15 bile acids in Tongren niuhuang qingxin pills, and to determine the contents of 15 batches of samples. **METHODS** Using dehydrocholic acid as internal standard, the determination was performed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method. The determination was performed on Hypersil GOLD C<sub>18</sub> column with methanol-0.1% formic acid solution as the mobile phase by gradient elution at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was 40 °C, and the sample size was 2 μL. Using heated electrospray ion source, parallel reaction monitoring mode scanning was performed in negative ion mode. SPSS 24.0 software was used for chemical pattern recognition analysis of content determination results. **RESULTS** The 15 bile acid components had a good linear relationship with peak area (all  $R^2 \geq 0.998\ 9$ ); their precision, repeatability and stability were all good (all RSD  $\leq 5.49\%$ ); the average recoveries were 93.8%-105.7% (RSD was 0.5%-5.8%). The average contents of taurocholic acid, 7-oxodeoxycholic acid, 12-dehydrocholic acid, glycocholic acid, 3-oxo-7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid, taurochenodeoxycholic acid, 3 $\alpha$ -hydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanic acid, hyocholic acid, taurodeoxycholic acid sodium salt hydrate, hyodeoxycholic acid, cholic acid, glycochenodeoxycholic acid, glycodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid were 670.56, 25.97, 10.54, 280.12, 4.04, 29.81, 182.98, 813.55, 120.95, 220.31, 797.37, 18.37, 68.59, 30.13, 59.82 μg/g, respectively. Both cluster analysis and principal component analysis divided 15 batches of Tongren niuhuang qingxin pills into 2 categories, S1-S12 as one category and S13-S15 as the other category. **CONCLUSIONS** The established method is accurate, sensitive and specific, and can determine many types of bile acids. It also can quickly achieve the quantitative analysis of 15 bile acids in Tongren niuhuang qingxin pills, which is suitable for the quality control of this drug.

**KEYWORDS** Tongren niuhuang qingxin pills; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; bile acids; content determination; chemical pattern recognition analysis

<sup>Δ</sup> 基金项目 国家自然科学基金项目(No.81973437, No.82274080); 泉州市科技计划项目(No.2021FX02)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药效物质及质量控制。  
E-mail:1280781974@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理学。  
E-mail:yfzheng@fjtc.edu.cn

同仁牛黄清心丸由人工牛黄、当归、川芎等27味中药制备而成<sup>[1]</sup>,有清心化痰、镇惊祛风的功能,常用于治疗因风痰阻窍而引起的头昏眼花、痰涎壅盛、神智错乱、语言不清以及惊风抽搐。人工牛黄为方中君药,具有清心肝经热、凉血解毒开窍的功效<sup>[1-2]</sup>。目前,尚未见到有

关同仁牛黄清心丸的法定质控标准,已发表的文献仅有采用气相色谱法测定同仁牛黄清心丸中麝香酮的含量<sup>[3]</sup>,而能同时测定该药中多个胆汁酸成分的报道尚未见到。

含牛黄中成药质量的决定性因素是牛黄及其代用品的质量<sup>[4]</sup>,而对牛黄中的胆汁酸成分进行定量研究将成为提高含牛黄中成药质量标准 and 保障其药物稳定性的关键<sup>[5]</sup>。胆汁酸的种类、成分复杂,部分成分分子量、极性相近,甚至是同分异构体,不易分离,且部分胆汁酸含量极低,不易检测到,这增加了相关分析检测的难度<sup>[6-7]</sup>。近年来,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术因融合了超高效液相色谱的分离能力和高分辨质谱的鉴定能力而广泛用于中药复方成分的分析与鉴定<sup>[8]</sup>。基于此,本研究建立了一种能同时测定同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分含量的UPLC-MS/MS法,并采用该法对15批样品进行了测定,旨在为该药的质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Dionex Ultimate 3000型超高效液相色谱系统、四极杆串联静电场轨道阱质谱仪(配备电喷雾离子源)、Heracus Fresco 17型离心机均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Milli-Q Direct 16型超纯水制备仪购自德国Merck Millipore公司;CPA225D型十万分之一电子天平购自德国Sartorius公司;XM-400UHP型超声波清洗机购自小美超声仪器(昆山)有限公司。

### 1.2 主要药品与试剂

甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA, 批号Y08A9E57765)、3-oxo-7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanoic acid (3-OCA, 批号N07GY167164)、牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA, 批号Y09S8K43540)、3 $\alpha$ -羟基-7-氧代-5 $\beta$ -胆烷酸(3 $\alpha$ -hydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanolic acid, 3 $\alpha$ -OH-7-OCA, 批号N30GB169735)、猪脱氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HOCA, 批号S27M8I36899)、胆酸(cholic acid, CA, 批号T16J8Q28663)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA, 批号Y29M9K57235)、甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA, 批号Y27M9E56969)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA, 批号Z01011LA14)、脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA, 批号S05N6I5476)、脱氢胆酸(dehydrocholic acid, DHCA, 批号S30J9I64022, 内标)、7-酮-3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -羟基胆烷酸(7-oxodeoxycholic acid, 7-ODCA, 批号Z09M10J82521)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA, 批号B15J11J118403)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司(纯度均大于95%);12-脱氢胆酸(12-dehydrocholic acid, 12-DHCA, 批号0000080453)、牛磺脱氧胆酸钠(taurodeoxycholic acid sodium salt hydrate, TDCA-NA, 批号B26J9J53831)对照品均购自美国Sigma-Aldrich公司(纯度均大于95%);猪

胆酸(hyocholic acid, HCA, 批号A1110816)对照品购自美国Cayman公司(纯度不小于98%)。

15批同仁牛黄清心丸由北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂提供,批号分别为20010460、21010855、21010310、21010095、21010858、21010857、21010189、19010326、21010919、21010312、21011012、21010870、21010859、22010142、22010140(编号依次为S1~S15);甲醇和甲酸为色谱纯或质谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱为Hypersil GOLD C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9  $\mu$ m);流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 20%A; 0.5~1.5 min, 20%A $\rightarrow$ 70%A; 1.5~7 min, 70%A $\rightarrow$ 61%A; 7~8 min, 61%A; 8~14 min, 61%A $\rightarrow$ 80%A; 14~15 min, 80%A $\rightarrow$ 85%A; 15~16 min, 85%A $\rightarrow$ 90%A; 16~17.5 min, 90%A $\rightarrow$ 20%A; 17.5~19 min, 20%A);柱温为40  $^{\circ}$ C;流速为0.2 mL/min;进样量为2  $\mu$ L。

#### 2.1.2 质谱条件

采用加热型电喷雾离子源、负离子监测模式(negative ion mode, Neg);喷雾电压为3.0 kV(-);毛细管温度为325  $^{\circ}$ C;辅助气温度为350  $^{\circ}$ C;鞘气流速为45 arb;辅助气流速为10 arb;吹扫气流速为1 arb;质谱测定数据采用平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)模式。各待测成分及内标的质谱优化参数见表1;PRM图见图1。

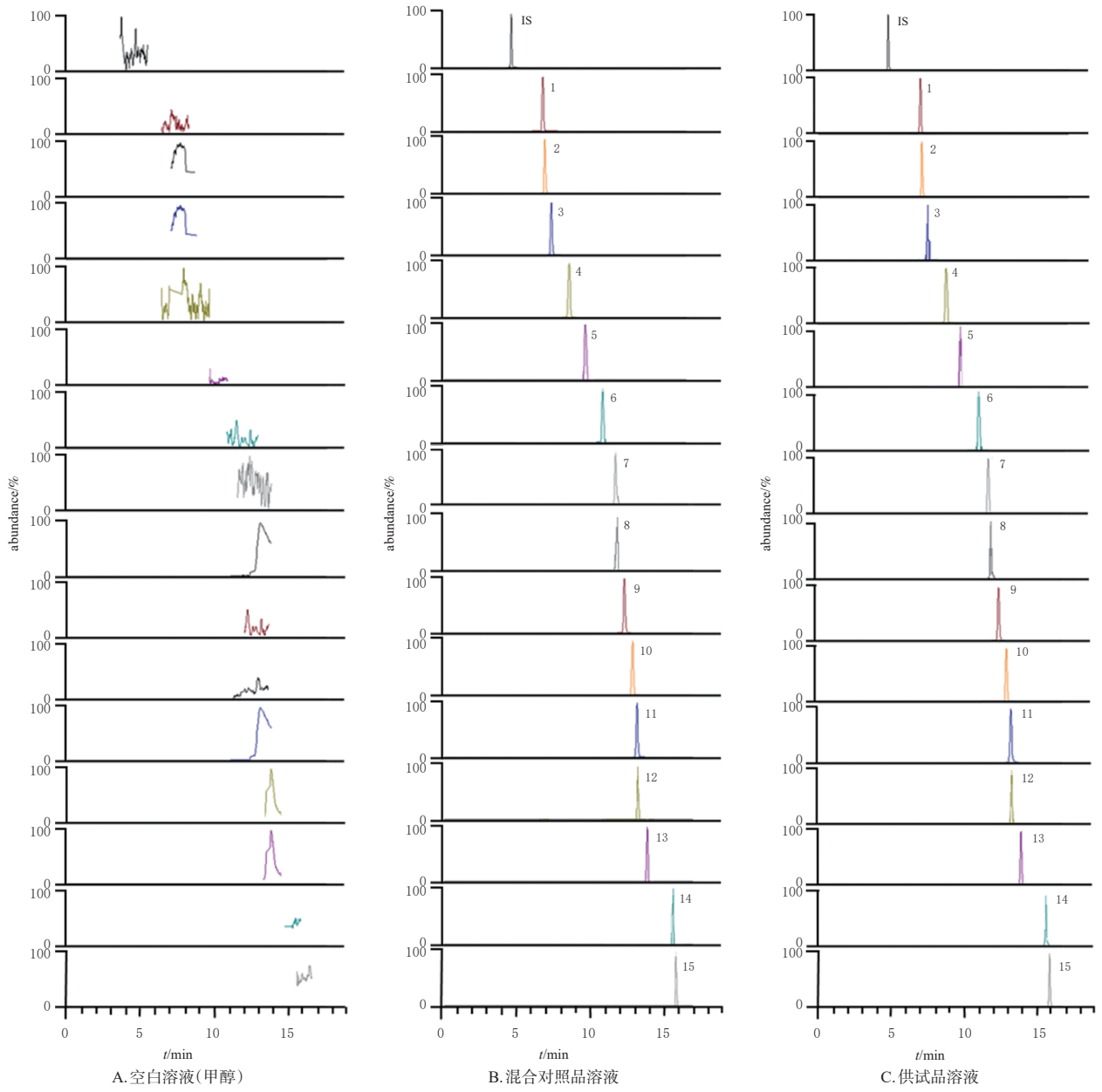
表1 各待测成分及内标的质谱优化参数

序号	待测成分	保留时间/min	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	碰撞能量/eV	电离模式
1	TCA	7.72	514.28	79.56	124	Neg
2	7-ODCA	7.92	405.26	123.08	45	Neg
3	12-DHCA	8.45	405.26	69.03	45	Neg
4	GCA	9.85	464.30	74.02	41	Neg
5	3-OCA	11.11	405.26	271.10	45	Neg
6	TCDCA	12.33	498.28	79.95	100	Neg
7	3 $\alpha$ -OH-7-OCA	12.79	389.26	389.26	10	Neg
8	HCA	12.90	407.28	407.28	10	Neg
9	TDCA-NA	13.44	498.29	79.95	100	Neg
10	HOCA	14.06	391.28	391.28	10	Neg
11	CA	14.38	407.28	407.28	10	Neg
12	GCDCA	14.45	448.30	74.02	40	Neg
13	GDCA	15.14	448.30	74.02	40	Neg
14	CDCA	17.04	391.28	391.28	10	Neg
15	DCA	17.28	391.28	391.28	10	Neg
16	DHCA(内标)	5.29	401.23	249.14	36	Neg

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 混合对照品母液及内标溶液

精密称取上述除DHCA外的15种对照品各适量,加甲醇超声(功率100 W,频率40 kHz,下同)溶解,制成质量浓度均为2 mg/mL的单一对照品母液。分别量取上述各单一对照品母液,用甲醇稀释,得到TCA、7-ODCA、



IS:DHCA;1:TCA;2:7-ODCA;3:12-DHCA;4:GCA;5:3-OCA;6:TCDCA;7:3 $\alpha$ -OH-7-OCA;8:HCA;9:TDCA-NA;10:HOCA;11:CA;12:GCDCA;13:GDCA;14:CDCA;15:DCA。

图1 同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的PRM图

12-DHCA、GCA、3-OCA、TCDCA、3 $\alpha$ -OH-7-OCA、HCA、TDCA-NA、HOCA、CA、GCDCA、GDCA、CDCA、DCA的质量浓度分别为3 997.66、206.44、350.86、2 074.28、92.53、223.69、1 709.53、4 257.16、960.72、1 685.76、5 052.81、96.43、545.48、253.55、465.09 ng/mL的混合对照品母液。

精密称取DHCA对照品适量，用甲醇溶解，制成质量浓度为10  $\mu$ g/mL的内标母液；再取内标母液适量，用甲醇稀释，得到质量浓度为20 ng/mL的内标溶液。

2.2.2 供试品溶液

取同仁牛黄清心丸适量，剪碎，加入等质量硅藻土，研磨成粉末，过20目筛。精密称取该粉末0.10 g，置于容量瓶中，加入10 mL甲醇充分摇匀，称重，超声提取30 min后，再次称重，加甲醇补足失重，以10 000 r/min离心

10 min，经0.22  $\mu$ m微孔滤膜滤过，取续滤液，置于1 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得到供试品溶液。取供试品溶液适量，按1:1(V/V)加入内标溶液后进样分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系及定量限、检测限考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品母液适量，用甲醇逐级稀释后，按1:1(V/V)加入内标溶液制成系列质量浓度的混合对照品溶液，按“2.1”项下分析条件进样测定，并以各对照品的质量浓度为横坐标(X)、对照品与内标的质量浓度之比为纵坐标(Y)进行线性回归；再分别以信噪比(S/N)=3计算检测限(limit of detection, LOD)，以S/N=10计算定量限(limit of quantitation, LOQ)，结果见表2。

表2 TCA等15个待测成分的线性关系及定量限、检测限考察结果

序号	待测成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(ng/mL)	LOD/(ng/mL)	LOQ/(ng/mL)
1	TCA	Y=0.318 5X+14.850 0	0.999 9	20.60~3 997.66	0.17	0.51
2	7-ODCA	Y=0.106 2X+0.089 1	0.999 3	4.68~206.44	0.72	2.16
3	12-DHCA	Y=0.027 6X+0.081 8	0.998 9	13.31~350.86	3.33	10.00
4	GCA	Y=0.583 2X+11.827 0	0.999 9	50.50~2 074.28	0.17	0.50
5	3-OCA	Y=0.165 4X+0.112 6	0.999 6	1.85~92.53	0.36	1.07
6	TCDCa	Y=0.503 8X+0.597 6	0.999 9	5.38~223.69	0.17	0.51
7	3 $\alpha$ -OH-7-OCA	Y=0.012 7X+0.307 1	0.999 4	53.76~1 709.53	2.41	7.23
8	HCA	Y=0.002 0X+0.096 5	0.999 4	151.35~4 257.16	3.00	9.01
9	TDCA-NA	Y=0.589 4X+0.212 1	0.999 5	23.62~960.72	0.67	2.01
10	HOCA	Y=2.902 1X+76.206 0	0.999 7	11.15~1 685.76	1.03	3.08
11	CA	Y=0.083 6X+5.703 5	0.999 7	33.85~5 052.81	1.06	3.17
12	GCDCa	Y=0.845 4X+0.832 6	0.999 8	1.75~96.43	0.17	0.52
13	GDCA	Y=0.778 6X+5.599 5	0.999 8	17.47~545.48	0.07	0.20
14	CDCA	Y=1.106 1X+7.043 7	0.999 7	10.67~253.55	0.17	0.52
15	DCA	Y=2.206 5X+13.832 0	0.999 6	13.85~465.09	0.07	0.21

2.3.2 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品母液适量,加甲醇分别稀释2、30、60倍,配制成高、中、低质量浓度的对照品溶液,按“2.1”项下分析条件在同一天连续进样6次,测定日内精密度;连续测定3 d,测定日间精密度。结果显示,日内精密度的RSD为1.59%~4.74%(n均为6),日间精密度的RSD为0.29%~5.49%(n均为3),表明仪器精密度较好。

2.3.3 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号S1),分别于制备后0、2、4、6、8、12、24、48 h按“2.1”项下分析条件进样测定,记录峰面积。结果显示,TCA等15个待测成分峰面积的RSD为1.15%~3.21%(n均为8),表明供试品溶液在48 h内稳定性较好。

2.3.4 重复性试验

取同一批同仁牛黄清心丸(编号S1),按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下分析条件进样测定,记录峰面积并以内标法计算15个胆汁酸成分的含量。结果显示,TCA、7-ODCA、12-DHCA、GCA、3-

OCA、TCDCa、3 $\alpha$ -OH-7-OCA、HCA、TDCA-NA、HOCA、CA、GCDCa、GDCA、CDCA、DCA的平均含量分别为356.12、21.78、3.82、144.01、1.83、13.62、41.80、494.18、56.24、151.08、517.84、10.79、39.68、29.50、47.89  $\mu$ g/g,RSD为0.77%~2.94%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(编号S1)0.05 g,共9份,分成3组,分别精密加入低、中、高水平(相当于样品含量的50%、100%、150%)的混合对照品母液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下分析条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,TCA、7-ODCA、12-DHCA、GCA、3-OCA、TCDCa、3 $\alpha$ -OH-7-OCA、HCA、TDCA-NA、HOCA、CA、GCDCa、GDCA、CDCA、DCA的平均加样回收率分别为97.1%~100.1%、102.0%~103.1%、99.1%~104.1%、93.8%~103.0%、96.1%~99.0%、98.2%~103.4%、95.1%~100.3%、98.5%~103.0%、97.7%~105.7%、96.8%~103.2%、97.4%~99.3%、96.7%~101.5%、95.1%~100.5%、97.7%~100.2%、94.6%~103.4%,RSD为0.5%~5.8%(n均为9),表明本方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

分别精密称取15批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下分析条件进样测定,记录峰面积并按内标法计算样品中15个胆汁酸成分的含量,每批样品平行测定3次,结果见表3。

2.5 不同批次同仁牛黄清心丸的化学模式识别分析

为考察同一厂家不同批次同仁牛黄清心丸间的质量差异性,笔者采用SPSS 24.0软件,以本法测定的15个胆汁酸成分的含量为变量,以平方欧氏距离为测度,对15批同仁牛黄清心丸进行聚类分析,结果见图2。由图2可知,当平方欧氏距离为5时,15批同仁牛黄清心丸可聚为2类,其中S1~S12聚为一类,S13~S15聚为一类,说明该厂家生产的同仁牛黄清心丸在质量上存在差异。

表3 不同批次同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的含量测定结果(n=3,  $\mu$ g/g)

待测成分	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	平均值
TCA	356.12	320.12	340.95	384.09	649.22	553.50	414.49	681.35	739.08	466.12	650.65	366.84	1 502.46	1 221.32	1 412.12	670.56
7-ODCA	21.78	9.07	25.36	30.31	17.12	14.00	28.61	18.38	18.42	12.09	16.31	27.93	39.63	62.55	48.03	25.97
12-DHCA	3.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.87	16.43	13.05	10.54
GCA	144.01	128.97	181.69	210.08	241.92	203.24	221.77	149.56	290.46	217.68	240.21	199.61	547.58	642.59	582.47	280.12
3-OCA	1.83	1.74	2.46	2.88	2.29	2.40	5.86	1.98	1.56	1.49	2.50	3.75	12.47	9.18	8.17	4.04
TCDCa	13.62	15.92	20.51	23.00	27.68	23.85	24.72	27.54	33.87	22.28	28.57	22.86	60.84	47.11	54.74	29.81
3 $\alpha$ -OH-7-OCA	41.80	110.14	52.44	63.24	240.30	194.71	71.63	265.32	248.63	196.40	229.22	57.04	566.66	173.80	233.40	182.98
HCA	494.18	343.60	563.15	700.65	703.55	588.13	817.49	590.77	836.09	659.28	676.95	627.99	1 652.14	1 463.60	1 485.66	813.55
TDCA-NA	56.24	55.27	71.83	82.15	107.46	89.31	84.46	116.07	125.59	87.12	107.43	78.32	253.77	251.80	247.43	120.95
HOCA	151.08	79.07	163.41	198.01	163.52	139.84	206.53	171.03	188.04	153.50	158.24	177.61	372.20	495.45	487.11	220.31
CA	517.84	337.28	618.04	755.32	620.20	514.68	780.00	574.33	690.91	683.90	581.09	658.96	1 351.70	1 594.39	1 681.96	797.37
GCDCa	10.79	8.40	13.00	14.56	17.25	14.37	15.50	5.38	19.77	15.88	17.21	14.58	41.00	31.17	36.72	18.37
GDCA	39.68	28.49	46.45	51.48	60.10	51.03	54.32	25.21	68.39	58.51	60.07	51.31	144.96	142.89	145.96	68.59
CDCA	29.50	9.93	28.83	38.03	21.86	18.05	46.30	12.76	24.23	20.77	21.06	31.48	54.95	30.42	63.82	30.13
DCA	47.89	20.03	54.82	61.99	43.04	36.20	53.77	56.48	47.64	33.96	41.77	62.09	101.36	165.66	70.54	59.82
总计	1 930.18	1 468.03	2 182.94	2 615.79	2 915.51	2 443.31	2 825.45	2 696.16	3 332.68	2 628.98	2 831.28	2 380.37	6 710.59	6 348.36	6 571.18	

-:未检出。

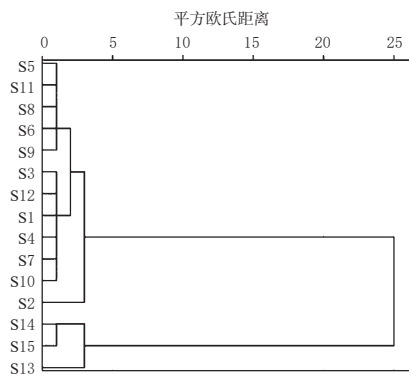


图2 15批同仁牛黄清心丸的层次聚类图

笔者又将15批同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的含量作为变量,采用主成分分析的方法进行分析。结果显示,提取出的前2个主成分累计方差贡献率达91.740%,表明该模型可以解释原有变量91.74%的信息;其中主成分1的方差贡献率为83.072%,主成分2的方差贡献率为8.668%。此外,由主成分分析的得分图(图3)可知,15批同仁牛黄清心丸可被分为2类,其中S13~S15为一类,其他批次为另一类,与聚类分析结果一致。

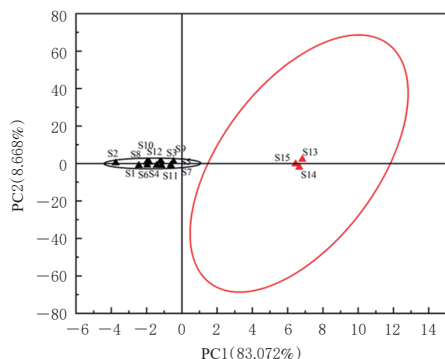


图3 15批同仁牛黄清心丸的主成分得分图

### 3 讨论

#### 3.1 检测条件的选择

胆汁酸是一类具有类固醇结构的有机酸,由一个甾环和一个脂肪侧链共同构成,缺少共轭体系。有研究联用液相色谱仪与蒸发光散射检测器检测胆汁类动物药中的胆汁酸成分,结果表明,含量较低的胆汁酸成分检测结果不佳<sup>[9]</sup>。胆汁酸种类较多且化学结构相似,部分胆汁酸还是同分异构体,检测不易。因此本研究使用高灵敏和高选择性的UPLC-MS/MS技术,采用Hypersil GOLD C<sub>18</sub>色谱柱,选用Neg进行多反应监测,并以DHCA为内标,以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相,所得图谱峰形对称、基线平稳、分离度好。

#### 3.2 测定结果分析

本研究采用建立的UPLC-MS/MS法对15批同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的含量进行测定,发现总含量最高的是S13批次,最低的是S2批次;15个胆汁酸成分中平均含量最高的是HCA,最低的是3-OCA。不同批次同仁牛黄清心丸中胆汁酸成分的含量存在差异,推测

其原因可能是牛黄药材各批次间质量不稳定,也可能是制剂过程中,由于环境、机器性能等不同因素,导致物料混合不均匀或成分降解,使得不同批次产品中各成分含量存在差异。因此,药品生产厂家在生产过程中应不仅重视原料的质量控制,还要严格把控制剂的生产工艺,确保产品质量的均一性。

结合聚类分析结果可知,15批同仁牛黄清心丸可分为2类,其中S1~S12为一类,S13~S15为另一类,说明不同批次的同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的含量存在一定的差异。主成分分析将胆汁酸成分中的多个变量通过线性转换选出2个主成分进行分析评价,所得结果与聚类分析结果相似,说明两种分析方法均能较好地反映出不同批次同仁牛黄清心丸品质间的差异性。由此得出,不同批次同仁牛黄清心丸中胆汁酸含量存在一定的差异,今后可进一步探究其谱效关系,为该药的质量控制和药效评价标准提供规律性的科学依据。

综上所述,本研究建立了同时测定同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分含量的UPLC-MS/MS法,并采用该方法测定了15批样品的含量,且化学模式识别分析可反映出不同批次同仁牛黄清心丸品质间的差异性。该方法准确、灵敏度高、专属性强,且测定胆汁酸种类较多,能快速实现对同仁牛黄清心丸中15个胆汁酸成分的定量分析,适用于该药的质量控制。

#### 参考文献

- [1] 赵一帆. 独树一帜的同仁牛黄清心丸[J]. 首都医药, 2014, 21(15): 37-38.
- [2] 李喜平, 张程亮, 刘东. 牛黄的现代研究(四): 药理作用[J]. 医药导报, 2017, 36(4): 355-360.
- [3] 蒋受军, 王成芳, 刘子沐, 等. 气相色谱法测定同仁牛黄清心丸中麝香酮的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9): 64-65.
- [4] 柳温曦. 中药牛黄及其代用品的真伪鉴别及牛黄药材及成药的质量控制方法研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2019.
- [5] 霍金海, 孙国东, 魏文峰, 等. UPLC-Q-TOF/MS法分析牛黄清感胶囊成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2340-2348.
- [6] 胡晓茹, 刘晶晶, 戴忠, 等. 含牛黄中成药的质量控制现状[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(17): 1374-1379.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.

(收稿日期: 2023-02-17 修回日期: 2023-08-16)

(编辑: 胡晓霖)