中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)13－0089－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.13.018

高效液相色谱－蒸发光散射检测器法快速测定转化熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸含量*

何焯斌[1]，黄　琦[2]，王　枫[3]，吴齐龙[3]，梅全喜[4]，钱正明[1△]

（1. 东莞市东阳光冬虫夏草研发有限公司，广东 东莞　523850；2. 林芝东阳光药业研发有限公司，西藏 林芝　860001；3. 重庆极泽生物科技有限公司，重庆　400799；4. 广东省深圳市宝安区中医院，广东 深圳　518000）

摘要：目的　建立快速测定转化熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）和牛磺鹅去氧胆酸（TCDCA）含量的高效液相色谱－蒸发光散射器检测法。**方法**　采用涡旋提取法制备样品。色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB－C_{18} 柱（30 mm×4.6 mm，2.7 μm），流动相为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液－乙腈（梯度洗脱），流速为 1.0 mL/min，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL，蒸发器温度为 120 ℃，雾化器温度为 60 ℃，气体流速为 1.60 L/min。**结果**　该方法可在 6 min 内完成样品的提取和分析。TUDCA 和 TCDCA 的质量浓度分别在 52.71～527.10 μg/mL、49.80～497.97 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好（$r \geq 0.999\ 8$）；检测限分别为 7.91，3.73 μg/mL，定量限分别为 15.81，7.47 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2.0%；平均加样回收率分别为 97.31% 和 101.34%，*RSD* 分别为 1.64% 和 1.20%（$n=6$）。10 批样品中 TUDCA 和 TCDCA 的平均含量分别为 36.07% 和 21.76%。**结论**　该方法操作简便、快速灵敏、重复性好、专属性强、结果准确，可快速、高效地测定转化熊胆粉中 TUDCA 和 TCDCA 的含量。

关键词：高效液相色谱－蒸发光散射检测器法；转化熊胆粉；牛磺熊去氧胆酸；牛磺鹅去氧胆酸；含量测定

Rapid Determination of Taurochenodeoxycholic Acid and Taurochenodeoxycholic Acid in Transformed Bear Bile Powder by HPLC－ELSD

HE Zhuobin[1], HUANG Qi[2], WANG Feng[3], WU Qilong[3], MEI Quanxi[4], QIAN Zhengming[1]

(1. Dongguan HEC Cordyceps R & D Co., Ltd., Dongguan, Guangdong, China 523850; 2. Linzhi HEC PHARM R&D CO., Ltd., Linzhi, Xizang, China 860001; 3. Chongqing Kinbear Biotechnology Co., Ltd., Chongqing, China 400799; 4. Shenzhen Baoan Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518000)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC)－evaporative light scattering detector (ELSD) method for rapid determination of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) and taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) in transformed bear bile powder. **Methods**　The sample was prepared by the vortex extraction method. The chromatographic column was Agilent Poroshell 120 SB－C_{18} column (30 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution－acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 ℃, the injection volume was 5 μL, the temperature of evaporator was 120 ℃, the temperature of atomizer was 60 ℃, and the flow rate of gas was 1.60 L/min. **Results**　This method could complete sample extraction and analysis within 6 min. The linear ranges of TUDCA and TCDCA were 52.71－527.10 μg/mL and 49.80－497.97 μg/mL ($r \geq 0.999\ 8$), respectively. The limits of detection were 7.91 μg/mL and 3.73 μg/mL, respectively. The limits of quantification were 15.81 μg/mL and 7.47 μg/mL, respectively. The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recoveries of TUDCA and

*基金项目：广东省药品监督管理局科技创新项目［2021ZDB05］。

第一作者：何焯斌，男，大学本科，助理工程师，研究方向为中药质量评价，（电子信箱）hezhuobin@hec.cn。

△通信作者：钱正明，男，博士，主任中药师，研究方向为中药质量评价，（电子信箱）qianzhengming1982@126.com。

药学刊，2022，40(7)：130－134.

[14] 郑瑞凤. 火焰原子吸收光谱法测钙镁时铝的干扰及消除[J]. 佳木斯大学学报(自然科学版)，2020，38(2)：114－117.

[15] 陈　亮，李　沁，张　聪，等. 火焰原子吸收光谱法测定小儿感冒颗粒中钙含量研究[J]. 海峡药学，2024，36(2)：36－39.

[16] 韩天鹅，朱佑敏，陆珊珊. 荧光分析法在药物分析中的应用研究[J]. 华东科技(综合)，2020(5)：1.

[17] 徐　婷. 原子吸收分光光度法测定水中钙和镁的方法验证[J]. 山西水利科技，2024(1)：36－39.

[18] 邵江娟，李　璇，翁婧丹，等. 矿物药的理化鉴别与含量测定实验教学改进设计[J]. 大学化学，2024，39(10)：137－142.

[19] 袁仕君，马　青，陈科力，等. 常见矿物类中药粉末的微性状鉴别[J]. 中草药，2021，52(5)：1454－1461.

[20] 赵正浩，夏维依. 化石类安神药物古今认识与应用[J]. 亚太传统医药，2024，20(11)：188－192.

[21] 郭海燕，蒋　杰，严铸云. 矿物药龙骨的药用进展与资源现状[J]. 中药与临床，2024，15(6)：80－84.

（收稿日期：2024－10－31；修回日期：2025－02－16）

TCDCA were 97.31% and 101.34%, with *RSD*s of 1.64% and 1.20% (n = 6), respectively. The average contents of TUDCA and TCDCA in 10 batches of samples were 36.07% and 21.76%, respectively. **Conclusion** This method is simple, fast and sensitive, with good repeatability, strong specificity, and accurate results, which can quickly and efficiently determine the content of TUDCA and TCDCA in transformed bear bile powder.

Key words: HPLC - ELSD; transformed bear bile powder; tauroursodeoxycholic acid; taurochenodeoxycholic acid; content determination

熊胆粉是我国传统的名贵中药材，具有悠久的入药历史和丰富的生物活性[1]。胆汁酸类成分是熊胆粉的主要活性成分，具有利胆保肝、溶解胆固醇结石、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、调节免疫等作用[2-5]。熊胆的野生资源极稀缺，目前市售熊胆粉主要由人工引流活熊胆汁经干燥处理所得[6-7]，该技术虽实现了熊胆粉的规模化生产，但市场需求持续增长，价格不断上涨，催生了大量假冒伪劣产品，导致熊胆粉市场混乱，严重影响了其临床疗效，并阻碍了中医药的可持续发展[7]。此外，该技术会对熊的身心健康造成极大伤害，受到了国内外动物保护组织的抵制。因此，亟须研发现代化的人工熊胆粉生产工艺，以保证熊胆粉产业的健康、持续发展。转化熊胆粉是以家鸡的胆汁为原料，通过模拟熊体内胆汁酸生成环境，经生物转化、干燥等工艺加工而成，其主要成分为牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）和牛磺鹅去氧胆酸（TCDCA），与熊胆粉的主要成分十分接近[1,8]。转化熊胆粉的产业化成功，有利于保护熊资源和缓解熊胆粉市场需求的压力。转化熊胆粉作为熊胆粉的替代品之一，具有广阔的发展前景，但前期报道多集中于野生熊胆粉和人工引流熊胆粉的化学成分研究，转化熊胆粉化学成分的研究鲜少。目前，多采用高效液相色谱（HPLC）法测定熊胆及其产品中主要胆汁酸的含量，但多数方法的整体分析时间较长（约30～140 min）[9-14]，不利于熊胆粉的产业化高效检测。核壳色谱柱具有高柱效、低背压的优点，已应用于吴茱萸[15]、葛根[16]、草豆蔻[17]、莳蓣[18]等多种中药材的快速液相分析。本研究中建立了快速测定转化熊胆粉中2种结合型胆汁酸含量的HPLC-蒸发光散射检测器（HPLC-ELSD）法，为转化熊胆粉的质量评价和产业化高效检测提供了技术支持。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司），配有Agilent 1260 Ⅱ型ELSD；XPE205DR型电子分析天平（精度为十万分之一），XPE26型电子分析天平（精度为百万分之一），均购自瑞士Mettler Toledo公司；Milli-Q型超纯水系统（德国Merck Millipore公司）；Vortex3型旋涡混匀器（德国IKA公司）。

1.2 试药

TUDCA对照品（中国食品药品检定研究院，批号为110815-201911，纯度为92.8%）；TCDCA钠对照品（重庆极泽生物科技有限公司，批号为9713-2，纯度为93.8%）；无水甲醇（批号为2109271），乙酸铵（批号为1803022），均为分析纯，购自西陇科学股份有限公司；乙腈（色谱纯，湖北弗顿科学技术有限公司，批号为DW26E121201）；10批（编号为S1-S10）转化熊胆粉样品均由重庆极泽生物科技有限公司提供，经东莞市东阳光冬虫夏草研发有限公司钱正明主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Poroshell 120 SB-C_{18}柱（30 mm × 4.6 mm，2.7 μm）；流动相：5 mmol/L乙酸铵水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～3 min时23%B → 30%B，3～4 min时30%B → 80%B，4～5 min时80%B）；流速：1.0 mL/min；柱温：40 ℃；进样量：5 μL；检测器：ELSD；载气：氮气；增益值：1；蒸发器温度：120 ℃；雾化器温度：60 ℃；气体流速：1.60 L/min。

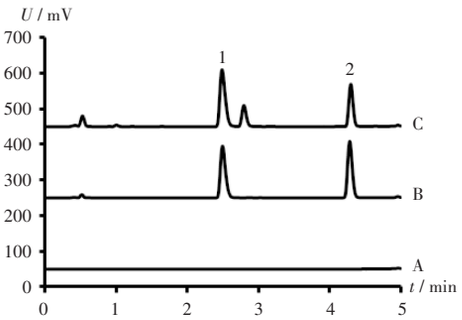
2.2 溶液制备

分别取TUDCA和TCDCA钠对照品各适量，精密称定，分别置10 mL容量瓶中，加无水甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为1.58，1.49 mg/mL的单一对照品贮备液。分别用移液管精密量取上述单一对照品贮备液各1 mL，混匀，即得混合对照品溶液。取转化熊胆粉样品约20 mg，精密称定，置50 mL离心管中，精密加入20 mL无水甲醇，密塞，涡旋提取30 s，取适量溶液，经0.22 μm有机系滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：取空白溶液（无水甲醇）和2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中，在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现，且空白溶液在TUDCA和TCDCA的出峰位置附近均无干扰，相邻色谱峰间的分离度大于1.5，表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察：取2.2项下混合对照品溶液适量，加无水甲醇稀释成系列梯度质量浓度，按2.1项下色谱条件进样测定，以TUDCA和TCDCA质量浓度的对数值（X）为横坐标、峰面积的对数值（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程$Y_{熊}$ = 1.453 1 $X_{熊}$ + 3.582 6（r =



1. 牛磺熊去氧胆酸　2. 牛磺鹅去氧胆酸

A. 空白溶液　B. 混合对照品溶液　C. 供试品溶液

图1　高效液相色谱图

1. TUDCA　2. TCDCA

A. Blank solution　B. Mixed reference solution　C. Test solution

Fig. 1　HPLC chromatograms

0.999 8)和 $Y_{鹅}$ = 1.339 5 $X_{鹅}$ + 3.695 2(r = 0.999 9)。结果表明，TUDCA和TCDCA的质量浓度分别在52.71~527.10 μg/mL、49.80~497.97 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定：取线性关系考察项下系列梯度质量浓度的混合对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比(S/N)约为3时的质量浓度为检测限，S/N约为10时的质量浓度为定量限。结果TUDCA和TCDCA的检测限分别为7.91，3.73 μg/mL，定量限分别为15.81，7.47 μg/mL。

精密度试验：精密量取2.2项下混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件于同1 d内重复进样测定6次，或连续3 d、每天重复进样测定2次，记录峰面积。结果TUDCA和TCDCA日内精密度试验结果的*RSD*分别为0.67%，1.21%(n = 6)，日间精密度试验结果的*RSD*分别为1.56%，1.79%(n = 6)，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批转化熊胆粉样品(编号为S1)适量，精密称定，平行6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果TUDCA和TCDCA含量的*RSD*分别为1.60%，1.99%(n = 6)，表明方法重复性良好。

稳定性试验：取转化熊胆粉样品(编号为S1)适量，精密称定，按2.2项下方法制备供试品溶液，分别于制备后0，4，8，12 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果TUDCA和TCDCA含量的*RSD*分别为0.45%，1.10%(n = 4)，表明供试品溶液放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验：取已知含量的转化熊胆粉样品(编号为S1)5 mg，精密称定，平行6份，按100%比例分别加TUDCA和TCDCA钠对照品，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表1，表明方法准确度良好。

2.4　样品含量测定

取10批(编号为S1－S10)转化熊胆粉样品各适量，精密称定，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算样品中2种结合型胆汁酸的含量。结果转化熊胆粉中TUDCA和TCDCA的平均含量分别为36.07%和21.76%，且样品中TUDCA的含量均大于28.0%，TCDCA的含量均大于18.0%，均符合《中华人民共和国卫生部药品标准：新药转正标准(第十一册)》[WS_3－09(B－09)－96(Z)][19]及云南省[20]、四川省[21]地方中药材标准要求。进一步分析显示，10批转化熊胆粉样品中，不同批次TUDCA含量的*RSD*为3.23%，TCDCA含量的*RSD*为3.27%，表明不同批次的转化熊胆粉稳定性良好，这种稳定性可能得益于其制备工艺的稳定性[8]。详见表2。

3　讨论

3.1　色谱条件优化

前期试验中考察了2种常用流动相(0.1%甲酸水溶液－乙腈、5 mmol/L乙酸铵水溶液－乙腈)的分离效果[8,22]，结果显示，后者能更有效地改善色谱峰拖尾现象和提高分离度；同时分别考察了2种色谱柱(Agilent Poroshell 120 EC－C_{18}柱、Agilent Poroshell 120 SB－

表1　加样回收试验结果(n = 6)

Tab. 1　Results of the recovery test (n = 6)

取样量	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\overline{X}$(%)		*RSD*(%)	
(mg)	TUDCA	TCDCA	TUDCA	TCDCA	TUDCA	TCDCA	TUDCA	TCDCA	TUDCA	TCDCA	TUDCA	TCDCA
5.225	1.762	1.221	1.631	1.079	3.358	2.330	97.85	102.78				
5.260	1.774	1.230	1.631	1.079	3.397	2.301	99.51	99.26				
5.263	1.775	1.230	1.631	1.079	3.328	2.329	95.22	101.85	97.31	101.34	1.64	1.20
5.261	1.774	1.230	1.631	1.079	3.380	2.330	98.47	101.95				
5.263	1.775	1.230	1.631	1.079	3.354	2.325	96.81	101.48				
5.256	1.773	1.229	1.631	1.079	3.339	2.316	96.01	100.74				

注：TUDCA为牛磺熊去氧胆酸，TCDCA为牛磺鹅去氧胆酸。表2同。

Note: TUDCA refers to tauroursodeoxycholic acid, and TCDCA refers to taurochenodeoxycholic acid (for Tab. 1 - 2).

表2 转化熊胆粉中2种结合型胆汁酸含量测定结果($\bar{X} \pm s$,%)

Tab. 2 Results of the content determination of two binding bile acids in transformed bear bile powder ($\bar{X} \pm s$,%)

样品编号	TUDCA	TCDCA
S1	33.76 ± 0.31	22.71 ± 0.74
S2	36.45 ± 0.50	22.57 ± 0.86
S3	35.18 ± 0.15	21.23 ± 0.72
S4	36.92 ± 0.55	21.54 ± 0.09
S5	36.81 ± 0.04	22.22 ± 0.25
S6	35.56 ± 0.15	21.88 ± 0.77
S7	35.76 ± 0.06	21.28 ± 0.07
S8	38.14 ± 0.83	22.34 ± 0.61
S9	36.03 ± 0.33	21.42 ± 0.16
S10	36.07 ± 0.07	20.43 ± 0.48

C_{18}柱)的分离效果,结果显示,使用后者TUDCA色谱峰的分离度更好。因此,最终选择5 mmol / L乙酸铵水溶液-乙腈作为流动相,并使用Agilent Poroshell 120 SB-C_{18}柱进行后续分析。还比较了紫外检测器和ELSD的分析效果,结果显示,2种结合型胆汁酸在ELSD上的响应值明显优于在紫外检测器上;随后进一步考察了ELSD中不同蒸发器温度(40,60,80,100,110,120 ℃)和雾化器温度(40,60,80 ℃)的影响,结果显示,蒸发器温度为120 ℃、雾化器温度为60 ℃时2种结合型胆汁酸的响应值最高。故最终确定2.1项下色谱条件,且方法学考察均符合《中国药典》的相关要求。

3.2 分析时间比较

以往研究中多采用超声提取及全多孔C_{18}柱结合HPLC法测定熊胆粉及其产品中TUDCA和TCDCA的含量,但多数方法的整体分析时间较长(30~140 min)[9-14]。本研究中建立的方法在6 min内(含提取30 s和分析5 min)即可完成转化熊胆粉中2种结合型胆汁酸的提取和含量测定,有效缩短了提取和分析的时间,极大地提高了检测效率。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、快速灵敏、重复性好、专属性高、结果准确,可快速、高效地测定转化熊胆粉中2种结合型胆汁酸的含量,为转化熊胆粉产业化检测提供了更高效的手段,有助于提升转化熊胆粉的质量控制水平,也为其他含胆汁酸类成分的药材及其产品的质量评价提供了参考。

参考文献

[1] 李新月,苏芳芳,蒋 超,等. 中药熊胆资源发展历程与展望[J]. 中国中药杂志,2022,47(16):4284-4291.
[2] 梅全喜,林 慧,孔祥廉. 单味中药防治脂肪肝作用的研究进展[J]. 中国药业,2006,15(18):1-3.
[3] 张 培,陈晓双,李 静,等.《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》推荐的中药注射剂应用解析[J]. 中国药业,2020,29(10):12-15.
[4] 陈星玲,宿树兰,刘 睿,等. 胆汁类动物药中胆汁酸化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(19):4898-4906.
[5] 李新月,苏芳芳,蒋 超,等. 中药熊胆功效演进及成分研究概述[J]. 中国中药杂志,2022,47(18):4846-4853.
[6] 林国华,杜 犀,吴 朝,等. 熊胆粉保肝抗癌作用机制研究进展[J]. 临床医学研究与实践,2020,5(18):196-198.
[7] 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.
[8] 张怡欣. 生物转化熊胆粉品质评价及质量标准提升[D]. 上海:上海中医药大学,2020.
[9] 殷金可,许 文,刘 珂,等. HPLC-ELSD法同时测定熊胆粉中4个胆汁酸成分含量[J]. 福建中医药,2023,54(3):27-30.
[10] YUAN MH, ZHOU T, LEI KL, et al. Identification of the Authenticity and Geographical Origin of Bear Bile Powder by Using High Performance Liquid Chromatography - Charged Aerosol Detector Fingerprints Combined with Chemometrics[J]. Chemistry & Biodiversity, 2023, 20(3): e202201109.
[11] 李晓琼,刘岩庭,叶财发,等. 一测多评法测定熊胆粉中多种结合型胆酸的含量[J]. 海峡药学,2016,28(3):60-63.
[12] WANG N, FENG YB, XIE TN, et al. Chemical and biological analysis of active free and conjugated bile acids in animal bile using HPLC-ELSD and MTT methods[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2011, 2(1): 125-130.
[13] XIONG J, ZHENG T, SHI Y, et al. Analysis of the fingerprint profile of bioactive constituents of traditional Chinese medicinal materials derived from animal bile using the HPLC-ELSD and chemometric methods: An application of a reference scaleplate[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 174: 50-56.
[14] 石 岩,魏 锋,林瑞超,等. 熊胆粉中主要胆汁酸类成分的测定及分析[J]. 中国药学杂志,2016,51(22):1958-1961.
[15] 陈 路,冯世鑫,蒋 妮,等. 不同炮制方法对吴茱萸生物碱类有效成分含量的影响[J]. 中国药业,2021,30(17):57-60.
[16] 林可盛,胡星园,杨学慧,等. 基于核壳色谱技术的葛根快速液相分析[J]. 今日药学,2022,32(6):412-417.
[17] 谭国英,黄 琦,沈千汇,等. 草豆蔻高效液相色谱指纹图谱快速分析法研究[J]. 今日药学,2022,32(6):409-411.
[18] 李英哲,李佳东,黄梦龙,等. 薪蒾配方颗粒特征图谱及含量测定研究[J]. 中国药业,2023,32(6):60-66.
[19] WS_3-09(B-09)-96(Z),中华人民共和国卫生部药品标准 新药转正标准(第十一册)[S].
[20] 云YPBZ-0205-2014,云南省食品药品监督管理局 中药标准[S].
[21] SCYCBZ2021-001,四川省食品药品监督管理局 中药标准[S].
[22] 师秀琴,阚全程,徐 英. HPLC-MS/MS研究痰热清胶囊生产过程中熊胆粉化学成分的变化[J]. 中国药学杂志,2017,52(22):2023-2034.

(收稿日期:2024-07-31;修回日期:2025-03-01)