不同厂家八宝惊风散中人工牛黄胆汁酸类活性成分的含量测定及差异分析Δ

钟　琪[1*]，陈伟康[2]，周国平[2]，刘艳梅[2]，刘德鸿[2#]，李　晶[3]（1.赣州市人民医院药剂科，江西 赣州　341000；2.江西省药品检验检测研究院/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心，南昌　330029；3.江西省中医药研究院，南昌　330029）

中图分类号　R927.2　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）20-2502-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.20.10

摘　要　目的　建立同时测定八宝惊风散中人工牛黄有效成分（胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠）含量的方法，比较不同厂家样品中3个成分的含量差异。**方法**　采用超高效液相串联质谱法测定3个厂家9批八宝惊风散中胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的含量，色谱柱为Phenomenex Luna® C_{18}，流动相为乙腈-水（梯度洗脱），流速为0.5 mL/min，柱温为40 ℃，进样量为2 μL。质谱采用负离子单四极杆模式，胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的*m/z*分别为407.2、392.2、514.2。以3个成分的含量为指标，对9批样品进行聚类分析和主成分分析。**结果**　胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的线性范围分别为5.48～548.40、5.38～538.40、4.74～474.05 ng/mL（r≥0.999 3）；精密度、重复性、稳定性（24 h）的RSD均不高于3.7%（n=6），平均回收率分别为103.3%、103.3%、101.6%，RSD分别为3.3%、3.4%、4.2%（n=6）。9批样品中胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸钠的含量分别为0.702～1.711、0.599～2.049、0.664～1.752 mg/g。A厂家样品中3个成分的平均含量较高，批间差异最小；C厂家样品中3个成分的平均含量最低，批间差异较大。聚类分析基本可以区分不同厂家的样品；以主成分综合得分为指标进行聚类分析，结果与含量聚类分析结果基本一致。**结论**　成功建立了同时测定八宝惊风散中人工牛黄3个胆汁酸类有效成分含量的方法。各厂家样品中3个成分的含量存在较大差异。

关键词　八宝惊风散；胆酸；猪去氧胆酸；牛磺胆酸钠；人工牛黄；含量测定

Determination and difference analysis of bile acid active constituents of artificial bezoar in Babao jingfeng powder from different manufacturers

ZHONG Qi[1], CHEN Weikang[2], ZHOU Guoping[2], LIU Yanmei[2], LIU Dehong[2], LI Jing[3] (1. Dept. of Pharmacy, The People's Hospital of Ganzhou, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2. Jiangxi Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine/Jiangxi Provincial Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 3. Jiangxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the method for determination of bile acid active constituents (cholic acid, hyodeoxycholic acid and sodium taurocholate) in Babao jingfeng powder, and to compare the differences of 3 constituents in Babao jingfeng powder from different manufacturers. **METHODS** UPLC-MS method was adopted to determine the contents of cholic acid, hyodeoxycholic acid and sodium taurocholate in 9 batches of Babao jingfeng powder from 3 manufacturers. The separation was performed on a Phenomenex Luna® C_{18} column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was 40 ℃ and the sample size was 2 μL. MS system was operated in a negative ion single quadrupole mode, and the *m/z* of cholic acid, hyodeoxycholic acid and sodium taurocholate were 407.2, 392.2 and 514.2, respectively. With the contents of three components as the index, cluster analysis and principle component analysis were performed on 9 batches of samples. **RESULTS** The linear ranges of cholic acid, hyodeoxycholic acid and sodium taurocholate were 5.48-548.40, 5.38-538.40, 4.74-474.05 ng/mL, respectively (r≥0.999 3). RSDs of precision, repeatability and stability tests (24 h) were all lower than or equal to 3.7% (n=6), and the average recoveries were 103.3%, 103.3% and 101.6% with RSDs of 3.3%, 3.4%, 4.2% (n=6), respectively. The contents of cholic acid ranged 0.702-1.711 mg/g, those of deoxycholic

Δ **基金项目** 江西省中医药中青年骨干人才（第一批）培养计划项目（No.赣中医药科教字〔2020〕2号）

＊ **第一作者** 主管药师，硕士。研究方向：药物分析。E-mail：570661008@qq.com

通信作者 主管中药师，硕士。研究方向：中成药质量控制与评价。E-mail：479193106@qq.com

acid ranged 0.599-2.049 mg/g, and those of sodium taurocholate ranged 0.664-1.752 mg/g in 9 batches of samples. The average content of 3 components in samples from manufacturer A was high, and the difference between batches was the smallest; the average content of 3 components from manufacturer C was the lowest, and the difference between batches was large. Cluster analysis could basically distinguish samples from different manufacturers; cluster analysis was conducted by using the comprehensive score of principal components as an indicator, the results of which were basically consistent with those of cluster analysis for content. **CONCLUSIONS** The method is established successfully for the content determination of the 3 bile acid active constituents of artificial bezoar in Babao jingfeng powder. The contents of 3 components in Babao jingfeng powder from 3 manufacturers are significantly different.

KEYWORDS Babao jingfeng powder; cholic acid; hyodeoxycholic acid; sodium taurocholate; artificial bezoar; content determination

八宝惊风散质量标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第二十册，由天麻（制）、黄芩、人工牛黄等19味中药组成。该品种具有祛风化痰、退热镇惊之功效，可用于小儿惊风、发烧咳嗽、呕吐痰涎，因其临床疗效较好，被誉为“儿科圣药”。其中，人工牛黄在方中发挥清热解毒、退热、化痰定惊的重要作用。但八宝惊风散现行质量标准中仅有显微鉴别、黄酮类化合物化学鉴别、丁香薄层鉴别项，无含量测定项；经查阅文献，虽有一些关于方中药味的质量研究报道，却均未探讨人工牛黄的质量控制标准。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，可用于痰热谵狂、神昏不语、小儿急惊风等病症的治疗[1]。胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸为人工牛黄中的主要活性成分[2]，具有非常好的抗菌[3]、抗病毒[4]作用，尤其对β-内酰胺酶耐药菌株感染亦有较好的疗效[5]，因此也是小儿氨酚黄那敏颗粒、小儿化毒胶囊、氨金黄敏颗粒、复方小儿退热栓等小儿常用退热药品的重要组成成分。中国传统医学中的小儿惊风发热与现代医学中的细菌、病毒感染等密切相关。基于人工牛黄在抗菌、抗炎、抗病毒及退热方面所起的重要作用，以及八宝惊风散现有质量控制方法中对人工牛黄质量控制的缺失，同时考虑到人工牛黄价格较高，市场上掺伪现象常见等诸多因素，对八宝惊风散中人工牛黄的3个活性胆汁酸类成分开展质量评价工作具有重要意义。

本研究拟采用超高效液相串联质谱法，建立八宝惊风散中胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的含量测定方法，并对3个厂家的9批样品进行差异分析，旨在为提高八宝惊风散中人工牛黄的质量控制标准及临床疗效提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1290型超高效液相色谱仪（美国Agilent公司）、API型4000三重串联四极杆质谱仪（美国AB Sciex公司）、ML204T型万分之一天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]、BT 25 S型十万分之一天平[赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

9批八宝惊风散均为市售品，分别来自属地为广东、江西的A、B、C 3个厂家，样品编号分别为A1～A3、B1～B3、C1～C3；制备阴性样品所用饮片均购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司。胆酸对照品（批号100078-201415，纯度98.9%）、猪去氧胆酸对照品（批号100087-201411，纯度99.7%）、牛磺胆酸钠对照品（批号110815-201911，纯度87.3%）均购自中国食品药品检定研究院；乙腈为色谱级，购自美国Sigma-Aldrich公司；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

以Phenomenex Luna® C_{18}（150 mm×2 mm，3 μm）为色谱柱；以乙腈为流动相A、水为流动相B，进行梯度洗脱（0～4 min，5%A→40%A；4～7 min，40%A→70%A；7～10 min，70%A；10～10.1 min，70%A→5%A；10.1～14 min，5%A）；流速：0.5 mL/min；柱温：40 ℃；进样量：2 μL。

采用电喷雾离子源，喷雾气压力为60 psi，干燥气压力为50 psi，气帘气压力为25 psi；离子源温度为550 ℃；喷雾电压为－4 500 V；负离子单四极杆模式；胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的m/z分别为407.2、392.2、514.2。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

取胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠对照品各适量，精密称定，置棕色量瓶中，加甲醇分别制成质量浓度为109.68、107.68、94.81 μg/mL的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液0.2 mL，置同一100 mL棕色容量瓶中，加甲醇定容，即得质量浓度分别为219.36、215.36、189.62 ng/mL的混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液

取八宝惊风散0.1 g，精密称定，置具塞棕色锥形瓶中，精密加入甲醇50 mL，称定质量，超声（功率500 W，频率40 kHz）处理30 min，放冷，再称定质量，加甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过。精密量取续滤液5 mL，置100 mL棕色容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，用0.22 μm的微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3　阴性样品溶液

按八宝惊风散的处方及工艺制备缺人工牛黄和胆南星的阴性样品（因胆南星为天南星用胆汁炮制而成，其中含少量的胆汁酸类成分），按“2.2.2”项下方法制备成阴性样品溶液。

2.3　方法学考察

2.3.1　专属性试验

分别取阴性样品溶液、混合对照品溶液和供试品溶液（编号A1），按“2.1”项下检测条件进样测定。结果显示，阴性样品溶液对检测无干扰，色谱见图1。

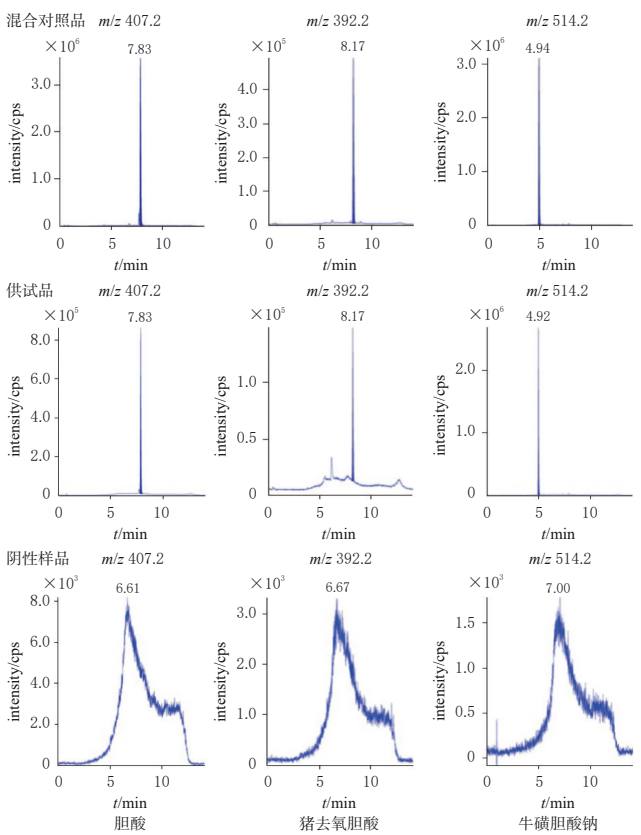


图1　混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液的专属性试验色谱图

2.3.2　线性关系考察及检测限、定量限测定

精密吸取“2.2.1”项下各对照品储备液0.025、0.025、0.025、0.2、0.2、0.25 mL，分别置500、100、50、200、100、50 mL棕色量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成胆酸质量浓度分别为5.48、27.42、58.84、109.68、219.36、548.40 ng/mL，猪去氧胆酸质量浓度分别为5.38、26.92、53.84、107.68、215.36、538.40 ng/mL，牛磺胆酸钠质量浓度分别为4.74、23.70、47.40、94.81、189.62、474.05 ng/mL的混合对照品溶液，按“2.1”项下检测条件进样测定，以各成分质量浓度（x）为横坐标，峰面积（y）为纵坐标，用Analyst工作站拟合标准曲线。精密吸取混合对照品溶液进行梯度稀释，分别以信噪比为3∶1和10∶1时对应的质量浓度作为各成分的检测限和定量限，结果见表1。

表1　待测成分的线性关系考察结果和检测限、定量限结果

待测成分	线性方程	r	线性范围/(ng/mL)	检测限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
胆酸	$y=1.36\times10^{4}x+4.61\times10^{5}$	0.999 3	5.48～548.40	1.64	5.48
猪去氧胆酸	$y=2.26\times10^{3}x-3.74\times10^{3}$	0.999 6	5.38～538.40	1.61	5.38
牛磺胆酸钠	$y=1.46\times10^{4}x+6.20\times10^{5}$	0.999 3	4.74～474.05	1.42	4.74

2.3.3　精密度试验

取供试品溶液（编号A1），按“2.1”项下检测条件连续进样6次，测定峰面积，计算RSD。结果显示，胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠峰面积的RSD分别为2.1%、1.9%、2.2%（n=6），表明方法精密度良好。

2.3.4　稳定性试验

取供试品溶液（编号A1），按“2.1”项下检测条件，在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时分别进样测定，记录峰面积，计算RSD。结果显示，胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠峰面积的RSD分别为2.9%、3.1%、3.5%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.3.5　重复性试验

取八宝惊风散（编号A1）6份，每份0.1 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，并按“2.1”项下检测条件进样分析，按外标法计算含量。结果显示，胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的平均含量分别为1.483、1.768、1.503 mg/g，RSD分别为2.5%、3.7%、3.2%（n=6），表明方法重复性良好。

2.3.6　加样回收率试验

精密称取八宝惊风散（编号A1）6份，每份0.05 g，分别精密加入含胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠对照品的甲醇溶液（胆酸1 535.52 ng/mL、猪去氧胆酸1 722.82 ng/mL、牛磺胆酸钠1 516.92 ng/mL）50 mL，按“2.2.2”项下自“称定质量”起，同法制备成供试品溶液；再按“2.1”项下检测条件进样分析，记录峰面积，并计算回收率及RSD。结果显示，胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的平均回收率分别为103.3%、103.3%、101.6%，RSD分别为3.3%、3.4%、4.2%（n=6），表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取不同批次八宝惊风散，按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，再按“2.1”项下检测条件进样分析，按外标法计算各批次样品中胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠的含量，结果见表2。

表2 不同厂家八宝惊风散样品的含量测定结果（n=3）

编号	胆酸		猪去氧胆酸		牛磺胆酸钠	
	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%
A1	1.481	6.1	1.772	8.1	1.511	5.9
A2	1.389		1.801		1.586	
A3	1.569		2.049		1.697	
B1	1.187	7.1	1.888	23.4	1.078	10.0
B2	1.081		1.201		1.285	
B3	1.244		1.415		1.291	
C1	0.811	51.5	0.955	40.3	0.664	52.2
C2	1.711		1.389		1.752	
C3	0.702		0.599		0.887	
均值	1.242	27.2	1.452	32.8	1.306	28.6

2.5 样品数据分析

对表2数据进行描述性及探索性分析，结果显示，3个厂家样品之间胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠含量存在一定差异，推测是由于投料的人工牛黄质量差异或者生产工艺不同导致的。A厂家样品3个成分的平均含量均高于其他2个厂家样品，且批间差异最小；C厂家样品3个成分的平均含量均低于其他2个厂家样品，且批间差异较大。这表明A厂家样品中人工牛黄的质量和对生产工艺的控制能力可能优于其他2个厂家；C厂家样品的质量相对较差，批间差异大，质量控制不稳定。应用IBM SPSS软件，采用组间连接系统聚类法，以平方欧氏距离为测度进行聚类分析，结果见图2。当欧氏距离为7.0时，9批样品可聚为3类，A1～A3、C2为第1类，B1～B3为第2类，C1、C3为第3类，基本可以区分不同厂家的样品；但C厂家有1批样品与A厂家的3批样品归为一类，其可能原因为C厂家的人工牛黄原料批间差异较大或生产工艺批间差异较大。上述结果表明，不同批次样品3个成分的含量存在一定的差异，这可能与厂家所用原料和生产工艺存在差异有关。

以3个成分的含量为变量，对9批样品进行主成分分析，以主成分的特征值及贡献率作为选择主成分的依据，结果，主成分1特征值为2.589，贡献率为86.285%，是唯一主成分。计算3个厂家样品的主成分综合得分，A、B、C 3个厂家样品的得分分别为2.36～2.63、1.77～2.04、1.09～2.43，RSD分别为6.2%、7.2%、47.3%。以主成分综合得分为指标进行聚类分析，结果（图略）与含量聚类分析结果基本一致。

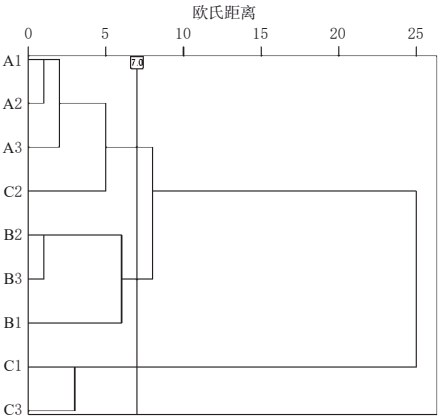


图2 9批八宝惊风散聚类分析树状图

3 讨论

3.1 测定方法的选择

胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠均为甾体类化合物，紫外吸收为末端吸收，使用常规的紫外检测器难以取得理想效果[6]。也有学者采用蒸发光散射检测器[7]或者衍生化方法[8]对其进行检测，但蒸发光散射检测器灵敏度相对较差，在待测成分含量较低时表现不佳，且待测成分的峰纯度无法考证，而衍生化方法的操作较繁琐。八宝惊风散处方药味复杂，人工牛黄处方量小，基质干扰严重，笔者前期尝试采用普通液相色谱法进行分析，未能成功。因此，本研究采用灵敏度和选择性均更高的超高效液相串联质谱法进行测定。

3.2 色谱条件及质谱条件的确定

本课题组前期考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-10 mmol/L乙酸铵溶液、甲醇-10 mmol/L乙酸铵溶液4个溶剂系统，结果表明，水相采用纯水或乙酸铵溶液，有机相采用甲醇或乙腈对分离的影响均不大；考虑到乙腈柱压更小，添加乙酸铵与否对分离及灵敏度无影响，故最终选用了乙腈-水作为流动相。本课题组还考察了等度和梯度洗脱的区别，结果发现，梯度洗脱峰形较好，且梯度洗脱对样品中吸附在色谱柱上的强保留杂质有较好的洗脱作用，有利于延长色谱柱的寿命。因胆汁酸类成分含有羧基，易形成负离子，因此质谱离子源采用了负离子模式电离。本课题组还比较了单四极杆模式及多反应监测模式，结果发现，胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸钠的分子离子均有较大响应，但采用多反应监测模式的二级碎片离子响应较小。为了使建立的方法更加灵敏，本研究选用了单四极杆模式。

3.3 提取方法的考察

本课题组前期比较了甲醇直接提取和样品加稀盐酸酸化后再以氯仿提取两种提取方法，结果表明，两种方法均能提取出胆汁酸类成分，但酸化后再用氯仿提取

的样品测得值（编号A1样品中胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸钠含量分别为1.013、1.230、1.034 mg/g）较甲醇直接提取（见表2样品A1数据）的含量低，且操作复杂，故本研究选择用甲醇直接提取。

4 结语

本研究建立了超高效液相串联质谱法同时测定八宝惊风散中胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠含量的方法，该方法线性范围宽，专属性和重复性良好，能够在15 min内快速实现对目标成分的分离，并能很好地区分八宝惊风散批间及不同厂家之间的差异。3个厂家样品之间胆酸、猪去氧胆酸和牛磺胆酸钠含量存在一定差异，这可能与厂家所用人工牛黄原料不同和生产工艺存在差异有关。由于本研究所用的八宝惊风散均为市售品，无法取得相应批次制剂生产投料的人工牛黄饮片，故仅能通过检测制剂中3个胆汁酸类成分的含量间接分析制剂生产工艺的均一性。后续本课题组将进一步收集相关样品及人工牛黄饮片，以进一步明确不同厂家3个胆汁酸类成分含量均一性不佳的原因。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[M].2020年版.北京：中国医药科技出版社出版，2020：5-8.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China：part Ⅰ[M]. 2020 version. Beijing：China Medical Science Press，2020：5-8.

[2] LIN C H，WANG Y S，LE M Q，et al. Recent progress in bile acid-based antimicrobials[J]. Bioconjug Chem，2021，32(3)：395-410.

[3] WU J，YU T T，KUPPUSAMY R，et al. Cholic acid-based antimicrobial peptide mimics as antibacterial agents[J]. Int J Mol Sci，2022，23(9)：4623.

[4] HAN J Y，JEONG H I，PARK C W，et al. Cholic acid attenuates ER stress-induced cell death in coxsackievirus-B3 infection[J]. J Microbiol Biotechnol，2018，28(1)：109-114.

[5] RASHID S A，NORMAN N，TEO S H，et al. Cholic acid：a novel steroidal uncompetitive inhibitor against β-lactamase produced by multidrug-resistant isolates[J]. World J Microbiol Biotechnol，2021，37(9)：152.

[6] 石岩，李慧勇，李广生，等.牛、羊胆的质量标准现状及相关问题的探讨[J].中国中药杂志，2021，46(6)：1580-1584.
SHI Y，LI H Y，LI G S，et al. Current quality standards of cattle bile and sheep bile quality standards and discussion on related problems[J]. China J Chin Mater Med，2021，46(6)：1580-1584.

[7] 谢思敏，陈家仪，汤迎湛，等.复方小儿退热栓的质量标准提高研究[J].中国药房，2020，31(17)：2106-2111.
XIE S M，CHEN J Y，TANG Y Z，et al. Study on quality standard improvement for compound child antifebrile suppository[J]. China Pharm，2020，31(17)：2106-2111.

[8] 石岩，孙冬梅，魏锋，等.柱前衍生HPLC法测定体外培育牛黄中主要胆汁酸类成分[J].药物分析杂志，2016，36(11)：2046-2050.
SHI Y，SUN D M，WEI F，et al. Quantification of main bile acids in *in vitro* cultivated *Calculus bovis* by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization[J]. Chin J Pharm Anal，2016，36(11)：2046-2050.

（收稿日期：2023-04-06　修回日期：2023-09-16）
（编辑：邹丽娟）