

LCMS-8045 测定牛黄中的猪脱氧胆酸

LCMSMS-299

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera XR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定牛黄中猪脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸的方法。牛黄样品用甲醇充分溶解，经 Shim-packXR-ODS III(2.0 mm I.D.×75 mm L., 1.6 μm) 色谱柱分离，多反应监测模式 (MRM) 测定。结果显示，在 20~2000 ng/mL 范围内，胆酸及四种脱氧胆酸线性良好，线性相关系数 >0.997，准确度介于 87.0%~109.8% 之间；40 ng/mL 连续进样 6 针，保留时间及峰面积相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.227%~0.400%、1.145%~5.042%。该方法可用于牛黄及人工牛黄中胆酸及脱氧胆酸类化合物的测定。

关键词： 三重四极杆质谱 猪脱氧胆酸 胆酸 脱氧胆酸 鹅脱氧胆酸

牛黄是牛科动物的干燥胆结石，是一种名贵的中药，具有清心、豁痰、开窍、凉肝、息风、解毒等功效。牛黄主要成分有胆酸、胆汁酸等，天然牛黄不易获得，我国已研制出人工牛黄和人工培育牛黄。人工牛黄由牛胆粉、胆酸、猪脱氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成。“2015 版药典”中针对牛黄仅规定了胆酸的含量，薄层色谱对于人工牛黄和天然牛黄难以

区分。此外，对于牛黄中胆酸、多种胆汁酸分离分析尚未见报道。

本文使用岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8045 对牛黄粉进行了分析，建立了猪脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸的定量检测方法，为牛黄质量控制及质量标准制定提供参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 Nexera XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-20AD_{XR}×2 输液泵，DGU-20A₃ 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-packXR-ODS III(2.0 mm I.D. ×75 mm L., 1.6 μm)

流动相：A 相 -2 mM 乙酸铵水溶液，B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 60%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Action	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6.10	Pumps	Pump B Conc.	60
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI-

雾化气流速：3.0 L/min

DL 温度：250℃

加热模块温度：500℃

加热气流速：12.0 L/min

接口温度：350℃

扫描模式：MRM，参数见表 2

干燥气流速：8.0 L/min

驻留时间：50 ms

延迟时间：3 ms

表2 MRM参数表

物质名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE(V)	Q3Pre Bias(V)
猪脱氧胆酸	Hyodeoxycholic acid	83-49-8	391.15	355.20*	13	39	14
			391.15	373.40	29	35	23
胆酸	Cholic acid	81-25-4	407.10	289.10*	15	41	27
			407.10	389.10	12	36	21
脱氧胆酸	Deoxycholic acid	83-44-3	391.15	373.40*	29	35	23
			391.15	355.20	13	39	14
熊脱氧胆酸	Ursodeoxycholic acid	128-13-2	391.15	355.20*	13	39	14
			391.15	373.40	29	35	23
鹅脱氧胆酸	chenodeoxycholic acid	474-25-9	391.15	355.20*	13	39	14
			391.15	373.40	29	35	23

*定量离子对

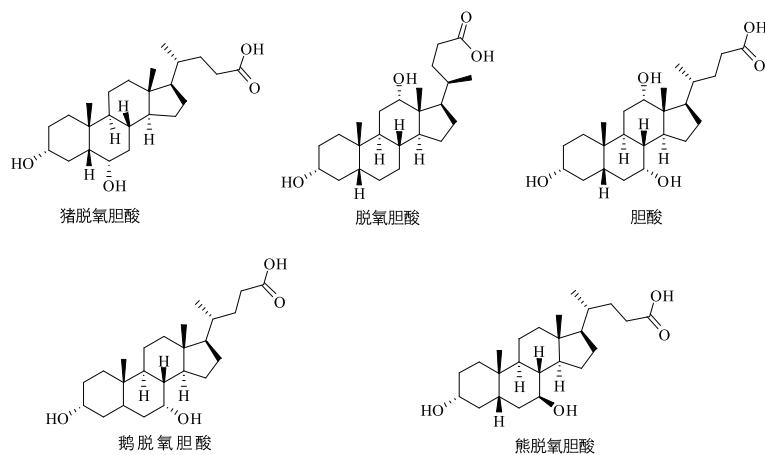


图1 猪脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸结构图

1.3 样品前处理方法

取 1 g 牛黄粉置于离心管，加入适量甲醇溶解，超声 5 min，定容至 10 mL，以 6:4(v/v) 甲醇水稀释 1000 倍，待测。

结果与讨论

2.1 标准品色谱

下图为 5 种胆酸、胆汁酸的 MRM 色谱图。

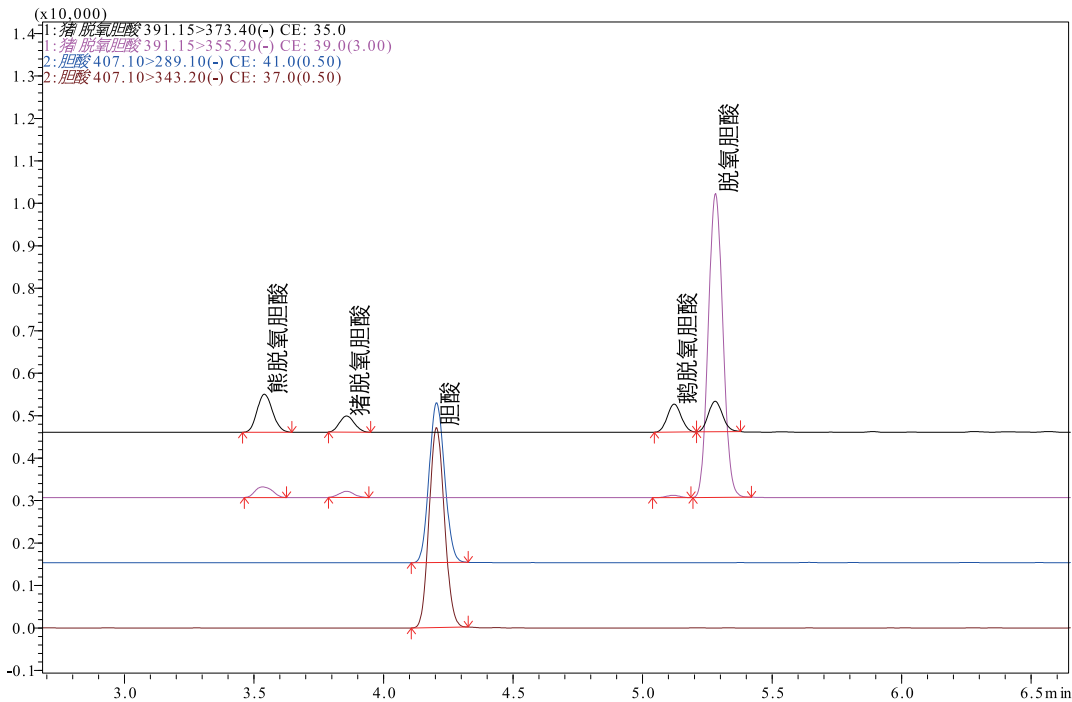
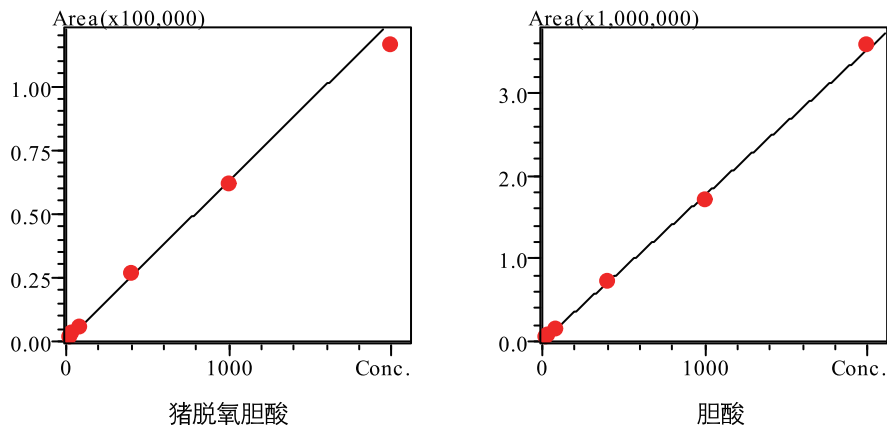


图2 猪脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸的MRM色谱图（浓度20 ng/mL）

2.2 线性范围

将 20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、400 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL 的混合标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示，线性方程、线性范围和相关系数结果见表 3。



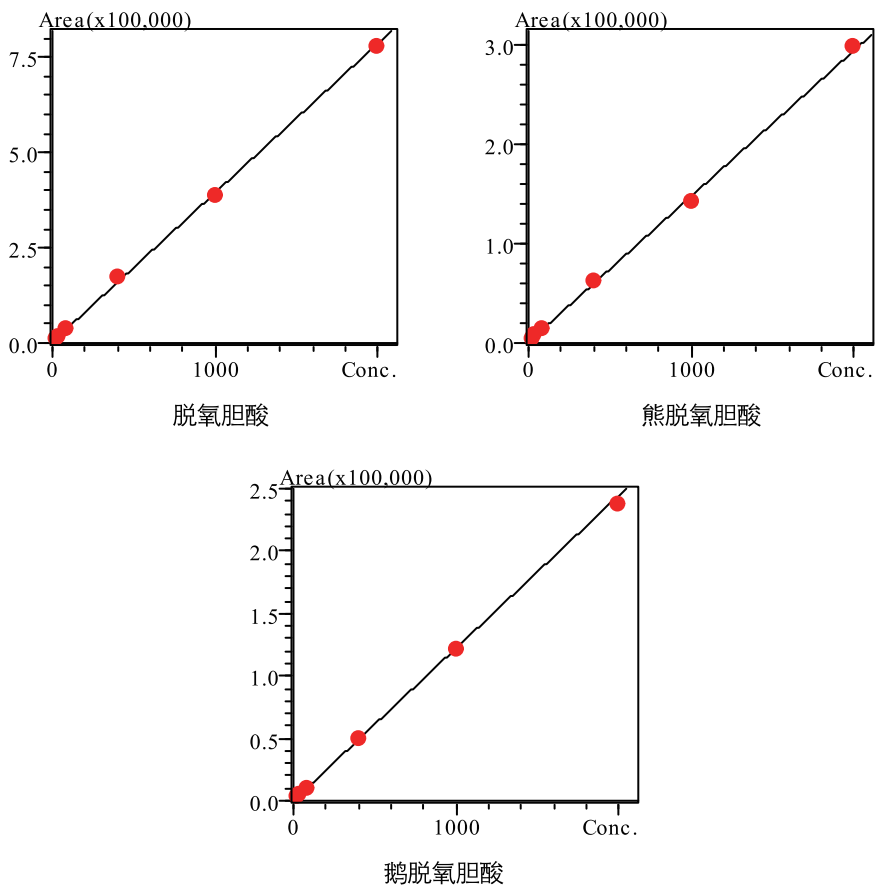


图3 5种胆酸、胆汁酸的校准曲线

表3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	准确度 (%)
1 猪脱氧胆酸	$Y = (62.6764)X + (333.395)$	20-2000	0.9979	92.4-107.9
2 胆酸	$Y = (1763.19)X + (4359.56)$	20-2000	0.9997	96.0-103.9
3 脱氧胆酸	$Y = (392.484)X + (2570.14)$	20-2000	0.9992	87.0-109.8
4 熊脱氧胆酸	$Y = (146.490)X + (1080.33)$	20-2000	0.9996	91.3-107.6
5 鹅脱氧胆酸	$Y = (122.303)X + (162.162)$	20-2000	0.9990	96.5-108.6

2.3 灵敏度实验

对浓度为 20 ng/mL 混合标准溶液进样分析, 计算 5 种胆酸、胆汁酸的检出限 (S/N=3, LOD 表示)、定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表4 检出限和定量限

编号	名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	猪脱氧胆酸	1.25	3.80
2	胆酸	0.03	0.10
3	脱氧胆酸	0.01	0.02
4	熊脱氧胆酸	0.55	1.67
5	鹅脱氧胆酸	0.68	2.07

2.4 重复性

对浓度为 40 ng/mL 混合标准溶液进样分析, 连续进样 6 次, 各化合物的保留时间及峰面积相对标准偏差 (RSD) 如表 5 所示。

表5 保留时间和峰面积重复性(n=6)

化合物名称	重复性 (RSD%)	
	保留时间	峰面积
猪脱氧胆酸	0.400	5.042
胆酸	0.294	1.145
脱氧胆酸	0.227	2.733
熊脱氧胆酸	0.297	1.674
鹅脱氧胆酸	0.237	2.972

2.5 实际样品分析

三份牛黄疑似样、一份天然牛黄、一份人工牛黄样品, 磨粉, 取 1.00 g 样品置于 1.5 mL 离心管, 加入适量甲醇溶解, 超声 5 min, 定容至 10 mL, 以 6:4 甲醇水稀释 1000 倍, 按照 1.2 条件进行分析, 结果如下图 4 和表 6。

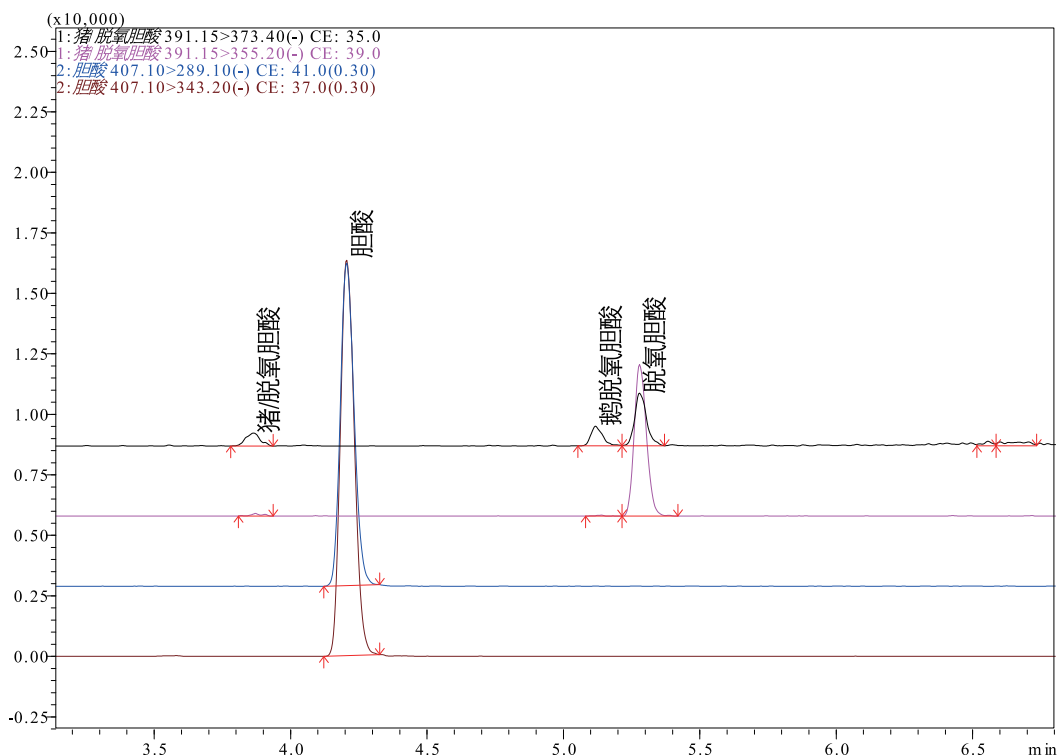


图4 某牛黄疑似样品MRM色谱图

表6 某牛黄样品中胆酸、胆汁酸的检测结果

编号	名称	浓度(μg/L)				
		样品 1	样品 2	样品 3	天然牛黄	人工牛黄
1	猪脱氧胆酸	26.00	60.95	51.43	/	1065.22
2	胆酸	107.48	99.12	98.53	168.63	457.35
3	脱氧胆酸	43.71	32.10	34.76	122.65	114.36
4	熊脱氧胆酸	/	/	/	/	/
5	鹅脱氧胆酸*	18.65	19.09	17.40	27.61	45.26

*鹅脱氧胆酸定量结果低于校准曲线低限。

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera XR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统测定牛黄中猪脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸。结果显示, 在 20~2000 ng/mL 范围内, 胆酸及四种脱氧胆酸线性良好, 线性相关系数 >0.997, 准确度介于 87.0%~109.8% 之间; 40 ng/mL 连续进样 6 针, 保留时间及峰面积相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.227%~0.400%、1.145%~5.042%。该方法可用于牛黄及人工牛黄中胆酸及脱氧胆酸类化合物的测定。