

清开灵注射液中 14 种胆汁酸的 HPLC-ESI-MS/MS 快速鉴定

张加余^{1,2}, 张倩¹, 张红霞¹, 董鲁艳¹, 卢建秋^{2*}, 乔延江^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;
2. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究清开灵注射液中胆汁酸类成分的 ESI-MS/MS 裂解规律及其快速识别方法。方法: 采用 HPLC-ESI-MS/MS 技术研究 5 种胆汁酸类成分的 ESI-MS/MS 裂解规律, 并对 8 个生产厂家清开灵注射液中的胆汁酸类成分进行快速鉴别。结果: 5 种胆汁酸类成分具有相似的 ESI-MS/MS 裂解特征; 利用这些特征从清开灵注射液中快速鉴定了 14 个胆汁酸类成分; 其中 11 个为 8 个厂家注射液共有成分, 3 个存在于个别厂家产品中。结论: 利用 HPLC-ESI-MS/MS 技术可以从复杂物质体系中快速鉴定胆汁酸类成分, 并为中药复方制剂的复杂物质基础阐明与质量标准提高提供了有效的方法。

[关键词] 清开灵注射液; 胆汁酸; 液质联用; ESI-MS/MS 裂解规律; 快速鉴定

清开灵注射液是传统名方“安宫牛黄丸”的改良剂型, 由胆酸、珍珠母(粉)、猪去氧胆酸、栀子、水牛角(粉)、板蓝根、黄芩苷、金银花 8 味中药组成^[1-2]。临床上广泛用于热病、中风偏瘫、神志不清、急性肝炎、上呼吸道感染等, 是中医急诊科室必备中成药^[3-4]。方中胆酸、猪去氧胆酸清热、镇惊、开窍, 水牛角、珍珠母解热、镇静、安神, 金银花、栀子、板蓝根、黄芩苷清热解毒、除烦, 诸药相加, 共奏良效^[5]。按照中药君臣佐使的组方理论, 胆酸和猪去氧胆酸为方中君药, 起主要的药效作用。2010 年版《中国药典》收录的清开灵注射液标准中, 胆酸和猪去氧胆酸是以主要含这 2 种成分的提取物入药的。

鉴于中药复方是基于“多成分、多靶点”的作用模式发挥药效的, 因此尽量多地阐明其中的物质组成具有重要的意义。当前, 研究清开灵注射液君药中的胆酸类成分的文献较多, 但大多是针对胆酸和猪去氧胆酸的定量研究^[6-8], 并且少量涉及胆酸类成分 LC-MS 定性研究的文献中, 鉴定的胆汁酸类成分未超过 5 种^[9]。为了更深入地

研究清开灵注射液中的该类成分, 本文建立了一种快速、灵敏的 HPLC-ESI-MS/MS 鉴定研究方法, 以期进一步丰富清开灵注射液物质基础和质量控制研究工作。

1 材料

Agilent 1100 series 高效液相系统, 配有 ELSD 检测器; Agilent XCT Plus 电喷雾离子阱质谱仪系统, 通过电喷雾电离(ESI)接口与 HPLC 联接; KQ-300DE 医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D, BS110S 电子分析天平(Sartorius, Switzerland); Milli-Q 超纯水纯化系统。

所用色谱级乙腈和甲醇均购自 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA), 乙酸购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); 胆酸(供含量测定用, 批号 100078-200414)、猪去氧胆酸(供含量测定用, 批号 100087-200610)、鹅去氧胆酸(供含量测定用, 批号 110806-200704)、熊去氧胆酸(供含量测定用, 批号 0755-9003)均购自中国食品药品检定研究院; 去氧胆酸(供含量测定用, 纯度 >98%)购自成都普瑞法科技开发有限公司。8 个厂家清开灵注射液编号为 F1 ~ F8。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 对照溶液制备 各对照品均采用色谱纯甲醇制成约 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 然后配成混合对照品溶液。

[稿件编号] 20121023010

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2010ZX09502-002); 中药注射剂安全性研究技术平台建设项目

[通信作者] * 卢建秋, Tel: (010) 64286203, E-mail: lujq@vip.sina.com; * 乔延江, Tel: (010) 84738621, E-mail: yanjiangqiao@sina.com

[作者简介] 张加余, Tel: (010) 64286407, E-mail: zhangjiayu0615@163.com

2.1.2 供试溶液制备 清开灵注射液,过 0.22 μm 的微孔滤膜,取续滤液注入液相色谱仪进行测定。

2.2 液相色谱条件

Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.2% 乙酸溶液, B 为乙腈-甲醇 (3:1) 的混合溶液,梯度洗脱, 0 ~ 10 min, 30% ~ 45% B, 10 ~ 36 min, 45% ~ 49% B, 36 ~ 45 min, 49% ~ 64% B, 45 ~ 60 min, 64% ~ 81% B, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; ELSD 检测器参数漂移管温度 110 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气 (空气) 流速 1.5 L \cdot min⁻¹, 不分流模式。

2.3 质谱检测条件

负离子模式: 雾化气和干燥气均为氮气 (纯度 > 99.99%), 碰撞气为氦气 (纯度 > 99.99%); 干燥气流速 11 L \cdot min⁻¹; 雾化室压力 35 Pa; 雾化温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压 3 500 eV; 目标质量数 400; 化合物稳定性 (compound stability) 为 50%; 离子阱驱动水平 (trap drive level) 100%; 扫描范围 m/z 100 ~ 800; 流动相采用柱后分流方式, 进入质谱检测器的流动相 0.25 mL \cdot min⁻¹。

3 结果

3.1 HPLC-ELSD 条件选择

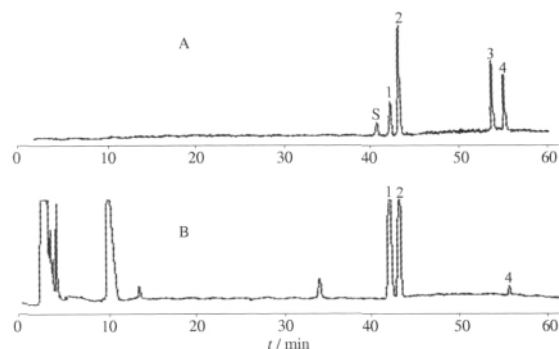
在以往药物研究和常规检验中,通常采用紫外分光光度法^[10]、薄层鉴别和薄层扫描法^[11-12]对胆汁酸类成分进行定性和定量分析,但这些方法专属性较差,受其他成分及显色反应条件等影响较大。而采用 HPLC-UV 定性定量时,由于胆酸仅有末端吸收,检测非常困难。蒸发光散射检测器 (ELSD) 的出现,则大大拓宽了药物化学成分的检测范围,尤其适合应用于紫外吸收特征不明显的成分如胆汁酸类成分的研究。因此,本研究选择采用 HPLC-ELSD 对清开灵注射液中的胆汁酸进行初步的定性研究。

3.2 HPLC-ESI-MS/MS 条件选择

尽管 ELSD 是一种通用型检测器,几乎对所有非挥发性成分都会有响应,并消除了杂质和流动相的紫外吸收干扰,但是基线噪音偏大、灵敏度偏低是其难以克服的缺陷,限制了其在微量成分定性定量研究中的应用。LC-MS 是当前已经发展成熟的在线分析技术,其将高效液相色谱优秀的分离能力与质谱的高灵敏度、高专属性有机地结合在一起,是分析复杂物质体系最有效的检测工具。试验结果表明,

LC-MS 对于胆汁酸类成分的反应非常灵敏,无论是正离子模式还是负离子模式,检测到的胆汁酸类成分的数量都比 ELSD 多,对于阐明注射液中胆汁酸类成分的组成非常有利。

由于大量同分异构体的存在,前期的色谱分离对于 LC-MS 区分该类成分尤为重要。试验结果表明,不同的流动相系统对色谱图整体面貌有较大的影响。采用乙腈-水系统时,部分含量偏低的色谱峰易被掩盖于含量高的色谱峰中,导致检出的成分偏少。因此,通过优选确定以乙腈-甲醇 (3:1) 混合溶液作为有机相,以 0.2% 乙酸溶液作为水相,可以更好地实现胆汁酸类成分同分异构体的有效分离。结果见图 1 2。



S. 熊去氧胆酸; 1. 胆酸; 2. 猪去氧胆酸; 3. 鹅去氧胆酸; 4. 去氧胆酸 (图 2 同)。

图 1 混合对照品 (A) 和清开灵注射液 (B) HPLC-ELSD 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference standards (A) and Qingkailing injection (B)

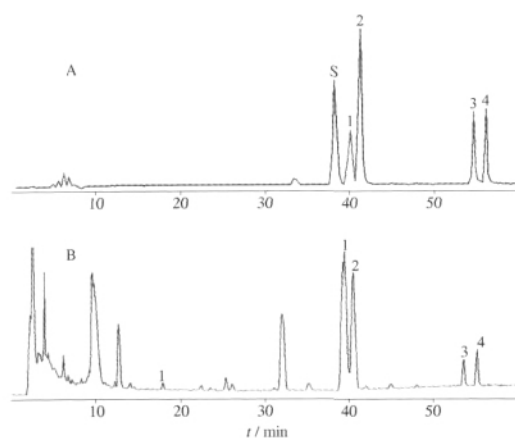


图 2 混合对照品 (A) 和清开灵注射液 (B) TIC 图
Fig. 2 Total ion chromatogram of mixed reference standards (A) and Qingkailing injection (B) in negative mode

3.3 ESI-MS/MS 裂解特征

试验首先对胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸的质谱裂解规律进行了研究。结果表明,选择负离子模式检测时,既可得到易于辨认的 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰,还可降低成分总离子流色谱图的背景值。

以胆酸为例,研究该类化合物的 ESI-MS/MS 裂解规律:其一级质谱谱图中给出了准分子离子 m/z 407 $[M-H]^-$ 加合离子 m/z 443 $[M-H+2H_2O]^-$ 和 $[2M-H]^-$,可确定其相对分子质量为 408。结果见图 3。在二级质谱谱图中, $[M-H]^-$ 离子与离子阱内的碰撞气 He 碰撞,发生 CID-MS/MS 反应并产生一系列子离子,如 m/z 389 $[M-H-H_2O]^-$, m/z 371 $[M-H-2H_2O]^-$, m/z 353 $[M-H-3H_2O]^-$, m/z 363 $[M-H-CO_2]^-$, m/z 345 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$, m/z 343 $[M-H-2H_2O-CO]^-$ 等主要碎片离子,结果见图 3。而在三级质谱谱图中,母离子 $[M-H-2H_2O-CO]^-$ 进一步裂解,产生 $[M-H-3H_2O-CO]^-$ 以及 RDA 裂解离子 $[M-H-2H_2O-CO-C_4H_8]^-$ 。结果见图 3。其他 4 个已知化合物的裂解途径与胆酸也大致相同。这说明,胆汁酸类成分的 ESI-MS/MS 裂解方式主要以中性丢失 H_2O , CO_2 , CO 以及发生 RDA 裂解反应等,呈现出较强的规律性。

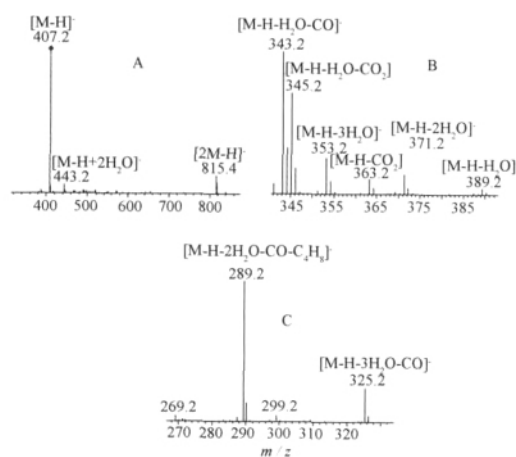


图 3 胆酸对照品 ESI-MS/MS 图

Fig. 3 ESI-MS/MS chromatogram of cholic acid reference standard

3.4 各主要离子峰的归属推断

通过与已有的对照品比对,可以将化合物 9,

10, 13, 14 准确鉴定为胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸。化合物 1, 3, 7 均在一级质谱中产生 m/z 407 的准分子离子峰,并且在 MS/MS 裂解过程中产生的子离子也大致相同,表明他们都是胆酸的同分异构体。经查阅文献,胆汁酸类化合物母核上常见的取代位置有 3-, 6-, 7-, 12-位。其中胆酸的取代位置是在 3-, 7-, 12-位。在动物胆汁中,比较常见胆酸异构体还有 α -猪胆酸(3-, 6-, 7-位),参考文献 [9],其极性与胆酸比较接近且含量相对较高,因此将化合物 7 鉴定为 α -猪胆酸。其他 2 个成分,则由于含量相对较低,将其推断为 6, 7, 12-三羟基胆烷酸和 3, 6, 12-三羟基胆烷酸。

化合物 2 的 ESI-MS 谱给出的准分子离子峰为 m/z 423,其裂解途径与胆酸也基本类似。从相对分子质量上推断,该化合物的母核上比胆酸多 1 个羟基取代,结合胆汁酸类成分母核上的常见取代位置,将其鉴定为 3, 6, 7, 12-四羟基胆烷酸。

化合物 11 和 12 的准分子离子峰均为 m/z 389,相对分子质量比猪去氧胆酸少 2D。与胆酸类成分相比,其 ESI-MS/MS 裂解途径最明显的特征是 $[M-H]^-$ 离子易中性丢失 CO 分子,表明它们的母核中含有酮基或羰基,由此将它们鉴定为 3-羟基-12-酮胆烷酸和 3-羟基-6-酮胆烷酸。而化合物 5, 6, 8 的相对分子质量则比胆酸少 2D,说明它们可能比胆酸要少 1 个羟基取代,而多了 1 个羰基。结合分布于动物胆汁内的该类成分报道,可以将它们分别鉴定为 3, 12-二羟基-7-酮胆烷酸, 7, 12-二羟基-3-酮胆烷酸和 3, 7-二羟基-12-酮胆烷酸。化合物 4 的相对分子质量较胆酸少 4D,可推断其母核结构较胆酸要少 2 个羟基取代,多了 2 个羰基,因此将其鉴定为 3-羟基-7, 12-二酮胆烷酸。结果见表 1。

4 讨论

LC-MS 可以检测到很多微量的胆汁酸类成分,表明其灵敏度大大优于 HPLC-ELSD,有利于复杂物质体系的阐明。

早期的 LC-MS 研究曾确认清开灵注射液中并不含有熊去氧胆酸^[13]。然而该结论未能引起研究者的注意,仍有较多关于该注射液中熊去氧胆酸的定性和定量报道^[9, 14-16]。本文通过对市售 8 家清开灵注射液产品中胆汁酸类成分的分析,并未发现熊去氧胆酸的存在,说明采用熊去氧胆酸作为定量指标并不妥当。

表1 清开灵注射液中胆汁酸类成分的LC-MS/MS鉴定

Table 1 Characterization of bile acids in Qingkailing injection by LC-MS/MS

No.	t_R /min	[M - H] ⁻	分子式	多级裂解碎片离子	归属	厂家
1	17.9	407	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	MS ² [407]: 345 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (100), 343 [M - H - CO - 3H ₂ O] ⁻ (75), 325 [M - H - CO - 4H ₂ O] ⁻ (66), 371 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (61), 353 [M - H - 3H ₂ O] ⁻ (37) MS ³ [345]: 327 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (100)	6,7,12-三羟基胆烷酸	F1, F3 ~ F8
2	22.0	423	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	MS ² [423]: 405 [M - H - H ₂ O] ⁻ (100), 369 [M - H - 3H ₂ O] ⁻ (19), 341 [M - H - 4H ₂ O] ⁻ (14) MS ³ [405]: 369 [M - H - 3H ₂ O] ⁻ (100), 387 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (37.7)	3,6,7,12-四羟基胆烷酸	F1 ~ F8
3	23.6	407	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	MS ² [407]: 343 [M - H - CO - 3H ₂ O] ⁻ (100), 345 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (67) MS ³ [343]: 289 [RDA] (100)	3,6,12-三羟基胆烷酸	F1, F2, F5, F7
4	23.9	403	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	MS ² [403]: 289 [RDA] (100), 333 [RDA] (36)	3-羟基-7,12-二酮胆烷酸	F1, F6, F7
5	25.3	405	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	MS ² [405]: 343 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (100), 361 [M - H - CO ₂] ⁻ (72), 369 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (43) MS ³ [343]: 289 [RDA] (100)	3,12-二羟基-7-酮胆烷酸	F1 ~ F8
6	26.2	405	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	MS ² [405]: 387 [MH - H ₂ O] ⁻ (100) MS ³ [387]: 369 [M - H - H ₂ O] ⁻ (21), 323 [M - H - 2H ₂ O - CO] ⁻ (12)	7,12-二羟基-3-酮胆烷酸	F1 ~ F8
7	31.7	407	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	MS ² [407]: 389 [M - H - H ₂ O] ⁻ (100) MS ³ [389]: 371 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (100)	α-猪胆酸	F1 ~ F8
8	35.4	405	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	MS ² [405]: 361 [M - H - CO ₂] ⁻ (100), 343 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (52) MS ³ [361]: 343 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (100), 289 [RDA] (25)	3,7-二羟基-12-酮胆烷酸	F1 ~ F8
9	39.3	407	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	MS ² [407]: 343 [M - H - CO - 2H ₂ O] ⁻ (100), 345 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ (86), 353 [M - H - 3H ₂ O] ⁻ (61), 371 [M - H - 3H ₂ O] ⁻ (42), 363 [M - H - CO ₂] ⁻ (31), 389 [M - H - H ₂ O] ⁻ (19) MS ³ [343]: 289 [RDA] (100), 325 [M - H - CO - 3H ₂ O] ⁻ (37)	胆酸	F1 ~ F8
10	40.2	391	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	MS ² [391]: 373 [M - H - H ₂ O] ⁻ (100) MS ³ [373]: 355 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (100), 345 [M - H - H ₂ O - CO] ⁻ (5)	猪去氧胆酸	F1 ~ F8
11	41.9	389	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	MS ² [389]: 305 [M - H - 3CO] ⁻ (100), 327 [M - H - H ₂ O - CO ₂] ⁻ (41), 343 [M - H - H ₂ O - CO] ⁻ (23), 371 [M - H - H ₂ O] ⁻ (12)	3-羟基-12-酮胆烷酸	F1 ~ F8
12	44.8	389	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	MS ² [389]: 305 [M - H - 3CO] ⁻ (100), 327 [M - H - H ₂ O - CO ₂] ⁻ (3), 343 [M - H - H ₂ O - CO] ⁻ (14)	3-羟基-6-酮胆烷酸	F1 ~ F8
13	53.4	391	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	MS ² [391]: 373 [M - H - H ₂ O] ⁻ (100) MS ³ [373]: 355 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (100)	鹅去氧胆酸	F1 ~ F8
14	55.0	391	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	MS ² [391]: 345 [M - H - CO - H ₂ O] ⁻ (100), 355 [M - H - 2H ₂ O] ⁻ (40), 347 [M - H - CO ₂] ⁻ (39), 327 [M - H - CO - 2H ₂ O] ⁻ (38) MS ³ [345]: 327 [M - H - CO - 2H ₂ O] ⁻ (100)	去氧胆酸	F1 ~ F8

对比8个厂家胆汁酸类成分可以发现,除6,7,12-三羟基胆烷酸,3,6,12-三羟基胆烷酸和3-羟基-7,12-二酮胆烷酸外,其他11个成分均可在8个厂家样品中检测到,表明不同厂家的注射液中胆汁酸类成分存在一定的差异性,可能与所用原料和生产工艺有关。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 1110.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用. 第4卷[M]. 北京:学苑出版社,1998: 3166.
- [3] 徐军杰. 常用中药药理与临床[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005: 430.
- [4] 金玉龙,赵志新. 清开灵注射液的临床研究[J]. 中医学报,1995,10(4): 54.
- [5] 杨坚毅,陈惠红. 清开灵注射液临床与药理研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2001,21(8): 494.
- [6] 程晓慧,汤清. HPLC-ELSD法测定清开灵中胆酸的含量[J]. 中医学报,2009,37(4): 66.
- [7] 江英桥. HPLC-ELSD法测定清开灵注射液中胆酸和猪去氧胆酸的含量[J]. 中国药品标准,2006,7(4): 31.
- [8] 杨立伟,刘潇潇,巩琨,等. 清开灵系列品种中胆酸和猪去氧胆酸的通用检测方法研究[J]. 中国药房,2012,23(35): 3340.
- [9] Zhang H Y, Hu P, Luo G A, et al. Screening and identification of multi-component in Qingkailing injection using combination of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2006, 577(2): 190.
- [10] 辛勋,陆红云. 紫外分光光度法测定速效伤风胶囊中胆酸含量[J]. 中国药业,2000,9(1): 36.
- [11] 杜守颖,吴清,曹春林. 双解注射液中熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量的薄层扫描测定[J]. 中国中药杂志,1995,20(10): 608.
- [12] 叶蓓蓓,潘莉,王栋,等. 薄层扫描法同时测定人工牛黄中胆酸及猪去氧胆酸的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(4): 706.
- [13] 刘国文,刘密新,吴筑平,等. 中药复方“清开灵”注射液中胆酸类物质的液相色谱/质谱/质谱分析[J]. 分析化学,2001,29(6): 621.
- [14] 严诗恺,辛文峰,罗国安,等. 应用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器联用技术同时测定清开灵注射液中的五类有效成分[J]. 色谱,2005,23(5): 482.
- [15] 武彦舒,金城,张倩,等. 清开灵注射液中10种有效成分的同时测定及其质量相关性研究[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(11): 3112.
- [16] 叶磊,曹进,徐燕,等. 胆酸类成分 HPLC-ELSD 单一标准品替代法含量测定研究[J]. 中成药,2004,26(9): 750.

Rapid identification of 14 bile acids contained in Qingkailing injection by HPLC-ESI-MS/MS

ZHANG Jia-yu^{1,2}, ZHANG Qian¹, ZHANG Hong-xia¹, DONG Lu-yan¹, LU Jian-qiu^{2*}, QIAO Yan-jiang^{1*}

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Scientific Experiment Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate ESI-MS/MS fragmentation pattern of bile acids contained in Qingkailing injection, and the rapid identification method. **Method:** HPLC-ESI-MS/MS technology was adopted to investigate ESI-MS/MS fragmentation pattern of five bile acids contained in Qingkailing injection, and rapidly identify bile acids contained in Qingkailing injection from eight different manufacturers. **Result:** 5 bile acids showed similar ESI-MS/MS fragmentation patterns, based on which 14 bile acids were rapidly separated from Qingkailing injection. Among them, 11 were found in injections of all of the manufacturers, and the rest three were found in individual manufacturers. **Conclusion:** HPLC-ESI-MS/MS is used to rapidly identify bile acids from complex material systems, which provides an effective method for interpreting the complex material base of compound traditional Chinese medicine preparations and enhance the quality standards.

[Key words] Qingkailing injection; bile acid; HPLC-MS; ESI-MS/MS fragmentation pattern; rapid identification

doi: 10.4268/cjmm20130712

[责任编辑 曹阳阳]