

标准研讨

猪胆粉 HPLC-ELSD 全轮廓谱图主要胆汁酸测定及化学计量学分析*

石岩¹, 耿颖¹, 郑天骄^{1,4}, 魏锋¹, 林瑞超^{2,3}, 马双成¹

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016;

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 4. 中国药科大学, 南京 211198)

摘要 目的: 建立测定猪胆粉中主要胆汁酸类成分的 HPLC-ELSD 法, 并对样品的全轮廓色谱图进行化学计量学分析。方法: 采用 SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温为 40 °C, 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹; ELSD 漂移管温度为 110 °C, 氮气流量为 2.8 L · h⁻¹, 增益为 1。使用 COW 法校正样品的色谱峰, 并对数据进行聚类分析和主成分分析。结果: 有 2 批样品未检出甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸, 另外 20 批样品的甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸的含量分别在 6.4%~36.5% 和 4.5%~27.0% 之间。化学计量学分析结果表明, 自制样品与对照药材图谱更接近, 而与市售样品差异较大。结论: 该法适合从定性和定量的角度对猪胆粉进行质量评价与控制。

关键词: 动物药; 猪胆粉; 胆汁酸; 甘氨酸猪去氧胆酸; 甘氨酸鹅去氧胆酸; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测器; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 00-0283-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.02.14

Determination of the major bile acids in pig bile powder by HPLC-ELSD and chemometric analysis of the whole chromatographic profiles*

SHI Yan¹, GENG Ying¹, ZHENG Tian-jiao^{1,4}, WEI Feng¹, LIN Rui-chao^{2,3}, MA Shuang-cheng¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica,

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of

Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 4. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract **Objective:** To establish a method for determination of the major bile acids in pig bile powder and its chemometric analysis of the whole chromatographic profiles. **Methods:** This analysis was performed at 40 °C on a SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.2% formic acid solution and acetonitrile as a linear gradient elution and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. An ELSD was used with a nitrogen flow-rate of 2.8 L · h⁻¹ at a drift tube temperature of 110 °C and the gain was 1. The data of these chromatograms were processed by COW method and analyzed by hierarchical clustering analysis (HCA) and principle component analysis (PCA).

* 国家十二五“重大新药创制”专项课题——中药质量安全检测和风险控制技术平台 (2014ZX09304307-002)

第一作者 Tel: (010) 67095995; E-mail: san0373@163.com

Results: Glycohyodeoxycholic acid and glycochenodeoxycholic acid were not detected in two batches samples from market. The content ranges of glycohyodeoxycholic acid and glycochenodeoxycholic acid in the other samples were 6.4%–36.5% and 4.5%–27.0%, respectively. The chemometrics showed that self-prepared samples were closer with reference medicinal material than market samples. **Conclusion:** Simultaneous qualitative and quantitative methods are suitable for the quality evaluation and the quality control of pig bile powder.

Keywords: animal medicine; pig bile powder; bile acid; glycohyodeoxycholic acid; glycochenodeoxycholic acid; HPLC; ELSD; Hierarchical clustering analysis; principle component analysis

猪胆是一种重要的动物来源的中药材,中国自古就将其作为药用,首载于《名医别录》,距今已有千余年药用历史。《本草纲目》中描述猪胆为“苦、寒、无毒”,用于治疗“赤白痢、小便不通、消渴无度、目翳、目赤肿痛、疔疮恶肿、风闭塞”等病症,称“方家用猪胆,取其寒能胜热,滑能润燥,苦能入心,又能去肝胆之火也”。猪胆的传统制法是将猪宰杀后,剖腹将胆囊取出,胆汁鲜用或将胆囊挂起晾干。现代常将猪的胆汁滤过,干燥,粉碎制得猪胆粉,具有清热润燥、止咳平喘、解毒的功效,主要用于顿咳、哮喘、热病燥渴、目赤、喉痹、黄疸、泄泻、痢疾、便秘、痈疮肿毒的治疗^[1-2]。

猪胆粉中主要含有胆汁酸、胆色素、蛋白和脂类等成分。其中胆汁酸类成分是其成分,主要有猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸(taurohyodeoxycholic acid, THDCA)、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸(glycohyodeoxycholic acid, GHDCA)和甘氨酸鹅去氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)^[2-6]。胆汁酸类成分不仅是猪胆粉中的主要成分,也是其主要的活性成分,因此常通过对该类成分的定性和定量分析来达到对猪胆粉药材的质量评价与控制的目的。中国药典 2015 年版一部^[1]仅对其中的 THDCA 进行了含量控制,然而从本文研究发现,猪胆粉中的甘氨酸结合型胆汁酸含量最高,而 GHDCA 和 GCDCA 是其含量最高的 2 个胆汁酸类成分,这 2 种胆汁酸含量之和约为 40% 以上。

胆汁酸类成分的测定方法主要有薄层扫描法(TLCS 法)^[7]、高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV 法)^[8]、高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD 法)^[9-11]、气相色谱法(GC 法)^[12]、氢核磁共振法(¹H NMR 法)^[13-14]、胶束电动毛细管电泳法(MEKCE 法)^[15]、高速逆流层析与蒸发光散射联用法(HSCCC-ELSD 法)^[16]、气相色谱-质谱法(GC-MS

法)^[17-18]、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS 法)^[19-21]、液相色谱-质谱法(LC-MS 法)^[22-25]以及柱前衍生化 HPLC 法^[26-29]。由于胆汁酸类成分缺少共轭结构,因此紫外吸收极弱,不经衍生化的情况下, HPLC-UV 法只能使用末端吸收,才能对其进行检测,灵敏度与准确度均不理想。目前,胆汁酸类成分的测定手段多为 HPLC-ELSD 法及 LC-MS 法。HPLC-ELSD 法的检测成本较低,测定的灵敏度不高,而 LC-MS 法测定灵敏度较好,更适合测定样品中的微量成分,其仪器的维护和测定成本很高。由于本文主旨是对猪胆粉中的主要胆汁酸类成分进行测定研究,所以选用了较低成本的 HPLC-ELSD 法,其较低的成本以及较易维护的特点也更利于方法的推广使用。

全轮廓色谱数据研究是以连续的色谱数据点为研究变量,相较于以已积分的色谱峰或已测定的成分含量为研究对象的方式而言,具有更加全面、客观等优点,不仅可有效避免微小色谱信息的遗漏,也可避免积分误差引起的错误结论,而且对色谱峰的完全分离要求不高。本文在完成 22 批不同来源的猪胆粉样品中主要胆汁酸类成分的测定研究之外,还尝试运用系统聚类分析和主成分分析这 2 个最常用的化学计量学方法对所测样品的 HPLC-ELSD 全轮廓图谱进行分析研究,藉此为猪胆粉药材的质量评价与控制提供技术参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters, 美国); Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech, 美国)。Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料:十八烷基键合硅胶; Agilent, 美国)。数据处理使用 Empower 3 网络版液相色谱工作站(Waters, 美

国)和 Matlab 2009a 数学软件(Mathworks, 美国)。Mettler AE240 电子天平(Mettler-Toledo, 瑞士); KQ-300DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 中国)。

1.2 试药

乙腈为色谱级, 水为 Milli-Q 超纯水, 甲酸为质谱级, 其他试剂均为分析纯。

GHDCA (批号 24-CF-57-3) 来自加拿大 TRC 公司, 甘氨酸去氧胆酸钠(GCDCA-Na, 批号 081M5209V) 来自美国 SIGMA 公司; 两者纯度均大于 98%。

测定样品为 22 批猪胆粉样品, 其中序号为 1~16 的样品(编号 ZD1~ZD16)为自制样品(将鲜猪胆汁过滤, 冷冻干燥后制得), 序号为 17 的样品(编号 ZD-STD)为猪胆粉对照药材(批号 121273-201101, 中国食品药品检定研究院), 序号为 18~22 的样品(编号 ZD-S-1~ZD-S-5)为市售样品。

2 主要胆汁酸类成分的测定

2.1 供试品溶液的制备

取样品粉末约 25 mg, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称量, 超声(功率 300 W, 频率 40 kHz)处理 20 min, 甲醇补足减失的量, 过滤, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 GHDCA 对照品适量, 加甲醇配成每 1 mL 含 GHDCA 为 0.810 mg 的对照品母液, 以及每 1 mL 含 GHDCA 分别为 0.091、0.162、0.230、0.253、0.276 mg 的系列对照品溶液。

取 GCDCA-Na 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 GCDCA-Na 为 0.400 mg 的对照品母液以及每 1 mL 含 GCDCA-Na 分别为 0.040、0.080、0.120、0.160、0.200 mg 的系列对照品溶液。

2.3 色谱条件

采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 流动相为 0.2% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~20 min, 25%B → 55%B; 20~21 min, 55%B → 25%B), 流速 1.0 mL · min⁻¹; ELSD 漂移管温度 110 °C, 氮气流量 2.8 L · h⁻¹, 增益为 1; 进样量 10 μL。

在上述色谱条件下, 对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取系列对照品溶液各 10 μL 进样, 测定并记录各对照品溶液色谱图中色谱

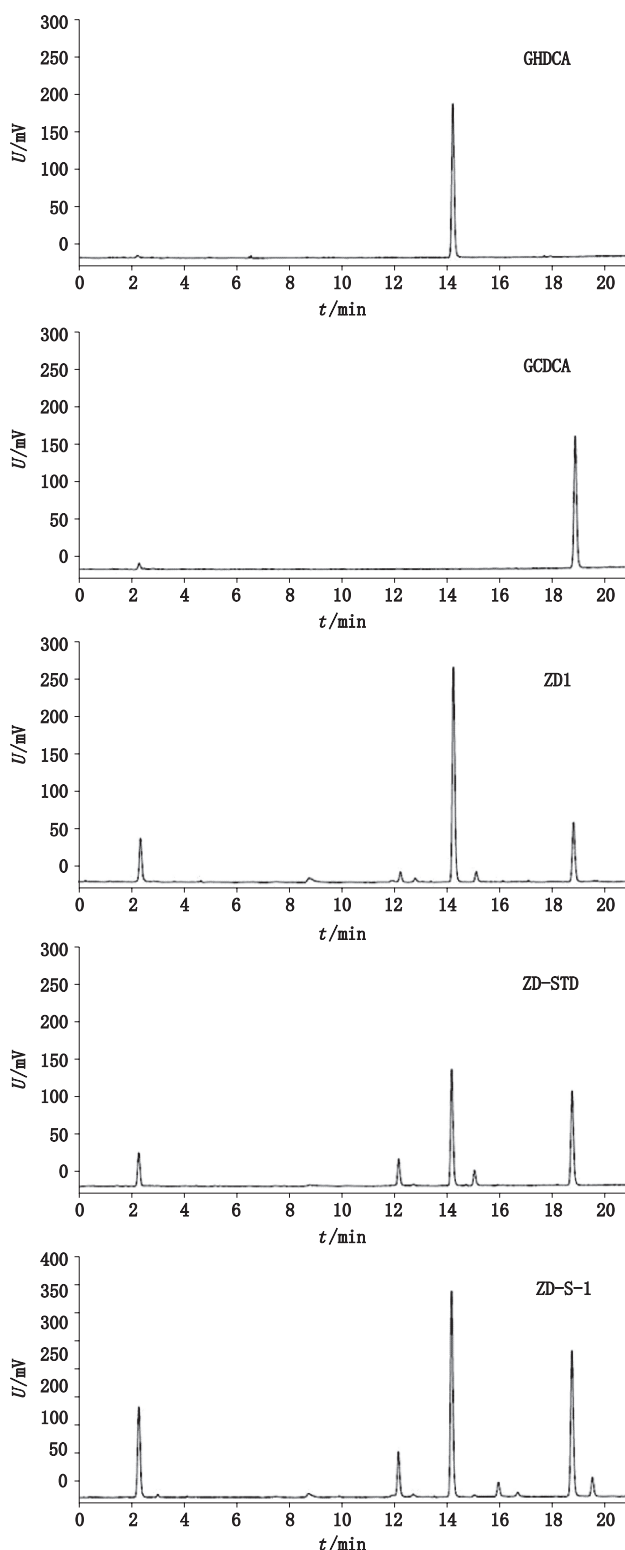


图 1 对照品及样品的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and samples

峰峰面积, 以对照品进样量(μg)的对数值为横坐标, 对应的色谱峰峰面积的对数值为纵坐标, 绘制 GHDCA 和 GCDCA-Na 的标准曲线。GHDCA 和

GCDCA-Na 质量浓度分别在 0.091~0.276 mg·mL⁻¹ 和 0.040~0.200 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 回归方程及相关系数分别为

$$Y=1.440\ 5X+6.036\ 8\quad r^2=0.999\ 2$$

$$Y=1.596\ 3X+5.982\ 3\quad r^2=0.999\ 9$$

2.4.2 精密度试验 取 ZD2 样品的供试品溶液连续进样 6 次, 记录待测成分色谱峰峰面积, 计算 GHDCA 和 GCDCA-Na 峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 1.1%。

2.4.3 重复性试验 取 ZD2 样品, 平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 测定 ZD2 猪胆粉样品中 GHDCA 和 GCDCA (由 GCDCA-Na 换算可得) 的平均含量分别为 32.2% 和 18.4%, RSD 分别为 1.3% 和 1.6%。

2.4.4 回收率试验 取 ZD2 样品 6 份, 每份约 12.5 mg, 分别精密称定并精密加入质量浓度为 0.810 mg·mL⁻¹ 的 GHDCA 对照品溶液和质量浓度为 0.400 mg·mL⁻¹ 的 GCDCA-Na 对照品溶液各 5 mL, 再分别精密加入甲醇 40 mL, 称量, 超声 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 处理 20 min, 甲醇补足减失的量, 过滤, 进样, 测定得 GHDCA 和 GCDCA-Na 的平均回收率 ($n=6$) 分别为 100.6% 和 99.0%, RSD 分别为 1.9% 和 2.3%。

2.4.5 稳定性试验 取 ZD2 样品的供试品溶液, 分别在 0、4、12、24、36、48、60 h 进样, 分别测定 GHDCA 和 GCDCA 的峰面积, 计算两者峰面积的 RSD 分别为 2.3% 和 3.0%, 结果表明供试品溶液 60 h 内稳定性良好。

2.4.6 检测下限与定量下限的确定 将 GHDCA 和 GCDCA-Na 对照品溶液分别稀释至适合的浓度, 信噪比为 3:1 时的进样量 (ng) 为检测下限 (LOD), 信噪比为 10:1 时的进样量 (ng) 为定量下限 (LOQ)。结果 GHDCA 的 LOD 与 LOQ 分别为 15.2 ng 和 50.7 ng, 测定 GCDCA-Na 的 LOD 与 LOQ 分别为 15.0 ng 和 50.0 ng。

2.5 样品测定结果

将 16 批自制猪胆粉样品、5 批市售猪胆粉样品和 1 批猪胆粉对照药材按照“2.1”项方法制备成供试品溶液, 并按照上述色谱条件进行测定, 以标准曲线法计算 GHDCA 和 GCDCA (由 GCDCA-Na 换算可得) 含量, 结果见表 1。

3 全轮廓谱图化学计量学分析

3.1 色谱峰保留时间的校正

由于色谱采集的外部环境变化以及仪器的波动等因素, 各批次样品的色谱图中相同成分的色谱峰的

表 1 猪胆粉样品测定结果

Tab. 1 The contents of the two major BAs in the samples of pig bile powder

序号 (No.)	编号 (code)	来源 (origin)	含量 (content) / %	
			GHDCA	GCDCA
1	ZD1	自制 (self-made sample)	33.4	15.2
2	ZD2	自制 (self-made sample)	32.2	18.4
3	ZD3	自制 (self-made sample)	24.2	26.1
4	ZD4	自制 (self-made sample)	32.8	16.9
5	ZD5	自制 (self-made sample)	25.9	27.0
6	ZD6	自制 (self-made sample)	21.6	23.4
7	ZD7	自制 (self-made sample)	36.5	13.4
8	ZD8	自制 (self-made sample)	16.5	26.3
9	ZD9	自制 (self-made sample)	29.2	18.5
10	ZD10	自制 (self-made sample)	27.0	19.0
11	ZD11	自制 (self-made sample)	34.1	15.7
12	ZD12	自制 (self-made sample)	27.0	23.4
13	ZD13	自制 (self-made sample)	30.1	21.5
14	ZD14	自制 (self-made sample)	24.7	26.3
15	ZD15	自制 (self-made sample)	21.5	12.6
16	ZD16	自制 (self-made sample)	13.4	15.1
17	ZD-STD	对照药材 (reference crude drug)	20.3	19.4
18	ZD-S-1	市售 (commercial sample)	17.7	14.8
19	ZD-S-2	市售 (commercial sample)	14.3	10.6
20	ZD-S-3	市售 (commercial sample)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
21	ZD-S-4	市售 (commercial sample)	6.4	4.5
22	ZD-S-5	市售 (commercial sample)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)

保留时间会有一定的漂移, 因此在全轮廓色谱图的分析之前, 必须要对谱图进行保留时间的校正。

本文中猪胆粉的色谱图有 3 600 个横坐标数据点, 因此 22 批猪胆粉色谱数据可组成 22×3 600 的二维矩阵。本文采用 COW 算法对各批猪胆粉的 HPLC-ELSD 谱图信号进行保留时间的校正; 相关参数: segment length=35, slack size=5; 校正前后见图 2。

由图 2 可知, 未经保留时间校正的各共有色谱峰的出峰时间均有一定程度的波动, 而经过校正后, 各共有色谱峰的出峰时间均能达到较好的一致性, 较好地排除了随机误差及部分系统误差的影响, 适合进行下一步的数据分析。

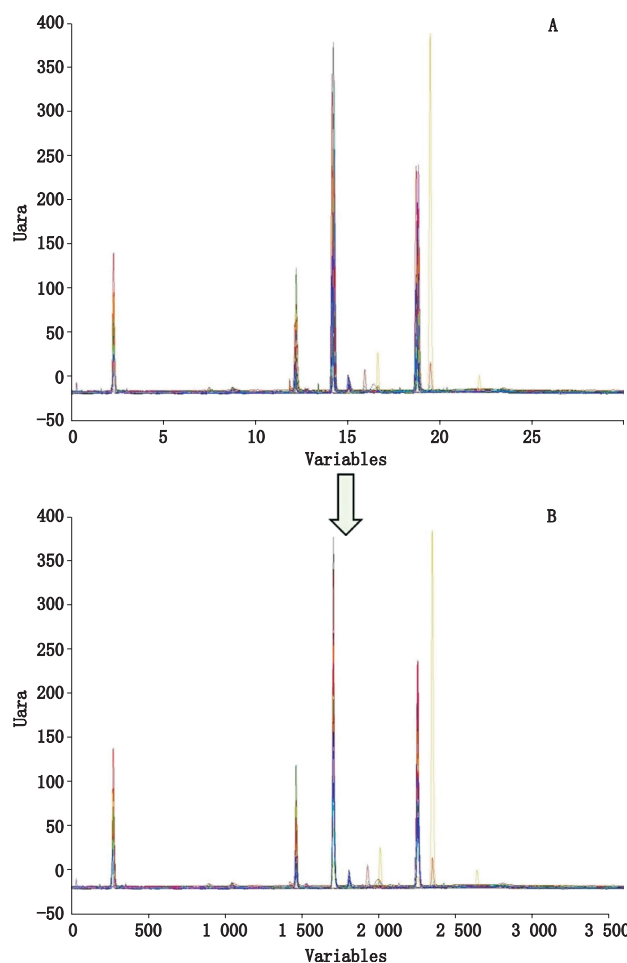


图2 各批样品色谱图校正前(A)和校正后(B)色谱图

Fig. 2 Unaligned (A) and aligned (B) chromatograms of all batches of samples

3.2 系统聚类分析

对校正后的各批样品色谱数据进行分析,即为对该二维矩阵进行分析。不同于色谱峰面积和成分含量,全轮廓谱图常会出现随机信号噪音等可能干扰数据分析的情况,因此为得到最佳的数学分析模型,通常需要在对数据进行分析前对谱图数据进行适当预处理。本文采用标准正态变量法(standard normal variate, SNV)对矩阵数据进行处理,然后对处理得到的数据取一阶导数,最后对经过预处理的矩阵数据进行系统聚类分析(ward法),见图3。

由图3可以看出,16批自制猪胆粉样品、1批猪胆粉对照药材样品和1批市售猪胆粉样品(ZD-S-1)可聚为一类,而其余各批市售猪胆粉样品均不能聚成一类,并且分别与上述聚类距离远近不同,相距最远的样品为ZD-S-3,其次为ZD-S-5。系统聚类分析的结果与各批样品所含主要胆汁类成分的结果具有高度的一致性。

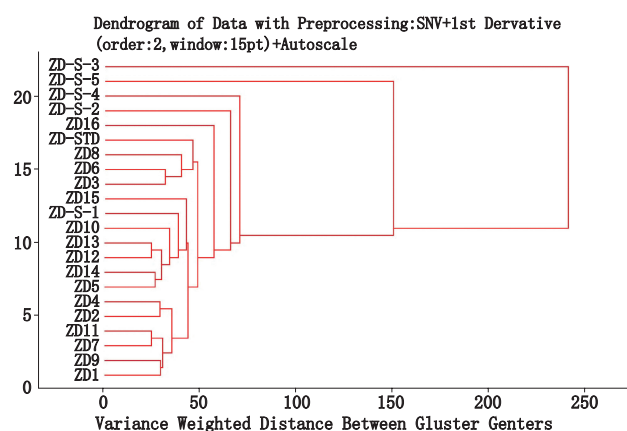


图3 系统聚类分析树状图

Fig. 3 The dendrogram of hierarchical clustering analysis

3.3 主成分分析

与系统聚类分析相同,在对矩阵数据进行主成分分析前,首先采用标准正态变量法和一阶导数法对数据进行预处理。本文所建立的主成分分析模型的前3个主成分方差贡献率分别为53.81%、24.19%和3.80%,可见第一和第二主成分的方差最大,累计方差贡献率已达78.00%,基本达到表征该数学模型的要求,各批样品的第一和第二主成分的二维得分图见图4。

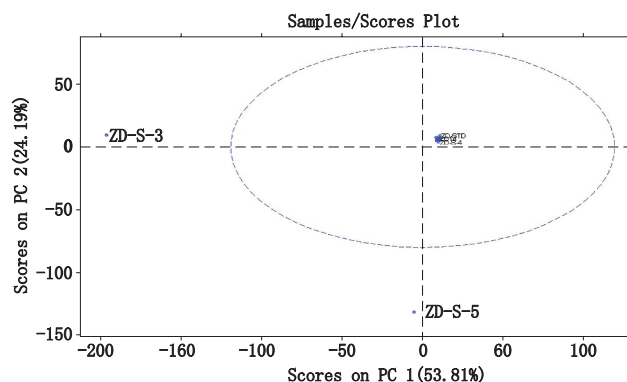


图4 样品主成分分析二维得分图

Fig. 4 The 2D score scatter plot of PCA

由图4可看出2批市售样品ZD-S-3和ZD-S-5距离其他样品均较远,其中ZD-S-3与其他样品的距离主要体现在第一主成分,而ZD-S-5与其他样品的距离主要体现在第二主成分,由于ZD-S-3和ZD-S-5的存在,拉大了图4中的横坐标和纵坐标的比例,相对来说其他样品聚为一类。

将第三主成分加入,绘制样品的三维主成分得分图,见图5。由图5可知,虽然第三主成分的方差贡献率远不及第一和第二主成分,然而将其加入进行分析,可发现更多的样品隐含信息。虽然样品ZD-S-2

和 ZD-S-4 与大部分样品的第一和第二主成分的得分相近,但是第三主成分的得分却差别较大。在图 3 中,样品 ZD-S-1 可以与自制样品和对照药材样品聚成一类,但是其在第三主成分的得分上仍存在一些差异,而自制样品和对照药材样品则完全聚在一起。

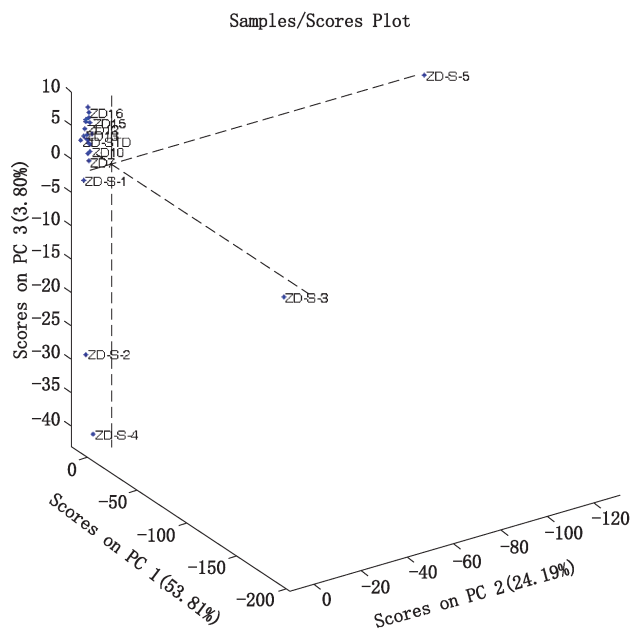


图 5 样品主成分分析三维得分图

Fig. 5 The 3D score scatter plot of PCA

4 讨论

由表 2 可知,2 批市售猪胆粉 ZD-S-3 与 ZD-S-5 中均未检出 GHDCA 和 GCDCA 成分,而其余 20 批猪胆粉样品均可检出 GHDCA 和 GCDCA, GHDCA 含量在 6.4%~36.5% 之间, GCDCA 含量在 4.5%~27.0% 之间,均具有较高含量。在上述 20 批样品中有 15 批样品的 GHDCA 含量高于 GCDCA,占 20 批样品的 75%,而只有 25% 的样品的 GCDCA 含量高于 GHDCA,可见多数情况下,猪胆粉中 GHDCA 含量应该高于 GCDCA 含量。

自制的猪胆粉中, GHDCA 和 GCDCA 的平均含量分别为 26.9% 和 19.9%,而可检出 GHDCA 和 GCDCA 的 3 批市售猪胆粉中 GHDCA 和 GCDCA 的平均含量分别为 12.8% 和 10.0%,猪胆粉对照药材与自制猪胆粉样品中的 GHDCA 和 GCDCA 含量差距不大,而市售猪胆粉中 GHDCA 和 GCDCA 含量则相对较低。

与组分变量相比,全轮廓谱图代表着更大量的样品信息,以其为自变量进行分析所得到的结果显然也更加准确和全面,并且其对色谱峰的完全分离及组

分数值(含量或峰面积)测定的准确性要求很低,最大程度减小了测定的准确性对分析结果造成的影响。本文对全轮廓谱图的分析中所使用的 COW 算法是目前十分常用的信号校正算法,其校正的关键点在于 Segment length 和 Slack size 的优化与选择。该法与传统指纹图谱软件的色谱峰校正方法相比,具有无需预先进行色谱峰的积分处理和对色谱峰分离要求不高的优点,并且可对非共有峰的样品进行统一处理,可更多地保留原谱图的信息。本文采用 2 种无监督的方法对样品进行分析,结果均与含量测定结果的分析一致。

中国药典 2015 年版^[1]明确规定猪胆粉药材的制法为“取猪胆汁,滤过,干燥,粉碎,即得。”本文中自制猪胆粉所用猪胆汁均为从屠宰场购得新鲜猪胆囊,将其小心剪开口后挤出胆汁过滤所得,然后严格按照制法进行干燥并粉碎。在干燥方法选择时,为避免常温下干燥时间过长可能导致的蝇虫污染和腐败变质等情况的发生,采取了冷冻干燥的方式。

通过对样品的分析与测定可以发现,自制的猪胆粉样品与对照药材样品具有高度的一致性,而这两者均与市售猪胆粉药材存在有一定的差异,结合样品的外观性状进行分析,这种情况有可能是加工过程中添加辅料所致。中国药典 2015 年版一部^[1]中对该药材的制法并无可以添加辅料的描述,并且辅料添加的种类等级及其添加的比例也会直接关系到猪胆粉药材的安全性与有效性。5 批市售样品中,有 2 批均未检出 GHDCA 和 GCDCA 这 2 种猪胆粉中的主要胆汁酸类成分,表明这 2 批样品极有可能为假冒的猪胆粉药材,由以上分析可见,市售猪胆粉药材的质量问题十分值得关注。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 319
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 319
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3064
Nanjing University of Chinese Medicine. Great Dictionary of Chinese Medicine [M]. 2nd Ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 2006: 3064
- [3] 邓启华, 姚颖, 刘婷, 等. 猪胆汁中主要胆汁酸的提取分离[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(4): 405
DENG QH, YAO Y, LIU T, et al. The extraction and purification of three kinds of bile acids from pig bile [J]. Chin J Biochem Pharm, 2012, 33(4): 405
- [4] KANDRAC J, KEVRESAN S, GU JK, et al. Isolation and determination

- of bile acids [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, 31 (3): 157
- [5] HE J, LI J, SUN WJ, *et al.* Preparative isolation and purification of three glycine conjugated cholic acids from PULVIS FELLIS SUIS by high-speed countercurrent chromatography coupled with ELSD detection [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2012, 35 (5): 737
- [6] 陈志维, 黎玉翠, 暴梅佳, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定猪胆粉结合胆酸中甘氨酸和牛磺酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30 (2): 288
- CHEN ZW, LI YC, BAO MJ, *et al.* Determination of glycine and taurine in Pulvis Fellis Suis conjugated cholic acid by pre-column derivation on HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30 (2): 288
- [7] 宋占军, 邓振华, 韩纠曼. 薄层扫描法测定熊胆中结合胆汁酸含量 [J]. *药物分析杂志*, 1993, 13 (3): 194
- SONG ZJ, DENG ZH, HAN JM. Determination of conjugated cholic acids in bear bile by TLC-scan [J]. *Chin J Pharm Anal*, 1993, 13 (3): 194
- [8] 何姣, 李静, 朱砂, 等. RP-HPLC 法同时测定猪胆粉药材中 3 种牛磺结合型胆酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32 (2): 229
- HE J, LI J, ZHU S, *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of three tauro-conjugated cholic acids in Pulvis Fellis Suis [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32 (2): 229
- [9] KONG WJ, JIN C, LIU W, *et al.* Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five bile acid derivatives in Calculus Bovis and its medicinal preparations [J]. *Food Chem*, 2010, 120 (4): 1193
- [10] KONG WJ, JIN C, XIAO XH, *et al.* Determination of multicomponent contents in Calculus Bovis by ultra-performance liquid chromatography - evaporative light scattering detection and its application for quality control [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33 (10): 1518
- [11] ROCCALDO S, ANTIMO G, FEDERICA I, *et al.* HPLC-ELSD analysis of amidated bile acids: an effective and rapid way to assist continuous flow chemistry processes [J]. *Talanta*, 2012, 100 (10): 364
- [12] GEORG K, GUSTAV P. Analysis of bile acids in serum and bile by capillary gas-liquid chromatography [J]. *J Lipid Res*, 1978, 19 (6): 771
- [13] GOWDA GAN, SHANAIAH N, COOPER A, *et al.* Bile acids conjugation in human bile is not random; new insights from ^1H -NMR spectroscopy at 800 MHz [J]. *Lipids*, 2009, 44 (6): 527
- [14] OMKAR BI, TEDROS B, NILS A. *et al.* Simultaneous quantification of glycine- and taurine-conjugated bile acids, total bile acids, and choline-containing phospholipids in human bile using ^1H NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53 (3): 667
- [15] HU Z, HE LC, ZHANG J, *et al.* Determination of three bile acids in artificial Calculus Bovis and its medicinal preparations by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 837 (1-2): 11
- [16] HE J, ZHANG YM, ITO Y, *et al.* Semi-preparative isolation and purification of three tauro-conjugated cholic acids from Pulvis Fellis Suis by HSCCC coupled with ELSD detection [J]. *Chromatographia*, 2011, 73 (3-4): 361
- [17] TSAI S, ZHONG YS, WENG JF, *et al.* Determination of bile acids in pig liver, pig kidney and bovine liver by gas chromatography-chemical ionization tandem mass spectrometry with total ion chromatograms and extraction ion chromatograms [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218 (3): 524
- [18] KELLER S, JAHREIS G. Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 813 (1-2): 199
- [19] GAUTROT J, ZHU XX. Molar mass of main-chain bile acid-based oligo-esters measured by SEC, MALDI-TOF spectrometry and NMR spectroscopy: a comparative study [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 581 (2): 281
- [20] MIMS D, HERCULES D. Quantification of bile acids directly from urine by MALDI-TOF-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375 (5): 609
- [21] MIMS D, HERCULES D. Quantification of bile acids directly from plasma by MALDI-TOF-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378 (5): 1322
- [22] CRISTINA LQ, LINDSAY MD, HECTOR VM, *et al.* Bile UPLC-MS fingerprinting and bile acid fluxes during human liver transplantation [J]. *Electrophoresis*, 2011, 32 (15): 2063
- [23] XIANG X, HAN Y, NEUVONEN M, *et al.* High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of bile acid concentrations in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878 (1): 51
- [24] HAGIO M, MATSUMOTO M, FUKUSHIMA M, *et al.* Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS [J]. *J Lipid Res*, 2008, 50 (1): 173
- [25] LI K, WANG H, BRANT C, *et al.* Multiplex quantification of lamprey specific bile acid derivatives in environmental water using UHPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879 (32): 3879
- [26] WANG G, STACEY N, EARL J. Determination of individual bile acids in serum by high performance liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 1990, 4 (4): 136
- [27] CAVRINI V, GATTI R, RODA A, *et al.* HPLC-fluorescence determination of bile acids in pharmaceuticals and bile after derivatization with 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1993, 11 (8): 761
- [28] GATTI R, RODA A, CERRE C, *et al.* HPLC-fluorescence determination of individual free and conjugated bile acids in human serum [J]. *Biomed Chromatogr*, 1997, 11 (1): 11
- [29] MILAN N, MILAN P, JIŘÍ K, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of ursodeoxycholic acid after solid phase extraction of blood serum and detection-oriented derivatization [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24 (s5-6): 937

(本文于 2016 年 3 月 3 日收到)