

## 西黄丸 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

周杰<sup>1</sup>, 商雪莹<sup>1</sup>, 佟玲<sup>2</sup>, 刘晓琳<sup>2</sup>, 张蕾<sup>1\*</sup>

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 天津天士力集团研究院, 天津 300410

**摘要:** 目的 建立西黄丸的 HPLC-ELSD 指纹图谱的质量评价方法。方法 采用 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.5%醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 ℃。蒸发光散射检测器的条件为漂移管温度 45 ℃, 载气体积流量 1.5 L/min。结果 建立了西黄丸 HPLC 指纹图谱共有模式, 标定出 25 个共有峰, 有 24 个共有峰来自乳香, 1 个共有峰 (2 号峰) 来自体外培育牛黄, 西黄丸不同批次之间相似度均大于 0.9, 采用聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和特征图谱相似度分析对 10 批西黄丸 HPLC 特征图谱进行评价, 找出相对差异较大的样品以及对于西黄丸质量影响较大的成分。

**结论** 该 HPLC 指纹图谱结合模式识别可以较好地反映西黄丸的内在质量, 为西黄丸的进一步研究提供科学依据。

**关键词:** 西黄丸; HPLC-ELSD; 指纹图谱; 质量评价; 11-羰基-β-乙酰乳香酸; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2219-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.011

## Study on fingerprint analysis of Xihuang Pills by HPLC-ELSD

ZHOU Jie<sup>1</sup>, SHANG Xue-ying<sup>1</sup>, TONG Ling<sup>2</sup>, LIU Xiao-lin<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>

1. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Institute of Pharmaceutical Analysis, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To establish the quality evaluation of fingerprints of Xihuang Pills by HPLC-ELSD. **Methods** The chromatography conditions were defined as waters C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Mobile phase was methanol-0.5% acetic acid, gradient elution; temperature of column was set at 30 ℃. The ELSD conditions were as follows: the temperature of drift tube was 45 ℃, the gas speed was 1.5 L/min. Ten batches of Xihuang Pills samples were analyzed for similarity analysis (SA), hierarchical clustering analysis (HCA) and principle component analysis (PCA). **Results** The chromatographic fingerprint was completed with 25 recognizable peaks, and the samples with great differences and the compounds with greater impact on the quality were obtained through HCA and PCA. **Conclusion** HPLC fingerprint combining with pattern recognition could reflect the intrinsic quality to provide a scientific basis for the quality control of Xihuang Pills.

**Key words:** Xihuang Pills; HPLC-ELSD; fingerprint; quality assessment; acetyl-11-keto-β-boswellic acid; principle component analysis; hierarchical clustering analysis

西黄丸, 又名犀黄丸, 出自清·王洪绪所著《外科证治全生集·卷四》, 由体外培育牛黄 15 g、人工麝香 15 g、乳香 (醋制) 550 g 和没药 (醋制) 550 g 4 味药组成, 全方配合, 具有清热解毒、消肿散结之功效。用于热毒壅结所致痈疽疔毒、瘰癧、癌肿等症<sup>[1-6]</sup>。现代药理学研究显示西黄丸具有抗肿瘤、增强免疫功能、抗菌和抗炎等活性<sup>[7]</sup>, 临床主要用于多种恶性肿瘤 (如白血病、肝癌、肺癌、乳腺癌

等) 和良性肿瘤疾病的治疗<sup>[8-10]</sup>。其质量标准收载于《中国药典》2015 年版, 采用性状鉴别、显微鉴别 (体外培育牛黄和麝香)、薄层鉴别 (乳香)、猪去氧胆酸的检查、游离胆红素的检查和总胆红素的定量测定作为西黄丸的评价标准<sup>[11]</sup>。这些评价标准具有一定的质量控制作用, 但难以有效控制由多味中药组成的中药复方制剂的内在质量。

随着西黄丸的生产厂家日益增多及对中药质

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A020226031); 广州市科技计划项目 (201607010334)

作者简介: 周杰, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 15626250632 E-mail: zhoujie\_gz@163.com

\*通信作者 张蕾, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础与药动学研究。Tel: (020)39358081 E-mail: zhangleic431@163.com

量要求的日渐提高,更加全面地、符合现代评价标准的质量控制方法愈加重要。本课题组通过采用被广泛认可的指纹图谱<sup>[12-13]</sup>评价系统来对西黄丸中的成分进行质量评价和控制,建立了能反映内在质量差异的西黄丸质量控制方法。本实验对西黄丸非挥发性部位进行研究,为西黄丸质量标准的提高提供依据。

## 1 仪器与材料

LC-20A 型高效液相色谱仪,包括 SPD-M20A 检测器、DGU-20A 四元泵,日本 Shimadzu 公司; AEG-220 型电子天平,万分之一,日本岛津公司; BP211D 型电子天平,十万分之一,德国 Sartorius 公司; KQ-300DE 型超声清洗仪,昆山市超声仪器有限公司。

体外培育牛黄对照药材(批号 140925)、人工麝香对照药材(批号 140816)、乳香对照药材(批号 120970-201305)、天然没药对照药材(批号 120967-201104)、胶质没药对照药材(批号 121250-201104)及 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸对照品(批号 111760-201502,质量分数>98%)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯,天津市致远化学试剂有限公司。乳香、没药、体外培育牛黄、麝香药材由广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室周劲松副教授鉴定分别为橄榄科乳香属植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 树皮渗出的树脂、橄榄科没药属植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂、牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的新鲜胆汁作为母液,再加入去氧胆酸、胆酸、复合胆红素钙等制成的干粉和鹿科动物林麝 *Moschus berezovskii* Flerov. 雄体香囊中的干燥分泌物。西黄丸 10 个批次分别为 20140509、20140625、20140712、20140726、20140873、20140950、20141142、20141143、20140507、20140508,均由天津天士力(辽宁)制药责任有限公司提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取西黄丸粉末 1.00 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密移取 20 mL 甲醇,具塞冰浴超声 20 min,提取 2 次,放至室温,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液于梨形瓶中,减压浓缩,用甲醇复溶并转移至 25 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

### 2.2 对照品溶液的制备

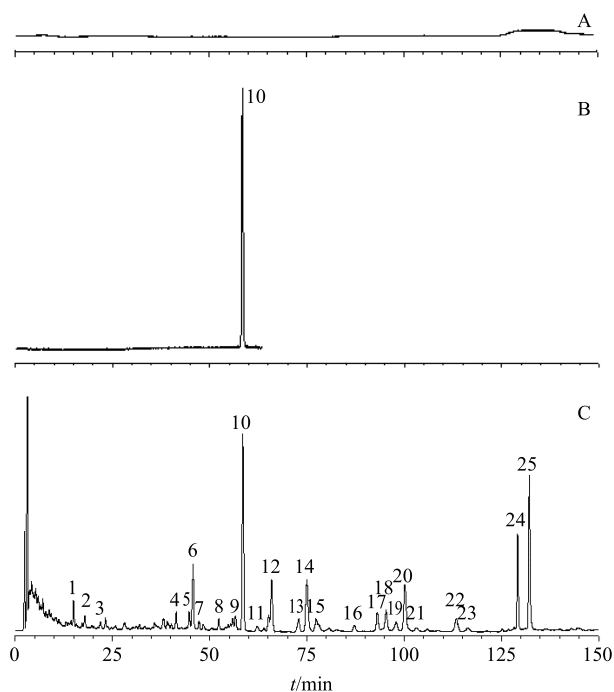
取 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成质量浓度为 1.22 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, Waters Symmetry C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);进样量 20  $\mu$ L;柱温 30  $^{\circ}$ C;体积流量 0.8 mL/min;流动相为甲醇-0.5%醋酸水溶液,程序洗脱,洗脱程序为 0~10 min, 75%甲醇;10~45 min, 75%~87%甲醇;45~75 min, 87%甲醇;75~85 min, 87%~90%甲醇;85~115 min, 90%甲醇;115~120 min, 90%~97%甲醇;120~150 min, 97%甲醇;检测器为蒸发光散射检测器,漂移管温度为 45  $^{\circ}$ C;空气体积流量 1.5 L/min,增益为 2。典型色谱图见图 1。

### 2.4 指纹图谱研究

**2.4.1 精密度试验** 取同一批西黄丸粉末(批号 20140726),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图。选取位于色谱图居中且色谱峰面积最大的 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸(10 号



1~25-10 批西黄丸指纹图谱共有峰 10-11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸  
1—25-the fingerprint common peaks of 10 batches Xihuang Pill  
10-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid

图 1 空白对照 (A)、11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸对照品 (B) 和西黄丸供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank (A), acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid reference substance (B), and Xihuang Pill sample (C)

峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.08%~0.71%,相对峰面积的 RSD 为 1.56%~4.96%,表明该仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取同一批西黄丸粉末(批号 20140726),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别在 0、2.5、5、7.5、10、12.5、15 h 进样,记录色谱图。以 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸(10 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.07%~0.69%,相对峰面积的 RSD 为 2.77%~4.56%,表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批号的西黄丸粉末(批号 20140726)6 份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,记录色谱图,

以 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸(10 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.17%~1.70%,相对峰面积的 RSD 为 1.59%~4.90%,表明该方法重复性良好。

**2.4.4 共有模式的建立及共有峰的确定** 取西黄丸 10 个不同批号的样品,按“2.1”项下方法处理成供试品溶液进样测定,记录色谱图。通过“中药指纹图谱相似度评价系统 2004A”软件生成对照指纹图谱色谱图,并对 10 批西黄丸样品的色谱指纹峰进行匹配并叠加,结果见图 2。将出现频率为 100%且峰面积占比不小于 0.35%的色谱峰界定为指纹图谱共有峰,以中位数法筛选指纹图谱特征峰,获得 25 个共有峰,见图 1-C。

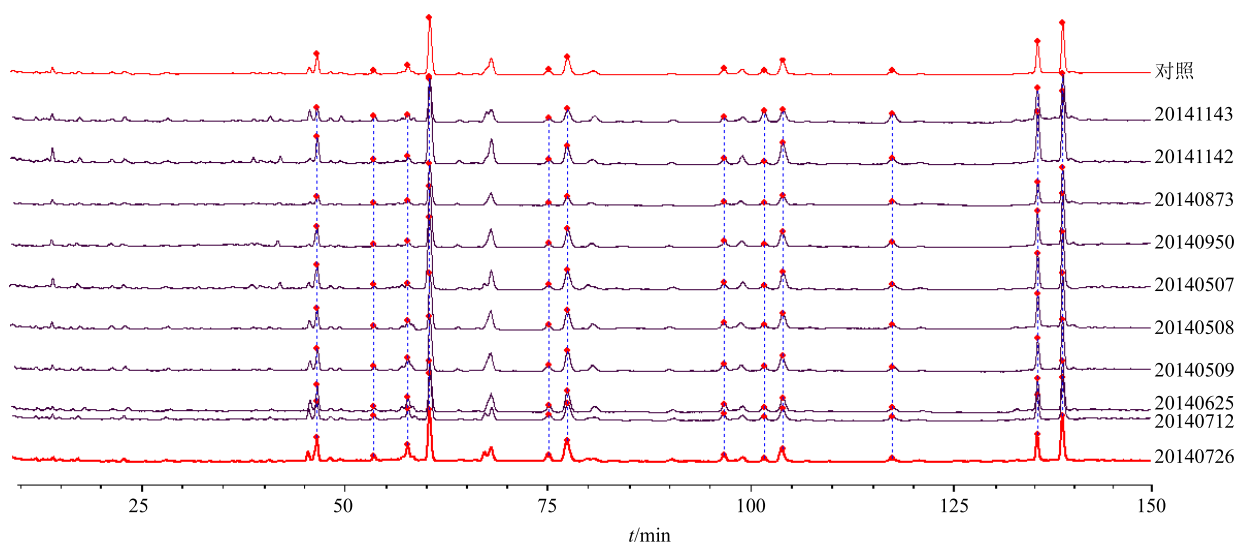


图 2 10 批西黄丸样品的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Xihuang Pills

**2.4.5 特征性成分<sup>[14]</sup>的定量测定** 取 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别进样 1、2、4、8、16、30  $\mu$ L,记录色谱图,以峰面积的自然对数为纵坐标( $Y$ ),以进样量的自然对数为横坐标( $X$ ),绘制标准曲线,进行线性回归,得到回归方程  $Y=1.399 X+12.90$ ,  $r=0.999 5$ ,线性范围 0.10~3.00  $\mu$ g。

取西黄丸样品,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法计算样品中 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸的质量分数。结果表明,10 批样品中 11-羧基- $\beta$ -乙酰乳香酸的质量分数在 9.67~18.20 mg/g。

**2.4.6 共有峰归属研究** 为了确认西黄丸样品共有峰的来源,采用从成品图谱逆向回溯至原料药材的

方式,将西黄丸中乳香、没药、牛黄、乳香药材按“2.1”项下方法分别制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样<sup>[15]</sup>,结果见图 3。将各个原料药材色谱图与供试品色谱图共有峰进行对比,发现西黄丸中 25 个共有峰中有 24 个共有峰来自乳香,1 个共有峰(2 号峰)来自体外培育牛黄。

**2.4.7 西黄丸 HPLC 指纹图谱的相似度评价** 相似度是评价中药指纹图谱的 1 个重要参数,是根据指纹图谱的整体相似程度来计算中药化学组分整体波动程度的一种评价方法,据此分析中药制剂的稳定性及中药化学成分的均一性,相似度越高说明西黄丸样品间化学成分均一性越好。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A”对样品指纹图谱进行相似度评价。结果批号为 20140509、20140625、

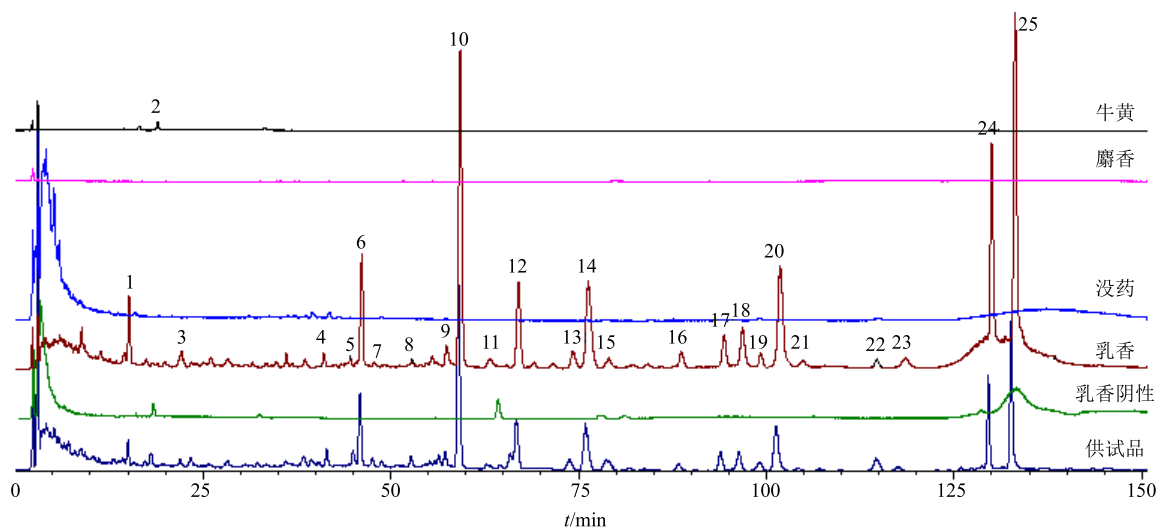


图 3 西黄丸指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig. 3 Fingerprint of characteristic peaks in Xihuang Pills

20140712、20140726、20140873、20140950、20141142、20141143、20140507、20140508 的样品与对照指纹图谱的相似度分别为 0.985、0.987、0.990、0.994、0.992、0.982、0.988、0.968、0.972、0.991，可见西黄丸样品与对照指纹图谱的相似度均大于 0.9，表现出较好的化学成分一致性。

## 2.5 基于聚类分析评价西黄丸质量

聚类分析是将相似样品归类的最常用方法，能根据共有峰的相对峰面积将样品聚类，还能反映样品之间的相近程度，在指纹图谱研究中具有直观、结论形式简明的特点<sup>[16-17]</sup>。为了全面、直观地了解 10 个批次的西黄丸化学成分之间的异同，采用 SPSS 19.0 中的系统聚类分析对西黄丸批次之间的差异进行分析。在进行聚类分析中，为了综合尽可能多的信息，选取了指纹图谱中共有率 $\geq 80\%$ 的色谱峰信息作为分析变量。聚类方法为组间联结，采用余弦为度量方法。结果见图 4，10 个批次西黄丸之间欧氏距离系数在 0~25 变动，当欧氏距离在 19~25，10 批西黄丸分为 2 个表征群，20140950 批次的西黄丸表现出相对明显的差异性；欧氏距离在 16~19，20141143 批次的西黄丸与其余 8 批西黄丸区别。

## 2.6 基于主成分分析 (PCA) 评价西黄丸质量

在评价西黄丸质量时引入“降维”的概念，也就是 PCA。PCA 是最常用的多指标线性的降维压缩和多变量分析方法，可将众多具有一定相关性的变量，重新组合成一组新的、相互无关的综合指标来代替原有的变量，从而实现以最少的主成分尽可能

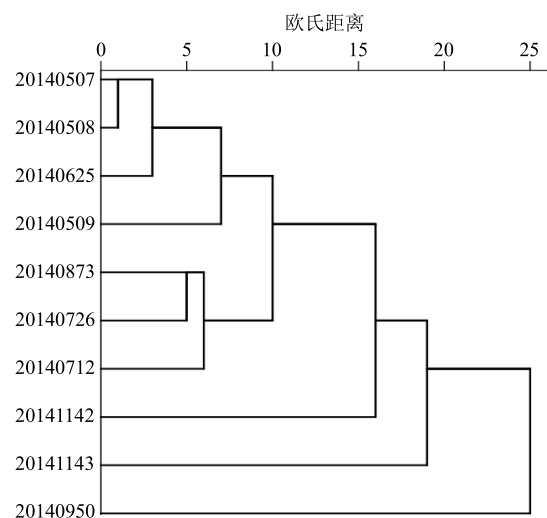


图 4 10 批西黄丸指纹图谱聚类分析

Fig. 4 Fingerprint cluster analysis of 10 batches of Xihuang Pills

多的体现原变量的信息<sup>[18-19]</sup>。本实验运用 SPSS 19.0 统计分析软件进行 PCA，得到主成分方差以及旋转成分矩阵。结果见表 1，提取的前 4 个因子解释的方差占总方差的 90.881%，能比较全面地反映整体的样品信息。为从 PCA 模型中获取更多不同产地样本化学组成差异的信息，提取 PCA 模型的载荷因子。因为在 PCA 模型中，PC1、PC2 和 PC3 的累积贡献率达 83.926%，是主要成分，因此，只探讨 PC1、PC2 和 PC3 的载荷即可说明不同批次西黄丸样品化学成分的差异。

在表 2 旋转成分矩阵中可以看到，与第一因子

表 1 西黄丸的 PCA  
Table 1 PCA results of Xihuang Pills

| 主成分 | 初始特征值 |         |         | 提取平方和 |        |         |
|-----|-------|---------|---------|-------|--------|---------|
|     | 合计    | 贡献率方差/% | 累积贡献率/% | 合计    | 方差%    | 累积贡献率/% |
| PC1 | 6.404 | 42.695  | 42.695  | 6.404 | 42.695 | 42.695  |
| PC2 | 3.470 | 23.137  | 65.831  | 3.470 | 23.137 | 65.831  |
| PC3 | 2.714 | 18.095  | 83.926  | 2.714 | 18.095 | 83.926  |
| PC4 | 1.043 | 6.955   | 90.881  | 1.043 | 6.955  | 90.881  |
| PC5 | 0.591 | 3.940   | 94.821  |       |        |         |
| PC6 | 0.372 | 2.483   | 97.305  |       |        |         |
| PC7 | 0.290 | 1.935   | 99.240  |       |        |         |
| PC8 | 0.088 | 0.588   | 99.828  |       |        |         |
| PC9 | 0.026 | 0.172   | 100.000 |       |        |         |

表 2 西黄丸成分的载荷分析  
Table 2 Load analysis of components in Xihuang Pills

| 成分 (峰号) | 主成分    |        |        |        |
|---------|--------|--------|--------|--------|
|         | PC1    | PC2    | PC3    | PC4    |
| 15      | 0.969  | 0.043  | 0.003  | 0.179  |
| 12      | 0.945  | 0.046  | -0.056 | 0.162  |
| 14      | 0.918  | -0.229 | 0.159  | -0.027 |
| 6       | 0.812  | 0.096  | -0.167 | 0.389  |
| 2       | 0.781  | 0.564  | -0.124 | 0.183  |
| 5       | -0.084 | 0.929  | 0.069  | -0.227 |
| 1       | -0.013 | 0.883  | -0.082 | 0.071  |
| 8       | 0.486  | 0.809  | 0.048  | 0.296  |
| 11      | -0.096 | 0.029  | 0.968  | 0.164  |
| 4       | -0.141 | 0.027  | 0.903  | -0.292 |
| 13      | 0.314  | -0.135 | 0.860  | 0.291  |
| 3       | -0.124 | 0.608  | 0.636  | 0.052  |

相关较密切的成分(峰号)是 15、12、14、6、2,这 5 个成分对第 1 因子具有显著贡献,且依次降低;成分(峰号)5、1、8 对第 2 因子有显著贡献;成分(峰号)11、4、13、3 对第 3 因子有显著贡献。因而,不同批次的西黄丸样品化学组成的差异主要体现在这 12 种成分(15、12、14、6、2、5、1、8、11、4、13、3)量的不同。

将数据代入 Simca-p 12.0 作图,得到 PCA 二维分布散点图,见图 5,可以看出,10 批西黄丸中成分大部分样品表现在一个表征群,小部分样品存在部分离散,与聚类分析的结果一致。

### 3 讨论

中药指纹图谱能够较为全面地反映中药饮片及

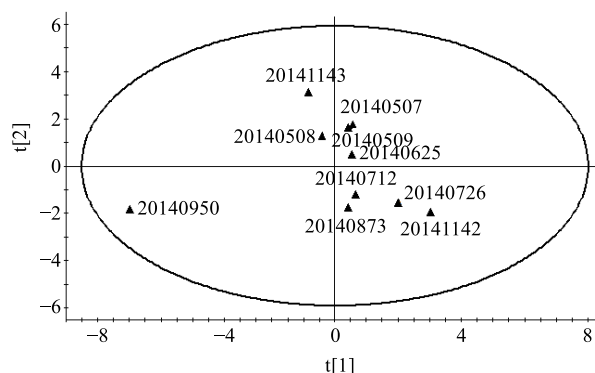


图 5 10 批西黄丸指纹图谱主成分二维分布散点图

Fig. 5 PCA projection of 10 batches of Xihuang Pills

中成药所含化学成分的信息,进而对药品质量进行整体描述和评价<sup>[20-21]</sup>。本实验建立了西黄丸甲醇提取液的 HPLC 指纹图谱,标定出其中的 25 个共有峰,通过模式识别分析,可直观、灵敏地反映出不同批次西黄丸的内在成分差异。可以看到此 10 批西黄丸色谱峰之间的相似度较高,表现出其化学成分的均一性;在聚类分析的结果与二维分布散点图中可以看出,批号为 20140950 的西黄丸的色谱信息在这 10 批样本中表现出相对明显的差异性。

通过聚类分析发现不同批次的西黄丸之间化学成分均一性良好,结合主成分二维分布散点图可以看出 10 批样品之间化学成分质量的均一性,需要注意的是在主成分二维空间散点分布图中可以看出个别样品,如 20140950 和 20141143 批次的西黄丸,相对其他批次样本的微小差异也是可以被精确地加以区分,这也与聚类分析的结果一致。本研究引入“降维”的概念来对色谱峰信息进行 PCA,找出造成差异的主要化学成分及其对样品差异的贡献程

度,从而为西黄丸制定更加合理的质量控制标准提供依据。

#### 参考文献

- [1] 陈信义,王婧,张雅月,等.西黄丸药效学研究及治疗肿瘤特点分析[J].中华中医药杂志,2010,25(3):409-412.
- [2] 郭杨志,冯兴中,杜娟,等.西黄丸联合化疗治疗恶性肿瘤疗效的 Meta 分析[J].中医杂志,2015,56(11):929-933.
- [3] 肖桦,秦旭华,赖宇,等.西黄丸含药血清经 Wnt 信号转导通路细胞周期蛋白 D1 调控人肺癌干细胞增殖的机制[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(15):172-176.
- [4] 马杰,王一尧,杨伟,等.西黄丸抗肿瘤作用及其免疫清除功能的实验研究[J].中国中药杂志,2014,39(8):1499-1501.
- [5] 戴一.西黄丸的药理作用及临床应用概况[J].药物评价研究,2012,35(6):473-476.
- [6] 樊永平.中医辨证结合西黄丸治疗 1 例脑干胶质瘤体会[J].中华中医药杂志,2010,1(2):245-248.
- [7] 杨伟,关硕,胡俊霞,等.西黄丸对荷瘤大鼠的抗肿瘤及其对炎症因子的调节作用[J].现代药物与临床,2013,28(6):847-850.
- [8] 程志强.西黄丸治疗晚期原发性肝癌 23 例疗效观察[J].中华中医药杂志,2010,25(1):52-54.
- [9] 陈筱婷,葛鑫宇,刘彬,等.西黄丸含药血清对 SW480 人结肠癌细胞迁移及侵袭的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(2):136-141.
- [10] 金娟,李志鸿.西黄丸联合化疗治疗乳腺癌 30 例[J].中华中医药杂志,2010,25(5):715-716.
- [11] 中国药典[S].一部.2015.
- [12] 胡军华,任继华,王雪,等.过敏性鼻炎颗粒毛细管气相指纹图谱研究[J].中草药,2016,47(6):923-927.
- [13] 刘瞳.北刘寄奴的指纹图谱分析与主要成分含量测定[D].北京:中央民族大学,2016.
- [14] 周杰,商雪莹,佟玲,等.HPLC-ELSD 法同时测定西黄丸中 6 种乳香酸类成分[J].中草药,2017,48(4):706-709.
- [15] 王祥红,谢培山,田润涛,等.复方中成药保济丸的 HPLC-DAD 指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2007,32(17):1748-1751.
- [16] 王元清,韩彬,向荣,等.总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性[J].中草药,2015,46(19):2863-2869.
- [17] 李海娟,赵鑫,贾庆飞,等.东北 6 种蒲公英瘦果形态聚类分析及分子系统学证据[J].药学报,2012,47(8):1063-1069.
- [18] 赵洪芝,孟宪生,叶挺祥,等.六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究[J].中草药,2010,41(1):48-51.
- [19] 李振皓,刘培,钱大玮,等.主成分分析用于香附四物汤效应部位体外经皮渗透的研究[J].药学报,2013,48(6):933-939.
- [20] 徐益清,杨辉,罗友华.高效液相色谱指纹图谱在中药制药过程中的研究进展[J].海峡药学,2016,28(2):8-11.
- [21] 于姗姗,李敏,张秋红.中药配方颗粒的指纹图谱研究进展[J].中国执业药师,2016,13(1):38-40.