

基于非靶向与靶向代谢组学探究天然与人工麝香组方西黄丸中挥发性成分的差异

王静¹, 徐芳竹¹, 孟莉², 朱麒麟¹, 赵焕君¹, 于彩娜¹, 陈雪莲³, 高慧^{1*}, 袁子民^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034;

3. 广东省妇幼保健院, 广州 510000)

[摘要] 目的:采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS)和气相色谱-三重四极杆质谱法(GC-QqQ-MS)结合非靶向和靶向代谢组学方法,系统分析天然麝香与人工麝香组方西黄丸的化学成分差异,建立天然麝香与人工麝香组方西黄丸的鉴别体系。方法:采用HS-SPME-GC-MS技术非靶向代谢组学方法检测8个厂家9个批次西黄丸的挥发性成分,通过美国国家标准与技术研究院(NIST)谱库质谱信息鉴定挥发性成分,通过正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)确定天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的差异性挥发性成分。采用GC-QqQ-MS靶向代谢组学方法测定9个厂家27个批次西黄丸中 α -蒎烯、 β -榄香烯、麝香酮、脱氢表雄甾酮、乙酸龙脑酯、乙酸辛酯的含量并进行聚类分析、主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),确定鉴别天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的差异性挥发性成分。结果:西黄丸非靶向代谢组学研究鉴定出291种挥发性成分,主要类别包括烯类、酯类、烷烃、醇类、酮类、萜类等成分。OPLS-DA结果表明由人工麝香组方的西黄丸(A1、C1、D1、E1、F1、G1、I1)与由天然麝香组方的西黄丸(H1、H3)有明显的分离,筛选出差异性成分30种,进一步雷达图分析发现,辛醇、乙酸龙脑酯和麝香酮相对含量存在显著差异。靶向代谢组学的聚类分析和PCA结果表明,由天然麝香组方的西黄丸H1、H3与由人工麝香组方的西黄丸及西黄丸H2分成两类;PLS-DA确定差异性挥发性成分为麝香酮、乙酸辛酯和脱氢表雄甾酮,乙酸辛酯含量在此两组中无显著差异,麝香酮和脱氢表雄甾酮在此两组西黄丸中有明显差异($P<0.05$)。结论:麝香酮和脱氢表雄甾酮可用于天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的鉴别。该研究系统、全面地分析了天然麝香组方西黄丸和人工麝香组方西黄丸所含主要挥发性成分种类与含量差异,可为西黄丸的质量评价与控制提供科学依据。

[关键词] 西黄丸; 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS); 气相色谱-三重四极杆质谱法(GC-QqQ-MS); 天然麝香; 人工麝香; 鉴别; 麝香酮; 脱氢表雄甾酮

[中图分类号] R242;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0194-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251968

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250917.1057.002>

[网络出版日期] 2025-09-17 14:25:20 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Volatile Component Differences in Xihuangwan Prepared with Natural and Artificial Musk Based on Non-targeted and Targeted Metabolomics

WANG Jing¹, XU Fangzhu¹, MENG Li², ZHU Qizhen¹, ZHAO Huanjun¹, YU Caina¹, CHEN Xuelian³,

GAO Hui^{1*}, YUAN Zimin^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China;

2. Liaoning Academy of TCM, Shenyang 110034, China;

3. Guangdong Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-

[收稿日期] 2025-07-08

[基金项目] 辽宁省科技厅联合基金项目(2023-MSLH-148);辽宁省教育厅基本科研项目储备项目(2024-JYTCB-054)

[第一作者] 王静,博士,副教授,从事中药质量评价及物质基础研究,Tel:0411-85890139,E-mail:wjyuanmeng@163.com

[通信作者] *袁子民,博士,教授,从事中药药剂及炮制机制研究,Tel:0411-85890145,E-mail:yuanzimin@163.com;

*高慧,博士,教授,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890146,E-mail:gaohuitcm@163.com

MS) and GC-triple quadrupole MS (GC-QqQ-MS) in combination with non-targeted and targeted metabolomics were employed to systematically analyze the chemical composition differences of Xihuangwan prepared with natural musk and artificial musk, and establish an identification system for them. **Methods:** The volatile components of 9 batches of Xihuangwan samples from 8 manufacturers were analyzed by HS-SPME-GC-MS non-targeted metabolomics, and identified by comparing their MS data with the National Institute of Standards and Technology (NIST) spectral library. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was used to identify differential volatile components of Xihuangwan prepared with natural musk and artificial musk. Additionally, GC-QqQ-MS targeted metabolomics was applied to quantify the levels of α -pinene, β -elemene, muscone, dehydroepiandrosterone, bornyl acetate, and octyl acetate in 27 batches of samples from 9 manufacturers. Cluster analysis, principal component analysis (PCA), and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were conducted to further explore the differences in volatile components between Xihuangwan samples prepared with natural musk and artificial musk. **Results:** Non-targeted metabolomics identified 291 volatile compounds in Xihuangwan, including alkanes, esters, alkanes, alcohols, ketones, naphthalenes and others. OPLS-DA analysis revealed distinct separation between Xihuangwan samples containing artificial musk (A1, C1, D1, E1, F1, G1, I1) and those containing natural musk (H1, H3). A total of 30 differential metabolites were identified. The relative contents of these 30 differential metabolites were visualized using a radar chart, revealing significant differences in the levels of octanol, borneol acetate and muscone. Cluster analysis and PCA results from targeted metabolomics indicated that Xihuangwan could be classified into two distinct groups: one composed of natural musk (H1, H3) and the other of artificial musk, sample H2. PLS-DA identified muscone, octyl acetate, and dehydroepiandrosterone as key differential volatile components. Although no significant difference was observed in the content of octyl acetate between the two groups, statistically significant differences were found for muscone and dehydroepiandrosterone ($P < 0.05$). **Conclusion:** Muscone and dehydroepiandrosterone can be used for the differentiation of Xihuangwan samples containing natural musk from those containing artificial musk. This study systematically and comprehensively analyzed the differences in the types and contents of major volatile components in Xihuangwan prepared with natural musk and artificial musk, providing a scientific basis for quality evaluation and control of Xihuangwan.

[Keywords] Xihuangwan; headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS); GC-triple quadrupole MS (GC-QqQ-MS); natural musk; artificial musk; identification; muscone; dehydroepiandrosterone

西黄丸是抗癌经典名方, 记载于清代名医王洪绪《外科证治全生集》, 由牛黄、麝香、醋乳香、醋没药4味贵细药材组成^[1], 具有清热解毒、消肿散结的功效; 在现代临床上多应用于恶性肿瘤类疾病的治疗及其辅助治疗^[2-5], 方中的牛黄有体外培育牛黄、人工牛黄和天然牛黄3种, 麝香有人工麝香和天然麝香2种, 因此, 市场上销售的西黄丸可以分为两类, 由天然牛黄、天然麝香组方的西黄丸和由非天然牛黄(体外培育牛黄或人工牛黄)、人工麝香组方的西黄丸。2025年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)对西黄丸的质量评价包括牛黄、体外培育牛黄、麝香的显微鉴别, 乳香的薄层鉴别, 猪去氧胆酸和游离胆红素的检查, 胆红素的含量测定等, 但上述评价方法不能区分由天然牛黄、天然麝香组方的西黄丸和由体外培育牛黄、人工麝香组方的西黄丸。

西黄丸中麝香、醋乳香和醋没药均含有挥发性成分, 如麝香中的麝香酮, 乳香中的 α -蒎烯、乙酸辛酯, 没药中的 β 、 γ 、 δ -榄香烯等。天然麝香药材珍贵稀有, 现在多由人工麝香取代, 刘薇等^[6]采用气相色谱-质谱法(GC-MS)对西黄丸中人工麝香进行鉴别, 确定了人工麝香中特有的对照色谱峰, 可以区分人工麝香和天然麝香, 但这些对照色谱峰没有定性鉴别, 属未知成分。DING等^[7]采用GC-MS比较天然麝香和人工麝香的挥发性成分, 发现人工麝香

中脱氢表雄甾酮和雄甾酮的含量远高于天然麝香, 由人工麝香组方的片仔癀中可以检测到这2种成分, 由天然麝香组方的片仔癀未检测到。人工麝香中大环酮类、雄性激素类化合物的种类和含量均与天然麝香有较大差异^[8]。乳香分为索马里乳香和埃塞俄比亚乳香, 乳香和没药经常临床上相配伍使用, 二者合用具有活血祛瘀、消肿止痛、敛疮生肌之效。现有文献主要对西黄丸中麝香酮、 α -蒎烯、乙酸辛酯、 β -榄香烯进行了含量测定^[9-11], 对天然牛黄、天然麝香组方西黄丸和体外培育牛黄、人工麝香组方西黄丸中挥发性成分的鉴别、含量比较, 以及西黄丸挥发性质控成分的确定研究甚少。

代谢组学的整体性、系统性与中药药效作用特点相吻合, 被广泛用于中药质量评价与控制、中药药效物质基础筛选与作用机制等研究, 其中, 非靶向代谢组学是对有机体内源性代谢物的全面、系统的分析, 是一种无偏向的代谢组学分析, 可以发现新的生物标记物; 靶向代谢组学是针对特定一类代谢物的研究分析, 研究该类代谢物的代谢变化或验证非靶向代谢组学鉴定出的生物标志物^[12]。将非靶向代谢分析和靶向代谢分析结合起来, 可以为发现和评估特定代谢物提供深入的见解。因此, 本研究运用顶空进样微萃取气相色谱质谱技术(HS-SPME-GC-MS), 采用非靶向代谢组学对天然

麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸中的挥发性成分种类和相对含量进行分析,确定差异性化学成分。基于气相色谱串联三重四极杆质谱法(GC-QqQ-MS),采用靶向代谢组学测定西黄丸中主要挥发性化学成分的含量,确定鉴别天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的质控成分,为西黄丸的质量评价提供科学依据。

1 材料

7890A-5975C型气质联用仪、8890-7000E型气相色谱-串联三重四极杆质谱联用仪、7693A型自动进样器(美国安捷伦公司),MASS-6036ASH型固相微萃取仪(上海新拓分析仪器科技有限公司),METTLER AE240型十万分之一电子天平(瑞士METTLER公司),BP211D型万分之一电子天平、CP225D型电子分析天平(德国赛多利斯公司),HC-2062型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

共收集A~I共9个厂家西黄丸样品各3批,具体信息见增强出版附加材料。 α -蒎烯、 β -榄香烯、麝香酮、脱氢表雄甾酮、乙酸龙脑酯、乙酸辛酯、萘对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DSTDP002201、DST240613-267、DSTDS004701、DST210318-053、DST231123-143、DSTDY036601、DSTDN008701,纯度均 $\geq 98\%$),乙酸乙酯、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 基于HS-SPME-GC-MS分析不同厂家西黄丸的挥发性成分

2.1.1 样品粉末的制备

取西黄丸适量,按质量比1:3加入适量硅藻土,充分研磨分散均匀后作为样品粉末。

2.1.2 顶空进样微萃取条件

取样品粉末(过5号筛)约1.0 g,精密称定,置15 mL顶空瓶中,插入装有65 μm 聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯(PDMS/DVB)萃取纤维头的手动进样器,80 $^{\circ}\text{C}$ 下预平衡10 min,萃取50 min取出,立即插入色谱仪进样口(温度250 $^{\circ}\text{C}$),解吸5 min。

2.1.3 色谱条件

采用Agilent DB5石英毛细管色谱柱(0.25 mm \times 30 m, 0.25 μm),进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$,程序升温(初始温度40 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,以9 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至130 $^{\circ}\text{C}$,以2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至230 $^{\circ}\text{C}$),载气为氦气,流速为1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,不分流进样,进样量1 mL,柱压10 psi(1 psi \approx 6.895 kPa)。

2.1.4 质谱条件

采用电子轰击离子源(EI),离子

源温度250 $^{\circ}\text{C}$,接口280 $^{\circ}\text{C}$,电子碰撞能量70 eV;四极杆温度150 $^{\circ}\text{C}$,倍增管电压1.2 kV,扫描质量范围 m/z 29~400。

2.1.5 样品检测及数据分析

经GC-MS分离检测后得到总离子流(TIC),将各色谱峰的质谱图与美国国家标准与技术研究院(NIST)2.0谱库比对,筛选质谱匹配度 $\geq 85\%$ 的化合物,结合文献确定挥发性成分,采用峰面积归一法确定各成分的相对含量。将所采集的总离子流色谱数据进行峰对齐、峰提取和归一化等预处理,再进行数据标准化,然后将A1、C1、D1、E1、F1、G1、I1、H1、H3样品的保留时间、质荷比和峰面积等数据矩阵采用SIMCA-P13.0软件进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),以变量重要性投影(VIP)值 >1 筛选差异化学成分。

2.2 基于GC-QqQ-MS测定不同厂家西黄丸中主要化学成分的含量

2.2.1 内标及对照品溶液的制备

取萘适量,精密称定,加甲醇-乙酸乙酯(1:4)混合溶液制成每1 mL含0.6 μg 的溶液,作为内标溶液。另取 α -蒎烯对照品约3 mg、 β -榄香烯对照品约8 mg、麝香酮对照品约8 mg、脱氢表雄甾酮对照品约6 mg、乙酸龙脑酯对照品约8 mg、乙酸辛酯对照品约4 mg,精密称定,分别置10 mL量瓶,以甲醇-乙酸乙酯(1:4)混合溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

分别取不同厂家西黄丸样品粉末(过三号筛)约1 g,精密称定,精密加入甲醇-乙酸乙酯(1:4)混合溶液5 mL,称定质量,超声(功率500 W,频率40 kHz)提取30 min,放置室温,补足减轻的质量,以4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min(离心半径10 cm),精密量取上清液2.5 mL置5 mL量瓶中,加入内标溶液2 mL,以甲醇-乙酸乙酯(1:4)混合溶液稀释至刻度,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备

取麝香10.14 mg、牛黄10.14 mg、醋没药371.62 mg、黄米236.4 mg按2.2.2项下方法配制成乳香阴性供试品溶液。取麝香10.14 mg、牛黄10.14 mg、黄米236.4 mg、醋乳香371.62 mg按2.2.2项下方法配置成没药阴性供试品溶液。取牛黄10.14 mg、醋没药371.62 mg、黄米236.4 mg、醋乳香371.62 mg按2.2.2项下方法配置成麝香阴性供试品溶液。取一西黄丸样品按2.2.2项下方法制备,不加内标溶液,制得萘阴性供试品溶液。

2.2.4 色谱条件

采用Agilent HP-5MS石英毛细管

色谱柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm), 进样口温度 250 °C, 程序升温(初始 80 °C, 保持 2 min, 以 3.0 °C·min⁻¹ 升至 100 °C, 保持 2 min, 以 6.0 °C·min⁻¹ 升至 170 °C, 保持 1 min, 以 2.0 °C·min⁻¹ 升至 180 °C, 保持 1 min, 以 9.0 °C·min⁻¹ 升至 198 °C, 以 2.0 °C·min⁻¹ 升至 200 °C, 保持 1 min, 以 4.0 °C·min⁻¹ 升至 250 °C, 保持 3 min), 载气为氦气, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 分流比 10:1, 进样量 1.0 μL。

2.2.5 质谱条件 采用EI, 电子碰撞能量 70 eV, 四极杆温度 150 °C, 传输线温度 250 °C, 离子源温度 230 °C, 数据采集模式, ①全扫描模式, 电子能量 70 eV, 增益 1, 扫描时间 200 ms, 步长 0.1 amu, 阈值 100; ②多反应监测(MRM)模式, 电子能量 70 eV, 增益 1, 离子数 15, 驻留时间 20 ms, 各化合物的离子对信息见表 1。

表1 各化合物的MRM信息

Table 1 MRM information for each compound

| 化合物 | 母离子 <i>m/z</i> | 子离子 <i>m/z</i> | 碰撞能量/eV |
|--------|----------------|----------------|---------|
| α-蒎烯 | 136 | 93 | 10 |
| β-榄香烯 | 204 | 189 | 10 |
| 麝香酮 | 238 | 97 | 10 |
| 脱氢表雄甾酮 | 288 | 270 | 10 |
| 乙酸龙脑酯 | 136 | 95 | 10 |
| 乙酸辛酯 | 112 | 70 | 10 |
| 萘 | 128 | 102 | 30 |

2.2.6 方法学考察 按照 2.2.1 项下方法制备内标与混合对照品溶液, 按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.2.3 项下方法制备阴性供试品溶液, 按照 2.2.4、2.2.5 项下方法检测, 考察方法专属性。精密吸取 2.2.1 项下各对照品溶液适量, 用甲醇-乙酸乙酯(1:4)混合溶液逐级稀释, 配制 6 个浓度梯度, 每个浓度溶液中加入内标溶液 0.5 mL, 即得系列浓度的混合对照品溶液, 按照 2.2.4、2.2.5 项下方法检测, 记录色谱图及峰面积, 以对照品浓度/萘浓度为横坐标(*X*), 对照品峰面积/萘峰面积为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线。按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.2.4、2.2.5 项下方法重复测定 6 次, 记录各成分峰面积并计算相对标准偏差(RSD), 考察仪器精密度。取同一份供试品溶液, 按照 2.2.4、2.2.5 项下方法, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 测定, 记录各成分峰面积并计算 RSD, 考察样品在 24 h 内的稳定性。取同一厂家、批次西黄丸样品, 按 2.2.2 项下方法分别平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.4、2.2.5 项下方法测定, 记录各成分峰面积并计算其平均质量分数及 RSD, 考察该方

法的重复性。取已知含量的西黄丸样品, 根据各指标成分含量, 按照 1:1 比例加入同等量的对照品, 按照 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.2.4、2.2.5 项下方法测定, 计算各成分的加样回收率及 RSD, 考察方法准确性。

2.2.7 样品含量测定及数据分析 取 2.2.2 项下供试品溶液 1 μL, 按 2.2.4、2.2.5 项下方法测定, 计算各成分峰面积, 按内标法对其含量进行计算。采用迈维代谢数据处理平台(<https://cloud.metware.cn/>)对不同厂家西黄丸中 6 种指标成分的含量进行聚类分析, 主成分分析(PCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA), 根据 PLS-DA 中 VIP 值>1, 筛选差异性化学成分。最后对组间差异性成分进行非参数检验分析 Wilcoxon test 分析, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基于 HS-SPME-GC-MS 分析不同厂家西黄丸的挥发性成分

3.1.1 不同厂家西黄丸挥发性成分种类的分析 西黄丸挥发性成分 36 min 内得到较好的分离, 峰形尖锐且对称性好, 经 NIST 库检索, 共鉴定出 291 种挥发性成分, 主要包括烯类、酯类、烷烃、醇类、酮类、萘类等, 西黄丸中挥发性成分烯类成分最多, 酯类、烷烃、醇类、酮类其次, 其中 A1 样品中烯类成分含量最高, C1 样品中酯类、醇类成分含量最高, H3 样品中烷烃类成分含量最高, 以 A1 样品为例, 各类化学成分相对含量从高到低的顺序为烯类、醇类、酯类、酮类、呋喃类、烷烃萘类、醛类、其他类。见增强出版附加材料。

3.1.2 不同厂家西黄丸挥发性成分的相对含量比较 不同厂家西黄丸相对质量分数在 5% 以上的挥发性成分见增强出版附加材料。结果显示, C1~G1、H1、H3、I1 样品的主要挥发性成分为乙酸辛酯(8.10%~26.18%)、(3*R*-反式)-4-乙基-4-甲基-3-异丙基-1-异丙基环己烯(5.88%~11.09%)、α-古巴烯(6.54%~9.24%)、[1*S*-(1α, 2β, 4β)]-1-乙基-1-甲基-2, 4-双(1-甲基乙基)环己烷(5.63%~23.94%)、α-愈创木烯(6.42%~15.93%)、埃匹库泽烯酮(5.21%~9.44%)、(-)-β-波旁烯(5.09%~7.40%)、愈创木-3, 11-二烯(11.60%~11.69%)。A1 样品主要成分为乙酸辛酯(7.79%)、反式-3, 7-二甲基-1, 3, 6-辛三烯(7.82%)、顺式-α-佛手柑烯(8.17%)、α-檀香烯(30.59%)、β-红没药烯(8.59%), 与其他 7 个厂家西黄丸有明显差异。其中, 乙酸辛酯在不同厂家西黄丸中均存在, 但相对含量差异较大, 该成分来源于

醋乳香,这可能与乳香药材来源差异大有关。

3.1.3 不同厂家西黄丸的 OPLS-DA 对不同厂家西黄丸进行 OPLS-DA,结果表明,由人工麝香组方的西黄丸(A1、C1、D1、E1、F1、G1、I1)与由天然麝香组方的西黄丸(H1、H3)有明显的分离。经交叉验证得到模型评价参数 R^2Y (模型对 Y 变量的可解释度)=0.976, Q^2 (模型的可预测度)=0.502,均 ≥ 0.5 ,说明模型具有较好的可解释度和预测能力,模型有效可靠且各组样本之间能够较好分离。根据 VIP 值 >1 筛选出 30 种差异性成分,见增强出版附加材料。对不同厂家西黄丸中差异性成分的相对含量进行统计分析,不同厂家西黄丸中辛醇、乙酸龙脑酯和麝香酮相对含量存在明显差异。辛醇在 C1 样品中相对含量最高,为 10%,A1 样品中相对含量最低,为 0.68%;乙酸龙脑酯在 C1 样品中含量最高(4.35%),F1 样品中含量最低(0.06%);麝香酮在不同厂家西黄丸中均存在,C1 样品含量最高(2.94%),由天然麝香组方的西黄丸中含量最低,H1、H3 样品中含量分别为 0.29%,0.46%,因此,辛醇、乙酸龙脑酯和麝香酮可作为西黄丸质量控制的化学指标,见图 1。

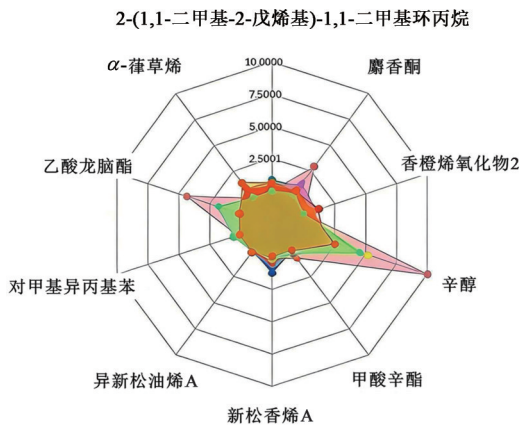


图1 不同厂家西黄丸中挥发性成分相对含量雷达分析
Fig. 1 Radar analysis of relative contents of volatile components in Xihuangwan from different manufacturers

3.2 基于 GC-QqQ-MS 测定不同厂家西黄丸中主要挥发性成分的含量

3.2.1 方法学考察 阴性供试品溶液、对照品溶液和西黄丸 B1 供试品溶液(含内标物萘)的 MRM 色谱图中,7 种成分峰形良好,阴性供试品溶液无干扰,该方法专属性良好。各种成分在各自范围内 $r > 0.999$,线性关系良好。各成分精密性、稳定性、重复性的 RSD 均 $<5\%$,各指标成分的平均加样回收率为 96.02%~101.75%,RSD 均 $<5\%$,表明该方法符合含量测定方法学要求。见表 2 及增强出版附加材料。

表2 西黄丸中 6 种指标成分的线性关系考察

Table 2 Investigation on linear relationship of 6 index components in Xihuangwan

| 化学成分 | 回归方程 | 线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | r | 定量限 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|--------------|--------------------|--------------------------------------|--------|---------------------------------------|
| α -蒎烯 | $Y=0.07X-0.3057$ | 1.9375~62 | 0.9994 | 76 |
| β -榄香烯 | $Y=0.0039X-0.052$ | 4.9688~159 | 0.9995 | 225 |
| 麝香酮 | $Y=0.0224X-0.317$ | 5.037~161.2 | 0.9992 | 202 |
| 脱氢表雄甾酮 | $Y=0.0232X-0.2041$ | 3.8~121.6 | 0.9994 | 190 |
| 乙酸龙脑酯 | $Y=0.0469X-0.0145$ | 0.40~64.0 | 0.9998 | 22 |
| 乙酸辛酯 | $Y=0.0024X-0.0118$ | 2.0~320.0 | 0.9995 | 90 |

3.2.2 指标成分的含量测定 A1~A3 样品中未检出 β -榄香烯,D2、D3、E1~E3、F1~F3 样品中未检出乙酸龙脑酯,H1、H3 样品中未检出脱氢表雄甾酮。同厂家不同批次西黄丸中各成分含量差异较小,D1 样品中 α -蒎烯、E1 样品中 β -榄香烯、E2 样品中麝香酮、G1 样品中脱氢表雄甾酮、H2 样品中乙酸龙脑酯、I1 样品中乙酸辛酯均含量为最高。见表 3。

3.2.3 不同厂家西黄丸中主要挥发性成分含量的聚类分析和 PCA 聚类分析结果显示,天然麝香组方西黄丸 H1、H3 聚为一类,其余样品整体可聚为一类,其中 H2 样品是由天然麝香组方,但是,西黄丸 H2 与人工麝香组方西黄丸 D2、D3 聚为一类,分析西黄丸 H2 的质量存在问题,因该药为网络购买,因此不能确定西黄丸 H2 的真伪。见增强出版附加材料。

将不同厂家西黄丸中 α -蒎烯、 β -榄香烯、麝香酮、脱氢表雄甾酮、乙酸龙脑酯、乙酸辛酯的含量结果进行 PCA, R^2X 为 0.939, Q^2 为 0.0676,人工麝香组方西黄丸,与天然麝香组方西黄丸 H1、H3 有显著分离趋势,但是,西黄丸 H2(网上购买)与其他厂家的西黄丸(组方为体外培育牛黄和人工麝香)聚集在一起,PCA 结果与聚类分析结果一致,两种分析方法表明,由天然麝香组方的西黄丸与由人工麝香组方的西黄丸,主要挥发性成分含量有显著差异,同时,结果表明西黄丸 H2 质量存在问题,因此后续分析将西黄丸 H2 归为人工麝香组方的西黄丸一类。见增强出版附加材料。

3.2.4 不同厂家西黄丸中主要成分含量的 PLS-DA

分析结果显示,H1、H3 样品与其余样品可明显分离, R^2X 为 0.818, R^2Y 为 0.630, Q^2 为 0.386,PLS-DA 结果可靠,模型验证结果 R^2 和 Q^2 与 Y 轴交点分别为 0.074、-0.229,模型验证未过拟合。依据 VIP 值 >1 ,筛选差异性化学成分为麝香酮、乙酸辛酯和脱氢表雄甾酮,其中,麝香酮和脱氢表雄甾酮 2 种化学成分

表3 不同厂家西黄丸中主要挥发性成分的含量 (n=3)

| 编号 | α-蒎烯 | β-榄香烯 | 麝香酮 | 脱氢表雄甾酮 | 乙酸龙脑酯 | 乙酸辛酯 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A1 | 0.011 9 | - | 0.355 4 | 0.075 7 | 0.010 2 | 0.160 1 |
| A2 | 0.012 0 | - | 0.332 6 | 0.063 9 | 0.008 7 | 0.193 6 |
| A3 | 0.011 2 | - | 0.292 1 | 0.059 5 | 0.003 9 | 0.222 5 |
| B1 | 0.026 0 | 0.133 5 | 0.376 3 | 0.071 5 | 0.013 6 | 0.987 9 |
| B2 | 0.026 3 | 0.135 8 | 0.379 9 | 0.072 0 | 0.014 5 | 0.967 9 |
| B3 | 0.026 2 | 0.135 3 | 0.378 6 | 0.070 7 | 0.013 8 | 0.957 9 |
| C1 | 0.011 2 | 0.046 4 | 0.371 5 | 0.069 3 | 0.014 8 | 0.180 9 |
| C2 | 0.011 8 | 0.051 0 | 0.343 4 | 0.073 5 | 0.017 0 | 0.228 1 |
| C3 | 0.011 6 | 0.032 7 | 0.375 0 | 0.074 0 | 0.027 4 | 0.221 5 |
| D1 | 0.068 2 | 0.247 2 | 0.305 0 | 0.064 6 | 0.014 3 | 1.778 8 |
| D2 | 0.017 9 | 0.128 1 | 0.281 9 | 0.059 8 | - | 1.258 9 |
| D3 | 0.018 9 | 0.132 0 | 0.280 1 | 0.052 8 | - | 1.294 8 |
| E1 | 0.023 9 | 0.419 6 | 0.360 4 | 0.077 4 | - | 0.906 0 |
| E2 | 0.023 8 | 0.398 5 | 0.434 1 | 0.072 3 | - | 0.966 1 |
| E3 | 0.032 4 | 0.361 1 | 0.251 3 | 0.063 0 | - | 1.149 8 |
| F1 | 0.011 9 | 0.106 2 | 0.241 6 | 0.053 2 | - | 0.302 6 |
| F2 | 0.011 6 | 0.104 2 | 0.325 0 | 0.057 3 | - | 0.270 7 |
| F3 | 0.011 1 | 0.097 4 | 0.300 9 | 0.058 2 | - | 0.206 6 |
| G1 | 0.023 6 | 0.172 8 | 0.284 8 | 0.102 8 | 0.007 5 | 0.645 4 |
| G2 | 0.024 9 | 0.155 3 | 0.268 8 | 0.055 4 | 0.007 5 | 0.630 8 |
| G3 | 0.017 5 | 0.170 4 | 0.327 2 | 0.061 9 | 0.006 9 | 0.457 6 |
| H1 | 0.038 0 | 0.103 5 | 0.136 5 | - | 0.059 7 | 1.184 0 |
| H2 | 0.023 2 | 0.091 7 | 0.291 1 | 0.057 9 | 0.060 6 | 1.458 0 |
| H3 | 0.014 6 | 0.094 1 | 0.120 8 | - | 0.033 0 | 0.922 7 |
| I1 | 0.037 4 | 0.296 7 | 0.293 1 | 0.050 8 | 0.005 2 | 2.279 4 |
| I2 | 0.037 1 | 0.303 9 | 0.305 8 | 0.053 4 | 0.005 2 | 2.278 3 |
| I3 | 0.036 6 | 0.295 8 | 0.300 6 | 0.054 1 | 0.005 0 | 2.193 6 |

均来源于麝香,乙酸辛酯来源于醋乳香,见增强出版附加材料。

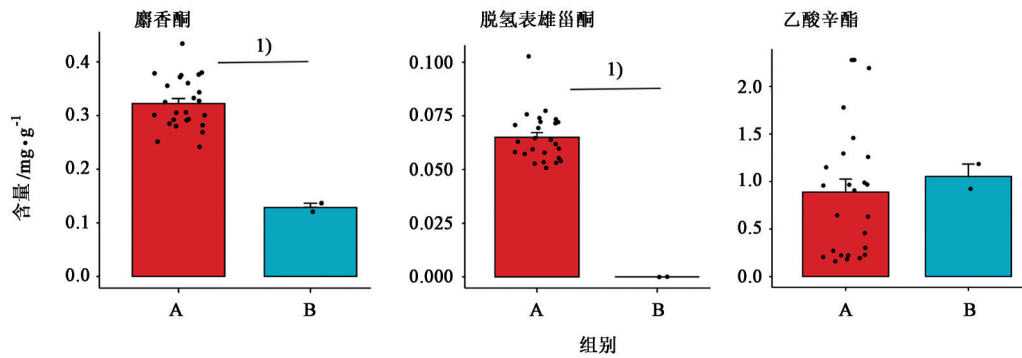
以人工麝香组方的西黄丸及H2为一组(A组),以天然麝香组方的西黄丸H1、H3为一组(B组),对差异性成分麝香酮、乙酸辛酯和脱氢表雄甾酮含量Wilcoxon test分析,B组中麝香酮的含量显著低于A组(P<0.05)。B组中脱氢表雄甾酮均未检测出,A组中该成分质量分数为0.050 8~0.102 8 mg·g⁻¹。乙酸辛酯在A组、B组中的含量差异无统计学意义,乙酸辛酯来源于醋乳香,研究结果表明,乳香的来源对区分天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸意义不大,综上,麝香酮和脱氢表雄甾酮可用于此两组西黄丸的鉴别、评价和质量控制。见图2。

4 讨论

本研究采用HS-SPME-GC-MS对不同厂家西

黄丸的挥发性成分进行系统分析,不同厂家西黄丸中挥发性成分烯类成分最多,PCA和OPLS-DA结果表明不同厂家西黄丸质量存在差异,筛选出差异挥发性成分30种,相对含量差异较大的成分主要有辛醇、麝香酮和乙酸龙脑酯。采用GC-QqQ-MS测定不同厂家西黄丸中α-蒎烯、β-榄香烯、麝香酮、脱氢表雄甾酮、乙酸龙脑酯、乙酸辛酯含量,并进行聚类分析、PCA和PLS-DA,确定麝香酮和脱氢表雄甾酮是鉴别天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的主要差异性化学成分。

天然麝香和人工麝香中均含有麝香酮,麝香酮具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗惊厥、抗抑郁多种药理作用^[13-17],在中枢神经系统、心血管系统、生殖系统等发挥重要作用^[18-19]。本研究对不同厂家西黄丸中麝香酮含量测定结果表明,天然麝香组方西黄丸中麝香酮含量显著低于人工麝香组方西黄丸,何轶



注: A组 $n=25$, B组 $n=2$; ¹⁾ $P < 0.05$

图2 西黄丸中差异性成分的含量分析

Fig. 2 Content analysis of differential components in Xihuangwan

等^[20]采用气相色谱法测定9个厂家20批西黄丸中麝香酮的含量,结果表明麝香酮含量差异大,但在本研究中,不同厂家之间的人工麝香组方西黄丸中麝香酮含量差异较小。人工麝香是国家中药一类新药,是国家保密品种,人工麝香生产工艺稳定,因此人工麝香中麝香酮含量稳定,变化不大。天然麝香中麝香酮的含量受不同产地、不同种类林麝的影响,差异较大^[21],本研究检测天然麝香组方西黄丸所含的麝香酮的含量差异不大,可能因为样品数量比较少造成的,因此,要确定区分天然麝香还是人工麝香组方的西黄丸,麝香酮含量限度的确定还需要扩大西黄丸样品检测的数量,这也是本课题组下一步需要研究的工作。

脱氢表雄甾酮是肾上腺分泌的主要类固醇产物,具有雌激素样或雄激素样作用,具有调节免疫、抗衰老、抗肿瘤、治疗阿尔茨海默病等药理作用,也是区分天然麝香和人工麝香的特征性成分^[22-24]。本研究发现,天然麝香组方西黄丸中未检测到脱氢表雄甾酮,而人工麝香组方西黄丸检测到,因此,脱氢表雄甾酮可以是鉴别二者的专属性成分。醋乳香中的乙酸辛酯、乙酸龙脑酯、 α -蒎烯,醋没药中的 β -榄香烯在天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸中含量差异无统计学意义,研究结果表明,醋乳香、醋没药不是区别二者的主要药材。

综上所述,本研究基于HS-SPME-GC-MS和GC-QqQ-MS法对不同厂家西黄丸中的挥发性成分进行了系统分析,确定麝香酮和脱氢表雄甾酮是区分天然麝香组方西黄丸与人工麝香组方西黄丸的主要化学成分。本研究为完善西黄丸的质量评价和控制提供实验基础和科学依据。本研究仍存在一些不足:天然麝香组方西黄丸的厂家较少,不同批次仅2个,样品的数量不够充足;西黄丸中主要成

分含量测定应该增加麝香中的化学成分种类;天然麝香组方西黄丸、人工麝香组方西黄丸的整体动物、细胞水平药效试验的比较。未来需要开展西黄丸非挥发性成分种类、含量的测定,并结合抗肿瘤药效试验,确定西黄丸的药效成分,建立西黄丸的HPLC指纹图谱,完善西黄丸的质量标准。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王洪绪. 外科证治全生集[M]. 北京:人民卫生出版社,1989:36. WANG H X. Waikē Zhengzhī Quānshēng Jīng[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1989:36.
- [2] 徐国晷,谢鑫灵,孙大兴. 西黄丸联合TC化疗方案对晚期乳腺癌患者临床疗效及生活质量的影响研究[J]. 中华中医药学刊,2018,36(1):232-234. XU G S, XIE X L, SUN D X. Effect of Xihuang pill combined with TC endocrinotherapy for advanced breast cancer patients and the influence on quality of life[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(1): 232-234.
- [3] 王健,杨焕莲. 西黄丸联合来曲唑治疗晚期乳腺癌的临床研究[J]. 现代药物与临床,2019,34(2):429-433. WANG J, YANG H L. Clinical study of Xihuang pills combined with letrozol in treatment of advanced breast cancer[J]. Drugs Clin, 2019, 34(2): 429-433.
- [4] 周云娣. 西黄丸辅助治疗晚期原发性肝癌效果观察[J]. 临床合理用药杂志,2020,13(4):73-75. ZHOU Y D. Effect of Xihuang pill in the adjuvant treatment of advanced primary liver cancer[J]. Chin J Clin Rat Drug Use, 2020, 13(4): 73-75.
- [5] 马常天. 吉非替尼联合西黄丸治疗晚期非小细胞肺癌的疗效评价[J]. 当代临床医刊,2021,34(2):84-86. MA C T. Efficacy evaluation of gefitinib combined with Xihuang pills in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. J Contemp Clin Med, 2021, 34(2): 84-86.
- [6] 刘薇,邹秦文,程显隆,等. 气相色谱质谱联用技术用于西黄丸中人工麝香的鉴别方法[J]. 中国医学科学院学报,2014,36(6):

- 591-598.
LIU W, ZHOU Q W, CHEN X L, et al. Detection of Artificial Musk in Xihuangwan by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2014, 36(6): 591-598.
- [7] DING M, FAN J L, HUANG D F, et al. From non-targeted to targeted GC-MS metabolomics strategy for identification of TCM preparations containing natural and artificial musk[J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 41-51.
- [8] 蒋且英, 罗云, 谭婷, 等. 气质联用和化学计量学比较不同品种和产地麝香挥发性成分组成[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3): 49-55.
JIANG Q Y, LUO Y, TANG T, et al. Comparison of volatile chemical compositions of Moschus from different species and producing areas by GC-MS and chemometric analysis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(3): 49-55.
- [9] 刘凯丽, 刘艳之, 王世晖, 等. 一测多评法结合指纹图谱和化学模式识别分析在西黄丸质量评价中的应用[J]. *中国药房*, 2022, 33(18): 2219-2223.
LIU K L, LIU Y Z, WANG S H, et al. Application of quantitative analysis of multi-components by single marker combined with fingerprint and chemical pattern recognition analysis in the quality evaluation of Xihuang pills[J]. *China Pharm*, 2022, 33(18): 2219-2223.
- [10] 王秀文, 刘艳之, 卫春红, 等. 超临界流体萃取-GC-MS分析西黄丸中挥发性成分[J]. *化学研究与应用*, 2021, 33(3): 423-429.
WANG X W, LIU Y Z, WEI C H, et al. Analysis of volatile components in Xihuang pills by supercritical fluid extraction and GC-MS[J]. *Chem Res Appl*, 2021, 33(3): 423-429.
- [11] 马丽. 高效液相色谱法、气相色谱法及气相色谱-质谱法对西黄丸中11-羰基- β -乳香酸的鉴别及含量测定比较[J]. *贵州医药*, 2018, 42(6): 666-667.
MA L. Identification and determination of 11-carbonyl- β -boswellic acid in Xihuang pills by high performance liquid chromatography, gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Guizhou Med J*, 2018, 42(6): 666-667.
- [12] GAO W, LIU K, WANG R, et al. Integration of targeted metabolite profiling and sequential optimization method for discovery of chemical marker combination to identify the closely related plant species[J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152829.
- [13] ZOU Y H, XU L Y, WANG W Y, et al. Muscone restores anoikis sensitivity in TMZ-resistant glioblastoma cells by suppressing TOP2A via the EGFR/Integrin β_1 /FAK signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155714.
- [14] WANG D, LIU X, HONG W, et al. Muscone abrogates breast cancer progression through tumor angiogenic suppression via VEGF/PI3K/Akt/MAPK signaling pathways[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 214.
- [15] REN W, ZHAO F, HAN Y, et al. Muscone improves hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced neuronal injury by blocking HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway via modulating microRNA-142 [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13523.
- [16] HE M C, SHI Z, QIN M, et al. Muscone ameliorates LPS-induced depressive-like behaviors and inhibits neuroinflammation in prefrontal cortex of mice[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 559-577.
- [17] WEI C J, HUA F, CHEN Y H, et al. Muscone alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and enhancement of SIRT3[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(1): 85-96.
- [18] WANG J, XING H, QIN X M, et al. Pharmacological effects and mechanisms of muscone [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 262: 113120.
- [19] 杨晓莉, 常艳, 郭东贤, 等. 麝香酮药理学作用研究进展[J]. *中国药业*, 2025, 34(5): 129-133.
YANG X L, CHANG Y, GUO D X, et al. Research progress on pharmacological effects of muscone[J]. *China Pharm*, 2025, 34(5): 129-133.
- [20] 何轶, 张聿梅, 鲁静, 等. 西黄丸中指标成分含量测定及挥发性成分指纹图谱的建立[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(3): 480-485.
HE Y, ZHANG Y M, LU J, et al. Index component determination and the fingerprint chromatography of volatile components in Xihuang pills[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(3): 480-485.
- [21] LV S Q, LEI Z X, YAN G, et al. Chemical compositions and pharmacological activities of natural musk (Moschus) and artificial musk: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114799.
- [22] 宿斌, 熊志飞, 赵炳, 等. 慢性自发性荨麻疹患者血清维生素D、脱氢表雄酮硫酸酯水平与Th1/Th2细胞因子及免疫球蛋白的关系分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(4): 435-439.
SU B, XIONG Z F, ZHAO B, et al. Analysis of the relationship between serum vitamin D and dehydroepiandrosterone sulfate levels with Th1/Th2 cytokines and immunoglobulins in patients with chronic spontaneous urticaria [J]. *Int J Lab Med*, 2020, 41(4): 435-439.
- [23] 王颖, 于榕, 姚明辉. 脱氢表雄酮硫酸酯对地佐环平所致记忆损伤小鼠的作用及机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2007, 16(3): 160-163.
WANG Y, YU R, YAO M H, et al. Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on dizocilpine-induced memory impairment in mice and mechanism [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2007, 16(3): 160-163.
- [24] 王雁, 饶曼人. 脱氢表雄酮硫酸酯对体外大鼠脑皮层神经细胞拟老化反应的影响[J]. *药学报*, 1998, 33(6): 14-18.
WANG Y, RAO M R. Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on mimetic aging actions of cerebral cortex of fetal rats *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*, 1998, 33(6): 14-18.

[责任编辑 吕冬梅]