

## 小金丸脂溶性和水溶性部位的HPLC指纹图谱分析

冯碧<sup>1</sup>, 宋娇<sup>1</sup>, 慈志敏<sup>1</sup>, 曹波<sup>1</sup>, 许洪<sup>2</sup>, 杜晓娟<sup>2</sup>, 林俊芝<sup>3</sup>, 张定堃<sup>1</sup>, 韩丽<sup>1\*</sup>, 许润春<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都永康制药有限公司, 成都 610041;

3. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

**[摘要]** 目的:建立小金丸脂溶性部位、水溶性部位的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱并进行指纹图谱相似度评价,探讨小金丸的质量一致性。方法:采用Welch Ultimate AQ-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相选择0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(脂溶性部分:0~5 min, 40%B; 5~10 min, 40%~50%B; 10~20 min, 50%~60%B; 20~30 min, 60%~65%B; 30~40 min, 65%~70%B; 40~50 min, 70%~80%B; 50~60 min, 80%~90%B; 60~65 min, 90%~95%B; 65~75 min, 95%~100%B; 75~80 min, 100%B。水溶性部分:0~20 min, 2%~5%B; 20~30 min, 5%~10%B; 30~37 min, 10%~20%B; 37~45 min, 20%~30%B; 45~50 min, 30%~40%B; 50~58 min, 40%B),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30 °C。脂溶性部位和水溶性部位的检测波长分别设定为202, 250 nm,进样量依次为10, 20 μL。对5个厂家共30批市售小金丸进行HPLC检测,使用主成分分析(PCA)对各部位色谱峰进行分析,并对色谱峰进行指认。结果:指纹图谱共检测出55个色谱峰,30批小金丸指纹图谱相似度差异较大。小金丸脂溶性部位、水溶性部位的指纹图谱相似度RSD分别为21.5%和32.8%,厂家间与厂家内样品质量差异较大,且脂溶性部位成分主导小金丸化学一致性评价结果,其中,来自枫香脂的成分是影响该制剂化学差异的主要原因。结论:市售小金丸质量一致性较差。双部位指纹图谱的建立为小金丸整体质量评控提供了新思路,可为传统丸剂的质量一致性评价提供参考。

**[关键词]** 小金丸; 脂溶性部位; 水溶性部位; 指纹图谱; 相似度; 主成分分析(PCA); 高效液相色谱法(HPLC)

**[中图分类号]** R22;R94;R28;C37;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0139-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201052

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200205.1607.003.html>

**[网络出版日期]** 2020-2-5 16:26

### HPLC Fingerprint Analysis of Liposoluble and Water-soluble Fractions of Xiaojinwan

FENG Bi<sup>1</sup>, SONG Jiao<sup>1</sup>, CI Zhi-min<sup>1</sup>, CAO Bo<sup>1</sup>, XU Hong<sup>2</sup>, DU Xiao-juan<sup>2</sup>, LIN Jun-zhi<sup>3</sup>,

ZHANG Ding-kun<sup>1</sup>, HAN Li<sup>1\*</sup>, XU Run-chun<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Chengdu 611137, China; 2. Chengdu Yonkon Pharmacy Co. Ltd., Chengdu 610041, China;

3. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of liposoluble and water-soluble fractions of Xiaojinwan were established and the similarity of fingerprints was evaluated, so as to explore the quality consistency of Xiaojinwan. **Method:** Chromatographic separation was carried out on Welch Ultimate AQ-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of 0.1% phosphoric acid solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (liposoluble fraction of 0-5 min, 40%B; 5-10 min, 40%-50%B; 10-20 min, 50%-60%B; 20-30 min, 60%-65%B; 30-40 min, 65%-70%B; 40-50 min, 70%-80%B; 50-

**[收稿日期]** 20191212(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81873232);成都中医药大学中药学学科特色创新科研团队项目(CXTD2018006);成都中医药大学附属医院院基金项目(2017-D-YY-46)

**[第一作者]** 冯碧,在读硕士,从事中药新技术、新工艺研究,E-mail:1033712891@qq.com

**[通信作者]** \*韩丽,博士,教授,从事中药新技术、新工艺研究,E-mail:hanliy@163.com;

\*许润春,博士,副教授,从事中药炮制研究,E-mail:309786953@qq.com

60 min, 80%-90%B; 60-65 min, 90%-95%B; 65-75 min, 95%-100%B; 75-80 min, 100%B; water-soluble fraction of 0-20 min, 2%-5%B; 20-30 min, 5%-10%B; 30-37 min, 10%-20%B; 37-45 min, 20%-30%B; 45-50 min, 30%-40%B; 50-58 min, 40%B), the flow rate was  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , the column temperature was  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . The detection wavelengths of the liposoluble and water-soluble fractions were 202, 250 nm, and their injection volumes were 10, 20  $\mu\text{L}$ , respectively. A total of 30 batches of Xiaojinwan from five manufacturers were detected by HPLC, the chromatographic peaks of each part were analyzed by principal component analysis (PCA) and identified. **Result:** A total of 55 chromatographic peaks were detected in the fingerprints, and the similarity of fingerprint of 30 batches of Xiaojinwan was quite different. The relative standard deviations (RSDs) of fingerprint similarity of liposoluble and water-soluble fractions of Xiaojinwan were 21.5% and 32.8%, respectively. There were significant differences in the quality of samples from different manufacturers and the same manufacturer, and the chemical consistency evaluation results were dominated by liposoluble fraction, and the main reason for the chemical difference of this preparation was the composition of Liquidambaris Resina. **Conclusion:** The quality consistency of Xiaojinwan is poor. The establishment of two-fraction fingerprint provides a new idea for the overall quality evaluation and control of Xiaojinwan, and can provide a reference for the quality consistency evaluation of traditional pills.

**[Key words]** Xiaojinwan; liposoluble fraction; water-soluble fraction; fingerprint; similarity; principal component analysis (PCA); high performance liquid chromatography (HPLC)

小金丸原名小金丹,首载于清代《外科证治全生集》,“小”寓意剂量小,“金”知其精贵,“丹”乃精炼之意,是当代中医临床治疗乳腺增生的首选中成药,具有培育成中成药大品种的潜力与价值<sup>[1]</sup>。此外,小金丸对甲状腺结节、前列腺增生、带状疱疹后遗神经痛等也有较好的治疗效果<sup>[2-4]</sup>。

小金丸由麝香、木鳖子、制草乌、枫香脂、醋乳香、醋没药、五灵脂、酒当归、地龙、香墨共10味药物组成,各药材粉碎成细粉后,加淀粉与淀粉糊,泛制糊丸。处方药味组成复杂,涵盖了树脂树胶类药物、动物药、粪便类药物、矿物药、植物药、贵细药及毒剧药,药材性质各异,成分繁多。2015年版《中国药典》仅对小金丸中双酯型生物碱含量进行限定,以麝香酮含量作为质量控制标准,不足以客观反映小金丸质量的全貌。熊茜等<sup>[5]</sup>测定了不同厂家不同批次小金丸中10种成分的含量,但极少有关于小金丸整体质量评控方法的研究。

中药指纹图谱从中药物质基础的角度出发,运用现代分析检测技术,能够系统、整体、专属地表征中药所共有的以及内在的特征,是一种有效评价中药质量的方法<sup>[6]</sup>。本实验采用HPLC建立了小金丸脂溶性和水溶性双部位指纹图谱,对5个厂家生产的30批小金丸样品进行指纹图谱测定并分析了指纹图谱相似度,通过主成分分析探索各批次小金丸分类情况,最后进行药材色谱峰指认,以期填补小金丸整体质量一致性评控方法的空缺,为实现小金

丸的质量一致性奠定基础。

## 1 材料

UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),BSA224S型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。原儿茶酸、花生四烯酸对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为170822,170217,纯度均 $\geq 98\%$ ),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。收集5个厂家共30批市售小金丸,样品信息见表1;人工麝香、木鳖子、制草乌、枫香脂、醋乳香、醋没药、酒当归、地龙、五灵脂(醋炒)饮片均由成都永康制药有限公司提供,经成都中医药大学药学院中药炮制教研室许润春副教授鉴定,均符合2015年版《中国药典》的相关项下要求。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用Welch Ultimate AQ-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相0.1%磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱,洗脱程序见表2。流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;脂溶性部位和水溶性部分的检测波长分别为202, 250 nm;进样量依次为10, 20  $\mu\text{L}$ ;进样前预平衡10 min。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取原儿茶酸、花生四烯酸对照品适量,分别加甲醇定容至10 mL,配成质量浓度分别为11.6, 47.1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 脂溶性部位** 先将小金丸粉碎成细粉,精密

表1 30批市售小金丸的样品信息

Table 1 Sample information of 30 batches of Xiaojinwan for sale

样品	厂家	批号	样品	厂家	批号
S1	A	180501	S16	B	170902
S2	A	161102	S17	B	180903
S3	A	180301	S18	B	190103
S4	A	180101	S19	B	180502
S5	A	180302	S20	B	180508
S6	A	181102	S21	C	1804016
S7	A	170701	S22	C	1807002
S8	A	171001	S23	C	1809008
S9	A	171101	S24	C	1803003
S10	A	181201	S25	C	1712001
S11	A	171102	S26	C	1804002
S12	B	181207	S27	C	1801002
S13	B	181208	S28	D	20180102
S14	B	1811206	S29	D	20171005
S15	B	160806	S30	E	1609002Z

表2 小金丸不同部位检测的梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedure for detection of different parts of Xiaojinwan

部位	t/min	乙腈/%
脂溶性	0	40
	5	40
	10	50
	20	60
	30	65
	40	70
	50	80
	60	90
	65	95
	75	100
水溶性	80	100
	0	2
	20	5
	30	10
	37	20
	45	30
	50	40
	58	40

称取0.6 g,加入乙醚5 mL,超声处理30 min(功率250 W,频率40 kHz,下同),滤过;滤渣加乙醚3 mL超声15 min,滤过;滤渣加乙醚2 mL洗涤,合并滤

液、洗涤液,于40 °C挥干溶剂,加甲醇溶解并定容至5 mL,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

**2.3.2 水溶性部位** 取脂溶性样品滤渣,挥干残留溶剂,加水5 mL,超声30 min,于5 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径200 mm),取上清液,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

#### 2.4 方法学考察

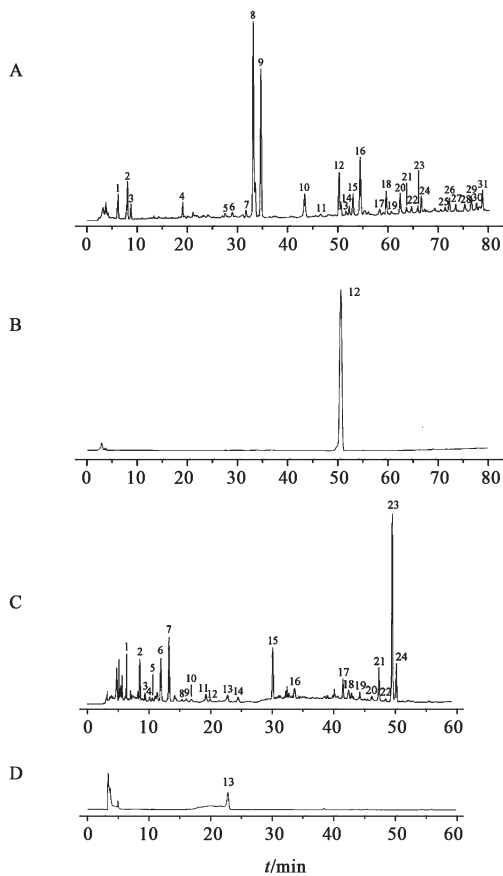
**2.4.1 精密度试验** 取样品S1的脂溶性和水溶性部位供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别平行测定6次,脂溶性部位以9号峰为参比峰,水溶性部位以23号峰为参比峰,计算各色谱峰相对保留时间的RSD均≤0.08%,相对峰面积的RSD均≤3.8%,表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取样品S1适量,按2.3项下方法平行制备6份供试品溶液,按照2.1项下色谱条件测定,脂溶性部位以9号峰为参比峰,水溶性部位以23号峰为参比峰,计算各色谱峰相对保留时间的RSD均≤1.0%,相对峰面积的RSD均≤4.6%,表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取样品S1的脂溶性和水溶性部位供试品溶液,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h按2.1项下色谱条件测定,脂溶性部位以9号峰为参比峰,水溶性部位以23号峰为参比峰,计算各色谱峰相对保留时间的RSD均≤2.4%,相对峰面积的RSD均≤3.9%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.5 指纹图谱的相似度分析** 取不同厂家、不同批次的小金丸进行指纹图谱检测,将结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以样品S1指纹图谱为参照图谱,选择平均数为对照图谱生成方法进行指纹图谱相似度分析。结果脂溶性、水溶性部位的对照指纹图谱分别可检出31, 24个色谱峰,通过对照品指认,确定脂溶性部位12号峰为花生四烯酸,水溶性部位13号峰为原儿茶酸。见图1。

30批小金丸样品的脂溶性、水溶性HPLC指纹图谱见图2。结果显示脂溶性部位有11个共有峰,分别为脂溶性部位第1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 15, 16, 18, 20号色谱峰,水溶性部位7个共有峰,分别为水溶性部位第1, 2, 6, 7, 15, 23, 24号色谱峰。将指纹图谱相似度评价结果导入Origin 9.0软件进行分析,见图3。结果发现A, C, D, E厂家小金丸的脂溶性部位相似度大多数在0.9以上,而B厂家脂溶性部位的相似度为0.304~0.917,样品差异较大,仅1个批次样品



A. 脂溶性部位; B, D. 对照品; C. 水溶性部位; 12. 花生四烯酸; 13. 原儿茶酸

图1 小金丸不同部位的HPLC对照指纹谱

Fig. 1 HPLC control fingerprints of liposoluble fraction and water-soluble fraction of Xiaojinwan

相似度>0.9,说明B厂家小金丸的脂溶性成分变异较大,一致性较差。水溶性部位相似度也存在厂家之间的差异,A和C厂家小金丸水溶性部位相似度较好(均>0.9),而B,D,E厂家小金丸水溶性部位相似度变异较大,B厂家水溶性部位相似度RSD达54.7%,提示其批次间差异极大,与其他厂家相比,厂家D的2个批次小金丸水溶性部位相似度分别为0.366,0.378,相似度较差。综上分析,提示厂家间小金丸质量参差不齐,且同一厂家内各批次样品间的化学成分变异也很大,说明小金丸在整体质量控制方面还存在不足。

**2.6 多元统计分析** 将色谱峰三维矩阵结果引入SIMCA-P 13.0软件进行分析,对30批小金丸所有色谱峰的峰面积进行主成分分析(PCA),见图4,从所有色谱峰信息中提取2个主成分,发现这2个主成分构成的信息量占总信息量的88.25%,基本保留了原来变量的信息。由图4(A1)可知,B厂家有2批小金丸与A厂家样品聚为一类,其他批次聚为一类,

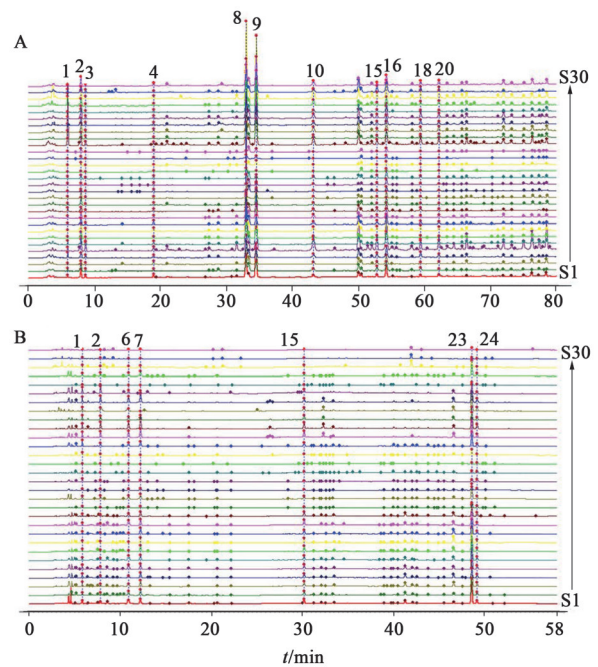


图2 30批小金丸脂溶性(A)和水溶性部位(B)的HPLC指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of liposoluble fraction (A) and water-soluble fraction (B) of 30 batches of Xiaojinwan

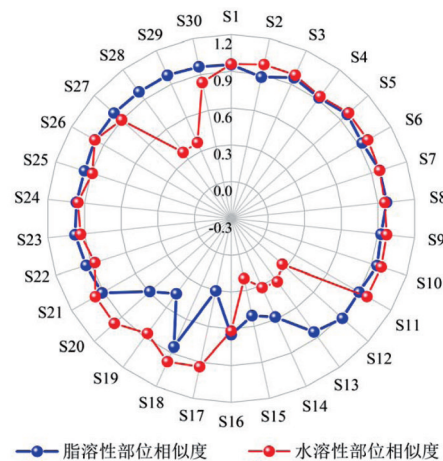


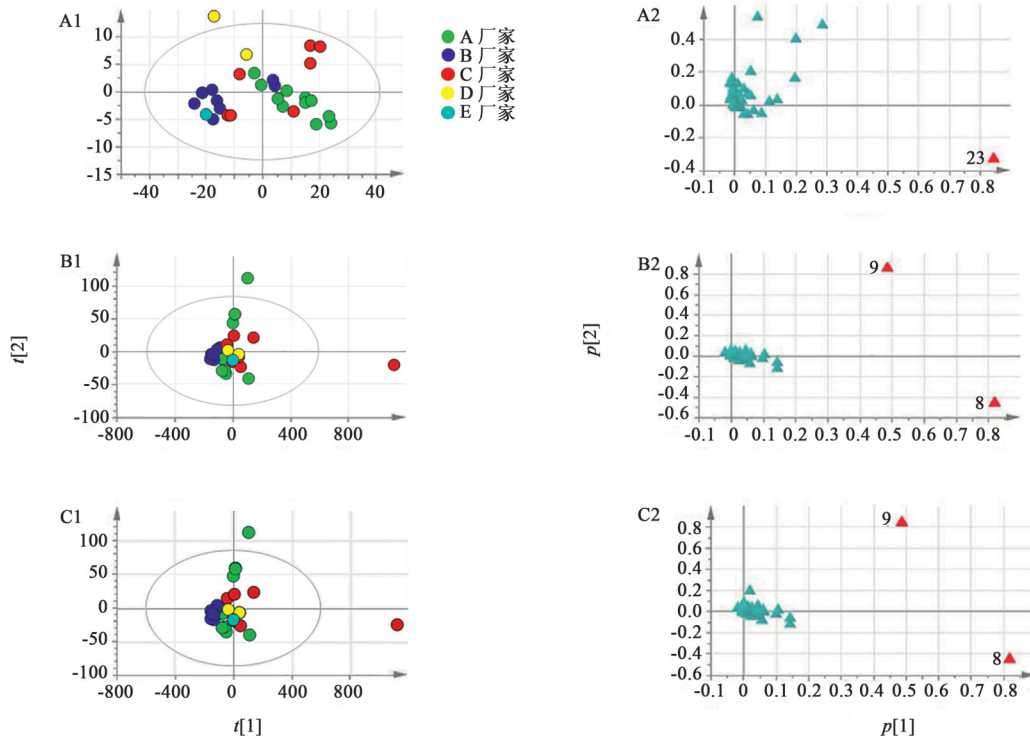
图3 30批小金丸HPLC指纹谱的相似度分析

Fig. 3 Similarity analysis of HPLC fingerprint of 30 batches of Xiaojinwan

且E厂家小金丸与B厂家样品聚为一类,说明E厂家生产的小金丸与B厂家生产的小金丸水溶性成分差异不大,但A,B厂家样品间有明显的差异;C厂家小金丸水溶性部位的差异较大,厂家内没有明显的分类,且部分批次与A厂家聚为一类,部分批次与B厂家聚为一类;D厂家有1批为其他29批样品的离群值,说明其与大部分批次小金丸有显著差异。由图4(A2)可知,水溶性部位23号色谱峰对分类结果具有较大贡献,是影响各批样品差异性的主要因素。小金丸脂溶性部位和全指纹图谱色谱峰PCA

均提取2个主成分,累计贡献率分别为98.09%和97.66%,证明PCA模型良好。由图4(B1)和(C1)可知,小金丸脂溶性部位与小金丸全成分色谱峰的PCA结果基本一致,说明小金丸的整体质量水平与

其脂溶性部位成分关系密切;除A厂家和C厂家有1批小金丸色谱峰数据为离群值外,其余各厂家小金丸无明显的分类情况,并且由图4(B2)和(C2)可知,脂溶性部位8,9号峰对分析结果贡献最大。



A1.水溶性部位色谱峰得分图;A2.水溶性部位色谱峰载荷图;B1.脂溶性部位色谱峰得分图;B2.脂溶性部位色谱峰载荷图;C1.全色谱峰得分图;C2.全色谱峰载荷图

图4 30批小金丸色谱峰面积的PCA

Fig. 4 PCA for chromatographic peak area of 30 batches of Xiaojinwan

**2.7 药材归属峰指认** 按照小金丸处方比例,精密称取人工麝香、木鳖子、制草乌、枫香脂、醋乳香、醋没药、酒当归、地龙、五灵脂(醋炒)9味小金丸组方药材(香墨为小金丸组方中的一味矿物类药物,主要由碳元素组成,因此未对香墨进行分析),分别按2.3项下方法制备药材供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行检测。以S5小金丸样品HPLC色谱图作为对照,进行药材色谱峰归属,见图5,6。结果发现脂溶性部位8号和9号色谱峰均来自组方药材枫香脂,提示枫香脂可能为影响小金丸整体化学成分差异的主要因素。结果发现枫香脂、木鳖子和乳香中含有大量的脂溶性成分,而脂溶性部位指纹图谱的8号和9号色谱峰均来自组方药材枫香脂,提示枫香脂可能为影响小金丸整体化学成分差异的主要因素。

### 3 讨论

小金丸以药材原粉直接混合入药,保留了传统

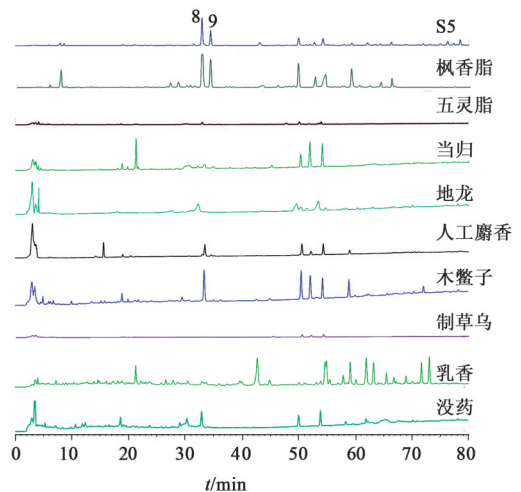


图5 小金丸样品及药材脂溶性部位的HPLC

Fig. 5 HPLC chromatograms of liposoluble fraction of medicinal materials and Xiaojinwan

丸剂的工艺,现代临床使用量大,效果显著,是传统丸剂的代表之一。小金丸因其复杂的处方和特殊

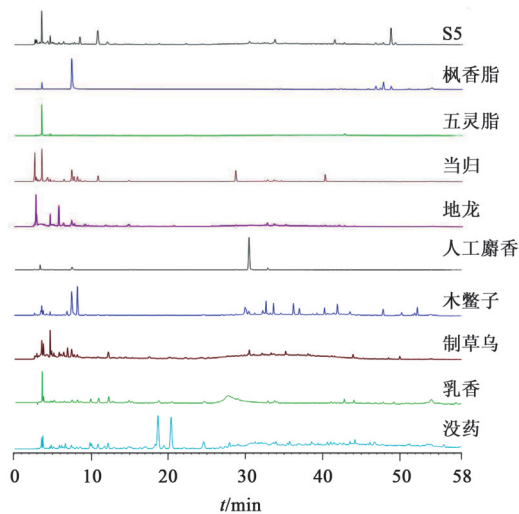


图6 小金丸样品及药材水溶性部位的HPLC  
Fig. 6 HPLC chromatograms of water-soluble fraction of medicinal materials and Xiaojinwan

的人药形式,导致原药材质量一致性和混合均匀性成为影响该成药质量一致性的关键因素。熊茜等<sup>[7]</sup>和任桂林<sup>[8]</sup>拟通过粒子设计改善小金丸药材粉末的混合均匀性问题,解决了工艺环节对质量一致性的影响,但其在质量评控方面还有明显不足。

小金丸组方药味来源各异,故本研究针对小金丸组方复杂、药味来源各异的特点,创新性地对小金丸脂溶性、水溶性部位分别建立HPLC指纹图谱,全面地展示了小金丸的化学成分谱。结果表明同一厂家内和厂家间小金丸样品的质量一致性均存在问题,并且厂家之间相差较大,其引起差异的主要原因是小金丸中脂溶性部位成分,追溯到药材,发现枫香脂主要影响了小金丸指纹图谱相似度。小金丸脂溶性部分和水溶性部分HPLC指纹图谱方法的建立,为研究市售小金丸质量情况及小金丸整体质量一致性评控提供了研究基础。脂溶性部位的提取溶剂考察了石油醚、乙醚、正丁醇、乙酸乙酯、丙酮等,水溶性部分提取溶剂考察了水和不同体积分数(50%,70%)乙醇,利用二极管阵列检测器(DAD)检测数据,对波长190~400 nm的指纹图谱进行分析,结合色谱峰数量和峰强度综合考察,最终确定分别选择乙醚和水为提取溶剂,脂溶性部分选择202 nm作为检测波长,水溶性部分选择250 nm作为检测波长。通过多部位、全波段扫描的全面分析,能够最大程度展现小金丸化学成分谱。

小金丸脂溶性部位指纹图谱色谱峰明显多于水溶性部位,且响应值是水溶性部位的5~10倍,说明小金丸中的脂溶性成分较多且含量较高,是影响

整体化学差异的主要因素,应当加强对乳香、没药、当归尤其是枫香脂等含有较多脂溶性成分药材的质量把控。同时,一些水溶性成分 also 具有很强的生物活性。当归中的阿魏酸具有增强血管舒张、抗血栓等活性,为小金丸中活血的药效物质基础<sup>[9-10]</sup>;原儿茶酸来自小金丸组方药材五灵脂,具有抗炎、抗肿瘤等药理作用,为小金丸抗炎镇痛、抗乳腺增生的药效物质基础<sup>[11]</sup>;说明水溶性部位存在一些低含量、高活性的物质。因此,对于小金丸这种复杂体系中成药的整体质量评控不仅需要化学方法的把关,同时也应根据药物特点选择合适的生物方法对化学方法进行补充、完善,做到了真正意义上的中成药整体质量评控。

#### [参考文献]

- [1] 熊茜,冯碧,曹波,等.小金丸现代研究概况及关键问题分析[J].中国中药杂志,2018,43(24):4801-4807.
- [2] 刘现栋.小金丸治疗甲状腺结节临床研究[J].河南中医,2014,34(6):1189-1190.
- [3] 江宁.小金丸治疗良性前列腺增生80例[J].世界中医药,2008,3(5):277.
- [4] 李慧芳.小金丸治疗带状疱疹后遗神经痛临床分析[J].数理医药学杂志,2018,31(4):544-546.
- [5] 熊茜,潘媛,张婷,等.HPLC-MS/MS多组分定量测定结合化学计量学研究市售小金丸的质量一致性[J].中草药,2017,48(11):2189-2196.
- [6] 徐妍,杨华蕊,杨永寿,等.中药指纹图谱研究现状及展望[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(76):91-94.
- [7] 熊茜,王小平,张定堃,等.基于粒子设计原理的中药制丸粉末中间体均一性优化与评价:以小金丸为例[J].药学报,2017,52(10):1611-1620.
- [8] 任桂林.粒子设计改善小金丸混合均匀性研究[D].成都:成都中医药大学,2015.
- [9] CHOI J H, PARK J K, KIM K M, et al. *In vitro* and *in vivo* antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(1): e22004.
- [10] FUKUDA T, KURODA T, KONO M, et al. Augmentation of ferulic acid-induced vasorelaxation with aging and its structure importance in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2015, 388(10): 1113-1117.
- [11] KHAN A K, RASHID R, FATIMA N, et al. Pharmacological activities of protocathechuic acid [J]. Acta Pol Pharm, 2015, 72(4): 643-650.

[责任编辑 刘德文]