

银翘解毒颗粒中金银花的投料规范性研究

陆静娴, 陈勇, 黄琴伟, 马临科, 祝明^{*}(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310053)

摘要: 目的 采用 HPLC-ELSD 建立银翘解毒颗粒中山银花检查方法, 对制剂中金银花的投料规范性进行研究。方法 采用 Ecosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.1% 甲酸(63:37) 为流动相, 蒸发光散射检测器。结果 以灰毡毛忍冬皂苷乙为指标, 对不同省份的 11 批金银花进行测定, 结果均未检出。同时在 189 批次银翘解毒颗粒样品中, 116 批次样品检出灰毡毛忍冬皂苷乙, 其中 94 批次超上限, 存在违规投料的情况。结论 本法专属性好, 灵敏度高, 可为更好地控制银翘解毒颗粒的制剂质量提供科学依据, 进而促使企业规范生产。

关键词: 银翘解毒颗粒; 投料规范性; 山银花; 金银花; 灰毡毛忍冬皂苷乙

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)13-1669-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.014

引用本文: 陆静娴, 陈勇, 黄琴伟, 等. 银翘解毒颗粒中金银花的投料规范性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1669-1672.

Research on Normalization Feeding of Lonicerae Japonicae Flos in Yinqiao Jiedu Granules

LU Jingxian, CHEN Yong, HUANG Qinwei, MA Linke, ZHU Ming^{*}(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-ELSD method for the determination of Lonicerae Japonicae Flos in examination of Yinqiao Jiedu granules, to investigate the phenomenon of illegal feeding. **METHODS** Ecosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was adopted; mobile phase was methanol-0.1% formic acid solution (63:37); ELSD detector was used. **RESULTS** Maranthoidin B was used as a marker. Among 11 batches from different provinces, no batch was detected with maranthoidin B. Among 189 batches of Yinqiao Jiedu granules, maranthoidin B was detected in 116 batches, and 94 batches were above the limit. There were cases of illegal feeding. **CONCLUSION** The established method is simple and sensitive; it provides a scientific basis for better quality control of Yinqiao Jiedu granules and standardize the production behavior.

KEYWORDS: Yinqiao Jiedu granules; normalization feeding; Lonicerae Flos; Lonicerae Japonicae Flos; maranthoidin B

银翘解毒颗粒处方由金银花、连翘等 9 味中药组成, 其中金银花药材在中国药典 2005 年版以前包括金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 和山银花 *Lonicerae Flos*, 因此, 2005 年前有较多银翘解毒颗粒生产企业采用山银花作为投料, 2005 年后, 金银花来源分列, 但是通过国家药典委员会信息的查询, 并无银翘解毒颗粒生产企业对处方提出变更。同时, 现行质量标准中只对金银花和山银花共有成分绿原酸的含量进行控制^{[1]1505}, 缺乏专属性, 不能制约投料规范性问题。故有必要对现今银翘解毒颗粒市场的金银花投料情况进行摸底筛查, 结合山银花成分的特点, 建立专属的山银花检查方法, 以评价生产企业的投料规范性。

中国药典 2015 年版一部中含金银花类制剂的银花检查均选用灰毡毛忍冬皂苷乙为特征性成分^{[1]1498,738}, 杨倩茹等^[2]对 220 份山银花样品进行

含量测定, 比较皂苷平均含量, 山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙的含量高低依次为灰毡毛忍冬、华南忍冬和红腺忍冬; 川续断皂苷乙的含量高低依次为黄褐毛忍冬、红腺忍冬、灰毡毛忍冬和华南忍冬。康帅等^[3]通过调研发现, 市场上流通的山银花多以灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand.-Mazz. 为主, 以湖南隆回为集散地, 并有外销; 红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq. 和黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng. 商品多在产地流通, 而华南忍冬 *L. confusa* DC. 来源的山银花药材在市场上已很难发现, 基本退出商品。基于上述原因, 本实验以灰毡毛忍冬皂苷乙为指标, 考察银翘解毒颗粒制剂中是否存在山银花替代金银花投料。

1 仪器与试药

U3000RSLC 液相色谱仪(戴安, ELSD6000 蒸发光散射检测器); LC-20AT-ELSD2000ES 液相色谱

作者简介: 陆静娴, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)86459414
药师 Tel: (0571)86459414 E-mail: zhumingd@hotmail.com

E-mail: lujingxian1984@126.com ^{*}通信作者: 祝明, 女, 主任中

谱仪(岛津, 配备 DGU-20A₅ 在线脱气机、LC-20AT 四元梯度泵、SIL-20AC 带温控自动进样器、CTO-20AC 智能型柱温箱、奥泰 ELSD2000ES 蒸发光散射检测器)。

灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111814-201303; 含量: 92.8%); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余为分析纯。银翘解毒颗粒为国家评价性抽验的样品, 共 189 批次, 抽自 31 个省(区、市), 涉及 27 家生产企业。金银花及山银花药材经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 及灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 的干燥花蕾。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Ecosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇-0.1% 甲酸(63:37) 为流动相; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL; 蒸发光散射检测器(漂移管温度: 105 °C; 氮气流速: 2.6 L·min⁻¹)。在该色谱条件下, 灰毡毛忍冬皂苷乙峰能与其他杂质峰得到很好的分离, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成 0.5 mg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取银翘解毒颗粒, 研细, 取约 2.5 g, 精密称定, 至具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取灰毡毛忍冬皂苷乙(0.730 5 mg·mL⁻¹) 对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以色谱峰面积的对数值(Y) 为纵坐标, 以进样量(μg) 的对数值(X) 为横坐标, 进行线性回归。结果表明灰毡毛忍冬皂苷乙在 0.365 3~8.766 3 μg 内与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程 $Y=1.606 2X+0.863 6$, $r=0.999 7$ 。将对照品溶液逐级稀释, 按信噪比 10:1 计算定量限(LOQ), 结果银翘解毒颗粒的 LOQ 为每袋 5 mg。

2.5 仪器精密度试验

取陕西 5# 制药企业(批号: 15043802) 的供试品

溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积 RSD 为 1.3%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取陕西 5# 制药企业(批号: 15043802) 的样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果灰毡毛忍冬皂苷乙的平均含量为 2.542 0 mg·g⁻¹, RSD=1.1%, 说明方法重复性好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量(含量为 2.542 0 mg·g⁻¹) 的陕西 5# 制药企业(批号: 15043802) 的样品粉末约 1.25 g, 精密加入对照品溶液(0.730 5 mg·mL⁻¹) 5.0 mL, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果显示平均回收率($n=6$) 为 101.98%, RSD 为 1.4%, 结果见表 1。

表 1 银翘解毒颗粒中灰毡毛忍冬皂苷乙加样回收率测定结果

Tab. 1 Results of recovery test of maranthoidin B in Yinqiao Jiedu granules

编号	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1	1.247 1	3.170 1	3.652 6	6.922 7	102.74	102.0	1.4
2	1.249 5	3.176 2	3.652 6	6.975 9	104.03		
3	1.248 4	3.173 4	3.652 6	6.854 7	100.78		
4	1.254 3	3.188 4	3.652 6	6.846 4	100.15		
5	1.254 4	3.188 7	3.652 6	6.933 9	102.54		
6	1.256 7	3.194 5	3.652 6	6.906 9	101.63		

2.8 专属性试验

2.8.1 山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙含量的测定
试验中测定了不同产地的 9 批山银花含量, 均检出灰毡毛忍冬皂苷乙, 含量为 2.81%~6.88%。

2.8.2 金银花中灰毡毛忍冬皂苷乙含量的测定
测定了 11 批不同省份, 不同企业提供的金银花中灰毡毛忍冬皂苷乙, 结果该 11 批样品均未测出灰毡毛忍冬皂苷乙。

2.8.3 阴性样品的制备
试验根据银翘解毒颗粒的处方进行了模拟工艺试验, 正常处方(金银花) 投料, 制备阴性样品。阴性样品按“2.3”项下方法制备, 样品中未出现灰毡毛忍冬皂苷乙色谱峰, 结果见图 1。

综上, 认为灰毡毛忍冬皂苷乙为山银花的专属成分, 金银花中无该成分; 按正常处方投料,

不应出现灰毡毛忍冬皂苷乙色谱峰, 故选择以灰毡毛忍冬皂苷乙作为检测山银花的指标。

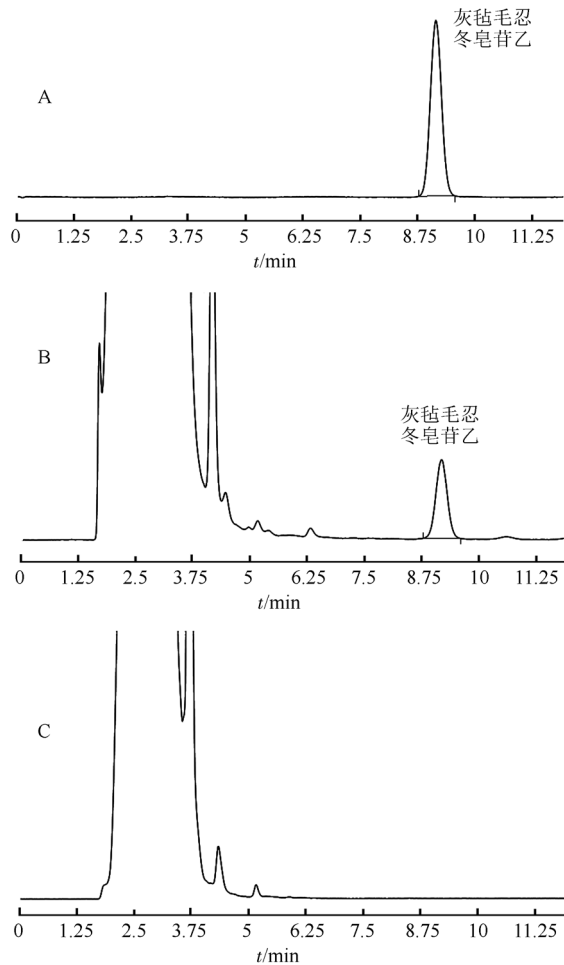


图1 高效液相色谱图

A-灰毡毛忍冬皂苷乙对照品; B-银翘解毒颗粒山银花检查阳性样品; C-阴性样品[银翘解毒颗粒正常处方(金银花)]。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-maranthoidin B reference substance; B-positive sample of Yinqiao Jiedu Granules with Lonicerae Flos; C-negative sample normal prescription(Lonicerae Japonicae Flos of Yinqiao Jiedu Granules).

2.9 稳定性试验

精密吸取供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件, 分别间隔 0, 1, 7, 12, 16, 21, 27, 33, 38 h 测定 1 次, 灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积 RSD 为 1.2%, 结果显示供试品溶液在室温下放置 38 h 内稳定。

2.10 耐用性考察

考察了提取方式(超声和回流)、提取溶剂(甲醇、50%甲醇、50%乙醇)、提取时间(超声 30, 40, 60 min)、料液比(2 g/25 mL、2.5 g/25 mL、3 g/25 mL)的影响, 并进行方法学考察和耐用性考察。考察了不同品牌色谱柱[Ecosil C₁₈、Zorbax SB C₁₈、Ultimate Plus C₁₈, 规格均为(250 mm×4.6 mm,

5 μm)], 不同品牌色谱仪(岛津 LC-20AT-ELSD2000ES, 戴安 U3000RSLC-ELSD6000), 不同柱温(35, 40, 45 °C), 不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹)对本方法的影响。结果显示同一批样品中灰毡毛忍冬皂苷乙的含量 RSD 分别为 1.7%, 1.0%, 2.1%, 0.9%。说明方法耐用性好。

3 样品测定

取银翘解毒颗粒样品, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见表 2。

表2 银翘解毒颗粒中灰毡毛忍冬皂苷乙的含量测定结果
Tab. 2 Assay results of maranthoidin B in Yinqiao Jiedu granules

生产企业	每袋规格/g	批次	每袋检出结果/mg
广东 1#企业	15	32	13.4~31.4
广东 2#企业	15	10	14.3~24.2
		2	未检出
广东 3#企业	15	1	未检出
		1	检出(低于限度)
广东 4#企业	15	1	检出(低于限度)
广东 5#企业	15	1	16.5
广西 1#企业	15	2	检出(低于限度)
		1	未检出
广西 2#企业	15	15	未检出
广西 3#企业	12	3	未检出
		2	检出(低于限度)
广西 4#企业	15	3	16.3~18.4
广西 5#企业	15	3	检出(低于限度)
广西 6#企业	15	5	未检出
河南 1#企业	15	2	未检出
河南 2#企业	15	2	检出(低于限度)
陕西 1#企业	5	2	14.3~17.1
陕西 2#企业	15	1	检出(低于限度)
		18	10.1~32.9
陕西 3#企业	15	4	32.1~57.5
陕西 4#企业	15	1	32.6
陕西 5#企业	15	2	31.7~36.6
上海 1#企业	15	3	13.2~25.5
四川 1#企业	15	1	未检出
		17	9.9~16.2
四川 2#企业	15	7	未检出
四川 3#企业	15	31	未检出
四川 4#企业	15	1	未检出
四川 5#企业	15	1	12.2
		1	未检出
		3	检出(低于限度)
云南 1#企业	15	2	检出(低于限度)
重庆 1#企业	15	3	未检出
		4	检出(低于限度)
重庆 2#企业	15	1	检出(低于限度)

4 讨论

4.1 限度制定

中国药典 2015 年版一部中规定山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量总量不得 $<5.0\%$ 。以本次测定的山银花中含量最高的批次样品(含量为 6.88%)计算,并且按 100% 转移率计算,则金银花中若掺杂有 5% 山银花时,银翘解毒颗粒(规格为每袋 $15, 5\text{ g}$)中灰毡毛忍冬皂苷乙的量不得 $>9.2\text{ mg}$ 。即银翘解毒颗粒中灰毡毛忍冬皂苷乙含量超过该限度时,认为投料的金银花中掺杂有山银花。

4.2 样品测定结果分析

根据拟定限度,27 家生产单位的 189 批次银翘解毒颗粒中有 116 批次样品检出灰毡毛忍冬皂苷乙,其中 94 批次超上限,判定为不符合规定,比例为 49.7% 。包括广西 2#企业在内的 7 家生产企业的样品中均未检出灰毡毛忍冬皂苷乙,包括广东 3#企业在内的 9 家生产企业的样品有少量检出但未超过拟定的限度。另有陕西 3#、4#、5#企业生产的样品中灰毡毛忍冬皂苷乙含量特别高,分析认为该类公司涉嫌直接采用山银花替代金银花投料;其余多家企业均检出灰毡毛忍冬皂苷乙,

且含量超过本次实验规定的限度,故认为可能存在于山银花掺杂投料,或直接用山银花投料且投料的量还没到处方中规定的金银花的量。

根据以上结果发现,金银花药材在实际生产中有使用不规范的情况,采用 HPLC-ELSD 能够有效的将金银花和山银花区分开来。部分企业存在用山银花混充金银花投料的情况或使用劣质原料投料。针对上述问题,有必要对现行标准进行提高完善,增加山银花检查项。针对目前金银花投料规范性、低劣饮片投料等情况,建议加强对一些生产管理混乱企业的日常监督检查,同时加强对原材料的抽验力度。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部 [S]. 2015: 1505, 1498, 738.
- [2] YANG Q R, ZHAO Y Y, HAO J B, et al. Research progress on chemical constituents and their differences between *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(7): 1204-1211.
- [3] KANG S, ZHANG J, WANG YD, et al. Pharmacognostic authentication study for *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34(11): 1913-192.

收稿日期: 2018-10-26

(本文责编: 蔡珊珊)