

小儿咽扁颗粒中掺伪山银花检验方法研究

姜军华^{1#}, 吴良发^{1#}, 许妍^{1*}, 戴忠^{2*}, 周志强¹ (1. 江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立小儿咽扁颗粒中山银花的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)检查方法, 打击中药制剂中金银花的掺假行为。方法: 采用薄层色谱(TLC)法, 以灰毡毛忍冬皂苷乙为指标成分, 以三氯甲烷-甲醇-水(6:4:1)为展开剂, 快速筛查小儿咽扁颗粒中掺伪的山银花; 采用HPLC-ELSD法鉴别小儿咽扁颗粒中掺伪的山银花, 选择Sun Fire[®]C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速1 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 进样量10 μL; 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)法进行确证, 选择Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈(150 mm×2.1 mm, 3 μm)色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速0.3 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 质谱使用电喷雾离子源, 负离子模式下检测。结果: TLC法检测结果显示, 34批样品中共有8家企业生产的16批次样品疑似检出灰毡毛忍冬皂苷乙; HPLC-ELSD法的验证结果与TLC法一致, 小儿咽扁颗粒中金银花掺伪山银花5%及以上即可检出; 16批次检出灰毡毛忍冬皂苷乙样品均得到HPLC-MS法确证。结论: 所建系列方法专属性好, 灵敏度高, 简便、快捷, 为打击金银花掺伪提供了有力的技术支持。

关键词: 小儿咽扁颗粒; 金银花; 山银花; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)04-0443-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.04.011

Study on the Test Method of Adulterated Lonicerae Flos in Xiaoer Yanbian Granule

Jiang Junhua^{1#}, Wu Liangfa^{1#}, Xu Yan^{1*}, Dai Zhong^{2*}, Zhou Zhiqiang¹ (1. Jiangxi Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering and Technology Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC-ELSD identification method of Lonicerae Flos in Xiaoer Yanbian granules, crack down on the adulteration of Lonicerae Japonicae Flos in traditional Chinese medicine preparations.

Methods: The adulterated Lonicerae Flos in Xiaoer Yanbian granules were quickly screen by TLC with macranthoidin B as the index component and trichloromethane methanol water (6 : 4 : 1) as the developing agent; The adulterated Lonicerae Flos in Xiaoer Yanbian granules were identified by HPLC-ELSD, a Sun Fire[®] C₁₈(2)

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目(编号 2019JS05)

作者简介: 姜军华 Tel: (0791) 88158716; E-mail: m13617004949@163.com

共同第一作者: 吴良发 Tel: (0791) 88158780; E-mail: 757497260@qq.com

通信作者: 许妍 Tel: (0791) 88158716; E-mail: 1332408991@qq.com

戴忠 Tel: (010) 67095150; E-mail: daizhong@nifdc.org.cn

column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was selected, the mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the sample volume was 10 μL; it was confirmed by LC-MS, and the column was Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 3 μm) gradiently eluted with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 °C. Electrospray ion source was used for mass spectrometer, detected in negative ion mode. **Results:** TLC test results showed that a total of 16 batches of 34 samples produced by 8 enterprises were suspected of detecting macranthoidin B; the verification result of HPLC-ELSD method were consistent with TLC method, and 5% or more of Lonicerae Flos mixed with Lonicerae Japonicae Flos in Xiaoer Yanbian granules could be detected. The 16 batches of macranthoidin B samples were confirmed by HPLC-MS. **Conclusion:** The established series of methods have good specificity, high sensitivity, simplicity and rapidity, and it provides a strong technical support for combating Lonicerae Japonicae Flos adulteration.

Keywords: Xiaoer Yanbian Granule; Lonicerae Japonicae Flos; Lonicerae Flos; Macranthoidin B; HPLC-ELSD

小儿咽扁颗粒为小儿用药,由金银花、射干等8味中药材组成,具有清热利咽、解毒止痛之功效^[1],临床用于治疗急性咽炎^[2-3]、急性扁桃体炎^[4-5]等。自《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2005年版开始,金银花来源分列,忍冬科植物忍冬为金银花的唯一来源^[6]。经查询国家药典委员会网站可知,自2005年后未批复任何小儿咽扁颗粒生产企业将处方中金银花变更为山银花。随着金银花市场需求日益增长,药材资源有限,而山银花价格较低廉,存在山银花替代金银花投料的现象。《中国药典》2020年版一部显示,金银花和山银花均含有绿原酸^[7-10],而小儿咽扁颗粒现行标准对金银花的控制仅限于绿原酸的控制,无法区分所投药材是金银花还是山银花。相关研究显示,灰毡毛忍冬皂苷乙^[11-13]为山银花特征性成分,通过测定小儿咽扁颗粒中是否含该成分,了解本品中金银花药材的真实投料情况。本课题组研究建立了小儿咽扁颗粒中山银花的薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)^[14-15]快速筛查方法和高效液相色谱-蒸发光散射检测器(High Performance Liquid Chromatography-evaporative Light Scattering Detector, HPLC-ELSD)检查法^[16-17],最后采用液相色谱-质谱(Liquid Chromatography-mass Spectrometry, LC-MS)法^[18-22]进行确证,并对不同厂家的34批样品进行系统的分析,为小儿咽扁颗粒的质量监管提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260高效液相色谱仪,配备Alltech

3300 ELSD检测器,Agilent公司;Agilent 1200快速液相色谱仪-API4000串联质谱仪,配备ESI源、G1312B二元高压泵,G1367D自动进样器,G1315C检测器,G1379B真空在线脱气机,G1316B柱温箱,Agilent公司;Sartorius BT 25S电子天平(十万分之一)、Sartorius CP225D电子天平(万分之一),Sartorius公司。预制硅胶G薄层色谱板(青岛海洋化工有限公司)、预制高效硅胶G薄层色谱板(Merck公司);

1.2 试剂

对照药材金银花(批号121060-201608)、山银花(批号121595-201001)以及对照品灰毡毛忍冬皂苷乙(Macranthoidin B;批号111814-20160,纯度94.4%)均来自中国食品药品检定研究院。小儿咽扁颗粒为江西省监督抽验样品,共计34批,涉及13家企业。乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,水为Milli-Q制备的超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC方法与结果

2.1.1 溶液的制备

2.1.1.1 对照品溶液

取对照品1.03 mg,加甲醇1 mL使溶解,摇匀,即得。

2.1.1.2 对照药材溶液

分别取对照药材金银花和山银花各0.4 g,加水50 mL,煎煮1 h,滤过,滤液用水饱和的正丁醇振荡提取2次,每次30 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次30 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,摇匀,即得。

2.1.1.3 供试品溶液

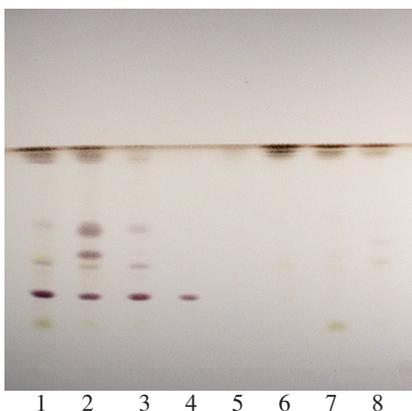
取本品8 g或4 g(无蔗糖),加水50 mL使溶解,离心(4000 r·min⁻¹)10 min,取上清液,用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次30 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次30 mL,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,摇匀,即得。

2.1.1.4 阴性对照溶液

按处方称取不含金银花的其他药材制成缺金银花阴性样品;取阴性样品8 g,按“2.1.1.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.1.2 样品测定

分别对13家企业生产的34批样品按“2.1.1”项下方法分别制成供试品溶液。取其中4家企业的供试品溶液、“2.1.1”项下对照品溶液、对照药材溶液及缺金银花的阴性对照溶液各4 μL,分别点于同一硅胶G薄层色谱板上,使成条带状,以三氯甲烷-甲醇-水(6:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,结果见图1。



1、2. 检出灰毡毛忍冬皂苷乙的样品; 3. 山银花对照药材;
4. 灰毡毛忍冬皂苷乙对照品; 5. 金银花对照药材; 6. 阴性对照; 7、8. 正常投料样品。

图1 TLC方法学考察和样品测定薄层色谱图

通过对34批样品采用TLC法初筛检测,共有8家企业生产的16批次样品疑似检出灰毡毛忍冬皂苷乙;其余样品未检出山银花的特征性成分,起到了快速筛查的目的。由于灰毡毛忍冬皂苷乙最大吸收靠近紫外区,其常用检测器为蒸发光散射检测器,故采用HPLC-ELSD法检测样品中的灰毡毛忍冬皂苷乙。

2.2 HPLC-ELSD方法与结果

2.2.1 色谱条件

采用Sun Fire[®]C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;以水为流动相A,乙腈为流动相B,梯度洗脱(0~8 min, 80%A→72%A; 8~21 min, 72%A→67%A; 21~24 min, 67%A; 24~26 min, 67%A→80%A);流速1 mL·min⁻¹;柱温30℃;进样量10 μL;ELSD检测器,气体流速1.8 L·min⁻¹。理论板数以灰毡毛忍冬皂苷乙计算应不低于5000。

2.2.2 对照品溶液的制备

取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品13.23 mg,精密称

定,置100 mL量瓶中,加50%甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

取本品5袋内容物,研细,取4 g或2 g(无蔗糖),精密称定,置锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,称量,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称量,用50%甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 山银花对照药材溶液的制备

取山银花对照药材0.1 g,按“2.2.3”项下方法制成对照药材溶液。

2.2.5 阴性对照溶液的制备

按处方称取不含金银花的其他药材制成缺金银花阴性样品;取阴性样品4 g,按“2.2.3”项下方法制成缺金银花阴性对照溶液。

2.2.6 测定法

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、山银花对照药材溶液及阴性对照溶液各10 μL,注入

HPLC仪, 测定。若出现与灰毡毛忍冬皂苷乙相同保留时间的色谱峰, 则说明样品中有山银花。色谱

峰见图2。

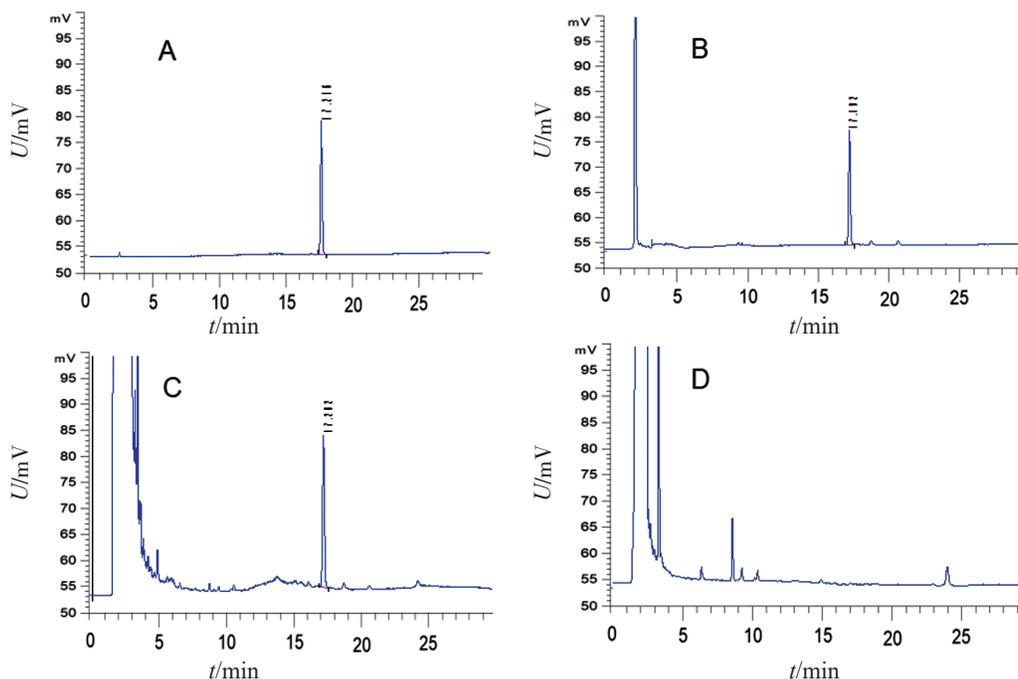


图2 灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(A)、山银花对照药材(B)、含山银花供试品(C)、阴性对照(D)色谱图

2.2.7 方法学研究

2.2.7.1 线性关系考察

精密吸取对照品溶液(质量浓度 $0.1249 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2、5、10、20、30 μL , 依次进样分析, 测得峰面积的积分值, 以进样量的常用对数(X)为横坐标, 以峰面积积分值的常用对数(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线方程: $Y=0.6133X-1.2531$, $R^2=0.9997$, 结果表明灰毡毛忍冬皂苷乙进样量在 $0.25 \sim 3.75 \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

2.2.7.2 精密度试验

精密吸取对照品溶液(质量浓度 $0.1249 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 μL , 连续进样6次, 峰面积常用对数的平均值($n=6$)为2.2164, RSD为1.6%。显示此方法精密度良好。

2.2.7.3 重复性试验

精密称取同一样品6份, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果样品中灰毡毛忍冬皂苷乙平均含量($n=6$)为 $0.9004 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD为0.81%, 表明方法的重复性良好。

2.2.7.4 稳定性试验

精密吸取同一样品溶液, 分别于0、4、8、

12、20、24 h进样测定, 结果灰毡毛忍冬皂苷乙含量的RSD($n=6$)为1.7%, 表明稳定性良好。

2.2.7.5 回收率试验

取样品2 g ($0.9004 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 各6份, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液(精密称取对照品11.35 mg, 置250 mL量瓶中, 加50%甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得) 25 mL, 按“2.2.3”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果表明小儿咽扁颗粒中灰毡毛忍冬皂苷乙6次准确度测定的平均回收率($n=6$)为99.4%, RSD为1.0%。

2.2.7.6 检出限及定量限

取“2.2.2”项下对照品溶液稀释至不同浓度, 进行测定, 采用信噪比法确定检出限及定量限, 信噪比3:1时的量为检出限, 信噪比10:1时的量为定量限, 分别为0.03、0.25 μg 。

2.2.7.7 耐用性

考察了Sun Fire[®] C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、依利特Hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、AlltimaTM C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 3种不同品牌色谱柱, 结果灰毡毛忍冬皂苷乙在不同色谱柱上均分离良好, 色谱峰均可达到基

线分离,表明该方法对3种色谱柱适用性良好,对色谱柱选择性不强。

2.2.7.8 限度

分别自制金银花中含3%、4%、5%、6%山银花的样品A、样品B、样品C、样品D。

分别取上述样品各4 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进行测定。结果表明,当金银花中掺有3%的山银花时,样品中未检出灰毡毛忍冬皂苷乙(低于检测限);当金银花中掺有4%的山银花时,样品中检出灰毡毛忍冬皂苷乙;当掺有5%的山银花时,所测得的峰面积与定量限相当,故综合考虑采用液相验证时,供试品色谱中,在与灰毡毛忍冬皂苷乙对照品色谱峰保留时间相应的位置不得出现相同的色谱峰。若出现保留时间相同的色谱峰,且该色谱峰的峰面积值大于参比溶液(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液)的峰面积值,则视为阳性检出。

2.2.7.9 样品测定

取34批小儿咽扁颗粒,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进行测定。结果表明,共有8家企业生产的16批次样品检出灰毡毛忍冬皂苷乙。其余样品未检出山银花的特征性成分。HPLC-ELSD法的高灵敏度、高分离效果及定量方式,可准确判定小儿咽扁颗粒中是否存在掺伪山银花。为避免研究结果出现假阳性,课题组采取用LC-MS法进行确证。

2.3 LC-MS法确证

2.3.1 色谱条件

采用Thermo Hypersil GOLD aQ C_{18} (150 mm \times 2.1 mm, 3 μm) 色谱柱,以乙腈为流动相A,0.1%甲酸水溶液为流动相B,梯度洗脱(0~6 min, 30%~50%A; 6~6.5 min, 50%~30%A; 6.5~11 min, 30%A),流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量5 μL 。

2.3.2 质谱条件

采用电喷雾电离源(Electrospray Ionization, ESI),负离子检测,电喷雾电压 -4500 V,多反应监测模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM),干燥气温 450 $^{\circ}\text{C}$,气帘气 20 kPa,碰撞气 6 kPa;锥孔电压为-110 V,碰撞电压为-60 V;选择 m/z 1397.8 \rightarrow 1073.7作为检测离子对。

2.3.3 对照品溶液的制备

取“2.2.2”项下对照品溶液1 mL,置于100 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 供试品溶液的制备

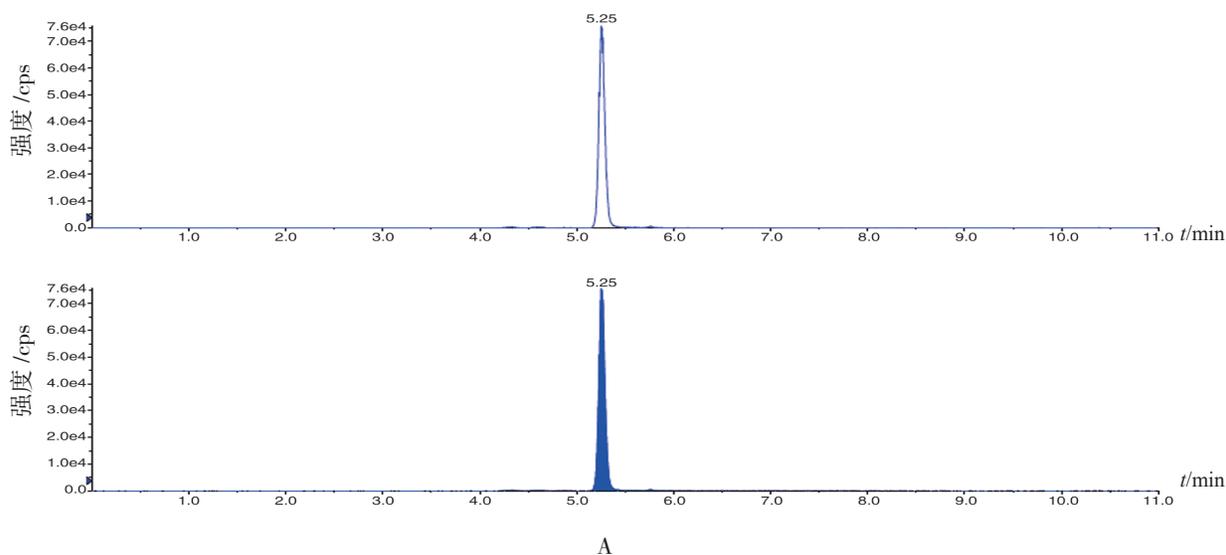
取“2.2.3”项下的供试品溶液1 mL,置于200 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.5 阴性对照溶液的制备

取“2.2.5”项下的阴性对照溶液1 mL,置于200 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.6 测定方法

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液5 μL ,注入LC-MS仪,记录所得质谱MRM色谱图见图3。



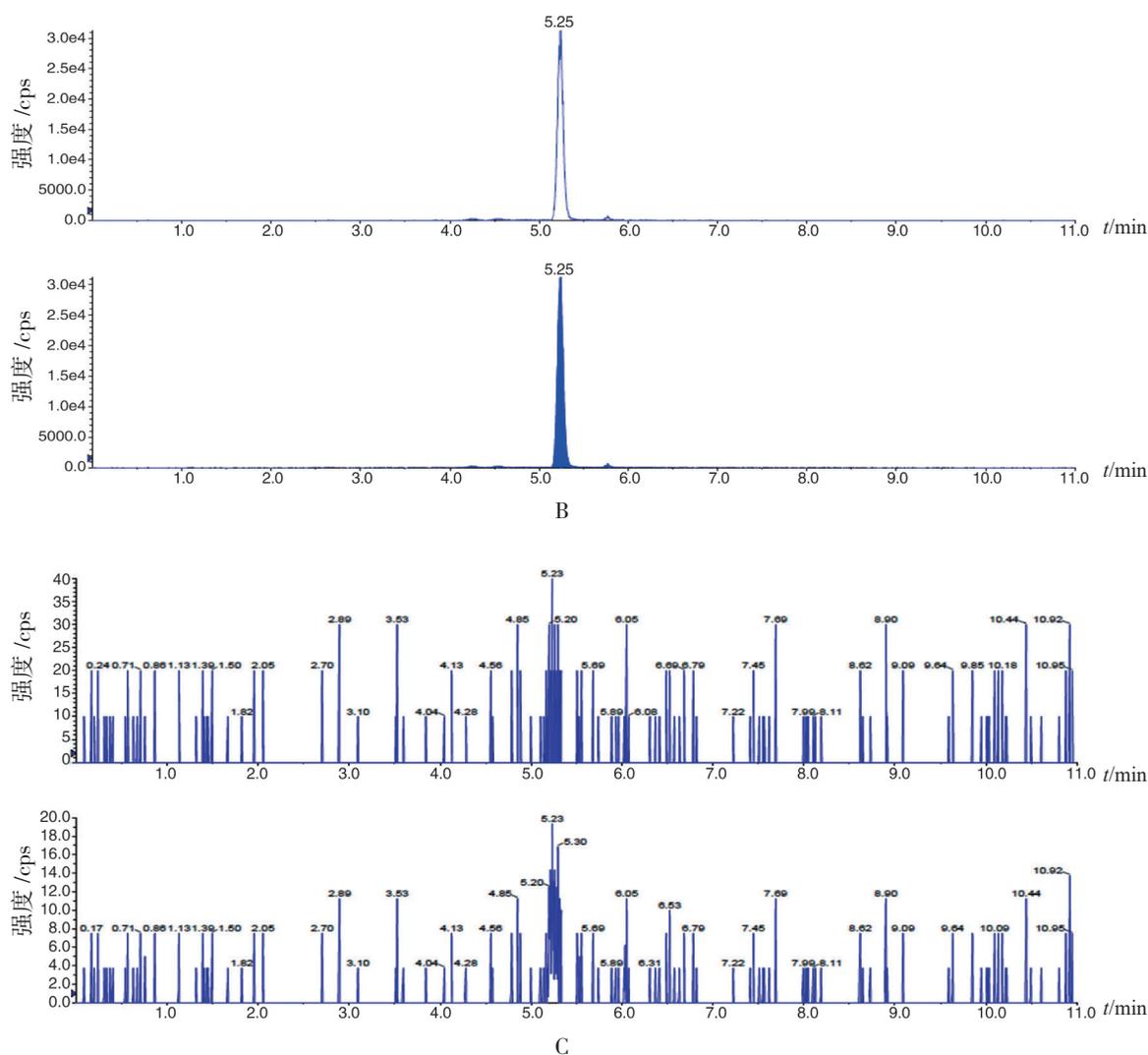


图3 灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(A)、含山银花供试品(B)、阴性对照(C)MRM图

16批次检出灰毡毛忍冬皂苷乙的阳性样品通过LC-MS法进行确证,结果证明HPLC-ELSD法检出的色谱峰为灰毡毛忍冬皂苷乙。

3 讨论

参考灰毡毛忍冬皂苷乙的TLC鉴别方法,选择山银花特征性成分灰毡毛忍冬皂苷乙作为指标成分,通过方法学考察,小儿咽扁颗粒正常样品在灰毡毛忍冬皂苷乙对照品相应位置无干扰,且斑点清晰易检视。TLC法虽快捷、成本低,但存在检测限高、对边缘性结果无法做出准确判断、无法进行定量等不足,因此,TLC鉴别方法可作为小儿咽扁颗粒中掺伪山银花的初筛方法,准确的判定和定量需采用HPLC-ELSD法。

建立HPLC-ELSD法时,分别考察了等度和梯

度洗脱以及不同流动相(甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液)对分离度和柱效的影响,最终发现乙腈-水梯度洗脱可得到最优的分离度和柱效,且基线平稳。该方法具有灵敏度高、准确性好,样品处理简单等优势,可作为判定小儿咽扁颗粒中是否掺伪山银花的检验方法。

课题组在建立小儿咽扁颗粒中掺伪山银花的HPLC-ELSD检验方法时,采用特异性强的LC-MS法对阳性样品中山银花的特征性成分灰毡毛忍冬皂苷乙进行了成分确证,进一步证明了所建方法的准确性。

本研究所建方法为中药质量监管提供了灵活、适用的技术手段。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020：568-569
- [2] 张可可，陈建新，张芬，等. 小儿咽扁颗粒抗急性咽炎药理作用研究[J]. 世界中医药，2019，14（5）：1158-1162.
- [3] 陈强，叶文斌，苏小芳. 利巴韦林气雾剂联合小儿咽扁颗粒治疗急性口咽喉炎疗效观察[J]. 吉林医学，2018，39（7）：1328-1329.
- [4] 陈双，单建聪，管丽芬，等. 小儿咽扁颗粒治疗儿童急性扁桃体炎疗效观察[J]. 家庭医药. 就医选药，2018，（7）：192.
- [5] 张小庆. 头孢克洛咀嚼片联合小儿咽扁颗粒治疗儿童急性扁桃体炎临床观察[J]. 临床合理用药杂志，2017，10（10）：88-89.
- [6] 中华人民共和国药典：一部[S]. 2005：152-153.
- [7] 刘惠，杨姣，朱志飞，等. 基于总量统计矩分析法的金银花、山银花HPLC指纹图谱评价[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（21）：132-139.
- [8] 章娟，黄琪，曾凡俊，等. 金银花和山银花UPLC特征图谱-化学成分模式识别方法研究[J]. 辽宁中医药大学学报，2022，24（7）：49-53.
- [9] 王莹，郝江波，陈佳佳，等. 基于主要化学成分差异的金银花与山银花种质资源系统评价研究[J]. 中南药学，2020，18（5）：825-831.
- [10] 杨倩茹，赵媛媛，郝江波，等. 金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J]. 中国中药杂志，2016，41（7）：1204-1211.
- [11] 王赵，李耀磊，李静，等. 金银花配方颗粒评价性抽验结果分析与建议[J]. 中国药事，2019，33（5）：528-533.
- [12] 孙玲，樊晓兰，郭绮，等. 一测多评法同时测定山银花药材中5种皂苷类成分的含量[J]. 中国药房，2017，28（18）：2546-2549.
- [13] 黄海燕，饶伟文，钟建理. 金银花与山银花指纹图谱对比[J]. 中国现代药物应用，2016，10（16）：288-289.
- [14] 王伟佳. 双黄连注射液质量控制研究[J]. 黑龙江医药，2017，30（1）：10-12.
- [15] 高珊，郭月秋，刘斯亮. 现时金银花与山银花比较鉴别分析[J]. 中国医药科学，2017，7（1）：52-55，154.
- [16] 林永强，王淑华，徐丽华，等. 金银花与山银花的鉴别方法研究[J]. 药学研究，2013，32（2）：69-71.
- [17] 黄晓燕，罗时，李荣玮，等. 银柴颗粒中山银花藤检查方法的研究[J]. 中南药学，2019，7（12）：2119-2122.
- [18] 占永良，程志娟，吾小芬. UPLC-MS/MS法同时测定山银花药材中10种有效成分的含量[J]. 中药材，2017，40（9）：2112-2115.
- [19] 覃丽邴，白桂昌，张慧，等. 银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查[J]. 中国药事，2021，35（12）：1375-1382.
- [20] 郑文燕，李哲，冯启宏，等. HPLC和UPLC-MS/MS法考察清热解毒口服液中金银花投料规范性[J]. 中国药师，2022，25（1）：189-193.
- [21] 周丽清，胡敏. 利胆片中山银花检查方法的研究[J]. 海峡药学，2020，32（12）：51-53.
- [22] 吕运权，杜娟. UPLC法筛查小儿咳喘灵颗粒中掺杂山银花[J]. 中医临床研究，2019，11（10）：27-29.

（收稿日期 2022年7月7日 编辑 郑丽娥）