

银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查

覃丽娜^{1,2#}, 白桂昌^{2#}, 张慧^{2*}, 何颂华^{2*} (1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西食品药品检验所, 国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的: 建立银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查方法, 考察生产企业是否存在使用山银花代替金银花投料现象。方法: 采用高效液相色谱-串联质谱法, 色谱柱为Waters CORTECS (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱, 流速为0.5 mL·min⁻¹。结果: 灰毡毛忍冬皂苷乙在0.0440~5.504 μg·mL⁻¹呈良好的线性关系, 平均回收率为101.49%, RSD=5.97% (n=9); 川续断皂苷乙在0.0458~5.720 μg·mL⁻¹呈良好的线性关系, 平均回收率为104.71%, RSD=4.99% (n=9)。结论: 本方法灵敏、准确, 可作为银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查方法。

关键词: 银翘解毒颗粒; 金银花; 山银花; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙; 高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)12-1375-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.12.008

Adulteration Inspection of Lonicerae Japonicae Flos in Yinqiaojiedu Granules

Qin Lili^{1,2#}, Bai Guichang^{2#}, Zhang Hui^{2*}, He Songhua^{2*} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Institute of Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chinese Material Medica, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To establish the identification method for the adulteration of Lonicerae Japonicae Flos in Yinqiaojiedu Granules to investigate whether there is a phenomenon of using Lonicerae Flos to replace Lonicerae Japonicae Flos in the manufacture enterprises. **Methods:** LC-MS method was used with Waters CORTECS (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) as analytical column, acetonitrile and water were used as mobile phase for gradient elution, the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. **Results:** Macranthoidin B showed good linear relationship in the range of 0.0440-5.504 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 101.49% with RSD=5.97% (n=9). Dipsacoside B showed good linear relationship in the range of 0.0458-5.720 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 104.71% with RSD=4.99% (n=9). **Conclusion:** The method is sensitive and accurate, which can be applied to adulteration detection of Lonicerae Japonicae Flos in Yinqiaojiedu Granules.

Keywords: Yinqiaojiedu Granules; Lonicerae Japonicae Flos; Lonicerae Flos; macranthoidin B; dipsacoside B; LC-MS

作者简介: 覃丽娜; Tel: (0771) 5828498; E-mail: 68223105@qq.com

共同第一作者: 白桂昌; Tel: (0771) 5828498; E-mail: 353246271@qq.com

通信作者: 张慧; Tel: (0771) 5828498; E-mail: 362591531@qq.com

何颂华; Tel: (0771) 5828498; E-mail: hshua3@sina.com

银翘解毒颗粒由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子(炒)、桔梗、淡竹叶、甘草等九味药组成。从《中华人民共和国药典》2005年版开始,金银花分列为金银花和山银花,忍冬科植物忍冬为金银花的唯一植物来源,其他品种均归为山银花^[1]。品种分别列出后,中成药处方中标明使用金银花的不允许使用山银花代替,否则以假药论处。经查阅文献发现,金银花和山银花在化学成分上是有差别的,山银花含有金银花所没有或含量很低的特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙^[2-4]。银翘解毒颗粒处方标明使用金银花,本文拟建立质谱法检查银翘解毒颗粒中是否含有山银花。为考察生产企业是否存在使用山银花代替金银花投料现象,本研究对银翘解毒颗粒进行金银花掺伪检查研究。

1 仪器与试药

Agilent 6460三重四极杆液质联用仪, Agilent

1260高效液相色谱仪, Alltech 3300 ELSD蒸发光检测器, ML204型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), Hei-VAP型旋转蒸发仪(德国Heidolph公司)。

灰毡毛忍冬皂苷乙(中国食品药品检定研究院提供,供含量测定用,批号111814-201604,含量94.4%);川续断皂苷乙(中国食品药品检定研究院提供,供含量测定用,批号111813-201403,含量92.2%);水杨酸(中国食品药品检定研究院提供,供含量测定用,批号100106-200303,含量100%)。

银翘解毒颗粒10批。山银花样品10批,经广西食品药品检验所黄清泉主管中药师鉴定为山银花,详见表1。

金银花样品3批,经广西食品药品检验所黄清泉主管中药师鉴定为金银花,详见表2。

表1 山银花收集情况

序号	名称编号	产地	来源
1	山银花 1	广西	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
2	山银花 2	亳州	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
3	山银花 3	广西	黄褐毛忍冬 <i>Lonicera fulvotomentosa</i>
4	山银花 4	贵州	黄褐毛忍冬 <i>Lonicera fulvotomentosa</i>
5	山银花 5	马山	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
6	山银花 6	怀化	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
7	山银花 7	怀化	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
8	山银花 8	广西	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
9	山银花 9	江西	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>
10	山银花 10	江西	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i>

表2 金银花收集情况

序号	名称编号	产地	来源
1	金银花 1	广东广州	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>
2	金银花 2	广西南宁	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>
3	金银花 3	广西玉林	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>

2 山银花和金银花中灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙的含量情况

2.1 山银花

测定方法：按照《中华人民共和国药典》

2020年版一部山银花【含量测定】项下方法，测定收集到的10批山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙总含量，结果如表3。

表3 山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙含量测定结果

序号	样品编号	川续断皂苷乙含量 /%	灰毡毛忍冬皂苷乙含量 /%	总含量 /%
1	山银花 1	3.267	2.489	5.756
2	山银花 2	0.356	5.156	5.511
3	山银花 3	1.889	未检出	1.889
4	山银花 4	5.100	未检出	5.100
5	山银花 5	未检出	5.278	5.278
6	山银花 6	未检出	5.933	5.933
7	山银花 7	0.522	5.844	6.367
8	山银花 8	未检出	6.856	6.856
9	山银花 9	未检出	7.667	7.667
10	山银花 10	0.311	8.467	8.778

注：川续断皂苷乙检出限为 0.02%；灰毡毛忍冬皂苷乙检出限为 0.01%。

2.2 金银花

据文献报道，金银花不含或仅含少量灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙^[4-6]。

3 银翘解毒颗粒模拟样品和掺入5%山银花的银翘解毒颗粒模拟样品的制备

按制剂制法，分别掺入0%与5%山银花，制成银翘解毒颗粒模拟样品以及掺入5%山银花的银翘

解毒颗粒模拟样品。

4 方法与结果

4.1 色谱条件

色谱柱为Waters CORTECS (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm)，以乙腈为流动相A，水为流动相B，按表4程序进行洗脱；流速为0.5 mL · min⁻¹；柱温为35 °C，进样量为5 μL。

表4 洗脱程序

时间 /min	水 /%	乙腈 /%
0 ~ 5	95 → 80	5 → 20
5 ~ 10	80 → 10	20 → 90
10 ~ 13	10	90
13 ~ 13.5	10 → 95	90 → 5
13.5 ~ 19	95	5

4.2 质谱条件

采用电喷雾负离子模式 (ESI⁻)，多反应离子监测 (MRM)；干燥气温度：350 ℃；雾化器压力：40 Psi；干燥气流速：5 L·min⁻¹；鞘流气温度：350 ℃；鞘流气流速：10 L·min⁻¹；毛细管电压：3500 V；喷嘴电压：500 V。

4.3 检测离子对的选择

参考文献^[7-8]，使用灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙及水杨酸（内标）对照品，根据其精确分子量，使用Agilent Optimizer质谱条件优化软件优化得参数如表5。

表5 质谱采集参数

编号	成分	母离子	子离子	碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
1	灰毡毛忍冬皂苷乙	1397.7	1073.5*	230	41
		1397.7	603.2	230	97
		1397.7	471.3	230	100
2	川续断皂苷乙	1073.6	749.3*	240	41
		1073.6	323.1	240	29
3	水杨酸	137.0	92.9*	130	16
		137.0	64.8	130	32

注：“*”为定量离子。

4.4 内标溶液的制备

参考文献^[9-10]，选用水杨酸作为内标。取水杨酸对照品10.63 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，即得每1 mL含106.3 μg的水杨酸内标储备液。

4.5 混合对照品溶液的制备

精密称取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品11.66 mg、川续断皂苷乙对照品12.41 mg，分别置20 mL量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，再分别精密吸取2.00 mL，置同一10 mL量瓶中，加50%甲醇稀释至刻度，摇匀，即得每1 mL各含100 μg的混合对照品贮备溶液。

分别精密量取混合对照品贮备溶液及上述内标储备液适量，加50%甲醇制成每1 mL各含0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 μg的混合对照品溶液（其中水杨酸浓度皆为1 μg·mL⁻¹）。

4.6 供试品溶液的制备

取本品适量，研细，取约1.0 g，精密称定，

置50 mL量瓶中，精密加入内标溶液1.0 mL，再加甲醇约45 mL，超声处理（功率320 W，频率40 kHz）1 h，放冷，加甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，精密吸取续滤液2.00 mL，置10 mL量瓶中，加50%甲醇稀释至刻度，摇匀，微孔滤膜（0.22 μm）滤过，即得。

4.7 测定法

分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各5 μL，注入高效液相色谱-串联质谱联用仪，测定，以内标标准曲线法计算灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙的含量。

4.8 线性关系考察

取“4.5”项下的混合对照品溶液，进样测定，处理软件计算的线性回归方程见表6，表明灰毡毛忍冬皂苷乙在0.0440 ~ 5.504 μg·mL⁻¹、川续断皂苷乙在0.0458 ~ 5.720 μg·mL⁻¹线性关系良好。

表6 灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙线性结果

编号	成分	处理软件计算的回归方程	处理软件计算的 r^2	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	灰毡毛忍冬皂苷乙	$Y=1.0534X+0.02242$	0.9998	0.0440 ~ 5.504
2	川续断皂苷乙	$Y=0.6988X-0.00578$	0.9995	0.0458 ~ 5.720

注: Y 表示校正因子 ($f = \text{成分峰面积} / \text{内标峰面积}$); X 代表浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

4.9 精密度试验

取同一份供试品溶液(样2),按拟订的色谱条件,连续测定6次,测定色谱峰峰面积,结果灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积的RSD为0.71% ($n=6$),川续断皂苷乙峰面积的RSD为1.08% ($n=6$),表明本方法精密度良好。

4.10 重复性试验

取同一批样品(样2),按拟定的方法制备6份供试品溶液,分别进样5 μL ,按拟订的色谱条件测定,结果灰毡毛忍冬皂苷乙平均含量为0.3149 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=2.43% ($n=6$);川续断皂苷乙平均含量为0.0667 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=2.49% ($n=6$);表明方法的重复性良好。

4.11 稳定性试验

对同一供试品溶液(样2),分别在0、4、8、12、16 h测定,共测定5次,结果灰毡毛忍冬皂苷乙平均含量为0.3024 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=2.53% ($n=5$);川续断皂苷乙平均含量为0.0637 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD=2.41% ($n=5$),表明样品溶液在16 h内稳定。

4.12 加样回收试验

精密称取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品11.66 mg,置20 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再精密吸取2.00 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 mL含0.04403 mg的灰毡毛忍冬皂苷乙对照品溶液。

精密称取川续断皂苷乙对照品12.41 mg,置20 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再精密吸取3.00 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 mL含0.03433 mg的川续断皂苷乙对照品溶液。

取供试品适量(样2,其中灰毡毛忍冬皂苷乙含量0.3149 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、川续断皂苷乙含量0.0667 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),研细,取约0.5 g(9份),精密称定,置50 mL量瓶中,分别精密加入灰毡毛忍冬皂苷乙对照品溶液(0.04403 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.00、3.00、5.00 mL(各3份);精密加入川续断皂苷乙对照品溶液(0.03433 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.50、1.00、2.00 mL(各3份),按供试品溶液的制备方法,制成加样回收样品溶液,进样,测定。结果如表7、8,表明方法的准确度良好。

4.13 检测限测定

取川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙均未检出的银翘解毒颗粒模拟样品约1 g,精密称定,精密加入混合对照品溶液(浓度约10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL(加样水平0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),按供试品溶液的制备方法,同法制成加样样品溶液,结果加样水平0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的加样样品川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙定性、定量离子信噪比均大于3。综合考虑样品基质效应,拟定川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙的检测限均为0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4.14 定量限测定

取川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙均未检出的银翘解毒颗粒模拟样品约1 g,精密称定,精密加入混合对照品溶液(浓度约10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 6.0 mL(加样水平0.06 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),按供试品溶液的制备方法,同法制成加样样品溶液,结果加样水平0.06 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的加样样品川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙定性、定量离子信噪比均大于10。综合考虑样品基质效应,拟定川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙的定量限均为0.07 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表7 灰毡毛忍冬皂苷乙加样回收试验结果

编号	取样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	灰毡毛忍冬皂苷乙 加入量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
1	0.5224	0.16448	0.25427	0.08806	101.96		
2	0.5244	0.16511	0.25321	0.08806	100.04		
3	0.5011	0.15778	0.24412	0.08806	98.05		
4	0.5438	0.17122	0.31231	0.13209	106.81		
5	0.5241	0.16502	0.31076	0.13209	110.33	101.49	5.97
6	0.5303	0.16697	0.31178	0.13209	109.63		
7	0.5011	0.15778	0.36684	0.22015	94.96		
8	0.5086	0.16014	0.37085	0.22015	95.71		
9	0.5022	0.15812	0.36936	0.22015	95.95		

表8 川续断皂苷乙加样回收试验结果

编号	取样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	川续断皂苷乙 加入量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
1	0.5224	0.03485	0.05158	0.017165	97.47		
2	0.5244	0.03498	0.05239	0.017165	101.41		
3	0.5011	0.03343	0.05047	0.017165	99.28		
4	0.5438	0.03628	0.07406	0.03433	110.06		
5	0.5241	0.03496	0.07167	0.03433	106.92	104.71	4.99
6	0.5303	0.03538	0.07444	0.03433	113.79		
7	0.5011	0.03343	0.10410	0.06866	102.93		
8	0.5086	0.03393	0.10742	0.06866	107.04		
9	0.5022	0.03350	0.10455	0.06866	103.48		

4.15 样品测定

按上述拟订的方法,测定10批来自不同生产企业的银翘解毒颗粒、银翘解毒颗粒模拟样品以及掺入5%山银花的银翘解毒颗粒样品,结果如表9。结果显示,10批样品均检出川续断皂苷乙或灰毡毛

忍冬皂苷乙,但川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙的总含量均小于掺入5%山银花的银翘解毒颗粒样品的含量,故结果仍判定为未检出。对照品、掺入5%山银花的样品与市售银翘解毒颗粒样品图谱见图1、2。

表 9 样品测定结果

序号	川续断皂苷乙含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	灰毡毛忍冬皂苷乙含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	与掺入 5% 山银花的模拟 样品比较
1	0.263	0.056	0.319	小于
2	0.068	0.315	0.383	小于
3	0.061	0.300	0.360	小于
4	0.035	0.212	0.246	小于
5	0.036	0.226	0.262	小于
6	0.036	0.223	0.259	小于
7	0.012	0.023	0.036	小于
8	0.007	0.008	0.014	小于
9	0.047	未检出	0.047	小于
10	0.003	未检出	0.003	小于
模拟样品	0.0006	0.0005	0.001	小于
掺入 5% 山银 花模拟样品	0.090	0.298	0.388	/

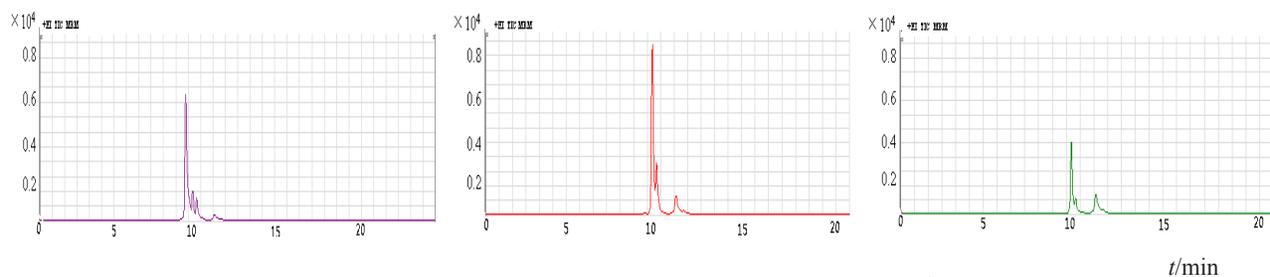


图 1 川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙混合对照品 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (左)、掺入 5% 山银花的银翘解毒颗粒模拟样品 (中) 及市售银翘解毒颗粒样品 (编号 2, 右) 总离子流图

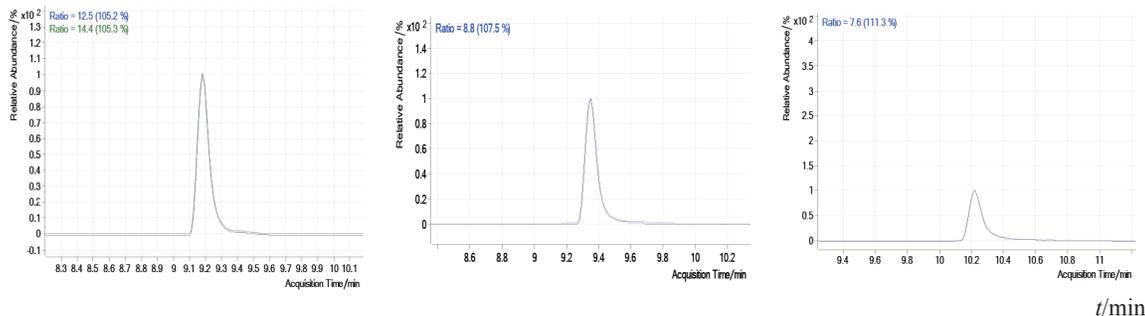


图 2 灰毡毛忍冬皂苷乙对照品 (左)、川续断皂苷乙对照品 (中)、水杨酸 (右) MRM 图

5 讨论

5.1 测定方法选择

曾试验过采用不同的提取方法及不同的展开系统进行薄层色谱检查^[9-10], 阴性样品在灰毡毛忍冬皂苷乙对照品相应位置无干扰, 但在川续断皂苷乙对照品斑点相应位置有干扰, 故放弃。

5.2 供试品溶液提取

曾试验对不同的提取方式(加热回流和超声)、提取溶剂(甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇)和提取时间(30、60、90 min)进行了考察, 结果发现, 甲醇超声提取60 min效果最佳。

5.3 流动相选择

曾试验过以乙腈-0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱, 发现各色谱峰与以乙腈-水为流动相洗脱时相比较差异不明显, 考虑到保护色谱柱, 选择乙腈-水为流动相。

5.4 限度制定依据

《中华人民共和国药典》2020年版四部通则0212药材和饮片检定通则中规定: 药屑及杂质不得过3%。考虑到山银花与金银花产地分布广泛, 二者性状相似度高, 金银花中容易混杂有少量山银花; 金银花中掺入5%山银花可忽略不计, 非故意掺伪; 且金银花中含有微量的灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙, 质谱可检出, 故以掺入5%山银花的银翘解毒颗粒模拟样品的含量限度作为制定依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 32-33, 230-232.
- [2] 肖美凤, 刘文龙, 周晋. 金银花和山银花的研究现状及质量控制的关键问题[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4905-4911.
- [3] 刘力名, 郭东晓. 金银花提取物中山银花投料的检查方法研究[J]. 智慧健康, 2017, 13(33): 72-74.
- [4] 李泮霖, 李楚源, 刘孟华, 等. 基于UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS技术的金银花、山银花化学成分比较[J]. 中南药学, 2016, 14(4): 33-39.
- [5] 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.
- [6] 李红霞, 王雪芹, 李振国, 等. 不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2935-2937.
- [7] 王亚丹, 何轶, 戴忠, 等. HPLC-MS-MS同时测定山银花中10种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1870-1875.
- [8] 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.
- [9] 陈叶青. 银翘解毒颗粒质量标准研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
- [10] 何远景. 复方双花颗粒中金银花的定性鉴别标准提高研究[J]. 四川中医, 2017, 35(1): 49-52.

(收稿日期 2021年7月7日 编辑 王雅雯)