

金银花配方颗粒、标准汤剂含量测定及指纹图谱研究

朱敏¹, 魏惠珍^{1,2}, 金浩鑫², 吴柳瑾², 鄢星¹, 林苗苗¹, 张晓男¹, 饶毅^{1,2*}

¹江西中医药大学, 南昌 330004; ² 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006

摘要: 本文主要为金银花配方颗粒的质量评价提供依据, 并建立金银花配方颗粒、标准汤剂含量测定及 HPLC 指纹图谱的研究方法。主要采用 HPLC 法测定金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒绿原酸、木犀草苷含量, 建立三者指纹图谱共有模式。结果显示金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒中绿原酸、木犀草苷含量差异较大; 分别建立金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒的指纹图谱; 金银花配方颗粒 HPLC 指纹图谱中的 12 个共有峰均可在标准汤剂中追踪到, 有 11 个可以在饮片中得到追踪, 并指认出绿原酸、芦丁、木犀草苷 3 种成分。表明所建立的定性、定量分析方法简便, 准确度高, 专属性强, 对金银花配方颗粒的鉴定及质量控制具有指导意义和参考价值。

关键词: 金银花饮片; 标准汤剂; 配方颗粒; 含量测定; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: J001-6880(2019)1-0110-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.1.017

Content determination and fingerprint of *Lonicera japonica* formula granules and standard decoctions

ZHU Min¹, WEI Hui-zhen^{1,2}, JIN Hao-xin², WU Liu-jin², YAN Xing¹,
LIN Miao-miao¹, ZHANG Xiao-nan¹, RAO Yi^{1,2*}

¹Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004;

²The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006

Abstract: This paper established the content determination of *Lonicera japonica* formula granules, standard decoction and HPLC fingerprint study method, which provided the basis for the quality evaluation of *Lonicera japonica* formula granules. HPLC method was used to determine the content of *Lonicera japonica* herb, standard decoction, formula granules chlorogenic acid and luteoloside. The common pattern of the three fingerprints was established. The results showed that the contents of chlorogenic acid and luteoloside in *Lonicera japonica* herb, standard decoction and formula granules were significantly different. Fingerprint of *Lonicera japonica* herb, standard decoction and formula granules were established respectively. A total of 12 peaks in HPLC fingerprint of *Lonicera japonica* formula granules can be traced in standard decoction, 11 were tracked in the herb and to identify the chlorogenic acid, rutin and luteoloside of 3 components. The indicates that the method of qualitative and quantitative analysis is simple, accurate, and specific, which has guiding significance and reference value for the identification and quality control of formula granules.

Key words: *Lonicera japonica* herb; standard decoction; formula granules; content determination; fingerprint

中药配方颗粒是由单位中药饮片经水提、浓缩、干燥、制粒而成, 具有免煎易服、起效快、携带方便, 安全卫生等优点^[1,2]; 由于中药配方颗粒经一系列现代制备工艺加工制成后, 在性状和显微鉴别上已经完全不同原药材, 因此, 制定科学有效、重现性好的质量控制方法对中药配方颗粒具有重大意义。

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb 的干燥花蕾或带初开的花, 药用历史悠久, 为常用中药之一^[3]。金银花主要含有挥发油类、有机酸类、黄酮类、三萜皂苷类、环烯醚萜类等成分, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化等药理作用; 其中绿原酸具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒等药理作用^[4-9]。

已有文献报道金银花配方颗粒的质量标准研究^[10-13], 但仅检测了其中绿原酸的含量, 有的进行了指纹图谱的初步研究, 代云桃等^[14]研究了金银花

收稿日期: 2018-04-10 接受日期: 2018-12-12

基金项目: 江西省重点研究计划(2017ACG70010)

* 通信作者 Tel: 86-791-7119609; E-mail: raoyi99@126.com

标准汤剂的质量评价方法。本文在上述研究的基础上,根据2016年8月国家药典委员会颁布的《中药配方颗粒管理办法(征求意见稿)》的原则,制备金银花配方颗粒,并与标准汤剂进行了比较,利用HPLC方法分别建立了金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒的含量测定方法及指纹图谱鉴别方法,分别检测了15批次的金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒中绿原酸、木犀草苷两种成分的含量,并比较了三者主要化学成分的差异,不仅对最终配方颗粒的质量具有很好的可控性,而且表明配方颗粒制备工艺的稳定性,为金银花配方颗粒替代传统药材的可行性研究及临床研究提供可行性依据。

1 实验材料

SHIMADZU LC-20AD 高效液相色谱仪(SHI-

MADZU,日本),梅特勒 AB-104N 万分之一电子天平(梅特勒-托利多,瑞士),SHIMADZU AUW220D 十万分之一电子分析天平(SHIMADZU,日本),Milli-Q 超纯水机(Millipore,美国)。

绿原酸对照品(批号110753,纯度为96.2%),木犀草苷对照品(批号111720,纯度94.9%),芦丁对照品(100080,纯度为92.6%),三者均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,15批金银花饮片,购自山东、河南、山西等地;根据《中国药典》2015版金银花中含量测定项测定绿原和木犀草苷的含量,见表1,结果显示所有批次的饮片中绿原酸含量均大于1.5%,木犀草苷含量均大于0.05%,全部符合药典标准。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	产地 Origin	绿原酸 Chlorogenic acid (%)	木犀草苷 Galuteolin (%)
J1	平邑铜石 Tongshipingyi	1.8	0.114
J2	平邑山阴 Shanyinpingyi	3.1	0.219
J3	平邑流峪 Liuyupingyi	2.9	0.152
J4	平邑百彦 Baiyanpingyi	3.8	0.266
J5	平邑郑城 Zhengchengpingyi	2.9	0.240
J6	临沂平邑 Pingyilinyi	1.5	0.246
J7	山东临沂 Linyishandong	3.5	0.162
J8	封丘尹岗 Yingangfengqiu	3.2	0.213
J9	封丘鲁岗 Lugangfengqiu	3.2	0.213
J10	封丘王村 Wangcunfengqiu	3.0	0.234
J11	封丘际固 Jigufengqiu	2.9	0.205
J12	封丘黄德 Huangdefengqiu	3.4	0.178
J13	南阳西峡 Xixiananyang	1.5	0.213
J14	南阳西峡 Xixiananyang	1.6	0.233
J15	运城新绛 Xinjiangyuncheng	1.8	0.235

2 实验方法

2.1 含量测定的建立

2.1.1 色谱条件

条件1(绿原酸):色谱柱 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(12:88, v/v);检测波长:327 nm,流速:1.0 mL/min,柱温:30 °C,进样量:10 μL。

条件2(木犀草苷):色谱柱 Agilent ZORBAX

SB-phenyl(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 90%~80% B, 15~30 min, 80% B, 30~40 min, 80%~70% B);检测波长:350 nm,流速:1.0 mL/min,柱温:30 °C,进样量:10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称定绿原酸、木犀草苷对照品适量,加50%乙醇制成浓度分别为39.1 μg/mL和19.4 μg/mL的对照品溶液。

2.1.3 标准汤剂和配方颗粒的制备

标准汤剂的制备(参考2016年8月国家药典委员会颁布的《中药配方颗粒管理办法(征求意见稿)》的原则):取金银花饮片100 g,精密称定,加12倍量水浸泡30 min,武火煮沸,文火保持微沸30 min,趁热过滤;药渣加10倍水煎煮,文火保持微沸20 min,趁热过滤,合并2次煎液,减压浓缩,冷冻干燥(每克标准汤剂相当于2.5 g饮片)。

配方颗粒的制备:将上述项所得煎液减压浓缩,喷雾干燥,干法制粒而成(每克配方颗粒相当于2 g饮片)。

2.1.4 供试品溶液的制备

取本品粉末(研磨后)适量,精密称取,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇25 mL,称定重量,超声处理(功率250 W,频率35 kHz)20分钟,放冷,再称定重量,用50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,即得供试品A(用于测定木犀草苷的含量),再精密量取续滤液5 mL,置25 mL棕色量瓶中,加50%乙醇至刻度,即得供试品溶液B(用于测定绿原酸的含量)。

2.1.5 方法学考察

精密密度试验 连续进样对照品溶液6次,结果RSD值均在2.0%以内,表明仪器的精密密度良好。

重复性试验 按“2.1.4”项下方法平行制备六份供试品溶液,进样测定,结果标准汤剂中绿原酸RSD值为0.95%、木犀草苷RSD值为1.43%,配方颗粒中绿原酸RSD值为1.49%、木犀草苷RSD值为1.08%,表明该方法测定金银花标准汤剂和配方颗粒的重复性良好。

溶液稳定性试验 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,制样后0、2、4、8、12、24 h进样分析,结果标准汤剂中绿原酸RSD值为0.95%、木犀草苷RSD值为0.26%,配方颗粒中绿原酸RSD值为1.59%、木犀草苷RSD值为1.56%,表明金银花标准汤剂和配方颗粒溶液在24 h内溶液基本稳定。

线性试验 分别进浓度为6.7、13.4、26.7、53.5、133.7 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸对照品溶液和浓度为3.9、7.7、19.4、38.7、96.8 $\mu\text{g/mL}$ 木犀草苷对照品溶液,测定峰面积,以浓度为(X)为横坐标,峰面积为(Y)为纵坐标,计算回归方程,结果显示绿原酸回归方程 $Y = 31222564.49X - 59431.08$ ($r = 0.9999$),表明绿原酸在6.7~133.7 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系;木犀草苷回归方程 $Y = 27997136.92X -$

514865.05 ($r = 0.9999$),表明木犀草苷在3.9~96.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系。

加样回收试验 取已知含量金银花标准汤剂、配方颗粒的样品6份,按100%加入的量分别加入绿原酸对照品、木犀草苷对照品适量,按“2.1.4”项下方法制备,计算回收率,结果显示标准汤剂中绿原酸平均回收率为100.91% (RSD = 1.58%);木犀草苷平均回收率为100.23% (RSD = 1.53%),配方颗粒中绿原酸平均回收率为99.98% (RSD = 1.10%);木犀草苷平均回收率为100.16% (RSD = 1.23%),说明该方法测定金银花标准汤剂和配方颗粒的准确性良好。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 92% B, 5~15 min, 92%~80% B, 15~35 min, 80% B, 35~55 min, 80%~70% B, 55~60 min, 70%~58% B); 检测波长: 350 nm, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 10 μL 。

2.2.2 对照品溶液的制备

分别取绿原酸、芦丁、木犀草苷对照品适量,加50%乙醇溶解,制成混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

饮片供试品溶液的制备 参照《中国药典》2015版金银花中木犀草苷含量测定的制备方法。

标准汤剂供试品溶液的制备 按上述“2.1.4”项下供试品A溶液方法制得标准汤剂供试品溶液。

配方颗粒供试品溶液的制备 按上述“2.1.4”项下供试品A溶液方法制得配方颗粒供试品溶液。

2.2.4 方法学考察

精密密度试验 连续进样供试品溶液6次,结果饮片、标准汤剂、配方颗粒相对保留时间和相对峰面积的RSD值均在5%以内,表明仪器的精密密度良好。

重复性试验 按“2.2.3”项下方法平行制备六份供试品溶液,进样测定,结果饮片、标准汤剂配方颗粒相对保留时间和相对峰面积RSD值均在5%以内,表明该方法测定金银花饮片、标准汤剂和配方颗粒的重复性良好。

溶液稳定性试验 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,制样后0、2、4、8、12、24 h进样分析,结果饮片、标准汤剂、配方颗粒相对保留时间和相对峰面积RSD值均在5%以内,表明金银花饮片、标准汤剂

和配方颗粒溶液在 24 h 内溶液基本稳定。

3 实验结果

3.1 含量测定结果

按“2.1.4”项下,制备供试品溶液,测定金银花标准汤剂和配方颗粒绿原酸、木犀草苷的含量,同时计算 15 批饮片至标准汤剂、饮片至配方颗粒绿原

酸、木犀草苷平均转移率(转移率 = 制剂中指标成分含量/饮片中指标成分含量 × 100%),结果见表 2、图 1 和图 2,实验结果:15 批标准汤剂、配方颗粒中绿原酸平均转移率分别为 57.10%、47.50%,木犀草苷平均转移率分别为 20.78%、18.36%,表明本实验的制备工艺成熟、稳定。

表 2 金银花标准汤剂、配方颗粒中绿原酸、木犀草苷含量测定结果 (%)

Table 2 Lonicera japonica standard decoction and formula granules of chlorogenic acid and luteoloside content determination results (%)

编号 No.	标准汤剂 Standard decoction				配方颗粒 Formula granules			
	绿原酸 Chlorogenic acid	转移率 Transfer rate	木犀草苷 Galuteolin	转移率 Transfer rate	绿原酸 Chlorogenic acid	转移率 Transfer rate	木犀草苷 Galuteolin	转移率 Transfer rate
J1	2.3	51.11	0.140	24.56	1.6	44.44	0.045	19.74
J2	4.8	61.94	0.242	22.10	3.1	50.00	0.090	20.55
J3	3.7	51.03	0.174	22.89	2.8	48.28	0.061	20.07
J4	4.3	45.26	0.216	16.24	2.7	35.53	0.092	17.29
J5	4.0	55.17	0.232	19.33	2.5	43.10	0.079	16.46
J6	2.4	64.00	0.264	21.46	1.5	50.00	0.092	18.70
J7	5.4	61.71	0.176	21.73	3.5	50.00	0.053	16.36
J8	4.5	56.25	0.180	16.90	2.8	43.75	0.060	14.08
J9	4.7	58.75	0.226	21.22	3.2	50.00	0.082	19.25
J10	4.6	61.33	0.242	20.68	3.1	51.67	0.087	18.59
J11	4.5	62.07	0.230	22.44	3.0	51.72	0.079	19.27
J12	4.5	52.94	0.180	20.22	2.9	42.65	0.068	19.10
J13	2.4	64.00	0.220	20.66	1.7	56.67	0.082	19.25
J14	2.4	60.00	0.244	20.94	1.6	50.00	0.087	18.67
J15	2.3	51.11	0.238	20.26	1.6	44.44	0.085	18.09
均值 AVG	3.80	57.10	0.217	20.78	2.50	47.50	0.076	18.36
RSD%	29.20	10.10	16.38	10.23	28.00	10.80	19.72	9.20

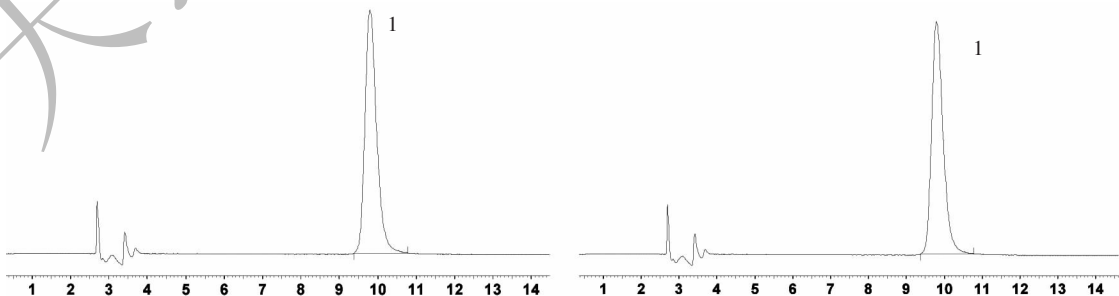


图 1 绿原酸含量测定 HPLC 图谱

Fig. 1 Determination of chlorogenic acid by HPLC

注:1. 绿原酸。Note:1. chlorogenic acid.

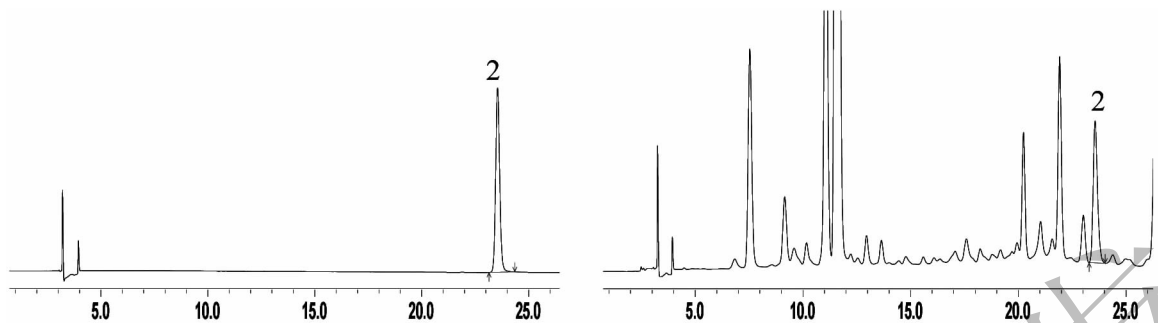


图2 木犀草苷含量测定 HPLC 图谱

Fig. 2 Determination of galuteolin by HPLC

注:2. 木犀草苷。Note:2. galuteolin.

3.2 金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒指纹图谱的建立

按“2.2.3”项下色谱条件测定 15 批饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 图谱,将所得到的色谱数据导入《中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件,采用多点校正将谱峰自动匹配,中位数计算得出样品指纹图的共有模式,结果见图 3~图 6,金银花标准汤剂、配方颗粒对照图谱见图 6,共有峰 12 个,峰 4 为绿原酸、峰 8 为芦丁、峰 9 为木犀草苷(参照峰)。相似度计算结果见表 3,从下图及表可知,金银花标准汤剂和配方颗粒的指纹图谱非常相似,说明两者的成分差异很小,为配方颗粒代替传统汤剂提供了可行性参考。

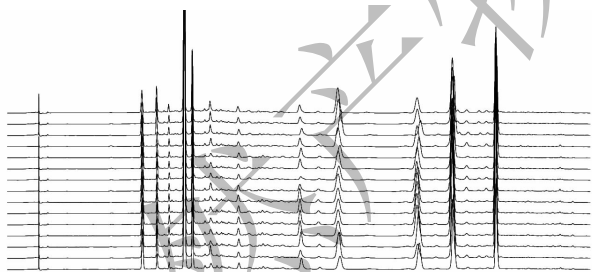


图3 金银花配方颗粒指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of formula granules of *Lonicera japonica*

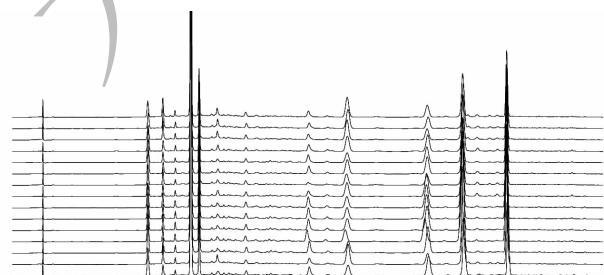


图4 金银花标准汤剂指纹图谱

Fig. 4 Fingerprint of standard decoction of *Lonicera japonica*

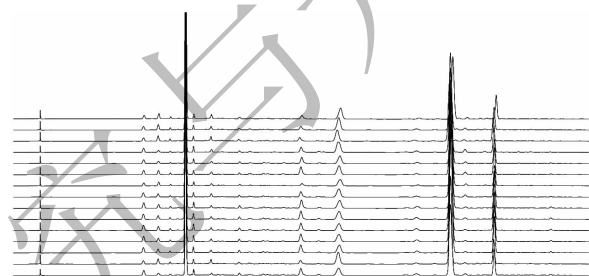


图5 金银花饮片指纹图谱

Fig. 5 Fingerprints of *Lonicera japonica*

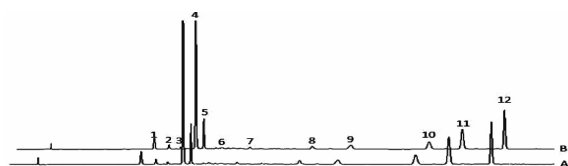


图6 金银花标准汤剂、配方颗粒对照指纹图谱图

Fig. 6 The relative fingerprint of standard decoction and formula granules of *Lonicera japonica*

注:4:绿原酸;8:芦丁;9:木犀草苷;A:标准汤剂;B:配方颗粒。

Note:4. chlorogenic acid;8. rutin;9. galuteolin;A. standard decoction;B. formula granules.

4 结论

本文对标准汤剂、配方颗粒的质量控制主要从 2 个方面把关;①饮片源头:饮片具有代表性,共 15 个批次,质量标准符合 2015 版《中国药典》各项规定;②制备过程:标准汤剂、配方颗粒的制备过程有统一的标准化操作,15 批标准汤剂、配方颗粒中绿原酸平均转移率分别为 57.10%、47.50%,木犀草苷平均转移率分别为 20.78%、18.36%表明本实验的制备工艺成熟、稳定。

15 批金银花饮片和相对应的 15 批标准汤剂、配方颗粒指纹图谱相似度均在 0.99 以上,说明金银

表3 15批金银花饮片、标准汤剂、配方颗粒指纹图谱的相似度

Table 3 15 batch fingerprints similarity degree of *Lonicera japonica*, standard decoction and formula granules

序号 NO.	饮片 Herbs	标准汤剂 Standard decoction	配方颗粒 Formula granules
1	0.999	0.999	0.998
2	0.999	0.998	0.998
3	1.000	0.998	0.999
4	0.999	0.998	0.998
5	1.000	0.999	0.999
6	0.992	0.996	0.996
7	0.991	0.995	0.996
8	0.993	0.995	0.995
9	0.996	0.999	0.998
10	0.995	0.999	0.999
11	0.996	0.996	0.997
12	0.998	0.998	0.999
13	0.987	0.996	0.997
14	0.990	0.994	0.995
15	0.994	0.995	0.995

花标准汤剂和配方颗粒的制备工艺非常稳定、可靠。从图5可见,金银花标准汤剂和配方颗粒的指纹图谱非常相似,说明9两者的成分差异很小,金银花配方颗粒可以代替金银花饮片的煎煮口服液体。

通过比较金银花标准汤剂、配方颗粒对照指纹图谱,两者的相似度均大于0.99,说明两者成分差异较小,为配方颗粒代替传统汤剂提供了可行性参考。

综上所述,本论文中建立的金银花配方颗粒含量测定与HPLC指纹图谱方法稳定性、重复性好,能较全面地反映金银花配方颗粒的内在质量,为金银花配方颗粒质量控制和评价提供了参考。

参考文献

- 1 Yu SS, Li M, Zhang QH. Progress in research on fingerprints of Chinese medicinal granules [J]. China Licensed Pharmacist (中国执业药师), 2016, 13(1): 38-40.
- 2 Zhang CY, Li P, Qi H, et al. Analysis on the geologic background and physicochemical properties of cultivated soil of

- Flos *Lonicerae* in the geo-authentic and non-authentic producing areas [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 2: 114-117.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Ch. P, Vol I (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 221.
- 4 Zhang BX, Zhou FQ, Guo QM. Research progress of flavonoids on *Lonicerae japonicae* Flos in last five years [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 349
- 5 Pang R. Advances in pharmacological studies on active components of *Lonicera japonica* [J]. J Shaanxi Coll Tradit Chin Med (陕西中医学院学报), 2011, 34(3): 77-79.
- 6 Lin D, Zhao GL, Liu JJ. Extraction of active components from Flos *Lonicerae* and their bacteriostatic test [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2003, 15: 436-437.
- 7 Ma YM, Li J, Ma L. Advances in pharmacology of *Lonicera japonica* [J]. Inner Mongolia Med J (内蒙古中医药), 2012, 31: 105-106.
- 8 Chen Q, Deng YR, Xia N. Purification of polyphenols from *Lonicerae Flos* [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2012, 35: 185-189.
- 9 Ji RF, Liu SX, Wang WQ, et al. Research advances in iridoids from plants of *Lonicera Linn* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 1226-1232.
- 10 Guo YZ, Liao CZ, Zhai XF, et al. Study on quality standard for Jinyinhua dispensing granule [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 6: 19-21.
- 11 Xia YF, Yan S, Yang Y. Study on quality standard of honey-suckle formula granules [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合外科杂志), 2017, 23: 287-291.
- 12 Liu HH. Study on the industrial competitiveness of Concentrated Herb Granule (CHG) and the key technologies of CHG of Flos *Lonicerae* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2011.
- 13 Huang LY, Ye LH, Zheng JP. Comparative study on chlorogenic acid content in *Lonicerae Japonicae* Flos and the dispensing granules [J]. China Pharm (中国药师), 2013, 16(1): 71-73.
- 14 Dai, Li Q, Fan ZQ, et al. Quality evaluation of decoction of single medicinal herb—a case of *Lonicerae Japonicae* Flos [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 809-816.