

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.05.017

银翘解毒丸质量评价方法研究*

杨美丽,张少杰,杨金蕊,杜冬勤,王楠

(河北省保定市食品药品检验所,河北保定 071000)

摘要:目的 建立银翘解毒丸指纹图谱及多成分同时定量分析法,为其质量控制及评价提供技术支持。方法 采用高效液相色谱-二极管阵列(HPLC-DAD)法建立指纹图谱,并同时测定绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷3个指标性成分的含量,对26批银翘解毒丸进行分析;采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法初步筛查山银花替代金银花非法投料情况。结果 银翘解毒丸指纹图谱中标定了15个共有峰,相似度为0.709~0.997;聚类分析结果显示,指纹图谱相似度为0.85以下的样品为质量存疑。26批样品中有5批质量存疑;2批绿原酸及牛蒡苷的含量极低,3批连翘酯苷A的含量极低,质量分析结果与指纹图谱结果具有一致性。26批样品中,山银花阳性检出3批,阳性检出率为11.54%。结论 该方法准确、可靠,可检测不按标准投料、非法投料等问题,可用于银翘解毒丸的质量控制及评价。

关键词:银翘解毒丸;指纹图谱;多成分定量分析;非标准检验;质量控制;质量评价

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)05-0063-07

Quality Assessment of Yinqiao Jiedu Pills

YANG Meili, ZHANG Shaojie, YANG Jinrui, DU Dongqin, WANG Nan

(Baoding Institute for Food and Drug Control, Baoding, Hebei, China 071000)

Abstract: Objective To establish the fingerprint and multi-component quantitative analysis of Yinqiao Jiedu Pills, and to provide reliable technical support for its quality control and assessment. **Methods** High-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) was used to establish the fingerprint and simultaneously determine the contents of chlorogenic acid, forsythiaside A and arctiin in 26 batches of Yinqiao Jiedu Pills. HPLC-evaporative light scattering detector (ELSD) was used to screen the illegal substitution of *Lonicerae Flos* for *Lonicerae Japonicae Flos*. **Results** There were 15 common peaks were identified in the established fingerprint of Yinqiao Jiedu Pills and the similarity was 0.709-0.997. The cluster analysis showed that the samples with a similarity of less than 0.85 were of questionable quality. Among the 26 batches of samples, there were five batches of samples with questionable quality, the contents of chlorogenic acid and arctiin in two batches were extremely low, and forsythiaside A in three batches was extremely low, and the quality analysis results were consistent with the fingerprints. Among the 26 batches of samples, *Lonicerae Flos* (positive samples) could be detected in the batches of samples, and the positive rate was 11.54%. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control and assessment of Yinqiao Jiedu Pills.

Key words: Yinqiao Jiedu Pills; fingerprint; multi-component quantitative analysis; non-standard method; quality control; quality assessment

中药复方制剂具有多药味、多靶点的特点,中药特征/指纹图谱能较全面地反映中药所含化学成分的种类与数量,是评价中药复方制剂整体质量的有效手段^[1]。将中药特征/指纹图谱技术与多指标成分定量分析相结合,可同时达到控制复方制剂中主要药味含量的目的^[2]。非标准检验方法可考察药品生产过程中违反《药品生产质量管理规范》(GMP)要求的情况,如不按标准投料、替代投料等,是检验及评价药品质量非常重要的技术手段。银翘解毒丸(蜜丸)源自清代医学家吴瑭所著《温病条辨》中的银翘散,由金银花、连翘、薄荷、荆芥(穗)、桔梗、牛蒡子等9味药材组方,具有疏风解表、清热解毒功效,现行标准收载于原中华人民共和国卫生部药典委员会1990年颁布的《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十九册)》,检验项目仅有性状、鉴别和检查项^[3],可控性较

差,亟待提高。目前,关于银翘解毒丸质量控制的研究主要集中在绿原酸、连翘苷等1种或几种成分的含量测定或特征图谱上^[4-8]。本研究中参考文献[9-11],首先建立了银翘解毒丸的指纹图谱及多成分同时定量分析的方法,进行了相似度评价及聚类分析,建立了测定绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷3个指标性成分含量的方法,并对收集的26批次样品进行了整体质量分析与评价;初步建立了山银花替代/混合金银花非法投料的非标准检验方法,可多方面考察市场上银翘解毒丸的质量情况。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DIONEX Ultimate 3000型液相色谱仪[包括二极管阵列(DAD)检测器,赛默飞世尔科技<中国>有限公司];SHIMADZU LC-2010A型高效液相色谱仪[包括

*基金项目:河北省保定市科技计划项目[1951ZF088]。

第一作者:杨美丽,女,硕士研究生,高级工程师,研究方向为药品检验及质量标准,(电子信箱)kathy236@126.com。

紫外(UV)检测器,日本岛津公司];Waters e2695-2424 型高效液相色谱仪[包括蒸发光散射(ELSD)检测器,美国沃特世科技有限公司];Sartorius CPA 225D 型电子天平(德国赛多利斯集团,精度为万分之一/十万分之一);SK7200H 型超声波清洗器(功率为 350 W,频率为 53 kHz,上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号为 110753-201716,含量以 99.3% 计),牛蒡苷对照品(批号为 110819-201611,含量以 95.9% 计),甘草苷对照品(批号为 111610-201607,含量以 100.0% 计),连翘苷对照品(批号为 110821-201615,含量以 94.9% 计),连翘酯苷 A 对照品(批号为 111810-201606,含量以 93.4% 计),灰毡毛忍冬皂苷乙对照药材(批号为 111814-201604),川续断皂苷乙对照药材(批号为 111813-201403),金银花对照药材(批号为 121060-201608),连翘对照药材(批号为 120908-201216),薄荷对照药材(批号为 120916-201310),荆芥对照药材(批号为 120911-201512),淡豆豉对照药材(批号为 121594-201403),牛蒡子对照药材(批号为 120903-201510),桔梗对照药材(批号为 121028-201612),甘草对照药材(批号为 120904-201620),山银花对照药材(批号为 121595-201202),均购自中国食品药品检定研究院;淡竹叶(药都集团茗都药业有限公司,批号为 170701);乙腈为色谱纯,磷酸、甲酸、冰醋酸均为分析纯,水为娃哈哈纯净水;26 批银翘解毒丸(水蜜丸、大蜜丸各 13 批)购于河北省内各市县,涉及省内外生产企业共 6 家。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱及多成分同时定量分析

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex Luna Omega Polar C₁₈ 100A (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),按表 1 程序进行梯度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

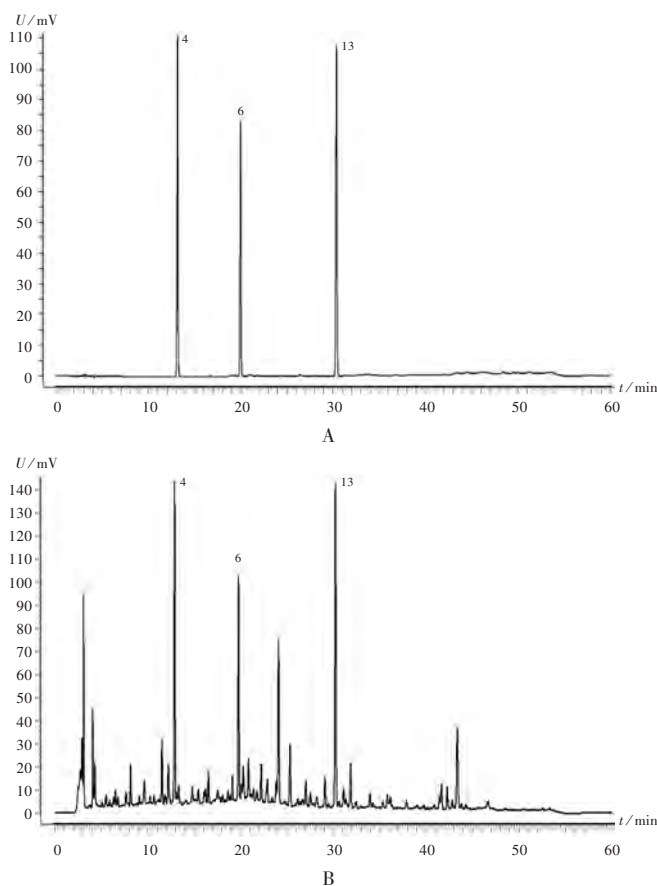
表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program (%)

时间	乙腈(A)	0.1% 磷酸溶液(B)
0 ~ 50 min	7→50	93→50
50 ~ 53 min	50→7	50→93
53 ~ 60 min	7	93

2.1.2 溶液制备

供试品溶液:取水蜜丸(研碎)0.9 g,或大蜜丸(剪碎)1.35 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,超声(功率为 250 W,频率为



4. 绿原酸 6. 连翘酯苷 A 13. 牛蒡苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

4. chlorogenic acid 6. forsythoside A 13. arctiin

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

40 kHz)处理 30 min,放至室温,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

单一对照药材溶液:取处方中各药味的对照药材,参照供试品溶液取样量按处方比例取样,按供试品溶液制备方法逐一制备对照药材溶液。

单一对照品溶液:取绿原酸对照品、牛蒡苷对照品、连翘苷对照品、连翘酯苷 A 对照品、甘草苷对照品各适量,精密称定,加 50% 甲醇溶解,分别制成每 1 mL 含 0.1 mg 的单一对照品溶液。

混合对照品溶液:取绿原酸对照品、连翘酯苷 A 对照品、牛蒡苷对照品各适量,精密称定,加 50% 甲醇制成质量浓度分别为 113.1, 96.58, 96.57 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 指纹图谱方法学考察与分析

精密度试验:取同一供试品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测定特征峰 15 个。结果以峰面积较大、分离度较好的 13 号峰(保留时间约为 30.3 min)为参照峰,1~15 号峰的相对保留时间和相对峰面积的

RSD 均小于 1.00% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时连续进样 7 次。结果以 13 号峰为参照峰, 1~15 号峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 1.80% ($n=7$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 17033705)样品 7 份, 依法制备供试品溶液, 并进样测定。结果以 13 号峰为参照峰, 1~15 号峰的相对保留时间和相对峰面积含量的 RSD 均小于 1.00% ($n=7$), 表明方法重复性良好。

特征峰指认及归属: 分别取单一对照品溶液进样测定, 比较色谱峰的保留时间及紫外光谱结果, 结果样品指纹图谱中峰 4 为绿原酸, 峰 6 为连翘酯苷 A, 峰 8 为甘草苷, 峰 12 为连翘苷, 峰 13 为牛蒡苷, 详见图 2。将制备的单一对照药材溶液分别进样分析, 与样品色谱峰的保留时间及紫外光谱比较, 结果峰 2, 3, 4 属金银花, 峰 1, 6, 9, 12 属连翘, 峰 7, 8 属甘草, 峰 13 属牛蒡子。

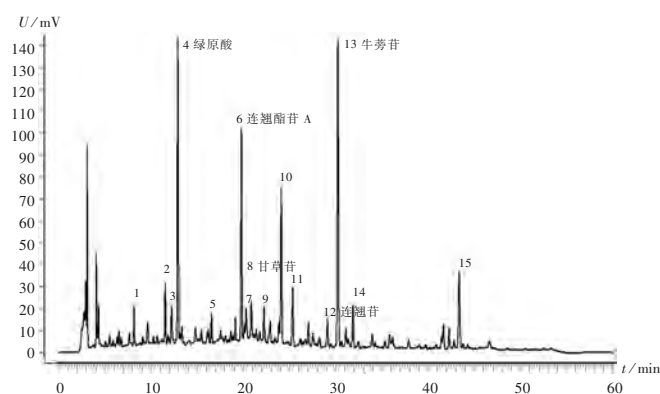


图 2 指纹图谱特征峰指认

Fig. 2 Identification of characteristic peaks in fingerprint

指纹图谱测定及相似度评价: 对 26 批样品进行指纹图谱测定, 以 13 号峰(牛蒡苷)为参照峰, 各峰相对保留时间的 RSD 均小于 5.00%。采用国家药典委员会主持开发的中药指纹图谱相似度评价软件生成标准谱图, 分别对 26 批样品与标准谱图进行多点校正、Mark 峰匹配并计算相似度。匹配谱图见图 3, 相似度见表 2。

聚类分析: 采用 SPSS 18.0 统计学软件中系统聚类法的 Ward 法, 选取平方 Euclidean 距离为度量标准, 对所测样品与标准谱图的相似度进行系统聚类分析, 结果按相似度大小将样品分为 3 类。1) 相似度为 0.95 以上的有 16 批样品, 其绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷含量均非常高, 尤其是连翘酯苷 A 所代表的连翘归属的色谱峰峰高均显著高于其他批次。2) 相似度为 0.90~0.95 的无样品。3) 相似度为 0.80~0.90 的有 8 批样品, 其中 0.85~0.90 的有 5 批样品, 与标准谱图比较, 其主要差

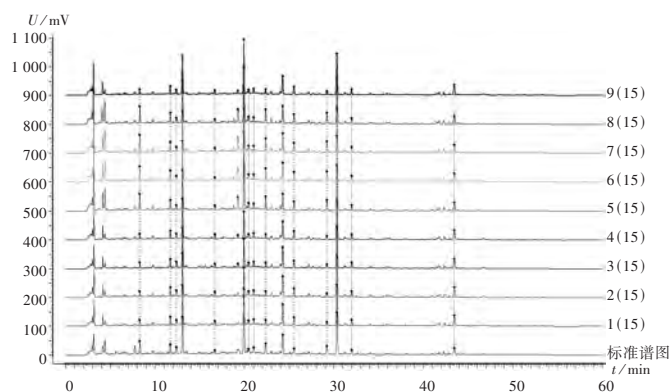


图 3 银翘解毒丸(部分示例)与标准谱图 Mark 峰匹配图

Fig. 3 Matching diagram of Yinqiao Jiedu Pills (some examples) with Mark peak of standard spectrogram

表 2 银翘解毒丸相似度计算结果

Tab. 2 Similarity of Yinqiao Jiedu Pills

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
1	0.885	10	0.997	19	0.848
2	0.888	11	0.996	20	0.847
3	0.896	12	0.997	21	0.997
4	0.889	13	0.994	22	0.988
5	0.995	14	0.992	23	0.977
6	0.995	15	0.999	24	0.975
7	0.996	16	0.759	25	0.976
8	0.996	17	0.709	26	0.978
9	0.895	18	0.823		

异为连翘相关成分含量相对偏低, 经与同厂样品(相似度在 0.95 以上)对照分析, 结合连翘采收期认为, 青翘、老翘均可对连翘投料造成同厂、不同批次成药间的差异, 而有研究证实两者的连翘酯苷 A、连翘苷等成分确实存在较大差异^[12]; 相似度为 0.80~0.85 的有 3 批样品(编号为 18, 19, 20), 其连翘相关成分含量同样偏低, 但经其他研究证实其存在山银花替代/混合金银花投料的情况; 聚类分析将相似度为 0.80~0.90 的样品聚为一类, 能分析出使用老翘投料的样品, 但由于山银花及金银花在紫外检测条件下的谱图差异小, 成分差异不明显, 因此聚类未能再细化, 但 0.85 的限度也基本能将银翘解毒丸的真伪优劣区分开来。4) 相似度为 0.80 以下的有 2 批样品(编号为 16, 17), 图谱中显示绿原酸和牛蒡苷含量极低, 存在不按处方投料、以次充好投料等嫌疑。因此, 指纹图谱相似度在 0.85 以下的样品均可视为样品质量存疑。详见图 4 和表 3。

2.1.4 多成分定量分析

线性关系考察: 分别精密量取绿原酸对照品溶液(113.1 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL 和 3 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 分别取 5 μL 和 10 μL 及稀释前绿原酸对照品溶液 5, 10, 15 μL , 进样分析。精密

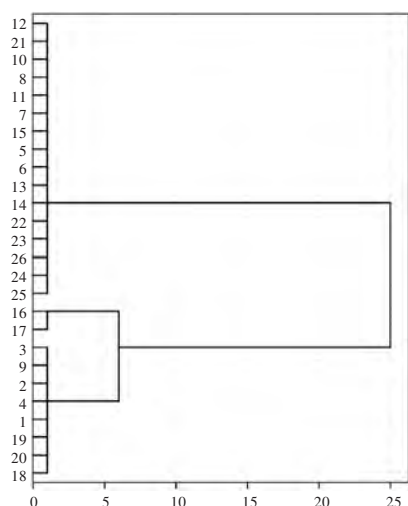


图4 指纹图谱相似度聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of fingerprint similarity

表3 银翘解毒丸聚类分析结果

Tab. 3 Cluster analysis of Yinqiao Jiedu Pills

相似度	样本量(批)	百分比(%)
>0.95	16	61.54
0.90~0.95	—	—
0.80~0.90	8	30.77
<0.80	2	7.69

注:—为未检出。

Note:— indicates not detected.

量取连翘酯苷A对照品溶液(96.58 μg/mL)3 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,分别取3,5,10 μL及稀释前连翘酯苷A对照品溶液(96.58 μg/mL)5,10,15 μL,进样分析。精密量取牛蒡苷对照品溶液(96.57 μg/mL)1 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,分别取5,10,20 μL及稀释前牛蒡苷对照品溶液(96.57 μg/mL)5,10,15 μL,进样分析。均以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归,得各成分的回归方程,结果各化合物在相应进样量范围内线性关系良好。同时,分别测得3个化合物的检测限(S/N=3)与定量限(S/N=10)。详见表4。

表4 3个成分的线性关系、检测限和定量限考察结果

Tab. 4 The results of linear relationship, limit of detection and limit of quantitation of three compounds

成分	线性回归方程	R ²	线性范围(μg)	检测限(μg)	定量限(μg)
绿原酸	$Y=1782.28X+4578.33$	1.000	56.55~1696.54	0.04	0.12
连翘酯苷A	$Y=1399.7X-52452$	0.997	86.92~1448.63	0.09	0.29
牛蒡苷	$Y=1704.8X+4995.7$	0.999	48.29~1448.57	0.03	0.10

精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,连续进样6次。结果绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷峰面积的RSD分别为0.65%,0.79%,0.35%(n=6),表明仪器精密

度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件分别于0,1,2,4,6,8,12,24 h时进样测定。结果绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷峰面积的RSD分别为0.25%,0.50%,0.25%(n=8),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为17033705)样品7份,依法制备供试品溶液,并依法测定。结果绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷的平均含量分别为2.743 4,2.526 3,3.651 4 mg/g(n=7),RSD分别为1.02%,1.39%,0.73%(n=7),表明方法重复性良好。

专属性试验:用单一对照药材溶液、对照品溶液模拟试验,考察阴性样品在待测成分处有无干扰。色谱图见图5。结果表明,金银花及牛蒡子中均含有绿原酸,金银花中含量较高;牛蒡苷只存在于牛蒡子中,连翘酯苷A只存在于连翘中,其他药味在绿原酸、牛蒡苷、连翘酯苷A相应位置上无干扰,即阴性样品溶液在待测成分处均无干扰。

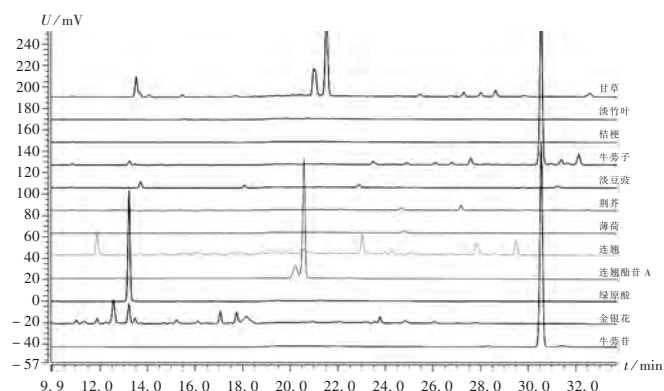


图5 单一对照药材溶液及对照品溶液高效液相色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of single reference material solution and reference solution

加样回收试验:取样品粉末8份,每份0.45 g,精密称定,按样品含量的100.00%分别加入绿原酸对照品、连翘酯苷A对照品、牛蒡苷对照品,依法制备供试品溶液,进样10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果见表5。

样品含量测定及分析:取26批样品,依法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,采用外标法计算样品中绿原酸、连翘酯苷A、牛蒡苷的含量。结果见表6。可见,不同生产厂家的绿原酸及牛蒡苷含量基本无差异,但编号为16,17的样品(山西某公司生产的大蜜丸)的绿原酸及牛蒡苷含量极低;连翘酯苷A的含量为每袋14.4~45.6 mg或每丸4.5~46.8 mg(因剂型不同,每袋或每丸均为1次口服剂量,相当于原药材的量相同),差异较大,其中编号为18,19,20的3批样品的含量最低。上述26批样品按现行药品标准检验均合格,

表 5 加样回收试验结果 ($n=8$)
Tab. 5 Results of recovery tests ($n=8$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
绿原酸	0.450 1	1.234 8	1.355 4	2.573 2	98.75	98.66	0.68
	0.450 0	1.234 5	1.355 4	2.578 7	99.17		
	0.450 2	1.235 1	1.355 4	2.560 7	97.80		
	0.450 3	1.235 4	1.355 4	2.561 5	97.84		
	0.450 0	1.234 5	1.355 4	2.581 8	99.40		
	0.450 1	1.234 8	1.355 4	2.578 4	99.13		
	0.450 4	1.235 6	1.355 4	2.563 9	98.00		
	0.450 0	1.234 5	1.355 4	2.578 4	99.15		
连翘酯苷 A	0.450 1	1.137 1	1.302 0	2.421 9	98.68	98.95	0.59
	0.450 0	1.136 8	1.302 0	2.420 0	98.56		
	0.450 2	1.137 3	1.302 0	2.428 4	99.16		
	0.450 3	1.137 6	1.302 0	2.421 2	98.59		
	0.450 0	1.136 8	1.302 0	2.422 8	98.77		
	0.450 1	1.137 1	1.302 0	2.443 1	100.31		
	0.450 4	1.137 8	1.302 0	2.423 2	98.72		
	0.450 0	1.136 8	1.302 0	2.423 1	98.79		
牛蒡苷	0.450 1	1.643 5	1.666 7	3.326 7	100.99	101.60	0.72
	0.450 0	1.643 1	1.666 7	3.337 8	101.68		
	0.450 2	1.643 9	1.666 7	3.324 2	100.82		
	0.450 3	1.644 2	1.666 7	3.325 2	100.86		
	0.450 0	1.643 1	1.666 7	3.353 9	102.65		
	0.450 1	1.643 5	1.666 7	3.354 0	102.63		
	0.450 4	1.644 6	1.666 7	3.337 8	101.59		
	0.450 0	1.643 1	1.666 7	3.332 3	101.35		

表 6 样品含量测定结果 (mg)
Tab. 6 Results of content determination of samples (mg)

编号	绿原酸	连翘酯苷 A	牛蒡苷	编号	绿原酸	连翘酯苷 A	牛蒡苷
1	16.21	15.02	22.19	14	12.62	46.84	24.32
2	16.83	14.42	21.64	15	13.51	41.41	24.33
3	16.20	15.03	22.18	16	1.81	16.22	0.45
4	16.22	14.41	21.60	17	0.91	14.41	0.18
5	16.21	41.42	25.21	18	14.42	5.44	17.12
6	16.83	39.58	25.81	19	12.60	5.43	24.31
7	17.42	45.63	25.21	20	13.52	4.53	18.91
8	18.04	45.01	25.21	21	15.32	35.12	20.74
9	16.21	15.03	22.22	22	13.52	27.01	19.81
10	16.22	43.84	24.61	23	17.10	28.82	24.27
11	12.62	40.81	22.23	24	16.21	26.12	22.53
12	12.64	40.21	21.60	25	14.38	13.39	20.71
13	12.01	33.61	21.02	26	16.21	27.02	23.38

但按本研究中含量测定方法检验,发现 5 批样品(编号为 16, 17, 18, 19, 20)明显存在质量问题,与指纹图谱相似度分析结果一致,相似度均低于 0.85,质量存疑。

2.2 山银花替代/混合金银花投料非标准检验方法与结果

色谱条件:色谱柱为 Waters Sunfire C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温为 30 ℃;流动相为乙腈(A)–0.4% 醋酸(B),梯度洗脱程序见表 7;流速为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL。

表 7 流动相梯度洗脱程序 (%)

时间	乙腈 (A)	0.4% 醋酸 (B)
1 ~ 10 min	11.5→15	88.5→85
10 ~ 12 min	15→29	85→71
12 ~ 18 min	29→33	71→67
18 ~ 30 min	33→45	67→55

Waters 2424 ELSD 检测器参数:漂移管温度为 60 ℃;动力级别为 60%;增益值为 150;压力为 35 psi。

溶液制备:取 1 袋/丸样品,粉碎或剪碎,置具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇溶液 30 mL,超声(功率为 300 W,频率为 53 kHz)处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,用水饱和正丁醇萃取 2 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,用氨试液 30 mL 洗涤 1 次,将正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 使溶解,作为供试品溶液。取除金银花外的其他对照药材组成 1 次口服剂量的阴性样品,照供试品溶液制备方法制备阴性对照样品溶液。另取金银花及山银花适量,同法制备金银花对照药材溶液及山银花对照药材溶液。

专属性考察:灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙是山银花区别于金银花的主要成分^[13-15]。本研究中发现,阴性样品在川续断皂苷乙色谱峰位置无干扰,而山银花特征色谱峰明显,金银花于此色谱条件下几乎无响应。若山银花替代金银花投料,可明显检查出色谱峰,故确定了川续断皂苷乙作为特征性成分检查山银花的依据。色谱图见图 6。

样品山银花测定:26 批样品中,水蜜丸有 13 批,按上述检查方法均未检出川续断皂苷乙;大蜜丸有 13 批,3 批检出阳性,且色谱峰非常明显,阳性检出率为 11.54%,表明确实存在部分企业违反 GMP 相关规定,不按标准投料、替代/混合投料的情况。色谱图见图 7。

3 讨论

3.1 标准检验情况

银翘解毒丸现行药品标准有性状、鉴别、检查项,26 批样品经标准检验全部合格。由于鉴别项仅定性不定量,不同厂家不同批号样品的显微及薄层色谱鉴别图谱虽存在一定差异,质量参差不齐,但均满足检出要求,故标准检验结果全部合格。

3.2 指纹图谱及多成分同时定量分析及质量评价

银翘解毒丸由 9 味药材组方,金银花、连翘为君药,

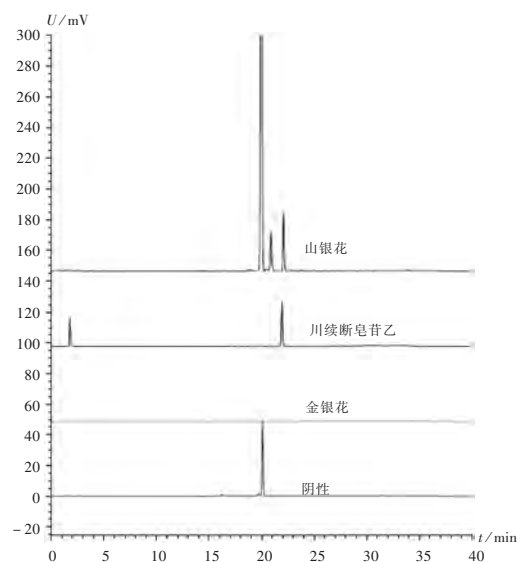


图6 专属性考察高效液相色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms for specificity test

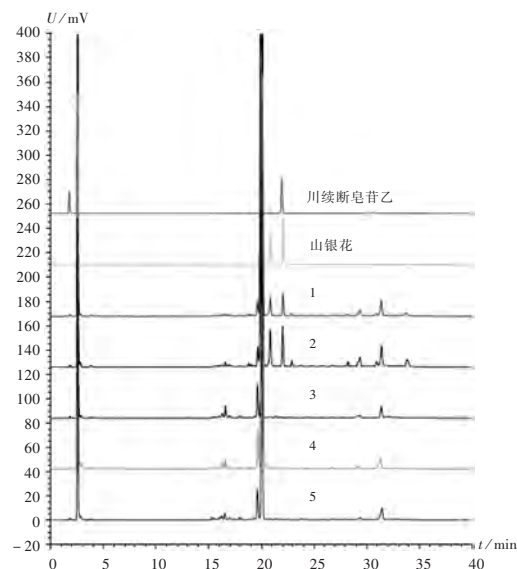


图7 部分样品山银花测定高效液相色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms for determination of *Lonicerae Flos* in some samples

荆芥、薄荷、淡豆豉为医药,牛蒡子、桔梗、甘草、淡竹叶为佐药,甘草调和诸药,为使药^[16]。9味药中,荆芥、薄荷含挥发性成分,宜采用气相色谱法分析;桔梗因其成分结构特征,宜采用HPLC-ELSD法分析;金银花、连翘、牛蒡子、甘草等均在指纹图谱(采用HPLC-DAD法)中良好呈现,选取图中分离度好、含量高且具有药味代表性的成分进行定量测定,以期同时定性定量测定,合理评价该药。

指纹图谱测定及相似度评价分析中,筛查出5批样品相似度低于0.85,质量存疑。结果显示,有2批(编号为16,17)绿原酸及牛蒡苷含量极低,有3批(编号为18,19,20)连翘酯苷A含量极低,质量存疑。指纹图谱与含量测定分别筛查出的5批能一一对应,显示方法具有相关性。26批样品标准检验合格率为100.00%,按该

方法检验质量存疑率为19.23%,样品存在不按处方投料、以次充好投料等嫌疑。

2015年版《中国药典(一部)》规定连翘采收期不同,有青翘、老翘之分,但方剂入药无指导说明,而两者在成分含量上有显著差异,连翘酯苷A在6月下旬到7月下旬采收含量最高,8月采收有所下降,但幅度不大,9月采收下降幅度较大^[17]。指纹图谱分析中,同为北京同某堂银翘解毒丸,相似度高于0.95的批次中连翘的相关成分显著高于相似度为0.85~0.90的批次,分析认为前者为青翘投料,后者为老翘投料。由于没有相关指导原则,厂家随意投料,易造成不同批次药效变化及治疗效果的波动,建议有关部门进行相关考察,对二者制订不同的质量标准,并开展药理学、药效学差异等方面的研究工作,以便正确指导生产及临床应用。

3.3 非标准检验方法筛查情况

2005年版至2015年版《中国药典(一部)》中山银花的性味、归经、功能主治、用法用量与金银花完全相同,但由于其价格低廉,又有使用合法的历史,在外观性状上与忍冬(金银花的一个主要来源)也较相似,则部分企业违规将其替代/混合金银花使用。该行为违反了GMP相关规定,扰乱了市场秩序,造成了不正当竞争,应严厉打击。26批样品中,有3批检出山银花阳性,说明实际生产中确实存在部分企业违反GMP相关规定,不按标准投料,不按规定生产,须严厉打击。本研究中目前进行了初步筛查,后续会继续完善检查方法,坚决打击药品生产过程中的违法、违规现象。

3.4 方法评价

本研究结果显示,在现行标准基础上建立的指纹图谱及多指标性成分含量同时测定的方法,有效补充了标准方法的漏洞,一次测定可多方面分析药品,可体现药品的真实性,综合评价药物整体质量。初步建立的山银花替代/混合金银花投料的非标准检查方法,可有效筛查出不按标准投料、违反GMP要求生产的药品。本研究中建立的方法对规范生产及对银翘解毒丸的质量控制均能提供有效的技术支持。

参考文献

- [1] 胡晓茹,杨思广,戴忠,等. 葛根芩连片特征图谱及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(9):1590-1596.
- [2] 丰加涛,金郁,王金成,等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制[J]. 色谱,2008,26(2):180-185.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十九册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:200.
- [4] 曾小飞,杨娟艳. 银翘解毒丸中绿原酸含量测定研究[J]. 北方药学,2013,10(12):6.
- [5] 权勤波,李启红. HPLC法测定银翘解毒丸中绿原酸和牛蒡苷