

金银花提取物的质量分析方法评价

艾光丽¹, 曾桢², 王维¹, 蒲旭峰^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611130; 2. 成都市食品药品检验研究院, 成都 610000)

[摘要] **目的:**探索金银花提取物质量控制的专属性方法,为相关制剂的质量控制提供参考。**方法:**采用 HPLC,流动相乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,5%~20% A;15~30 min,20%~30% A;30~40 min,30% A),检测波长327 nm。比较金银花提取物与山银花、杜仲叶原药材及其提取物中绿原酸含量和特征图谱,分析银黄制剂中金银花提取物的质量。**结果:**原药材、提取物中均是山银花所含的绿原酸含量最高,质量分数分别为3.56%~5.09%、4.62%~6.12%;金银花提取物与杜仲叶提取物无明显差异,绿原酸质量分数约4%;金银花、山银花、杜仲叶提取物酸化后绿原酸含量均提高,分别为6.90%、7.35%、6.47%。山银花、杜仲叶提取物及其酸化提取物的特征图谱与金银花提取物标准图谱相同,部分银黄制剂中检测出了杜仲叶的主要成分京尼平苷酸和山银花的主要成分灰毡毛忍冬皂苷乙。**结论:**金银花提取物中可能存在添加山银花和杜仲叶的情况,需加强质量控制,为金银花提取物质量标准的提高及检测方法的选择提供了重要依据。

[关键词] 金银花提取物; 质量控制; 山银花; 杜仲叶; 绿原酸; 特征图谱; 银黄制剂

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0022-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050022

Evaluation of Quality Analysis Method of Lonicerae Japonicae Flos Extract

AI Guang-li¹, ZENG Zhen², WANG Wei¹, PU Xu-feng^{2*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China;
2. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the exclusive methods for quality control of Lonicerae Japonicae Flos extract. **Method:** HPLC was employed with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution for gradient elution and detection wavelength at 327 nm. The quality of Lonicerae Japonicae Flos extract in Yinhuang preparations was analyzed, the content of chlorogenic acid and specific chromatogram of Lonicerae Japonicae Flos extract were compared with the extract and original medical herb of Lonicerae Flos and Eucommiae Folium. **Result:** The highest contents of chlorogenic acid in the original medical herbs and its extracts were Lonicerae Flos, mass fractions were 3.56%-5.09% and 4.62%-6.12%; there was no difference between Lonicerae Japonicae Flos extract and Eucommiae Folium extract, the content of chlorogenic acid was about 4%. After acidification, the contents of chlorogenic acid in Lonicerae Japonicae Flos extract, Lonicerae Flos extract and Eucommiae Folium extract were all increased. Specific chromatogram of extract and acid extract of Lonicerae Flos and Eucommiae Folium were the same as the standard chromatogram of Lonicerae Japonicae Flos extract. Some of Yinhuang preparations had been checked geniposidic acid from Eucommiae Folium and macranthoidin B from Lonicerae Flos. **Conclusion:** Lonicerae Japonicae Flos extract may be added to Lonicerae Flos and Eucommiae Folium, its quality control should be strengthened.

[Key words] Lonicerae Japonicae Flos extract; quality control; Lonicerae Flos; Eucommiae Folium; chlorogenic acid; specific chromatogram; Yinhuang preparations

[收稿日期] 20160804(020)

[基金项目] 成都市食品安全风险研究项目(2015cdfk01)

[第一作者] 艾光丽,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:15828578362,E-mail:1063681279@qq.com

[通讯作者] *蒲旭峰,博士,研究员,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:13808055205,E-mail:pxf68@263.net

金银花具有清热解毒、疏散风热、抗菌消炎的功效。药理研究表明有机酸类是金银花的主要药效物质,其主要包括新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸及异绿原酸 A, B, C^[1]。金银花提取物是以金银花为原料提取纯化而得的提取物,通常作为金银花中药复方制剂的处方原料,如银黄制剂等,银黄系列制剂是由金银花提取物和黄芩提取物 2 种物质加工而成。《中国药典》2015 年版(一部)^[2]以绿原酸的含量和特征图谱来控制银黄制剂中金银花提取物的质量。绿原酸除了存在于忍冬科植物忍冬、红腺忍冬及灰毡毛忍冬等叶、花、茎中之外,杜仲科植物杜仲叶等也广泛存在^[3],且这些科属均含有机酸类成分^[4-17]。

由于金银花提取物未实行批准文号管理,故没有固定的提取方法和专属性强的质量标准控制方法。现市售金银花提取物仅以绿原酸含量为指标进行控制,缺乏一定的专属性。因为绿原酸为大自然植物普遍存在的化学成分;植物中绿原酸成分可在提取过程中经酸碱处理、酶解处理等方法转换而成^[3,18-19]。为更好地控制金银花提取物及其复方制剂的质量,本实验通过对山银花、杜仲叶原药材及其提取物中绿原酸含量和特征图谱与金银花提取物进行比较,同时对银黄制剂中金银花提取物的质量进行分析,以期发现金银花提取物质量控制中可能存在的问题,为该提取物质量标准的提高提供参考依据。

1 材料

2695-2998 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),AUX220 型电子天平(日本岛津公司),AE240 型电子天平(德国赛多利斯公司)。金银花(河北、河南),山银花(贵州、重庆秀山 1 和 2),杜仲叶(都江堰、成都市荷花池药材市场 1 和 2)均经成都市食品药品检验研究院中药室周世玉主任鉴定,分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥带初开的花、忍冬科植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* 的干燥带初开的花、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥叶;银黄颗粒(成都神鹤药业有限责任公司,批号 160309;西安天一秦昆制药有限责任公司,批号 141108;成都第一药业有限公司,批号 150034;四川锡成药业有限公司,批号 150107;广东一片天医药集团制药有限公司,批号 150701;中山市恒生药业有限公司,批号 20150713),银黄含片(上海福达制药有限公司,批号 150510;成都地奥制药集团有限公司,批号 1510002;石家庄华诺制药股份有限公司,批号 140911),银黄片(哈尔滨华雨制药集团有限公司,批号 150501),银黄胶囊(四川省仁德制药

有限公司,批号 141003;石家庄四药有限公司,批号 YH15060203;四川锡成药业有限公司,批号 160102),银黄滴丸(浙江维康药业股份有限公司,批号 B151127;烟台东诚大洋制药有限公司,批号 150511),银黄口服液(湖北太子药业有限公司,批号 151002,151101),金银花提取物、山银花提取物及杜仲叶提取物(自制,均按《中国药典》2015 年版银黄片项下“金银花提取物”的提取方法制备^[2]),绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-201314,纯度 96.6%)。水为超纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 Symmetry-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 20% A; 15 ~ 30 min, 20% ~ 30% A; 30 ~ 40 min, 30% A),检测波长 327 nm,柱温 35 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 3.73 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得 74.6 mg·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取样品(过三号筛)适量,混匀,精密称取 0.3 g,置 50 mL 棕色量瓶中,加入 50% 甲醇约 35 mL,超声处理 30 min,冷却,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.2 样品的测定

2.2.1 原药材 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定河北金银花,河南金银花,贵州山银花,秀山山银花 1,秀山山银花 2,荷花池杜仲叶 1,荷花池杜仲叶 2,都江堰杜仲叶原药材中绿原酸的质量分数分别为 3.26%, 2.86%, 3.56%, 4.66%, 5.09%, 1.27%, 1.09% 和 0.35%,表明山银花药材中绿原酸的含量最高。

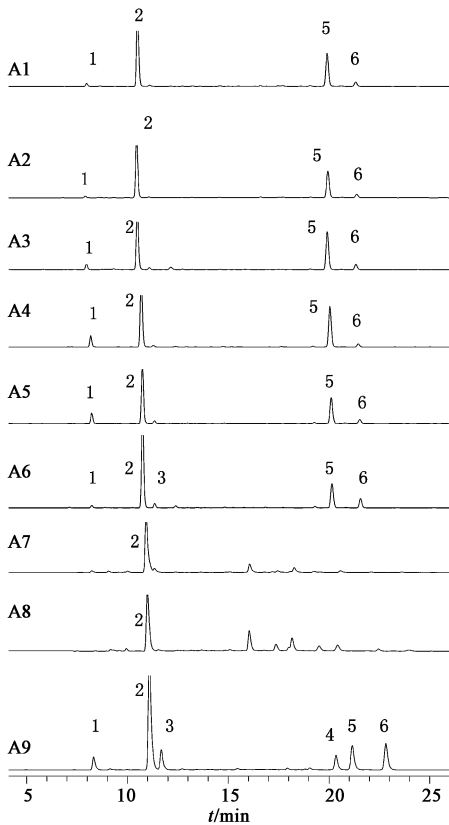
2.2.2 提取物 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定河北金银花,河南金银花,贵州山银花,秀山山银花 1,秀山山银花 2,荷花池杜仲叶 1,荷花池杜仲叶 2,都江堰杜仲叶提取物中绿原酸的质量分数分别为 4.16%, 3.62%, 4.62%, 5.84%, 6.12%, 3.57%, 3.23% 和 0.65%。表明山银花提取物中的绿原酸含量最高,金银花与荷花池杜仲叶提取物中绿原酸含量无显著差异,提示绿原酸含量高低不能代表金银花的用量。

2.2.3 酸化提取物 为了提高绿原酸的含量,从

植物叶中提取绿原酸时,常采用酸处理方法。用稀盐酸调节水的 pH 约 5,按《中国药典》2015 年版银黄片项下“金银花提取物”的提取方法制备提取物^[2],按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,结果河北金银花、贵州山银花、荷花池杜仲叶 1 酸化后提取物中绿原酸的质量分数分别为 6.90%、7.35% 和 6.47%。说明经过酸化处理,金银花、山银花、杜仲叶提取物中绿原酸含量均增高,不能用绿原酸含量高低来说明金银花的使用情况。

2.3 特征图谱

2.3.1 原药材 按 2.1.1 项下色谱条件分别对不同产地金银花、山银花、杜仲叶原药材进行测定,并与金银花提取物标准特征图谱进行比较,结果发现未经提取的原药材特征图谱与标准图谱不同,特征图谱能控制原药材代替提取物投料,见图 1。



A1. 河北金银花; A2. 河南金银花; A3. 贵州山银花; A4. 秀山山银花 1; A5. 秀山山银花 2; A6. 荷花池杜仲叶 1; A7. 荷花池杜仲叶 2; A8. 都江堰杜仲叶; A9. 标准特征图谱; 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸; 5. 3,5-O-二咖啡酰奎宁酸; 6. 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸

图 1 原药材的特征谱

Fig. 1 Specific chromatograms of original medical herbs

2.3.2 提取物 按 2.1.1 项下色谱条件分别对金银花、山银花、杜仲叶提取物及部分酸化提取物进行

测定,并与金银花提取物标准特征图谱比较,发现山银花、杜仲叶提取物和 3 种酸化提取物特征图谱与金银花提取物标准特征图谱相同,以特征图谱作为控制该提取物是否以金银花为原料提取纯化而得缺乏专属性。同时,原药材经酸化后所得提取物,除绿原酸特征峰外,其余 5 个特征峰均减少,说明仅以特征峰保留时间控制金银花提取物质量有一定缺陷,见图 2。

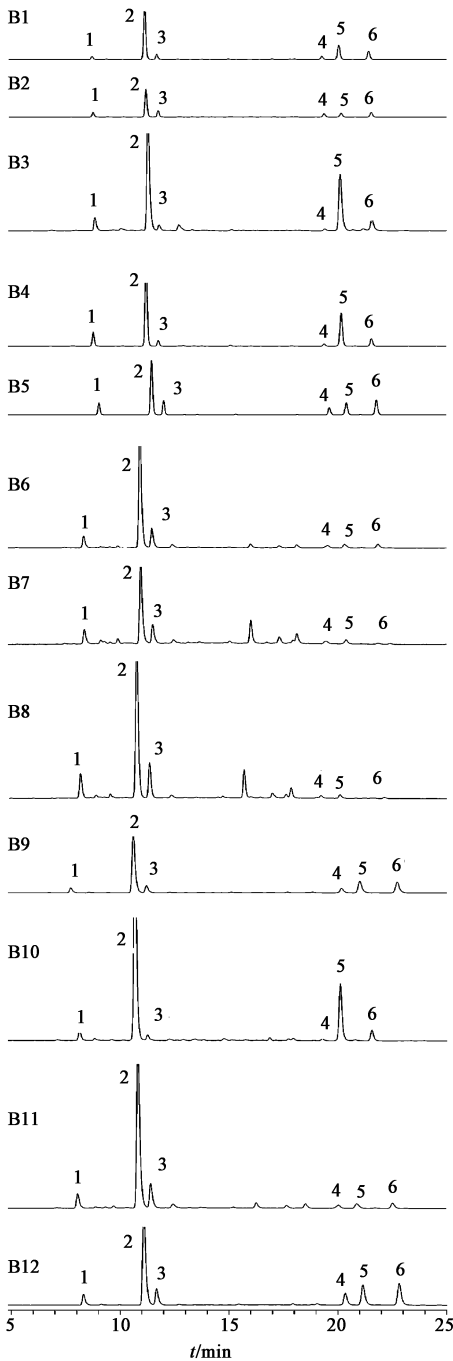
2.4 杜仲叶提取物的检测 杜仲叶的主要成分为绿原酸、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷等,按 2.1.1 项下色谱条件对杜仲叶提取物和金银花提取物进行 DAD 全波长扫描,发现在 237 nm 处杜仲叶提取物呈现与金银花提取物不同的色谱峰。经比较 237 nm 处金银花提取物和杜仲叶提取物的特征图谱,发现杜仲叶提取物有明显的京尼平苷酸色谱峰,而金银花提取物中不含有,故可用此波长条件检测金银花提取物中是否含有杜仲叶提取物。按上述方法对 20 批银黄制剂进行检验,结果批号 150107, 160309, 150034, YH15060203, 160102, 359160115, 150510, 151002, 151101 共 9 批银黄制剂中检出京尼平苷酸,说明成药中可能存在添加杜仲叶提取物的情况,见图 3,4。

2.5 山银花提取物的检测 山银花中含有灰毡毛忍冬皂苷乙成分,而金银花中不含有。按《中国药典》2015 年版一部(银黄片)【检查】山银花项下方法检测成方制剂中是否存在山银花提取物冒充金银花提取物的情况。对 20 批银黄制剂进行检验,结果发现批号 20150713, 150701, 141108 的 3 批银黄颗粒中检出灰毡毛忍冬皂苷乙,说明银黄制剂中可能存在山银花提取物冒充金银花提取物的情况,见图 5。

3 讨论

3.1 实验过程中发现的问题 《中国药典》2015 年版一部银黄片项下金银花提取物修订了绿原酸的含量限度,将“按干燥品计算,含绿原酸不得少于 4.0%”修订为“按干燥品计算,含绿原酸不得少于 1.5%”。由 2.2.2 项下结果可知,金银花提取物质量分数约 4.0%,因此在制定金银花提取物质量标准时,应考察市售金银花提取物及更多金银花样品的含量。

《中国药典》2010 年版第三增补本“银黄片”项下有山银花限量检查,银黄系列其他品种项下未规定,《中国药典》2015 年版(一部)新增了银黄颗粒和银黄口服液的山银花检查项目,用以控制金银花提取物及其成药中以山银花冒充金银花的现象。

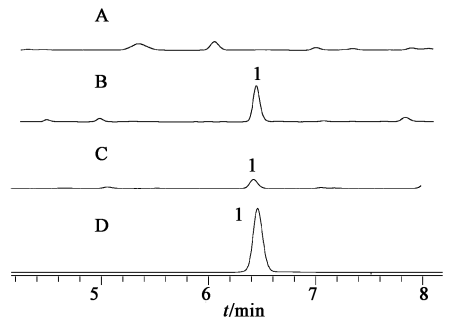


B1. 河北金银花; B2. 河南金银花; B3. 贵州山银花; B4. 秀山山银花 1; B5. 秀山山银花 2; B6. 荷花池杜仲叶 1; B7. 荷花池杜仲叶 2; B8. 都江堰杜仲叶; B9. 酸化河北金银花; B10. 酸化贵州山银花; B11. 酸化荷花池杜仲叶 1; B12. 标准特征图谱; 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸; 5. 3,5-O-二咖啡酰奎宁酸; 6. 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸

图 2 提取物的特征谱

Fig. 2 Specific chromatograms of extracts

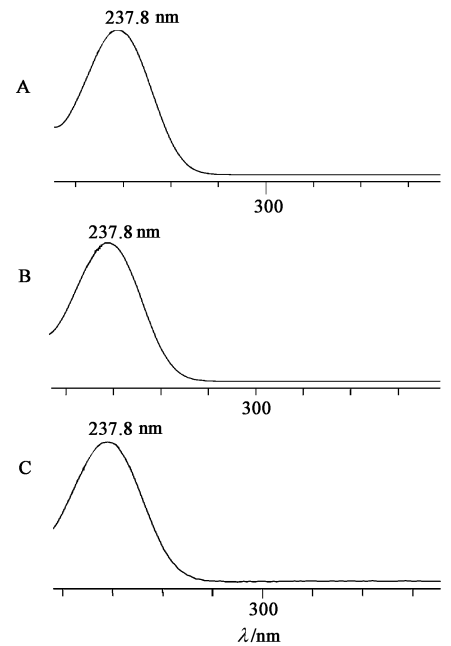
上述 3 批制剂检测出灰毡毛忍冬皂苷乙的银黄颗粒生产日期均为执行《中国药典》2015 年版(一部)之前,说明在执行更为严格标准之前,某些药品生产企业的自律性不佳。



A. 河北金银花提取物; B. 杜仲叶提取物; C. 银黄颗粒(批号 150107); D. 对照品; 1. 京尼平苷酸

图 3 检测波长 237 nm 下京尼平苷酸的 HPLC

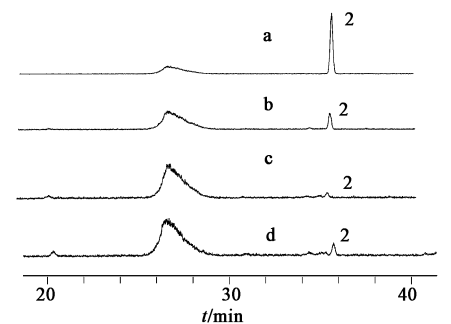
Fig. 3 HPLC chromatograms of geniposidic acid at 237 nm



A. 对照品; B. 杜仲叶提取物; C. 银黄颗粒(批号 150107)

图 4 京尼平苷酸的紫外吸收峰

Fig. 4 Ultraviolet absorption peak of geniposidic acid



a. 对照品; b. 供试品(批号 20150713); c. 供试品(批号 150701); d. 供试品(批号 141108); 2. 灰毡毛忍冬皂苷乙

图 5 银黄颗粒的 HPLC

Fig. 5 HPLC chromatograms of Yinhuang granules

按《中国药典》2015 年版银黄片特征图谱项下

方法对杜仲叶提取物进行检测,发现杜仲叶提取物特征图谱与银黄制剂特征图谱相似度极高,且其特征峰能满足标准要求。杜仲叶提取物在保留时间 12.8 min 附近出现与成药相同的吸收,且吸收程度远远大于金银花提取物和山银花提取物。但杜仲叶功效为补肝肾、强筋骨,与金银花的不符,会影响银黄制剂的临床效应。

3.2 市售金银花提取物和含金银花或金银花提取物的保健品 本文对不同厂家、批号的市售金银花提取物和银菊露、金银花露、金银花糖、王老吉润喉糖、枇杷金银花含片、双花麦菊含片保健品中绿原酸的含量及特征图谱进行了分析。结果表明市售金银花提取物中绿原酸质量分数 0.04% ~ 5.9%,存在显著差异性,特征图谱均能达到标准要求;保健品中绿原酸质量分数较低,在 0 ~ 0.006 6%,特征图谱不能达到标准要求。这可能是不同厂家对金银花进行提取时使用的提取方法、提取溶剂、原药材等不一样的缘故,应加强对金银花及其提取物规范使用的监督管理。

3.3 提取物制备方法的选择 以绿原酸转移率为指标,分别对杜仲叶提取物的流浸膏、干浸膏(加淀粉)和浸膏(直接蒸干全部溶剂)3 种剂型进行了分析研究,结果表明干浸膏中绿原酸的转移率最大,可达 100%,与《中国药典》2015 年版(一部)银黄片项下金银花提取物的提取方法相同,故本文采用该方法制备提取物。

3.4 样品的选择 金银花、山银花及杜仲叶中均含有绿原酸类成分,经市场调研发现,金银花每千克药材价格 140 ~ 160 元,山银花每千克 20 ~ 50 元,杜仲叶每千克市场价约 10 元。银黄颗粒以金银花提取物投料,市场每盒售价在 10 ~ 16 元,存在成方制剂与金银花药材价格倒挂现象,故本文选择山银花和杜仲叶、金银花进行试验分析。

综上所述,不能仅仅以绿原酸含量和 6 个特征峰来衡量金银花提取物的质量,应该进一步建立更具专属性的质量标准来控制金银花提取物的质量。一测多评法、对照提取物、指纹图谱是目前较成熟的质量控制技术或方法,运用新技术、新方法进一步加强对金银花提取物有效成分的研究,建立科学、系统、完整金银花提取物质量标准,使其更有效地控制金银花提取物质量,保障用药安全。《中国药典》2015 年版规定不能使用其他中药材代替金银花,据相关文献报道,金银花复方制剂中存在山银花替代金银花的情况,但目前尚无其他中药材替代金银花的相关报道^[20]。后续研究将着重于建立金银花提取物及

金银花复方制剂中杜仲叶提取物的检测方法,并制定更具专属性的金银花提取物质量控制方法。

[参考文献]

- [1] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药,2002,24(12):973-976.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1495-1498.
- [3] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材,2012,35(7):1180-1185.
- [4] Gewali M B, Hattori T, Namba T. Constituents of the stems of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1988, 42(3):247-248.
- [5] Hattori M, Che Q M, Gewali M B, et al. Studies on Du-Zhong leaves (III): Constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. Shoyakugku Zasshi, 1988, 42(3):76-80.
- [6] 彭应枝,邓梦如,周芳,等. 张家界杜仲叶的化学成分研究[J]. 中南药学,2013,11(3):179-181.
- [7] 翁裕馨,陈湘宏,刘占厚,等. 细毡毛忍冬叶绿原酸类化学成分研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(27):16566-16568.
- [8] 刘荣华,唐芳瑞,陈兰英,等. 不同产地杜仲叶中 5 种主要有效成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(18):31-34.
- [9] 汤丹,李会军,钱正明,等. 黄褐毛忍冬花蕾咖啡酰奎宁酸类成分研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(20):1537-1539.
- [10] 茅青,曹东,贾宪生. 灰毡毛忍冬化学成分的研究[J]. 药学学报,1993,28(4):273-281.
- [11] 贺清辉,李会军,毕志明,等. 红腺忍冬藤茎的化学成分[J]. 中国天然药物,2006,4(5):385-386.
- [12] 柴兴云,窦静,贺清辉,等. 山银花中酚酸类成分研究[J]. 中国天然药物,2004,2(6):339-340.
- [13] 陈玲,张海艳,李晓,等. 忍冬的化学成分研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):108-114.
- [14] 赵留存,叶世芸,杨春,等. UPLC-PDA-ELSD 测定贵州山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):64-67.
- [15] 于金倩,王召平,朱焯,等. 忍冬根的化学成分及其抗炎作用[J]. 药学学报,2016,51(7):1110-1116.
- [16] 梁从莲,刘红燕,崔媛,等. 金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):44-46.
- [17] 张伟. 忍冬属五种药用植物研究进展[J]. 内蒙古中医药,2015(2):127-129.
- [18] 邓良,袁华,喻宗沅. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2015,22(7):4-6.
- [19] 席利莎,木泰华,孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报,2014,28(2):292-301.
- [20] 郭巧技,舒畅,宋茜,等. 复方鱼腥草片中山银花检查方法的建立[J]. 中国药师,2015,18(8):1416-1419.

[责任编辑 刘德文]