



章厉劼, 廖欢, 栾庆祥, 等. HPLC 法测定兽用银翘散中绿原酸和连翘苷含量[J]. 黑龙江农业科学, 2022(10):83-88.

HPLC 法测定兽用银翘散中绿原酸和连翘苷含量

章厉劼¹, 廖欢¹, 栾庆祥¹, 黄鑫¹, 金晓峰¹, 余波², 王庆红¹

(1. 贵州省兽药饲料检测所, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 为了提升兽用银翘散的质控技术, 对提取方法、提取溶剂、测定波长、流动相等方面进行研究, 建立了同时测定兽用银翘散中绿原酸、连翘苷含量的高效液相色谱法。结果表明, 银翘散采用 50 mL 的 50% 甲醇溶液超声提取 30 min 后, 提取液补重, 用 C₁₈ 色谱柱分离, 乙腈-0.4% 磷酸溶液梯度洗脱, 检测波长为 277 nm 为最佳提取条件。绿原酸、连翘苷分别在 20~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 2.5~50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈现良好的线性关系, 相关系数均大于 0.999 99, 平均回收率分别为 101.5% ($RSD=2.47\%$, $n=6$) 和 93.7% ($RSD=2.69\%$, $n=6$)。该方法具有操作简单、准确性好、精密度高、适用性强等优点, 可作为兽用银翘散的质量评价与控制方法应用。

关键词: 高效液相色谱; 银翘散; 绿原酸; 连翘苷; 含量测定

“银翘散”源于《温病条辨》, 由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子、桔梗、淡竹叶、甘草、芦根十种药物组成^[1-2]。具有辛凉解表、清热解毒的功效, 主治外感风热或温病初起^[3]。畜牧养殖上多用于治疗猪肺疫、猪丹毒、热结、热毒湿疹、咳嗽多痰、中暑伤寒、肺热痰喘等^[4], 对猪蓝耳病也具有明显的治疗效果^[5]。对禽流感病毒具有明显可抑制作用^[6], 可防止鸭大肠杆菌病^[7], 提高家禽主动免疫水平和抗菌能力, 减少死淘数, 增加产蛋量等^[8-9]。银翘散用于畜牧养殖疗效明显, 成本低廉, 易于推广, 是减抗、替抗的主要产品之一。亦被收载于《中国兽药典》2020 年版中, 但药典中质检方法仅有显微鉴别^[10], 无法满足兽用银翘散的质量控制。

绿原酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降血压、降血脂、保肝利胆、增加白血球等药理活性, 为金银花中含量最高的有机酸成分^[11]。连翘苷对大肠杆菌、金色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌均有抑制作用, 是连翘的主要成分之一^[12]。银翘散中以金银花、连翘为君药, 入药量加大, 主要效用成分为绿原酸和连翘苷, 作为兽用银翘散质量评价具有很强的代表性, 且对照品价格相对较低, 所用高效液相色谱仪为兽药企业生产许可必配设备, 对兽药企业具有较强的适用性。本方法对兽

药银翘散中绿原酸、连翘苷测定波长、流动相、提取溶剂、提取方法等进行优化研究, 并通过系统性试验、线性试验、精密度试验、稳定性试验等方法验证, 建立了 HPLC 同时测定兽用银翘散中绿原酸、连翘苷含量的测定方法, 可有效提升兽药企业对银翘散的质量评价与控制。

1 材料与方法

1.1 材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(配 2998 二极管检测器); KQ-250DE 超声波振荡器(昆山市超声仪器厂); TB-215D 分析天平(梅特勒公司, 十万分之一); BP221S(赛多利斯公司, 万分之一); 绿原酸对照品(中国兽医药品监察所, 批号: Z0261702, 含量: 98.3%); 连翘苷对照品(中国食品药品检定研究所, 批号: 110821-201213, 含量: 95.3%); 银翘散(遵义县兽药厂生产, 批号: 170901、170902、170903; 山西芮城科龙兽药有限公司生产, 批号: 20170701); 自制银翘散; 甲醇(色谱纯); 乙腈(色谱纯); 磷酸(分析纯); 水为一级水; 其他试剂为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent T C-C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈为流动相 A, 以 0.4% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱, 见表 1; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长为 277 nm; 进样体积为 20 μL 。

1.3 样品制备

1.3.1 对照品溶液的制备 取绿原酸、连翘苷对照品适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸浓度为 20, 40, 100, 200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及连翘苷浓

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2021]一般 039 号); 贵州省地厅级科技计划项目(黔农牧[2021]001 号)。

第一作者: 章厉劼(1983—), 男, 硕士, 高级畜牧师, 从事饲料、兽药、畜产品质量安全研究。E-mail: 33317413@qq.com。

通信作者: 栾庆祥(1986—), 男, 硕士, 高级实验师, 从事兽药质量安全研究、畜产品质量风险评估、中兽药标准制修订。E-mail: 470510825@qq.com。

度为 2.5, 5.0, 12.5, 25.0 和 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5 组混标对照品溶液。

表 1 洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~3.5	10	90
3.5~6.0	10→15	90→85
6.0~15.0	15	85
15.0~17.0	15→22	85→78
17.0~25.0	22	78
25.0~27.0	22→10	78→90
27.0~30.0	10	90

1.3.2 供试品溶液的制备 取银翘散样品 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精确加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

1.4 检测方法的优化

分别对测定波长、流动相、提取溶剂、提取方法、仪器条件等进行优化, 通过银翘散测定结果确定最高效便捷的检测方法。

1.4.1 测定波长选择 测定对照品溶液及供试品溶液在 200~600 nm 的光谱图, 比较绿原酸、连翘苷的最大吸收峰, 筛选最合适的检测波长。

1.4.2 流动相选择 分别选用乙腈-0.4% 磷酸溶液^[13]、乙腈-0.2% 磷酸溶液^[14]、乙腈-0.5% 冰醋酸溶液^[15]、甲醇-0.15% 甲酸水^[16]、乙腈-水、甲醇-水^[10]等溶剂系统考察, 经多次调整梯度洗脱条件优化分离效果。

1.4.3 提取溶剂的优化 选用 50% 甲醇、70% 甲醇、100% 甲醇、70% 乙醇作为提取溶剂进行比较优化。

1.4.4 提取方法优化 比较超声时间在 10, 20, 30 和 40 min; 称样量在 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 g; 提取液用量 25, 50, 100 mL 时的提取效果。

1.4.5 仪器条件优化 比较色谱柱柱温在 30, 40, 50 $^{\circ}\text{C}$; 流速在 0.8, 1.0, 1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时的分离效果。

1.5 方法学考察

分别考察方法的系统适应性、线性、精密度、稳定性、重复性、回收率、方法适用性, 验证该方法的可行性。

1.5.1 系统适用性试验 取银翘散供试品溶液测定, 以绿原酸峰计算理论塔板数、分离度。

1.5.2 线性试验 取 5 组混标对照品溶液, 分别测定, 记录色谱峰面积, 绘制成标准曲线。

1.5.3 精密密度试验 取绿原酸浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、连翘苷浓度为 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混标对照品溶液重复测定 6 次, 测定色谱峰面积; 取银翘散供试品溶液重复测定 6 次, 记录色谱峰面积, 计算相对标准偏差。

1.5.4 稳定性试验 取银翘散供试品溶液, 分别在配制后 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样测定, 计算相对标准偏差。

1.5.5 重复性试验 取同一银翘散 6 份, 按“供试品溶液配制”方法制备, 分别测定, 记录色谱峰面积, 计算相对标准偏差。

1.5.6 回收率试验 取银翘散 6 份, 分别加入绿原酸对照溶液(0.020 58 g→10 mL) 2.00 mL, 连翘苷对照溶液(0.020 90 g→10 mL) 0.25 mL, 配制成阳性样品, 按“供试品溶液配制”方法制备, 分别测定, 计算绿原酸、连翘苷回收率。

1.5.7 方法适用性试验 分别在 Agilent 1260 infinity、赛默飞 U3000 高效液相色谱仪上选用 Agilent T C-C₁₈ (2) (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、菲罗门 Luna 5 μm C₁₈ (2) (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 3.5 μm) 色谱柱 4 种不同的常见色谱柱来考察绿原酸、连翘苷的适用性。

1.5.8 样品含量测定 取 4 个批号银翘散及自制银翘散样品各 3 份, 按“供试品溶液配制”方法制备, 分别测定, 计算每个样品中绿原酸、连翘苷平均含量。

1.6 数据分析

采用 Excel 2010 处理数据及制作图表。

2 结果与分析

2.1 检测方法的优化

2.1.1 测定波长选择 绿原酸、连翘苷分别在 326 和 277 nm 有最大吸收峰, 在 326 nm 时, 连翘苷几乎无吸收响应, 最终选取 277 nm 作为检测波长。

2.1.2 流动相的选择 4 种流动相中乙腈-0.4% 磷酸溶液对绿原酸、银翘苷与其他干扰组分离效果和响应最好, 因此最终确定乙腈-0.4% 磷酸溶液作为流动性。

2.1.3 提取溶剂优化 4 种提取溶剂中 50% 甲醇作为提取液时, 绿原酸、连翘苷的测定峰面积最大, 提取效果最佳, 是最佳提取溶剂。

2.1.4 提取方法优化 在超声提取 30 min、称取样品 1 g,提取溶剂使用 50 mL 时,绿原酸、连翘苷的测定峰面积最大,提取效果最佳,是最佳的提取方式。

2.1.5 仪器条件优化 色谱柱柱温 30 ℃流速 1.0 mL·min⁻¹时,绿原酸、连翘苷其他干扰组分

离效果和响应最好。

2.2 方法学考察

2.2.1 系统适用性试验 以绿原酸计算,本方法理论塔板数大于 5 000,绿原酸、连翘苷与其他杂峰分离度大于 1.5,色谱图见图 1、2。结果表明在本试验所测成分分离度良好。

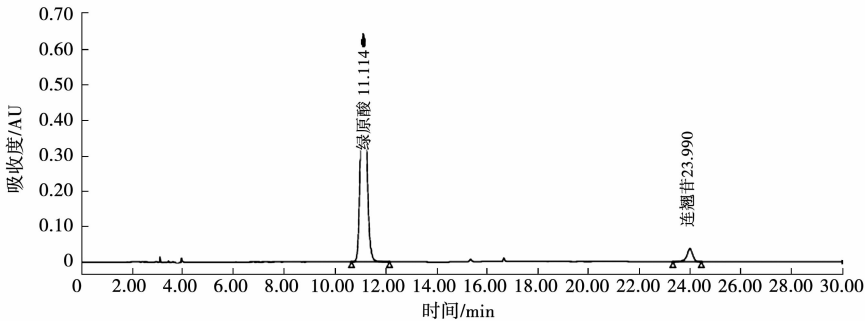


图 1 混标对照溶液色谱图

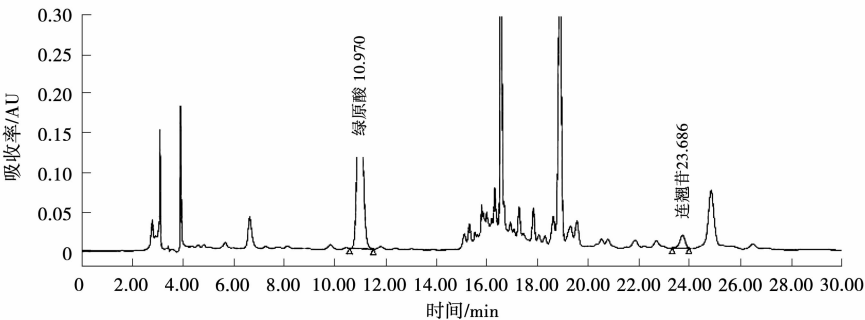


图 2 供试品溶液色谱图

2.2.2 线性试验 本方法选用外标法定量,对绿原酸、连翘苷的峰面积(Y)和浓度(X)制作工作曲线。绿原酸标准曲线见图 3,回归方程为 $Y=26\,368X-154\,423$ ($n=5$), $R^2=0.999\,99$;连翘苷标准曲线见图 4,

回归方程为 $Y=12\,142X-7\,902$ ($n=5$), $R^2=0.999\,99$ 。结果表明,绿原酸、连翘苷分别在 $20\sim 400\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $2.5\sim 50.0\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

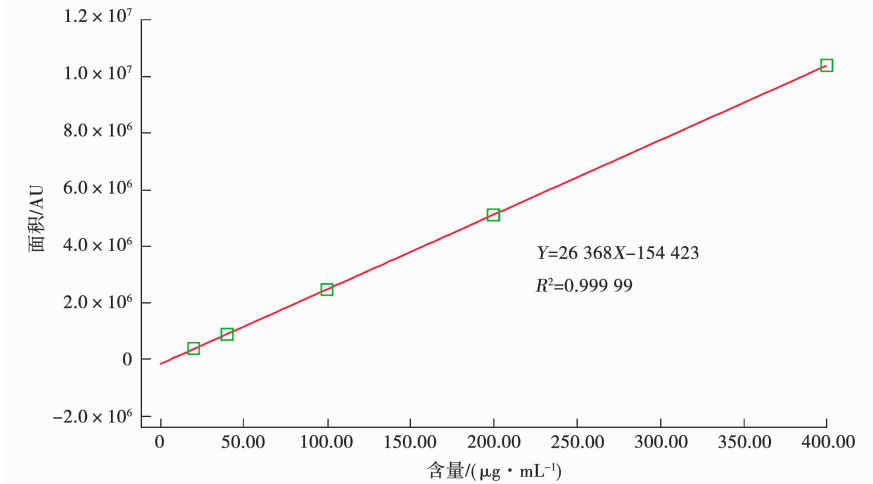


图 3 绿原酸线性关系图

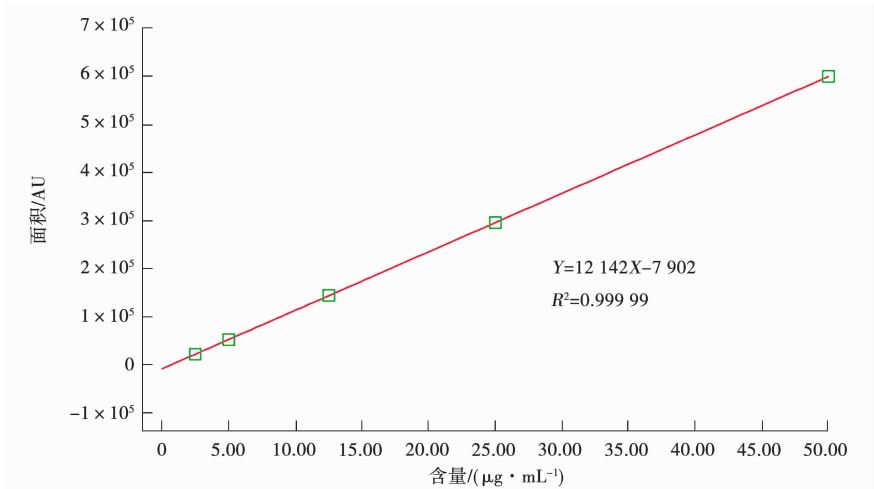


图 4 连翘苷线性关系图

2.2.3 精密度实验 由表 2 可知,混标对照溶液 0.25%,自制银翘散绿原酸、连翘苷峰面积 *RSD* 分别为 0.27%和 0.10%和 0.71%,表明本试验精密度良好。

表 2 精密度试验结果

样品名称	进样次数	绿原酸峰面积/AU	绿原酸峰面积平均值/AU	<i>RSD</i> /%	连翘苷峰面积/AU	连翘苷峰面积平均值/AU	<i>RSD</i> /%
对照溶液	1	4767314	4754857	0.27	358304	357277.8	0.25
	2	4767903			358229		
	3	4760674			357067		
	4	4752829			357526		
	5	4736559			356327		
	6	4743862			356214		
自制银翘散	1	3361396	3359482	0.10	148233	146686.2	0.71
	2	3355621			147048		
	3	3356374			145453		
	4	3357877			146516		
	5	3362537			147199		
	6	3363089			145668		

2.2.4 稳定性试验 银翘散供试品溶液在配制后 0,2,4,8,16,24 h 分别测定,绿原酸、连翘苷峰面积 *RSD* 分别为 0.22%和 0.56%,表明在 24 h 内基本稳定。

2.2.5 重复性试验 由表 3 可知,测定 6 份银翘散供试溶液,绿原酸、连翘苷平均含量分别为 7.480 和 0.976 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,*RSD* 分别为 1.30%和 1.62%。表明本试验的重复性良好。

表 3 重复性试验结果

样品名称	称样量/g	绿原酸含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	绿原酸含量 平均值/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	<i>RSD</i> /%	连翘苷 含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	连翘苷含量 平均值/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	<i>RSD</i> /%
1	1.0688	7.577	7.480	1.30	0.9964	0.976	1.62
2	1.0096	7.594			0.9897		
3	1.0508	7.458			0.9790		
4	1.0135	7.381			0.9761		
5	1.0737	7.361			0.9575		
6	1.0511	7.504			0.9589		

2.2.6 回收率试验 由表 4 可知,测定 6 份加标银翘散样品,平均回收率分别为 101.5%和 93.7%。表明本试验的准确性良好。

2.2.7 方法适用性试验 在 2 种高效液相色谱仪上使用 4 种不同品牌型号的色谱柱进行测试,绿原酸、连翘苷的保留时间有变化,但检测结果无影响。

表 4 回收率试样结果

名称	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%
绿原酸	1.0080	7.540	4.116	11.640	99.6	101.5	2.47
	1.0072	7.594	4.116	11.702	99.8		
	1.0142	7.702	4.116	11.756	98.5		
	1.0206	7.861	4.116	12.125	103.6		
	1.0156	7.983	4.116	12.280	104.4		
	1.0198	8.141	4.116	12.393	103.3		
连翘苷	1.0080	0.984	0.522	1.480	95.0	93.7	2.69
	1.0072	0.991	0.522	1.497	96.9		
	1.0142	1.005	0.522	1.506	95.9		
	1.0206	1.026	0.522	1.503	91.4		
	1.0156	1.042	0.522	1.522	92.0		
	1.0198	1.062	0.522	1.538	91.1		

表 5 样品含量测定结果

批号	绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	RSD/ %	连翘苷/ (mg·g ⁻¹)	RSD/ %
170901	7.46	1.9	0.977	0.21
170902	7.23	0.6	1.05	0.42
170903	6.47	1.0	0.904	1.80
20170701	2.55	0.8	0.900	1.62
自制银翘散	6.51	1.1	0.650	1.33

3 讨论

银翘散作为从古至今的中医经典方剂,具有很好的清热、解毒、消肿、散痈、抗炎、抗菌功效^[10],被畜牧养殖上广泛使用。由于兽药原料质量等级偏低、兽药企业规模较小、生产工艺水平较低、质检水平参差不齐,对于银翘散这类中药成分多,效用多的中药复方制剂,质量控制难度大。目前,采用外标法测定银翘散中单个或多个效用成分的研究报道已很多^[13-18],但这些方法中研究对象均为人药,存在对照品消耗量大、成本高、设备性能及人员技术要求高等缺点,并不适用于兽用银翘散的质控。本研究利用高效液相色谱建立了兽用银翘散同时提取、分离主要有效成分绿原

可见方法适用于不同设备、不同色谱柱条件下测定。

2.2.8 样品含量测定 对 4 个批号银翘散及自制银翘散样品进行测定,结果见表 5。可以看出,不同厂家银翘散及自制银翘散中绿原酸、连翘苷含量差异较大,同一厂家、不同批号的含量也存在一定差异,产品质量差异大。

酸、连翘苷的分析方法。本方法绿原酸、连翘苷分别在 20~400 μg·mL⁻¹和 2.5~50.0 μg·mL⁻¹内呈现良好的线性关系,相关系数均大于 0.999 99,阳性添加样品回收率分别为 101.5%和 93.7%,24 h 内基本稳定,在不同仪器和不同色谱柱条件下有较强重复适应性。方法具有操作简单、准确性高、适用性强、测定成本低,对人员设施要求不高的优点。结合兽药企业普遍仪器配置不高、人员技术水平不足和质检成本投入不够的实际情况,能有效提升企业对银翘散的质控能力,保障产品质量。促进中兽药产业的快速发展,助力减抗、替抗行动。

为控制企业质控成本,该方法未将牛蒡苷、木犀草苷、胡薄荷酮等效用成分共同研究,对银翘散的质控存在缺陷。近年来,单药材 HPLC 指纹图谱和特征图谱的质控方法得到较为广泛,后续对兽用银翘散开展此类研究,能更好提升银翘散的质量控制方法。

4 结论

本文建立了一种基于高效液相色谱法同时测定兽用银翘散中绿原酸、连翘苷含量的分析方法。本方法的色谱条件为色谱柱:Agilent T C-C₁₈ (2)

(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);柱温: 30 $^{\circ}$ C;流动相: 乙腈-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱);进样时间: 30 min, 流速: 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 277 nm;进样体积为 20 μ L。前处理方法为取银翘散样品 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精确加入 50%甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 溶液经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 经高效液相色谱仪测定。该方法准确性、稳定性、精密度、耐用性、回收率等结果较好, 可用于实际样品品质控检测。

参考文献:

- [1] 王学明. 银翘散加减治疗牛异物呛肺[J]. 养殖技术顾问, 2004(10): 30.
- [2] 刘玉梅, 张自强, 邓雯, 等. 银翘散在炎症模型中的抑制作用[J]. 河南科技大学学报(农学版), 2004, 24(3): 58-59.
- [3] 丁华洲. 中兽药银翘散配伍详解与应用案例总结[J]. 猪业观察, 2017(1): 44-46.
- [4] 魏永昆. 银翘散在兽医临床上的应用[J]. 四川畜牧兽医, 1996(3): 51.
- [5] 江斌. 中药银翘散治疗猪呼吸与繁殖综合征(蓝耳病)的效果观察[J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33(3): 10-11.
- [6] 赵增成, 宋敏训, 李桂明, 等. 银翘散抗禽流感病毒体外抑制试验[J]. 山东农业科学, 2017, 49(12): 107-109, 148.
- [7] 黄志成. 银翘散对鸭试验性大肠杆菌病防治作用的研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(20): 106-107, 114.

- [8] 廖秀华, 林兆京, 郑景齐, 等. 中草药制剂银翘散提高蛋鸡育雏和育成期抗病力的试验[J]. 畜禽业, 2014(2): 26-27.
- [9] 廖秀华, 施晞, 林兆京, 等. 中草药制剂银翘散在蛋鸡养殖中的应用试验[J]. 福建畜牧兽医, 2014, 36(3): 8-10.
- [10] 中华人民共和国兽药典: 2020 版二部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [11] 丁敏, 王丽玲, 秦玉川. 金银花中绿原酸的水提取工艺研究[J]. 浙江林业科技, 2022, 42(2): 15-20.
- [12] 张俊顺, 骆嘉原, 姜喆卉. 连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2022, 36(7): 193-201.
- [13] 罗云, 张婧, 赵海平, 等. 高效液相色谱法同时测定银翘散中绿原酸、连翘苷、牛蒡苷、甘草苷、甘草酸的含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(6): 473-476.
- [14] 印酬, 王洪凤, 向红霞, 等. 超高效液相色谱法同时测定银翘散中 4 种指标性成分含量[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(24): 2170-2172.
- [15] 薛鑫, 郑琴, 杨佳柳, 等. HPLC 法同时测定银翘散煎液中七种有效成分含量[C]//中华中医药学会中药制剂分会, 世界中医药学会联合会中药药剂专业委员会. “好医生杯”中药制剂创新与发展论坛论文集(下), 2013: 149-154.
- [16] 刘利辉, 徐剑, 张永萍. UPLC 测定银翘散中的多指标性成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 67-70.
- [17] 张敏, 刘莉, 王洪凤. “一测多评”法在银翘散质量控制中的应用[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(5): 570-577.
- [18] 刘雅茹, 王雪峰, 孟宪生. HPLC 测定银翘散中牛蒡子苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2006(13): 1113-1114.

Determination of Chlorogenic Acid and Forsythin in Veterinary Yinqiao Powder by HPLC

ZHANG Li-jie¹, LIAO Huan¹, LUAN Qing-xiang¹, HUANG Xin¹, JIN Xiao-feng¹, YU Bo², WANG Qing-hong¹

(1. Guizhou Institute of Veterinary Medicine and Feed Testing, Guiyang 550003, China; 2. Guizhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guiyang 550003, China)

Abstract: In order to improve the quality control technology of Yinqiao powder for veterinary drug enterprises, this paper studied the extraction method, extraction solvent, determination wavelength and flow equality, and established a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of chlorogenic acid and forsythiin in Yinqiao powder for veterinary use. The results showed that Yinqiao powder was extracted with 50 mL of 50% methanol solution by ultrasound for 30 min, then the extract was separated by C₁₈ column and eluted by acetonitrile-0.4% phosphoric acid gradient. The optimal detection wavelength was 277 nm. Chlorogenic acid and phillyrin showed good linear relationship at 20-400 μ g·mL⁻¹ and 2.5-50.0 μ g·mL⁻¹ respectively. The correlation coefficients were greater than 0.999 99. The average recoveries were 101.5% (RSD=2.47%, n=6) and 93.7% (RSD=2.69%, n=6) for chlorogenic acid and forthyacin, respectively. This method has the advantages of simple operation, good accuracy, high precision and strong applicability, and can be used as one of the quality evaluation and control methods of Yinqiao powder for veterinary use.

Keywords: high performance liquid chromatography; Yinqiao powder; chlorogenic acid; forsythin; assay