

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.08

# UPLC-PDA 法测定杨树花口服液中非法添加物黄芩苷

魏秀丽,张传津,李有志

(山东省兽药质量检验所,济南 250022)

[收稿日期] 2017-06-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 01-0050-06 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 为了建立超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA法)测定杨树花口服液中非法添加物黄芩苷,取适量黄芩苷对照品、杨树花口服液阴性样品、阳性添加样品、抽检样品经 50% 甲醇溶解,超声提取,滤液过滤并定量稀释后,作为供试品溶液,采用 UPLC-PDA 法检测。色谱分离采用 ACQUITY UPLC™ HSS T3 色谱柱为分离柱,柱温:35 ℃;流动相体系:A 项为乙腈,B 项为 0.4% 磷酸水溶液,进行梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:10 μL;选择二极管阵列检测器,检测波长为 278 nm,上机测定。通过保留时间、光谱图、峰纯度等参数对黄芩苷进行定性定量检测。结果表明,黄芩苷在 0.5 ~ 100 μg/mL 的范围内线性关系良好( $R^2 = 0.999$ );杨树花口服液中添加黄芩苷 0.05 mg/mL,信噪比(S/N) > 3,确定为方法的检测限;添加 0.1 mg/mL,信噪比(S/N) > 10,确定为方法的定量限;杨树花口服液在 0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL 黄芩苷添加水平的回收率为 95% ~ 105%,批内批间变异系数均小于 10%,准确度和精密度良好,完全满足检测需求。而且峰纯度角与阈值符合要求。本方法经济快速、灵敏、重现性好,适用于杨树花口服液中非法添加黄芩苷的定性定量检测。

**[关键词]** 黄芩苷;超高效液相色谱-二极管阵列检测法;中兽药;杨树花口服液;非法添加

## Determination of Baicalin in Yangshuhua Koufuye by UPLC-PDA

WEI Xiu-li, ZHANG Chuan-jin, LI You-zhi

(Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China)

**Abstract:** To establish a UPLC-PDA method for determination and confirmation of baicalin added illegally in Yangshuhua Koufuye. **Methods:** The amount of baicalin control products, Yangshuhua Koufuye negative samples, the positive samples added baicalin, sampling appropriate amount dissolved in 50% methanol, with ultrasonic extraction, filtration and quantitative diluted and then detected by UPLC-PDA. An ACQUITY UPLC™ HSS T3 column was used with gradient elution of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid as the mobile phase (0.35 mL/min) and with column temperature 35 ℃; sample size: 10 μL; The signals were detected by PDA detector, and the detection wavelength was 278 nm. By comparing the retention time, spectra, peak purity and other parameters to identify Baicalin. Baicalin in the range of 0.5 ~ 100 μg/mL of the linear relationship is good ( $R^2 = 0.999$ ); The

**作者简介:** 魏秀丽,高级兽医师,从事兽药和畜禽产品质量监督检验、非法添加物专项监测及新兽药研发工作。E-mail: tammy0106@163.com

detection limit was 0.05 mg/mL ( $s/n>3$ ), and the quantitation limit was 0.1 mg/mL ( $s/n>10$ ). Added at the level of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL recovery rate was 95%~105%, the intra and inter assay coefficients of variation were less than 10%, with good accuracy and precision, fully meet the detection requirements. But the peak purity and threshold requirements. The method was rapid, reliable, sensitive and reproducibility, adapts to the determination of baicalin in yangshuhua koufuye, and can be used as a qualitative, quantitative determination method.

**Key words:** baicalin; UPLC-PDA; traditional Chinese veterinary medicine; Yangshuhua Koufuye; illegal additive

近年来,兽药监管部门针对一些不法企业在中兽药中非法添加化学药品,组织开展了系列中兽药中非法添加物检测方法的研究,对开展非法添加物的筛查、确证工作提供了科学准确的检测依据,有力打击了非法造假行为,已取得了初步成效;但是现在市场又出现了一种新的极其隐蔽的兽药造假行为:一些不法企业为了提高疗效,私自调整中药处方,在原中药处方中添加处方外的中药成分,对动物安全同样带来潜在危害。山东省兽药质量检验所承担了山东省和部分外省的非法添加物专项检测任务<sup>[1]</sup>,在抽检的杨树花口服液检出了处方外成分黄芩苷<sup>[2]</sup>,建立了杨树花口服液中非法添加物黄芩苷的测定-超高效液相色谱法。研究通过优化流动相梯度洗脱等色谱条件,提高了分离效果,可以作为定性、定量的确证方法,为制定相关标准,

以及非法添加物专项任务提供检验依据。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 分析天平:感量 0.00001 g;仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪。

1.2 药品及试剂 黄芩苷,批号 110715-201016,含量 94.0%,中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯;超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC™ HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相 A:乙腈;流动相 B:水溶液(0.4%磷酸),进行梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:10 μL;柱温:35 ℃。二极管阵列检测器,检测波长为 278 nm。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件表

Tab 1 Gradient elution condition table

时间/h	流动相 A/%	流动相 B/%	曲线
0	10	90	
0~3	10→25	90→75	6
3~6	25→40	75→60	6
6~8	40→10	60→90	6
8~10	10	90	6

## 2.2 样品制备

2.2.1 阴性样品 5 批 5 家企业报批的杨树花口服液经检验不含有黄芩苷。待检的抽检样品 1 批。

2.2.2 标准储备液的制备 精密称取黄芩苷对照品 10.64 mg,加甲醇至 50 mL,制成 200 μg/mL 的溶

液,作为外标储备液。

2.2.3 标准工作液的制备 取适量标准工作液,用初始比例流动相稀释,制备成系列浓度为:0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、20、50、100 μg/mL 标准工作液,绘制标准曲线。

2.2.4 阳性添加样品的制备 精密量取黄芩苷储备液适量,加 1 mL 杨树花口服液,置 25 mL 容量瓶中,配置成的 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL 的杨树花口服液阳添加样品,加入 50% 甲醇适量,超声处理 20 min,加入 50% 甲醇定容摇匀,静置(或离心),滤

过;取滤液 1.6 mL,加初始流动相至 10 mL,摇匀,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,作为阳性添加样品。阳性样品和待测样品同法处理。每个添加浓度制备三份平行样,每份样品至少进样 2 次,取平均值。报告 12 个回收率测定结果并计算相对标准偏差(RSD),见表 2。

表 2 阳性添加样品制备表

Tab 2 Sample preparation schedule for positive addition

黄芩苷添加浓度	黄芩苷储备液加入量	杨树花口服液取样量	溶媒/终体积	初始流动相稀释
0.05 mg/mL	0.25 mL			
0.1 mg/mL	0.5 mL			
0.2 mg/mL	1 mL	1 mL	50% 甲醇定容至 25 mL	1.6 mL → 定容至 10 mL
0.4 mg/mL	2 mL			
0.6 mg/mL	3 mL			

## 2.3 方法线性考察及添加回收试验结果

2.3.1 标准曲线 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离黄芩苷,在 0.5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内标准曲线方程为  $Y=94800X+10600$ ,  $Y$  为黄芩苷峰面积,  $X$  为黄芩苷的浓度,其相关系数  $R^2$  为 0.999,线性良好。

2.3.2 方法的检测限和定量限 阴性样品经检测不含黄芩苷,含有防腐剂苯甲酸,杨树花口服液中添加黄芩苷,液相色谱与苯甲酸分离良好,无其他

干扰,添加 0.05 mg/mL,信噪比(S/N)>3,确定为方法的检测限;添加 0.1 mg/mL,信噪比(S/N)>10,确定为方法的定量限;根据药物发生药效所需要的可能添加的浓度,检测限和定量限足以满足要求。

2.3.3 方法的准确度和精密度 杨树花口服液中添加浓度分别 0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL,批内批间变异系数均小于 10%,阳性添加样品的回收率在 95%~105%,见表 3。准确度和精密度良好,完全满足检测需求。

表 3 杨树花口服液中添加黄芩苷的回收率试验结果( $n=12$ )

Tab 3 Test result of recovery rate of baicalin added in yangshuhua koufuye

中兽药	添加浓度 /( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率/%	平均回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	
杨树花口服液	0.1	99.32	97.98	100.08	99.13	1.07
	0.2	99.68	98.69	99.67	99.35	0.57
	0.4	99.53	99.78	99.34	99.55	0.22
	0.6	99.85	99.97	100.21	100.01	0.18

2.4.4 抽检样品的结果判定 空白样品色谱图未检出黄芩苷,黄芩苷对照溶液、抽检阳性样品的色谱图见图 1~图 2,其黄芩苷出峰的保留时间一致,

初步判定抽检样品添加了黄芩苷;对抽检阳性样品光谱图与黄芩苷对照溶液光谱图(图 3)进行比较,非常一致,抽检样品保留时间 4.987 min 的色谱峰

纯度角 0.045, 纯度阈值 0.248, 纯度角小于纯度阈值, 说明光谱均匀, 未包裹共流出物, 满足检测要求 (图 4), 最终确证抽检样品非法添加了黄芩苷, 通

过含量计算, 其杨树花口服液中黄芩苷含量高于 15 mg/mL。

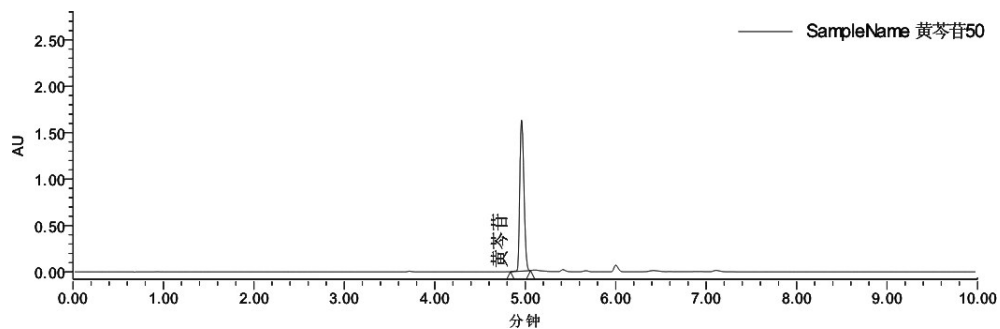


图 1 50µg/mL 黄芩苷对照品色谱图

Fig 1 50µg/mL Baicalin control chromatogram

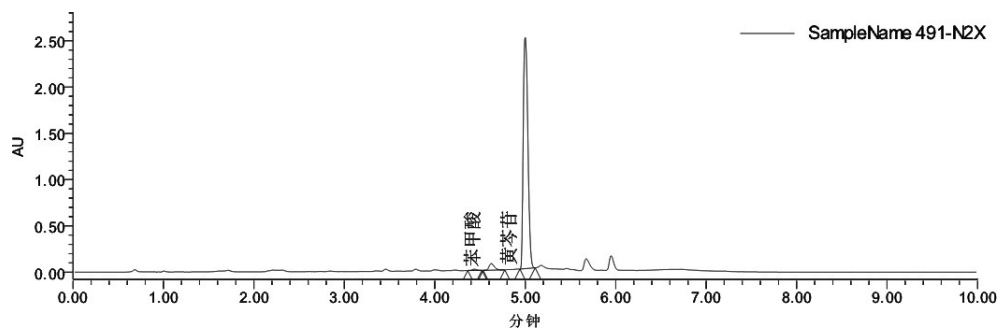


图 2 检出抽检阳性样品色谱图

Fig 2 Sampling detection positive sample chromatogram

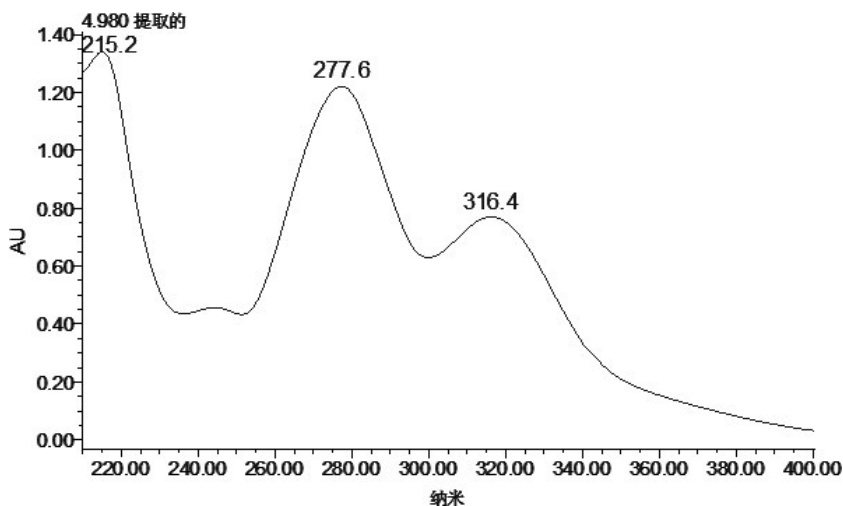


图 3 黄芩苷光谱图

Fig 3 Baicalin spectrogram

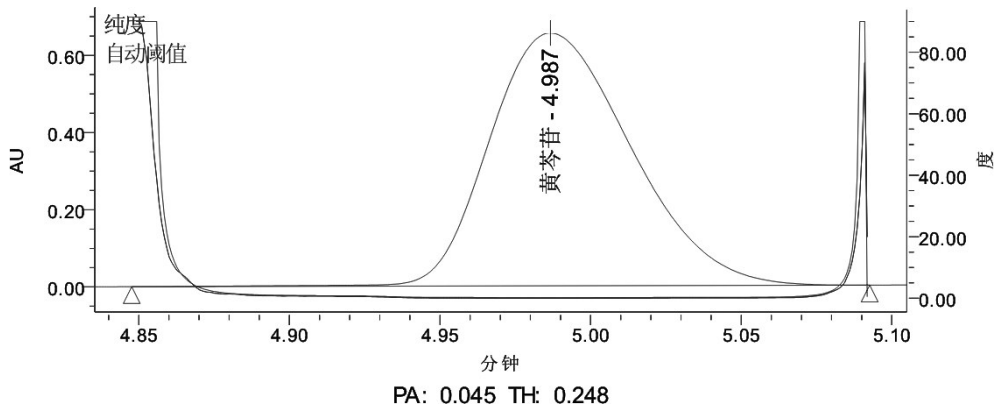


图 4 黄芩苷纯度图

Fig 4 Baicalin Purity map

### 3 讨论与结论

3.1 选用超高效液相色谱仪,检测方法准确经济快速。本实验室是在检测杨树花口服液中是否含非法添加物时,采用超声提取法,滤过上机检测,偶尔发现了非目标峰峰形尖锐,峰面积异乎寻常的巨大,经过众多的化药和抗生素光谱图进行比对发现均不是,后发现其色谱出峰时间和光谱图与黄芩苷非常一致,然后选择 0.4% 磷酸和乙腈为流动相进行方法验证,选择超高效液相 PDA 检测器,梯度洗脱,与苯甲酸分离度满足要求,系统适应性良好。用超高效液相色谱运行一针需要 10 min,比一般的液相色谱时间节约了 30 min,流速为 0.35 mL,流动相节约了 36.5 mL,不仅减少了实验室耗能耗电,还减少了废液排放,符合绿色节能减排的原则。

3.2 色谱柱和柱温的选择。一开始选用了 ACQUITY UPLCTMBEH C18 色谱柱,分离效果和峰形较差,后选用了 ACQUITY UPLCTMHSS T3 色谱柱,使得苯甲酸和黄芩苷分离较好,峰形较好。在柱温条件优化时,选择了柱温 30 °C、35 °C、40 °C,比较发现 35 °C 效果最好,一是与 40 °C 比较,与防腐剂苯甲酸分离度较好,而与 30 °C 比较系统压力相对较小,最终选择了柱温 35 °C。通过光谱图显示黄芩苷在 278 nm 存在最大吸收,故波长选择 278 nm。

3.3 非法添加黄芩苷的潜在风险。黄芩苷是黄芩提取物、双黄连口服液、银黄提取物口服液、清解合

剂、黄连解毒散、龙胆泻肝散、郁金散、四黄止痢颗粒等中兽药中起重要作用的一种组分,具有清热燥湿,泻火解毒等功效,用于治疗湿热、泻痢等;随着黄芩提取物等中药良好的治疗效果及全国范围内的推广应用,其他兽药中如若再非法添加黄芩苷,有可能造成剂量过大,引起不良反应<sup>[2]</sup>。

3.4 非法添加物筛查的合理性分析。查资料证实杨树花水提液中主要化学成分包括多糖、黄酮类、有机酸、强心甙、内酯及香豆素,蒽醌类化合物、酚类或鞣质,植物甾醇等,而且白毛杨雄花序含有多种黄酮类化合物,主要有山奈酚、芹菜素、槲皮素、木犀草素、水杨苷等,但是不含有黄芩苷<sup>[3-5]</sup>,而且文献报道杨树花与黄芩复方研发的注射液对仔猪泻痢等有良好的协同作用<sup>[4]</sup>,因此其非法添加符合逻辑规律。

3.5 方法适用范围及说明。实验只针对杨树花口服液中黄芩苷非法添加物的检测进行了方法学的考察验证,因为不同样品背景基质效应差异很大,需要进一步研究其他兽药单方或复方中黄芩苷的检测方法,为进一步制订地方或国家非法添加物质量标准奠定基础,保障养殖业用药安全,保障动物食品安全和公共卫生安全。

本方法建立了超高效液相色谱法测定杨树花口服液中非法添加物黄芩苷,采用外标法,对样品进行提取稀释后测定,专属性强、灵敏度高、检测限

低。通过方法学考察,完全适合杨树花口服液中黄芩苷非法添加的定性、定量检测。

### 参考文献:

- [1] 农医发[2017]2号文农业部关于印发《2017年兽药质量监督抽检计划》的通知[Z]. 2017.  
Agricultural medicine [2017]2 paper on the Ministry of Agriculture issued 2017 quality supervision and sampling of veterinary drugs plan notice [Z]. 2017.
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版 [S].  
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2015 edition[S].
- [3] 王艳萍,董林,郭世金,等. 杨树花中黄酮类化合物的种类及其药理作用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012,4(2):97-98.

Wang Y P, Dong L, Guo S J, *et al.* Flavonoids in poplar flower species and Pharmacological action [J]. Heilongjiang animal husbandry and veterinary medicine, 2012,4 (2): 97-98.

- [4] 房春林. 杨树花及其复方制剂药学与临床应用研究, 四川大学大学博士论文[D]. 2010.  
Fang C L. Study and clinical application of poplar flower and its compound pharmacy, Sichuan Agricultural University Doctoral Dissertation[D]. 2010.
- [5] 韩立,班付国,周红霞,等. 高效液相色谱法测定杨树花口服液中水杨苷的含量[J]. 中国兽药杂志, 2014(6):25-27.  
Han L, Ban F G, Zhou H X, *et al.* Determination of salicin in Yanhshuhua oral liquid by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary, 2014(6):25-27.

(编辑:陈希)