

# HPLC - PDA 方法同时检测黄连解毒散中非法添加的对乙酰氨基酚和盐酸溴己新

董玲玲,龚旭昊,王静文,杨星,范强\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-02-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 05-0019-05 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 为同时检测黄连解毒散中非法添加的对乙酰氨基酚和盐酸溴己新,以十八烷基键合硅胶为填充剂,1%冰醋酸溶液(用三乙胺调剂 pH 值至 4.0)为流动相 A,甲醇为流动相 B,进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,波长扫描范围为 210~400 nm,柱温 25 °C,建立了 HPLC - PAD 检测方法,并采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品比对方法,对非法添加药物进行确证。结果显示,对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的回收率分别为 98.6% 和 99.4%,RSD 分别为 0.6% 和 0.2%;线性方程分别为  $y = 43408x - 401.96, R^2 = 1$  和  $y = 14331x - 1682.4, R^2 = 1$ ;检测限分别为 1 和 5 mg/g;定量限分别为 2 和 10 mg/g。本方法简洁、灵敏、可靠,可同时对黄连解毒散中非法添加的对乙酰氨基酚和盐酸溴己新违禁药物进行定性和定量检测。

**[关键词]** 对乙酰氨基酚;盐酸溴己新;黄连解毒散;HPLC - PDA

## Simultaneous Determination of Acetaminophen and Bromhexine Hydrochloride Illegally Added in the Huanglian Jiedu Powder by HPLC - PDA

DONG Ling - ling, WANG Jing - wen, GONG Xu - hao, YANG Xing, FAN Qiang\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A method for the simultaneous determination of acetaminophen and bromhexine hydrochloride illegally added in the Huanglian Jiedu Powder was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using 1% acetic acid solution (adjusting pH to 4.0 by triethylamine) and methanol with gradient elution as the mobile phase. The scanning wavelength was from 210 to 400 nm. Peak purity test and spectrum similarity test were used to identify the illegally added drugs. The mean recoveries of acetaminophen and bromhexine hydrochloride was 98.6% and 99.4%, respectively. RSD was 0.6% and 0.2%, respectively. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of acetaminophen and bromhexine hydrochloride in the Huanglian Jiedu Powder.

**Key words:** acetaminophen; bromhexine hydrochloride; Huanglian Jiedu Powder; HPLC - PDA

基金项目: "十二五"科技支撑计划(2015BAD11B03 - 4)

作者简介: 董玲玲,硕士研究生,从事药品检验工作。

通讯作者: 范强。E - mail: fanqiang@ivde.gov.cn

黄连解毒散的主要成分有黄连、黄芩、黄柏、栀子,主治三焦实热、疮黄肿毒,适用于马、牛、羊、猪、兔及家禽<sup>[1]</sup>,应用广泛。对乙酰氨基酚因其解热镇痛作用明显,价格低廉,常被不法商家添加在兽药中以“增强药效”。盐酸溴己新有较强的溶解黏痰作用,可使痰中的多糖纤维素裂解,稀化痰液<sup>[2]</sup>,常用做祛痰药。在黄连解毒散中添加对乙酰氨基酚和盐酸溴己新,不仅违反了《兽药管理条例》,也为动物源性食品安全埋下了隐患。

有关兽药中非法添加对乙酰氨基酚的检测方法已有不少<sup>[3-5]</sup>,而针对兽药中非法添加盐酸溴己新的检测方法却鲜有报道,更没有同时检测兽药中非法添加对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的方法报道。而实际工作中已发现有市售黄连解毒散中非法添加了对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的情况存在,因此有必要建立简洁、灵敏、可靠的方法检测黄连解毒散中非法添加的对乙酰氨基酚和盐酸溴己新。国内外已报道的用于检测盐酸溴己新的方法最常用的是高效液相色谱法<sup>[2,6-7]</sup>,另外还有近红外光谱法<sup>[8]</sup>、化学发光法<sup>[9]</sup>等。参考上述文献,并综合考虑对乙酰氨基酚、盐酸溴己新的物理化学性质及黄连解毒散的特点,本文拟建立一种快速、准确、可靠的定性定量方法,以期广泛应用于非法添加的检测工作。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters e2695 液相系统、2998 PDA 二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站软件(美国 Waters 公司)、Mettler AE240 型十万分之一天平(美国 Mettler Toledo 公司)、MiliQ 纯水机、雷磁 PHSJ-4A型 pH 计。

1.2 试药与试剂 对乙酰氨基酚对照品(含量:99.9%,批号:100018-201409,中国食品药品检定研究院),盐酸溴己新对照品(含量:99.9%,批号:100427-201102,中国食品药品检定研究院);供试品:黄连解毒散空白样品(自制散剂);黄连解毒散阳性样品(批号:20150643),甲醇(德国 Merck 公司,色谱纯),三乙胺(美国 Fisher Scientific 公司,色谱纯),冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),去离子水(MiliQ 纯化系统制备的去离子水)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:资生堂 MGII C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:1% 冰醋酸溶液(用三乙胺调剂 pH 值至 4.0)为流动性 A,甲醇为流动相 B,按下表进行梯度洗脱,流速:1.0 mL/min,柱温:25 °C,进样量:10 μL,二极管阵列检测器(PDA,检测波长:210~400 nm,记录 248 nm 波长处的色谱图)。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	70	30
5	70	30
6	30	70
20	30	70
21	70	30
25	70	30

### 2.2 溶液制备

2.2.1 黄连解毒散 空白储备液 取自制黄连解毒散 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 50.0 mL,超声处理 15 min,静置,滤过,作为黄连解毒散空白储备液。

2.2.2 黄连解毒散空白溶液 取黄连解毒散空白储备液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为黄连解毒散空白溶液。

2.2.3 对乙酰氨基酚对照品储备液 取对乙酰氨基酚对照品 25 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 1 mg/mL 的对乙酰氨基酚对照品储备液 A。精密量取 2 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得 0.02 mg/mL 的对乙酰氨基酚对照品储备液 B。

2.2.4 盐酸溴己新对照品储备液 取盐酸溴己新对照品 25 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 1 mg/mL 的盐酸溴己新对照品储备液 A。精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得 0.1 mg/mL 的盐酸溴己新对照品储备液 B。

2.2.5 系统适用性溶液 取黄连解毒散空白储备液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加对乙酰氨基酚对照品储备液 A 和盐酸溴己新对照品储备液 A 各 5 mL,加初始流动相稀释至刻度,摇匀。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 供试品本底及干扰 精密量取黄连解毒散空白溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图

和光谱指数图,另取系统适用性溶液 10  $\mu\text{L}$ ,同法操作,结果见图 1、图 2,表明黄连解毒散本底在对乙酰氨基酚和盐酸溴己新相应位置不产生干扰。

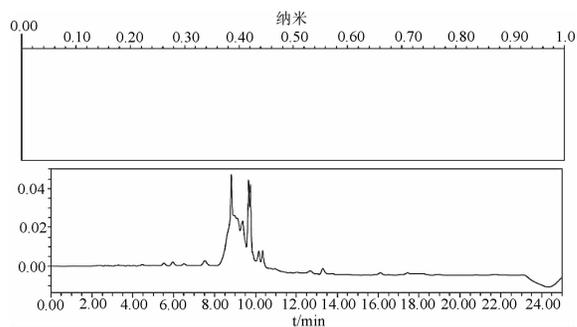


图 1 黄连解毒散空白溶液光谱色谱图

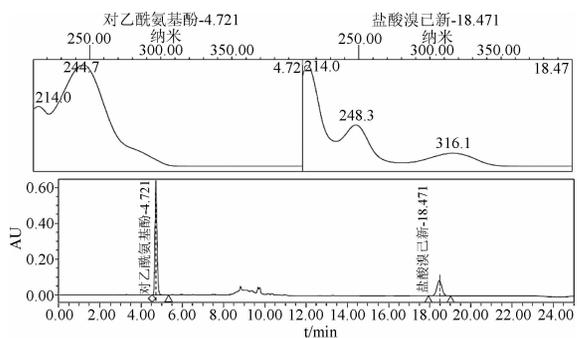


图 2 系统适用性溶液光谱色谱图

**2.3.2 线性关系考察** 精密量取对乙酰氨基酚对照品储备液 A 和盐酸溴己新对照品储备液 A 各 2.5 mL,置同一 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 1、3、5、7、9 mL,置 10 mL 容量瓶中,加初始流动相稀释至刻度,摇匀,得浓度为 5、15、25、35、45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对乙酰氨基酚和盐酸溴己新混合标准曲线溶液,测定。按各对照品峰面积与对应的浓度作标准曲线,并计算回归方程和相关系数。对乙酰氨基酚的回归方程为  $y = 43408x - 401.96$ ,  $R^2 = 1$ ; 盐酸溴己新的回归方程为  $y = 14331x - 1682.4$ ,  $R^2 = 1$ ,表明对乙酰氨基酚和盐酸溴己新在 5 ~ 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

**2.3.3 检测限与定量限** 检测限溶液制备:取黄连解毒散空白储备液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中,分别精密加入对乙酰氨基酚对照品储备液 B 适量(1、2、3 mL),加初始流动相稀释至刻度。另取黄连解毒散空白储备液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中,分别精密加入盐酸溴己新对照品储备液 B 适量(1、2、

3 mL),加初始流动相稀释至刻度。以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限(图 3 - 图 4),  $S/N \geq 10$  的浓度为定量限。该色谱条件下对乙酰氨基酚的检测限为 1 mg/g,定量限为 2 mg/g; 盐酸溴己新的检测限为 5 mg/g,定量限为 10 mg/g。为达到“药效”,有时兽药中非法添加其它药物的量非常大,本方法所制定的检测限和定量限能够满足实际工作需要。

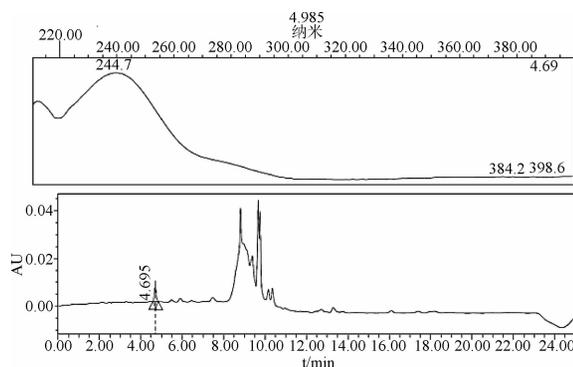


图 3 对乙酰氨基酚检测限光谱色谱图

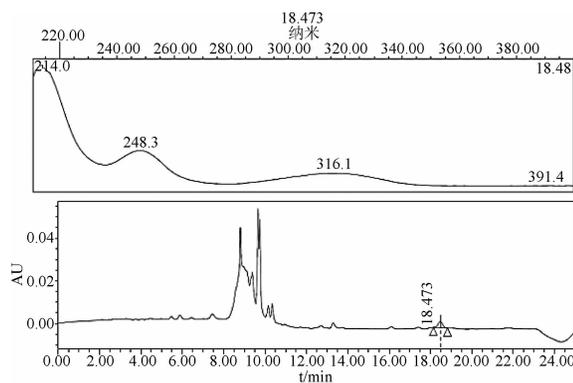


图 4 盐酸溴己新检测限光谱色谱图

**2.3.4 准确度** 以黄连解毒散空白中添加对乙酰氨基酚和盐酸溴己新对照品做回收率试验来考察方法的准确度。储备液加对照品做回收率试验来考察方法的准确度。回收率试验溶液配制:取自制黄连解毒散 2.0 g,置 50 mL 量瓶中,取对乙酰氨基酚对照品 50 mg、盐酸溴己新对照品 50 mg,分别精密称定,置上述量瓶中,加甲醇适量,超声处理 15 min 使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。平行配制 6 份,结果见表 2。对乙酰氨基酚回收率为 98.6%,  $RSD$  为 0.6%; 盐酸溴己新回收率为 99.4%,  $RSD$  为 0.2%。

表2 回收率结果

对乙酰氨基酚				盐酸溴己新			
加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
50.03	97.65			49.96	99.27		
49.88	98.89			50.11	99.62		
49.88	98.38	98.6	0.6	50.05	99.34	99.4	0.2
50.21	99.16			50.09	99.44		
50.13	98.69			50.20	99.17		
50.08	99.05			49.93	99.54		

2.3.5 耐用性 以系统适用性溶液作为供试品溶液,从柱温、色谱柱两个方面考察方法的耐用性。保持其它检测条件不变,调节柱温为 20 ℃、25 ℃、30 ℃,发现随着柱温升高,保留时间提前,但其与

相邻色谱峰的分度大于 1.5;选择三款不同品牌色谱柱,考察不同色谱柱对测定的影响,结果如表 3 所示:三种品牌色谱柱均可用于该检查。结果表明方法耐用性较好。

表3 三种色谱柱耐用性考察结果表

非法添加药物	色谱柱	保留时间/min	分离度	理论塔板数	拖尾	纯度角度	纯度阈值	PDA 匹配角度	PDA 匹配阈值
对乙酰氨基酚	资生堂 MG II	4.72	-	>10000	<1.2	0.163	0.324	0.214	1.056
	Atlantis T3	5.36	-	>15000	<1.1	0.271	0.456	0.154	1.131
	GRACE Alltima	5.12	2.0	>10000	<1.2	0.143	0.363	0.460	1.076
盐酸溴己新	资生堂 MG II	18.47	2.7	>27000	<1.1	0.425	0.690	0.385	1.341
	Atlantis T3	18.89	4.3	>37000	<1.1	0.565	1.419	0.513	1.117
	GRACE Alltima	14.51	3.6	>16000	<1.2	0.716	0.919	0.168	1.185

2.4 样品测定结果 取黄连解毒散阳性样品 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 50.0 mL,超声处理 15 min,静置,滤过;取续滤液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加初始流动相稀释至刻度,摇匀,用建立的 HPLC - PDA 法对该样品中非法添加物进行测定,供试品色谱图中保留时间 4.72 min 的色谱峰与对乙酰氨基酚对照

品保留时间一致,18.47 min 的色谱峰与盐酸溴己新对照品保留时间一致,且与各自对照品光谱图及最大吸收波长一致,匹配角度均小于匹配阈值,光谱相似。表明供试品中添加了对乙酰氨基酚和盐酸溴己新,结果分别为 42.76 mg/g 和 24.50 mg/g,供试品色谱光谱图见图 5,结果见表 4。

表4 黄连解毒散阳性样品检测结果

结果	对乙酰氨基酚对照品	盐酸溴己新对照品	黄连解毒散阳性样品		结果
			对乙酰氨基酚	盐酸溴己新	
保留时间/min	4.72	18.47	4.69	18.45	与对照品一致
最大吸收波长/nm	244.7	248.3;316.1	244.7	248.3;316.1	与对照品一致
纯度角度	0.163	0.425	0.075	0.306	角度小于阈值,为单一物质峰
纯度阈值	0.324	0.690	0.360	0.828	
PDA 匹配角度	-	-	0.072	0.192	角度小于阈值,光谱相似
PDA 匹配阈值	-	-	1.094	1.426	

### 3 讨论与小结

3.1 流动相的选择 盐酸溴己新为 2 个氨基取代的二溴苯甲胺结构,其中一个氨基的 2 个氢原子被甲基和环己基取代,由此可知其在 C18 固定相中的保留能力较强,应用高比例有机相才能将其洗脱。而对乙酰氨基酚极性大,在固定相中保留弱,洗脱

快。考虑到对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的极性差别和黄连解毒散的复杂成分,在等度条件下实现三者的分离较困难。因此,需采用梯度洗脱方法实现对黄连解毒散中非法添加对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的检测。根据文献<sup>[3-4]</sup>,兽药中非法添加对乙酰氨基酚检查方法常采用高比例磷酸盐溶液,尝试

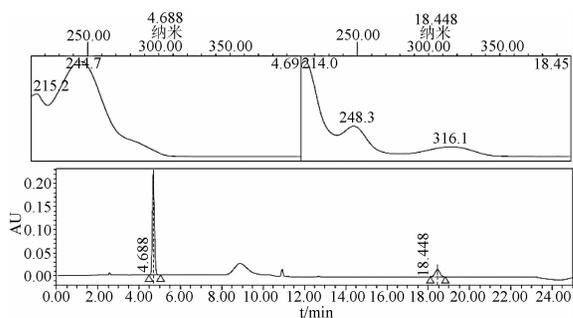


图5 黄连解毒散阳性样品光谱色谱图

调高有机相比例以尽快洗脱盐酸溴己新,但高比例的有机相易导致磷酸盐析出堵塞高效液相色谱仪和色谱柱。尝试以冰醋酸溶液作为水相<sup>[2]</sup>,加入三乙胺调节 pH 值。选择不同浓度的冰醋酸溶液,调至不同的 pH 值。经过优化,最终确定以 1% 冰醋酸溶液作为水相,调节 pH 值至 4.0,既能实现有效分离,也能保证峰型良好。

**3.2 提取条件的选择** 在非法添加高通量筛查工作中常以甲醇作为溶剂,虽然甲醇提取黄连解毒散有效成分的能力也较强,但考虑到对乙酰氨基酚和盐酸溴己新在甲醇中的溶解性良好,因此,仍选取甲醇作为提取溶剂。同时为了尽可能少提取黄连解毒散的有效成分,并保证对乙酰氨基酚和盐酸溴己新完全溶解,因此选择超声处理 15 min,作为提取条件。

**3.3 提取波长的选择** 在此测定条件下,对乙酰氨基酚和盐酸溴己新对照品在 210 ~ 400 nm 波长范围内的最大吸收波长分别为 244.7、248.3、316.1 nm。黄连解毒散中含有黄芩、黄连、黄柏、栀子等,主要有效成分黄芩苷、小檗碱、栀子苷、黄柏酮等均有紫外吸收,最大吸收波长分别为 278、345、238 和 212 nm<sup>[10-11]</sup>。为最大限度的排除黄连解毒散有效成分及测定溶剂等对紫外吸收的干扰,选择 248 nm 作为提取波长。

**3.4 峰纯度检查和光谱相似度检查** 峰纯度检查可以作为判断色谱峰是否为单一物质峰的重要指标,无论是在方法优化过程中,还是在供试品非法添加物检查中都能发挥重要作用。根据色谱工作站处理软件(Waters Empower3)对色谱峰的处理结果显示对乙酰氨基酚和盐酸溴己新的纯度角度均小于纯度阈值,说明未包裹共流出物,在对乙酰氨基酚和盐酸溴己新出峰处无其他干扰峰,均为单一物质峰;光谱相似度检查可以将供试品中相应添加物的光谱与对照品进行匹配,以排除保留时间一致

但紫外光谱不同的添加物的干扰。以对乙酰氨基酚和盐酸溴己新对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液,将供试品中非法添加物色谱峰的光谱与光谱库进行匹配,匹配角度均小于匹配阈值,说明供试溶液中相应色谱峰的光谱与对乙酰氨基酚和盐酸溴己新对照品的光谱非常相似。峰纯度检查配合光谱相似度检查,比单纯的供试品与对照品对比法更有说服力。本文采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品对比方法,对黄连解毒散中非法添加对乙酰氨基酚和盐酸溴己新进行确证,结果可靠。

试验所建立的方法中黄连解毒散各有效成分对检测无干扰,通过与对照品色谱峰的保留时间进行比对,以及峰纯度检查和光谱相似度检查来判定黄连解毒散中是否添加了对乙酰氨基酚和盐酸溴己新,方法简便、可靠、重复性好,可广泛应用于兽药非法添加检测工作,为兽药质量安全监管提供技术保障。

#### 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中国兽药典二〇一〇年版二部[S].
- [2] 陈睿,田兰,刘惠军. 高效液相色谱法测定盐酸溴己新及其片剂的含量和有关物质[J]. 药物分析杂志, 2007, 1: 132-134.
- [3] 董玲玲,杨星,范强,等. 氟喹诺酮类制剂中非法添加对乙酰氨基酚和安乃近的测定方法研究[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(8): 93-95.
- [4] 郝利华,于晓辉,董玲玲,等. HPLC-PDA 法同时测定黄芪多糖注射液非法添加的四种解热镇痛类药物[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(8): 28-31.
- [5] 朱小红,李涛,马鹏飞,等. 气相色谱-质谱检测方法快速筛查保健食品及中成药中 8 种非甾体抗炎药[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1847-1852.
- [6] 刘淑华,赵志刚. HPLC 法测定盐酸溴己新及其片剂的含量[J]. 中国药事, 2008, 22(1): 68-69.
- [7] Pai P N, Rao G K, Murthy M S, et al. Simultaneous determination of salbutamol sulphate and bromhexine hydrochloride in tablets by reverse phase liquid chromatography[J]. Indian J Pharm Sci, 2009, 71(1): 53-56.
- [8] 谢洪平,徐乃玉,李一林,等. 近红外光谱法快速测定复方氯丙那林溴己新胶囊的 3 种有效成分[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 10(26): 1194-1196.
- [9] 刘梅,崔香. 流动注射化学发光法测定盐酸溴己新[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2373-2375.
- [10] 马志英. 兽药黄连解毒散中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的 HPLC 法测定[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(10): 1080-1084.
- [11] 苏静华,张超,孙磊,等. HPLC 法同时测定黄连上清片的黄芩-黄连-黄柏药对中 9 个指标性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 1940-1945.