

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.10.07

UPLC – PDA 联合 UPLC – MS/MS 法确证一批标称杨树花口服液中非法添加物甘草酸

魏秀丽^{1,2,3}, 张传津^{1,2,3*}, 刘道中^{1,2,3}, 李有志^{1,2,3*}, 杨志昆^{1,2,3}, 陈志强^{1,2,3}

(1. 山东省饲料兽药质量检验中心; 2. 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室;

3. 动物源细菌耐药性监测与精准化用药山东省工程实验室, 济南 250022)

[收稿日期] 2023-04-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 09-0047-07 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 采用 UPLC – PDA 联合 UPLC – MS/MS 方法确证了一批标称杨树花口服液中非法添加物甘草酸。样品经提取稀释后, 采用 ACQUITY UPLC T₃ 色谱柱为分离柱, UPLC – PDA 初步筛查, 再用负离子扫描, 液相色谱串联质谱仪上机测定。通过对比色谱图保留时间和光谱图的峰形以及质谱图, 结果表明最终确证该批样品中非法添加物为甘草酸。UPLC – PDA 方法中甘草酸检测限为 20 μg/mL, 定量限为 50 μg/mL。本方法快速、灵敏、重现性好, 适用于本批标称杨树花口服液中甘草酸的检测。

[关键词] 杨树花口服液; 甘草酸; 非法添加

UPLC – PDA Combined UPLC – MS/MS Method to Confirm the Illegal Addition of Glycyrrhizic Acid in One Batch of Nominal Yangshuhua Koufuye

WEI Xiu – Li^{1,2,3}, ZHANG Chuan – Jin^{1,2,3*}, LIU Dao – zhong^{1,2,3}, LI You – Zhi^{1,2,3*},

YANG Zhi – Kun^{1,2,3}, CHEN Zhi – qiang^{1,2,3}

(1. Shandong Center for Quality Control of Feed and Veterinary Drugs, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and

Risk Assessment for Animal Products, China Shandong Engineering Laboratory for Drug Resistance Monitoring and Precise Drug Use of

Animal Origin Bacteria, Jinan 250022, China)

Abstract: The illegal addition of glycyrrhizic acid in a batch of nominal Yangshuhua Koufuye was confirmed using UPLC – PDA combined with UPLC – MS/MS method. After extraction and dilution, ACQUITY UPLC T₃ column was used as separation column, UPLC – PDA, and liquid chromatography tandem mass spectrometer. By comparing the retention time of the chromatogram and the peak shape of the spectrogram and the mass spectrometer, the results showed that the illegal addition was glycyrrhizic acid. For UPLC –

基金项目: 2019 年山东省农业应用重大创新专项“蛋鸡安全生产关键技术集成创新与示范”(SD2019XM004); 李有志泰山产业领军人才项目(TSCX202211023)

作者简介: 魏秀丽, 正高级兽医师, 从事兽药质量监督检验、标准制修订及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津, E – mail: 1153702137@qq.com; 李有志, E – mail: 1914343652@qq.com

PDA, the limit of detection was 20 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantification was 50 $\mu\text{g/mL}$. This method is fast, sensitive and reproducible, and is suitable for the detection of glycyrrhizic acid in this nominal Yangshuhua koufuye.

Key words: Yangshuhua koufuye. ; glycyrrhizic acid; illegal additive.

杨树花口服液是《中国兽药典》2020 年版第二部中收录的产品,主要由杨树花经提取制成的合剂,功能化湿止痢,主治痢疾和肠炎,广泛用于马牛羊猪大动物和兔家禽^[1-3];但 2020 年版《中国兽药典》杨树花口服液质量控制有薄层鉴别,没有含量测定项,容易被非法企业非法添加其他化合物。据贾纪萍和韩立等报道杨树花中含有丰富的黄酮类、蒽醌类等物质^[4-9],杨树花口服液中有多种有效成分:芹菜素、木犀草素、槲皮素和水杨苷、多糖、黄酮类、有机酸、强心甙、内酯及香豆素,蒽醌类化合物、甾醇、酚类或鞣质^[10-12]等,均未见其含有甘草酸的报道。魏秀丽和龚旭昊^[13-15]报道在杨树花口服液中检出过非法添加的黄芩苷、环丙沙星和乙酰甲喹等。由于标准本身不可能针对所有的添加物进行质量控制,所以需要检验人员熟悉杨树花口服液的图谱,并对处方外的成分进行辨识。本实验室在监督抽检兽药样品过程中,发现一批次标称杨树花口服液薄层鉴别不合格,而且检出了处方外成分。本研究使用 UPLC-PDA 联合 UPLC-MS/MS 法通过对比色谱图保留时间和光谱图的峰形结果及质谱图,来判定其非法添加物,以期兽药监管提供依据和借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 分析天平(感量 0.01 g、0.00001 g,瑞士 Mettler 公司);Waters Acquity™ 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);AB 4000 Q TRAP 液质(美国 AB 公司)。

1.2 药品及试剂 甘草酸对照品(含量 94.4%,批号:110731-202122,中国食品药品检定研究院);乙腈、甲醇、磷酸(色谱纯,德国默克公司);水为一级水自制。企业报批产品作为阴性对照样品;监督抽检产品:一批标称杨树花口服液。

2 方法与结果

2.1 超高效液相色谱-二极管阵列检测法色谱条件 色谱柱:waters T₃ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相 A:乙腈(0.1% 磷酸);流动相 B:水(0.1% 磷酸),梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:0.1-5 μL ;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$,进样室温度 10 $^{\circ}\text{C}$ 。二极管阵列检测器,3D 扫描范围:190-400 nm,检测波长为 251 nm。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution condition			
时间/ min	流动相 A 乙腈(0.1% 磷酸)/%	流动相 B 水(0.1% 磷酸)/%	时间 /min
0~3	8	92	
3~5	8→12	92→88	6
5~8	12→20	88→80	6
8~10	20	80	6
10~12	20→28	80→72	6
12~16	28	72	6
16~25	28→70	72→30	6
25~26	70	30	6
26~27	70→85	30→15	6
27~28	85	15	6
28~29	85→8	15→92	6
29~30	8	92	6

2.2 超高效液相串联质谱法色谱条件 采用 AB 4000 Q TRAP 液质,waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流速 0.3 mL/min,进样量 1-5 μL ;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A:乙腈;B:水;色谱洗脱条件如表 2 所示:

表 2 液质色谱洗脱梯度

Tab 2 Liquid chromatography elution gradient		
时间 (Min)	A:乙腈 %	B: 水 %
0~2	5	95
2~8	5→60	95→40
8~8.5	60→95	40→5
8.5~11	95	5
11~11.1	95→5	5→95
11.1~12	5	95

2.3 超高效液相串联质谱法质谱条件

串联质谱条件为:使用电喷雾离子源,负离子

扫描模式,离子喷雾电压(IS): -4500V;离子源温度:550 ℃;气帘气(CUR): 20 L/min;雾化气(GS1):55 L/min;辅助气(GS2):55 L/min。

离子对及质谱参数如表 3 所示:

表 3 甘草酸母离子子离子及质谱参数表

Tab 3 glycyrrhizic acid mother ion daughter ion and mass spectrometry parameter table				
化合物名称	定量离子对	定性离子对	DP(电压)	CE 碰撞能量
甘草酸	821.5 > 351.0	821.5 > 351.0	-209	-58
甘草酸		821.5 > 193.2	-140	-65

2.4 样品制备

2.4.1 阴性样品 报批样品作为阴性样品。

2.4.2 标准储备液及工作液的制备 精密称取甘草酸对照品约 20 mg,置于 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,置水浴中振摇使溶解,放置至室温,稀释至刻度,摇匀,即得约 400 μg/mL 的对照储备液,-20 ℃ 冰箱保存。

2.4.3 超高效液相色谱法工作液的制备 精密量取储备液适量,至 10 mL 容量瓶中,配置成 200 μg/mL 的工作液,4 ℃ 冰箱保存,用于超高效液相色谱的标准工作液使用。

2.4.4 超高效液相色谱-串联质谱法工作液的制备 取 200 μg/mL 的工作液用液相串联质谱方法中的初始比例流动相适量倍比稀释,得 5、10、25、40、50、100 ng/mL 的液相色谱串联质谱用的标准工作溶液。最终取浓度为 25 ng/mL 的甘草酸作为 UPLC-MS/MS 对照溶液。

2.4.5 阳性添加样品的制备 取杨树花口服液 1.0 mL,加入甘草酸对照品溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。重复配制 6 份,进样,计算甘草酸添加量和回收率平均值及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.5 提取净化方法

2.5.1 样品提取 精密量取空白样品、待测样品 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理 30 分钟使溶解,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取滤液作为 UPLC-PDA 供试品溶液。

2.5.2 样品稀释 取适量母液,用初始流动相水:

乙腈=(95:5) 稀释适宜倍数,用滤膜(0.22 μm)滤过,取滤液作为 UPLC-MS/MS 供试品溶液。(根据供试品 UPLC-PDA 测定的含量值,稀释适量倍数至约 25 ng/mL 的浓度,供超高效液相串联质谱上机测定,本批次杨树花样品多次稀释累计 20000 倍,上液质测定。)

2.6 方法线性考察及添加回收试验结果

2.6.1 UPLC-PDA 专属性 在选定的色谱条件下,测得甘草酸色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,在 2.1 项条件下,甘草酸对照品和杨树花口服液样品待测液,色谱保留时间为 20.1 min 左右,保留时间相差不超过 +0.1 min;分离度远大于 1.5,理论塔板数达 2.6-3.2 × 10⁵,见图 1-3,均满足检测要求,纯度角和纯度阈值均满足要求,见表 4。

本研究利用 PDA 检测器采集甘草酸的对照溶液光谱图,在波长 190-400 nm 范围内扫描,发现甘草酸在 251 nm 处有最大吸收,故选择 251 nm 作为两者的检测波长,光谱图见图 4-5。

而且待测样品色谱图中出现色谱峰与相应对照品主峰保留时间一致(差异小于等于 ±5%)。阳性添加样品的光谱图、色谱图与对照品和待测样品的图谱较一致,纯度角小于纯度阈值说明纯度高、无包裹共流出物,确证样品中添加了甘草酸。对照品和待测样品的纯度角纯度阈值图见图 6-7,阳性添加样品的色谱图见图 8,报批合格样品中不含甘草酸,色谱图见图 9。

表 4 不同样品的色谱参数表

Tab 4 Table of chromatographic parameters for different samples			
不同样品	各项参数	甘草酸	进样量
对照品	保留时间/min	20.10	1 μL
	峰面积	478272	
	纯度角	0.070	
	纯度阈值	0.438	
样品	保留时间/min	20.12	2 μL
	峰面积	294667	
	纯度角	0.636	
	纯度阈值	90.000	
阳性添加样品	保留时间/min	20.10	2 μL
	峰面积	789592	
	纯度角	0.850	
	纯度阈值	90.000	

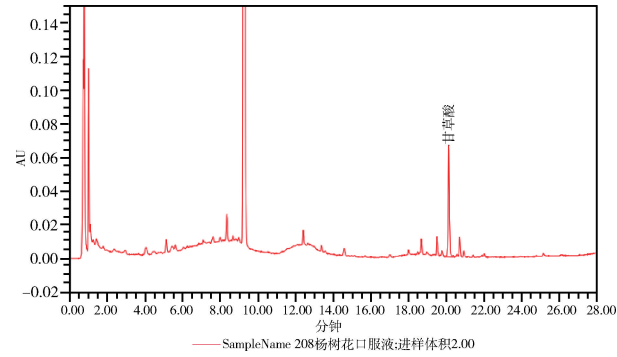


图 1 杨树花口服液样品 UPLC 色谱图

Fig 1 UPLC chromatogram of Yangshuhua koufuye sample

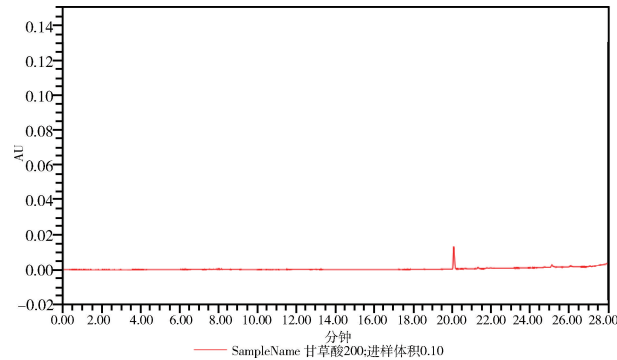


图 2 200 µg/mL 甘草酸对照溶液色谱图
(进样量 0.1 µL)

Fig 2 UPLC Chromatography of 200 µg/mL glycyrrhizic acid reference solution Injection volume :0.1 µL

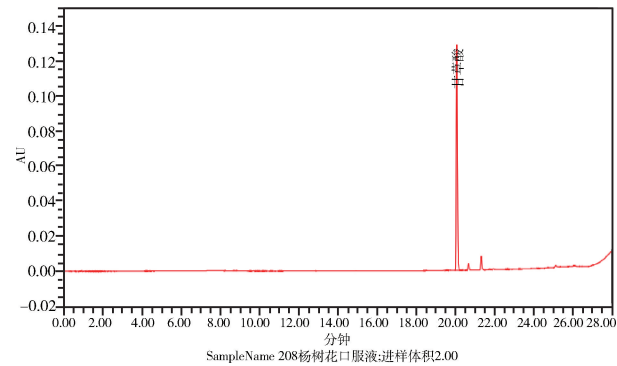


图 3 200 µg/mL 甘草酸对照品溶液 UPLC 色谱图
(进样量 1 µL)

Fig 3 UPLC chromatogram of 200 µg/mL glycyrrhizic acid reference solution Injection volume 1 µL

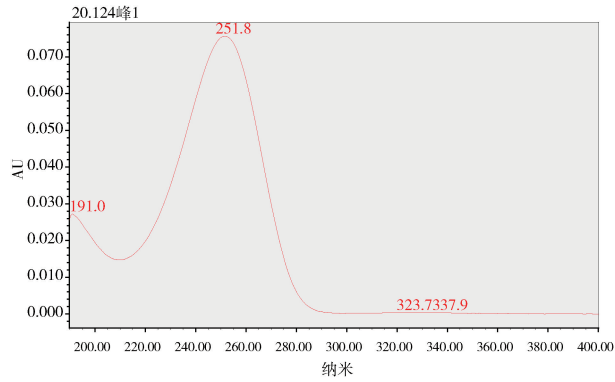


图 4 甘草酸对照品溶液光谱图

Fig 4 Spectrogram of glycyrrhizic acid reference solution

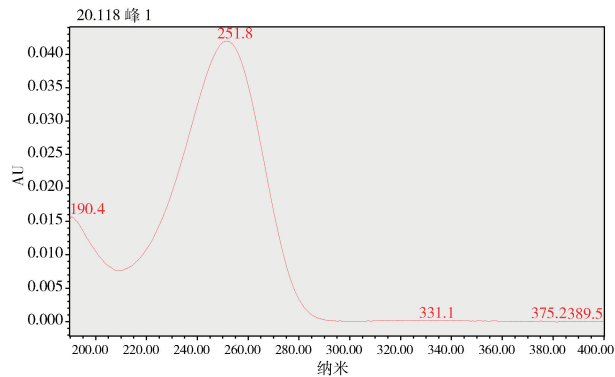


图 5 杨树花口服液中甘草酸光谱图

Fig 5 Spectrogram of glycyrrhizic acid inYangshuhua koufuye

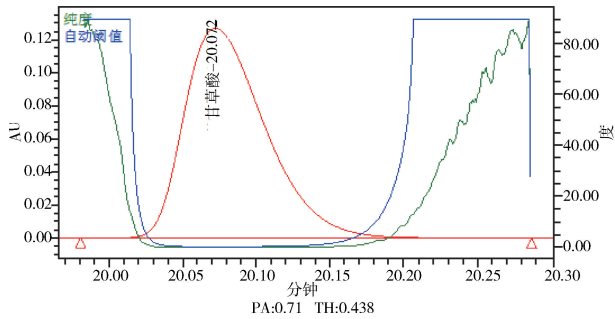


图 6 甘草酸对照品溶液纯度阈值图

Fig 6 Purity threshold of glycyrrhizic Acid reference solution

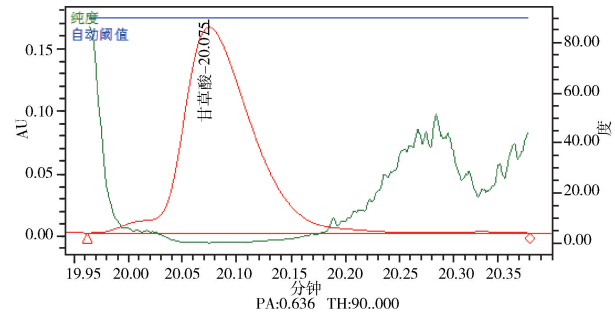


图 7 杨树花口服液样品中甘草酸纯度阈值图

Fig 7 Purity threshold of glycyrrhizic Acid in Yangshuhua koufuye

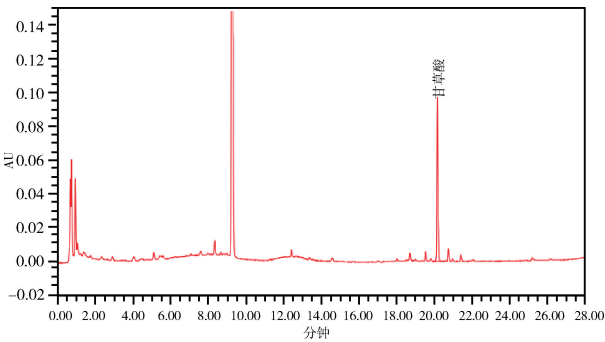


图 8 杨树花口服液添加样品甘草酸色谱图

Fig 8 UPLC Spectrogram of glycyrrhizic acid with positive addition sample of Yangshuhua koufuye

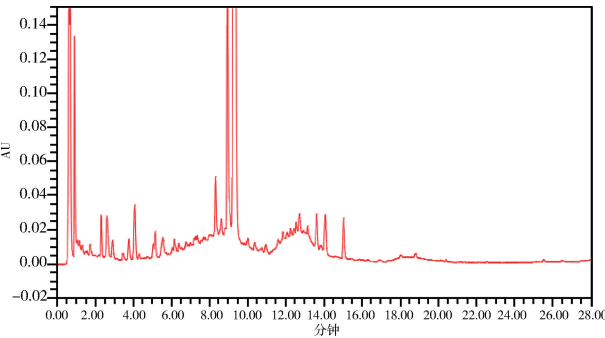


图 9 杨树花口服液报批合格样品色谱图

Fig 9 UPLC Spectrogram of Yangshuhua koufuye Samfor approval

2.6.2 UPLC – PDA 方法标准曲线的绘制 精密吸取甘草酸对照品工作溶液适量,以不同的体积:0.1、0.2、0.5、1、2、5 μL 进样,以进样量(μg)和峰面积响应值为 X 和 Y,来绘制校准曲线。

甘草酸在 20 – 1000 ng 范围内,线性良好,对照曲线为 $y = 2419.3537x - 2423.9239$, $R^2 = 1.0000$ 。对照曲线见图 10。

进样量体积 μL	进样量 ng	峰面积
0.1	20	48871
0.2	40	95427
0.5	100	238413
1	200	478272
2	400	964726
5	1000	2417810

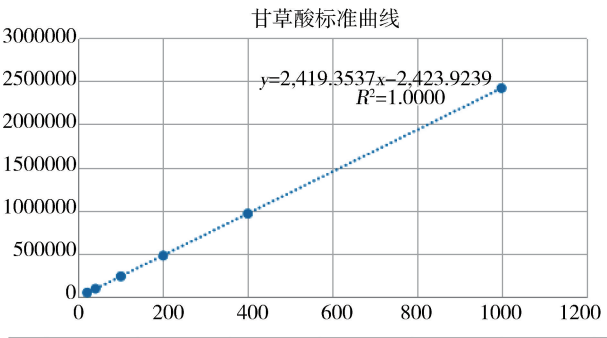


图 10 甘草酸对照曲线图

Fig 10 Standard curve diagram of glycyrrhizic acid

2.6.3 UPLC – PDA 方法的检出限和定量限 对甘草酸对照品溶液,倍比稀释成含甘草酸约 5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,进行 UPLC 分析,以溶液检测时的信噪比(S/N)分别大于等于 3,且光谱图不失真为前提,结果 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为药物的检出限。以溶液检测时的信噪比(S/N)分别大于等于 10,且光谱图不失真为前提,结果 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为药物的定量限。

2.6.4 UPLC – PDA 方法的准确度和精密度 待测样品杨树花口服液,通过六次样品平行处理的检测,平均含量为 0.528 mg/mL ;添加量为 0.964 mg/mL 时,实际回收率平均值 102.8%,变异系数 0.32%,完全满足检测需求。

表 8 甘草酸加样回收率试验结果

Tab 8 Result of glycyrrhizic acid Sample Addition Recovery Test						
加入对照品储备液			甘草酸 5mL			
样品平行处理 6 份	1 – 1	1 – 2	1 – 3	1 – 4	1 – 5	1 – 6
甘草酸原有量 A1 (mg)				0.528		
甘草酸加入对照品的量 B1 (mg/mL)				0.964		
甘草酸实测量 C1 (mg/mL)	1.515	1.523	1.519	1.516	1.518	1.522
甘草酸实测加入量 D1 (mg/mL)	0.987	0.995	0.991	0.988	0.990	0.994
回收率 (%)	102.39	103.22	102.80	102.49	102.70	103.11
平均回收率 (%)				102.8		
变异系数 (%)				0.32		

2.6.5 UPLC-MS/MS 专属性 在质谱中,对照品和待测杨树花口服液中的甘草酸在 5.87 min 左右出峰,保留时间和两个定性离子对都非常一致,未知样品主成分进一步确证为甘草酸。稀释至含 25 ng/mL 左右的甘草酸待测样品溶液进样量 1 μ L,其特征离

子质量色谱图见图 11。甘草酸 821.5 > 351.0 定量离子对保留时间 5.87 min,峰面积 1.148E4,峰高 3.024E3,信噪比 S/N 为 30.2;甘草酸 821.5 > 193.2 定性离子对保留时间 5.87 min,峰面积 3.795E3,峰高 1.143E3,信噪比 S/N 为 11.4。

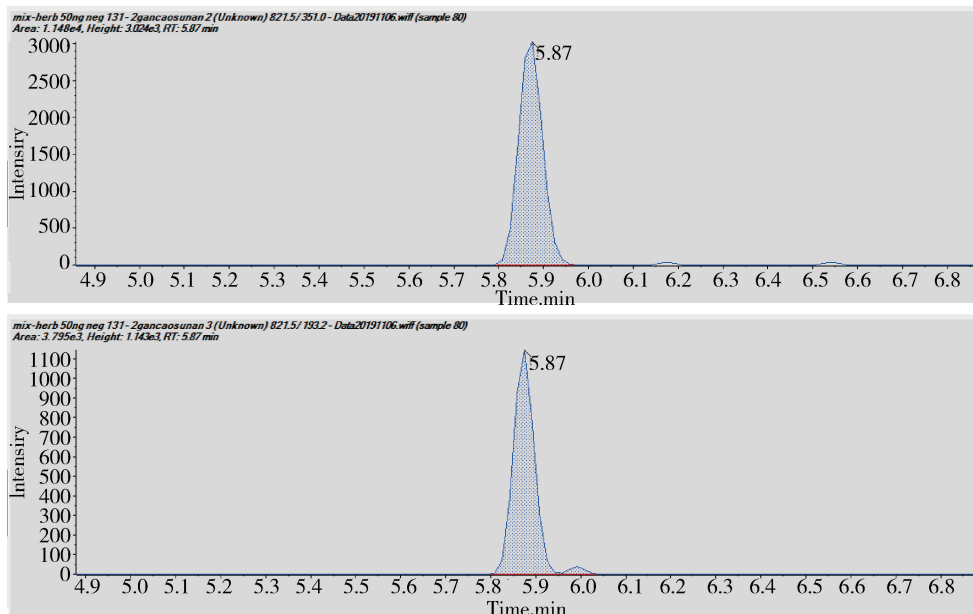


图 11 甘草酸特征离子质量色谱图

Fig 11 Characteristic ion mass chromatogram of glycyrrhizic acid

3 讨论与结论

3.1 如何初步判断发现处方外成分 近十年来,每年农业农村部下达的兽药监督抽检任务,都特别注重兽药中非法添加物的测定,并对兽药抽检的不合法生产企业进行重点监控、处罚甚至吊销生产许可。如何来判定其处方外添加了化合物,添加了何种化合物,是难点。所以我们查阅了大量的文献,杨树花药材中会含有丰富的黄酮类物质、多糖、氨基酸、植物甾醇等^[4-9],杨树花口服液中韩立等曾报道含有蒽醌类、槲皮素、水杨酸等^[10-12];曾经检出处方外不该含有哪些物质,如魏秀丽等报道^[13-15]在杨树花口服液中检出过非法添加的黄芩苷、环丙沙星和乙酰甲喹等。采用报批合格的杨树花口服液作为阴性样品,观察其色谱特征图谱和光谱图,对比待测的抽检样品杨树花口服液的光谱峰和光谱图,并查看异常峰及其光谱图,我们发现了含量高的一个色谱峰光谱图与甘草酸光谱图一致,

是特意处方外非法添加物。

3.2 如何初步确定处方外成分 UPLC-PDA 方法中,在相同实验条件下,供试品色谱图中如出现色谱峰与相应对照品主峰保留时间一致(差异小于等于 $\pm 5\%$)、在 190-400 nm 波长范围内,两者光谱图无明显差异,最大吸收处波长一致(差异小于等于 ± 2 nm),则初步判为检出被测试药物为甘草酸。供试品色谱图中如出现与相应对照品保留时间一致的色谱峰,但小于检出限,判定为未检出被测试药物。

3.3 如何最终确证处方外成分 在 UPLC-MS/MS 方法中,通过母离子和子离子定量离子对和定性离子对的比较,进一步确证处方外非法添加物为甘草酸;由于样品稀释了 20000 倍,依然具有卓越的检测能力,其实与 UPLC-PDA 方法相比,大大提升了检出限和定量限,显示了液质的准确性和优越性。

综上所述,使用 UPLC – PDA 联合 UPLC – MS/MS 法检测本批次标称为杨树花口服液中的甘草酸,精准快捷、经济环保,能有效控制杨树花口服液的质量。而且这是本实验室首次发现杨树花口服液中非法添加甘草酸,以中国知网的搜索结果来看,暂时未发现相同的报道。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典 2020 年版二部,中国农业出版社,杨树花口服液质量标准[S].
Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020. China Agricultural Press, Standard for quality of Yangshuhua koufuye [S].
- [2] 许二学. 杨树花及其提取物在动物生产中的应用[J]. 现代农业科技, 2013(07): 297 + 300.
Xu E X. Application of Poplar Flower and Its Extract in Animal Production [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013 (07): 297 + 300.
- [3] 耿健,向志宇,韩建鑫等. 杨树花抗菌作用及机制的研究进展[J]. 湖北畜牧兽医, 2017, 38(01): 13 – 15.
Geng J, Xiang Z Y, Han J X, *et al.* Progress on the antibacterial effect and mechanism of poplar flowers [J]. Hubei Animal Husbandry Medicine, 2017, 38(01): 13 – 15.
- [4] 侯莹莹,赵岩,唐国胜,等. RP – HPLC 同时测定杨树花和杨树叶中 3 个植物甾醇含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(12): 2150 – 2153. DOI:10.16155/j.0254 – 1793.2014.12.009.
Hou Y Y, Zhao Y, Tang G S, *et al.* RP – HPLC simultaneously determined the content of three phytosterols in poplar flowers and poplar leaves[J]. Journal of Drug Analysis, 2014, 34(12): 2150 – 2153.
- [5] 赵岩,唐国胜,侯莹莹,等. 柱前衍生 RP – HPLC 测定杨树花中氨基酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(07): 2192 – 2197.
Zhao Y, Tang G S, Hou Y Y, *et al.* Pre – column derived RP – HPLC determination of amino acid content in poplar flowers[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2014, 5(07): 2192 – 2197.
- [6] 侯勇. 杨树花化学成分及其生物活性研究[D]. 安徽医科大学, 2019.
Yong H. Study on the chemical composition and biological activities of poplar flowers[D]. Anhui Medical University, 2019.
- [7] 陈俭清,王碧莹,赵家洪等. 杨树花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(04): 510 – 513.
Chen J Q, Wang B Y, Zhao J H, *et al.* Populus flower HPLC fingerprint study[J]. Modern Applied Pharmacy in China, 2018, 35(04): 510 – 513.
- [8] 唐国胜. 杨树花化学成分分析、结构修饰及生物活性筛选[D]. 吉林农业大学, 2015.
Tang Guosheng. Analysis of chemical composition, structural modification and biological activity screening of poplar flowers [D]. Jilin Agricultural University, 2015.
- [9] 侯勇,厉博文,张广杰等. 杨树花化学成分的分离鉴定 II [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 77 – 81.
Hou Y, Li B W, Zhang G J, *et al.* Isolation and identification of the chemical components of poplar flowers[J]. Chinese Journal of Experimental Formulology, 2018, 24(23): 77 – 81.
- [10] 贾纪萍,陈晓兰,金礼琴等. 杨树花口服液的质量标准研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(01): 122 – 125.
Jia J P, Chen X L, Jin L, *et al.* Study on Quality Standards of poplar Oral Solution [J]. Chinese Veterinary Journal, 2019, 55(01): 122 – 125.
- [11] 贾纪萍,陈晓兰,金礼琴等. 杨树花口服液的有效成分研究进展[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(01): 40 – 41 + 44.
Jia J P, Chen X L, Jin L Q, *et al.* Progress in effective components of poplar flower oral fluid [J]. Anhui Agriculture Bulletin, 2019, 25(01): 40 – 41 + 44.
- [12] 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, 48(06): 25 – 27.
Han L, Ban F G, Zhou H X, *et al.* Determination of salicyside in poplar Oral Solution by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 48(06): 25 – 27.
- [13] 魏秀丽,丁新仁,李有志,等. 中兽药中非法添加物风险监测结果的探讨[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(3): 63 – 66.
Wei X L, Ding X R, Li Y Z, *et al.* Discussion on Risk Monitoring Results of Illicit Additives in Chinese [J]. Med Chin J Veter Med, 2019, (3): 63 – 66.
- [14] 龚旭昊,杨星,张璐等. 麻杏石甘口服液、杨树花口服液中非法添加黄芩苷 HPLC – PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(09): 22 – 27.
Gong X H, Yang X, Zhang L, *et al.* Establishment of HPLC – PDA Detection Method of Baicalin and poplar Oral Solution [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 54(09): 22 – 27.
- [15] 魏秀丽,张传津,李有志. UPLC – PDA 法测定杨树花口服液中非法添加物黄芩苷[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(01): 50 – 55.
Wei X L, Zhang C J, Li Y Z, *et al.* Determination of illegal addition of baicalin in poplar flower oral solution by UPLC – PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 52(01): 50 – 55.