doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2020.09.04

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

龚旭昊,杨星,张璐*,范强,汪霞

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

「收稿日期] 2020 - 04 - 19 「文献标识码]A 「文章编号]1002 - 1280 (2020) 09 - 0022 - 06 「中图分类号]S859.79

[摘 要] 为建立麻杏石廿口服液、杨树花口服液中非法添加黄芩苷的测定方法,采用十八烷基键合硅胶为填充剂,甲醇 - 水 - 磷酸(V: V: V = 45: 55: 0.2)为流动相,等度洗脱,流速为 1.0 mL/min,二极管阵列检测器,提取波长为 278 nm。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。在此液相色谱条件下,黄芩苷与其他物质峰分离良好。按外标法以峰面积计算,黄芩苷在麻杏石廿口服液和杨树花口服液中的平均回收率分别为 99.6% 和 100.2%, RSD 分别为 0.6% 和 0.8%。结果表明该检测方法简便、准确、可靠,可用于测定麻杏石廿口服液、杨树花口服液中非法添加的黄芩苷。

「关键词】 黄芩苷;麻杏石甘口服液;杨树花口服液;高效液相色谱 - 二极管阵列检测法

Determination of Baicalin in Maxingshigan Koufuye and Yangshuhua Koufuye by HPLC – PDA

GONG Xu - hao, YANG Xing, ZHANG Lu*, FAN Qiang, WANG Xia

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

Corresponding author: ZHANG Lu, E - mail:zhanglu8070@126.com

Abstract: A method for the determination of baicalin illegally added in Maxingshigan and Yangshuhua injection was developed by the high performance liquid chromatography with photo – diode array detector. It was tested with C18 column, using methanol – water – phosphoric acid (V: V: V = 45:55:0.2) as mobile phase for Isometric elution, flow rate was 1 mL per minute. The extract wavelength was 278 nm. Peak purity test and spectrum similar test were used to determine the illegally added drug except the method of comparison between sample and reference. Under the conditions of liquid chromatography, the separation of baicalin and other peaks is required. The peak area is calculated according to the external standard method, the mean recovery of baicalin in Maxingshigan Koufuye and Yangshuhua Koufuye was 99.6% and 100.2%, and RSD was 0.6% and 0.8%,

作者简介: 龚旭昊,从事兽药检验检测工作。

respectively. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of baicalin illegally added in Maxingshigan Koufuye and Yangshuhua Koufuye.

Key words: Baicalin; Maxingshigan Koufuye; Yangshuhua Koufuye; HPLC - PDA

麻杏石甘口服液由石膏、麻黄、苦杏仁、甘草四 味中药制备而成,具有清热、宣肺、平喘等功效,主 治肺热咳喘[1]。杨树花口服液由杨树花药材制备 而成,具有清热解毒、化湿止泻等功效,主治痢疾、 肠炎[2]。两种口服液在临床上均有较好疗效而被 广泛使用。黄芩苷是从黄芩药材中提取分离出的 一种黄酮类化合物,具有显著的生理活性,可泻实 火,除湿热,主治壮热烦渴、肺热咳喘、湿热泻痢等 症[3]。由此可见,黄芩苷和以上两种口服液的在功 效主治方面有较多相似之处。近来,在监督检验工 作中,通过筛查发现某企业的一批麻杏石甘口服液 样品中非法添加了处方外成分黄芩苷,但目前尚没 有现行的标准和方法可用于该项检测。因此,参考 《中国兽药典》2015年版二部黄芩药材质量标准及 相关文献,选择黄芩苷为测试药物,麻杏石甘口服 液和杨树花口服液为目标制剂,建立了麻杏石甘口 服液和杨树花口服液中非法添加黄芩苷的检查 方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Waters e2695,2998 PDA 检测器, Empower3 色谱工作站软件),分析天平(Mettler XS205,十万分之一),昆山KQ-300型超声波清洗器, Millipore 超纯水仪。甲

醇(德国 Merck 公司,色谱纯),磷酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),超纯水(Millipore 超纯水仪制备)。

1.2 试药 黄芩苷对照品(批号: Z0271705, 中国 兽医药品监察所, 96.8%);麻杏石甘口服液和杨树 花口服液供试品空白: 均为经检测合格的相关监督 抽检样品;麻杏石甘口服液供试品: 某企业生产的 经检测含有黄芩苷非法添加的样品;杨树花口服液 供试品:上述杨树花口服液供试品空白中添加黄芩 苷测试药物(阳性模拟)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Shiseido MG II C18(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相: 甲醇 – 水 – 磷酸(V:V:V=45:55:0.2),柱温: 30 $^{\circ}$ C,流速: 1.0 mL/min,进样量: 10 μ L。二极管阵列检测器,采集波长范围为 210 ~ 400 nm,分辨率为 1.2 nm,记录 278 nm 波长处的色谱图。供试品溶液中黄芩苷色谱峰和相邻色谱峰的分离度应符合要求。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 称取黄芩苷对照品 10 mg,置 100 mL量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇 匀,得浓度为 100 μg/mL的黄芩苷对照品溶液。按 2.1 方法测定,结果见图 1。

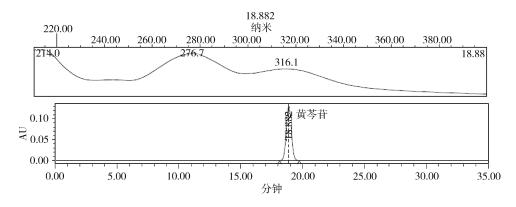


图 1 黄芩苷对照品溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of baicalin control solution

2.2.2 室白溶液 取麻杏石甘口服液和杨树花口服液供试品空白各 1 mL,分别置 100 mL量瓶中,加50% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得两种供试品

空白溶液。按 2.1 方法测定,结果见图 2~图 3,表明两种供试品基质对待测物黄芩苷没有干扰。

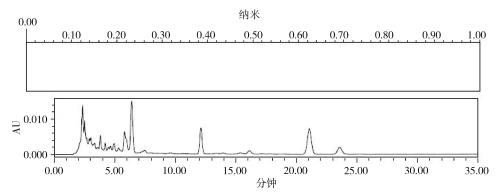


图 2 麻杏石甘口服液空白溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of blank solution of Maxingshigan Koufuye

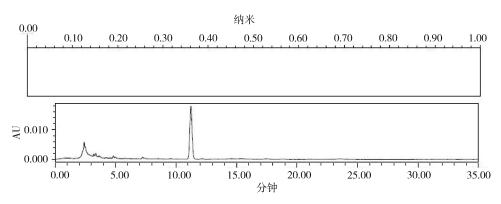


图 3 杨树花口服液空白溶液色谱图

Fig 3 Chromatogram of blank solution of Yangshuhua Koufuye

2.2.3 供试品溶液 取麻杏石甘口服液供试品 1 mL,照 2.2.2 项下操作制备成麻杏石甘口服液供试品溶液;取杨树花口服液供试品 1 mL,置 100 mL 量

瓶中,再称取 10 mg 黄芩苷对照品置同一量瓶中,加 50% 甲醇溶液使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得杨树花口服液供试品溶液。结果见图 4~图 5。

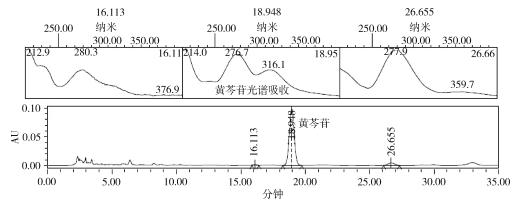


图 4 麻杏石甘口服液供试液色谱图

Fig 4 Chromatogram of test solution of Maxingshigan Koufuye

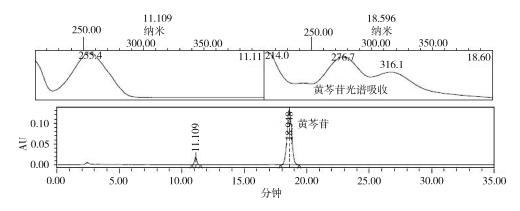


图 5 杨树花口服液供试液(阳性模拟)色谱图

Fig 5 Chromatogram of test solution (positive simulation) of Yangshuhua Koufuye

- 2.2.4 建立光谱数据库的溶液 以黄芩苷对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液。
- 2.3 峰纯度与光谱相似度检查 取两种供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 色谱条件测定。对两种供试品溶液色谱图中黄芩苷色谱峰进行峰纯度检查,结果见表 1,显示黄芩苷峰的纯度角度均小于纯度阈值,说明未包裹共流出物。表明在此色谱条件下,黄芩苷的出峰处均无其他干扰峰,为单一物质峰,方法可行。

对两种供试品溶液中黄芩苷峰的色谱图及光谱图与对照品溶液进行匹配,结果见表 1~表 2与图 1、图 4~图 5。数据显示,麻杏石甘口服液及杨树花口服液供试品溶液中保留时间 18.948 min 和18.596 min 的色谱峰与黄芩苷对照品的保留时间均一致,且均与对照品的光谱图及最大吸收波长一致,匹配角度均小于匹配阈值。表明两种供试品溶液中相应色谱峰的色谱、光谱与黄芩苷对照品的均一致,为同一物质。

表 1 峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 1 Test results of peak purity and spectral similarity

				*	•		
黄芩苷色谱峰	纯度角度	纯度阈值	结果	匹配角度	匹配阈值	结果	
麻杏石甘口服液供试品	0.029	0.220	单一物质峰	0.030	1.019	光谱相似	
杨树花口服液供试品	0.244	0.472	单一物质峰	0.220	1.171	光谱相似	

表 2 供试品与对照品色谱、光谱结果表

Tab 2 Chromatographic and spectral results of test and control samples

结果	黄芩苷对照品	麻杏石甘口服液	杨树花口服液	
保留时间/min	18.882	18.948	18.596	
最大吸收波长/nm	214.0,276.7,316.1	214.0,276.7,316.1	214.0,276.7,316.1	

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 通过两种供试品空白试验排除了 样品基质对待测物黄芩苷的干扰。同时,峰纯度检 查结果显示在此色谱条件下,两种供试品色谱图中 黄芩苷峰均为单一物质峰。 2.4.2 检测限 检测限溶液的配制:分别取麻杏石甘口服液和杨树花口服液供试品空白各 1 mL,各置 100 mL量瓶中,分别精密加入黄芩苷对照品溶液适量(0.5、1、1.5 mL),用 50% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得。经光谱相似度检查结果显示,

测试药物光谱指数图发生轻微变形时仍能实现与光谱库中对照品光谱的匹配,但考虑到兽药非法添加量一般都较大,因此,本检验方法以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限。两种制剂中黄芩苷检测限均为50 mg/L。

2.4.3 准确度 以两种供试品空白中添加被测物对照品(检测限浓度的 10 倍)做回收率试验来考察方法的准确度,每种供试品重复制备 6 份,以 2.2.1中的对照品溶液作为对照进样,以外标法按峰面积计算回收率。结果显示麻杏石甘口服液中黄芩苷的回收率为 99.6%, RSD 为 0.6%; 杨树花口服液

中黄芩苷回收率为 100.2%, RSD 为 0.8%。

2.4.4 耐用性 从柱温、色谱柱两个方面考察方法的耐用性。调节柱温分别为 25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃,结果显示,两种制剂的供试液中黄芩苷保留时间随柱温升高,保留时间有所提前,但测试药物黄芩苷在三种柱温下和相邻色谱峰分离度均大于1.5,且峰面积、拖尾因子、理论塔板数基本没有变化。选择三款不同品牌色谱柱,对两种制剂的供试溶液进样测定,考察不同色谱柱对测定的影响。结果显示,三种品牌色谱柱均可用于该项检查,方法耐用性较好,见表 3。

表 3 三种色谱柱耐用性考察结果表

Tab 3 Durability test results of three chromatographic columns

——————————————— 色谱柱型号	麻杏石甘口服液			杨树花口服液		
(4.6 mm ×250 mm,5 μm)	理论塔板数	分离度	拖尾因子	理论塔板数	分离度	拖尾因子
Waters SunFire	>11000	>2.4	<1.1	>11000	>13.5	<1.1
Shiseido MG II	>11000	>4.7	< 1.1	>11000	>14.0	<1.1
Dikma	>11000	>3.8	<1.1	>11000	>13.3	< 1.1

3 讨论与结论

- 3.1 提取溶剂选择 根据药典及文献相关方法, 分别考察了水、50% 甲醇、甲醇对测试药物黄芩苷 的提取效率。即精密量取麻杏石甘口服液供试品 1 mL置 100 mL 量瓶中,分别加入水、50% 甲醇、甲 醇稀释至刻度,摇匀,进样测定。结果发现,测试药 物黄芩苷在 50% 甲醇中的提取效果优于其他溶剂, 最终选择 50% 甲醇为供试品提取溶剂。
- 3.2 提取方式选择 为了解提取方式对口服液中测试药物提取效率的影响,精密量取麻杏石甘口服液供试品 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,分别采取不超声直接稀释至刻度并振摇,超声10 min、超声 30 min 后放置至室温并稀释至刻度,摇匀,进样测定。结果上述三种提取方式所得测试药物黄芩苷峰面积 RSD 为 0.42%,小于 2%。该结果表明,振摇、超声 10 min、30 min 的提取效率基本一致,为方便实验操作,选择振摇作为本方法测试药物的提取方式。
- 3.3 非法添加物筛查合理性分析 在以往的中兽药非法添加检查中,发现的添加物多为化学药物成分,而现在市场又出现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^[4]。该行为不但给动物安全带来很多潜在危害,而且也给检验检测工作带来了更大挑战。本文研究的目标制剂麻杏石甘口服液和杨树花口服液在功效主治方面和黄芩苷有诸多相似之处,但这两种口服液中均不含有黄芩苷^[4-7],而有资料显示^[8-9],黄芩中成分对两种制剂疗效的发挥有一定的协同作用,且市场中已发现杨树花口服液中非法添加黄芩苷的案例。因此上述两种目标制剂中非法添加黄芩苷符合逻辑规律。
- 3.4 检查方法的扩充使用 除麻杏石甘口服液和 杨树花口服液外,其他兽药制剂亦可能非法添加黄 芩苷。当采用该检查方法用于其他兽药制剂中非 法添加黄芩苷检查时,要注意目标分析物以外的成

分是否会对测定产生干扰和添加量是否达到药物 发挥药效的可能浓度,需进行空白试验、系统适用 性试验及检测限的测定,进而满足检验检测的 要求。

试验所建立的方法中,麻杏石甘口服液和杨树花口服液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,以及峰纯度及光谱相似度检查来判定两种制剂中是否添加了黄芩苷,方法操作简单、专属性强、灵敏度高、易于推广,能为兽药质量安全监管提供一定的技术保障。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准(2017 年版中药卷)[S]. China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Quality standard of veterinary medicine (2017 version of traditional Chinese medicine volume)[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015 年版二部)
 [S].
 China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2015 version 2 [S].
- [3] 黄兆胜. 中药学[M]. 人民卫生出版社,2002.

 Huang Z S. Traditional Chinese pharmacology[M]. People's medical publishing house,2002.
- [4] 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(1):50-55.

- Wei X L, Zhang C J, Li Y Z. Determination of Baicalin in Yang-shuhua Koufuye by UPLC PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018,52(1):50 55.
- [5] 章安源,李有志,张传津,等. HPLC 法同时测定麻杏石甘口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱及苦杏仁苷含量[J]. 中国兽药杂志,2018,52(10):72 -77.

 Zhang A Y, Li Y Z, Zhang C J, et al. Determination of Ephed-
 - Zhang A Y, Li Y Z, Zhang C J, et al. Determination of Ephedrine Hydrochloride and A-mygdalin in Maxingshigan Oral Liquid by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018,52(10);72 77.
- [6] 邓中甲. 方剂学[M]. 中国中医药出版社,2017.

 Deng Z J. Formulas of Chinese medicine[M]. China press of traditional Chinese medicine,2017.
- [7] 石任兵. 中药化学[M]. 人民卫生出版社,2016.

 Shi R B. Chemistry of traditional chinese medicine[M]. People's medical publishing house,2016.
- [8] 赵思佳. 葛根芩连汤、麻杏石甘汤量效的循证医学评价[D]. 北京中医药大学、2013.
 - Zhao S J. Evidence based medicine evaluation of dosage effect of Gegen Qinlian decoction and Maxing Shigan decoction [D]. Beijing University of traditional Chinese Medicine, 2013.
- [9] 房春林. 杨树花及其复方制剂药学与临床应用研究[D]. 四川农业大学,2010.
 - Fang C L. Study and clinical application of poplar flower and its compound pharmacy [D]. Sichuan Agricultural Uniersity, 2010.

(编辑:陈希)