

兽用双黄连注射液中非法添加解热镇痛类药物的 高效液相色谱检测法

周芷锦 罗成江 陈晓林 郭炫君 林仙军

浙江省兽药饲料监察所,杭州 311101

摘要 建立了高效液相色谱法测定兽用双黄连注射液中非法添加 4 种解热镇痛类药物的方法。采用 Waters Symmetry C18(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)色谱柱分离 4 种解热镇痛类药物,以磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)-甲醇(65:35)为流动相,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL,采用二极管阵列检测器进行检测,采集的波长范围 190~400 nm,分辨率为 1.2 nm,记录 260 nm 处的色谱图。结果显示,4 种解热镇痛类药物的浓度在 1~100 μg/mL 范围内的线性良好,相关系数 r 均为 0.999 9,回收率在 97.8%~100.8%,相对标准偏差在 0.9%~4.0%,检测限 1.0 mg/mL。本方法快速、准确,可用于兽用双黄连注射液中非法添加解热镇痛类药物的定性和定量检测。

关键词 高效液相色谱法;兽用双黄连注射液;解热镇痛类药物

兽用双黄连注射液在兽医临床上应用广泛,主要用于预防和治疗畜禽上呼吸道感染等疾病^[1]。由于此类症状通常伴有发热、红肿、疼痛等症候群出现,因而,一些不良兽药生产企业,为提高所谓的“疗效”,进而提高其产品市场占有率,往双黄连注射液中非法添加解热镇痛类药物^[2]。由于解热镇痛类药物的不当使用,使可食性动物组织中的解热镇痛类药物有残留的风险。经大量调研发现,双黄连注射液中可能添加的解热镇痛类药物有安乃近、对乙酰氨基酚、安替比林和氨基比林。

然而,关于中兽药双黄连注射液中添加该类药物的检测方法较少。二极管阵列检测技术具有灵敏度高、准确性好等优点^[3]。因而,近年来常用于微量^[4]、痕量兽药或非法添加物的筛查与确证^[5-6]。为了有力打击兽用双黄连注射液中非法添加解热镇痛类药物的现象,开展了高效液相色谱-二极管阵列检测器的筛查与确证方法研究^[7]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1)仪器。Waters 2695 高效液相色谱仪(配 2996

PDA 二极管阵列检测器)(美国 Waters 公司);AG-285 电子天平(Mettler 公司);DELTA320 pH 计(Mettler 公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2)对照品。安乃近(批号 100002-200605)、对乙酰氨基酚(批号 100018-200409)、安替比林(100506-200301)和氨基比林(100503-200302)对照品均来自中国食品药品检定研究院,含量均大于 99.0%。

3)试剂。三乙胺、磷酸二氢钠、氢氧化钠均为分析纯;甲醇,色谱纯,Merck KGaA 公司;水为超纯水。

4)阴性双黄连注射液。为自制产品,取金银花、黄芩、连翘按照工艺的要求制作,经检测不含安乃近、对乙酰氨基酚、安替比林和氨基比林。

5)阳性添加样品。根据临床使用情况,在阴性双黄连注射液中分别添加安乃近、对乙酰氨基酚、氨基比林和安替比林对照品适量,添加的浓度为 2.0 mg/mL、10.0 mg/mL 和 50.0 mg/mL。

1.2 方 法

1)对照品储备液(0.5 mg/mL)的制备。取安乃

收稿日期:2017-02-07

基金项目:浙江省“三农六方”科技协作项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1)

周芷锦,女,1985 年生,兽医师。

近、对乙酰氨基酚、安替比林和氨基比林对照品各约 25 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 流动相定容, 制成对照品储备液。

2) 供试品溶液的制备。取上述样品 1.0 mL 于 50 mL 量瓶中, 定容, 摇匀; 量取 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 作为供试品溶液。

3) 光谱数据库溶液 (20 μ g/mL) 的制备。取对照品储备液适量, 加流动相定容制得。

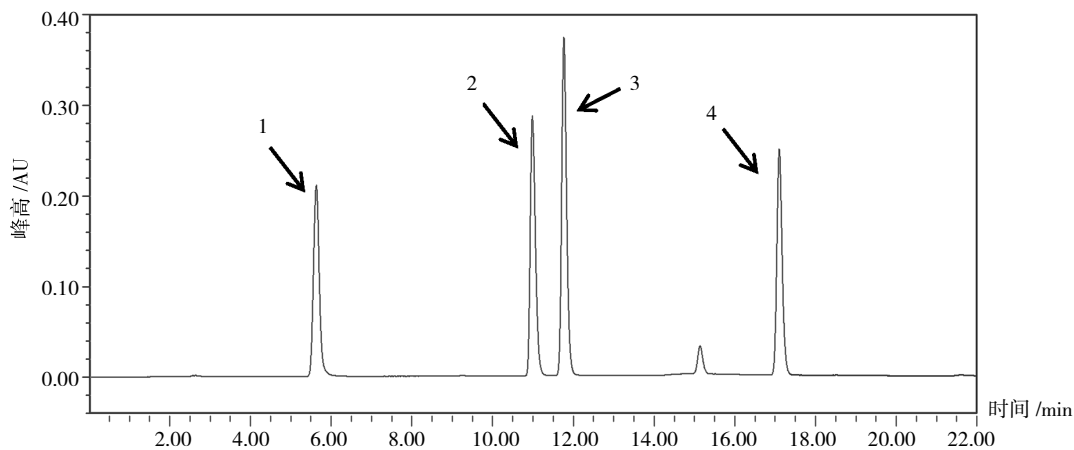
2 结果

1) 高效液相色谱条件。采用的色谱柱为 Waters Symmetry C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μ m); 流动相为磷酸盐缓冲液 (具体的配制为磷酸二氢钠 6.0 g, 加水 100 mL 使溶解, 加三乙胺 1 mL, 用氢氧化

钠试液调节 pH 值至 7.0) - 甲醇 (65 : 35); 采用二极管阵列检测器 (PDA 检测器) 进行检测, 采集的波长范围 190 ~ 400 nm, 分辨率为 1.2 nm, 记录 260 nm 处的色谱图; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。分别精密量取对照品溶液 2 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 加流动相定容, 进样, 记录色谱图 (见图 1), 光谱图 (见图 2 ~ 5)。

图 1 表明 4 种解热镇痛类药物峰形较好, 分离度满足要求; 图 2- 图 5 分别是相应药物的二极管阵列扫描光谱图, 如果供试品溶液与对照品溶液色谱峰的保留时间一致, 光谱图亦一致, 则可以判定供试品溶液中检出的未知物是相应的解热镇痛类药物。

2) 线性关系。取对照品储备液, 用流动相定容,



1: 对乙酰氨基酚; 2: 安乃近; 3: 安替比林; 4: 氨基比林

图 1 混合对照品溶液 (20 μ g/mL) 色谱

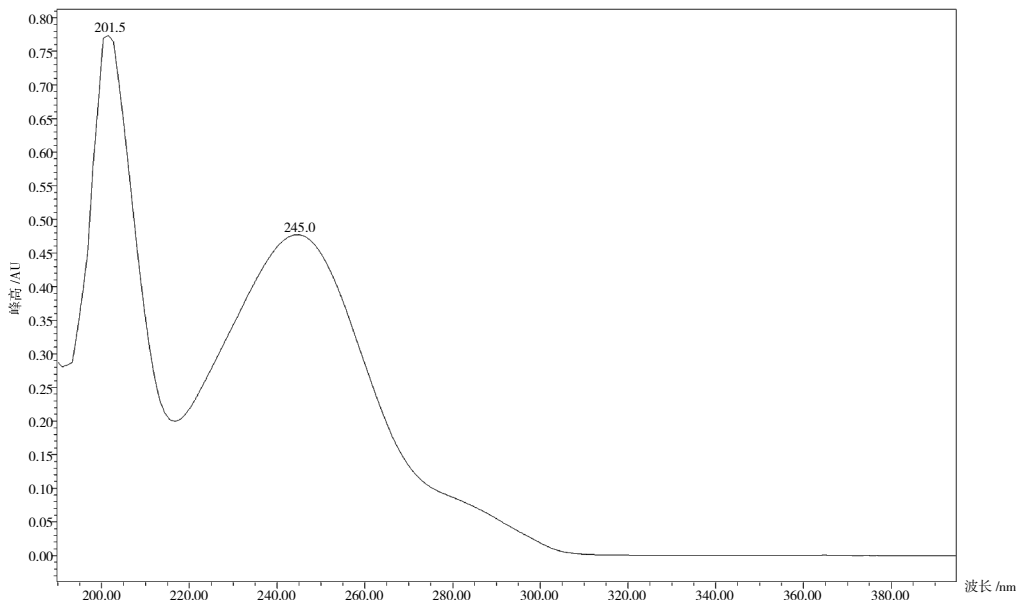


图 2 对乙酰氨基酚对照品溶液光谱

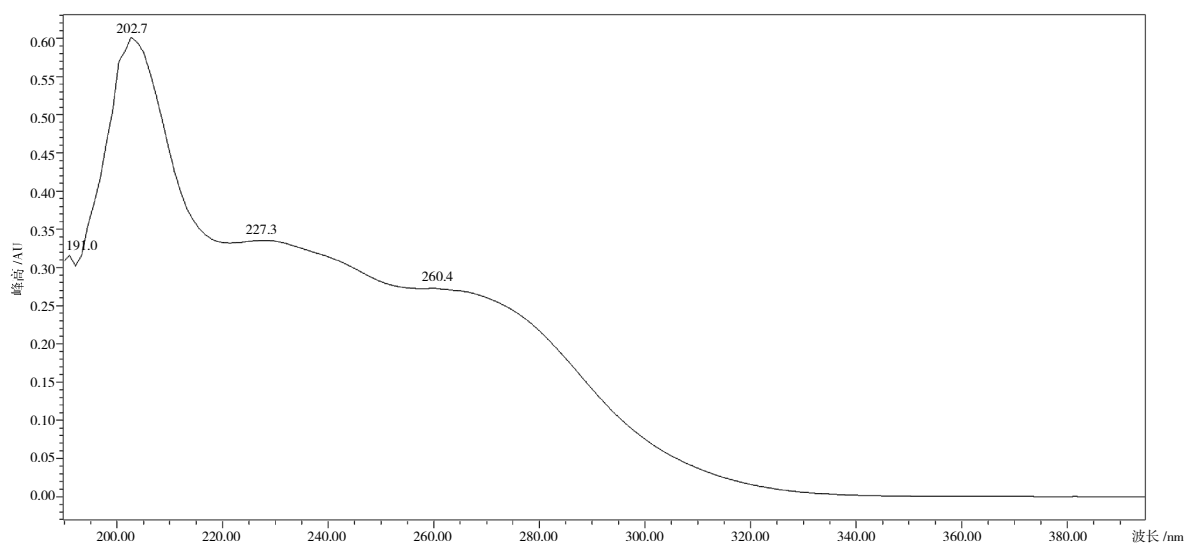


图 3 安乃近对照品溶液光谱

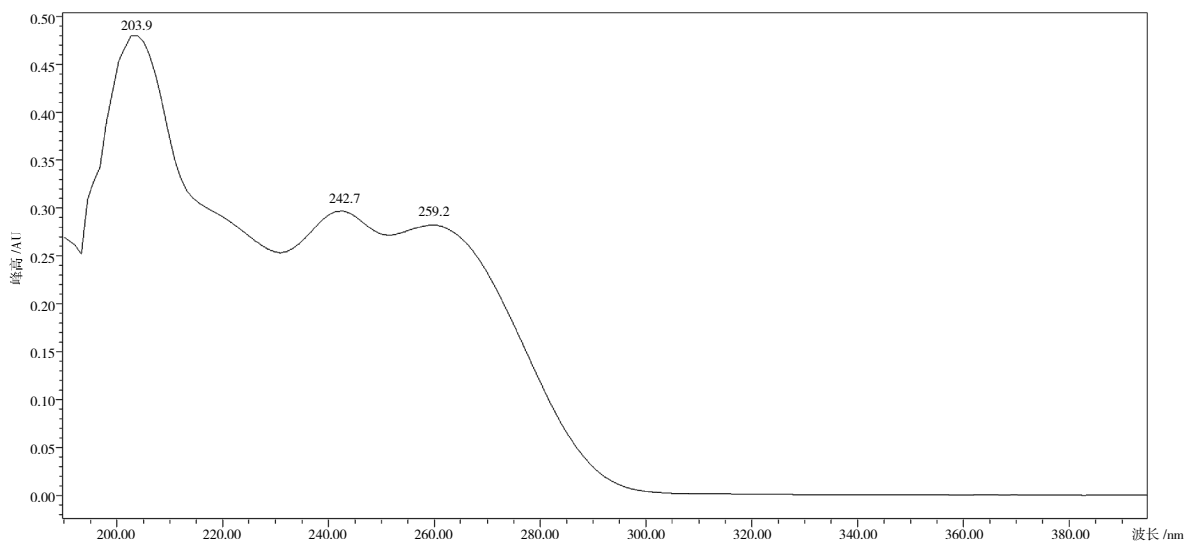


图 4 安替比林对照品溶液光谱

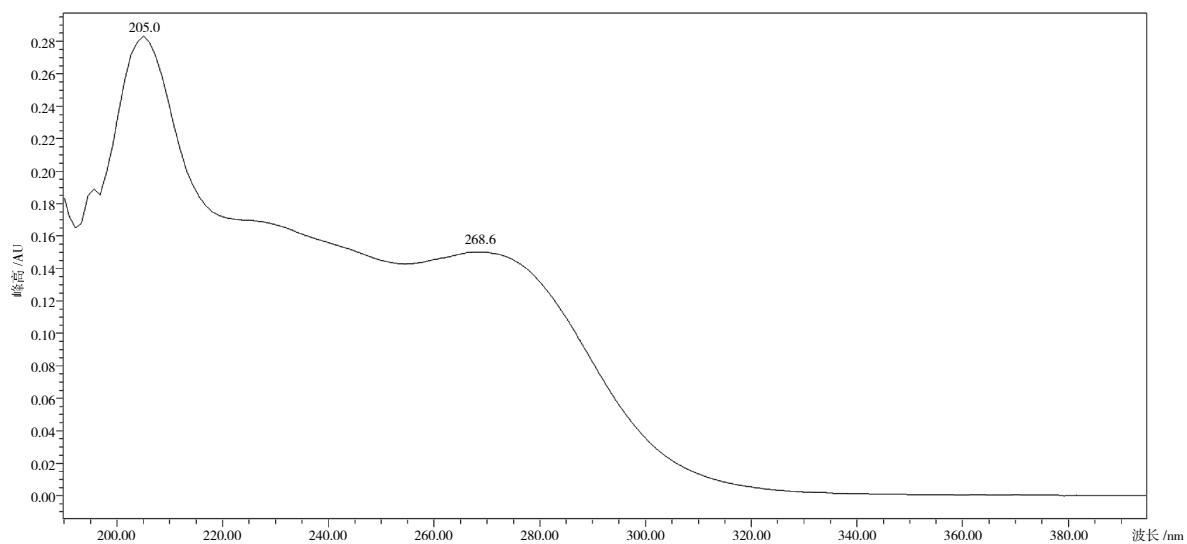


图 5 氨基比林对照品光谱

表 1 线性方程及相关系数

药物名称	线性方程	相关系数 <i>r</i>
对乙酰氨基酚	$Y=1.4 \times 10^5 X + 8\ 145$	0.999 9
安乃近	$Y=1.2 \times 10^5 X + 10\ 785$	0.999 9
安替比林	$Y=1.0 \times 10^5 X + 16\ 000$	0.999 9
氨基比林	$Y=1.1 \times 10^5 X + 18\ 603$	0.999 9

表 2 回收率试验结果 (*n*=5)

药物名称	添加浓度/(mg/mL)	平均回收率/%	RSD/%
对乙酰氨基酚	2.0	98.1	3.5
	10.0	99.0	3.2
	50.0	98.8	3.6
安乃近	2.0	97.9	2.5
	10.0	98.6	1.4
	50.0	99.6	1.9
安替比林	2.0	99.5	2.8
	10.0	98.4	3.9
	50.0	97.9	4.0
氨基比林	2.0	97.8	1.2
	10.0	100.1	0.9
	50.0	100.8	3.2

制成 1、5、10、25、100 μg/mL 的系列对照品溶液,进样,以峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标,进行线性回归,结果见表 1,在该浓度范围内,4 种药物线性相关系数均大于 0.999,表明线性关系良好。

3)回收率试验。按上述方法制备阳性添加样品,依照建立的方法进行检测,回收率结果见表 2。3 个添加浓度的平均回收率均在 97.8%~100.8%,相对标准偏差(RSD)在 0.9%~4.0%,表明方法稳定性良好。

4)方法耐用性。设置柱温为 25、30、35 ℃,4 种药物均能有效分离,柱温越高保留时间越前。使用不同品牌、不同型号的色谱柱,Waters Symmetry C18(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)柱保留性能较好,保留时间适中;Waters Atlantis C18(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)柱和 Agilent ZORBAX Extend-C18(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)也能很好地分离 4 种药物。考察不同流速对分离的影响,设定流速 0.8、1.0、1.2 mL/min 进行测定,结果表明,不同流速均分离良好。说明本方法的耐用性较好。

5)实际样品检测。以建立的方法对 16 批抽检

的兽用双黄连注射液进行检测,检出 1 批(产地河北,批号为 15080201)含有安替比林 45.0 mg/mL。

3 讨论与分析

1)提取溶剂和方式的选择。在加标回收率试验中,采用超声和涡旋 2 种方式提取,结果发现,超声的提取效率更高,简单可行。提取溶剂分别选择水、0.2%磷酸溶液、乙腈、乙醇、甲醇等,结果水和 0.2%磷酸溶液提取,安乃近的回收率较低;乙醇和乙腈提取出更多的杂质,容易干扰检测;甲醇作为提取溶剂合适,提取效率较高,基本没有杂质干扰。

2)检测波长的选择。本试验涉及的 4 种解热镇痛类药物在 260 nm 波长处均有最大或较大吸收。因此,选择提取 260 nm 波长处的色谱图。

参 考 文 献

- [1] 袁宏伟.双黄连注射液的药理作用及临床新用途[J].现代医药卫生,2007,23(16):2505-2506.
- [2] 肖学勇,曹莹,徐斐,等.兽用抗生素中非法添加 5 种解热镇痛类药物的高效液相色谱检测方法研究 [J]. 畜牧与饲料科学,2014(11):8-12,16.
- [3] 吴小红,李焕德,朱荣华,等.HPLC-MS/MS 法鉴别中药制剂中非法添加的多种解热镇痛类化学药物 [J]. 中南药学,2010(10):724-729.
- [4] SILVIA J,LAJOS V, GINES F, et al. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography mass spectrometry in plant organs of *Datura* species [J].Journal of Chromatography A,2012,12(32):295-301.
- [5] LIPKA E,CHARTON J,VACCHER C.Development of HPLC/fluorescence detection method for chiral resolution of dansylated benzimidazoles derivatives [J].Biomedical Chromatography,2014,28(1):4-9.
- [6] YANAWATH S,RODJANA B.Alternative green preconcentration approach based on ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and HPLC for determination of benzimidazole anthelmintics in milk formulae tittaya boontongto [J].Chromatographia,2014,77(21/22):1557-1562.
- [7] JIANG W Z,WANG Z H,ROSS C B, et al. Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay [J].Anal Chem,2013,85(4):1995-1999.