

高效液相色谱法定性检测 5种中兽药散剂中违规添加的氯霉素

杨秀玉, 万仁玲, 马玉叶, 刘自扬

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

[收稿日期] 2006-08-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2006)12-0011-04 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立了定性检测止痢散、白头翁散、苍术香连散、银翘散和清瘟败毒散五种中兽药散剂中违规添加的氯霉素的高效液相色谱法。根据《中国兽药典》2000年版二部规定的处方配制五种中药散剂, 根据氯霉素禁用以前的临床治疗量和中药散剂的临床治疗量, 在配制的中药散剂中定量加入氯霉素作为样品; 用丙酮提取, 高效液相色谱——二极管阵列检测器进行定性测定。试验表明, 该方法快速、简便, 可用于上述五种中兽药散剂中违规添加氯霉素的定性检测。

[关键词] 高效液相色谱法; 氯霉素; 中兽药散剂; 定性

The Qualitative Determination of Chloramphenicol Violated in the Five Veterinary Traditional Chinese Herb Medicine Powders by HPLC

YANG Xiuyu, WAN Renling, MA Yuyue, LIU Ziyang

(China Institute of Veterinary Drug Control Beijing 100081)

Abstract A HPLC method for the qualitative determination of chloramphenicol violated in the five veterinary traditional Chinese herb medicine powders which were zhili, baitouweng, cangzhuxianglian, yinqiao, qingwenbaidu was established. According to the prescriptions in the Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2000 edition), the five veterinary traditional Chinese medicine powders were prepared as negative samples and the five powders added chloramphenicol according to the dosage in veterinary clinic before being prohibited were prepared as positive samples. The chloramphenicol in samples were extracted with acetone and determined by HPLC/UV/PAD. The method was fast and simple, could be applied to determination of chloramphenicol violated in the five veterinary traditional Chinese medicine powders.

Key words HPLC; chloramphenicol; veterinary traditional Chinese herb medicine; the qualitative determination

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是 1947 年由委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae* 培养液中提取的一种对革兰氏阳性菌和阴性菌、立克次氏体等有抑制作用的广谱抗生素, 1948 年用于临床, 1949

年确定化学结构, 是第一个可用化学方法合成的抗生素^[1]。氯霉素应用广泛, 曾对畜禽疾病的控制和治疗起到了重要作用, 但是由于氯霉素对人体免疫系统有抑制作用, 可造成白细胞和血小板减少, 严

重者发展为粒细胞性白血病及再生障碍性贫血^[2], 因此欧美等发达国家已相继禁止使用, 我国也已明文规定在食品动物中禁止使用。然而, 养殖生产中常有违法使用现象, 屡禁不止, 亦发现有在中药制剂中添加氯霉素以提高疗效的情况。

本研究根据氯霉素禁用以前的临床治疗量和中药散剂的临床治疗量, 在配制的中药散剂中定量加入氯霉素, 用高效液相色谱法, 简便、快速地定性检测止痢散、白头翁散、苍术香连散、银翘散和清瘟败毒散 5 种中兽药散剂中的氯霉素。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪, 配紫外检测器和二极管阵列检测器, Waters 2690-2487 和 996 Millennium 32 色谱工作站, Water 公司; 分析天平, AE240 型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 试剂

1.2.1 标准品与对照品 氯霉素标准品, 批号 0303-9613 效价 994 单位/mg 购自中国生物制品检定所。甲砒霉素对照品, 批号 K0241201, 含量 99.1%; 氟苯尼考对照品, 批号 K0281104, 含量 99.2%, 均由中国兽药药品监察所提供。

1.2.2 供试品

1.2.2.1 阴性对照散剂 止痢散、白头翁散、苍术香连散、银翘散和清瘟败毒散, 购买合格药材按《中国兽药典》2000 年版二部规定的处方自配。

1.2.2.2 含氯霉素的供试散剂 按照 2% 的比例在 1.2.2.1 中配制的散剂中添加氯霉素标准品, 混匀。

1.2.3 试剂 乙腈, 色谱纯; 庚烷磺酸钠、二甲基甲酰胺和冰醋酸, 分析纯; 双蒸水, 自制

2 方法和结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 分别称取 1.2.2.2 项下的供试散剂 1.0 g 置 100 mL 锥形瓶中, 加丙酮 10 mL, 超声提取 10 min 加流动相 90 mL, 摇匀, 静置, 过滤; 精密量取滤液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀作为供试品溶液。

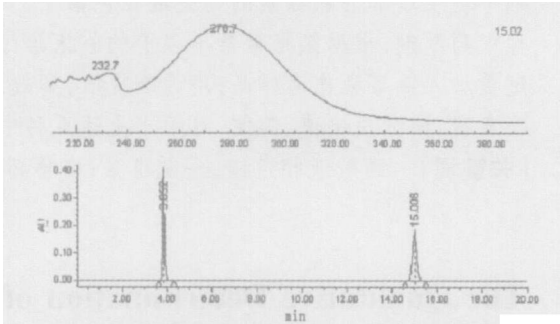
2.1.2 对照品溶液的制备 取氯霉素对照品适量, 精密称定, 加适量丙酮使溶解, 用流动相稀释制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2 色谱条件及系统适用性 色谱柱为 YMC-PACK ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为庚

烷磺酸钠二甲基甲酰胺溶液(取 0.1% 庚烷磺酸钠溶液 500 mL 与二甲基甲酰胺 5 mL, 冰醋酸 0.5 mL, 混匀)-乙腈(75:25)^[3]; 检测波长 272 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 对甲砒霉素对照品、氟苯尼考对照品和氯霉素标准品溶液及混合标准溶液进行了定性检测, 结果见表 1, 3 种药物的色谱图及光谱图见图 1~4。

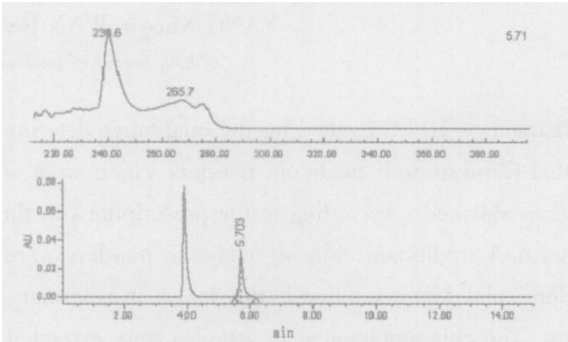
表 1 系统适用性试验数据

组分名称	保留时间/min	理论板数	分离度	拖尾因子
甲砒霉素	5.763	10320	5.2	1.2
氟苯尼考	12.268	14784	11.0	1.0
氯霉素	15.302	21788	8.6	0.3



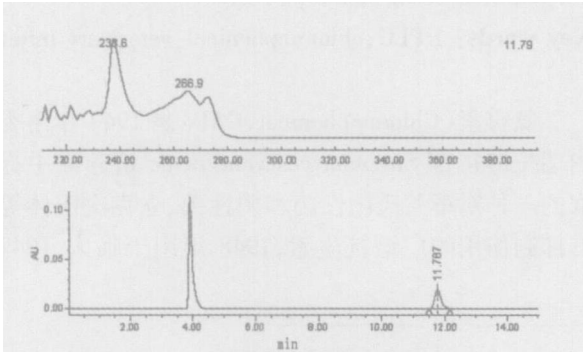
保留时间 15.008 min 为氯霉素峰; 3.852 min 为溶剂峰

图 1 氯霉素标准品光谱图及色谱图



保留时间 5.703 min 为甲砒霉素峰

图 2 甲砒霉素对照品光谱图和色谱图



保留时间 11.787 min 为氟苯尼考峰

图 3 氟苯尼考对照品光谱图和色谱图

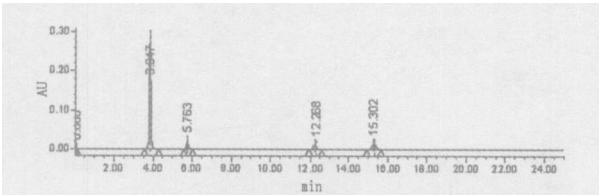


图 4 甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素混合标准液色谱图

2.3 专属性试验 按 2.1.2 项下方法制备甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素的混合标准液进行试验, 三者能够很好地分离, 并采用二极管阵列检测, 氯霉素的类似物甲砒霉素和氟苯尼考不干扰其检测。

2.4 检测限试验 按 2.1.1 项下的方法制备不同浓度的止痢散、白头翁散、苍术香连散、银翘散和清瘟败毒散的供试溶液进行检测, 检测限见表 2。

表 2 检测限试验数据

信噪比与检测限	止痢散	白头翁散	苍术香连散	银翘散	清瘟败毒散
信噪比	2 7:1	2 8:1	1 8:1	3 3:1	2 8:1
检测限 / (mg·kg ⁻¹)	0.125	0.05	0.6	0.25	0.25

表 3 不同厂牌色谱柱检测中药散剂中氯霉素的保留时间

色谱柱名称	YMC-pack ODS C ₁₈	VARIAN	Phenomenex LUNA	Waters symmetry C ₁₈	Lichrosorb 大连依利特公司	Inertsil (5μm) 日本
保留时间 / min	14~20	16	10	7.5 (峰型异常)	3.2	5.0

2.7 二极管阵列检测器确证 按 2.1 项下的方法制备阴性对照溶液、供试品溶液和对照品溶液, 取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 用二极管阵列检测器进行测定, 记录相应的光谱图 and 色谱图, 对散剂中添加的氯霉素做进一步定性确证。以止痢散为例, 其阴性对照和供试品的光谱图及色谱图见图 5、6。其他散剂供试品溶液的光谱图及色谱图见图 7~10。

3 讨论

3.1 根据氯霉素在甲醇、乙醇、丙酮或乙二醇中易溶, 水中微溶的特点, 考虑到中药散剂用醇类溶剂提取其中的氯霉素时, 中药中的许多组分溶于有机醇类而干扰氯霉素的检测, 因此, 本试验的提取溶剂选用丙酮, 经试验研究证明, 丙酮可以提取供试品中的氯霉素, 而且, 中药中的其他组分峰与氯霉素峰可以分开, 不影响氯霉素的检测。

3.2 供试品中氯霉素的超声提取时间以 10 min 为好, 从中兽药散剂中同时萃取出的组分种类较少, 不干扰氯霉素的检测, 提取时间延至 15 或 20 min 时, 同时萃取出的中药组分增多; 10 和 20 min 提取时间的氯霉素萃取量基本相同。

2.5 耐受性试验 改变供试品前处理中氯霉素的提取时间, 改变流动相的组成和 pH 值; 更换不同厂牌、同一厂牌不同批号的色谱柱; 改变进样量; 采用不同的流速进行试验。结果表明, 供试品中氯霉素的提取时间以超声处理 10 min 为最好; 改变流动相的组成和 pH 值, 氯霉素的保留时间发生改变, 但不影响氯霉素的定性检测; 更换不同厂牌、同一厂牌不同批号的色谱柱, 在 2.2 项的色谱条件下试验, 结果依据色谱法的基本要求, 中药散剂中氯霉素的定性检测最好选用 Phenomenex LUNA、VARIAN 和 YMC-pack ODS 色谱柱 (表 3), YMC-pack ODS 牌 3 个批号的色谱柱试验, 氯霉素的保留时间约为 14~21 min, 不同的流速均不影响氯霉素的定性检测。

2.6 供试品的检测 按 2.1 项下的方法制备供试品溶液和对照品溶液, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果止痢散、白头翁散、苍术香连散、银翘散和清瘟败毒散中的氯霉素均可定性检测。

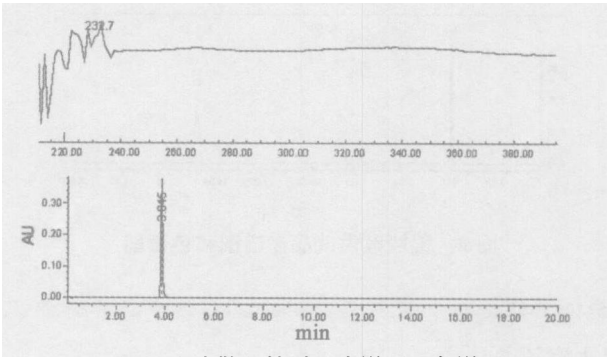


图 5 止痢散阴性对照光谱图及色谱图

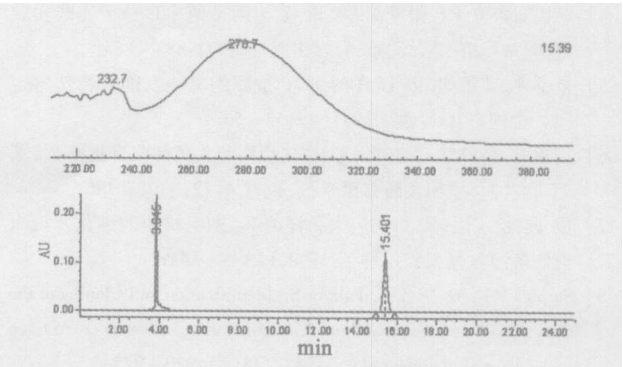


图 6 止痢散供试品光谱图及色谱图

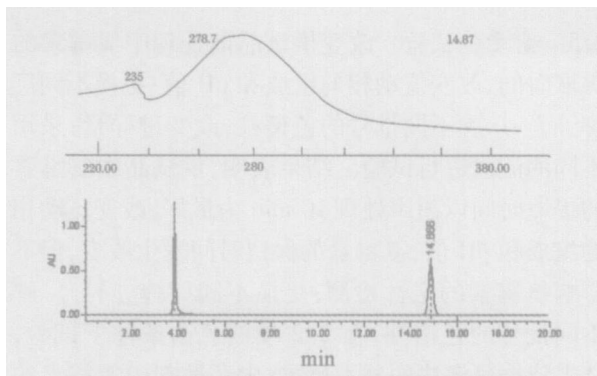


图 7 白头翁散供试品光谱图和色谱图

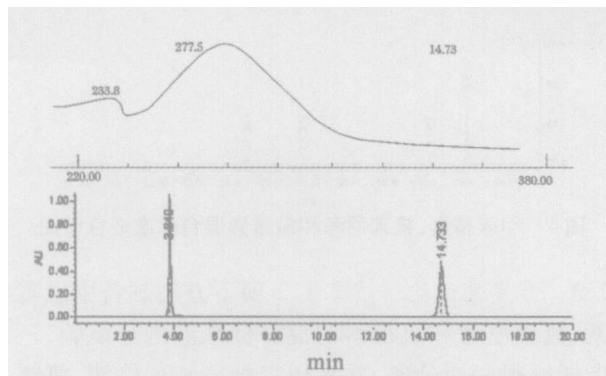


图 10 清瘟败毒散供试品光谱图及色谱图

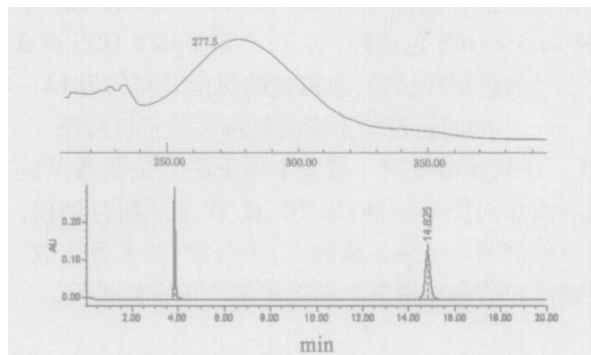


图 8 苍术香莲散供试品光谱图和色谱图

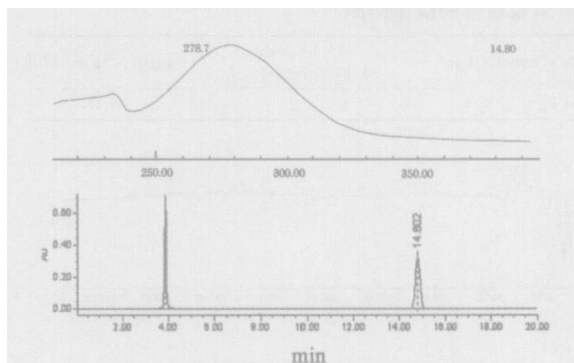


图 9 银翘散供试品光谱图和色谱图

3.3 试验采用 6 种不同品牌的色谱柱进行试验 (具体型号见表 2 规格均为 $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 除 Waters symmetry C_{18} 色谱柱外, 其它几种色谱柱均可进行氯霉素的定性检测。根据色谱的要求, 综合考虑最好选用 Phenomenex LUNA、VARIAN 和 YMC-pack ODS 色谱柱或其它等效色谱柱, 使被测组分的保留时间在 $10 \sim 20 \text{ min}$ 。

3.4 试验采用 2 种不同比例的流动相, 0.1% 庚烷磺酸钠溶液中二甲基甲酰胺和冰醋酸的量改用 3 种不同的比例进行试验, 均不影响氯霉素的定性检测。

参考文献:

- [1] 张致平. 微生物药理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 现代生物技术与医药科技出版中心, 2003: 291.
- [2] 朱模忠. 兽药手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 现代生物技术与医药科技出版中心, 2002: 73.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 776.

(上接 26 页)

- [4] 萨姆布鲁克·J, 弗里奇·E F, 曼尼阿蒂斯·T. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 883~884.
- [5] 范书才, 郭景煜. 大肠杆菌 987P 抗原的提纯及部分特性鉴定 [J]. 中国畜禽传染病, 1987(4): 53~56.
- [6] 周碧君, 苟万里, 王开功, 等. 仔猪腹泻源大肠杆菌贵州株 K_{88} 菌毛研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 4(22): 291~296.
- [7] 成进, 徐定法, 黄炯, 等. 大肠杆菌 K_{88} 菌毛抗原的纯化及抗血清制备 [J]. 新疆农业科学, 1992(1): 43~44.
- [8] Shipley P L, Dougan G, Falkow S. Identification and Cloning of the Genetic Determinant that Encodes for the K_{88ac} Adherence Antigen [J]. Journal of Bacteriology, 1981, 145(2): 920~925.

- [9] 李春华, 梁宏德, 杨艳艳, 等. K_{88} , K_{99} 基因工程菌菌毛抗原的提纯及其检测 [M]. 河南畜牧兽医, 1999, 20(4): 7~8.
- [10] 罗清华. 大肠杆菌 K_{88ac} 抗原提纯及高特异性抗血清制备 [J]. 家畜传染病, 1985, 33(2): 27~29.
- [11] 杜银中. 大肠杆菌菌毛油乳剂苗的实验研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(1): 4~5.
- [12] 李学伍. 双价工程苗 K_{88} , K_{99} 表达蛋白提取方法的探讨及抗原性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 22(2): 140~142.
- [13] Jones G W, Rutter J M. The Association of K_{88} Antigen with Haemagglutinating Activity in Porcine Strains of *Escherichia coli* [J]. Journal of General Microbiology, 1974, 84(1): 135~144.