

HPLC 法测定中兽药散剂中非法添加土霉素的方法研究

李树纲^{1,2}, 金录胜^{1,2}, 王登临^{1,2}, 杲寿善^{1,2}, 张宏^{1,2}, 于清伟^{1,2}, 张蕾^{1,2}, 史梓萱^{1,2}

(1. 甘肃省兽药饲料监察所, 兰州 730030; 2. 甘肃省动物卫生监督所, 兰州 730030)

[收稿日期] 2011-05-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2011)11-0019-04 [中图分类号] S853.76

[摘要] 建立了高效液相色谱法检测清肺散、白头翁散、止痢散等中兽药散剂中非法添加土霉素的方法。用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 以 0.05 mol/L 草酸铵溶液 - 二甲基甲酰胺 - 0.2 mol/L 磷酸氢二铵 (75:20:5) (用氨试液调 pH 值至 8.0 ± 0.2) 为流动相, 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C。结果显示, 土霉素的线性范围为 100~300 μ g/mL, 线性方程为 $Y = 4.90 \times 10 X - 2.39 \times 10^3$, ($r = 0.9996, n = 5$), 本方法的回收率为 80.68%~119.23%, RSD 为 0.66%~1.85%。结果表明, 本方法准确、可靠, 适用于中兽药散剂中非法添加土霉素的检测。

[关键词] 中兽药散剂; 土霉素; HPLC; 检测

Study on the Determination Method of Oxytetracycline Added Illegally in Veterinary Chinese Materia Medica Powders by HPLC

LI Shu-gang^{1,2}, JIN Lu-sheng^{1,2}, WANG Deng-lin^{1,2}, GAO Shou-shan^{1,2},
ZHANG Hong^{1,2}, YU Qing-wei^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, SHI Zi-xuan^{1,2}

(1. Gansu Institute of Veterinary Drug and Feed Inspection, Lanzhou 730030, China;

2. Gansu Institute of Animal Health Inspection, Lanzhou 730030, China)

Abstract: An HPLC method was established for effective detection on oxytetracycline added illegally in veterinary Chinese materia medica powders as Qingfei San, Baitouweng San and Zhili San, etc. A reverse-phase C_{18} column was used, the mobile phase was 0.05 mol/L ammonium oxalate solution - DMF - 0.2 mol/L ammonium dibasic phosphate (75:20:5) (adjusted the pH value with ammoniac solution to 8.0 ± 0.2), the determination wave length was 280 nm, the flow rate was 1.0 mL/min and the column worked at 35 $^{\circ}$ C. The result demonstrated that the linearity range of oxytetracycline was 100~300 μ g/mL, the linear equation is $Y = 4.90 \times 10 X - 2.39 \times 10^3$ ($r = 0.9996, n = 5$), the recovery was 80.68%~119.23%, RSD was 0.66%~1.85%. It indicated that this method was accurate, reliable, and suitable in the determination of oxytetracycline added illegally in veterinary Chinese materia medica powders.

Key words: veterinary Chinese materia medica powders; oxytetracycline; HPLC; determination

土霉素 (Oxytetracycline), 又名氧四环素, 是四环素类碱性广谱抗生素, 用于治疗大肠杆菌或沙门氏菌引起的畜禽胃肠道疾病 (如白痢、黄痢等) 和支原体等引起的肺炎、咳喘等疾病。目前一些不法分

子通过在中兽药散剂中非法添加土霉素使得疗效缓和的中兽药散剂具有了速效、高效、特效的特点, 但这种违规做法会诱导畜禽耐药菌的产生, 造成畜产品药物残留等问题, 最终给人类身体健康造成巨

作者简介: 李树纲 (1983 年 -), 男, 助理兽医师, 从事兽药监督、检验及方法研究。E-mail: 306979352@qq.com

大危害。本文旨在研究建立 HPLC 法测定中兽药散剂中非法添加土霉素的方法。

1 试药与仪器

1.1 试药

1.1.1 对照品 土霉素对照品,批号为 130487 - 200302,来源于中国药品生物制品检定所,含量为 88.2%。

1.1.2 供试品

1.1.2.1 阴性对照散剂 清肺散、白龙散、白头翁散、苍术香连散、止痢散、四味穿心莲散、麻杏石甘散,购买合格药材按《中华人民共和国兽药典》2005 年版二部规定的处方自配。

1.1.2.2 阳性添加散剂 阳性添加散剂按照 2.5% (根据土霉素预混剂的用法与用量中的混饲法,经过试验分析,阳性添加比例定为 2.5% 为宜) 的比例在 1.1.2.1 中配制的散剂中添加土霉素对照品,混匀。

1.1.3 试剂 N-N 二甲基甲酰胺,色谱纯,天津市光复精细化工研究所;草酸铵,分析纯,西安化学试剂厂;磷酸氢二铵,分析纯,天津市化工试剂六厂;氨水,分析纯,烟台市双双化工有限公司;盐酸,分析纯,白银良友化学试剂有限公司。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 1100 可变波长紫外检测器); ZORBAX Eclipse XDB - C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); UF 型超纯水机; TG18G 台式高速离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司,最大转速为 18 000 r/min); 电子天平 (梅特勒 - 托利多仪器 (上海) 公司, AE240: 感量为 0.000 01, AE100: 感量为 0.00 01); 实验室 pH 计 (FE20, 梅特勒 - 托利多仪器 (上海) 有限公司)。

2 实验方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 分别称取 1.1.2 项下的供试散剂 1.0 g, 置 50 mL 离心管中, 精密加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 25 mL, 涡旋混匀, 振摇提取 15 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 精密量取上清液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取土霉素对照品适量, 置 25 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 mL 振摇使溶解, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 作为对照品贮备液 (1 mg/mL)。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅

烷键合硅胶为填充剂; 以 0.05 mol/L 草酸铵溶液 - 二甲基甲酰胺 - 0.2 mol/L 磷酸氢二铵 (75 : 20 : 5) (用氨试液调 pH 值至 8.0 ± 0.2) 为流动相; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 35 °C; 紫外检测器; 检测波长 280 nm。按 2.1 项下的方法分别制备供试品溶液和对照品溶液 (精密吸取 2.1.2 项下的对照品贮备液, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液制成 50 μg/mL 的溶液), 在此色谱条件下, 对其进行了进样分析 (图 1 - 图 15), 土霉素主峰的保留时间为 10.119 min, 能够与供试品中其他成分色谱峰很好地分离, 峰形良好。

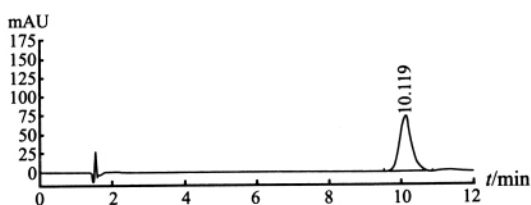


图 1 土霉素对照品溶液色谱图

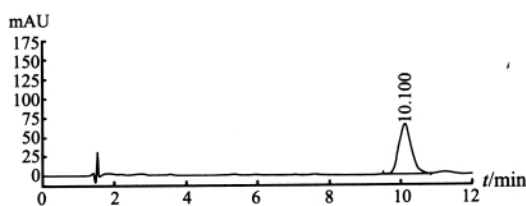


图 2 清肺散阳性添加样品溶液色谱图

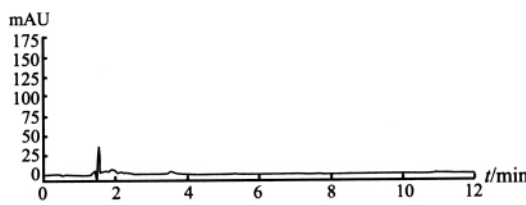


图 3 清肺散阴性样品溶液色谱图

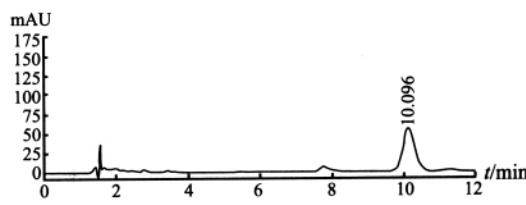


图 4 白龙散阳性添加样品溶液色谱图

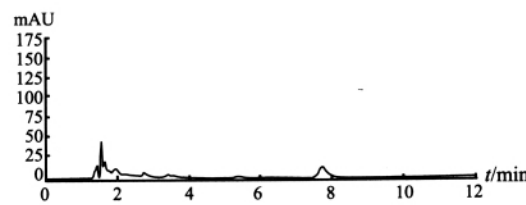


图 5 白龙散阴性样品溶液色谱图

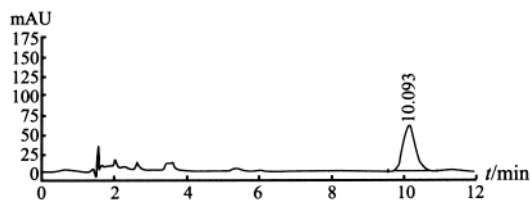


图6 白头翁散阳性添加样品溶液色谱图

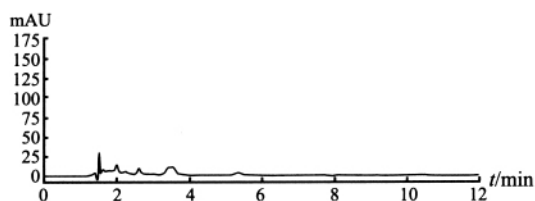


图7 白头翁散阴性样品溶液色谱图

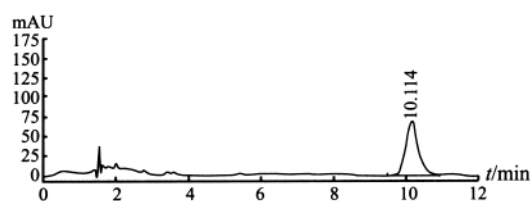


图8 苍术香连散阳性添加样品溶液色谱图

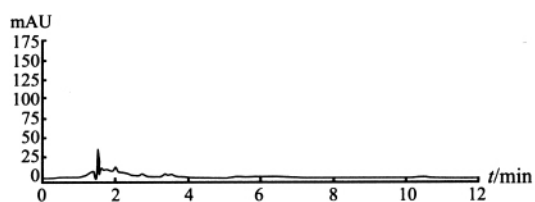


图9 苍术香连散阴性样品溶液色谱图

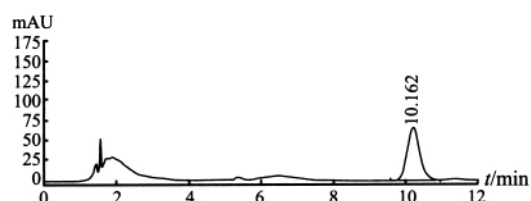


图10 止痢散阳性添加样品溶液色谱图

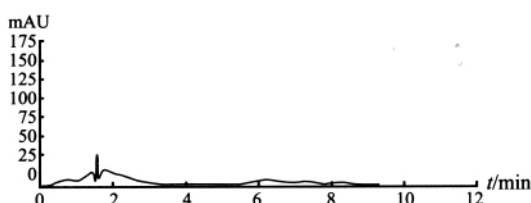


图11 止痢散阴性样品溶液色谱图

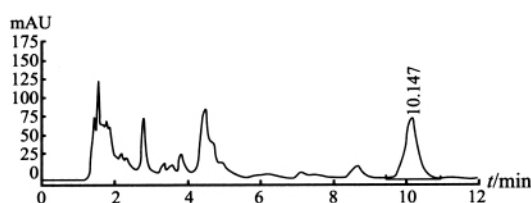


图12 四味穿心莲散阳性添加样品溶液色谱图

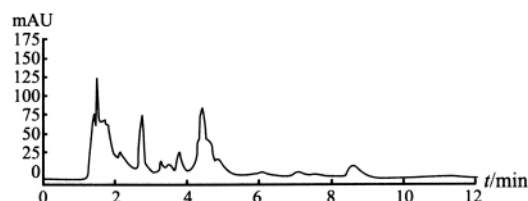


图13 四味穿心莲散阴性样品溶液色谱图

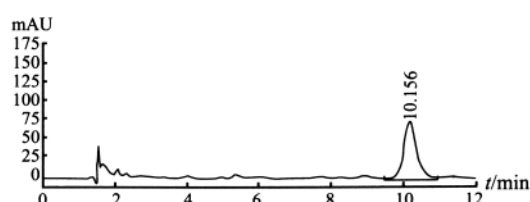


图14 麻杏石甘散阳性添加样品溶液色谱图

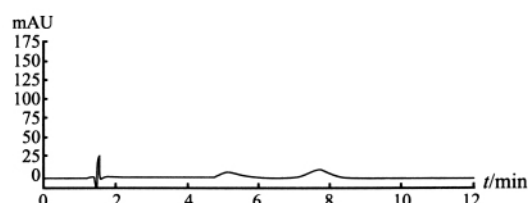


图15 麻杏石甘散阴性样品溶液色谱图

2.3 线性范围 分别精密吸取 2.2.1.2 项下的对照品贮备液 2.50、3.75、5.00、6.25、7.50 mL，置 25 mL 容量瓶，加 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度，配制系列标准溶液。按实验确定的最佳条件进行测定，依照浓度由小到大的次序，按上述色谱条件进样分析，以系列标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线(图 16)，得线性方程 $Y = 4.90 \times 10 X - 2.39 \times 10^3$ ， $r = 0.9996$ ，结果表明土霉素在 100~300 $\mu\text{g/mL}$ (即 2~6 mg/kg) 范围内线性关系良好。

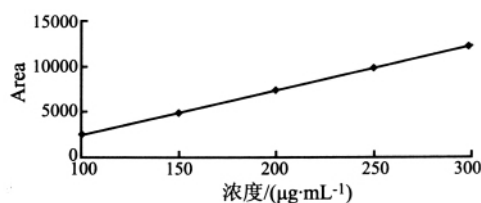


图16 土霉素的标准曲线

2.4 精密度试验 取土霉素对照品溶液，按上述色谱条件重复连续进样 6 次，每次进样量为 20 μL ，测定峰面积，其 RSD 为 0.23%，表明此方法的仪器精密度符合要求。

2.5 重现性实验 取同一品种的同批供试品各 5 份，按 2.2.1 和 2.2.2 项下操作，测定土霉素的峰

面积,其RSD为1.14%,表明此方法的重现性良好。

2.6 溶液稳定性实验 将同一对照品的3个不同浓度的溶液在室温下考察,按上述色谱条件,分别于1、3、6、10、24 h测定峰面积,其土霉素主峰面积的RSD分别为0.32%、0.28%、0.40%,表明土霉素溶液在24 h内稳定(图17-图18)。

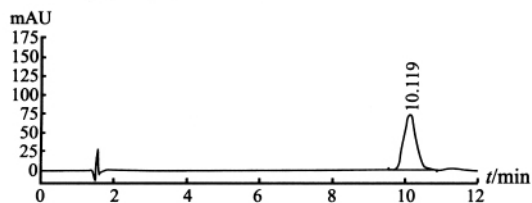


图17 土霉素对照品溶液色谱图

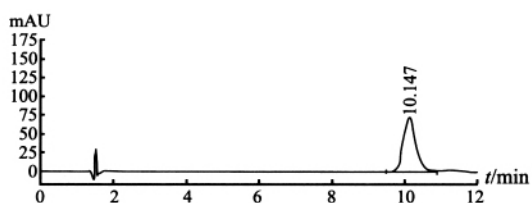


图18 常温放置24 h后的土霉素对照品溶液色谱图

2.7 检测限与定量限 按2.1.1项下的方法制备一定浓度的清肺散、白龙散、白头翁散、苍术香连散、止痢散、四味穿心莲散、麻杏石甘散供试品溶液进行检测,以信噪比(S/N)≥3为检测限(LOD),信噪比(S/N)≥10为定量限(LOQ)。

2.8 加样回收率试验 分别按25、50、150 g/kg的添加浓度精密称取土霉素对照品,加入1.1.2.1项下的自制散剂中,每个浓度做5份平行样,按2.1.1项下的方法制备供试品溶液,与对照品平行进样分析,按外标一点法,计算回收率及批内变异系数。本方法的回收率为80.68%~119.23%,变异系数为0.66%~1.85%。结果见表1。

3 讨论

3.1 根据土霉素在乙醇中微溶,在水中极微溶解,在氢氧化钠试液和稀盐酸中溶解的特点,考虑到中药散剂用醇类溶剂提取其中的土霉素时,中药中的许多组分溶于有机醇类而干扰土霉素的检测,因此,本试验的提取溶剂选用稀盐酸,经试验研究证明,稀盐酸可以提取供试品中的土霉素,而且中药

表1 中兽药散剂中添加回收率试验结果(n=5)

添加浓度/(g·kg ⁻¹)	测定参数/%	散剂名称						
		1	2	3	4	5	6	7
25	平均回收率	93.55	80.68	87.73	97.24	90.71	119.23	112.51
	RSD	0.66	1.12	1.63	1.59	1.70	1.85	1.24
50	平均回收率	95.12	81.38	87.98	99.08	92.63	118.49	106.20
	RSD	0.82	1.21	1.51	1.71	1.82	1.76	1.28
150	平均回收率	96.92	82.69	90.69	98.36	94.11	119.01	109.42
	RSD	0.76	1.16	1.39	1.50	1.69	1.80	1.12

注:1、2、3、4、5、6、7分别代表清肺散、白龙散、白头翁散、苍术香连散、止痢散、四味穿心莲散、麻杏石甘散。

中的其他组分峰与土霉素峰的分度符合要求,不影响土霉素的检测。

3.2 供试品中土霉素的提取以振摇提取15 min,8 000 r/min离心10 min为好,从中兽药散剂中同时提取出的组分种类较少,不干扰土霉素的检测,提取时间延至20 min或更长时,同时提取出的中药组分相应增多;15 min和20 min提取时间的土霉素提取量基本相同。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇〇五年版一部[S]. 北京: 中国农业出版社.
 [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇〇五年版二

部[S]. 北京: 中国农业出版社.
 [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南(化学药品卷)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
 [4] 中华人民共和国农业部. 兽药地方标准上升国家标准[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2006.
 [5] 药物分析试验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
 [6] 杨秀玉, 万仁玲, 王玉叶, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(12): 11-14.
 [6] 高迎春, 苏梅, 魏秀丽, 等. 薄层色谱和液相色谱法鉴别中兽药散剂中掺加的磺胺噻唑啉钠[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(2): 23-25.
 [7] 贾振民, 吴宁鹏, 宋志超, 等. 高效液相色谱法测定中兽药制剂中噻唑啉类药物[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(3): 13-15.
 [8] 贾振民, 陈蓄, 宋志超, 等. 中兽药制剂中氟喹诺酮类药物检测方法的研究[J]. 中国畜牧医, 2010, 37(10): 190-193.