

高效液相色谱法测定乙酰甲喹注射液的含量

郑洁, 马慧楠, 李娟

(辽宁省大连市农产品质量监测中心, 大连 116037)

[收稿日期] 2012-07-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)01-0034-03 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为建立 HPLC 法测定乙酰甲喹注射液含量的方法, 试验选用 Sunfire C18 色谱柱, 检测波长为 254 nm, 流动相采用磷酸二氢钾溶液 (0.01 mol/L) (pH = 6.0): 乙腈为 90:10, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C。结果显示, 浓度在 0.01032~0.10320 mg/mL 的范围内, 峰面积与测定浓度呈良好的线性关系, $r=0.9996$, 加样平均回收率为 99.5%, 重复性试验 RSD 为 0.3%, 最低检出限为 1.2 ng。该方法简便、准确、可行, 可用于乙酰甲喹注射液的质量控制。

[关键词] 乙酰甲喹; HPLC; 含量测定

Determination of Mequindox Injection by HPLC

ZHENG Jie, MA Hui-nan, LI Juan

(Agro-Products Quality Supervision and Inspection Center, Dalian 116037, China)

Abstract: To establish HPLC method for determination of mequindox injection. Use a Sunfire C18 column packed with octadecylsilane bonded silica gel. Detection wavelength was 254 nm. The mobile phase consisted of a mixture of potassium dihydrogen phosphate buffer (0.01 mol/L) (pH = 6.0) and acetonitrile with a proportion of 90:10, flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C. The calibration curve of Mequindox was linear within the range of 0.01032~0.10320 mg/mL, $r=0.9996$, The mean recovery rate is 99.5%, The RSD of precision was 0.3%, The detection limit was 1.2 ng. This method is simple, accurate and reproducible. It can be used to control the quality of mequindox injection.

Key words: mequindox; HPLC; determination

乙酰甲喹又名痢菌净, 是兽医临床广泛使用的药物之一, 具有广谱抗菌活性和较强的体内外抗菌活性。其注射液的含量测定方法为非水滴定法^[1], 该方法受人为和环境因素影响较大, 终点颜色变化不显著, 常常会因为终点判定困难而导致结果测定不准确, 且所用试剂毒性较大。本文采用高效液相色谱法测定乙酰甲喹注射液的含量, 方法简便快速, 结果更加准确可靠, 可用于乙酰甲喹注射液的质量控制并为标准修订提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪 Waters2695 型(配二级管阵列检测器, DAD); 色谱柱, Sunfire C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 电子天平 SartoriusBP221S; 实验室 pH 计, 上海雷磁 pHSJ-4A 型; 电热恒温干燥

箱, DHG-9240A 型。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯), Tedia Company Inc; 磷酸二氢钾(分析纯), 天津科密欧化学试剂有限公司; 三乙醇胺(分析纯), 天津科密欧化学试剂有限公司; 实验用水为超纯水。

1.3 药品

1.3.1 对照品 乙酰甲喹, 中国兽医药品监察所, 批号: H0111008, 纯度: 99.6%。

1.3.2 供试品 乙酰甲喹注射液 3 批, 分别为: 韶山大北农动物药业有限公司, 批号 11092601, 规格 0.2 g: 10 mL; 四川省欧邦动物药业有限公司, 批号 20100806, 规格 0.2 g: 10 mL; 江西博莱大药厂, 批号 20110525, 规格 0.25 g: 5 mL。

1.4 溶液的配制

1.4.1 对照品溶液 取在 105℃ 干燥至恒重的乙酰甲喹对照品适量, 精密称定, 用 90% 乙腈配制成为含乙酰甲喹约为 0.05 mg/mL 的溶液。

1.4.2 供试品溶液 取供试品 (11092601) 3 支, 将注射液倒入烧杯中混匀, 精密量取适量, 配制成为浓度约为 0.05 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 即得。

1.5 试验方法

1.5.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Sunfire C18, (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测波长为 254 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱温为 30.0 ℃; 流动相为磷酸二氢钾溶液 (0.01 mol/L) (三乙醇胺调节 pH = 6.0): 乙腈 = 90:10。

1.5.2 线性关系考察 精密称取乙酰甲喹对照品 25.80 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加 90% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。再精密量取储备液 1、2、5、8、10 mL 分别置 50 mL 容量瓶中, 加 90% 乙腈至刻度, 摇匀, 分别进样 10 μL, 测定峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.5.3 重复性试验^[2] 精密量取 1.4.2 项下的供试品溶液, 重复进样 6 次, 进样体积为 10 μL, 计算 6 次峰面积的 RSD 值。

1.5.4 稳定性试验 将供试品溶液放置 0、2、5、10、13、18、24 h 进样, 按 1.5.1 方法测定, 记录每个时间点的峰面积, 计算 7 个峰面积的 RSD 值。

1.5.5 检测限与定量限 取乙酰甲喹对照品 12.58 mg, 用 90% 乙腈逐级稀释, 记录图谱, 信噪比为 3 时测定检测限, 在信噪比为 10 时测定定量限。

1.5.6 加样回收试验 精密量取供试品 (11092601) 溶液 5 mL, 置 200 mL 容量瓶中, 用 90% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品储备液。另精密称定乙酰甲喹对照品 26.06 mg, 至 100 mL 容量瓶中, 用 90% 乙腈稀释至刻度, 作为对照品储备液。精密移取 5 mL 供试品储备液 9 份分别置于 9 个 100 mL 容量瓶中, 再分别精密加入对照品储备液 5.0、10.0、15.0 mL 各 3 份, 90% 乙腈溶定容至刻度, 摇匀, 按 1.5.1 方法测定含量。

1.5.7 系统适用性 取乙酰甲喹对照品和供试品适量, 按 1.4 方法配制成为系统适用性溶液。取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。乙酰甲喹的保留时间约为 16 min, 理论板数按乙酰甲喹峰计算均大于 5000, 乙酰甲喹样品的色谱峰与辅料峰能得到良好的分离, 分离度为 13.5, 结果见图 1、图 2。

1.5.8 含量测定 精密量取 1.3.2 项下的三个厂家的乙酰甲喹样品适量 (约相当于乙酰甲喹 50 mg), 置 100 mL 容量瓶中, 用 90% 乙腈稀释至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加

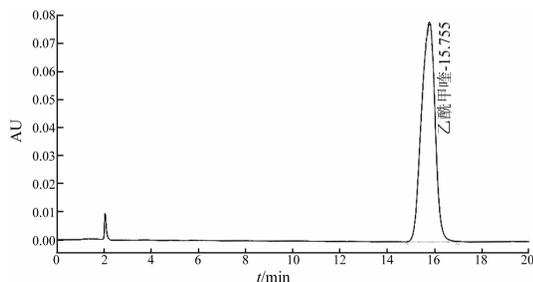


图 1 乙酰甲喹对照品

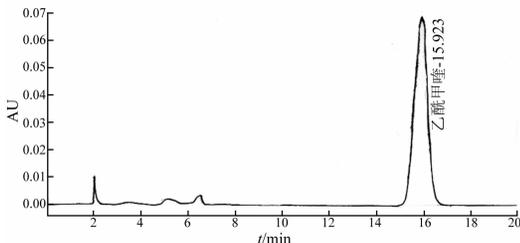


图 2 乙酰甲喹供试品

90% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀。同时精密称取乙酰甲喹对照品适量, 照 1.4.1 项下的方法配制成为对照品溶液, 照 1.5.1 项下的方法测定含量, 结果与非水滴定法测定的结果进行比较。

2 结果

2.1 线性关系考察 以供试品峰面积对浓度进行线性回归, 得回归方程: $Y = 1.608 \times 10^4 + 2.840 \times 10^7 X$, $r = 0.9996$ 。结果表明浓度在 0.01032 ~ 0.10320 mg/mL 的范围内, 峰面积与测定浓度呈良好的线性关系。

2.2 重复性试验 供试品乙酰甲喹峰面积的 RSD 为 0.3%, 结果表明重复性良好。

2.3 稳定性试验 7 个时间点的含量测定结果 RSD 为 0.9%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4 检测限和定量限 信噪比为 3 时测得检测限为 1.2 ng, 在信噪比为 10 时测得定量限为 4.0 ng。

2.5 回收率试验 9 份添加样品的平均回收率及 RSD 见表 1。

表 1 回收率测定结果 (n=9)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.3075	1.2978	3.5984			
2.3075	1.2978	3.5979	99.5		
2.3075	1.2978	3.5986			
2.3075	2.5956	4.8978			
2.3075	2.5956	4.8936	99.7	99.5	0.3
2.3075	2.5956	4.8952			
2.3075	3.8934	6.1698			
2.3075	3.8934	6.1699	99.2		
2.3075	3.8934	6.1684			

诸多环节,国家兽药追溯系统只是兽药行业产品追溯体系建设的一部分内容,只有加大经费投入和政策导向,企业才有积极性投入人力物力才于其中、监管部门才有手段来监管;只有保障其实施,社会才能认知其重要性。因此,应进一步保证投入,把兽药追溯体系建设纳入动物防疫体系建设,并逐步和动物标识及疾病可追溯体系的有效对接。

国家兽药产品追溯信息系统项目的建设,其最终产品就是建设完成一个可以用来进行兽药产品信息追溯的工具,该系统应用多种方式在企业 and 中央数据库间进行数据的采集和传输,其中央数据库的运行、维护、协调管理,包括硬件、软件的日常运行和维护,还要技术上的种种难题,都需要政府部门在推广、组织实施追溯制度时全面考虑。

参考文献:

[1] 丁 鲲.关于建立农业企业质量安全追溯系统的思考[J]. 中国农村科技,2010,(10):74-75.

[2] Madec F, Geers R, E Vesseur, *et al.* Traceability in the pig production chain [J]. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 2001, 20 (2): 523-537.

[3] United States Department of Agriculture (USDA). Marketing and Regulatory Programs Animal and Plant Health Inspection Service, National Animal Identification System (NAIS) - Technical Supplement to Draft Program Standards. [Z/OL]. (2005-07-26) <http://animalid.aphis.usda.gov/nais/>

[4] 陈红华,田志宏.国内外农产品可追溯系统比较研究[J]. 商场现代化,2007,(21):5-6.

[5] 中华人民共和国第 67 号令. 畜禽标识及养殖档案管理办法 [Z/OL]. (2006-06-26). <http://www.agri.gov.cn/blggt/t20060628638621.htm>

[6] 张晶声. 各国建设动物标识溯源系统的做法[J]. 中国畜牧业通讯,2006,(7):60-62.

[7] 肯尼斯 C. 劳顿. 管理信息系统[M]. 薛华成, 编译. 北京: 机械工业出版社, 2011.

[8] 中国物品编码中心. 二维条码技术与应用[M]. 北京: 中国计量出版社, 2007.

[9] 李士雷. 条码与 RFID 技术应用现状分析[J]. 市场周刊(新物流), 2007,(08):58.

(责任编辑:李文平)

(上接第 35 页)

2.6 样品测定 三个厂家的乙酰甲嗪注射液的含量见表 2。结果表明高效液相色谱法较非水滴定法的结果无显著差异。

表 2 样品测定结果

样品批号	高效液相法/%	非水滴定法/%
11092601	92.3	91.8
20100806	105.9	105.6
20110525	93.3	92.6

3 讨论

3.1 乙酰甲嗪难溶于水,溶剂中含有大部分有机相乙腈,使乙酰甲嗪完全溶解,少量的水使注射液中的辅料及杂质等水溶性物质溶解,以达到完全溶解样品的目的。

3.2 通过上述试验可以看出,用高效液相色谱法测定乙酰甲嗪注射液的含量,其线性和回收率均取得令人满意的结果,与传统的非水滴定法比较,高效液相法有结果准确,数据稳定,简单易行的特点,也可以克服非水滴定法操作繁琐复杂的缺点,避免人为因素和环境因素对结果造成的影响,防止使用大量氯仿进行提取操作而给检测人员带来的肝损害。

3.3 近年来,有人用紫外分光光度法测定乙酰甲嗪注射液的含量^[3]。与紫外法相比,高效液相法可有效地避开辅料对有效成分的干扰,可以更直观地发现注射液中添加的其它非药用组分。

3.4 本试验所采用的流动相,有机相比比例占 10%,在此比例下,保留时间保持在 16 min 左右,理论塔板数为 5000,并且辅料和有效成分达到有效分离。而水相的 pH 在 5~7 范围内变化时,对色谱峰的影响不大,而 pH 为 6 时,峰形最好。

3.5 DAD 检测器记录的紫外光谱图显示,乙酰甲嗪在 242 nm 和 254 nm 附近有最大吸收,见图 3。由于在 242 nm 波长附近辅料的干扰峰比较大,而在 254 nm 附近处辅料的峰高最小,因此选择 254 nm 波长为检测波长较合理。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部. 兽药国家标准—兽药地方标准上升国家标准(第二册)二〇〇六版[S].

[2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版[S].

[3] 徐克功,胡永萍. 紫外分光光度法测定痢菌净注射液的含量[J]. 云南农业,2007,1:38-39.

(责任编辑:陈 希)