

HPLC – PDA 法测定 17 种兽药中非法添加多西环素

周红霞¹, 李慧素^{1*}, 吴宁鹏¹, 高瑞霖²

(1. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2. 郑州市第七中学, 郑州 450000)

[收稿日期] 2015-08-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0036-06 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了 17 种兽药中非法添加多西环素的 HPLC – PDA 法。采用十八烷基键合硅胶为填充剂, 以醋酸盐缓冲液 – 乙腈(80:20) 为流动相, 二极管阵列检测器进行全波长(200~400 nm) 扫描, 检测波长为 280 nm, 并通过液相色谱保留时间、紫外光谱信息和峰纯度检查, 对非法添加物质进行定性鉴别和定量测定。结果表明, 该色谱条件下, 多西环素与其他物质峰分离良好。多西环素在 5~500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好, 回收率在 86.5%~118.1% 之间, RSD 为 0.2%~4.5%, 检测限为 0.5 mg/g 。本方法准确、可靠、重现性好, 可用于兽药制剂中多西环素的定性和定量检测。

[关键词] 多西环素; 峰纯度检查; 高效液相色谱法

Determination of Doxycycline in Veterinary Drug by HPLC – PDA

ZHOU Hong – xia¹, LI Hui – su^{1*}, WU Ning – peng¹, GAO Rui – lin²

(1. Henan Institute of Veterinary Drug & Feed Control, Zhengzhou 450008, China;

2. Zhengzhou NO.7 Middle School, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: A method for the determination of doxycycline in 17 kinds of veterinary drug was developed by the high performance liquid chromatography with photo – diode array detector (HPLC – PDA). It was tested with C18 column, using acetate buffer solution – acetonitrile (80:20) as the mobile phase. The detection wavelength was set at 280 nm and simultaneously collected the spectrum at wavelength of 200~400 nm. After separated by

基金项目: 2015 年国家畜禽产品质量安全风险评估项目 (GJFP2015008)

作者简介: 周红霞, 研究员, 从事兽药质量监测与监督。

通讯作者: 李慧素。E – mail: lihuisu2010@126.com

参考文献:

- [1] 张春燕. 不同环境基质中抗生素和藻毒素的 UPLC/MS/MS 分析方法建立与应用[D]. 河北师范大学, 2013.
- [2] 吴剑平, 张鑫, 李丹妮, 等. 五种抗菌药物从猪、鸡饲料至有机肥中的药物残留迁移规律研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 05: 43 – 48.
- [3] 张丹俊, 潘孝成, 赵瑞宏, 等. 畜禽粪便中抗菌药物残留检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 11: 101 – 103.
- [4] 李云辉, 吴小莲, 莫测辉, 等. 畜禽粪便中喹诺酮类抗生素的高效液相色谱 – 荧光分析方法[J]. 江西农业学报, 2011, 08: 147 – 150.
- [5] 张敏, 刘庆玉, 敖永华. 高效液相色谱 – 荧光检测畜禽粪污中四种氟喹诺酮类抗生素残留[J]. 湖北农业科学, 2012, 03: 602 – 604.
- [6] 夏天骄, 夏训峰, 徐东耀, 等. 基于固相萃取 – 高效液相色谱法的畜禽粪便中四环素类抗生素残留量检测[J]. 安全与环境学报, 2013, 02: 121 – 125.

(编辑: 陈希)

HPLC. The ultraviolet spectra information, retention time and peak purity test were used to identify and determinate the doxycycline by comparison with those of reference substances. Results showed that doxycycline and other materials finely separated. And Doxycycline showed good linearity in the concentration range of detection. The average recoveries of the drugs ranged from 86.5% ~ 118.1% at spiked levels with *RSD* less than 4.5%. the detection limit of doxycycline was 0.5 mg/g. In conclusion, the method is accurate and reproducible, and provides a reliable way for detecting doxycycline adulterated in veterinary drug.

Key words: doxycycline; peak purity test; HPLC – PDA

多西环素(Doxycycline, DOC)又名强力霉素,属于第二代半合成四环素衍生物,临床上广泛用于治疗畜禽等动物的细菌性疾病^[1]。由于多西环素价格相对低廉、来源广泛,且抗炎疗效明显,因此极易被不法分子掺入在抗菌消炎类药物增强疗效。通过对市场上销售和生产的抗菌药物调研,结合2014年监督抽检筛查结果,发现市场上存在为提高药物疗效而在部分抗菌药物中非法添加多西环素的现象,严重影响了兽药市场的稳定。由于非法添加通常是隐形行为,容易造成药量叠加,带来耐药性和药物残留的安全隐患,并能通过食物链传递,对人造成危害^[2]。

为了更好的打击非法添加行为,需要建立兽药中非法添加多西环素的检查方法,目前,还没有对兽药中非法四环素类中的一种或者几种药物进行测定的方法,因此,本试验参考相关文献^[3~5],采用高效液相色谱法与二极管阵列检测器,建立了氟喹诺酮类制剂、氟苯尼考注射液及硫酸庆大霉素注射液等17种制剂中非法添加多西环素的HPLC – PDA检测方法。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Agilent 1100 高效液相色谱系统,包括二极管阵列检测器;MILIPORE 超纯水器;METTLER XP205 电子天平。超声波清洗器:KQ – 3200E 型。甲醇为色谱纯,其他均为分析纯,水符合实验室一级水要求。

1.2 药品 多西环素对照品,含量为100.0%,批号H0160704,来自中国兽药药品监察所。盐酸多西环素,含量为90%,由河南某兽药生产企业提供。

甲磺酸达氟沙星注射液、氧氟沙星注射液、甲磺酸培氟沙星注射液、恩诺沙星注射液(溶液)、盐酸环丙沙星注射液、烟酸诺氟沙星注射液、氟苯尼考注射液(溶液)、硫酸庆大霉素注射液、甲磺酸培氟沙星可溶性粉(颗粒)、乳酸诺氟沙星可溶性粉、恩诺沙星可溶性粉、氧氟沙星可溶性粉、盐酸环丙沙星可溶性粉和氟苯尼考粉,均来自市售产品,经

检测均不含多西环素。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agel Venusil XBP C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:醋酸盐缓冲液 – 乙腈(80:20),其中醋酸盐缓冲液(0.25 mol/L 醋酸铵 – 0.1 mol/L 乙二胺四醋酸二钠 – 三乙胺(100:10:1),用冰醋酸或氨水调节pH值至8.8;二极管阵列(PDA)检测器,采集波长范围为200 ~ 400 nm,分辨率为1.2 nm;记录280 nm波长处的色谱图;柱温30℃;进样量20 μL。在该色谱条件下,多西环素主峰与各物质峰分离度均符合要求。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品贮备液 精密称取多西环素对照品50 mg,置50 mL量瓶中,加0.01 mol/L盐酸溶液溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液,放置于4℃冰箱中保存。

2.2.2 供试品溶液 称取(量取)供试品1.0 g(或1.0 mL),置50 mL容量瓶中,加0.01 mol/L盐酸溶液10 mL(氟苯尼考类制剂需加10 mL乙腈),超声处理5 min,静置,用0.01 mol/L盐酸溶液稀释至刻度,摇匀。精密量取5 mL,置50 mL量瓶中,用0.01 mol/L盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性空白溶液配制 称取(量取)无非法添加的各制剂约1.0 g(或1.0 mL),照2.2.2项下操作制备成阴性空白溶液。

2.2.4 空白添加溶液 取无非法添加的各制剂,按1%、2%、5%进行添加,照2.2.2项下操作制备成各制剂的空白添加溶液。

2.3 峰纯度检查 对供试品溶液色谱图中多西环素色谱峰进行峰纯度检查,采用被测物峰纯度角小于纯度阈值的方法确定该被测物为单一物质峰。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性 精密量取2.2.1项下对照品贮备液,用0.01 mol/L盐酸溶液分别稀释成5、10、20、50、100、200、500 μg/mL的系列标准工作溶液,按

照 2.1 项下色谱条件, 从低浓度到高浓度依次注入高效液相色谱仪测定。以对照品溶液浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 求得线性回归方程及相关系数。

2.4.2 回收率试验 精密称取多西环素对照品 10、50、100 mg 各 3 份, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加入 1.0 g (或 1.0 mL) 阴性样品, 混匀, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液 10 mL 溶解 (氟苯尼考类制剂需加 10 mL 乙腈), 超声处理 5 min, 静置, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 得到相当于多西环素 20、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 添加浓度的溶液, 精密量取 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 按照 2.1 项下液相条件记录色谱图。计算回收率及相对标准偏差。

2.4.3 检测限 将多西环素对照品溶液进行梯度稀释后, 制成系列浓度 0.1、0.2、0.5、1、2、5 $\mu\text{g/mL}$, 添加到阴性空白制剂中, 照 2.2.2 项下操作并进行检测。以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限。

2.4.4 专属性 通过阴性空白试验排除各制剂中主要成份对于被测物的干扰。采用被测物峰纯度

角小于纯度阈值的方法进行峰纯度检查。结果显示, 此液相条件下多西环素出峰处无其他干扰峰, 为单一物质峰, 方法可行。

2.4.5 耐用性 从柱温、流动相 pH 值、流速、色谱柱三个方面考察方法的耐用性。改变柱温分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$, 调节流动相 pH 值分别为 8.6、8.8 和 9.0, 改变流动相比例分别为 75:25、80:20 和 82:18; 改变流速分别为 0.8、0.9、1.0 mL/min; 选择不同品牌色谱柱, Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm); Thermos Hypersil Gold (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm); Waters SunfireTM C18 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm), 对其峰型, 分离度, 峰纯度和出峰时间进行考察。

2.5 结果与分析

2.5.1 峰纯度检查 对供试品溶液色谱图中多西环素峰进行峰纯度检查, 结果显示, 硫酸庆大霉素注射液和氟苯尼考类制剂均无紫外吸收, 对多西环素检出无干扰, 氟喹诺酮类制剂虽有紫外吸收, 但与添加物多西环素均能很好的分离, 且多西环素峰的纯度角度均小于纯度阈值, 表明在此液相条件下, 多西环素的出峰处无其他干扰峰, 为单一物质峰, 方法可行。

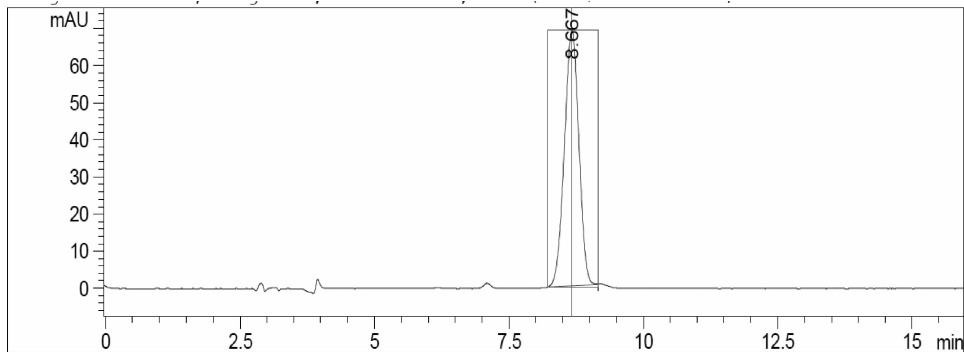


图 1 供试品 (氟苯尼考注射液) 添加多西环素的色谱图

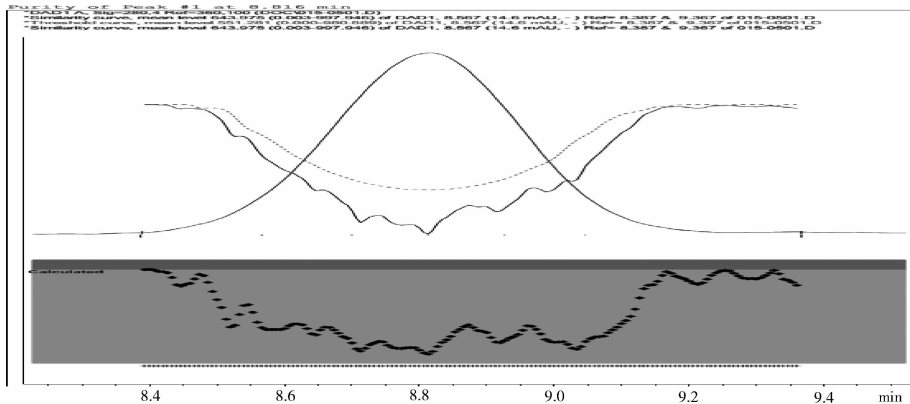


图 2 供试品 (氟苯尼考注射液) 添加多西环素的纯度检查图

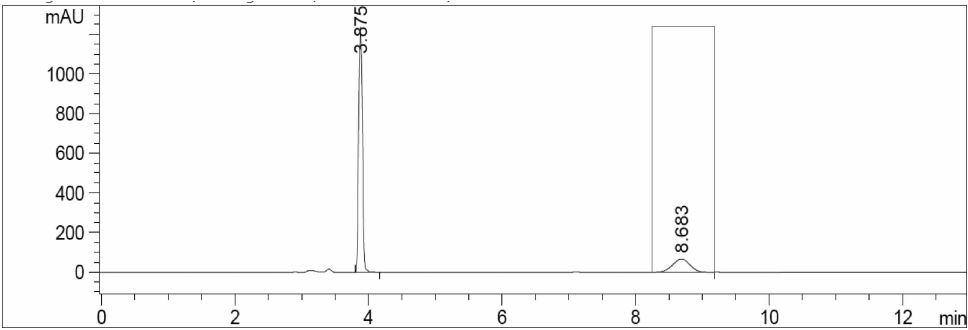


图3 供试品(诺氟沙星可溶性粉)添加多西环素的色谱图

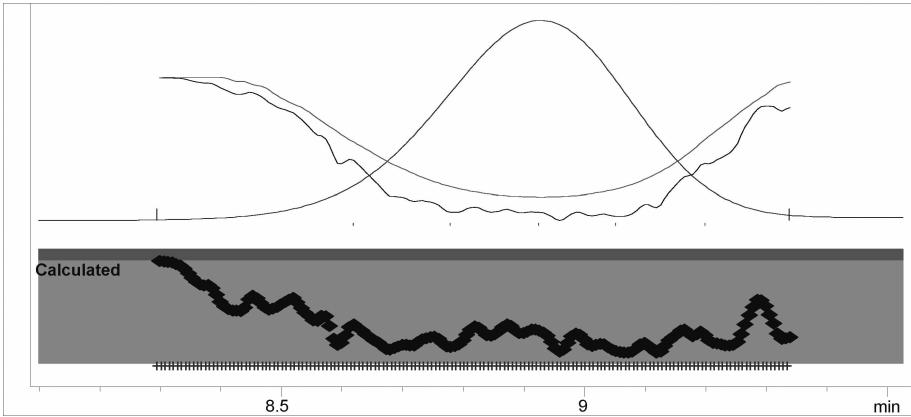


图4 供试品(诺氟沙星可溶性粉)添加多西环素的纯度检查图

2.5.2 线性 多西环素在5~500 μg/mL的系列浓度内进行测定,以峰面积(y)对浓度(x)进行线性回归,多西环素的回归方程 $Y = 14.801X + 44.897$ 和相关系数 r 为0.9997。结果表明:甲氧苄啶在5~500 μg/mL的浓度范围内线性关系良好。

2.5.3 回收率试验 由于添加回收试验中多西环素对照品的使用量较大,用符合纯度要求的多西环

素原料药代替对照品进行添加回收试验,即在阴性空白样中分别添加多西环素原料,按照1%、2%和5%三个浓度进行添加,通过试验计算回收率及相对标准偏差。该方法中各制剂中添加甲氧苄啶的回收率为86.5%~118.1%, RSD 为0.2%~4.5%,结果见表1、表2。

表1 注射液及溶液中添加多西环素回收率试验结果表

添加浓度	样品编号	回收率/%									
		甲磺酸达氟沙星注射液	氧氟沙星注射液	甲磺酸培氟沙星注射液	恩诺沙星注射液	恩诺沙星溶液	盐酸环丙沙星注射液	烟酸诺氟沙星注射液	氟苯尼考注射液	氟苯尼考溶液	硫酸庆大霉素注射液
1%	1	86.5	100.0	100.8	89.3	100.4	95.1	94.9	111.3	106.9	95.3
	2	88.1	100.4	101.2	90.0	103.5	96.2	94.9	110.3	104.2	98.9
	3	88.5	101.1	101.0	90.8	100.6	98.8	95.8	106.2	103.7	96.8
	平均值	87.8	100.5	101.0	90.0	104.4	95.6	95.2	109.2	104.9	96.7
	RSD /%	1.2	0.5	0.2	0.9	1.7	0.6	0.5	2.5	1.6	3.6

续表											
添加浓度	样品编号	回收率/%									
		甲磺酸达氟沙星注射液	氧氟沙星注射液	甲磺酸培氟沙星注射液	恩诺沙星注射液	恩诺沙星溶液	盐酸环丙沙星注射液	烟酸诺氟沙星注射液	氟苯尼考注射液	氟苯尼考溶液	硫酸庆大霉素注射液
5%	1	101.0	103.6	101.8	100.9	101.5	98.8	97.5	103.1	104.1	100.2
	2	100.1	102.3	101.6	97.5	103.2	99.2	99.2	104.7	103.5	101.3
	3	95.9	103.7	101.4	98.0	102.2	99.0	101.6	105.0	103.2	99.7
	平均值	99.0	103.2	101.6	98.8	102.3	99.0	99.4	104.6	103.6	100.4
	RSD /%	2.8	0.8	0.2	1.9	0.8	0.2	2.0	1.8	0.4	0.8
10%	1	101.2	104.7	101.8	97.6	104.2	97.7	98.4	102.2	102.0	93.9
	2	99.0	105.8	101.8	99.4	103.9	101.9	93.8	103.4	104.9	101.4
	3	102.1	103.6	102.3	96.1	105.5	100.4	96.8	103.1	104.8	102.0
	平均值	100.8	104.7	102.0	97.7	104.5	100.0	96.3	102.9	103.9	99.1
	RSD /%	1.6	1.1	0.3	1.7	0.8	2.1	2.4	0.6	1.6	4.5

表 2 可溶性粉及颗粒添加回收率实验结果表

添加浓度	样品编号	回收率/%						
		甲磺酸培氟沙星可溶性粉	甲磺酸培氟沙星颗粒	乳酸诺氟沙星可溶性粉	恩诺沙星可溶性粉	氧氟沙星可溶性粉	盐酸环丙沙星可溶性粉	氟苯尼考粉
1%	1	112.9	98.5	108.0	112.4	103.1	98.2	112.9
	2	116.0	97.2	104.9	111.3	109.6	101.8	108.3
	3	114.5	99.7	108.4	118.1	106.5	102.7	106.2
	平均值	114.4	98.5	107.1	114.0	106.4	100.9	109.1
	RSD	1.4	1.3	1.8	3.2	3.1	2.3	3.1
5%	1	104.4	101.2	103.9	103.9	102.5	103.1	102.2
	2	104.6	104.3	104.4	105.7	104.0	103.0	103.4
	3	102.9	102.4	102.4	104.4	104.5	99.2	102.7
	平均值	104.0	102.7	103.6	104.7	103.7	101.8	102.8
	RSD	0.9	1.5	1.0	0.9	1.0	2.2	0.6
10%	1	102.0	101.4	103.0	103.5	102.9	103.1	101.5
	2	100.7	97.6	103.0	102.7	102.4	100.1	102.6
	3	99.0	101.7	96.9	104.3	102.3	103.9	105.8
	平均值	100.6	99.2	101.0	103.5	102.5	102.4	103.3
	RSD	1.5	3.9	3.5	0.8	0.3	1.9	2.2

2.5.4 检测限 综合考虑色谱图峰型、峰面积和多西环素有效浓度等因素,以光谱图失真(最大吸收波长差异大于±2 nm)的最大浓度作为方法的检测限。结果表明,浓度为0.5 μg/mL,光谱图失真;浓度为1 μg/mL,光谱图不失真。

2.5.5 耐用性 通过对柱温、流动相比例、流速和

色谱柱的进行改变,多西环素保留时间受柱温影响较小,随柱温升高,保留时间略提前;随流动相有机相比例的增加,多西环素的保留时间前移,但对分离度并未产生明显的影响;随着流速的增加,保留时间明显提前;三种不同品牌色谱柱均可用于该检查,仅保留时间不同。结果显示,本方法耐用性较

好,能够满足检测要求。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 利用二极管阵列检测器,在 190~400 nm 波长范围内进行紫外吸收图谱扫描,多西环素在 280 nm 波长处有最大吸收,对所选的 17 种兽药制剂进行紫外扫描发现,在 280 nm 附近都不会产生干扰,所以选择 280 nm 为检测波长。

3.2 流动相选择 参考相关文献^[6-8],分别比较了 0.1 mol/L 磷酸二氢铵:乙腈:甲醇(58:20:22), 0.05 mol/L 草酸铵溶液-N,N 二甲基甲酰胺-0.2 mol/L 磷酸氢二铵溶液(65:30:5)和醋酸盐缓冲液(0.25 mol/L 醋酸铵-0.1 mol/L 乙二胺四醋酸二钠-三乙胺(100:10:1)-乙腈(80:20),发现采用醋酸盐缓冲液-乙腈(80:20)时,多西环素峰型对称,与各供试品主成分分离情况良好。因此选择了醋酸盐缓冲液-乙腈(80:20)为流动相。

3.3 检测限 本实验采用的 HPLC-DAD 法测定兽药制剂中非法添加多西环素,以光谱图失真的最大浓度作为本方法的检测限,根据现有仪器条件,当多西环素的上机浓度低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,光谱图已严重失真。则多西环素在各制剂中的检测限为 0.5 mg/g(或 mg/mL)。

3.4 回收试验的影响因素 由于本试验采用的是空白添加的方法,非法添加的称样量将直接影响回收率的结果。本实验添加浓度为 1% 时,非法添加的称样量较少(10 mg 左右),采用称量纸直接称重法,称量误差较大,造成回收率偏低或者偏高。另外,由于多西环素属于酸碱两性物质,在酸性溶液($\text{pH} < 2$)、中性或碱性($\text{pH} > 7$)均易发生降解,某些制剂的辅料和主药与多西环素互相作用也可能会影响回收率的结果,这还待进一步考察。

3.5 稀释溶剂的选择 多西环素在水或甲醇中易溶,但多西环素的水溶液极不稳定,在弱酸性溶液中相对稳定,因此,选择 0.01 mol/L 盐酸溶液作为

稀释剂。同时,由于氟苯尼考类在水中微溶解,用 0.01 mol/L 盐酸溶液溶解时,会出现白色沉淀,造成非法添加成分溶解不完全;加入 10 mL 乙腈,可以使取样量的氟苯尼考类制剂完全溶解,再加入 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释时,不会有沉淀析出。

4 结论

本文建立了 HPLC-DAD 法检测 17 种兽药制剂中非法添加多西环素的检测方法,结合液相色谱保留时间和紫外光谱两方面的信息,结合峰纯度检查,增强了检测结果的准确度,实现兽药中非法添加物的高效、快速、准确识别。该方法具有操作简便、回收率高、灵敏度高等特点,可以用于兽药制剂中多西环素的检测,并为打击兽药制剂非法添加多西环素制假行为,提供了有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 兽药使用指南(化学药品卷)[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [2] 周媛,贡玉清,邵德佳. 有关中兽药中非法添加化学药物的探讨[J]. 中兽医医药杂志,2010,4(3):28-30.
- [3] 丁祥军. 多西环素分析方法研究进展[J]. 数理医药学杂志,2008,(2):115-116.
- [4] 刘福艳,李晓燕,黄金丽,等. HPLC-DAD 法同时检测抗炎类中药制剂中非法掺入的 6 种四环素类抗生素[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(7):531-535.
- [5] 董玲玲,范强,杨星,等. 氟苯尼考粉中非法添加烟酰胺和氨茶碱的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2014,48(5):47-50.
- [6] 李永梅. HPLC 法对氟尼康中盐酸多西环素及氟苯尼考含量的测定[J]. 中国当代医药,2009,16(13):68-70.
- [7] 李向超,黄显会,曾振灵. 多西环素注射液的研制及其含量测定[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(8):217-220.
- [8] 刘智钧,张玉莲. 盐酸多西环素含量测定方法的比较[J]. 广东化工,2012,39(7):188-189.

(编辑:侯向辉)