

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.10

高效液相色谱法同时测定兽用 复方氨基比林注射液中二组分含量的研究

陈锡龙, 孙真峥, 王庆红

(贵州省兽药饲料监察所, 贵阳 550003)

[收稿日期] 2017-03-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 09-0056-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了兽用复方氨基比林注射液二组分含量测定的高效液相色谱法。以 C18 柱为固定相, 0.05 mol/L 的磷酸二氢钾(用三乙胺调节 pH 值到 8.2): 乙腈 = 75 : 25 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 240 nm。采用外标法定量计算含量。巴比妥的线性范围为 5.6~280 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 回归方程为 $y = 21.856x + 42.143$ ($n = 5$), 相关系数 $R^2 = 1.0000$; 氨基比林的线性范围为 14.3~715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 回归方程为 $y = 22.267x - 13.009$ ($n = 5$), 相关系数 $R^2 = 1.0000$ 。巴比妥 80%、100%、120% 三个添加水平的回收率在 97.86%~101.06% 之间, 相应的氨基比林的回收率在 99.48%~100.84% 之间。方法专属性强, 灵敏度佳, 准确度高, 能够有效控制兽用复方氨基比林注射液的质量。

[关键词] 复方氨基比林注射液; 含量测定; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Two Components in Veterinary Compound Aminophenazone Injection by HPLC

CHEN Xi-long, SUN Zhen-zheng, WANG Qing-hong

(Guizhou Provincial Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feeds, Guiyang 550003, China)

Abstract: A method was developed to determine two components of veterinary Compound Aminophenazone Injection by HPLC, with C18 column as stationary phase, a solution of 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 8.2 by triethylamine)-acetonitrile = 75 : 25 as mobile phase, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 degree Celsius, and wavelength of 240 nm. It was quantified by external standard method and the linear range of barbital was between 5.6 and 280.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the regression equation was $y = 21.856x + 42.143$, $R^2 = 1.0000$; the linear range of aminophenazone was between 14.3 and 715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the regression equation was $y = 22.267x - 13.009$, $R^2 = 1.0000$. Results showed that recoveries of 80%, 100%, 120% adding level of barbital were between 97.86% and 101.06%, and relative recoveries of aminophenazone were between 99.48% and 100.84%. The method was precise, specific and accurate, and could be used for the content determination of veterinary Compound Aminophenazone Injection.

Key words: compound aminophenazone injection; content determination; HPLC

兽用复方氨基比林注射液为临床常用的解热镇痛药,主要用于马、牛、羊、猪等动物的解热和抗风湿,也可用于马和骡的疝痛。复方氨基比林注射液收载于 2015 版《中华人民共和国兽药典》^[1],其两个组分的含量测定均采用滴定法。该方法操作繁琐,专属性不强^[2]。有文献^[2-4]报道了人用药品中复方氨基比林注射液或复方氨基比林注射液三组分的 HPLC 测定法,但关于兽药的测定法未见报道。文献^[5-6]只报道了兽药安痛定注射液中氨基比林和安替比林含量的 HPLC 法,但不包括巴比妥。本试验采用普通 C18 柱作为固定相,通过高效液相色谱法同时测定了复方氨基比林注射液中两个组分的含量,并进行了方法学验证。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂 Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(配紫外检测器);BP211D 型电子分析天平(德国塞多利斯公司);巴比妥对照品(中国食品药品检

定研究院,批号:171202-201206,含量:99.6%);氨基比林对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100503-201302,含量:99.9%);试验样品复方氨基比林注射液四批,规格均为 10 mL:氨基比林 0.715 g+巴比妥 0.285 g,编号分别为:A、B、C、D(标称生产企业名称及批号分别为:上海申亚动物保健品有限公司,150531;山西易多利动物药业有限公司,150801;上海申亚动物保健品有限公司,160319;遵义县兽药厂,160401);甲醇为色谱纯;水为纯净水;其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax SB C18(5 μm, 4.6 mm×250 mm);流动相:0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调节 pH 值到 8.2):乙腈=75:25;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 240 nm^[2-3];进样体积为 10 μL。在此色谱条件下,复方氨基比林混合标准溶液及供试品溶液色谱图见图 1。

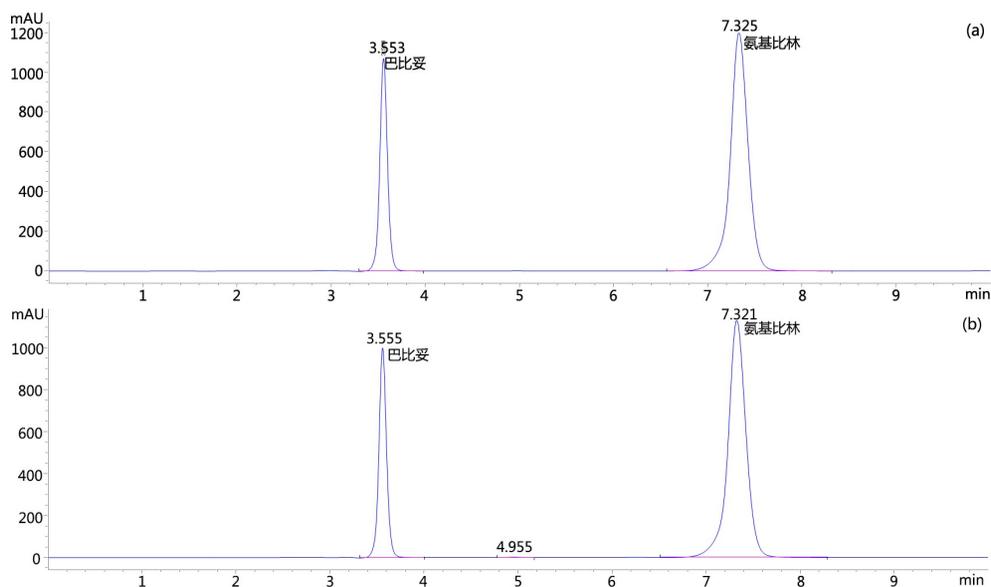


图 1 复方氨基比林混合标准溶液 (a) 及供试品溶液 (b) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of standards (a) and sample (b) of compound aminophenazone

1.2.2 标准溶液的制备 分别精密称取巴比妥对照品 28.0 mg 和氨基比林对照品 71.5 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,混匀,即得巴比妥浓度为 280.0 μg/mL,氨基比林浓度为

715.0 μg/mL 的氨基比林混合标准溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备 精密量取复方氨基比林注射液 1.00 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,混匀,制成巴比妥浓度为

285.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氨基比林浓度为 715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的复方氨基比林溶液作为供试品溶液。

2 结果

2.1 线性范围 精密量取巴比妥浓度为 280.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氨基比林浓度为 715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨基比林混合标准溶液适量, 分别置于 10 mL 容量瓶

中, 加流动相稀释至刻度, 得含巴比妥浓度分别为 5.6、28.0、56.0、140.0、280.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和氨基比林浓度分别为 14.3、71.5、143.0、357.5、715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液系列。精密吸取各标准溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。巴比妥及氨基比林标准曲线数据分别见表 1 和表 2。

表 1 巴比妥溶液的标准曲线数据

Tab 1 Data of barbital standard curve

级别 Level	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration	峰面积 Peak area	线性方程 Linear equation
1	5.6	174.20	$y = 21.856x + 42.143$ $R^2 = 1.0000$
2	28.0	656.41	
3	56.0	1253.10	
4	140.0	3099.60	
5	280.0	6165.10	

表 2 氨基比林溶液的标准曲线数据

Tab 2 Data of aminophenazone standard curve

级别 Level	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration	峰面积 Peak area	线性方程 Linear equation
1	14.3	318.84	$y = 22.267x - 13.009$ $R^2 = 1.0000$
2	71.5	1568.60	
3	143.0	3170.90	
4	357.5	7940.10	
5	715.0	15912.00	

2.2 仪器精密度试验 精密量取巴比妥浓度为 280.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和氨基比林浓度为 715.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液 10 μL , 上机测定。重复测定 6 次, 巴比妥和氨基比林测量结果峰面积的 RSD 值分别为 0.04% 和 0.08%, 说明方法具有良好的精密度。

2.3 重复性试验 取批号为 160401 的 D 样品, 精密量取适量, 分别按标示量用流动相稀释制成 1 mL 含巴比妥 285.0 μg 和氨基比林 715.0 μg 的供试品溶液, 作 6 个平行, 按上述方法中的色谱条件测定, 每个平行进样 2 针, 结果巴比妥和氨基比林的平均含量分别为标示含量的 96.0% 和 95.1%, RSD 值分别为 0.05% 和 0.06%。

2.4 回收率试验 精密称取巴比妥和氨基比林标准物质适量, 按处方分别制成含巴比妥和氨基比林分别为 80%(L)、100%(M)、120%(H) 的三种不同浓度的添加样品各 3 份, 然后分别量取 100 μL 添加样品置 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并定容至刻度。精密吸取 10 μL 上机测定, 计算各添加样品的回收率, 结果见表 3 和表 4。

2.5 溶液稳定性试验 取复方氨基比林注射液, 精密量取适量, 用流动相稀释制成 1 mL 含巴比妥 285.0 μg 和氨基比林 715.0 μg 的供试品溶液, 分别于 0、12、24 h, 测定峰面积, 结果表明溶液在 24 h 内稳定。

表 3 巴比妥回收率试验结果

Tab 3 Recovery results of barbital in different adding level

添加水平 Adding level	加入量/mg Added amount/mg	测得量/mg Tested amount/mg	回收率/% Recovery/%	平均回收率/% Average recovery/%	RSD/%
L	23.56	23.81	101.06	99.06	1.76
	22.52	22.13	98.27		
	22.92	22.43	97.86		
M	28.25	28.61	101.27	99.91	1.51
	28.41	28.46	100.18		
	28.11	27.63	98.29		
H	34.46	34.16	99.13	99.06	0.56
	34.79	34.26	98.48		
	33.69	33.55	99.58		

表 4 氨基比林回收率试验结果

Tab 4 Recovery results of aminophenazone in different adding level

添加水平 Adding level	加入量/mg Added amount/mg	测得量/mg Tested amount/mg	回收率/% Recovery/%	平均回收率/% Average recovery/%	RSD/%
L	58.22	58.06	99.73	99.84	0.20
	57.36	57.20	99.72		
	58.39	58.43	100.07		
M	71.56	71.62	100.84	100.40	0.57
	72.45	72.90	100.62		
	75.63	75.44	99.75		
H	85.66	85.34	99.63	99.65	0.18
	84.69	84.55	99.83		
	88.42	87.96	99.48		

2.6 样品含量的测定 取 A、B、C、D 四公司生产的复方氨基比林注射液样品,精密量取 1.00 mL 置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,作为供试品溶液,精密吸取 10 μ L 上机测定。另取 1 mL 含巴比妥 280.0 μ g 和氨基比林 715.0 μ g 的混合标准溶液,作为对照品溶液,同法测定。按外标法以峰面积计算含量,巴比妥结果分别为 96.6%、95.0%、94.9% 和 95.9%;氨基比林结果分别为 101.9%、99.8%、96.1% 和 95.1%。而传统的滴定法对应的巴比妥测量结果分别为 102.6%、103.2%、99.1% 和 95.7%;氨基比林结果分别为 99.4%、103.2%、

100.0% 和 98.2%。

3 讨论与小结

3.1 流动相 pH 值的选择 使用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈作为流动相时,巴比妥和氨基比林的色谱峰重合在一起无法分离。当用三乙胺调节 pH 值到 8.0 以上时,即可把巴比妥和氨基比林的色谱峰分离开。pH 越高,得到的峰形越好,不过,普通的 C18 柱对 pH 值的耐受有限,一般应低于 8.0,最高不能超过 8.5。为避免操作不当损坏柱子,故选择用三乙胺调节 pH 值为 8.2 的 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈作为流动相。

3.2 流动相比比例的选择 使用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调节 pH 值到 8.2) : 乙腈 = 73 : 27、75 : 25 及 80 : 20 的比例运行样品,其中,73 : 27 的流动相在运行低浓度样品时,巴比妥的色谱峰会受到试剂峰或杂质峰的干扰;80 : 20 的流动相运行样品时,氨基比林的色谱峰拖尾较严重,峰形较差;而 75 : 25 的流动相峰形良好,保留时间适当,故选择使用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调节 pH 值到 8.2) : 乙腈 = 75 : 25 作为流动相。

3.3 色谱柱的选择 分别采用粒径 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm Waters 公司的 Symmetry C18, Agilent 公司的 ZORBAX SB-C18、5TC-C18(2), Shimadzu 公司的 VP-ODS C18 以及粒径 3.5 μm , 4.6 mm \times 100 mm 的 Agilent 公司的 Eclipse plus C18 色谱柱进行试验。结果表明,普通的 C18 柱在弱碱性条件下均可分离复方氨基比林注射液中的两个组分。同时,由于流动相的 pH 值较高,为避免碱性物质对色谱柱造成损害,宜使用专用的色谱柱。

3.4 滴定法与液相法对检测结果的影响及原因 复方氨基比林注射液的含量采用传统的滴定方法进行测定时,所得到的巴比妥的结果略有偏高,这与检测员判断滴定是否到达终点有比较密切的关系。当滴定已经到达终点时,滴定经验不够丰富的检测员一般不敢断定为终点,而是要等到混浊比较明显时才会终止滴定,而此时终点已过,故滴定结果一般均会略有偏高。同时,样品中的某些杂质如氯离子等可能也会影响对终点的判定。采用高效液相色谱法进行测量,结果更为准确,因为减少了人为因素带来的终点误差。

3.5 试验方法与文献报道方法的差异 曾有文献报道了人用药品复方氨基比林注射液或复方氨基比林注射液三组份含量测定的高效液相色谱法。但李世彩等^[3]所采用的磷酸缓冲液为磷酸二氢钾及磷酸氢二钾混合配制而成,未使用三乙胺调节 pH 值;而杨锡祥等报道的方法^[2]中未给出磷酸盐缓冲液的配制方法,但使用三乙胺调节 pH 值至 8.0,使用的色谱柱长度分别为 150 mm 和 200 mm。许润娟等^[4]使用的流动相为乙腈-0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠-三乙胺(35 : 65 : 0.05,用 50%醋酸调

节 pH 到 8.0), 色谱柱长度为 250 mm, 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。试验中使用的是常用的 250 mm 长的色谱柱,并大胆地把 pH 值提高到 8.2,得到的色谱峰峰形也极为理想。其次,流动相比比例与文献报道的也略有差异。虽然 240 nm 的检测波长并非氨基比林及巴比妥的最佳检测波长,但在该波长下巴比妥的色谱峰峰形尖锐,峰宽较窄,不易受到试剂峰的干扰,故也选择 240 nm 作为检测波长。

3.6 小结 采用 C18 柱作为固定相,0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调节 pH 值到 8.2) : 乙腈 = 75 : 25 作为流动相,使用高效液相色谱法测定兽用复方氨基比林注射液的含量,方法专属性强,灵敏度佳,准确度高,能够有效控制兽用复方氨基比林注射液的质量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典, 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 281-282. Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, first edition in 2015[S]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2016: 281-282.
- [2] 杨锡祥, 张影. 高效液相色谱法同时测定复方氨基比林注射液三组份的含量[J]. 安徽医药, 2009, 13(3): 271-273. Yang X X, Zhang Y. Determination of compound aminopyrine, quinizine, barbitone injection by HPLC[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2009, 13(3): 271-273.
- [3] 李世彩, 牛景云, 孙山. 复方氨基比林注射液三组份的 HPLC 测定[J]. 中国药业, 2000, 9(6): 24-32. Li S C, Liu J Y, Sun S. Determination of compound aminopyrine, quinizine, barbitone injection by HPLC[J]. China Pharmaceuticals, 2000, 9(6): 24-32.
- [4] 许润娟, 魏雪芳. RP-HPLC 法测定复方氨基比林注射液三组份的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(8): 967-969. Xu R J, Wei X F. Determination of three component in compound anlin barbituo injection [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2005, 25(8): 967-969.
- [5] 刘红云, 郑举, 张莉, 等. HPLC 法同时测定安痛定注射液中氨基比林和安替比林的含量[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(9): 5-7. Liu H Y, Zheng J, Zhang L. Simultaneous determination of aminophenazone and phenazone in antondine injection by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(9): 5-7.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.11

中药防治鸡大肠杆菌病的研究进展

张璐, 龚旭昊, 戴青, 王静文, 范强*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-03-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 09-0061-07 [中图分类号] S853.74

[摘要] 利用中药防治鸡大肠杆菌病已成为近几年兽医药界研究的热点, 并得到广泛认可。检索国内外相关文献, 从中药作用机理、试验研究和临床实践三个方面进行综述, 分析在研究和应用过程中存在的问题, 并提出加强中药体内抑菌作用、抗炎作用和质粒消除作用机理研究, 明确处方作用机理以优化中药配伍, 完善中药质量控制体系以增强疗效等建议, 为促进中药在防治鸡大肠杆菌病中的广泛应用提供参考。

[关键词] 中药; 鸡大肠杆菌病; 机理; 临床

Research Progress on Prophylaxis and Treatment of Chicken Colibacillosis using Chinese Materia Medica

ZHANG Lu, GONG Xu-hao, DAI Qing, WANG Jing-wen, FAN Qiang*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: FAN Qiang, E-mail: fanqiang@ivdc.org.cn

Abstract: Using Chinese materia medica to prevent and treat chicken colibacillosis has become a focus in the fields of veterinary in recent years and has been widely recognized. In this paper, the mechanism of Chinese materia medica, experimental study and clinical practice were summarized through consulting the domestic and foreign literature. Analyze the problems of research and application. Propose that we should enhance the research of antibacterial effect *in vivo*, anti-inflammatory effect and plasmid elimination effect. We'd better make the mechanism clear to optimize the prescription compatibility and improve the quality control system in order to enhance curative effect. We hope that Chinese materia medica can be widely used in prevention and control of chicken colibacillosis.

Key words: Chinese materia medica; chicken colibacillosis; mechanism; clinic

作者简介: 张璐, 从事中兽药的检验和研究工作。

通讯作者: 范强。E-mail: fanqiang@ivdc.org.cn

[6] 闰小峰, 孙志文. 高效液相色谱法测定安痛定注射液中氨基比林和安替比林的含量[J]. 中国兽药杂志, 2011, 47(2): 77-79.

Yuan X F, Sun Z W. Determination of aminophenazone and

phenazone in antondine injection by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 47(2): 77-79.