

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.06

HPLC 法测定盐酸二氟沙星粉中二氟沙星的含量

陈晓林, 陆春波, 陈慧华, 林仙军, 包爱情*

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101)

[收稿日期] 2017-12-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0035-08 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立并验证了高效液相色谱法测定盐酸二氟沙星粉中二氟沙星含量的方法。采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以磷酸溶液(取磷酸 3.0 mL, 加水至 1000 mL, 用三乙胺调节 pH 至 3.0±0.1, 加乙腈 50 mL)-甲醇(78:22, V/V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 波长 273 nm。试验结果表明二氟沙星在 2~100 μg/mL 范围内线性良好, $R^2=0.9999$, 平均回收率为 98.1% ($n=9$), RSD 为 1.0%。本文开发的方法与农业部公告 1960 号刊载的紫外分光光度法相比具有更好的专属性, 同时简便、快速、准确, 适用于产品的质量控制。

[关键词] 盐酸二氟沙星; 含量测定; 高效液相色谱法

Content Determination of Difloxacin in Difloxacin Hydrochloride Powder by HPLC

CHEN Xiao-lin, LU Chun-bo, CHEN Hui-hua, LIN Xian-jun, BAO Ai-qing*

(Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 311101, China)

Corresponding author: BAO Ai-qing, E-mail: baoaiqing@126.com

Abstract: A method for determination of difloxacin in difloxacin hydrochloride powder by HPLC was developed and validated. Analysis was performed on a C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of phosphorous acid solution(3.0 mL phosphoric acid was diluted to 1000 mL water and adjusted with triethylamine to pH of 3.0±0.1, then add 50 mL acetonitrile)-methanol (78:22, V/V) with a 1.0 mL/min flow rate in 30 ℃ condition. The determination wave length was 273 nm. The results showed that the calibration curve was linear in the range of 2~100 μg/mL ($R^2=0.9999$), and the average recovery was 98.1% ($n=9$) with RSD of 1.0%. The method in No. 1960 bulletin of the Ministry of Agriculture is a ultraviolet spectrophotometry method. In contrast with the ultraviolet spectrophotometry method, the method developed in this article has higher specificity. This method was convenient, rapid, and accurate, which was suitable to control the quality of difloxacin hydrochloride powder.

Key words: difloxacin hydrochloride; content determination; high performance liquid chromatography (HPLC)

作者简介: 陈晓林, 从事兽药检测工作。

通讯作者: 包爱情。E-mail: baoaiqing@126.com

二氟沙星是畜禽专用的第三代喹诺酮类药物,又名双氟沙星,由美国 Abbott 公司在 1984 年研制,其盐酸盐制剂已经在国内兽医临床上有着广泛的应用^[1-2]。盐酸二氟沙星常用于敏感细菌如大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄菌、变形杆菌、多杀性巴氏杆菌等引起的畜禽慢性呼吸道病、气管炎、肠炎、肺炎、禽霍乱、链球菌病、伤寒等疾病,尤其对鸡的大肠杆菌病,仔猪红、黄、白痢有特效^[3-4]。二氟沙星结构如图 1 所示,因在喹诺酮环的 N1 位引入 4-氟苯基,抗菌谱扩大,抗革兰阳性菌尤其是链球菌和铜绿假单胞菌的活性进一步增强,并改善了药物动力学特征,相对减小了对幼年动物的软组织的损伤和毒副作用。在 C7 位引入甲基哌嗪,增加了抗革兰阳性菌的活性,改善了对酶的拮抗作用^[5]。盐酸二氟沙星粉,收录于农业部公告 1960 号^[6],采用紫外-可见分光光度法对其鉴别和含量进行测定。但该方法专属性较差,通过比较农业部 1960 号收录的二氟沙星制剂,恩诺沙星制剂及诺氟沙星制剂的标准,发现三者最大吸收波长非常接近。因此,通过紫外方法测定盐酸二氟沙星粉中二氟沙星的含量,方法专属性较差,易受到不法企业非法添加的恩诺沙星或者诺氟沙星等化合物的影响。二氟沙星与恩诺沙星、诺氟沙星等比较,原料价格较高。农业部于 2015 年发布了 2292 号公告^[7],公告规定自 2015 年 12 月 31 日起,停止生产用于食品动物的洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种原料药的各种盐、酯及其各种制剂,涉及的相关企业的兽药产品批准文号同时撤销。在抽检的样品中发现了检出诺氟沙星的盐酸二氟沙星粉样品。恩诺沙星使用广泛,价格低廉且未被禁用,虽未发现使用恩诺沙星替代其他喹诺酮类药物的实例,但亦有较大潜在风险。因此,开发专属性更强的液相方法,对控制产品质量,打击不法企业弄虚作假有重要意义。当前涉及到二氟沙星含量检测的方法多集中在动物组织中^[8-10],对盐酸二氟沙星制剂中二氟沙星含量测定的研究尚未见报道。

本文对盐酸二氟沙星粉中二氟沙星含量检测的液相方法进行了研究,开发了高效液相色谱法测

定盐酸二氟沙星粉中二氟沙星的含量,并对方法进行了验证。

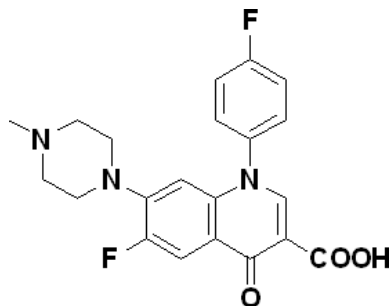


图 1 二氟沙星结构简式

Fig 1 Structural formula of difloxacin

1 材料

1.1 仪器 Aglient 1260 高效液相色谱仪,配安捷伦二极管阵列检测器,美国 Aglient 公司;XS-205 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;KQ-500E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与材料 甲醇、乙腈为色谱纯,Merck KGaA 公司,其余试剂均为分析纯;实验用水为 milli-Q 超纯水。盐酸二氟沙星对照品(来源:中国兽医药品监察所,批号:H0401204,含量:99.6%);恩诺沙星(来源:中国兽医药品监察所,批号:H0081505,含量:99.5%);环丙沙星(来源:中国食品药品检定研究院,批号:130451-201203,含量:84.2%);氧氟沙星(来源:中国食品药品检定研究院,批号:130454-201206,含量:99.5%);诺氟沙星(来源:中国食品药品检定研究院,批号:130450-201206,含量:99.5%);盐酸二氟沙星粉供试品 1(规格 5%),由 X 厂生产;盐酸二氟沙星粉供试品 2、3(规格 5%),由 Y 厂生产;盐酸二氟沙星粉供试品 4(规格 5%)由 Z 厂生产。

2 方法与结果

2.1 喹诺酮类药物的紫外相似性 喹诺酮类药物由于其结构较为相似,紫外光谱图往往也较为相似,农业部 1960 号公告中收录的三种喹诺酮制剂鉴别均为紫外-可见分光光度法,最大吸收波长差值均在 2 nm 以内,见表 1,故仅通过紫外光谱图或

者最大吸收波长来判断可能会出现差错。

表 1 喹诺酮类药物最大紫外吸收波长

Tab 1 The maximum ultraviolet absorption wavelength of quinolones

制剂名称	化合物	紫外最大吸收波长/nm
盐酸二氟沙星粉	二氟沙星	273、323、334
恩诺沙星可溶性粉	恩诺沙星	271、322、334
烟酸诺氟沙星可溶性粉	诺氟沙星	271、323、335

2.2 色谱条件 色谱柱:Waters XSelect CSH C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:磷酸溶液(取磷酸 3.0 mL,加水至 1000 mL,用三乙胺调节 pH 至 3.0±0.1,加乙腈 50 mL,下称磷酸溶液)-甲醇(78 : 22, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;扫描波长:210~400 nm,记录 273 nm 的色谱图;进样量:20 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取盐酸二氟沙星对照品 25.65 mg,置 50 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL,超声使溶解,冷却至室温,用水稀释并定容至刻度,作为对照品储备液(含二氟沙星约 500 μg/mL)。精密量取适量,用磷酸溶液稀释成 50 μg/mL 的对照品溶液,即得。

2.3.2 系统适应性溶液 分别精密称取恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星对照品 25.89、22.92、24.08、25.27 mg 置 50 mL 量瓶中,各加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL,超声使溶解,冷却

至室温,用水稀释并定容至刻度,各喹诺酮药物浓度均约 500 μg/mL。精密量取上述喹诺酮溶液与对照品储备液溶液 5 mL 置同一 50 mL 量瓶中,用磷酸溶液稀释至刻度,即得。

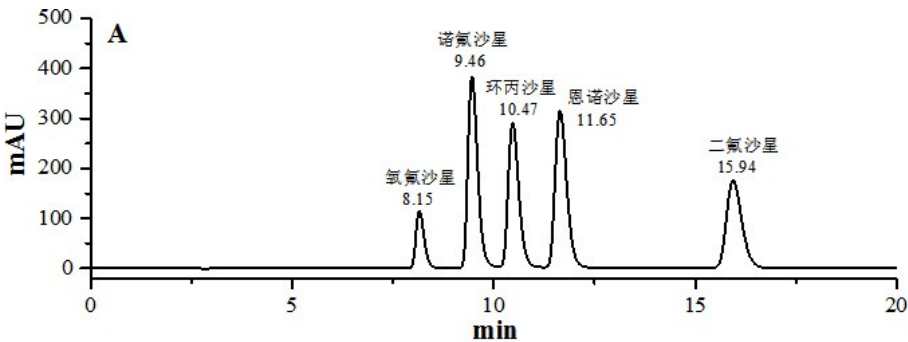
2.3.3 供试品溶液 精密称取供试品适量(约相当于二氟沙星 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL,超声使溶解,冷却至室温,用水稀释并定容至刻度。精密量取上述溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,用磷酸溶液稀释至刻度。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验 5 种喹诺酮类药物在试验条件下完全分离,分离度均大于 2.1,各化合物的色谱峰理论塔板数均大于 7000,方法专属性良好。系统适应性溶液色谱图及相应对照品光谱图见图 2。

2.4.2 线性范围 精密量取对照品储备液适量,用磷酸溶液稀释成 2,5,10,25,50,100 μg/mL 的系列对照品溶液,按上述色谱条件,精密量取 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积,以峰面积积分值(Y)对浓度(X,μg/mL)进行线性回归计算,方程为: $Y=103.72X+5.33$ ($R^2=0.9999$),线性范围为 2~100 μg/mL。结果表明在线性范围内,二氟沙星浓度与峰面积呈现良好的线性关系。盐酸二氟沙星对照品溶液(50 μg/mL)色谱图见图 3。

2.4.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL,按上述色谱条件,连续重复进样 6 次,记录峰面积,计算结果,二氟沙星峰面积的 RSD 为 0.1%,表明仪器精密度良好。



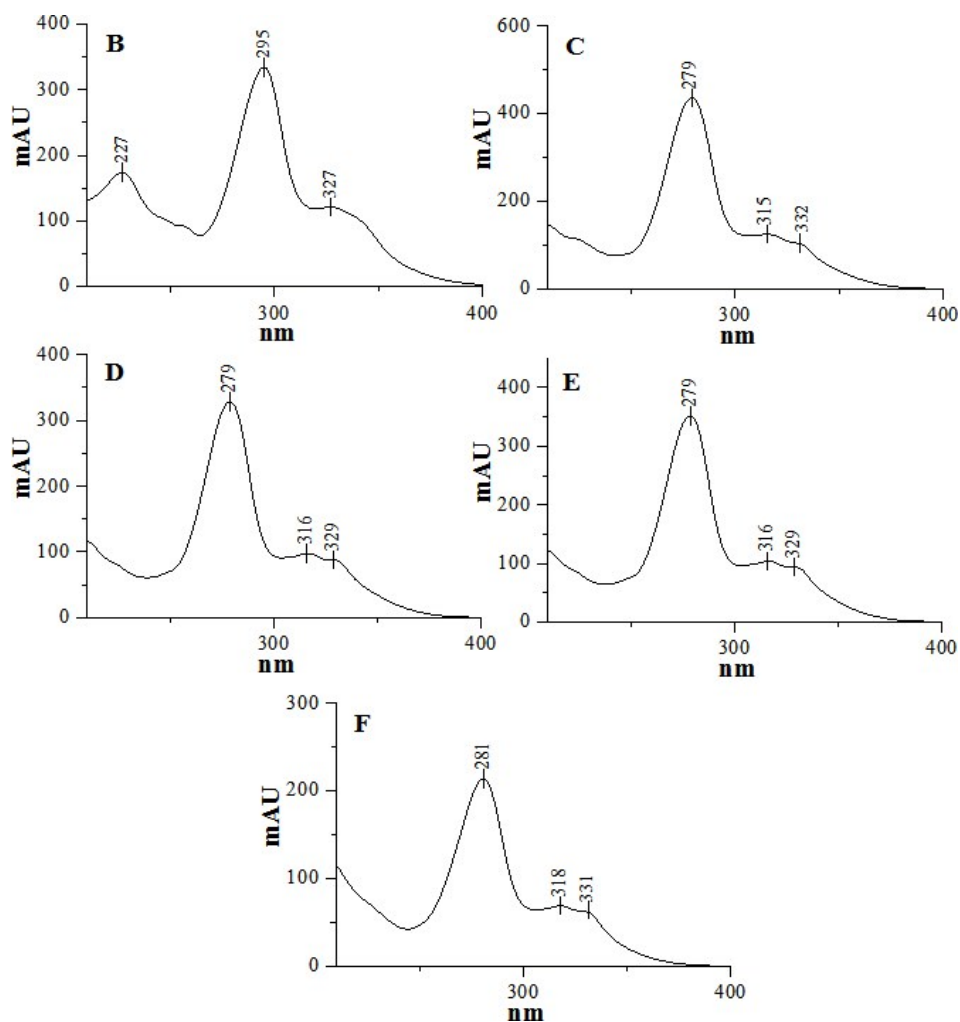


图 2 系统适应性色谱图 (A) 及氧氟沙星对照品光谱图 (B)、诺氟沙星对照品光谱图 (C)、环丙沙星对照品光谱图 (D)、恩诺沙星对照品光谱图 (E)、盐酸二氟沙星对照品光谱图 (F)

Fig 2 Chromatogram of (A) system suitability and spectrograms of (B) ofloxacin reference substance (C) norfloxacin reference substance (D) ciprofloxacin reference substance (E) enrofloxacin reference substance (F) difloxacin hydrochloride reference substance

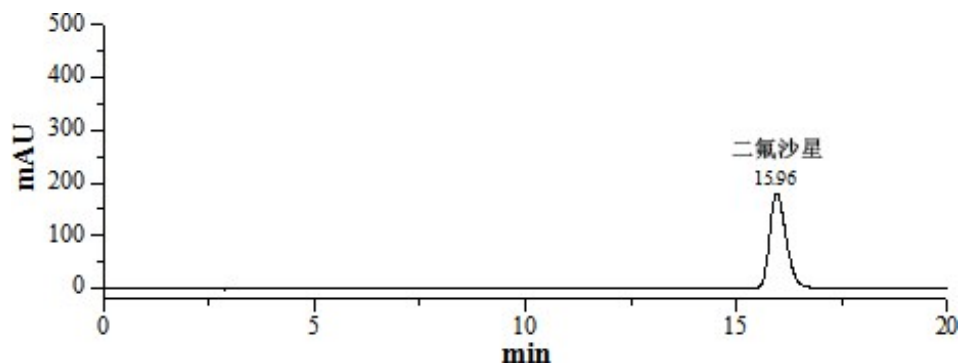


图 3 盐酸二氟沙星对照品溶液 (50 $\mu\text{g/mL}$) 色谱图

Fig 3 Chromatogram of difloxacin hydrochloride reference substance solution (50 $\mu\text{g/mL}$)

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(供试品 1),分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 20 μ L,记录色谱峰面积,二氟沙星峰面积的 *RSD* 为 0.4%。结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批供试品(供试品 1),照 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,测定供试品溶液中二氟沙星的含量。结果测得二氟沙星的含量均值为占标示量的 105.4%,*RSD* 为 0.2% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 准确称取已知含量的盐酸二氟沙星粉(供试品 1,规格 5%,含量为占标示量的 105.1%)0.25 g,共 9 份,置 50 mL 量瓶中,按高(120%)、中(100%)和低(80%)三个浓度水平分别添加盐酸二氟沙星对照品,制得向已知含量制剂中添加已知测定物的添加样品,每个浓度水平的添加样品分别制备 3 份,照 2.3.3 项方法制备。测定并计算回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果表($n=9$)

Tab 2 Results of recovery test ($n=9$)

编号	样品取样量/g	样品中二氟沙星质量/mg	盐酸二氟沙星对照品加入量/mg	对照品中二氟沙星质量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
H1	0.2436	12.80	16.21	14.79	27.35	98.4		
H2	0.2394	12.58	16.28	14.86	27.14	98.0		
H3	0.2514	13.21	16.02	14.62	27.39	97.0		
M1	0.2539	13.34	13.56	12.38	25.43	97.7		
M2	0.2587	13.59	13.51	12.33	25.84	99.4	98.1	1.0
M3	0.2489	13.08	13.85	12.64	25.46	97.9		
L1	0.2457	12.91	11.25	10.27	23.05	98.7		
L2	0.2399	12.61	11.39	10.40	22.96	99.5		
L3	0.2458	12.92	11.47	10.47	23.04	96.7		

2.4.7 耐用性 在选定的色谱条件下,比较了 Waters XSelect CSH C18(4.6 mm×250 mm,5 μ m)和 Aglient Eclipse XDB C18 (4.6 mm×250 mm,5 μ m)色谱柱,结果表明两者均可使 5 种喹诺酮药物分离良好;对温度进行了考察,在本文优化的流动相下选择温度为 25 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C 时,除出峰时间发生微小变化外,其余变化很小;将流动相中磷酸溶液与甲醇的比例调整为 75 : 25 和 81 : 19 进行测试,结果表明,流动相比比例的微调也仅能影响出峰时间,对峰形和理论塔板数影响甚小。综上所述,不同品牌的色谱柱、不同流动相有机相与水相比比例以及不同

温度,均能满足试验需要,方法耐用性较强。

2.5 实际样品测定 取不同的盐酸二氟沙星粉供试品,按 2.3.3 项下方法处理,按上述色谱条件进行测定,每个样品制备 2 份,计算样品中二氟沙星的含量,取平均值。供试品 1 与供试品 2 色谱图及供试品 2 主峰光谱图见图 4。试验中发现供试品 2 和供试品 3 中未检出二氟沙星而检出诺氟沙星,并将供试品 2 和供试品 3 主峰光谱图与诺氟沙星对照品光谱图比对,确认为诺氟沙星。同时将本文方法与农业部 1960 号公告中收录的紫外方法进行比较,见表 3。

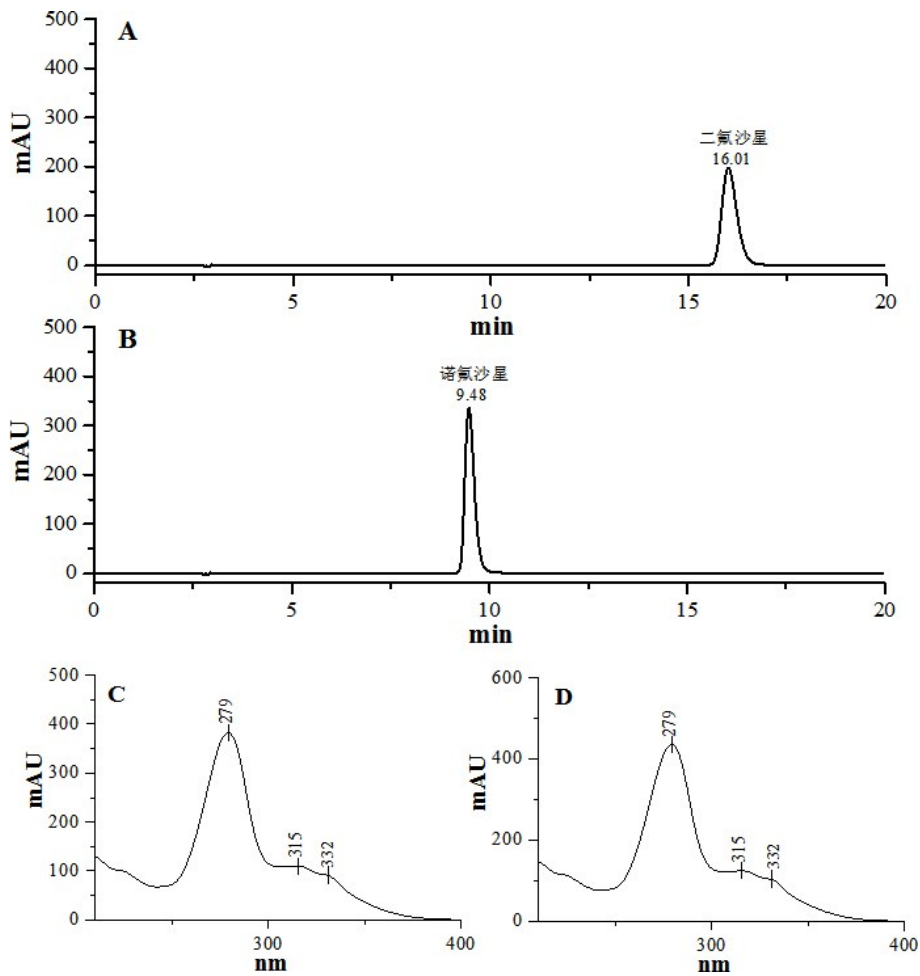


图 4 供试品 1(合格供试品) 色谱图(A)、供试品 2(异常供试品) 色谱图(B) 及供试品 2 主峰光谱图(C)、诺氟沙星对照品光谱图(D)

Fig 4 Chromatogram of (A) sample 1 (a qualified sample) (B) sample 2 (an abnormal sample) and spectrograms of (C) the main peak in sample 2 (D) norfloxacin reference substance

表 3 样品含量测定结果(标示量/%,n=2)

Tab 3 Results of content determination of samples (labelled amount/%, n=2)

供试品	本方法	农业部公告 1960 号紫外方法	两者偏差/ %	说明
1	105.4	105.1	0.1	
2	未检出	107.6	/	B、C 样品中并未检出二氟沙星, 检出诺氟沙星。
3	未检出	98.6	/	
4	108.0	107.8	0.1	

2.6 薄层色谱法鉴别盐酸二氟沙星粉中的二氟沙星 分别称取氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星和盐酸二氟沙星对照品各 50 mg, 加 5 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液使溶解, 加水稀释至 10 mL。取供试品适量, 用水稀释成含二氟沙星每

1 mL 中 5 mg 的溶液。取上述溶液各 1 μL, 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-苯-二乙胺-水(15 : 20 : 10 : 7 : 4) 为展开剂, 展开后, 晾干, 置紫外灯(254 nm) 下检视(薄层鉴别方法参照农业部公告 1960 号盐酸二氟沙星粉标准

中鉴别 1), 如图 5。二氟沙星与恩诺沙星在上述薄层色谱条件下, 斑点比移值 (R_f) 极为接近, 难以分

辨, 而二氟沙星与其他氟喹诺酮则相对容易区分。

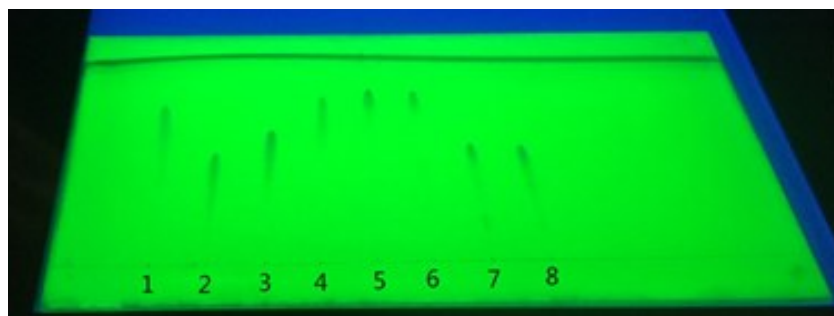


图 5 薄层色谱图 (1. 氧氟沙星溶液; 2. 诺氟沙星溶液; 3. 环丙沙星溶液; 4. 恩诺沙星溶液; 5. 二氟沙星溶液; 6. 供试品 1 (合格样品); 7. 供试品 2 溶液 (含诺氟沙星); 8. 供试品 3 溶液 (含诺氟沙星))

Fig 5 Thin-layer chromatograms of 1. ofloxacin solution, 2. norfloxacin solution, 3. ciprofloxacin solution, 4. enrofloxacin solution, 5. difloxacin hydrochloride solution, 6. Sample 1 solution (a qualified sample), 7. Sample 2 solution (a sample contains norfloxacin), 8. Sample 3 solution (a sample contains norfloxacin)

3 结 论

在波长选择上, 农业部公告 1960 号盐酸二氟沙星粉标准中规定供试品在 273 nm 波长处有最大吸收, 因此, 本文选用该波长作为检测波长。在流动相优化上, 本文参考了农业部公告 2448 号^[11]中《氟苯尼考粉和氟苯尼考预混剂中非法添加氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星检测方法》, 对其流动相中磷酸溶液和甲醇比例进行了适当调整, 使检测效率更高。

将本文开发的液相方法与农业部公告 1960 号中紫外方法进行比较, 试验数据显示两者在测定合格样品中二氟沙星含量时, 测定结果基本一致。但在针对使用诺氟沙星乃至其他喹诺酮类化合物替代本品中的二氟沙星时, 液相方法具有显著优势, 可轻易发现使用其他喹诺酮类药物替代二氟沙星的情况。由于恩诺沙星与二氟沙星在紫外光谱方面无法区分, 而在薄层色谱中又与二氟沙星非常接近, 因此, 使用现有标准对盐酸二氟沙星进行检测时如遇见使用恩诺沙星替代二氟沙星的情况, 有可能会将假药误判成合格样品。

本文开发的方法简便、准确、重现性好、专属性

强, 能够有效的控制该产品的质量, 为产品标准改进提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Stamm J M, Hanson C W, Chu D T, *et al.* *In vitro* evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones [J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1986, 29 (2): 193-200.
- [2] Fernandes P B, Chu D T, Bower R R, *et al.* *In vivo* evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones [J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1986, 29 (2): 201-208.
- [3] Hirschhorn L and Neu H C. Factors influencing the *in vitro* activity of two new aryl-fluoroquinolone antimicrobial agents, difloxacin (A-56619) and A-56620 [J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1986, 30 (1): 143-146.
- [4] Fernandez-Varon E, Carceles C M, Marin P, *et al.* Pharmacokinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular, and intragastric administration to horses [J]. *American journal of veterinary research*, 2006, 67 (6): 1076-1081.
- [5] Burkhardt J E, Hill M A, Carlton W W, *et al.* Histologic and Histochemical Changes in Articular Cartilages of Immature Beagle Dogs Dosed with Difloxacin, a Fluoroquinolone [J]. *Veterinary Pathology*, 1990, 27 (3): 162-170.
- [6] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 1960 号[S]. Ministry of Agriculture. No. 1960 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.07

阿维菌素残留溶剂气相色谱检测方法的建立

韩宁宁, 于晓辉, 戴青, 于丽娜, 赵晖, 杨秀玉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0042-04 [中图分类号] S859.83

[摘要] 采用 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷为固定相的毛细管柱, 进样口温度 220 ℃, 检测器温度 250 ℃, 载气: 氮气, 流速 5 mL/min, 进样量 0.2 μL, 分流比: 10:1, 程序升温: 初始温度为 50 ℃, 保持 5 min, 以每分钟 15 ℃ 的速率升温至 80 ℃, 再以每分钟 26.7 ℃ 的速率升温至 240 ℃。在该色谱条件下, 甲醇与内标异丙醇及溶剂间二甲苯分离度良好, 检出限为 6 μg/mL, 重复性 *RSD* 为 3.0%, 添加回收率为 90.8%。不同色谱柱、柱温、流速、不同进样口温度、不同检测器温度耐用性良好。结果表明该方法可用于阿维菌素残留溶剂的定量检测。

[关键词] 阿维菌素; 甲醇; 残留溶剂; 气相色谱法

Establishment of the Method for Determination of the Residual Solvent of Avermectin by Gas Chromatography

HAN Ning-ning, YU Xiao-hui, DAI Qing, YU Li-na, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu*

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

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: yangxiuyu@ivdc.gov.cn

Abstract: In order to establish a gas chromatographic method for the determination of the residual solvent of avermectin, a capillary column with 6% cyano propyl phenyl -94% two methyl polysiloxane as a stationary phase

作者简介: 韩宁宁, 硕士, 从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 杨秀玉。E-mail: yangxiuyu@ivdc.gov.cn

[7] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 2292 号[S].

Ministry of Agriculture. No. 2292 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].

[8] Galvidis I A, Burkin M A. Selective Immunodetection of Difloxacin in Animal Muscles and Sera: Role of Hapten Orientation [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1755-1764.

[9] Galvidis I A, Burkin M A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: difloxacin and sarafloxacin case [J]. Analytical Methods, 2016, 8(29): 5843-5850.

[10] Tayeb Cherif K, Peris-Vicente J, Carda-Broch S, *et al.* Analysis of danofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin and sarafloxacin in honey using micellar liquid chromatography and validation according to the 2002/657/EC decision [J]. Analytical Methods, 2015, 7(15): 6165-6172.

[11] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 2448 号[S].

Ministry of Agriculture. No. 2448 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].

(编辑: 侯向辉)