

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.07

# HPLC-PDA 法同时测定硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 4 种化学药物

熊 玥, 宋慧敏, 汪云花, 孙 瑶, 石慧慧

(江苏省兽药饲料质量检验所, 南京 210036)

[收稿日期] 2018-03-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0040-07 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立了同时测定硫酸新霉素可溶性粉中非法添加甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啉的 HPLC-PDA 方法。样品用甲醇提取, 经 C18 柱分离, 以磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 采用二极管阵列检测器进行全波长 (200~400 nm) 扫描, 提取波长为 230 nm。检查保留时间、峰纯度和光谱相似度, 对非法添加化学药物进行确证。结果表明, 4 种化学药物在 0.01~0.12 mg/mL 范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9998$ ); 回收率在 98.0%~99.9% 之间,  $RSD \leq 1.0\%$ , 检出限为 1~5 g/kg。该检测方法专属性强、操作简便, 可用于硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 4 种化学药物的测定。

**[关键词]** 硫酸新霉素可溶性粉; 非法添加; 高效液相色谱-二极管阵列法

## Simultaneous Determination of Four Kinds of Illegally Added Chemical Drugs in Neomycin Sulfate Soluble Powder by HPLC-PDA

XIONG Yue, SONG Hui-min, WANG Yun-hua, SUN Yao, SHI Hui-hui

(Jiangsu Testing Institute of Veterinary Drug and Feed, Nanjing 210036, China)

**Abstract:** To establish a method for simultaneous determination of illegally adding metronidazole, salicylic acid, mequindox and trimethoprim in neomycin sulfate soluble powder by the high performance liquid chromatography with photo-diode array detector (HPLC-PDA), samples were extracted by methanol. C18 column was applied with mobile phase consisting of sodium dihydrogen phosphate buffer-methanol (70 : 30) at a flow rate of 1.0 mL/min. The extract wavelength was 230 nm from the scanning of 200~400 nm by photo-diode array detector. Retention time, peak purity test and spectral similarity were helped to identify the four kinds of target analytes. The linearity in the correlation range of 0.01~0.12 mg/mL were good ( $r \geq 0.9998$ ). The recoveries ranged from 98.0% to 99.9% with the relative stand deviations ( $RSDs$ ) all below 1.0%. The limits of detection were from 1 to 5 g/kg. In conclusion, the method has good specificity and simple treatment, and can be used as a reliable way for detecting drugs adulterated in neomycin sulfate soluble powder.

**Key words:** neomycin sulfate soluble powder; illegal drug adulteration; HPLC-PDA

硫酸新霉素为氨基糖苷类抗生素,其制剂硫酸新霉素可溶性粉临床上主要用于治疗禽敏感的革兰氏阴性菌所致的胃肠道感染,是常见的兽用处方药<sup>[1]</sup>。甲硝唑为硝基咪唑类抗原虫药,用于牛毛滴虫病、肠道原虫病等,亦可广泛用于厌氧菌所致感染<sup>[2]</sup>。水杨酸是一种脂溶性的有机酸,具有中等程度的抗真菌作用<sup>[2]</sup>。乙酰甲喹为喹啉类药物,具有广谱抗菌活性,主要用于密螺旋体所致的猪痢疾和细菌性肠炎<sup>[2]</sup>。甲氧苄啶为广谱抗菌药,对多种革兰氏阳性菌及阴性菌均有抗菌作用,一般不单独做抗菌药使用,常作为增效剂与磺胺药联合应用<sup>[3]</sup>。目前市场上一些不法兽药生产企业为提高竞争力,常在制剂中非法添加一种或多种处方外化学药物以达到提高治疗效果的目的,给畜禽养殖业带来了安全隐患。农业农村部已加大了对兽药处方外非法添加的监管与打击力度,从 2015 年开始实施鉴别抽检和摸底抽检<sup>[4]</sup>,近年来又陆续发布了多个兽药处方外非法添加物检查的公告作为检验依据。近期,在进行非法添加常规筛查时<sup>[5]</sup>,发现两批硫酸新霉素可溶性粉供试品图谱中出现多个响应值较高的未知色谱峰,对比前期收集的化合物紫外光谱特征图,疑似检出处方外成分甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶。本文建立了同时测定硫酸新霉素可溶性粉中非法添加甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶的高效液相色谱法,对疑似阳性样品进行了确证,方法简单可靠,从而为非法添加检测方法研究提供了新的实验方法及数据。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters Arc 高效液相色谱仪配 2998 PDA 二极管阵列检测器和 Empower 3 色谱工作站软件(美国 Waters 公司)、XS105DU 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、FE20 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司)、KQ-300DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

## 1.2 试药与试剂

1.2.1 试剂 甲醇、三乙胺均为色谱纯(美国 Merck 公司);磷酸二氢钠、氢氧化钠为分析纯(南京化学试剂有限公司);水为超纯水。

1.2.2 对照品 甲硝唑对照品(含量:100.0%,批号:100191-201507,中国食品药品检定研究院)、水杨酸对照品(含量:99.3%,批号:100106-201605,中国食品药品检定研究院)、乙酰甲喹对照品(含量:99.6%,批号:H0111505,中国兽医药品监察所)、甲氧苄啶(含量:99.9%,批号:100031-201205,中国食品药品检定研究院)。

## 1.2.3 供试品

1.2.3.1 硫酸新霉素可溶性粉制剂空白 经检验不含甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶的企业报批产品,批号为 16101709,规格为 100 g:32.5 g(325 万单位)。

1.2.3.2 疑似阳性样品 两个样品均为 2017 年度国家兽药风险监测抽检的产品,其中硫酸新霉素可溶性粉样品 A,标称河北某企业生产,批号为 20151004,规格为 100 g:3.25 g(325 万单位);硫酸新霉素可溶性粉样品 B,标称福建某企业生产,批号为 20151201,规格为 100 g:6.5 g(650 万单位)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加水 1000 mL 使溶解,加三乙胺 0.5 mL,用氢氧化钠试液调节 pH 值至 7.0)-甲醇(70:30)为流动相,流速:1.0 mL/min,柱温:30 ℃,进样量:10 μL,二极管阵列检测器,采集波长范围为 200~400 nm,分辨率 1.2 nm,记录 230 nm 波长处的色谱图。

## 2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液制备 取供试品 1.0 g,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 40 mL,超声处理 15 min,静置,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过。取滤液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.2 混合对照品储备液及系统适用性溶液制备

分别取甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶对照品各 25 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 1 mg/mL 的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成

0.1 mg/mL 的系统适用性溶液。

### 2.2.3 硫酸新霉素可溶性粉制剂空白溶液制备

取硫酸新霉素可溶性粉制剂空白 1.0 g, 照 2.2.1 项下操作制成硫酸新霉素可溶性粉制剂空白溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 专属性及系统适用性考察 精密量取硫酸新霉素可溶性粉制剂空白溶液 10 μL, 照 2.1 项下

色谱条件, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图及光谱图。另取系统适用性溶液 10 μL, 同法操作。结果表明制剂空白溶液在 4 种被测物甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶相应的出峰位置处不产生干扰, 说明方法的专属性强; 4 种被测物色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度良好, 说明所选试验条件满足测定要求(图 1、图 2)。

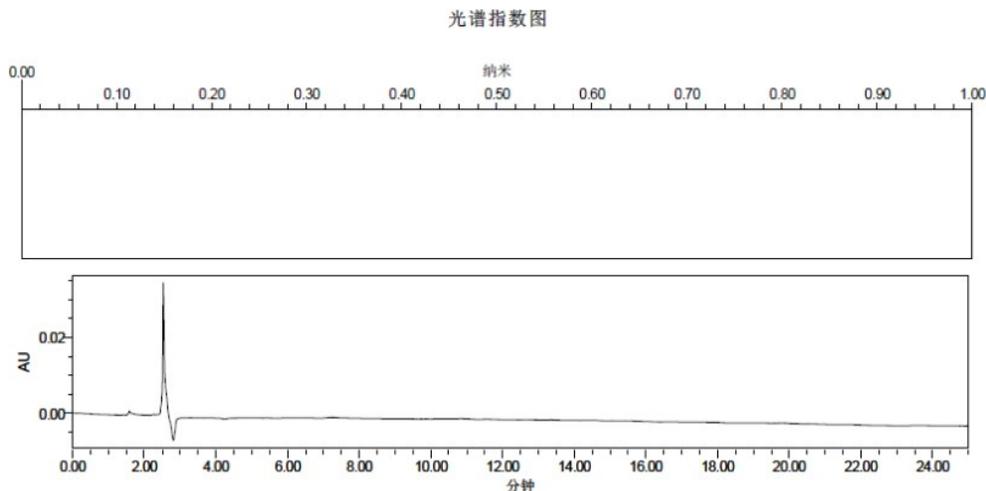


图 1 硫酸新霉素可溶性粉制剂空白溶液光谱指数图

Fig 1 Chromatogram and spectogram of blank solution

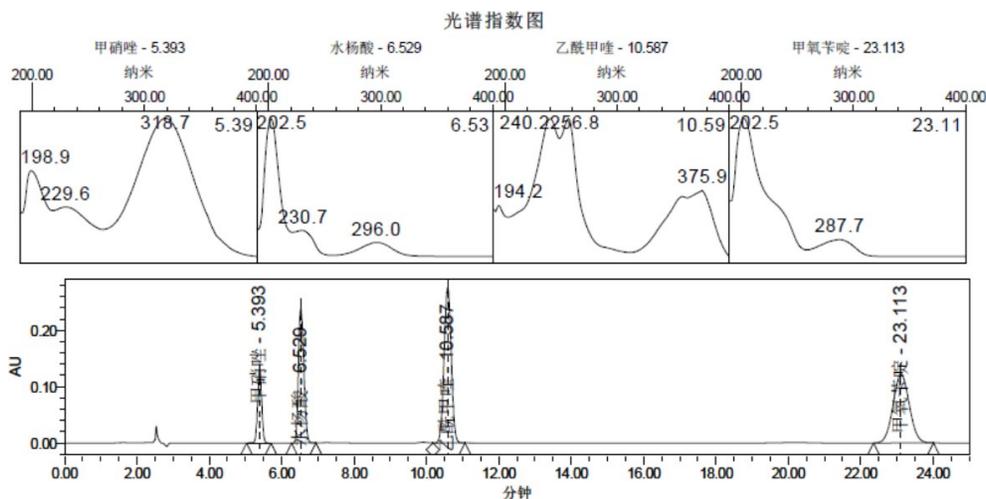


图 2 系统适用性溶液光谱指数图

Fig 2 Chromatogram and spectogram of system suitability solution

2.3.2 线性 精密量取混合对照品储备液 1、1、1、2、1、3 mL 分别置于 100、50、25、25、10、25 mL 量瓶

中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制备成浓度为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10、0.12 mg/mL 的标准曲线溶

液,照 2.1 项下色谱条件测定。按峰面积与对应的浓度作标准曲线,并计算回归方程和相关系数。甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶对照品的回归方

程及相关系数见表 1。结果表明 4 种被测物在 0.01~0.12 mg/mL 浓度范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

表 1 4 种被测物的回归方程、相关系数、线性范围、检测限

Tab 1 Calibration curves, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection of 4 drugs

被测物名称	回归方程	相关系数 $r$	线性范围/(mg · mL <sup>-1</sup> )	检测限/(g · kg <sup>-1</sup> )
甲硝唑	$y = 9826.7x + 1491$	0.9998	0.01~0.12	5
水杨酸	$y = 24335x + 7242.3$	0.9999	0.01~0.12	5
乙酰甲喹	$y = 36908x + 817.2$	0.9999	0.01~0.12	1
甲氧苄啶	$y = 36455x - 10129$	0.9999	0.01~0.12	2

2.3.3 准确度 以硫酸新霉素可溶性粉制剂空白加甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶对照品做回收率试验来考察方法的准确度。回收率试验溶液配制:取硫酸新霉素可溶性粉制剂空白 1.0 g,另精密称取 4 种对照品各 20 mg,置同一 50 mL 量瓶中,加甲醇 40 mL,超声处理 15 min,静置,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过。取滤液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。平行配制上述试验溶液各 6 份。精密量取上述溶液各 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,照 2.1 项下色谱条件测定。结果显示:甲硝唑回收率为 98.6%, $RSD$  为 0.4%;水杨酸回收率为 98.0%, $RSD$  为 0.7%;乙酰甲喹回收率为 99.4%, $RSD$  为 0.7%;甲氧苄啶回收率为 99.9%, $RSD$  为 1.0%,均符合方法学要求。

2.3.4 检测限 参考文献方法<sup>[6]</sup>配制不同浓度的加标溶液,分析所得色谱图及光谱图,以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限<sup>[3]</sup>。取硫酸新霉素可溶性粉制剂空白 1.0 g,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 40 mL,超声处理 15 min,静置,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过。取滤液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,平行操作 5 份,分别精密加入系统适用性溶液(0.1 mg/mL)适量(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL),加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。精密量取上述检测限样品溶液各 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,照 2.1 项下色谱条件测定检测限,该色谱条件下甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶在硫酸新霉素可溶性粉中的检出限

见表 1。

2.3.5 耐用性 从柱温、流动相 pH 值、色谱柱三个方面考察检测方法的耐用性。调节柱温为 25、30、35  $^{\circ}$ C,结果表明:随着柱温升高,4 种被测物保留时间均有所提前;调节流动相 pH 值为 6.5、7.0 和 7.5,结果表明:在所调节范围内,4 种被测物保留时间、光谱图差别不大;选择三款不同品牌色谱柱(资生堂 MG,250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m; Waters Atlantis T3,250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m; Waters SunFire C18,150 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m),考察不同色谱柱对检测的影响,在所建检测方法条件下,三种品牌色谱柱所得色谱峰的分度、理论塔板数、对称因子均符合规定,方法耐用性较好。

2.4 疑似阳性供试品测定结果 取疑似阳性的硫酸新霉素可溶性粉样品照 2.2.1 项下方法制备成供试品溶液;取 2.2.2 项下系统适用性溶液作为建立对照品光谱数据库的溶液,分别精密量取上述试验溶液各 10  $\mu$ L,照 2.1 项下色谱条件测定。用 Empower 3 色谱工作站软件建立对照品光谱数据库,并对供试品溶液的峰纯度和光谱匹配度进行计算。峰纯度检查结果:样品 A 与样品 B 色谱图中各峰的纯度角度均小于纯度阈值,结果表明样品 A 与样品 B 色谱图中各峰均为单一物质峰。光谱相似度检查结果:样品 A 色谱图中,与乙酰甲喹、甲氧苄啶对照品保留时间一致的色谱峰的光谱图及最大吸收波长分别与乙酰甲喹、甲氧苄啶对照品的光谱

图及最大吸收波长保持一致,且匹配角度均小于匹配阈值,光谱相似,为同一物质;样品 B 色谱图中,与甲硝唑、水杨酸及乙酰甲嗪对照品保留时间一致的色谱峰的光谱图及最大吸收波长分别与甲硝唑、水杨酸及乙酰甲嗪对照品的色谱图及最大吸收波长保持一致,且匹配角度均小于匹配阈值,光谱相似,为同一物质。结合保留时间、峰纯度及光谱相似度检查结果,综合判定样品 A 中非法添加了乙酰

甲嗪及甲氧苄啶,样品 B 中非法添加了甲硝唑、水杨酸及乙酰甲嗪。以 2.2.2 项下的系统适用性溶液作为对照进样,以外标法按峰面积计算含量,样品 A 中乙酰甲嗪添加量约为 150 g/kg,甲氧苄啶添加量约为 60 g/kg。样品 B 中甲硝唑添加量约为 102 g/kg,水杨酸的添加量约为 31 g/kg,乙酰甲嗪添加量约为 107 g/kg。实验结果见图 3、图 4 和表 2、表 3。

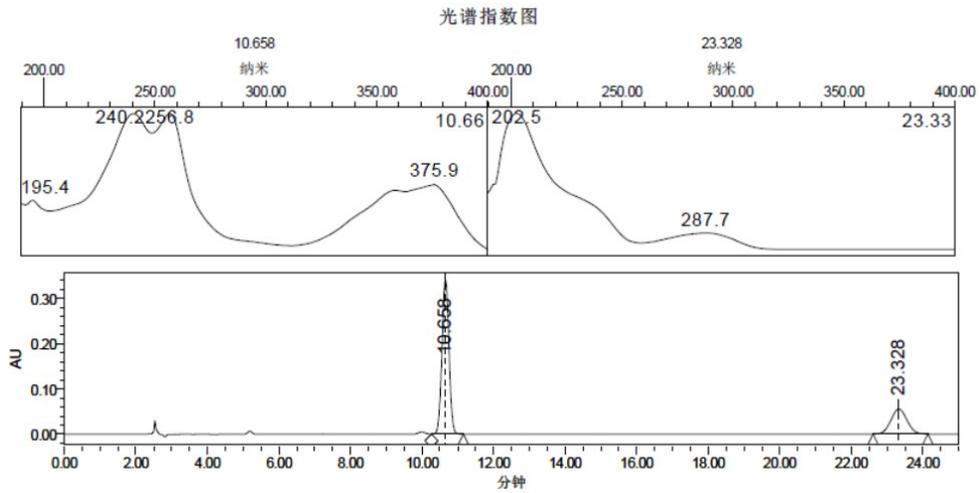


图 3 样品 A 溶液光谱指数图

Fig 3 Chromatogram and spectrogram of the sample A solution

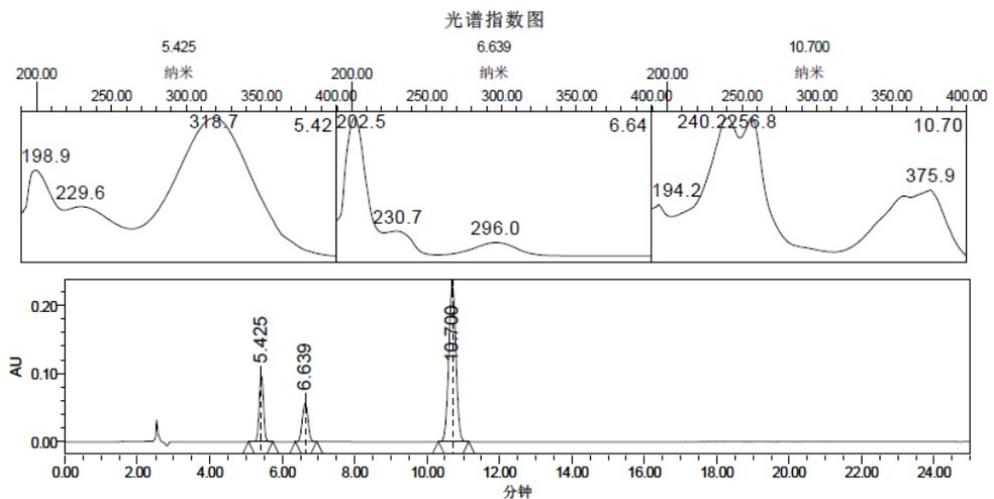


图 4 样品 B 溶液光谱指数图

Fig 4 Chromatogram and spectrogram of the sample B solution

表 2 峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 2 Results of peak purity test and spectral similarity test

样品编号	色谱峰	纯度角度	纯度阈值	峰纯度检查结果	PDA 匹配角度	PDA 匹配阈值	光谱相似度检查结果
样品 A	乙酰甲喹	0.066	0.234	角度小于阈值, 为单一物质峰	0.098	1.015	角度小于阈值, 光谱相似
	甲氧苄啉	0.055	0.246		0.060	1.057	
样品 B	甲硝唑	0.215	0.222	角度小于阈值, 为单一物质峰	0.079	1.017	角度小于阈值, 光谱相似
	水杨酸	0.086	0.260		0.149	1.033	
	乙酰甲喹	0.059	0.222		0.069	1.015	

表 3 保留时间及紫外光谱结果表

Tab 3 Results of retention time and UV absorprion spectra

色谱峰	保留时间/min	最大吸收波长/nm
甲硝唑	对照品	229.6、318.7
	样品 B	229.6、318.7
水杨酸	对照品	202.5、230.7、296.0
	样品 B	202.5、230.7、296.0
乙酰甲喹	对照品	240.2、256.8、375.9
	样品 A	240.2、256.8、375.9
	样品 B	240.2、256.8、375.9
甲氧苄啉	对照品	202.5、287.7
	样品 A	202.5、287.7

### 3 讨论与结论

3.1 色谱条件的选择 本实验在非法添加初步筛查时,采用的是农业部公号 2448 号中黄芪多糖注射液非法添加解热镇痛类化合物检查方法<sup>[7]</sup>,使用的流动相盐浓度较高,故减少磷酸二氢钠与三乙胺的使用量,调整为以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加水 1000 mL 使溶解,加三乙胺 0.5 mL,用氢氧化钠试液调节 pH 值至 7.0)-甲醇(70:30)为流动相,各色谱峰与相邻色谱峰之间分离度最小值为 4,且峰形良好,理论塔板数均大于 8000。硫酸新霉素化学结构不具备特征的紫外发色团,采用紫外检测器直接测定,供试品色谱图中并无色谱峰出现。综合考虑 4 种被测化学药品在该色谱条件下的最大吸收波长,选取 230 nm 作为检测波长,保证各峰面积大小合适,便于结果的判定。

3.2 测定用溶剂的选择 在非法添加高通量筛查工作中常以甲醇作为提取溶剂,且 4 种被测化学药

物在甲醇中均溶解性良好,故选择甲醇作为提取溶剂。

3.3 检查方法的扩展使用 除硫酸新霉素可溶性粉外,当采用该检查方法用于其他兽药制剂的检查时,需进行空白试验和系统适用性试验,并测定方法的检出限,注意调整供试品溶液或对照品溶液的浓度,使两者目标分析物的峰面积尽量接近,以便于结果的判定。

3.4 兽药非法添加物检测标准展望 随着国家对农产品质量安全的日益重视,农业农村部对兽药处方外非法添加的监管与打击力度也不断加大,近年来发布了多批公告作为兽药处方外非法添加物检查的检验依据,但相关标准的制修订还跟不上少数企业非法添加的步伐。如本实验中涉及的硫酸新霉素可溶性粉样品,目前并无与之相关的非法添加检验方法公告发布,兽药中非法添加水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啉已有多篇文献报告,且农业农村部

公告中已有检测方法发布,但兽药中非法添加甲硝唑,则既无文献报道亦无公告发布,需要引起有关部门的重视。农业农村部应进一步加快兽药中非法添加检测方法的制修订工作,为严厉打击非法添加违法行为提供依据。

本研究建立了 HPLC-PDA 法同时测定硫酸新霉素可溶性粉中非法添加甲硝唑、水杨酸、乙酰甲喹、甲氧苄啶的方法,方法简便、专属性强,为兽药市场的安全监管提供了一定的技术支撑。

**参考文献:**

[1] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典 2015 年版(一部) [S].  
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the first volume of 2015 edition) [S].

[2] 中国兽药典委员会.兽药质量标准(2017 年版)化学药品卷 [S].  
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Quality Standard for Veterinary Drugs, 2017, Chemical Medicine Volume [S].

[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 2010 年版[S].  
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia Guide to Utilization of Veterinary Drug in Veterinary Pharmacopoeia of People's

Republic of China, 2017, Chemical Medicine Volume [S].

[4] 国家农业部官网.农业部持续创新兽药抽检制度加快提升兽药产品质量水平[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/201503/t20150316\\_4440988.htm](http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/201503/t20150316_4440988.htm).  
Official Website of Ministry of Agriculture. The Ministry of Agriculture continues to innovate the sampling system of veterinary drugs to accelerate the improvement of veterinary drug product quality level [EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/201503/t20150316\\_4440988.htm](http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/201503/t20150316_4440988.htm).

[5] 农医发[2017]2 号文农业部关于印发《2017 年兽药质量监督抽检计划》的通知[Z].  
Agricultural medicine [2017] 2 paper on the ministry of Agriculture issued 2017 quality supervision and sampling of veterinary drugs plan notice [Z].

[6] 戴青,于丽娜,张璐,等.硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加乙酰甲喹的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J].中国兽药杂志,2017,51(2):19-23.  
Dai Q, Yu L N, Zhang L, et al. Determination of Mequindox in Apramycin Sulfate Soluble Power by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary, 2017, 51(2): 19-23.

[7] 农业部.中华人民共和国农业部公告 2448 号[S].  
Ministry of Agriculture. No. 2448. Bullerion of the Ministry of Agriculture of the People's Republic [S].

(编辑:侯向辉)