

高效液相色谱法测定中药散剂中添加的土霉素

赵晶晶¹, 王玮², 宋扬³

(1. 山西省饲料兽药监察所, 太原 030027; 2. 太原土壤肥料测试中心, 太原 030001; 3. 山西长治医学院, 山西长治 046000)

[收稿日期] 2012-08-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)01-0036-03 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了建立高效液相色谱法检测白龙散、三子散、四味穿心莲散中非法添加土霉素的检测方法, 实验采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液: 乙腈(84:16)为流动相, 检测波长 353 nm, 流速 1.5 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温为室温。结果表明土霉素在 0.5 ~ 1000 μg/mL 范围内线性关系良好; 检测限分别为白龙散 0.3 μg/mL, 三子散 1 μg/mL, 四味穿心莲散 0.2 μg/mL; 回收率在 98.3% ~ 100.2% 之间, RSD 为 0.16% ~ 0.73%。本方法准确、可靠, 可用于中药散剂中非法添加土霉素的含量检测。

[关键词] 中药散剂; 土霉素; 高效液相色谱法

Determination of Oxytetracycline in Chinese Herbal Powder by HPLC

ZHAO Jing-jing¹, WANG Wei², SONG Yang³

(1. Shanxi Province Institute of Feed and Veterinary Drug Control, Taiyuan 030027, China; 2. Taiyuan Soil Fertilizer Test Center, Taiyuan 030001, China; 3. A College of Medicine in Changzhi City of Shanxi, Changzhi, Shanxi 046000, China)

Abstract: An HPLC method was established for effective detection on oxytetracycline added illegally in Chinese herbal powders as Bailong San, Sanzi San and Siweichuanxinlian San. A reverse-phase C18 column was used, the mobile phase was phosphate buffer-acetonitrile (84:16), the determination wave length was 353 nm, the flow rate was 1.5 mL/min, the sample size was 10 μL, the column worked at room temperature. The result demonstrated that the linearity range of oxytetracycline was 0.5 ~ 1000 μg/mL, the limit of detection of Bailong San was 0.3 μg/mL, the limit of detection of Sanzi San was 1 μg/mL and the limit of detection of Siweichuanxinlian San was 0.2 μg/mL. The recovery was 98.3% ~ 100.2%, RSD was 0.16% ~ 0.73%. It indicated that this method was accurate, reliable and suitable in the determination of oxytetracycline added illegally in veterinary medicine powders.

Key words: Chinese herbal powder; oxytetracycline; HPLC

土霉素(Oxytetracycline), 又名氧四环素, 是四环素类广谱抗生素, 用于治疗大肠杆菌或沙门氏菌引起的犊牛白痢、羔羊痢疾和仔猪黄痢等疾病, 以及支原体引起的牛肺炎、猪气喘病和鸡慢性呼吸道等病^[1]。但目前存在一些在具有清热解毒、凉血止痢功能的中药散剂中非法加入土霉素的现象, 导致畜禽疾病治疗过程中土霉素的使用对象和使用

剂量失去有效控制, 这种做法会诱使畜禽耐药菌的产生, 造成畜产品药物残留等问题, 最终给人类健康造成巨大危害。本文旨在研究建立 HPLC 法测定中药散剂中非法添加土霉素的方法, 一方面引起业内对土霉素在中药散剂中滥用问题的重视, 另一方面为规范土霉素的使用、控制土霉素对动物性食品及人类健康的威胁提供有力的依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 药品与试剂 土霉素对照品, 中国兽医药品监察所提供(批号 K0030712, 含量 92.4%)。供试品白龙散(批号为 20120301)、三子散(批号为 20120401)、四味穿心莲散(批号为 20120305), 由山西省芮城县第二兽药厂提供。试验用乙腈为色谱纯, 盐酸、磷酸二氢钠为分析纯。盐酸溶液(0.1 mol/L)作为对照品和供试品的稀释溶剂, 磷酸盐缓冲液(pH 值 3.5)。

1.1.2 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪, 紫外检测器, SB-C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。电子分析天平(型号 BP-211s), pH 计(型号 PB-10), 0.22 μm 滤膜。

1.2 样品制备

1.2.1 供试品 取白龙散、三子散、四味穿心莲散各 1.0 g 作为供试品。

1.2.2 阳性添加供试品 根据土霉素和上述几种中药散剂在畜禽疾病治疗过程中的使用量^[2], 将土霉素的治疗量折算到中药散剂的使用量中来决定土霉素在散剂中的添加量。分别称取 1.0 g 白龙散、三子散、四味穿心莲散各 15 份, 每个品种添加土霉素对照品三个浓度, 每一浓度各添加 5 份。白龙散的添加量为: 9、20、35 mg; 三子散的添加量为: 13、50、100 mg; 四味穿心莲的添加量为: 16、50、100 mg。将上述添加散剂分别充分混匀, 作为阳性添加供试品。

1.2.3 供试品溶液及阳性添加供试品溶液的制备 取 1.2.1 供试品和 1.2.2 阳性添加供试品, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 50 mL, 超声提取 15 min, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 得到供试品溶液及各自 3 个浓度的阳性添加供试品溶液, 分别为: 白龙散阳性添加溶液(用 BT 表示) BT1~3(对应 4.5、10、17.5 μg/mL); 三子散阳性添加溶液(用 ST 表示) ST1~3(对应 6.5、25、50 μg/mL); 四味穿心莲散阳性添加溶液(用 CT 表示) CT1~3(对应 8、25、50 μg/mL)。

1.2.4 对照品溶液的制备 精密称取土霉素对照品 50 mg 置 50 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 1(1000 μg/mL)。从上述溶液中精密量取 10、5 mL 分别置 100 mL 容量瓶中, 稀释摇匀, 作为对照品溶液 2(100 μg/mL) 和对照品溶液 3(50 μg/mL), 从

对照品溶液 2 中精密量取 20、10 mL 分别置 100 mL 容量瓶中, 稀释摇匀, 作为对照品溶液 4(20 μg/mL) 和对照品溶液 5(10 μg/mL), 从对照品溶液 5 中精密量取 10、5 mL 分别置 100 mL 容量瓶中, 稀释摇匀, 作为对照品溶液 6(1 μg/mL) 和对照品溶液 7(0.5 μg/mL)。

1.3 色谱条件^[3] 以磷酸盐缓冲液: 乙腈(84:16) 为流动相, 流速为 1.5 mL/min; 检测器为紫外检测器, 检测波长 353 nm; 柱温为室温; 进样量 10 μL。

2 结果

2.1 系统适用性试验 取 1.2.3 项下的 BT1、ST1、CT1 和 1.2.4 项下的对照品溶液 5, 在 1.3 色谱条件下进行分析, 图谱结果见图 1-图 7。土霉素主峰的保留时间为 3.5 min 左右, 理论塔板数大于 5000, 拖尾因子在 0.97~1.01 之间, 土霉素峰能与供试品中其他成分色谱峰很好地分离。

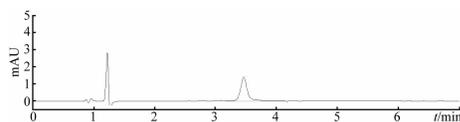


图 1 土霉素对照品溶液色谱图

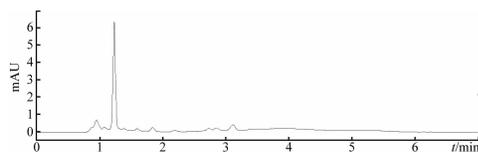


图 2 白龙散色谱图

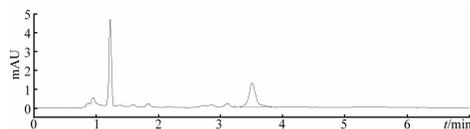


图 3 白龙散阳性添加色谱图

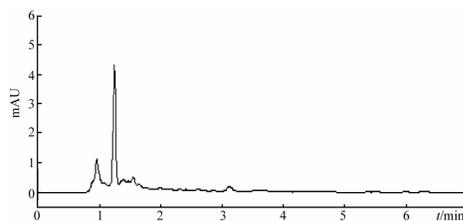


图 4 三子散色谱图

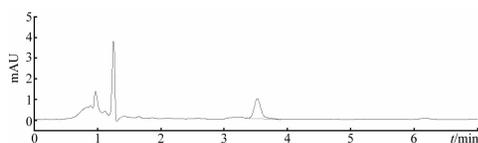


图 5 三子散阳性添加色谱图

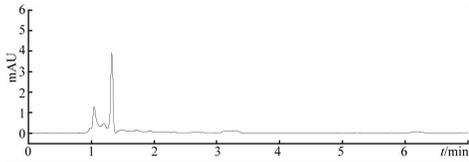


图6 四味穿心莲散色谱图

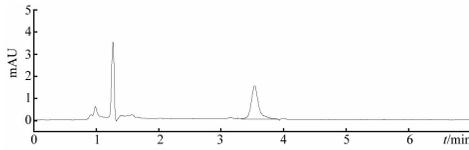


图7 四味穿心莲散阳性添加色谱图

2.2 线性范围 取 1.2.4 项下的对照品溶液 1 ~ 7 (浓度为 1000 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 按 1.3 色谱条件进行分析, 结果表明在 0.5 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内土霉素峰面积和溶液浓度呈良好的线性关系。回归方程为: $y = 1.1038x + 3.4311$, $R^2 = 0.9998$ 。

2.3 精密度试验 分别取 1.2.3 项下的 BT1、ST1、CT1 阳性添加供试品溶液, 按 1.3 项下色谱条

表2 中药散剂中添加回收率实验结果 ($n = 5$)

溶液编号	白龙散		三子散		四味穿心莲散	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
1	99.6 ~ 100.0	0.16	98.6 ~ 98.9	0.13	98.6 ~ 99.6	0.43
2	98.5 ~ 99.6	0.49	97.9 ~ 99.3	0.57	98.4 ~ 99.5	0.47
3	98.3 ~ 99.3	0.41	98.5 ~ 100.2	0.73	98.5 ~ 99.3	0.31

2.6 稳定性实验 分别取 1.2.3 项下的 BT1、ST1、CT1 阳性添加供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、6、8、12、24 h 进行测定, 结果表明 24 h 内峰面积无明显变化, RSD 分别为白龙散 0.29%, 三子散 0.41%, 四味穿心莲散 0.64%。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 根据土霉素在乙醇中微溶, 在水中极微溶解, 在氢氧化钠试液和稀盐酸中溶解的特点^[4], 考虑到中药散剂用醇溶剂提取其中的土霉素时, 中药中的许多组分溶于醇类而干扰土霉素的检测, 因此, 本实验的提取溶剂选用稀盐酸。经试验研究证明, 稀盐酸可以提取供试品中的土霉素, 且测定时中药散剂的组分峰与土霉素峰的分度符合度符合要求, 不影响土霉素的检测。

3.2 提取时间的考察 供试品中土霉素的提取以超声处理 15 min 为好, 同时从散剂中提取出的组分较少, 不干扰土霉素的检测; 提取时间延长至

件连续进样 6 次, 测定峰面积, 相对标准偏差 (RSD) 为白龙散 0.83%, 三子散 1.14%, 四味穿心莲散 0.34%。

2.4 检测限与定量限 分别取 1.2.3 项下的 BT1、ST1、CT1 阳性添加供试品溶液, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液逐步稀释, 按 1.3 项下的色谱条件进行检测, 检测限和定量限结果见表 1。

表1 检测限和定量限测定结果

散剂名称	检测限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
白龙散	0.3	1.1
三子散	1.0	3.2
四味穿心莲散	0.2	0.7

2.5 准确度 分别取 1.2.3 项下 BT1 ~ 3、ST1 ~ 3、CT1 ~ 3、三个浓度各 5 份平行样, 与对照品平行进样分析, 按外标法, 计算回收率和 RSD 值, 结果见表 2。

20 min 或更长时, 土霉素峰面积无明显变化^[5]。

总之, 本方法具有样品前处理简便快速, 检测时间短, 灵敏度高, 线性关系良好等优点。结果表明, 高效液相色谱法可以作为中药散剂中非法添加土霉素的测定方法。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版一部[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南 (中药卷)[S].
- [3] 中华人民共和国农业部. 兽药地方标准上升国家标准 2010 年版[S].
- [4] 李树刚, 金录胜, 王登临, 等. HPLC 法测定中兽药散剂中非法添加土霉素的方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(11): 19-22.
- [5] 罗晓燕, 林玉娜, 刘莉治. SPE-HPLC 法同时测定水产品中四种抗生素残留的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 198-220.

(责任编辑: 陈 希)