

鱼腥草注射液中非法添加甲氧氯普胺的 HPLC - PDA 检测方法的建立

王静文, 范 强, 龚旭昊, 董玲玲, 杨 星, 万仁玲, 顾进华*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2015 - 11 - 16 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2016) 03 - 0045 - 04 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为检测鱼腥草注射液中非法添加的甲氧氯普胺, 以十八烷基键合硅胶为填充剂, 0.02 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调剂 pH 值至 4.0) - 乙腈(81:19)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 波长扫描范围为 200~400 nm, 柱温 25 °C, 建立了 HPLC - PAD 检测方法, 并采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品比对方法, 对非法添加药物进行确证。结果显示, 甲氧氯普胺回收率为 98.8%, *RSD* 为 0.3%; 线性方程为 $y = 43542070x + 36695$, $R^2 = 1$; 检测限为 6 $\mu\text{g/mL}$; 定量限为 9 $\mu\text{g/mL}$ 。本方法快速、灵敏、可靠, 可对鱼腥草注射液中非法添加的甲氧氯普胺违禁药物进行定性和定量检测。

[关键词] 甲氧氯普胺; 鱼腥草注射液; HPLC - PDA

Determination of Metoclopramide Illegally Added in the Houttuynia Cordata Injection by HPLC - PDA

WANG Jing - wen, FAN Qiang, GONG Xu - hao, DONG Ling - ling, YANG Xing, WAN Ren - ling, GU Jin - hua*

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

Abstract: A method for the determination of metoclopramide in the Houttuynia Cordata Injection was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using 0.02 mol/L phosphoric acid solution (adjusting pH to 4.0 by triethylamine) and acetonitrile as the mobile phase. The scanning wavelength was from 200 to 400 nm. Peak purity test and spectrum similarity test were used to identify the metoclopramide. The mean recovery of metoclopramide was 98.8% and *RSD* was 0.3%. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of metoclopramide in the houttuynia Cordata Injection.

Key words: metoclopramide; Houttuynia Cordata Injection; HPLC - PDA

鱼腥草注射液为鱼腥草经水蒸气蒸馏制成的
灭菌水溶液。临床中主要功能为清热解毒, 消肿排

脓, 利尿通淋, 主治肺痈, 痢疾, 乳痈, 淋浊^[1]。甲氧
氯普胺又称胃复安、灭吐灵, 为有机合成的普鲁卡

基金项目: “十三五”科技支撑计划(2015BAD11B03 - 4)

作者简介: 王静文, 硕士, 从事兽药检验检测工作。

通讯作者: 顾进华。E - mail: gujinhua@ivdc.org.cn

因酰胺衍生物,系中枢性和外周性多巴胺 D_2 受体阻断剂,抑制中枢催吐化学感受区中的多巴胺受体而调高该感受区的阈值,同时可以促进上消化道运动而不刺激胃液、胆汁和胰腺分泌。临床上常用于治疗慢性消化不良引起胃肠运动障碍,改善恶心、呕吐等症状、癌症放、化疗和手术后的呕吐^[2]。由于该药物价格低廉,应用广泛,有关其不良反应的报道也日渐增多。甲氧氯普胺半衰期短,个体间的药动学特征差异大,长期或高剂量使用容易造成严重的锥体外系反应^[3]。在鱼腥草注射液中添加甲氧氯普胺,不仅违反了《兽药管理条例》,也为动物源性食品安全埋下了隐患。

国内外文献已报道的用于甲氧氯普胺检测的方法有:高效液相色谱法^[4]、高效液相色谱串联质谱法^[5]、气相色谱-质谱检测法及分光光度法^[6],但目前尚未有检测非法添加甲氧氯普胺的方法报道,因此有必要建立快速、准确、灵敏的方法检测鱼腥草注射液中非法添加的甲氧氯普胺。参考以上文献结合中兽药中非法添加化学药品的特点^[7-8],本文建立了快速、准确、可靠的定性定量方法,以期广泛应用于非法添加的检测工作。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters e2695 液相系统、2998 PDA 二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站软件(美国 Waters 公司)、Mettler XS205 型十万分之一天平(美国 Mettler Toledo 公司)、MiliQ 纯水机、雷磁 PHSJ-4A 型 pH 计。

1.2 试药与试剂 甲氧氯普胺对照品(含量:99.8%,批号:100832-201404,中国食品药品检定研究院),供试品:鱼腥草注射液空白样品(批号:20140901);鱼腥草注射液阳性样品(批号:20140601),乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯,批号:1747130433),甲醇(德国 Merck 公司,色谱纯,批号:1748007433),三乙胺(美国 Fisher Scientific 公司,色谱纯,批号:111435),磷酸(国药集团化学试剂有限公司,优级纯,批号:20140819),去离子水(MiliQ 纯化系统制备的去离子水)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters Atlantis T3(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相:0.02 mol/L 磷酸溶液(三乙胺调节 pH 值至 4.0)-乙腈(81:19),流速:1.0 mL/min,柱温:25 $^{\circ}$ C,进样量:20 μ L,二极管阵列检测器(PDA,检测波长:200~400 nm,记录 275nm 波长处的色谱图)。

2.2 溶液制备

2.2.1 鱼腥草注射液空白溶液 取已测得不含甲氧氯普胺的鱼腥草注射液 10 mL,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,过滤,作为空白对照溶液。

2.2.2 甲氧氯普胺对照品储备液 取甲氧氯普胺对照品 15 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 0.3 mg/mL 的对照品储备液。

2.3 方法学考察

2.3.1 样品本底及干扰 精密量取对照品溶液(0.006 mg/mL)和鱼腥草注射液空白溶液各 20 μ L,注入高效液相色谱仪,记录色谱图和光谱指数图,检测鱼腥草注射液中成分对测定结果是否产生干扰。结果见图 1、图 2,鱼腥草注射液本底对甲氧氯普胺的检测不产生干扰。

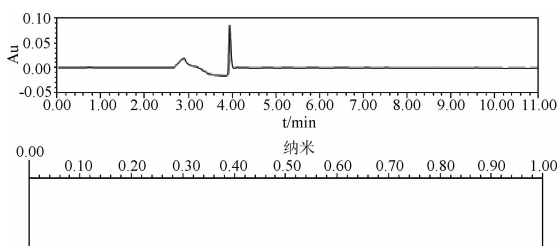


图1 鱼腥草注射液空白溶液色谱图、光谱图

2.3.2 线性关系考察 精密量取甲氧氯普胺对照品储备液 1、3、5、7、9 mL 置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.006、0.018、0.030、0.042、0.054 mg/mL 的标准曲线溶液,测定。按甲氧氯普胺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。甲氧氯普胺回归方程为 $y = 43542070x + 36695$, $R^2 = 1$ 。表明甲氧氯

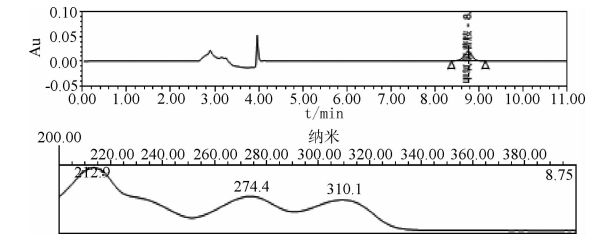


图2 甲氧氯普胺对照品(0.006mg/mL)色谱图、光谱图

普胺在6~54 μg/mL 浓度范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.3.3 检测限与定量限 检测限溶液制备:取已测得不含甲氧氯普胺的鱼腥草注射液 1 mL,置 10 mL容量瓶中,精密加入甲氧氯普胺对照品溶液(0.006 mg/mL)适量(0.5、1、1.5、2 mL),用甲醇稀释至刻度。以光谱图(图 3)失真的最大浓度作为方法的检出限, $S/N\geq 10$ 的浓度为定量限。该色谱条件下甲氧氯普胺在鱼腥草注射液样品中的检出限为 6 μg/mL;定量限为 9 μg/mL。

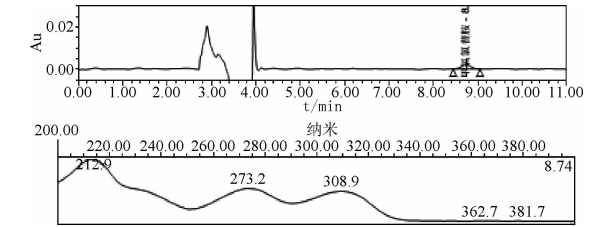


图3 甲氧氯普胺检出限色谱图、光谱图

2.3.4 准确度 以空白鱼腥草注射液加甲氧氯普胺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:取已测得不含甲氧氯普胺的鱼腥草注射液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,精密加入甲氧氯普胺对照品储备液(0.3 g/mL)1 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。平行配制 6 份,结果见表 1,甲氧氯普胺回收率为 98.8%, RSD 为 0.3%。

表 1 甲氧氯普胺回收率结果			
加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
14.64	97.54	98.8	0.3
14.89	98.56		
14.93	98.69		
15.06	99.51		
15.13	99.57		
14.84	99.31		

2.3.5 耐用性 从柱温、流动相 pH 值、色谱柱三个方面考察方法的耐用性。调节柱温为 20 ℃、25 ℃、30 ℃,结果显示:随着柱温升高,保留时间略提前,但差异小于 0.4 min;调节流动相 pH 值为 3.0、4.0 和 5.0,结果显示:随着 pH 值的降低,甲氧氯普胺的保留时间缩短;选择三款不同品牌色谱柱,以甲氧氯普胺对照品溶液(0.006 mg/mL)作为供试品溶液,考察不同色谱柱对测定的影响,结果如表 2 所示:三种品牌色谱柱均可用于该检查,方法耐用性较好。

表 2 三种色谱柱耐用性考察结果表			
色谱柱型号	保留时间/min	理论塔板数	对称因子
Waters Atlantis T3, 4.6×250 mm,5 μm	8.749	>9000	<1.1
GRACE Alltima C18, 4.6×250 mm,5 μm	8.622	>9000	<1.1
资生堂 MG II C18, 4.6×150 mm,5 μm	4.559	>5000	<1.2

2.4 样品测定结果 取该批阳性鱼腥草注射液 0.5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,用建立的 HPLC-PDA 法对该样品进行甲氧氯普胺含量测定,结果为 3.23 mg/mL,样品中甲氧氯普胺的色谱光谱图、纯度图和光谱匹配图见图 4-图 6,纯度角度为 0.11,纯度阈值为 0.385,纯度角度小于纯度阈值,为单一物质峰;匹配角度为 0.567,匹配阈值为 1.173,匹配角度小于匹配阈值,光谱相似。

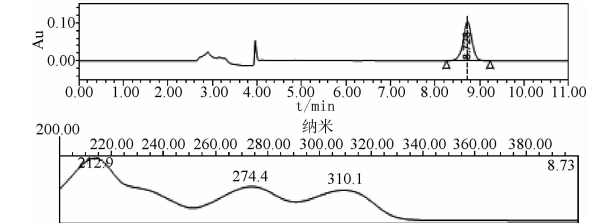


图4 鱼腥草注射液阳性样品中甲氧氯普胺色谱图、光谱图

3 讨论与小结

3.1 流动相的选择 甲氧氯普胺为对氨基苯甲酰胺类药物,碱性较强,参考文献资料^[3-5],考察了其在 0.02 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调剂 pH 值至 4.0)-乙腈(81:19)、乙腈-0.025 mol/L 乙酸铵(0.2% 三乙胺,冰醋酸调节 pH 至 5.7)(20:80)、甲醇-乙腈-醋酸盐缓冲液(pH 4.0)-三乙胺

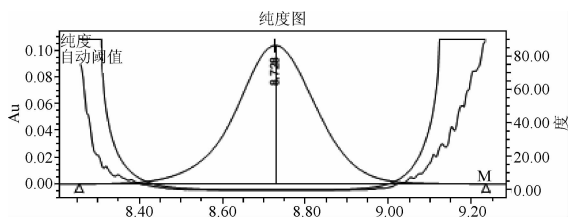


图5 鱼腥草注射液阳性样品中甲氧氯普胺纯度图

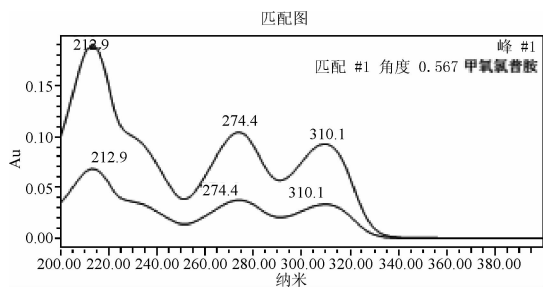


图6 鱼腥草注射液阳性样品中甲氧氯普胺光谱匹配图

(7:18:15:0.1) 和磷酸二氢钾溶液(pH 4.0) - 乙腈(100:25) 作为流动相时的分离情况,结果表明以 0.02 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调剂 pH 值至 4.0) - 乙腈(81:19) 作为流动相时,甲氧氯普胺保留时间适宜,峰形良好。

3.2 测定用溶剂的选择 鱼腥草注射液为鱼腥草经水蒸气蒸馏制成的灭菌水溶液^[1],可与甲醇任意比例混溶;对甲氧氯普胺在甲醇中的溶解性进行考察,发现在本方法浓度范围内,甲氧氯普胺在甲醇中的溶解性良好。考虑到在非法添加高通量筛查工作中以甲醇作为溶剂具有普适性,选取甲醇作为检测用溶剂。

3.3 提取波长的选择 鱼腥草注射液中主要有效成分为挥发油,包括癸酰乙醛、甲基正壬酮、 α -松油醇、4-萜品醇、乙酸龙脑酯、月桂醛等,通常用气相色谱法进行检测^[10],在 200~400 nm 波长范围内无明显紫外吸收。甲氧氯普胺对照品在 200~400 nm 波长范围最大吸收波长为 213、275、310 nm,为避免测定溶剂及流动相对紫外吸收的干扰,选择 275 nm 作为提取波长。

3.4 峰纯度和光谱相似度 通过与对照品建立的标准物质谱库比较,Waters Empower 工作站可以对峰纯度和光谱匹配度进行计算,当纯度角度小于纯度阈值时,可以判定为单一物质峰,当匹配角度小于匹配阈值时,可以判定光谱相似。通常作为判断峰纯度和光谱相似度的重要依据。

由于具有疗效显著价格低廉等特点,鱼腥草注射液一直广泛应用于临床治疗。本文所建立的鱼腥草注射液中非法添加甲氧氯普胺的 HPLC-PDA 检测方法,简便、快捷、重复性好,适用于鱼腥草注射液中非法添加甲氧氯普胺的检测。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 兽药国家标准(第一册)[S].
- [2] A Boussairi, F Guyon. Liquid chromatographic analysis with electrochemical detection for metoclopramide in human plasma [J]. Chromatographia, 1987,23(9): 651-652.
- [3] 王琳,程刚,邹梅娟,等. 反相高效液相色谱法测定家犬体内甲氧氯普胺的血药浓度[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 432-435.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二〇一五年版二部[S].
- [5] 查光,周辉,胡蓓,等. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中甲氧氯普胺的浓度[J]. 沈阳药科大学学报,2008, 25(11): 910-913.
- [6] Shah J, Jan M R, Khan M A, et al. Spectrophotometric determination of metoclopramide in pharmaceutical preparations [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2005, 60(7): 633-635.
- [7] 董玲玲,杨星,范强,等. 氟喹诺酮类制剂中非法添加对乙酰氨基酚和安乃近的测定方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2015,51(8):93-95.
- [8] 郝丽华,毕言锋,郭桂芳,等. HPLC-PDA 法测定黄芪多糖注射液中非法添加利巴韦林的试验[J]. 中国兽药杂志, 2013,49(2):76-78.
- [9] 郭桂芳,杨星,董玲玲,等. 恩诺沙星注射液中非法添加磺胺嘧啶 HPLC-PDA 检查法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2013,47(11):40-42.
- [10] 李毅斌,唐建,刁培渊,等. 人用鱼腥草注射液新质量标准的解读与思考[J]. 中国兽药杂志, 2013,47(1):53-59.

(编辑:陈希)