

鱼腥草注射液中非法添加水杨酸和 氧氟沙星 HPLC - PDA 检测方法的建立

龚旭昊,王静文,董玲玲,杨星,范强*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2015-12-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 02-0037-04 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为建立鱼腥草注射液中非法添加水杨酸和氧氟沙星的测定方法,采用十八烷基键合硅胶为填充剂,磷酸二氢钠溶液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加 1000 mL 水使溶解,加三乙胺 0.5 mL,用氢氧化钠饱和溶液调节 pH 值至 7.0) - 甲醇为流动相,梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,二极管阵列检测器,提取波长为 293 nm。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。在此液相色谱条件下,水杨酸、氧氟沙星与其他物质峰分离良好。按外标法以峰面积计算,水杨酸和氧氟沙星的平均回收率分别为 99.3% 和 98.8%,RSD 分别为 0.6% 和 0.8%。结果表明该检测方法简便、准确、可靠,可用于同时测定鱼腥草注射液中非法添加的水杨酸和氧氟沙星。

[关键词] 水杨酸;氧氟沙星;鱼腥草注射液;峰纯度检查;光谱相似度检查;HPLC - PDA

Determination of Salicylic Acid and Ofloxacin in Houttuynia Injection by HPLC - PDA

GONG Xu - hao, WANG Jing - wen, DONG Ling - ling, YANG Xing, FAN Qiang*

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

Abstract: A method for the determination of salicylic acid and ofloxacin in houttuynia injection was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using gradient elution with sodium dihydrogen phosphate solution (Taking the sodium dihydrogen phosphate 3.0 g, add 1000 mL water to dissolve, and add 0.5 mL triethylamine, adjusting pH to 7.0 by sodium hydroxide saturated solution) and methanol as the mobile phase, flow rate was 1 mL per minute. The extract wavelength was 293 nm. Peak purity test and spectrum similar test were help to determine the salicylic acid and ofloxacin except the method of comparison between sample and reference. Under the conditions of liquid chromatography, the separation of salicylic acid, ofloxacin and other peaks is required. The mean recovery of salicylic acid and ofloxacin were 99.3% and 98.8%, and RSD were 0.6% and 0.8%, respectively. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of salicylic acid and ofloxacin in houttuynia injection.

Key words: salicylic acid; ofloxacin; houttuynia injection; peak purity test; spectrum similar test; HPLC - PDA

作者简介: 龚旭昊, 硕士, 从事中兽药检验检测工作。

通讯作者: 范强。E - Mail: fanqiang@ivdc.org.cn

鱼腥草注射液是鱼腥草经水蒸气蒸馏制成的灭菌水溶液,具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋等功效^[1],素有“中药抗生素”之称,在兽医临床上应用较为广泛。近年来,发现有不法厂家利用中药成分复杂,质量标准相对落后的特点,为使产品达到迅速起效等目的,在中兽药制剂中非法添加处方外成分,给动物源性食品安全埋下了隐患^[2-3]。水杨酸是一种脂溶性的有机酸,具有抗真菌和止痒作用^[4]。氧氟沙星是一种第三代喹诺酮类抗菌药,主要用于革兰氏阴性菌引起的急慢性感染^[5]。而一些不法厂家正是利用这些药物具有抗菌谱广、杀菌力强、吸收快、体内分布广泛等特点^[6],通过非法添加手段,以使产品在短时间内起到明显效果,达到不正当竞争的目的。

因洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星4种原料药的各种盐、酯及其各种制剂可能对养殖业、人体健康造成潜在风险或危害,农业部发布第2292号公告决定在食品动物中停止使用这4种兽药,并撤销相关批准文号^[7]。而在检验工作中,通过筛查发现送检的某批鱼腥草注射液样品中非法添加了水杨酸和氧氟沙星,但目前尚没有现行的标准和方法可用于该项检测。因此,参考已建立的相关检测方法^[8],选择水杨酸、氧氟沙星为测试药物,鱼腥草注射液为目标制剂,建立了鱼腥草注射液中非法添加水杨酸、氧氟沙星的检查方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Waters e2695,PDA,Empower3 色谱工作站软件);分析天平(十万分之一);三乙胺、甲醇为色谱纯。

1.2 试剂 水杨酸对照品(批号:100106-201104,中国食品药品检定研究院,99.9%),氧氟沙星对照品(批号:H0091210,中国兽医药品监察所,99.5%);供试品空白:经检测合格的鱼腥草注射液监督抽检样品;供试品:某企业生产的经检测含有水杨酸及氧氟沙星非法添加的鱼腥草注射液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅

烷键合硅胶为填充剂,以磷酸二氢钠溶液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加 1000 mL 水使溶解,加三乙胺 0.5 mL,用氢氧化钠饱和溶液调节 pH 值至 7.0)为流动相 A,甲醇为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;二极管阵列检测器,采集波长范围为 210~400 nm,分辨率为 1.2 nm,记录 293 nm 波长处的色谱图。各色谱峰之间的分离度均应符合要求。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
8	70	30
9	40	60
16	40	60
17	70	30
22	70	30

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液和对照品溶液 取供试品 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;取 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。另取水杨酸对照品和氧氟沙星对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 中含水杨酸 0.1 mg、氧氟沙星 0.05 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 系统适用性溶液 取水杨酸、氧氟沙星对照品适量,加甲醇使溶解,制成含上述两种对照品分别为 0.1、0.05 mg/mL 的混合溶液,按 2.1 方法测定,结果见图 1,显示水杨酸色谱峰与氧氟沙星峰分离度良好,两者间无干扰。

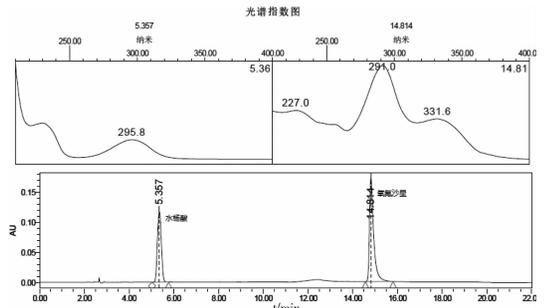


图 1 系统适用性色谱光谱图

2.2.3 鱼腥草注射液空白溶液 取供试品空白 1.0 mL,照 2.2.1 项下操作制备成供试品空白溶液,按 2.1 方法进行测定,结果见图 2,表明供试品基质对待测物水杨酸和氧氟沙星没有干扰。

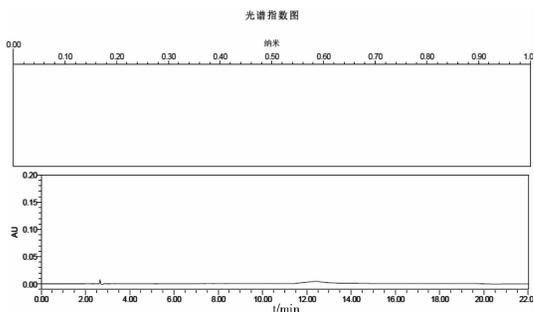


图2 供试品空白溶液色谱图

2.2.4 建立光谱数据库的溶液 以水杨酸、氧氟沙星对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液。

2.3 峰纯度检查 取供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 按 2.1 色谱条件测定。对供试品溶液色谱图中水杨酸和氧氟沙星色谱峰进行峰纯度检查, 结

果见表 2, 显示水杨酸峰与氧氟沙星峰的纯度角度均小于纯度阈值, 表明在此色谱条件下, 水杨酸和氧氟沙星的出峰处均无其他干扰峰, 为单一物质峰, 方法可行。

2.4 光谱相似度检查 对供试品溶液中水杨酸和氧氟沙星峰的色谱行为及光谱图与对照品溶液进行匹配, 结果见表 2 - 表 3 与图 3 - 图 5。数据显示, 供试品溶液中保留时间 5.360 min 的色谱图与水杨酸对照品保留时间一致, 14.804 min 的色谱图与氧氟沙星对照品保留时间一致, 且均与各自对照品的光谱图及最大吸收波长一致, 匹配角度均小于匹配阈值。表明供试品溶液中相应色谱峰的色谱、光谱与水杨酸、氧氟沙星对照品的色谱、光谱一致, 为同一物质。

表 2 供试品峰纯度及光谱相似度检查结果表

色谱峰	纯度角度	纯度阈值	结果	匹配角度	匹配阈值	结果
供试品中水杨酸色谱峰	0.109	1.034	单一物质峰	0.241	1.036	光谱相似
供试品中氧氟沙星色谱峰	0.142	1.038	单一物质峰	0.026	1.024	光谱相似

表 3 供试品与对照品保留时间及紫外光谱结果表

结果	水杨酸对照品	氧氟沙星对照品	供试品	
保留时间/min	5.372	14.819	5.360	14.804
最大吸收波长/nm	295.8	227.0、291.0、331.6	295.8	227.0、291.0、331.6

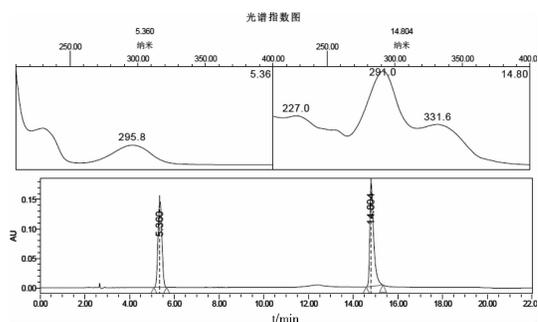


图3 供试品溶液色谱光谱图

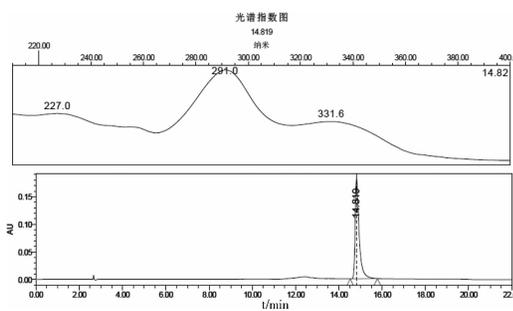


图5 氧氟沙星对照品色谱光谱图

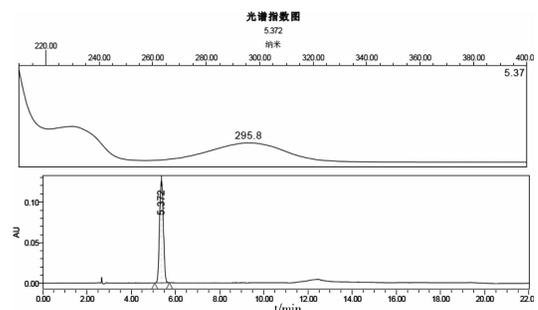


图4 水杨酸对照品色谱光谱图

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 通过供试品空白试验排除样品基质对于水杨酸和氧氟沙星的干扰。同时, 峰纯度检查结果也显示在此色谱条件下二者均为单一物质峰。

2.5.2 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 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$, 结果显示: 水杨酸、氧氟沙星保留时

间受柱温影响较小,随柱温升高,保留时间略提前;调节流动相 pH 值为 6.8、7.0 和 7.2,结果显示:随流动相 pH 值的增大,水杨酸和氧氟沙星保留时间基本不变,且三种 pH 值下分离度均大于 1.5;选择 3 款不同品牌色谱柱,以系统适用性溶液作为供试溶液,考察不同色谱柱对测定的影响,结果显示 3 种品牌色谱柱均可用于该检查,方法耐用性较好。

表 4 3 种色谱柱耐用性考察结果表

色谱柱型号(4.6×250 mm,5 μm)	理论塔板数	分离度(最小)
Waters Atlantis T3 C18	>6000	>24
GRACE Alltima C18	>4000	>25
Shiseido MG II C18	>4000	>25

2.5.3 检出限 检出限溶液配制:取供试品空白 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;取 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入水杨酸对照品溶液(0.1 mg/mL)或氧氟沙星对照品溶液(0.05 mg/mL)适量(0.2、0.5、1 mL),加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。以色谱峰纯度阈值大于纯度角度为方法的检出限,水杨酸和氧氟沙星检出限均为 2.5 mg/mL。

2.5.4 准确度 以供试品空白中添加被测物对照品做回收率试验来考察方法的准确度。

回收率试验溶液的配制:取供试品空白 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,取水杨酸对照品 25 mg、氧氟沙星对照品 12.5 mg,分别精密称定,置上述量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。重复制备 6 份,分别测定。以 2.2.1 中的对照品溶液作为对照进样,以外标法按峰面积计算回收率。结果显示水杨酸回收率为 99.3%,RSD 为 0.6%;氧氟沙星回收率为 98.8%,RSD 为 0.8%。

3 讨论与小结

3.1 波长的选择及色谱条件的优化 在 210~400 nm 波长范围内对水杨酸和氧氟沙星对照品进行扫描,结果显示二者在 293 nm 均有较强吸收,因此选择该波长作为检测波长。此外,由于氧氟沙星

分子结构中存在羧基和哌嗪基,为两性化合物,极性很强^[9]。向流动相中添加三乙胺,不但可以调节 pH 值,而且可以增强保留,同时作为扫尾剂还可以起到减少拖尾、改善峰形的作用,进而使色谱分析条件得到进一步的优化。

3.2 检查方法的扩充使用 除鱼腥草注射液外,其他兽药制剂亦可能非法添加水杨酸或氧氟沙星。当采用该检查方法用于此类兽药制剂的检查时,一方面要注意目标分析物以外的成分是否会对测定产生干扰,需进行空白试验和系统适用性试验,确保供试品溶液中水杨酸色谱峰、氧氟沙星色谱峰与相邻色谱峰的分离度应符合要求;另一方面要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,以便于检测和确认。

本检测方法通过供试品峰与对照品峰的保留时间、峰纯度及光谱特征的对比来确定鱼腥草注射液中是否添加了水杨酸或氧氟沙星,方法简便、快速、准确、高效,能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. 兽药国家标准(化学药品、中药卷)(第一册)[S].
- [2] 郝利华,于晓辉,董玲玲,等. HPLC-PDA 法同时测定黄芪多糖注射液中非法添加的四种解热镇痛类药物[J]. 中国兽药杂志,2012,46(8):28-31.
- [3] 董玲玲,范强,杨星,等. 氟苯尼考粉中非法添加烟酰胺和氨茶碱的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2014,48(5):47-50.
- [4] 杨玲. HPLC-DAD 法快速检测中药抗菌类软膏剂中非法添加氯霉素和水杨酸[J]. 海峡药学,2011,23(10):72-73.
- [5] 郭润勤. 高效液相色谱法测定左氧氟沙星滴耳剂中的主药含量[J]. 安徽医药,2009,13(6):609-610.
- [6] 方忠意,班付国,周红霞,等. 氟苯尼考粉中非法添加四种喹诺酮类药物的 HPLC 检测方法研究[J]. 中国兽药杂志,2013,47(3):34-37.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 2292 号[Z],2015.
- [8] 中华人民共和国农业部公告第 2508 号[Z],2014.
- [9] 傅晓航. 高效液相色谱法测定氧氟沙星胶囊中氧氟沙星的含量[J]. 化学分析计量,2005,14(4):28-30.

(编辑:陈希)