

4 种兽用注射液中非法添加倍他米松 UPLC – PDA 检查方法的建立

韩春晓¹, 张 越², 李洪伟¹, 许 彬¹, 李欣南^{1*}

(1. 辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[收稿日期] 2016 – 08 – 23 [文献标识码] A [文章编号] 1002 – 1280 (2017) 01 – 0046 – 06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为了建立柴胡注射液、维生素 C 注射液、盐酸林可霉素注射液、黄芪多糖注射液中非法添加倍他米松的超高效液相色谱检查方法, 采用 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 以 0.75% 三乙胺溶液 (用磷酸调节 pH 为 3.0) – 甲醇 – 乙腈 (50:45:5) 为流动相; 流速为 0.3 mL · min⁻¹; 二极管阵列检测器, 波长采集范围为 190 ~ 400 nm, 记录色谱图波长 242 nm。柱温 25 °C, 进样量 10 μL。倍他米松质量浓度在 20.0 ~ 180.0 mg · L⁻¹ 内峰面积呈良好线性关系 ($R^2 = 0.9997$, $n = 7$), 在柴胡注射液、盐酸林可霉素注射液、维生素 C 注射液、黄芪多糖注射液中倍他米松的平均回收率分别为 103.5% ($RSD = 0.2\%$)、101.2% ($RSD = 0.8\%$)、100.4% ($RSD = 1.7\%$)、99.2% ($RSD = 1.7\%$)。本方法简便、快速、准确, 可用于柴胡注射液等四种兽用注射液中非法添加倍他米松的检测。

[关键词] 超高效液相色谱法; 柴胡注射液; 维生素 C 注射液; 盐酸林可霉素注射液; 黄芪多糖注射液; 倍他米松

Establishment of Detection Methods for Betamethasone in the 4 Kinds of Veterinary Injections by UPLC – PDA

HAN Chun – Xiao¹, ZHANG Yue², LI Hong – wei¹, XU Bin¹, LI Xin – nan^{1*}

(1. Liaoning Province Animal Feed Quality and Safety of Veterinary Testing Centers, Shenyang 110016, China;

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A method for the determination of betamethasone in bupleurum injection, lincomycin hydrochloride injection, vitamin C injection, and asragulus polysaccharin injection was developed by UPLC – PDA. It was tested with the Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C18 column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), using 0.75% tri-ethylamine phosphatic liquor/solution (pH = 3.0) – methyl alcohol – acetonitrile – (50:45:5) as the mobile phase; The flow rate was 0.3 mL/min; The detection wavelength was set at 242 nm and simultaneously collected the spectrum at wavelength of 190 ~ 400 nm. The column temperature had been remained in 25 °C. The injection volume was 10 μL. The linear range of betamethasone was 20.0 ~ 180.0 mg · L⁻¹ ($R^2 = 0.9997$, $n = 7$); The mean recovery

作者简介: 韩春晓, 硕士, 从事兽药中非法添加检测技术研究及兽药新药研发方面研究。

通讯作者: 李欣南。E-mail: Lixinnanli@163.com

for betamethasone in bupleurum injection, lincomycin hydrochloride injection, vitamin C injection and asragalus polysacharin injection were 103.5% ($RSD = 0.2\%$), 101.2% ($RSD = 0.8\%$), 100.4% ($RSD = 1.7\%$), 99.2% ($RSD = 1.7\%$). This method is accurate, easy and fast, and provides a reliable way for detecting betamethasone in bupleurum injection and another three kinds of veterinary injections.

Key words: UPLC; bupleurum injection; vitamin C injection; lincomycin hydrochloride injection; asragalus polysacharin injection; betamethasone

倍他米松作为一种糖皮质激素,与糖、脂肪、蛋白质的代谢和生长发育等有着密切的关系,具有抗炎、抗毒、抗过敏、抗休克、抗免疫和抗发热(退热)等作用,在临床上有着十分广泛的应用^[1],如糖皮质激素的内科适应症有内分泌代谢病如高脂血症,感染性疾病如急性血吸虫病,系统性结缔组织病如系统性红斑狼疮等^[2],临床上常短期使用于调节人体代谢和对抗炎症。糖皮质激素是一组具有广泛的活性物质,对机体各脏器的机能均具有广泛的作用和影响,但如果长期给药,不可避免地会引起许多副作用和并发症,严重的副作用和并发症可导致病人死亡^[3],如长期应用可引起水、盐、糖、蛋白质及脂肪的代谢紊乱,诱发或加重感染,引发一些精神神经症状如情绪及行为异常,骨质疏松易发生病理性骨折,以及一些消化道症状如胃和十二指肠溃疡等^[4-5]。常见的糖皮质激素中,研究较多的为地塞米松,醋酸泼尼松等,对于倍他米松,目前还没有专门的试验方法。试验选取与糖皮质激素作用相似或与糖皮质激素联合使用的四种注射液作为基质,柴胡是临床常用中药药材,具有和解退热、疏肝解郁功效,柴胡注射液具有清热抗炎、抗病毒、保肝等作用,小柴胡汤与糖皮质激素联合能减少激素用量,减轻激素副作用^[6-7];糖皮质激素可用于由盐酸林可霉素引起的过敏性休克^[8];黄芪多糖可用于感染性疾病的治疗过程^[9];大剂量维生素 C 和糖皮质激素都可以用于治疗婴幼儿免疫性血小板减少性紫癜,均恢复良好^[10],更昔洛韦眼用凝胶联合维生素 C、糖皮质激素球结膜下注射治疗角膜内皮炎^[11]。但是简单将倍他米松添加到以上制剂中,可能引起倍他米松结构发生改变,产生毒副作用,因此需

建立一种方法以检测注射剂中非法添加的倍他米松。以往的糖皮质激素主要的检测方法有液相色谱-质谱联用,高效液相色谱法,反相高效液相色谱法,超高效液相色谱法等^[12-15],超高效液相色谱法简便易操作,结果准确,因此选用超高效液相色谱法检测倍他米松。

1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪-二极管阵列检测器(Waters 公司);AG-285 电子天平(Mettler 公司);DELTA320 pH 计(Mettler 公司);KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药 三乙胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),磷酸(分析纯,北京北化精细化学品有限责任公司),甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技中国有限公司),乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技中国有限公司),水(超纯水)。倍他米松对照品(批号为 40718,含量质量分数为 98.8%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。柴胡注射液(10 mL:原生药 10 g)、维生素 C 注射液(10 mL:0.5 g)、盐酸林可霉素注射液(10 mL:1 g)、黄芪多糖注射液(10 mL:0.2 g)均为市售样品,且经检测不含倍他米松。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相为 0.75% 三乙胺溶液(取 7.5 mL 三乙胺加水至 1000 mL 用磷酸调节 pH 至 3.0)-甲醇-乙腈 50:45:5,流速为 0.3 mL·min⁻¹,二极管阵列检测器,波长采集范围 190~400 nm,记录色谱图波长 242 nm,柱温为 25℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 阴性对照溶液 分别精密量取无非法添加的柴胡注射液,盐酸林可霉素注射液,维生素 C 注射液,黄芪多糖注射液 2、1、2、3 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,用 0.75% 三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 取倍他米松对照品约 20 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入 0.75% 三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)溶液适量,超声(250 W, 40 KHz)处理 10 min,使其溶解,稀释至刻度,摇匀,即得倍他米松对照品储备液($200.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);精密量取倍他米松对照品储备液 5 mL 至 10 mL 量瓶中,用 0.75% 三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)溶液稀释至刻度,摇匀,即得倍他米松对照品溶液($100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2.3 阳性添加溶液 在无非法添加的阴性注射液中分别添加倍他米松对照品适量,混匀,根据倍他米松注射液的含量,添加剂量参考临床使用剂量,添加剂量分别为 80、100、120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 建立光谱数据库的溶液 以 2.2.2 中倍他米松对照品溶液($100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)作为建立光谱数据库的溶液。

2.3 专属性与系统适应性试验 分别精密吸取

2.2.1 项下阴性对照溶液、2.2.2 项下倍他米松对照品溶液、2.2.3 项下阳性添加溶液($100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)各 10 μL ,分析条件按照 2.1 项中的参数测定,进样分析。结果显示,阴性样品出峰时间均较早,在 1 min 之前,而倍他米松出峰时间约 3 min,表明阴性样液对目标分析物测定无基质干扰,按倍他米松计算理论板数 ≥ 5000 ,阴性样品对阳性溶液的测定结果无影响。结果见下图 1 - 图 6。

2.4 峰纯度和光谱相似度检查 对阳性添加溶液色谱图中的注射液所含药物色谱峰进行峰纯度检查,以及对倍他米松的光谱图与光谱库进行匹配,按注射液与倍他米松浓度比分别为 1:1 进行检查匹配,结果表明各色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,说明该色谱条件下,四种注射液以及倍他米松

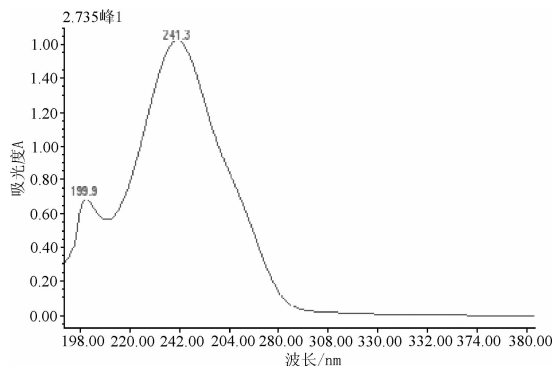
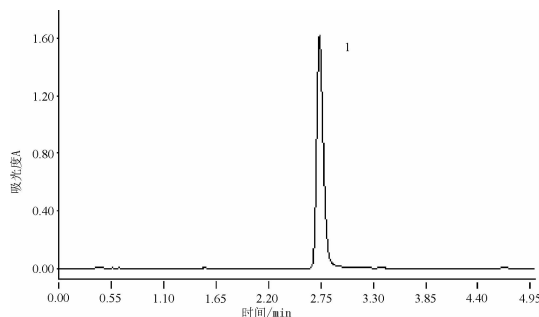
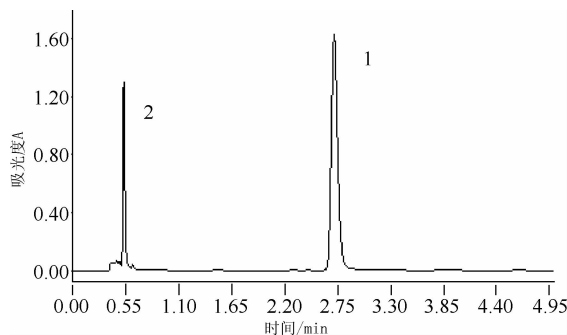


图 1 倍他米松对照品 PDA 光谱图



1 为倍他米松的色谱峰

图 2 倍他米松对照品 UPLC 色谱图

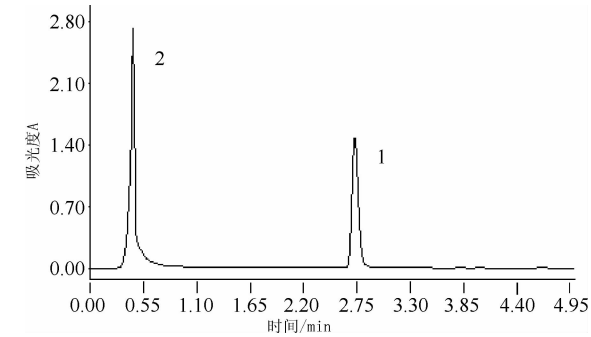


1 为倍他米松色谱峰;2 为柴胡注射液色谱峰

图 3 柴胡注射液阳性溶液 UPLC 色谱图

的出峰位置无其他干扰峰,为单一物质峰,方法可行;且 PDA 匹配角度均小于匹配阈值,供试品溶液中相应色谱峰的光谱与倍他米松的光谱非常相似,可认为是同一物质,数据结果见表 1。

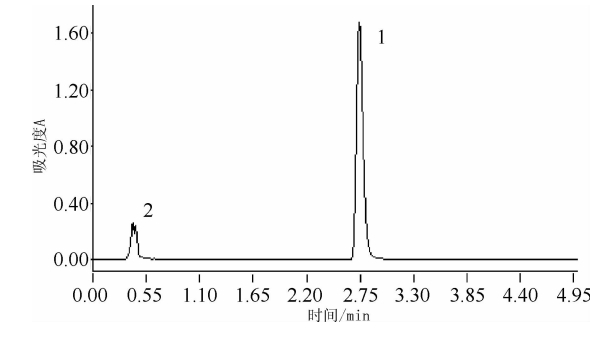
2.5 线性关系 分别精密量取 2.2.2 项下倍他米松对照品储备液适量,用 0.75% 三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)溶液稀释制成浓度分别为 20.0、



1 为倍他米松色谱峰;2 为黄芪多糖注射液色谱峰

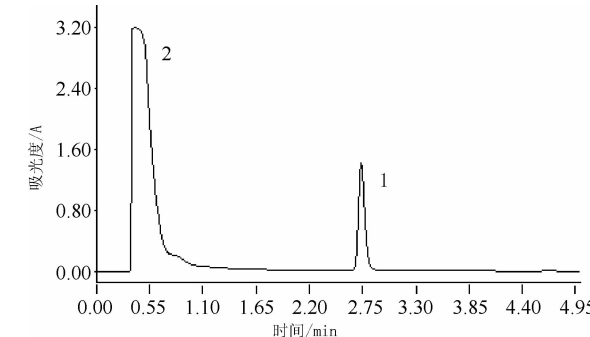
图 4 黄芪多糖注射液阳性溶液 UPLC 色谱图

40.0、80.0、100.0、120.0、140.0、180.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液,按“2.1”项中色谱条件,从低浓度向高浓度依次进行测定,记录色谱图,分别以标准溶液浓度为横坐标,以色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归运算,得倍他米松回归方程为 $A = 71308234.45p + 35358.939$, $R^2 = 0.9997$ 。结果表明倍他米松质量浓度在 20.0 ~ 180.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时与峰面积呈良好线性关系。



1 为倍他米松色谱峰;2 为盐酸林可霉素注射液色谱峰

图 5 盐酸林可霉素注射液阳性溶液 UPLC 色谱图



1 为倍他米松色谱峰;2 为 VC 注射液色谱峰

图 6 维生素 C 注射液阳性溶液 UPLC 色谱图

表 1 峰纯度检查结果表							
药物名称	峰名称	纯度角度	纯度阈值	纯度结果	匹配角度	匹配阈值	PDA 理想匹配结果
柴胡注射液	倍他米松	0.621	0.773	单一物质峰	0.193	1.250	是
维生素 C 注射液	倍他米松	0.154	0.563	单一物质峰	0.172	1.241	是
黄芪多糖注射液	倍他米松	0.204	0.649	单一物质峰	0.173	1.241	是
盐酸林可霉素注射液	倍他米松	0.145	0.531	单一物质峰	0.126	1.241	是

2.6 回收率试验

2.6.1 精密度

2.6.1.1 仪器精密度试验 取 2.2.2 项下倍他米松对照品溶液 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,记录色谱峰面积。得倍他米松色谱峰面积的 RSD 为 0.12%。表明色谱系统精密度良好。

2.6.1.2 重复性试验 取按 2.2.3 项下制备的四种阳性添加溶液 6 份,按 2.1 色谱条件分析,记录光谱,色谱图,计算柴胡注射液、盐酸林可霉素注射液、维生素 C 注射液、黄芪多糖注射液中倍他米

松含量的平均值,分别为 20.04、20.07、20.05、20.05 mg ; RSD 分别为 0.45%、0.31%、0.16%、0.32%;表明本方法中倍他米松的重复性良好。

2.6.2 加标回收率试验 取“2.2.3”四种阳性添加溶液,按“2.1”条色谱条件测定,记录色谱图,用外标法以色谱图峰面积计算回收率,结果见表 2。

2.7 检测限 将 2.2.3 项下阳性添加溶液(添加剂量为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)逐级稀释,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,光谱图,以光谱图失真的最大浓度为检测限,检出限为 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,结果见图 7。

表2 回收率试验结果

样品名称	添加水平/ (mg·L ⁻¹)	回收率/% (n=9)			批内平均 回收率/%	相对标准偏差 (RSD/% n=3)	批间平均 回收率/%	相对标准偏差 (RSD/% n=9)
		1	2	3				
柴胡注射液	80	103.34	103.51	103.41	103.42	0.08		
	100	103.57	103.2	103.21	103.33	0.2	103.5	0.2
	120	103.37	103.6	103.57	103.51	0.12		
盐酸林可霉素注射液	80	100.34	100.39	100.81	100.51	0.25		
	100	100.81	100.74	100.91	100.82	0.09	101.2	0.8
	120	100.35	100.42	100.16	100.31	0.13		
维生素C注射液	80	98.52	98.72	98.77	98.77	0.13		
	100	99.96	100.16	99.94	100.02	0.12	100.4	1.7
	120	102.17	102.7	102.62	102.50	0.23		
黄芪多糖注射液	80	100.99	100.98	100.8	100.92	0.11		
	100	97.11	97.09	96.97	97.06	0.08	99.2	1.7
	120	98.74	99.94	99.85	99.51	0.67		

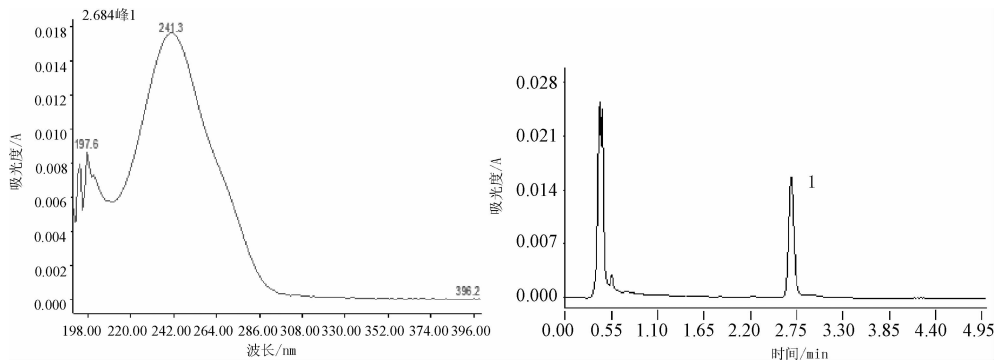


图7 倍他米松的检测限光谱图及色谱图

2.8 耐用性试验

2.8.1 供试品溶液的稳定性 取2.2.3项下倍他米松阳性添加溶液(100.0 mg·L⁻¹),按2.1项下色谱条件分别在0、2、4、8、12、16、24 h测定,计算地倍他米松色谱峰面积的RSD为0.29%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8.2 色谱条件的微小改变 取2.2.2与2.2.3项下同一对照溶液和阳性添加溶液,调整流动相的配比:7.5%三乙胺溶液(pH=3.0)-甲醇-乙腈(45:50:5、55:40:5、45:45:10);调整柱温:20℃、25℃、30℃;改变流速:0.2 mL·min⁻¹、0.4 mL·min⁻¹,以上色谱条件的微小改变对分离效果、含量测定均无明显影响。

3 讨论

3.1 溶剂以及流动相的选择 试验建立了柴胡、

盐酸林可霉素、维生素C、黄芪多糖注射液中非法添加倍他米松的检查方法,该方法采用Waters Acquity UPLC超高效液相色谱仪-二极管阵列检测器,以0.75%三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)为溶剂,优化流动相比比例为0.75%三乙胺溶液(pH为3.0)-甲醇-乙腈(50:45:5),保证了良好的峰型和分离效果,并提高了回收率。

顾明芬^[16]在用高效液相色谱法检测黄芪多糖注射液中的地塞米松磷酸钠时采用的流动相及溶剂为三乙胺溶液(取三乙胺0.75 mL,加水稀释至1000 mL,用磷酸调节pH值至3.0±0.05)-甲醇-乙腈(55:40:5),倍他米松和地塞米松为同分异构体,但试验中发现倍他米松在该流动相为溶剂时溶解度不好,调整溶剂比例为7.5%三乙胺溶液:乙腈:甲醇(70:29:1)时,溶解度良好;同时试验采用

超高效液相色谱法,调整流动相比比例为0.75%三乙胺溶液($\text{pH}=3.0$)—甲醇—乙腈(50:45:5),分离度良好,效率高。

3.2 检测波长的选择以及适用性结果 研究规定的条件下,倍他米松在199和242 nm有最大吸收,前者的吸收明显低于后者,故选择定量波长为242 nm。

本方法检测限为 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,在光谱图未失真的范围内,倍他米松的线性良好,添加浓度较低时本方法仍然适用。方法重复性、线性关系良好($R^2=0.9997$),添加回收率在99.2%~103.5%范围内, RSD 在0.2%~1.7%之间。四种注射液中倍他米松的出峰位置无其他干扰峰,为单一物质,PDA匹配结果理想。

利用化学药物疗效确切、适用范围广的特点,滥用或非法使用兽药及违禁药品的现象屡见不鲜^[17-18],但一些药物可以通过食物链的累积与传递,降低了动物性食品的安全性,增加了食用动物性食品致人生病的危险性。添加的药物种类繁多,为相关检测机构带来挑战。应提前完善兽药中非法添加药物的检测方法,提升检测水平,增强对非法添加药物的识别能力,防患于未然^[19]。本试验采用的UPLC—PDA法大大缩短了检测时间($\leq 5\text{ min}$),且PDA检测器可以定性目标化合物,可以用于中兽药违法添加检测。

参考文献:

- [1] 吴斌.糖皮质激素副作用的中医药研究进展[J].时珍国医国药,2010,21(3):719-721.
- [2] 赵篱陶,黄慈波.糖皮质激素的合理使用[J].临床药物治疗杂志,2010,8(1):23-28.
- [3] 杨清儒,杨璐舟.糖皮质激素的副作用及并发症对策[J].中国现代医生,2008,46(3):31-32.
- [4] 王学叶.糖皮质激素的不良反应[J].临床和实验医学杂志,2008,7(10):133-134.
- [5] 杨晓丽,宋纯东.中医药辩证糖皮质激素副作用之我见[J].光明中医,2011,26(3):465-466.
- [6] 康新奇.柴胡注射液的药理及不良反应分析[J].中国现代药物应用,2015(19):254-255.
- [7] 许浚实,黑洁,孙长义.小柴胡汤中具有糖皮质激素样作用单剂的实验研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2004,7(8):781-783.
- [8] 谢柏岚.盐酸林可霉素注射液致过敏性休克抢救体会[J].中国保健营养,2014,(7):4008.
- [9] 李毅斌,陈文.黄芪多糖注射液非法添加成分检测与思考[J].中兽医医药杂志,2012,31(1):73-75.
- [10] 李仕勇.大剂量维生素C与糖皮质激素治疗婴幼儿免疫性血小板减少性紫癜疗效比较[J].中国当代医药,2011,19(21):238.
- [11] 庞松然.更昔洛韦眼用凝胶联合维生素C、糖皮质激素球结膜下注射治疗角膜炎的临床研究[J].中国医药指南,2011,9(21):302-304.
- [12] 陈凤,陈宇,董培建.HPLC—MS联用同时检测支气管类中成药中违禁添加的11种糖皮质激素[J].中成药,2016,36(1):102-106.
- [13] 潘军.HPLC法筛查中药软膏制剂中非法添加的17种糖皮质激素[J].中成药.2014,36(11):2323-2326.
- [14] 单敏,郑方晔,李锋武.RP—HPLC法测定复方倍他米松注射液有关物质[J].药物分析杂志,2008,28(4):624-626.
- [15] 张振兴,孙旭,高媛,等.UPLC法测定倍他米松尿素乳膏中倍他米松含量[J].中国药师,2014,17(7):1116-1118.
- [16] 顾明芬,陈小秋.黄芪多糖注射液非法添加地塞米松磷酸钠的检查方法研究[J].中国兽药杂志2014(6):28-31.
- [17] 计娅丽.浅谈畜产品质量安全存在的问题及对策[J].河南畜牧兽医(市场版)2013(1):44-45.
- [18] 周媛,贡玉清,邵德佳.有关中兽药中非法添加化学药物的探讨[J].中兽医医药杂志2010,29(4):28-31.
- [19] 林中,黄萍,方光伟.兽药中非法添加违禁药物的原因分析及监管对策[J].中国兽药杂志2014,48(5):63-65.

(编辑:陈希)