

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.07

三氮脒含量测定的高效液相色谱法研究

林仙军, 周芷锦, 罗成江, 王彬, 陈晓林

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101)

[收稿日期] 2017-06-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 01-0046-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了 HPLC 法测定注射用三氮脒中三氮脒含量的方法。采用 C18 色谱柱, 以 0.05 mol/L 磷酸溶液-乙腈 (95 : 5, V/V) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 370 nm, 柱温为 30 °C。结果三氮脒在 1~100 µg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 $r=0.9998$ 。建立的方法操作简便、准确、可靠, 可用于三氮脒的质量控制。

[关键词] 三氮脒; 高效液相色谱; 含量测定

Determination of Diminazene Aceturate in Diminazene Aceturate for Injection by HPLC

LIN Xian-jun, ZHOU Zhi-jin, LUO Cheng-jiang, WANG Bin, CHEN Xiao-lin

(Zhejiang Province Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feed, Hangzhou 311101, China)

Abstract: A HPLC method was established for determination of diminazene aceturate in diminazene aceturate for injection. Analysis was performed on ODS chromatography column. The mobile phase was consisted of a mixture of 0.05 mol/L phosphate solution and acetonitrile (95 : 5, V/V). The detected wavelength was 370 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 °C. A good linearity of the calibration curves was obtained with the range of 1~100 µg/mL for diminazene aceturate ($r=0.9998$). The method is simple, accurate, reliable and applicable to the determination of diminazene aceturate in diminazene aceturate for injection.

Key words: diminazene aceturate; HPLC; determination

三氮脒为兽医专用抗原虫药^[1], 别名贝尔尼、血虫净, 为重氮胺苯腈乙酰胺甘氨酸盐水合物, 对家畜的锥虫、梨形虫及边虫均有作用^[2-4], 用药后血药浓度高, 维持时间短, 治疗效果好, 预防效果差^[5]。三氮脒对家畜的毒性较大^[6], 安全范围较小, 可引起副交感神经兴奋样反应, 过量使用可引起死亡^[7]。三氮脒的质量标准收载于《中华人民共和国

兽药典》2015 年版一部^[8], 采用永定滴定法测定含量, 专属性较差, 对于符合规定的样品能够准确检测, 但对于不纯的样品往往无法准确测定, 滴定时不能显示终点无法检测或者终点显示不准确。对三氮脒的研究主要有残留检测^[9-10] 和有关物质^[11], 但未见高效液相色谱法测定三氮脒含量的报道。因此, 研究高效液相色谱法测定三氮脒的含

基金项目: 浙江省“三农六方”科技协作项目 (CTZB-F160728AWZ-SNY1-25)

作者简介: 林仙军, 高级畜牧师, 从事兽药、饲料和畜产品质量安全检测工作。E-mail: lxj1000@163.com

量,对完善兽药质量标准有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 仪器设备 Agilent 1260 高效液相色谱仪,配 DAD 检测器(美国 Agilent 公司);AG-285 电子天平(Mettler 公司);SL502N 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);METTLER TOLEDO 320 酸度计(Mettler 公司);METTLER TOLEDO T50 全自动滴定仪(Mettler 公司)。

1.2 试剂与药品 乙腈、甲醇均为色谱纯,德国默克公司;磷酸、三乙胺、盐酸、过氧化氢和氢氧化钠均为分析纯;水为超纯水。三氮脒对照品来源为 Dr.Ehrenstorfer GmbH,批号 G125952,含量 88.9%。注射用三氮脒来源为成都中牧生物药业有限公司,批号为 20150901,20150902,20150903,规格为 1 g;A 企业,批号为 160401,规格为 1 g。

1.3 对照品溶液和供试品溶液的配制 分别取三氮脒对照品和供试品适量,精密称定,用 5%乙腈溶液超声溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 20 μg 的溶液,摇匀,作为对照品溶液。

1.4 标准曲线系列溶液的配制 取三氮脒对照品适量,用 5%乙腈溶液超声溶解并稀释制成每 1 mL 中含三氮脒 100 μg 的溶液,摇匀,作为对照品溶液。取对照品溶液适量,用 5%乙腈溶液稀释成浓度分别为 1、2、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

1.5 高效液相色谱条件和系统适应性试验 色谱柱:Agilent Zorbax XDB C18 内径 4.6 mm,柱长 250 mm,粒径 5 μm ;检测波长:370 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相为 0.05 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 3.0)-乙腈(95:5,V/V)。

1.6 永停法滴定的方法 取本品 1 g,精密称定,加水 20 mL 使溶解,加盐酸溶液(1 \rightarrow 2)40 mL,搅拌使溶解,再加溴化钾 2 g,用亚硝酸钠滴定液(0.1 mol/L)迅速滴定。每 1 mL 亚硝酸钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 51.55 mg 的 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_7 \cdot 2\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及线性关系考察 取 1.4 项下溶液,按照建立的色谱条件进样检测,得到三氮脒对照品溶液色谱图见图 1。以系列对照品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,三氮脒在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好,线性方程 $Y=102.12X-1.4706$,相关系数 $r=0.9998$,标准曲线图见图 2。

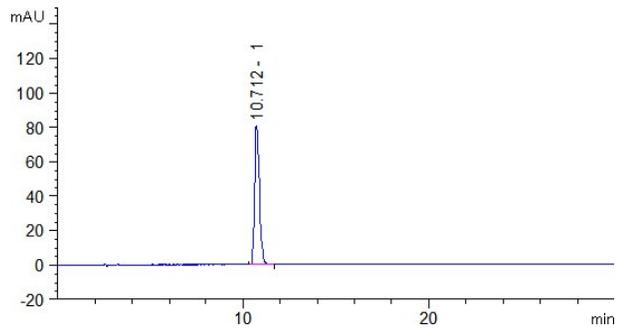


图 1 三氮脒对照品溶液(1.三氮脒)

Fig 1 Diminazene reference solution (1.diminazene)

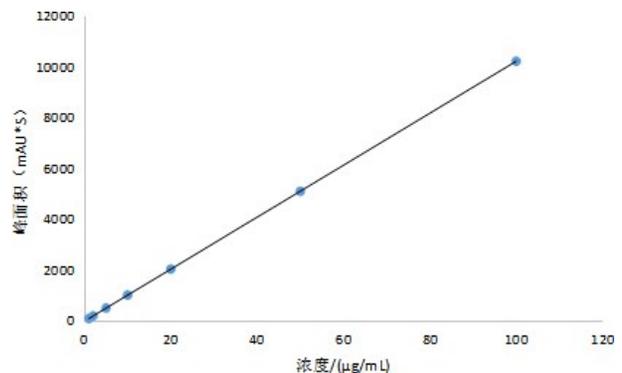


图 2 三氮脒标准曲线图

Fig 2 Diminazene standard chart

2.2 稳定性试验 取批号为 20150901 的三氮脒供试品溶液,分别于 0、2、4、6、12 和 24 h 进行测定,测得三氮脒峰面积分别为 2048.15645、2046.13654、2041.56871、2032.56225、2010.11236 和 2035.66785,表明供试品溶液稳定性良好。

2.3 HPLC 法和永停法比较 分别用 HPLC 法和永停法对实际样品进行测定,数据见表 1。对成都

中牧生物药业有限公司提供的注射用三氮脒进行检测,批号为 20150901,20150902,20150903,三氮脒的含量与永停法一致,相对偏差在 0.5% 以内。同时对 A 企业产品,批号为 160401,规格为 1 g 的注射用三氮脒进行了含量测定,HPLC 法测定结果

为 18.4%,峰形良好没有干扰。而永停法无法显示终点,含量无法测定。根据后续初步研究,判断该注射用三氮脒中含有大量多西环素,怀疑多西环素对永停法测定三氮脒产生干扰,导致无法测定的现象发生。

表 1 HPLC 法与永停法测定含量结果比较 (n=3)

Tab 1 Comparison of content determination by HPLC method and permanent stop method (n=3)

批号	20150901	20150902	20150903	160401
HPLC 法/%	97.9	97.8	97.7	18.4
永停法/%	98.0	98.0	98.1	无法显示终点
HPLC 法和永停法相对偏差/%	0.1	0.1	0.2	/

3 讨论和小结

取标准曲线系列溶液中 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,在 200-400 nm 波长范围内进行 DAD 扫描。结果三氮脒在 370 nm 的波长处有最大吸收,见图 3。因此,选择 370 nm 作为检测波长。

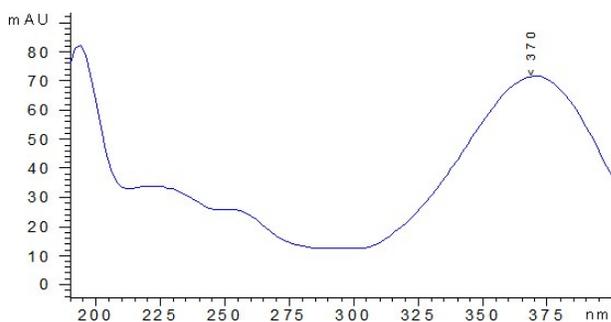


图 3 三氮脒 DAD 扫描图谱

Fig 3 Diminazene DAD scanning pattern

用乙腈-水作为流动相时,三氮脒色谱峰拖尾较为严重。在流动相中加入三乙胺、磷酸等改进剂能够抑制解离,改善峰形。研究考察了 0.01、0.025 和 0.05 mol/L 等不同浓度的磷酸溶液,添加三乙胺调节 pH 值为 2.0、2.5、3.0 和 3.5。结果磷酸浓度低,峰形拖尾较严重,磷酸浓度提高,色谱峰拖尾得到改善;pH 值对色谱峰影响较小,和金录胜^[11]的研究一致;考察了乙腈的比例对保留时间的影响,乙腈的量 5% 的时候,保留时间约为 10.6 分钟,比

较合适。

三氮脒为黄色或橙黄色结晶性粉末,无臭,遇光、遇热外观变为橙红色,但含量保持不变。对三氮脒的稳定性进行了研究,取三氮脒 0.1 g,分别加 1 mol/L 盐酸溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液和 5% 过氧化氢溶液各 1 mL,放置 1 h,依法测定。结果三氮脒在 1 mol/L 盐酸溶液中的放置 1 h 后,溶液无色,含量下降明显,90% 以上已降解;在氢氧化钠溶液和过氧化氢溶液中溶液颜色橙红色,含量稳定。其降解产生的杂质均不干扰三氮脒色谱峰。

对含量较低或者存在非法添加物干扰的注射用三氮脒,永停滴定法多数无法准确测定其含量,而高效液相色谱法具有良好的专属性,能够准确测定三氮脒的含量,具有明显的优势。因此,建立的方法可用于三氮脒的质量控制。

参考文献:

- [1] Samuel W M, Joshua M M, John C M, *et al.* In vitro activity and in vivo efficacy of a combination therapy of diminazene and chloroquine against murine visceral leishmaniasis [J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2015, (3): 214-223.
- [2] Nwodo N N. Antitrypanosomal potentials of the extract and fractions of *Abrus precatorius* seeds [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2012, (11): 857-861.
- [3] Omoja V U, Anaga A O, Obidike I R, *et al.* The effects of combination of methanolic leaf extract of *Azadirachta indica* and dimi-

- nazene diacetate in the treatment of experimental *Trypanosoma brucei brucei* infection in rats[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, (5): 337-341.
- [4] Padma N P, Mahendran K, Subas C J, *et al.* *Trypanosoma evansi* infection in a German shepherd dog—Apparent successful treatment using serial low dose of diminazene aceturate[J]. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 2015, (1-2): 70-74.
- [5] Adieme I C, Ezeh I O, Ugochukwu E I, *et al.* Effect of diminazene aceturate, levamisole and vitamin C combination therapy in rats experimentally infected with *Trypanosoma brucei brucei*[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014, (6): 438-445.
- [6] Oluyomi S A, Faoziyat A S. Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems[J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2015, (2): 145-149.
- [7] Oguejiofor C F, Ochiogu I S, Umeoduagu C J. Increasing doses of diminazene aceturate; adverse reproductive effects in female Wistar rats[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010, (11): 887-889.
- [8] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典》2015 年版[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Chinese Veterinary Pharmacopoeia*, 2015 edition.[S].
- [9] 赵吉祥, 李博, 路文华, 等. 猪血浆样品中三氮脒质量浓度的高效液相色谱测定方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2014, (1): 93-97.
- Zhao J X, Li B, Lu W H, *et al.* Development of high performance liquid chromatography for determination of the level of diminazene diacetate in swine plasma sample[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2014, (1): 93-97.
- [10] 刘瑾, 曾振灵, 余静贤, 等. 牛乳中三氮脒残留高效液相色谱检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2012, (5): 533-536.
- Liu J, Zeng Z L, Yu J X, *et al.* Development of a high performance liquid chromatography method for the detection of diminazene diacetate residue in milk[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, (5): 533-536.
- [11] 金录胜, 陈莎莎, 李树纲, 等. 反相高效液相色谱法测定三氮脒有关物质的方法学研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2010, (6): 41-43.
- Jin S L, Chen S S, Li S G, *et al.* Determination on related substances in diminazene aceturate by RP—HPLC[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2010, (6): 41-43.

(编辑:陈希)