

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.07

# 高效液相色谱法测定 6 种兽用中药散剂中的利福平

章安源,李有志,张志民,张传津,冯涛,陈玲,刘道中

(山东省兽药质量检验所;山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室,济南 250022)

[收稿日期] 2017-12-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0042-07 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 为建立麻黄鱼腥草散、鸡痢灵散、定喘散、银翘散、金花平喘散、四黄止痢颗粒 6 种中兽药散剂中非法添加利福平高效液相色谱检查方法,研究使用 C18(4.6 mm×250 mm,5 $\mu$ m) 色谱柱,样品经前处理后用流动相稀释(乙腈:甲醇:磷酸盐缓冲液=35:35:30),采用二极管阵列检测器(HPLC-DAD),波长采集范围为 200~400 nm,记录色谱图波长为 237 nm,流速为 1.0 mL/min,进样量为 10  $\mu$ L。结果表明,利福平进样浓度在 5~250  $\mu$ g/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系( $r^2=0.9997$ ),平均回收率在 92.9%~93.7% 之间,RSD 在 0.4%~1.13% 之间( $n=6$ )。试验方法简便、准确、可行,适用于兽用中药制剂中非法添加利福平的定性定量检测。

**[关键词]** 高效液相色谱法;中兽药散剂;利福平

## Detection of Rifampicin in the Six Veterinary Chinese Herb Medicine Powders by HPLC

ZHANG An-yuan, LI You-zhi, ZHANG Zhi-min, ZHANG Chuan-jin, FENG Tao, CHEN Ling, LIU Dao-zhong

(Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute;

Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China)

**Abstract:** A detection method of rifampicin illegally adulterated in the six veterinary traditional Chinese herb medicine powders. It was established by HPLC. The six veterinary Chinese Herb powders in cluding Manghuangyuxingcao San, Jililing San, Dingchuan San, Yinqiao San, Jinhuaapingchuan San, Sihuangzhili keli. Samples directly diluted by mobile phase (acetonitrile : methanol : phosphatebuffer = 35 : 35 : 30), High performance liquid chromatography with diode array detector. Photodiode array detector wave length range was 200~400 nm, The recorded wave length was 237 nm, The flow rate was 1.0 mL/min, The injection volume was 10  $\mu$ L. The results showed rifampicin in 5~250  $\mu$ g/mL concentration range of linear relationship is good; 6 kinds of veterinary chinese herb medicine powders recoveries in 92.9%~93.7%, the coefficient of variation in 0.4%~1.13%. The method has good recovery rate, accuracy is higher, which can be used for qualitative and quantitative detection of rifampicin illegally added in veterinary traditional chinese herb medicinal powders.

**Key words:** HPLC; veterinary traditional chinese medicine powders; rifampicin

2012 年,我国发布了国家中长期动物疫病防治规划<sup>[1]</sup>。奶牛结核病计划至 2020 年全国 7 省达到维持或净化标准<sup>[2]</sup>。养殖过程中抗菌药物的广泛使用(甚至滥用)易造成动物源性细菌耐药性的出现,多重耐药菌便可以通过食物传播到人类,耐药基因可在人类、动物和环境之间进行传播<sup>[3]</sup>,威胁动物源性食品和公共卫生的安全。

我国农业部为大力打击非法添加违禁药物,已经版布的 2448 号公告制订了多种中兽药散剂非法添加解热镇痛、金刚烷胺类等化学药物检查方法<sup>[4]</sup>。但利福平是人用药,已发布的公告中尚不涉及利福平的检查,研究旨在建立一种简单、方便、适用的高效液相色谱法,对兽用中药散剂中违规添加利福平进行定性定量检测。

## 1 材料与方 法

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪 Waterse2695(配二极管阵列检测器 2998);AE-240 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-250DB 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

1.2.1 对照品 利福平对照品来自中国食品药品检定研究院,批号 130496-201703,含量 98.8%。

1.2.2 阴性样品 麻黄鱼腥草散、鸡痢灵散、金花平喘散、定喘散、银翘散制备:按比例<sup>[5]</sup>称取药材,置粉碎机中粉碎,混合均匀后为阴性样品;四黄止痢颗粒由山东某企业提供,未检测出利福平的合格产品,作为阴性样品。

1.2.3 阳性添加样品 按照 1.2.2 项下方法处理后阴性样品添加利福平对照品,混匀。

1.2.4 试剂 甲醇、乙腈,为色谱纯,德国 Merck 公司;磷酸二氢钾,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液为 0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液<sup>[6]</sup>。

### 1.3 检测方法

1.3.1 高效液相色谱条件 色谱柱为 waters C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 $\mu$ m);流动相为乙腈-甲醇-磷酸盐缓冲液(35:35:30);检测器为二极管阵列

检测器;采集波长范围 200~400 nm,分辨率 1.2 nm;记录 237 nm 波长处的色谱图、光谱图中纯度角度、纯度阈值及 PDA/FLR 匹配 1 角度、PDA/FLR 匹配 1 阈值;流速 1.0 mL/min,柱温为 30 $^{\circ}$ C;进样体积为 10  $\mu$ L。

1.3.2 阴性样品溶液的制备 按 1.2.2 方法将处理后的样品各称取 1.0 g 置锥形瓶中,加入流动相 50 mL,超声处理 20 min,静置,滤过,取续滤液 1.0 mL,加流动相定容至 100 mL 容量瓶中,用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,取滤液上机。

1.3.3 阳性样品溶液的制备 按 1.3.2 方法制备的阴性样品中每 1 mL 添加 0.1 mg 利福平,混匀作为阳性添加样品。

1.3.4 对照品溶液的配制 精密称取利福平对照品 100 mg(精确到 0.1 mg)加流动相定量稀释成每 1 mL 含 100  $\mu$ g 溶液(临用前避光配制)<sup>[7]</sup>,用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,取滤液上机。

## 2 结 果

2.1 专属性试验 照 1.3.1 项下条件,精密吸取对照品溶液、阴性样品溶液、阳性样品溶液各 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪。对照品溶液 237 nm 处有最大吸收波长(图 1)保留时间约为 6.953 min 的峰(图 2)。阳性样品溶液色谱图中的利福平峰(图 3~图 14)与对照品出峰时间一致。

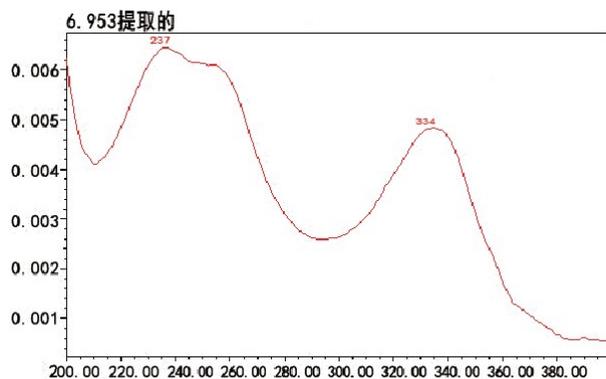


图 1 对照品溶液(100  $\mu$ g/mL)光谱图

Fig 1 Ultra-violet spectra of reference substance

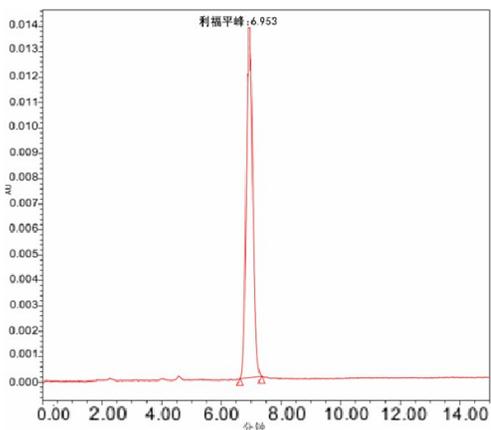


图 2 对照品溶液色谱图 (100 µg/mL)

Fig 2 The chromatogram of reference substance

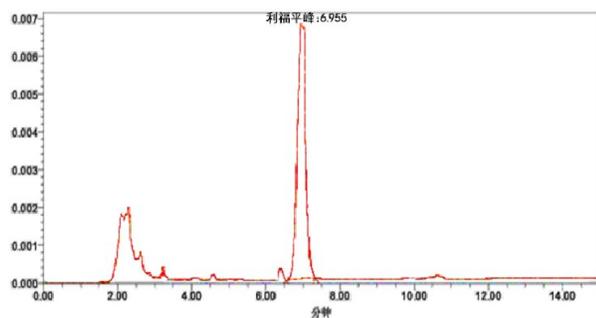


图 6 鸡痢灵散阳性样品溶液

Fig 6 The spiked sample of Jiling San

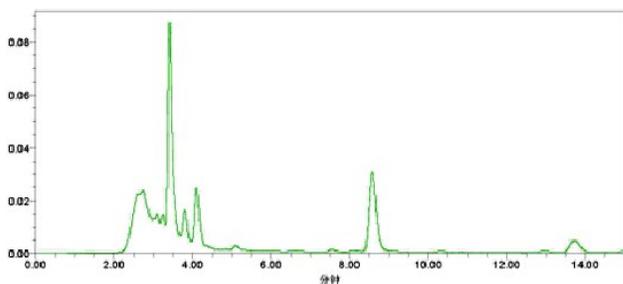


图 3 麻黄鱼腥草散阴性样品溶液

Fig 3 The chromatogram of negative sample of Manghuangyuxingcao San

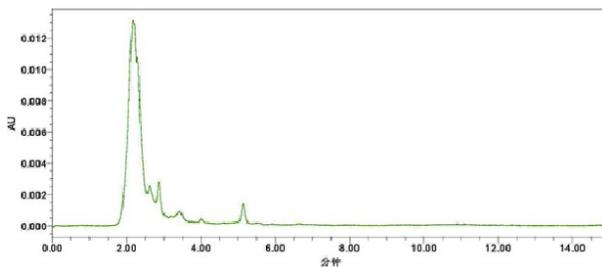


图 7 定喘散阴性样品溶液

Fig 7 The chromatogram of negative sample of Dingchuan San

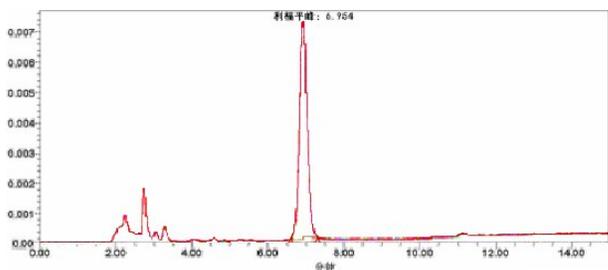


图 4 麻黄鱼腥草散阳性样品溶液

Fig 4 The spiked sample of Manghuangyuxingcao San

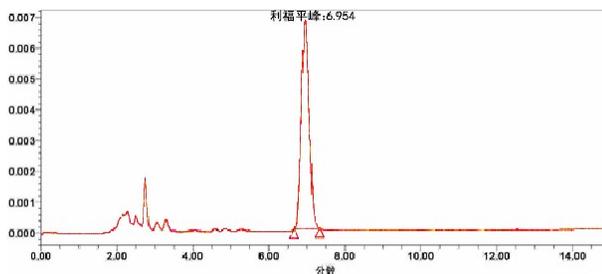


图 8 定喘散阳性样品溶液

Fig 8 The spiked sample of Dingchuan San

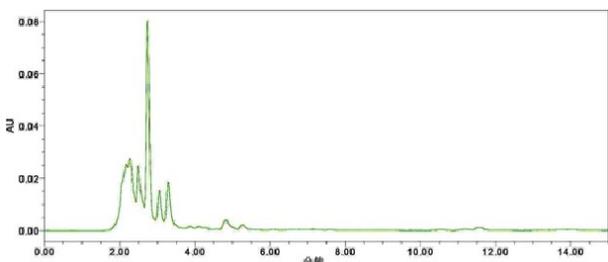


图 5 鸡痢灵散阴性样品溶液

Fig 5 The chromatogram of negative sample Jiling San

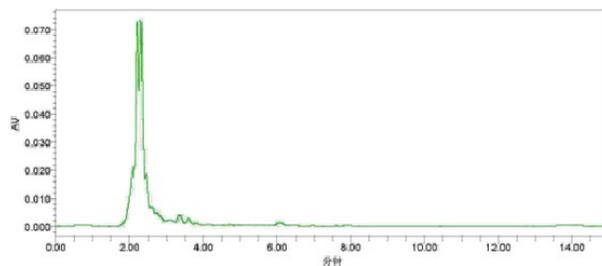


图 9 银翘散阴性样品溶液

Fig 9 The chromatogram of negative sample of Yinqiao San

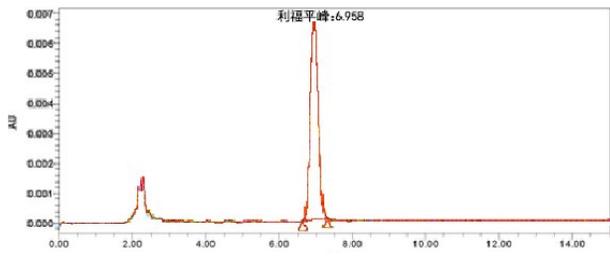


图 10 银翘散阳性样品溶液

Fig 10 The spiked sample of Yinqiao San

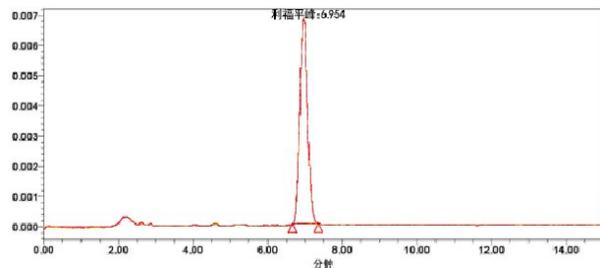


图 14 四黄止痢颗粒阳性样品溶液

Fig 14 The spiked sample of Sihuangzhili keli

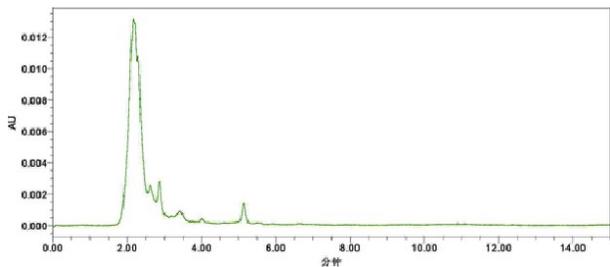


图 11 金花平喘散阴性样品溶液

Fig 11 The chromatogram of negative sample of Jinhua pingchuan San

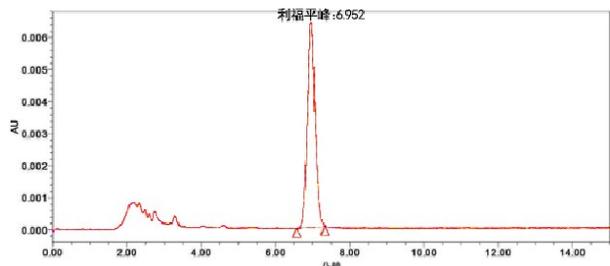


图 12 金花平喘散阳性样品溶液

Fig 12 The spiked sample of Jinhua pingchuan San

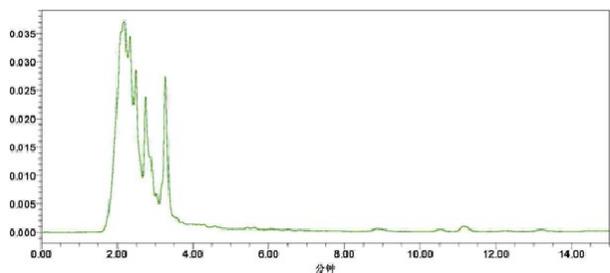


图 13 四黄止痢颗粒阴性样品溶液

Fig 13 The chromatogram of negative sample of Sihuangzhili kel

2.2 峰纯度及光谱匹配检查图 建立对照品溶液中利福平峰的光谱库,对阳性样品溶液和对照品溶液中保留时间约为 6.93 min 的峰进行峰纯度检查,纯度角度小于纯度阈值(图 15,图 17);PDA/FLR 匹配 1 角度小于 PDA/FLR 匹配 1 阈值(图 16,图 18)。

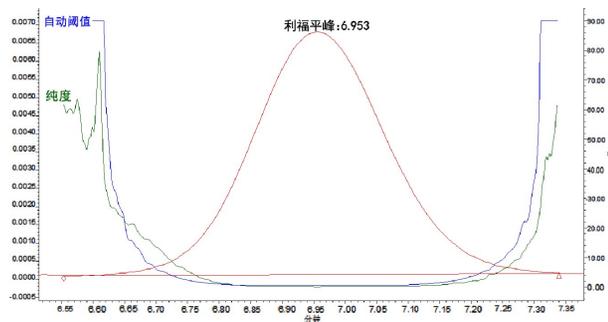


图 15 利福平峰纯度图

Fig 15 The peak purity test of the reference substance

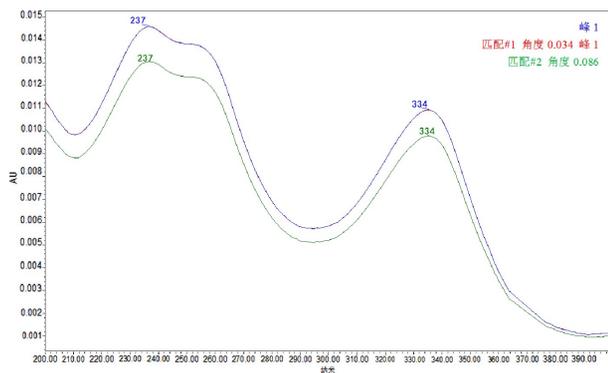


图 16 利福平光谱匹配图

Fig 16 Matching angle and threshold in the reference substance

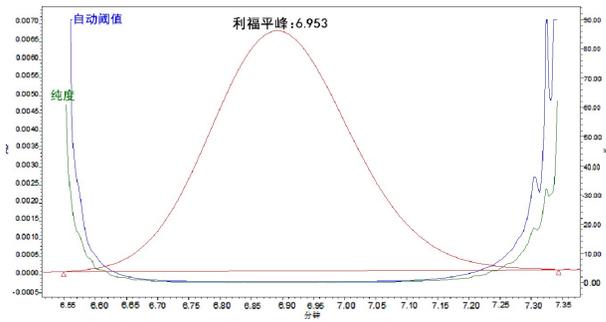


图 17 麻黄鱼腥草散中性样品中福平峰纯度图

Fig 17 The peak purity test of the spiked sample of Manghuangyuxingcao San

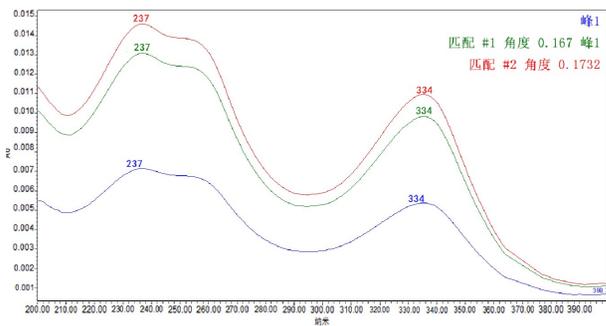


图 18 麻黄鱼腥草散阳性样品中利福平峰匹配图

Fig 18 Matching angle and threshold in the spiked sample of Manghuangyuxingcao San

2.3 检测限试验 取 1.3.4 项下储备液,分别配制浓度为 500、50、25、10、5、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,进行测定,同时记录色谱图与光谱图,得出光谱图失真浓度是 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,故为方法检出限浓度。

2.4 线性关系考察 精密量取利福平对照品贮备液,用流动相逐级稀释成 5、10、25、50、100、250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列溶液,注入液相色谱仪,按照 1.3.1 条件下测定,按利福平面积与对应的浓度做标准曲线,并计算回归方程和相关系数 ( $R^2$ ),回归方程为:  $y = 22404x - 5001.4 (r^2 = 0.9997)$ 。结果表明,利福平在 5~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 0.10  $\text{mg}/\text{mL}$  的利福平对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,在 1.3.1 条件下进行测定,连续测定 6 次,峰面积  $RSD$  为 0.1%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同批四黄止痢颗粒(批号为 20170101,标识生产单位为山东某生物科技有限公司),按 1.3.2 项下制备 6 份样品溶液,分别注入液相色谱仪,在 1.3.1 项下测定含量, $RSD$  为 0.5%,表明重复性好。

2.7 回收率试验 按 1.3.3 项下方法制备阳性添加样品,每种样品各平行 6 份,制备成样品溶液后,按照外标法定量,分别注入液相色谱仪,在 1.3.1 条件下进行测定,利福平平均回收率为 92.9%~93.7%之间, $RSD$  在 0.4%~1.13%之间,显示该方法回收率较好,准确度较高。结果见表 1。

2.8 耐用性试验 从柱温、流动相、色谱柱三个方面考察方法的耐用性。分别改变柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、35  $^{\circ}\text{C}$ ;调整流动相中弱酸缓冲液浓度及比例,使用不同品牌、不同型号的色谱柱:Agilent XDB-C18 (4.6  $\text{mm} \times 250 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ ); Agilent Plus C18 (4.6  $\text{mm} \times 250 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ ); Waters Symmetry C18 (4.6  $\text{mm} \times 250 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ ) 等,进样分析,考察色谱条件变动时该方法的耐用性。

2.8.1 稳定性试验 取同一对照品溶液,于制备后 0、2、4、6、12、24 h 注入液相色谱仪,在 1.3.1 项下条件分别进行测定,利福平峰面积的  $RSD$  为 0.2%,表明溶液在 24 h 内稳定。

2.8.2 判定依据 在相同条件下,在 200~400 nm 波长范围内供试品出现的色谱峰与对照品色谱峰保留时间相一致(差异小于等于  $\pm 5\%$ );两者光谱图无明显差异(必要时可调整供试品溶液的浓度);最大吸收处波长一致(差异小于等于  $\pm 2 \text{ nm}$ ),则判为检出被测试药物<sup>[4]</sup>。上述研究表明,6 种阳性添加样品色谱图中出现未知峰与对照品出峰时间一致,吸光度一致;纯度角小于纯度阈值,PDA/FLR1 匹配角 1 小于 PDA/FLR1 匹配 1 阈值,说明二者光谱均匀,未包裹共流出物,均为单一物质峰。故判定此阳性添加样品中出现的未知峰为利福平。

### 3 讨论与小结

3.1 波长、流动相的比例及柱温选择 利福平在 237 和 334 nm 有最大吸收,前者的吸收强度明显高于后者,故选择定量波长为 237 nm。利福平为弱酸

表 1 利福平添加回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab 1 The result of the recovery rate of rifampicin

样品名称	添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
麻黄鱼腥草散	100.23	92.44	92.23	93.7	1.13
	100.09	93.32	93.23		
	100.14	94.30	99.16		
	100.26	94.60	99.34		
	100.14	95.28	99.14		
	100.42	93.36	98.94		
鸡痢灵散	100.35	94.23	93.90	93.6	0.6
	100.24	93.03	92.81		
	100.02	94.24	94.22		
	100.23	93.55	93.34		
	100.36	93.38	93.05		
	100.28	94.38	94.12		
定喘散	100.90	93.63	92.79	93.4	0.8
	100.99	93.35	92.43		
	100.23	93.45	93.24		
	100.15	93.77	93.63		
	100.24	94.63	94.40		
	100.08	94.16	94.08		
银翘散	100.60	94.21	93.65	93.6	0.4
	100.40	94.06	93.69		
	100.21	93.25	93.05		
	100.34	94.34	94.02		
	100.26	94.14	93.90		
	100.41	93.94	93.56		
金花平喘散	99.58	92.69	93.08	93.2	0.8
	100.24	94.56	94.54		
	100.02	93.18	93.16		
	100.36	93.63	93.29		
	100.29	92.38	92.11		
	100.34	93.38	93.06		
四黄止痢颗粒	99.58	93.21	93.60	92.9	1.0
	100.24	92.69	92.67		
	100.02	92.04	92.02		
	100.36	94.55	94.21		
	100.69	92.38	91.75		
	100.49	93.38	92.92		

性药物,在相对弱酸环境下稳定<sup>[6,8]</sup>,试验中分别选用乙腈和甲醇溶解对照品,超声 20 min 后,对照品未完全溶解,可见异物。考虑到药物性质及吸光度的稳定性,采用弱酸性的流动相较乙腈和甲醇快

速、完全溶解样品,故选择流动相提取和稀释样品。通过调整流动相中缓冲液浓度为 0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液(比例 30%~40%)和 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(比例 30%~40%)运行样品,其中,后

者在运行低浓度样品时,利福平色谱峰易受到试剂峰或杂质峰的干扰,分离度较差,峰形较差,柱压高;而使用低比例 30%,低浓度 0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液运行样品,分离效果好,峰形对称,保留时间适当,柱压稳定。故筛选乙腈:甲醇:浓度 0.04 mol/L 的磷酸二氢钾溶液(比例 30%)=35:35:30 作为试验流动相。相较于 25℃ 柱温,30℃ 柱温时系统柱压明显降低,峰形好,出峰时间稳定,35℃ 柱温与 30℃ 柱温效果差别不大,30℃ 温度即可满足检测要求,故对柱温做具体规定调整到 30℃。更换不同厂家的同类型色谱柱分别进行测定,出峰时间及峰型无明显差异,利福平含量的 RSD 为 1.1%,表明色谱柱的微小变动对测量结果无明显影响。

3.2 兽用中药散剂种类的选择及启示 中药属于天然药物,残留毒物量小,在现代养殖业预防和控制疾病发挥重要作用<sup>[9-11]</sup>,散剂中的许多中药成分有抗感染、抗病毒,止痢的功效,添加利福平突出其止痢平喘抗感染功效。散剂性状是粉末状,与利福平易混匀,外观不易发现,故筛选本试验 6 种中兽医散剂作为阴性样品检测。

从筛选该批散剂的非法添加物到建立检测方法,对打击兽药处方外添加提供了一定的思路,提示兽药的非法添加不仅仅局限于兽用药,也有可能添加人用药物。目前,我国中兽药散剂中检测利福平的方法还没有完全建立,采用 HPLC 法建立了 6 种中兽药散剂中利福平的检测方法。该方法快速、简便、灵敏度高,为兽药行业健康发展大力推广使用的检测方法,有较好的实际应用价值。

## 参考文献:

- [1] 国务院.国务院办公厅关于印发国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020 年)的通知[Z].  
Circular of the general office of the State Council on the issuance of the national long-term plan(2012-2020)[Z].
- [2] 孙淑芳,王媛媛,刘陆世,等.发达国家牛结核病根除计划的法律要点分析[J].中国动物检疫,2015,32(12):41-44.  
Sun S F, Wang Y Y, Liu L S, et al. Analysis of key legal points of bovine tuberculosis eradication plans in developed[J].China

Animal Health Inspection,2015,32(12):41-44.

- [3] 王娟,王新华,徐海,等.多重耐药菌在人类、动物和环境的耐药和传播机制[J].微生物学报,2016,56(11):1671-1679.  
Wang J, Wang X H, Xu H, et al. Research on drug resistance and transmission mechanism of multidrug resistant organisms in human, animal and environment[J].Acta Microbiologica Sinica, 2016,56(11):1671-1679.
- [4] 中华人民共和国农业部.公告第 2448 号[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Bulletin No.2448[S].
- [5] 中华人民共和国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典 2015 年版兽药典[S].  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. China Veterinary Pharmacopoeia 2015[S].
- [6] 张利斌,张晓庆,郝晓辉,等.HPLC 对肺结核患者利福平血药浓度的监测[J].同济大学学报医学版,2012,33(3):664-667.  
Zhang L B, Zhang X Q, Hao X H, et al. Monitoring of plasma rifampicin concentrations in patients with pulmonary tuberculosis by HPLC[J].Journal of Tongji University(Medical Science), 2012, 33(3):664-667.
- [7] 崔艳莉,严寒,何琼,等.高效液相色谱法检测 5 种兽用中药制剂中的利福平[J].中国兽药杂志,2015,49(6):49-53.  
Cui Y L, Yan H, He Q, et al. Detection of Rifampicin in the Five Veterinary Traditional Chinese Herb Medicine Powders by HPLC[J].Chinese Journal of Veterinary Drug,2015,49(6):49-53.
- [8] 谢永国,于俊,丁红梓.HPLC 法测定利福平在血清中的浓度并作老年患者的药代动力学研究[J].药学与临床研究.2017,25(4):305-307.  
Xie Y G, Yu J, Ding H Z. Determination of Plasma Rifampicin by HPLC and Study of Its Pharmacokinetics in Elder Patients[J].Pharmaceutical and Clinical Research.2017,25(4):305-307.
- [9] Somchit M N, Reezal I, Nur I Elysha, et al. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of Cassia alata[J].Journal of Ethno-pharmacology,2003,84(1):1-4.
- [10] Zakaria E A. The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria[J].European Food Research and Technology, 2004, 218(5):460-464.
- [11] 张纯萍,宋立,吴辰斌,等.我国动物源细菌耐药性监测系统简介[J].中国动物检疫,2017,34(3):34-38.  
Zhang C P, Song L, Wu C B, et al. Drug Resistance Surveillance Network for Zoonotic Bacteria in China[J].China Animal Health Inspection,2017,34(3):34-38.