

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.03

HPLC-PDA 法测定恩诺沙星注射液中 非法添加乙酰甲喹和水杨酸

薄永恒¹, 李淑焕², 李有志^{1*}, 冯涛¹, 徐红玮¹, 张琦¹

(1.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;

2.山东省农业工程学院食品科学与工程学院, 济南 250100)

[收稿日期] 2019-01-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0014-07 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了高效液相色谱法测定恩诺沙星注射液中非法添加乙酰甲喹、水杨酸含量的方法。试验采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 以 0.025 mol/L 磷酸溶液-乙腈 (85:15, V/V) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 二极管阵列检测器进行全扫描和 232 nm 波长测定。结果表明乙酰甲喹在 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, $R^2=1.000$, 平均回收率为 99.62%; 水杨酸在 1.0~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, $R^2=1.000$, 平均回收率为 99.51%; RSD 在 0.07%~3.44% 之间。本方法准确、可靠、重现性好, 可用于恩诺沙星注射液中非法添加乙酰甲喹、水杨酸的定性和定量检测。

[关键词] 乙酰甲喹; 水杨酸; 非法添加; 测定; 高效液相色谱法

Determination Addition of Maquinox and Salicylic Acid in Enrofloxacin Injection by HPLC

BO Yong-heng¹, LI Shu-huan², LI You-zhi^{1*}, FENG Tao¹, XU Hong-wei¹, ZHANG Qi¹

(1. Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute (Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products), Jinan 250022, China; 2. College of Food Science and Engineering, Shandong Agriculture and Engineering University, Jinan 250022, China)

Corresponding author: LI You-zhi, E-mail: liyouzhi2009@126.com

Abstract: A method was developed and validated for the content determination of maquinox and salicylic acid in enrofloxacin injection by HPLC. It was tested with C18 column, using phosphorous acid solution-methanol (85:15, V/V) as the mobile phase. The extract wave length was 232 nm from full scan. Results showed that the calibration curve of maquinox was good linear between the peak areas and the concentrations of 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$, the correlation coefficient (r) was 1.000 and the mean recovery was 99.62%; the calibration curve of salicylic acid was good linear between the peak areas and the concentrations of 1.0~50 $\mu\text{g/mL}$, the correlation coefficient (r) was 1.000 and the mean recovery was 99.51%; RSD was 0.07%~3.44%. In conclusion, the method was

基金项目: 山东省地方标准制定(兽质监标发[2017]13)

作者简介: 薄永恒, 博士, 从事兽药残留检测工作。

通讯作者: 李有志。E-mail: liyouzhi2009@126.com

accurate, reliable and reproducible, and provided a reliable way for detecting acetoquinone and salicylic acid adulterated in enrofloxacin injection.

Key words: acetylquinone; salicylic acid; illegal addition; determination; high performance liquid chromatography (HPLC)

恩诺沙星注射液收载于《中国兽药典》2015 版第一部^[1],为广谱杀菌药,对大肠杆菌、沙门氏菌等都有杀菌效用,主要治疗由此病菌引起的消化系统、呼吸系统疾病。乙酰甲喹商品名称为痢菌净^[2],兽医临床主要用于禽巴氏杆菌病、雏鸡白痢等。水杨酸属于非甾体抗炎药,常用于缓解家畜的发烧、感冒时的体温升高及关节疼痛等症状^[3]。当前,某些不法兽药生产企业为了扩大恩诺沙星药物的疗效,而隐蔽乙酰甲喹和水杨酸的使用,在恩诺沙星注射液中添加乙酰甲喹和水杨酸的现象时有发生,造成乙酰甲喹和水杨酸的混乱使用,且不能执行其休药期,最终造成动物性食品中残留乙酰甲喹和水杨酸的严重后果。目前,关于乙酰甲喹和水杨酸的含量检测方法的报道较多,主要包括紫外可见分光光度法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等。由于兽药制剂之间的检测方法差距较大,检测量上不在同一个级别,而且药物成分之间存在相互干扰^[4],因此,急需开发一种同时检测恩诺沙星、乙酰甲喹和水杨酸的方法,用以检测恩诺沙星注射液中乙酰甲喹和水杨酸的存在。为利于地市县等兽药检验部门开展兽药非法添加的检验工作,本研究将建立科学、有效、简单的恩诺沙星注射液中非法添加乙酰甲喹和水杨酸的检测技术,以有效杜绝非法添加的问题。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695e 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;XS-205 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 试剂与材料 甲醇、乙腈为色谱纯,Merck KGaA 公司,其余试剂均为分析纯;实验用水为 milli-Q 超纯水。乙酰甲喹对照品(中国兽医药品监察所,批号:H0401204,含量:99.6%);恩诺沙星(中国兽医药品监察所,批号:H0081505,含量:99.5%);水

杨酸(中国食品药品检定研究院,批号:130451-201203,含量:84.2%)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters XBridge C18 色谱柱,(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:0.025 mol/L 磷酸溶液:乙腈=85:15(V:V);流速 1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:25 °C;二极管阵列检测器参考条件:定性采集波长范围 200~400 nm;定量波长 232 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 量取恩诺沙星注射液 0.5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL 置 50 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 称乙酰甲喹、水杨酸对照品 50 mg(准确至 0.01 mg),置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液,精密量取 1 mL 置 100 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品工作液。

2.2.3 系统适应性溶液 分别精密量取乙酰甲喹、水杨酸对照品储备液 100 μL 和 200 μL,置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,即得。

2.2.4 阴性添加溶液 分别精密量取乙酰甲喹、水杨酸对照品储备液适量,置 10 mL 量瓶中,用阴性无添加的恩诺沙星注射液的供试品溶液稀释并定容至刻度。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 乙酰甲喹、水杨酸在试验条件下完全分离,分离度均大于 1.5,各化合物的色谱峰理论塔板数均大于 5000,方法专属性良好。系统适应性溶液色谱图(图 1)及相应对照品光谱图(图 2)。

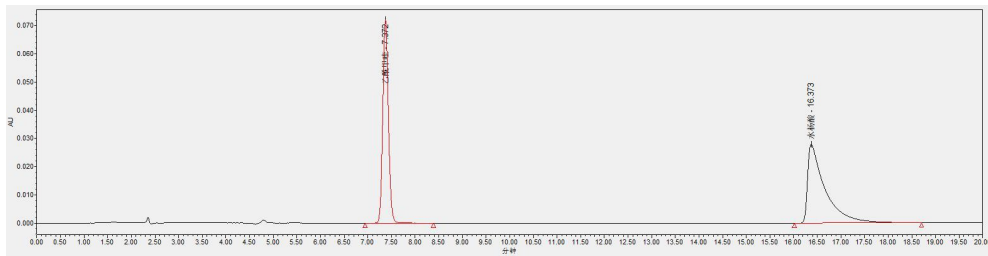


图 1 水杨酸(浓度 20µg/mL)、乙酰甲喹(浓度 10µg/mL) 色谱图

Fig 1 Chromatogram of salicylic acid (20µg/mL) and acetoquinolone (10µg/mL)

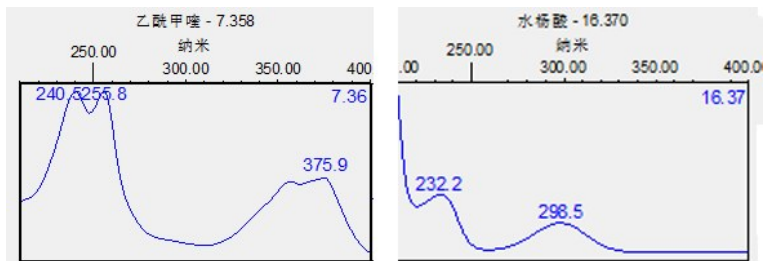


图 2 乙酰甲喹、水杨酸光谱图

Fig 2 Spectrum of acetoquinolone and salicylic acid

2.3.2 线性范围 精密称乙酰甲喹、水杨酸对照品 50 mg(准确至 0.01 mg),置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,备用。用流动相分别配制水杨酸、乙酰甲喹的混合标准溶液 5 种,浓度分别为 50、20 µg/mL、20、10 µg/mL、10、5 µg/mL、2、1 µg/mL、1、0.5 µg/mL。从低浓度到高浓度一次注入液相色谱仪测定,以峰面积为纵坐标,相应浓度为横坐标,绘制标准曲线,水杨酸、乙酰甲喹标准工作曲线回归方程分别为: $y = 35628.467x - 4908.954$ 、 $y = 58342.897x + 2297.349$,相关系数 R^2 分别为 1.000、

1.000。结果表明在线性范围内,水杨酸、乙酰甲喹浓度与峰面积呈现良好的线性关系。

2.3.3 峰纯度检查 对阴性空白添加样品的光谱图中两个目标化合物进行峰纯度检查,结果见图 4~图 5和表 1。结果显示,阴性空白在 232 nm 处有吸收值,但与两个目标化合物有较大分离,分离度大于 1.5,达到很好的分离,如图 3,且各色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,表明此色谱条件下,两个目标化合物的出峰位置无其他干扰峰,为单一物质,方法可行。

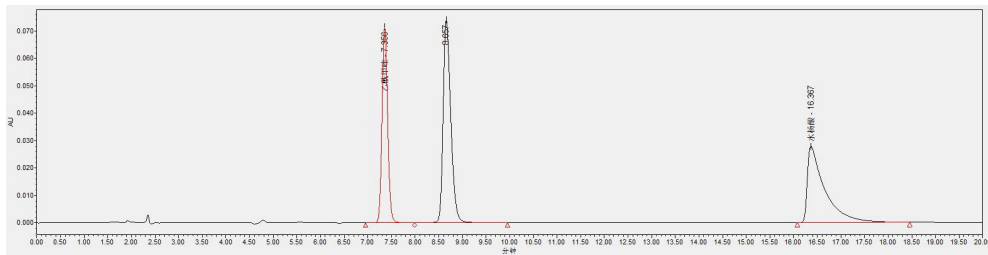


图 3 水杨酸(浓度 20 µg/mL)、乙酰甲喹(浓度 10 µg/mL)的阴性添加溶液色谱图

Fig 3 Chromatogram of salicylic acid (20 µg/mL) and acetoquinolone (10 µg/mL) in negative addition solution

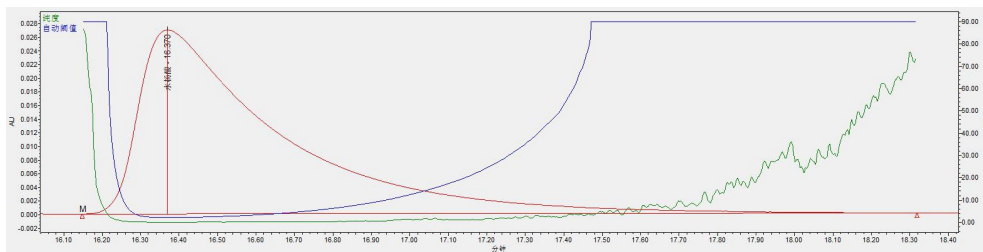


图 4 阴性空白添加水杨酸的纯度图

Fig 4 Purity diagram of the addition of salicylic acid to the negative blank

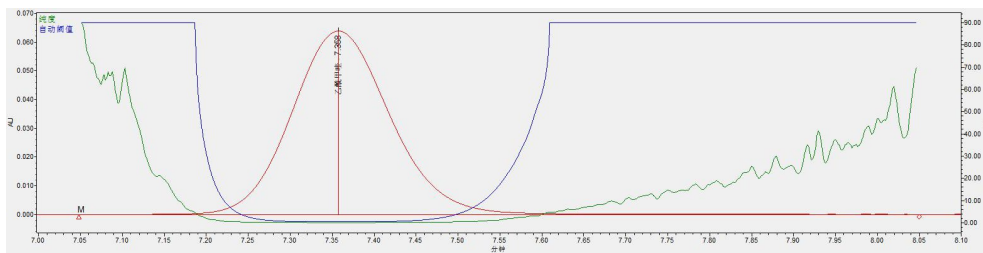


图 5 阴性空白添加乙酰甲喹的纯度图

Fig 5 Purity map of acetaminophen added to negative blank

表 1 峰纯度检查结果表

Tab 1 Peak Purity Check Results Table

序列号	名称	保留时间	纯度角度	纯度阈值	纯度结果
1	乙酰甲喹	7.358	0.129	0.900	单一物质
2	恩诺沙星	8.658	0.041	0.620	单一物质
3	水杨酸	16.370	0.397	4.717	单一物质

2.3.4 灵敏度试验 在阴性样品中添加乙酰甲喹、水杨酸标准溶液,获得 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的添加乙酰甲喹终浓度样品和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的添加水杨酸终浓度样品,进行检测,以光谱图失真的最大浓度作为方法的检出限^[5]。水杨酸在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的添加终浓度下,光谱图已失真,如图 6,因此,水杨酸的最低检出限浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在恩诺沙星注射液中的检出限为 0.5 mg/mL ;乙酰甲喹在 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的添加终浓度下,光谱图已失真,如图 7,因此,乙酰甲喹的最低检出限浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在恩诺沙星注射液中的检出限为 0.25 mg/mL 。

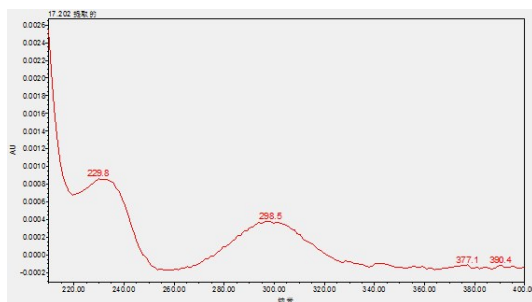


图 6 水杨酸的检出限光谱图(0.5mg/mL)

Fig 6 Spectral map of salicylic acid detection limit (0.5mg/mL)

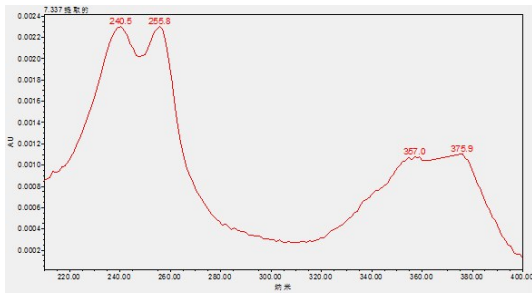


图 7 乙酰甲喹的检出限光谱图(0.25mg/mL)

Fig 7 Spectral map of detection limit of acetoquinone (0.25mg/mL)

2.3.5 准确度和精密度试验 取制得的阴性空白溶液,分别加入适量的 1 mg/mL 的水杨酸和乙酰甲喹标准溶液适量,制成高添加浓度样品(水杨酸 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,乙酰甲喹 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),中添加浓度样品(水杨酸 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,乙酰甲喹 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),低添加浓度样品(水杨酸 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,乙酰甲喹 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。每个浓度三份平行样品。计算回收率以及相对标准偏差。结果显示水杨酸平均回收率为 99.51%;乙酰甲喹平均回收率为 99.62%;相对标准偏差 RSD 在 0.07%~3.44%之间,结果见表 2~表 3。

表 2 恩诺沙星注射液中乙酰甲喹添加回收率实验结果

Tab 2 Experimental results of recovery of acetoquinone in enrofloxacin injection

添加终浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	样品编号	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
10	1	9.92	99.25	99.22	0.07
		9.92	99.16		
	2	9.92	99.16		
		9.92	99.18		
	3	9.94	99.35		
		9.92	99.23		
5	1	4.99	99.74	100.87	3.44
		4.99	99.75		
	2	4.97	99.33		
		5.40	107.94		
	3	4.96	99.18		
		4.96	99.28		
1	1	0.99	98.77	98.77	0.37
		0.99	98.53		
	2	0.99	99.28		
		0.98	98.21		
	3	0.99	98.90		
		0.99	98.96		

表 3 恩诺沙星注射液中水杨酸添加回收率实验结果

Tab 3 Experimental results of salicylic acid addition recovery rate in enrofloxacin injection

添加终浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	样品编号	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
20	1	20.03	100.15	99.78	0.64
		19.80	99.02		
	2	20.02	100.12		
		19.78	98.90		
	3	20.04	100.19		
		20.06	100.28		

续表

添加终浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	样品编号	测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10	1	10.07	100.72	100.75	0.11
		10.08	100.80		
	2	10.08	100.83		
		10.08	100.75		
	3	10.05	100.54		
		10.08	100.84		
2	1	1.94	97.19	98.00	1.19
		1.93	96.33		
	2	1.98	98.97		
		1.98	99.15		
	3	1.98	98.89		
		1.95	97.49		

2.3.6 稳定性试验 取同一阴性添加溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL ,记录色谱峰面积,乙酰甲喹、水杨酸峰面积的 RSD 均小于 0.4%。结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.3.7 耐用性 从柱温及色谱柱两个方面考察方法的耐用性。改变柱温为 20、25、30、40 $^{\circ}\text{C}$,出峰顺序无变化,保留时间稍有变化。使用不同品牌、不同型号的色谱柱,例如,Thermp HypersiL GoLd(4.6 \times 250 mm,5 μm);Waters XBridge C18(4.6 \times 150 mm,5 μm);Waters XBridge C18(3.5 \times 150 mm,5 μm)等,结果 3 种成份仍能很好的分离且出峰时间理想。最佳实验条件的选择中流速的变化对 3 种成份的影响也不大,本方法的耐用性良好。

3 讨论与结论

3.1 流动相选择 根据《中国兽药典》2015 版第一部恩诺沙星注射液的含量测定方法,设定了流动相 0.025 mol/L 磷酸溶液:乙腈的比例,分别为 83:17,85:15,90:10,结果显示在流动相 0.025 mol/L 磷酸溶液:乙腈体积比为 85:15 时,恩诺沙星、乙酰甲喹、水杨酸的分离度符合分离的要求,因此,选择 0.025 mol/L 磷酸溶液:乙腈(85:15)为流动相。

3.2 吸光度选择 由于在乙酰甲喹最大吸收值时,水杨酸的吸收度较低,在水杨酸的最大吸收

值 232 nm 作为定量波长时,乙酰甲喹也有较大吸收,以便获得最准确的吸收值,因此,选择 232 nm 作为方法的吸收波长。

3.3 光谱图的处理 作为定性的最主要图谱,对阴性空白添加样品的光谱图中两个目标化合物进行峰纯度检查,当纯度角度小于纯度阈值时,判定为此出峰物质为单一物质,同时与标品光谱图比对应出峰时间一致时,判定为此物质为对应出峰时间的标准物质添加,以此为添加物定性标准。

本方法采用二极管阵列检测器进行检测,实现了恩诺沙星注射液中添加乙酰甲喹、水杨酸的定性定量检测。同时可以通过峰纯度检查锁定非法添加物,通过保留时间与对照品进行对比,实现了恩诺沙星注射液中非法添加物的高效、快速、准确识别,成功建立了恩诺沙星注射液中添加乙酰甲喹、水杨酸的测定——高效液相色谱法。本方法乙酰甲喹检出限为 0.25 mg/mL、水杨酸检出限为 0.5 mg/mL。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版(一部) [S].

- Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the first volume of 2015 edition) [S].
- [2] 刘桂兰, 夏雪林, 仝玉慧, 等. 乙酰甲喹性质、毒性与替代药物 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(8): 46-49.
Liu G L, Xia X L, Tong Y H, *et al.* Character, Toxin and Substitution of Maquinox [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(8): 46-49.
- [3] 张志琴, 司军强, 呼海燕, 等. 水杨酸类药物的镇痛作用及其机制研究进展 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2003, 7(4): 341-343.
Zhang Zh Q, Si J Q, Hu H Y, *et al.* Progress of Analgesic Effect and Mechanism of Salicylates [J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2003, 7(4): 341-343.
- [4] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 2508 号 [S].
Ministry of Agriculture. No. 2508 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [S].
- [5] 李慧素, 杜红鸽, 吴宁鹏, 等. HPLC-PDA 法测定兽药中非法添加四种解热镇痛抗炎类药物 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(10): 36-43.
Li H S, Du H G, Wu N P, *et al.* Determination of Four Kinds of Illegal Additives Antipyretic - analgesic and Anti-inflammatory Drugs in Veterinary Drugs by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(10): 36-43.

(编辑: 侯向辉)