

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.01.06

HPLC - PDA 法测定氟苯尼考注射液、柴胡 注射液中非法添加培氟沙星、洛美沙星

杨 星, 龚旭昊, 马秋冉, 董玲玲, 赵富华, 于晓辉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-09-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 01-0031-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了氟苯尼考注射液、柴胡注射液中非法添加培氟沙星、洛美沙星的 HPLC - PDA 检查方法。采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以磷酸溶液 - 乙腈 - 甲醇(85.5:7.0:7.5)为流动相;二极管阵列检测器,提取波长为 277 nm。通过液相色谱保留时间、峰纯度检查和光谱相似度检查对非法添加物进行确证。结果表明,该色谱条件下培氟沙星、洛美沙星与其他物质分离良好。培氟沙星在氟苯尼考注射液、柴胡注射液中的平均回收率分别为 101.4% ($RSD = 0.2\%$)、100.0% ($RSD = 0.4\%$),洛美沙星在氟苯尼考注射液、柴胡注射液中的平均回收率分别为 101.2% ($RSD = 0.1\%$)、99.8% ($RSD = 0.5\%$)。本方法简便、准确、可靠,可用于检查氟苯尼考注射液、柴胡注射液中非法添加的培氟沙星、洛美沙星。

[关键词] 氟苯尼考注射液;柴胡注射液;培氟沙星;洛美沙星;峰纯度检查;光谱相似度检查;高效液相色谱法

Determination of Pefloxacin and Lomefloxacin in Florfenicol Injection and Bupleurum Injection by HPLC - PDA

YANG Xing, GONG Xu - hao, MA Qiu - ran, DONG Ling - ling, ZHAO Fu - hua, YU Xiao - hui*

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

Corresponding author: YU Xiao - hui, E - mail: Shuilon0220@sina.com

Abstract: A method for the determination of pefloxacin and lomefloxacin in florfenicol injection and bupleurum injection was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using phosphoric acid solution - acetonitrile - methanol (85.5:7.0:7.5) as the mobile phase. The extract wavelength was 277 nm. Retention time, peak purity test and spectrum similar test were used to identify pefloxacin and lomefloxacin. Results showed that pefloxacin, lomefloxacin and other materials were finely separated. The mean recoveries of pefloxacin in florfenicol injection and bupleurum

作者简介: 杨 星, 助理研究员, 从事兽用化学药品检验工作。

通讯作者: 于晓辉。E - mail: Shuilon0220@sina.com

injection were 101.4% ($RSD = 0.2\%$), 100.0% ($RSD = 0.4\%$), and the mean recoveries of lomefloxacin in florfenicol injection and bupleurum injection were 101.2% ($RSD = 0.1\%$), 99.8% ($RSD = 0.5\%$). In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of pefloxacin, lomefloxacin in florfenicol injection and bupleurum injection.

Key words: florfenicol injection; bupleurum injection; pefloxacin; lomefloxacin; peak purity test; spectrum similar test; HPLC

柴胡注射液临床上主要用于治疗感冒发热,具有解热、抗炎、抗病毒、抗惊厥、保肝等药理作用^[1]。氟苯尼考是兽医专用的氯霉素类广谱抗生素,氟苯尼考注射液主要用于治疗猪、鸡敏感菌所致的感染^[2]。有些不法厂家为使兽药达到迅速起效的目的,在抗病毒药物和抗菌药中非法添加其他种类的抗生素,从而提高销量来获取更大利润。2015 年 9 月 1 日,农业部发布第 2292 号公告^[3],决定在食品动物中停止使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种兽药,撤销相关兽药产品批准文号。现有农业部公告中非法添加检查方法检查的氟喹诺酮类药物均为氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星与恩诺沙星,并未涉及洛美沙星和培氟沙星。考虑到培氟沙星、洛美沙星存在被非法添加的可能,从而给动物源性食品的安全埋下隐患,因此,需要建立一种简便的方法以检查兽药中非法添加的培氟沙星和洛美沙星,为严查违法使用培氟沙星和洛美沙星提供技术支撑。本试验参考已建立的相关检测方法^[4-8],采用高效液相色谱法与二极管阵列检测器,建立了氟苯尼考注射液、柴胡注射液中非法添加培氟沙星、洛美沙星的 HPLC-PDA 检测方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪-二极管阵列检测器(Waters e2695 2998, Empower2 色谱工作站软件);分析天平(梅特勒 XS 205, 十万分之一);甲醇、乙腈、三乙胺为色谱纯,水(超纯水),磷酸为分析纯。

1.2 试剂 甲磺酸培氟沙星对照品(含量:99.6%,批号:H0171209,中国兽医药品监察所);盐酸洛美沙星对照品(含量:98.6%,批号:H0121505,中国兽医药品监察所);空白制剂:氟苯尼考注射液空白样品(批号:20161210,规格:

10%)、柴胡注射液空白样品(批号:20170501,规格:10 ml 相当于原生药 10 g),经检测均不含培氟沙星、洛美沙星;供试品:氟苯尼考注射液阳性样品(自制,含 1.25% 的培氟沙星、洛美沙星)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以磷酸溶液(取磷酸 3.0 mL 加水至 1000 mL,用三乙胺调节 pH 值至 3.0 ± 0.1 ,加乙腈 53 mL,摇匀)为流动相 A,乙腈为流动相 B,甲醇为流动相 C,按 A:B:C 为 85.5:7.0:7.5 进行洗脱;流速 1.0 mL/min;进样量:10 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C;采用二极管阵列检测器,采集波长范围为 200 nm ~ 400 nm,分辨率为 1.2 nm;记录 277 nm 波长处的色谱图,同时记录光谱图。

2.2 溶液配制

2.2.1 制剂空白溶液 取空白制剂 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加 2% 磷酸溶液-乙腈(1:1)稀释至刻度,摇匀;取 2.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度,摇匀。

2.2.2 供试品溶液 精密量取供试品 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 2% 磷酸溶液-乙腈(1:1)稀释至刻度,摇匀;精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度,摇匀。

2.2.3 培氟沙星、洛美沙星对照品储备液 取甲磺酸培氟沙星对照品、盐酸洛美沙星对照品各约 12.5 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 2% 磷酸溶液-乙腈(1:1)使溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 培氟沙星、洛美沙星对照品溶液 精密量取培氟沙星、洛美沙星对照品储备液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度,摇匀。

2.2.5 检测限溶液(0.5、1.0、2.0 g/L) 取空白

制剂 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入培氟沙星、洛美沙星对照品储备液 2、4、8 mL, 加 2% 磷酸溶液 - 乙腈(1:1) 稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀。

2.2.6 回收率试验溶液 取空白制剂 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 精密加入甲磺酸培氟沙星对照品、盐酸洛美沙星对照品各约 12.5 mg, 加 2% 磷酸溶液 - 乙腈(1:1) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀。

2.2.7 建立光谱数据库的溶液 以培氟沙星、洛美沙星对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 HT 通过制剂空白试验和本底添

加试验排除各制剂中主要成分与辅料对被测物的干扰。分别精密量取 2.2.1 项下制剂空白溶液、2.2.4 项下培氟沙星、洛美沙星对照品溶液、2.2.6 项下回收率试验溶液各 10 μ L, 照 2.1 项下色谱条件, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图与光谱图。结果显示, 培氟沙星、洛美沙星对照品的保留时间分别约为 7.9、10.0 min, 氟苯尼考注射液的主成分的保留时间约为 19.7 min, 柴胡注射液的主成分无紫外吸收, 其辅料也不在培氟沙星、洛美沙星出峰处出峰(图 1 ~ 图 3)。此外, 回收率试验溶液中培氟沙星、洛美沙星峰的纯度角度均小于纯度阈值(表 1、表 2), 均为单一物质峰, 表明该色谱条件下 2 种制剂本底均对培氟沙星、洛美沙星的测定无干扰。

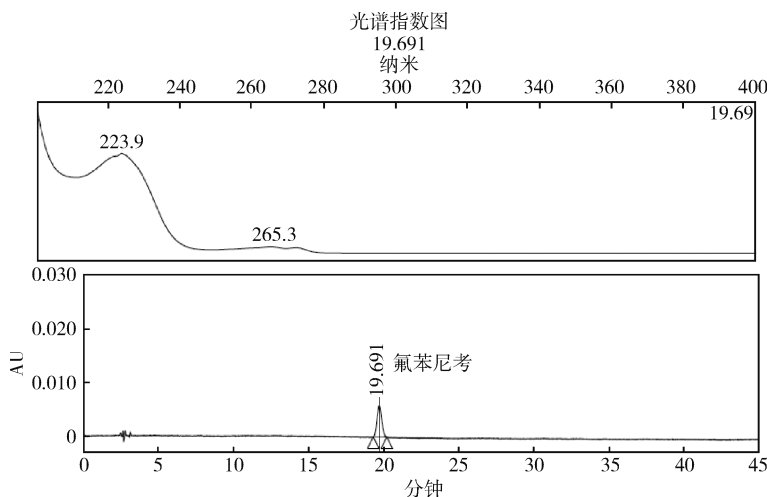


图 1 氟苯尼考注射液空白溶液光谱色谱图

Fig 1 The chromatogram and spectrum of florfenicol injection

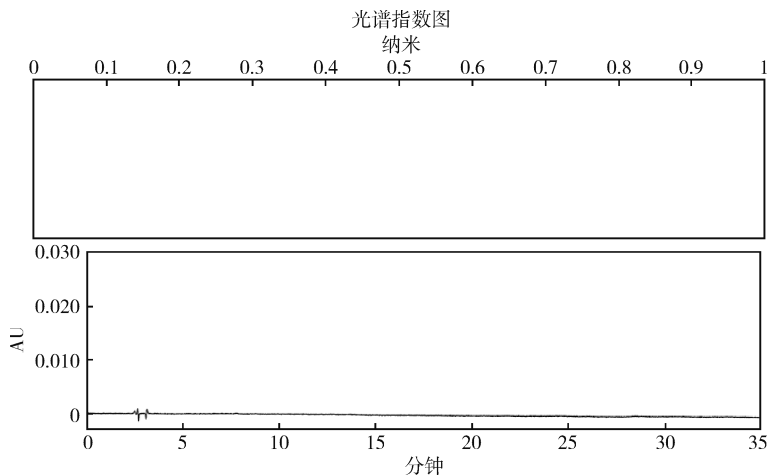


图 2 柴胡注射液空白溶液光谱色谱图

Fig 2 The chromatogram and spectrum of bupleurum injection

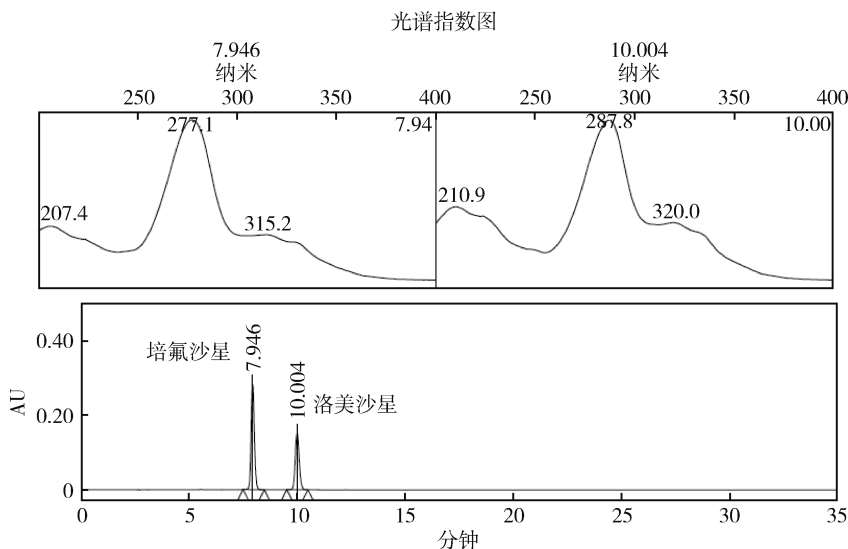


图 3 培氟沙星、洛美沙星对照品光谱色谱图

Fig 3 The chromatogram and spectrum of pefloxacin and lomefloxacin

表 1 培氟沙星峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 1 The results of peak purity test and spectrum similar test of pefloxacin

药物名称	保留时间/min	纯度角度	纯度阈值	纯度结果	匹配角度	匹配阈值	匹配结果
氟苯尼考注射液	7.956	0.078	1.079	单一物质峰	0.065	1.045	光谱相似
柴胡注射液	7.950	0.085	1.088	单一物质峰	0.056	1.048	光谱相似
培氟沙星对照品	7.946	0.082	1.085	单一物质峰	0.000	1.046	光谱相似

表 2 洛美沙星峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 2 The results of peak purity test and spectrum similar test of lomefloxacin

药物名称	保留时间/min	纯度角度	纯度阈值	纯度结果	匹配角度	匹配阈值	匹配结果
氟苯尼考注射液	10.022	0.092	1.091	单一物质峰	0.068	1.057	光谱相似
柴胡注射液	10.011	0.093	1.102	单一物质峰	0.055	1.058	光谱相似
洛美沙星对照品	10.004	0.091	1.099	单一物质峰	0.000	1.059	光谱相似

2.3.2 检测限 通过制剂空白添加被测物对照品来考察方法的检测限。照 2.2.5 项下配制各制剂的检测限溶液(0.5、1.0、2.0 g/L),精密量取 10 μ L 进行测定。综合考虑色谱图峰型、峰面积,以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限。结果显示,2 种制剂检查培氟沙星、洛美沙星的检测限均为 1.0 g/L。

2.3.3 准确度 通过制剂空白添加被测物对照品做回收率试验来考察方法的准确度。照 2.2.6 项下平行配制 6 份各制剂的回收率试验溶液,精密量取 10 μ L 进行测定。结果显示,培氟沙星在氟苯尼

考注射液、柴胡注射液中的平均回收率分别为 101.4% ($RSD = 0.2\%$)、100.0% ($RSD = 0.4\%$),洛美沙星在氟苯尼考注射液、柴胡注射液中的平均回收率分别为 101.2% ($RSD = 0.1\%$)、99.8% ($RSD = 0.5\%$)。

2.3.4 耐用性 以各制剂的回收率试验溶液作为耐用性试验溶液,从柱温、流速、色谱柱、磷酸溶液 pH 值、流动相比比例共五个方面考察培氟沙星、洛美沙星检查方法的耐用性。调节柱温分别为 25、30、35 $^{\circ}$ C,结果显示:随柱温升高,培氟沙星、洛美沙星

保留时间提前,分离度均符合要求;改变流速分别为 0.9、1.0、1.1 mL/min,结果显示:随流速增大,培氟沙星、洛美沙星保留时间提前,分离度均符合要求;选择三款不同品牌色谱柱, Waters Atlantis T3 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、资生堂 MG III C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Waters Xbridge C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 结果显示:三款色谱柱培氟沙星、洛美沙星的保留时间不同,培氟沙星、洛美沙星峰与其他峰分离度均符合要求,理论板数均高于 10000,拖尾因子为 1.1 ~ 1.2;调节磷酸溶液 pH 值为 2.9、3.0 和 3.1,结果显示:随磷酸溶液 pH 值的改变,培氟沙星和洛美沙星的保留时间基本不变,且三种 pH 值下分离度均符合要求;调节流动相磷酸溶液 - 乙腈 - 甲醇的比例分别为 (86:6.5:7.5)、(85.5:7.0:7.5)、(85:7.5:7.5), 结果显示:

随乙腈比例升高,培氟沙星、洛美沙星保留时间提前,分离度均符合要求。以上结果表明,本方法耐用性较好,能满足培氟沙星、洛美沙星的检查要求。

2.4 样品测定 取氟苯尼考注射液阳性样品,照 2.2.2 项下配制供试品溶液,培氟沙星、洛美沙星对照品溶液的浓度调整为峰面积与供试品溶液相当。分别精密量取 10 μL,照 2.1 项下色谱条件,注入高效液相色谱仪,记录色谱图与光谱图。结果显示,供试品溶液在与培氟沙星、洛美沙星对照品保留时间一致处出峰;两个色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,为单一物质峰;将其光谱分别与培氟沙星、洛美沙星对照品的光谱匹配,匹配角度均小于匹配阈值,说明其与培氟沙星、洛美沙星对照品的光谱相似,且两者最大吸收波长均一致。以上结果表明样品中检出培氟沙星、洛美沙星(表 3)。

表 3 氟苯尼考注射液阳性样品检查结果表

Tab 3 The results of florfenicol injection sample test

/	保留时间/min	最大吸收波长/nm	纯度角度	纯度阈值	匹配角度	匹配阈值
氟苯尼考注射液中培氟沙星色谱峰	8.027	207.4,277.1,315.2	0.087	1.085	0.044	1.047
氟苯尼考注射液中洛美沙星色谱峰	10.119	210.9,287.8,320.0	0.095	1.099	0.051	1.060
培氟沙星对照品	8.019	206.2,277.1,315.2	0.084	1.090	0.000	1.048
洛美沙星对照品	10.112	210.9,287.8,320.0	0.097	1.106	0.000	1.062

3 讨论

3.1 流动相系统与溶媒的选择 参考中华人民共和国农业部公告第 2448 号中“肥猪散、健胃散、银翘散等中药散剂中非法添加氟喹诺酮类药物(物质)检查方法”的流动相系统与溶媒,选择与其相同的流动相系统与溶媒。该公告方法检查氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星 4 种非法添加物,本方法检查培氟沙星、洛美沙星 2 种非法添加物,由于两种方法的色谱条件与溶液配制方法一致,其优势是采用一种检查方法,即可检测以上 6 种氟喹诺酮类药物中的任意一种,最多同时检测 5 种。不足之处是极端情况下当以上 6 种氟喹诺酮类药物同时非法添加时,无法保证氧氟沙星、诺氟沙星与培

氟沙星 3 个色谱峰之间的分离度均大于 1.5,峰纯度角度小于纯度阈值,这也是下一步的改进方向。

3.2 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器,在 200 nm ~ 400 nm 波长范围内进行紫外吸收图谱扫描。培氟沙星在 207、277、315 nm 波长处有最大吸收,洛美沙星在 211、288、320 nm 波长处有最大吸收,两者分别在 277、288 nm 波长处的吸收度较高,任选一个均可,本文选择 277 nm 作为检测波长。

3.3 保留时间、峰纯度检查与光谱相似度检查 保留时间是否一致是判断两个色谱峰是否为同一化合物的初步依据,而峰纯度检查可以判断色谱峰是否为单一物质峰,光谱相似度检查可以排除保留

时间一致,但紫外光谱不同的化合物的干扰。在对 2 种制剂的回收率试验溶液和检测限溶液的各项检测中,与培氟沙星、洛美沙星对照品溶液主峰保留时间一致处均出峰,且这两全色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,匹配角度均小于匹配阈值。表明在该液相条件下,可在 2 种制剂中检出培氟沙星、洛美沙星,方法可行。

3.4 其他兽药制剂非法添加检查 除氟苯尼考注射液、柴胡注射液外,其他兽药制剂亦可能非法添加培氟沙星或洛美沙星,在实际检验工作中,一方面应进行空白试验和检测限测定,另一方面要注意非法添加物以外的成分是否对测定有干扰,选择合适的色谱柱和调节流动相比比例,使非法添加物与其他色谱峰完全分离的同时,缩短运行时间,减少试剂损耗,从而减少对环境的污染,如本次试验时,将 Waters Atlantis T3 色谱柱更换为 Waters Xbridge 色谱柱,氟苯尼考的出峰时间可由 37.1 min 缩短至 19.7 min,而培氟沙星、洛美沙星与相邻色谱峰分离度仍符合要求。

4 结 论

本方法建立了 HPLC - PDA 法检测氟苯尼考注射液和柴胡注射液中非法添加培氟沙星、洛美沙星的检查方法,综合保留时间、最大吸收波长、峰纯度检查和光谱相似度检查四方面的信息,实现了兽药中非法添加物的准确识别。该方法操作简便、快速、灵敏度高,为打击兽药制剂中非法添加培氟沙星、洛美沙星的制假行为提供了有力的技术支持。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 兽药使用指南(中药卷)[M]. 2010 年版. 北京: 中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Guidelines for use of veterinary traditional Chinese drugs [M]. 2010 Edition. Beijing: China Agriculture Press.

- [2] 中国兽药典委员会. 兽药使用指南(化药卷)[M]. 2010 年版. 北京: 中国农业出版社
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Guidelines for use of veterinary chemical drugs [M]. 2010 Edition. Beijing: China Agriculture Press.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 2292 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 2292[S].
- [4] 王静文,龚旭昊,范强,等. 三种呼吸系统兽药制剂中非法添加盐酸溴己新、吡咯美辛的 HPLC - PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 45 - 50.
Wang J W, Gong X H, Fan Q, *et al.* Determination of bromhexine hydrochloride and indometcain illegally added in three veterinary preparations by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 45 - 50.
- [5] 陈晨,韩春晓,魏园园,等. HPLC - PDA 法测定柴胡注射液中非法添加利巴韦林的研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(07): 37 - 40.
Chen C, Han C X, Wei Y Y, *et al.* Determination of illegally added ribavirin in bupleurum injection by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(07): 37 - 40.
- [6] 龚旭昊,王静文,董玲玲,等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(02): 37 - 40.
Gong X H, Wang J W, Dong L L, *et al.* Determination of salicylic and ofloxacin in houttuynia injection by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(02): 37 - 40.
- [7] 杨星,丁双阳,赵富华,等. HPLC - PDA 法测定 3 种兽药中非法添加非泼罗尼[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(08): 19 - 24.
Yang X, Ding S Y, Zhao F H, *et al.* Determination of Fipronil in Veterinary Drug by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(08): 19 - 24.
- [8] 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 Announcement No. 2448[S].

(编辑:陈希)