

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.07

清热解毒类中兽药中非法添加吲哚美辛的 HPLC - PDA 检测方法的建立

张浩然,徐汀,张亦菲,田恺,华贤辉,商军*

(上海市兽药饲料检测所,上海 201103)

[收稿日期] 2020-02-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)06-0049-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立了 HPLC - PDA 法测定清热解毒类中兽药中吲哚美辛的检测方法。采用 ODS_{C₁₈} 色谱柱(柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm), 流动相为乙腈:0.1 mol/L 冰醋酸(50:50, V₁:V₂) 为流动相, 采集波长范围为 200 ~ 400 nm, 定量波长为 317 nm, 进样量为 10 μL。试验结果表明, 吲哚美辛在 5 ~ 200 μg/mL 范围内线性良好($r=0.9999$), 各基质中吲哚美辛的检测限均为 1.0 g/kg, 峰纯度检查和光谱相似度检查均符合要求。其中, 板二黄片中吲哚美辛的平均回收率为 96.5%, 相对标准偏差(RSD)为 0.9% ($n=6$); 三黄散中吲哚美辛的平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.3% ($n=6$); 扶正解毒散中吲哚美辛的平均回收率为 100.6%, RSD 为 0.8% ($n=6$)。本法应用清热解毒类中兽药中非法添加吲哚美辛的检测, 结果准确可靠。

[关键词] 高效液相色谱法; 非法添加; 吲哚美辛; 中兽药

Determination of Indomethacine Illegally Added in Traditional Chinese Medicine by HPLC - PDA

ZHANG Hao-ran, XU Ting, ZHANG Yi-fei, TIAN Kai, HUA Xian-hui, SHANG Jun*

(Shanghai Institute for Veterinary Drugs and Feeds Control, Shanghai 201103, China)

Corresponding author: Shang Jun, E-mail: sjshvdc@163.com

Abstract: A method for the determination of Indomethacine in traditional Chinese medicine by HPLC was developed. The ODS - C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the column, with the scanning wavelength set from 200 ~ 400 nm. The detection wavelength was 317 nm. An isocratic elution method using acetonitrile: 0.1 mol/L acetic acid (50:50, V₁:V₂) as mobile phase was developed, and the injection volume was 10 μL. The linear range was 5 ~ 200 μg/mL ($r=0.9999$). The mean recovery of Indomethacine in Ban'er Huang tablets was 96.5%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.9% ($n=6$). The mean recovery of Indomethacine in Sanhuang powder was 99.3%, and the RSD was 1.3% ($n=6$). The mean recovery of

作者简介: 张浩然, 助理畜牧师, 从事兽药饲料检测分析工作。

通讯作者: 商军。sjshvdc@163.com。

Indomethacine in Fuzheng Jiedu powder was 100.6%, and the RSD was 0.8% ($n=6$). The limit of detection was 1.0 g/kg. The peak purity test and spectra matching test were applied. The method is reliable for the determination of Indomethacine illegally added in traditional Chinese medicine.

Key words: HPLC; Indomethacine; illegal addition; oral suspension; traditional Chinese medicine

吲哚美辛为解热镇痛类非甾体抗炎药, 收载于《中华人民共和国药典》2015 年版(二部)^[1], 《中华人民共和国兽药典》中并未收载。该药物主要通过抑制环氧合酶的合成, 下调体温中枢的温度调定点, 从而使机体达到正常的产热散热平衡, 故可用于治疗非特异性发热^[2]。但其副作用大, 长期使用不良反应发生率为 35% ~ 50%^[3], 如消化性溃疡、穿孔、水肿、高血压等^[4]。最近, 在兽药监督抽检工作中首次发现了中兽药梅香片中非法添加吲哚美辛的情况, 因此有必要建立清热解暑类中兽药中非法添加吲哚美辛的检测方法。

板二黄片由黄芪、淫羊藿、盐黄柏、山楂及地黄五味药材用水煎煮, 滤过浓缩至膏状后, 先与板蓝根细粉混匀制粒, 后粉碎并与连翘、白术粉末混匀, 过筛, 加入适量辅料, 制粒压片而成^[5]; 三黄散由黄芩、黄柏、大黄及大青叶四味药材粉碎、过筛、混匀而成^[5]; 扶正解毒散主要是由板蓝根、黄芪和淫羊藿三味中药材粉碎、过筛、混匀而成^[6]。因此, 为使本法有一定的代表性, 本文选取了工艺、成分均较复杂的板二黄片以及相对简单的三黄散和扶正解毒散, 在参考了相关文献后^[7-9], 结合非法添加检测方法的技术特点, 建立了清热解暑类中兽药中非法添加吲哚美辛的 HPLC-PDA 检测方法, 为中兽药中非法添加吲哚美辛的检测提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪: Waters e2695, 配二极管阵列检测器(PDA), 沃特世公司; 电子天平: 感量 0.01 mg, AB265-S, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 纯水机: Molatom 1810A, 中国重庆摩尔水处理设备有限公司。

1.2 试剂 吲哚美辛对照品(Dr. Ehrenstorfer GmbH, 批号为 G832449, 含量 99.4%); 实验用水(电阻率 > 18 MΩ·cm, 符合 GB/T6682 一级用水的规

定); 乙腈(色谱纯); 乙酸(色谱纯); 板二黄片阴性样品(批号: 20181001); 三黄散阴性样品(批号: 17070255); 扶正解毒散阴性样品(批号: 2016110201); 梅香片阳性样品(批号: 20190301)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 采用 ODSC₁₈ 色谱柱(柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm); 流动相: 乙腈: 0.1 mol/L 冰醋酸(50: 50, V₁: V₂); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL; PDA 参考条件: 采集波长范围 200 ~ 400 nm, 分辨率为 1.2 nm; 定量波长: 317 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取供试品 1 g, 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 精密加入流动相 20.00 mL, 超声提取 20 min, 静置, 滤过, 精密量取滤液 1.00 mL 置 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品储备溶液 取吲哚美辛对照品 100.35 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液。

2.2.3 对照品工作溶液 精密量取 1.00 mL 对照品储备溶液置 100 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 滤液作为对照品工作溶液。

2.2.4 建立光谱数据库的溶液 以对照品工作溶液(2.2.3)作为建立光谱数据库的溶液, 建立光谱数据库。

2.3 供试品的测定 按照 2.1 的色谱条件及 2.2 的溶液制备方法, 将供试品溶液和对照品工作溶液注入高效液相色谱仪。按外标法以峰面积计算, 即得吲哚美辛的含量。

2.4 线性关系考察 将对照品储备液精密稀释, 制备 200、100、50、20、10、5 μg/mL 的吲哚美辛对照

品溶液。每个浓度点重复 5 次进样,按照 2.1 的色谱条件进行测定,以吲哚美辛对照品浓度为横坐标 (x),以相应浓度测得的峰面积为纵坐标 (y),绘制标准曲线。得到线性方程为 $y = 11214x - 10416$ 。本方法在吲哚美辛浓度为 5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$)。

2.5 专属性考察 取板二黄片阴性样品、三黄散阴性样品及扶正解毒散阴性样品,按照 2.2 的制备方法得到空白基质溶液。通过空白基质溶液及对照品工作溶液进行专属性试验。结果表明,基质对吲哚美辛的出峰没有干扰,不影响含量测定。典型色谱图见图 1 ~ 图 4。

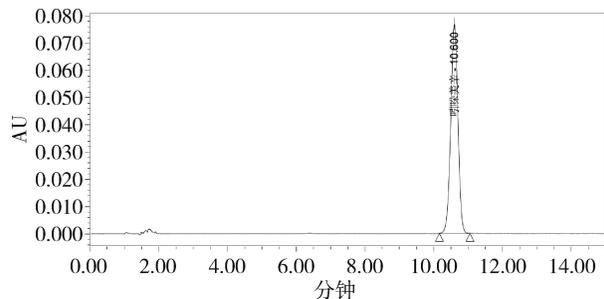


图 1 吲哚美辛的色谱图(0.1 mg/mL)

Fig 1 Chromatogram of Indomethacin (0.1 mg/mL)

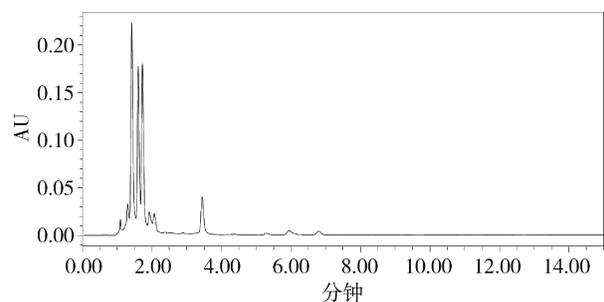


图 2 板二黄片阴性基质溶液的色谱图

Fig 2 Negative solution chromatogram of Ban'er Huang tablets

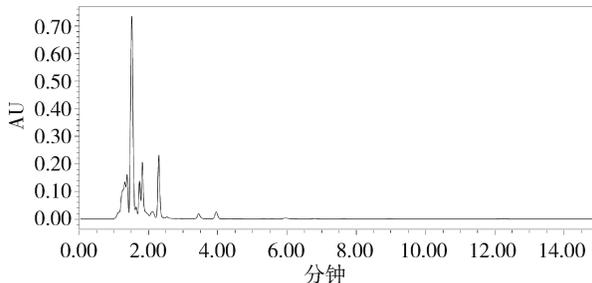


图 3 三黄散空白基质溶液的色谱图

Fig 3 Negative solution chromatogram of Sanhuang power

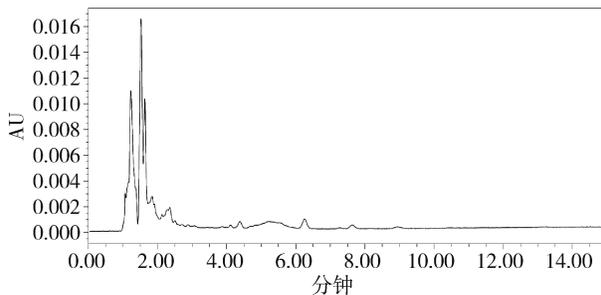


图 4 扶正解毒散空白基质溶液的色谱图

Fig. 4 Negative solution chromatogram of Fuzheng Jiedu power

2.6 峰纯度检查 取板二黄片阴性样品、三黄散阴性样品及扶正解毒散阴性样品各 1 g,加入适量对照品储备溶液,制成吲哚美辛添加量为 1 g/kg 的阴性添加样品,按照 2.1 的色谱条件及 2.2 处理方法制成峰纯度检查溶液,进行测定。结果表明,样品色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,说明吲哚美辛的出峰没有干扰,可确定为单一物质峰(表 1)。

表 1 峰纯度和光谱相似度检查结果表

Tab 1 The results of peak purity and spectra matching test

阴性基质	纯度角度	纯度阈值	结果	PDA 纯度角度	PDA 纯度阈值	结果
板二黄片	0.563	0.700		0.482	1.353	
三黄散	0.488	0.715	单一物质	0.258	1.341	同一物质
扶正解毒散	0.487	0.707		0.281	1.392	

2.7 光谱相似度检查 将峰纯度检查溶液(2.6)中吲哚美辛的光谱图和光谱数据库进行匹配。结果表明,PDA 匹配角度均小于 PDA 匹配阈值,说明光谱的相似度高,可确定为同一物质(表 1)。

2.8 检测限 取板二黄片阴性样品、三黄散阴性样品及扶正解毒散阴性样品各 1 g,逐级加入适量对照品储备溶液,制成吲哚美辛添加量为 2 g/kg、1 g/kg、0.4 g/kg 的阴性添加样品,按照 2.1 的色谱条件及 2.2 处理方法进行测定。考虑到非法添加的成分含量大都较高,故选择光谱图失真的最大浓度作为本方法的检测限^[10]。结果表明,检测限为 1.0 g/kg。典型图谱见图 5 ~ 图 10。

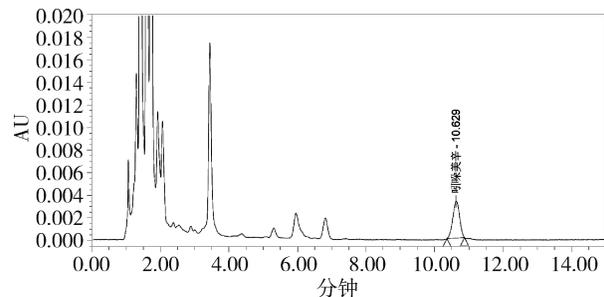


图 5 板二黄片中添加吲哚美辛的色谱图(1 g/kg)

Fig 5 Chromatogram of Indomethacin added in Ban'er Huang tablets (1 g/kg)

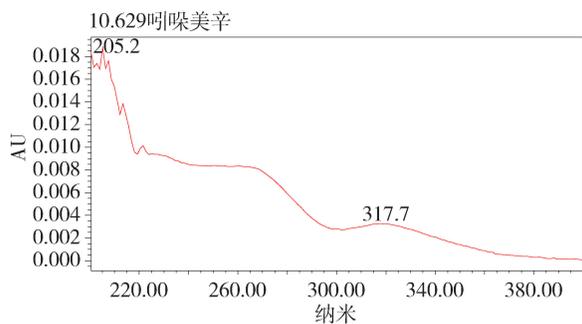


图 6 板二黄片中添加吲哚美辛的光谱图(1 g/kg)

Fig 6 Spectrum of Indomethacin added in Ban'er Huang tablets (1 g/kg)

2.9 准确度试验 取板二黄片阴性样品、三黄散阴性样品及扶正解毒散阴性样品各 1 g,加入适量对照品储备溶液,制成吲哚美辛添加量约为 3 g/kg 的阴性添加样品。每个基质 6 个平行,按照 2.1 的

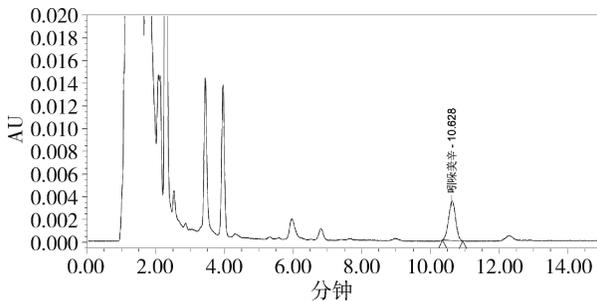


图 7 三黄散中添加吲哚美辛的色谱图(1 g/kg)

Fig 7 Chromatogram of Indomethacin added in Sanhuang powder (1 g/kg)

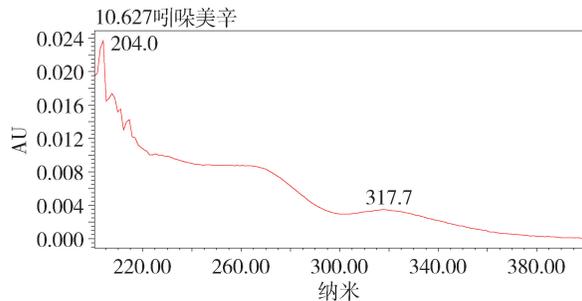


图 8 三黄散中添加吲哚美辛的光谱图(1 g/kg)

Fig 8 Spectrum of Indomethacin added in Sanhuang powder (1 g/kg)

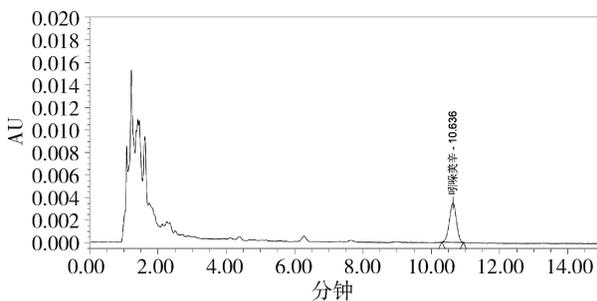


图 9 扶正解毒散中添加吲哚美辛的色谱图(1 g/kg)

Fig 9 Chromatogram of Indomethacin added in Fuzheng Jiedu power (1 g/kg)

色谱条件及 2.2 处理方法,进行测定。板二黄片中吲哚美辛的平均回收率为 96.5%,RSD 为 0.9%;三黄散中吲哚美辛的平均回收率为 99.3%,RSD 为 1.3%;扶正解毒散中吲哚美辛的平均回收率为 100.6%,RSD 为 0.8%(表 2)。试验结果符合《中华人民共和国兽药典》^[11]2015 年版附录 9101 的要求。

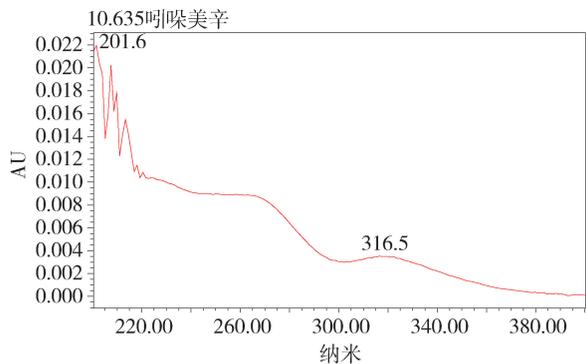


图 10 扶正解毒散中添加吲哚美辛的光谱图(1 g/kg)

Fig 10 Spectrum of Indomethacin added in Fuzheng Jiedu power (1 g/kg)

表 2 准确度试验结果 (n=6)

Tab 2 The results of accuracy test (n=6)

阴性基质	添加量/ (mg/mL)	实测含量/ (mg/mL)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD/%
板二黄片	2.97	2.88	96.97	96.5	0.9
	2.93	2.83	96.59		
	2.98	2.87	96.31		
	2.97	2.86	96.30		
	2.97	2.84	95.62		
	2.98	2.90	97.32		
三黄散	2.98	3.02	101.34	99.3	1.3
	2.97	2.93	98.65		
	2.96	2.91	98.31		
	2.98	2.97	99.66		
	2.98	2.95	98.99		
	2.98	2.94	98.66		
扶正 解毒散	2.98	2.97	99.66	100.6	0.8
	2.99	3.02	101.00		
	2.97	2.98	100.34		
	2.97	3.02	101.68		
	2.98	2.97	99.66		
	2.97	3.01	101.35		

2.10 稳定性试验 按照 2.2 的处理方法,制备各基质阴性添加的供试品溶液进行稳定性试验,室温下分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 后按照 2.1 的色谱条件进行测定。吲哚美辛峰面积的 RSD 均小于 0.6% ,

说明供试品溶液 24 h 内的稳定性良好。

2.11 耐用性试验 选取各基质的准确度试验溶液进行耐用性试验,考察柱温及不同色谱柱的影响。调节柱温分别为 25℃、30℃、35℃,结果表明,随着柱温的提升,吲哚美辛的出峰时间略有提前,相差约 1 min;不同规格及不同厂商的色谱柱(Shiseido MG II 250 × 4.6 mm, 5 μm; Shiseido MG II 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; Waters symmetry 150 mm × 4.6 mm, 5 μm)在本方法中所得的吲哚美辛色谱峰的理论塔板数、拖尾因子均符合检测要求,说明本方法耐用性较好。

2.12 阳性供试品测定 采用本法,对梅香片阳性样品进行测定,结果表明,该阳性样品中吲哚美辛的添加量为 15 g/kg,具体结果见表 3,图 11。

3 讨论与结论

3.1 检测波长的确定 将对照品工作溶液按照 2.1 的色谱条件注入液相色谱仪,在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行波长扫描,选择其最大吸收波长 317 nm 作为定量波长。

3.2 流动相的选择 本文参考了《中华人民共和国药典》^[1]中吲哚美辛肠溶片的液相色谱条件,该条件下,吲哚美辛色谱峰的对称性好,出峰时间适宜,在基质中不受其他杂质峰的干扰,故选择乙腈; 0.1 mol/L 冰醋酸(50: 50, V₁: V₂)为流动相,与相关文献报道一致^[12-14]。

3.3 阳性样品的确证 对于非法添加阳性样品的确证,除保留时间要求一致外,还需要辅以最大吸收波长、峰纯度和光谱相似度三个条件。首先,供试品和对照品的紫外光谱图相匹配,并且最大吸收波长相差不超过 ±2 nm。其次,利用事先建立的光谱数据库,可以进行峰纯度和光谱相似度检查,若纯度角度小于纯度阈值,则确认为单一物质;若匹配角度小于匹配阈值,则认为光谱高度相似。最后,结合以上四个条件,避免了保留时间一致但光谱不同的物质的干扰,从而做出确证。

表 3 阳性样品检测结果表 (n=2)

Tab 3 The results of the positive sample test (n=2)

名称	保留时间/min	最大吸收波长/nm	纯度角度	纯度阈值	PDA 匹配角度	PDA 匹配阈值
吲哚美辛对照品	10.308	317.7	0.268	0.488	0.154	1.193
梅香片阳性样品	10.312	317.7	0.088	0.290	0.105	1.093
结果	与对照品一致	与对照品一致	纯度角度小于纯度阈值,为单一物质		匹配角度小于匹配阈值,光谱相似	

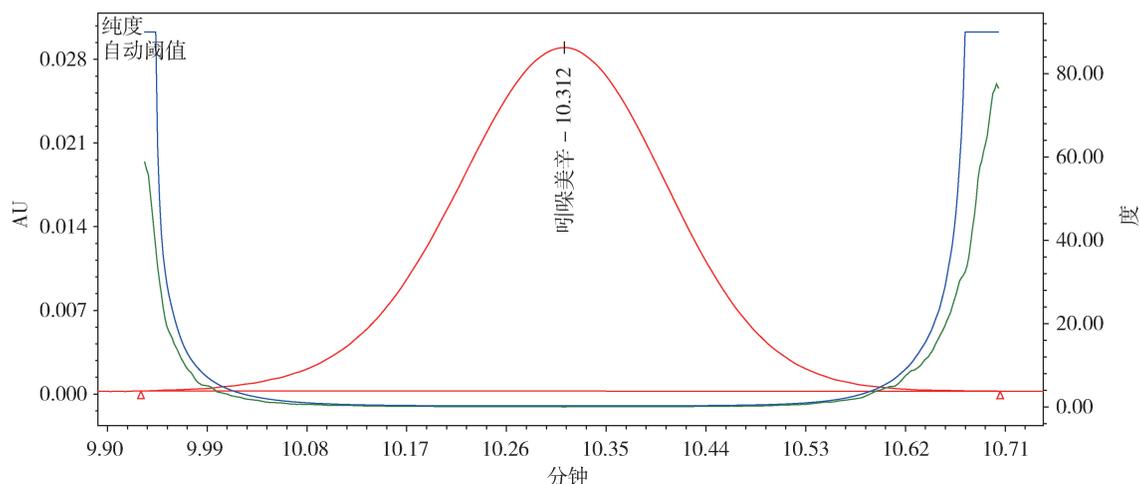


图 11 梅香片阳性样品中吲哚美辛的纯度图

Fig 11 Purity plot of Indomethacin in Meixiang tablets

3.4 本法的通用性 本文利用建立好的方法对阳性供试品(2.12)梅香片中的吲哚美辛进行检测。结合 3.3 中总结的四个条件,完成了梅香片中吲哚美辛的确证(表 3)并进行了定量。此外,为验证定量的准确性,按照添加量和本底浓度之比为 0.8:1, 1:1, 1.2:1 进行低、中、高三种浓度的准确度试验,每个浓度 3 份平行,得到平均回收率为 101.2%, RSD 为 0.4% ~ 1.1%。结果表明,本法定量准确。因此,本方法在两种散剂和两种片剂基质的应用,体现了较好的通用性。

以上试验结果表明,本法操作简便快速,准确性、重复性均较好,可应用于中兽药中非法添加吲哚美辛的检测工作。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(二部)

[S].

Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the second volume of 2015 edition) [S].

[2] 雷曙光, 罗永煌, 陈君. 吲哚美辛研究概况及其在动物上的应用[J]. 中国动物保健, 2011, 13(01): 14-17.

Lei S G, Luo Y H, Chen J. Research survey of Indomethacin and its application in animals [J]. China Animal Health, 2011, 13(01): 14-17.

[3] 濮永杰, 赵雨晋, 吴逢波, 等. 137 例吲哚美辛口服制剂不良反应文献分析[J]. 中国药房, 2010, 21(36): 3435-3436.

Pu Y J, Zhao Y J, Wu F B, et al. Literature Analysis of 137 ADR Induced by Indometacin Oral Preparation [J]. China Pharmacy, 2010, 21(36): 3435-3436.

[4] 徐军辉, 李存金, 王仕平, 等. 中成药中非法添加化学药品吲哚美辛检测方法的研究[J]. 中国药品标准, 2010, 11(06): 416-420.

Xu J H, Li C J, Wang S P, et al. Studies on Determination Method of Indometacin Adding Illegally in Antirheumatic Class Traditional Chinese Medicine [J]. Drug Standards of China 2010, 11(06): 416-420.

[5] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年版(中药卷)[S].

- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Quality Standard of Veterinary Medicine (the traditional Chinese medicine volume of 2017 edition) [S].
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版(二部)[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the second volume of 2015 edition) [S].
- [7] 周红霞, 杜丹丹, 王颖, 等. 12 种兽药中非法添加甲氧苄啶的 HPLC - PDA 检查方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(11):43 - 48.
Zhou H X, Du D D, Wang Y, *et al.* Determination of Trimethoprim in the 12 Kinds of Veterinary Drugs by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(11):43 - 48.
- [8] 周红霞, 李慧素, 吴宁鹏, 等. HPLC - PDA 法测定 17 种兽药中非法添加多西环素[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(10): 36 - 41.
Zhou H X, Li H S, Wu N P, *et al.* Determination of Doxycycline in Veterinary Drug by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(10): 36 - 41.
- [9] 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.
- [10] 韩宁宁, 于晓辉, 范强, 等. HPLC - PDA 方法检测柴辛注射液非法添加的克林霉素[J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(05): 47 - 49.
Han N N, Yu X H, Fan Q, *et al.* Detection of clindamycin illegally added in Chaixin injection by HPLC - PDA [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2018, 37(05): 47 - 49.
- [11] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版(一部)[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the first volume of 2015 edition) [S].
- [12] 逯小萌. 高效液相色谱法测定氨糖美辛肠溶片中吡罗美辛含量[J]. 中国药业, 2014, 23(24): 74 - 75.
Lu X M. HPLC Method for Determining Indomethacin Content in Glucosamine and Indomethacin Enteric Coated Tablets [J]. China Pharmaceuticals, 2014, 23(24): 74 - 75.
- [13] 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、吡罗美辛的 HPLC - PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 45 - 50.
Wang W J, Gong X H, Fan Q, *et al.* Determination of Bromhexine Hydrochloride and Indometacin Illegally Added in Three Veterinary Preparations by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 45 - 50.
- [14] 宋怡, 孔凡建, 王泉. 氨糖美辛肠溶片中吡罗美辛含量测定方法的比较研究[J]. 中国药品标准, 2018, 19(02): 130 - 134.
Song Y, Kong F J, Wang Q. Comparison and Research of Assay of Indometacin in Glucosamine Indometacin Enteric - coated Tablets [J]. Drug Standards of China, 2018, 19(02): 130 - 134.

(编辑:陈希)