doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2023.04.09

硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 4 种苯并咪唑类和 3 种大环内酯类抗寄生虫药物 HPLC - PDA 检测方法的建立

王 轩[1],张秀英[1],赵富华[1],熊 玥[2],彭文绣[1],叶能胜[3],韩宁宁[1*]

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. 江苏省兽药饲料质量检验所,南京 210036;3. 首都师范大学化学系,北京 100048)

[收稿日期] 2022 - 08 - 23 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2023) 04 - 0060 - 08 [中图分类号] S859.797

[摘 要] 建立了硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 7 种抗寄生虫药物的 HPLC - PDA 检测方法。采用十八烷基键合硅胶为填充剂;以水 - 乙腈为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL/min;二极管阵列检测器,波长为 245 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,7 种抗寄生虫药物间分离度良好,在 3 ~ 80 μg/mL 浓度范围内线性关系良好(R^2 > 0.9998),回收率在 103.9% ~ 105.8% 之间,$RSD \leq 2.5\%$,4 种苯并咪唑类和 3 种大环内酯类的检测限分别为 0.05 g/kg 和 0.3 g/kg。该方法操作简便、快速、灵敏度高,可用于硫酸新霉素可溶性粉中非法添加抗寄生虫药物的测定。

[关键词] 硫酸新霉素可溶性粉;非法添加;抗寄生虫药物;高效液相色谱法

Determination of 4 Benzimidazoles and 3 Macrolides Antiparasitic Drugs Illegally Added in Neomycin Sulfate Soluble Powder by HPLC - PDA

WANG Xuan[1], ZHANG Xiu - ying[1], ZHAO Fu - hua[1], XIONG Yue[2], PENG Wen - xiu[1], YE Neng - sheng[3], HAN Ning - ning[1*]

(1. *China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*; 2. *Jiangsu Testing Institute of Veterinary Drug and Feed*, *Nanjing* 210036, *China*; 3. *Department of Chemistry*, *Capital Normal University*, *Beijing*, 100048, *China*)

Corresponding author: *HAN Ning - ning*, *E - mail*: *hnn19841001@126.com*

Abstract: A method was established for the determination of seven antiparasitic drugs in neomycin soluble powder by the high - performance liquid chromatography with photo - diode detector (HPLC - PDA). C18 column was applied with mobile phase consisting of acetonitrile and water, gradient elution, at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 245 nm. Retention time, peak purity test and spectrum similar test were utilized to

基金项目:北京市科学技术协会 2020 - 2022 年度青年人才托举工程项目(No. 118);中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项(No. GY202001、No. GY2021007)

作者简介:王 轩,硕士,从事兽药抗生素检测与研究。

通讯作者:韩宁宁。E - mail:hnn19841001@126.com

identify the antiparasitic drugs. seven antiparasitic drugs were detected through the established method, which showed a good limits of detection (0.05 g/kg of benzimidazoles and 0.3 g/kg of macrolides) and linear range (3 ~ 80 μg/mL) with a high correlation coefficients ($r^2 > 0.9998$). The recoveries ranged from 103.9% to 105.8%. The established method is simple, rapid and sensitive, and can be utilized for the determination of antiparasitic drugs illegally added to neomycin sulfate soluble powder.

Key words: neomycin sulfate soluble powder; illegally addition; antiparasitic drugs; high - performance liquid chromatography

新霉素属于氨基糖苷类抗生素,硫酸新霉素可溶性粉主要用于禽大肠杆菌和沙门氏菌等革兰氏阴性菌所致的大肠杆菌病、鸡白痢等[1]。近日,在监督抽检中发现有厂家在硫酸新霉素可溶性粉中添加阿苯达唑,扰乱了兽药市场,也为动物源性食品安全埋下隐患。市场上常用的抗寄生虫类兽药来源主要为两类,一类是苯并咪唑类,包括氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑等;一类是大环内酯类,包括乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素等。目前,苯并咪唑类抗寄生虫药的含量测定方法主要为容量分析法[2]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[3],大环内酯类抗寄生虫药的检测方法有 HPLC[4]和高效液相色谱 - 串联质谱法[5]等。检索发现,上述抗寄生虫药除阿维菌素质量标准收载于 2017 年版《兽药质量标准》[6]中外,其余 6 个测试药物质量标准均收载于《中国兽药典》中。苯并咪唑类药物的含量测定多采用容量法,有关物质多采用薄层色谱法;大环内酯类药物的含量测定和有关物质均采用高效液相色谱法。另外,经文献检索发现,农业部公告第 1730 号公布了同时检测饲料中 8 种苯并咪唑类药物的高效液相色谱测定方法[7]。本文涉及的抗寄生虫药物检测方法见表 1。

表 1　检测方法汇总表

Tab 1　Summary of detection methods

标准来源	《中国兽药典》或 2017 年版《兽药质量标准》		农业部公告第 1730 号
	含量测定	有关物质	饲料中药物的含量测定
氧阿苯达唑	容量法	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:乙腈 - 0.5 mol/L 四丁基溴化铵溶液 - 冰醋酸 - 水(16∶2∶1∶81);λ = 289 nm	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:水和乙腈进行梯度洗脱;λ = 296 nm
阿苯达唑	容量法	薄层色谱法	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:水和乙腈进行梯度洗脱;λ = 296 nm
芬苯达唑	容量法	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:甲醇 - 水 - 冰醋酸(30∶70∶1)和甲醇 - 水 - 冰醋酸(70∶30∶1)进行梯度洗脱;λ = 280 nm	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:水和乙腈进行梯度洗脱;λ = 296 nm
三氯苯达唑	容量法	薄层色谱法	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:水和乙腈进行梯度洗脱;λ = 296 nm
乙酰氨基阿维菌素	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:0.1% 高氯酸溶液和乙腈进行梯度洗脱;λ = 245 nm	同含量测定	/
阿维菌素	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:甲醇 - 水(85∶15);λ = 245 nm	同含量测定	/
伊维菌素	高效液相色谱法:以十八烷基键合硅胶为填充剂;流动相:乙腈 - 甲醇 - 水(53∶35∶12);λ = 254 nm	同含量测定	/

目前,尚无兽药制剂中抗寄生虫药的检测方法。本文根据监督抽检发现的问题,选择氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑、乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素为测试药物,硫酸新霉素可溶性粉为目标制剂,参考《中国兽药典》2020 年版一部及其他相关检测方法[8-9],建立硫酸新霉素可溶性粉中上述测试药物的检查方法。

1　仪器与材料

1.1　仪器与试剂　Waters 2695 高效液相色谱仪配有二极管阵列检测器(PDA2998)和色谱工作站处理软件 Empower 3(美国 Waters 公司)、AX205 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司 KQ300E)。乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水。

1.2　试药　氧阿苯达唑对照品、阿苯达唑对照品、芬苯达唑对照品、三氯苯达唑对照品、乙酰氨基阿维菌素对照品、阿维菌素对照品和伊维菌素对照品均源自中国兽医药品监察所。

1.3　供试品

1.3.1　制剂空白　硫酸新霉素可溶性粉,某市售产品,为检验合格、无非法添加的产品,批号 20201218,规格 100 g∶6.5 g。

1.3.2　疑似阳性样品　硫酸新霉素可溶性粉,某市售产品,批号 210901,规格 100 g∶3.25 g(325 万单位)。

2　方法与结果

2.1　色谱条件　色谱柱:Dikma Diamonsil C18(4.6×250 mm,5 μm),流动相 A:超纯水;流动相 B:乙腈。梯度洗脱方法见表 2,流速:1.0 mL/min,柱温:40 ℃,进样量:10 μL,二极管阵列检测器,检测波长 190 ~ 400 nm,记录 245 nm 波长处的色谱图。

2.2　溶液制备

2.2.1　空白溶液　制剂空白溶液:称取 1.3.1 项硫酸新霉素可溶性粉 100 mg,置 10 mL 量瓶中,加含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 8 mL,超声 5 min,再用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为制剂空白溶液;溶剂空白:含 1% 冰醋酸的甲醇溶液。

表 2　梯度洗脱方法表

Tab 2　Gradient elution method

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
2	70	30
16	30	70
21	30	70
21.5	15	85
26	15	85
26.5	12	88
30	12	88
30.5	70	30
35	70	30

2.2.2　系统适用性溶液　取乙酰氨基阿维菌素适量,以含 1% 冰醋酸的甲醇溶液为溶剂,制成每 1 mL 中约含 0.2 mg 的溶液,取上述溶液 1 mL,与阿维菌素溶液对照品 1 mL 混合,作为系统适用性溶液。

2.2.3　供试品溶液　称取 1.3.2 项硫酸新霉素可溶性粉 100 mg,置 10 mL 量瓶中,加含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 8 mL,超声 5 min,再用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.4　混合对照品溶液　取氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素对照品适量,以含 1% 冰醋酸的甲醇溶液为溶剂,超声 5 min,制成每 1 mL 中各含 0.2 mg 的溶液,取上述溶液 1 mL 和阿维菌素溶液对照品 1 mL 混合,作为对照品溶液。

2.2.5　检测限溶液　取硫酸新霉素可溶性粉约 100 mg,置 10 mL 量瓶中,精密加入 2.2.4 项混合对照品溶液(7 种抗寄生虫药物的浓度均约为 0.1 mg/mL)适量(0.025、0.05、0.2、0.3 mL),加含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 8 mL,超声 5 min,用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得检测限测试溶液。

2.2.6　光谱数据库溶液　使用 2.2.4 项混合对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液,建立抗寄生虫药物光谱数据库。

2.3　方法建立与优化

2.3.1　溶剂的选择　现有质量标准显示,伊维菌素在甲醇中易溶;乙酰氨基阿维菌素在甲醇中极易溶;阿维菌素在甲醇中略溶;芬苯达唑在甲醇中微溶;三氯苯达唑在甲醇中溶解。因此首选采用甲醇作为混合对照品溶液的溶剂。采用甲醇分别配制 0.2 mg/mL 的对照品溶液时,氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素对照品均可溶解(阿维菌素对照品溶剂即为甲醇);但将上述六种对照品混合,超声 20 min 亦无法完全溶解。分析原因可能是大环内酯类药物与苯并咪唑类药物在甲醇中混合时,会影响苯并咪唑类药物的溶解度。

进一步检索发现,现有质量标准显示,阿苯达唑、芬苯达唑在冰醋酸中溶解;氧阿苯达唑在冰醋酸中易溶。因此,尝试采用含有冰醋酸的甲醇溶液配制上述六种对照品的混合溶液。当冰醋酸浓度为 0.5% 时,超声 20 min 仍无法完全溶解;当冰醋酸浓度提高至 1% 时,超声 5 min,即可完全溶解。因此,采用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液作为溶剂。

此外,当采用分析纯或化学纯冰醋酸配制含 1% 冰醋酸的甲醇溶液时,大环内酯类药物的紫外光谱图会呈现明显锯齿状,尤其是低浓度时,会发生光谱图失真,影响方法的检测限[10]。另外,部分品牌的分析纯冰醋酸在 4 min 附近产生色谱峰,容易影响氧阿苯达唑的检测。实验表明当采用 HPLC 级冰醋酸可解决上述问题,因此本方法采用 HPLC 级冰醋酸进行溶液的配制。

2.3.2　色谱条件的选择　农业部公告第 1730 号采用的水 – 乙腈梯度洗脱条件可实现苯并咪唑类药物的良好分离。采用该方法对 7 种对照品的混合溶液进行测定时,乙酰氨基阿维菌素和阿维菌素保留时间接近,且受二者分别对应的小组分 B_{1b} 影响,无法实现良好分离。因此对该色谱条件的 15 min 之后的梯度洗脱条件进行了调整,实现了七种对照品主峰的良好分离(如图 1 A 和表 3 所示)。

考虑到乙酰氨基阿维菌素和阿维菌素的分离是该色谱条件实现良好分离的关键点,因此,系统适用性溶液采用该两种对照品配制混合溶液,采集色谱图,要求乙酰氨基阿维菌素和阿维菌素的分离度应不小于 1.5。

当采用常规积分方式时,乙酰氨基阿维菌素和阿维菌素的纯度角度有可能大于纯度阈值,采用峰谷至峰谷的积分方式,可实现纯度角度小于阈值。

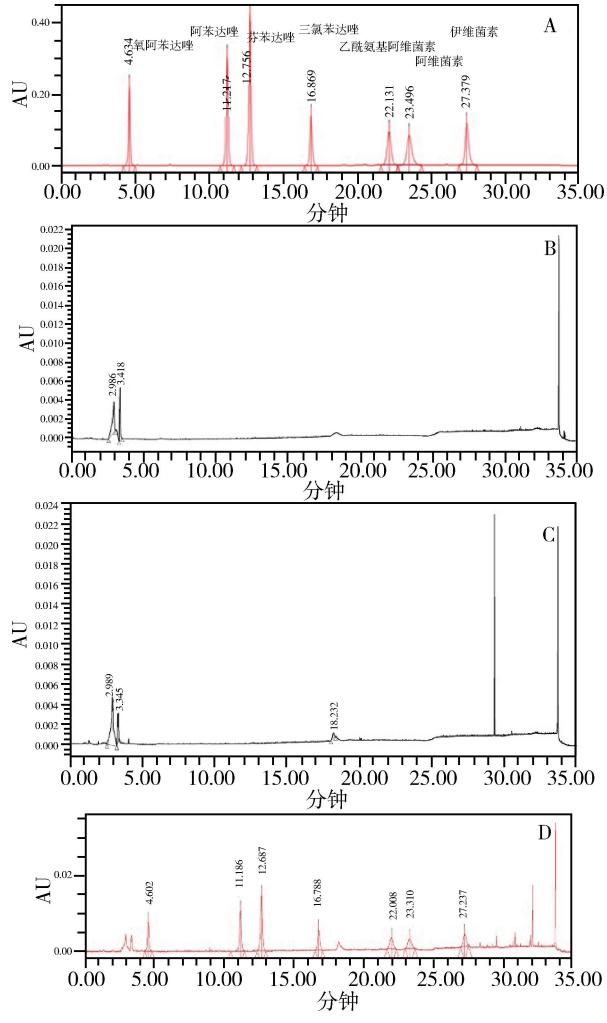

图 1　七种对照品混合溶液色谱图(A);溶剂空白色谱图(B);硫酸新霉素可溶性粉制剂空白色谱图(C);硫酸新霉素可溶性粉中添加 7 中抗寄生虫药物色谱图(D)

Fig 1　Chromatogram of mixed solution of seven reference substances(A). Chromatogram of negative solution of solvent(B). Chromatogram of negative solution of neomycin sulfate soluble powder(C). Chromatogram of neomycin sulfate soluble powder added seven reference substances(D)

表 3　7 种对照品纯度及分离度结果

Tab 3　Purity and resolution of seven reference substances

对照品名称	保留时间/ min	纯度角度/纯度阈值	分离度
氧阿苯达唑	4.634	0.141/0.272	28.1
阿苯达唑	11.217	0.058/0.245	28.1/5.9
芬苯达唑	12.756	0.042/0.254	5.9/15.4
三氯苯达唑	16.869	0.084/0.250	15.4/13.7
乙酰氨基阿维菌素	22.131	0.221/0.224	13.7/2.5
阿维菌素	23.496	0.092/0.231	2.5/7.4
伊维菌素	27.379	0.110/0.223	7.4

2.3.3　检测波长的选择　苯并咪唑类药物的最大吸收波长约为 220 nm 和 290 nm，在 245 nm 亦有较强吸收。大环内酯类药物的最大吸收波长约为 245 nm。综合考虑，采用 245 nm 作为本方法的检测波长。七种抗寄生虫药物的光谱图见图 2。

2.4　方法验证

2.4.1　专属性　按照 2.1 项所示色谱条件，分别采集溶剂空白（图 1 B）和制剂空白（图 1 C）溶液色谱图，结果显示二者在 7 种抗寄生虫类药物出峰时间均无色谱峰，不干扰该 7 种药物的测定。

1.1.1

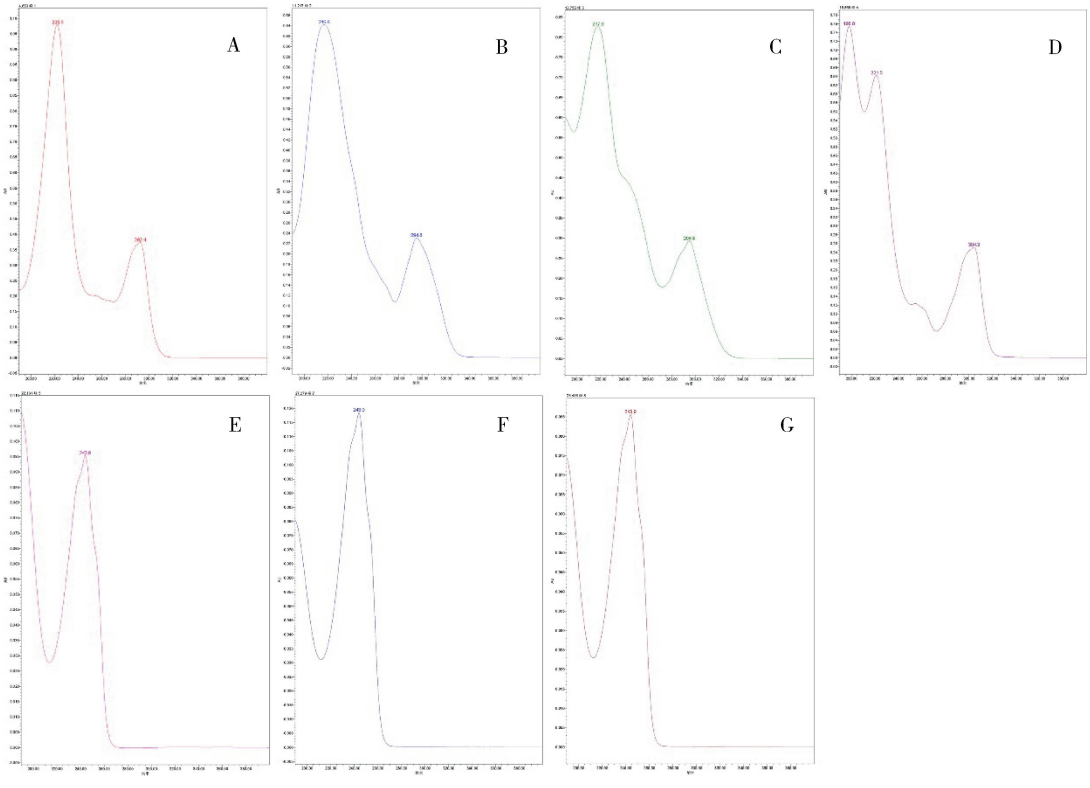

图 2　氧阿苯达唑（A）、阿苯达唑（B）、芬苯达唑（C）、三氯苯达唑（D）、乙酰氨基阿维菌素（E）、阿维菌素（F）和伊维菌素（G）的光谱图

Fig 2　Spectrograms of oxyalbendazole (A), albendazole (B), fenbendazole (C), triclabendazole (D), acetamido abamectin (E), abamectin (F) and ivermectin (G)

2.4.2　检测限　当 7 种抗寄生虫类药物在目标制剂中的浓度为 0.025 g/kg 时，七种药物的光谱图 300 nm 以上波段均呈锯齿状；当浓度为 0.05 g/kg 时，四种苯并咪唑类药物光谱图与对照品溶液对应的光谱图一致，最大吸收波长一致，纯度角度小于纯度阈值，显示为单一物质峰，将该浓度作为四种苯并咪唑类药物的检测限；当浓度为 0.2 g/kg 时，虽然三种大环内酯类药物的光谱图与对照品溶液

对应的光谱图一致,但纯度角度均大于纯度阈值;当浓度为 0.3 g/kg 时,三种大环内酯类药物的光谱图与对照品溶液对应的光谱图一致,最大吸收波长一致,纯度角度小于纯度阈值,显示为单一物质峰,将该浓度作为三种大环内酯类药物的检测限。

2.4.3　线性范围　分别精密量取混合对照品溶液 0.8、0.5、0.2、0.1、0.3 mL,分别精密加入含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 0.2、0.5、0.8、0.9、9.7 mL,混合,得浓度为 80、50、20、10、3 μg/mL 的对照品标准溶液。以各抗寄生虫药物在制剂空白中的添加浓度 x(μg/mL)对峰面积 y 作图,并进行统计学处理,得到 7 种抗寄生虫药物的回归方程,并计算得到决定系数 R^2(表 4)。结果显示,在 3 ~ 80 μg/mL 的浓度范围内,上述 7 种抗寄生虫药物添加浓度与峰面积呈良好的线性关系,适用于外标法定量计算。

表 4　7 种抗寄生虫药物的线性考察结果

Tab 4　Linear results for seven antiparasitic drugs

药物名称	线性范围(μg/mL)	线性方程	R^2
氧阿苯达唑	3 – 80	$y = 190606x + 9796.4$	0.9998
阿苯达唑	3 – 80	$y = 328027x - 4582.4$	1.0000
芬苯达唑	3 – 80	$y = 397551x + 17955$	1.0000
三氯苯达唑	3 – 80	$y = 173059x + 6417.3$	0.9999
乙酰氨基阿维菌素	3 – 80	$y = 191150x + 4600.7$	0.9999
阿维菌素	3 – 80	$y = 191073x + 30.033$	1.0000
伊维菌素	3 – 80	$y = 185374x - 2236.1$	1.0000

2.4.4　准确性　以空白制剂添加被测药物对照品(添加浓度为大环内酯类药物检测限浓度的5倍)进行回收率试验,考察方法的准确度,空白制剂中添加被测药物对照品的色谱图见图 1 D。取硫酸新霉素可溶性粉 100 mg,置 10 mL 量瓶中,精密量取混合对照品溶液 1.5 mL 置上述 10 mL 量瓶中,加含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 8 mL,超声 5 min,用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得回收率试验溶液。平行制备 6 份。精密量取混合对照品溶液 1.5 mL置 10 mL 量瓶中,加含 1% 冰醋酸的甲醇溶液 8 mL,超声 5 min,用含 1% 冰醋酸的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。分别采集回收率试验溶液和对照品溶液的色谱图,计算回收率(表 5)。

根据兽药质量标准分析方法验证指导原则(《中国兽药典》附录 9101)规定,在约 1.5 g/kg 的添加浓度下,回收率应在 90% ~ 108% 之间,重复性 *RSD* 应小于 3%。表 4 结果显示 7 种抗寄生虫药物的平均回收率均在此范围内,方法准确度良好。

2.4.5　耐用性　在不同柱温(35 ℃、40 ℃、45 ℃)、不同流速(0.95、1.0、1.05 mL/min)条件下分别对混合对照品溶液进行测定。在上述条件下,7 种抗寄生虫药物与周围峰的分离度均大于 1.5,对应主峰的峰纯度角度均小于阈值,为单一物质峰,表明该方法对温度和流速具有良好的耐受性。共采用 6 款不同品牌的色谱柱(均为 C 18,250 × 4.6 mm,5 μm)分别对混合对照品溶液进行测定,结果显示,仅 Diamonsil 和 Phenomenex Gemini 两款色谱柱可对上述 7 种药物均实现良好分离,表明该方法需要限定色谱柱品牌。

表 5　回收率考察结果($n = 6$)

Tab 5　Recovery of seven antiparasitic drugs in neomycin sulfate soluble powder ($n = 6$)

对照品名称	回收率/%						平均回收率/%	*RSD*/%
氧阿苯达唑	103.55	105.91	103.80	105.31	105.71	105.62	105.0	1.0
阿苯达唑	103.41	105.21	104.97	105.60	104.48	105.45	104.9	0.8
芬苯达唑	105.21	106.65	105.47	106.42	105.75	107.20	105.8	1.1
三氯苯达唑	103.66	106.33	104.60	104.76	105.34	103.23	104.7	1.1
乙酰氨基阿维菌素	103.19	106.09	104.68	104.50	105.33	106.43	105.0	1.2
阿维菌素	104.32	102.33	104.43	105.25	105.97	105.94	104.7	1.4
伊维菌素	107.28	106.05	102.70	100.69	104.49	102.43	103.9	2.5

2.5　阳性样品测定　取硫酸新霉素可溶性粉阳性样品,照 2.2.3 项配制供试品溶液,将混合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 注入液相色谱仪,照 2.1 项色谱条件,同时记录色谱图和光谱图。结果显示,供试品溶液在与阿苯达唑峰保留时间一致处出峰,该色谱峰纯度角度小于纯度阈值,证明为单一物质峰;将其光谱图与阿苯达唑对照品的光谱图进行匹配,匹配角度小于匹配阈值,说明其与阿苯达唑对照品的光谱相似,且二者的最大吸收波长一致。故判定该批供试品中检出阿苯达唑。

3　讨论与结论

3.1　检查方法的扩展使用　除硫酸新霉素可溶性粉制剂外,当采用该检测方法用于其他兽药制剂中非法添加氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑、乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素的检查时,应进行空白试验和检测限测定。必要时,可调整供试品溶液或对照品溶液的浓度,使两者峰面积相似。通过与对照品溶液色谱图保留时间、光谱图的对比,确定供试品中是否含有上述 7 种抗寄生虫类药物。

3.2　保留时间、峰纯度检查与光谱相似度检查　目标组分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,峰纯度检查可以判断该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。本实验以制剂空白中加入 7 种抗寄生虫药物对照品进行保留时间、峰纯度检查和光谱相似度检查。在与 7 种抗寄生虫药物对照品溶液峰保留时间一致处出峰,且纯度角度小于纯度阈值,匹配角度小于匹配阈值,从而证明本方法具有可行性。

3.3　非法添加原因分析　硫酸新霉素可溶性粉在临床上主要用于禽类大肠杆菌病,能够有效治疗家禽肠炎、肠毒综合征和球虫混合感染。而阿苯达唑则是一种高效低毒的广谱驱肠虫兽药。不法企业在硫酸新霉素可溶性粉中添加阿苯达唑旨在“提高”其产品驱虫疗效,但这无形中增加了正处于治疗过程中的禽类的肝肾功能负担,从而可能造成病情恶化。因此,在硫酸新霉素可溶性粉中非法添加阿苯达唑会引起潜在的、无法预计的危害。

3.4　建立高通量非法添加检查方法的设计理念　在本研究工作中,建立了 7 种抗寄生虫药物的检查方法。文献中非法添加方法的建立过程,通常会采取发现某一制剂中出现某个非法添加物质,建立针对单一物质的非法添加方法[11-13],造成标准繁多,适用性较低的问题。本研究通过非法添加筛查,发现硫酸新霉素可溶性粉制剂中疑似添加了阿苯达唑。考虑苯并咪唑类及大环内酯类化合物结构与化学性质具有一定程度的相似性,适宜采用同一方法同时检测,同时考虑上述两类抗寄生虫药物占有较大的市场份额,选取了 7 种具有代表性的抗寄生虫类药物作为目标物,建立了高通量的非法添加检查方法,为打击兽药非法添加犯罪行为提供技术支撑,有效防控兽药安全风险。

3.5　与已发表的方法比较　将本研究结果与文献中以建立的方法进行比较,结果见表 6。本研究中,实现了对 4 种苯并咪唑类和 3 种大环内酯类抗寄生虫药的同时检测,线性范围覆盖检验检测范围,回收率良好,有效提升了兽药制剂中抗寄生虫药的检测效率。

表 6　与其他抗寄生虫药检测方法比较

Tab 6　Comparison of other determination methods of Antiparasitic

目标分析物	检测方法	线性范围	回收率	文献
阿苯达唑、三氯苯达唑、盐酸左旋咪唑、地克珠利	HPLC - PDA	10 ~ 200 μg /mL	98.9% ~ 105.4%	3
噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、甲氧咪唑、氧苯达唑、三氯苯达唑	HPLC - PDA	/	/	7
伊维菌素、阿维菌素	HPLC - FLD	/	88.2% ~ 107.2%	14
氧阿苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、三氯苯达唑、乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素	HPLC - PDA	3 ~ 80 μg /mL	103.9% ~ 105.8%	本工作

本方法建立了 HPLC－PDA 法检测硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 7 种抗寄生虫类药物的检查方法，综合保留时间、峰纯度检查和光谱相似度检查三方面信息，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，为打击兽药制剂非法添加抗寄生虫药物制假行为提供了有力的技术支持。

参考文献：

[1] 戴新予，郝海红，黄玲利，等. 氨基糖苷类对禽肠道细菌的耐药判定标准研究进展[J]. 中国抗生素杂志，2018，43(11)：1332－1337.
Dai X，Hao H，Huang L，et al. Establishment on the Resistant Standards for Aminoglycosides Against Digestive Tract Bacteria in Chickens[J]. Chinese Journal of Antibiotics，2018，43(11)：1332－1337.

[2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版(一部)[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the first volume of 2020 edition) [S].

[3] 吴 昊，刘红云，张 莉，等. 梯度洗脱 HPLC 法同时测定 4 种驱虫药物的含量[J]. 安徽农业科学，2019，47(14)：210－212＋227.
Wu H，Liu H，Zhang L，et al. Simultaneous Determination of 4 Anthelmintics by Gradient Elution HPLC Method[J]. Journal of Anhui Agricultural Science，2019，47(14)：210－212＋227.

[4] 韩宁宁，赵富华，戴 青，等. 伊维菌素吡喹酮咀嚼片含量测定方法的建立[J]. 中国兽药杂志，2019，53(05)：1－9.
Han N，Zhao F，Dai Q，et al. Establishment of the Content Determination Method for Ivermectin and Praziquantel Chewable Tablets[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2019，53(05)：1－9.

[5] 李玉立，陈可心，唐塔娅，等. 动物源样品中阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医，2018，45(11)：3296－3304.
Li Y，Chen K，Tang T，et al. Research Progress on Detection Methods of Avermectin Residues in Animal Origin Samples[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine，2018，45(11)：3296－3304.

[6] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年版(化学药品卷)[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Drug Quality Standard 2017 Edition (Chemicals Volume) [S].

[7] 中华人民共和国农业部公告第 1730 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 1730[S].

[8] 熊 玥，宋慧敏，汪云花，等. HPLC－PDA 法同时测定硫酸新霉素可溶性粉中非法添加 4 种化学药物[J]. 中国兽药杂志，2018，52(11)：40－46.
Xiong Y，Song H，Wang Y，et al. Simultaneous Determination of Four Kinds of Illegally Added Chemical Drugs in Neomycin Sulfate Soluble Powder by HPLC－PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2018，52(11)：40－46.

[9] 熊 玥，汪 澄，刘建晖，等. 恩诺沙星粉中未知添加物的确证[J]. 色谱，2021，39(06)：633－641.
Xiong Y，Wang C，Liu J，et al. Confirmation of Unknown Additives in Enrofloxacin Powder [J]. Chinese Journal of Chromatography，2021，39(06)：633－641.

[10] 王 轩，韩宁宁，杨秀玉，等. 阿莫西林可溶性粉中非法添加氟苯尼考的 HPLC－PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志，2021，55(08)：48－53.
Wang X，Han N，Yang X，et al. Determination of Illegally Added of Florfenicol in Amoxicillin Soluble Powder by HPLC－PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2021，55(08)：48－53.

[11] 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].

[12] 中华人民共和国农业部公告第 2398 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 2398[S].

[13] 中华人民共和国农业部公告第 2395 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 2395[S].

[14] 胡晓楠，郭文丽，王 云，等. 高效液相色谱－荧光法同时检测水产中阿维菌素和伊维菌素[J]. 现代食品，2019，20：164－166.
Hu X，Guo W，Wang Y，et al. Simultaneous Determination of Abamectin and Ivermectin in Aquatic Products by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence [J]. Modern Food，2019，20：164－166.

(编 辑：侯向辉)