

五种兽药中非法添加喹乙醇和乙酰甲喹的 HPLC-PDA 检测方法的建立

吴宁鹏¹, 王丽景², 李慧素¹, 孟 蕾¹

(1. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2. 郑州后羿制药有限公司, 郑州 450000)

[收稿日期] 2014-07-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0043-07 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 建立了高效液相色谱法测定五种制剂中非法添加喹乙醇与乙酰甲喹的方法。以十八烷基键合硅胶为填充剂, 乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 6.0) 为流动相, 二极管阵列检测器进行全波长 (200~400 nm) 扫描, 检测波长为 260 nm, 并采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品比对方法, 对非法添加药物进行确证。结果表明, 该色谱条件下喹乙醇、乙酰甲喹与其他物质峰分离良好。喹乙醇、乙酰甲喹在 0.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好, 回收率在 91.1%~105.7% 之间, $RSD \leq 3.1\%$, 喹乙醇、乙酰甲喹的检测限分别为 1.0 和 2.5 mg/g。

[关键词] 喹乙醇; 乙酰甲喹; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 峰纯度检查; 光谱相似度检查

Determination of Olaquinox and Mequinox Illegally Added in Five Kinds of Veterinary Drug by HPLC-PDA

WU Ning-peng¹, WANG Li-jing², LI Hui-su¹, MENG Lei¹

(1. Henan Institute of Veterinary Drug & Feed Control, Zhengzhou 450008, China; 2. Zhengzhou Houyi Pharmaceutical Co., Ltd, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: A method of illegally adding olaquinox and mequinox in the five kinds of preparations which using the high performance liquid chromatography was studied. It was tested with C18 column, using isocratic elution with 0.01mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 6.0) and acetonitrile as the mobile phase, diode array detector scanning 200~400 nm, the detection wavelength was 260 nm. Peak purity test and spectrum similar test were helped to identify the olaquinox and mequinox. The results showed that under the chromatographic condition, olaquinox, mequinox and other materials separated well. The linearity of olaquinox, mequinox in the range of 0.5~200.0 $\mu\text{g/mL}$ were good, the mean recovery of olaquinox, mequinox were 91.1%~105.7%, $RSD \leq 3.1\%$, the detection limits of olaquinox and mequinox were 1.0 and 2.5 mg/g.

Key words: olaquinox; mequinox; HPLC; photo-diode array detector; peak purity test; spectrum similar test

基金项目: 河南省重点科技攻关计划 (编号: 132102110078)

作者简介: 吴宁鹏, 高级兽医师, 从事兽药检验检测技术研究。E-mail: wnppeking2002@163.com

喹乙醇、乙酰甲喹属于喹噁啉类合成抑菌药物,具有广谱抗菌活性,被广泛用于促进动物生长和提高饲料转化率^[1]。近年来由于喹乙醇^[2-3]、乙酰甲喹^[4-6]的不合理使用,中毒事件时有发生。有些兽药企业为提高制剂疗效,牟取利益,违规在兽药制剂中添加非处方成分喹乙醇、乙酰甲喹,严重影响兽药市场的稳定,危害动物安全。本试验参考相关文献及《农业部第 1868 号公告—氟喹诺酮类制剂中非法添加乙酰甲喹、喹乙醇等化学药物检查方法》^[7],采用高效液相色谱法与二极管阵列检测器对硫酸黏菌素可溶性粉及预混剂、烟酸诺氟沙星可溶性粉、黄连解毒散和白头翁散等制剂中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的检测方法进行考察。该方法的建立可为其他兽用制剂中添加喹乙醇、乙酰甲喹的检测应用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waters 2695, PDA, Empower2 色谱工作站软件);超纯水仪;电子分析天平;超声波清洗器。

1.2 试剂与药品 磷酸二氢钾、甲醇、三乙胺,均为分析纯;乙腈为色谱纯。喹乙醇对照品(批号为 H0061103)、乙酰甲喹对照品(批号为 H0110703),均来自中国兽医药品监察所;喹乙醇、乙酰甲喹原料药,河南某兽药生产企业提供;硫酸黏菌素可溶性粉(10%)、硫酸黏菌素预混剂(10%)、烟酸诺氟沙星可溶性粉(30%)、黄连解毒散、白头翁散,均来自市售样品,经检测均不含喹乙醇和乙酰甲喹。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 根据文献方法^[7-8],采用 Waters XBridge-C18 柱;流动相:乙腈-0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液(三乙胺调 pH 值至 6.0)(5 : 95)(可做适当调整);二极管阵列(PDA)检测器,采集波长范围为 200~400 nm,分辨率为 1.2 nm;记录 260 nm 波长处的色谱图。

2.2 溶液配制

2.2.1 非法添加供试品(模拟) 取各制剂粉末,按 1%分别添加喹乙醇、乙酰甲喹,混匀。

2.2.2 供试品溶液和对照品溶液 精密称取供试品 1.0 g,置 50 mL 容量瓶中,加 20% 甲醇溶液适量,超声 30 min,放冷至室温,用 20% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀。精密量取 5.0 mL,置 50 mL 容量瓶中,用 20% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取喹乙醇对照品、乙酰甲喹对照品适量,分别加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.1 mg 的溶液,作为对照品溶液(临用前配制)。

2.2.3 各制剂空白溶液 称取无非法添加的各制剂粉末 1.0 g,照 2.2.2 项下操作制备成各制剂空白溶液。

2.2.4 建立光谱数据库的溶液 以喹乙醇、乙酰甲喹对照品溶液(0.1 mg/mL)作为建立光谱数据库的溶液。

2.3 峰纯度检查 对供试品溶液色谱图中喹乙醇、乙酰甲喹色谱峰进行峰纯度检查,见图 1-图 3、表 1。结果显示,喹乙醇峰与乙酰甲喹峰的纯度角度均小于纯度阈值,表明在此液相条件下,喹乙醇或乙酰甲喹的出峰处无其他干扰峰,均为单一物质峰,方法可行。

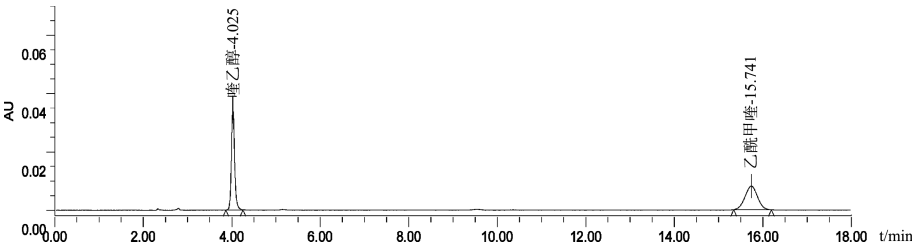


图 1 供试品(硫酸黏菌素可溶性粉)添加喹乙醇、乙酰甲喹色谱图

表 1 峰纯度检查结果表

供试品中的色谱峰	纯度角度	纯度阈值	结果	匹配角度	匹配阈值	结果
喹乙醇	0.255	0.421	单一物质峰	1.151	1.167	光谱相似
乙酰甲喹	0.530	0.696	单一物质峰	1.073	1.656	光谱相似

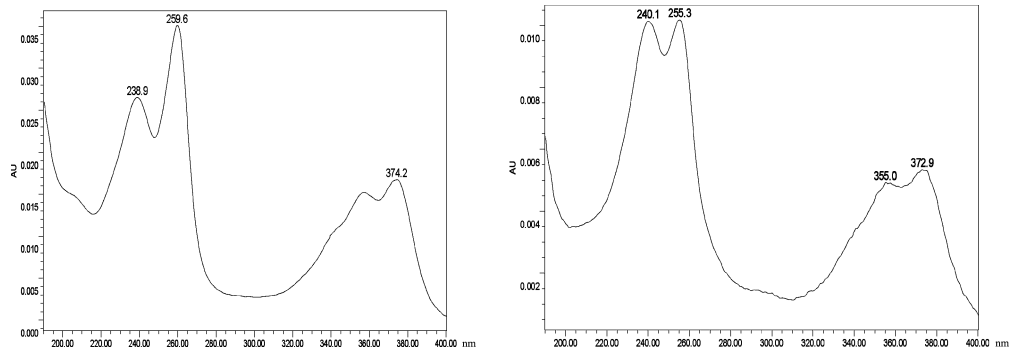


图2 供试品(硫酸黏菌素可溶性粉)添加噻乙醇(左)、乙酰甲喹(右)光谱图

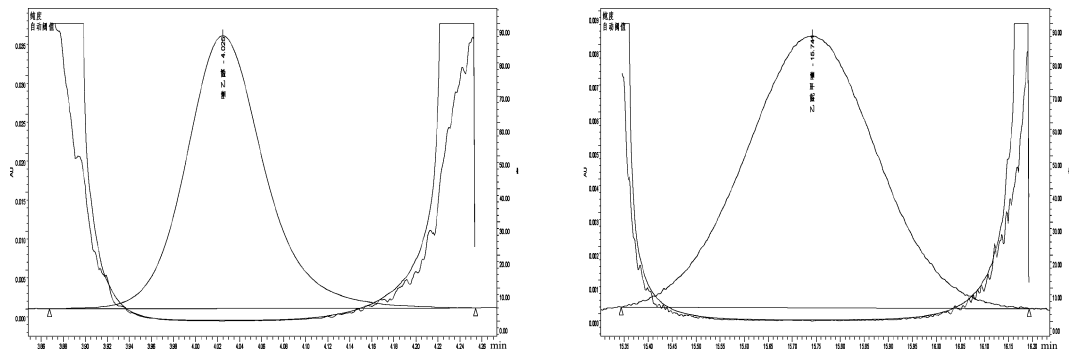


图3 供试品(硫酸黏菌素可溶性粉)添加噻乙醇(左)、乙酰甲喹(右)的峰纯度图

2.4 光谱相似度检查 对供试品溶液中噻乙醇、乙酰甲喹的光谱图与光谱库进行匹配,匹配角度均小于匹配阈值(表1),表明供试品溶液中相应色谱峰的光谱与噻乙醇、乙酰甲喹对照品的光谱非常相似,可认为是同一物质。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 通过各制剂空白试验排除各制剂中主要成份对于被测物的干扰。同时峰纯度检查结果也显示此液相条件下二者均为单一物质峰。

2.5.2 耐用性 从柱温、流动相 pH 值、色谱柱三个方面考察方法的耐用性。调节柱温为 25、30、35 ℃,结果显示:噻乙醇、乙酰甲喹保留时间受柱温影响较小,随柱温升高,保留时间略提前;调节流动相 pH 值变化为 5.8、6.0、6.2,结果显示:随流动相 pH 值的增大,噻乙醇保留时间不变,乙酰甲喹保留时间略提前,且三种 pH 值下分离度均大于 1.5;选择 4 款不同品牌色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Waters XBridge™ Shield RP18(4.6 mm×150 mm, 5 μm)、Waters Sunfire™ C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、SHIMADZU VP-ODS

(150 mm×4.6 mm, 5 μm)等,考察不同色谱柱对测定的影响,结果显示:噻乙醇、乙酰甲喹的出峰顺序没有变化,且能达到很好的分离,仅保留时间发生变化,表明 4 种品牌色谱柱均可用于该检查,方法耐用性较好。

2.5.3 检测限 将噻乙醇、乙酰甲喹的对照品溶液制成混合标准溶液,进行梯度稀释后添加到阴性对照制剂中,进行检测。以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限,噻乙醇的最低检测浓度为 2.0 μg/mL,在各制剂中的检测限为 1.0 mg/g;乙酰甲喹的最低检测浓度 5.0 μg/mL,在各制剂中的检测限为 2.5 mg/g。因中药成分较为复杂,以黄连解毒散和白头翁散的相关谱图为代表,见图 4-图 13。

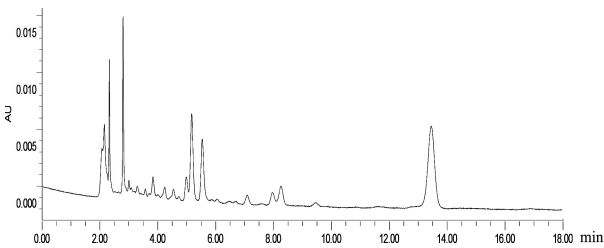


图4 黄连解毒散空白色谱图

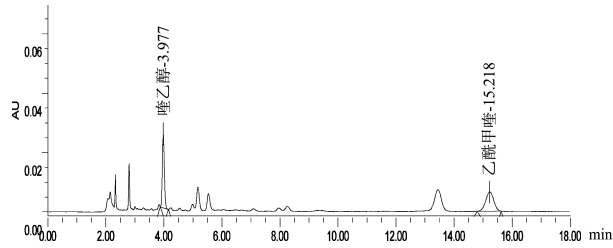


图 5 黄连解毒散添加 3-乙氧基蒽醌 (2 µg/mL) 检测限色谱图

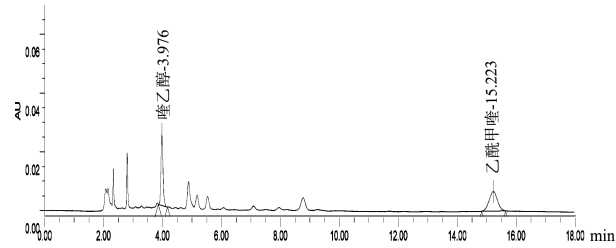


图 10 白头翁散添加 3-乙氧基蒽醌 (2 µg/mL) 检测限色谱图

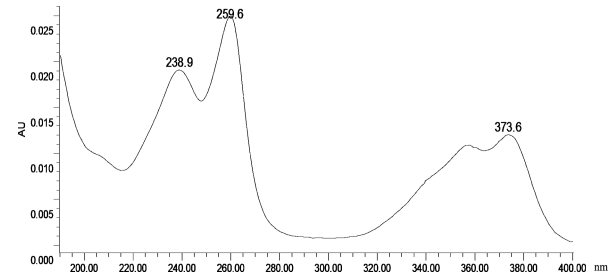


图 6 黄连解毒散添加 3-乙氧基蒽醌 (2 µg/mL) 检测限光谱图

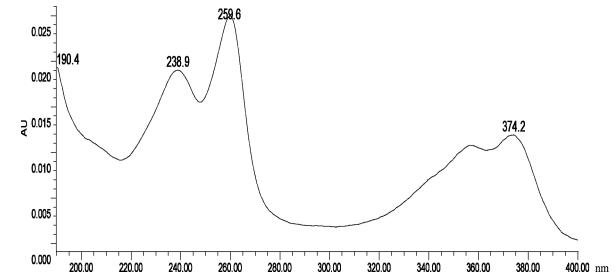


图 11 白头翁散添加 3-乙氧基蒽醌 (2 µg/mL) 检测限光谱图

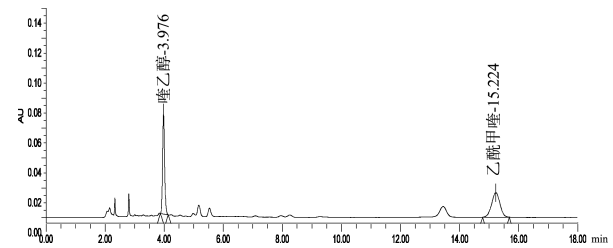


图 7 黄连解毒散添加 3-乙氧基蒽醌 (5 µg/mL) 检测限色谱图

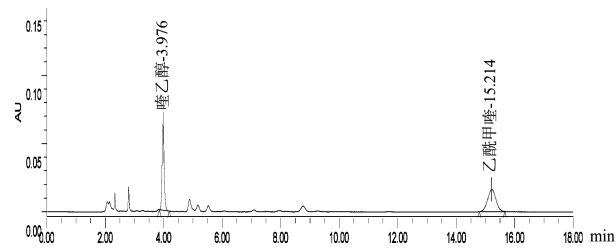


图 12 白头翁散添加 3-乙氧基蒽醌 (5 µg/mL) 检测限色谱图

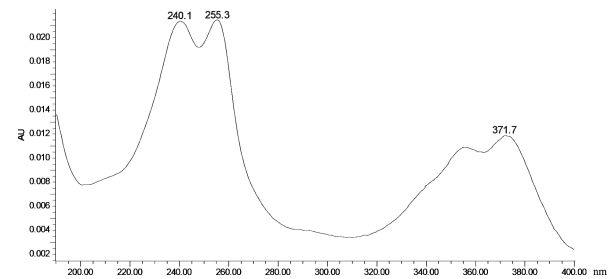


图 8 黄连解毒散添加 3-乙氧基蒽醌 (5 µg/mL) 检测限光谱图

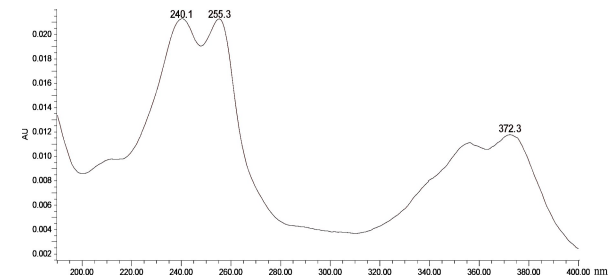


图 13 白头翁散添加 3-乙氧基蒽醌 (5 µg/mL) 检测限光谱图

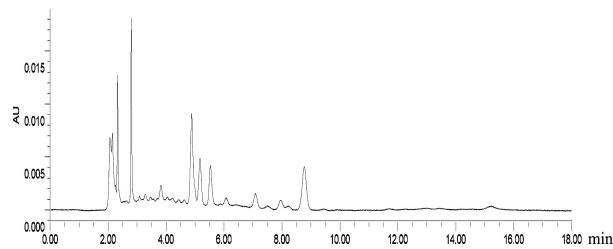


图 9 白头翁散空白色谱图

2.5.4 准确度 考虑到阳性添加试验需要 3-乙氧基蒽醌、3-乙氧基蒽醌的量较多,本试验使用兽药原料药代替标准物质进行阳性添加试验,回收率试验方法:硫酸黏菌素可溶性粉、硫酸黏菌素预混剂、烟酸诺氟沙星可溶性粉添加浓度分别为 1%、2% 和 5%,黄连解毒散、白头翁散添加浓度分别为 0.5%、1% 和 2%,每个浓度分别制备三个平行,求得添加回收率及相对标准偏差。该方法中 3-乙氧基蒽醌、3-乙氧基蒽醌的回收率

为 91.1~105.7%,*RSD* 均小于 3.1%。说明该检测方法可靠,结果见表 2~表 3。

2.5.5 线性与范围 取喹乙醇、乙酰甲喹对照品适量制成浓度为 1 mg/mL 的混合溶液,精密量取标准品贮备液适量,用 20% 甲醇水稀释成 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 μg/mL 的系列混合标准溶液,从低浓度到高浓度依次进样分析,以峰面积 *Y* 对标准溶液浓度 *X* 进行线性回归,喹乙醇、乙酰甲喹的回归方程分别为 $Y=94008X-100589$,相关系数为 0.9997; $Y=68131X-30938$,相关系数为 0.9999。结果表明,喹乙醇、乙酰甲喹在 0.5~200.0 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

表 2 预混剂、可溶性粉添加回收试验结果

添加药物	添加浓度	样品编号	制剂回收率/%		
			硫酸黏菌素可溶性粉	硫酸黏菌素预混剂	烟酸诺氟沙星可溶性粉
喹乙醇	1%	1	91.1	93.3	97.8
		2	96.8	92.1	93.7
		3	94.4	95.5	93.6
		平均值	94.1	93.6	95.0
		<i>RSD</i> /%	3.0	1.8	2.5
	5%	1	99.4	101.2	96.3
		2	99.2	102.5	96.7
		3	101.0	101.6	96.8
		平均值	99.8	101.8	96.6
		<i>RSD</i> /%	0.9	0.6	0.3
	10%	1	101.3	104.7	97.5
		2	101.4	105.7	95.5
		3	100.2	104.6	97.0
		平均值	101.0	105.0	96.6
		<i>RSD</i> /%	0.6	0.6	1.0
乙酰甲喹	1%	1	94.3	102.0	92.5
		2	97.7	103.7	91.1
		3	96.2	105.1	94.4
		平均值	96.1	103.6	92.6
		<i>RSD</i> /%	1.7	1.50	1.6
	5%	1	95.8	101.5	91.3
		2	95.9	102.4	91.8
		3	96.3	101.7	91.4
		平均值	96.0	101.8	91.5
		<i>RSD</i> /%	0.2	0.4	0.3
	10%	1	95.4	103.1	91.4
		2	95.0	105.0	90.1
		3	94.2	103.2	91.1
		平均值	94.5	103.8	90.8
		<i>RSD</i> /%	0.4	1.0	0.7

表 3 黄连解毒散、白头翁散添加回收试验结果

添加物质	添加浓度	样品编号	制剂回收率/%	
			黄连解毒散	白头翁散
喹乙醇	0.5%	1	97.9	100.1
		2	96.4	99.0
		3	98.6	102.8
		平均值	97.6	100.6
		RSD/%	1.1	1.9
	1%	1	98.3	102.0
		2	100.5	99.4
		3	99.9	96.2
		平均值	99.6	99.2
		RSD/%	1.1	2.9
	2%	1	99.9	95.3
		2	99.9	97.7
		3	101.6	97.5
		平均值	101.5	96.9
		RSD/%	0.9	1.3
乙酰甲喹	0.5%	1	90.0	93.3
		2	94.6	93.8
		3	90.9	94.6
		平均值	91.8	93.9
		RSD/%	2.6	0.6
	1%	1	91.0	96.7
		2	92.2	95.6
		3	91.2	96.3
		平均值	91.4	96.2
		RSD/%	0.7	0.5
	2%	1	94.0	95.8
		2	93.9	96.0
		3	94.7	96.0
		平均值	94.2	98.5
		RSD/%	0.4	0.1

3 讨论与小结

3.1 稀释溶剂的选择 试验比较了甲醇、80% 甲醇, 50% 甲醇, 20% 甲醇, 乙腈, 50% 乙腈等稀释溶剂, 结果表明, 稀释溶剂为 20% 甲醇、50% 甲醇时, 喹乙醇、乙酰甲喹的峰形对称, 能够达到很好的分离, 且稳定性良好。

试验用 20% 甲醇为提取液超声处理各样品, 结

果表明喹乙醇、乙酰甲喹回收率高, 峰尖锐对称, 操作方法简单易行, 因此试验选择 20% 甲醇为提取溶剂。

3.2 检测波长 有文献报道^[9-10]采用 365、254 nm 作为检测波长, 农医发[2009]17 号及农业部 1868 号公告中检测波长为 365 nm, 本试验采用二极管阵列检测器对样品进行全波长扫描, 喹乙醇在 239、

260、373 nm 处有最大吸收,其中 260 nm 响应值最高,明显高于 365 nm 处,乙酰甲喹在 240、255、372 nm 处有最大吸收,其中 240、255 nm 响应值最高,明显高于 365 nm 处。因此,本文采用 260 nm 作为检测波长,喹乙醇与乙酰甲喹分离度好,响应值高,能够很好地满足试验要求。

3.3 检测限 本方法喹乙醇、乙酰甲喹的检测限分别为 1000、2500 mg/kg,高于农医发[2009]17 号文中喹乙醇、乙酰甲喹在中药散剂中的检测限 50 mg/kg。本实验以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限,乙酰甲喹上机浓度为 1 ppm(即检测限为 500 mg/kg)时 300~400 nm 的光图谱已严重失真,上机浓度不可能再低,因此乙酰甲喹的检测限定为 2500 mg/kg,喹乙醇的检测限定为 1000 mg/kg。

此外,农医发[2009]17 号检查方法适用范围中未提及黄连解毒散与白头翁散,检查方法同时规定如用于其他中兽药散剂检测时,需进行空白试验和检测限测定。本试验根据现有仪器条件得出喹乙醇、乙酰甲喹的检测限分别为 1000、2500mg/kg。

目前,国外主要是采用 LC-MS/MS 法对喹乙醇、乙酰甲喹代谢产物^[11-13]进行研究。国内主要是对中兽药散剂、兽药制剂和饲料中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹进行测定,多采用 HPLC 法^[9-10]。本文采用 HPLC-PDA 法对黄连解毒散、白头翁散,硫酸黏菌素可溶性粉及预混剂、烟酸诺氟沙星可溶性粉五种制剂进行检测,结果表明本方法专属性好,准确度较高,重现性较强。

本方法采用高效液相色谱法结合二极管阵列检测器,对稀释溶剂、检测波长,色谱条件等进行考察,结果表明该检测方法适用于五种兽用药物制剂中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的检查。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版[S].
- [2] 吴双民, 李 剑. 畜禽喹乙醇中毒[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(5): 50-52.
- [3] 耿 毅, 汪开毓. 动物喹乙醇中毒研究进展[J]. 畜牧业, 2000, 5: 31-32.
- [4] 苏志强. 浅谈肉鸡乙酰甲喹中毒[J]. 今日畜牧兽医, 2007, (6): 42.
- [5] 刘迎春, 高怀涛. 乙酰甲喹的合理应用[J]. 养禽与禽病防治, 2009, (3): 42-43.
- [6] 杜子明, 杨林洲, 李淑娟, 等. 鸡乙酰甲喹中毒的诊断和防治[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(1): 118-120.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 1868 号, 氟喹诺酮类制剂中非法添加乙酰甲喹、喹乙醇等化学药物检查方法[S].
- [8] 农医发[2009]17 号, 附件 3: 中兽药散剂中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹检查方法[S].
- [9] 周艳飞, 李 洽, 王亚芳. HPLC 法测定乙酰甲喹和喹乙醇的方法研究[J]. 饲料研究, 2013, (4): 67-69.
- [10] 吴 萍, 张 明, 许 彬. 白头翁散、苍术香连散中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹检查法-高效液相色谱法检测限的测定[J]. 现代畜牧兽医, 2011, 6: 51-53.
- [11] Sniegocki T, Ghylik-Sikorska M, Posyniak A. Determination of carbadox and olaquinox metabolites in swine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014, 944: 25-29.
- [12] Merou A, Kaklamanos G, Theodoridis G. Determination of Carbadox and metabolites of Carbadox and Olaquinox in muscle tissue using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012: 881-882.
- [13] Yanshen Li, Kaili Liu, Rose C. Beier. Simultaneous determination of mequinox, quinocetone, and their major metabolites in chicken and pork by UPLC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2014, 160 (10): 171-179.

(编辑:陈 希)