

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.07

HPLC - PDA 法测定兽药中非法添加的 喹乙醇、乙酰甲喹检查方法

董玲玲, 于晓辉, 杨 星, 马秋冉, 赵富华, 汪 霞*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-12-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0036-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立兽药中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的通用检查方法。以十八烷基键合硅胶为填充剂, 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 波长扫描范围为 200~400 nm, 柱温 30 °C, 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。结果显示, 喹乙醇、乙酰甲喹与其他物质峰分离良好; 喹乙醇和乙酰甲喹在 12 种兽药中的平均回收率分别为 96.6%~101.4% 和 98.0%~101.3%, *RSD* 均小于 1.4%; 喹乙醇和乙酰甲喹的检测限均为 1.0 g/kg(L)。该检查方法简便、准确、可靠, 可用于检查兽药中非法添加的喹乙醇和乙酰甲喹。

[关键词] 喹乙醇; 乙酰甲喹; 兽药; HPLC - PDA

Determination of Olaquinox and Mequinox Illegally Added in Veterinary Drugs by HPLC - PDA

DONG Ling - ling, YU Xiao - hui, Yang - Xi, MA Qiu - ran, ZHAO Fu - hua, WANG Xia*

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

Corresponding author: WANG Xia, E-mail: wangxia_0909@126.com

Abstract: A method for the determination of olaquinox and mequinox illegally added in twelve kinds of veterinary drug was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using gradient elution with 0.1% potassium dihydrogen phosphate and acetonitrile as the mobile phase. The extract wavelength was 365 nm. Peak purity test and spectrum similar test were help to determine the olaquinox and mequinox except the method of comparison between sample and reference. The mean recovery of olaquinox and mequinox were between 96.6%~101.4% and 98.0%~101.3% respectively, and *RSD* were less than 1.4%; The detection limits of olaquinox and mequinox were both 1.0 g/kg(L). In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the

作者简介: 董玲玲, 硕士研究生, 从事兽药检验工作。

通讯作者: 汪 霞。E-mail: wangxia_0909@126.com

determination of olaquinox and mequinox in veterinary drug.

Key words: olaquinox; mequinox; veterinary drug; HPLC - PDA

近年来,兽药中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的现象仍有发生,喹乙醇是一种抗菌促生长剂,乙酰甲喹是广谱抗菌药^[1],非法添加不仅扰乱了兽药市场,也为动物源性食品安全埋下隐患。针对发现的问题,以 12 种兽药制剂为基础,建立兽药中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的检查方法。现在兽药中喹乙醇、乙酰甲喹的法定检查方法有 4 个^[2-3],均为高效液相色谱法^[4-5]。此外还有文献报道的液相方法及液质联用方法^[6-8]。现有方法的适用范围有交叉,流动相条件各不相同,曾出现乙酰甲喹与标称物质完全共流出而导致假阴性的结果,差点发生误判。为确保方法科学合理有效,有必要将同种类非法添加物的检查方法进行整合优化。因此,本文建立了兽药中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的通用检查方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Waters 2695, PDA, Empower2 色谱工作站软件);分析天平(十万分之一);MiliQ 纯水机;磷酸二氢钾、乙腈为色谱纯。

1.2 试剂 对照品:喹乙醇(H0061407)、乙酰甲喹(H0111008)、恩诺沙星(H0081505)、乳酸环丙沙星(H0141706)、氧氟沙星(H0090912)、诺氟沙星(H0071305)、硫酸黏菌素(K0271305),所有对照品均来自中国兽医药品监察所;供试品(空白)包括白头翁散、黄连解毒散、止痢散、银翘散、健胃散、清热散、清瘟败毒散、肥猪散、恩诺沙星可溶性粉、乳酸环丙沙星注射液、硫酸黏菌素预混剂及硫酸黏菌素可溶性粉均为市售合格样品,不含喹乙醇和乙酰甲喹;非法添加供试品(模拟):取供试品(空白),按 2.5% 添加喹乙醇或乙酰甲喹,混匀。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,按表 1 进行梯度洗

脱;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 365 nm 波长处的色谱图。喹乙醇和乙酰甲喹峰间分离度应符合要求,并应与其他峰完全分离。

表 1 流动相梯度洗脱表

Tab 1 Mobile phase gradient elution table

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
20	90	10
20.01	80	20
30	80	20
30.01	90	10
35	90	10

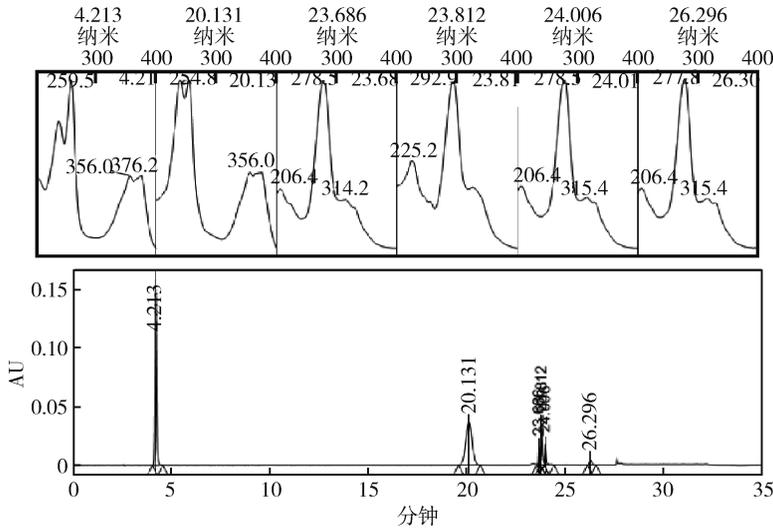
2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液和对照品溶液 取供试品 1.0 g(mL),置 50 mL 量瓶中,加 90% 乙腈溶液适量,超声处理 15 min 后,冷却至室温,用 90% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,过滤,作为供试品母液。取母液 1.0 mL,加 10% 乙腈溶液稀释至 10.0 mL,摇匀,作为供试品溶液。另取喹乙醇和乙酰甲喹对照品各约 25 mg,同法制备得对照品母液和对照品溶液。

2.2.2 系统适用性溶液 6 种对照品混合溶液:取喹乙醇、乙酰甲喹、氧氟沙星、诺氟沙星、乳酸环丙沙星和恩诺沙星 6 种对照品各约 25 mg,置同一 50 mL 量瓶中,照 2.2.1 项下对照品溶液配制方法制备。白头翁散阳性样品溶液:取白头翁散阳性添加样品照 2.2.1 项下供试品溶液配制方法制备。以上两种溶液作为系统适用性考察溶液。

2.2.3 供试品空白溶液 称取(量取)无非法添加的供试品 1.0 g(mL),照 2.2.1 项下操作制备成供试品空白溶液。

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(0.05 mg/mL)作为建立光谱数据库的溶液。



出峰顺序依次为啞乙醇、乙酰甲喹、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星

The order of peak outlet is Olaquinox, Mequindox, ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin

图 1 系统适用性色谱光谱图

Fig 1 Chromatogram of system suitability

2.3 峰纯度检查 对供试品溶液色谱图中啞乙醇和乙酰甲喹色谱峰进行峰纯度检查,结果显示 12 种兽药制剂中啞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,12 种兽药制剂中啞乙醇或乙酰甲喹的出峰处无其他干扰峰,方法可行。

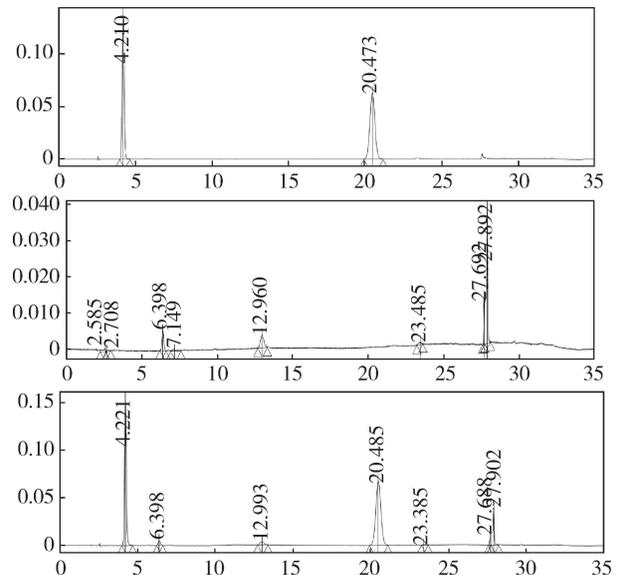
2.4 光谱相似度检查 对供试品溶液中啞乙醇、乙酰甲喹峰的光谱图与光谱库进行匹配,匹配角度均小于匹配阈值,表明非法添加供试品溶液中相应色谱峰的光谱与啞乙醇、乙酰甲喹对照品的光谱非常相似,可认为是同一物质。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 专属性检查溶液配制:取供试品空白母液和混合对照品母液各 1.0 mL,加 10% 乙腈溶液稀释至 10.0 mL,摇匀,即得供试品阳性添加溶液。以供试品空白溶液、溶剂空白和供试品阳性添加溶液作为专属性考察的溶液。

按拟定方法检查,对比 12 种供试品空白溶液与专属性检查溶液的色谱光谱图,结果显示供试品空白对于被测物无干扰。另外峰纯度检查结果也显示在拟定液相条件下,被测物啞乙醇、乙酰甲喹

均为单一物质峰。12 种兽药制剂中,白头翁散空白溶液在此检测条件下出峰最多,因此,以白头翁散专属性结果作为兽药制剂专属性考察结果的代表,结果见图 2。



A: 啞乙醇、乙酰甲喹混合标准品溶液;

B: 白头翁散空白溶液; C: 白头翁散阳性添加溶液

图 2 专属性考察结果图

Fig 2 Examination results of specificity

2.5.2 耐用性 耐用性考察的溶液配制:白头翁散空白溶液在此检查条件下出峰最多,因此以 6 种对照品混合溶液和白头翁散阳性样品溶液作为耐用性考察的溶液。配制过程同系统适用性溶液。

从柱温、流速、色谱柱三个方面考察方法的耐用性。调节柱温为 30 ± 2 °C,结果显示:喹乙醇保留时间受柱温影响较小,基本不变,乙酰甲喹随柱温升高,保留时间提前,与其它物质峰均能实现良好分离。调节流速值为 1.0 ± 0.1 mL/min,结果显示:随流动相流速的增大,喹乙醇、乙酰甲喹保留时间提前,不同流速下分离度均大于 1.5。选择 4 款不同品牌色谱柱,考察不同色谱柱对测定的影响,表 2 结果显示 4 种品牌色谱柱均可用于该检查,方法耐用性较好。

表 2 4 种色谱柱耐用性考察结果表

Tab 2 Durability results of the four types of columns

色谱柱型号 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	6 种对照品混合溶液		白头翁散阳性样品溶液	
	理论 塔板数	分离度*	理论 塔板数	分离度*
Kromasil C18	>10000	>10.0	>5500	>4.9
Aglient SB C18	>11000	>4.4	>10000	>13.0
Merck MN C18	>8000	>7.5	>7800	>12.9
Alltima C18	>11000	>5.6	>10000	>3.9

* 分离度指喹乙醇、乙酰甲喹与其它物质峰的分度

2.5.3 检测限 检测限溶液配制:取供试品空白母液 1.0 mL,分别精密加入喹乙醇对照品溶液(0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL)和乙酰甲喹对照品溶液(0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL),加 10% 乙腈溶液稀释至 10.0 mL,摇匀,配制成系列溶液。以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限,12 种兽药制剂中喹乙醇和乙酰甲喹检测限均为 1.0 g/kg(L),具体结果见图 3~14。

2.5.4 准确度 本方法以 12 种兽药制剂空白加被测物对照品做回收率试验来考察方法的准确度。称取(量取)无非法添加的供试品 1.0 g(1.0 mL),另取喹乙醇和乙酰甲喹对照品各约 25 mg,精密称定,置同一 50 mL 量瓶中,照 2.2.1 项下供试品溶

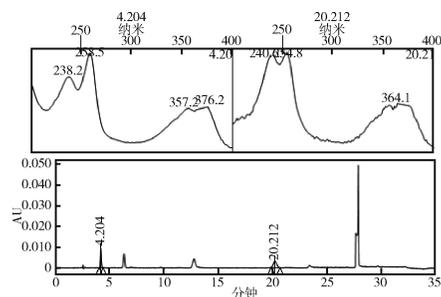


图 3 白头翁散检测限结果图

Fig 3 The detection limit of Baitouweng Powder

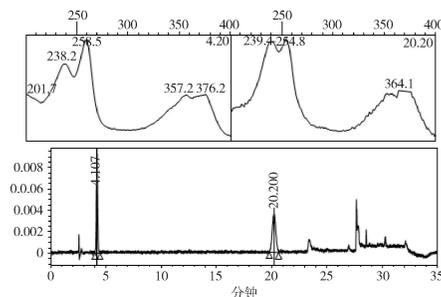


图 4 止痢散检测限测定结果图

Fig 4 The detection limit of Zhili Powder

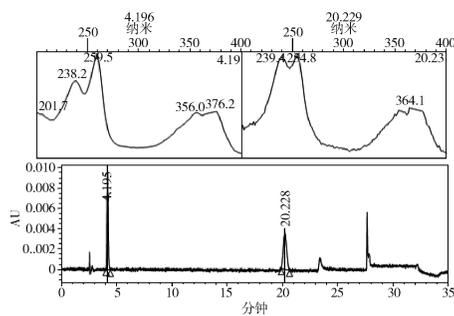


图 5 肥猪散检测限测定结果图

Fig 5 The detection limit of Feizhu Powder

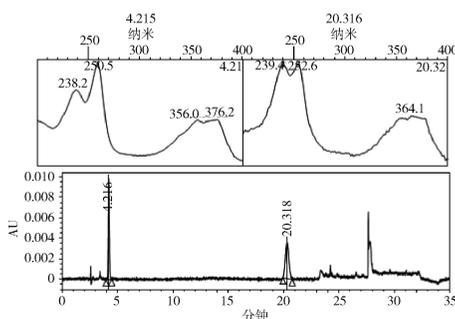


图 6 黄连解毒散检测限测定结果图

Fig 6 The detection limit of Huanglianjiadu Powder

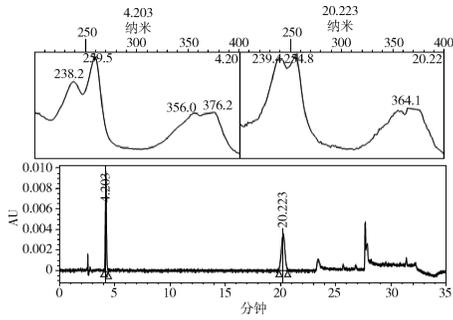


图 7 健胃散检测限测定结果图

Fig 7 The detection limit of Jianwei Powder

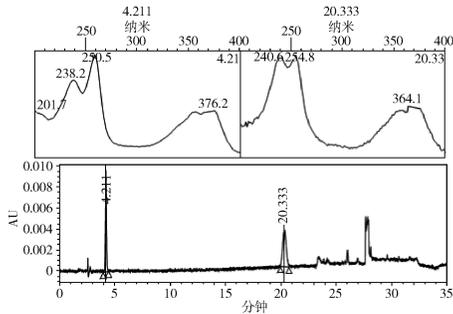


图 8 清热散检测限测定结果图

Fig 8 The detection limit of Qingre Powder

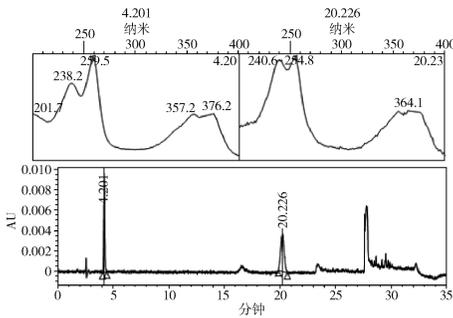


图 9 清瘟败毒散检测限测定结果图

Fig 9 The detection limit of Qingwenbaidu Powder

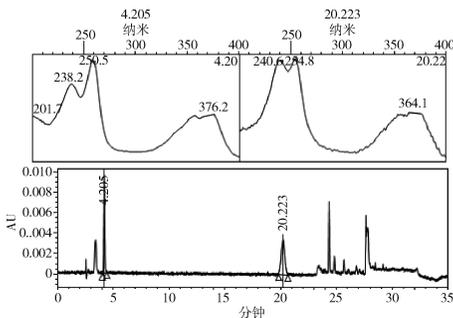


图 10 银翘散检测限测定结果图

Fig 10 The detection limit of Yinqiao Powder

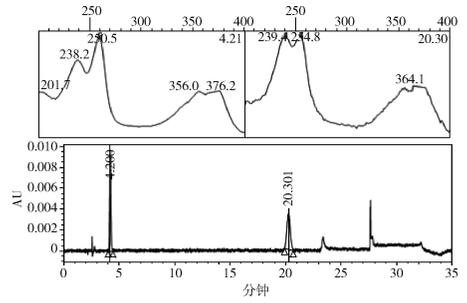


图 11 硫酸黏菌素预混剂检测限测定结果图

Fig 11 The detection limit of Colistin Sulfate Premix

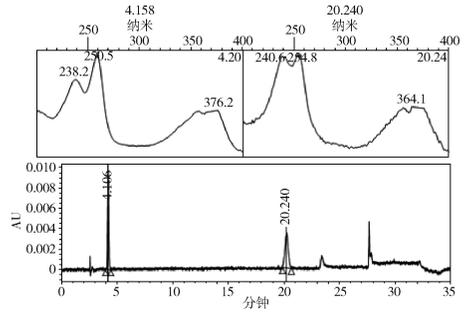


图 12 硫酸黏菌素可溶性粉检测限测定结果图

Fig 12 The detection limit of Colistin Sulfate

Soluble Powder

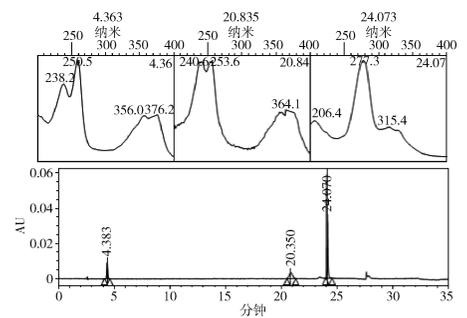


图 13 乳酸环丙沙星注射液检测限测定结果图

Fig 13 The detection limit of Ciprofloxacin

Lactate Injection

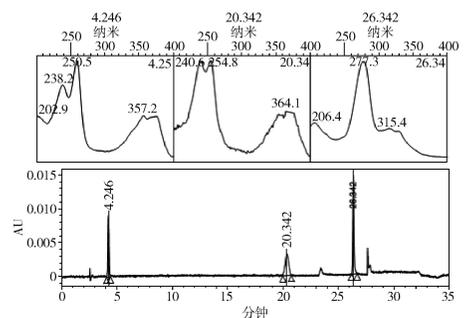


图 14 恩诺沙星可溶性粉检测限测定结果图

Fig 14 The detection limit of Soluble Powder of Enrofloxacin

液配制方法制备。平行配制 6 份。每份回收率试验溶液平行测定 2 次,按外标法计算回收率,结果见表 4。12 种兽药制剂中喹乙醇的平均回收率为

96.6% ~ 101.4%, 平均 *RSD* 为 0.2% ~ 1.3%; 乙酰甲喹的平均回收率为 98.0% ~ 101.3%, 平均 *RSD* 为 0.2% ~ 1.4%。

表 4 回收率结果表

Tab 4 Recovery results

兽药制剂	喹乙醇				乙酰甲喹			
	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
白头翁散	24.70	96.16	96.6	0.8	25.22	98.78	99.3	0.8
	25.10	96.31			24.12	98.26		
	25.16	97.61			25.2	100.04		
	24.81	96.04			25.13	100.11		
	24.52	95.90			25.04	98.75		
	25.38	97.39			24.98	99.94		
肥猪散	25.03	97.81	97.4	0.5	22.97	98.82	98.0	0.5
	25.23	97.51			24.85	97.71		
	25.53	96.55			25.18	98.00		
	24.38	97.12			23.97	97.77		
	24.66	97.32			24.09	97.65		
	25.20	97.99			24.65	98.29		
黄连解毒散	25.02	99.27	100.2	1.2	23.01	99.24	101.3	1.4
	26.04	102.27			24.12	102.35		
	26.10	99.62			24.18	100.83		
	24.18	99.49			24.26	103.03		
	24.37	101.03			24.45	101.91		
	24.66	99.32			25.32	100.41		
健胃散	24.99	98.05	97.6	0.5	24.45	98.17	98.2	0.3
	25.03	97.79			24.28	98.26		
	25.24	96.81			25.04	97.89		
	25.04	97.93			24.88	98.80		
	24.38	97.70			24.56	98.39		
	25.17	97.03			26.04	97.94		
清热散	25.79	98.88	99.8	0.9	25.08	99.46	99.9	0.4
	25.00	100.22			25.19	99.54		
	24.46	100.67			24.82	99.75		
	25.07	99.87			24.69	100.00		
	24.68	98.71			24.38	100.26		
	25.09	100.67			25.11	100.26		
清瘟败毒散	24.82	98.57	98.5	0.2	24.81	99.89	98.4	1.1
	25.04	98.46			25.21	98.39		
	24.73	98.29			25.07	97.42		
	24.79	98.55			25.48	97.83		
	25.14	98.78			25.22	97.26		
	24.76	98.14			24.65	99.47		
银翘散	24.91	99.27	99.1	1.0	24.43	98.52	98.5	1.2
	25.74	100.12			25.01	99.78		
	25.05	97.88			24.68	98.75		
	24.78	99.29			25.33	97.20		
	24.47	97.87			25.18	97.17		
	25.16	100.03			24.88	99.68		

续表

兽药制剂	喹乙醇				乙酰甲喹			
	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
止痢散	25.35	99.04	98.4	0.6	24.59	99.56	99.1	0.4
	25.72	97.45			25.18	98.91		
	24.30	98.41			25.25	99.43		
	24.38	98.77			25.02	99.30		
	24.30	97.86			24.27	98.84		
	24.82	98.90			24.63	98.72		
	25.55	100.00			22.97	99.48		
恩诺沙星 可溶性粉	24.73	100.75	100.0	0.8	24.85	99.25	99.2	0.2
	24.53	99.14			25.18	99.30		
	25.66	99.64			23.67	99.30		
	24.36	99.25			24.52	98.83		
	24.38	101.00			24.38	98.96		
	25.09	101.57			25.37	97.92		
环丙沙星 注射液	23.85	99.38	101.4	1.3	25.13	99.41	98.1	0.9
	24.88	102.11			25.07	96.92		
	24.20	103.14			25.92	98.48		
	23.06	100.35			25.99	97.66		
	24.33	101.93			25.03	98.16		
	25.33	99.99			24.94	99.77		
硫酸黏菌素 可溶性粉	23.54	99.96	99.6	1.1	24.15	100.40	99.7	1.0
	23.12	97.52			23.61	99.94		
	25.51	99.86			23.82	99.92		
	25.43	100.32			24.89	100.25		
	23.12	100.18			24.91	97.77		
硫酸黏菌素 预混剂	24.38	97.30	97.6	1.0	23.97	101.77	100.3	0.8
	25.66	96.76			25.82	100.38		
	24.38	97.30			24.38	99.56		
	24.85	96.68			25.07	99.78		
	26.01	99.02			24.57	100.07		
25.42	98.68	25.12	100.17					

3 讨论与结论

3.1 流动相的选择 在现有检测方法的基础上选择乙腈和 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液作为流动相的有机相和水相,同时为保证所有兽药制剂中强保留成分的完全洗脱,将洗脱条件改进为梯度洗脱。且经过考察发现:流动相 pH 值对检查的目标物喹乙醇和乙酰甲喹的分离没有影响,对二者的光谱图亦无影响,调节流动相 pH 值仅能改善喹诺酮类兽药制剂主成分的分离和峰形。因此,本检查方法不调节流动相的 pH 值。最终确立的流动相配制方法简便,完全能实现目标物的有效分离分析。

3.2 提取条件的选择 根据喹乙醇和乙酰甲喹的溶解性,同时考虑到尽量少引入兽药制剂中的组

分,参考中兽药散剂中非法添加乙酰甲喹、喹乙醇检查方法^[2],选择高浓度乙腈溶液作为提取溶剂。考察超声和磁力搅拌两种提取方式,结果显示超声的效果优于磁力搅拌。考察不同超声时间(5 min、10 min、15min、20 min)对喹乙醇、乙酰甲喹以及兽药制剂组分提取效率的影响,结果显示超声 15 min 时乙酰甲喹、喹乙醇的提取完全,且兽药制剂尤其是中兽药中的干扰相对较小。最终确定 90% 乙腈为提取溶剂,超声 15 min。而初始流动相为低比例有机相,提取溶剂与初始流动相的差别较大,容易引起喹乙醇色谱峰的分叉,因此,第二次稀释的溶液选择 10% 乙腈溶液,与初始流动相比例保持一致,有效解决了色谱峰分叉的问题。

3.3 提取波长的选择 喹乙醇最大吸收波长为 259.5 nm、357.2 nm 和 376.2 nm；乙酰甲喹最大吸收波长为 239.4 nm、254.8 nm 和 364.1 nm。虽然在高波长处，喹乙醇和乙酰甲喹的响应值低于低波长处，但考虑到在低波长处易受兽药制剂中其它组分的干扰，因此，兼顾喹乙醇和乙酰甲喹并参考现有农业部公告方法，选择 365 nm 作为提取波长。

本文建立了 HPLC - PDA 测定兽药制剂中非法添加喹乙醇和乙酰甲喹的通用检查方法，结合保留时间和紫外光谱特征两方面信息，以及峰纯度检查和光谱相似度检查结果，确保检查结果的准确可靠。同时，本方法是在现有众多方法基础上的优化，简化流动相的配制，解决质谱检查方法空白本底干扰的难题^[7-8]，同时扩大了检查的范围，真正实现兽药中非法添加喹乙醇和乙酰甲喹的高效、准确识别，为有力打击非法添加违法行为提供技术支持。

参考文献：

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二〇一五年版一部[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition, Volume I [S].
- [2] 农业农村部. 中华人民共和国农业部公告第 2448 号. 中兽药散剂中非法添加乙酰甲喹、喹乙醇检查方法[S].
Ministry of Agriculture and Rural Area. No. 2448. Bullerion of the Ministry of Agriculture and Rural Area of the People's Republic of China. Methods for the determination of illegal addition of acetylmethaquine and olaquinox in Chinese veterinary drug dispersion[S].
- [3] 农业农村部. 农业部公告第 2448 号. 硫酸黏菌素预混剂中非法添加乙酰甲喹检查方法[S].
Ministry of Agriculture and Rural Area. No. 2448. Bullerion of

the Ministry of Agriculture and Rural Area of the People's Republic of China. Method for the determination of illegal addition of acetyl methaquine in slime sulfate premix[S].

- [4] 农业农村部. 农业部公告第 2451 号. 兽药中非法添加乙酰甲喹和喹乙醇检查方法[S].
Ministry of Agriculture and Rural Area. No. 2448. Bullerion of the Ministry of Agriculture and Rural Area of the People's Republic of China. Methods for the illegal addition of acetylmethaquine and olaquinox in veterinary drugs[S].
- [5] 农业农村部. 农业部公告第 2448 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].
Ministry of Agriculture and Rural Area. No. 2448. Bullerion of the Ministry of Agriculture and Rural Area of the People's Republic of China. Method for the determination of illegal addition of acetyl methaquine and olaquinolamine in fluoroquinolone preparations and other chemical drugs[S].
- [6] 吴宁鹏, 王丽景, 李慧素, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(12): 43 - 49.
Wu N P, Wang L J, Li H S, *et al.* Determination of olaquinox and mequinox illegally added in five kinds of veterinary drug by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(12): 43 - 49.
- [7] 贾涛. 液质联用法测定饲料中卡巴氧乙酰甲喹喹烯酮和喹乙醇[J]. 饲料广角, 2015(23): 35 - 38.
Jia T. Determination of feed by liquid chromatography - mass spectrometry carbaxyl, mequinox, quinolone and mequinox [J]. Feed China, 2015(23): 35 - 38.
- [8] 章安源, 章安文, 牛华星, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测扶正解毒散剂中非法添加物喹乙醇、乙酰甲喹[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(10): 33 - 39.
Zhang A Y, Zhang A W, Niu H X, *et al.* Determination of olaquinox acetylmequinine illegally added in fuzheng detoxification powder by UPLC - MS/MS [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(10): 33 - 39.

(编辑:李文平)