

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.11.05

高效液相色谱 – 串联质谱法快速测定兽药制剂中喹诺酮类、磺胺类等 26 种药物

曹 秀, 刘秀娟, 冯慧慧, 杨亚琴, 余明霞, 董小海, 钟红舰*

(河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002)

[收稿日期] 2021-01-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 11-0029-11 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了兽药制剂中喹诺酮类、磺胺类、孔雀石绿、金刚烷胺等 26 种药物的高效液相色谱 – 串联质谱法的快速筛查与定量方法。样品经 0.2% 甲酸乙腈超声提取, 甲醇水 (1:1, V:V) 稀释 10000 倍后经 LC-MS/MS 测定。采用 C18 色谱柱分离, 以 5 mmol/L 甲酸 – 甲酸铵与甲醇 – 乙腈 (1:1, V:V) 为流动相, 梯度洗脱方式; 质谱采用电喷雾正离子模式离子化, 多反应监测模式 (MRM), 外标法标准曲线定量。26 种药物在 0.1 ~ 10.0 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r^2 均大于 0.99。该方法检出限为 0.01 mg/g, 定量限为 0.02 mg/g。兽药制剂中 26 种药物在 0.01 mg/g ~ 0.1 mg/g 添加范围内, 平均回收率为 70.0% ~ 101%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.9% ~ 8.8%。该方法简便快捷、准确度和灵敏度高, 能满足兽药制剂中常规添加药物及禁用药物进行快速筛查和准确定量。

[关键词] 兽药制剂; 喹诺酮类; 磺胺类; 孔雀石绿; 金刚烷胺; 高效液相色谱 – 串联质谱 (LC-MS/MS)

Rapid Determination of 26 Compounds in Veterinary Pharmaceutical Powder by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

CAO Xiu, LIU Xiu-juan, FENG Hui-hui, YANG Ya-qin, YU Ming-xia,

DONG Xiao-hai, ZHONG Hong-jian*

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Corresponding author: ZHONG Hong-jian, E-mail: 80456811@163.com

Abstract: A rapid screening and quantification method for 26 compounds such as quinolones, sulfonamides, malachite green and amantadine *et al*, in veterinary pharmaceutical powder was established by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. The samples were ultrasonically extracted with 0.2% formic acid – acetonitrile, and determined by LC-MS/MS after diluted with methanol – water (1:1, V:V) for 10000 times. The separation was performed on a C18 column using 5 mmol/L formic – ammonium formate and

作者简介: 曹 秀, 硕士, 主要从事农药残留与兽药残留检测。

通讯作者: 钟红舰。E-mail: 80456811@163.com

methanol – acetonitrile (1:1, V:V) as mobile phases in a gradient elution mode. The mass spectrometry was performed by electrospray ionization in positive ion mode, multiple reaction monitoring mode (MRM) and standard curve external standard method. The calibration curves of the 26 compounds were linear in the range of 0.1 ~ 10.0 ng/mL, with correlation coefficients more than 0.99. The limit of detections (LODs) were 0.01 mg/g, and the limit of quantification (LOQs) were 0.02 mg/g. The method was validated at spiked levels of 0.01, 0.02, 0.1 mg/g, and the overall recoveries were in a range of 70.0% ~ 101%, with relative standards deviations (RSDs) of 1.9% ~ 8.8%. The method was simple and convenient, efficient, accurate and sensitive, which would meet the requirements of screening and accurate quantification for the routine addition of drugs and banned drugs in veterinary pharmaceutical powder.

Key words: veterinary pharmaceutical powder; quinolones; sulfonamides; malachite green; amantadine; HPLC – MS/MS

目前,国内兽药市场竞争激烈,兽药制剂中非法添加化学药物的现象时有发生,添加药物种类多样,如禁用药物、人用药物;添加手段隐蔽,如同类药物代替标称药物,使得兽药检测与监管的难度越来越大^[1-2]。为进一步严格兽药生产与管理,农业农村部近年来连续发布了关于《兽药中非特定非法添加物质检查方法》的公告作为兽药非法添加的法定标准^[3-4]。兽药非特定非法添加物质的检查方法主要有显微镜检查法^[5]、薄层色谱法^[6]、高效液相色谱法^[7-10]、液相色谱串联质谱法^[11-14]等。显微镜检查法适用性范围窄;薄层色谱法是初筛的常见手段,但存在假阳性的风险。高效液相色谱配二极管阵列检测法(HPLC – PDA)应用范围广泛,适合于不同种类兽药制剂的非法药物添加检测,能准确确定性和定量。该方法日益成熟,农业农村部颁布诸多公告多为该方法。然而,HPLC – PDA在兽药非法添加物质检查中存在局限性,如无法鉴别PDA光谱图库以外的化合物;部分化合物在不同色谱条件下光谱图差异大,难溯源;无法检测无紫外吸收的化合物,造成漏筛等^[15]。液相色谱 – 串联质谱法由于其高特异性、高灵敏度的优点,已成为检测违禁添加药物的重要手段。该方法对添加物的检测无歧视,在合适的质谱条件下,可以获得其分子离子及碎片的信息,对推断未知物很有尤为重要,LC – MS/MS通过定性离子与定量离子能对未知物进行准确定量。近年来,LC – MS/MS技术在兽药制剂中氯霉素、硝基呋喃类药物、磺胺类药物、硝基

咪唑类药物及喹诺酮类药物的检测均有报道^[11-14]。

喹诺酮类及磺胺类药物是水产和畜牧养殖中常用的广谱抗菌药物,也是常见的非法添加药物;孔雀石绿、金刚烷胺与金刚乙胺属于禁用药物,这些药物在动物体内残留及代谢,会对人类健康造成一定伤害。兽药制剂基质种类多,如预混剂、可溶性粉剂、兽药散剂、注射液等,不能直接采用常规的饲料或动物源中兽药残留检测分析技术进行检测,因此建立一套有效的兽药制剂中多种兽药残留分析方法非常重要。

研究建立了兽药制剂中喹诺酮类、磺胺类、孔雀石绿、金刚烷胺等26种药物的高效液相色谱串联质谱法,该方法简单快捷,灵敏度高、结果准确可靠,可满足市场兽药制剂中多种药物的筛查需求,为兽药监管提供有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器 LC MS – 8050 高效液相色谱 – 串联质谱仪,配有电喷雾离子源及LabSolution LC MS数据处理系统(日本Shimadzu公司);快速混匀器SK – 1(金坛市中大仪器厂);高速冷冻离心机GL – 21B(上海安亭科学仪器厂);氮吹仪QGC – 36T(上海全岛公司)。

1.2 药品与试剂 氧氟沙星、诺氟沙星、甲磺酸培氟沙星、盐酸环丙沙星、洛美沙星、甲磺酸达氟沙星、恩诺沙星、盐酸沙拉沙星、氟甲喹、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲嘧

啉、磺胺氯哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺二甲异噁唑、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉、甲氧苄啶、孔雀石绿、隐色孔雀石绿、金刚烷胺、金刚乙胺, 26 种化合物标准物质均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度均大于 99.0%。甲醇、乙腈、甲酸, 色谱纯, 购自德国 Merck 公司。实验所用水为经 Milli-Q 净化系统(美国 Millipore 公司)制备的超纯水。试验所用兽药制剂样品均为市售合格样品, 分别为 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉、10% 恩诺沙星可溶性粉、25% 维生素 C 可溶性粉。

1.3 色谱及质谱条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱 CAPCELL PAK C₁₈ (100 mm × 2.0 mm, 3 μm); 柱温 40 ℃; 流动相 A 相为 5 mmol/L 甲酸-甲酸铵, B 相为甲醇-乙腈 (1:1, V:V); 线性梯度洗脱程序: 0~2 min, 90% A; 2~3 min, 85% A; 3~13 min, 85% A; 13~20 min, 15% A; 20~25 min, 15% A; 25.10 min 恢复初始比例, 90% A, 保持至 28 min; 流速为 0.200 mL/min; 进样体积为 1 μL。

1.3.2 质谱测定条件 电喷雾离子源, 正离子扫描; 多反应监测模式; 离子源接口电压 4.5 kV; 雾化气流速 3 L/min; 干燥气流速 10 L/min; 加热器流速 10 L/min; 脱溶剂管温度 250 ℃; 加热模块温度 400 ℃; 接口温度 300 ℃; 碰撞诱导电离气体压力 270 kPa, 各化合物质谱采集参数见表 1。

1.4 标准溶液的制备

1.4.1 单标标准储备液的制备 分别精密称取 5 mg(精确至 0.01 mg) 26 种化合物标准物质于各自的 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的单标标准储备溶液, 于 -20 ℃ 以下避光冷冻保存。

1.4.2 26 种化合物混合标准储备液的配制 分别精密称取 5 mg(精确至 0.01 mg) 26 种化合物标准物质于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的 26 种化合物混合标准储备溶液, 于 -20 ℃ 以下避光冷冻保存。

1.4.3 26 种化合物混合标准工作液的配制 准确移取 0.1 mL 26 种化合物混合标准储备液 (1 mg/mL) 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 10 μg/mL 的 26 种化合物混合标准工作液, 于 4 ℃ 避光冷藏保存。

1.4.4 26 种化合物混合标准曲线的配制 精密移取适量 26 种化合物 10 μg/mL 混合标准工作液, 用甲醇水 (1:1, V:V) 溶液稀释, 配制成质量浓度分别为 0.1、0.2、1、2、10 ng/mL 的混合标准工作曲线。

1.5 兽药制剂前处理 准确称取 1.00 g(精确至 0.01 g) 兽药制剂于 50 mL 塑料离心管中, 加 10 mL 0.2% 甲酸乙腈超声提取 10 min, 置于振荡器振荡 30 min, 8000 r/min 离心 5 min, 移取 2 mL 上清液于氮气吹干仪中浓缩至干, 用 1 mL 甲醇溶解残渣, 加 1 mL 0.2% 甲酸水溶液, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜得到预备液。为避免兽药原药对质谱的污染, 预备液经甲醇:水溶液 (1:1, V:V) 稀释 10000 倍后, 经 LC-MS/MS 测定。

1.6 检出限与定量限 选取 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉作为空白样品, 在空白样品添加适量的 26 种化合物混合标准储备液, 按 1.5 方法处理样品, 经 1.3 方法仪器条件进行测定。依据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N \geq 3$ 的浓度为方法检出限 (LOD), $S/N \geq 10$ 的浓度为方法定量限 (LOQ)。

1.7 精密度与准确度 采用标准添加法进行加标回收实验。分别在 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉样品中添加 LOD、LOQ 及 5 倍 LOQ 三个浓度水平的 26 种化合物混合标准储备液, 添加浓度见表 3。按 1.5 方法处理样品, 经 1.3 方法仪器条件进行测定。每个添加浓度进行 5 个样品的平行试验, 计算平均回收率及相对标准偏差。

1.8 实际样品的测定方法 选取市售合格的兽药制剂样品, 分别为 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉、10% 恩诺沙星可溶性粉、25% 维生素 C 可溶性粉按照 1.5 方法处理, 经 1.3 方法仪器条件进行测定。

表 1 26 种化合物质谱参数及保留时间

Tab 1 Retention time and main mass spectrometry parameters of 26 compounds							
序号	化合物	保留时间/min	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 电压/V	碰撞能量/eV	Q3 电压/V
1	磺胺嘧啶	5.43	251	156.05 *	-17	-15	-15
				92.1	-17	-27	-16
2	磺胺噻唑	6.60	255.95	92.05 *	-17	-26	-17
				155.95	-17	-15	-30
3	磺胺甲基嘧啶	7.93	264.8	91.90 *	-18	-30	-15
				171.8	-18	-17	-30
4	甲氧苄啶	9.35	290.85	260.95 *	-23	-25	-27
				229.95	-23	-24	-23
5	金刚烷胺	10.49	153.1	82.15	-12	-49	-17
				136.20 *	-14	-22	-13
6	磺胺甲噻二唑	10.70	270.9	78.1	-14	-44	-30
				156.00 *	-18	-15	-15
7	磺胺二甲嘧啶	11.22	278.75	92.1	-18	-29	-17
				92.10 *	-19	-31	-16
8	氧氟沙星	13.00	362.1	186.1	-19	-17	-18
				318.10 *	-19	-21	-21
9	诺氟沙星	13.33	320.05	261.1	-15	-29	-12
				301.95 *	-21	-21	-20
10	培氟沙星	13.95	334.05	231	-21	-39	-23
				315.95 *	-23	-21	-21
11	磺胺氯哒嗪	14.83	285.2	290	-23	-19	-29
				92.05 *	-20	-31	-18
12	环丙沙星	15.05	332.3	156	-20	-16	-15
				314.05 *	-23	-22	-21
13	磺胺间甲氧嘧啶	15.72	280.95	231.1	-23	-38	-22
				92.10 *	-18	-29	-17
14	磺胺甲基异恶唑	16.73	253.95	156	-18	-18	-30
				92.00 *	-17	-30	-16
15	洛美沙星	16.83	352.3	108.1	-17	-24	-10
				265.20 *	-26	-23	-16
16	达氟沙星	16.97	358	308.3	-26	-17	-19
				340.05 *	-26	-25	-16
17	恩诺沙星	17.27	360.05	283	-26	-24	-19
				342.00 *	-27	-23	-23
18	磺胺邻二甲氧嘧啶	17.44	311	316.15	-27	-20	-21
				156.00 *	-21	-18	-30
19	磺胺二甲异恶唑	17.76	268.05	91.9	-21	-30	-16
				156.10 *	-18	-14	-15
20	沙拉沙星	17.79	386.3	92.05	-18	-27	-17
				367.95 *	-27	-23	-25
21	金刚乙胺	18.91	181.3	298.95	-27	-27	-30
				164.10 *	-12	-19	-16
22	磺胺间二甲氧嘧啶	19.02	311	121.2	-12	-20	-16
				156.00 *	-22	-17	-29
23	磺胺喹噁啉	19.15	301	92	-22	-35	-22
				91.85 *	-20	-31	-16
24	氟甲唑	20.32	262.2	156	-20	-17	-15
				244.10 *	-18	-16	-15
25	孔雀石绿	21.10	329.1	202.1	-18	-28	-17
				313.00 *	-16	-37	-21
26	隐色孔雀石绿	25.45	331	208	-17	-37	-21
				239.00 *	-16	-31	-23
				316	-16	-22	-15

注：* 为定量离子

2 结果与分析

2.1 线性范围 按 1.4.4 方法配制的 26 种化合物混合标准工作曲线在 1.3 方法仪器条件下测定。26 种化合物混合标准溶液 (10 ng/mL) 总离子流图见图 1, 26 种化合物出峰顺序及保留时间见表 1, 26 种化合物分离度良好, 响应灵敏。以各化合物定量离子色谱峰面积 A 为纵坐标, 各化合物质量浓度 (ng/mL) 为横坐标, 绘制 26 种化合物的线性回归方程。结果表明: 26 种化合物在 0.1 ~ 10 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r^2 均大于 0.99, 26 种化合物的线性回归方程及相关系数见表 2。

2.2 检出限与定量限 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉作为空白样品经 1.5 方法处理后, 测定结果表明: 在相应的保留时间, 空白样品及试剂空白对 26 种目标化合物无干扰, 空白样品图谱及试剂空白图谱见图 2。依据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N \geq 3$ 的浓度为方法检出限, 该方法检出限为 0.01 mg/g, 特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N \geq 10$ 的浓度为方法定量限, 方法定量限为 0.02 mg/g。

2.3 精密度与准确度 依据 1.7 方法制备添加浓度分别为 0.01 mg/g、0.02 mg/g、0.1 mg/g 的阳性样品, 每个浓度水平下平行测定 5 次, 外标法标准曲线定量, 26 种化合物的平均回收率为 70.0% ~ 101%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.9% ~ 8.8%, 结果见表 3。图 3 为添加浓度为 0.1 mg/g 兽药制剂阳性样品图谱。

2.4 实际样品的测定 对市售的 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉、10% 恩诺沙星可溶性粉、25% 维生素 C 可溶性粉分别进行 HPLC - MS/MS 检测。结果表明: 20% 氟苯尼考粉、30% 氟苯尼考可溶性粉、25% 维生素 C 可溶性粉均未检出 26 种化合物。10% 恩诺沙星可溶性粉兽药制剂除标称“恩诺沙星”检出外, 其余 25 种化合物未检出。经测定, 10% 恩诺沙星可溶性粉兽药制剂中恩诺沙星含量为 105 mg/g (有效含量为 10.5%), 与产品标识含量 (10% 恩诺沙星) 一致。图 4 为 10% 恩诺沙星可溶性粉图谱。

表 2 26 种化合物线性范围、线性方程、相关系数、检出限及定量限

Tab 2 Regression equation, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of 26 compounds

序号	分析物	线性范围/(ng · mL ⁻¹)	线性方程	相关系数 r^2	检出限/mg · g ⁻¹	定量限/(mg · g ⁻¹)
1	磺胺嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 44133x + 6373.5$	0.9988	0.01	0.02
2	磺胺噻唑	0.1 ~ 10	$y = 30723x + 3388.2$	0.9986	0.01	0.02
3	磺胺甲基嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 34400x + 7828.8$	0.9982	0.01	0.02
4	甲氧苄啶	0.1 ~ 10	$y = 122714x - 5291.9$	0.9992	0.01	0.02
5	金刚烷胺	0.1 ~ 10	$y = 25613x + 5811.7$	0.9970	0.01	0.02
6	磺胺甲噻二唑	0.1 ~ 10	$y = 25442x + 8292$	0.9974	0.01	0.02
7	磺胺二甲嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 59611x + 8727.9$	0.9986	0.01	0.02
8	氧氟沙星	0.1 ~ 10	$y = 209419x - 962.81$	0.9992	0.01	0.02
9	诺氟沙星	0.1 ~ 10	$y = 216975x - 4902.8$	0.9999	0.01	0.02
10	培氟沙星	0.1 ~ 10	$y = 178456x + 29480$	0.9985	0.01	0.02
11	磺胺氯哒嗪	0.1 ~ 10	$y = 26240x + 7533$	0.9978	0.01	0.02
12	环丙沙星	0.1 ~ 10	$y = 275178x - 24536$	0.9996	0.01	0.02
13	磺胺间甲氧嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 22246x + 3502.7$	0.9986	0.01	0.02
14	磺胺甲基异恶唑	0.1 ~ 10	$y = 32381x + 6359.5$	0.9988	0.01	0.02
15	洛美沙星	0.1 ~ 10	$y = 81890x - 3277.7$	0.9999	0.01	0.02
16	达氟沙星	0.1 ~ 10	$y = 254577x + 32586$	0.9994	0.01	0.02
17	恩诺沙星	0.1 ~ 10	$y = 186101x - 10062$	0.9993	0.01	0.02
18	磺胺邻二甲氧嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 115652x - 5358.3$	0.9995	0.01	0.02
19	磺胺二甲异恶唑	0.1 ~ 10	$y = 114225x + 5087.1$	0.9992	0.01	0.02
20	沙拉沙星	0.1 ~ 10	$y = 111006x + 6769.2$	0.9980	0.01	0.02
21	金刚乙胺	0.1 ~ 10	$y = 156143x + 976.49$	0.9996	0.01	0.02
22	磺胺间二甲氧嘧啶	0.1 ~ 10	$y = 63216x + 8696.2$	0.9972	0.01	0.02
23	磺胺喹噁啉	0.1 ~ 10	$y = 37579x + 5119.4$	0.9994	0.01	0.02
24	氟甲唑	0.1 ~ 10	$y = 657077x - 6504.7$	0.9999	0.01	0.02
25	孔雀石绿	0.1 ~ 10	$y = 214158x - 14226$	0.9978	0.01	0.02
26	隐色孔雀石绿	0.1 ~ 10	$y = 896878x - 67182$	0.9996	0.01	0.02

表 3 26 种化合物在阳性样品中的回收率($n=5$)

Table3 Recoveries of 26 compounds in different positive samples ($n=5$)

序号	分析物	添加量/(mg·g ⁻¹)	20% 氟苯尼考粉阳性样品($n=5$)		20% 氟苯尼考可溶性粉阳性样品($n=5$)	
			平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
1	磺胺嘧啶	0.01	70.0	8.8	71.4	8.2
		0.02	73.1	5.7	73.0	6.8
		0.10	74.0	4.3	80.2	3.7
2	磺胺噻唑	0.01	70.0	8.6	71.9	5.3
		0.02	76.6	6.1	73.3	4.4
		0.10	78.3	6.7	78.2	2.5
3	磺胺甲基嘧啶	0.01	72.7	5.4	72.9	4.3
		0.02	72.5	6.1	72.9	3.0
		0.10	81.6	5.3	80.0	3.8
4	甲氧苄啶	0.01	87.1	5.4	89.5	5.5
		0.02	89.9	5.1	91.4	2.8
		0.10	90.5	5.2	94.0	2.2
5	金刚烷胺	0.01	71.5	8.8	75.9	6.2
		0.02	75.6	6.7	80.7	5.1
		0.10	79.7	6.7	83.5	2.9
6	磺胺甲噻二唑	0.01	70.1	7.9	77.4	6.7
		0.02	72.6	7.5	78.4	5.2
		0.10	81.2	6.2	85.2	4.3
7	磺胺二甲嘧啶	0.01	77.7	6.3	81.6	3.8
		0.02	85.5	5.2	83.5	3.6
		0.10	87.3	5.9	90.2	4.4
8	氧氟沙星	0.01	88.6	5.6	91.4	5.8
		0.02	90.2	5.7	92.0	2.3
		0.10	91.9	4.8	93.4	2.0
9	诺氟沙星	0.01	90.7	4.9	90.8	3.7
		0.02	91.9	5.5	91.2	2.8
		0.10	93.4	4.5	94.4	2.9
10	培氟沙星	0.01	82.7	4.6	87.1	3.3
		0.02	86.0	4.7	90.8	2.5
		0.10	85.6	2.2	91.9	3.5
11	磺胺氯哒嗪	0.01	70.1	4.4	72.4	8.8
		0.02	74.1	4.9	76.6	5.4
		0.10	78.7	4.2	80.6	6.2
12	环丙沙星	0.01	88.5	6.5	92.6	5.6
		0.02	91.4	5.0	93.8	5.9
		0.10	95.1	3.3	101.0	4.6
13	磺胺间甲氧嘧啶	0.01	73.8	5.5	82.2	4.6
		0.02	75.1	3.4	85.6	3.6
		0.10	79.0	3.2	88.9	3.2
14	磺胺甲基异恶唑	0.01	78.6	6.7	84.3	5.6
		0.02	82.4	4.3	85.1	5.0
		0.10	85.4	3.9	88.2	2.6
15	洛美沙星	0.01	86.9	2.6	92.1	8.2
		0.02	90.0	5.0	94.1	4.6
		0.10	91.1	5.0	97.6	2.1
16	达氟沙星	0.01	91.9	5.5	96.2	5.3
		0.02	94.3	4.9	97.2	4.4
		0.10	95.0	3.4	98.0	3.2
17	恩诺沙星	0.01	86.6	5.0	92.1	5.2
		0.02	88.8	4.3	95.2	5.0
		0.10	90.9	4.5	98.2	3.2

续表 3

序号	分析物	添加量/(mg·g ⁻¹)	20% 氟苯尼考粉阳性样品 (n = 5)		20% 氟苯尼考可溶性粉阳性样品 (n = 5)	
			平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
18	磺胺邻二甲氧嘧啶	0.01	80.2	6.4	88.6	6.2
		0.02	83.4	3.7	90.2	5.9
		0.10	87.5	4.0	91.4	3.3
19	磺胺二甲异恶唑	0.01	70.6	4.3	75.2	8.6
		0.02	73.4	4.3	77.6	5.6
		0.10	81.7	3.5	84.6	5.2
20	沙拉沙星	0.01	93.3	5.3	95.2	3.6
		0.02	92.4	3.2	96.2	3.2
		0.10	93.7	3.0	96.5	3.0
21	金刚乙胺	0.01	91.5	6.7	94.2	6.0
		0.02	93.8	3.9	95.2	3.2
		0.10	93.1	3.5	96.6	2.1
22	磺胺间二甲氧嘧啶	0.01	81.9	7.5	88.2	6.6
		0.02	88.7	5.8	89.6	5.2
		0.10	90.2	4.2	95.2	5.0
23	磺胺喹噁啉	0.01	70.9	5.6	75.2	4.6
		0.02	71.6	3.1	76.8	3.3
		0.10	76.7	3.7	80.2	3.8
24	氟甲喹	0.01	86.1	4.7	86.1	2.3
		0.02	88.6	3.9	88.6	2.2
		0.10	92.3	3.5	90.6	3.2
25	孔雀石绿	0.01	89.2	7.5	94.6	5.2
		0.02	90.5	3.8	95.2	4.8
		0.10	94.6	2.7	97.6	3.0
26	隐色孔雀石绿	0.01	91.3	5.0	96.2	4.4
		0.02	96.5	2.6	94.6	3.2
		0.10	96.4	1.9	97.1	2.8

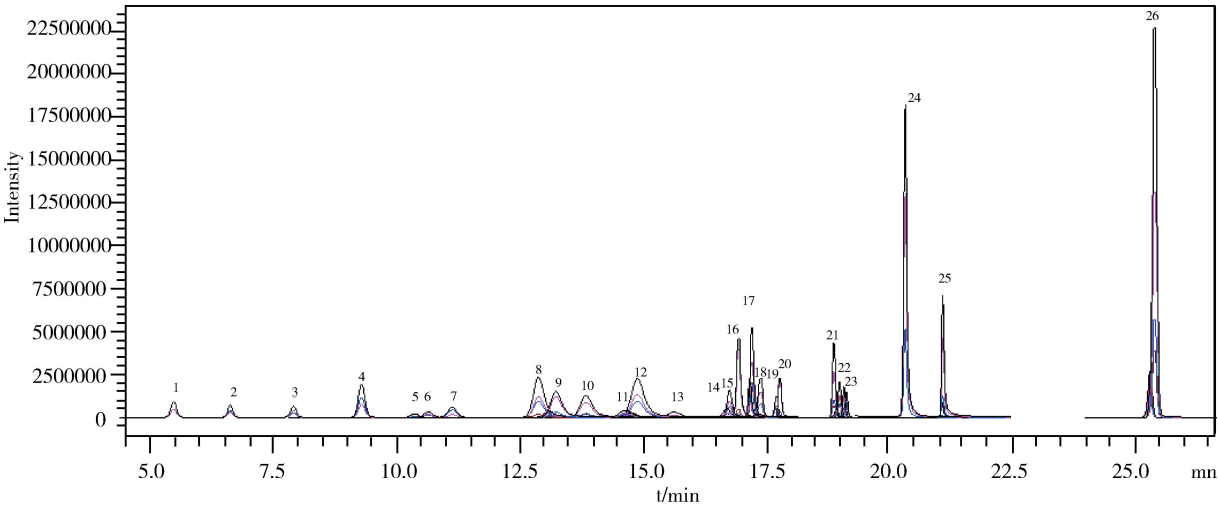


图 1 26 种化合物混合标准溶液 (10 ng/mL) 总离子流图

Fig 1 Total ion flow chromatograms of 26 compounds (10 ng/mL)

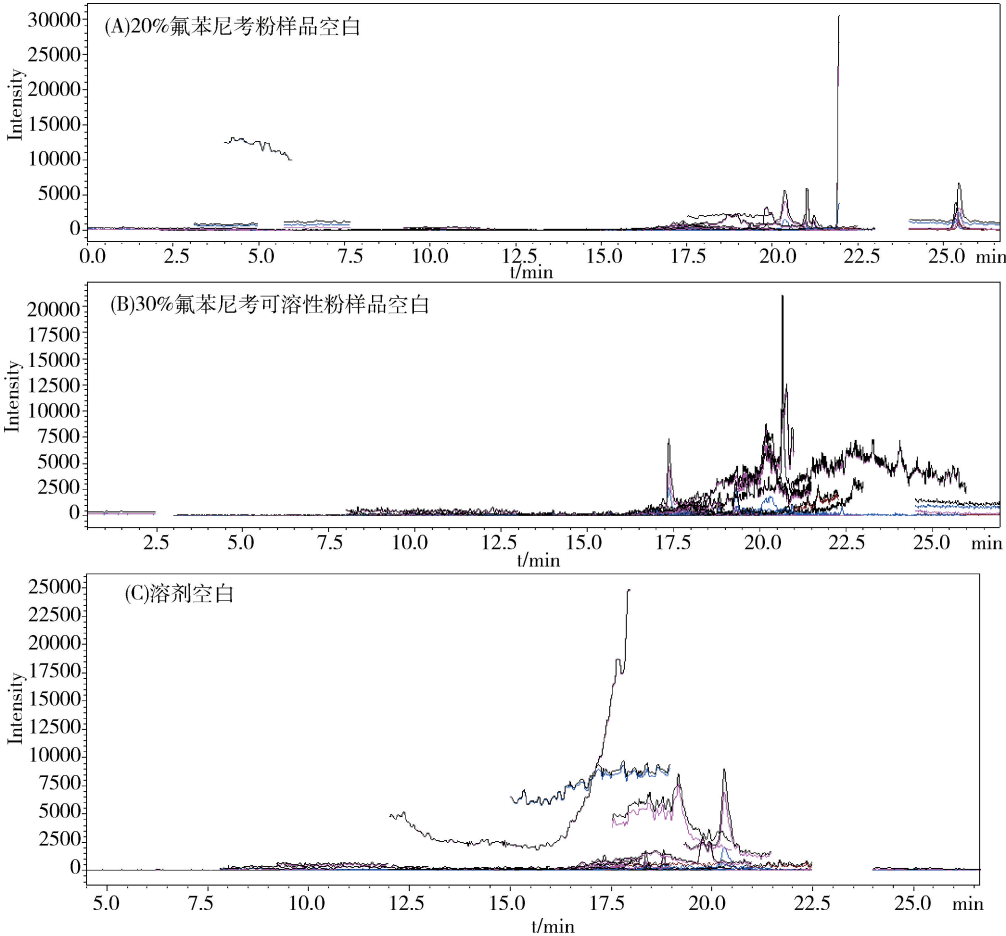


图 2 (A) 20% 氟苯尼考粉样品空白 (B) 30% 氟苯尼考可溶性粉样品空白 (C) 溶剂空白图谱

Fig 2 Chromatograms of blank samples (A) 20% florfenicol powder
(B) 30% florfenicol soluble powder) and (C) solvent blank

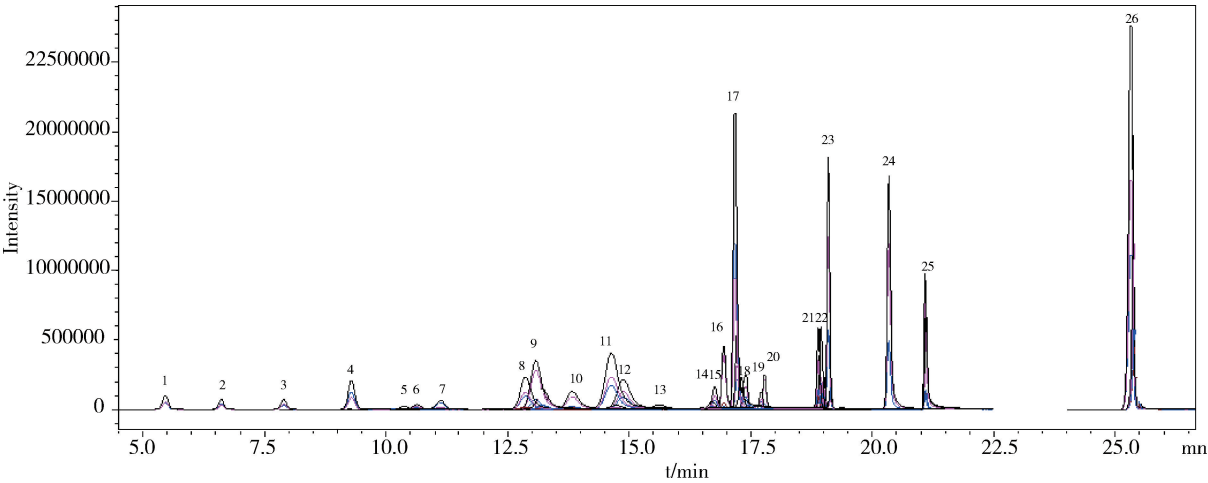


图 3 兽药制剂阳性样品 (添加量为 0.1 mg/g) 图谱

Fig 3 Chromatograms of spiked sample (0.1 mg/g)

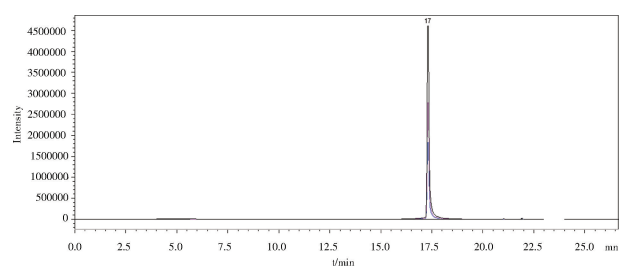


图 4 实际样品检测(10%恩诺沙星可溶性粉)图谱

Fig 4 Actual sample test
(10% enrofloxacin soluble powder)

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的优化 研究选用 CAPCELL PAK C18(100 mm×2.0 mm,3 μm)色谱柱对 26 种化合物进行分离,依据目标化合物的性质,流动相均选用酸性溶液,如 0.1% 甲酸水,乙酸铵溶液、甲酸-甲酸铵复配溶液。本研究考察了甲醇-乙腈(1:1, V:V)作为有机相时,选取 0.1% 甲酸水、5 mmol/L 乙酸铵及 5 mmol/L 甲酸-甲酸铵作为水相,采用梯度洗脱的方式对 26 种化合物进行分离。研究结果表明,当选用 5 mmol/L 甲酸-甲酸铵作为水相时,26 种化合物的分离度及峰形优于 0.1% 甲酸水和 5 mmol/L 乙酸铵溶液。

3.2 质谱条件的优化 方法采用不接分析柱的方式向质谱系统注入 1 μg/mL 的混合标准溶液,进样量为 1 μL。确定各化合物的最佳质谱条件,包括离子源温度、毛细管温度、加热模块温度、加热气流速、干燥气流速、氮气流速、选择特征离子对、Q1 和 Q3 的电压、碰撞能量等质谱分析条件。各化合物标准溶液经高效液相色谱流动相混合后注入 ESI 电离源,进行一级全扫描质谱分析。在正离子模式下对 [M+H]⁺ 进行子离子扫描,得到主要的子离子,并选择响应值高的子离子进行碰撞能量优化,最终确定了多反应监测的离子对及碰撞能量,建立的质谱参数见表 1。

3.3 提取溶剂的选择 兽药制剂基体复杂,含有大量的盐及表面活性剂。试验为避免兽药粉剂中有机盐份的干扰,选用甲醇、乙腈、0.2% 甲酸乙腈 3 种提取溶剂对 30% 氟苯尼考可溶性粉阳性样品

(添加浓度为 0.1 mg/g) 进行提取试验。选用甲醇和乙腈作为提取溶剂时,甲氧苄啶与磺胺类药物的平均回收率较高,为 80.2%~99.4%,喹诺酮类药物的平均回收率为 60.5%~80.2%,金刚烷胺与金刚乙胺的平均回收率为 58.9%~70.6%,孔雀石绿与隐色孔雀石绿的平均回收率为 66.2%~81.6%;选用 0.2% 甲酸乙腈作为提取溶剂时,甲氧苄啶与磺胺类药物的平均回收率为 78.2%~95.2%,喹诺酮类药物的平均回收率为 90.6%~101%,金刚烷胺、金刚乙胺、孔雀石绿与隐色孔雀石绿的平均回收率为 83.5%~97.6%。因此本试验选用 0.2% 甲酸乙腈作为兽药制剂的提取溶剂。

高效液相色谱-串联质谱法应用于兽药非特定非法添加物质的检查,其检出限能达到 1 μg/kg (十亿分之一),甚至更低。然而,同一车间同一流水线生产不同品种的兽药,尽管经过清场及清洗设备,还是会有少量的药物残留,一般这种残留是极低且不均匀。高效液相色谱-串联质谱法应用于兽药非特定非法添加物质的检查时更要注意选取的提取溶剂对兽药原药的提取效率,防止兽药原药对质谱造成污染,因此,经 LC-MS/MS 测定前用适当溶剂稀释后再上机测定。

目前,我国兽药非法添加物质检查的检测标准暂无判定限,仅要求给出检测方法的检出限或定量限。农业农村部颁布诸多公告多为高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-PDA),其检出限在 1 mg/g 左右。研究建立了高效液相色谱-串联质谱法同时快速测定兽药制剂中喹诺酮类、磺胺类、孔雀石绿及金刚烷胺 26 种药物的方法,且检出限低(0.01 mg/g)。26 种药物在较宽的浓度范围内线性关系良好,该方法操作简单、重复性好,方法灵敏度高,能对兽药粉剂中常规添加药物及禁用药物进行快速筛查和准确定量。研究为兽药制剂中多种非特定添加药物快速筛查和定量提供了参考,为行政监管部门提供了可靠的技术支撑。

参考文献:

[1] 孙芳,宋金鑫. 兽药制剂中非法添加化学药物现状及检测技

- 术研究进展[J]. 畜牧兽医科学(电子版),2020(04):60-61.
- Sun F, Song J L. Research Progress on Detection Technologies and the Current Situation for Chemical Drugs Illegally Adulterated in Veterinary Preparations[J]. *Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version)*, 2020(04):60-61.
- [2] 董玲玲, 于晓辉, 范强, 等. 兽药制剂中非法添加化学药物现状及检测技术研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(03):11-14.
- Dong L L, Yu X H, Fan Q, *et al.* Research Progress on Detection Technologies and the Current Situation for Chemical Drugs Illegally Adulterated in Veterinary Preparations[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2017, 51(03):11-14.
- [3] 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呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因检查方法等 34 个检查方法标准[S]. 2016.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 2448[S]. 2016
- [4] 中华人民共和国农业农村部公告第 289 号. 《兽药中非特定非法添加物质检查方法》等 3 项标准[S]. 2020.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 289[S]. 2020
- [5] 中兽药固体制剂中非法添加物质的检查方法——显微鉴别法[J]. 四川畜牧兽医, 2020, 47(07):39.
- Method for inspection of illegal additives in solid Chinese veterinary drug formulations - Microscopic identification method[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2020, 47(07):39.
- [6] 梁勇, 黄陈, 金礼琴, 等. 薄层色谱法和高效液相色谱法在中兽药质量控制中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2020, 41(04):97-100.
- Liang Y, Huang C, Jin L Q, *et al.* Application of TLC and HPLC Methods in Quality Control of Traditional Chinese Veterinary Medicines[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2020, 41(04):97-100.
- [7] 田晓玲. HPLC 法测定中兽药散剂中非法添加的 10 种磺胺类药物[J]. 现代畜牧兽医, 2018(07):16-19.
- Tian X L. Determination of sulfonamides in Traditional Chinese Medicine Powder by HPLC[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018(07):16-19.
- [8] 高婷, 李应超, 王亚芳, 等. 中兽药散剂中非法添加酰胺醇类药物的检测方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(09):49-56.
- Gao T, Li Y C, Wang Y F, *et al.* Study on the Detection Method of Illegal Addition of Amide-Alcohols in Chinese Veterinary Drug Powder[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(09):49-56.
- [9] 罗成江, 王彬, 陈晓林, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定乳酸环丙沙星可溶性粉中非法添加甲硝唑和替硝唑的研究[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(11):63-66.
- Luo C J, Wang B, Chen X L, *et al.* Determination of metronidazole and tinidazole illegally added in soluble ciprofloxacin lactate powder by high performance liquid chromatography-diode array detection[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(11):63-66.
- [10] 杨星, 龚旭昊, 马秋冉, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(01):31-36.
- Yang X, Gong X H, Ma Q R, *et al.* Determination of Pefloxacin and Lomefloxacin in Florfenicol Injection and Bupleurum Injection by HPLC-PDA[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020, 54(01):31-36.
- [11] 王晓利, 郭涛, 王珊珊, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定兽药粉剂中 18 种磺胺类违禁添加药物[J]. 分析测试学报, 2015, 34(01):115-119.
- Wang X L, Guo T, Wang S S, *et al.* Determination of 18 Sulfonamides in Veterinary Pharmaceutical Powder by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34(01):115-119.
- [12] 陆春波, 包爱情, 周芷锦, 等. UHPLC-Q/TOF MS 结合 HPLC-DAD 定性和定量分析硫酸黏菌素可溶性粉中的未知添加物[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(12):54-60.
- Lun C B, Bao A Q, Zhou Z J, *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of Unknown Additives in Colistin Sulphate Soluble Powder by UHPLC-Q/TOF MS and HPLC-DAD[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(12):54-60.
- [13] 侯轩, 陈勇, 陈凯, 等. HPLC-QTOF 和 HPLC-MS/MS 筛查与确证兽药中非法添加氧氟沙星等 15 种喹诺酮类药物[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(05):51-58.
- Hou X, Chen Y, Chen K, *et al.* Screening and confirmation of 15 illegally-added quinolones in veterinary drugs by High Performance Liquid Chromatography coupled with HPLC-QTOF and HPLC-MS/MS[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 52(05):51-58.
- [14] 马东杰, 艾连峰, 霍惠玲, 等. 通过式固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法快速测定中兽药制剂中 4 种硝基咪唑类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(09):2773-2778.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.11.06

硫酸头孢喹肟在安格斯牛体内 药物代谢动力学研究

刘雪松,陈亮,冯万字,张蕾,沈思思,兰世捷,李丹,苗艳,黄宝银,史同瑞*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院,黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2021-08-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 11-0039-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了探究硫酸头孢喹肟在安格斯牛体内的药物代谢动力学,对安格斯牛以 2 mg/kg 剂量分别进行静脉、肌肉、皮下注射后,于不同时间点颈静脉采血,应用 HPLC 测定血液中硫酸头孢喹肟的药物浓度,计算药动学参数。静脉、肌肉、皮下注射的消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$) 分别为 (2.05 ± 0.49) h、 (2.17 ± 0.51) h、 (2.37 ± 0.47) h,达峰时间 (T_{max}) 分别为 (0.75 ± 0.25) h、 (0.87 ± 0.25) h、 (1 ± 0.37) h,达峰浓度 (C_{max}) 分别为 (7.31 ± 1.98) $\mu\text{g/mL}$ 、 (5.34 ± 1.21) $\mu\text{g/mL}$ 、 (5.16 ± 1.29) $\mu\text{g/mL}$,药时曲线下面积 (AUC) 分别为 (24.72 ± 5.31) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、 (19.97 ± 3.11) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、 (20.51 ± 4.87) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$,平均留置时间 (MRT) 分别为 (2.83 ± 0.61) h、 (3.02 ± 0.71) h、 (3.26 ± 0.89) h,清除率 (CL) 分别为 (0.07 ± 0.02) L/h $\cdot$ kg、 (0.09 ± 0.03) L/h $\cdot$ kg、 (0.09 ± 0.04) L/h $\cdot$ kg,表观分布容积 (V_d) 分别为 (0.23 ± 0.06) L/kg、 (0.31 ± 0.08) L/kg、 (0.32 ± 0.09) L/kg。肌肉、皮下注射的绝对生物利用度 (F) 分别为 80.78%、82.96%。表明硫酸头孢喹肟在安格斯牛体内吸收快、消除慢,肌肉注射以及皮下注射的绝对利用度高。

[关键词] 硫酸头孢喹肟;高效液相色谱;药物代谢动力学;静脉注射;肌肉注射;皮下注射

基金项目: 黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项 (HNK2019CX16)

作者简介: 刘雪松,硕士研究生,主要从事兽药研究。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

(上接 38 页)

Ma D J, Ai L F, Huo H L, *et al.* Rapid and simultaneous determination of 4 nitroimidazoles in traditional Chinese veterinary medicine by pass through solid phase extraction purification and ultra performance liquid chromatography tandem mass Spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11 (09): 2773-2778.

器用于兽药非法添加物质检查的优劣性分析[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(04): 66-69.

Han N N, Xu Y, Yu L N, *et al.* Advantages and Disadvantages of HPLC-PDA Method Used in the Inspection of Illegal Adulteration in Veterinary Drugs [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(04): 66-69.

(编辑:陈希)

[15] 韩宁宁,徐嫒,于丽娜,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测