

HPLC-PDAD/MS 法检测中兽药散剂中 违规添加 2 种喹啉类氧化物的研究*

□刘自扬 万仁玲 高光 王雷 范强 孙雷 马玉叶

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

马长华** (北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要:目的:建立检测止痢散等 7 种中兽药散剂中违规添加喹乙醇、乙酰甲喹的 HPLC-PDAD 法,并用 MS 进行确证。方法:根据处方和临床治疗量配制阴性中兽药散剂和阳性供试品;用 90% 乙腈提取, HPLC-PDAD 法进行检测,并用 MS 进行确证。结果:检出限为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 喹乙醇和乙酰甲喹在止痢散中的平均回收率分别为 93.69% 和 101.22%。结论:该方法快速、简便、准确,可用于中兽药散剂中违规添加喹乙醇、乙酰甲喹的检测。

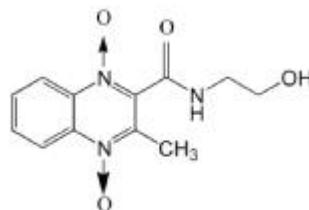
关键词:高效液相色谱法 二极管阵列检测器 质谱 喹乙醇 乙酰甲喹 中兽药散剂

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.05.028

目前,在中药制剂中违规添加化学物质的情况时有发生,在兽药领域则更为严重,自 2007 年以来,兽药检验系统多次在止痢散等中兽药散剂中发现了非法添加物,经实验初步判定为乙酰甲喹、喹乙醇等化学药物。这种行为不仅严重扰乱了市场秩序,而且若放任这种问题产品流通于市场,必然造成不知情用药或滥用药物,进而导致动物性产品残留超标,一方面会造成畜产品出口难,给养殖户造成严重的经济损失,另一方面会给人造成食源性细菌耐药性等的潜在危害。然而,由于对这类违法行为缺乏有效的监督检查手段,特别是缺乏对这类假药针对性的检测方法。但依据现行的国家标准检验,这些假药却还是合格的。因此,只有建立并执行针对这类违规添加化学物

质的假药的检测方法,才能在检测环节堵上这个监管漏洞,为执法部门严厉查处和打击这种违法行为提供技术依据,从而有效遏制在中药兽制剂中违规添加化学物质的造假行为。

本文选择了在中兽药散剂中的常见违规添加的 2 种喹啉类氧化物类药物(喹乙醇、乙酰甲喹)作为检测对象进行研究。本实验建立了检测止痢散等 7 种中兽药散剂中违规添加喹乙醇、乙酰甲喹的 HPLC-PDAD 法,并用 MS 进行确证。



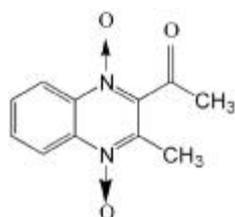
收稿日期: 2011-09-07

修回日期: 2011-10-08

* 中国兽医药品监察所所级科研项目:常用中兽药违规添加西药的检测研究,负责:高光。

** 通讯作者:马长华,教授,主要研究方向:中药质量控制及标准化,E-mail:machanghua60@sina.com。

喹乙醇^[1]Olaquinox, 又称喹酰胺醇, $C_{12}H_{13}N_3O_4$, 分子量: 263.25, 为广谱抗菌促生长剂, 主要用于猪的促生长和防治仔猪肠道感染等, 对大多数动物有明显的致畸作用, 对人也有潜在的三致性。



乙酰甲喹^[2]Mequinox, $C_{11}H_{10}N_2O_3$, 分子量: 218.21, 广谱抗菌药, 主用于密螺旋体所致猪痢疾及细菌性肠炎。使用剂量高于治疗量 3~5 倍或长期使时有毒性反应甚至死亡。

目前, 一些不法厂商出于降低成本和增强疗效的目的在清热解暑类和促生长类兽用中兽药散剂中违规添加喹乙醇和乙酰甲喹。

本研究根据用户反映情况, 确定止痢散等 7 种中兽药散剂为研究对象, 并根据处方配制阴性中兽药散剂, 根据喹乙醇、乙酰甲喹的临床治疗量和中兽药散剂的临床治疗量确定阳性样品的添加比例; 用 90% 乙腈作为提取溶剂, HPLC-*PDAD* 法进行检测, 并用 MS 进行确证。

一、仪器与试药

1. 仪器

高效液相色谱仪配二极管阵列检测器 Waters 2695-996, Empower2 工作站; 三重四极杆质谱仪 Waters Premier XE; 分析天平 XS205 型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 超声波处理器 KQ300 江苏昆山超声波仪器有限公司。

2. 试药

(1) 对照品。

喹乙醇对照品(含量: 99.5% 批号: H0061103)、乙酰甲喹对照品(含量: 99.8% 批号: H0110703), 均由中国兽药药品监察所提供。

(2) 供试品。

① 阴性对照散剂 止痢散、健胃散、清瘟败毒散、胃肠活、肥猪散、清热散和银翘散, 按处方^[2]自制。

② 阳性供试品 参考喹乙醇、乙酰甲喹与对应散剂的临床用量^[3-4], 确定添加比例, 并按此比例制成阳性样品。即添加比例=化药临床用量/中药临床用量。

经计算确定添加比例为 1%, 按照该比例在阴性对照散剂中分别添加喹乙醇、乙酰甲喹, 混匀, 即得。

(3) 试剂。

甲醇、乙腈、磷酸二氢钾均为色谱纯, 水为超纯水, 磷酸、三乙醇胺为分析纯。

二、方法和结果

1. 溶液制备

(1) 供试品溶液的制备。

取供试品 1.0 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 90% 乙腈 20.0 mL, 超声处理 15 min, 静置, 过滤, 取滤液 1.0 mL, 加流动相至 10.0 mL 定容摇匀, 作为供试品溶液。

(2) 对照品溶液的制备。

取喹乙醇、乙酰甲喹对照品适量, 加 90% 乙腈分别制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 加流动相稀释 10 倍, 作为对照品溶液。

2. 色谱条件

色谱柱: SHIMADZU VP-ODS C_{18} 4.6 mm×250 mm, 5 μ m; 流动相: 乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(3:7)(用三乙醇胺调 pH 值至 6.0); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μ L; 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。

3. 专属性试验

按照溶液制备和色谱条件项下的方法进行试验, 喹乙醇、乙酰甲喹和其他色谱峰能够很好的分离, 光谱图形状和最大吸收重现性好, 不同化合物光谱图差异明显, 专属性好(如图 1~16)。

4. 检出限的确定

将供试品分别配制成各含喹乙醇和乙酰甲喹为 0.1 g·kg⁻¹、0.05 g·kg⁻¹ 和 0.01 g·kg⁻¹, 并对其进行检测, 结果表明, 0.01 g·kg⁻¹ 时信噪比能达 20 左右, 但是中药中的成份对喹乙醇和乙酰甲喹检测有较大影响, 溶剂峰和中药中的成份峰大于喹乙醇峰和乙酰甲喹峰; 0.05 g·kg⁻¹ 时信噪比能达 100 左右, 中药中的成份对喹乙醇和乙酰甲喹检测相对于 0.01 g·kg⁻¹ 时影响较小, 喹乙醇峰和乙酰甲喹峰的峰大于溶剂峰和中药中的成份峰, 因此将检出限定为 0.05 g·kg⁻¹。

5. 耐用性试验

(1) 色谱柱比对。

用 YMC ODS C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)、Agilent ZORBAX ODS C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)、SHI-MADZU VP-ODS C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 做了对比

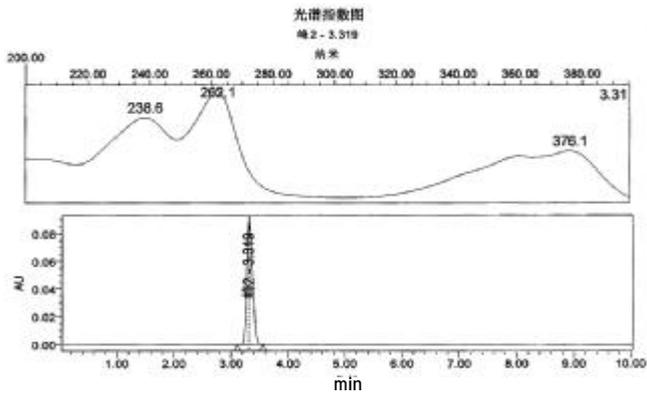


图1 喹乙醇对照品光谱图及色谱图

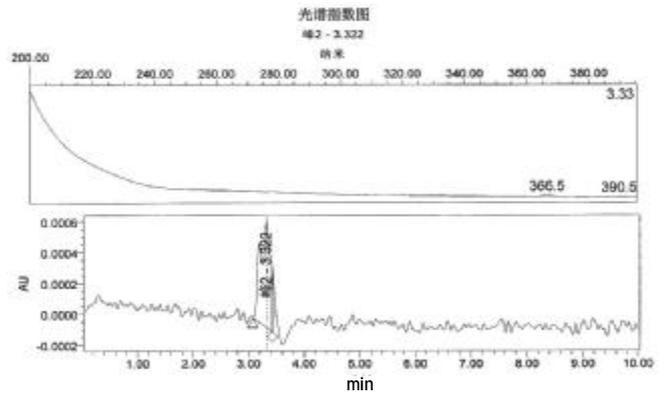


图5 止痢散阴性对照光谱图及色谱图

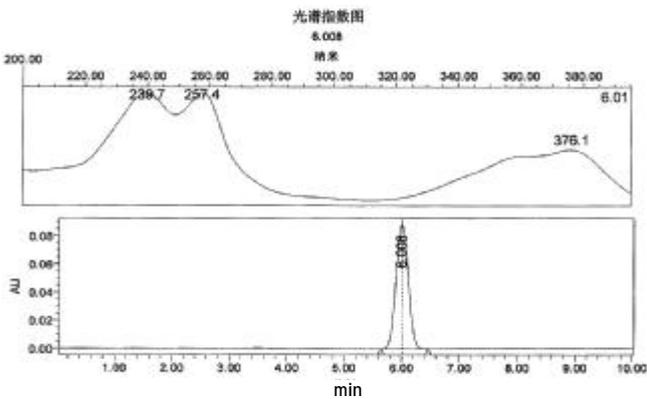


图2 乙酰甲喹对照品光谱图及色谱图

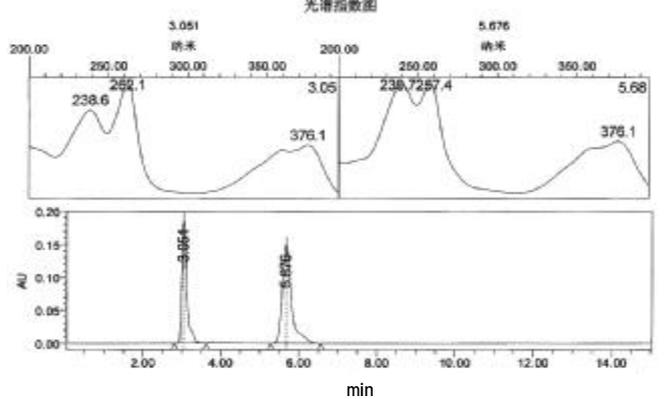


图6 止痢散阳性供试品光谱图及色谱图

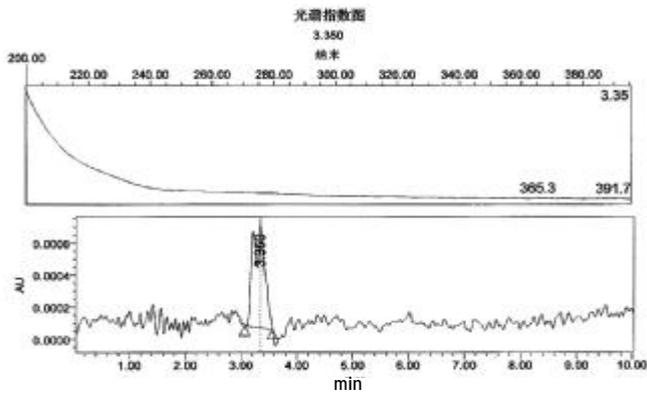


图3 健胃散阴性对照光谱图及色谱图

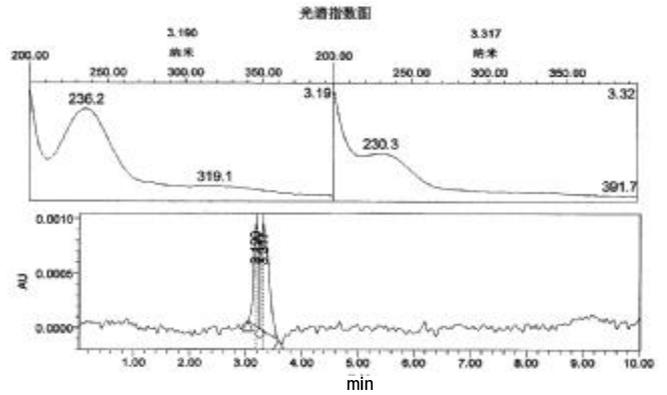


图7 清瘟败毒散阴性对照光谱图及色谱图

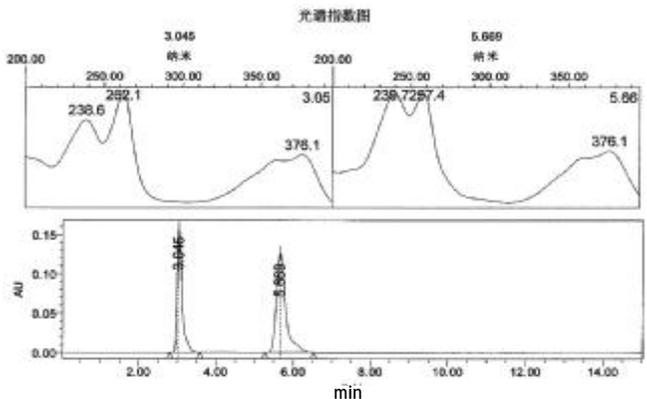


图4 健胃散阳性供试品光谱图及色谱图

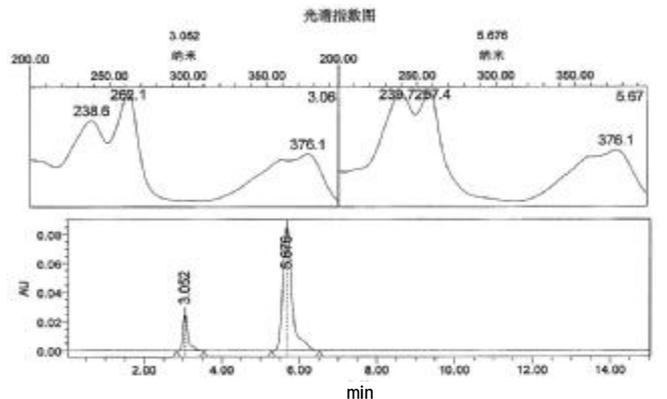


图8 清瘟败毒散阳性供试品光谱图及色谱图

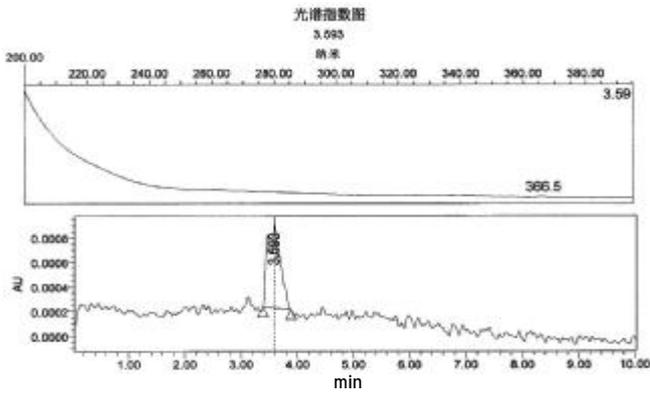


图9 银翘散阴性对照光谱图及色谱图

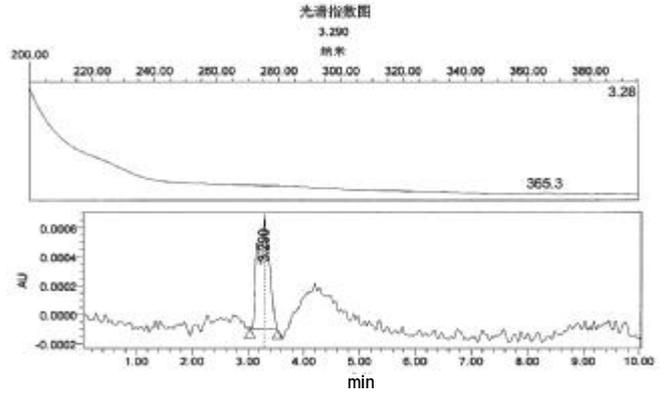


图13 清热散阴性对照光谱图及色谱图

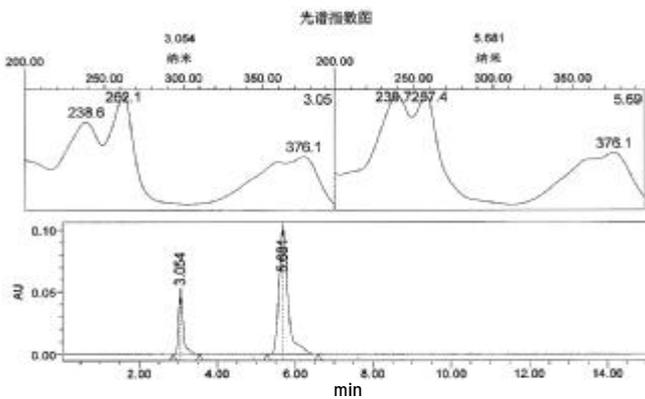


图10 银翘散阳性供试品光谱图及色谱图

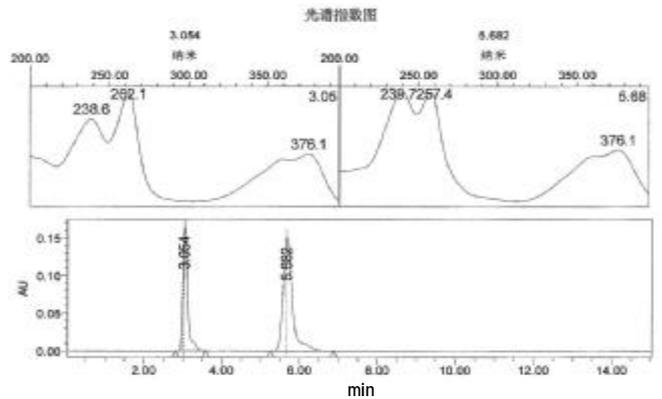


图14 清热散阳性供试品光谱图及色谱图

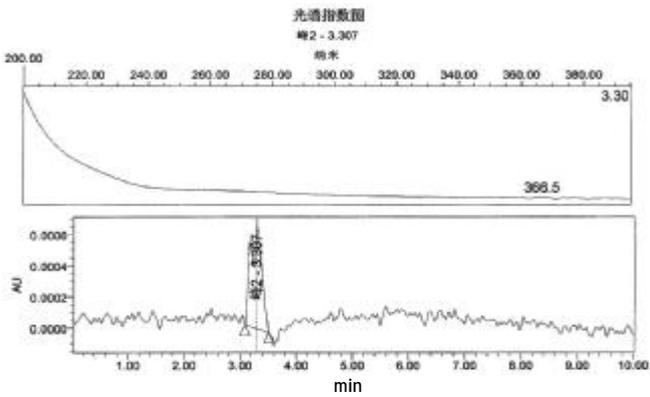


图11 肥猪散阴性对照光谱图及色谱图

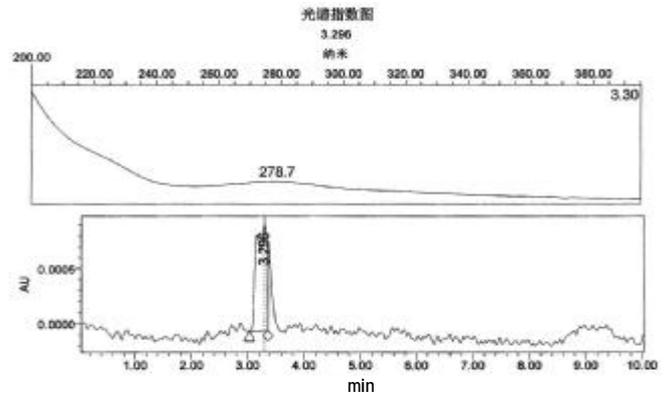


图15 胃肠活阴性对照光谱图及色谱图

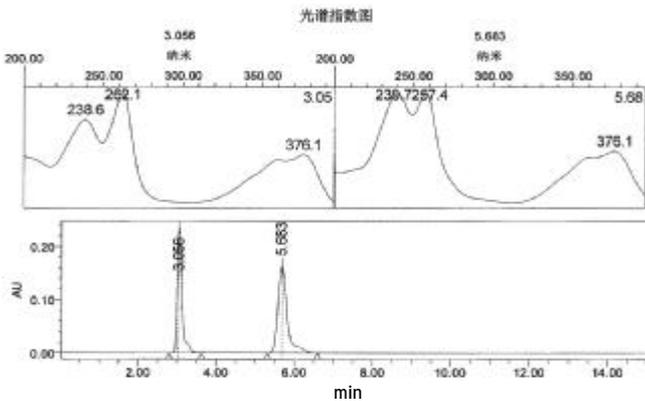


图12 肥猪散阳性供试品光谱图及色谱图

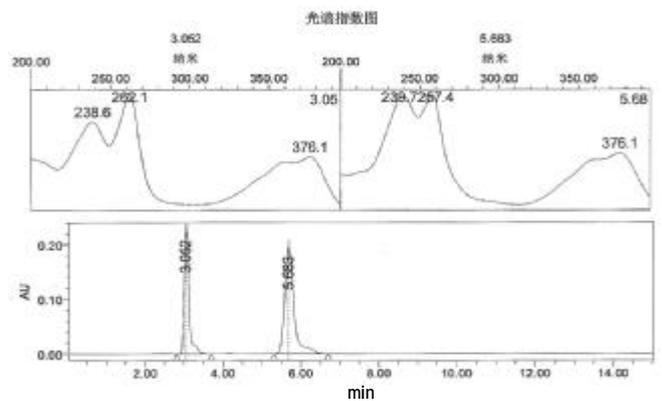


图16 胃肠活阳性供试品光谱图及色谱图

实验,测定结果:3根色谱柱除保留时间略有差异外其它无明显差异(相同的样品、相同型号的色谱仪、同一天进样)。

(2)流动相的改变。

①pH值的改变 将流动相的pH值分别配制成8.0、6.0、4.0,结果表明,pH值的改变对测定结果无明显影响,对峰形有一定影响。

②流动相配比的改变 除保留时间有所改变,其它无变化。

(3)流速的改变。

将流速定为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,结果除保留时间有所变化,其它无变化。

6. 二极管阵列检测器确证

(1)方法。

供试品测定为阳性后,用二极管阵列检测器进行确证,在报告中分别得到相应的光谱图和色谱图。用该检测器可得到色谱图中每个峰的光谱图,用于进一步的定性(见图1~16)。

(2)二极管阵列检测器光谱条件。

检测起始波长:200 nm;结束波长:400 nm。采集速率:1.0 光谱/秒;分辨率:1.2 nm。

(3)结果判定。

在相同试验条件下,供试品与相应的对照品具有相同的保留时间(偏差在5%以内)。

光谱图中,供试品应与对照品有相同的最大吸收波长,两者的偏差在 $\pm 2 \text{ nm}$ 之内。

供试品和对照品的相对吸光度大于10%时,两者的光谱图不应有明显差别。

7. 质谱确证

(1)方法。

取溶液制备项下的供试品溶液和对照品溶液,分别注入质谱仪,选用ESI电离方式、正离子模式测定其主峰。

(2)质谱条件。

毛细管电压:3.2 kv;锥孔电压:30 v;雾化气流速: $650 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$;反吹气流速: $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

(3)结果(见表1,图17~20)。

8. 回收率测定

(1)测定方法。

称取阴性散剂(止痛散)约1.25 g,置50 mL具塞锥形瓶中,分别精密称取喹乙醇、乙酰甲喹对照品10 mg、12.5 mg、15 mg,分别添加到锥形瓶中,精密加入

90%乙腈20 mL,密塞,称定重量,超声处理15 min,静置至室温,称定重量用90%乙腈补足损失重量,摇匀,过滤,精密量取续滤液1 mL,置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。分别取喹乙醇、乙酰甲喹对照品12.5 mg,精密称定,置25 mL量瓶中,加90%乙腈适量,超声使溶解,静置至室温,加90%乙腈稀释至刻度,摇匀,同法稀释10倍,作为对照溶液^[1]。

(2)结果(见表2)。

三、讨论

1. 流动相的选择

喹乙醇、乙酰甲喹在兽药质量标准中的质量控制方法主要为紫外分光光度法,专属性不强且中药

表1 质谱结果

名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量	氦气压力
喹乙醇	264.3	246.0、230.1、219.1、176.9	25ev	$3.7 \times 10^{-3} \text{ mbar}$
乙酰甲喹	219.1	142.7、159.8、184.8	25ev	$3.7 \times 10^{-3} \text{ mbar}$

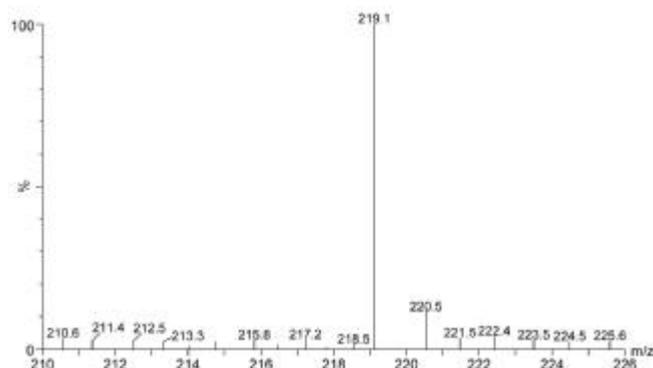


图17 喹乙醇分子离子质谱图

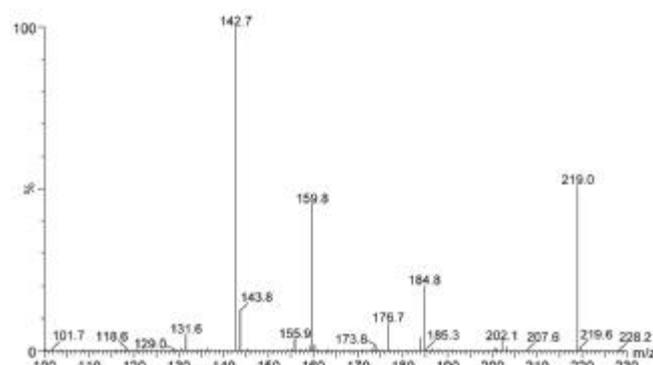


图18 喹乙醇碎片离子质谱图

组分的干扰较大,不适于检测中兽药散剂中违规添加的喹乙醇、乙酰甲喹。故只能参考食品等其他领域检测的方法^[7-8],但因该类物质在外国进出口检验中均不控制(特别是乙酰甲喹),故可参考的方法极为有限,经过摸索比较,确定最佳流动相为:乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(3:7)(用三乙醇胺调pH值至6.0)。

2. 提取时间的确定

供试品的超声提取时间以15 min为宜,提取时间过短影响回收率,而随着提取时间延长则从兽用中兽药散剂中萃取出的中药组分增多,增加干扰峰,影响测定。

3. 提取溶剂的选择

根据中药、喹乙醇和乙酰甲喹的性质对提取溶

剂进行筛选。分别用甲醇、乙腈、90%乙腈对7种兽用中兽药散剂进行提取,采用高效液相法进行测定。结果表明,乙腈和90%乙腈提取后中药造成干扰较小,但由于喹乙醇不易在乙腈中溶解,故选择90%乙腈为提取溶剂。

4. 检测波长的选择

在选择检测波长时,应符合两个基本要求,一是中药组分响应值尽可能低,二是喹乙醇和乙酰甲喹的响应值尽可能高。经实验,选择365 nm为检测波长。

5. 判定条件的确定

经反复实验,发现二极管阵列检测器对同一物质(吸收峰)扫描出的光谱图随被测物质的浓度和测定条件不同而不同,特别是被测物质浓度明显低于检出限时,扫描出的光谱图会失真,参考相关文献^[9]后,确定了判定条件。

6. 检测方法的选择

由于违规添加喹乙醇、乙酰甲喹的目的是增强疗效和降低成本,故实际添加的比例较高(约1%),否则达不到目的。因此,检测供试品有无违规添加,使用常量分析方法即可,即日常检测使用HPLC-PDAD方法,MS法仅是增加一种确证手段,在必要时使用。

此外,止痢散等7种兽用中兽药散剂阴性空白试验(见图10~16)结果表明,各散剂的中药组分均不影响检出喹乙醇、乙酰甲喹,故回收率试验仅以止痢散为例测定喹乙醇、乙酰甲喹的回收率。

参考文献

- 1 中国兽药典委员会编. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版一部. 北京:中国农业出版社,2010.
- 2 中国兽药典委员会编. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版二部. 北京:中国农业出版社,2010.
- 3 中国兽药典委员会编. 中华人民共和国兽药规范一九九二年版一部. 北京:中国农业出版社,1994.
- 4 中国兽药典委员会编. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南化学药品卷. 北京:中国农业出版社,2011.
- 5 中国兽药典委员会编. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南中药卷. 北京:中国农业出版社,2011.

- 6 中华人民共和国广东出入境检验检疫局. 进出口食品中农兽药残留实用检测方法. 北京:中国标准出版社,2004.

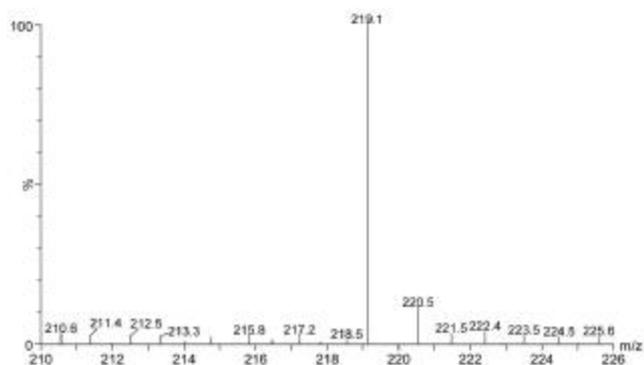


图19 乙酰甲喹分子离子质谱图

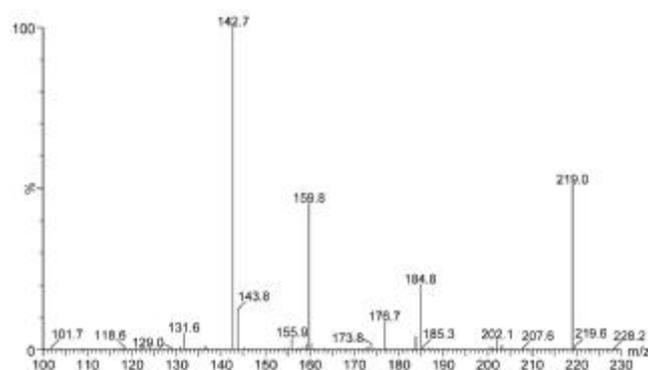


图20 乙酰甲喹碎片离子质谱图

表2 回收率测定结果

	80%			100%			120%			均值	RSD
喹乙醇(%)	92.52	93.75	93.99	94.22	95.35	94.28	92.60	92.80	93.67	93.69	1.0
乙酰甲喹(%)	101.19	100.20	101.88	100.63	103.82	99.94	100.30	101.42	101.64	101.22	1.2

- 7 中华人民共和国国家进出口商检局. SN 0197-93 《出口肉中噻乙醇残留量检验方法》中国标准出版社, 1993.
- 8 王炼, 杨元, 高玲, 等. 动物性食品中 11 种兽药残留量的高效液相色谱(HPLC)法测定. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3):276-278.

Determination of Olaquinox and Mequinox Illegally Adulterated into Seven Chinese Materia Medica Powders for Animals by HPLC-PDAD/MS

Liu Ziyang¹, Wan Renling¹, Gao Guang¹, Wang Lei¹, Fan Qiang¹, Sun Lei¹, Ma Yuye¹, Ma Changhua²

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: The study was aimed to establish a HPLC-PDAD method for determination of olaquinox and mequinox illegally adulterated into seven Chinese materia medica powders for animals. Powders and samples were prepared on the basis of prescriptions and dosage of the Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Samples were extracted with 90% acetonitrile, determined by HPLC-PDAD, and then identified by MS. The result showed that the limit of detection of olaquinox and mequinox was 0.05 g/kg. The mean recovery of olaquinox in the Zhili powder was 93.7%. The mean recovery of mequinox in the Zhili powder was 101.2%. It concluded that the method is rapid, simple and accurate. It can be used in the determination of olaquinox and mequinox illegally adulterated into the Chinese materia medica powders for animals.

Keywords: HPLC, PDAD, MS, olaquinox, mequinox, Chinese materia medica powder for animals

(责任编辑:李沙沙, 责任译审:王 晶)