

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.09.08

中兽药散剂中非法添加酰胺醇类药物的 检测方法研究

高 婷,李应超*,王亚芳,张连彦,张小飞,钟昆芮

(北京市兽药监察所,北京 102629)

[收稿日期] 2019-06-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 09-0049-08 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 建立了高效液相色谱测定中兽药散剂中甲砒霉素、氟苯尼考、氯霉素 3 种非法添加药物的方法。采用 Waters Atlantis T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇-乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 224 和 278 nm。该方法选取 4 种常见中药散剂:健胃散、止痢散、球虫散、胃肠活。经验证,甲砒霉素的检测限为 3 g/kg、氟苯尼考及氯霉素的检测限均为 4 g/kg,对照溶液的线性范围为 10~500 μg/mL,峰面积的相对标准偏差分别为 0.11%、0.11%、0.13%。按外标法计算其回收率,三种药物的回收率均在 98.0%~103.0%,变异系数均在 0.6%~1.6%。与传统的标准检测方法相比,研究最终完成了几种中兽药制剂中同时检测三种酰胺醇类药物,突破了原有标准中一种药物的检测方法,提高了检测工作效率,同时该方法具有较好的灵敏度、准确度和稳定性,能够满足对三种药物常规检测的要求。在实际工作中,通过对不同类别固体兽药制剂进行实验探索验证,得出该方法具有很好的适用性,为相关检测单位的检测工作提供了一定的技术支持,提高违法添加的检出率。

[关键词] 中兽药散剂;酰胺醇类;非法添加;高效液相色谱

Study on the Detection Method of Illegal Addition of Amide - Alcohols in Chinese Veterinary Drug Powder

GAO Ting, LI Ying - chao*, WANG Ya - fang, ZHANG Lian - yan,
ZHANG Xiao - fei, ZHONG Kun - rui

(Beijing Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 102629, China)

Corresponding author: LI Ying - chao, E - mail: 343657950@qq.com

Abstract: A method for the determination of Thiamphenicol, Florfenicol and Chloramphenicol in the Chinese veterinary drug powders by HPLC was established. Waters Atlantis T3 column (4.6 mm x 250 mm, 5 μm) was used in this method with a methanol - acetonitrile - water mobile phase, gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min

基金项目: 高 婷,硕士,兽医师,从事兽药中非法添加物的筛查及兽药检测新方法的研究应用。

作者简介: 李应超。E - mail:343657950@qq.com

and detection wavelengths of 224 and 278 nm. Four kinds of common Chinese medicine powders was selected: Jianwei Powder, Zhili Powder, Coccidial Powder and Gastrointestinal Activity. It has been verified that the detected limitation of Thiamphenicol is 3 g/kg, Florfenicol and Chloramphenicol is 4 g/kg. The linear range of the contrastive solution is 10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$, and the relative standard deviations of peak areas were 0.11%, 0.11% and 0.13%, respectively. The recoveries of the three drugs were all in the range of 98.0% ~ 103.0% according to the external standard method, and the coefficients of variation were all in the range of 0.6% ~ 1.6%. Compared with the traditional standard detection methods, this study finally completed the simultaneous detection of three amide alcohol drugs in several Chinese veterinary drug preparations, which broke the detection method of one drug in the original standard and improved the efficiency of detection work. The method has good sensitivity, accuracy and stability, which can adapt the requirements for routine detection of three drugs. In the actual work, it is concluded that the method has good applicability through experimental exploration and verification of different types of solid veterinary drug preparations. The method provided certain technical support for the detection work of related testing units and improved the detection rate of illegal addition.

Key words: Chinese veterinary medicine powder; amide alcohol; illegal addition, HPLC

酰胺醇类药物,主要有氯霉素、甲矾霉素及氟苯尼考,其作为一种抑菌性广谱抗生素,作用是抗感染,可作用于细菌核糖核蛋白体的 50S 亚基,而阻挠蛋白质的合成^[1]。由于其价格低廉,可大量生产,因此有些不法商家将酰胺醇类药物加入绿色、安全的中兽药散剂中,以提高药物抗菌作用。添加的化学药物与中药的相互作用既有可能减弱疗效,又有可能对动物产生新毒副作用^[2-3]。非法添加酰胺醇类药物导致畜禽产品中药物残留,对人的造血系统、消化系统具有严重的毒性反应,有可能引发人的再生障碍性贫血^[4-5],因此急需建立一种稳定的、可靠的方法监测中兽药散剂中酰胺醇类药物的非法添加现象。

目前,中兽药制剂中非法添加化学药物分析检测的技术手段主要有显微鉴别^[6]、薄层色谱分析^[7]、高效液相色谱^[8-9]、液质联用技术^[10]等。显微鉴别方法能够实现快速检测,但该方法只能进行初步定性;薄层色谱分析也是起到初筛的作用,存在假阳性的风险;液质联用技术一般不作为主要分析手段用于常量分析。高效液相色谱以分离性能高、分析速度快,通过保留时间及紫外图谱双重定性,减小了假阳性的可能性,因此,高效液相色谱不仅是兽药检验的常用分析方法,也是检查中兽药制

剂中非法添加化学药物的最主要的分析手段。

实验在上述文献的基础上,结合国家标准,对中兽药散剂中非法添加酰胺醇类药物进行研究,以满足检测需要。试样经 40% 甲醇溶解、离心、定容,最后经高效液相色谱二极管阵列检测器检测。本方法快速、高效,能够准确测定中兽药散剂中非法添加的酰胺醇类药物。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Agilent 1100, 美国,配有二极管阵列检测器)、电子天平(Mettler Toledo, 瑞士)。甲醇、乙腈(色谱级,美国 Fisher 公司),实验用水由 MilliQ - Gradient 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

1.2 对照品 甲矾霉素对照品(来源:中国兽医药品监察所,批号 K0241406,含量 99.7%)、氟苯尼考对照品(来源:中国兽医药品监察所,批号 K0301305,含量 99.3%)、氯霉素对照品(来源:中国药品生物制品检定研究院,批号 130555 - 201203,含量 99.8%)。

1.3 供试品 健胃散、止痢散、球虫散、胃肠活等中兽药散剂均来自企业审批检验的合格产品。

1.4 色谱条件 色谱柱为 Waters Atiantis © T3 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm。流动相 A 为甲醇;流动相 B

为乙腈;流动相 C 为水,梯度洗脱。流速 1.0 mL/min;检测波长为 224 和 278 nm;进样体积为 10 μ L。流动相梯度洗脱方法如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱方法

Tab 1 The method of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	13	12	75
12	13	12	75
26	0	40	60
30	13	12	75
35	13	12	75

1.5 标准溶液的制备

1.5.1 对照品储备溶液 分别精密称取甲砒霉素、氟苯尼考、氯霉素对照品 50、50、125 mg 置 100 mL 量瓶中,加 40% 甲醇溶液超声使溶解,用 40% 甲醇溶液稀释至刻度,浓度分别为 0.5、0.5、1.25 mg/mL,用时根据需要稀释至相应浓度。

1.5.2 系统适用性溶液 精密称取甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素对照品各 25 mg,置 50 mL 量瓶中,加 40% 甲醇溶液适量,超声使溶解,放置至室温,加 40% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加 40% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,浓度为 50 μ g/mL。

1.6 样品溶液的制备

1.6.1 阴性样品储备溶液 分别称取供试品 0.50 g,精密加入 50 mL 40% 甲醇溶液超声,6000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

1.6.2 阴性样品溶液 精密量取阴性样品储备液 1 mL,精密加入 9 mL 40% 甲醇溶液,混匀,上机前使用 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.6.3 阳性样品溶液 精密量取阴性样品储备液 1 mL,精密加入对照品储备液 1 mL 和 8 mL 40% 甲醇溶液,混匀。上机前使用 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.6.4 阳性添加样品 按照甲砒霉素、氟苯尼考及氯霉素制剂常用规格,即 5%、5%、12.5% 的比例在供试品中添加 3 种酰胺醇类药物。

2 结果与分析

2.1 系统适用性试验 取 40% 甲醇溶液、系统适用性溶液、阴性样品溶液、阳性添加样品溶液,在本试验确定色谱条件下测定,记录色谱峰,如图 1,图 2,图 3,图 4 所示。在此测定条件下,40% 甲醇溶液及各阴性样品溶液对待测组分没有干扰,各药物之间的分离度良好,甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素的出峰时间分别为 9.1、18.7、24.2 min,各目标峰纯度角小于纯度阈值,表明峰的纯度较好。

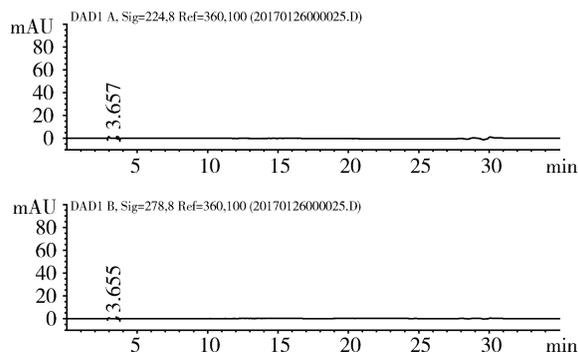


图 1 40% 甲醇溶液色谱图

Fig 1 The chromatogram of 40% Methanol solution

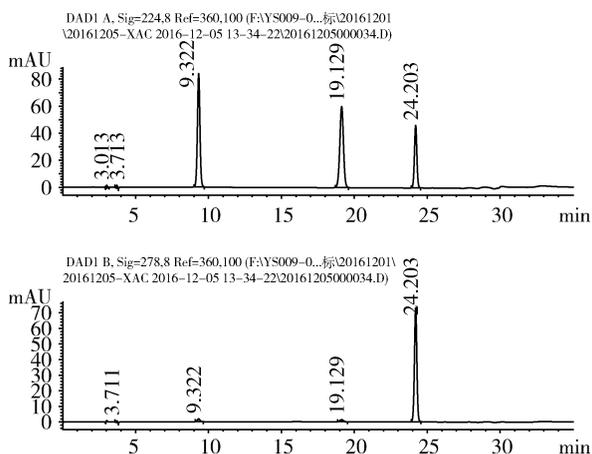


图 2 酰胺醇类药物对照品溶液 (50 μ g/mL) 色谱图
Fig 2 The chromatogram of Amide alcohol reference solution (50 μ g/mL)

2.2 精密度试验 取浓度为 50 μ g/mL 的甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素的混合标准溶液,在本试验确定色谱条件下,连续进样 6 次,其峰面积的 RSD 分别为 0.11%、0.11%、0.13%,表明在该色谱条件下检测,标准溶液精密度良好。

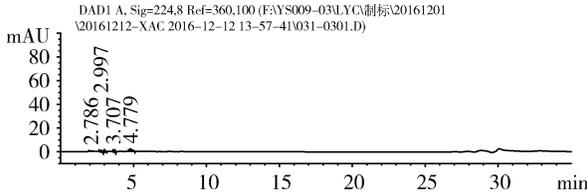


图 3 健胃散 - 空白色谱图

Fig 3 The blank chromatogram of Jianweisan

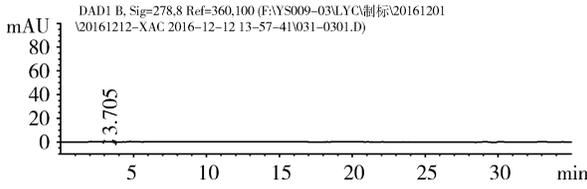


图 3 健胃散 - 空白色谱图

Fig 3 The blank chromatogram of Jianweisan

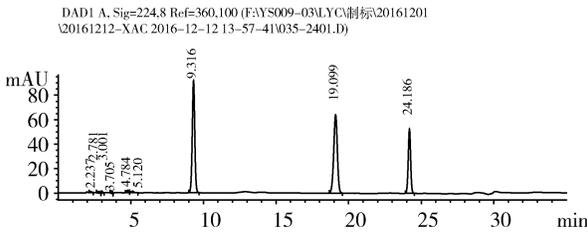


图 4 健胃散 - 添加 (50 μg/mL) 色谱图

Fig 4 The chromatogram of Jianweisan - addition

(50 μg/mL)

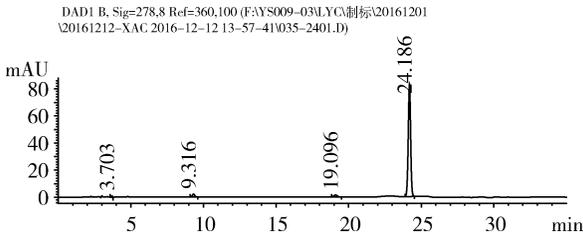


图 4 健胃散 - 添加 (50 μg/mL) 色谱图

Fig 4 The chromatogram of Jianweisan - addition

(50 μg/mL)

2.3 重现性试验 按阳性添加样品的制备方法制备 6 份健胃散添加溶液,在本试验确定色谱条件下进样,测定甲磺霉素、氟苯尼考和氯霉素的峰面积, RSD 分别为 2.13%、2.56%、2.29%,表明此方法的重现性良好。

2.4 检测限 精密量取各样品的阴性样品储备液 1 mL,置 15 mL 离心管中,精密加入系统适用性溶液适量(0.5 mL、0.6 mL 和 0.8 mL),用 40% 甲醇溶液稀释至 10 mL,摇匀,在本试验确定色谱条件下进样,以光谱未失真的最低添加量作为检测限。经对比光谱图及纯度峰,所检测药物中甲磺霉素的检测限为 3 g/kg、氟苯尼考及氯霉素的检测限均为 4 g/kg,如图 5 至 16 所示。

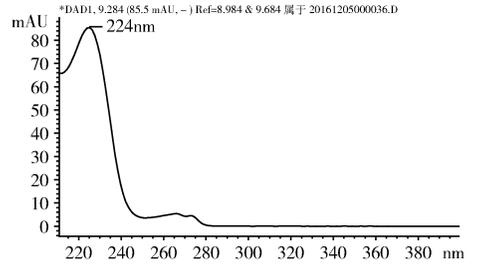


图 5 甲磺霉素 - 对照品 (50 μg/mL) 光谱图

Fig 5 The spectrum of Thiopentomycin - reference

(50 μg/mL)

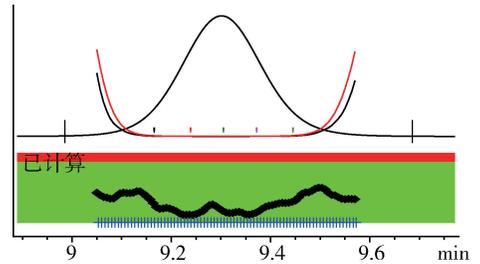


图 6 甲磺霉素 - 对照品 (50 μg/mL) 纯度峰

Fig 6 The purity peak of Thiopentomycin - reference

(50 μg/mL)

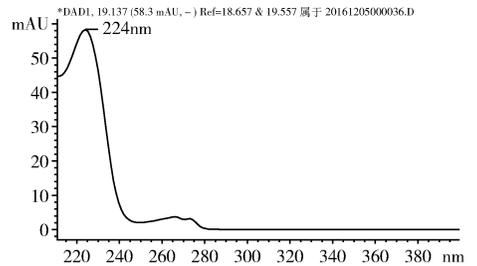


图 7 氟苯尼考 - 对照品 (50 μg/mL) 光谱图

Fig 7 The spectrum of Fluoroquinol - reference

(50 μg/mL)

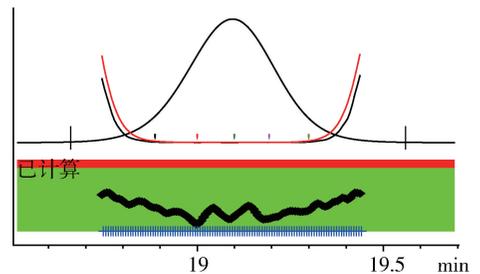


图 8 氟苯尼考 - 对照品 (50 μg/mL) 纯度峰

Fig 8 The purity peak of Fluoroquinol - reference

(50 μg/mL)

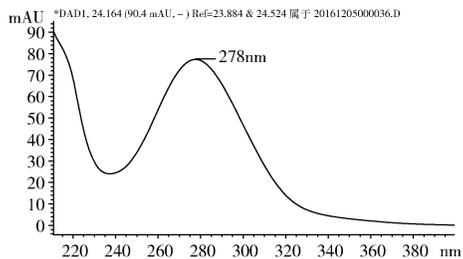


图 9 氯霉素 - 对照品 (50 µg/mL) 光谱图

Fig 9 The spectrum of Chloramphenicol - reference (50 µg/mL)

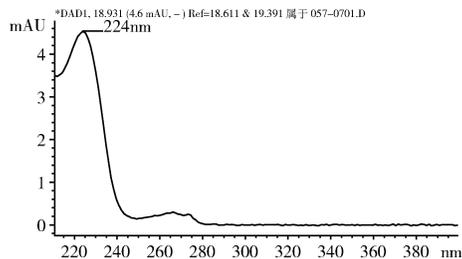


图 13 止痢散 (氟苯尼考 4 g/kg) 光谱图

Fig 13 The spectrum of Zhili San (Flufenicol 4 g/kg)

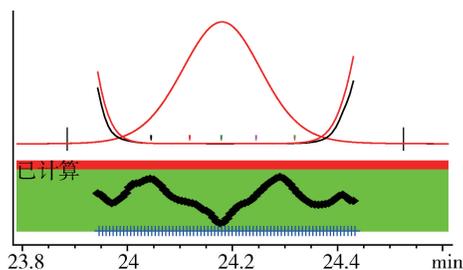


图 10 氯霉素 - 对照品 (50 µg/mL) 纯度峰

Fig 10 The purity peak of Chloramphenicol - reference (50 µg/mL)

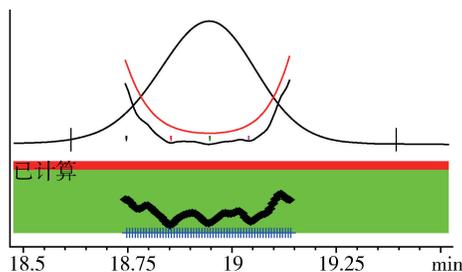


图 14 止痢散 (氟苯尼考 4 g/kg) 纯度峰

Fig 14 The purity peak of Zhili San (Flufenicol 4 g/kg)

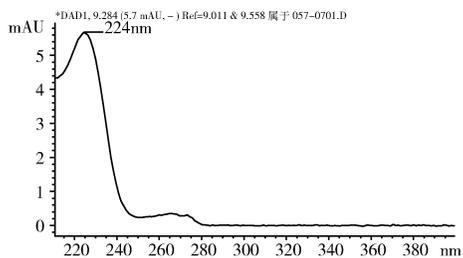


图 11 止痢散 (甲砒霉素 3 g/kg) 光谱图

Fig 11 The spectrum of Zhili San (Memboxin 3 g/kg)

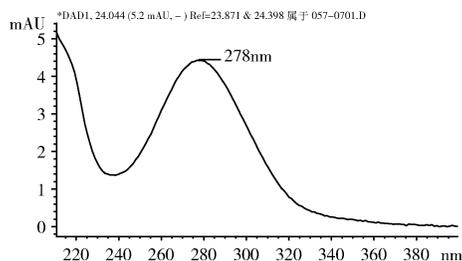


图 15 止痢散 (氯霉素 4 g/kg) 光谱图

Fig 15 The spectrum of Zhili San (Chloramphenicol 4 g/kg)

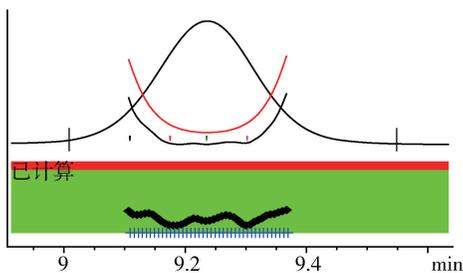


图 12 止痢散 (甲砒霉素 3 g/kg) 纯度峰

Fig 12 The purity peak of Zhili San (Memboxin 3 g/kg)

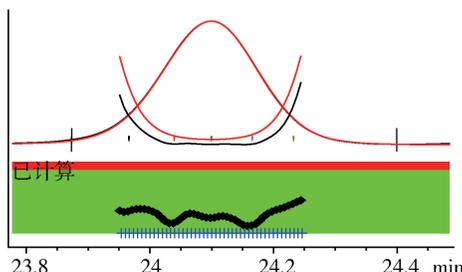


图 16 止痢散 (氯霉素 4 g/kg) 纯度峰

Fig 16 The purity peak of Zhili San (Chloramphenicol 4 g/kg)

2.5 标准曲线的绘制 精密量取甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素的对照品储备液,用 40% 甲醇稀释至浓度分别为 10、20、50、100、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在本试验的色谱条件下进行测定,以系列标准溶液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,三种药物的线性方程分别为 $y = 21.46x - 7.1245$; $y = 21.009x - 4.1586$; $y = 15.876x - 3.5812$,相关系数 R^2 均在 0.999 以上,如图 17 所示。结果表明,三种药物在 10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内时,药物浓度与相应峰面积线性关系良好。

2.6 加样回收率试验 在阴性样品中按照 80%、100%、120% 添加甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素 3 种酰胺醇类药物,按外标法计算其回收率,三种药

物的回收率在均在 98.0% ~ 103.0%,变异系数均在 0.6% ~ 1.6%,其试验结果如表 2 所示。

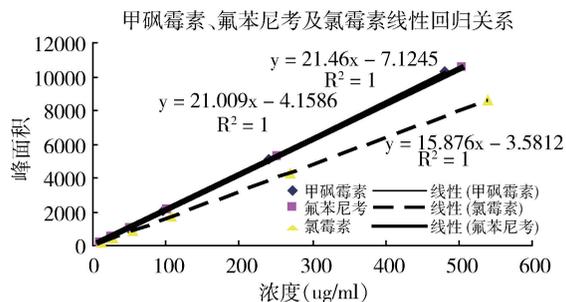


图 17 酰胺醇类药物标准曲线方程与相关系数

Fig 17 Standard curve equation and correlation coefficient of amide alcohols

表 2 中兽药散剂中添加酰胺醇类药物 (甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素) 的回收率和变异系数 (n=9)

Tab 2 Recovery and coefficient of variation of amide alcohols (Methamphetamine, Florfenicol and Chloramphenicol) added to Chinese veterinary drug powder (n=9)

空白样品名称	添加浓度/%	甲砒霉素			氟苯尼考			氯霉素		
		回收率 X/%			回收率 X/%			回收率 X/%		
健胃散	80	101.7	100.9	100.7	101.7	99.6	100.0	100.6	101.0	101.3
	100	103.0	100.2	99.2	102.0	100.1	99.4	100.5	99.1	99.2
	120	99.6	101.2	102.5	99.3	99.6	100.2	99.5	100.7	99.2
	\bar{X}	100.8			100.2			100.1		
	RSD/%	1.3			1.0			0.9		
止痢散	80	99.0	101.0	100.9	98.8	101.1	101.1	99.8	100.0	100.0
	100	100.1	101.6	101.3	100.2	102.6	102.8	100.8	101.2	101.4
	120	99.6	99.6	100.4	99.1	99.5	98.6	99.5	100.0	99.3
	\bar{X}	100.3			100.4			100.2		
	RSD/%	0.9			1.6			0.7		
球虫散	80	98.6	99.2	100.3	98.0	99.0	99.0	101.3	102.8	102.8
	100	99.3	99.1	99.1	100.7	100.8	100.5	99.8	98.6	98.8
	120	100.5	99.8	99.2	99.8	99.1	99.2	99.6	99.8	99.2
	\bar{X}	99.6			99.6			100.3		
	RSD/%	0.6			0.9			1.6		
胃肠活	80	99.3	98.8	98.3	100.3	99.9	99.3	99.3	98.8	98.3
	100	100.1	100.3	100.6	101.2	101.4	101.7	100.2	100.6	101.0
	120	100.0	100.3	100.3	101.1	101.4	101.4	100.5	100.8	100.6
	\bar{X}	99.8			100.9			100.0		
	RSD/%	0.8			0.8			1.0		

3 讨论与结论

3.1 中兽药散剂种类的选择 一直以来,中兽药具有绿色、安全、无残留的特点,备受广大养殖户的青睐,寄托了兽医兽药行业的厚望。本试验选择的四种中兽药散剂为养殖过程中的常用药,均有一定的预防和治疗肠道感染的作用。其中健胃散具有治疗呕吐反胃、消化不良的功效;止痢散具有治疗湿热泻痢、热毒血痢的功效;球虫散具有抗球虫病、凉血止血的功效;胃肠活具有治疗消化不良的功效。酰胺醇类药物,属抑菌性广谱抗生素,用于治疗敏感细菌所致的呼吸系统、肠道及尿路等感染,故在畜禽养殖中极有可能被非法添加到上述四种中兽药散剂中,用于加强预防及治疗细菌感染。

3.2 色谱柱及柱温的选择 通过改变柱温,未见色谱图有明显变化,考虑到本方法检测多样品及采用梯度洗脱的方式,试验选择以 35℃ 为检测温度,以提高色谱峰的重现性。本试验使用了不同品牌、不同型号的色谱柱: Waters Atiantis® T3 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)、Waters symmetry C18 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)、Waters Xterra C18 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)、Agilent Eclipse XDB - C18 (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 等色谱柱,综合考虑待测组分与其他药物的分离度,以及保留时间和灵敏度,只有 Waters Atiantis® T3 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 对甲矾霉素保留时间较长,能使被测成分有效的分离,并且与其他成分峰不产生干扰。其他色谱柱不能使中兽药制剂与三种酰胺醇类药物有效的分离,或者不能将三种被测药物有效的分离。

3.3 流动相的选择 试验在优化流动相的过程中尽量避免引入酸或盐类物质,以免减少柱子寿命。本试验探究了甲醇 - 水、乙腈 - 水、甲醇 - 乙腈 - 水三种流动相组合,经比较甲醇 - 乙腈 - 水的分离效果比甲醇 - 水或乙腈 - 水的分离效果要好。由于中药的成分比较复杂,等度洗脱未能完全实现药物的基线分离,因此选择梯度洗脱,洗脱程序为表 1,其中甲矾霉素的极性最强,最先出峰,保留时间为 9.3 min,氟苯尼考居中,保留时间为 19.1 min,氯霉素的极性最弱,最后出峰,保留时间为 24.2 min,此

时三种酰胺醇类药物能实现基线分离,并能与中兽药制剂中的成分有效的分离。

3.4 结论 试验采用高效液相色谱 - 二极管阵列检测器、梯度洗脱的方法,建立的中兽药散剂中非法添加酰胺醇类药物检查方法,能够实现添加的酰胺醇类药物与固体制剂药物中其他成分的有效分离,经峰纯度检查确保酰胺醇类药物出峰处无干扰,同时该方法较稳定、准确、重现性好,可用于中兽药散剂中酰胺醇类药物的检测。此外,经试验验证,该方法对于 β - 内酰胺类、四环素类等固体药物制剂中酰胺醇类非法添加的检测也具有较好的效果。

参考文献:

- [1] 程传民,李 云,周朝华,等. 畜产品中酰胺醇类药物测定方法的研究 [J]. 饲料广角,2016, 01: 32 - 35.
Cheng C M, Li Y, Zhou C H. *et al.* Study on the determination method of amide alcohol drugs in animal products [J]. Feed China, 2016, 01: 32 - 35.
- [2] 刘福艳,李 军,谢元超,等. 中成药中非法添加化学药品的现状与分析检测对策 [J]. 中国药事,2008, 12: 1067 - 1071.
Liu F Y, Li J, Xie Y C, *et al.* Recent advances and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in TCPM [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 12: 1067 - 1071.
- [3] 李 莉,高建龙,杨俊华,等. 中兽药散剂中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的检测方法应用 [J]. 中国兽药杂志,2012, 01: 37 - 39.
Li L, Gao J L, Yang J H, *et al.* Studies on detection methods of olaquinox and mequinox illegally adulterated into traditional Chinese medicine powder for animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 01: 37 - 39.
- [4] 刘传发,杨 帆. 动物源食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留检测方法的研究进展 [J]. 广东畜牧兽医科技,2015, 03: 1 - 4.
Liu C F, Yang F. Research progress on detection methods of florfenicol and florfenicol residues in animal source foods [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2015, 03: 1 - 4.
- [5] 陈 蕾,宋志超,张崇威,等. 动物源食品中酰胺醇类药物及其代谢物残留检测超高效液相色谱 - 串联质谱法研究 [J]. 中国兽药杂志,2015, 08: 28 - 34.
Chen Q, Song Z C, Zhang C W, *et al.* Determination of amphen-

- icols and metabolite residues in animal derived food by UPLC - MS/MS [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 08: 28 - 34.
- [6] 陈建蓉,李敏,吴春燕,等. 清瘟败毒散的组分及添加化学药物的显微鉴别 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 06: 228 - 229.
- Chen J R, Li M, Wu C Y, *et al.* Microscopic identification of the components of Qingwen Baidu powder and the addition of chemical drugs [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts, 2016, 06: 228 - 229.
- [7] 高迎春,苏梅,魏秀丽,等. 薄层色谱和液相色谱鉴别中兽药散剂中掺加的磺胺噻啉钠 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 02: 23 - 25.
- Gao Y C, Su M, Wei X L, *et al.* Identification of sulfaquinoline sodium in Chinese veterinary drug powder by TLC and HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 02: 23 - 25.
- [8] 赵玉丛,樊国燕. 固相萃取 - 高效液相色谱同时测定中兽药中 8 种氟喹诺酮类药物 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 11: 91 - 94.
- Zhao Y C, Fan G Y. Simultaneous determination of eight fluoroquinolones in veterinary drugs by solid phase extraction - HPLC [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2012, 11: 91 - 94.
- [9] 李树纲,金录胜,王登临,等. HPLC 法测定中兽药散剂中非法添加土霉素的方法研究 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 11: 19 - 22.
- Li S G, Jin L S, Wang D L, *et al.* Study on the determination method of oxytetracycline added illegally in Chinese veterinary drug powder by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 11: 19 - 22.
- [10] 曹莹,蒋音. 利用液质联用仪快速确证中兽药中的氟喹诺酮类药物 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 06: 27 - 29.
- Cao Y, Jiang Y. Rapid confirmation of fluoroquinolones in Chinese veterinary drug by LC - MS [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 06: 27 - 29.

(编辑:陈希)