

HPLC - DAD 法检测喹乙醇预混剂中 违规添加喹烯酮的研究

陆春波¹, 高三玉², 罗成江¹, 包爱情¹

(1 浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101; 2 浙江省台州市路桥区城区动物卫生监督所, 浙江台州 318050)

[收稿日期] 2016 - 10 - 13 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2017) 03 - 0061 - 04 [中图分类号] S859.83

[摘要] 确证 1 批次喹乙醇预混剂中的非法添加物。采用 HPLC - DAD 的谱库匹配, 推断出疑似添加物为喹烯酮, 从而建立了检测喹乙醇预混剂中违规添加喹烯酮的反相高效液相色谱法 (HPLC - DAD)。采用 Agilent Eclipse XDB - C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 水 (60:40), 流速 1.0 mL/min, 波长扫描范围为 210 ~ 400 nm。喹烯酮在 1 ~ 100 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, $r = 1.0000$; 平均回收率为 99.4% ~ 99.8%, $n = 5$, RSD 在 0.8% ~ 1.0% 之间。

[关键词] 喹乙醇; 预混剂; 喹烯酮; 反相高效液相色谱法

Determination of Quinocetone into Olaquinox Premix by HPLC - DAD

LU Chun - bo¹, GAO San - yu², LUO Cheng - jiang¹, BAO Ai - qing¹

(1. Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 311101, China;

2. Zhejiang Taizhou Luqiao District Animal Health Inspection Institute, Taizhou, Zhejiang 318050, China)

Abstract: To identify the unknown adulterated compound in one batch of olaquinox premix in the common course, an unknown compound was observed with characteristic UV spectra. The compound was deduced with the information provided by HPLC - DAD. Results showed that the unknown adulterated compound in this sample was identified as quinocetone. To establish a HPLC - DAD method for the determination of quinocetone in olaquinox premix, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB - C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of a mixture of a solution of methanol and water (60:40). The flow rate was 1.0 mL/min. The scanning wavelength was from 210 to 400 nm. Quinocetone in 1 ~ 100 μg/mL concentration range of linear is good ($r = 1.0000$). The average recoveries was 99.4% ~ 99.8% ($n = 5$) with RSD between 0.8% and 1.0%.

Key words: olaquinox; premix; quinocetone; HPLC - DAD

近年来,农业部对兽药处方外非法添加的监管与打击力度不断加大,规定鉴别抽检的检验应当执行《兽药国家标准补充检查方法》。对于没有补充

的检查方法标准,可按《兽药中非法添加物质检查方法标准》^[1]自行建立补充检查方法。在鉴别抽检时,试验发现有 1 批次喹乙醇预混剂样品添加喹烯

酮,添加手段极为隐蔽。为了打击非法添加行为,建立喹乙醇预混剂中违规添加喹烯酮药物的检查方法迫在眉睫。喹烯酮预混剂的检测方法主要是液相色谱法^[2],本研究在此基础上建立了喹乙醇预混剂中违规添加喹烯酮的检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司;XS-205 电子天平(感量 0.01 mg),瑞士 METTLER TOLEDO 公司;KQ-500E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与材料 甲醇为色谱纯,Merck 公司;实验用水为 milli-Q 超纯水。喹乙醇预混剂样品(批号为 16030101),标示规格为 5%,为 2016 年度监督抽检样品;喹乙醇对照品,批号 H0061103,含量 99.5%,购于中国兽药药品监察所;喹烯酮对照品,批号 H0561305,含量 99.6%,购于中国兽药药品监察所。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以甲醇-水(60:40)为流动相;流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL;二极管阵列检测器(DAD),采集波长范围 210~400 nm,分辨率为 1.2 nm,记录 314 nm 波长处的色谱图。

2.2 溶液制备

2.2.1 喹乙醇预混剂空白溶液 取已测得不含喹烯酮的喹乙醇预混剂(规格为 5%)1.0 g,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声 10 min,冷却,加甲醇稀释至刻度,摇匀;取 5.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液。

2.2.2 喹烯酮对照品储备液 取喹烯酮对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声 10 min,冷却,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 0.1 mg/mL 的对照品储备液。

2.2.3 系统适用性溶液 分别取喹乙醇和喹烯酮对照品各 10 mg,分别置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度;精密量取上述溶液各 5 mL,置同

一 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为系统适用性溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 量取系统适用性溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,考察喹乙醇和喹烯酮的分离度,结果见图 1。在上述色谱条件下,喹乙醇和喹烯酮的分离度为 17.99。

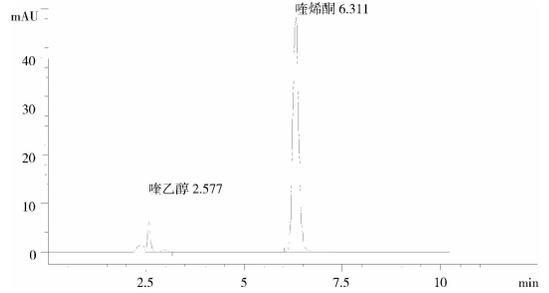


图 1 系统适用性色谱图

2.3.2 样品本底及干扰 精密量取空白溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果显示喹乙醇预混剂中成分对喹烯酮测定结果无干扰(图 2)。

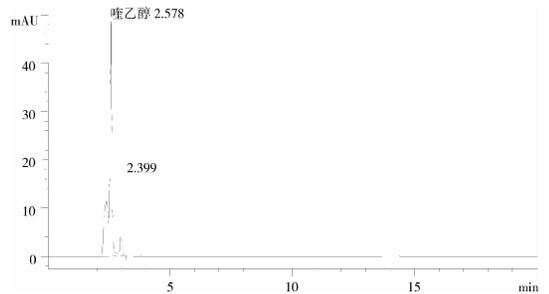


图 2 空白溶液色谱图

2.3.3 线性关系考察 精密量取喹烯酮对照品储备液适量,加甲醇制成 1、2、4、8、20、40、100 μg/mL 的标准曲线溶液,测定。按喹烯酮峰面积与对应的浓度作标准曲线,并计算回归方程和相关系数。喹烯酮回归方程为 $y = 51.00941x + 0.988822$, $r = 1.0000$ 。表明喹烯酮在 1~100 μg/mL 浓度范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.3.4 检测限和定量限 取已测得不含喹烯酮的喹乙醇预混剂(含喹乙醇 5%)1.0 g,置 100 mL 量瓶中,精密加入喹烯酮对照品储备液适量,制成浓

度 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/g 的添加样品。以光谱图(图 3)失真的最大浓度作为检出限,以 3 倍检出限作为定量限。该色谱条件下喹烯酮在喹乙醇预混剂样品中的检出限为 0.5 mg/g,定量限为 1.5 mg/g。

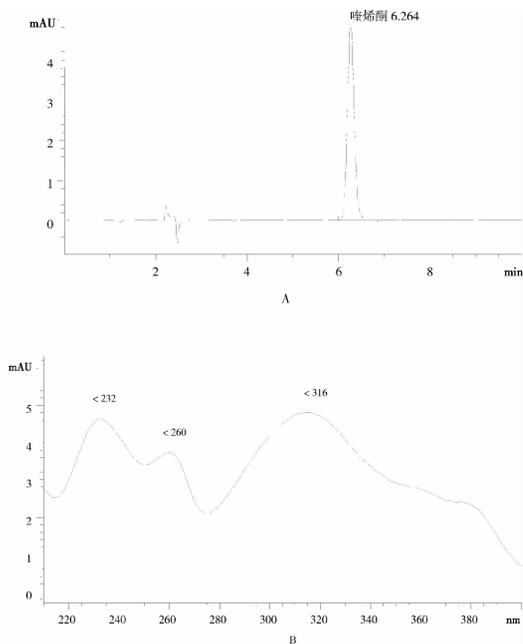


图 3 喹烯酮检出限色谱图(1 µg/mL) (A)、光谱图(B)

2.3.5 回收率试验 取已测得不含喹烯酮的喹乙醇预混剂(含喹乙醇 5%) 1.0 g, 置 100 mL 量瓶中, 加喹烯酮对照品适量, 分别按 0.5、1.0、2.5 mg/g 进行添加, 制成 3 个不同添加浓度, 每个浓度制备 5 个平行样品, 加甲醇适量, 超声 10 min, 冷却, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 取 5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按 2.1 项下的色谱条件, 每个样品重复进 2 针, 测定并计算回收率, 结果见表 1。

表 1 喹烯酮回收率结果(n=5)

添加浓度/(mg·g ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
0.5	99.5	0.8
1.0	99.8	1.0
2.5	99.4	0.5

2.3.6 样品的测定 取喹乙醇预混剂样品(批号为 16030101) 1.0 g, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 10 min, 冷却, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 取

5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。分别精密量取供试品溶液和喹烯酮对照品溶液(20 µg/mL) 10 µL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图和光谱图及峰纯度检查(图 4 ~ 图 5)。结果显示: 供试品溶液喹烯酮色谱峰与喹烯酮对照品溶液色谱峰保留时间一致, 光谱相似; 纯度因子大于纯度阈值, 显示为单一物质峰。

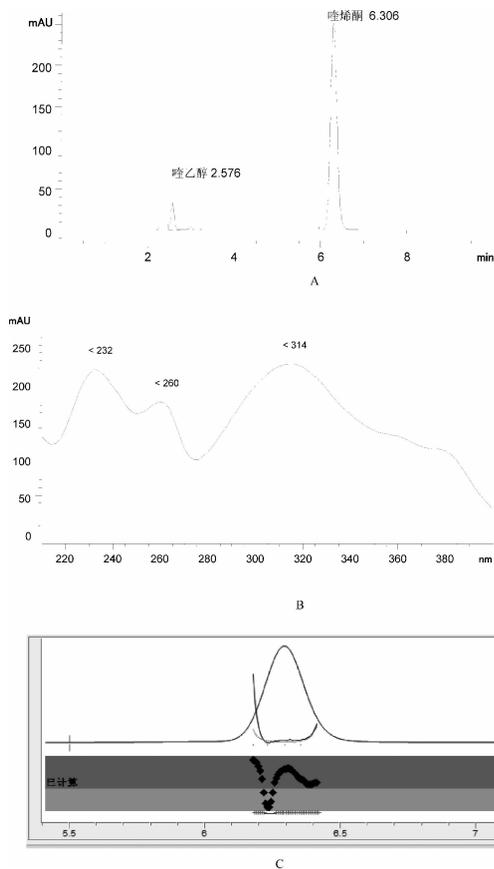


图 4 喹乙醇预混剂样品(批号 16030101) 色谱图(A)、光谱图(B)、纯度检查图(C) (纯度因子 998.939, 纯度阈值 990.000)

3 讨论与小结

3.1 非法添加物的发现和分析 喹乙醇预混剂的质量标准收载于《中国兽药典》二〇一〇版一部^[3], 采用可见-紫外分光光度法鉴别并测定其含量。在监督抽检时, 发现有 1 批次喹乙醇预混剂样品按质量标准检测, 鉴别项和含量项均符合标准规定, 但该批次样品的紫外光谱图与喹乙醇的紫外光谱图比较, 除了 266 nm 和 382 nm 波长处有最大吸收外, 在 310 nm 波长处多了一个最大吸收峰, 怀疑添加有其他喹噁啉类药物。采用 HPLC-DAD 谱库作了匹配, 疑似添加物锁定为喹烯酮。

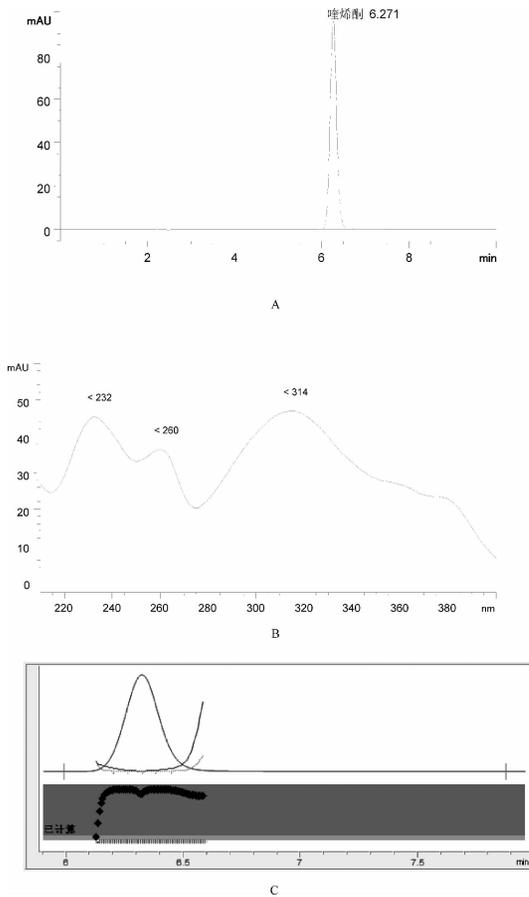


图5 喹烯酮对照品溶液(20 $\mu\text{g/mL}$)
 色谱图(A)、光谱图(B)、纯度检查图(C)
 (纯度因子999.944,纯度阈值990.000)

3.2 色谱条件、提取溶剂和提取波长的选择 本试验中采用的色谱条件,参照《兽药国家标准(化学药品、中药卷第一册)》^[3]喹烯酮预混剂的液相色谱条件,采用二极管阵列检测器。对喹烯酮在甲醇

中的溶解性进行考察,发现在本方法浓度范围内,喹烯酮在甲醇中的溶解性良好。考虑到在非法添加高通量筛查中以甲醇作为溶剂具有普适性,选取甲醇作为提取溶剂。喹烯酮对照品在210~400 nm波长范围最大吸收波长为232、260、314 nm,为避免测定溶剂及流动相对紫外吸收的干扰,选择314 nm作为提取波长。

喹乙醇和喹烯酮均属于喹噁啉衍生物,被广泛用作抗菌促生长饲料添加剂^[4]。该批次样品如果按照《中国兽药典二〇一〇年版一部》检测,含量测定和鉴别项均符合规定,含量测定结果显示含5%的喹乙醇。如果按本文的液相色谱方法检测,结果显示该批次样品含喹乙醇外,还添加2.5%的喹烯酮。用喹烯酮部分代替喹乙醇生产喹乙醇预混剂,不仅违反《兽药管理条例》,超量使用喹烯酮也给食品安全带来很大隐患。

参考文献:

- [1] 农业部. 农医发[2016]2号附录3[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 兽药国家标准(化学药品、中药卷第一册)[S].
- [3] 中国兽药典委员会. 中国兽药典二〇一〇年版一部[S].
- [4] 程古月,洪璇,郝海红,等. 兽用喹噁啉类药物毒理学机制的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(6): 1071-1075.

(编辑:侯向辉)