

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.10.06

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

章安源¹, 章安雯², 牛华星¹, 陈玲^{1*}, 张琦¹

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022; 2. 枣庄职业学院, 山东枣庄 277100)

[收稿日期] 2019-07-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2019)10-0033-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立了扶正解毒散中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹检测的 UPLC-MS/MS 方法。样品经 60% 乙腈提取稀释后, 采用 ACQUITY UPLC^R BEH C18 色谱柱为分离柱, 质谱正离子扫描分析测定。结果显示, 喹乙醇、乙酰甲喹在 5~200 ng/mL 的范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9984$, $R^2 = 0.9995$); 样品检出限为 25 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。在 80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 添加水平的回收率为 90%~103%, 批内批间变异系数均小于 10%。本方法灵敏、快速、重现性好, 适用于扶正解毒散中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的检测。

[关键词] 喹乙醇; 乙酰甲喹; 扶正解毒散; 超高效液相 - 串联质谱法

Determination of Olaquinox and Mequinox Illegally Added in Fuzhengjiedusan by UPLC-MS/MS

ZHANG An-yuan¹, ZHANG An-wen², NU Hua-xing¹, CHEN Ling^{1*}, ZHANG Qi¹

(1. Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute; Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China; 2. Zaozhuang Vocational College, Shandong, Zaozhuang 277100, China)

Corresponding author: CHEN Ling, E-mail: 13708935340@163.com

Abstract: A method was established for determination of Olaquinox and Mequinox illegally added in Fuzhengjiedusan by UPLC-MS/MS. The sample was extracted and diluted with 60% acetonitrile, the ACQUITY UPLCR BEH C18 was used as the separation column, and the determination was conducted by scanning positive ion by mass spectrometry. The results showed that the good linear range was 5 to 50 ng/mL ($R^2 = 0.9984$, $R^2 = 0.9995$). The detection limit was 2 $\mu\text{g/mL}$, and the quantitation limit was 5 $\mu\text{g/mL}$. The analysis of spiked 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$ olaquinox and mequinox showed that the recoveries ranged from 90% to 103% and the relative standard deviations were below 10%. The experiment showed that the method was reliable, sensitive and

作者简介: 章安源, 兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验及科研工作。

通讯作者: 陈玲。E-mail: 13708935340@163.com

reproducibility and suitable for the determination of olaquinox and mequinox illegally added in Fuzhengjiedusan.

Key words: olaquinox; mequinox; Fuzhengjiedusan; UPLC – MS/MS

喹乙醇、乙酰甲喹属于喹噁啉类合成抗菌药,具有广谱抗菌活性,促进动物生长。因此被广泛地用作抗菌促生长剂和饲料转化率制剂^[1-3];为保障动物产品质量安全,维护公共卫生安全和生态安全,农业农村部组织决定自 2019 年 5 月 1 日起,停止经营、使用喹乙醇等 3 种兽药的原料药及各种制剂^[4]。

但鉴于少数不法兽药企业在利益的驱动下,在清热解毒类和促生长类兽用中兽药散剂中违规添加。采用液相色谱法检测喹乙醇,样品前处理过程繁琐,检出限也较高,缺乏针对性的检测方法,给养殖户造成严重经济损失;另一方面也会给人造成食源性细菌耐药性等的潜在危害^[5]。

研究参考了饲料残留的检测方法^[6-7],首次建立了扶正解毒散剂中非法添加物喹乙醇、乙酰甲喹的超高效相串联质谱法,此方法可以作为非法添加喹乙醇、乙酰甲喹的定性、定量测定。

1 材料与方 法

1.1 仪器 AE-240 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);LC-30AD 高效液相色谱仪(岛津),SCI-Ex 四极杆带电喷雾源串联质谱仪(AB 公司);KQ-250DB 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);高速冷冻离心机(日立公司),0.22 μm 的滤膜为 Waters 公司。

1.2 药品及试剂 喹乙醇,批号 H0061103,含量 99.5%,乙酰甲喹,批号 H0111008,含量 99.6%,购自中国兽医药品监察所。甲酸、乙腈(色谱纯, Merck, 德国);超纯水。高纯氮,高纯氩(纯度均为 99.99%,济南德阳气体有限公司)。

1.3 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLCR BEH C18 色谱柱(50mm×2.1mm,1.7μm);流动相 A:乙腈;流动相 B:水溶液(0.1% 甲酸);流速:0.4mL/min;进样量:5 μL;柱温:35℃。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

| 时间/min | A/% | B/% |
|--------|-----|-----|
| 0.00 | 5 | 95 |
| 2.00 | 5 | 95 |
| 3.50 | 50 | 50 |
| 5.00 | 88 | 12 |
| 6.00 | 5 | 95 |

1.4 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描(ESI⁺);多反应监测(MRM);离子喷雾电压:5500;离子源温度:500℃;帘气:20;雾化气:50;加热气:50;测试药物定性、定量离子对及对应的去簇电压和碰撞能量见表 2

表 2 质谱测定参数

Tab 2 Mass Spectrometric Determination of Paramete

| 药物 | 定量离子对 | 定性离子对 | 去簇电压/V | 碰撞能量/eV | 保留时间/min |
|-----|-------------|----------------------------|--------|---------|----------|
| 喹乙醇 | 263.9 > 212 | 263.9 > 212 263.9 > 177 | 97 | 30 | 喹乙醇 |
| 喹乙醇 | 219 > 185 | 219 > 185 219 > 160 | 82 | 30 | 乙酰甲喹 |

1.5 样品制备

1.5.1 阴性样品 扶正解毒散,来源:山东天利和生物工程有限公司;批号 20181101。

1.5.2 标准储备液的制备 精密称取喹乙醇、乙酰甲喹 10 mg(准确至 0.01 mg),置 20 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。-20 °C 冰箱保存,贮存期 3 个月。

1.5.3 样品溶液的制备 精密称取 1.5.1 项下扶正解毒散 0.2 g,置 30 mL 离心管中,加 20 mL 60% 乙腈,40 °C 水浴超声处理 10 min,5000 r/min 离心 15 min,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中加初始流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,即得空白基质溶液。待测样品以上法处理,作为 UPLC-MS/MS 供试品溶液。

1.5.4 基质匹配标准储备溶液的制备 精密量取标准储备液 1 mL,置 100 mL 容量瓶中,加空白基质溶液稀释至刻度,摇匀,从中精密量取 1 mL 置 50 mL 容量瓶中,加空白基质溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,即得 100 ng/mL 的基质匹配标准储备溶液。

1.5.5 标准曲线的绘制 上述储备液(1.5.2)用初始比例流动相稀释,制成 5、7.5、10、15、20、50、100、200 ng/mL 的溶液,并绘制标准曲线。

1.5.6 阳性添加样品的制备 精密称取 16、20、24 mg 喹乙醇、乙酰甲喹加入到阴性样品中配制成 80、100、120 μg/mL 的阳性添加样品,旋涡混匀,每种添加浓度制备 3 份平行样,每份样品至少进样 2 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 线性考察 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离各离子。上述储备液(1.5.2)用初始流动性稀释,配制成 5、7.5、10、15、20、50、100、200 ng/mL 的溶液,经高效液相色谱串联质谱仪测定后,以标准溶液中喹乙醇、乙酰甲喹定量离子峰面积为横坐标,标准溶液中相应的喹乙醇、乙酰甲喹浓度为纵坐标,绘制标准曲线。如图 1 所示喹乙醇、乙酰甲喹在 5~200 ng/mL 的范围内标准曲线方程分别为 $Y = 0.0108X - 26.509$, $Y =$

$0.0032X - 24.2282$, 其相关系数分别为 R^2 为 0.9984, R^2 为 0.9995, 线性良好。见图 1, 图 2。

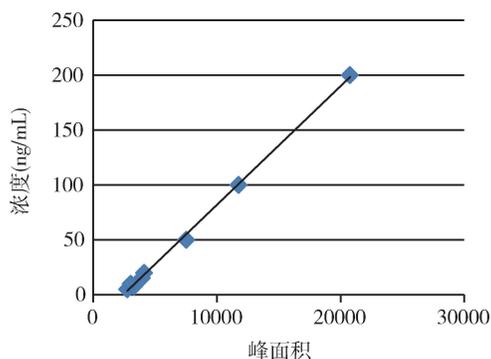


图 1 喹乙醇标准曲线

Fig 1 Standard curve of olaquinox

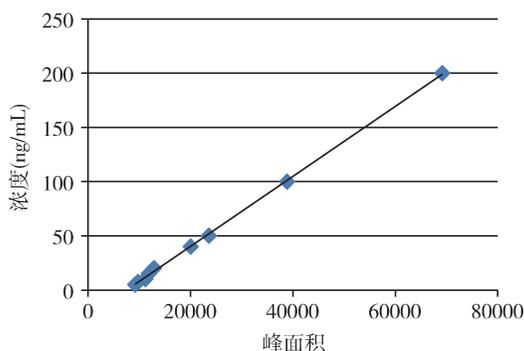


图 2 乙酰甲喹标准曲线

Fig 2 Standard curve of mequinox

2.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 2 μL, 连续进样 6 次。以峰面积计算, 得出喹乙醇、乙酰甲喹的 RSD 分别是 3.02%, 2.16%。表明仪器精密度良好, 符合检测要求。

2.3 重复性试验 同批供试品(批号为 20180201, 山东某兽药生物科技有限公司提供), 按 1.5.6 项下制备 6 份样品溶液, 喹乙醇、乙酰甲喹含量的 RSD 分别是 2.92%, 2.66%, 说明该方法重现性好, 含量稳定。

2.4 稳定性试验 取 1.5.6 项下同一供试品溶液(批号:20180201), 室温下每隔 4 h 连测 6 次, 进样体积 2 μL, 喹乙醇、乙酰甲喹峰面积 RSD 分别为 0.88%, 0.92%、0.85%, 表明本制剂在制备后的 24 h 内成份较稳定。

2.5 检测限和定量限 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 喹乙醇、乙酰甲喹对照品溶液信噪比(S/N) ≥ 3 , 确定为方法的检出限。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 喹乙醇/乙酰甲喹对照品溶液显示信噪比(S/N) ≥ 10 , 作为此方法定量限。

2.6 方法选择性的验证 选择 20 个空白样品, 按照优化条件进行处理后上机测定, 未发现有假阳性

结果, 表明该方法的选择性良好。

2.7 回收率试验 扶正解毒散中添加喹乙醇, 乙酰甲喹, 液质分离良好, 无干扰, 添加浓度 80、100、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 批内批间变异系数均小于 10%, 阳性添加样品的回收率在 90% ~ 103% 见表 3。

表 3 回收率试验结果 (n=9)

Tab 3 Result of recovery for olaquindo and mequindox

| 扶正解毒散 | 添加浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 回收率/% | | | 平均回收率/% | 批内 RSD/% | 批间 RSD/% |
|-------|---|--------|--------|--------|---------|----------|----------|
| 喹乙醇 | 80 | 89.56 | 92.37 | 92.13 | 91.35 | 1.7 | |
| | 100 | 85.47 | 92.51 | 93.01 | 90.33 | 4.6 | 7.4 |
| | 120 | 101.02 | 104.86 | 102.85 | 102.91 | 1.8 | |
| 乙酰甲喹 | 80 | 92.06 | 90.00 | 92.13 | 91.4 | 1.3 | |
| | 100 | 88.47 | 92.51 | 93.01 | 91.3 | 2.7 | 5.4 |
| | 120 | 98.02 | 99.86 | 102.85 | 100.2 | 2.4 | |

方法批内相对标准偏差 < 10%, 批间相对标准偏差 < 10%。

空白样品、对照溶液及阳性添加样品的液相色谱 - 串联质谱谱图见图 3 ~ 图 5。

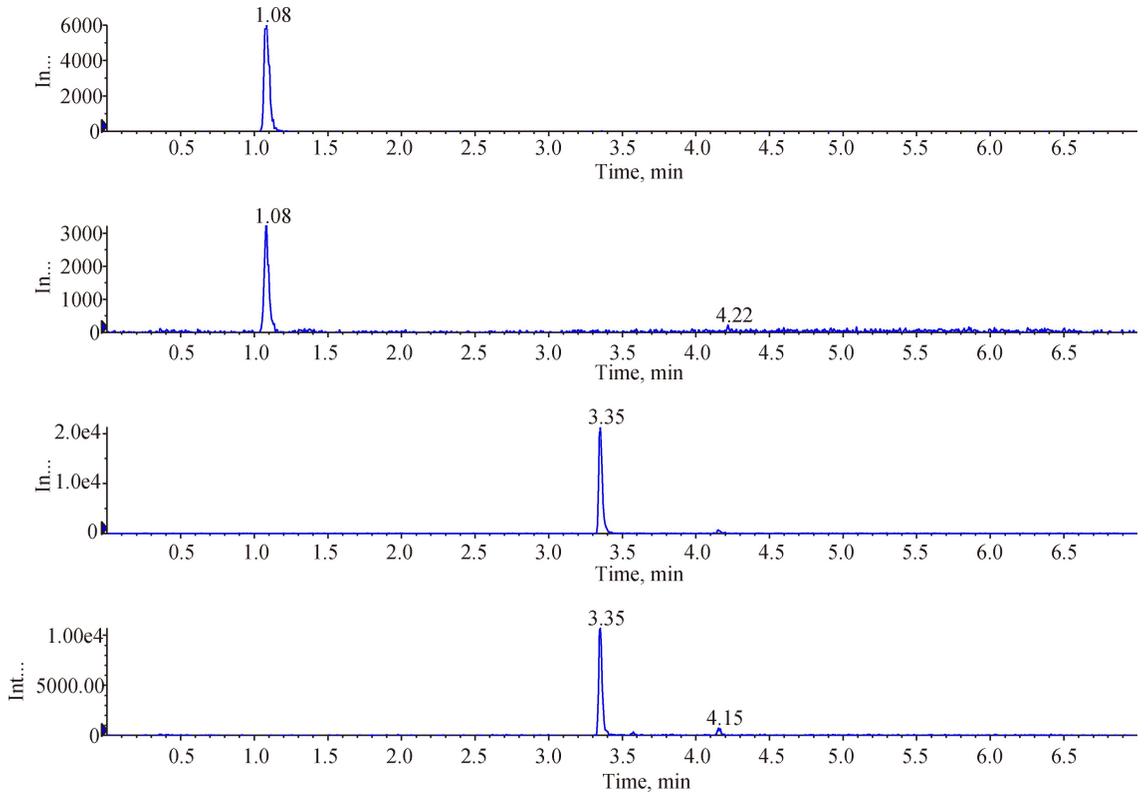


图 3 100 ng/mL 对照溶液提取离子色谱图

Fig 3 Extraction ion chromatograms of the contrast solution

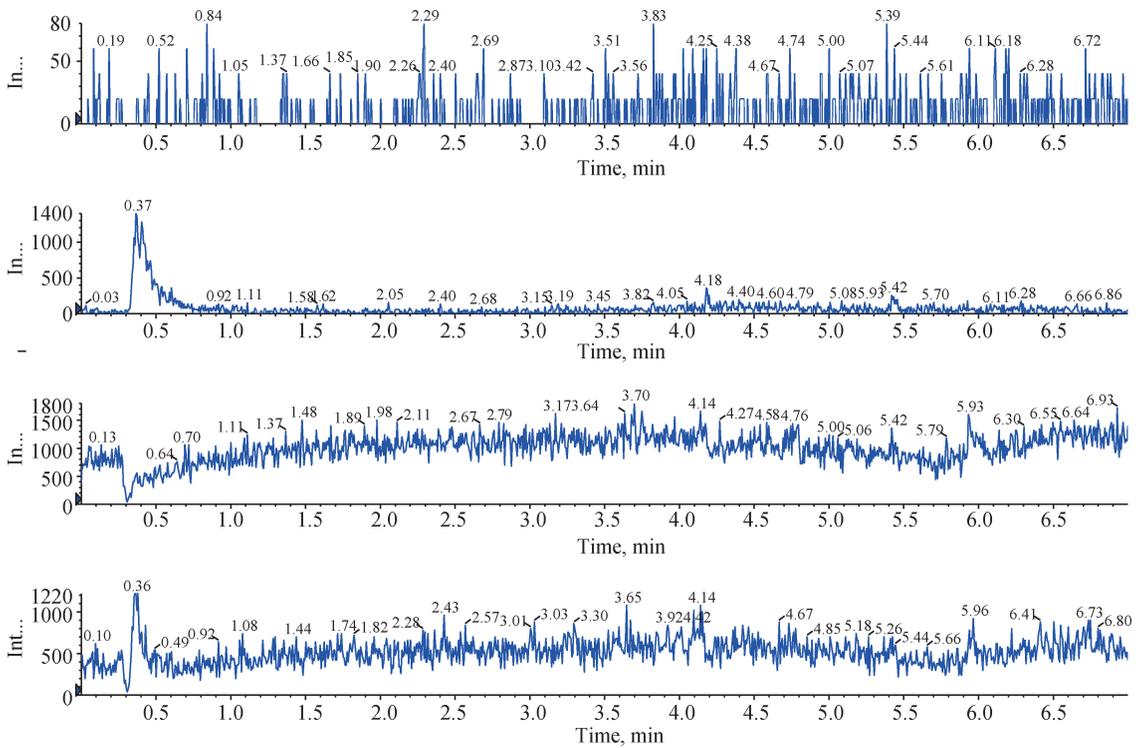


图 4 空白样品特征离子质量色谱图

Fig 4 Extraction ion chromatograms of the blank sample

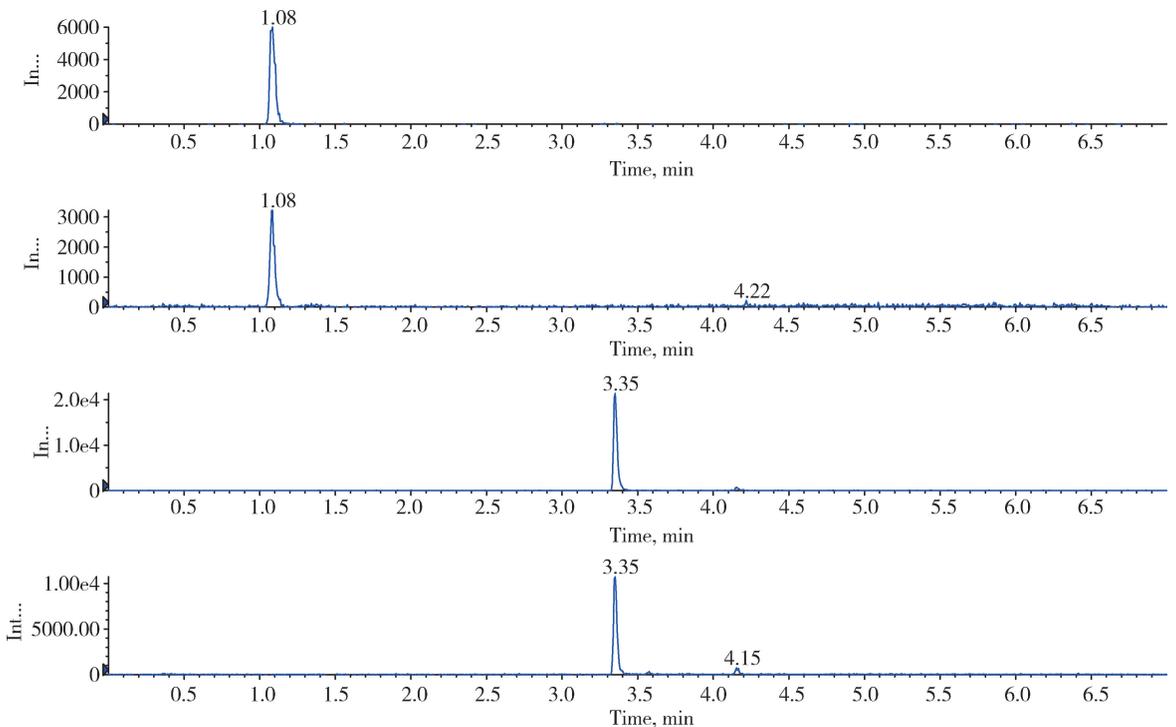


图 5 100 ng/mL 阳性添加样品特征离子质量色谱图

Fig 5 Extraction ion chromatograms of the positive added sample

3 讨论与结论

3.1 流动相的选择 实验选择甲醇(0.1%甲酸)和乙腈(0.1%甲酸)为流动相 A,分别考察了甲醇-水体系和乙腈-水体系分离情况,摒弃了乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(12:88)作为流动相^[8-9],降低了色谱柱因磷酸盐易堵的风险。不断调整流动相比列:甲醇和乙腈由 30% 下降到 15%^[10],最终选择了 5% 乙腈(0.1%甲酸)为流动相 A,不仅能使喹乙醇、乙酰甲喹很好的分离,其特征离子质量色谱图的峰形和分离度比好,而且降低了检测成本,有机试剂使用量较少,保护了环境。

3.2 质谱条件的优化 选择了多反应监测模式,正离子扫描,并不断优化了质谱条件:对离子源温度、去簇电压,碰撞能量等参数进行优化,使药物的离子化程度达到最佳状态。计算结果采用外标法,标准曲线线性良好;样品处理简单,经过 1000 倍的稀释,上机检测杂峰极微,无干扰,分离度好。

3.3 样品提取溶剂、处理方法及的选择 为确保药品中有效成分全部溶解,保证药物临床有效性,分别用甲醇、乙腈、60% 乙腈、5% 乙腈对不同批号的样品稀释并超声提取。直接采用甲醇、乙腈溶解样品,得到供试品溶液杂质成分多,采取 HLB 固相萃取柱净化样品^[11];过程繁琐,上机后柱效差,所得目标峰峰型、分离度均不理想。样品 60% 乙腈超声提取 15 分钟,离心后过滤上机,杂质干扰少,峰形对称,喹乙醇、乙酰甲喹回收率较高。基质匹配标准溶液采用空白基质溶液定容,空白基质溶液在与喹乙醇、乙酰甲喹对照品相同保留时间处,均无色谱峰出现,证明在很大程度上基质效应小,实验准确度高。

3.4 结论 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,且中药组分的干扰较大,故选择高效液相色谱串联质谱方法检测中兽药散剂中违规添加的喹乙醇、乙酰甲喹^[10];喹乙醇是一种基因毒剂、生殖诱变剂,具有致突变、致畸和致癌性。建立其它中兽药单方或复方制剂的喹乙醇、乙酰甲喹的检测方法,对保障人民健康,具有重要的实际意义。

综上所述,MS 串联可解决扶正解毒散中非法添加物喹乙醇、乙酰甲喹的定性、定量问题,消除基质干扰,使检测结果更为准确可靠。检测限低,灵敏度高;适合批量样品分析。其次运行时间短,比文献 HPLC 方法节省了大量流动相^[12-13],经济可行。为治理整顿中兽药中添加违禁药物,严厉打击违法行为,提供了检测依据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典,2015 年版二部 [S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China,2015 edition, volume II [S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南化学药品卷,2010 年版[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Guidelines for the Use of Veterinary Drugs in the Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume of Chemicals,2010[S].
- [3] 吴宁鹏,王丽景,李慧素,等. 五种中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 Veterinary Medicine. 2014,48(12):43-49.
- [4] 农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告 2638 号[S].
Ministry of Agriculture and Rural Area. No. 2638. Bullerion of the Ministry of Agriculture and Rural Area of the People's Republic of China[S].
- [5] 刘自扬,万仁玲,高光,等. 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[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2011,13(05):878-884.
Liu Z Y, Wan R L, Gao G, et al. Determination of two quinoxaline dioxide in Chinese veterinary powder by HPLC-PDAD/MS [J]. World Science and Technology (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica), 2011, 13 (05): 878-884.
- [6] 黄学泓,张林田,张冬辉. 超高效液相色谱串联质谱法测定全价饲料中 5 种喹啉类药物[J]. 饲料检测,2015(11):48-52.
Huang X H, Zhang L T, Zhang D H, Determination of five quinox-

- aline drugs in full - value feed by ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Feed Research, 2015(11):48 - 52.
- [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 Carbaxo, mequindox, Quinolone and Mequindox [J]. Feed China, 2015(23)35 - 38.
- [8] 吴萍, 张明, 许彬. 白头翁散、苍术香连散中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹检查法—高效液相色谱法检测限的测定[C]. 中国畜牧兽医学动物药品学分会第五届全国会员代表大会暨 2011 年学术年会论文集.
- Wu P, Zhang M, Xu B. Detection Limit of Illegal Addition of Ethanol and Ethylphthalide in Baitouweng Powder and Atractylodes Rhizoma Xianglian Powder by High Performance Liquid Chromatography[C]. Thesis Collection of the Fifth National Congress of the Society of Animal Pharmaceutical Sciences of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and the Annual Academic Conference of 2011.
- [9] 吴昊, 刘发全, 宋亚伟, 等. HPLC - DAD 同时检测饲用植物提取物中非法添加喹乙醇和乙酰甲喹的含量[J]. 安徽农业科学, 2018, 46 (24): 152 - 154.
- Wu H, Liu F Q, Song Y W, *et al.* Determination of Olaquinox and Mequindox in Forage Plant Extracts by HPLC - DAD[J]. Anhui Agriculture Science, 2018, 46 (24): 152 - 154.
- [10] 张锦红, 刘勇, 葛长荣, 等. 应用高效液相色谱法检测喹乙醇含量的研究进展[J]. 中国动物保健, 2004, 7:15 - 16.
- Zhang J H, Liu Y, Ge C R, *et al.* Advances in determination of Quinolone by high performance liquid chromatograph [J]. China Animal Health, 2004, 7:15 - 16.
- [11] 周艳飞, 李滢, 王亚芳. HPLC 法测定乙酰甲喹和喹乙醇的方法研究[J]. 饲料检测, 2013(4):67 - 69.
- Zhou Y F, Li H, Wang Y F, *et al.* Determination of acetylme-thaquine and quinolone by HPLC [J]. Feed Research, 2013 (4):67 - 69.
- [12] 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. [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 276 - 278.
- Wang L, Yang Y, Gao L, *et al.* Determination of 11 veterinary drug residues in animal food by high performance liquid chroma-togra. [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2004, 14(3): 276 - 278.
- [13] 李树纲, 丁兴莉, 张蕾, 等. HPLC - DAD 法检测三种兽用中药注射液中非法添加喹乙醇和乙酰甲喹的方法研究[C]. 中国畜牧兽医学动物药品学分会第五届全国会员代表大会暨 2016 年学术年会论文集.
- Li S G, Ding X L, Zhang L, *et al.* Determination of in three veter-inary traditional Chinese medicine injections by HPLC - DAD-Study on the Method of Illegally Adding Olaquinox and Acetylme-thaquine[C]. Thesis Collection of the Fifth National Congress of the Society of Animal Pharmaceutical Sciences of the Chinese So-ciety of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and the An-nual Academic Conference of 2016.

(编辑:陈希)