

超高效液相色谱法测定牧草中 马来酸麦角新碱含量

王博¹, 商方方², 陶玉洁¹, 徐汀¹, 张婧¹, 吴剑平¹, 李俊², 谷旭², 严凤^{1*}

(1. 上海市兽药饲料检测所, 上海 201103; 2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定牧草中马来酸麦角新碱含量的分析方法。**方法** 样品经纯甲醇提取后, 过混合阳离子(MCX)固相萃取柱净化。采用5 mmol/L 乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)(A)和乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱, 超高效液相色谱采用二极管阵列紫外检测器进行定量。**结果** 本方法的检测限为0.5 mg/kg, 定量限为2 mg/kg, 方法在0.05~5 µg/mL范围内线性良好($r=1$), 在2、10和20 mg/kg添加水平的回收率为83.80%~94.49%, 相对标准偏差 $\leq 3.5\%$ ($n=5$), 实际样品测定结果为6.3~194.8 mg/kg。**结论** 本方法具有良好的正确度和精密性, 能有效测定牧草中马来酸麦角新碱含量, 为将来马来酸麦角新碱应用到畜牧业打下了基础。

关键词: 马来酸麦角新碱; 超高效液相色谱法; 牧草

Determination of ergometrine maleate in herbage by ultra performance liquid chromatography

WANG Bo¹, SHANG Fang-Fang², TAO Yu-Jie¹, XU Ting¹, ZHANG Jing¹, WU Jian-Ping¹,
LI Jun², GU Xu², YAN Feng^{1*}

(1. Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China;
2. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for determining ergometrine maleate content in herbage by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** The samples were extracted with pure methanol, and purified using a mixed cation (MCX) solid-phase extraction column. Gradient elution was performed using 5 mmol/L ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phases, and quantitation was performed on UPLC using a diode array UV detector. **Results** The detection limit and quantitation limit of the method were 0.5 mg/kg and 2 mg/kg, respectively. The linearity was good within the range of 0.05–5 µg/mL ($r=1$). The recoveries were 83.80%–94.49% at the 2, 10, and 20 mg/kg levels. The relative standard deviation was less than 3.5% ($n=5$). The actual sample determination results were 6.3–194.8 mg/kg. **Conclusion** This method has good accuracy and precision, and can effectively determine the ergometrine maleate content in forage, which lays a foundation for the application of ergometrine maleate to animal husbandry in the future.

KEY WORDS: ergometrine maleate; ultra performance liquid chromatography; herbage

*通信作者: 严凤, 硕士, 高级畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。E-mail: yan508@163.com

*Corresponding author: YAN Feng, Master, Senior Engineer, Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feed staff, Shanghai 201103, China. E-mail: yan508@163.com

0 引言

牧草产业是我国农业发展的重点项目之一, 2015 年中央一号文提出要加快发展草牧业^[1]。牧草广泛应用于畜牧业, 但被关注的重点一直是其饲用价值^[2-4], 而牧草中营养成分丰富^[5-6], 其价值不应仅仅局限在其饲用价值上^[7-8], 更具有提高繁殖性能和提高屠宰性能等价值^[9-10]。有文献表明农作物能检测出生物碱, 例如夏天时麦草中的麦角新碱浓度达到最高^[11], 在畜牧业减抗、禁抗的大背景下, 马来酸麦角新碱作为一种生物碱或将在养殖业中发挥重要作用。

马来酸麦角新碱(ergonovine maleate, EM)为 9,10-二脱氢-N-[(S)-2-羟基-1-甲基乙基]-6-甲基麦角灵-8 β -甲酰胺马来酸盐, 是一种半合成的麦角生物碱, 对子宫平滑肌有高度选择性, 直接作用于子宫平滑肌, 作用强而持久, 其主要应用于治疗产后子宫出血、产后子宫复旧不全(加速子宫复原)等^[12-14], 但是麦角新碱也会引起过敏反应, 主要表现为头晕、恶心、呕吐、呼吸困难等^[15]。且新生儿误注后会引起中枢神经系统抑制和心脑血管收缩, 表现为神志障碍、尿少、心率快、呼吸急促、恶心呕吐及末梢循环障碍等^[16]。

美国药典(united states pharmacopeia, USP)对 EM 注射液及片剂规定中, 选用薄层色谱法对其含量进行测定^[17], 中国药典对 EM 原料及注射液规定中, 选用滴定法及紫外-可见分光光度法对其含量进行测定^[18]。国内外对牧草中马来酸麦角新碱检测及含量等尚未有相关标准及规定, 且尚未有相关文献对牧草中马来酸麦角新碱进行介绍, 本研究建立了一种超高效液相色谱法对牧草中马来酸麦角新碱含量进行测定, 为牧草中马来酸麦角新碱应用到畜牧业打下基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(上海沃特世科技有限公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(德国 BECKMAN 公司); VX-III 多管漩涡振荡器(北京 TARGIN 公司); AL204 电子天平(0.0000~210.0000 g, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); N-EVAP 水浴控温氮吹仪(上海安谱公司)。

甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 马来酸麦角新碱标准品(100 μ g/mL, 美国 A Chemtek Inc 公司); 乙酸铵、氨水(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司)。马来酸麦角新碱标准品化学结构式见图 1。

空白和实际牧草样品均为醉马草, 均由中国农业科学院饲料研究所寄送, 样品是风干后的干样, 将干样样品用粉碎机粉碎, 全部通过 0.42 mm 孔径筛, 混匀后常温避光保存。

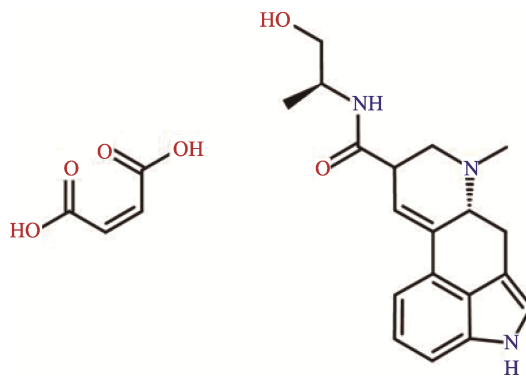


图 1 马来酸麦角新碱结构式

Fig.1 Structure of ergometrine maleate

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

流动相: A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸); B: 乙腈; 色谱柱: Waters T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 洗脱方式: 梯度洗脱, 洗脱方式见表 1; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

Table1 Procedure of gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0	85	15
2.7	85	15
2.8	0	100
4.2	0	100
4.3	85	15

1.2.2 标准品准备与处理

将标准品置于-20 $^{\circ}$ C冰柜避光保存, 保存期限为 1 年。

1.2.3 样品准备与处理

称取粉碎混匀后的样品 1 g 至 50 mL 离心管中, 精密加入 10 mL 甲醇, 涡匀后继续振荡 10 min, 9000 r/min 离心 5 min, 精密取 1 mL 置于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 0.1% 甲酸溶液, 混匀备用。

将 MCX 固相萃取小柱(60 mg/3 mL)用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化后, 取备用液全部过柱, 再用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗后, 用 3 mL 5%氨水甲醇洗脱, 将洗脱液置于 50 $^{\circ}$ C水浴氮气吹干后用 1 mL 15%乙腈复溶, 过 0.22 μ m 滤膜后, 待测。

2 结果与分析

2.1 仪器条件优化

根据前期文献查询^[19-20], 实验对色谱柱和流动相进行考察, 比较了 Agilent C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)、

Waters C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 和 Waters T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 3 根色谱柱, 并在此基础上比较了 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%):乙腈(80:20, V:V)、5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%):乙腈(90:10, V:V)、5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸):乙腈(85:15, V:V)、0.1%甲酸溶液:乙腈(85:15, V:V) 和 0.1%甲酸溶液:乙腈(90:10, V:V) 5 种流动相, 结果发现, 当色谱柱为 Waters T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 时, 目标峰峰型对称, 色谱峰尖锐且响应高, 当流动相为 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸):乙腈(85:15, V:V) 时, 目标峰出峰时间较早, 峰形尖锐且对称, 响应高。因此本研究选择 Waters T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 作为本研究的色谱柱, 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸):乙腈(85:15, V:V) 作为流动相。条件优化后的目标物色谱图如图 2 所示, 紫外吸收图谱如图 3 所示。

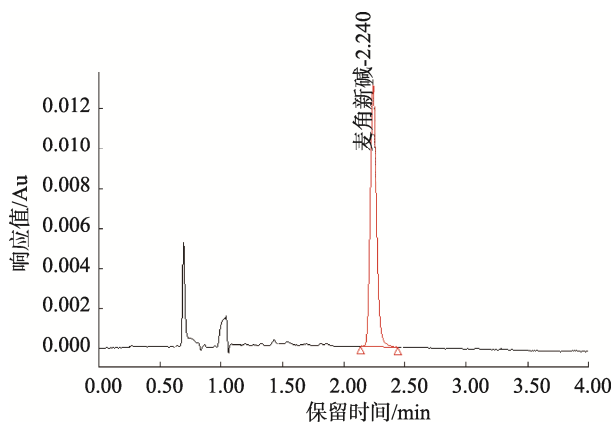


图2 浓度为 1 μg/mL 的标准品色谱图
Fig.2 Chromatogram of standard at 1 μg/mL

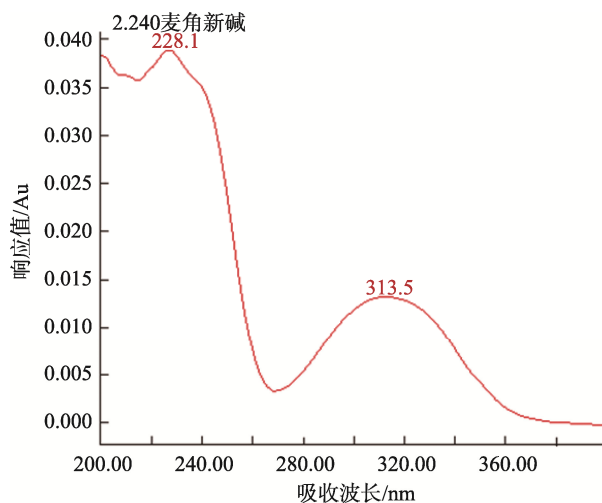


图3 浓度为 1 μg/mL 的标准品紫外吸收光谱图
Fig.3 UV absorption spectrum of standard at 1 μg/mL

2.2 前处理条件优化

2.2.1 净化条件优化

实验通过向空白牧草中添加 20 mg/kg 浓度的马来酸麦角新碱, 然后用甲醇进行提取, 比较了 HLB (60 mg/3 mL)、PRIME HLB (60 mg/3 mL) 和 MCX (60 mg/3 mL) 3 种固相萃取小柱。结果如图 4 所示, 回收率分别为 6.17%、19.11% 和 83.85%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 3.38%、0.66% 和 1.18%, 当选择 HLB (60 mg/3 mL)、PRIME HLB (60 mg/3 mL) 时, 提取效率变低, 而当 MCX (60 mg/3 mL) 作为净化用的固相萃取小柱时, 提取效率最高, 且能有效去除样品中带来的杂质干扰, 这有可能是因为 MCX (60 mg/3 mL) 对碱性化合物有良好的保留能力, 而基质中的大部分杂质并非碱性, 在淋洗过程中大部分都被洗掉, 因此, 本研究选择 MCX (60 mg/3 mL) 作为净化用的固相萃取小柱。

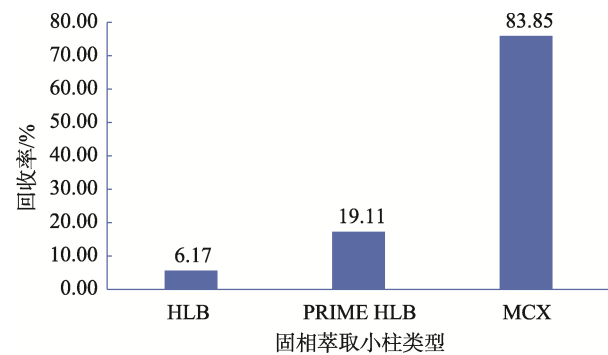


图4 不同净化条件比较(n=3)
Fig.4 Comparison of different purification conditions (n=3)

2.2.2 提取剂条件优化

农业行业标准 NY/T 2769—2015 《牧草中 15 种生物碱的测定 液相色谱-串联质谱法》对牧草中 15 种生物碱进行提取测定, 标准中规定使用碱性乙腈作为提取溶剂, 但是并未对马来酸麦角新碱提取作出规定, 因此本研究选择甲醇、乙腈和乙酸乙酯作为提取溶剂来考察。实验通过向空白牧草中添加 20 mg/kg 浓度的马来酸麦角新碱, 比较了甲醇、乙腈和乙酸乙酯的提取效率, 结果如图 5 所示, 回收率分别为 84.04%、76.76% 和 76.58%, RSD 分别为 0.24%、0.49% 和 1.91%, 当提取剂为甲醇时, 提取效率最高, 因此, 本研究选择甲醇作为提取溶剂。

2.3 绘制标准曲线

取适量标准品溶液, 用 15% 乙腈稀释成马来酸麦角新碱质量浓度为 0.05、0.1、0.5、1 和 5 μg/mL 的标准曲线系列工作溶液, 在优化的仪器条件下上机测定, 以各浓度的响应值为 Y 轴, 浓度为 X 轴绘制标准曲线, 计算线性方程、线性范围和相关系数, 具体结果见表 2。结果表明, 目标物在 0.05~5 μg/mL 范围内, 线性良好。

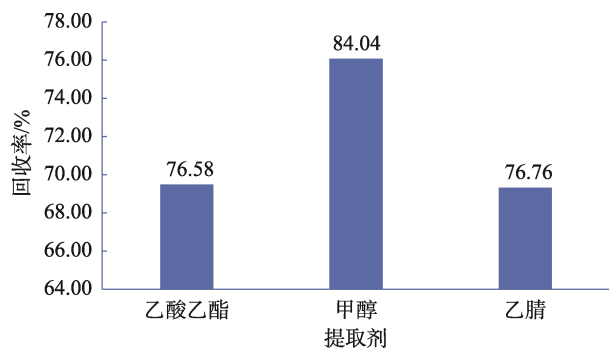


图 5 不同提取剂提取效率比较(n=3)

Fig.5 Comparison of extraction efficiency with different extractants (n=3)

表 2 马来酸麦角新碱的线性方程、线性范围和相关系数
Table 2 Linear equation, linear range and correlation coefficient of ergometrine maleate

化合物	线性方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r
马来酸麦角新碱	$Y=46660X-274.31$	0.05~5	1

2.4 检测限与定量限

在空白实际样品中添加质量浓度为 0.5 和 2 mg/kg 的马来酸麦角新碱, 按照优化好的前处理方法进行处理后上样分析, 所得色谱图如图 6~8 所示, 依据信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限, 信噪比 $S/N \geq 10$ 作为定量限, 结果表明本方法的检测限为 0.5 mg/kg, 定量限为 2 mg/kg。

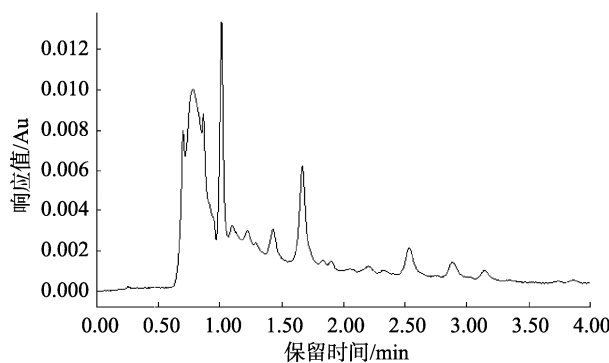


图 6 空白牧草样品色谱图

Fig.6 Chromatogram of blank herbage sample

2.5 回收率与精密度

选取空白牧草基质, 加入一定浓度马来酸麦角新碱对照品, 从 2、10、20 mg/kg 3 个不同浓度水平考察回收率及精密度, 结果见表 3。结果表明, 各浓度添加的批内回收率在 83.80%~94.49%之间, 批内标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 0.2%~3.5%之间; 批间回收率在 84.7%~92.3%之间, 批间 RSD 在 0.9%~3.0%之间。结果均符合 GB/T 23182—2008《饲料中兽药及其他化学物检测试

验规程》。

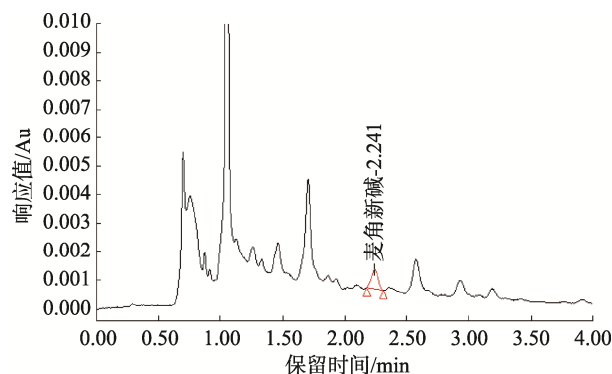


图 7 空白牧草样品添加 0.5 mg/kg 马来酸麦角新碱色谱图

Fig.7 Chromatogram of blank herbage sample added 0.5 mg/kg ergometrine maleate

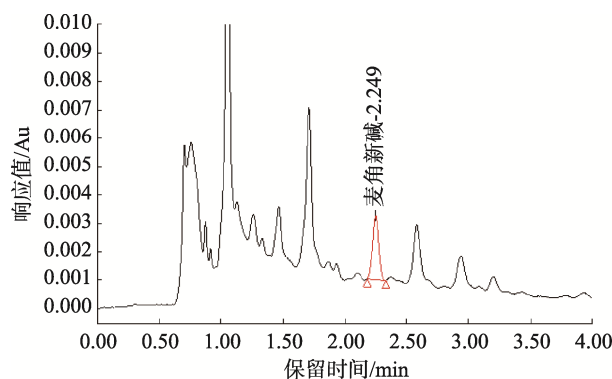


图 8 空白牧草样品添加 2 mg/kg 马来酸麦角新碱色谱图

Fig.8 Chromatogram of blank herbage sample added 2 mg/kg ergometrine maleate

表 3 牧草中马来酸麦角新碱的添加回收率及相对标准偏差(n=5)
Table 3 Recovery rate and relative standard deviation of ergometrine maleate in herbage (n=5)

添加浓度/(mg/kg)	批次	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
2	1	89.93	1.7		
	2	92.59	3.5	92.3	3.0
	3	94.49	0.7		
10	1	85.43	0.5		
	2	85.17	1.4	85.5	1.0
	3	85.91	0.8		
20	1	85.52	0.2		
	2	84.77	0.6	84.7	0.9
	3	83.80	0.2		

2.6 实际样品测定

按照本研究确定的方法,对收集到的4批牧草样品进行测定,测定结果如表4所示。结果表明,样品中马来酸麦角新碱的含量为6.3~194.8 mg/kg。其中,实际牧草样品1提取色谱图见图9。

表4 实际样品测定结果($n=3$)
Table 4 Results of actual sample ($n=3$)

样品名称	测定结果/(mg/kg)	RSD/%
牧草1	194.8	0.4
牧草2	96.5	0.1
牧草3	19.6	0.7
牧草4	6.3	0.1

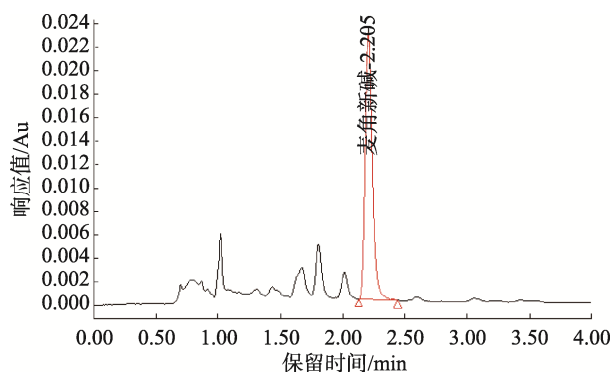


图9 实际牧草样品1提取色谱图

Fig.9 Chromatogram of actual herbage sample 1 extraction

3 结论与讨论

本研究建立了一种超高效液相色谱法测定醉马草中马来酸麦角新碱含量,检测限为0.5 mg/kg,定量限为2 mg/kg,含量在0.05~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好($r=1$),加标回收率为83.80%~94.49%, $\text{RSD} \leq 3.5\%$ 。由此可知,本方法具有良好的正确度和精密度,能有效测定牧草中马来酸麦角新碱含量,为将来马来酸麦角新碱应用到畜牧业打下了基础,测定的牧草实际样品中也检测出有马来酸麦角新碱,这也为牧草中生物碱将来被应用到畜牧业提供了理论支撑。

参考文献

[1] 农业部. 农业部关于印发《粮改饲工作实施方案》的通知[EB/OL]. [2017-06-20]. http://www.moa.gov.cn/nybg/2017/dlq/201712/t20171231_6133718.htm. [20210-01-22].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Notice of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China on the implementation plan of replacing grain crop with feed crop policy

[EB/OL]. [2017-06-20]. http://www.moa.gov.cn/nybg/2017/dlq/201712/t20171231_6133718.htm. [20210-01-22].

[2] 邓生荣. 应用优质牧草发展草食动物[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(12): 58-59.

DENG SR. Application of high quality forage to develop herbivores [J]. Chin Live Poul Breed, 2020, 16(12): 58-59.

[3] 高新, 杨维林, 梁家充, 等. 云南省家庭养殖农家饲草料高效利用策略-铁核桃枯、草果茎叶[J]. 云南畜牧兽医, 2021, (1): 28-31.

GAO X, YANG WL, LIANG JC, et al. Efficient utilization strategy of forage in family farming in Yunnan province-Iron walnut, stem and leaf of tsaokuo [J]. Yunnan J Anim Sci Vet Med, 2021, (1): 28-31.

[4] 曹允. 优质牧草在生态畜牧养殖中的应用进展[J]. 山东畜牧兽医, 2021, 42(1): 56-59.

CAO Y. Application progress of high quality forage in ecological animal husbandry [J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2021, 42(1): 56-59.

[5] 张志儒, 李超欣, 马骏, 等. 高蛋白饲草串叶松香草不同生长期营养成分分析[J]. 中国饲料, 2020, (21): 130-133.

ZHANG ZR, LI CX, MA J, et al. Analysis of nutritional components in different growth stages of high protein forage pinus bungeana [J]. China Feed, 2020, (21): 130-133.

[6] 王聪, 张登辉, 魏占虎, 等. 金盏花籽、串叶松香草与多年生黑麦草营养成分的对比分析研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2020, 39(6): 4-6.

WANG C, ZHANG DH, WEI ZH, et al. Comparative analysis and study on nutritional components of marigold stem, silphium perfoliatum and perennial ryegrass [J]. Anim Sci Vet Med, 2020, 39(6): 4-6.

[7] 赖大伟, 滕少花, 姚娜, 等. 台湾甜象草对肉牛的饲用价值研究[J]. 当代畜牧, 2014, (32): 83-85.

LAI DW, TENG SH, YAO N, et al. Study on the feeding value of Taiwan sweet elephant grass to beef cattle [J]. Contemp Anim Husbandry, 2014, (32): 83-85.

[8] 白春生, 佟明昊, 赵萌萌, 等. 施氮量和留茬高度对高丹草青贮发酵品质及饲用价值的影响[J]. 草地学报, 2020, 28(5): 1421-1426.

BAI CS, TONG MH, ZHAO MM, et al. Effects of nitrogen application rate and stubble height on fermentation quality and feeding value of Gaodancao silage [J]. Acta Agrestia Sin, 2020, 28(5): 1421-1426.

[9] 丁飞, 王升平. 日粮中添加皇竹草对母猪繁殖性能的影响[J]. 中国猪业, 2019, (4): 31-35.

DING F, WANG SP. Effects of dietary supplementation of *Pennisetum hybridum* on reproductive performance of sows [J]. China Swine Ind, 2019, (4): 31-35.

[10] 胡民强, 胡敏华. 日粮中皇竹草粉含量对马岗鹅屠宰性能及肉质的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, (6): 71-72.

HU MQ, HU MH. Effects of the content of *Pennisetum hybridum* meal in diet on slaughter performance and meat quality of magang geese [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2012, (6): 71-72.

[11] VERONIKA V, BENJAMIN F, MARKUS K, et al. Alkaloid concentrations of *Lolium perenne* Infected with *Epichlo festucae* var. lolii with different detection methods-A re-evaluation of intoxication risk in germany? [J]. J Fung, 2020, 6(3): 1-17.

[12] 郭瑞, 杜敏霞, 魏红霞, 等. 改良产后出血预测评分表指导下应用麦角新碱与卡前列素氨丁三醇预防产后出血的效果[J]. 中国实用医刊, 2020, 47(18): 73-75.

GUO R, DU MX, WEI HX, et al. Effect of ergonoxine and carboprost

- tromethamine on prevention of postpartum hemorrhage under the guidance of modified postpartum hemorrhage prediction score [J]. *Chin J Pract Med*, 2020, 47(18): 73–75.
- [13] 胡宇博, 王俊容, 王皓莹, 等. 卡贝缩宫素与麦角新碱联合缩宫素预防产后出血的临床效果观察[J]. *长春中医药大学学报*, 2021, 37(1): 126–128.
- HU YB, WANG JR, WANG HY, *et al.* Carbetocin acetate and ergonoxine combined with oxytocin in prevention of postpartum hemorrhage [J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2021, 37(1): 126–128.
- [14] 李志瑞, 王丽均. 麦角新碱+缩宫素治疗产后出血的临床效果及有效率评价[J]. *医学食疗与健康*, 2021, 19(2): 35–36.
- LI ZR, WANG LJ. Clinical effect and efficiency evaluation of ergonoxine and oxytocin in the treatment of postpartum hemorrhage [J]. *Med Die Health*. 2021, 19(2): 35–36.
- [15] 阚延静. 麦角新碱引起过敏 2 例报告[J]. *江苏医药*, 1994, (5): 236.
- KAN YJ. Ergometrine induced allergy: A report of 2 cases [J]. *Jiangsu Med J*, 1994, (5): 236.
- [16] 苏慧琴. 麦角新碱中毒 1 例[J]. *陕西医学杂志*, 1993, (6): 327.
- SU HQ. Ergometrine poisoning: A case report [J]. *Shaanxi Med J*, 1993, (6): 327.
- [17] The United States Pharmacopeial. Convention.U.S. Pharmacopeia42/ National Formulary37 [Z]. 2019.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- National Pharmacopoeia Committee. The pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [19] RUDOLF K, GEORGE S, ROY M, *et al.* Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391: 563–576.
- [20] SJULIA K, MICJAL W, PIOTR K, *et al.* Identification and determination of ergot alkaloids in morning glory cultivars [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(12): 3093–3102.

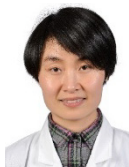
(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



王 博, 助理畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。

E-mail: wangbo1839@sina.com



严 凤, 硕士, 高级畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。

E-mail: yan508@163.com