

高效液相色谱-二极管阵列检测器用于兽药非法添加物质检查的优劣性分析

韩宁宁,徐 嫻,于丽娜,张 璐,戴 青,赵 晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 04-0066-04 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 阐述了高效液相色谱-二极管阵列检测器在兽药非法添加物质检查应用中的优势与局限:其优势在于方法特异性强、仪器普及面广、操作简单;局限在于无法鉴别光谱图库外的未知化合物,部分化合物在不同色谱条件下光谱图差异大难溯源,无法检出无紫外吸收的化合物。另外,进一步对应用该法的发展趋势进行了展望,以期对兽药非法添加打击治理工作提供参考。

[关键词] 兽药;非法添加;高效液相色谱-二极管阵列检测器;优势;局限;发展趋势

Advantages and Disadvantages of HPLC-PDA Method Used in the Inspection of Illegal Adulteration in Veterinary Drugs

HAN Ning-ning, XU Yuan, YU Li-na, ZHANG Lu, DAI Qing, ZHAO Hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The advantages and disadvantages of HPLC-PDA method used in the inspection of illegal adulteration in veterinary drugs were elaborated. This method has good specificity, widespread popularity, and simple operation. However it cannot identify the unknown compounds out of PDA spectral library or compounds without UV absorption, and some compounds which have different PDA spectra under different chromatographic conditions are difficult to trace. The development trend of the application of this method was prospected in order to provide reference for the renovation of illegal adulteration in veterinary drugs.

Key words: veterinary drugs; illegal adulteration; HPLC-PDA; advantages; disadvantages; development trend

随着兽药产业市场竞争的激烈化,某些兽药生产企业为了降低生产成本,或者提高产品的治疗效果,在兽药制剂中非法添加处方外成分,甚至添加国家明令禁止使用的成分,对兽药行业的健康发展

带来了极为恶劣的影响。近年来,国家对兽用药品处方外非法添加的打击力度逐年增大。2014-2015年,农业部连续两年将兽用抗菌药处方外非法添加专项检查作为全国农产品质量安全监管工作

作者简介:韩宁宁,硕士,从事抗生素检验检测工作。

通讯作者:赵 晖。E-mail:171977364@qq.com

重点之一, 2015 年 7 月, 出台《全国兽药(抗菌药)综合治理五年行动方案》, 明确要求强化非法兽药查处力度。与此同时, 以高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-PDA)为主导的兽药处方外非法添加检查方法也日益成熟, 农业部目前颁布的相关公告中大部分涉及该法^[1-11]。本文通过总结日常检验工作中使用 HPLC-PDA 法进行非法添加物质检查的经验, 归纳出该法在相关应用中的优势与不足, 并对非法添加物质检查的发展趋势进行了展望。

1 HPLC-PDA 在兽药处方外非法添加物检查应用中的优势

1.1 方法特异性强, 不易误判 具有紫外发色团的常见兽用化学药品的紫外光谱图信息特异性强, 且可根据光谱形状大致分类(如解热镇痛类、磺胺类、氟喹诺酮类等兽药), 易于非法添加物的初步分类判断。通过保留时间与紫外光谱图的对比可基本锁定目标添加物, 再通过液相软件中的纯度判断功能与 PDA 光谱匹配功能, 可进一步确认目标添加物, 不易造成误判错判。

1.2 仪器普及面广, 利于推广应用 高效液相色谱法作为一种分离效率高、选择性好、操作自动化的仪器方法, 自 20 世纪 60 年代后期发展起来后得以迅速推广, 现行的二〇一〇年版《中国兽药典》中收录的抗菌药, 具有紫外吸收且成分单一的品种, 大多采用 HPLC 法。而 20 世纪 80 年代发展起来的二极管阵列检测器, 由于一次进样可以得到丰富的定性定量信息, 数据处理快速简便, 已逐渐发展为高效液相色谱仪的标准配置。相对于液相质谱联用仪动辄上百万的采购价格, HPLC-PDA 几十万甚至国产仪器十几万的价格更易于为检验单位所接受。目前我国的兽药检验领域, 从国家所至市级所, 以及各大中型兽药企业, HPLC-PDA 已较为普及。仪器的普及面广, 是检验方法得以推广应用的根基。

1.3 操作简单, 对人员环境要求低 相对于 MS 复杂的配置与参数调节, HPLC-PDA 组成相对简单,

实验涉及的参数选择也仅有流速、柱温、波长、进样量等几个, 实验人员经相应培训后即可操作。仪器放置于普通分析实验室即可, 不需要特殊的防尘、降噪及恒温环境。

2 HPLC-PDA 在兽药处方外非法添加物检查应用中的局限

2.1 PDA 光谱图库覆盖面有限, 无法鉴别库外的化合物 作为非法添加物检查方法研究的牵头单位, 中监所化药室目前已建立了 70 余个品种的常见兽用化学药品 PDA 光谱图库。然而, 根据目前的检验结果可知, 非法添加物的涉及范围是十分广泛的, 人用药(如沙丁胺醇^[7]、头孢噻肟^[11]等)及具有抗菌作用的辅料(如苯甲酸等)均有检出。相对于多级裂分的高分辨质谱能够提供精确分子量与碎片离子峰而言, PDA 仅能提供未知物的光谱图及最大吸收波长等信息, 对于光谱图库外的未知添加物的结构解析信息指向性较差。虽然通过扩充光谱图库可以使其覆盖面增大, 但仅凭光谱图这一信息对于未知添加物的结构推断而言信息量过少。

2.2 部分化合物在不同色谱条件下光谱图差异较大, 难以溯源 结构中含有对酸性或碱性条件不稳定的基团(如 β -内酰胺环、酰胺键等)的化合物, 可能受酸性或碱性流动相的影响而降解, 产生的色谱图实际上是降解物的色谱图。我们在检验中即发现, 头孢噻肟(结构中含有 β -内酰胺环)在酸性色谱条件[磷酸溶液-乙腈(取磷酸 3.0 mL, 加水至 1000 mL, 用三乙胺调 pH 值至 3.0, 加乙腈 53 mL, 摇匀)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 甲醇为流动相 C, A:B:C 为 85:5:5.0:9.5]下的光谱图与在中性色谱条件[磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 3.0 g, 加水 1000 mL 使溶解, 加三乙胺 0.5 mL, 用饱和氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0)-甲醇(70:30)]下的光谱图不完全一致, 参见图 1-图 2。分析可能是由于酸性色谱条件导致 β -内酰胺环 3 号位的侧链断裂, 降解物的紫外发色团与头孢噻肟

有差异所致(图3)。虽然目前的光谱数据库中已包含了目标化合物的色谱条件,但对于未知化合物,当不同色谱条件下光谱图变化较大,又没有考虑色谱条件酸碱性的影响时,很难仅通过光谱图对未知添加物进行溯源。

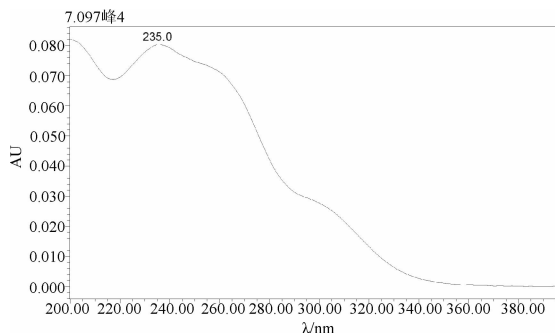


图1 头孢噻肟在中性色谱条件下的光谱图(待发表)

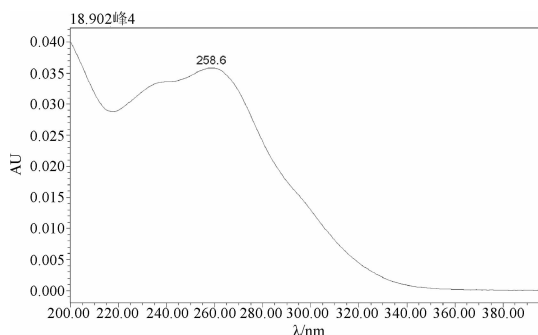


图2 头孢噻肟在酸性色谱条件下的光谱图(待发表)

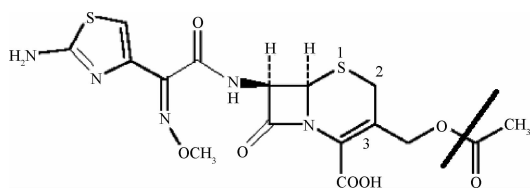


图3 头孢噻肟在酸性色谱条件下降解原理示意图(待发表)

2.3 无法检测没有紫外吸收的未知添加物,容易造成漏筛 PDA 检测器仅对具有紫外发色团的化合物产生响应,对没有紫外吸收的化合物仅有少数品种(如卡那霉素^[12]、盐霉素^[13])可通过柱前或柱

后衍生法进行检测。农业部目前发布的非法添加物检查公告中,没有一项是针对无紫外吸收的化合物。采用该法进行筛查,对于无紫外吸收的化合物,尤其是抗生素类(如大环内酯类、氨基糖苷类、聚醇醚类等)容易造成漏筛。

3 应用 HPLC-PDA 进行非法添加物检查的发展趋势

3.1 进一步扩大完善光谱图库,加强推广普及光谱图库的覆盖面决定了筛查范围的大小。随着非法添加物检查工作的推进,我们正不断的将新发现添加物的光谱图补充进数据库,将数据库图谱整理成册的工作也正在进行中。然而,在全国范围内进行非法添加物的长期专项打击治理,还需要各省市级兽药检验单位的积极参与与信息共享。

3.2 建立常见兽用化学药品质谱数据库,形成 PDA-MS 联合筛查新常态 虽然 UPLC-MS 法在非法添加物质检查中已有所应用^[14-16],但目前农业部批准的涉及该法的公告仅 2 个,尚未形成法律体系,难以形成打击力度。目前农业部发布的非法添加物检查公告中,涉及 UPLC-MS 法的仅有两个方法^[9]。目前常见兽用化学药品多级高分辨质谱数据库的信息尚不完善,难以形成筛查规模。因此急需建立兽用化学药品,尤其是没有紫外吸收的化学药品质谱数据库,以完成 PDA 筛查后的 MS 二级筛查,进一步避免漏筛。

3.3 引入近红外光谱、拉曼光谱等快速筛查方法的预筛机制 近红外光谱及拉曼光谱由于操作简便快速、无需更多样品前处理步骤而在人用药品非法添加物质检查中得以应用^[17],二者适于安在快检车中执行飞行检查、专项检查等特殊任务。然而,目前在兽用药品非法添加物质检查领域,二者均未得到应用。若将二者引入 PDA 筛查之前的预筛步骤,可快速锁定非法添加可疑样品,再应用 PDA 进行进一步验证,可较大程度的提高非法添加物质筛查工作效率。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部公告第 1848 号. 黄芪多糖注射液非法添加解热镇痛类、抗病毒类、抗生素类、喹诺酮类等 11 种化学药物(物质)检查方法和肥猪散、健胃散、银翘散等中兽药散剂中非法添加氟喹诺酮类化学药物(物质)检查方法[S]. 2012.
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 1868 号. 氟喹诺酮类制剂中非法添加乙酰甲唑、唑乙醇等化学药物检查方法[S]. 2012.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 1924 号. 氟苯尼考粉和氟苯尼考预混剂中非法添加氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的检查方法[S]. 2013.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 1934 号. 氟苯尼考制剂中非法添加磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶的检查方法[S]. 2013.
- [5] 中华人民共和国农业部公告第 1956 号. 乳酸环丙沙星注射液中非法添加对乙酰氨基酚检查方法[S]. 2013.
- [6] 中华人民共和国农业部公告第 2085 号. 阿莫西林可溶性粉中非法添加解热镇痛类药物检查方法[S]. 2014.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 2508 号. 注射用青霉素钾(钠)中非法添加解热镇痛药物检查方法等 11 个兽药非法添加化学药物(物质)检查方法[S]. 2014.
- [8] 中华人民共和国农业部公告第 2278 号. 鱼腥草注射液中非法添加甲氧氯普胺检查方法[S]. 2015.
- [9] 中华人民共和国农业部公告第 2320 号. 鱼腥草注射液中非法添加林可霉素检查方法等 3 个兽药非法添加化学药物(物质)检查方法[S]. 2015.
- [10] 中华人民共和国农业部公告第 2333 号. 扶正解毒散中非法添加茶碱、安乃近检查方法等 5 个兽药非法添加化学药物(物质)检查方法[S]. 2015.
- [11] 中华人民共和国农业部公告第 2353 号. 硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加头孢噻肟检查方法[S]. 2016.
- [12] 张明媛,常 靓,刘长海,等. 柱前衍生化高效液相色谱法检测硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素含量的改进[J]. 药学实践杂志,2013,31(5):343-346.
- [13] 徐恩民,刘少宁,李淑花,等. 高效液相色谱法测定盐霉素预混剂中盐霉素 A 的含量[J]. 中国兽药杂志,2013,47(8):52-54.
- [14] 胡兴娟,吴宁鹏,董瑞静,等. UPLC-MS/MS 测定 4 种兽药制剂中非法添加阿托品的方法研究[J]. 中国兽药杂志,2014,48(11):49-52.
- [15] 魏秀丽,高迎春,张传津,等. UPLC-MS/MS 法测定中兽药中非法添加物金刚烷胺[J]. 中南药学,2014,12(4):363-366.
- [16] 高迎春,魏秀丽,杨 林,等. TLC 及 UPLC-MS/MS 法检测中兽药散剂中磺胺类药物[J]. 中兽医医药杂志,2010,(3):41-44.
- [17] 韩 莹. 非法添加药物成分快速检测方法研究及应用进展[J]. 中国药物滥用防治杂志,2015,21(2):106-110.

(编辑:李文平)