

兽药制剂中非法添加化学药物现状及检测技术研究进展

董玲玲,于晓辉,范强,赵晖,韩宁宁,杨秀玉,万仁玲*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-08-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0011-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 针对目前兽药制剂中非法添加的情况,本文对近年来兽药制剂中非法添加化学药物情况,已查明用于非法添加的化学药物,以及目前用于兽药制剂中非法添加化学药物的检测技术进行综述,并对非法添加物的筛查思路提出展望。

[关键词] 非法添加;兽药制剂;检测技术

Research Progress on Detection Technologies and the Current Situation for Chemical Drugs Illegally Adulterated in Veterinary Preparations

DONG Ling - ling, YU Xiao - hui, FAN Qiang, ZHAO Hui,

HAN Ning - ning, YANG Xiu - yu, WAN Ren - ling*

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

Abstract: This paper summarized the current situation of the chemical drugs illegally adulterated in veterinary preparations, the analytical methodologies utilized for the detection of these drugs, and the prediction of the methods can be used in inspecting of these drugs.

Key words: illegally adulterated; veterinary preparations; detection technologies

我国是人口大国,畜禽产品的需求量非常大,这就带动了兽药市场的繁荣。截至 2016 年底,国家批准的兽药生产企业有 2093 家,另外还有进口兽药生产企业,兽药产业的市场竞争十分激烈。某些兽药生产企业为在市场竞争中占得一席之地,使用了“非常手段”:在兽药制剂中非法添加处方外化学药物以达到提高产品防治疾病的效果或者减少不良反应的目的,这不仅扰乱了兽药市场,也给畜

牧养殖业带来了极大的安全隐患。随着国家对农产品质量安全的日益重视,农业部对兽药处方外非法添加的监管与打击力度也不断加大,近年陆续发布了兽药处方外非法添加物检查的公告作为检验依据^[1-3]。为了更好的监测兽药制剂中非法添加化学药物提供技术支持,本文以近年来兽药制剂中非法添加化学药物现状为切入点,对非法添加的化学药物,检测技术做一综述,并对筛查思路提出展望。

基金项目:“十二五”科技支撑计划(2015BAD11B03-4)

作者简介:董玲玲,硕士研究生,从事兽药检验方面工作。

通讯作者:万仁玲。E-mail:wanrenling@ivdc.org.cn

1 兽药制剂非法添加化学药物现状

自 2008 年在监督抽检兽药中发现处方外药物以来,兽药制剂中非法添加化学药物的情况时有发生。根据近年来对兽药制剂的监测以及文献调研情况,目前兽药制剂中非法添加化学药品存在下列情况:(1)添加药物的种类繁多:a. 常见的有对乙酰氨基酚、安乃近等解热镇痛类药物;氟喹诺酮类、磺胺类等抗菌药物;茶碱、氨溴索等镇咳平喘类药物;还有 β -受体激动剂等^[4]。曾经发现,仅黄芪多糖注射液一种制剂中发现的非法添加药物就多达 11 种^[1]。b. 添加违禁药品及人用药,如林中等发现兽药中添加了氯霉素类和硝基呋喃类药物^[5]。(2)添加方式多样:a. 以同类药物替代标称药物,如 2014 年监督抽检过程中发现标称磺胺间甲氧嘧啶钠注射液实际检出药物为磺胺嘧啶。b. 存在一种制剂非法添加多种药物的情况,有的制剂添加的多种药物为同类药物^[6],有些干脆添加多种不同类药物,组成“包治百病的超级复方”,如 2015 年监督抽检过程中发现在鱼腥草注射液中非法添加了水杨酸、

氧氟沙星和林可霉素^[3,7]。(3)添加剂量随意:存在“想加就加,加多加少随意”的情况。例如检出频次较高的乙酰甲喹、甲氧苄啶等在不同兽药制剂中的添加量并不相同。(4)添加手段愈发“高明”,早期最常见的是在预混剂、可溶性粉或中兽药散剂等粉、散剂型中进行添加,简单方便;后来发现注射液等液体制剂中也有非法添加的现象,添加手段变得更加隐蔽。兽药制剂非法添加的乱象,侵害了符合《兽药生产质量管理规范》要求的生产企业的正当利益,“劣币驱逐了良币”;同时,也给不明真相使用了含有非法添加药物的畜禽养殖业带来了安全隐患和损失,很多动物源性食品的兽药残留正是因为滥用或使用假劣兽药造成的。

2 近年来兽药制剂中非法添加化学药物的汇总

根据近年来兽药监督抽检和兽药制剂的监测结果,将兽药制剂中非法添加的药物进行汇总,结果见表 1,中兽药散剂和注射液是非法添加的重灾区,其次抗菌类兽药的可溶性粉也常有非法添加的现象发生。

表 1 兽药制剂中非法添加化学药物情况汇总表

兽药制剂类型	非法添加药物名称
中兽药散剂	(乙酰甲喹、喹乙醇、甲氧苄啶、安乃近、对乙酰氨基酚、氨基比林、恩诺沙星等喹诺酮类、磺胺嘧啶等磺胺类、氨茶碱、二羟丙茶碱)*、盐酸溴己新、维生素 C、未知晶片
中兽药注射液/口服液	利巴韦林、林可霉素、地塞米松磷酸钠、盐酸吗啉胍、水杨酸、甲氧氯普胺
兽用可溶性粉/预混剂	甲硝唑、地美硝唑、克拉维酸钾、双氯芬酸钠、呋马唑酮、四环素、尼可刹米、头孢噻肟等头孢类、吡喹酮

* 添加频次高,也曾发现被非法添加在其余兽药制剂中

3 兽药制剂中非法添加化学药物检测技术研究进展

为了规范兽药市场,实现安全用药,农业部不断加大兽药处方外非法添加的打击力度,这就需要强大的技术手段作支撑。目前兽药制剂中非法添加化学药物检测有筛查与确证两部分工作,常用的检测技术方法主要有显微镜检查法、薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法等。近年来兽药制剂中非法添加药物的筛查与确证技术不断提升,也借鉴了一些国内外同行筛查与确证非法添加物的方法。

3.1 显微镜检查法

早在 2009 年,农业部组织开展了首批兽药国家补充检查方法的研究制订工作,以农医发[2009]17 号文件颁布了三个检查方法,是针对中兽药散剂中非法添加氯霉素、喹乙醇、乙酰甲喹、呋喃唑酮、

呋喃西林、呋喃妥因的检查^[8]。此后,对中兽药散剂进行显微鉴别时若发现处方外晶片,符合上述添加药物特征的可以直接判定,其余的则用高效液相色谱法等进一步筛查与确证。显微镜检查法在中兽药散剂非法添加药物筛查与确证方面发挥了重要的作用。

3.2 薄层色谱法(TLC 法)

薄层色谱法方便快捷,能够快速锁定非法添加药物的类别,可以作为初步筛查方法,为高效液相色谱法,液质联用、气质联用等方法进行进一步确证提供参考。

郝丽华等^[9]建立了黄芪多糖注射液中非法添加的安乃近、恩诺沙星等 6 种药物的薄层色谱快速筛查方法。其中林可霉素、利巴韦林斑点在 254 nm

紫外灯下检视不显色,而在碘蒸气熏蒸后显色;恩诺沙星显特殊的蓝色荧光;对乙酰氨基酚斑点接近溶剂前沿,而盐酸吗啉胍斑点展距较小。该方法成功实现了不同种类药物的分离,简单快捷,灵敏度高。

3.3 高效液相色谱法(HPLC 法)

高效液相色谱法在兽药制剂非法添加化学药物检查方面应用非常广泛,尤其是高效液相色谱配二极管阵列检测器法(HPLC-PDA 法)是对非法添加药物进行确证和定量的重要手段;而液相色谱-质谱联用方法(LC-MS 法)在非法添加物筛查过程中发挥重要作用。

3.3.1 高效液相色谱-紫外检测器法

高效液相色谱-紫外检测器法根据所配检测器的不同,分为普通紫外检测器法和二极管阵列检测器法(HPLC-PDA 法)。

高迎春等^[10]建立了中兽药散剂中添加磺胺喹噁啉钠的 HPLC 鉴别方法,在黄连解毒散、盐酸小檗碱和鸡球虫散阴性样品中添加磺胺喹噁啉钠对照品来对方法进行验证。但是以紫外检测器在固定波长处鉴别非法添加药物存在局限性,结构类似物往往最大吸收波长一致,若液相条件不能使之完全分离,则有可能造成误判。目前,高效液相色谱法用于非法添加药物筛查和检测最常见的是连接二极管阵列检测器,不仅可以提供非法添加药物的保留时间信息,还能提供特征紫外光谱信息,更加可靠。刘自扬^[11]建立了 3 种喹啉啉二氧化物;氧氟沙星等 9 种喹诺酮类药物;硝基呋喃等 3 种呋喃类药物以及利巴韦林、盐酸吗啉胍 2 种抗病毒药物等 4 种 HPLC-PDA 检测方法,用于中兽药制剂中非法添加化学药物的检测。此外,在其研究的基础上,借助色谱峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品保留时间比对的方法,对非法添加药物进一步确证,建立了氟喹诺酮类制剂中非法添加对乙酰氨基酚和安乃近的测定方法^[12]。班付国等^[13]用 HPLC-PDA 方法检查 17 种兽药中非法添加的氨茶碱和二羟丙茶碱,采用等度洗脱方式,两种药物在 0.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,且两种药物在 17 种兽药中的回收率也良好。龚旭昊等在等度洗脱条件下建立了水杨酸和氧氟沙星在鱼腥草注射液中的定性定量 HPLC-PDA 检查方法^[7]。

3.3.2 液相色谱-质谱联用方法(LC-MS 法)

LC-MS 方法对添加物的检测无歧视,能弥补 HPLC 方法中紫外检测器的不足,并且合适的质谱

条件下就可以获得添加物的分子离子和碎片信息,对于推断未知添加物尤为重要。因此,液相色谱-质谱联用技术在兽药制剂中非法添加物的筛查与检测方面的应用也日益增多。

曹莹等^[14]使用液相色谱-质谱联用仪(配有二极管阵列检测器),一次进样既获得紫外光谱数据又得到质谱数据,筛查出疑似添加物,再用对照品比对的方式进行确证,成功鉴别出兽用抗菌药和抗生素中非法添加的二氧丙嗪和氨溴索。韩宁宁等^[15]通过制备液相色谱将氟苯尼考粉中的未知添加物进行纯化,再用 UPLC-Q/TOFMS 法和 HPLC-PDA 法等 2 种方法对纯化后的添加物进行分析,成功推断其结构,最后再通过上述 2 种方法对推断进行验证,最终鉴定出该未知添加物为苯甲酸,为未知添加物的筛查提供了新思路。刘雪红等^[16]应用超高效液相色谱-串联质谱技术建立了兽用中药制剂穿心莲注射液和鱼腥草注射液中非法添加庆大霉素的定量检测方法。通过多反应监测模式进行测定。该法准确、快速。

3.4 气相色谱法(GC 法)

目前,气相色谱法在兽药制剂中非法添加物的检测方面应用较少。张立华等^[17]采用程序升温方式,石英毛细管柱,建立了中兽药散剂中非法添加金刚烷胺的氢火焰离子化气相色谱(GC-FID)含量测定方法。该方法线性关系良好,回收率较高,且整个方法运行时间仅需 15 min,快速准确可靠。

3.5 可用于兽药制剂非法添加化学药物检测的技术分析

除了上面列出来的几种方法之外,目前国内外用于非法添加的技术手段还有气相色谱-质谱联用法^[18],红外光谱法^[19],近红外光谱法^[20],拉曼光谱法^[21],离子迁移色谱法^[22]等,可将这些方法用于兽药制剂非法添加化学药物的检测。

4 小结与展望

非法添加药物在确证之前为未知物,一直以来对未知物的筛查都是工作中的难点。目前采用 HPLC-PDA 法建立非法添加的常见化学药物紫外光谱数据库,能够提供紫外光谱图与保留时间等信息,是现阶段兽药制剂中非法添加物常规筛查的重要依据。HPLC-PDA 法用于有紫外吸收的非法添加药物的检查,方便快捷,但对于本身没有共轭结构,没有紫外吸收或者即使有紫外吸收但组分复杂的药物如吉他霉素等,HPLC-PDA 法就不能发挥

作用,对于未收入光谱库的化合物会有漏查的风险,存在一定的局限性。这时可以借助联用技术来实现非法添加药物的检测。液质联用方法,尤其是高分辨率质谱能提供精确分子量,在化合物鉴别方面应用广泛^[23-24],但该方法目前在兽药制剂中非法添加物的筛查领域尚处于初级探索阶段。因此,需要投入更多的精力在液质联用方法的开发上,建立非法添加物筛查的质谱数据库。

根据已积累的工作经验,笔者认为可以研究1~2个初筛液相色谱方法尽可能多的采集可能用于非法添加的药物的紫外光谱信息,此处的初筛也可以理解为“粗筛”,不是传统意义上的建立一个检查方法,初筛方法不要求定量,不考究回收率,建立初筛方法的目的是明确是否有非法添加药物;另外,在采用HPLC-PDA法建立非法添加药物的确证检查方法时,将检查范围扩大到结构类似或者药理作用相似的一系列药物,而不仅仅局限于筛查出的某一种非法添加药物。同时考虑到兽药监督检验的重点是在省级以下兽药检测机构,因此制定的检查方法要适应基层检测的现状,使得方法的适用性更强。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部公告第1848号. 黄芪多糖注射液中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].
- [2] 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].
- [3] 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、鱼腥草注射液中非法添加水杨酸氧氟沙星检查方法和中药散剂中非法添加金刚烷胺和金刚乙胺检查方法等3项检查方法标准[S].
- [4] 蒋海芬,韦勋平,韦俏娜. 兽药中非法添加物检测新技术的应用[J]. 广西畜牧兽医,2015,32(2):109-110.
- [5] 林中,黄萍,方光伟. 兽药中非法添加违禁药物的原因分析及监管对策[J]. 中国兽药杂志,2014,48(5):63-65.
- [6] 徐恩民,张颖,刘少宁,等. 氟苯尼考制剂中磺胺二甲嘧啶和磺胺间甲氧嘧啶检测方法的研究[J]. 山东农业科学,2014,46(7):129-131.
- [7] 龚旭昊,王静文,董玲玲,等. 鱼腥草注射液中非法添加水杨酸和氧氟沙星HPLC-PDA检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2016,50(2):37-40.
- [8] 农医发[2009]17号. 中兽药散剂中非法添加呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因检查方法;中兽药散剂中非法添加氯霉素检查方法和中兽药散剂中非法添加喹乙醇检查方法[S].
- [9] 郝利华,董玲玲,于晓辉,等. 薄层色谱法快速筛选黄芪多糖注射液中非法添加的化学物质[J]. 中国兽药杂志,2012,46(05):29-30,39.
- [10] 高迎春,苏梅,魏秀丽,等. 薄层色谱和液相色谱法鉴别中兽药散剂中掺加的磺胺喹噁啉钠[J]. 中国兽药杂志,2010,44(2):23-25.
- [11] 刘自扬. 中兽药制剂中非法添加化学药物的检测研究[C]. 北京中医药大学.
- [12] 董玲玲,杨星,范强,等. 氟喹诺酮类制剂中非法添加对乙酰氨基酚和安乃近的测定方法研究[J]. 中国兽医杂志,2015,51(8):93-95.
- [13] 班付国,邹素华,吴宁鹏,等. HPLC-PDA法检测17种兽药中非法添加氨茶碱、二羟丙茶碱的研究[J]. 中国兽药杂志,2014,48(12):32-37.
- [14] 曹莹,闵钰婷,黄士新. 检测出新型镇咳平喘类药物在兽用抗菌药物和抗生素中的非法添加[J]. 上海畜牧兽医通讯,2015,1:18-21.
- [15] 韩宁宁,毕言锋,刘少伟,等. HPLC-PDA和UPLC-Q/TOF MS法筛查氟苯尼考粉中添加化合物[J]. 药物分析杂志,2016,36(2):306-312.
- [16] 刘雪红,张秀芹,乔颖. UPLC-MS/MS检测2种中兽药制剂中非法添加庆大霉素的研究[J]. 中国兽药杂志,2015,49(1):41-44.
- [17] 张立华,周剑,王敏. 中兽药散剂中非法添加金刚烷胺的检测方法研究及应用[J]. 化学试剂,2015,37(5):433-436.
- [18] 冯家力,潘振球,曹华娟,等. 减肥食品中违禁药物芬氟拉明、安非拉酮、马明啉的气相色谱-质谱检测[J]. 色谱,2004,22(3):228-232.
- [19] Miao L, Liu Y, Li H, *et al.* Two-dimensional correlation infrared spectroscopy applied to the identification of ephedrine and pseudoephedrine in illegally adulterated slimming herbal products[J]. Drug Test Anal, 2016,2:1936.
- [20] 王学良,冯艳春,胡昌勤. 近红外特征谱段相关系数法测定中药胶囊中添加枸橼醛西地那非[J]. 分析化学,2009,37(12):1825.
- [21] 李革,李菁. 化妆品中非法添加甲硝唑的拉曼光谱快速筛查研究[J]. 中国药事,2016,30(4):303-305.
- [22] Dunn J D, Gryniewicz - Ruzicka C M, Mans D J, *et al.* Qualitative screening for adulterants in weight-loss supplements by ion mobility spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012,71:18.
- [23] Ren Q, Wang Y L, Wang M L, *et al.* Screening and identification of the metabolites in rat urine and feces after oral administration of Lycopus lucidus Turcz extract by UHPLC-Q-TOF-MS mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016,1027(8):64-73.
- [24] 蓝芳,张毅,岳振峰,等. 液相色谱-四极杆/飞行时间质谱快速筛查饲料中36种违禁药物[J]. 分析测试学报,2012,31(12):1471-1478.

(编辑:陈希)