

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.09

# UHPLC-Q/TOF MS 结合 HPLC-DAD 定性和定量分析 硫酸黏菌素可溶性粉中的未知添加物

陆春波,包爱情,周芷锦,张航俊,陈慧华

(浙江省兽药饲料监察所,杭州 311101)

[收稿日期] 2018-02-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 12-0054-07 [中图分类号] S859.83

**[摘要]** 定性和定量分析一批兽药硫酸黏菌素可溶性粉中的未知添加物。照《中国兽药典》2010 年版一部对该批检品采用微生物检定法进行含量测定时,发现该样品的抑菌圈为虚圈,薄层色谱鉴别该样品,未显示与标准品溶液一致的主斑点,怀疑该样品中有处方外非法添加物。采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UHPLC-Q/TOF MS)对该样品进行筛查,发现疑似添加物,并使用液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)法进行了双重确证和含量测定。该样品中非法添加物确证为磺胺氯达嗪和甲氧苄啶,添加量分别为 58.5 mg/g 和 13.4 mg/g。

**[关键词]** 硫酸黏菌素可溶性粉;非法添加物;磺胺氯达嗪;甲氧苄啶;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱;液相色谱-二极管阵列检测法

## Qualitative and Quantitative Analysis of Unknown Additives in Colistin Sulphate Soluble Powder by UHPLC-Q/TOF MS and HPLC-DAD

LU Chun-bo, BAO Ai-qing, ZHOU Zhi-jin, ZHANG Hang-jun, CHEN Hui-hua

(Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 311101, China)

**Abstract:** A qualitative and quantitative analysis of unknown additives in a batch of veterinary colistin sulphate soluble powder had been implemented. During the content determination of the sample with the method of microbiological assay according to Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2010, the inhibition zones were virtual. And the spot of the sample did not accord with the spot of the reference substance in the identification by the thin-layer chromatography (TLC). It revealed that some unknown compounds may be doped in the sample. Then the screening of the sample through ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q/TOF MS) was carried out. Furthermore, double confirmation and content determination were accomplished by high performance liquid chromatography - diode array detection (HPLC-DAD). Sulfachloropyridazine and trimethoprim as the illegal additives were detected at 58.5 mg/g and 13.4 mg/g respectively. The research provided the technique references for the inspection of illegal adulterations in veterinary drug.

基金项目:浙江省“三农六方”科技协作项目(CTZB-F180706LWZ-SNY1)

作者简介:陆春波,高级兽医师,从事兽药检验和质量标准研究。E-mail:2586064747@qq.com

**Key words:** colistin sulphate soluble powder; illegal adulteration; sulfachloropyridazine; trimethoprim; ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q/TOF MS); high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD)

硫酸黏菌素收载于《中国兽药典》2010 年版<sup>[1]</sup>,属于多肽类抗菌药,是一种碱性阳离子表面活性剂,用于防治猪、鸡革兰氏阴性菌所致的肠道感染,如仔猪黄痢、仔猪白痢、仔猪副伤寒、鸡白痢、鸡大肠杆菌病等<sup>[2-3]</sup>。磺胺氯达嗪属于磺胺类抗菌药物,甲氧苄啶属于抗菌增效剂<sup>[4]</sup>,二者合用可产生协同作用,增强抗菌效果,对大多数革兰氏阳性菌和阴性菌均有较强抑制作用,用于猪、鸡大肠杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌等感染,如仔猪白痢、仔猪黄痢、猪肺疫、禽霍乱、鸡白痢、鸡大肠杆菌病等<sup>[5]</sup>。硫酸黏菌素和磺胺氯达嗪的适应症较为相似。目前,为了严厉打击兽药制剂中非法添加的状况,农业农村部颁布了一系列的公告,制订了硫酸黏菌素制剂中非法添加喹乙醇、乙酰甲喹和阿托品的检查方法<sup>[6-7]</sup>。但由于违规企业非法添加的手段越来越隐蔽,技术越来越高超,使用法定标准检测时无法发现或者难以发现,仅用已发布的公告检查也不能完全覆盖<sup>[8-9]</sup>。已报道的兽药非法筛查方法主要有液相法<sup>[10]</sup>和液质法<sup>[11]</sup>。近年来,采用建立的超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UHPLC-Q/TOF MS)的谱库,针对可疑样品进行筛查,发现疑似添加物,并使用 HPLC-DAD 法进行双重确证和含量测定。本文通过一个实际样品在检测中发现的异常,提出存在未知添加物的怀疑,使用高分辨质谱推断确证添加物以及液相色谱定量测定添加物,并对非法添加的原因进行了探讨,以期为打击兽药非法添加提供理论方法与技术支持。

## 1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料 Agilent 1260 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); Agilent 1290-6550 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱仪(UHPLC-Q/TOF MS),(美国 Agilent 公司);超纯水机(美国 Millipore 公司);XS205 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-500E 超声仪

(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国恩科公司);乙酸铵(分析纯,陕西陇化化工股份有限公司);磷酸(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司)。磺胺氯达嗪钠对照品购于中国兽医药品监察所,含量 96.4%(按磺胺氯达嗪计为 89.5%),批号为 H0221206;甲氧苄啶对照品购于中国食品药品检定研究院,含量 99.9%,批号为 100031-201205。黏菌素标准品购于中国兽医药品监察所,每 1mg 效价 22782 单位,批号为 K0271305。硫酸黏菌素可溶性粉(批号 20160602,标示规格 10%)为浙江省内抽检样品。

### 1.2 试验条件

1.2.1 UHPLC-Q/TOF MS 分析 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Waters Atlantis, 150 mm × 3.0 mm, 3 μm);流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为 5 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸甲醇溶液,梯度洗脱程序见表 1,后运行 3 min;流速 0.5 mL/min;柱温 25 °C;进样量 2 μL。质谱采用 ESI 源,扫描方式为正离子全扫描(ESI+),毛细管电压 4.0 kV,干燥气流速为 15 L/min,温度为 350 °C;鞘气流速为 12 L/min,温度为 350 °C。一级质谱数据采集为全扫描模式,扫描范围: $m/z$  100~1000 Da;采集速率为 1.5 spectra/s。二级质谱数据采集为目标离子采集模式(Targeted MS/MS),扫描范围: $m/z$  50~1000 Da;采集速率为 2.5 spectra/s;碰撞能量为 10、20、40 eV。采集数据时使用参比溶液对仪器质量轴进行实时校正,参比离子为  $m/z$  121.0509 和  $m/z$  922.0098。

1.2.2 HPLC-DAD 分析 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Agilent Eclipse XDB, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1%磷酸溶液,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱程序:0~2 min, 2%B;2~25 min, 2%B~100%B;25~28 min, 100%B;28~28.1 min,

100%B~2%B;28.1~31min,2%B,流速:1.0 mL/min;进样量:20  $\mu$ L,扫描波长:200~400 nm,记录 230 nm 波长处色谱图。

表 1 梯度洗脱表

Tab 1 Gradient elution table

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
1	95	5
4	40	60
14	0	100
18	0	100

### 1.3 溶液的制备

**1.3.1 供试品溶液** 精密称取硫酸黏菌素可溶性粉 0.1 g 置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶液约 80 mL 超声溶解后,用 50% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为 HPLC-DAD 供试品溶液。精密量取上述溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶液稀释至刻度,作为 UHPLC-Q/TOF MS 筛查和确证用供试品溶液。

**1.3.2 对照品溶液** 分别精密称取磺胺氯达嗪钠、甲氧苄啶对照品适量,用 50% 甲醇溶液溶解并定量稀释制成含磺胺氯达嗪、甲氧苄啶为 50  $\mu$ g/mL 的对照品溶液,用于 HPLC-DAD 验证;将上述溶液用 50% 甲醇溶液稀释制成 100 ng/mL 的溶液,作为 UHPLC-Q/TOF MS 确证用对照品溶液。

## 2 结果与分析

**2.1 未知物的发现** 照《中国兽药典》2010 年版一部对该样品按照硫酸黏菌素可溶性粉采用微生物检定法测定含量时,发现该样品的抑菌圈为虚圈(图 1)。且薄层色谱鉴别中样品溶液未显示与黏菌素标准品溶液相同的斑点(图 2),因此,怀疑该样品中可能有其他非法添加物。

**2.2 未知物的推断** 使用 UHPLC-Q/TOF MS 对该样品进行一级质谱数据采集,总离子流图(total ion chromatogram, TIC)如图 3 所示,TIC 图中在 5.123 和 5.549 min 有 2 处较大响应,对响应 1 和响应 2 分别进行质谱提取,得到  $m/z$  291.1452 和  $m/z$  285.0204 两处响应明显大于其他离子的离子(图

3),在 PCDL(MassHunter Workstation Personal Compound Database and Library)库中进行匹配,发现甲氧苄啶的  $[M+H]^+$  与  $m/z$  291.1452 匹配,匹配分数为 98.26,磺胺氯达嗪的  $[M+H]^+$  与  $m/z$  285.0204 匹配,匹配分数为 97.62,因此,初步推测两者为甲氧苄啶和磺胺氯达嗪。

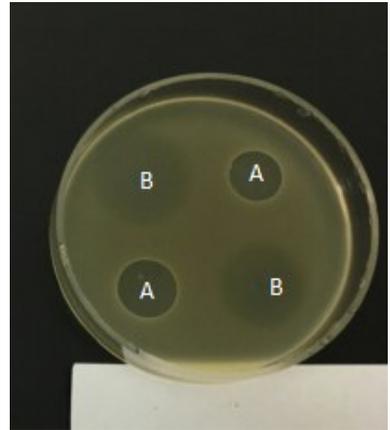


图 1 黏菌素标准品(A)和样品的抑菌圈(B)

Fig 1 the inhibition zone of (A) colistin reference substance and (B) sample



图 2 黏菌素标准品(A)和样品的薄层色谱图(B)

Fig 2 the thin-layer chromatogram of (A) colistin reference substance and (B) sample

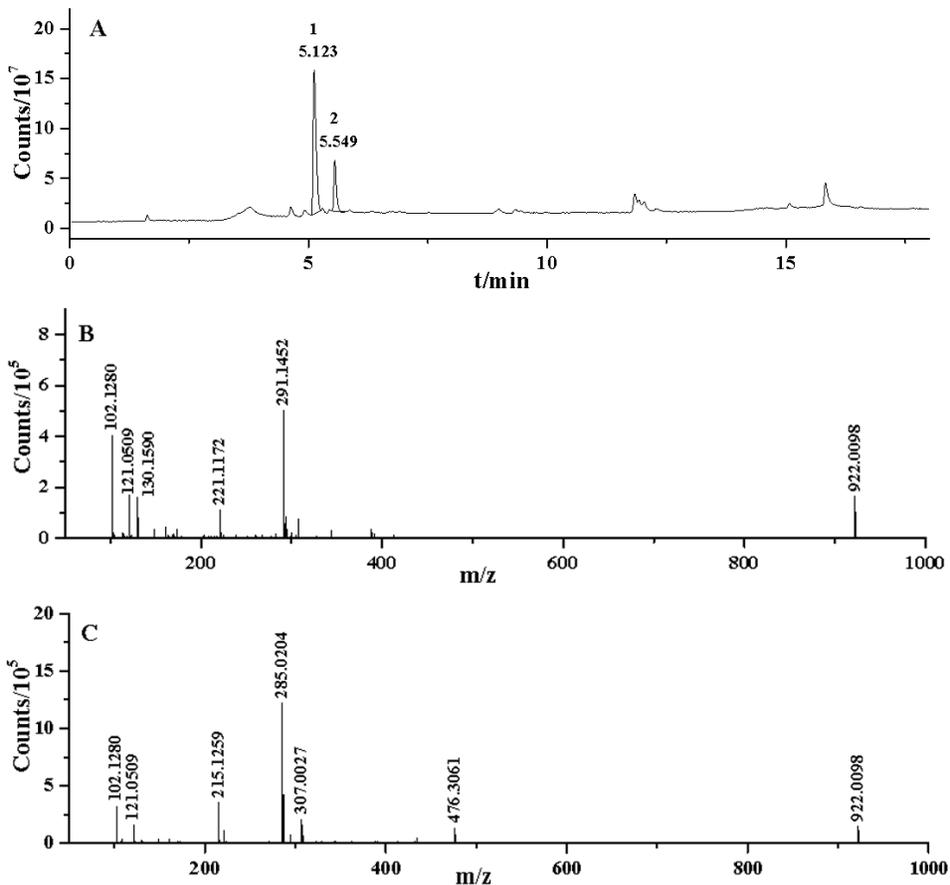


图3 检品总离子流图(A)及响应1质谱提取图(B)和响应2质谱提取图(C)

Fig 3 (A) Total ion chromatogram of the sample, (B) mass spectra extracted from response signal 1 and (C) mass spectra extracted from response signal 2

### 2.3 未知物的确证

**2.3.1 UHPLC-Q/TOF MS 确证** 将供试品溶液,照1.2.1项中条件分别以  $m/z$  为 285.0208 和 291.1452 为母离子进行二级质谱采集(图4~图5),另取磺胺氯达嗪和甲氧苄啶对照品溶液(100 ng/mL)在相同的条件下采集二级质谱,对照品图谱与样品图谱几乎完全一致,匹配值高达 98.21 和 97.58。添加的化合物确证为磺胺氯达嗪和甲氧苄啶。为进一步增强质谱信息的可信度,对裂解规律进行了推导。

**2.3.2 HPLC-DAD 确证** 将供试品溶液与对照品溶液色谱峰的保留时间(图6)和光谱图比对,并对峰纯度检查和光谱相似度进行检查来确证非法添加物。供试品溶液在1.2.2项条件下检出2个较大

的未知色谱峰,与该条件下磺胺氯达嗪和甲氧苄啶对照品溶液的保留时间一致,紫外光谱相似。供试品溶液和对照品溶液色谱峰的纯度值均在 998.6~999.6 之间,大于纯度阈值(990),为单一物质峰;光谱相似度检查结果显示:供试品溶液与对照品溶液色谱峰的光谱图进行匹配,匹配度均在 998.5~999.5 之间,高于匹配阈值(990),可认为是同一化合物。

**2.4 未知物的含量测定** 经上述 UHPLC-Q/TOF MS 和 HPLC-DAD 双重验证,确证样品中含有磺胺氯达嗪和甲氧苄啶,照《中国兽药典》2010 版<sup>[1]</sup>一部收录的复方磺胺氯达嗪钠粉中的含量测定方法检测磺胺氯达嗪钠和甲氧苄啶,含量分别为 65.4 mg/g(按磺胺氯达嗪计 58.5 mg/g)和 13.4 mg/g。

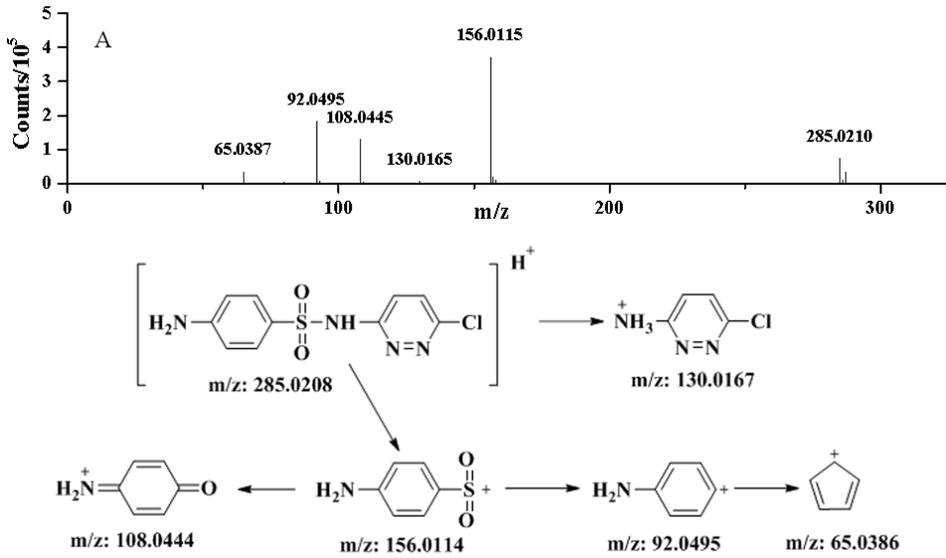


图 4 硫酸黏菌素可溶性粉中疑似化合物 ( $[M+H]^+$  为  $m/z$  285.0208) 的二级质谱图及可能裂解规律

Fig 4 MS /MS spectra of the suspected compound ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  285.0208) in colistin sulphate soluble powder and possible fragmentation pattern

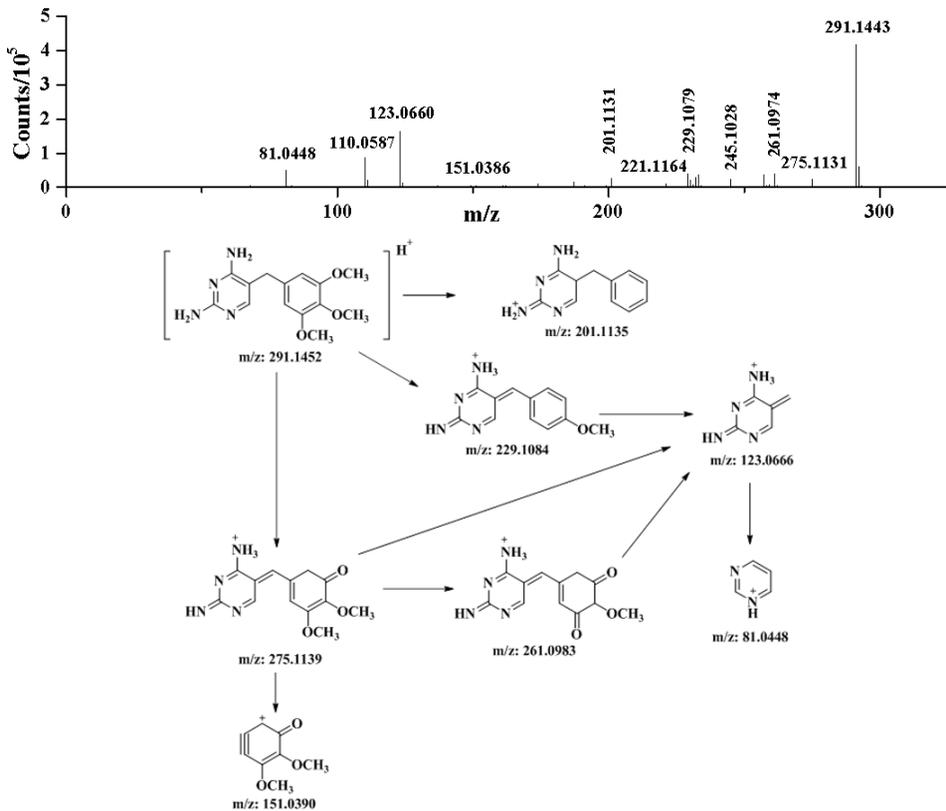


图 5 硫酸黏菌素可溶性粉中疑似化合物 ( $[M+H]^+$  为  $m/z$  291.1452) 的二级质谱图及可能裂解规律

Fig 5 MS /MS spectra of the suspected compound ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  291.1452) in colistin sulphate soluble powder and possible fragmentation pattern

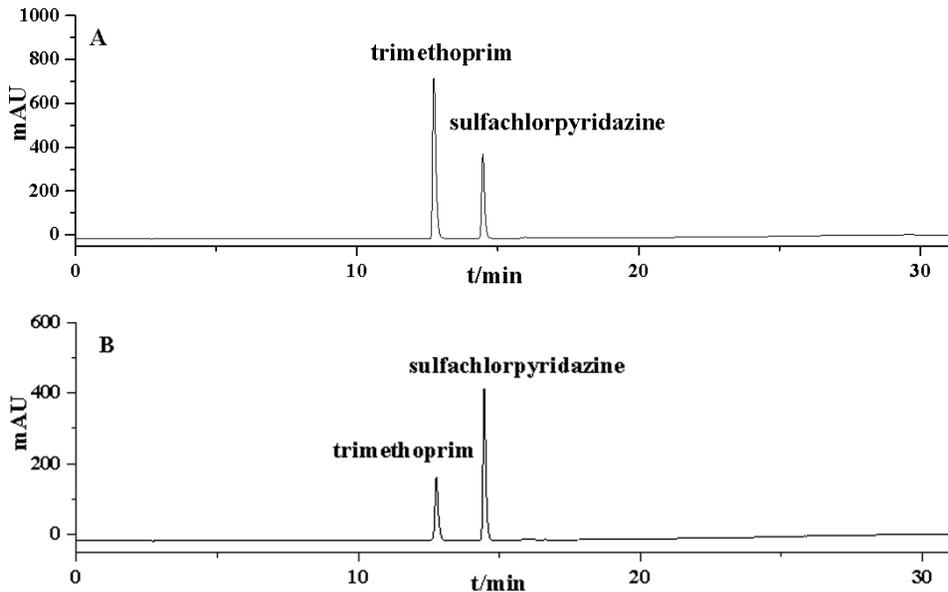


图 6 混合对照品溶液 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (A) 色谱图和检品色谱图 (B)

Fig 6 Chromatogram of (A) mixed reference substances (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and (B) the sample

### 3 讨论与结论

**3.1 UHPLC-Q/TOF MS 色谱条件的优化** 此色谱系统为常规筛查非法添加药物所用,考察流动相组成对色谱峰的分离、灵敏度和离子化率的影响。通常选择甲醇-水和乙腈-水作为流动相,对一般的化合物均能满足要求,甲醇价格较低,故选择甲醇。流动相中加入适量甲酸,绝大多数的正离子源的离子化效率会有一定提高。流动相中加入适量乙酸铵,适用于部分负离子源模式下的化合物检测。参照文献<sup>[9,12-14]</sup>,将本文的条件确定为最佳条件。

**3.2 UHPLC-Q/TOF MS 质谱条件的优化** 采用磺胺氯达嗪钠和甲氧苄啶对照品溶液 (100 ng/mL),优化质谱参数。通过一级质谱扫描获取目标药物的准分子离子峰,准分子离子进入二级质谱后发生断裂或重排等现象,产生不同的质核比的离子碎片,从而优化碰撞能量和定性离子,并推导了可能裂解的机理。

**3.3 非法添加的原因分析** 该样品薄层色谱鉴别发现并没有标示主成分的黏菌素,但采用微生物检定法测定含量,又有非正常抑菌圈产生,因此,怀疑有处方外添加成分。经 UHPLC-Q/TOF MS 和 HPLC-DAD 双重确证,发现样品中有磺胺氯达嗪

和甲氧苄啶,且磺胺氯达嗪和甲氧苄啶的含量分别为 58.5 mg/g 和 13.4 mg/g。与《中国兽药典》2010 年版一部收录的复方磺胺氯达嗪钠粉中的规格 (1000 g:磺胺氯达嗪钠 625 g 与甲氧苄啶 125 g) 稀释 10 倍接近,该样品已经不是简单意义上的处方外非法添加,而是有意将低浓度的复方磺胺氯达嗪钠粉当做硫酸黏菌素可溶性粉出售,推测生产企业如此做法的可能因为两者在功效上较为相近,而复方磺胺氯达嗪钠粉成本较低,因此,采用这种“顶替”来谋取利润。

当前兽药行业仍不规范,处方外非法添加的现象时有发生,且添加的成分不确定,像本文的例子甚至使用其他药物来替代,值得引起监管部门重视。本文从发现该批样品的非法添加到建立 UHPLC-Q/TOF MS 筛查确证和 HPLC-DAD 双重确证,发现非法添加的情况并对原因进行了一定的探讨,希望可以为有关部门打击兽药非法添加提供一定的思路。已经发布的农业农村部非法添加物检查方法,为针对某些指定药物的非法添加,包含药物只有 50 余种。由于 UHPLC-Q/TOF MS 的筛查范围更广,可建立多达几百甚至上千种药物的一级谱库和二级谱库,因此,采用 UHPLC-Q/TOF MS

的筛查方法,对可能存在的非法添加物进行较全面筛查、确认,以期为今后兽药的风险监测提供有力的技术支撑,进而掌握兽药质量的真实情况。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会.《中国兽药典》2010 年版[S]. Commission of Chinese pharmacopoeia. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2010 edition. [S].
- [2] Ku Y H, Lee M F, Chuang Y C, *et al.* *In vitro* activity of colistin sulfate against Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases[J]. Journal of microbiology, immunology, and infection, 2015, 48(6):699-702.
- [3] Huang J, Tang Y Q, Sun J Y. Intravenous colistin sulfate: A rarely used form of polymyxin E for the treatment of severe multi-drug-resistant Gram-negative bacterial infections[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2010, 42(4): 260-265.
- [4] De Smet J, Croubels S, De Backer P, *et al.* Effect of administration route and dose alteration on sulfadiazine-trimethoprim plasma and intestinal concentrations in pigs[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 50(6): 707-714.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 兽药使用指南. 化药卷 2010 年版[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China. Veterinary Drug Use Guid. Chemical Volume. 2010 Edition[S].
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业部公告 2448 号[S]. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. No. 2448 Bulletin of the Ministry of Agriculture[S].
- [7] 中华人民共和国农业部. 农业部公告 2451 号[S]. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. No. 2451 Bulletin of the Ministry of Agriculture[S].
- [8] 陆春波, 高三玉, 罗成江, 等. HPLC-DAD 法检测喹乙醇预混剂中违规添加喹烯酮的研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(3):61-64. Lu C B, Gao S Y, Luo C J. *et al.* Determination of quinocetone into olaquinox premix by HPLC-DAD[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(3):61-64.
- [9] 包爱情, 陈慧华, 陆春波, 等. 定性和定量分析磺胺氯吡嗪钠可溶性粉中的未知添加物[J]. 色谱, 2017, 35(5):520-525. Bao A Q, Chen H H, Lu C B, *et al.* Determination of quinocetone into olaquinox premix by HPLC-DAD[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(5):520-525.
- [10] 王静文, 龚旭昊, 范强, 等. 三种呼吸系统兽药制剂中非法添加盐酸溴己新、吡罗昔美辛的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12):45-50. Wang J W, Gong X H, Fan Q, *et al.* Determination of bromhexine hydrochloride and indometacin illegally added in three veterinary preparations by HPLC-PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12):45-50.
- [11] 张航俊, 周芷锦, 侯轩, 等. HPLC-MS/MS 检测双黄连注射液中非法添加 13 种喹诺酮类药物的研究[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 59-64. Zhang H J, Zhou Z J, Hou X, *et al.* Determination of illegally added 13 quinolones in ShuangHuangLian injection by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 59-64.
- [12] Kang J, Fan C L, Cao Y F, *et al.* Multi-residue screening of 100 multi-class veterinary drugs in milk powder by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal. Methods, 2014, 20(6): 8337-8349.
- [13] Wang Z, Wu C S, Wang G L, *et al.* A novel strategy for the determination of illegal adulterants in health foods and herbal medicines using high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(6): 925-935.
- [14] Dasenaki M E, Thomaidis N S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 880: 103-121.

(编辑:侯向辉)