

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.7.07

UPLC - PDA 联合 UPLC - MS/MS 法确证 一批未知药品中的卡那霉素

魏秀丽^{1,2,3}, 张传津^{1,2,3*}, 张琦⁴, 刘霄飞⁴, 张志民^{1,2,3}, 杨志昆^{1,2,3}

(1. 山东省饲料兽药质量检验中心, 济南 250100; 2. 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250100);
(3. 动物源细菌耐药性监测与精准化用药山东省工程实验室, 济南 250100; 4. 山东省畜产品质量安全中心, 济南 250100)

[收稿日期] 2021-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)07-0041-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 采用 UPLC - PDA 联合 UPLC - MS/MS 方法确证了未知药品中的卡那霉素。样品经提取稀释后, 采用 ACQUITY UPLC T₃ 色谱柱为分离柱, UPLC - PDA 初步筛查, 再用正离子扫描, 液相色谱串联质谱仪上机测定。结果显示, 未知物确证是卡那霉素; 样品检出限为 0.1 μg/mL, 定量限为 0.2 μg/mL。本方法快速、灵敏、重现性好, 适用于此批次未知药品中卡那霉素的检测。

[关键词] 卡那霉素; 未知药品; 超高效液相 - 串联质谱法

UPLC - PDA Combined UPLC - MS/MS Method to Confirm Kanamycin in a Batch of Unknown Drugs

WEI Xiu - li¹⁻³, ZHANG Chuan - jin^{1-3*}, ZHANG Qi¹⁻³, LIU Xiao - fei¹⁻³,
ZHANG Zhi - min¹⁻³, YANG Zhi - kun¹⁻³

(1. Shandong Center for Quality Control of feed and Veterinary Drugs. Jinan 250100, China)

(2. Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Jinan 250100, China)

(3. China Shandong Engineering Laboratory for Drug Resistance Monitoring and Precise Drug Use of Animal Origin Bacteria, Jinan 250100, China;

4. Shandong Provincial Center for Quality and Safety of Animal Products, Jinan 250100, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan - jin, E - mail: 1153702137@qq.com

Abstract: UPLC - PDA combined UPLC - MS/MS method was used to confirm Kanamycin in unknown drugs. The sample was extracted and diluted, and the ACQUITY UPLC T₃ chromatographic column was used as the separation column, UPLC - PDA preliminary screening, then positive ion scanning, liquid chromatography series mass spectrometer on the machine. The results showed that the unknown substance was Kanamycin, the detection limit was 0.1 μg/mL, the quantitative limit was 0.2 μg/mL. This method is rapid, sensitive and reproducible, and is suitable for the detection of Kanamycin in this batch of unknown drugs.

基金项目: 2015 年国家科技支撑计划“兽药安全与质量评价技术研究与应用”(BAD11B03-01)

作者简介: 魏秀丽, 正高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验、标准制修订及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津。E - mail: 1153702137@qq.com

Key words: Kanamycin; unknown drugs; UPLC – MS/MS

卡那霉素是一种人医临床使用的药物,起初用于抗感染的治疗^[1-2]。兽医临床中,有硫酸卡那霉素注射液、单硫酸卡那霉素可溶性粉或注射用硫酸卡那霉素的剂型,已经应用多年。从国家兽药基础数据库中,可以查到曾经有上百个生产批准文号,有部分已经过期,还有变更新批准文号的生产厂家。对假劣兽药或饲料添加剂的查处,依然是各级主管部门的监督重点。

应客户委托检测一种白色的未知粉末,违法者违规生产,无任何生产信息的标签可查。未知其主要成分。关于卡那霉素的检测方法,查阅相关文献,有蒸发光散射法(HPLC – ELSD)^[1-2]、微生物管碟法^[3]、柱后衍生法^[4]、电喷雾法(HPLC – CAD)^[5-7]、紫外可见分光光度法^[8-10]、质谱法^[11]等多种方法可以选择;根据实验室现有条件,前期用超高效液相色谱进行筛选后,初步怀疑是卡那霉素,后期建立了未知药品中卡那霉素的测定 – 超高效液相串联质谱法,本方法通过优化色谱和质谱条件,提高了分离效果,可以作为确证方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 分析天平:感量 0.00001 g;仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪, Waters Quattro premierXE 超高效液相 – 串联质谱仪,均为 Waters 公司;0.22 μm 的滤膜为 Waters 公司。

1.2 药品及试剂 卡那霉素,批号 K0071411, 773 U/mg;新霉素,批号 K0091511, 671 U/mg;安普霉素,批号 K0231610, 571 U/mg;大观霉素,批号 K0261705, 644 U/mg;四种药物标准品均购买自中国兽医药品监察所;甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯;葡萄糖,分析纯;超纯水。

2 方法与结果

2.1 超高效液相色谱 – 二极管阵列检测法色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC T₃ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相 A:乙腈(0.05% 磷酸);流动相 B:水溶液(0.05% 磷酸);流速:

0.35 mL/min;进样量:1 μL;柱温:35 °C。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

Tab 1 Liquid chromatographic gradient elution procedure

时间/min	流速/(mL · min ⁻¹)	A/%	B/%	曲线
0	0.35	2	98	
2	0.35	2	98	6
5	0.35	5	95	6
6	0.35	10	90	6
7.5	0.35	40	60	6
8.8	0.35	80	20	6
9.2	0.35	40	60	
9.5	0.35	2	98	
10	0.35	2	98	6

2.2 超高效液相串联质谱法色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC T₃ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相 A:甲醇(0.1% 甲酸);流动相 B:水溶液(0.1% 甲酸);流速:0.35 mL/min;进样量:2 μL;柱温:35 °C。液相色谱梯度洗脱程序见表 2。

表 2 液相色谱梯度洗脱程序

Tab 2 Liquid chromatographic gradient eluent procedure

时间/min	流速/(mL · min ⁻¹)	A/%	B/%	曲线
0	0.35	5	95	
1.2	0.35	5	95	6
2.2	0.35	35	65	6
4	0.35	95	5	6
5.2	0.35	95	5	6
6	0.35	5	95	6
7	0.35	5	95	6

2.3 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描(ESI⁺);多反应监测(MRM);离子源温度:110 °C;脱溶剂温度:320 °C;脱溶剂氮气流速:650 L/h;毛细管电压:2.5 kV;测试药物定性、定量离子对及对

应的锥孔电压和碰撞能量见表 3。

表 3 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

Table 3 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, cone hole voltage and collision energy

药物	定量离子对	定性离子对	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
卡那霉素	485.1 > 163.2	485.1 > 163.2	37	13	0.53
		485.1 > 324.3		12	

2.4 样品制备

2.4.1 阴性样品 葡萄糖作为阴性样品。

2.4.2 标准储备液的制备 精密称取卡那霉素等对照品各 10 mg, 加 5% 甲醇至 25 mL 容量瓶中, 定容, 制成 400 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为外标储备液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.4.3 超高效液相色谱法工作液的制备 精密量取储备液适量, 至 10 mL 容量瓶中, 配置成 200 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 用于超高效液相色谱的标准工作液使用。

2.4.4 超高效液相色谱 - 串联质谱法工作液的制备 取 200 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液用液相串联质谱方法中的初始比例流动相适量倍比稀释 10 倍, 得 20 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液。

2.4.5 标准工作液的制备 取适量卡那霉素标准工作液, 用空白基质溶液稀释, 制备成 0.1、0.2、0.5、1、2、5 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液, 绘制标准曲线。取浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素作为 UPLC - MS/MS 对照品溶液。

2.4.6 阳性添加样品的制备 精密称取 10 mg 卡那霉素加入到阴性样品 190 mg 中, 充分混匀, 配置成的 50 mg/g 的阳性添加样品, 每次做三份, 做三批, 共 9 份平行样, 每份样品至少进样 2 次, 取平均值。报告 9 个回收率测定结果并计算相对标准偏差(RSD)。

2.5 提取净化方法

2.5.1 UPLC - PDA 供试品 精密称取空白样品、待测样品及阳性添加样品各 100 mg, 各置于 50 mL 容量瓶中, 加入 5% 甲醇定容至 50 mL, 取滤液作为 UPLC - PDA 供试品溶液。

2.5.2 UPLC - PDA/MS 供试品 取适量母液, 用初始流动相水(0.1% 甲酸): 甲醇(0.1% 甲酸) = (95:5) 稀释 100 倍, 用滤膜(0.22 μm) 滤过, 取滤液作为 UPLC - MS/MS 供试品溶液。

2.6 方法线性考察及添加回收试验结果

2.6.1 UPLC - PDA 专属性 在选定的色谱条件下, 卡那霉素在 2.31 min 左右出峰, 与未知样品的保留时间和光谱图一致。而安普霉素、新霉素、大观霉素虽然光谱图相似, 但分别在 2.17 min、2.05 min、2.19 min 左右出峰。

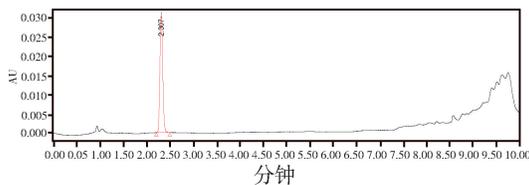


图 1 卡那霉素色谱图

Fig 1 Kanamycin chromatogram

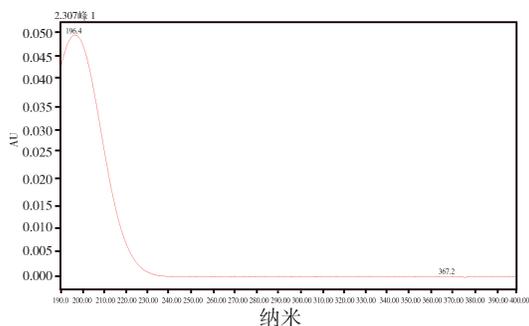


图 2 卡那霉素光谱图

Fig 2 Spectrogram of Kanamycin

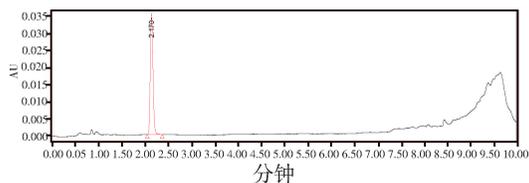


图 3 安普霉素色谱图

Fig 3 Antramycin chromatogram

2.6.2 UPLC - MS/MS 专属性 在质谱中, 卡那霉素在 0.54 min 左右出峰, 保留时间和两个定性离子对都非常一致, 未知样品主成分确证为卡那霉素。

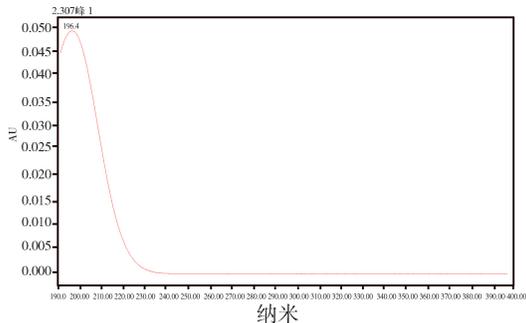


图 4 安普霉素光谱图

Fig 4 Spectrogram of Ampramycin

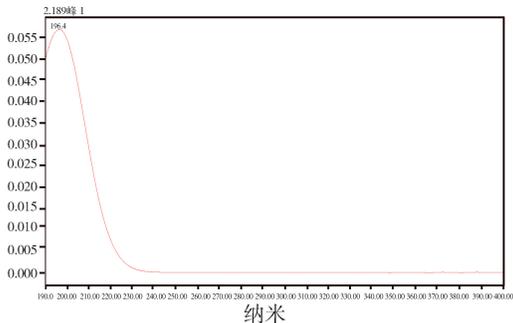


图 8 大观霉素光谱图

Fig 8 Spectrogram of spectinomycin



图 5 新霉素色谱图

Fig 5 Neomycin chromatography

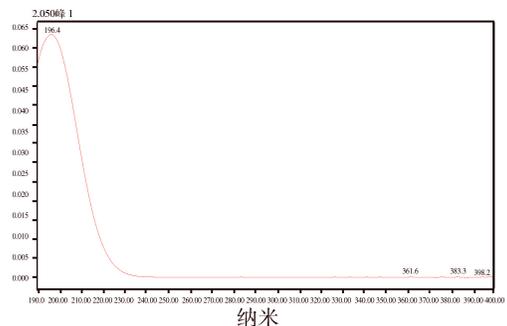


图 6 新霉素光谱图

Figure 6 Spectrogram of Neomycin

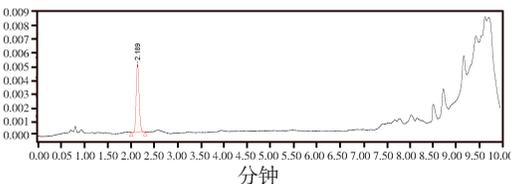


图 7 大观霉素色谱图

Fig 7 Spectinomycin chromatography

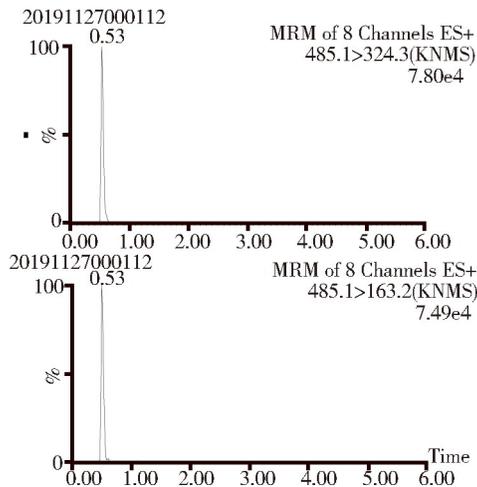


图 9 卡那霉素标准品溶液特征离子质量色谱图

Fig 9 Characterized ion mass chromatogram of kanamycin standard solution

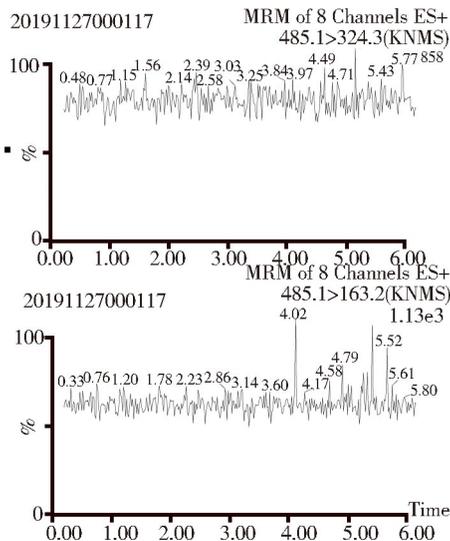


图 10 空白样品特征离子质量色谱图

Fig 10 Characteristic ion mass chromatogram of blank sample

阴性样品、对照品、阳性添加样品、待测未知样品的质谱图如下：见图 9 - 图 12。由于待测样品的样品均一度的问题，待测样品的含量在 90 ~ 130 mg/g 的范围内。

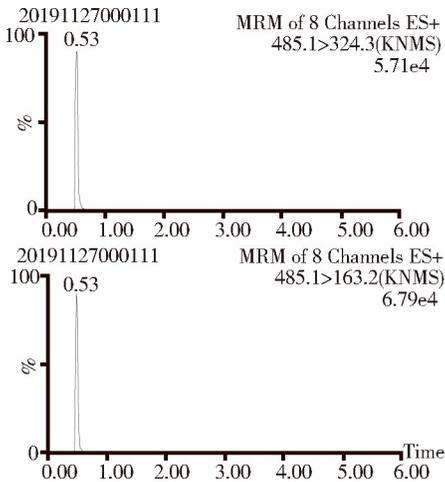


图 11 待测样品特征离子质量色谱图
Fig 11 Characteristic ion mass chromatogram of sample to be tested

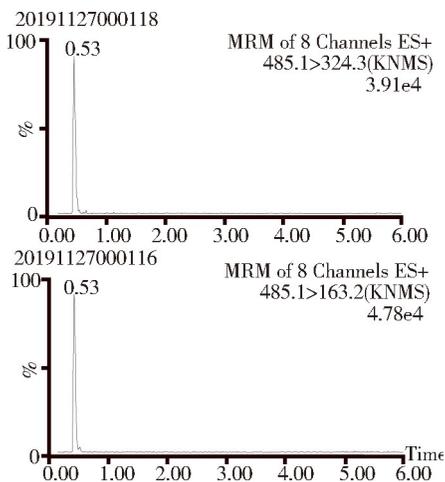


图 12 卡那霉素阳性添加样品特征离子质量色谱图
Fig 12 Characteristic ion mass chromatogram of Kanamycin positive sample

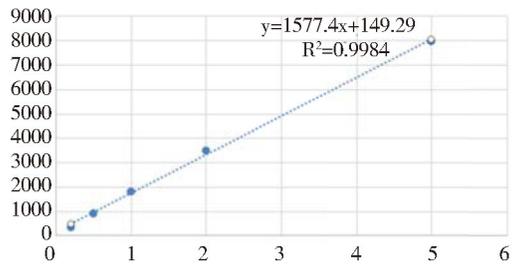


图 13 卡那霉素标准曲线图
Fig 13 Standard graph of Kanamycin

限;0.2 μg/mL 的标准品溶液,信噪比(S/N) > 10, 确定为方法的定量限。

根据药物发生药效所需要的可能添加的浓度, 检测限和定量限足以满足要求。添加浓度 50 mg/g, 批内批间变异系数均小于 10%, 阳性添加样品的回收率在 90% ~ 110% (表 4)。各特征离子质量色谱图见图 12。

表 4 卡那霉素阳性添加回收率试验结果 (n=9)

Tab 4 Results of Kanamycin positive recovery rate test (n=9)

样品	添加浓度 (50 mg/g)	回收率/%			平均回收率/%	批内 RSD/%
卡那霉素 阳性添加 样品	第一批	105.1	100.2	92.8	99.4	6.2
	第二批	103.5	94.6	104.9	101.0	5.5
	第三批	107.1	91.8	102.3	100.4	7.8

3 讨论与结论

实验接到样品后,先是进行了外观检查,样品为一种白色的粉末,在有机溶剂乙腈中溶解性比较差,在水相比较多的溶剂中溶解度很好,怀疑可能是 β-内酰胺类、氨基糖苷类等水溶性比较好的药物。为了节省时间,同时打开了两台仪器设备,进行流动相的平衡等前期工作,希望检测同时进行,以最快的时间出结果。然后精密称取了适量的药物,用水相比较多的溶剂进行溶解至清澈,进行适量稀释后过滤上机测试。在这种未知盲样检测中,无任何标准可以借鉴,无任何文献可以参考,完全靠平时检验工作的经验积累和对药品事件的敏感度,从接到委托样品到初步确定为卡那霉素,用时两个

2.6.3 标准曲线 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对,在 0.2 μg/mL ~ 5 μg/mL 的范围内标准曲线方程为 $Y = 1577.4X + 149.29$, Y 为卡那霉素定量离子峰面积, X (μg/mL) 为卡那霉素的浓度,其相关系数 R^2 为 0.9984,线性良好,见图 13。

2.6.4 方法的准确度和精密度 卡那霉素以外标法计算,液质分离良好,无任何干扰,0.1 μg/mL 的标准品溶液,信噪比(S/N) > 3,确定为方法的检测

多小时,速度很快。

实验在初期筛选时采用超高效液相色谱法,选择了乙腈(0.05%磷酸):水(0.05%磷酸)进行梯度洗脱,由于前期做中药非法添加物的初步筛选工作一直使用这个流动相,有一定化合物的光谱图谱库,比如解热镇痛类药物、 β -内酰胺类、氟喹诺酮类药物、氨基糖苷类药物、大环内酯类药物、氯霉素类药物、酰胺醇类药物、磺胺类药物、四环素类药物等近百种药物光谱图谱库,有着丰富的检测数据库,通过光谱图进行化合物的初步筛选,通过保留时间和光谱特征,初步推测为卡那霉素。

在质谱方法确证时,考虑到前期卡那霉素出峰较早,选择甲醇(0.1%甲酸):水(0.1%甲酸)进行梯度洗脱,特征离子峰形良好,无干扰,分离度和精密度良好,以外标法定量,满足检测需求。查阅文献有应用 CORTECS HILIC 色谱柱,ACQUITY UPLC BEH HILIC C18 的相关报道^[11-12],实验用 ACQUITY UPLC T3 色谱柱进行尝试,虽然保留时间比较早,但满足实验检测需求,在一天内顺利完成了检测任务。

本方法建立了 UPLC-PDA 联合 UPLC-MS/MS 法测定未知药品中的卡那霉素,采用外标法,对样品进行提取稀释后测定,准确性佳、灵敏度高、检测限低。通过方法学考察,本方法完全适合本批次未知药品中的卡那霉素的确认检测。

参考文献:

- [1] 中国农业出版社,中华人民共和国兽药典 2015 年版一部,硫酸卡那霉素质量标准[S].
China Agricultural Press, Animal Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2015, kanamycin sulfate quality Standard [S].
- [2] 王金凤,杨化新,朱俐,等. HPLC-NQAD 和 HPLC-ELSD 法测定硫酸卡那霉素注射剂的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(04):644-648.
Wang J F, Yang H X, Zhu L, et al. HPLC-NQAD and HPLC-ELSD determination of Kanamycin sulfate injection[J]. Journal of Drug Analysis, 2014, 34(04):644-648.
- [3] 于丽娜,徐 媛,韩宁宁,等. 硫酸卡那霉素注射液含量测定的

不确定度分析[J]. 中国兽药杂志,2015,49(02):40-43.

Yu L N, Xu J, Han N N, et al. Analysis of Uncertainty in Determination of Kanamycin Sulfate Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine 49(02):40-43.

- [4] 张杨慧,蒋孟虹,秦峰,等. 柱后衍生化-HPLC 法测定硫酸卡那霉素注射液及滴眼液的含量[J]. 中国抗生素杂志,2019,44(01):88-93.
Zhang Y H, Jiang M H, Qin F, et al. Determination of Kanamycin sulfate injection and eye drops by post-column derivatization-HPLC method [J]. Chinese Journal of antibiotics 44(01):88-93.
- [5] 张凤妹,王 建. HPLC-电喷雾检测器测定硫酸阿米卡星中卡那霉素和硫酸盐的含量[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(05):354-358.
Zhang F M, Wang J. HPLC-determination of kanamycin and sulfate in amikacin sulfate by electrospray detector [J]. Chinese Journal of Antibiotics 40(05):354-358.
- [6] 郭永辉,李香荷. HPLC-CAD 法同时测定硫酸卡那霉素注射液中卡那霉素和卡那霉素 B 的含量[J]. 中国药师,2018,21(06):1090-1092.
Guo Y H, Li X H. HPLC-cad determination of Kanamycin and Kanamycin B in Kanamycin sulfate injection by method [J]. Chinese pharmacist, 2018, 21(06):1090-1092.
- [7] 李 珉,侯金凤,陆 岩,等. HPLC-CAD 法测定硫酸卡那霉素及注射液含量及有关物质[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(03):341-347.
Li M, Hou J F, Lu Y, et al. HPLC-cad method for determination of kanamycin sulfate and injection and related substances [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(03):341-347.
- [8] 刘 敏,刘俊丽,田佳懿,等. 医院制剂复方苯海拉明滴鼻液中硫酸卡那霉素的含量测定[J]. 中国医药导报,2019,16(12):109-112.
Liu M, Liu J L, Tian J Y, et al. Determination of Kanamycin sulfate in compound phenhydramine nasal drops hospital preparations [J]. China Medical Guide, 2019, 16(12):109-112.
- [9] 张雪娇,刘春叶,杨黎燕,等. 可见分光光度法测定卡那霉素的含量[J]. 理化检验(化学分册),2016,52(05):510-513.
Zhang X J, Liu C Y, Yang L Y, et al. Determination of Kanamycin by visible spectrophotometry [J]. Physicochemical examination (Chemical Division), 2016, 52(05):510-513.
- [10] 刘照振,李文东,王俊秋. 氯卡麻滴鼻剂中氯霉素、盐酸麻黄碱和硫酸卡那霉素的含量测定[J]. 首都食品与医药,2015,22(04):46-49.
Liu Z Z, Li W D, Wang J Q. Determination of chloramphenicol,

ephedrine hydrochloride and kanamycin sulfate in nasal drops [J]. Capital Food and Medicine 22(04):46-49.

- [11] 万译文,黄向荣,伍远安,等. 固相萃取净化-高效液相色谱串联质谱法测定鱼肉制品中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的含量[J]. 现代食品科技,2018,34(08):255-259+266.
Wan Y W, Huang X R, Wu Y A, *et al.* Determination of streptomycin, dihydro streptomycin and kanamycin in fish meat products by solid phase extraction purification-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Modern Food

Technology,2018,34(08):255-259,266.

- [12] 陶大利,白鹤,李琴. SPE 净化-液质联用测定氨基糖苷类药物残留[J]. 中国乳品工业,2019,47(02):51-53,57.

Tao Dali, White Crane, Li Qin. SPE purification-determination of aminoglycoside residues by liquid-mass spectrometry[J]. China Dairy Industry,2019,47(02):51-53,57.

(编辑:陈希)