

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.08.08

HPLC - PDA 联合 UPLC - Triple TOF MS 法确证 恩诺沙星注射液中的非法添加物

宋慧敏,熊玥,汪云花,孙瑶,石慧慧

(江苏省兽药饲料质量检验所,南京 210036)

[收稿日期] 2021-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 08-0054-06 [中图分类号] S859.84

[摘要] 为确证 1 批恩诺沙星注射液中的非法添加物,通过 HPLC - PDA 法初筛,利用高分辨质谱对未知物进行筛查,并用 HPLC - PDA 和 UPLC - Triple TOF MS 两种方法进行验证,结果显示,该批样品中的非法添加物为加替沙星。本研究为兽药中非法添加物筛查及定性确证提供了一个有效的思路与方法。

[关键词] 恩诺沙星注射液;非法添加;加替沙星;确证

Identification of Illegal Additive in Enrofloxacin Injection by UPLC - Triple TOF MS and HPLC - PDA Method

SONG Hui - min, XIONG Yue, WANG Yun - hua, SUN Yao, SHI Hui - hui

(Jiangsu Testing Institute of Veterinary Drug and Feed, Nanjing 210036, China)

Abstract: To confirm the illegal addition in one batch of enrofloxacin injection. The unknown substance was screened by HPLC - PDA high - resolution mass spectrometry, and confirmed by combined HPLC - PDA and UPLC - Triple TOF MS, The results showed that the illegal additive in this batch of enrofloxacin injection was gatifloxacin. This study provides an effective ideas and method for the illegal additives qualitative analysis in veterinary drugs.

Key words: enrofloxacin injection; illegal addition; gatifloxacin; identification

自 2008 年发现第一例兽药处方外非法添加物以来,农业农村部对兽药处方外非法添加的监管与打击力度不断加大。除有针对性的出台相关法律法规进行处罚外,还相继发布了一系列公告作为兽药处方外非法添加物检查的依据^[1-2]。随着监管

手段不断加强,检查方法日臻完善,非法添加现象大幅减少,但仍有少数商家为了抢占市场份额,谋取利益最大化,采取各种手段寻求新的非法添加物。这些物质一般不常见,无论是作为兽药还是人用药,早已在市场上悄无声息,或才刚上市未进入

公众视野,有的甚至还在研发阶段。而目前已发布的检查方法多针对市场份额占有率较高的常用药,或有迹可循,或可预测的药物,这些新开发的药物无疑为非法添加的筛查带来了新的挑战。目前已发布的兽药处方外非法添加物的检查方法主要采用 HPLC-PDA 法,少数采用高效液相色谱-串联质谱法,这两种方法均需一定数量的谱库数据为支撑,而对于谱库外非法添加物的识别和确证就成了非法添加工作中的难点。随着高分辨质谱的飞速发展,UPLC-TOF MS 技术已越来越多的用于非法添加未知物的筛查。近日,在做非法添加物 HPLC-PDA 法常规筛查时,发现一批恩诺沙星注射液有一未知物,根据其紫外光谱特征及高分辨质谱提供的信息推测出疑似添加物,再用 HPLC-PDA 和 UPLC-Triple TOF MS 进行双重验证,最终确认该非法添加物为加替沙星。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Waters Arc 2998),配二极管阵列检测器(PDA2998);超高效液相色谱仪(Shimadzu UPLC LC-30A)-四级杆/飞行时间质谱仪(SCIEX Triple TOF 4600);分析天平(METTLER XS205)。乙腈、三乙胺、甲酸为色谱纯(Merk),水为超纯水,磷酸为优级纯。

1.2 试剂 加替沙星(含量 97.2%)购自中国药品生物制品检定所;恩诺沙星(含量 99.5%)购自中国兽医药品监察所;恩诺沙星注射液(100 mL:2.5 g)为江苏省内风险监测样品。

2 方法与结果

2.1 HPLC-PDA 法初筛

2.1.1 色谱条件 XBrige C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);以磷酸溶液 A(取磷酸 3.0 mL,加水至 1000 mL,用三乙胺调 pH 值至 3.0 ± 0.1,加乙腈 50 mL)-甲醇(88:12)为流动相;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:10 μL;采集波长范围为 190 ~ 400 nm,分辨率为 1.2 nm;记录 292 nm 波长处的色谱图,同时记录光谱图。

2.1.2 供试品溶液的制备 量取恩诺沙星注射液 1.0 mL,置具塞锥形瓶中,加 2% 磷酸溶液-乙腈

(1:1) 50 mL,超声处理 15 min,放置至室温,取 5.0 mL,用磷酸溶液 A(2.1.1 项下)稀释至 50 mL,摇匀,作为 HPLC-PDA 初筛用供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 称取恩诺沙星对照品 25 mg,置 50 mL 容量瓶中,按 2.1.2 项下方法操作,稀释制成每 1 mL 含约 50 μg 的对照品溶液。

2.1.4 结果分析 取供试品溶液和对照品溶液,在 2.1.1 项色谱条件下分别进样,供试品溶液色谱图中未出现与恩诺沙星保留时间一致的色谱峰,但在 30.773 min 处有一未知峰。该未知峰在 326、292、232 nm 处有最大吸收,其紫外光谱与喹诺酮类药物光谱特征相似,推测此峰为喹诺酮类药物或类似物。将该光谱图与建立的非法添加物光谱图库进行比对,未匹配到疑似添加物,需借助质谱做进一步分析。未知物光谱及色谱图见图 1。

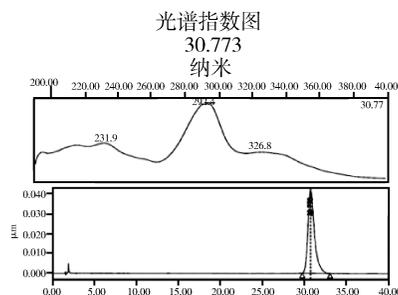


图 1 未知物光谱及色谱图

Fig 1 The chromatogram and spectrum of of the unknown compound

2.2 质谱法分析

2.2.1 色谱条件 ACQUITY HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱(0 ~ 6 min,由 90% A 线性变化为 10% A;6 ~ 10 min,保持 10% A;10 ~ 14 min,由 10% A 线性变化为 90% A;14 ~ 15 min,保持 90% A);流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:5 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾电离(ESI):正离子模式;喷雾电压:5500 V;雾化气:55 psi;加热辅助气:55 psi;气帘气:35 psi;离子源温度:500 °C;扫描模

式:MS mode,质量范围 100 ~ 1000 Da,扫描时间 100 ms;MS/MS mode,质量范围 100 ~ 1000 Da,扫描时间 50 ms,去簇电压(DP)80 V,碰撞能量(CE)35 eV,扩展碰撞能量(CES)15 eV。

2.2.3 供试品溶液的制备 取供试品溶液 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀;取 1.0 mL,用 50% 乙腈溶液稀释至 100 mL,摇匀;再取 1.0 mL,用 50% 乙腈溶液稀释至 100 mL,摇匀,即得。

2.2.4 结果分析 在 2.2.1 项和 2.2.2 项条件下,采集得到未知物的二级质谱图,利用 PeakView 软件对数据进行分析处理。根据预先导入的 40 种喹诺酮类化合物谱库信息,获得未知物提取离子流(XIC)图,对照 40 个化合物的 TOF-MS 质量精度和同位素分布情况,以及 TOF-MS/MS 谱图,得到匹配度。最终,在供试品中提取到和 Gatifloxacin(加替沙星)相似的一级质谱图,其精确质量数为 376.1667,一级质谱质量偏差为 0.3 ppm,母离子天然同位素比对结果良好(图 2)。另从图谱解析的角度看,二级质谱图(图 3)高质荷比区 $[M+H]^+ m/z$ 376.1667 离子强度最大,且和相邻碎片离子(m/z 358.1561)质荷比相差 18,属于合理丢失,推测应为未知物的分子离子峰,从而得知该未知物的分子量为 375,且分子中含奇数个 N 原子。又从图中同位素峰的比例看,该未知物不含 Cl 原子,结合 PDA 光谱图知其应为恩诺沙星同类物质,推测分子中应含有 F。对比 40 种喹诺酮类化合物,只有加替沙星符合以上所有特征,和谱库筛选结果一致。为进一步确认筛查结果,分别用 HPLC-PDA 法和 UPLC-Triple TOF MS 法对未知物进行验证。

2.3 HPLC-PDA 法验证和定量

2.3.1 供试品溶液制备 同 2.1.2 项下供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液制备 称取加替沙星对照品 25 mg,按 2.1.2 项下操作,稀释制成每 1 mL 含 50 μ g 的对照品溶液。

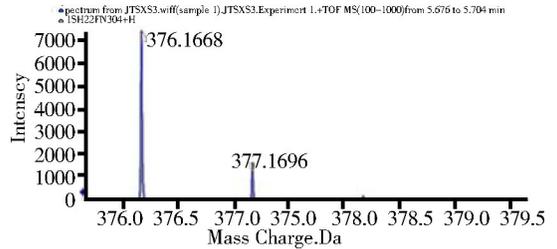


图 2 母离子天然同位素图

Fig 2 Natural isotopes of precursor ion

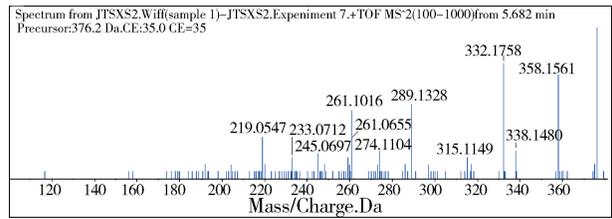


图 3 供试品二级质谱图

Fig 3 MS/MS spectra of the sample

2.3.3 色谱条件 同 2.1.1 项初筛色谱条件。

2.3.4 结果分析 将供试品中的未知物与加替沙星保留时间及紫外光谱图(图 4)进行比对,以及不同浓度本底添加对供试品中的未知物进行验证。供试品中未知色谱峰与加替沙星的保留时间一致,紫外光谱图一致;不同浓度(取对照品溶液与供试品溶液按 1:4、1:1、4:1 的比例混合)的本底添加试验显示,添加前后,供试品色谱峰的纯度角度均小于纯度阈值,可认为是单一物质峰,光谱的匹配角度均小于匹配阈值,可认为是同一化合物。验证结果表明,供试品溶液中未知物即为加替沙星,验证数据和结果见表 1、表 2。同时测得恩诺沙星注射液中非法添加加替沙星的含量为 2.2%。

表 1 HPLC-PDA 验证结果

Table 1 Verification results of HPLC-PDA		
分析物	保留时间/min	最大吸收波长/nm
加替沙星	30.693	231.9, 292.4, 325.8
供试品	30.773	231.9, 292.4, 325.8

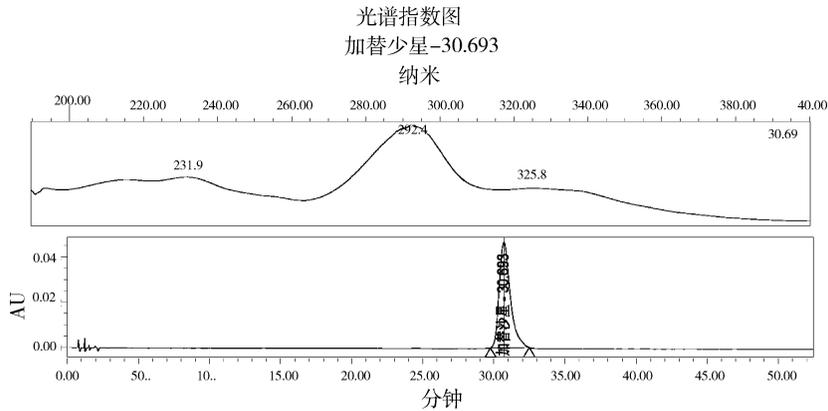


图 4 加替沙星对照品光谱指数图

Fig 4 Chromatogram and spectrogram of gatifloxacin

表 2 峰纯度与光谱相似度检查结果

Tab 2 Results of peak purity tests and spectral similarity tests

分析物	添加方式	纯度角度	纯度阈值	峰纯度检查结果	PDA 匹配角度	PDA 匹配阈值	光谱相似度检查结果
供试品	/	0.228	0.292		0.109	1.149	
加替沙星-供试品	1:4	0.109	0.298	纯度角度小于阈值,为单一物质峰	0.162	1.149	匹配角度小于阈值,为同一化合物
	1:1	0.136	0.292		0.147	1.147	
	4:1	0.142	0.285		0.175	1.147	

2.4 UPLC - Triple TOF MS 法验证

2.4.1 对照品溶液的制备 称取加替沙星对照品 25 mg,用 50% 乙腈溶液稀释制成每 1 mL 含 50 ng 的溶液,作为对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 使用 2.2.3 项下供试品溶液作为确证用供试品溶液。

2.4.3 仪器条件 同 2.2.1 项和 2.2.2 项。

2.4.4 结果分析 在与供试品相同分析条件下,得到加替沙星母离子准确分子量、母离子天然同位素、二级质谱图、保留时间四大信息,并将信息载入软件谱库中。将供试品中未知物的谱图信息与加替沙星谱图信息进行比较,得到一级质谱质量偏差为 0.2 ppm,二级谱库匹配度为 100%,保留时间基本一致,总体匹配度 98%,非法添加的未知物确证为加替沙星(图 5)。为进一步增强质谱信息的可信度,对裂解规律进行了推导(图 6)。

3 讨论

3.1 非法添加加替沙星合理性分析 恩诺沙星为第三代喹诺酮类药物,收载于《中国兽药典》2015 版一部^[3],是动物专用的广谱抗菌药物。加替沙星为第四代喹诺酮类药物^[4],与大多数氟喹诺酮抗菌药相比,增强了对革兰阳性菌及厌氧菌的抗菌作用,提高了生物利用度,从而表现出杀菌力强、选择性高的特点。临床上多用于呼吸、泌尿、生殖及消化系统等的感染,属人用药物。在恩诺沙星注射液非法添加抗菌作用更强的加替沙星,显然是为了片面追求疗效,抢占经营市场。

3.2 非法添加物筛查及确证的一般模式 目前,兽药制剂中非法添加物的筛查主要基于 HPLC - PDA 法,将未知物的光谱图与谱库中数据匹配,根据匹配结果,再用对照品谱图信息进行确证。这不仅要求有一定容量的数据库,而且对未知物的判定也仅限于库中化合物。本文将 UPLC - Triple TOF

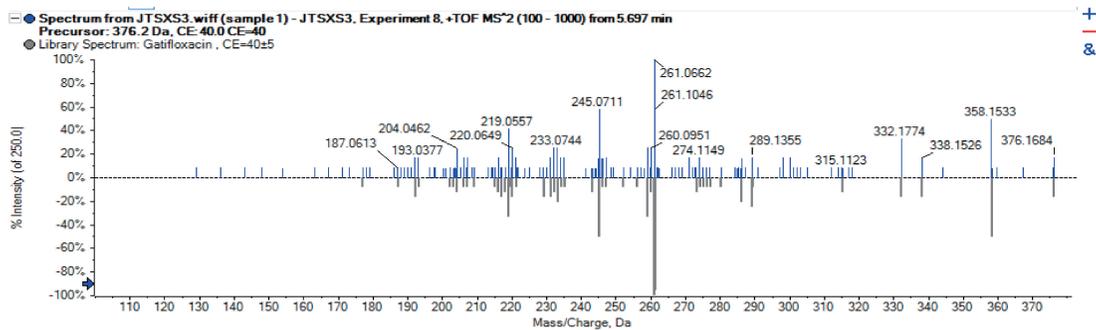


图 5 未知物二级谱图与加替沙星二级谱图的匹配图

Fig 5 MS/MS spectra of the unknown compound matches gatifloxacin

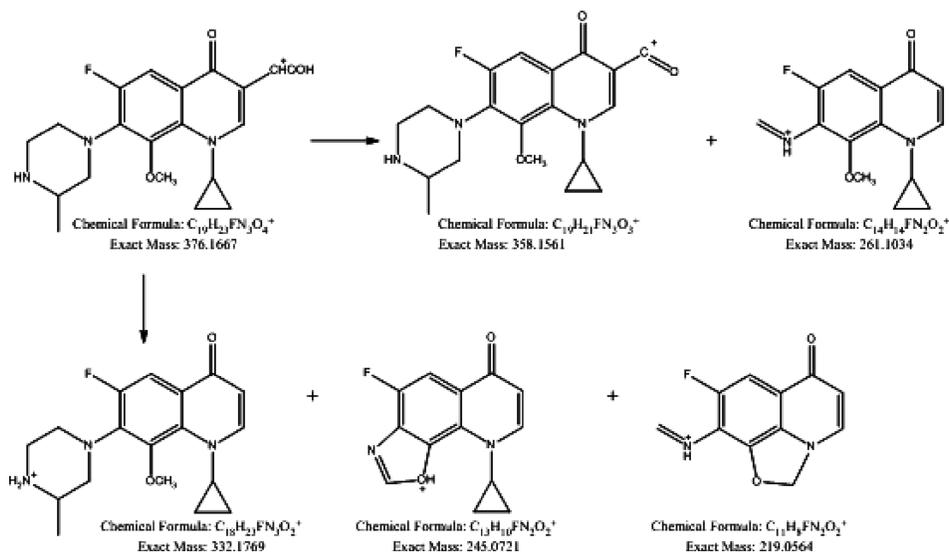


图 6 未知物可能裂解规律

Fig6 The possible fragmentation pattern of the unknown compound

MS 法与 HPLC - PDA 法相结合,利用高分辨质谱提供的精确质量数、同位素分布情况、二级质谱图等信息推测出疑似添加物,再分别用两种方法进行确认。在不具备高分辨质谱的条件下,也可利用低分辨质谱先获取未知物一级质谱图,根据谱图中分子离子峰和丢失碎片离子特征,结合谱图解析和 PDA 光谱图推测可能化合物,再进行确证。

3.3 扩充数据库的重要性 超高效液相色谱串联飞行时间质谱不仅能测得化合物的分子式和精确分子量,同时具备完全定性、定量的特性,具有高分辨率、高灵敏度和高扫描速度等特点^[5-6]。但这一切优势都需以强大的数据库为基础,所以只有不断

完善、丰富化合物数据库,才能充分发挥数据库的优势,发挥仪器本身的优势,进而对可能的非法添加物进行全面的筛查和确证。

近年来,在非法添加物的筛查中,恩诺沙星制剂多检出甲氧苄啶、苯甲酸、烟酰胺、水杨酸等非法添加物,加替沙星的检出尚属首次,且在其他制剂中也未曾检出过加替沙星。说明在高压的监管、处罚手段下,非法添加更加隐蔽,添加方式也更加多样。希望本文能给兽药中非法添加物检查提供一定的方法借鉴,同时也为监督管理部门提供监管思路。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部 2448 号公告. 兽药中非法添加物检查方法[S].
Announcement No. 2448 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Inspection method for illegal added substances in veterinary drugs[S].
- [2] 中华人民共和国农业农村部公告第 289 号. 兽药中非特定添加物质检查方法[S].
Announcement No. 289 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Inspection Method for Non-specific added substances in veterinary drugs[S].
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一五年版一部[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The First Volume of Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2015 Edition[S].
- [4] 朱曼,王睿. 第四代氟喹诺酮类抗菌药——加替沙星[J]. 中国临床药理学与治疗学,2001,(4):377-381.
Zhu M,Wang R. The fourth generation of fluoroquinolones - gat-

ifloxacin[J]. Chinese Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2001,(4):377-381.

- [5] 韩宁宁,毕言锋,刘少伟,等. HPLC-PDA 和 UPLC-Q/TOFMS 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.
Han N N,Bi Y F,Liu S W, *et al.* Screening And Validation Of The Unknown Compound In Florfenicol Powder By HPLC-PDA And UPLC-Q/TOF MS[J]. Chinese Journal OF Pharmaceutical Analysis, 2016,36(2):306-312.
- [6] 陆春波,包爱情,周芷锦,等. UPLC-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[J]. 中国兽药杂志,2018,52(12):54-60.
Lu C B, Bao A Q, Zhou Z J, *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of Unknown Additives in ColistinSulphate Soluble Powder by UHPLC-Q / TOF MS and HPLC-DAD[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018,52(11):54-60.

(编辑:侯向辉)