

# 黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素 检查方法的研究

刘自扬,董玲玲,毕言锋,郭桂芳,郝利华\*

(中国兽医药品监察所,北京,100081)

[收稿日期] 2015-12-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0056-04 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 为建立黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素的检查方法,采用薄层色谱法初筛出黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素的样品,而后用 HPLC-PDAD 法检测,液相色谱条件:采用 Atlantis® T 3 (十八烷基硅烷键合硅胶,4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为 0.02 mol/L 的磷酸氢二铵-乙腈(70:30),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 194 nm,最后用 LC-MS 法进行确证。结合薄层色谱、高效液相色谱光谱图以及质谱的分子离子峰等方面信息,证明该样品中确实非法添加了林可霉素,其中 HPLC-PDAD 法平均回收率为 97.8%,RSD 为 1.4%,检出限为 6 μg/mL。该检测方法准确可靠,可用于黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素的检测。

**[关键词]** 林可霉素;黄芪多糖注射液;薄层色谱;高效液相色谱;质谱

## Determination Methods of Lincomycin Illegally Adulterated into the Astragalus Polysaccharides Injection

LIU Zi-yang, DONG Ling-ling, BI Yan-feng, GUO Gui-fang, HAO Li-hua\*

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

**Abstract:** The study was aimed to establish TLC and HPLC-PDAD methods for determination of lincomycin illegally adulterated into the astragalus polysaccharides injection, and then identified by LC-MS. The method of TLC was used as a pretest, then the methods of HPLC-PDAD and LC-MS were used to identify lincomycin illegally adulterated into the astragalus polysaccharides injection. HPLC-PDAD was performed on a column of Atlantis® T 3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 194 nm. The mobile phase consisted of a mixture of a solution of 0.02 mol/L ammonium phosphate dibasic and acetonitrile (70:30) at a flow rate of 1.0 mL/min. The average recovery was 97.8% with RSD was 1.4%. The limit of detection of the method was 6 μg/mL. It has been proved that there was lincomycin illegally adulterated into the astragalus polysaccharides injection based on the data of the spots in the chromatogram of TLC, the retention time of HPLC including ultraviolet spectra and the molecular ion mass spectra. The method is accurate and reliable, and can be used to lincomycin illegally adulterated into the astragalus polysaccharides injection.

**Key words:** lincomycin; the astragalus polysaccharides injection; TLC; HPLC; MS

作者简介:刘自扬,硕士,从事中兽药检测研究和评审工作。

通讯作者:郝利华。E-mail:haolihua@ivdc.org.cn

林可霉素 [Lincomycin, 6-(1-甲基反-4-丙基-L-2-吡咯烷甲酰氨基)-1-硫代-6,8-二脱氧-D-赤式- $\alpha$ -D-半乳辛吡喃糖苷,  $C_{18}H_{34}N_2O_6S$ , 分子量: 406.54] 一般多以盐酸盐-水合物的形式出现, 主要用于治疗革兰氏阳性菌感染, 亦可用于治疗支原体和猪密螺旋体等感染<sup>[1]</sup>, 用作饲料添加剂时, 可促进肉鸡和育肥猪生长, 提高饲料利用率。过量使用能引起马、兔和其他草食动物严重的或致死性腹泻, 也可能产生神经肌肉阻断作用<sup>[2]</sup>。黄芪多糖是黄芪的主要活性成分之一, 具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化和抗应激等作用<sup>[3]</sup>, 黄芪多糖注射液作为其最常用的制剂, 具有能诱导机体产生干扰素, 调节机体免疫功能, 促进抗体形成等功效, 在兽医临床应用广泛, 用于鸡传染性法氏囊等病毒性疾病的治疗<sup>[4]</sup>。

自 2007 年以来, 兽药检验系统多次在黄芪多糖注射液等中兽药制剂中发现了非法添加物, 初步判定添加化学药物为林可霉素。因此, 亟需建立检测黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素的检查方法, 为中兽药制剂中非法添加化学物质提供检测手段。

## 1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Waters 2695e 高效液相色谱仪, 配有 Waters 2998 二极管阵列检测器、自动进样器和 Empower 2 工作站; Waters ACQUITY UPLC - Waters HDMS 液相色谱-质谱联用仪; CAMAG 紫外观测箱。硅胶 GF<sub>254</sub>, 青岛海洋化工分厂; 碘、乙酸乙酯、乙醇为分析纯, 磷酸氢二铵、甲酸、三乙胺、甲醇、乙腈为色谱纯。

林可霉素对照品: 中国兽医药品监察所, 批号: K0101003; 黄芪多糖提取物 (25%): 实验室自制; 样品 (3 个批次的黄芪多糖注射液分别编为 1 号、2 号和 3 号) 均为市售产品。

## 1.2 方 法

1.2.1 薄层色谱法 参照文献方法<sup>[1,5]</sup>, 取供试品 1 mL, 加甲醇-水 (1:1) 至 10 mL, 作为供试品溶液。另取林可霉素对照品, 用甲醇-水 (1:1) 制成每 1 mL 中含 5 mg 的溶液作为对照品溶液。再取黄芪多糖提取物, 加超纯水制成每 1 mL 中含 10 mg 黄芪多糖的溶液作为阴性对照溶液<sup>[5]</sup>。照薄层色谱法, 吸取上述三种溶液各 3  $\mu$ L, 点于硅胶 GF<sub>254</sub> 板上, 以乙酸乙酯-乙醇 (1:1) 为展开剂, 展开, 晾干。置紫外光灯 (254 nm) 下检视, 再经碘蒸气熏蒸后, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。在与林可霉素对照

品斑点相应的位置上不得检出斑点, 否则用 1.2.2 方法验证。

## 1.2.2 高效液相色谱法

1.2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 参照文献方法<sup>[6-7]</sup>, 所用色谱柱为 Waters Atlantis<sup>®</sup> T 3 4.6 mm  $\times$  250 mm, id, 5  $\mu$ m (十八烷基硅烷键合硅胶)。0.02 mol/L 的磷酸氢二铵-乙腈 (70:30) 为流动相; 采用二极管阵列检测器, 采集波长范围为 190~400 nm, 分辨率为 1.2 nm; 记录 194 nm 波长处的色谱图及光谱图。

1.2.2.2 测定法 取供试品 1 mL, 加水-乙腈 (70:30) 至 100 mL, 作为供试品溶液。取 1.2.1 阴性对照溶液 1 mL, 同法制成供试品阴性溶液, 另取林可霉素对照品 60 mg 于 25 mL 量瓶中, 加水-乙腈 (70:30) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用水-乙腈 (70:30) 稀释至刻度, 作为对照品溶液。取供试品溶液和对照品溶液各 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图及光谱图。供试品溶液中不得检出与林可霉素对照品溶液主峰保留时间一致且光谱指数图及最大吸收波长均一致的色谱峰, 否则按 1.2.3 质谱进行确证。

1.2.2.3 回收率试验 取阴性对照溶液 1 mL, 分别精密添加林可霉素对照品 40、50、60 mg, 振摇使溶解, 加水-乙腈 (70:30) 至 100 mL。每个浓度各制备 3 份平行样, 各取 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 同时记录光谱图和 194 nm 波长处的色谱图。

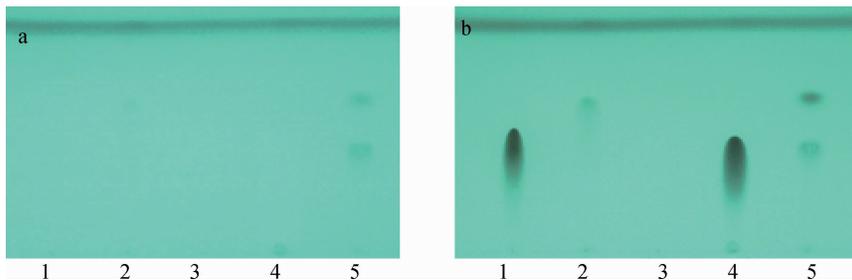
1.2.2.4 检出限试验 对照品工作溶液: 林可霉素对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水-乙腈 (70:30) 溶解并稀释至刻度, 摇匀 (100  $\mu$ g/mL)。检出限测试溶液: 分别量取 1.2.1 阴性对照溶液 1 mL、对照品工作溶液 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 水-乙腈 (70:30) 稀释至刻度, 摇匀 (林可霉素的浓度分别为 5、6、7、8、9、10  $\mu$ g/mL)。取检出限测试溶液 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 同时记录光谱图和 194 nm 波长处的色谱图。以光谱图不失真的浓度作为检出限。

1.2.3 质谱方法确证 参考文献方法<sup>[8-9]</sup>, 色谱条件为 Waters ACQUITY UPLC 液相色谱仪; ACQUITY C18 色谱柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, id, 1.7  $\mu$ m); 流速 0.3 mL/min; 柱温 35  $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 进样体积 2  $\mu$ L。

质谱条件为 Waters HDMS 四级杆-飞行时间质谱仪 (Q-TOF MS), 离子源为电喷雾正电离模式

(ESI<sup>+</sup>),毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 20 V;离子源及脱溶剂气温度分别为 120 ℃和 350 ℃;脱溶剂化气体流速设为 650 L/h。TOF MS 质量采集方式为全扫描,范围为  $m/z$  50 至 500Da,样品分析前用甲酸钠溶液进行质量数校正。另外,采用亮氨酸-脑啡肽溶液(LE,  $m/z$  566.2771)为 Lock mass 实时校正精确质量数。

通过对比对照品溶液和供试品溶液色谱峰的保留时间及分子离子峰,来确证样品中是否含有林可霉素。



1:1 号样;2:2 号样;3:阴性对照;4:林可霉素对照品;5:3 号样;a:254 nm 下检视结果; b:碘蒸气熏蒸后 254 nm 下检视结果

图 1 薄层色谱结果图

2.2 高效液相色谱法 结果见图 2-图 3,1 号样主峰保留时间与林可霉素对照品峰的保留时间一致,且两者光谱指数图及最大吸收波长均一致,确认 1 号样中含有林可霉素。方法学研究结果见下表:平均回收率为 97.8%,RSD 为 1.4%(表 1),检出限为 6 μg/mL,换算为在黄芪多糖注射液中的含量为 0.06%。

2.3 质谱确证 结果见图 5,1 号样溶液(图中 B)与林可霉素对照品溶液(图中 A)的选择离子监测色谱图中峰保留时间(RT)一致均为 1.14 min,1 号样中检出的  $m/z$  为 407.2 成分与林可霉素对照品的 407.2 一致,证明 1 号样中确实含有林可霉素。

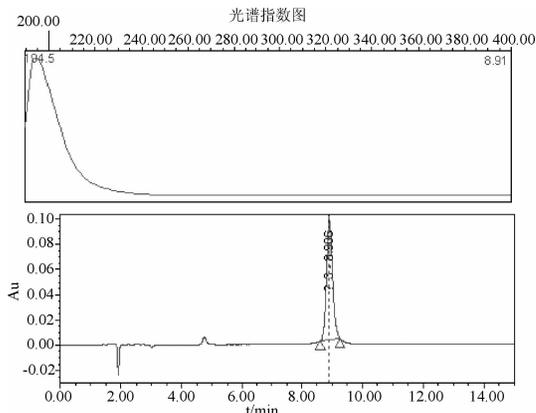


图 2 林可霉素对照品光谱指数图和色谱图

## 2 结果与分析

2.1 薄层色谱法 结果见图 1。紫外光灯(254 nm)下观察结果:1 号样、林可霉素对照品和阴性对照均未见斑点;2 号样斑点较浅,3 号样展开两个斑点。碘蒸气熏蒸后置紫外光灯(254 nm)下观察结果:1 号样中检出一个暗黑色主斑点,与林可霉素对照品斑点一致;2 号样斑点颜色加深,3 号样斑点与碘蒸气熏蒸前变化不明显。怀疑 1 号样为非法添加了林可霉素的黄芪多糖注射液,用高效液相色谱法(HPLC-PDAD)进行进一步检测。

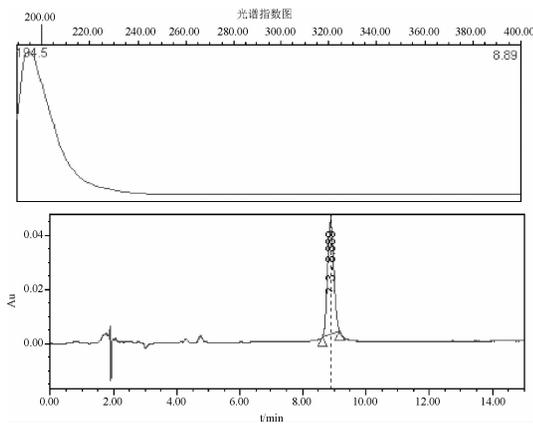


图 3 1 号样光谱指数图和色谱图

表 1 回收率试验结果表

	80%	100%	120%	平均值	RSD/%
1	98.7%	98.4%	95.4%		
2	99.5%	97.5%	96.3%	97.8%	1.4
3	99.1%	98.0%	97.6%		

## 3 讨论与小结

结果表明,在薄层色谱、高效液相色谱光谱和质谱中,1 号样出现与林可霉素对照品一致结果,确证

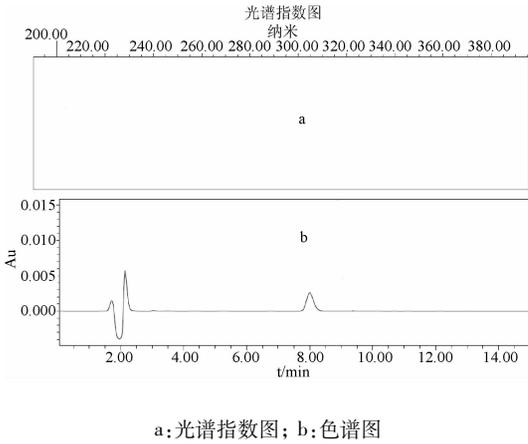


图4 供试品阴性光谱指数图和色谱图

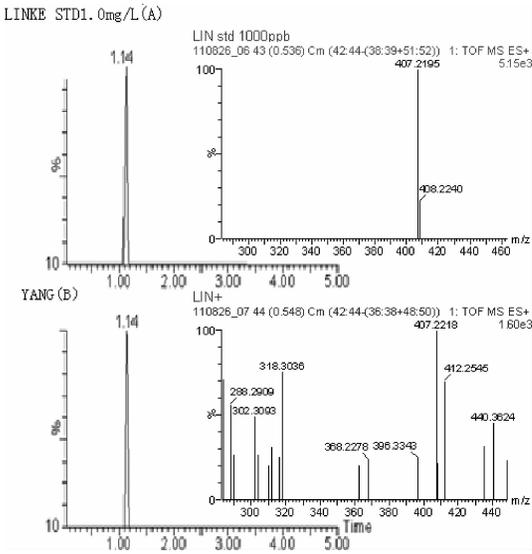


图5 林可霉素对照品(A)和1号样(B)全扫描质谱图及色谱图

1号样中含有林可霉素。阴性对照未出现与林可霉素相应的薄层色谱斑点、色谱峰和光谱图,对于本检测方法无干扰,可用于判断黄芪多糖注射液中是否非法添加林可霉素。质谱确证中,1号样溶液全扫描质谱图中除质量数为407.2的峰外,还检出其他峰,分析其为黄芪多糖注射液(含1%黄芪多糖)中的多糖降解物(各种小分子糖为主)和其他杂质,另外林可霉素在黄芪多糖注射液中添加量较少,故样品本底成分在质谱中的响应也相对明显。

针对黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素的

检查是一个常量分析(薄层色谱法即可检出),薄层色谱法和HPLC-PDAD法的无阴性干扰,考虑到HPLC-PDAD法的灵敏度和可靠性明显优于薄层色谱法,薄层色谱法又作为初筛方法,故在本试验中只对HPLC-PDAD法做进一步方法学研究,测得平均回收率为97.8%,RSD为1.4%,检出限为6 μg/mL,换算为在黄芪多糖注射液中的含量为0.06%。

本试验以市售的黄芪多糖注射液样品为研究对象,首先采用薄层色谱法对3批样品进行初筛,阳性结果者采用高效液相色谱法(HPLC-PDAD)进行检测,将供试品色谱峰与对照品色谱峰的保留时间进行比对,并比较二者紫外最大吸收波长及设定波长范围内光谱指数图的相似性。最终用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)确证,结果确定样品中有1批黄芪多糖注射液中非法添加了林可霉素。该方法可快速检测黄芪多糖注射液中非法添加林可霉素,同时质谱方法作为参考,在必要时可对检测结果进行确证。

#### 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版一部[S].
- [2] 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学药品卷[S].
- [3] 单体中,汪以真. 黄芪多糖的生物学功能及其在畜牧生产中的应用[J]. 中国饲料, 2006, (1):22-24.
- [4] 中国兽药典委员会. 国家兽药标准化学药品、中药卷第一册[S].
- [5] 邓树勇,马启龙,丁燕. TLC法快速筛选抗风湿类中成药中的化学药品[J]. 药物分析杂志,2009(10):1719-1721.
- [6] 黄滔敏,段更利,王东蕾. HPLC测定复方盐酸去氧肾上腺素喷鼻液中盐酸去氧肾上腺素、地塞米松磷酸钠和盐酸林可霉素的含量[J]. 复旦学报,2010,5:598-600.
- [7] 吴小红,李焕德. 高效液相色谱法-二极管阵列检测器同时分析测定中成药及保健品中非法添加的9种糖皮质激素[J]. 中南药学,2009,5,7(5)324-327.
- [8] 薛恒跃,王玉兰,于黎明,等. 中药制剂中添加化学药品苯巴比妥的检测方法研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):216-217.
- [9] 刑以文,闵春艳. IR-UPLC-MS/MS法鉴别妇炎康胶囊中非法添加的诺氟沙星[J]. 中国药品标准,2011,12(3):226-229.

(编辑:陈希)