

UPLC-MS/MS 检测女金丸中 9 种青霉素类抗生素残留*

李应才¹, 黄合琤¹, 董丽荣¹, 杨野²

(1. 昆明市食品药品检验所, 云南 昆明 650032; 2. 昆明理工大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时检测女金丸中 9 种青霉素类抗生素残留。**方法** 采用 ACQUITY UPLC BEH-C18 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)分离,以 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱。在电喷雾离子源,正离子模式下,以多反应监测模式(MRM)扫描进行检测,外标法定量。**结果** 9 种抗生素在相应范围内呈良好线性关系,相关系数(*r*)均大于 0.999;检测限为 0.01~0.03 ng·mL⁻¹,定量限为 0.02~0.1 ng·mL⁻¹;平均回收率(*n*=6)为 75.4%~100.2%,RSD 为 0.54%~3.43%。**结论** 该方法准确、简便、灵敏、高效,可用于女金丸中 9 种青霉素类抗生素残留的检测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱;女金丸;青霉素;双氯西林

中图分类号: R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)01-0079-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.01.015

Detection of 9 Penicillin Antibiotics Residues in Nujin pill by UPLC-MS/MS

LI Yingcai¹, HUANG Hecheng¹, DONG Lirong¹, YANG Ye²

(1. Kunming Institute for Food and Drug Control, Kunming, 650032, China;

2. Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650500, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method based on ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of nine penicillin antibiotics residues in Nujin pill. **Methods** The samples were separated on the CQUITY UPLC BEH-C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) chromatographic column by gradient elution using 0.1% formic acid and acetonitrile as the mobile phase. The electrospray ion source was operated in the positive ion mode using the multi-reaction monitoring (MRM) method, and the results were quantified by the external standard method. **Results** The correlation coefficients (*r*) of the nine drugs were all greater than 0.999 in the corresponding mass concentration ranges, and the detection limit was 0.01~0.03 ng·mL⁻¹ and the quantitative limit was 0.02~0.1 ng·mL⁻¹. The average recovery (*n*=6) was 75.4%~100.2% and RSD was 0.54%~3.43%. Of the 30 samples tested, 1 was found to contain dicloxacillin at a level of 0.193 mg·kg⁻¹. No other drugs were found. **Conclusion** The method is accurate, simple, sensitive and highly effective. It can be used for the determination of nine kinds of penicillin residues in traditional Chinese medicine pills.

KEY WORDS: UPLC-MS-MS; Nujin pill; penicillin; Dicloxacillin

女金丸(水蜜丸)是由当归等 23 味中药,粉碎成细粉,过筛,混均,每 100 g 粉末用炼蜜 35~50 g 作为黏合剂,加适量水制成的固体制剂^[1]。在蜜蜂养殖中,蜂农为了防病治病,会使用氯霉素、青霉素等各种抗生素,从而残留在蜂蜜中^[2-5]。青霉素类抗生素具有较多的不良反应,包括过敏反应、皮疹、白细胞数目减

少、心率增加、恶心、呕吐、血尿等,会累及多个系统及器官,使患者的器官功能受到损害,更有甚者会威胁生命安全^[6-7]。目前有文献报道蜂蜜中抗生素的检测^[8-11],但中药丸剂中抗生素的检测少有报道。中药丸剂的制备,如果使用了抗生素残留超标的蜂蜜,将带入制剂中,对人体产生伤害。本试验以女金丸(水

收稿日期: 2022-01-18

* 基金项目: 云南省科技厅项目(云南省青年拔尖人才 YNWR-QNBJ-2019-124)

第一作者简介: 李应才(1979-),男,副主任药师,研究方向:药品质量检验研究。E-mail:981042112@qq.com

蜜丸)为研究对象,采用超高效液相色谱-串联质谱法^[12-24],建立了一种快速、有效检测女金丸中 9 种青霉素类抗生素残留的检测方法,为中药丸剂中抗生素残留的检验研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 AB SCIE 5500+ QTRAP 质谱仪,配 ESI 离子源(美国应用生物系统公司);超高效液相色谱仪(SHIMADZU LC40);AL104(万分之一)电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);MS105DU(十万分之一)微量分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);Milli-Q 7015 超纯水制备仪(MERCK MILLIPORE 默克密理博);KQ5200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂试药 对照品 9 种青霉素混标(批号 21020687)来源于北京坛墨质检科技有限公司;色谱纯乙腈购于 Thermo Fisher 公司,色谱纯甲酸购于国药集团化学试剂有限公司。女金丸为网络购买样品,共 30 批次。

2 实验方法

2.1 实验条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH-C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液-乙腈;流速:0.2 mL·min⁻¹;柱温:40 ℃;进样量:10 μL。按照表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	0.1%甲酸水溶液/%	乙腈/%
0.00	95	5
3.00	5	95
4.00	5	95
4.10	95	5
6.00	95	5

2.1.2 质谱条件 采用 SCIEX 5500 + QTRAP 质谱系统,电喷雾离子源(ESI 源),多反应监测模式,离子源温度为 550 ℃,正离子模式扫描,离子源电压为 5.5 kv,喷雾气(Gas1) 55 Psi,辅助加热气(Gas2) 55 Psi,气帘气 30 Psi。优化得到各药物的质谱参数见表 2。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取上述对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加水使其溶解并定容至刻度,摇匀,得

表 2 各药物质谱参数

序号	药物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 (CE/V)	去簇电压 (DP/V)
1	阿莫西林	366.3	114.0*	25	56
			280.2	18	
2	氨苄西林	350.2	192.0*	22	64
			160.1	21	
3	哌嗪西林	518.2	143.1*	30	96
			160.1	35	
4	青霉素 G	335.2	160.2*	20	72
			176.1	20	
5	青霉素 V	351.2	160.0*	20	77
			192.0	20	
6	苯唑西林	402.3	160.2*	18	75
			243.2	18	
7	氯唑西林	436.3	160.2*	20	75
			277.2	21	
8	萘夫西林	415.0	199.0*	23	72
			171.0	49	
9	双氯西林	470.3	160.0*	20	80
			311.1	18	

注:标有*的离子为定量离子。

九种青霉素混合对照品储备液。

精密量取上述混合对照品储备液适量,用 20%乙腈溶液稀释至需要浓度,得 9 种青霉素混合对照品工作溶液。

2.2.2 供试品溶液 取供试品适量,研细,取约 2 g,精密称定,置 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中,加入 10 mL 水,涡旋震荡 10 min。精密加入乙腈 10 mL,涡旋混合 1 min,再加入 4.0 g 无水硫酸镁、1.0 g 氯化钠混合粉末,立即摇散,置振荡器上剧烈振荡 3 min,离心(5 000 r/min)5 min。精密吸取 5 mL 上层清液,置于预先装有 100 mg C18、150 mg N-丙基乙二胺(PSA)、100 mg 石墨化炭黑(GCB)的离心管中,涡旋 2 min,离心(5 000 r/min)5 min。精密吸取上清液 2 mL,置氮吹仪上于 40 ℃水浴吹干,精密加入 20%乙腈溶液 1.0 mL,涡旋混匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 线性范围、检测限及定量限考察 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液,用 20%乙腈溶液稀释

成系列浓度的混合对照品工作溶液,按“2.1”项条件测定。以各对照品质量浓度($X, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,以定量离子对峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归计算,结果色谱峰面积与其质量浓度在一定的范围内具有良好的线性关系, r 均大于 0.999。精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液,逐级稀释后按“2.1”项条件测定,以离子对信噪比大于等于 3 考察其检测限,以离子对信噪比大于等于 10 考察其定量限。结果见表 3。

表 3 各药物成分线性关系、检测限及定量限

药物名称	线性回归方程	相关系数(r)	线性范围($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
阿莫西林	$y=13130x-13069$	0.9991	0.1-50	0.03	0.1
氨苄西林	$y=17633x-11495$	0.9992	0.1-50	0.03	0.1
哌嗪西林	$y=4025x-3300$	0.9997	0.1-50	0.03	0.1
青霉素 G	$y=36585x-15773$	0.9997	0.03-50	0.01	0.03
青霉素 V	$y=40995x-31296$	0.9992	0.03-50	0.01	0.03
苯唑西林	$y=72561x-69617$	0.9990	0.02-50	0.01	0.02
氯唑西林	$y=5756x-9219$	0.9992	0.1-50	0.03	0.1
萘夫西林	$y=209957x-53334$	0.9995	0.02-50	0.01	0.02
双氯西林	$y=23827x-20661$	0.9996	0.1-50	0.03	0.1

2.4 精密性、重复性、稳定性实验 精密吸取同一混合对照品工作溶液,按“2.1”项条件测定,连续进样 6 次,其峰面积的 RSD 均小于 4%,表明仪器精密性良好。精密称取 6 份阴性样品,每份约 2.0 g,加对照品溶液,添加量为 10.0 ng,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项条件分别进样测定,计算各添加药物成分的含量,其平均含量 RSD 均小于 4%,表明该方法重复性好。取同一份供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 后,按“2.1”项条件分别进样测定,记录各药物成分峰面积并计算其 RSD 值,均小于 4%,表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定。结果见表 4。

2.5 准确度试验 精密称取 6 份阴性样品,每份约 2.0 g,加对照品溶液,添加量为 10.0 ng,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项条件分别进样测定。结果见表 5。

表 4 各药物成分的精密性、重复性、稳定性结果($n=6$)

药物名称	仪器精密性(RSD/%)	重复性(RSD/%)	稳定性(RSD/%)
阿莫西林	3.22	1.22	2.28
氨苄西林	2.57	2.72	2.51
哌嗪西林	2.73	3.14	3.50
青霉素 G	1.08	2.02	2.09
青霉素 V	2.03	1.85	2.71
苯唑西林	1.39	1.04	1.52
氯唑西林	2.29	3.61	1.95
萘夫西林	1.47	1.06	1.35
双氯西林	2.11	2.00	2.27

表 5 各药物成分加样回收率试验结果($n=6$)

成分	加入量/ ng	测得量/ ng	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
阿莫西林	10.0	10.28	102.8	100.2	2.26
		9.98	99.8		
		9.93	99.3		
		9.70	97.0		
		9.92	99.2		
		10.28	102.8		
		9.43	94.3		
		10.17	101.7		
		9.95	99.5		
氨苄西林	10.0	9.78	97.8		
		9.79	97.9		
		10.12	101.2	97.6	3.43
		9.95	99.5		
		9.93	99.3		
		9.55	95.5		
		9.78	97.8		
		9.20	92.0		
		9.20	92.0		
青霉素 G	10.0	8.20	82.0	79.6	2.13
		8.10	81.0		
		7.95	79.5		
		7.88	78.8		
		7.90	79.0		
		7.72	77.2		

续表 5

成分	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	/ng	/ng	%	%	%
青霉素 V	10.0	8.30	83.2	83.5	2.62
		8.72	87.2		
		8.18	81.8		
		8.45	84.5		
		8.10	81.0		
苯唑西林	10.0	7.53	75.3	75.4	0.54
		7.62	76.2		
		7.55	75.5		
		7.55	75.5		
		7.50	75.0		
氯唑西林	10.0	7.83	78.3	77.3	1.82
		7.65	76.5		
		7.91	79.1		
		7.82	78.2		
		7.53	75.3		
萘夫西林	10.0	7.78	77.8	79.1	1.36
		8.00	80.0		
		7.83	78.3		
		7.90	79.0		
		8.07	80.7		
双氯西林	10.0	8.30	83.0	80.9	2.30
		8.21	82.1		
		8.15	81.5		
		8.00	80.0		
		8.12	81.2		
		7.77	77.7		

2.6 实际样品的检测 利用建立的方法,对 30 批样品进行检测,结果在 30 批样品中,有 1 批样品检出双氯西林,含量为 $0.193 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其他样品均未检出。对照品溶液(A)和阳性供试品溶液(B)多反应监测(MRM)色谱图见图 1。

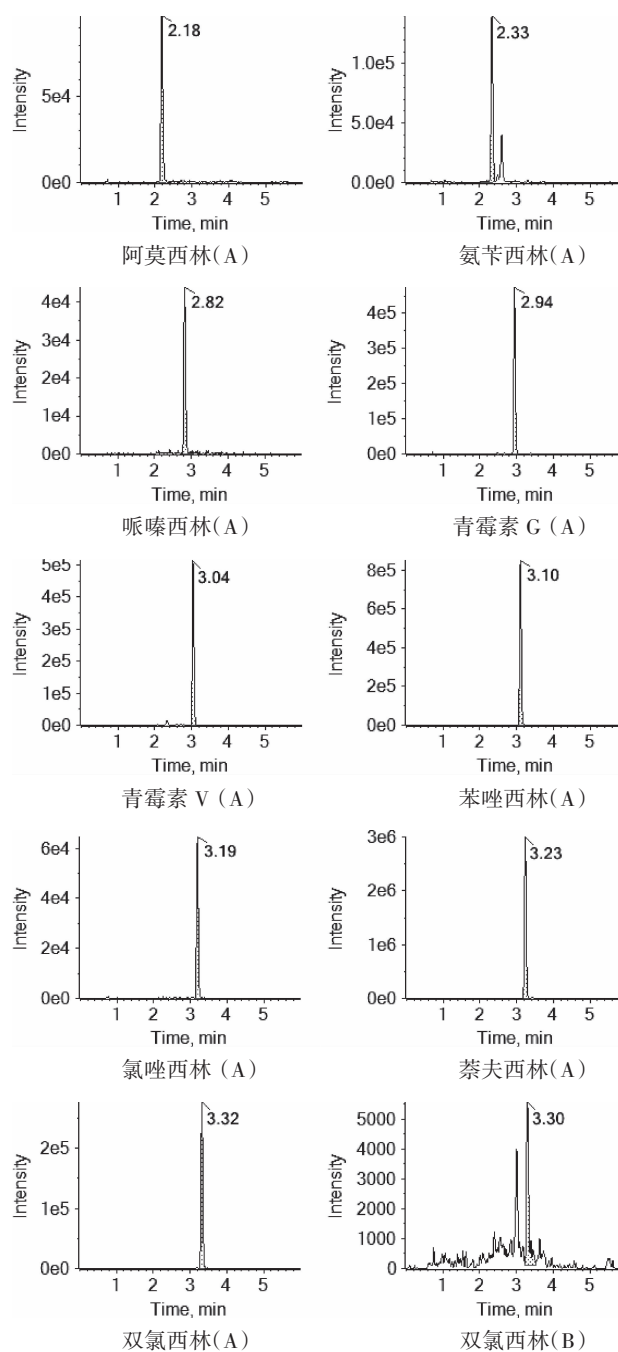


图 1 对照品溶液(A)和阳性供试品溶液(B)多反应监测(MRM)色谱图

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 本试验比较了流动相体积分数为 0.1%的甲酸水溶液-0.1%甲酸甲醇溶液、0.1%的甲酸水溶液-甲醇溶液、0.1%的甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液及 0.1%的甲酸水溶液-乙腈溶液对目标物的分离效果。结果表明,流动相体积分数为 0.1%的甲酸水溶液-乙腈溶液时,目标物离子化效率高,色谱峰形好。

3.2 前处理方法的优化 本方法比较了水、甲醇和乙腈,作为提取溶剂进行直接提取的提取效率,结果用水提取,乙腈萃取提取效率最好,但由于样品基质复杂,基质干扰效应明显,难于满足回收率要求。本文选择了QUECHERS盐包萃取净化法,通过优化PSA、GCB和C18用量比例,达到了最优净化效果。

3.3 中药丸剂抗生素残留检测的思考 中药丸剂抗生素残留,除了人为添加外,主要由蜂蜜残留而引入。目前蜂蜜中抗生素的检测已有报道。由于蜂蜜基质相对中药更单一,对实验的基质干扰更小,建议加强对中药丸剂辅料蜂蜜的抗生素残留进行检测控制。

4 小结

本试验建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时检测中药丸剂中9种青霉素类抗生素残留的分析方法。该方法具备灵敏度高、重复性好、分析时间短、取样量小等优点,可为检测中药丸剂中抗生素残留提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:547-549.
- [2] 李周敏,邵诚,方惠群. 蜂蜜中残留抗生素的检测方法研究[J]. 安徽医药,2012,16(5):568-570.
- [3] 陈明,王冉,魏瑞成,等. 市售蜂蜜产品中抗生素残留问题[J]. 蜜蜂杂志,2013,33(2):11-12.
- [4] 陈炯,李玉伟,宁准梅,等. 欧盟蜂蜜抗生素残留监控体系研究及对我国的启示[J]. 食品工业科技,2013,34(15):277-280.
- [5] 姚焕洁. 蜂蜜中的抗生素的研究意义及检验方法分析[J]. 食品安全导刊,2016(21):80.
- [6] 孙庆. 青霉素类抗生素发生不良反应的药学分析[J]. 中外医疗,2021,40(19):81-83.
- [7] 钟斌. 青霉素类药物发生不良反应的药学分析[J]. 北方药学,2020,17(3):190-191.
- [8] 李学民,母健,王蕾,等. 液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中9种青霉素[J]. 河北大学学报(自然科学版),2012,32(5):492-498.
- [9] 汪建妹,杨华,曾银欢,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中抗生素和农药浓度[J]. 浙江大学学报(理学版),2018,45(3):330-342.
- [10] 徐宜宏,李晓东,姜玲玲,等. 超高效液相色谱串联质谱法同时检测蜂蜜中多种抗生素残留的研究[J]. 畜牧与饲料科学,2018,39(12):17-22.
- [11] 左甜甜,张琳琳,金红宇,等. UPLC-MS/MS检测益心酮片中37个非法添加解热镇痛类化合物[J]. 药物分析杂志,2021,41(10):1739-1747.
- [12] 王艳红,王广珠,张任男,等. HPLC-MS/MS法同时测定止咳平喘类中成药中添加的7个化学抗菌类物质[J]. 药物分析杂志,2021,41(8):1399-1407.
- [13] 陈瑞春,贾海涛,艾连峰,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和奶粉中9种青霉素类药物残留量[J]. 食品科学,2011,32(18):249-252.
- [14] 王飞,陈其勇,宓捷波,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定畜产品中6种青霉素类药物残留理化检[J]. 理化检验(化学分册),2015,51(6):756-760.
- [15] 左志辉,高立勤,唐素芳. 固相萃取-液相色谱串联质谱法同时定量检测蜂蜜中28种抗生素类药物残留的研究[J]. 药物分析杂志,2009,29(7):1196-1201.
- [16] 郑景娇. 食品中抗生素残留常用检测技术应用浅析[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(21):7884-7889.
- [17] 樊士勇,周辛波. 关注新型抗菌药物研究进展[J]. 临床药物治疗杂志,2017,15(10):91-92.
- [18] 李周敏,孙艳艳,姚开安,等. 动物源性食品中抗生素残留检测前处理及其分析方法研究进展[J]. 药物分析杂志,2013,33(6):901-906.
- [19] 张甦,胡青,孙健,等. 液质联用检测中成药和保健食品中非法添加的48种抗生素类成分[J]. 中成药,2015,37(3):542-548.
- [20] 李进,张培培,姚尚辰,等. 柱切换LC-MS_n法分析阿莫西林钠克拉维酸钾原料的杂质谱[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(3):330-340.
- [21] 徐硕,金鹏飞,徐巧玲,等. 中药及保健品中非法添加化学药物的研究进展[J]. 中国新药杂志,2015,24(16):1843-1850.
- [22] 王静文,曹进,王钢力,等. 保健食品中非法添加药物检测技术研究进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(1):1-11.
- [23] 郭宇鹏,潘军. 中成药中非法添加10种喹诺酮类药物的LC-MS/MS检测方法研究[J]. 中国药师,2015,18(12):2162-2164.
- [24] 林伟杰,梁祈,詹若挺. 止咳平喘类中成药中9种非法添加化学成分的定性定量检验方法研究[J]. 广州中医药大学学报,2017,34(3):418-423.