

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.09.02

高效液相色谱 - 串联质谱法检测清肺止咳散中添加阿奇霉素含量

章安源¹, 张传津¹, 王洪涛², 张琦¹, 陈志强¹, 李有志¹, 魏秀丽¹,
牛华星¹, 杨修镇¹, 薄永恒¹, 刘霄飞¹, 魏茂莲¹, 田学磊³, 陈玲^{1*}

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022;

2. 潍坊海关, 山东潍坊 261041; 3. 青岛信诺邦生物科技有限公司, 山东青岛 266000,)

[收稿日期] 2021-05-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2021)09-0008-07 [中图分类号] S859.796

[摘要] 建立了清肺止咳散中非法添加阿奇霉素的 HPLC-MS/MS 含量检测方法。样品经乙腈提取稀释后, 以 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱为分离柱, 质谱正离子扫描分析测定。结果显示, 在 5~250 ng/mL 范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9993$); 方法检出限为 25 mg/kg, 定量限为 50 mg/kg。在 50、100、200、500 mg/kg 添加水平的回收率为 89.1%~98.6%, 批内变异系数小于 1.6%, 批间变异系数为 4.1%。本方法灵敏、快速、重现性好, 适用于清肺止咳散中非法添加阿奇霉素含量的测定。

[关键词] 阿奇霉素; 清肺止咳散; 高效液相色谱 - 串联质谱法

Determination of Azithromycin in Qingfeizhikesan Powder by High-performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry

ZHANG An-yuan¹, ZHANG Chuan-jin¹, WANG Hong-tao², ZHANG Qi¹, CHEN Zhi-qiang¹,
LI You-zhi¹, WEI XiU-Li¹, NIU Hua-xing¹, YANG Xiu-Zhen¹, BO Yong-Hen¹, LIU Xiao-fei¹,
WEI Mao-Lian¹, TIAN Xue-Lei³, CHEN Ling^{1*}

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Jinan 250022, China;

2. Weifang Customs, Weifang, Shandong 261041, China 3. Qingdao Xinnuobang Biotechnology Co. Ltd., Qingdao, Shandong 266000, China)

Corresponding author: CHEN Ling, E-mail: 675773633@qq.com

Abstract: A HPLC-MS/MS method for the determination of azithromycin illegally added in Qingfei Zhike powder was established. The sample was extracted and diluted with acetonitrile, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 was used as the separation column, scanned positive ion by mass spectrometry. The results showed that the

作者简介: 章安源, 高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验及科研工作; 张传津, 研究员, 从事兽药畜产品检验、兽医药理毒理学研究及新兽药研制开发, 为共同第一作者。

通讯作者: 陈玲。E-mail: 67577363@qq.com

good linear range was from 5 to 250 ng/mL ($R^2 = 0.9993$) ; The detection limit was 25 mg/kg, and the quantitation limit was 50 mg/kg. The analysis of additive concentration 50, 100, 200, 500 mg/kg showed that the recoveries ranged from 89.1% to 98.6% and the coefficient of variation between and within batches were below 4.1%, 1.6%. The experiment showed that the method was reliable, sensitive and suitable for the determination of azitromycin added in Qinfeizhikesan powder.

Key words: azitromycin; qinfeizhikesan powder; HPLC - MS/MS

大环内酯类抗生素阿奇霉素抗菌谱广,临幊上广泛用于治疗敏感菌所致呼吸道、皮肤和软组织感染^[1-3]。有些养殖户在化痰清肺、平喘止咳等中兽药散剂中违规添加阿奇霉素,目的是控制畜禽咳嗽病的治疗,我国农业部在 2005 年 8 月曾发布了第 560 号令,取消了阿奇霉素作为兽药使用。非法添加人用抗生素,不仅易产生细菌耐药性问题,而且增加动物源性食品中阿奇霉素的残留风险。当前国内外尚无中兽药散剂中阿奇霉素的检测方法标准,仅有含量测定相关的液相色谱方法,专属性不强,且中药组分的干扰较大,本实验拟建立高效液相色谱-串联质谱方法检测中兽药散剂中违规添加的阿奇霉素含量,为中兽药单方或复方制剂中非法添加阿奇霉素含量的定性、定量检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器 AE - 240 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Agilent 1260 - 6460 高效相色谱四极杆电离喷雾串联质谱仪(美国安捷伦公司); KQ - 250DB 超声仪(昆山市超声仪有限公司), 5810R 高速冷冻离心机(日本日立公司), 0.22 μm 的滤膜为美国 Waters 公司。

1.2 药品及试剂 阿奇霉素(来源: CAS 公司, 编号: 83905 - 01 - 5, 纯度≥97%)。甲酸、乙腈(色谱纯, 德国 Merk 公司,); 超纯水。高纯氮, 高纯氩(纯度均为 99.99%, 济南德阳气体有限公司)。

1.3 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱, 100 mm × 3.0 mm, 粒径 2.7 μm, 或性能相当者; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水溶液(0.1% 甲酸); 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 °C。高效液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0.00	10	90
2.00	90	10
5.00	90	10
5.30	10	90
9.00	10	90

1.4 质谱条件 电离方式: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描(ESI⁺); 检测方式: 多反应监测(MRM); 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流量: 9.0 L/min; 鞘气温度: 250 °C; 鞘气流速: 11.0 L/min; 碰撞气: 40 psi; 毛细管电压: 4 kV; 测试药物定性、定量离子和碰撞能量见表 2。

表 2 质谱测定参数

Tab 2 Mass Spectrometric Determination of Parameter

药物	定量离子对	定性离子对	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
阿奇霉素	749.3 > 591.1	749.31 > 591.1 749.31 > 158.3	90 90	30 50

1.5 样品制备

1.5.1 阴性样品 清肺止咳散, 来源: 山东某兽药企业; 批号 20201101。

1.5.2 标准储备液的制备 精密称取阿奇霉素标准品 10.31 mg(准确至 0.01 mg), 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摆匀, 即得 1000 μg / mL 标准储备液。-20 °C 冰箱保存, 贮存期 3 个月。

1.5.3 样品溶液的制备 准确称取 1.5.1 项下样品 0.2 g(精确到 0.001 g)于 250 mL 三角烧瓶中, 加入 50 mL 40% 乙腈溶液超声提取 15 min, 转移至

100 mL 容量瓶中, 加初始流动相(1.3)稀释至刻度。用滤纸过滤, 收集续滤液。准确吸取续滤液 1.0 mL, 至 10 mL 容量瓶中, 用初始流动相(1.3)稀释至刻度, 摆匀, 滤膜过滤, 过滤液待测。同时按上述步骤做样品空白试验。

1.5.4 空白基质溶液的制备 称取 0.2 g 样品 50 份, 按照 1.5.3 项下方法处理后即得空白基质溶液。

1.5.5 基质匹配标准储备溶液的制备 精密量取标准储备液 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加空白基质溶液稀释至刻度, 摆匀, 滤过, 即得 10 μg/mL 的基质匹配标准储备溶液。

1.5.6 阳性添加样品的制备 准确称取阿奇霉素 5、10、20、50 mg 加入到阴性空白散剂样品 100 g 中, 混匀, 即每 1 kg 分别添加阿奇霉素 50、100、200、500 mg, 每个添加量制备 3 份平行样, 按待测样品制备方法(1.5.3 项)制备阳性添加样品, 在上述液相色谱条件(1.3 项)和质谱条件(1.4 项)进行测定, 每份样品至少进样 2 次, 取平均值。

1.5.7 基质标准曲线的制备 准确吸取 5.0 mL 基质匹配标准储备溶液(10 μg/mL), 至 100 mL 容量瓶中, 用空白基质溶液稀释至刻度, 摆匀, 得 500 ng/mL 的基质标准溶液。分别吸取 500 ng/mL 的基质标准溶液适量, 用空白基质溶液倍比稀释, 得 5、10、25、50、100、125、250 ng/mL 的标准物质系列工作液。

2 结果与分析

2.1 线性考察 在选定的色谱条件下, 使用梯度洗脱的方法, 可有效地分离各离子。5、10、25、50、100、125、250 ng/mL 的基质匹配标准溶液, 经高效液相色谱-串联质谱仪测定后, 以标准溶液中阿奇霉素定量离子峰面积为纵坐标, 标准溶液中相应的阿奇霉素浓度为横坐标, 绘制基质标准曲线。阿奇霉素在 5~250 ng/mL 范围内标准曲线线性回归方程为 $Y = 1309.94X + 119.96$, 其决定系数 R^2 为 0.9993, 线性关系良好。

2.2 精密度试验 精密吸取基质匹配标准溶液 50 ng/mL(10 μL), 连续进样 6 次。以峰面积计算, 得出阿奇霉素峰面积的 RSD(相对标准偏差)为

1.8%。表明仪器精密度良好, 符合检测要求。

2.3 稳定性试验

2.3.1 标准溶液稳定性 配制阿奇霉素标准储备液将其分装为 3 瓶, 分别将其储存在冷冻、冷藏和室温条件下, 每周稀释上机, 考察稳定性。实验数据表明, -20 ℃ 和 4 ℃ 储存的标准储备液 3 个月内无明显差异, 25 ℃ 存储条件下略有差异。结果见表 3。

表 3 标准储备液稳定性考察

Tab 3 Stability of standard stock solution

化合物	浓度/ (μg·mL ⁻¹)	保存温 度/℃	实测回收率/%					
			0 d	15 d	30 d	60 d	90 d	
			-20	100.0	99.8	99.6	99.1	98.2
阿奇霉素	200	4	100.0	99.8	99.6	99.1	98.2	
		25	100.0	99.5	99.1	98.7	96.8	

2.3.2 基质添加阿奇霉素稳定性 清肺止咳散中添加阿奇霉素(50 mg/kg)后, 分别将其储存在冷冻、冷藏和室温条件下, 稀释至 10 ng/mL 上机, 并且每周将不同储存状态下的标准储备液和中间液进行稀释上机, 即用第 0 天的数据为标曲单点对每周的数据进行校正。实验数据表明, 在冷冻(-20 ℃)条件下储存的标准 90 d 内, 无降解。而在室温条件下储存的阿奇霉素储备液从第 2 个月开始出现降解; 阿奇霉素中间液从第 1 个月就开始出现降解, 第 2 个月时已经出现明显降解。结合实验数据和 GB/T 27404-2008 推荐的有效期, 阿奇霉素储备液和中间液的有效期最终定为 3 个月。结果见图 1。

2.4 回收率试验 50、100、200、500 mg/kg 四个添加浓度下, 平均回收率在 89.1%~98.6% (表 4)。批内相对标准偏差 <1.6%, 批间相对标准偏差为 4.1%。

2.5 检出限和定量限 空白基质按确定的步骤处理后, 测定结果表明: 在相应的保留时间, 空白基质对所测分析物无干扰。在空白样品中添加阿奇霉素标准品, 按确定的提取方法处理后, 经高效液相色谱-串联质谱仪检测, 计算信噪比。添加浓度为 25 mg/kg 时, 标准溶液信噪比(S/N) ≥ 3, 确定为

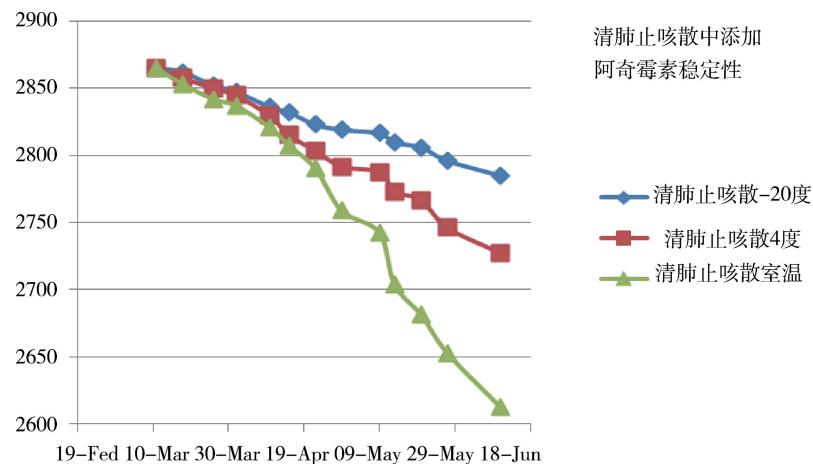


图 1 清肺止咳散添加阿奇霉素溶液稳定性

Fig 1 Stability of Qingfeizhike powder added azithromycin solution

表 4 回收率和精密度试验结果 ($n=3$)

Tab 4 Result of recovery and precision for azithromycin

清肺止咳散	添加量/(mg·kg ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
阿奇霉素	50	97.46	99.55	98.78	98.6 1.1
	100	95.04	95.30	96.88	95.7 1.0
	200	92.08	91.21	91.29	91.5 0.5
	500	87.81	88.85	90.56	89.1 1.6 4.1

方法的检出限。添加浓度为 50 mg/kg 时, 标准溶液显示信噪比(S/N) ≥ 10, 作为此方法定量限。检测限和定量限满足检测要求。

2.6 质谱图 空白样品、对照溶液及阳性添加样品的高效液相色谱-串联质谱图见图 2~图 4。

3 讨论与结论

3.1 前处理方法的选择与优化 为确保散剂中添加阿奇霉素有效成分全部溶解, 分别用甲醇、乙腈、水、20% 乙腈水、40% 乙腈水、60% 乙腈水、80% 乙腈水、乙腈:0.1% 甲酸水(40:60)、乙腈:0.2% 甲酸水(40:60)、乙腈:0.5% 甲酸水(40:60)对不同批号的样品稀释并超声提取。结果发现甲醇、水提取时, 提取得到供试品杂质成分多, 回收率不高; 用乙腈提取后的提取液较为清澈, 基质干扰小。因为阿奇霉素在中性水溶液中相对较稳定, 因此, 决定调节乙腈和水的比例, 实验结果发现, 40% 乙腈水提取后的供试品溶液基质干扰最小。阿奇霉素属于弱碱性化合物, 易溶于酸性水溶液^[4], 为进一步确

定甲酸水的用量, 研究比较甲酸 0.1%、0.2%、0.5% 用量时, 结果表明甲酸用量为 0.1% 时, 超声提取 15 min, 且基质效应无明显差别, 杂质干扰少, 峰形对称, 阿奇霉素回收率较高。故选择初始流动相处理样品。基质匹配标准溶液采用空白基质溶液定容, 空白基质溶液在与阿奇霉素对照品相同保留时间处, 均无色谱峰出现, 证明在很大程度上基质效应小, 实验准确度高。

3.2 液相色谱条件的选择与优化 本实验分别考察甲醇-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液分离情况, 摒弃了乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(12:88)作为流动相, 降低了色谱柱因磷酸盐易堵的风险^[5-8]。不断调整流动相比例: 甲醇和乙腈由 30% 下降到 10%, 最终选择了乙腈-0.1% 甲酸水(1:9, 体积比)为初始流动相, 不仅能使阿奇霉素很好的分离, 其特征离子质量色谱图的峰形和分离度好, 降低了检测成本, 有机试剂使用量较少, 有利环保。

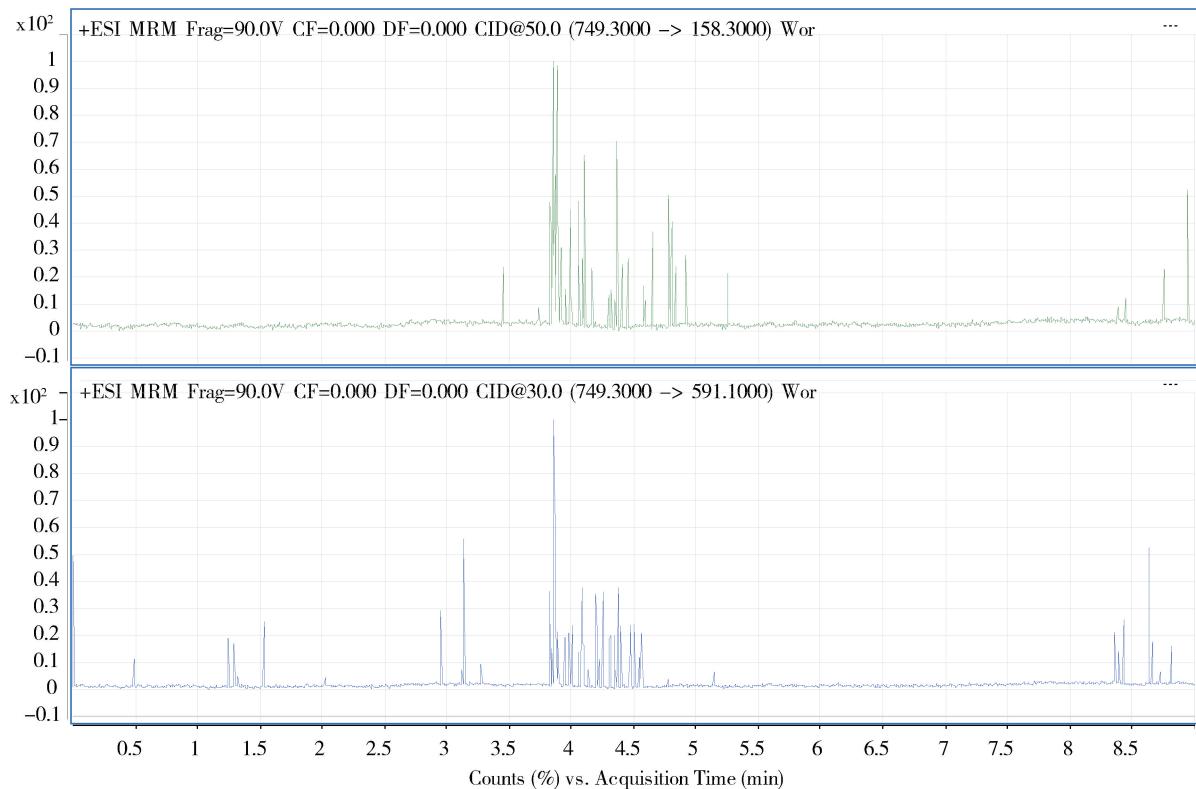


图 2 空白样品特征离子质量色谱图

Fig 2 Extraction ion chromatograms of the blank sample

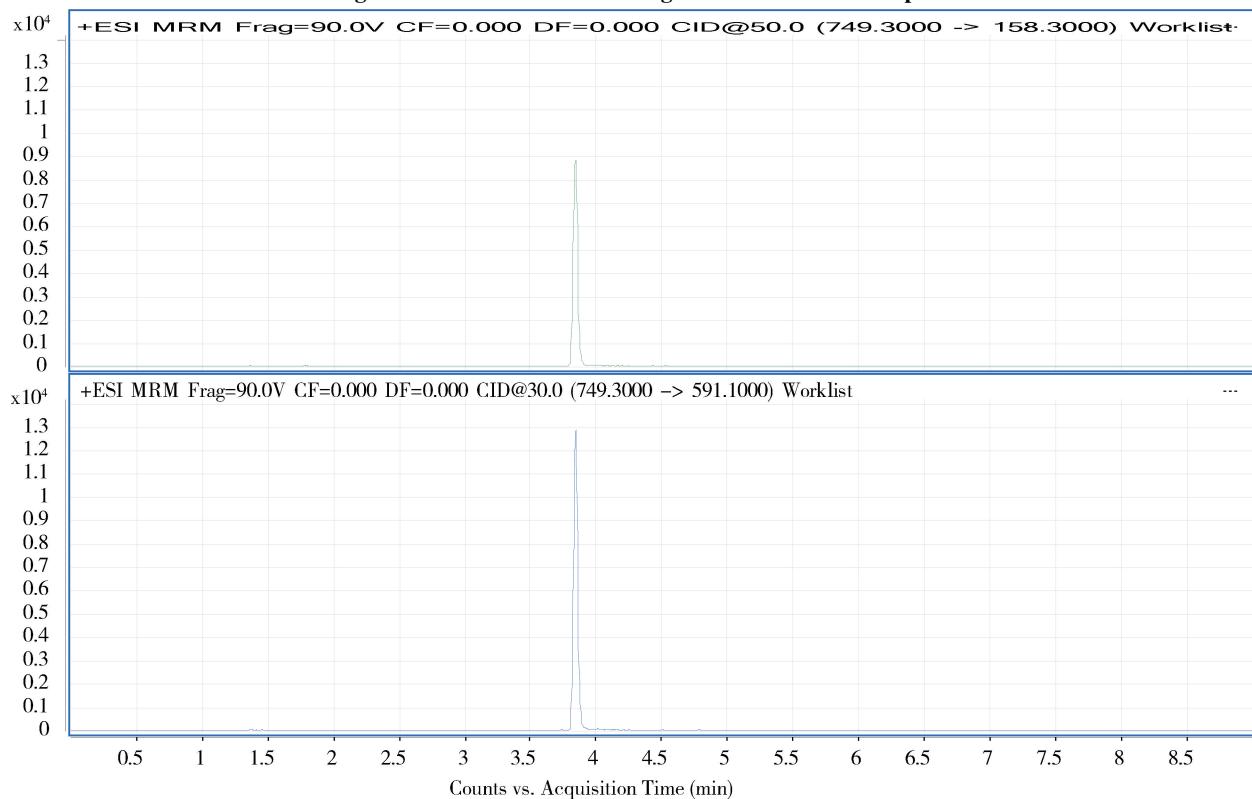


图 3 对照溶液提取离子色谱图

Fig 3 Extraction ion chromatograms of the contrast solution

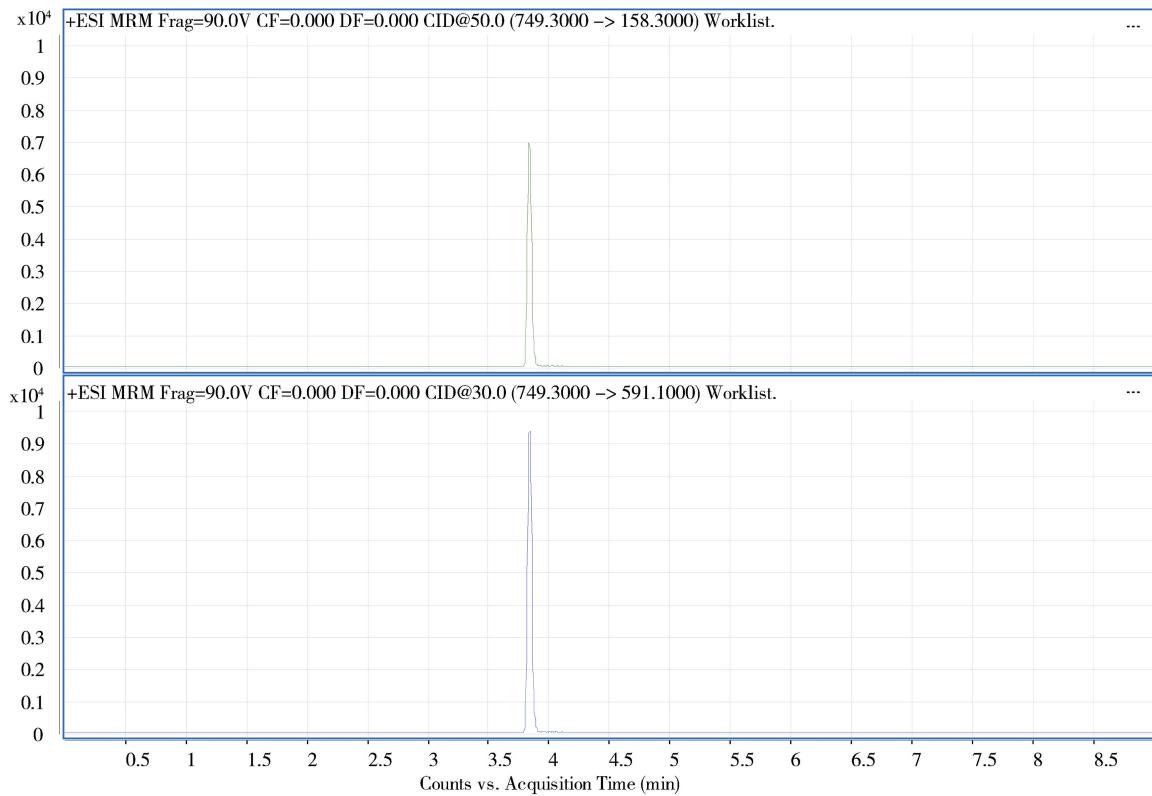


图 4 阳性添加样品特征离子质量色谱图

Fig 4 Extraction ion chromatograms of the positive added sample

3.3 质谱条件的选择与优化 采用 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 的阿奇霉素标准溶液在不接色谱柱的条件下, 分别用电喷雾电离正离子模式 (ESI^+) 和负离子模式 (ESI^-) 进行母离子全扫描。结果发现, 阿奇霉素正离子模式的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 为 m/z 749.3, 负离子模式下的 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 为 m/z 747.3, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 信号远远高于 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。在正离子模式 (ESI^+) 下对阿奇霉素进行二级质谱全扫描, 得到 m/z 591.1、 m/z 158.3、 m/z 116.1、 m/z 83.1 四个相对信号较高的子离子。利用安捷伦 Optimizer 软件对阿奇霉素的子离子碎裂电压、碰撞能量等参数进行进一步的优化, 获得最佳的仪器条件。结合样品基质的质谱图最终选取离子丰度最高、本底干扰最小的 m/z 749.3 > 591.1 作为定量离子, m/z 749.3 > 158.3 作为定性离子。

本实验建立了中兽药散剂中非法添加阿奇霉素含量的高效液相色谱-串联质谱法检测方法。实验过程简单、快速, 回收率较高, 各项性能指标均达到

了行业标准要求, 同时基质干扰小, 检测结果准确可靠, 检出限低, 灵敏度高, 适用于清肺止咳散中非法添加阿奇霉素的定性、定量检测, 为治理整顿中兽药中添加违禁药物, 提供了检测参考和技术支撑。

参考文献:

- [1] Llor C, Boada A, Pons-vigues M, et al. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* In healthy carrier individuals in primary care in Barcelona area [J]. Atencion Primaria, 2018, 50(1): 44–52.
- [2] Mykhal Ko Y O, Duhovych T V, Kish P P. Susceptibility of streptococcus pneumoniae to fluoroquinolones and macrolides in upper respiratory tract infections [J]. Wiadomosci Lekarskie, 2017, 70(2): 224–226.
- [3] Li Y Q, Lin X H, Yao X, et al. Synergistic antimicrobial activity of colistin in combination with rifampin and azithromycin against *Escherichia coli* producing MCR-1 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(12): 234–241.
- [4] 王硕, 张晶, 邵兵. 超高效液相色谱-串联质谱测定污泥中氯霉素、磺胺类、喹诺酮类、四环素类与大环内酯类抗生素

- [J]. 分析测试学报,2013,32(2):179–185.
- Wang S, Zhang J, Shao B. Determination of chloramphenicol, sulfonamides, quinolones, tetracyclines and macrolides in sludge by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of analytical testing,2013,32(2):179–185.
- [5] 孙雷,张甄,王树槐,等. 超高效液相色谱串联质谱法对动物源食品 13 种林可胺类及大环内酯类药物残留的检测 [J]. 分析测试学报,2009,28(9):1058–1065.
- Shun L, Zhang Z, Wang S H, et al. Determination of 13 kinds of lincomycin and macrolide residues in animal food by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of analytical testing,2009,28(9):1058–1065.
- [6] Shen Y, Yin C, Su M, et al. Rapid, sensitive and selective liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) method for the quantification of topically applied azithromycin in rabbit conjunctiva tissues [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010,52(1):99–104.
- [7] Piatkowska M, Jedziniak P, Zmudzki J. Comparison of different sample preparation and insecticide residues in eggs by liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Analytical Methods, 2014, 6(9): 3034–3044.
- [8] Wu J, Qian Y, Zhang C, et al. Application of graphene – based solid – phase extraction coupled with ultra high – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for determination of macrolides in fish tissues[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(5):1448–1457.

(编 辑:侯向辉)