

液相色谱/质谱法检测血液中林可霉素*

潘爱华¹, 姚骏骅², 陈缙光³, 伍新尧¹

(1. 中山大学基础医学院法医系, 广东 广州 510089;

2. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275;

3. 中山大学药学院, 广东 广州 510089)

摘 要: 采用液液萃取法提取血液中林可霉素, 液相色谱/大气压化学电离/离子阱质谱技术(HPLC/APCI/MS/MS)进行检测。该法在0.02~3.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 线性相关系数0.999 3, 检测限为5 ng/mL ($S/N = 3$), 定量检出限为20 ng/mL ($S/N = 10$)。各添加水平样品回收率均在95%以上, 日间和日内RSD均小于5%, 适于样本分析的需要。

关键词: 林可霉素; 液相色谱/大气压化学电离/离子阱质谱; 液液萃取法

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0046-03

林可霉素是一种林可酰胺类抗生素, 对革兰氏阳性菌有较强的抗菌能力, 尤其对厌氧菌有良好抗菌作用, 对革兰氏阴性菌亦有效。林可霉素在临床上多用于治疗化脓性炎症和感染及骨质炎症。临床应用后, 少数患者可出现胃肠道反应, 如恶心、呕吐及胃部不适和腹泻等^[1], 偶有皮疹、血管性水肿等过敏反应, 严重时甚至引起突发性过敏性休克^[2], 乃至死亡^[3]。

作者在司法鉴定工作中发现一例疑因静脉注射林可霉素而引起过敏性死亡的非法行医事件, 因此研究林可霉素的确证分析方法, 提供科学的法律依据, 对此类事件的法医学鉴定具有重要意义。

药品中林可霉素的检测方法报导较多, 常采用高效液相色谱(HPLC)分离紫外检测^[4]或电化学检测^[5]。Luo等^[6]采用气相色谱(GC)技术分析了鲑鱼组织中林可霉素的残留。由于生物样本中基体成分复杂, 以上分析方法专属性不强, 因而均不适用于林可霉素的的确证分析。本文研究和首次报导采用高灵敏、高选择性的HPLC/MS/MS技术分析血液中林可霉素, 并成功地用于司法鉴定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Thermo Finnigan LCQ DECA XP型高效液相色谱/离子阱质谱联用仪, 包括四元梯度泵、大气压化学电离源(APCI)、自动进样系统、Xcalibur数据处理

系统; MMS-3010振荡机(日本东京理化器械株式会社); MGS-2000-G吹付式试管浓缩仪(日本东京理化器械株式会社); 高速台式离心机 TGL-16G(上海安亭科学仪器厂); 微型混合器 WH-90A(上海亚荣生化仪器厂)。盐酸林可霉素(中国药品生物制品检定所), 乙腈(色谱纯, Merck公司), 乙酸乙酯、甲酸、甲醇、钨酸钠和其它试剂均为市售分析纯试剂, 水为超纯水。

1.2 色谱分析和质谱检测条件

液相色谱条件: 色谱柱: Hypersil[®] BDS C₈ 5 μm $\times$ 4.6 mm $\times$ 150 mm 色谱柱, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流量: 0.75 mL/min。流动相: 0.02% 甲酸水溶液/乙腈(体积比为60:40), 采用恒比洗脱。离子化方式: 大气压化学电离(APCI), 正离子检测; 质量扫描范围: 110~600 u; 蒸发温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 放电电流 6 μA ; 源电压: 5.0 KV; 鞘气(N_2)流速: 40 a.u.; 辅助气(N_2)流速: 10 a.u.; 毛细管温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压: 9 V; 碰撞气: 氦气, MS/MS 相对碰撞能为27%。

1.3 对照品溶液配制

精密称取5.0 mg 盐酸林可霉素标准品, 用甲醇溶解并定容至5 mL, 配制浓度为1 mg/mL的标准储备溶液, 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 临用时稀释成各浓度标准溶液。

1.4 血液样品处理

精确移取血液0.5 mL于10 mL具塞离心管中,

* 收稿日期: 2004-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20375049)

作者简介: 潘爱华(1970年生)女, 讲师; 通讯联系人: 姚骏骅; E-mail: puiarc02@zsu.edu.cn

加入 pH 4.5 磷酸缓冲溶液 1 mL, 于旋涡混合器上混匀 30 s, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 分出上清液。重复上述操作一次, 合并上清液。再加入 100 μ L 10% 钨酸钠溶液和 20 μ L 3.6 mol/L H_2SO_4 溶液, 旋涡振荡 1 min, 沉淀蛋白, 离心, 转移出上清液。依次加 1 mol/L KOH 溶液 0.6 mL、4 mL 乙酸乙酯, 加盖后将离心管置于振荡机上振荡提取 5 min, 离心 5 min, 移取有机相于另一试管中, 重复乙酸乙酯萃取操作一次, 合并有机相。将有机相置于 60 $^{\circ}C$ 试管浓缩仪中, 用 N_2 吹干有机溶剂。残渣用 500 μ L 的 0.02% 甲酸水溶液/乙腈 (体积比为 60:40), 混匀后进样 10 μ L。

1.5 血液林可霉素标准曲线制备

分别移取血液 0.5 mL, 精密加入不同量的林可霉素对照品溶液, 配成浓度为 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0 μ g/mL 的血液标准, 按 1.4 操作。

2 结果与讨论

2.1 HPLC/MS/MS 分析

在 MS 检测条件下, 取林可霉素标准溶液直接导入 APCI 源, 获得其 MS 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 407.2。再将标准溶液和血液制备样品分别进样, 按色谱分析条件分离, 选择准分子离子 $[M+H]^+$ 407.2 为母离子进行二级全扫描质谱分析。其二级全扫描质谱图如图 1 所示, 林可霉素保留时间为 3.62 min。图 2 中林可霉素二级全扫描质谱图显示, 其准分子离子 m/z 407.2 通过离子阱串联质谱技术主要裂解为 359.2、126.2 等碎片离子。

2.2 方法有效性

2.2.1 线性范围和检测限 按 1.5 制备血液林可霉素标准进行 HPLC/MS/MS 分析, 以外标法峰面积进行定量, 在 0.02 ~ 3.0 μ g/mL 范围内, 线性关

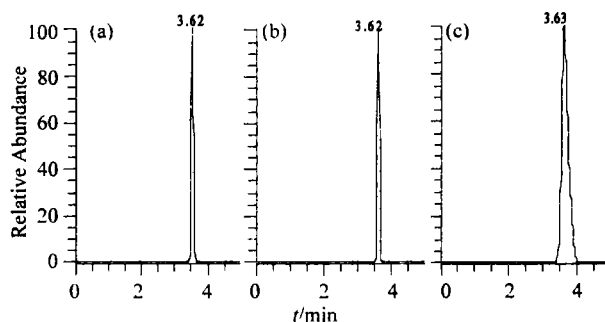


图 1 母离子 m/z 407.2 的二级全扫描质谱图

Fig.1 Full scan MS^2 chromatograms of parent ion at m/z 407.2 of samples

(a) 0.1 μ g/mL 标准溶液;

(b) 0.1 μ g/mL 标准添加血液样本; (c) 血液样本

系良好, 相关系数为 0.999 3, 检测限 (LOD) 为 5 ng/mL ($S/N = 3$), 定量检出限 (LOQ) 为 20 ng/mL ($S/N = 10$)。

2.2.2 精密度和回收率 分别移取血液 0.5 mL, 精密加入高、中、低 3 种浓度的林可霉素对照品溶液, 按 1.4 项处理, 分别进样测定 5 次, 连续 5 天测定, 测得结果见表 1。

表 1 标准添加血液样品的精密度和回收率¹⁾

Tab.1 Intra-day and inter-day precision and recovery of spiked samples

浓度 (μ g·mL ⁻¹)	日内		日间	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
0.10	96.1	4.1	95.2	4.4
1.0	98.3	2.3	97.7	2.7
2.0	97.4	2.1	97.0	2.4

血液样品, $n = 5$

2.3 方法应用

精确移取血液 0.5 mL, 按 1.4 项制备样品, 进样 10 μ L 进行 HPLC/MS/MS 分析, 测得血液样品中林可霉素浓度为 1.66 μ g/mL。

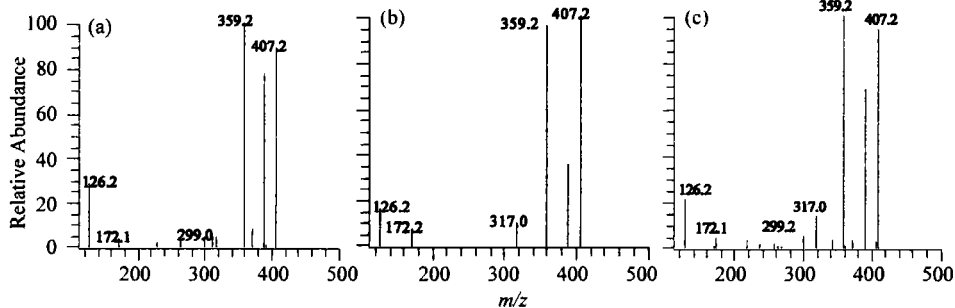


图 2 母离子 m/z 407.2 的二级全扫描质谱图

Fig.2 Full scan MS^2 spectra of parent ion at m/z 407.2 of samples

(a) 0.1 μ g/mL 标准溶液; (b) 0.1 μ g/mL 标准添加血液样本; (c) 血液样本

3 结 论

本文建立了血液样品中林可霉素的液相色谱/质谱/质谱检测方法。该方法灵敏度高,线性范围宽,精密度高,专属性强,可满足法庭药物确证分析的需要,并为司法鉴定提供科学依据。

参考文献:

- [1] 潘瑞云,王风. 林可霉素临床应用的不良反应[J]. 齐鲁医学杂志,2001,16(2):168-169.
- [2] 连士锁,陈方平,朱玉寅. 林可霉素致过敏性休克 1 例[J]. 辽宁药物与临床,2001,4(3):99.
- [3] 王兴彬,王伟,左翠娥. 盐酸林可霉素过敏反应致死 1 例[J]. 陕西医学杂志,1998,27(6):382.
- [4] 徐黎玲. 盐酸林可霉素滴眼液的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志,2003,34(2):95-96.
- [5] SZÜNYOG J, ADAMS E, LIEKENS K, et al. Analysis of a formulation containing lincomycin and spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 29:213-220.
- [6] LUO W H, YIN B Z, ANG C Y W, et al. Determination of lincomycin residues in salmon tissues by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection [J]. J Chromatogr B, 1996, 687:405-411.

Determination of Lincomycin in Blood by High Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Ion Trap Mass Spectrometry

PAN Ai-hua¹, YAO Jun-hua², CHEN Zuan-guang³, WU Xin-yao¹

(1. Department of Forensic Medicine, Preclinical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;

2. Instrumentation Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: A method was built for the determination of lincomycin in blood by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/ion trap mass spectrometry (HPLC/APCI/MS/MS). The liquid-liquid extracts from blood were separated by a Hypersil[®] BDS C₈ column with 0.02% formic acid in water 60%: acetonitrile 40% as mobile phase. Presence of lincomycin was confirmed by two characteristic product ions of m/z 126.2 and 359.2 from the parent ion at m/z 407.2. The assay exhibited a linear range of 0.02 ~ 3.0 $\mu\text{g/mL}$, a correlation coefficient of 0.999 3 and gave a limit of detection at 5 ng/mL ($S/N = 3$) and a limit of quantification at 20 ng/mL ($S/N = 10$). The coefficients of variation for both intra-day and inter-day were less than 5% and the recoveries were better than 95% at various spiked levels. The validated method fully meets the requirement for lincomycin analysis in blood in forensic medicine due to its specificity and sensitivity.

Key words: lincomycin; HPLC/APCI/MS/MS; liquid-liquid extracts