

牛奶中吡利霉素残留检测 高效液相色谱-串联质谱法研究

孙雷, 朱馨乐, 王树槐, 汪霞, 仲锋

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2007-09-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2007)12-0027-03 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了牛奶中吡利霉素残留检测的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法。液相色谱条件为: 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵溶液(30:70, V/V), 柱温为 30 °C, 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 10 μL。质谱条件为: 电喷雾离子源(ESI⁺), 多反应监测(MRM)方式进行采集; 监测离子质荷比(*m/z*)为 411.5 > 112.0, 411.5 > 363.4。以吡利霉素的同分异构体异吡利霉素作内标, 内标法定量。结果表明: 吡利霉素的线性范围为 20~400 ng/mL, 相关系数 $R^2 = 0.9999$, 方法检测限为 2 ng/mL, 定量限为 5 ng/mL; 从 50、100 和 150 ng/mL 三个添加浓度检测结果可以看出, 方法的平均回收率为 90.4%~104.3% ($n=6$), 批内、批间 RSD 均小于 5%。

[关键词] 吡利霉素; 牛奶; 高效液相色谱-串联质谱法

Detem ination of Pirlimycin in the Milk by HPLC-MS/MS

SUN Lei, ZHU Xin-le, WANG Shu-huai, WANG Xia, ZHONG Feng

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Abstract A HPLC-MS/MS method was established for the determination of pirlimycin in milk. HPLC condition: the chromatography column is Waters XBridge C₁₈ column of 150 mm × 2.1 mm, 5 μm; mobile phase is acetonitrile and 0.01 mol/L ammonium acetic(30:70, V/V); column temperature is 30 °C; flow rate is 0.2 mL/min; injection volume is 10 μL. Mass Spectrometry condition: ESI⁺ and MRM mode; monitored ions(*m/z*) are 411.5 > 112.0, 411.5 > 363.4. The calibration curve was good linear between the ratio of the peak areas and concentrations of pirlimycin from 20 to 400 ng/mL containing the internal standard (iso-pirlimycin) at 100 ng/mL, the correlation coefficient R^2 is 0.9999. The detection limit of the method was 2 ng/mL and the limit of quantification was 5 ng/mL. The average recoveries from spiked milk at the three concentrations of 50, 100 and 150 ng/mL ranged from 90.4%~104.3% ($n=6$), intra- and inter-batch variation coefficients were both less than 5%.

Key words pirlimycin; milk; LC-MS/MS

吡利霉素(Pirlimycin)属于最新研制的林可霉素类抗菌药物(结构式见图1), 1993年获准在美国上市, 商品名为鼎速(Pissue), 常用作奶牛的乳房注

入剂。体外及临床试验结果表明吡利霉素对金黄色葡萄球菌、无乳球菌、停乳链球菌、乳房链球菌所致的临床及亚临床型乳腺炎效果明显, 优于其他乳

腺炎药物。美国和欧盟规定其在牛奶中的 MRL 值均为 100 μg/L。本实验通过对吡利霉素三个不同添加浓度的考察, 制定了一种检测牛奶中吡利霉素的 LC-MS/MS 确证方法, 方法简便、灵敏度高且专属性强, 可用于实际样本的检测。

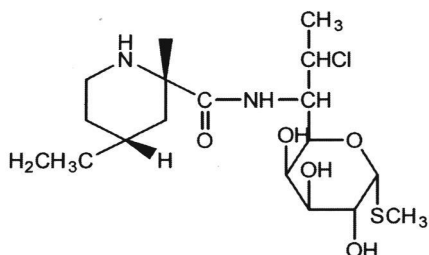


图 1 盐酸吡利霉素的化学结构

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相质谱联用仪, Waters 2695-Quattro micro™, Waters 公司; AE260 电子天平, Mettler-toledo 公司; biofuge Strators 高速冷冻离心机, 德国贺利氏公司; RescitrTherm3 样品浓缩器, Pierce 公司; SR4 漩涡混合器, IKA 公司; Oasis MCX 小柱, 60 mg/3 cc, Waters 公司。

1.2 药品和试剂 盐酸吡利霉素对照品, 纯度为 97%; 盐酸异吡利霉素对照品, 纯度为 94%, 均由浙江海正药业有限公司提供。乙腈、甲醇为色谱纯, MERCK 公司; 甲酸、氨水、正丙醇为分析纯。所用水为超纯水。

1.3 对照溶液的配制 精密称定盐酸吡利霉素对照品约 11 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。精密称定盐酸异吡利霉素对照品约 12 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的内标储备液。精密移取适量储备液, 用甲醇稀释成浓度为 1 μg/mL 的标准和内标工作液。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.01 mol/L 乙酸铵溶液 (30:70, V/V), 柱温为 30 °C, 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 10 μL。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI⁺), 毛细管电压为 3.4 kV, 锥孔电压为 34 V, 萃取电压为 3 V, RF 透镜电压为 1V; 源温为 105 °C, 脱溶剂温度为 350 °C; 锥孔气流速为 50 L/h, 雾化气流速为 450 L/h 多反应监测离子情况见表 1。

1.4.3 定性与定量 该方法定性需满足四个条件: ①试剂空白和样品空白不能出现与阳性对照相同的离子峰; ②特征离子色谱峰的信噪比 (S/N)

表 1 吡利霉素和内标的定性、定量离子对以及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对	驻留时间 锥孔电压 碰撞能量		
		t/s	N	eV
吡利霉素	411.5 > 112.0	0.6	34	28
	411.5 > 363.4	0.6		20
异吡利霉素	411.5 > 112.0	0.6	34	28
	411.5 > 363.4	0.6		20

注: * 标示的为定量离子对。

都在 3:1 以上; ③试样色谱峰的相对保留时间 (分析物与内标的保留时间之比), 应与校正溶液的相对保留时间一致, 容许偏差为 ±2.5%; ④检测到的离子的相对丰度与校正溶液的相对丰度一致, 容许偏差为 ±25%。本方法在定量时, 标准和内标都以响应强度最强的 411.5 > 112.0 作为定量离子进行数据计算。

1.4.4 标准曲线绘制 精密量取适量的工作液, 用甲醇稀释成浓度为 20, 50, 100, 200, 400 ng/mL 的系列对照液 (含内标异吡利霉素 100 ng/mL), 以其质量色谱峰与相应内标的峰面积比为纵坐标, 对照溶液的浓度为横坐标制图制得标准曲线。

1.4.5 样品前处理 取 2 mL 试料, 置 50 mL 离心管内, 加入适量内标, 加含 1% 甲酸的乙腈溶液 5 mL, 涡旋混合 10 s, 5 000 r/min 离心 5 min 转移上清液至 50 mL 鸡心瓶。用含 1% 甲酸的乙腈液 5 mL 重复提取 1 次, 合并上清液, 加正丙醇 3 mL, 于 60 °C 旋转蒸发至干。用含 1% 甲酸的 50 mmol/L 乙酸铵溶液 6.0 mL 溶解残余物, 备用。固相萃取柱依次用甲醇、水各 2 mL 预洗。取 3.0 mL 备用液过柱, 用 2% 甲酸、甲醇各 2 mL 淋洗, 真空抽干。用 3% 氯化甲醇 3 mL 洗脱, 收集洗脱液。于 50 °C 下氮气吹干, 残余物用 1.0 mL 甲醇溶解, 经微孔滤头过滤后作为试样溶液, 供高效液相色谱 - 串联质谱法测定。

1.4.6 灵敏度的确定 将吡利霉素加入到空白牛奶中, 制成 1, 2, 5 ng/mL 三个浓度的添加样品, 经上述方法前处理后, 用 LC-MS/MS 检测, 观察吡利霉素质量色谱峰的信噪比和对应药物浓度, 定其检测限和定量限。

1.4.7 准确度和精密度的测定 采用标准添加法, 在空白牛奶中添加 3 个不同浓度 (选取方法灵敏度所要求的 0.5 MRL, MRL 和 1.5 倍 MRL) 的吡利霉素进行回收率试验, 各浓度进行 6 个样品平行试验, 重复 3 次, 求批内批间相对标准偏差。

2 结果

2.1 标准曲线 吡利霉素浓度在 20~400 ng/mL 范围内, 特征离子质量色谱峰面积和内标的峰面积

比与浓度线性关系良好,线性方程为 $y = 0.0126x + 0.0446$, $R^2 = 0.9999$,标准曲线见图 2。

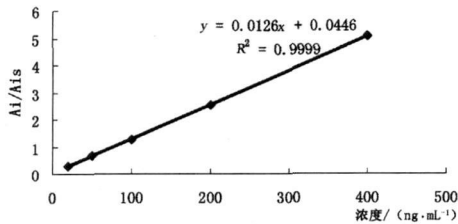
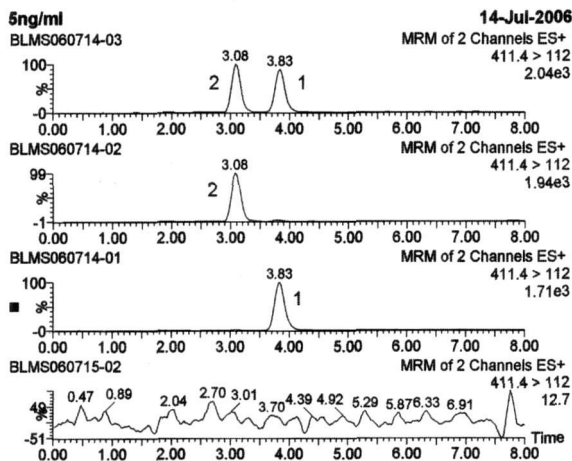


图 2 吡利霉素溶液的标准曲线

2.2 方法灵敏度 按上述方法进行处理,当添加浓度为 5 ng/mL 时,测得吡利霉素的信噪比 $S/N > 10$ (按峰对峰计),说明方法的定量限可至 5 ng/mL。当添加浓度为 2 ng/mL 时,测得吡利霉素的信噪比 $S/N > 3$ (按峰对峰计),表明方法的检测限可至 2 ng/mL。

5 ng/mL 的对照溶液和 5 ng/mL 的添加试液中吡利霉素和内标的特征离子质量色谱图见图 3 和图 4,并附有溶剂空白和牛奶空白的图谱。



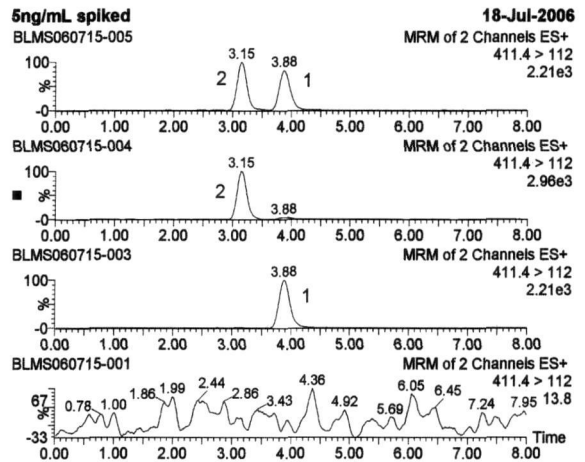
1—吡利霉素得到的特征离子质量色谱图(411.5 > 112.0);
2—内标异吡利霉素得到的特征离子质量色谱图(411.5 > 112.0)

图 3 5 ng/mL 对照溶液中吡利霉素特征离子质量色谱图

2.3 方法精确度 空白牛奶中吡利霉素在 5Q 10Q 150 ng/mL 三个添加水平,平均回收率为 90.4% ~ 104.3%,批内 RSD 为 1.3% ~ 3.5%,批间 RSD 为 1.2% ~ 2.7%。结果见表 2。

3 讨论

3.1 电喷雾离子源的选择 常见的大气压电离源有电喷雾电离源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)和大气压光电离源(APPI)等,从吡利霉素的分子结构特征可以看出该药属于极性较强的药物,使用 ESI 源可以明显提高方法的灵敏度,在流动相中加入适量的乙酸铵可以明显提高吡利霉素的离子化



1—吡利霉素得到的特征离子质量色谱图(411.5 > 112.0);
2—内标异吡利霉素得到的特征离子质量色谱图(411.5 > 112.0)

图 4 牛奶中添加 5 ng/mL 吡利霉素特征离子质量色谱图

表 2 牛奶中添加吡利霉素回收率测定结果

药物名称	添加浓度 / 测定批次 (ng·mL ⁻¹)	批内平均回收率 %	批内 RSD %	批间 RSD %	离子相对丰度 %
吡利霉素	50	1 104.3 ± 3.3	3.2	2.7	23.6 ± 0.5
		2 99.1 ± 2.9	3.0	2.7	22.9 ± 0.9
		3 103.1 ± 2.7	2.6	2.7	22.7 ± 3.1
	100	1 99.2 ± 2.9	2.9	1.2	25.5 ± 0.2
		2 99.9 ± 1.9	1.9	1.2	21.9 ± 1.2
		3 101.5 ± 1.5	1.5	1.2	21.6 ± 1.5
	150	1 90.4 ± 1.2	1.3	2.2	26.4 ± 0.3
		2 94.5 ± 1.4	1.4	2.2	23.2 ± 0.4
		3 91.9 ± 3.2	3.5	2.2	25.5 ± 0.4

效率,获得较好的色谱峰,显著增强质谱的响应。

3.2 样品的前处理 提取溶剂的选择:牛奶中含有大量的蛋白质,实验中分别尝试了丙酮、酸化乙醇、酸化乙腈等不同的提取溶剂,发现用 1% 的甲酸乙腈提取时回收率较为理想,很好满足确证方法的要求。

固相萃取柱的选择:吡利霉素属碱性化合物,分子极性较强,因此选用了碱性极性物质吸附能力较强的复合模式阳离子交换柱(MCX柱),在酸性环境中吡利霉素以完全离子化方式与复合模式吸附剂作用,当用甲醇淋洗时离子型化合物将得以完全保留,而单纯以疏水性作用为保留机制的物质将被大部分去除。用氨化甲醇进行洗脱,可以调节 pH 值使离子化的吡利霉素变为中性,进而洗脱出来。结果表明该方法净化样品效果理想,且重现性好。

参考文献:

- [1] Rex E Homish, Ryan D Roof, John R West. Pirlinycin Residue in Bovine Liver - a Case of Reverse Metabolism [J]. Analyst 1998, (123): 2463-2467.