

# 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用检测人血浆中缬更昔洛韦及其代谢物

LCMSMS-319

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用技术测定人血浆中缬更昔洛韦及其代谢物更昔洛韦的方法。人血浆样品经甲醇沉淀，离心后取得的上清液加水适量稀释，可在 6 min 内快速、准确地测定其中的缬更昔洛韦及其代谢物更昔洛韦。本文考察了方法的专属性、线性、定量限、重复性、基质效应、残留；结果表明：缬更昔洛韦、更昔洛韦在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.99；方法定量限为 0.5 ng/mL(缬更昔洛韦、更昔洛韦)；使用高灵敏度的 LCMS-8060 系统，可以简化前处理过程，在提高分析效率的同时，显著降低成本。

**关键词：**缬更昔洛韦 更昔洛韦 超高效液相色谱三重四极杆质谱

缬更昔洛韦为合成的 2-脱氧鸟苷类似物，是抗病毒药更昔洛韦 (ganciclovir) 的前体药物；口服缬更昔洛韦后在肠黏膜细胞酯酶和肝酯酶的作用下迅速水解成更昔洛韦，更昔洛韦在病毒内和细胞内酶磷酸化作用下生成三磷酸更昔洛韦，后者与三磷酸脱氧鸟苷 (dGTP) 竞争作为病毒 DNA 多聚酶的底物，抑制病毒 DNA 的合成，从而产生抗巨细胞病毒 (CMV) 活性。临床适用于治疗获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 患者的巨细胞病毒

(CMV) 视网膜炎及预防高危实体器官移植患者的 CMV 感染。

本文旨在建立一种人血浆中缬更昔洛韦及其代谢物更昔洛韦含量的检测方法，为研究人体内缬更昔洛韦代谢过程提供一种快速、灵敏、简便的检测方法，以契合合作机构\*同时分析人血浆中缬更昔洛韦及其活性代谢物含量的需求。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutionsLCMS DB Ver.5.85 版色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：InertSustainBio C18, 2.1 mm I.D.

×100 mm L., 1.9 μm(PEEK)

流动相：A 相 -0.05% 甲酸 -2 mM 乙酸铵水溶液；

B 相 - 甲醇

流速：0.40 mL/min

进样体积：20 μL

柱温：30℃

样品温度：15℃

洗针液：R3 为 0.05% 氨水溶液 - 甲醇

(体积比为 1:1)；R0 为 50% 甲醇水溶液；

清洗液体积 1000 μL。

洗针模式：进样前后洗针，External(进样针外壁清洗)，清洗泵 → 清洗口。

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	25
2.80	Pumps	Pump B Conc.	90
4.30	Pumps	Pump B Conc.	90
4.31	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

DL 温度: 250°C

离子源接口电压: 4.5 kV

加热模块温度: 400°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

接口温度: 300°C

加热气: 干燥空气 10.0 L/min

驻留时间: 30 ms

干燥气: 氮气 10.0 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	CAS No.	前体离子 [M+H] <sup>+</sup>	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	碰撞能量 CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
缬更昔洛韦 Valganciclovir	175865-60-8	355.20	152.05*	-10.0	-20.0	-16.0
			135.00	-10.0	-44.0	-25.0
更昔洛韦 Ganciclovir	82410-32-0	256.10	152.05*	-10.0	-13.0	-30.0
			135.00	-10.0	-31.0	-24.0
阿昔洛韦 Acyclovir	59277-89-3	226.10	135.00	-17.0	-27.0	-26.0

\*代表定量离子对

1.3 标准品与试剂

缬更昔洛韦标准对照品溶液: 缬更昔洛韦标准对照品 (含量 >99.0%), -20°C 保存。

更昔洛韦标准对照品溶液: 更昔洛韦标准对照品 (含量 >99.0%), -20°C 保存。

阿昔洛韦 (内标): 阿昔洛韦标准对照品 (含量 >99.0%), -20°C 保存。

甲醇: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

实验用水: 由 Milli-Q Plus 水净化系统经去离子与二次净化制得。

甲酸: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 98%, 室温保存。

乙酸铵: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 99.0%, 室温保存。

#### 1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

缬更昔洛韦标准储备液：精密称定 1.07 mg 缬更昔洛韦标准对照品，用 50% 甲醇水稀释至 10.0 μg/mL，于 -20℃ 冰箱保存，备用。

更昔洛韦标准储备液：精密称定 1.13 mg 更昔洛韦标准对照品，用 50% 甲醇水稀释至 10.0 μg/mL，于 -20℃ 冰箱保存，备用。

缬更昔洛韦及更昔洛韦工作溶液：吸取适量缬更昔洛韦及更昔洛韦储备液，用 50% 甲醇水分别配制浓度为 10、20、40、100、200、400、1000、2000 ng/mL (缬更昔洛韦、更昔洛韦) 工作液；临用按体积比 1:1 混匀；至适宜容器中于 4℃ 冰箱保存，备用。

阿昔洛韦 (内标) 标准储备液：精密称定 1.09 mg 阿昔洛韦标准对照品，用 50% 甲醇水溶解并定容至 1 mL 混匀，至适宜容器中于 -20℃ 冰箱保存备用。

阿昔洛韦 (内标) 标准工作溶液：用 50% 甲醇水配制浓度为 1000 ng/mL 标准工作液，至适宜容器中于 4℃ 冰箱保存，备用。

#### 1.5 样品制备

标准曲线样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液、10 μL 内标工作液、涡旋混合 30 s 后加入 400 μL 甲醇涡旋混合 1 min，于 14000 rpm 离心 10 min；取上层清液 100 μL，用 900 μL 纯水稀释，以 20 μL 进样 LC-MS/MS 分析。

质控样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 缬更昔洛韦及更昔洛韦质控工作液、10 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

基质样品：人血浆 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液、10 μL 内标工作液，其余处理过程同标准曲线样品。

工作液样品：取纯水 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液、10 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

$$\text{基质效应 (\%)} = \frac{\text{基质样品峰面积}}{\text{工作液样品峰面积}} \times 100\%$$

## 结果与讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

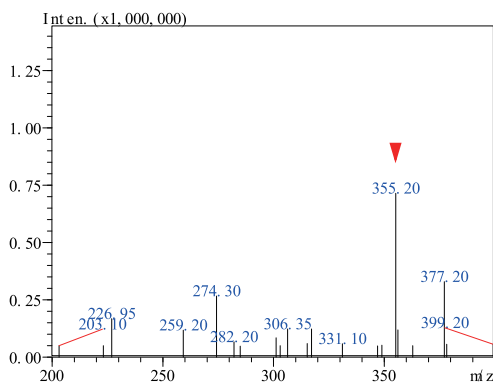


图1 缬更昔洛韦一级质谱图

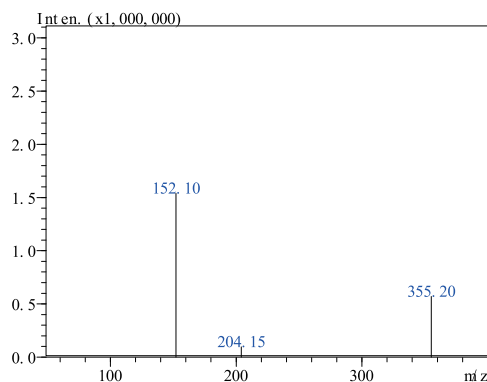


图2 缬更昔洛韦产物离子质谱图

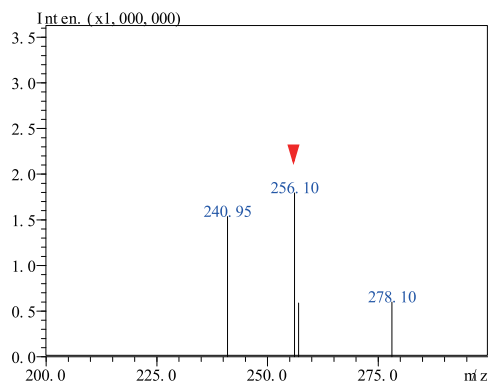


图3 更昔洛韦一级质谱图

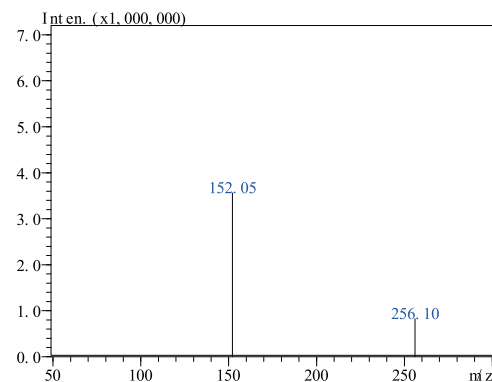


图4 更昔洛韦产物离子质谱图

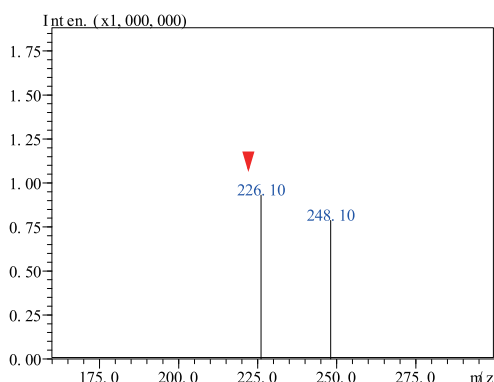


图5 内标-阿昔洛韦一级质谱图

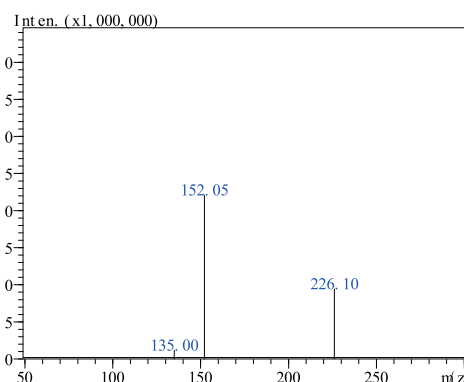


图6 内标-阿昔洛韦产物离子质谱

## 2.2 选择性

取空白人血浆匀浆 100  $\mu$ L, 按照样品处理方法制备, 结果如图 7~12 所示。结果显示, 人空白血浆中目标化合物缬更昔洛韦、更昔洛韦及内标的通道均不干扰定量限样品的检测。

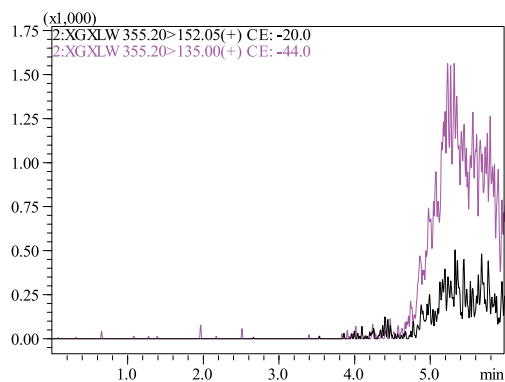


图7 空白血浆MRM谱图-缬更昔洛韦

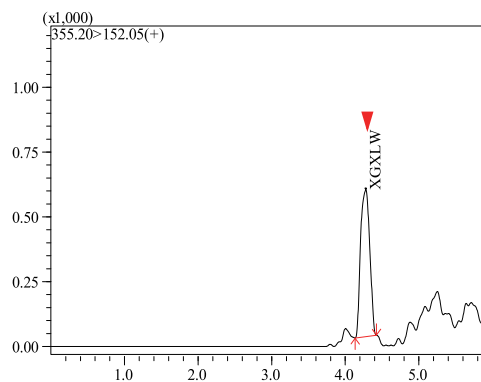


图8 血浆样品MRM谱图-缬更昔洛韦 (0.5 ng/mL)

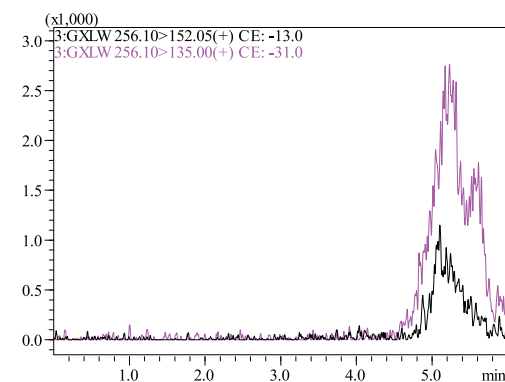


图9 空白血浆MRM谱图-更昔洛韦

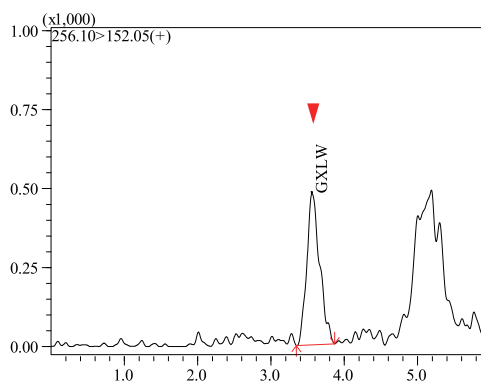


图10 血浆样品MRM谱图-更昔洛韦 (0.5 ng/mL)

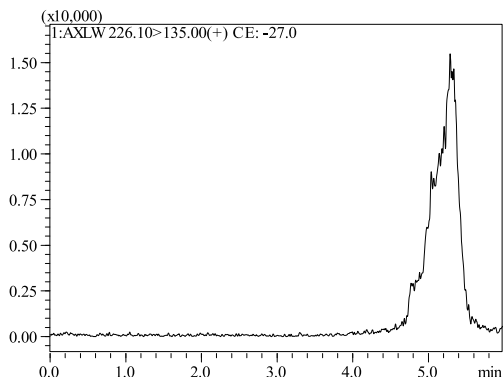


图11 空白血浆MRM谱图-阿昔洛韦

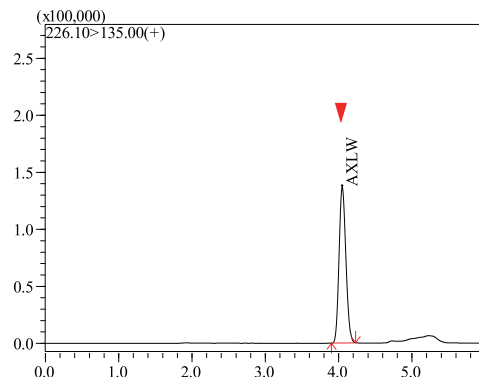


图12 血浆样品MRM谱图-阿昔洛韦

### 2.3 线性范围

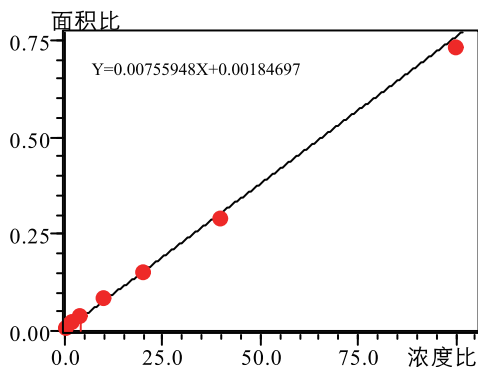


图13 缬更昔洛韦血浆校准曲线

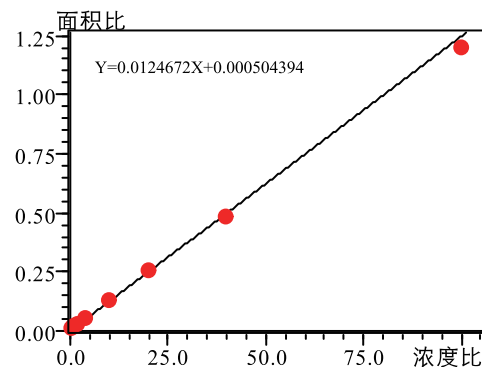


图14 更昔洛韦血浆校准曲线

人血浆配制校准曲线样品浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL(缬更昔洛韦、更昔洛韦)。标准曲线如图 13、14 所示，线性方程及相关系数见表 3，其中 y 值代表待测物质与内标物质峰面积的比值，x 值代表血浆中待测物质浓度比。

表3 缬更昔洛韦、更昔洛韦校准曲线参数(线性回归，权重为1/C<sup>2</sup>)

名称	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
缬更昔洛韦	$Y=0.00755948X+0.00184697$	0.5~100	94.9~107.5	0.9985
更昔洛韦	$Y=0.0124672X+0.000504394$	0.5~100	96.2~103.9	0.9995

### 2.4 基质效应

基质效应考察结果如表 4 所示。

表4 基质效应(n=3)

浓度水平	基质效应 (%)			
	理论浓度 (ng/mL)	缬更昔洛韦	理论浓度 (ng/mL)	更昔洛韦
LLOQ	0.5	92.7	0.5	102.2
MQC	5	104.8	5	93.3
HQC	50	104.4	50	100.9
内标		100.2		

结果表明，缬更昔洛韦、更昔洛韦低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 92.7~104.4% 之间。

## 2.5 精密度与准确度

考察四个浓度水平质控样品的日内精密度，结果如表 5 所示。

表5 方法精密度与准确度(n=6)

待测物质/ 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%	待测物质/ 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%
缬更昔 0.5	7.03	93.1	更昔 0.5	7.88	102.2
洛韦 5.0	3.95	95.1	洛韦 5.0	3.22	93.3
洛韦 50	2.85	95.2	洛韦 50	3.95	100.9

结果表明，缬更昔洛韦、更昔洛韦低、中、高浓度样品日内精密度在 2.85~7.88% 之间；准确度在 93.1~102.2% 之间。

## 2.6 残留

在高浓度样品 (STD8) 后进样分析空白样品，结果缬更昔洛韦、更昔洛韦及内标物质检测通道均无目标化合物干扰。

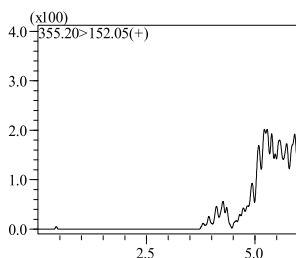


图15 缬更昔洛韦残留考察图谱

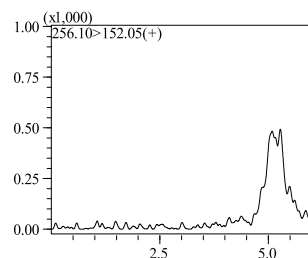


图16 更昔洛韦残留考察图谱

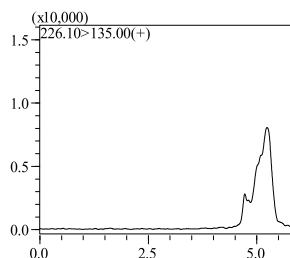


图17 阿昔洛韦残留考察图谱

## 结论

缬更昔洛韦、更昔洛韦在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.99；方法定量限为 0.5 ng/mL(缬更昔洛韦、更昔洛韦)；缬更昔洛韦、更昔洛韦低、中、高浓度样品日内精密度在 2.85~7.88% 之间；准确度在 93.1~102.2% 之间；缬更昔洛韦、更昔洛韦低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 92.7~104.4% 之间；方法无残留。缬更昔洛韦、更昔洛韦基质干扰较大；采用甲醇、乙腈、0.1% 三氟乙酸-乙腈直接沉淀，基质干扰仍存在，且存在溶剂效应；碱化血浆后经乙酸乙酯/甲醇=1:1(v:v) 液液萃取，更昔洛韦回收率仅为 30% 左右，且处理过程繁琐。使用高灵敏度的 LCMS-8060 系统，血浆样品直接沉淀后，取上清液用纯水适当稀释后进样，可以消除基质干扰；同时，此方法简化了血浆样品的前处理过程，在提高分析效率的同时，显著降低成本。