

CLAM-2000-LCMS-8050CL 联用系统测定人血清中 8 种抗真菌药的含量

LCMSMS-389

摘要： 本文利用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用对血清中 8 种抗真菌药进行定性定量分析。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品，内标法定量，每个样品从在线自动前处理到液质分析完成仅需 4 min。血清样品使用试剂盒提供的试剂除蛋白后，离心，移取上清液，进样分析。采用电喷雾离子源正离子模式，MRM 模式采集数据，内标法定量。结果显示，在各自的线性范围内，氟胞嘧啶等 8 种抗真菌药及代谢物的线性良好，线性相关系数 > 0.999。低、高两个浓度的质控样品定值结果与标示浓度的偏倚位于 85%~115% 之间，在允许范围内。同时，进行了重复性实验，保留时间的 RSD ≤ 0.33%，浓度的 RSD ≤ 6.43%。该方法可用于临床样本的快速、准确定量。

关键词： CLAM-2000 在线自动前处理 液相色谱 - 三重四极杆质谱 医用质谱仪 治疗药物监测 (TDM) 抗真菌药

近年来，真菌感染的发生概率大幅上升，其主要原因是接受器官移植、免疫抑制疗法以及滥用药物导致的。由于实际临床需求增加，抗真菌药物品种有了很大的发展，但是真菌感染的发病率与死亡率仍然很高，临床上抗真菌药物的选择与疗法主要由医生经验决定。体内药物浓度必须达到治疗浓度并维持用药才能起效，因此抗真菌药物的血清浓度监测被证明对于治疗真菌感染的给药方案优化甚至预防真菌感染都是最有效的方法之一。常用的抗真菌药物主要分为多烯类、吡咯类、棘白菌素类以及氟胞嘧啶等。吡咯类的药物，如伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑以及代谢物羟基伊曲康唑，由于其广谱抗菌性，广泛用于真菌

治疗的感染。吡咯类抗菌药主要通过抑制一种或多种 CYP 酶活性来治疗真菌性感染。棘白菌素类抗菌药毒副作用较小，临床上主要与其他类抗真菌药联合使用。由于药代动力学特征、副作用、药物相互作用和药物基因组学显著差异，抗真菌药在治疗过程中血药浓度个体差异很大，因此需要对特定的药物进行血药浓度监测，保证用药安全有效。

本文利用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用对血清中 8 种抗真菌药进行定性定量分析。有助于高通量、更简单、更安全、更准确地实现临床研究中复杂重复的工作流程。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 CLAM-2000-LCMS-8050 联用系统（见图 1）。具体配置为：在线自动前处理仪 CLAM-2000，CLAM-2000 Ver. 1.13 在线自动前处理仪工作站，LC-30A×2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050CL 三重四极杆质谱仪配 ESI 离子源，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图 1 岛津 CLAM-2000-LCMS-8050 CL 联用系统

1.2 分析条件

液相条件：

流动相：A相 -0.1% 乙酸 +5 mM 乙酸铵水溶液；B相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

色谱柱：Shim-pack GIST 2.1 mm I.D. ×50 mm L., 2.0 μm

柱温：40°C

进样体积：2 μL (Co-injection, 纯水 =10 μL)

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

表 1 梯度洗脱条件

时间	单元	处理命令	值
0.30	泵	B.Conc	5
0.40	泵	B.Conc	40
1.50	泵	B.Conc	95
2.00	泵	B.Conc	95
2.10	泵	B.Conc	5
3.50	控制器	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI⁺

接口电压：4.5 KV

雾化气：3.0 L/min

加热气流量：10.0 L/min

干燥气流量：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 管温度：250°C

加热块温度：400°C

扫描模式：MRM 模式，见表 2

表 2 MRM 参数

化合物	英文名	CAS No.	类型	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
氟胞嘧啶	5-Fluorocytosine	2022-85-7	目标	130.0	58.0*	-10	-37	-22
				130.0	112.9	-10	-23	-19
氟康唑	Fluconazole	86386-73-4	目标	306.9	238.1*	-22	-24	-12
				306.9	220.0	-22	-12	-12
羟基伊曲康唑	Hydroxy-Itraconazole	112559-91-8	目标	721.1	408.2*	-28	-39	-27
				721.1	392.2	-22	-36	-26
艾莎康唑	Isavuconazole	241479-67-4	目标	438.2	224.0*	-21	-8	-13
				438.2	369.0	-21	-12	-15
伊曲康唑	Itraconazole	84625-61-6	目标	705.1	392.2*	-22	-38	-26
				705.1	432.2	-22	-34	-29
酮康唑	Ketoconazole	65277-42-1	目标	531.2	489.3*	-10	-25	-13
				531.2	244.2	-13	-30	-10
泊沙康唑	Posaconazole	171228-49-2	目标	701.2	614.3*	-22	-36	-28
				701.2	344.2	-22	-47	-22
伏立康唑	Voriconazole	137234-62-9	目标	350.2	281.2*	-29	-8	-11
				350.2	127.2	-29	-12	-11

¹³ C, ¹⁵ N ₂ - 氟胞嘧啶	¹³ C, ¹⁵ N ₂ -5-Fluorocytosine	1216616-31-7	内标	133.1	115.0	-10	-23	-19
d4- 氟康唑	d4-Fluconazole	1124197-58-5	内标	310.9	242.1	-22	-24	-12
d5- 羟基伊曲唑	d5-Hydroxy-Itraconazole	1217524-77-0	内标	726.2	413.2	-28	-39	-27
¹³ C,d4- 艾莎康唑	¹³ C,d4-Isavuconazole	-	内标	443.0	224.0	-21	-8	-13
d5- 伊曲康唑	d5-Itraconazole	84625-61-6	内标	710.2	397.2	-22	-38	-26
d8- 酮康唑	d8-Ketoconazole	1217706-96-1	内标	539.3	497.3	-10	-25	-13
d4- 泊沙康唑	d4-Posaconazole	1133712-26-1	内标	705.3	618.3	-22	-36	-28
d3- 伏立康唑	d3-Voriconazole	1217661-14-7	内标	353.2	284.2	-29	-8	-11

* 定量离子对

1.3 基质标准品、质控品及样品制备

参考德国 RECIPE 《血清 / 血浆中抗真菌药试剂盒使用指南》，进行样品制备。

该试剂盒包含以下部分：

基质标准品：3 个水平的人血清基质加标冻干粉

质控品：2 个水平的人血清基质加标冻干粉

内标：含 ¹³C, ¹⁵N₂- 氟胞嘧啶、d4- 氟康唑等 8 种同位素标记的内标的冻干粉

优化用混标：冻干粉

蛋白沉淀剂：50 mL

样品释放剂：50 mL

基质标准品 (Level 0~Level 3) 和质控品 (Level I、Level II)：1.0 mL 纯水溶解，涡旋混匀 15 min。

内标工作液：准确加入 5.0 mL 蛋白沉淀剂，混匀，超声 15 min。

优化用混标：加入 2.0 mL 流动相 B，混匀。

基质标准品、质控品和样品前处理方法：

在 CLAM-2000 工作站界面优化自动前处理参数、蛋白沉淀剂使用量、震荡转速、震荡时间、抽滤时间等。确定样品自动前处理程序具体操作为 (1)、吸取 15 μL 甲醇活化过滤管，准备上样；(2)、吸取对照品、质控品或血清样品 20 μL 上样；(3)、吸取内标工作液沉淀剂 40 μL 至过滤管进行沉淀蛋白；(4)、转速 2400 rpm 震荡 90 秒；(5)、使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 120 s 使溶液进入接收管；(6)、接收管转移至液相自动进样器，进样 2 μL。

■ 结果讨论

2.1 基质标准品色谱图

岛津 CLAM-2000-LCMS-8050 CL 联用系统可以实现并行前处理，即在一个样品自动前处理时，系统会根据前处理程序，同时自动开始下一个样品的前处理，并可以多个样品同时处理 (见图 2)，大大缩短了前处理时间，若实验单个样品前处理时间为 6 min，质谱分析时间为 5 min，并行前处理功能使样品在线自动前处理与液质分析时间重叠，从在线自动前处理到液质分析完成仅需 6 min，大大节省分析时间，优化仪器的使用和样品通量。本实验样品前处理时间为 4 min，质谱分析时间为 3.5 min。

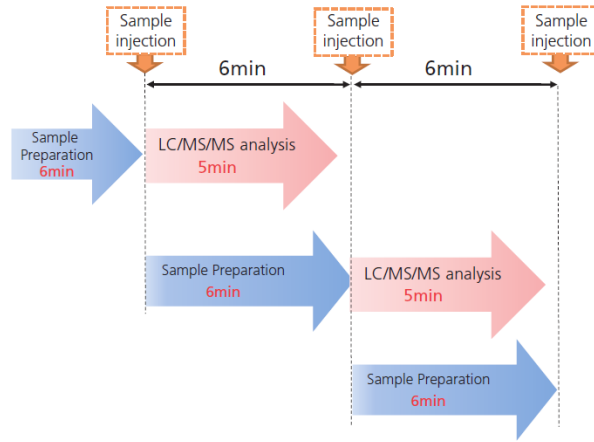


图 2 CLAM-2000 并行前处理示意图

2.2 基质标准品色谱图

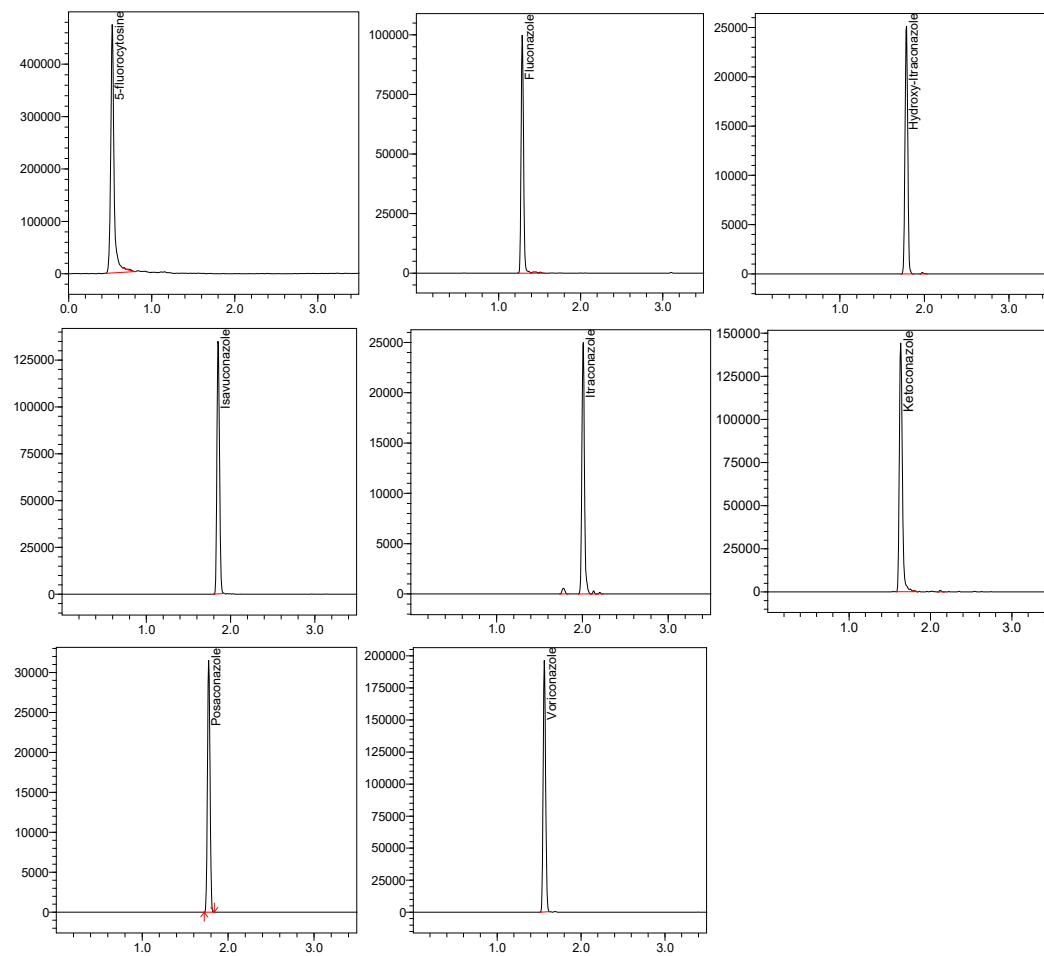


图 3 基质标 Level 1 浓度色谱图

2.2 基质标准品色谱图

试剂盒中各级别基质标品浓度和线性回归各浓度的准确度如表 3 所示，按 1.3 中的分析条件进行分析检测，利用内标法制作校准曲线。该线性范围包含了药物的正常血药浓度范围 [1]。线性良好，线性方程、相关系数见图 2。

表 3 8 种抗真菌药的校准曲线

化合物	基质标曲浓度 (µg/mL)			准确度 (%)
	Level1	Level 2	Level 3	
5-Fluorocytosine	5.12	39.7	117	95.7-104.8
Fluconazole	0.564	4.14	12.6	99.0-100.9
Hydroxy-Itraconazole	0.164	1.19	3.6	98.0-101.8
Isavuconazole	0.482	3.49	10.6	97.6-102.1
Itraconazole	0.133	0.955	2.94	99.6-100.4
Ketoconazole	0.406	2.89	8.34	98.0-101.8
Posaconazole	0.232	1.68	5.01	98.1-101.7
Voriconazole	0.265	1.93	5.9	99.8-100.2

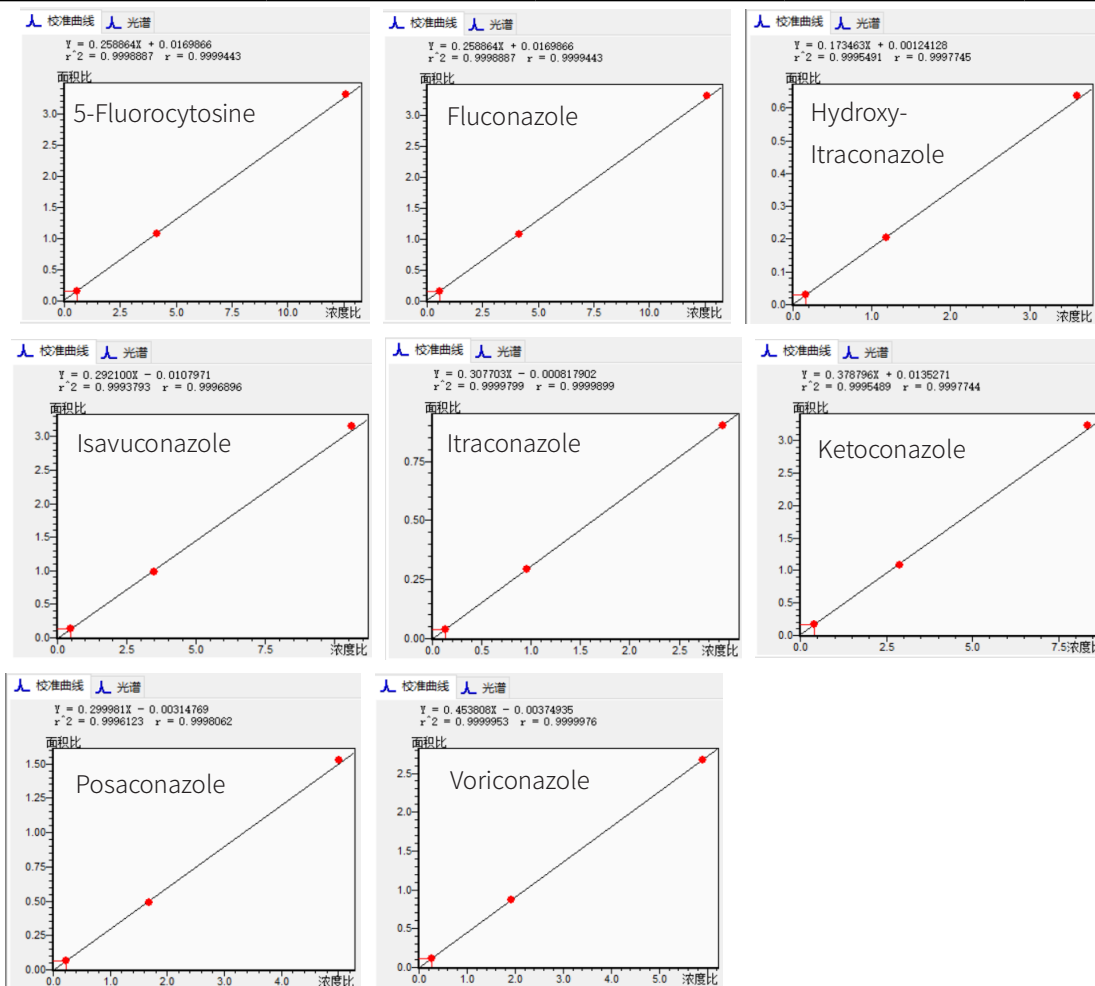


图 2 8 种抗真菌药的线性方程及相关系数

2.4 质控样品考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对试剂盒中的质控品 Level I 和 Level II 进行分析, 标示浓度和允许波动范围如表 4 所示, 实际检测浓度在允许波动范围内。

表 4 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (µg/mL)		允许波动范围 (µg/mL)		实测浓度 (µg/mL)	
	Level I	Level II	Level I	Level II	Level I	Level II
5-Fluorocytosine	21.7	50.9	17.40-26.10	40.70-61.10	22.40	50.20
Fluconazole	2.29	5.4	1.83-2.75	4.32-6.48	2.25	5.54
Hydroxy-Itraconazole	0.654	1.56	0.52-0.79	1.25-1.87	0.68	1.58
Isavuconazole	1.92	4.55	1.54-2.31	3.64-5.46	1.97	4.59
Itraconazole	0.528	1.26	0.42-0.63	1.01-1.51	0.61	1.28
Ketoconazole	1.63	3.68	1.30-1.96	2.94-4.41	1.58	3.45
Posaconazole	0.91	2.18	0.73-1.09	1.74-2.61	1.00	2.28
Voriconazole	1.07	2.53	0.85-1.28	2.03-3.04	1.01	2.45

2.5 重复性考察

质控品 Level I 和 Level II 分别连续进行前处理进样分析 6 次, 计算保留时间及浓度的相对标准偏差 (RSD)。结果如表 5 所示, 8 种抗真菌药物保留时间及浓度 RSD 均处于合理范围。

表 5 重复性考察结果

化合物	保留时间 RSD (%)		浓度 RSD (%)	
	Level I	Level II	Level I	Level II
5-Fluorocytosine	0.22	0.14	6.43	2.48
Fluconazole	0.33	0.27	3.43	2.07
Hydroxy-Itraconazole	0.25	0.19	3.05	1.12
Isavuconazole	0.24	0.18	2.29	1.13
Itraconazole	0.26	0.17	3.83	3.93
Ketoconazole	0.30	0.20	2.55	2.27
Posaconazole	0.28	0.19	4.03	4.10
Voriconazole	0.29	0.21	1.40	1.29

■ 结果与讨论

本文建立了一种利用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050CL 联用对血清中 8 种抗真菌药进行定性定量分析的方法。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品，内标法定量，线性相关系数 > 0.999 。低、高浓度质控样品定值结果均在允许范围内，重复性实验保留时间的 $RSD \leq 0.33\%$ ，浓度的 $RSD \leq 6.43\%$ 。此联用系统能在线自动处理样品且数据重复性好，消除手动操作生物样品带来的风险，最大限度地减少操作人员与生物样本的接触，放入采血管、必要试剂和专用处理管，便可进行在线自动前处理，每个样品并行处理，以优化仪器的使用和样品通量，并且通过软件来管理试剂、校准曲线、控制样品和系统维护，确保系统的性能和可靠性，系统提供可视化的图表和数据，可实时提醒用户试剂量的减少或 QC 样品结果的变化等，是一种全自动化的分析系统。该方法可供临床实验室参考。

参考文献

[1] Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and blood concentration of nearly 1000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care* 2012;16:R136.