

# 自动样品前处理液质联用法监测氨基糖苷类抗生素及万古霉素的血浆药物浓度

LCMSMS-770

**摘要：** 本文利用 CLAM-2030 自动样品处理仪串联超高效液相色谱三重四极杆质谱系统，建立了人血浆中 7 种氨基糖苷类抗生素和万古霉素的自动化高通量检测方法。血浆样品经 CLAM-2030 蛋白沉淀，离心过滤后，即可自动转移至 LC-MS/MS 进行数据采集。经基质效应、提取回收率、线性、精密度及准确度等方法学评价，结果显示该方案快速、稳定、可靠，可以替代繁琐的人工操作，提高检测效率。

**关键词：** CLAM-2030 自动样品前处理 治疗药物监测 氨基糖苷类抗生素

氨基糖苷类抗生素常用于治疗严重感染，特别是革兰氏阴性杆菌感染。氨基糖苷类由于其肾毒性而且治疗窗窄，需要进行治疗药物监测，以保证合理安全用药。氨基糖苷类药物监测 (TDM) 的益处已得到公认。万古霉素是一种糖肽类抗生素，由于它们的协同作用，经常与氨基糖苷类一起使用，它也具有肾毒性，也需要进行监测。

虽然 LC-MS/MS 现在被认为是 TDM 的金标准方

法，但许多临床实验室仍在使用免疫测定法。免疫测定具有交叉反应性，特异性差，效率低下且检测成本高。基于以上原因，开发一种高灵敏、高特异、高通量的药物浓度监测方法具有重要的现实意义。

本文建立了一种 CLAM-2030 全自动样品处理仪与亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 三重四极杆质谱联用的高通量检测方法，可实现自动样品处理及检测，可同时分析 7 种氨基糖苷类和万古霉素。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

CLAM-2030 串联超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 (图 1)，具体配置为

输 液 泵： LC-30A

系 统 控 制 器： CBM-20A

自 动 进 样 器： SIL-30AC

质 谱 检 测 器： LCMS-8060

柱 温 箱： CTO-30A

自 动 样 品 处 理 仪： CLAM-2030

色 谱 工 作 站： LabSolutions Ver. 5.91

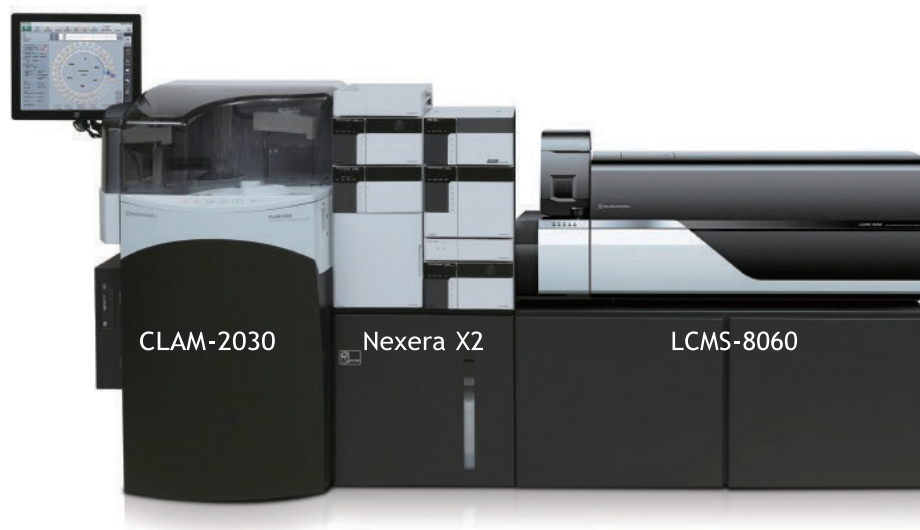


图 1 CLAM-2030 串联超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色 谱 柱 : InertSustain Amide ( 50 mm×2.1 mm I.D., 3 μm ), GL Sciences, 货号 : 5020-88727  
 流 动 相 : A 相 -1% 甲酸水 +250 mM 甲酸铵; B 相 - 乙腈  
 流 速 : 0.4 mL/min  
 进 样 体 积 : 0.5 μL  
 柱 温 : 50°C  
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 75%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	B.Conc	75
1.30	Pumps	B.Conc	55
2.80	Pumps	B.Conc	55
2.90	Pumps	B.Conc	75
4.75	Controller	Stop	

### 质谱条件

离 子 源 : ESI(+)  
 雾化气流速 : 2.5 L/min  
 加热气流速 : 10.0 L/min  
 干燥气流速 : 3.0 L/min  
 加热模块温度 : 300°C  
 D L 温 度 : 150°C  
 接 口 温 度 : 500°C  
 扫 描 模 式 : MRM

表 2 化合物 MRM 离子对

#	化合物	英文名	CAS 号	定量离子对	定性离子对
1	阿米卡星	Amikacin	37517-28-5	586.3 > 163.3	586.3 > 425.2
2	阿贝卡星	Arbekacin	51025-85-5	553.4 > 163.1	553.4 > 425.3
3	庆大霉素 C1a	Gentamicin C1a	26098-04-4	450.4 > 322.1	450.4 > 163.1
4	庆大霉素 C1	Gentamicin C1	25876-10-2	478.4 > 322.2	478.4 > 157.1
5	庆大霉素 C2	Gentamicin C2	25876-11-3	464.4 > 322.1	464.4 > 160.1
6	潮霉素 B(内标)	Hygromycin B	31282-04-9	528.3 > 352.1	528.3 > 256.9
7	卡那霉素	Kanamycin	8063-07-8	485.4 > 163.1	485.4 > 324.0
8	新霉素 B	Neomycin B	119-04-0	615.4 > 163.1	615.4 > 163.0
9	巴龙霉素	Paromomycin	7542-37-2	616.4 > 293.1	616.4 > 163.1
10	妥布霉素	Tobramycin	32986-56-4	468.3 > 324.1	468.3 > 163.1
11	万古霉素	Vancomycin	1404-90-6	725.4 > 1307.2	725.4 > 144.4

## 1.3 样品前处理

使用 CLAM-2030 自动样品前处理仪, 以相同的方法处理校准品、QC 及样品。20 微升水 / 异丙醇 (1:3) 活化过滤器, 并加入 100 微升沉淀剂 (三氯乙酸 100 g/L 水溶液)。然后加入 20 μL 内标 (水中 50 μg/mL 的潮霉素 B) 和 20 μL 血浆。涡旋 1 分钟后, 在 90 秒内过滤沉淀物, 并将提取物转移至自动进样器进样分析。样品制备过程建议与分析检测重叠可增加样品通量。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 线性关系

使用具有  $1/x$  或  $1/x^2$  加权的二次回归模型通过内标法计算校准曲线。准确度需在 85% - 115% 之间。典型的校准曲线如图 2 所示，LLOQ 的色谱图如图 3 所示。

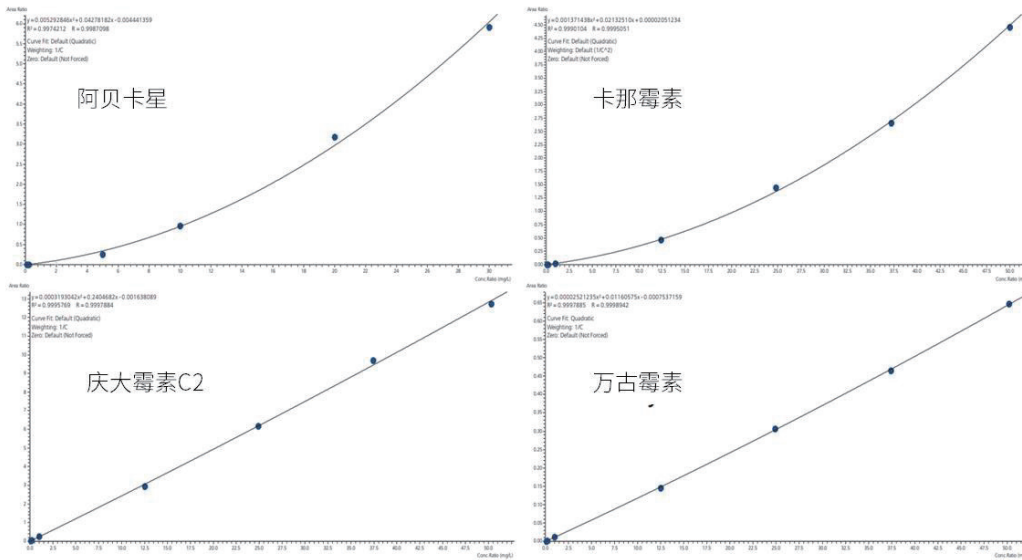
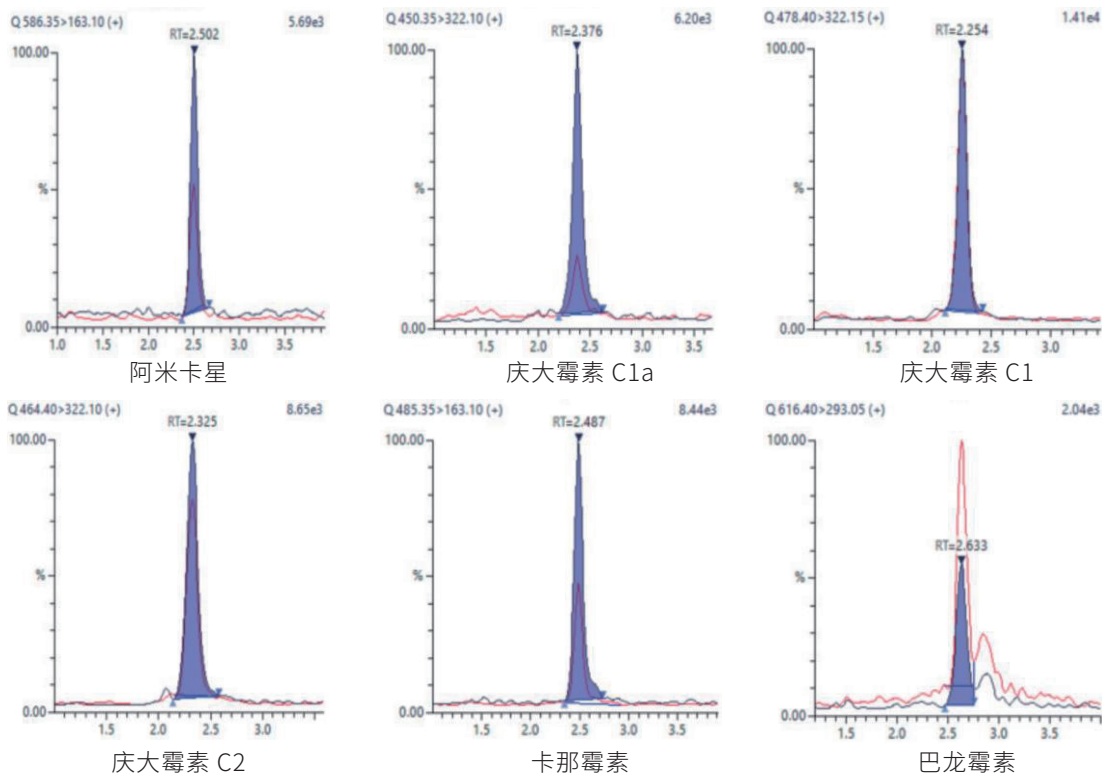


图 2 典型的校准曲线



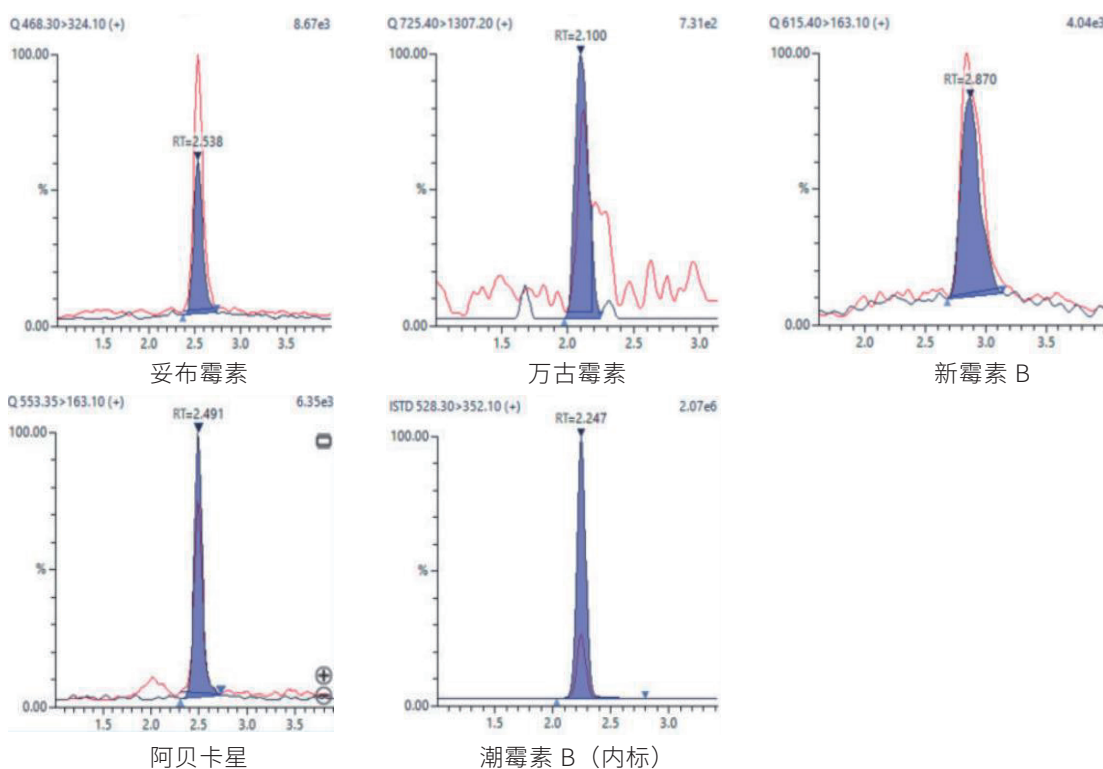


图 3 LLOQ 色谱图

## 2.2 回收率结果

通过比较血浆 QC 的峰面积与溶液 QC 峰面积来评估总回收率（即萃取和基质效应）。每种类型的样品制备一式三份。结果如表 3 所示。平均回收率在 89% - 105% 之间，说明萃取率高且基质效应低。

表 3 回收率结果 (n=3)

化合物	血浆 QC		溶剂 QC		% 回收率
	平均峰面积	%RSD	平均峰面积	%RSD	
阿米卡星	10113056	9%	10759507	2%	94%
庆大霉素 C1a	3527104	2%	3525507	4%	100%
庆大霉素 C1	43678905	0.30%	44889021	9%	97%
庆大霉素 C2	8757317	9%	8725000	4%	100%
卡那霉素	9596851	7%	10020195	1%	96%
巴龙霉素	2588488	12%	2735816	0%	95%
妥布霉素	20326679	10%	18901937	1%	108%
万古霉素	3188732	0.40%	3573458	1%	89%
新霉素 B	2505853	8%	2382767	9%	105%
潮霉素 B	6872652	2%	7641951	1%	90%

## 2.3 精密度与准确性

连续 3 天检测四个浓度水平的 QC 样品（重复 5 次进样）来评估精密度和准确度。评价标准是相对标准偏差 <15% (LOQ 为 20%)，准确度在 80 - 120% 之间。结果见表 4。

表 4 精密度及准确性结果

		阿米卡星	庆大霉素 C1a	庆大霉素 C1	庆大霉素 C2	卡那霉素
QC LOQ	平均浓度 (µg/mL)	0.0984	0.0980	0.0968	0.0996	0.1080
	%RSD	6.10%	10.40%	6.30%	9.50%	8.10%
	理论浓度 (µg/mL)	0.1010	0.1010	0.1010	0.1010	0.1000
	准确度	97.40%	97.00%	95.80%	98.60%	108.00%
QCA (低)	平均浓度 (µg/mL)	0.2830	0.3030	0.2690	0.3080	0.2730
	%RSD	2.50%	3.90%	5.40%	1.90%	2.10%
	理论浓度 (µg/mL)	0.3020	0.3020	0.3020	0.3020	0.3000
	准确度	93.60%	100.00%	89.20%	102.00%	91.00%
QCB (中)	平均浓度 (µg/mL)	27.8	25.3	25.7	26.9	26.9
	%RSD	3.30%	3.80%	1.00%	2.80%	2.50%
	理论浓度 (µg/mL)	25.0	24.9	24.9	24.9	24.8
	准确度	111.00%	102.00%	103.00%	108.00%	108.00%
QCC (高)	平均浓度 (µg/mL)	44.5	43.8	44.8	46.4	45.6
	%RSD	1.80%	3.20%	1.30%	3.00%	1.20%
	理论浓度 (µg/mL)	42.7	42.6	42.6	42.6	42.4
	准确度	104.00%	103.00%	105.00%	109.00%	107.00%
		阿米卡星	庆大霉素 C1a	庆大霉素 C1	庆大霉素 C2	卡那霉素
QC LOQ	平均浓度 (µg/mL)	0.1100	0.1140	0.1020	0.1050	0.0998
	%RSD	13.80%	13.80%	6.30%	10.30%	11.10%
	理论浓度 (µg/mL)	0.1000	0.1000	0.1000	0.1000	0.0990
	准确度	110.00%	114.00%	102.00%	105.00%	101.00%
QCA (低)	平均浓度 (µg/mL)	0.2760	0.2780	0.3230	0.2770	0.2690
	%RSD	10.30%	3.20%	6.00%	7.10%	4.10%
	理论浓度 (µg/mL)	0.3000	0.3010	0.3000	0.3010	0.3000
	准确度	92.10%	92.30%	108.00%	92.00%	89.50%
QCB (中)	平均浓度 (µg/mL)	27.8	26.8	51.8	27.4	16.0
	%RSD	3.80%	2.50%	4.70%	4.90%	3.10%
	理论浓度 (µg/mL)	24.8	24.9	49.6	24.9	15.0
	准确度	112.00%	108.00%	104.00%	110.00%	106.00%
QCC (高)	平均浓度 (µg/mL)	43.4	45.5	90.4	40.3	26.5
	%RSD	1.00%	1.20%	2.10%	3.60%	1.00%
	理论浓度 (µg/mL)	42.4	42.6	84.9	84.9	25.2
	准确度	102.00%	107.00%	106.00%	47.50%	105.00%

## ■ 结论

本文建立了一种快速自动化的方法来检测氨基糖苷类抗生素和万古霉素，应用于治疗药物的监测。方法性能足以确保常规准确定量。样品制备的自动化还极大地提高了实验室的通量和易用性。

岛津应用云

