

LC-MS/MS 快速测定人血浆中 10 种抗结核药物含量

LCMSMS-771

摘要：本文建立了 LC-MS/MS 方法同时检测人血浆中的 10 种抗结核药物异烟肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB)、吡嗪酰胺 (PZA)、利福平 (RIF)、利福布汀 (RFB)、利福喷汀 (RFP) 以及 4 种二线抗结核药物乙硫异烟胺 (ETH)、丙硫异烟胺 (PTO)、氨基硫脲 (THS) 和氯法齐明 (CFZ)，包含了几乎所有常用的抗结核药物。血浆样品采用乙腈沉淀蛋白质，7 分钟内即可完成检测。结果表明，INH、EMB、PZA、RIF、RFB、RFP、ETH、PTO、THS 和 CFZ 分别在 5 - 7500、1 - 1500、5 - 50000、5 - 7500、1 - 3000、10 - 10000、1 - 3000、1 - 3000、2 - 4000 和 0.1 - 200 ng/mL 范围内具有良好的线性关系， $R > 0.99$ 。结果表明，该方法在灵敏度、分离效率和简便性方面取得了显著进步。

关键词：治疗药物监测 LC-MS/MS 抗结核药物

技术特点：

- ❖ 使用蛋白沉淀法进行样品处理，简便快速回收率高且易于自动化处理。
- ❖ 优选的色谱柱实现了 10 种抗结核药物的良好保留、分离及峰型。

结核病仍然是一个全球性挑战，特别是随着耐药病例的增加，结核病的治疗也在一线抗结核药物的基础上进行调整。逐渐添加二线抗结核药物进行进一步治疗。常用的十种药物包括异烟肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB)、吡嗪酰胺 (PZA)、利福平 (RIF)、利福布汀 (RFB)、利福喷汀 (RFP) 等一线抗结核药物以及乙硫异烟胺 (ETH)、丙硫异烟胺 (PTO)、氨基硫脲 (THS) 和氯法齐明 (CFZ) 等四种二线抗结核药物。这些药物结构、大小和极性各异。因此，在短时间内分离和检测多种药物具有挑战性。

目前已有几种分析方法来测量抗结核药物的血浆

浓度，包括高效液相色谱 (HPLC) 紫外检测 (UV)、毛细管电泳 - 紫外和超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS)。其中，大多数方法只能检测两到四种一线抗结核药物，包括 INH、EMB、PZA 和 RIF。而且这些方法的灵敏度相对较低：定量限大于 100.00 ng/ml，分析时间大于 9 min。

本研究建立了一种同时检测人血浆中的 10 种抗结核药物的 LC-MS/MS 方法。色谱分离采用资生堂 CAPCELL PAK-ADME (2.1 mm × 50 mm, 3 μm) 色谱柱，流动相为乙腈水 (含 0.1% 甲酸)，梯度洗脱，流速为 0.4 mL/min，进样量为 1 μL。7 分钟内即可完成检测。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 LCMS-8050 具体配置如下：

输液泵：LC-30AD
自动进样器：SIL-30AC
系统控制器：CBM-20A

检测器：LCMS-8050
柱温箱：CTO-30A
工作站软件：LabSolutions Version 5.81

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：CAPCELL PAK-ADME (2.1 mm × 50 mm, 3 μm)
流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸乙腈
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1
流速：0.4 mL/min
柱温：40°C
进样温度：15°C
进样量：1 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
1.00	95	5
3.00	40	60
4.00	40	60
5.00	10	90
5.01	95	5
7.00	95	5

质谱条件

离子化模式：ESI(+)	离子源温度：300°C
加热气：空气 15.0 L/min	DL管温度：250°C
雾化气：氮气 3.0 L/min	加热模块温度：450°C
干燥气：氮气 5.0 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
驻留时间：10 ms	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

序号	名称	简称	前体离子 > 产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	异烟肼	INH	138.20>121.00	-10	-18	-11
2	乙胺丁醇	EMB	205.30>116.10	-15	-16	-20
3	吡嗪酰胺	PZA	124.10>79.10	-16	-18	-29
4	利福平	RIF	823.50>719.50	-22	-20	-28
5	利福布汀	RFB	847.60>815.40	-22	-28	-40
6	利福喷汀	RFP	877.60>845.10	-20	-21	-22
7	乙硫异烟胺	ETH	167.15>140.00	-12	-19	-24
8	丙硫异烟胺	PTO	181.10>121.10	-22	-27	-20
9	氨基硫脲	THS	237.15>220.00	-10	-11	-14
10	氯法齐明	CFZ	473.15>431.00	-11	-37	-29
11	异烟肼 -d4	INH-d4	142.00>125.00	-14	-18	-21
12	乙胺丁醇 -d4	EMB-d4	209.00>120.00	-20	-16	-22
13	吡嗪酰胺 -d3	PZA-d3	128.00>110.00	-13	-15	-18
14	利福平 -d3	RIF-d3	826.50>794.30	-36	-18	-28

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品储备液配制

标准品储备溶液：以甲醇为溶剂配制储备液，每个化合物标准品储备液最终浓度为 0.2 mg/mL，-20°C 储存备用。

内标储备液：以甲醇为溶剂配制内标储备液，最终浓度为 1.0 mg/mL，-20°C 储存备用。

1.3.2 校准品及质控品配制

校准品：将 10 μL 标准系列工作液添加到 100 μL 空白血浆中，配制 7 个系列浓度校准品，见表 3。

质控品：取 100 mL 空白血浆并添加混合标准溶液，制备低、中、高浓度 QC 样品。低浓度为线性最小浓度 120%，中浓度为线性中间浓度，高浓度为线性最大浓度 80%，见表 3。

表 3 校准品浓度信息

序号	名称	校准品 (ng/mL)						
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
1	INH	5	10	50	200	1000	5000	7500
2	EMB	1	20	100	250	750	1500	5000
3	PZA	5	50	200	1000	4000	25000	50000
4	RIF	5	10	50	200	1000	5000	7500
5	RFB	1	5	10	50	250	1000	3000
6	RFP	10	50	100	500	2500	5000	10000
7	ETH	1	5	10	50	250	1000	3000
8	PTO	1	5	10	50	250	1000	3000
9	THS	2	20	100	500	2000	3000	4000
10	CFZ	0.1	0.5	2.0	10	50	100	200

1.3.3 样品前处理

将 100 μ L 空白血浆加入装有 5 μ L 混合内标溶液的 1.5 mL 离心管中。涡旋 10 秒后，加入 295 μ L 乙腈，涡旋 1 分钟。在 4 $^{\circ}$ C 下，15,000 g 离心 10 分钟，去除沉淀的蛋白质。所得上清液用氮气在 40 $^{\circ}$ C 下干燥后，将样品重新溶解在 100 μ L 含有 0.1% 甲酸的甲醇水溶液中，取 1 μ L 注入 LC-MS/MS 系统。

■ 实验结果

2.1 方法选择性

通过检测六份不同病人来源的空白血浆及其空白血浆加标样品来评估方法选择性，结果见图 1。空白血浆样品色谱图中无任何干扰峰，说明该方法无潜在内、外源干扰信号；加标样品 10 个药物的峰型及分离度良好。结果表明该方法的选择性良好。

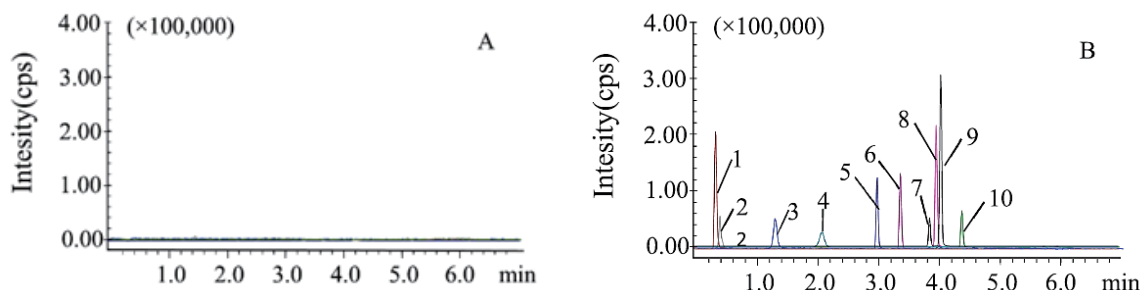


图 1 A 为空白血浆色谱图，B 为空白血浆加标样品色谱图
 (峰 1 - 10 分别为 EMB、INH、PZA、ETH、PTO、THS、RFB、RIF、RFP、CFZ)

2.2 校准曲线

使用 7 个标准浓度的校准品分析测定，内标法定量，得到校准曲线相关系数、线性范围和校准品准确度见表 4。结果显示 10 种药物线性相关系数均大于 0.99，准确度误差在 $\pm 15\%$ 以内，满足准确定量要求。

表 4 标准曲线参数 (1/C 加权)

序号	名称	相关系数 R	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	INH	0.998	5~7500	98.4~109.9
2	EMB	0.997	1~5000	93.5~111.3
3	PZA	0.996	5~50000	92.7~110.7

4	RIF	0.998	5~7500	93.0~106.0
5	RFB	0.999	1~3000	97.7~106.8
6	RFP	0.999	10~10000	92.9~109.0
7	ETH	0.999	1~3000	98.4~108.4
8	PTO	0.999	1~3000	99.5~111.8
9	THS	0.999	2~4000	91.8~104.9
10	CFZ	0.998	0.1~200	94.5~105.9

2.3 精密度及准确度

低、中和高水平 QC 样品重复测定 5 次, 评估准确度和精密度。结果见表 5。10 种药物三个浓度水平的精密度 RSD% 均小于 7%, 准确度误差在 $\pm 15\%$ 以内, 均可满足定量要求。

表 5 精密度测试结果

序号	名称		低水平 QC	中水平 QC	高水平 QC
1	INH	精密度 RSD%	3.1	2.2	3.5
		准确度 %	105.4	103.5	100.1
2	EMB	精密度 RSD%	4.9	5.9	3.6
		准确度 %	94.1	91.2	92.7
3	PZA	精密度 RSD%	5.2	1.8	1.7
		准确度 %	101.9	101.8	102.8
4	RIF	精密度 RSD%	5.8	2.1	2.9
		准确度 %	109.6	108.7	105.4
5	RFB	精密度 RSD%	6.9	3.1	1.9
		准确度 %	94.1	91.2	92.8
6	RFP	精密度 RSD%	2.8	3.7	3.2
		准确度 %	109.3	112.0	112.9
7	ETH	精密度 RSD%	3.3	4.60	2.1
		准确度 %	122.1	101.2	104.4
8	PTO	精密度 RSD%	5.1	1.1	2.2
		准确度 %	104.3	104.9	105.3
9	THS	精密度 RSD%	3.5	1.6	4.6
		准确度 %	103.4	106.5	106.9
10	CFZ	精密度 RSD%	5.8	4.6	5.6
		准确度 %	96.2	92.6	99.4

2.4 患者样本测定

对某医院 34 例接受抗结核药物治疗的肺结核患者血液样本进行了检测。34 例患者中, 除了刚入院的 4 名患者外, 大多数结核病患者服用三到四种药物, 包括 INH、EMB、PZA、RIF 和 RFP, 对一线抗结核药物反应不佳的患者将被给予 PTO 治疗。34 例样本检测得到的药物浓度见表 6。NH 的浓度为 375.26 - 4539.26 ng/mL, EMB 为 313.52 - 2872.09 ng/mL, PZA 为 8129.53 - 27080.98 ng/mL, RIF 为 499.57 - 4716.34 ng/mL, RFP 为 1100.25 - 10987.82 ng/mL, PTO 为 1080.40 ng/mL。未发现服用剩余抗结核药物的患者。

表 6 34 例患者样本检测结果

样品	浓度					
	INH(ng/mL)	EMB(ng/mL)	PZA(ng/mL)	RIF(ng/mL)	RFP(ng/mL)	PTO(ng/mL)
S1	3248.95	1362.34	29418.23	1536.26	-	-
S2	-	1530.11	33331.92	-	9001.49	-
S3	1385.49	1612.24	24288.37	1121.03	1100.25	-
S4	865.12	1362.76	-	2717.26	-	-
S5	489.75	1597.35	-	1520.34	-	-
S6	896.32	813.56	10236.25	2668.47	-	-
S7	1548.36	2150.26	-	-	-	-
S8	2010.91	1275.68	23485.90	1566.06	-	-
S9	4052.35	-	21554.93	1130.03	-	-
S10	962.10	503.76	14214.76	518.74	-	-
S11	-	-	-	-	-	-
S12	497.53	953.73	17587.08	951.01	-	-
S13	1493.24	664.10	9671.23	499.57	-	-
S14	4539.26	2872.09	18236.89	2061.91	-	-
S15	-	-	-	-	-	-
S16	1563.21	1266.49	15693.54	952.73	3606.65	-
S17	375.26	892.14	1321.09	-	-	-
S18	796.32	553.81	8129.54	1457.57	-	-
S19	1765.23	1658.58	18898.79	1255.45	-	-
S20	-	2277.41	27080.99	2169.46	10987.82	-
S21	-	871.70	-	-	-	1080.40
S22	2329.03	1453.32	27872.52	2069.75	-	-
S23	3223.77	1718.63	-	-	-	-
S24	763.29	426.11	-	-	-	-
S25	2178.30	1345.46	-	1392.71	-	-
S26	961.28	649.63	9563.24	756.34	-	-
S27	965.34	362.84	11952.92	-	-	-
S28	938.54	313.52	-	1998.63	-	-
S29	1856.93	1424.41	24754.05	4716.34	7667.97	-
S30	-	-	-	-	-	-
S31	1087.98	672.51	16088.78	1241.26	-	-
S32	-	-	-	-	-	-
S33	2189.47	1873.54	23539.63	-	-	-
S34	2652.78	1308.99	23027.51	1978.43	-	-

“-” 代表未检出

■ 结论

本文建立了一种同时定量人血浆中十种抗结核药物的 LC-MS/MS 方法。经方法选择性、线性关系、精密度及准确度等方法学验证，结果显示该方法灵敏度特异性好、线性范围广、准确度高。该方法可用于监测结核病患者的血药浓度，为提高药物疗效、减少不良反应、改善结核病治疗提供更全面、更高效的检测方法。

岛津应用云

