

LC-MS/MS 测定人血清中万古霉素的浓度

LCMSMS-724

摘要：使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了血清中万古霉素测定方法。使用内标、校准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，校准曲线相关系数大于 0.999，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94.6%~102.8% 之间，RSD 在 1.6%~3.3% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于万古霉素治疗药物监测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 万古霉素 治疗药物监测

技术特点：

- ❖ 使用串联质谱结合检测试剂盒，建立了血清中万古霉素测定方法。
- ❖ 前处理使用更简便 96 孔蛋白沉淀板，提高了前处理效率。
- ❖ 分析时间仅需 4 min，提高了万古霉素检测效率

万古霉素作为一种糖肽类抗菌药物，是治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌和肠球菌所致的重症感染包括败血症、肺部感染、皮肤软组织感染的疗效确切又比较安全的抗生素。对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌院内肺部感染，万古霉素为首选药物。临床万古霉素使用量的增加会导致细菌对其敏感性发生变化，易诱发生耐万古霉素的金黄色葡萄球菌，耐万古霉素的肠球菌，后果十分严重。保持万古霉素血药浓度可避免耐药菌株产生。因万古霉素治疗窗相对较窄、个体差异大、且具有明显的肾毒性，因此，在临床应用时，应定时对其血药浓度检测，及时调整剂量，制定合理的给药方案以实现个体化给药，减少不良反应

发生率。国际上推荐对应用大剂量万古霉素并且使用疗程较长的患者、肾功能不稳定（如明显恶化或明显改善）的患者、联合使用其它肾毒性药物的患者、儿童及老人等高风险人群进行治疗药物监测。目前临床上万古霉素血药浓度测定方法主要有免疫法、直接化学发光法、高效液相色谱法、高效液相色谱 - 串联质谱法。高效液相色谱 - 串联质谱法作为特异性强，灵敏度高的检测方法，在临床上逐渐取代传统方法。

本文使用串联质谱 LCMS-8045 CL，建立了血清中万古霉素测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于万古霉素治疗药物监测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8045 CL 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40 CL	在线脱气机：	DGU-405 CL
输液泵：	LC-40D XR CL×2	柱温箱：	CTO-40C CL
柱温箱：	SIL-40C XR CL	质谱仪：	LCMS-8045 CL
色谱工作站：	Labsolutions CL Ver.1.30		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm);
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-30048-01;

流动相：试剂盒提供

进样体积：1 μL

柱温：40℃

流速：0.5 mL/min

洗针液：甲醇 / 水 = 1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 1%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	1
1.00	泵	B.Conc	98
2.00	泵	B.Conc	98
2.10	泵	B.Conc	1
4.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式：	ESI+	雾化气流速：	3.0 L/min
接口电压：	4 kV	干燥气流速：	5.0 L/min
接口温度：	300°C	加热气流速：	15.0 L/min
D L 温度：	150°C	碰撞气：	氩气
加热模块温度：	400°C	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
MRM 参数：	见表 2		

表 2 MRM 优化参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Vancomycin	725.6	100.1*	-30	-43	-19
		144.2	-30	-18	-15
Vancomycin-IS	691.0	100.0	-20	-45	-18

注：* 表示定量离子

1.3 校准品及样品制备

使用万古霉素测定试剂盒（液相色谱 - 串联质谱法，山东英盛生物技术有限公司）按照试剂盒说明书进行实验。试剂盒包含高浓度万古霉素校准品，低中高浓度质控品 LQC, MQC, HQC, 万古霉素内标，万古霉素校准品稀释液，万古霉素提取液，流动相 A, 流动相 B, 96 孔蛋白沉淀板。

内标浓缩液制备：取 100 μ L 纯水加入到万古霉素内标干粉小瓶中，超声 2 min，涡旋震荡 1 min，冰箱冷冻保存。

内标工作液制备：取内标浓缩液，按 1:199 用内标提取液稀释混匀，得内标工作液，现用现配。

高浓度校准品溶液制备 (L1)：取 1 mL 纯水加入到万古霉素校准品冻干粉小瓶中，溶解混匀。

万古霉素校准品稀释液制备：取 3 mL 纯水加入到万古霉素校准品稀释液冻干粉小瓶中，溶解混匀。

基质匹配校准曲线制备：取 500 μ L 高浓度校准品溶液 L1，用 500 μ L 校准品稀释液稀释混匀，得校准品溶液 L2，如此依次按 1:1 等比例稀释校准品溶液得校准品溶液 L3 ~ L6，共 6 个浓度，基质校准曲线浓度见表 3。

基质匹配质控品溶液制备：取 1 mL 纯水加入到万古霉素质控品冻干粉小瓶中，溶解混匀，低中高浓度质控品浓度分别为 4.72 μ g/mL、9.62 μ g/mL、37.81 μ g/mL。

校准品、质控品及样品前处理：向 96 孔蛋白沉淀板中加入 350 μ L 内标工作液，每孔中加入 100 μ L 样品，吹打混匀，静置 5 min，通过正压装置将孔内液体压入 96 孔接收板中，取 100 μ L 96 孔接收板中滤液至另一 96 孔进样板中，加入 100 μ L 纯水，混匀后上机测定。

 表 3 校准曲线浓度表 (μ g/mL)

名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Vancomycin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

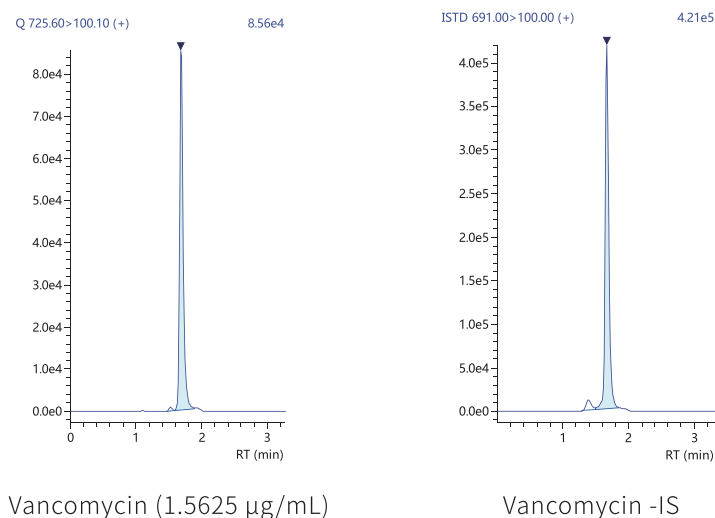


图 1 校准曲线最低点谱图

2.2 线性测定结果

对校准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线结果见表 4，万古霉素在校准曲线浓度范围内线性相关系数大于 0.999，准确度在 95.8%~102.5% 之间，满足测定需求。

表 4 校准曲线结果

名称	线性方程	线性范围 (µg/mL)	相关系数	准确度 (%)
Vancomycin	$Y = 0.117699 * X - 0.00178551$	1.5625~50	0.9998	95.8%~102.5%

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对低中高浓度质控品进行前处理，每个浓度质控品重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94.6%~102.8% 之间，RSD 在 1.6%~3.3% 之间，满足临床测定需求。

表 5 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 µg/mL)

质控	项目	数值
LQC	理论浓度	4.72
	测定浓度	4.54
	质控范围	4.013~5.429
	质控准确度 %	96.2
	RSD%	3.3
MQC	理论浓度	9.62
	测定浓度	9.89
	质控范围	8.179~11.065
	质控准确度 %	102.8
	RSD%	1.8

	理论浓度	37.81
	测定浓度	35.77
HQC	质控范围	32.140~43.484
	质控准确度 %	94.6
	RSD%	1.6

■ 结论

使用串联质谱 LCMS-8045 CL，建立了血清中万古霉素测定方法。使用内标、校准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，校准曲线相关系数大于 0.999，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 94.6%~102.8% 之间，RSD 在 1.6%~3.3%，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于万古霉素治疗药物监测。

岛津应用云

