

LC-MS/MS 检测人血浆中 3 种抗肿瘤化疗药物含量

LCMSMS-654

摘要：本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪内标法测定人血浆中 3 种化疗药物的含量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9999，方法准确度在 95%~105% 之间，精密度 RSD 均小于 3%，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词：临床检测 LC-MS/MS 化疗药物

肿瘤已成为全球发病率和死亡率的主要原因。目前，肿瘤的主要治疗方法包括手术、放疗和化疗，抗肿瘤化疗药物是治疗癌症常用的方法之一。化疗药物最初是作为细胞增殖抑制剂或者细胞毒性化合物，通过抑制血管生成或抑制快速增殖的恶性细胞发挥治疗作用。不可避免的是，这些药物会破坏正常细胞，并产生一系列毒副作用。化疗药物对肿瘤的治疗效果和毒副作用存在个体差异，标准剂量下，一些患者可能会痊愈，一些患者可能没有效果，而另外一些患者可能会产生严重毒性反应。化疗药物的治疗效果和毒副

反应的平衡，取决于药物的系统暴露量以及药物代谢的个体差异，因此其治疗药物监测对于增效减毒，合理用药来说具有重要意义。

本文应用 3 项化疗药物吉西他滨、甲氨蝶呤、环磷酰胺含量测定试剂盒，使用岛津 LCMS-8045 CL 液相色谱三重四级杆质谱仪开发了其治疗药物监测方法。血浆样品经含同位素内标物的甲醇进行蛋白沉淀后，取上清加水稀释后即可进样分析，一针进样，6.5 分钟即可完成 3 种化疗药物分析，该方法简单易捷，适合自动化及高通量检测分析。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL，具体配置如下：

输液泵：LC-40D XR CL

检测器：LCMS-8045 CL

自动进样器：SIL-40C XR CL

柱温箱：CTO-40C CL

系统控制器：CBM-40 CL

工作站软件：LabSolutions LCMS CL Ver. 1.30

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 × 2.1 mm, 2.7 μm)，SGLC, 货号：227-32003-03

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水 5 mM 醋酸铵，B 相 -0.1% 甲酸甲醇

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

进样器温度：5°C

柱温：35°C

进样量：2 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.30	95	5
2.50	5	95
4.50	5	95
4.51	95	5
6.50	95	5

质谱条件

离子化模式: ESI+	离子源温度: 300°C
加热气: 空气 10.0 L/min	DL 管温度: 250°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	加热模块温度: 400°C
干燥气: 氮气 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
驻留时间: 25 ms	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

No.	化合物	英文名称	CAS 号	离子对	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	吉西他滨	Gemcitabine	95058-81-4	264.1>112.0	-17.0	-19.0	-19.0
2	甲氨蝶呤	Methotrexate	59-05-2	455.1>308.1	-16.0	-20.0	-21.0
3	环磷酰胺	Cyclophosphamide	50-18-0	261.1>140.0	-17.0	-21.0	-29.0
4	吉西他滨 -13C,15N ₂	Gemcitabine -13C,15N ₂	1262897-74-4	267.1>115.0	-17.0	-19.0	-19.0
5	甲氨蝶呤 -d3	Methotrexate-d3	432545-63-6	458.1>311.1	-16.0	-20.0	-21.0
6	环磷酰胺 -d4	Cyclophosphamide-d4	173547-45-0	265.1>140.0	-17.0	-21.0	-29.0

1.3 样品配制和前处理

1.3.1 样品配制

(1) 将试剂盒 (3 项抗肿瘤化疗药物检测试剂盒, 豪思生物) 和血浆样品恢复至室温后, 涡旋混匀。

(2) 校准品配制: 将试剂盒中校准品 1-6 各取 10 μL 加入 90 μL 空白血浆或血清中, 涡旋 1 分钟, 得系列校准品 1-6, 浓度如表 5 所示。

(3) 质控品配制: 将试剂盒中质控品各取 10 μL 加入 90 μL 空白血浆或血清中, 涡旋 1 分钟, 得低、中、高水平质控品 LQC、MQC、HQC, 浓度如表 3 所示。

表 3 校准品 & 质控品浓度信息

#	化合物	校准品 (ng/mL)						质控品 (ng/mL)		
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	LQC	MQC	HQC
1	吉西他滨	5	20	40	100	200	400	15	60	240
2	甲氨蝶呤	25	100	200	500	1000	2000	75	300	1200
3	环磷酰胺	25	100	200	500	1000	2000	75	300	1200

1.3.2 样本前处理

- 移取 100 μL 校准品 / 质控品 / 待测血清样本于 1.5 mL 离心管;
- 加入 300 μL 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋混合 2 min;
- 于 4°C, 10000 rpm 离心 5 min;
- 取 100 μL 上清于进样小瓶并加入 900 μL 纯水混匀;
- 上机后自动进样器以 2 μL 进样分析。

实验结果

2.1 线性关系

将 6 个标准浓度的校准品按 1.3.2 中前处理条件进行分析测定, 以浓度比为横坐标, 面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线得到相关系数、线性范围和校准品准确度见表 4。

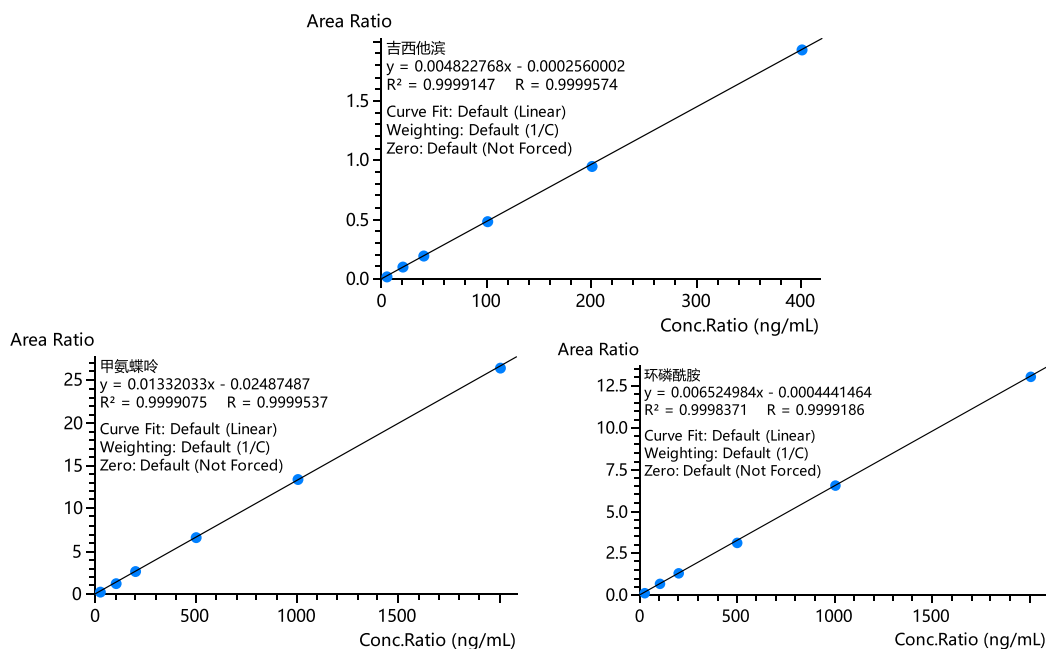


图 1 3种化疗药物校准曲线

表 4 校准曲线参数

#	名称	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	吉西他滨	0.9999	5-400	95.8~103.7
2	甲氨蝶呤	0.9999	25-2000	98.5~101.3
3	环磷酰胺	0.9999	25-2000	97.2~102.2

2.2 精密度

本实验分别对低、中、高浓度的正常人血清基质加标样（质控品）进行3次重复测定，数据结果见表5至表7。方法准确度在95%~105%之间，精密度RSD均小于3%，可满足临床日常检验需求。

表 5 吉西他滨精密度 & 准确度结果 (n=3)

#	样品	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	误差 %
1	LQC	14.28	2.00%	15	-4.83%
2	MQC	59.13	2.93%	60	-1.44%
3	HQC	233.85	0.84%	240	-2.56%

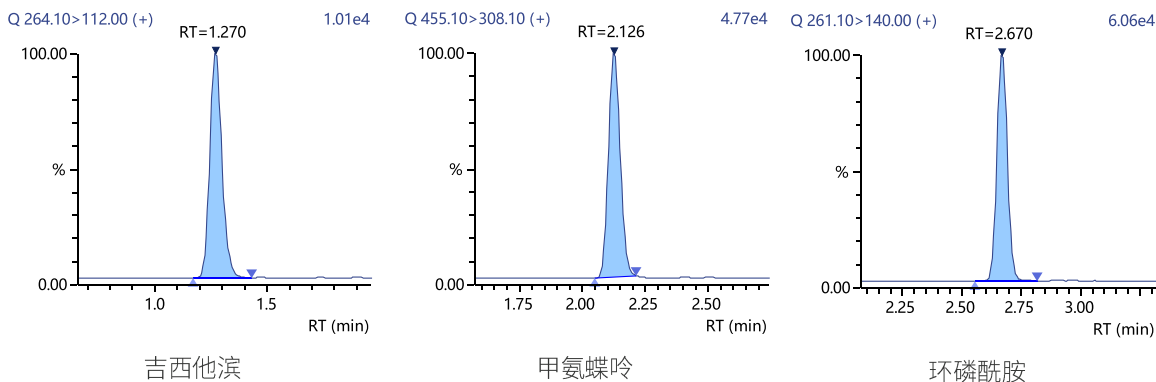
表 6 甲氨蝶呤精密度 & 准确度结果 (n=3)

#	样品	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	误差 %
1	LQC	75.37	0.79%	75	0.49%
2	MQC	307.60	2.13%	300	2.53%
3	HQC	1209.41	1.74%	1200	0.78%

表 7 环磷酰胺精密度 & 准确度结果 (n=3)

#	样品	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	误差 %
1	LQC	71.40	1.77%	75	-4.80%
2	MQC	293.11	1.92%	300	-2.30%
3	HQC	1183.95	2.42%	1200	-1.34%

2.3 低浓度质控品色谱图



■ 结论

本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪内标法定量测定人血浆中3种化疗药物的含量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能，验证结果优异，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

