

LCMS-8050 CL 同时测定血清中伏立康唑、 万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺

LCMSMS-507

摘要：本文利用岛津临床用 LCMS-8050CL 三重四极杆液质联用系统建立了人血清中抗菌药物伏立康唑、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺同时分析的方法。该方法采用内标法定量，线性相关系数在 0.997 以上；人血清样品中添加三个不同浓度的标准溶液，加标回收率在 94.0~108.2% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.50~3.94% 之间，可用于实际样品的检测。

关键词：LCMS-8050 CL 三重四极杆液质联用系统 血清 抗菌药

抗菌药物在由细菌或真菌引起的感染性疾病中显示出了良好的疗效，成了临床应用最广泛的药物之一。但抗菌药物在治愈并挽救许多患者生命的同时，由于其不合理使用不良后果也相应增加，如不良反应的增多、病原菌耐药比例上升、患者治疗失败、医疗资源浪费以及给患者健康造成重大损害，甚至致残致死，合理的抗菌药物使用剂量不仅可以降低药物不良反应的发生概率，而且能避免诱导和产生耐药菌株。

伏立康唑、万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺是临床上常用的抗菌药物，药物疗效、毒性均与血药浓度浓度相关，为提高临床疗效和安全性，国内外的指南均推荐进行药物浓度监测，临床医生可根据监测的血

药浓度，结合病人病情等进行个体化给药剂量的调整，提高该类药物疗效，减少毒副作用的发生。目前，临床上常用免疫法对这些药物进行检测，但免疫法试剂盒比较昂贵，特异性差导致结果偏差较大，对于多种药物联合治疗时不能满足多种药物同时、快速检测的需求。高特异性、高灵敏度和高选择性的液相色谱串联质谱技术仅需一次简单的样品前处理即可同时测定患者体内多种抗菌药的浓度。

本文采用岛津临床用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 CL，建立了人血清中伏立康唑、利奈唑胺、万古霉素和替考拉宁同时分析的方法，该方法灵敏度高、分析速度快，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A CL

脱气机：DGU-20A₅ CL

输液泵：LC-30AD CL × 2

自动进样器：SIL-30ACMP CL

柱温箱：CTO-30A CL

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm, P/N: 227-30765-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水； B 相 - 乙腈 / 甲醇 (1/1) 含 0.1% 甲酸

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：8 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.3	泵	B.Conc	20
3.00	泵	B.Conc	98
4.00	泵	B.Conc	98
4.10	泵	B.Conc	20
6.50	控制器	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)	接口电压: 4.0 kV
雾化气流速: 3 L/min	加热模块温度: 400°C
DL 温度: 250°C	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
接口温度: 300°C	干燥气流速: 10.0 L/min
MRM 参数: 见表 2	加热气流量: 10.0 L/min

表 2 MRM 参数

中文名	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
伏立康唑	350.1	127.1*	-15	-20	-23
		281.1	-15	-16	-30
伏立康唑 -D3	353.1	127.1*	-15	-20	-23
		284.1	-15	-16	-30
利奈唑胺	338.2	296.1*	-20	-17	-29
		194.9	-19	-22	-19
利奈唑胺 -D3	341.2	297.1*	-14	-18	-19
		195.1	-10	-25	-12
万古霉素	725.4	100.1*	-22	-33	-22
		144.2	-22	-16	-15
替考拉宁	940.5	316.3*	-30	-15	-15
		298.3	-30	-24	-21

注: * 表示定量离子对

1.3 标准溶液配制及样品制备

标准曲线的配制: 取伏立康唑、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺标准品储备液, 用空白血清将标准品储备液按照倍比稀释的方式稀释为标准系列工作溶液, 伏立康唑浓度为 0.12、0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$, 万古霉素浓度为 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$, 替考拉宁浓度为 1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$, 利奈唑胺浓度为 0.31、0.62、1.2、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 。

内标工作液配制: 取内标准品储备液, 用乙腈 / 甲醇 (1/1) 混合溶液将内标储备液稀释为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 内标标准品工作溶液。

样品预处理: 取 50 μL 标准样品 / 质控样品 / 待测样本, 加入 150 μL 内标工作液, 涡旋混匀 5 min, 12500 rpm 离心 5 min, 取上清 20 μL 于带内插管的进样小瓶中, 再加入 180 μL 超纯水, 涡旋混匀 1 min, 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

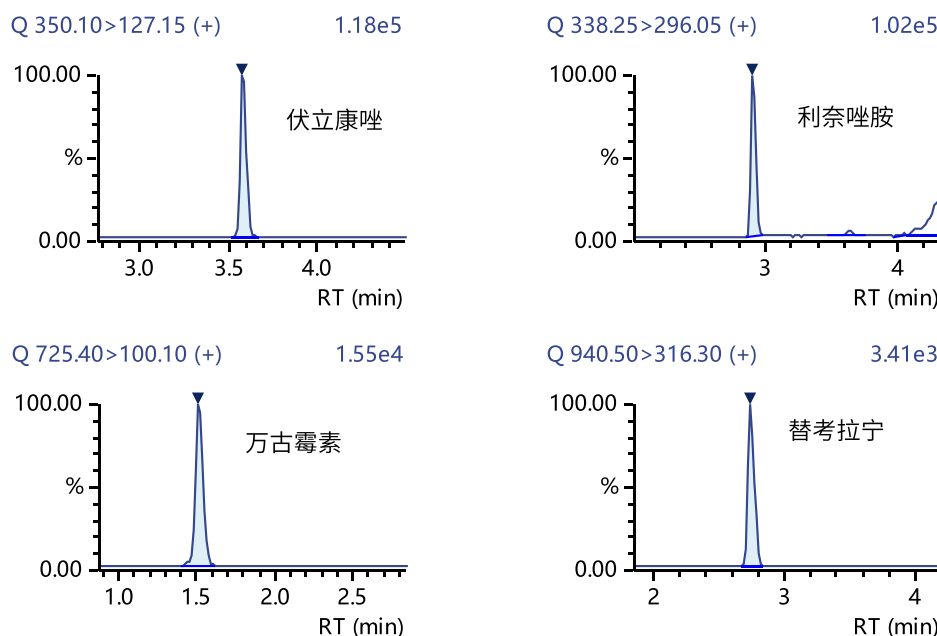


图 1 标准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 线性范围

按照 1.3 配制标准系列工作溶液，处理后直接上机分析，以内标法绘制标准曲线，伏立康唑和利奈唑胺选用对应的同位素内标，万古霉素和替考拉宁选用伏立康唑 -D3 做内标，曲线结果如下表 3 所示，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数在 0.997 以上，准确度在 91.5%-108.4% 之间。

表 3 标准曲线结果

化合物	线性方程	线性范围 (µg/mL)	相关系数	准确度 (%)
伏立康唑	$Y = (2.23733)X + (-0.0497001)$	0.12-8.0	0.998	93.5-105.5
利奈唑胺	$Y = (2.61619)X + (-0.113356)$	0.31-20.0	0.998	95.8-108.4
万古霉素	$Y = (0.0624974)X + (-0.00560687)$	0.78-50.0	0.999	96.6-102.3
替考拉宁	$Y = (0.0100656)X + (-0.00670450)$	1.56-100.0	0.997	91.5-106.7

2.3 重复性考察

取线性最低点按照 1.3 中的处理方法，处理后连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 0.18% 和 5.04%，仪器精密度良好。

表 4 重复性测试 (n=6)

化合物	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
伏立康唑	0.08	2.58
利奈唑胺	0.08	1.93
万古霉素	0.18	3.95
替考拉宁	0.14	5.04

2.4 加标回收实验

人血清样品中添加低、中、高三个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 5 所示，三个不同浓度加标回收率在 94.0~108.2% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.50~3.94% 之间，方法准确可靠。

表 5 加标回收实验结果 (n=3)

化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 %	重复性 RSD%	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 %	重复性 RSD%	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 %	重复性 RSD%
伏立康唑	0.25	102.6	1.01	1.6	106.7	0.93	4.0	106.0	0.26
利奈唑胺	0.62	97.0	2.52	4.0	103.6	2.18	10.0	105.8	3.94
万古霉素	1.6	101.6	2.83	10.0	105.9	1.96	25.0	108.2	0.25
替考拉宁	3.0	94.0	3.23	18.0	99.1	0.53	50.0	101.3	0.50

■ 结论

本实验建立了一种使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A CL 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用同时测定人血清中伏立康唑、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺的方法。采用内标法定量，灵敏度高、分析速度快，前处理仅需一步简单的蛋白沉淀，操作简单；人血清样品中三个不同浓度加标回收率在 94.0~108.2% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.50~3.94% 之间，可满足临床日常检验需求，供相关从业人员参考。

岛津应用云

