

# LCMS-8050 测定血浆中利福平浓度

## LCMSMS-496

**摘要：**本文建立了一种使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪测定血浆中利福平的方法。实验采用该系统在 6.0 min 内完成利福平的检测，采用同位素内标法定量，定量下限 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，线性范围为 0.1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，相关系数 0.9997。定量下限与低、中、高三水平质控浓度的批内、批间精密度 RSD 均小于 10.26%，各浓度水平质控样品的准确度均符合生物样本分析要求，提取回收率、基质效应等结果均符合生物样品分析要求。该方法具有分析速度快、专属性强、灵敏度高的特点，可用于人体内利福平血药浓度的测定。

**关键词：**三重四极杆液质联用仪 血浆 利福平

利福平是抗结核治疗的一线用药，在临床上应用较长时间，但是其个体差异大，尤其是对于一些特殊的用药群体例如儿童，合适的用药剂量仍然存在问题，用量过大容易导致肝损伤等系列不良反应，剂量不足又容易诱发耐药。

本文采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，建立了血浆中利福平的检测方法，该方法分析速度快、选择性强、灵敏度高，可供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A<sub>5R</sub>

输液泵：LC-30AD × 2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

质谱仪：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18(100 mm L.×2.1 mm I.D.,2.0  $\mu\text{m}$ ，  
岛津（上海）实验器材有限公司，PN：227-30001-04))

流动相：A 相 -5 mM 甲酸铵溶液，B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：2  $\mu\text{L}$

柱温：40°C

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 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.51	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8050

离子源：ESI (+)

接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°C

扫描模式：MRM

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
利福平	823.40	399.20	-30.0	-26.0	-26.0
利福平 -D3	826.40	402.20	-30.0	-26.0	-26.0

### 1.3 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份利福平适量，用甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 利福平储备液。取其中一份储备液用甲醇逐级稀释成浓度为 500、250、100、50、25、10、5  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作曲线；另一份储备液用甲醇分别稀释成浓度为 375、50、7.5  $\mu\text{g/mL}$  的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20  $\mu\text{L}$  加入 980  $\mu\text{L}$  人空白血浆中，依次配制成标准曲线 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10  $\mu\text{g/mL}$ ；分别取三个不同浓度质控溶液 20  $\mu\text{L}$  加入 980  $\mu\text{L}$  人空白血浆中，依次配制成 0.15、1、7.5  $\mu\text{g/mL}$  质控样品。

精密称取利福平 -D3 适量，用甲醇溶解配制成 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的利福平 -D3 储备液用甲醇稀释为 1.0  $\mu\text{g/mL}$  内标溶液，待用。

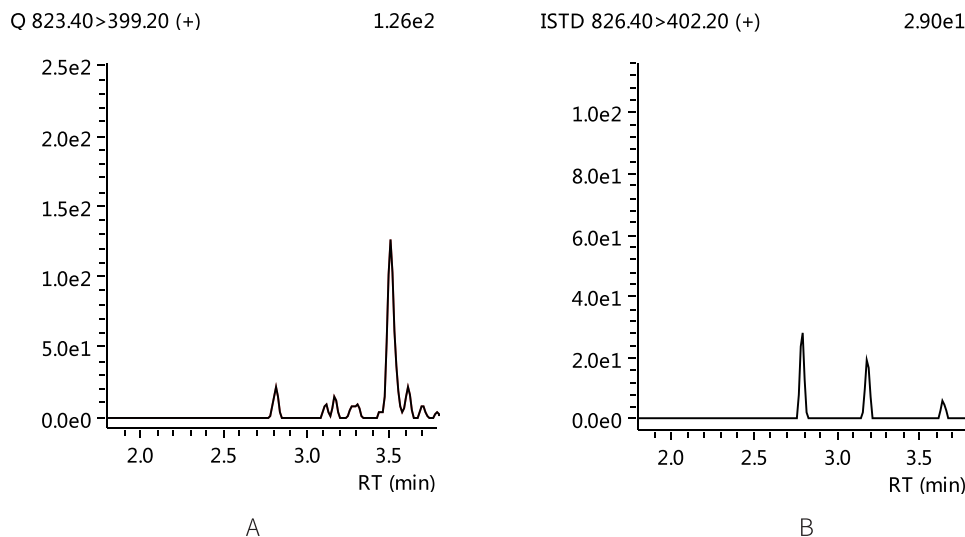
### 1.4 血浆样品前处理方法

取 10  $\mu\text{L}$  血浆样品，加入 90  $\mu\text{L}$  水，加入 10  $\mu\text{L}$  内标溶液，加入 390  $\mu\text{L}$  乙腈，涡旋振荡 1 分钟，12000 转 / 分钟离心 5 分钟，取 100  $\mu\text{L}$  上清液，加 900  $\mu\text{L}$  水，涡旋混匀后进样分析，进样体积 2  $\mu\text{L}$ 。

## ■ 结果与结论

### 2.1 方法选择性

取空白血浆，制备空白血浆样品 (double blank)、只添加内标的空白样品 (blank)、0.1  $\mu\text{g/mL}$  血浆基质加标样品，按照 1.4 方法处理并测定，MRM 色谱图见图 1。结果表明，空白血浆中的内源物质无干扰，同时同位素内标对目标化合物的通道没有影响，方法具有较强的选择性。



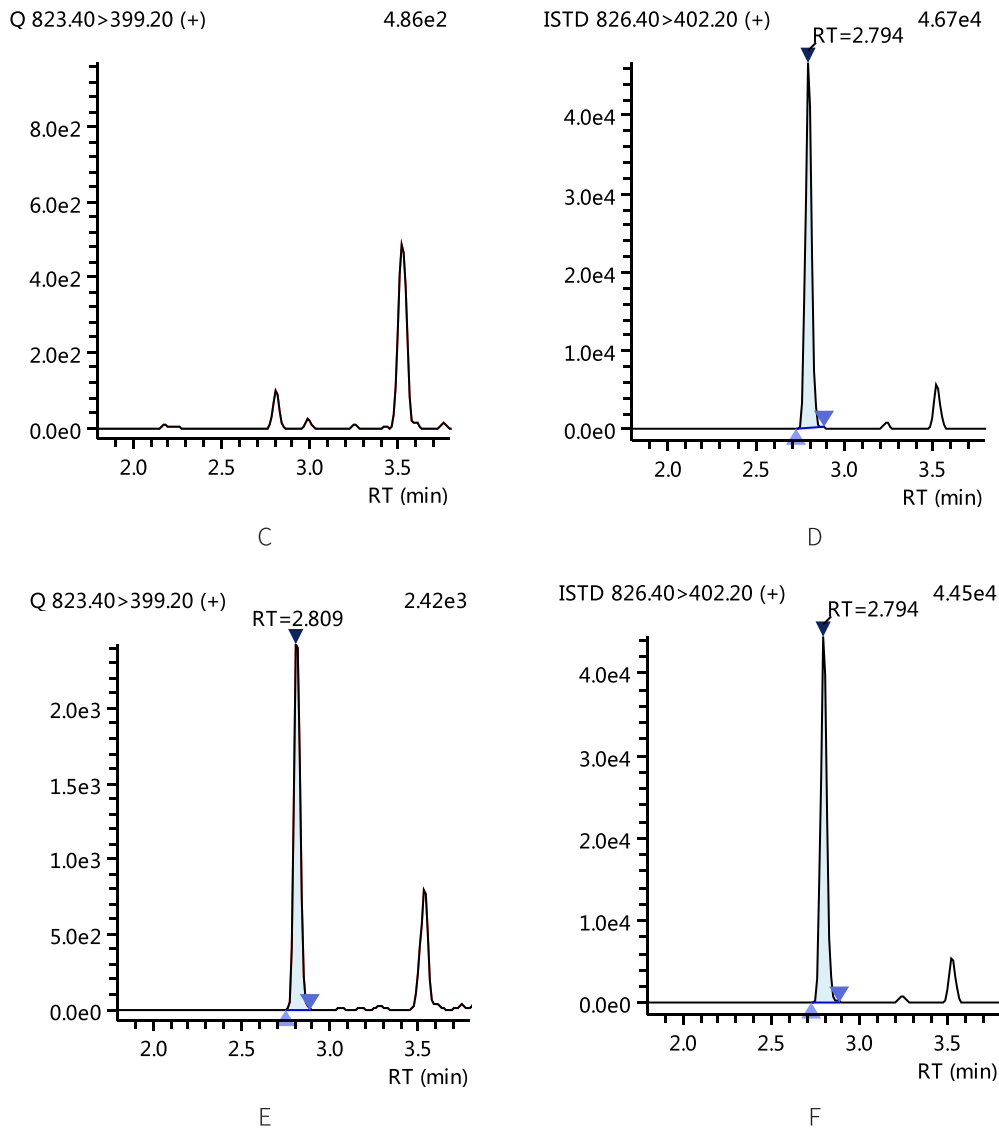


图 1. 利福平与利福平 -D3 色谱图 (A、B: double blank 样品; C、D: blank 样品; E、F: 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  血浆基质加标样品)

## 2.2 线性范围

按照 1.3 中的条件制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的血浆加标样品，按 1.4 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，同位素内标法进行定量。所得校准曲线如图 2 所示，线性方程及相关系数见表 3，其中  $y$  值代表利福平峰面积与利福平 -D3 峰面积的比值， $x$  值代表血浆中利福平浓度。结果表明该方法利福平在 0.1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内线性关系良好，方法定量下限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

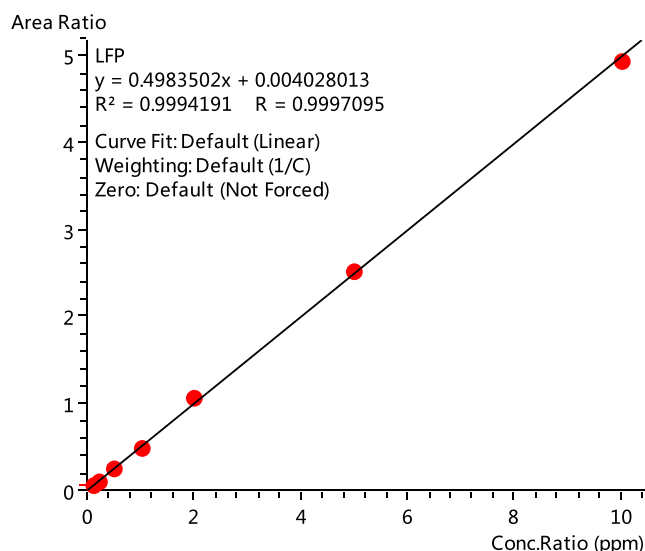


图 2. 利福平校准曲线

表 3 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

编号	名称	线性方程	相关系数	准确度 (%)
利福平		$Y = (0.498350)X + (0.00402801)$	0.10~10.00	97.3~105.8
				0.9997

### 2.3 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.15、1.00、7.50  $\mu\text{g/mL}$  质控样品以及定量下限 0.10  $\mu\text{g/mL}$  样品, 按照 1.4 方法制备, 每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析, 连续测定 3 天, 每日随行标准曲线, 用测得的质控样品中利福平浓度计算批内及批间精密度, 结果见表 4。结果显示, 各浓度水平精密度、准确度均符合生物样本分析要求。

表 4 方法批内批间精密度和准确度结果

理论浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	批内精密度 RSD%	批间精密度 RSD%	准确度 %
0.10	7.86	10.26	84.5~116.9
0.15	8.43	9.46	83.8~112.6
1.00	2.90	4.49	95.9~113.2
7.50	1.17	4.44	89.0~104.1

### 2.4 方法回收率考察

考察三个浓度质控样品 (每个浓度重复 6 次) 的回收率, 结果如表 5 所示, 各浓度水平利福平的回收率均大于 85%。

表 5 方法回收率结果

浓度水平	理论浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均回收率 %
LQC	0.15	91.2
MQC	1.00	89.9
HQC	7.50	87.9

## 2.5 基质效应考察

基质效应考察三个浓度水平质控样品（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 6，各浓度水平基质效应因子及内标归一化基质效应因子均在 85%~115% 之间。

表 6 基质效应考察结果

浓度水平	理论浓度 (µg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	0.15	101.1%	98.3%
MQC	1.00	95.9%	93.2%
HQC	7.50	96.2%	93.5%
内标基质效应因子		102.9%	

## ■ 结论

本文使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了血浆中利福平的测定方法。该方法在 6.0 min 内快速完成利福平的检测，采用同位素内标法定量，定量下限 0.1 µg/mL，线性范围为 0.1~10 µg/mL，相关系数为 0.9997。定量下限与低中高三水平质控浓度的批内、批间精密度及准确度均满足检测需求，回收率及基质效应等结果均符合生物样品分析要求。该方法快速简单、选择性强、灵敏度高，可用于血浆中利福平的定量分析。

岛津应用云

