

LCMS-8050 测定人血清中 6 种抗病毒药物

LCMSMS-450

摘要：使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立了人血清中洛匹那韦、利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔及奥司他韦 6 种抗病毒药物同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样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范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足日常检验需求。该方法可以为血清中抗病毒药物的检测提供很好的借鉴和参考。

关键词：LCMS-8050 抗病毒药物 血清 新型冠状病毒肺炎

新型冠状病毒肺炎爆发后，国家卫健委发布 1 号公告，将新型冠状病毒感染的肺炎纳入传染病防治法规定的乙类传染病，但采取甲类传染病的预防、控制措施，同时将其纳入检疫传染病管理。国家卫生健康委员会及国家中医药管理局先后发布更新了七个版本《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》。第六版及第七版诊疗方案均提出，使用洛匹那韦 / 利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔等抗病毒药物治疗新型冠状病毒肺炎。诊疗方案同时提出，要注意上述药物的不良反应及禁忌症（如患有心脏疾病者禁用氯喹）以及其他药物的相互作用问题，在临床应用中进一步评价目前

所试用药物的疗效。同时，由中国药师协会治疗药物监测药师分会及众多权威组织编撰《新型冠状病毒肺炎及常见合并症药物治疗与药学监护指引》，该指引明确指出加强对上述抗病毒药物进行药学监护。

本文使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8050，建立了人血清中洛匹那韦、利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔及奥司他韦 6 种抗病毒药物含量测定方法（6 种抗病毒药物结构信息见图 1），该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，线性范围宽，专属性强，供相关人员参考。

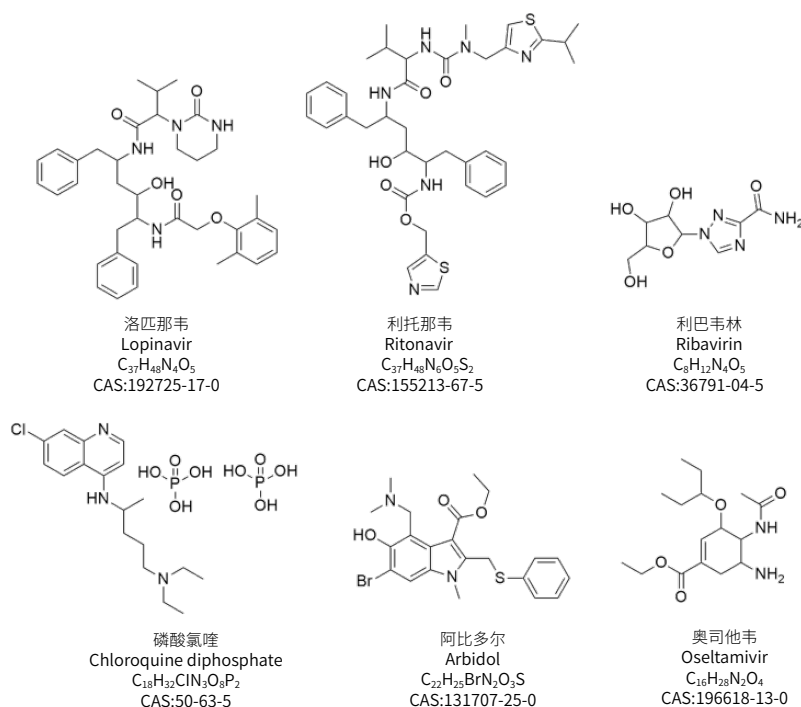


图 1 6 种抗病毒药结构信息

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8050。具体配置为 LC-30AD×2（输液泵），DGU-20A_{5R}（在线脱气机），SIL-30AC_{MP}（自动进样器），CTO-30A（柱温箱），CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：InertSustainBio C18 HP（100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm）

流动相：流动相 A-0.05% 甲酸水溶液（含 5mM 乙酸铵）；流动相 B- 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：0.5 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
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.60	Pumps	Pump B Conc.	30
3.50	Pumps	Pump B Conc.	30
4.50	Pumps	Pump B Conc.	95
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
5.60	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件：

分析仪器：LCMS-8050

加热模块温度：400°C

离子源：ESI (+)

DL 温度：250°C

雾化气流速：3.0 L/min

离子源温度：300°C

加热气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias (V)	CE(V)	Q3Pre Bias (V)
洛匹那韦	Lopinavir	629.4	155.2*	-24	-12	-30
		629.4	447.4	-24	-30	-22
利托那韦	Ritonavir	721.4	296.15*	-22	-10	-14
		721.4	268.15	-22	-12	-18

利巴韦林	Ribavirin	245.2	113.2*	-13	-10	-23
		245.2	96.2	-21	-30	-19
磷酸氯喹	Chloroquine diphosphate	320.3	247.15*	-17	-35	-25
		320.3	142.2	-13	-30	-14
阿比多尔	Arbidol	477.1	432.0*	-19	-30	-30
		477.1	279.0	-19	-25	-29
洛匹那韦 -D ₈	Lopinavir-D8	637.4	163.25	-26	-46	-30
利托那韦 - ¹³ C, ₃ D ₃	Ritonavir- ¹³ C, ₃ D ₃	725.3	300.1	-28	-19	-20

注：* 为定量离子对

1.3 标准品及样品制备

标准工作曲线配制：取 6 种抗病毒药母液，用乙腈逐步稀释成系列浓度的标准工作液，取 90 μL 空白血清，加入 10 μL 标准工作液，混匀，配制成标准工作曲线，具体浓度见表 3。内标母液使用乙腈稀释成含 2000 ng/mL 洛匹那韦 -D₈ 及 800 ng/mL 利托那韦 -¹³C,₃D₃ 混合内标工作液。

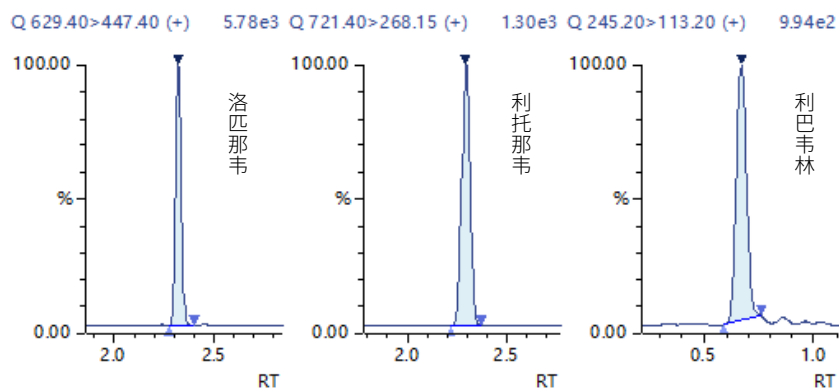
表 3 标准曲线浓度信息 (ng/mL)

名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
洛匹那韦	20	100	200	500	2000	5000	20000
利托那韦	5	25	50	125	500	1250	5000
利巴韦林	10	50	100	250	1000	2500	10000
磷酸氯喹	10	50	100	250	1000	2500	10000
阿比多尔	5	25	50	125	500	1250	5000
奥司他韦	2	10	20	50	200	500	2000

标准品及血清样品前处理方法：取 100 μL 标准工作曲线或血清样本，加入 10 μL 内标工作液及 290 μL 乙腈，涡旋均匀，13000 rpm 离心 5 min，取 300 μL 上清液，进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图



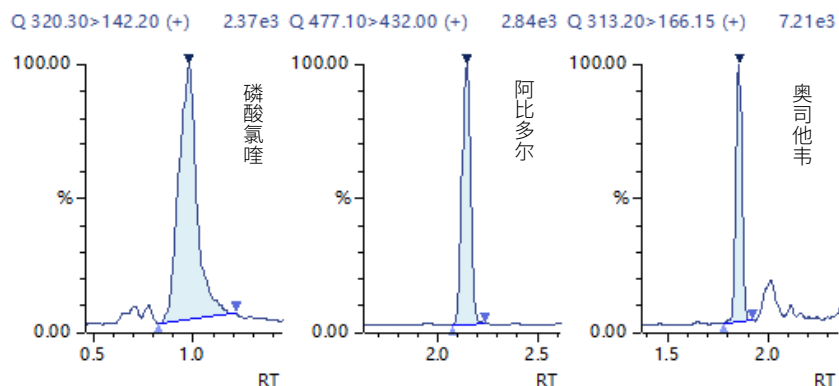


图 2 标准曲线最低点谱图

2.2 线性关系

采用内标法建立洛匹那韦、利托那韦 2 种抗病毒药物标准曲线，采用外标法建立利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔、奥司他韦 4 种抗病毒药物标准曲线，结果如表 4 所示。结果显示，6 种抗病毒类药物在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.994 以上，准确度均在 85%~115% 之间。

表 4 标准曲线结果

目标物	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
洛匹那韦	$Y = (0.0129538)X + (-0.00141657)$	20~20000	0.9977	90.1~109.8
利托那韦	$Y = (0.000372660)X + (-5.46889e-005)$	5~5000	0.9977	90.0~110.3
利巴韦林	$Y = (243.414)X + (639.173)$	10~10000	0.9973	91.1~110.1
磷酸氯喹	$Y = (1573.42)X + (-145.614)$	10~10000	0.9964	92.4~113.3
阿比多尔	$Y = (1758.43)X + (-651.971)$	5~5000	0.9954	91.1~111.1
奥司他韦	$Y = (5082.96)X + (5033.83)$	2~2000	0.9948	92.8~112.6

2.3 质控样本准确度考察

按 1.3 中的前处理方法对空白血清添加低中高浓度质控品，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结果与理论值接近，满足日常测定需求。

表 5 质控准确度考察结果

目标物	LQC 理论值 (ng/mL)	LQC 回收率 (%)	MQC 理论值 (ng/mL)	MQC 回收率 (%)	HQC 理论值 (ng/mL)	HQC 回收率 (%)
洛匹那韦	50	106.3	1000	103.1	10000	109.8
利托那韦	12.5	105.4	250	97.2	2500	110.3
利巴韦林	25	93.6	500	99.9	5000	107.7
磷酸氯喹	25	86.1	500	99.7	5000	114.6
阿比多尔	12.5	85.2	250	100.8	2500	113.0
奥司他韦	5.0	112.2	100	95.5	1000	99.0

2.4 精密度考察

按 1.3 的前处理方法和 1.2 中的分析条件对低浓度质控品连续 6 针分析，重复性结果显示，峰面积精密度 RSD 分别为 1.8%、1.9%、2.4%、2.2%、1.7% 及 1.9%，表明仪器稳定性良好。

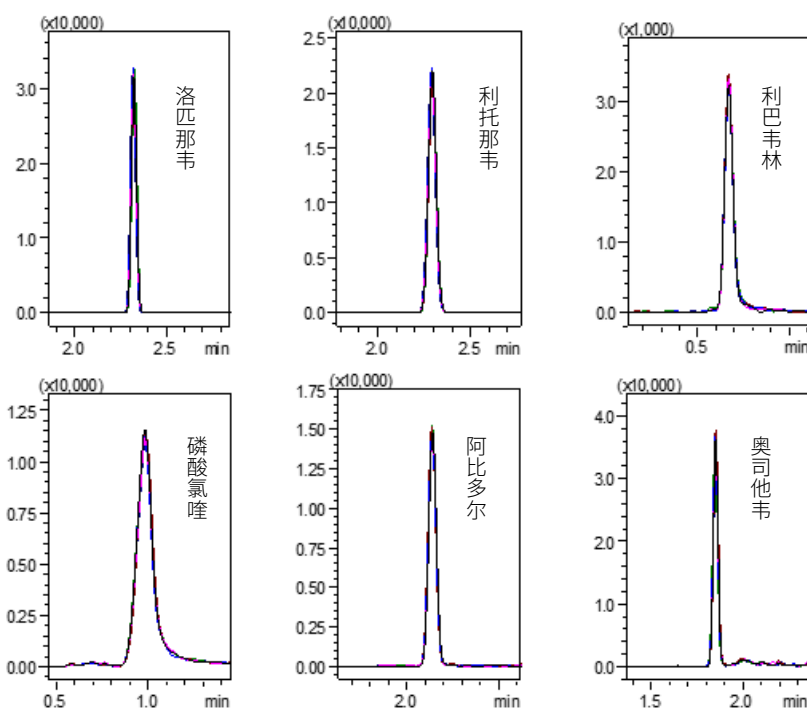


图3 低浓度质控连续6针分析稳定性谱图

■ 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立了人血清中洛匹那韦、利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔及奥司他韦 6 种抗病毒药物同时测定的方法。使用同位素内标、标准样品及加标样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范围宽，标准曲线相关系数均大于 0.994，方法准确度及精密度均可满足日常检验需求。该方法可以为血清中抗病毒药物的检测提供很好的借鉴和参考。

岛津应用云

