

# LCMS-8050CL 用于人血清中 11 种抗真菌药及代谢物的同时分析

LCMSMS-379

**摘要：** 本文利用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱 (LCMS-8050CL) 对血清中 11 种抗真菌药及代谢物进行定性定量分析。血清样品使用试剂盒提供的试剂除蛋白后，离心，移取上清液，进样分析。采用电喷雾离子源，正、负离子模式，MRM 模式采集数据，内标法定量。结果显示，在各自的线性范围内，氟胞嘧啶等 11 种抗真菌药及代谢物的线性良好，线性相关系数 >0.995。低、高两个浓度的质控样品定值结果与标示浓度的偏倚位于 75%~125% 之间，同时，进行了重复性实验，保留时间的 RSD ≤ 0.39%，浓度的 RSD ≤ 7.96%。该方法可用于临床样本的快速、准确定量。

**关键词：** 液相色谱 - 三重四极杆质谱 医用质谱仪 治疗药物监测 (TDM) 抗真菌药

近年来，真菌感染的发生概率大幅上升，其主要原因是接受器官移植、免疫抑制疗法以及患艾滋病人增加导致的。抗真菌药物有了很大的进展，但是真菌感染的发病率与死亡率仍然很高，临床上抗真菌药物的选择与疗法由医生决定。抗真菌药物的血清浓度监测被证明对于治疗真菌感染的给药方案优化甚至预防真菌感染都是最有效的方法之一。常用的抗真菌药物主要分为多烯类、吡咯类、棘白菌素类以及氟胞嘧啶等。吡咯类的药物，如伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑以及代谢物羟基伊曲康唑，由于其广谱抗菌性，广泛用于真菌治疗的感染。吡咯类抗菌药主要通过抑制一种或多种 CYP 酶活性来治疗真菌性感染。棘白菌素类抗菌药毒副作用较小，例如

阿尼芬净、米卡芬净，临床上主要与其他类抗真菌药联合使用。由于药代动力学特征、副作用、药物相互作用和药物基因组学显著差异，抗真菌药在治疗过程中血药浓度个体差异很大。例如 5- 氟胞嘧啶 35-70 mg/L 是正常范围，而两性霉素 B 的治疗浓度位于 0.2-3.0 mg/L。这给治疗药物监测带来了挑战。

目前已有一些文献建立了同时分析血清中四种抗真菌药物的 LC-MS 分析方法，主要包括氟康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、伏立康唑等三唑类抗真菌药。本文使用试剂盒方法，建立了血清中 11 种抗真菌药的 LCMS 分析方法，前处理方法简便，分析通量高，适用于临床样品的快速、准确分析。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津医用质谱仪：超高效液相色谱仪 LC-30A CL 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 CL 联用系统。LC-30A CL 系统包括 LC-30AD CL × 2 (输液泵)，DGU-20A<sub>5</sub>CL (在线脱气机)，SIL-30ACMPCL (自动进样器)，CTO-30A CL (柱温箱)，CBM-20A CL 系统控制器，LCMS-8050 CL 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件：

流动相：A 相 - 0.1% 乙酸 + 5 mM 乙酸铵水溶液；

B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

色谱柱：Shim-packGIST 2.1 mm I.D.

× 50 mm L., 2.0 μm

柱温：40°C

进样体积：1 μL (Co-injection, 纯水 = 10 μL)

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

表1 梯度洗脱条件

时间	单元	处理命令	值
0.30	泵	B.Conc	5
0.40	泵	B.Conc	40
1.50	泵	B.Conc	95
2.00	泵	B.Conc	95
2.10	泵	B.Conc	5
3.50	控制器	Stop	

## 质谱条件:

 离子源: ESI+ (-)  
 接口电压: 4.5 kV(-3.0 kV)  
 雾化气: 3.0 L/min  
 加热气流量: 10.0 L/min  
 干燥气流量: 10.0 L/min

 接口温度: 300°C  
 DL 管温度: 250°C  
 加热块温度: 400°C  
 扫描模式: MRM 模式, 见表 2

表2 MRM参数

化合物	英文名	类型	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	内标组
氟胞嘧啶	5-Fluorocytosine	目标	130.0	58.0*	-10	-37	-22	1
			130.0	112.9	-10	-23	-19	
两性霉素B	Amphotericin B	目标	924.4	743.5	-28	-21	-20	2
			924.4	906.6*	-28	-13	-32	
阿尼芬净	Anidulafungin	目标	1140.4	1122.5*	-34	-17	-42	7
			1140.4	1104.6	-38	-23	-38	
氟康唑	Fluconazole	目标	306.9	238.1*	-22	-24	-12	2
			306.9	220.0	-22	-12	-12	
羟基伊曲康唑	Hydroxy-Itraconazole	目标	721.1	408.2*	-28	-39	-27	3
			721.1	392.2	-22	-36	-26	
艾莎康唑	Isavuconazole	目标	438.2	224.0*	-21	-8	-13	4
			438.2	369.0	-21	-12	-15	
伊曲康唑	Itraconazole	目标	705.1	392.2*	-22	-38	-26	5
			705.1	432.2	-22	-34	-29	
酮康唑	Ketoconazole	目标	531.2	489.3*	-10	-25	-13	6
			531.2	244.2	-13	-30	-10	
泊沙康唑	Posaconazole	目标	701.2	614.3*	-22	-36	-28	7
			701.2	344.2	-22	-47	-22	
伏立康唑	Voriconazole	目标	350.2	281.2*	-29	-8	-11	8
			350.2	127.2	-29	-12	-11	
<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -氟胞嘧啶	<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -5-Fluorocytosine	内标	133.1	115.0	-10	-23	-19	1
d4-氟康唑	d4-Fluconazole	内标	310.9	242.1	-22	-24	-12	2
d5-羟基伊曲康唑	d5-Hydroxy-Itraconazole	内标	726.2	413.2	-28	-39	-27	3
<sup>13</sup> C,d4-艾莎康唑	<sup>13</sup> C,d4-Isavuconazole	内标	443.0	224.0	-21	-8	-13	4
d5-伊曲康唑	d5-Itraconazole	内标	710.2	397.2	-22	-38	-26	5
d8-酮康唑	d8-Ketoconazole	内标	539.3	497.3	-10	-25	-13	6
d4-泊沙康唑	d4-Posaconazole	内标	705.3	618.3	-22	-36	-28	7
d3-伏立康唑	d3-Voriconazole	内标	353.2	284.2	-29	-8	-11	8
米卡芬净**	Micafungin	目标	1268.8	300.3*	30	70	21	8
			1268.8	469.4	30	56	16	

\*定量离子对

\*\*米卡芬净为ESI-, 其余化合物均为ESI+

### 1.3 基质标准品、质控品及样品制备

参考德国 RECIPE 《血清 / 血浆中抗真菌药试剂盒使用指南》，进行样品制备。

该试剂盒包含以下部分：

基质标准品：3 个水平的人血清基质加标冻干粉

质控品：2 个水平的人血清基质加标冻干粉

内标：含  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}_2$  氟胞嘧啶、d4- 氟康唑等 8 种同位素标记的内标的冻干粉

优化用混标：冻干粉

蛋白沉淀剂：50 mL

样品释放剂：50 mL

基质标准品 (Level 0~Level 3) 和质控品 (Level I、Level II)：1.0 mL 纯水溶解，涡旋混匀 15 min。在 15-30°C 下，保质期 1d (阿尼芬净、米卡芬净 3h)；在 2-8°C 下保质期 7d (阿尼芬净、米卡芬净 2d)；在 -18°C 以下保质期 1 月 (阿尼芬净、米卡芬净 7d)；

内标工作液：准确加入 5.0 mL 蛋白沉淀剂，混匀，超声 15 min。在 15-30°C 下，保质期 1 d (阿尼芬净、米卡芬净 3 h)；在 2-8°C 下保质期 8 d (阿尼芬净、米卡芬净 2 d)；在 -18°C 下保质期 28 d (阿尼芬净、米卡芬净 7 d)；

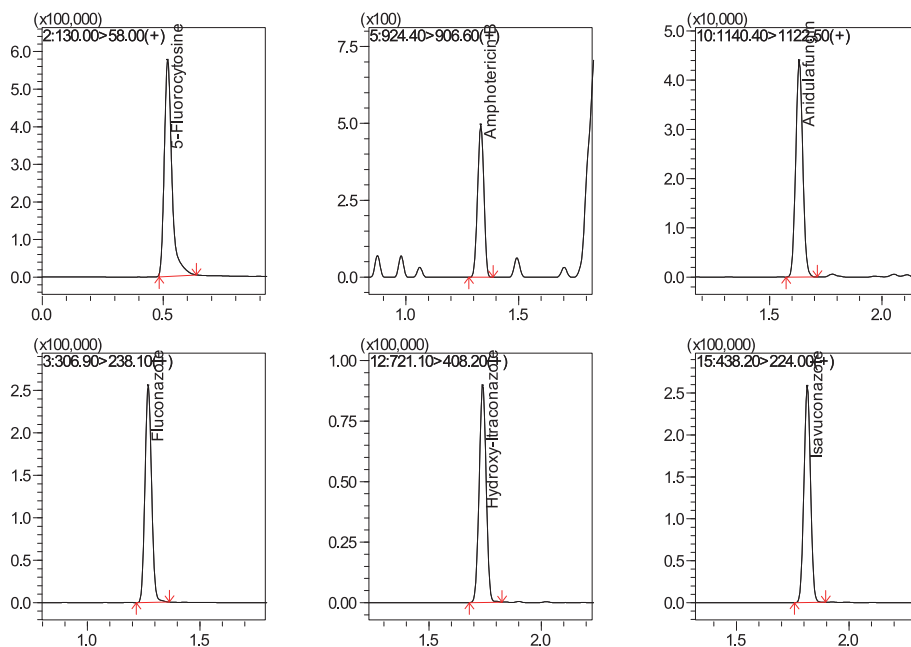
优化用混标：加入 2.0 mL 流动相 B，混匀。在 15-30°C 下，保质期 1 d (阿尼芬净、米卡芬净 3h)；在 2-8°C 下保质期 8d (阿尼芬净、米卡芬净 2 d)；在 -18°C 下保质期 28d (阿尼芬净、米卡芬净 7d)；

基质标准品、质控品和样品前处理方法：

分别精密吸取 50  $\mu\text{L}$  标准品、质控品或血清样品溶液于 2 mL 离心管中，然后加入 100  $\mu\text{L}$  内标工作液，涡旋 30 s；10000 $\times$ g 离心 5 min，取上清液，过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜上机，转移至带内插管的 1.5 mL 进样瓶，LCMS 分析。

## 结果与讨论

### 2.1 基质标准品色谱图



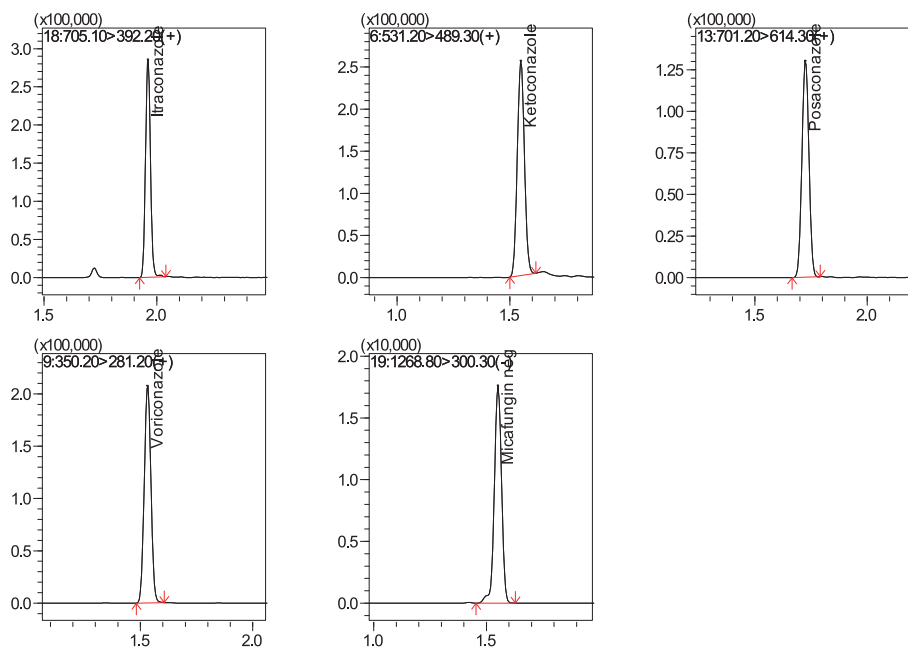


图1 基质标Level 1浓度色谱图

## 2.2 线性范围

试剂盒中各级别基质标品浓度和线性回归各浓度的准确度如表 3 所示，按 1.3 中的分析条件进行分析检测，利用内标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数见图 2。

表3 11种抗真菌药的校准曲线及定量限

化合物	基质标曲浓度 (µg/mL)			准确度 (%)
	Level1	Level 2	Level 3	
5-Fluorocytosine	5.12	39.7	117	99.0-100.8
Amphotericin B	0.084	1.72	5.23	90.8-109.5
Anidulafungin	0.461	3.17	8.98	87.9-109.3
Fluconazole	0.564	4.14	12.6	95.6-102.7
Hydroxy-Itraconazole	0.164	1.19	3.6	98.3-101.7
Isavuconazole	0.482	3.49	10.6	96.8-106.0
Itraconazole	0.133	0.955	2.94	98.6-102.5
Ketoconazole	0.406	2.89	8.34	98.1-102.9
Posaconazole	0.232	1.68	5.01	97.6-103.5
Voriconazole	0.265	1.93	5.9	96.2-106.2
Micalungin	2.12	14.9	46.3	96.2-104.7

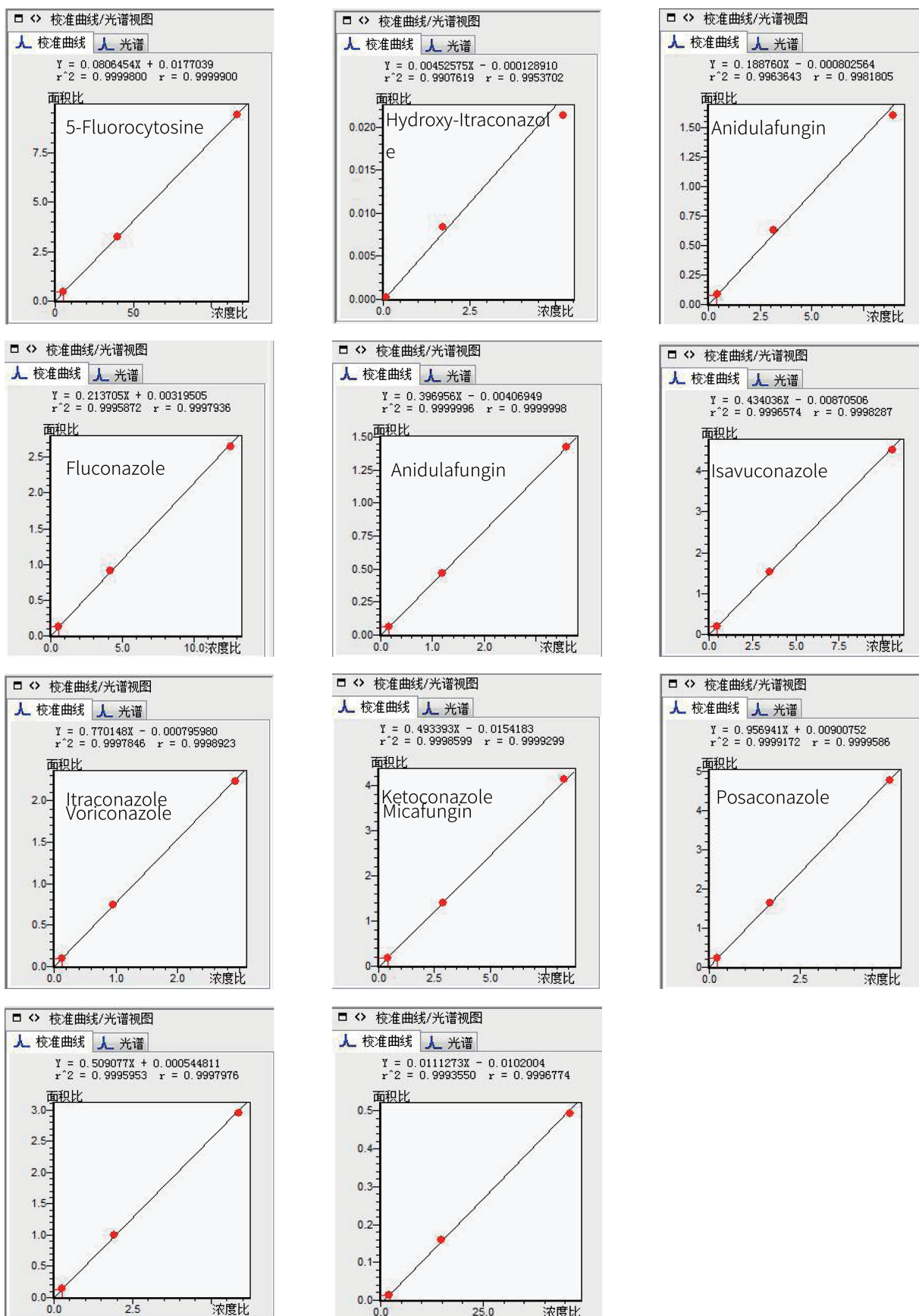


图2 11种抗真菌药的线性方程及相关系数

### 2.3 质控样品考察

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对试剂盒中的质控品 Level I 和 Level II 进行分析, 标示浓度和允许波动范围如表 4 所示, 实际检测浓度在允许波动范围内。

表4 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (µg/mL)		允许波动范围 (µg/mL)		实测浓度 (µg/mL)	
	Level I	Level II	Level I	Level II	Level I	Level II
5-Fluorocytosine	21.7	50.9	17.4-26.1	40.7-61.1	21.11	48.76
Amphotericin B	0.864	2.59	0.648-1.08	1.95-3.24	0.66	2.44
Anidulafungin	1.82	4.11	1.45-2.18	3.29-4.93	1.59	3.38
Fluconazole	2.29	5.4	1.83-2.75	4.32-6.48	2.33	5.45
Hydroxy-Itraconazole	0.654	1.56	0.523-0.785	1.25-1.87	0.67	1.51
Isavuconazole	1.92	4.55	1.54-2.31	3.64-5.46	1.91	4.57
Itraconazole	0.528	1.26	0.422-0.633	1.01-1.51	0.55	1.25
Ketoconazole	1.63	3.68	1.3-1.96	2.94-4.41	1.58	3.63
Posaconazole	0.91	2.18	0.728-1.09	1.74-2.61	0.96	2.19
Voriconazole	1.07	2.53	0.854-1.28	2.03-3.04	1.08	2.46
Micafungin	8.25	19.1	6.19-10.3	14.3-23.9	6.97	17.70

### 2.4 重复性考察

质控品 Level I 和 Level II 连续进样分析 6 次, 计算保留时间及浓度的相对标准偏差 (RSD)。结果如表 5 所示, 11 种抗真菌药物保留时间及浓度 RSD 均处于合理范围。

表5 重复性考察结果

化合物	保留时间RSD (%)		浓度RSD (%)	
	Level I	Level II	Level I	Level II
5-Fluorocytosine	0.09	0.16	0.81	0.87
Amphotericin B	0.39	0.30	7.36	7.22
Anidulafungin	0.23	0.26	7.96	2.09
Fluconazole	0.26	0.32	3.05	1.85
Hydroxy-Itraconazole	0.21	0.24	2.08	1.86
Isavuconazole	0.21	0.23	2.07	1.71
Itraconazole	0.19	0.20	1.30	0.99
Ketoconazole	0.25	0.27	2.47	0.74
Posaconazole	0.22	0.24	3.35	2.10
Voriconazole	0.24	0.27	3.66	5.37
Micafungin	0.23	0.26	2.06	3.80

## 结论

本文使用岛津医用质谱仪 (LCMS-8050CL) 对血清中 11 种抗真菌药及代谢物同时进行定性定量分析。血清样品经过蛋白沉淀后, 进样分析。结果显示, 氟胞嘧啶等 11 种抗真菌药及代谢物的线性良好, 线性相关系数 > 0.995。低、高两个浓度的质控样品定值结果与标示浓度的偏倚位于 75%~125% 之间, 保留时间的 RSD ≤ 0.39%, 浓度的 RSD ≤ 7.96%。该方法可供临床实验室参考。