

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定血浆中替比夫定

LCMSMS-143

摘要： 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中替比夫定的方法。方法采用同位素内标法替比夫定 -D₃ 定量，方法定量限 1.0 ng/mL，线性范围为 1.0~10000 ng/mL，相关系数 0.9999。方法选择性实验表明空白血浆中不存在明显干扰；方法的日内精密度 1.52~2.18%，日间精密度 1.58~2.11%，各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%，能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平替比夫定的回收率均在 100% 左右，基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子在 100% 左右；稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定，3 次冻融循环浓度无显著变化，处理后的样品在自动进样器内(10℃)放置 72 小时替比夫定无显著变化。将方法用于给药后病人血药浓度分析，结果表明相同给药剂量和采样时间不同病人体内血药浓度差异显著，利用本方法能够为临床个性化给药方案的确定提供有力保障。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中替比夫定含量的快速检测，可用于人体替比夫定血药浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词： 超快速液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 替比夫定

替比夫定 (Telbivudine) 即 β-L-2'-胸腺嘧啶脱氧核苷 (LdT) 是一种 L 型核苷，具有高效、选择性以及抑制乙型肝炎病毒复制的特异性抗病毒活性，能够比拉米夫定更有效地抑制乙肝病毒 DNA 复制。研究替比夫定的药代参数对于治疗不同程度的肝损伤乙肝患者就有非常重要的临床指导意义。

目前生物样品中替比夫定血药浓度测定方法的文献

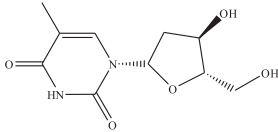
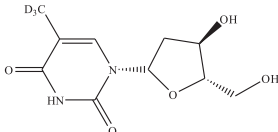
报道较少，主要以液质联用的方法为主，但是缺少能够快速、高灵敏地检测该药物血药浓度的方法。本工作针对以往检测方法检测限低，样品前处理过程复杂、费时等特点，建立了一种快速、灵敏、选择性好、特异性强的 LC-MS/MS 方法，用于定量测定人血浆中替比夫定浓度，以支持该药物的药代动力学特征研究，及相关的临床追踪研究。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
替比夫定	Telbivudine	3424-98-4	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	
替比夫定 -D ₃ (IS)	Telbivudine -D ₃	/	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅ CD ₃	

1.2 仪器

本实验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 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil Sustain C18 Column (3.0 mm I.D.×100 mm L., 3 μm)

流动相: A 相 -0.1 % 甲酸水溶液

B 相 - 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 2 μL

自动进样器温度: 10 °C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5 %, 洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI, 正离子模式分析

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 8.0 L/min

接口温度: 250°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 350°C

干燥气流速: 12.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

MRM 参数: 见表 3

表 3 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
替比夫定	243.10	127.10	-26.0	-10.0	-13.0
替比夫定 -D3	246.10	130.10	-16.0	-9.0	-25.0

1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 替比夫定储备液。一份储备液用纯水逐级稀释成浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的工作曲线；另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 的质控溶液。取 10 μL 标准工作曲线加入 990 μL 空白血浆中，依次配制成标准曲线；取 10 μL 质控溶液加入 990 μL 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 替比夫定 -D3 储备液，用纯水稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$ ，配制成内标工作液。

含酶内标工作液配制：取 40 μL 内标工作液，加到试管中，加入 200 μL 替比夫定水解酶 ($>1 \text{ U}/\mu\text{L}$)，再加入 360 μL 纯水，得到含酶工作液。同时取 40 μL 内标工作液，加到试管中，加入 560 μL 纯水，制得不含酶工作液。

1.5 样品前处理方法

由于替比夫定进入体内会被磷酸化，为测定血浆中的替比夫定，在前处理过程中首先通过磷酸水解酶将去磷酸化后，再进一步对血浆中的替比夫定进行提取。

取 100 μL 血浆样品，加入 40 μL 含酶内标工作液，涡旋振荡 1 分钟，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 1 小时，水解酶在孵育的过程中将血浆中的磷酸化替比夫定完全去磷酸化后，加入 200 μL 乙腈，13000 r/min 离心 5 分钟，取 200 μL 上清液进样分析，进样体积 2 μL 。

1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 $1/x$ 。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (3 ng/mL、400 ng/mL、8000 ng/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度 / 理论浓度 $\times 100\%$ 计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

替比夫定回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

稳定性考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较室温下放置 8 小时 / 3 次冻融循环的质控样品的测定浓度与理论浓度之间的差异，三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异应均在 $\pm 15\%$ 以内，CV% 值均小于 15%。

提取样品的自动进样器稳定性，处理后的分析批在自动进样器中放置 72 小时内再次分析，再次分析的结果应满足整个分析批的接收标准。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

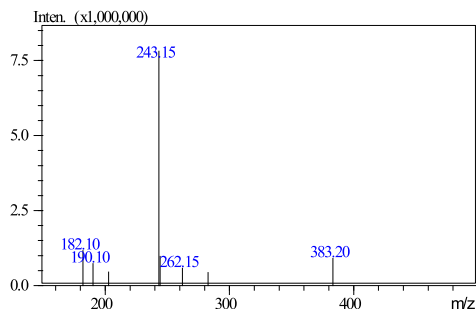


图 1 替比夫定的一级质谱图

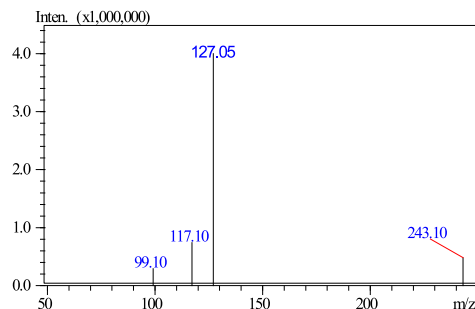


图 2 替比夫定的产物离子扫描图(CE 值-8 V)

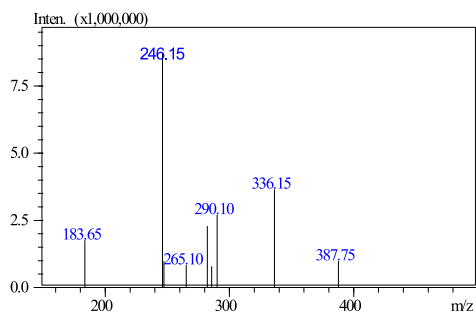


图 3 替比夫定-D₃的一级质谱图

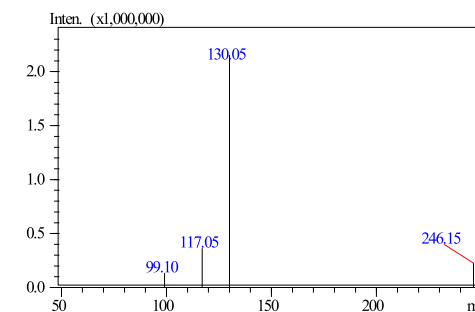


图 4 替比夫定-D₃的产物离子扫描图(CE 值-8 V)

2.2 方法选择性

考察空白基质和 1 ng/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，替比夫定及其同位素内标的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

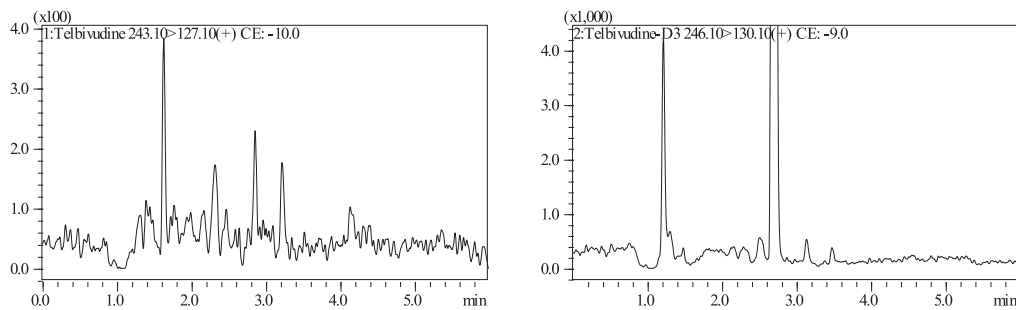


图 5 空白血浆样品的 MRM 色谱图

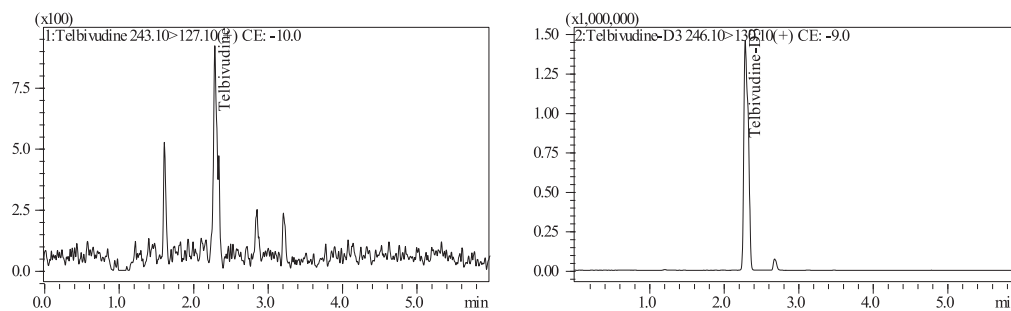


图 6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察同位素内标对替比夫定测定结果的影响，处理过程加入同位素内标的空白样品（QC0 样品）如图 7 所示，与图 6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，替比夫定的检测通道中目标化合物的干扰不对最低定量限造成干扰。结果表明同位素内标不会对替比夫定的准确测定造成影响。

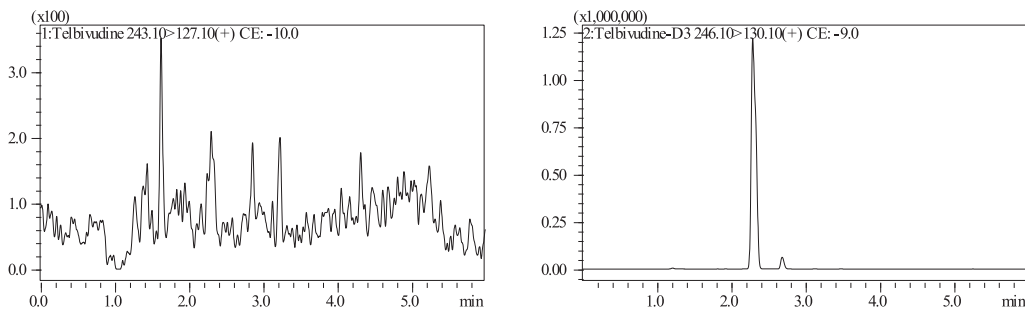


图 7 QC0 的 MRM 色谱图

考察目标化合物对同位素内标响应值的影响，选择 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品在处理过程不加入同位素内标，结果如图 8 所示，重复 6 个样品分析所得到的同位素内标通道的干扰峰面积平均值为 5198，此分析批同位素内标的面积最小值为 4075831，干扰峰面积仅占同位素内标的最小峰面积的 0.1%，替比夫定不会对其同位素内标的响应值造成明显干扰。

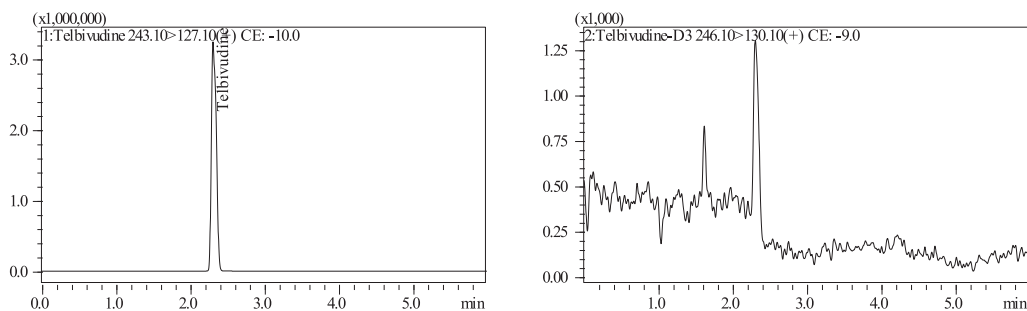


图 8 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品（无内标）的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 1 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL、5000 ng/mL、10000 ng/mL 的血浆加标样品，按 1.5 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 9 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表替比夫定峰面积与替比夫定 -D₃ 峰面积的比值，x 值代表血浆中替比夫定浓度。方法检出限确定为 1 ng/mL，在此浓度水平，精密度和准确度均在接受标准内，6 次重复分析 RSD 为 5.98%，准确度为 98.2~114.8%，S/N 平均值为 22.4。

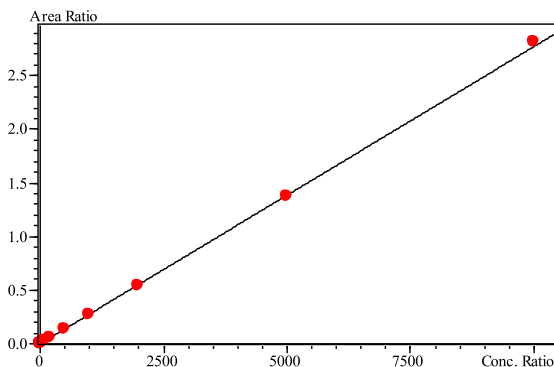


图 9 替比夫定标准曲线

表 4 校准曲线参数（线性回归，权重为 1/C）

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
替比夫定	$Y = (2.77 \times 10^{-4})X + (3.39 \times 10^{-5})$	1~10000	93.1~116.6 %	0.9998

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度，结果如表 5 所示。方法的日内精密度 1.52~2.18 %，日间精密度 1.58~2.11 %，各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4 %。

表 5 方法日间精密度和日内精密度结果(3 天，每天重复 6 次)

理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度 %
3	2.18	2.11	107.7~114.4
400	1.52	1.58	91.6~95.9
8000	1.76	1.68	95.4~101.3

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平替比夫定的回收率分别为 100.6±2.5 %，104.5±1.5 % and 104.3±1.6 %，内标的回收率为 106.7±1.4 %。实验结果表明替比夫定及其内标的回收率一致，并且与浓度无相关性，满足准确定量的要求。

表 6 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (ng/mL)	平均回收率 %
LQC	3	100.6
MQC	400	104.5
HQC	8000	104.3

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (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 7，各浓度水平基质效应因子均大于 80 %，内标归一化基质效应因子均在 100 % 左右。

表 7 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质 效应因子
LQC	3	82.3%	99.0%
MQC	400	81.7%	101.0%
HQC	8000	90.8%	101.5%
内标基质效应因子		83.1%	

2.7 稳定性考察

由于采样过程中样品会放置在室温条件下，因此方法验证过程中考察样品的 8 小时室温稳定性，比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 放置在室温下 8 小时后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 ±5 % 以内，并且 CV % 值均小于 1.5 %。血浆中替比夫定在室温下 8 小时内具有稳定性。

样品采集后保存在 -20°C ，测定前室温放置融化后再混匀进行测定，因此需要对样品的冻融稳定性进行考察。比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）经过 3 次冻融循环后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明测定值与理论值的差异均在 $\pm 5\%$ 以内，并且 CV % 值均小于 2.0 %。说明血浆中替比夫定的浓度在 3 次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

2.8 提取样品在自动进样器内的稳定性

考察提取样品在自动进样器（ 10°C ）中的稳定性，整个分析批完成分析后依然放置在自动进样器中，72 小时内重复分析，实验结果表明 72 小时内重复分析的分析批中标准曲线、质控样品均满足准确定量的要求，由此表明所提取的样品在自动进样器内放置 72 小时内具有稳定性。

2.9 实际样品分析

利用经过验证的血浆中替比夫定的测定方法，对服用替比夫定一定时间后所采集的 64 例病人血浆中药物浓度进行测定，典型色谱图如图 10、11 所示，其中病人 1 血药浓度为 108 ng/mL，病人 2 血药浓度为 4320 ng/mL。结果表明在同一给药剂量的情况下，服药后相同采样时间的情况下，不同病人体内的血药浓度差异非常大，对于临床合理用药提供指导。

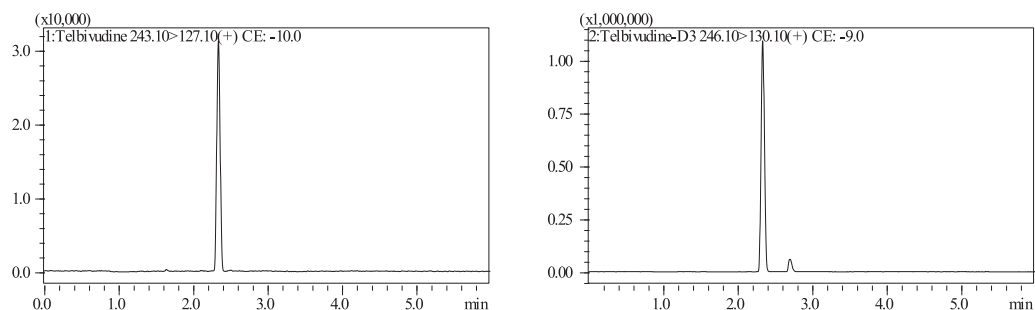


图 10 病人 1 的 MRM 色谱图

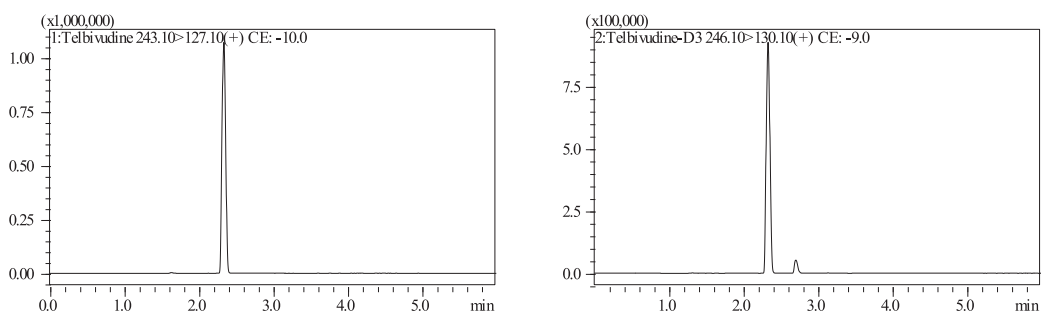


图 11 病人 2 的 MRM 色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 MS-8050 联用测定血浆中替比夫定的方法。该方法在 6 min 内完成血浆中替比夫定的检测,采用同位素内标法定量,方法定量限 1 ng/mL,线性范围为 1~10000 ng/mL,相关系数在 0.9998。选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质,并且替比夫定和其同位素内标之间无相互干扰。方法的日内精密度 1.52~2.18%,日间精密度 1.58~2.11%,各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%,能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求;各浓度水平替比夫定的回收率均在 100% 左右,基质效应因子均大于 80%,内标归一化基质效应因子在 100% 左右;稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定,3 次冻融循环替比夫丁浓度无显著变化,处理后的样品在自动进样器内(10°C)放置 72 小时替比夫定无显著变化。实验样品分析结果表明本方法能够成功用于临床病人样品分析,为指导临床合理用药提供帮助。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点,适合血浆中替比夫定含量的快速准确检测。