

# LC-MS/MS 法痕量分析血浆中雷扎芬净的含量

## LCMSMS-1069

**摘要：**本文基于生物惰性液相结合三重四极杆串联质谱仪，建立了血浆中雷扎芬净的痕量分析方法。经系统优化的样品前处理流程及色谱 - 质谱条件，方法定量下限可达 0.05 ng/mL（信噪比 18.2），回收率大于 89%。方法学验证显示：线性范围覆盖 0.05-100 ng/mL ( $r=0.997$ )；空白血浆无基质干扰；残留量低；低中高浓度质控样本的精密度均满足生物分析标准要求。该方法具有灵敏度高、重现性好、低残留等特点，可为雷扎芬净的临床前药代研究提供可靠支持。

**关键词：**环肽药物 雷扎芬净 串联质谱 临床药代检测

### 技术特点：

- ❖ 使用 LCMS-8060RX 分析血浆中雷扎芬净定量下限可达 0.05 ng/mL；
- ❖ 使用优化后的 SPE 样品前处理方法，雷扎芬净回收率达 89% 以上；
- ❖ 低吸附色谱柱和前端惰性液相的使用，明显降低雷扎芬净残留问题。

雷扎芬净 (Rezafungin) 是一种由 6 个氨基酸组成的新型环肽类抗真菌药物，主要通过抑制  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶，而导致细胞壁破损和细胞死亡，达到抗真菌感染的目的，由于哺乳动物不存在  $\beta$ (1,3)-D- 葡聚糖，故对机体的影响小。同时相较于传统棘白菌素药物，其改良的化学结构赋予更长的半衰期（约 130 小时），可实现每周一次给药，显著提升患者依从性。2023 年 3 月美国食品和药物管理局 (FDA) 批准了 Rezzayo (rezafungin, 注射用瑞扎芬净)，用于治疗方案有限或没有替代方案的成人念珠菌血症和侵袭性念珠菌病。

环肽是通过化学性质稳定的化学键（如两个半

胱氨酸残基之间的二硫键）形成的结构稳定的环状结构，同线性肽相比，具有抗酶解能力增强，长效化能力突出等优势。目前，液质联用法由于具有灵敏度高、特异性强、效率高等优点，成为环肽类药物体内分析重要技术手段之一。然而，利用 LC-MS/MS 分析环肽类药物时，会遇到灵敏度差、非特异性吸附、内源性基质干扰等问题。面对环肽类大分子体内检测分析的需求与挑战，本文使用岛津生物惰性液相与 LCMS-8060RX 联用系统，建立灵敏、稳定的体内分析方法，为实现雷扎芬净环肽高效、准确的定量分析提供技术支持。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用仪器由岛津生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-8060RX 联用。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XSi × 2	自动进样器：	SIL-40C XSi
柱温箱：	CTO-40C	质谱仪：	LCMS-8060RX
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.128		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Scepter Claris C18-300 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9  $\mu$ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-31209-02)

流动相：A相 -0.1% 甲酸水溶液；B相 -0.1% 甲酸乙腈  
流速：0.3 mL/min  
柱温：40 °C 进样体积：10 μL  
洗脱方式：梯度洗脱，B项初始浓度为25%，具体见表1

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流量 (mL/min)	泵 A 浓度	泵 B 浓度
4.00	0.3000	5.0	95.0
6.00	0.3000	5.0	95.0
6.10	0.3000	75.0	25.0
8.00		控制器	Stop

质谱条件：

离子源：ESI (+) 接口温度：250°C  
接口电压：+4.0 kV DL 温度：100°C  
聚焦电压：+2.0 kV 加热块温度：400°C  
雾化气：氮气 3.0 L/min 加热气：空气 15.0 L/min  
干燥气：氮气 3.0 L/min 喷针位置：+2 mm  
扫描模式：MRM，参数见表2

表2 MRM 参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
雷扎芬净	604.30	343.30*	-32.0	-32.0	-21.0
	604.30	104.30	-32.0	-44.0	-17.0
奥曲肽 (IS)	510.45	120.20	-28.0	-34.0	-19.0

注：\* 表示定量离子

### 1.3 标准品与质控样品的配制

分别精密称取雷扎芬净适量，溶解配制两份 1.0 mg/mL 储备液。储备液分别用 0.1% 甲酸乙腈：水 (20:80) 稀释液成浓度为 100 μg/mL 的母液。取其中一份母液 5 μL 加入 495 μL 空白血浆，配制成 1000 ng/mL 标准工作曲线最高点浓度，后用空白血浆配制成浓度 0.05、0.1、0.5、1、2、10、30、100 ng/mL 的标准工作曲线；另一份母液按照上述方法，使用空白血浆依次配制成 0.08、2.00、80 ng/mL 质控样品。

精密称奥曲肽适量，溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的储备液用 0.1% 甲酸乙腈：水 (20:80) 稀释为 2 μg/mL 内标溶液，待用。

### 1.4 血浆样品前处理方法

取血浆样品 100 μL，依次加入 2 μg/mL 内标溶液 2 μL、50 mM Tris 缓冲液 100 μL 稀释涡旋混匀 2 min。取混合后溶液加入已活化好的 96 孔固相萃取板 (SHIMSEN Plateo DVB micro-SPE)，淋洗除杂后，用洗脱液 200 μL 分别洗脱两次，收集全部洗脱溶液，30°C 条件下减压蒸干，用 0.1% 甲酸乙腈：水 (20:80) 复溶，而后转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 10 μL。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 前体离子及二级碎片离子选择

环肽由氨基酸通过肽键脱水缩合而成，其氨基酸残基可表现出不同的酸碱性（见图1）。在电喷雾电离（ESI）分析中，与其他生物大分子相似，环肽分子会呈现多重电荷状态。雷扎芬净是由6个氨基酸组成的环酯肽且含有季铵基团。使用ESI离子源对其进行一级质谱扫描，得到一价母离子  $[M]^+$  1225.10 和脱水二价母离子  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  604.35、 $[M-2H_2O+2H]^{2+}$  595.25（见图2）。对母离子进行二级碎片分析，发现三种母离子均优先产生侧链碎片离子  $m/z$  104 和  $m/z$  343，这可能是由于其侧链残基较环状主链结构更易断裂。此外，一价母离子CID裂解所需能量高于二价母离子，导致其更难碎裂。

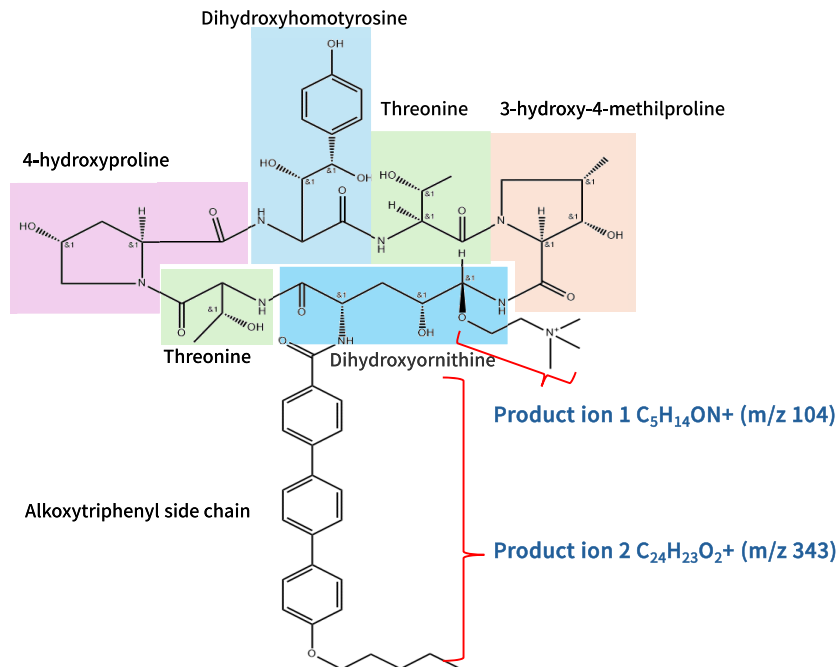
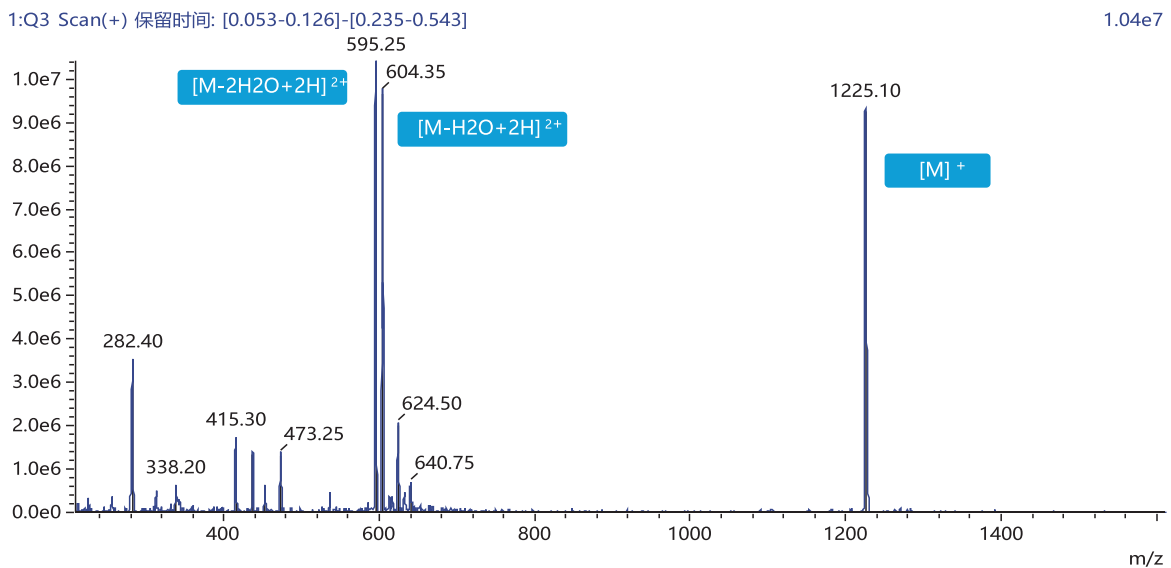


图1 雷扎芬净结构图



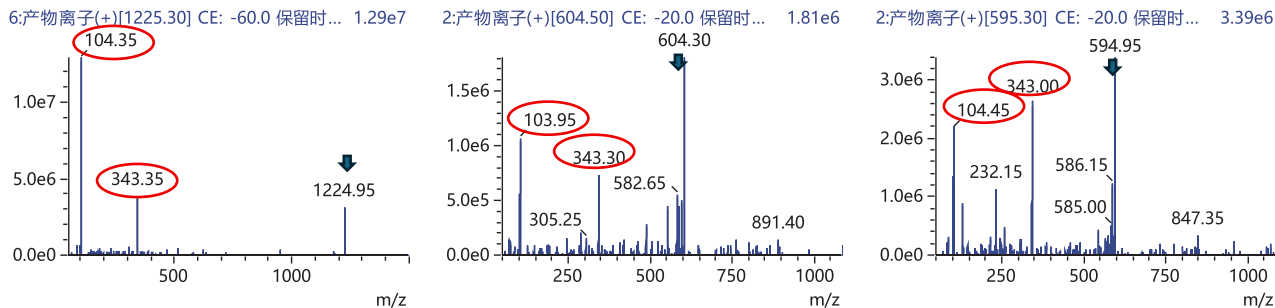


图 2 雷扎芬净一级和二级质谱图（上：母离子；下：产物离子）

### 2.2 不同碎片离子基质灵敏度比较

使用 1 ng/mL 血浆基质样品，进行不同前体离子灵敏度比较。结果显示，碎片离子通道 m/z 104 较 m/z 343 明显更易受到干扰。对于相同的碎片离子，其对应的前体离子响应强度排序为：m/z 604 > m/z 595 > m/z 1225。综合考量灵敏度和背景噪音，最终选择 m/z 604>343 和 m/z 604>104 分别作为定量和定性离子对。

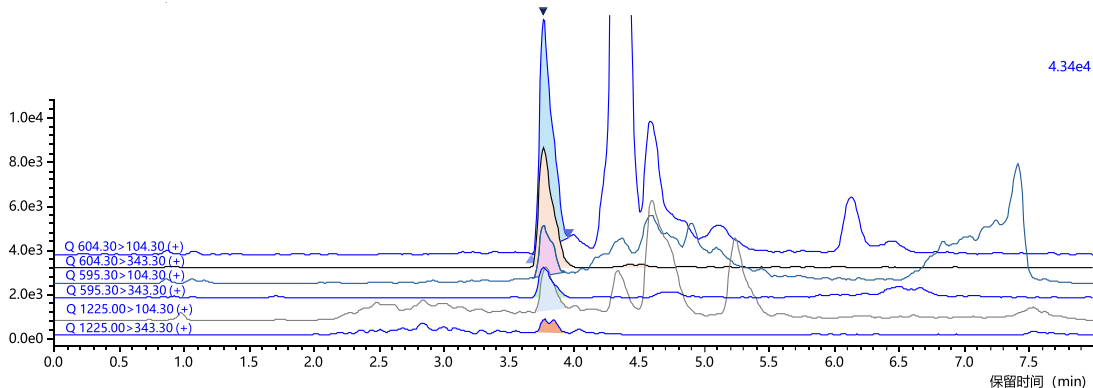


图 3 不同前体离子 MRM 通道灵敏度比较

### 2.3 离子源参数对灵敏度影响

对离子源参数进行了系统的考察：离子源温度（DL 温度、接口温度、加热块温度）、离子化电压（接口电压、聚焦电压）、离子源气流（雾化气、加热气、干燥气）、喷针位置。结果显示，DL 温度对目标物灵敏度的影响最为显著。图 4 为不同 DL 温度下目标物灵敏度的变化趋势：DL 温度越低，灵敏度响应越高。综合基质样本情况，选择 100°C 作为最终的 DL 温度，用于后续分析。

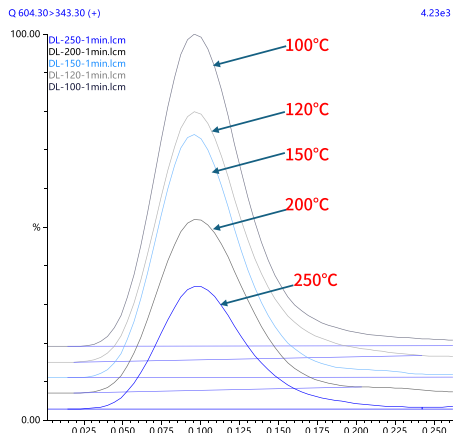


图 4 不同 DL 温度对灵敏度影响

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 方法选择性及灵敏度

通过对液相条件与质谱参数的全面优化，使用 LCMS-8060RX 最终建立雷扎芬净血浆定量方法的定量下限 (LLOQ) 可达 0.05 ng/mL，空白血浆中目标物通道与内标通道均无明显干扰，检测方法具有优异的选择性与灵敏度。图 5 展示了，按照 1.4 项下前处理方法处理后，空白血浆与定量下限 (LLOQ) 0.05 ng/mL 的色谱图，信噪比为 18.2，雷扎芬净的保留时间为 3.5 min，内标的保留时间为 1.7 min。

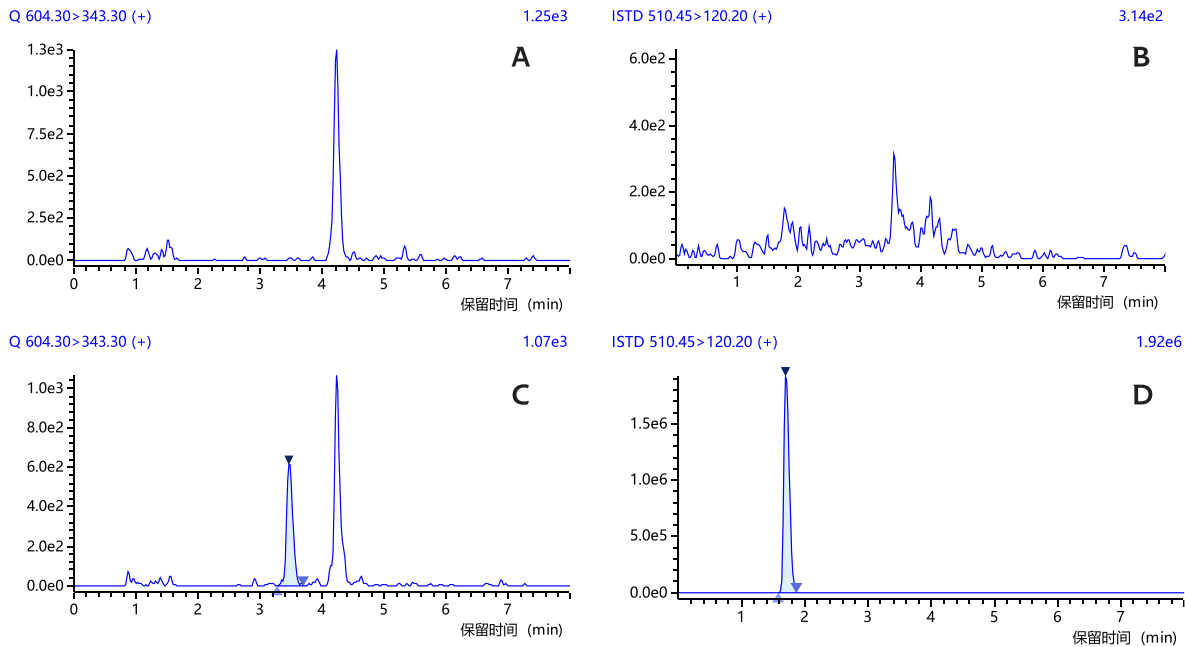


图 5 雷扎芬净与奥曲肽内标 MRM 色谱图  
(A、B: 人空白血浆; C、D: 定量下限 0.05 ng/mL 血浆含内标样品)

### 2.4.2 线性范围

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备工作曲线，内标法进行定量分析。以血浆中雷扎芬净浓度与内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标，以雷扎芬净峰面积与奥曲肽峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为  $1/C^2$ ，进行线性回归分析。所建方法线性范围为 0.05-100 ng/mL，相关系数 0.997，结果表明雷扎芬净在 2000 倍浓度范围内线性关系良好，具体结果图 6。

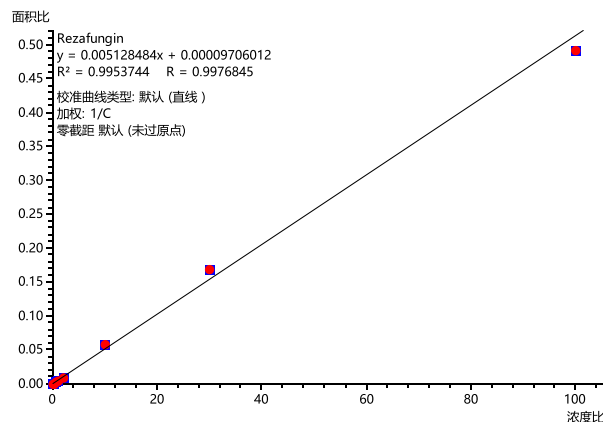


图 6 血浆中雷扎芬净标准曲线

### 2.4.3 精密度与准确度

为考察方法精密度与准确度，取已配制好的 0.08、2.00、80.00 ng/mL 质控样品，按照 1.4 方法制备，每个浓度的血浆样品分别制备 6 份平行样品进行分析，用测得质控样品中雷扎芬净峰面积的 RSD% 值评价方法精密度与准确度，结果见表 3。结果表明，各浓度水平精密度、准确度均符合生物样品检测要求。

表 3 雷扎芬净精密度与准确度 (n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 %
LQC	0.08	6.43	88.37-104.50
MQC	2.00	3.27	95.71-103.58
HQC	80.00	2.56	100.96-107.85

### 2.4.4 回收率

取低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 3 次），按照 1.4 方法制备，以血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.4 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比，即  $A1/A2 \times 100\%$ ，考察血浆样本处理方法的提取回收率。实验可见，通过样品前处理方法的细致优化，各浓度水平雷扎芬净回收率均大于 89%、RSD 小于 6.5%，具体结果见表 4。

表 4 方法回收率结果 (n=3)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	RSD%
LQC	0.08	89.41	6.39
MQC	2.00	98.52	3.81
HQC	80.00	104.13	2.83

### 2.4.5 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 3 次），通过比较空白血浆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即为基质效应，并计算内标归一化基质效应。结果可见，使用优化后的样品前处理方法，各浓度水平基质效应因子均大于 85%，具体结果见表 5。

表 5 基质效应考察结果 (n=3)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应 %	内标基质效应 %	A/A <sub>IS</sub> 基质效应
LQC	0.08	65.14	72.55	89.78
MQC	2.00	59.91	69.72	85.92
HQC	80.00	62.41	68.75	90.77

### 2.4.6 系统残留考察 (Carryover)

多肽类化合物因其富含非极性残基和电荷，极易在金属材质表面发生非特异性吸附，导致残留现象。为克服雷扎芬净环肽检测中遇到的此类问题，本研究采用了生物惰性液相系统结合表面惰性化处理的色谱柱进行分析。该系统通过避免样品与金属表面接触的惰性设计，显著减少了吸附。实验结果证实：在完成高浓度血浆样品检测后，常规液相系统的空白样品中仍可检测到微量雷扎芬净，而经惰性系统分析后的空白样品，其目标化合物通道未出现明显的色谱峰。这表明惰性液相系统与惰性色谱柱的联合应用，能有效解决环肽类化合物分析中的吸附残留问题。

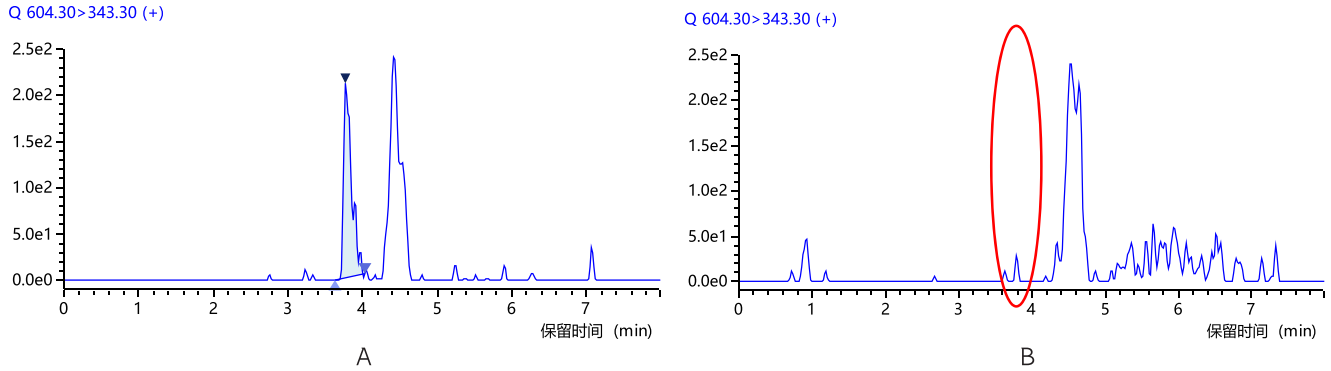


图7 系统残留考察空白样品色谱图  
(A: 普通液相 + 非惰性处理色谱柱结果; B: 惰性液相 + 惰性处理色谱柱结果)

## ■ 结论

本文使用岛津特色产品生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060RX 连用, 开发血浆中雷扎芬净的定量分析方法。通过系统优化色谱和质谱参数, 结合生物惰性液相的系统特点, 获得雷扎芬净色谱峰峰形对称、残留量低、定量下限可达 0.05 ng/mL, 并且线性范围可从 0.05 ng/mL 至 100 ng/mL, 相关系数 0.997。通过方法学验证结果表明所建方法具有灵敏度高、重复性好、残留量低的特点, 满足雷扎芬净生物样本分析要求, 可为药物研发体内研究提供快速准确的检测方法。

岛津应用云

