

SCIEX液相色谱串联质谱系统检测血浆中卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑

Determination of Caspofungin、Posaconazole、Voriconazole N-Oxide和Voriconazole in Plasma by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

林泽彬 (Lin Zebin) , 荆莲艳 (Jing Lianyan) , 李国庆 (Li Guoqing)
SCIEX China Clinical BU

Keywords: Plasma; Caspofungin; Posaconazole; Voriconazole N-Oxide; Voriconazole

引言

卡泊芬净 (Caspofungin) 是棘白菌素类抗真菌药, 可特异性抑制真菌细胞壁的组成成分 β - (1, 3) -D-葡聚糖的合成, 从而破坏真菌结构使之溶解。伏立康唑 (Voriconazole) 和泊沙康唑 (Posaconazole) 为三唑类抗真菌药, 通过抑制对真菌肝药酶CYP有依赖的羊毛甾醇14 α -去甲基化酶, 进而抑制对真菌细胞膜麦角甾醇的生物合成, 使真菌细胞膜的结构和功能丧失, 发挥其抗真菌活性。两者均有抗菌谱广、药效强、不良反应少等特点。伏立康唑主要通过肝脏代谢, 约总剂量的80%以代谢物的形式排出体外, 其代谢产物主要为N-氧化物 (Voriconazole N-Oxide), 在血浆中约占72%。

本方法采用蛋白沉淀法提取, 然后SCIEX液相色谱串联质谱系统, 以待测目标物的同位素标记物为内标, 检测血浆中卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑。

实验部分

标准品前处理方法: 向1.5 mL离心管里依次加入25 μ L 空白血浆、75 μ L乙腈 (含200 ng/mL混合内标) 和25 μ L标准溶液 (0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μ g/mL混合标准溶液), 涡旋5 S后, 15,000 r/min离心5 min。取50 μ L上清液加入950 μ L 20%乙腈溶液混合均匀, 进行LC-MS/MS分析, 进样量10 μ L。

质控品前处理方法: 向1.5 mL离心管里依次加入25 μ L 空白血浆、75 μ L乙腈 (含200 ng/mL混合内标) 和25 μ L标准溶液 (0.3、3、8 μ g/mL质控溶液), 涡旋5 S后, 15,000 r/min离心5 min。取

50 μ L上清液加入950 μ L 20%乙腈溶液混合均匀, 进行LC-MS/MS分析, 进样量10 μ L, 平行6份。

样品前处理方法: 向1.5 mL离心管里依次加入25 μ L 血浆、75 μ L乙腈 (含200 ng/mL混合内标) 和25 μ L乙腈, 涡旋5S后, 15,000 r/min离心5 min。取50 μ L上清液加入950 μ L 20%乙腈溶液混合均匀, 进行LC-MS/MS分析, 进样量10 μ L。

表1. 内标工作液浓度。

Cspofungin-D4 (ng/mL)	Posaconazole-D4 (ng/mL)	Voriconazole-D3 (ng/mL)
200	200	200

色谱条件:

色谱柱使用Phenomenex F5 column (100 \times 3.0 mm, 2.6 μ m) 进行分离, 流动相选用水 (含0.1% 甲酸) 作为A相, 和乙腈 (含0.1% 甲酸) 作为B相, 柱温设为40 $^{\circ}$ C, 进样量为10 μ L; 进行梯度洗脱, 液相梯度见表2。

表2. 液相梯度洗脱条件。

Time min	流速 mL/min	A %	B %
0.00	0.5	70	30
0.50	0.5	70	30
3.00	0.5	20	80
3.10	0.5	5	95
5.00	0.5	5	95
5.10	0.5	70	30
7.00	0.5	70	30

质谱条件：

使用SCIEX Triple Quad™ 4500MD系统。采用采用电喷雾离子源（Electrospray Ionization, ESI）和多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）模式进行质谱扫描。离子源参数：加热气（GS1）为55 psi，辅助加热气（GS2）为55 psi，脱溶剂气温度为550℃，气帘气（Curtain Gas, CUR）为30 psi，碰撞气（Collision Gas, CAD）为8 psi。为了获取较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（Declustering Potential, DP）和碰撞电压（Collision Energy, CE），目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表3。

表3. 抗生素及内标物MRM离子通道参数

化合物ID	Q1	Q3	驻留时间 Dwell Time (msec)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (V)
Caspofungin	547.6	538.5 ^a	35	120	18
	547.6	392.3 ^b	35	120	26
Posaconazole	701.3	614.2 ^a	25	190	50
	701.3	546.2 ^b	25	190	55
Voriconazole N-Oxide	366.1	224 ^a	20	75	24
	366.1	143.1 ^b	20	75	15
Voriconazole	350.1	281.3 ^a	20	90	23
	350.1	223.9 ^b	20	90	27
Cspofungin-D4	549.5	540.4 ^a	35	110	19
	549.5	396.4 ^b	35	110	26
Posaconazole-D4	705.4	618.4 ^a	25	160	52
	705.4	550.3 ^b	25	160	57
Voriconazole-D3	353.2	284 ^a	20	90	25
	353.2	224 ^b	20	90	26

注：^a为定量离子对，^b为定性离子对

结果与讨论

图1. 空白血浆样本卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑提取离子流图出峰位置无干扰，专属性良好。

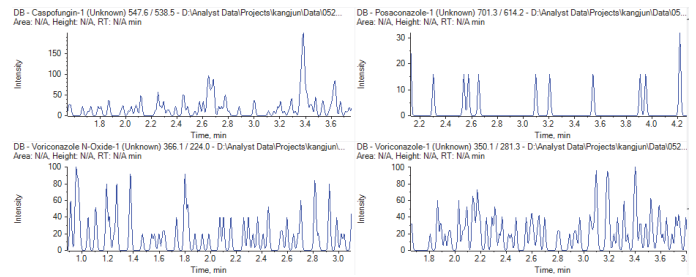


图1. 空白血浆样本提取离子流图。

图2. 以空白血浆为基质卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑在定量下限0.1 μg/mL LLOQ提取离子流图

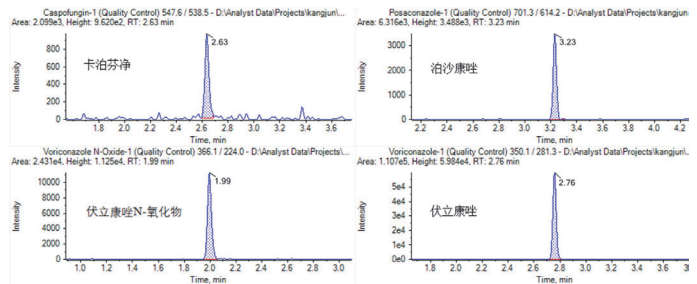


图2. 抗真菌药定量下限LLOQ (0.1μg/mL) 提取离子流图。

卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑回归方程和线性范围见表3，卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑在相应的浓度范围内线性良好，r均大于0.995。

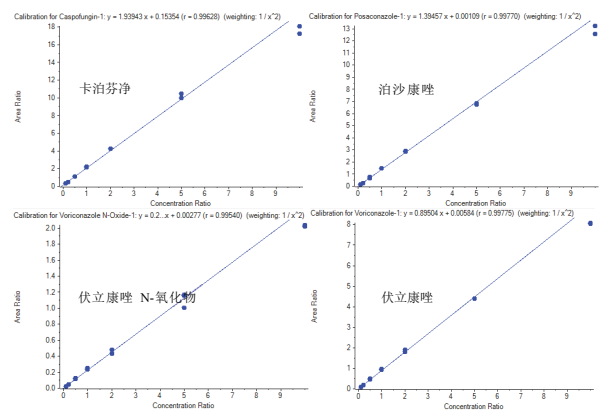


图3. 抗真菌药标准曲线。

表4. 四种抗菌药物线性回归方程。

化合物名称	回归方程	相关系数 (r)	线性范围
Caspofungin	$y=1.93943x+0.15354$	$r=0.99628$	0.1~100 µg/ml
Posaconazole	$y=1.39457x+0.00109$	$r=0.99770$	
Voriconazole N-Oxide	$y=0.22465x+0.00277$	$r=0.99540$	
Voriconazole	$y=0.89504x+0.00584$	$r=0.99775$	

为了考察方法的重现性及准确性, 分别进行卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑的精密度和准确度方法验证。从表4可以看出, 卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑的低、中、高浓度的精密度 (CV) 均在1.06~9.84%以内, 准确度均在91.91~105.04%之内。

总结

本方法使用SCIEX 高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统。实现了同时检测人血浆中卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑浓度。因此, 本方法采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式, 可对血浆中四种抗菌药同时进行快速的定性和定量分析。卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑各通道出峰位置无干扰, 专属性良好; 在0.1~10 µg/mL范围线性良好 ($r>0.995$); 准确度 (91.91~105.04%) 和精密度 (1.06~9.84%) 满足方法学要求。

表5. 卡泊芬净、泊沙康唑、伏立康唑N-氧化物和伏立康唑的准确度及精密度结果。

化合物名称	实际浓度 (µg/mL)	检测浓度 (µg/mL)	RSD %	Accuracy %
Posaconazole	0.10	0.10	6.82	101.05
	0.30	0.29	7.50	96.33
	3.00	3.00	3.17	100.01
	8.00	7.84	3.21	97.96
Voriconazole N-Oxide	0.10	0.09	6.28	91.91
	0.30	0.30	5.49	98.46
	3.00	3.14	4.39	104.81
	8.00	7.93	2.16	99.18
Voriconazole	0.10	0.10	4.82	102.92
	0.30	0.31	3.90	102.39
	3.00	3.10	1.68	103.21
	8.00	7.65	1.06	95.64
Caspofungin	0.10	0.10	9.84	102.56
	0.30	0.30	5.98	99.96
	3.00	3.15	8.33	105.04
	8.00	7.87	3.08	98.40

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9819-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808 1388
传真: 010-5808 1390

全国免费垂询电话: 800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址: 上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333

网址: www.sciex.com.cn

广州分公司
地址: 广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835

微博: @SCIEX