

SCIEX LC-MS/MS系统同时检测人血清中更昔洛韦、万古霉素、去甲万古霉素、卡泊芬净和替考拉宁

Simultaneous Determination of Ganciclovir, Vancomycin, Norvoncomycin, Caspofungin and Teicoplanin in Serum by SCIEX LC-MS/MS

贺琳娟, 赵祥龙, 郭立海

He Linjuan, Zhao Xianglong, Guo Lihai

Key Words: Ganciclovir, Vancomycin, Norvoncomycin, Caspofungin, Teicoplanin, Serum

引言

更昔洛韦 (Ganciclovir), 属于抗病毒类药物, 用于防治免疫功能缺陷病人的巨细胞病毒感染。万古霉素 (Vancomycin)、盐酸去甲万古霉素 (Norvoncomycin Hydrochloride) 和替考拉宁 (Teicoplanin), 在结构上均属于糖肽类抗生素 (如图 1), 主要用于革兰氏阳性菌所致的严重感染, 能够抑制细菌细胞壁的合成。但万古霉素和去甲万古霉素具有一定的肾毒性, 临床使用时需严格控制剂量, 做到精准用药^[1]。卡泊芬净 (Caspofungin), 为棘白菌素类抗真菌药, 能够抑制真菌和酵母菌细胞壁的合成, 但其药代动力学过程受到多种因素影响, 如器官功能、药物相互作用等会引起体内血药浓度的个体差异^[2]。

对于具有潜在毒性风险且个体差异较大的抗病毒抗菌类药物, 血药浓度监测能够提高疗效并减少不良反应。目前, 已有多种针对上述5种抗生素的检测方法, 包括免疫测定法、高效液相色谱法及液相色谱串联质谱法。免疫法对化合物的特异性不足, 易与内源性蛋白质产生交叉反应, 存在测定结果假阳性的情况。此外, 液相色谱法则需要较大的样本量及较长的分析时间^[3]。因此, 需要开发一种简单快速、高灵敏度的方法来检测临床治疗药物监测中常用抗生素。

本实验采用蛋白沉淀法提取, SCIEX液相色谱串联质谱系统分析, 同时测定血清中更昔洛韦、万古霉素、盐酸去甲万古霉素、替考拉宁和卡泊芬净的浓度, 为临床用药提供精准的化学信息。

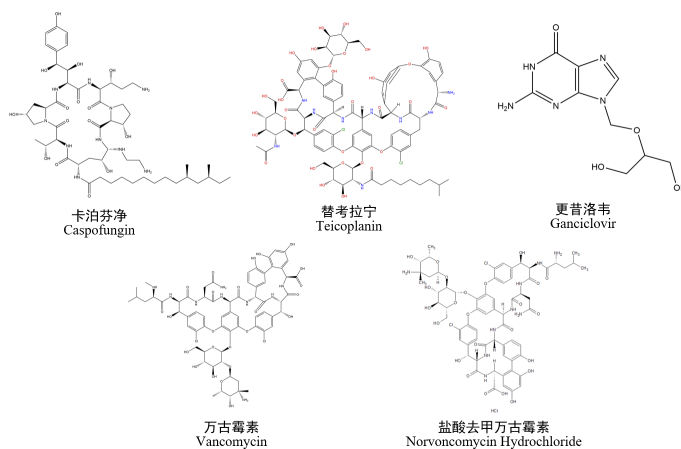


图1. 5种化合物结构式。

实验部分

1. 样品前处理

将20 μL 内标工作液加入50 μL 血清样本中, 然后加入150 μL 的1%甲酸甲醇, 涡旋混合30 s, 10000 rpm离心10 min。取上清待测。

2. 液相条件

色谱柱为Phenomenon Kinetex C18 (2.6 μm , 2.1 \times 100 mm), 流动相采用0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈溶液, 柱温设定为40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量1 μL , 流速为0.3 mL/min。梯度洗脱设置见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------|-------|
| 0.0 | 95 | 5 |
| 1.0 | 50 | 50 |
| 1.5 | 2 | 98 |
| 3.8 | 2 | 98 |
| 3.9 | 95 | 5 |
| 5.0 | 95 | 5 |

3. 质谱条件

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: 雾化气 (GS1) 为45 psi, 辅助加热气 (GS2) 为35 psi, 脱溶剂温度为450 °C, 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为35 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为9 psi, 喷雾针 (Ionspray, IS) 电压为5000 V。离子对信息见表2。

表2. 5种化合物及其内标物质的质谱参数

| 化合物 | Q1 | Q3 | ID | DP | CE |
|--------|-------|-------|-----------|----|----|
| 更昔洛韦 | 256.1 | 152.1 | GXLW-1* | 60 | 20 |
| | 256.1 | 135.1 | GXLW-2 | 60 | 46 |
| 万古霉素 | 724.8 | 144.1 | WGMS-1* | 75 | 20 |
| | 724.8 | 100.1 | WGMS-2 | 75 | 70 |
| 去甲万古霉素 | 718.7 | 144.2 | QJWGMS-1* | 65 | 19 |
| | 718.7 | 100.1 | QJWGMS-2 | 65 | 45 |
| 卡泊芬净 | 547.5 | 538.6 | KBFJ-1* | 60 | 19 |
| | 547.5 | 131.1 | KBFJ-2 | 60 | 39 |
| 替考拉宁 | 940.9 | 316.3 | TKLN-1* | 65 | 20 |
| | 940.9 | 204.0 | TKLN-2 | 65 | 30 |
| 更昔洛韦内标 | 261.1 | 152.1 | GXLW-IS | 60 | 20 |
| 万古霉素内标 | 731.0 | 144.0 | WGMS-IS | 75 | 20 |
| 卡泊芬净内标 | 549.6 | 549.6 | KBFJ-IS | 60 | 20 |

* 定量离子

结果与讨论

1. MRM典型色谱图

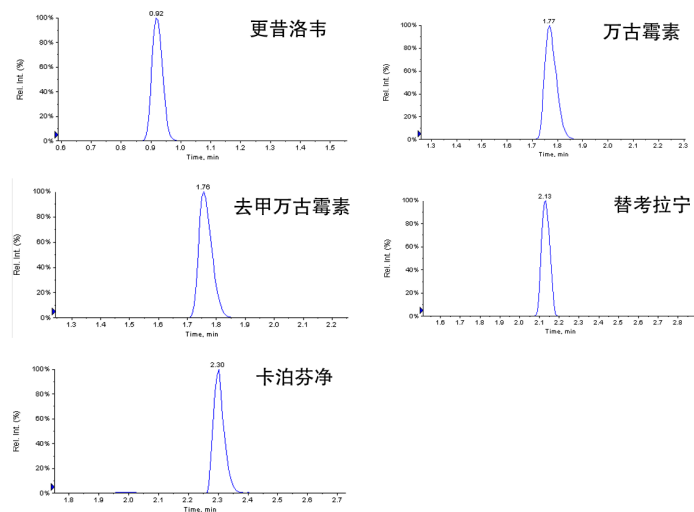


图2. 5种化合物典型色谱图。

2. 线性范围

以空白血清为空白基质, 配制混合标曲工作溶液, 按照上述前处理步骤处理, 制作标准工作曲线。各化合物均在相应的浓度范围内线性良好, 回归系数 r 均大于0.99, 结果见表3。

表3. 回归方程和线性范围

| 化合物 | 回归方程 | 权重 | 相关系数 r | 线性范围 |
|--------|-----------------------------|---------|-------------|--------------------------|
| 更昔洛韦 | $Y=0.03470x+0.02748$ | $1/x^2$ | $r=0.99690$ | 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ |
| 万古霉素 | $Y=56.07864x \pm 311.55329$ | $1/x$ | $r=0.99662$ | 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ |
| 去甲万古霉素 | $Y=48.65092x \pm 32.88654$ | $1/x$ | $r=0.99679$ | 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ |
| 卡泊芬净 | $Y=171.44762x \pm 0.02859$ | $1/x^2$ | $r=0.99252$ | 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ |
| 替考拉宁 | $Y=26.05167x \pm 144.82423$ | $1/x$ | $r=0.99889$ | 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ |

3. 精密度与回收率

为了考察方法的重现性及准确性, 分别对各个化合物基质加标的精密度 (RSD) 和回收率进行方法验证。制备低 (50 ng/mL)、中-1 (150 ng/mL)、中-2 (750 ng/mL)、高 (2500 ng/mL) 四个浓度的质控样本, 按上述前处理步骤平行处理6个样本, 从表4可以看出, 各浓度水平下精密度 (RSD) 均在10%以内, 回收率均在89%~115%之间。

表4. 精密度及回收率结果

| 化合物 | 理论浓度 (ng/mL) | 实测值 (ng/mL) | 回收率 /% | RSD /% |
|--------|-----------------|----------------|-----------|-----------|
| 更昔洛韦 | 50 | 46.87 | 93.74 | 2.35 |
| | 150 | 142.78 | 95.19 | 1.72 |
| | 750 | 671.74 | 89.57 | 6.31 |
| | 2500 | 2412.66 | 96.51 | 2.66 |
| 万古霉素 | 50 | 55.70 | 111.41 | 7.13 |
| | 150 | 155.12 | 103.41 | 5.68 |
| | 750 | 701.69 | 93.56 | 5.77 |
| | 2500 | 2557.04 | 102.28 | 2.08 |
| 去甲万古霉素 | 50 | 47.47 | 94.95 | 5.91 |
| | 150 | 160.26 | 106.84 | 4.86 |
| | 750 | 723.68 | 96.49 | 5.34 |
| | 2500 | 2240.96 | 89.64 | 1.96 |
| 卡泊芬净 | 150 | 144.92 | 96.61 | 1.98 |
| | 750 | 694.63 | 92.62 | 7.26 |
| | 2500 | 2620.76 | 104.83 | 1.21 |
| 替考拉宁 | 150 | 161.50 | 107.67 | 3.87 |
| | 750 | 739.11 | 98.55 | 8.35 |
| | 2500 | 2681.60 | 107.26 | 7.65 |

总结

本方案采用蛋白沉淀法进行样品前处理，无需复杂的操作步骤，同时结合SCIEX LC-MS/MS系统，可以同时检测人体血清中5种抗病毒抗菌类药物，即更昔洛韦、万古霉素、去甲万古霉素、卡泊芬净和替考拉宁，能够很好地满足临床治疗药物监测的需要。该方法特异性好，灵敏度高，稳定性高，并且分析时间短，可极大的节约耗材和时间成本。

参考文献

- [1] Scribel L, Zavascki AP, Matos D, et al. Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: analytical validation and clinical assessment, J of Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [J]. 2020, 1137:121897. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121897.
- [2] Liu L, Zhang L, Zheng X, et al. LC-MS/MS-based multiplex antibacterial platform for therapeutic drug monitoring in intensive care unit patients. Front. Pharmacol [J]. 2023, 14:1116071. doi: 10.3389/fphar.2023.1116071.
- [3] Franco V, Marchiselli R, Fattore C, et al. Development and validation of an HPLC-UV assay for the therapeutic monitoring of the new antiepileptic drug perampanel in human plasma. Ther Drug Monit [J]. 2016, 38 (6), 744-750. doi:10.1097/FTD.00000000000003500.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15771-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)