

SCIEX液相色谱串联质谱系统测定人脑脊液中两性霉素B的含量

Determination of Amphotericin B in human Cerebrospinal fluid by SCIEX Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry System

裴旭哲，刘瑞琛，黄超，赵祥龙，刘冰洁

Pei Xuzhe, Liu Ruichen, Huang Chao, Zhao Xianglong,Liu Bingjie

SCIEX 中国

Key Words : Amphotericin B , Cerebrospinal fluid ,SCIEX LC-MS/MS system

引言

两性霉素 B 是一种多烯类抗真菌药物，在临床上具有重要意义，主要用于治疗严重的、危及生命的真菌感染，尤其在其他抗真菌药疗效不佳或患者无法耐受时发挥关键作用。两性霉素 B 在脑脊液和血液中的含量存在显著差异，脑脊液中含量较低，浓度仅有血液中的2~10 %，传统检测方法灵敏度有挑战，与传统检测方法相比，质谱检测脑脊液中两性霉素B具有高灵敏度、高特异性、定量准确、可进行多组多指标同时分析、样本用量少，检测速度快优势。

两性霉素B是大分子多烯类抗生素，其结构中的内酯环、羟基等基团使其稳定性较差，对比有机溶剂沉淀，重金属沉淀法用于它的分离纯化时，优点在活性保护、工艺成本等方面更突出。有机溶剂易破坏两性霉素B的内酯环结构，还会因脱水作用导致其生物活性大幅下降，且操作需严格低温控温才能减少破坏；而重金属沉淀金属离子与发酵液中的杂蛋白、多糖等形成沉淀，不会破坏两性霉素B的核心抗菌结构，常温下就能避免其活性受损。

相比于传统的有机溶剂沉淀，重金属沉淀效率高：反应速率快，能快速形成稳定沉淀，兼容性好：无需引入大量有机溶剂，避免样品中挥发性成分损失或变性；操作简便：无需复杂设备，仅需加入沉淀剂、离心分离即可，降低实验成本，其次可以大幅度降低病人脑脊液采样量，对检测病人无论是心理还是生理方面都会大大降低负担。

鉴于目前已有文献报道采用有机溶剂沉淀脑脊液中两性霉素，而本方案采用非有机溶剂沉淀法一针进样，该方法操作简单、专一性强、大幅度降低脑脊液取样量，仅需20μL脑脊液即可满足临床对脑脊液两性霉素B监测的需求，同时降低临床病人对取脑脊液量量大的心理负担，减小病人压力。

一、实验部分

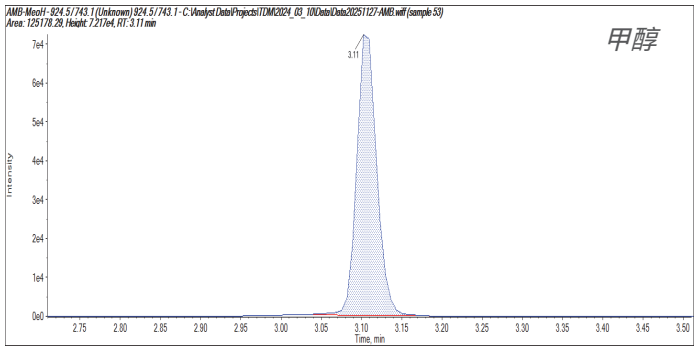
1. 样品前处理

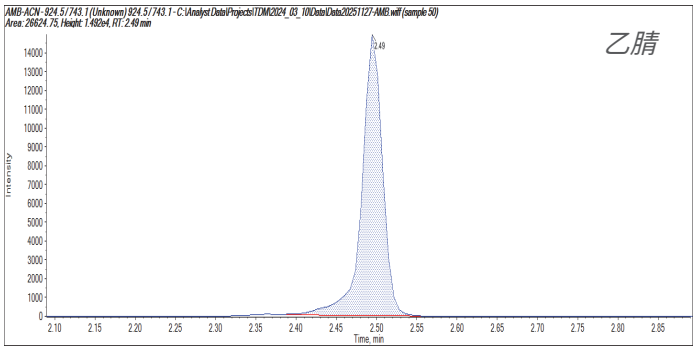
精密量取脑脊液样品20 μL，加入内标溶液5 μL、40 μL饱和硫酸锌水溶液、，涡旋1 min，加入50μL水，以14 000 r/min离心10 min，取上清进样分析。

2. 质谱色谱方法优化

采用同样一浓度样品分别以甲醇、乙腈为流动相，对比不同流动相对两性霉素B灵敏度影响结果显示以甲醇为流动相该样品峰面积125178，响应为7.2×10^4；以乙腈为流动相该样品峰面积为26625，响应为1.49×10^4，两者灵敏度差距有4.8倍，故以甲醇为流动相更为合适，如下图所示。

通过FIA模式[质谱方法自动优化]对质谱离子源参数、去簇电压、碰撞电压进行系统的优化结果显示定量离子对去簇电压最佳值为40 V，碰撞电压最佳值为30eV，离子源电压5500 V，温度550°C，雾化器 65 psi 辅助加热气 50 psi，碰撞气Medium，最终使灵敏度由原来的2.2×10^4提升至5.4×10^4，提升有2.5倍。





4. 色谱质谱方法

色谱条件

色谱柱：飞诺美 F5(100×3.0 mm, 2.6 μm)

流动相：A：水溶液(含0.1%甲酸)，B：甲醇溶液，柱温：40 ℃，梯度洗脱，液相梯度见表1。

表1. 洗脱梯度

时间(min)	A(%)	B(%)	流速(mL/min)
0	70	30	0.6
1	70	30	0.6
2.2	5	95	0.6
3.3	5	95	0.6
3.4	70	30	0.6
5.5	70	30	0.6

质谱条件

ESI离子源

气帘气CUR: 25 psi　　碰撞气CAD: Medium

雾化气GS1: 65 psi　　辅助气: GS2: 50 psi

IS电压: 5500 V　　源温度: 550 ℃

化合物离子对信息见表2:

表2. 化合物离子对及电压参数

Q1	Q3	DWELL	ID	DP	CE
924.5*	743.1	100	两性霉素B*	40	25
906.5	743.1	100	两性霉素B	40	20
350.1	281.3	100	伏立康唑(内标)	60	17

* 代表定量离子对

二、结果与讨论

以人工脑脊液为基质，考察了待测物线性范围、精密度和准确度、回收率，实验结果表明该检测方案方法学良好，脑脊液基质中两性霉素B谱图如图1所示:

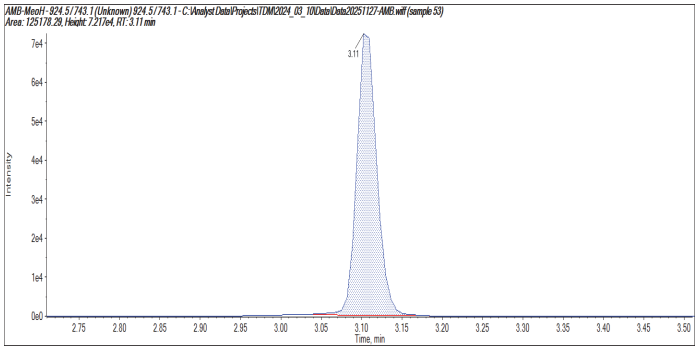


图1. 定量分析的提取离子流图

以人工脑脊液为基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线(浓度单位均为ng / mL)。

分析物	工作曲线	R	线性范围
两性霉素B	Y=245.2782x±39.75	0.999	5~200

待测物回收率97.6~104.3 %之间，基质效应在99.2~107.4 %之间满足方法学要求。

基质效应 低浓度10ng/mL 高浓度 100ng/mL	Area		Area	基质效应(%)
脑脊液	NA		NA	
基质加标低浓度1	1977	空白加标低浓度1	1841	107.4
基质加标低浓度2	1900	标液样低浓度2	1850	102.7
基质加标低浓度3	1963	标液样低浓度3	1848	106.2
基质加标高浓度1	20500	标液样高浓度1	19662	104.3
基质加标高浓度2	20196	标液样高浓度2	20355	99.2
基质加标高浓度3	19974	标液样高浓度3	20096	99.4

连续6针进样，高低质控精密度分别为2.1%和1.52%。

分析物	低质控 20ng/mL(%)	高质控 100ng/mL (%)
两性霉素B	98.3	104.3
	97.6	102.1
	98.2	99.3
	97.8	98.9
	101.2	103.2
	100.4	101.2
重复性(CV)	1.52	2.1

采用常规蛋白沉淀法进行取100 μL脑脊液沉淀剂为有机溶剂甲醇前处理，结果如下：

以人工脑脊液为基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线(浓度单位均为ng / mL)。

分析物	工作曲线	R	线性范围
两性霉素B	Y=240.55x+33.92	0.998	5~200

基质效应 低浓度10ng/mL 高浓度 100ng/mL	Area		Area	基质效应(%)
脑脊液	NA		NA	
基质加标低浓度1		空白加标低浓度1		
基质加标低浓度2		标液样低浓度2		
基质加标低浓度3		标液样低浓度3		
基质加标高浓度1		标液样高浓度1		
基质加标高浓度2		标液样高浓度2		
基质加标高浓度3		标液样高浓度3		

三、小结

本方法基于SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统建立脑脊液中两性霉素B LC-MS/MS测定方法，并对方法的专属性、线性、精密度、准确度、加标回收进行了系统的方法学验证。每个样本仅需5.5 min，且具有特异性好、准确度高等优点，可以满足临床对脑脊液中两性霉素B监测的需求，为临床调整患者药剂量提供重要的支持。

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。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-39862-A

SCIEX中国

北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路
18号院A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

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

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

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897
官网：**sciex.com.cn**
官方微信：**SCIEX-China**