

SCIEX 液相色谱串联质谱系统同时检测5种抗菌药物及代谢产物

Determination of Five Antibiotics and their Metabolites in Serum by SCIEX LC-MS/MS

荆莲艳, 张元媛, 李国庆

Jing Lianyan, Zhang Yuanyuan, Li Guoqing

Keywords: Fluconazol, Voriconazole, Itraconazole, Hydroxyitraconazole, Posaconazole

引言

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 14α -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。氟康唑是治疗真菌感染的一种药物, 为广谱抗真菌药, 对真菌感染有治疗作用。伊曲康唑 (Itraconazole) 为新一代三唑类高效广谱抗真菌药, 可结合真菌细胞色素P450同工酶, 抑制其麦角甾醇合成。伊曲康唑需要在肝脏代谢, 其主要代谢产物羟基伊曲康唑也有较高的抗菌活性。

为了确保抗菌药临床用药的安全与合理, 有必要建立一种快速特异灵敏的并可以同时测定血清中几种药物浓度的方法。本试验建立一种LC-MS/MS同时测定伏立康唑、泊沙康唑、氟康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑浓度, 并考查准确性和精密度, 该法操作简单, 专一性强, 灵敏度高, 可以满足临床治疗药物监测的需要。

实验部分

1、样品前处理

样品前处理: 向1.5 mL离心管里依次加入25 μ L血清、45 μ L乙腈 (含250 ng/mL混合内标) 和25 μ L乙腈, 涡旋5 S后, 15,000r/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20 μ L。

2、检测方法

色谱条件: 使用飞诺美Kinetex F5 Column (3.0 \times 100mm, 2.6 μ m)进行分离, 流动相选用0.1%甲酸水溶液作为A相, 和0.1%甲酸乙腈作为B相, 柱温设为40 $^{\circ}$ C, 进样量20 μ L, 进行梯度洗脱, 液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

Time(min)	Flow rate(mL/min)	A%	B%
0	0.5	50	50
0.5	0.5	50	50
2	0.5	5	95
2.5	0.5	5	95
2.51	0.5	50	50
3	0.5	50	50

质谱条件: 采用正电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI) 和多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式进行质谱检测。离子源参数: 喷雾针 (Ionspray, IS) 正模式电压为+5500V, 加热气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为50和50psi, 脱溶剂气温度为500 $^{\circ}$ C; 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2。

表2. 5种抗菌药物及内标物MRM离子通道参数

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell (msec)	ID	DP (V)	CE (V)
307.1	169.1	25	Fluconazol01a	100	50
307.1	220	100	Fluconazol02	100	26
307.1	238	100	Fluconazol03	100	23
350.1	127.1	20	Voriconazole01 a	120	105
350.1	224.1	100	Voriconazole02	120	27
350.1	281.1	100	Voriconazole03	120	24
705.2	392.2	20	Itraconazole01 a	160	53
705.2	432.3	20	Itraconazole02	160	47
705.2	450.3	20	Itraconazole03	160	45
721.2	408.2	20	Hydroxyitraconazole01 a	160	52
721.2	392.3	20	Hydroxyitraconazole02	160	51
721.2	430.2	20	Hydroxyitraconazole03	160	52
701.2	683.4	20	Posaconazole01 a	160	47
701.2	614.3	20	Posaconazole02	160	52
701.2	686.3	20	Posaconazole03	160	34
311.2	242.2	20	Fluconazol -D4	88	40
705.4	618.2	20	Posaconazole -D4	180	53
714.3	401.2	20	Itraconazole -D9	100	51
729.2	400.1	20	Hydroxyitraconazole -D8	170	45

注：a代表定量离子对

结果与讨论

对空白血清样本中氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑提取离子流图的考察表明，氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑的出峰位置无干扰，专属性良好，见图1。

以空白血清为基质，考察了氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑在定量下限0.1 µg/mL的出峰和响应情况，结果表明化合物峰型良好，见图2。

氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑的回归方程和线性范围见表3，r均大于0.995，5种抗菌药物在相应的浓度范围内线性良好。

表3. 回归方程和线性范围

测定项目	线性范围 (µg/mL)	回归方程 (相关系数r)
氟康唑	0.1~25	Y=1.32903 X +0.01606 (r=0.99965)
伏立康唑	0.1~25	Y=14.73696 X +0.21149 (r=0.99528)
伊曲康唑	0.1~25	Y=2.46650 X +0.02772 (r=0.99986)
羟基伊曲康唑	0.1~25	Y=4.15827X +0.13957 (r=0.99924)
泊沙康唑	0.1~25	Y=8.95554 X +0.09326 (r=0.99719)

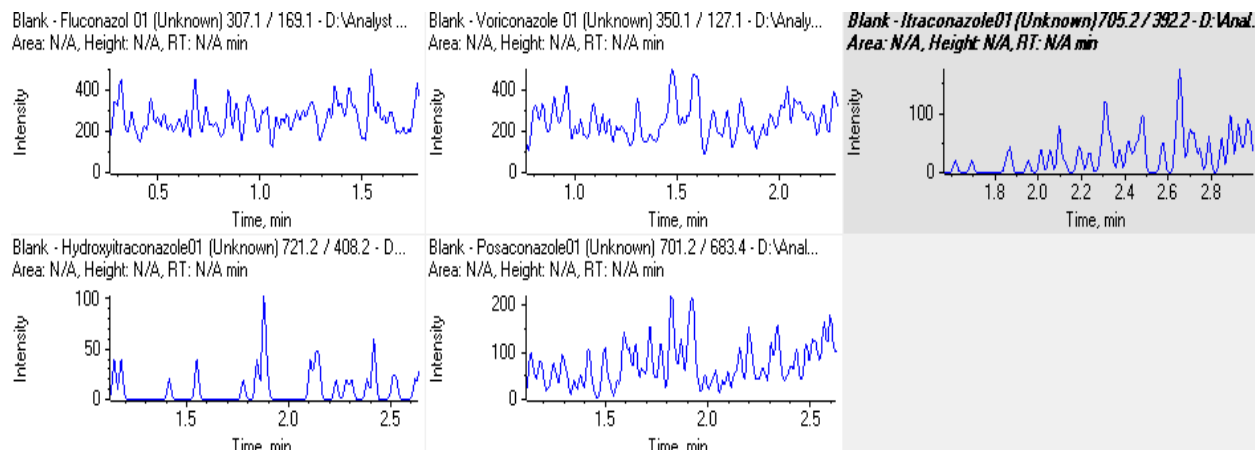


图1. 空白血清样本提取离子流图（依次为氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑）

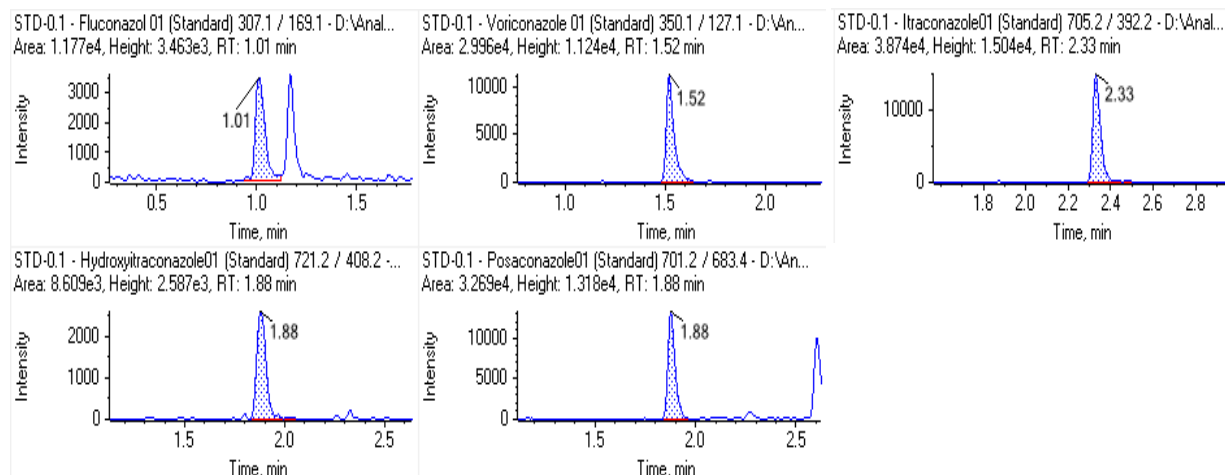


图2. 血清基质中0.1 µg/mL 氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑提取色谱图

表4. 血清中5种抗菌药物精密度和准确度

化合物名称	实际浓度 (µg/mL)	检测浓度 (µg/mL) (n=6)	RSD %	Accuracy %
氟康唑	0.30	0.31	3.44	102.88
	12.50	13.05	4.30	104.43
伏立康唑	0.30	0.29	8.55	97.12
	12.50	12.48	5.62	99.81
伊曲康唑	0.30	0.32	2.49	105.46
	12.50	13.17	4.46	105.37
羟基伊曲康唑	0.30	0.29	7.48	97.61
	12.50	13.48	5.28	107.80
泊沙康唑	0.30	0.31	4.42	101.88
	12.50	12.32	3.79	98.52

以混合实际人群血清添加标液的形式制备质控样本，对5种抗菌药物定量的精密度和准确度进行验证。从表4可以看出，不同浓度的质控样本精密度和准确度均在8.55%以内，准确度均在97.12~107.80%之内，满足FDA和CLSI相关法规要求。

总结

本方法使用SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统为高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统。本方法采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式，可对血清中氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑进行快速的定性和定量分析。该方法具有、特异性高、线性好、准确度高优点，可以满足临床治疗药物监测的需要。

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。仅供处方销售。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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12607-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: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)