

血清中 20 种抗生素药物分析方法

应用及技术服务部

摘要: **目的** 建立同时测定血清中 20 种抗生素类药物的检测方法。**方法** 血清样本经 Cleanert PPT 蛋白沉淀板沉淀蛋白后, 采用 Phenomenex Luna Omega Polar C18 色谱柱进行分离, LC/MS-MS 在 ESI 模式下采用 MRM 进行定性定量分析。**结果** 20 种存在极性差异的抗生素类药物色谱峰分离度良好, 血药浓度在 10~5000 ng/mL 间, 线性相关系数 $R^2 > 0.99$, 目标物三个加标水平下回收率为 65.2%~115.8%, 相对标准偏差均在 9.6% 内。**结论** 该方法准确度与重复性均满足方法学验证要求, 且具有操作时间短、自动化及高通量等前处理优势, 色谱分离上也实现了对多组分存在极性差异的抗生素类药物的监测分析。

关键词: 抗生素类药物; Cleanert PPT; Luna Omega Polar C18; LC/MS-MS; 牛血清

引言

治疗药物监测 (TDM) 是通过定量测定血清或血浆中药物浓度来指导用药剂量优化, 是目前提倡的精准医疗中很有价值的药物治疗工具。不同患者在药代动力学方面存在着显著的个体差异, 通过 TDM 对患者个体剂量的滴定, 可获得最佳的治疗, 同时降低中毒风险。目前, 用于临床治疗的抗生素有上百种, 种类繁多 (β 内酰胺类、氨基糖苷类、多肽类、四环素类、抗菌类等), 其性质差异较大, 有些抗生素有效药物浓度范围较窄, 因此为保证抗生素用药的安全与合理, 有必要建立一种快速灵敏度高的并可以同时测定血清中多种药物浓度的方法。

化合物信息

表 1. 抗生素类药物化合物信息

中为名称	英文名称	CAS 号	分子式
伏立康唑	Voriconazole	137234-62-9	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₅ O
万古霉素	Vancomycin	1404-90-6	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄
替考拉宁	Teicoplanin	61036-62-2	C ₇₈ H ₇₇ Cl ₂ N ₈ O ₃₂ R
利奈唑胺	Linezolid	165800-03-3	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₄
环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃

(盐酸) 莫西沙星	Moxifloxacin	186826-86-8	C21H25ClFN3O4
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	C10H11N3O3S
哌拉西林	Piperacillin	61477-96-1	C23H27N5O7S
阿莫西林 (三水合物)	Amoxicillin	61336-70-7	C16H25N3O8S
头孢吡肟	Cefepime	88040-23-7	C19H24N6O5S2
头孢呋辛 (酸)	Cefuroxime	55268-75-2	C16H16N4O8S
美罗培南 (三水合物)	Meropenem	96036-03-2	C17H25N3O5S.3H2O
亚胺培南 (一水合物)	Imipenem (IMP)	64221-86-9	C12H17N3O4S.H2O
异烟肼	Isoniazid	54-85-3	C6H7N3O
利福平	Rifampin	13292-46-1	C43H58N4O12
氟康唑	Fluconazole	86386-73-4	C13H12F2N6O
恩替卡韦 (水合物)	Entecavir	209216-23-9	C12H15N5O3
替诺福韦	Tenofovir	147127-20-6	C9H14N5O4P
拉米夫定	Lamivudine	134678-17-4	C8H11N3O3S
依非韦伦	Efavirenz	154598-52-4	C14H9ClF3NO2

实验部分

仪器、试剂与材料

主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪 AB SCIEX API 4500MD, 配有电喷雾离子源 (ESI);
96 孔板正压固相萃取装置 Agela SPE-M96。

试剂材料

蛋白沉淀板: Cleanert PPT, 2 mL/well;

实验用水、乙腈、甲酸均为色谱级;

样品基质

实验采用的基质为 EDTA 牛血清样本, -18 °C 保存;

溶液配制

0.1% 甲酸溶液: 准确吸取 1 mL 甲酸加入至 1000 mL 纯水中, 混匀。

20 种抗生素单标均外购, 按照各自温度要求避光保存。

20 种抗生素混标配制：由于化合物灵敏度差异，需配制成差异浓度的抗生素混标，混标中万古霉素、头孢吡肟、头孢呋辛、美罗培南、亚胺培南、替考拉宁的浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其余均为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，使用 80% 乙腈水溶液溶解定容，避光保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

标准基质工作液由牛血清配制而成，配制方法见表 2：

表 2. 标准基质工作液配制方法

标准基质工作液编号	目标浓度 ng/mL	中间溶液 $\mu\text{g}/\text{mL}$	转移体积 μL	牛血清体积 μL
STD1	5/50	C1 (0.05/0.1)	100	900
STD2	10/100	C2 (0.1/1)	100	900
STD3	50/500	C3 (0.5/5)	100	900
STD4	100/1000	C4 (1/10)	100	900
STD5	200/2000	C5 (2/20)	100	900
STD6	500/5000	C6 (5/50)	100	900

基质标准曲线 MTD 配制方法见表 3：

表 3. 标准曲线配制方法

样品编号	曲线浓度 ng/mL	吸取基质溶液	基质体积 μL	沉淀剂体积 μL
MTD1	1/10	STD1 牛血清	100	400
MTD2	2/20	STD2 牛血清	100	400
MTD3	10/100	STD3 牛血清	100	400
MTD4	20/200	STD4 牛血清	100	400
MTD5	40/400	STD5 牛血清	100	400
MTD6	100/1000	STD6 牛血清	100	400

分析步骤

样品前处理：

Cleanert PPT 与收集板放置在一起；

加入 4 倍样品体积的沉淀剂（400 μL 乙腈）；

加入 100 μL 牛血清样本（稀释 5 倍）；

使用移液器反复吹打充分混匀样品，沉淀蛋白；

正压收集滤液用于分析。

测定

色谱条件

色谱柱：Luna Omega Polar C18 (3 × 150 mm, 3 μm, 100 Å)；

流动相：A: 0.1% 甲酸水；B: 乙腈；

流速：0.4 mL/min；

柱温：40 °C；

进样量：1 μL；

梯度程序见表 4：

表4. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	100	0
1.2	0.4	100	0
1.8	0.4	75	25
4.5	0.4	45	55
6	0.4	10	90
9	0.4	10	90
9.2	0.4	100	0
12	0.4	100	0

质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源 (ESI)

扫描方式：多反应监测正负离子模式 (MRM)

喷雾针电压：±4500 V

离子源温度：550 °C

加热器 (GS1)：40 psi

辅助加热气 (GS2)：50 psi

气帘气 (CUR)：35 psi

碰撞气 (CAD)：8 psi

为获得较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE)，目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化，优化信息参见表5。

表5. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	加和离子形式	Q1	Q3	DP/V	CE/V
Vancomycin	[M+2H] ²⁺	724.9	100.1*	36	67

		724.7	144	60	18
Ciprofloxacin	[M+H] ⁺	332.2	231*	115	50
		332.2	288.1	115	26
Moxifloxacin	[M+H] ⁺	402.2	261.1*	110	33
		402.2	364.5	110	37
Sulfamethoxazole	[M+H] ⁺	254.1	156*	65	22
		254.1	108	65	36
Isoniazid	[M+H] ⁺	138	121.1*	80	20
		138	93	80	25
Rifampin	[M+H] ⁺	823.5	791.5*	160	26
		823.5	399.1	160	35
Fluconazole	[M+H] ⁺	307	220.1*	81	25
		307	237.9	81	23
Amoxicillin	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	398.2	349.1	60	22
		398.2	381*	60	15
Cefepime	[M+H] ⁺	481.2	396.1*	70	18
		481.2	324.1	70	23
Entecavir	[M+H] ⁺	278.2	152.2	114	26
		278.2	81.1*	120	36
Lamivudine	[M+H] ⁺	230	111.9*	50	25
		230	95.1	50	51
Linezolid	[M+H] ⁺	338	296*	130	27
		338	235.1	130	30
Meropenem	[M+H] ⁺	384.1	141.1*	103	21
		384.1	254	103	23
Piperacillin	[M+Na] ⁺	540.1	398.1*	120	23
		540.1	165.1	120	23
Voriconazole	[M+H] ⁺	350.2	281.1*	100	23
		350.2	224.1	100	27
Imipenem	[M+H] ⁺	300	142	90	38
		300	98*	90	38
Teicoplanin A2-2	[M+2H] ²⁺	940.6	316.2*	115	19
		940.6	204.2	115	26
Tenofovir	[M+H] ⁺	287.9	176.1*	80	35
		287.9	206.1	80	30
Cefuroxime	[M-H] ⁻	422.9	206.7*	-60	-20
		422.9	318	-60	-10
Efavirenz	[M+H] ⁺	314.9	244.9*	-90	-23
		314.9	69	-90	-44

注：表 5 中标 “*” 为定量离子。

结果与讨论

实验发现，20 种抗生素存在着一定的性质差异，其中异烟肼、美罗培南、亚胺培南、替诺福韦、拉米夫定等化合物极性较大，普通 C18 色谱柱对其几乎无保留，出峰时间早分离差，色谱峰造成较大的容积效应。通过对色谱柱的筛选，Luna Omega Polar C18 在普通疏水相互作用的基础上增加了极性基团的修饰，增强了极性化合物在色谱柱上的保留，提高分离度，降低容积效应，化合物分离情况见图 2、3。为考察方法重现性和准确性，分别对 20 种抗生素进行精确度（RSD）和准确度的方法验证，向血清中分别添加低、中、高三种浓度的标准溶液，理论添加浓度见表 6，按照 Cleanert PPT 的前处理方式处理样本，每个添加浓度平行测定 6 次，计算回收率与精密度结果。从表 6 可得，20 种抗生素类药物添加浓度的回收率均在 65.2%~115.8%之内，精密度 RSD 在 9.6%以内，血清中抗生素类药物浓度测定方法的回收率和精密度良好，且此前处理方法具有可批量同时测定几十个样本，前处理耗时仅 15min 的优势。

表 6. 实验结果

化合物	理论加标浓度 ng/mL	检测结果 ng/mL	回收率%	RSD%
Vancomycin	500	464.30	92.9	9.2
	1000	971.51	97.2	6
	5000	4221.44	84.4	3.5
Cefepime	100	82.96	83	4.8
	500	549.40	109.9	7.9
	5000	4089.41	81.8	4.5
Meropenem	100	93.35	93.4	3.4
	500	476.12	95.2	6.9
	5000	4913.07	98.3	2.9
Imipenem	500	507.23	101.4	4.1
	1000	1014.94	101.5	2.9
	5000	5111.11	102.2	6.6
Teicoplanin A2-2	1000	832.53	83.3	9.4
	5000	5156.70	103.1	8.5
Cefuroxime	100	65.23	65.2	9.6
	500	447.98	89.6	8.8
	5000	5019.42	100.4	4.9
Ciprofloxacin	10	8.08	80.8	7.4
	50	44.85	89.7	6.5
	500	540.63	108.1	7.4

Moxifloxacin	10	9.90	99	3.8
	50	39.46	78.9	7.8
	500	490.34	98.1	3.4
Sulfamethoxazole	10	8.01	80.1	3.3
	50	45.00	90	6.9
	500	505.90	101.2	7.5
Isoniazid	10	8.56	85.6	4.2
	50	50.17	100.3	6.5
	500	485.37	97.1	7.2
Rifampin	10	7.86	78.6	3.2
	50	47.81	95.6	6.1
	500	395.41	77.9	7.4
Fluconazole	10	8.56	85.6	5.6
	50	45.53	91.1	5.6
	500	513.19	102.6	6.2
Amoxicillin	10	7.41	74.1	9.5
	50	48.35	96.7	5.9
	500	483.00	96.6	5.3
Entecavir	10	9.09	90.9	4.2
	50	53.36	112.7	7.4
	500	499.32	99.9	6.4
Lamivudine	10	8.44	84.4	7.3
	50	57.92	115.8	4.8
	500	485.29	97.1	4.8
Linezolid	10	8.17	81.7	6.2
	50	46.43	92.9	8.7
	500	505.20	101.0	6.1
Voriconazole	10	8.33	83.3	3.7
	50	49.03	98.1	7.5
	500	482.61	96.5	5.1
Piperacillin	50	37.15	74.3	6.2
	500	440.41	88.1	6.6
	1000	987.44	98.7	4.8
Tenofovir-1	50	43.73	87.5	5.1
	500	472.06	94.4	3.8
	1000	789.49	78.9	7.7

实验谱图

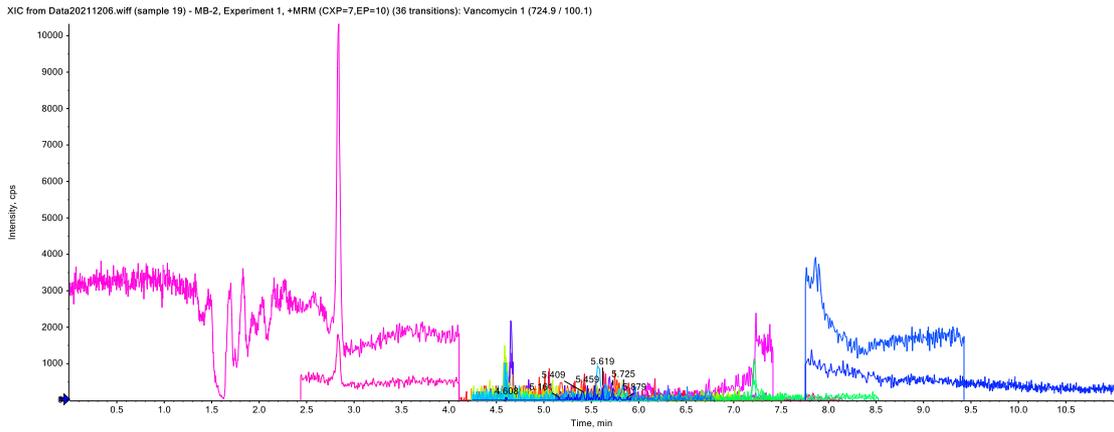


图 1. 空白样品总 XIC 色谱图

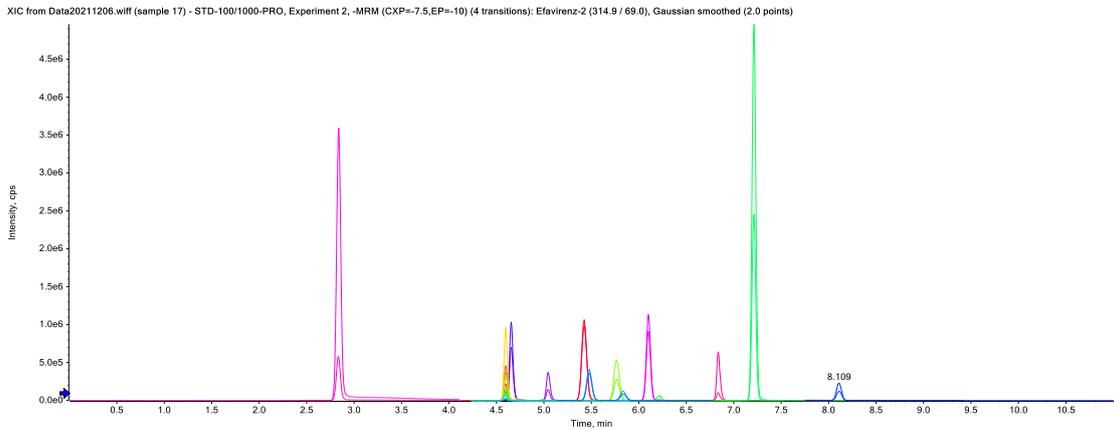
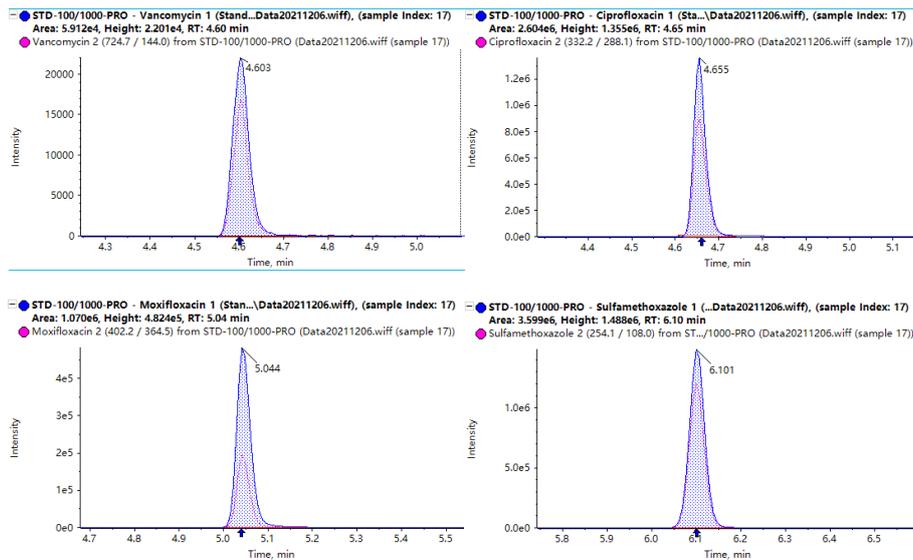
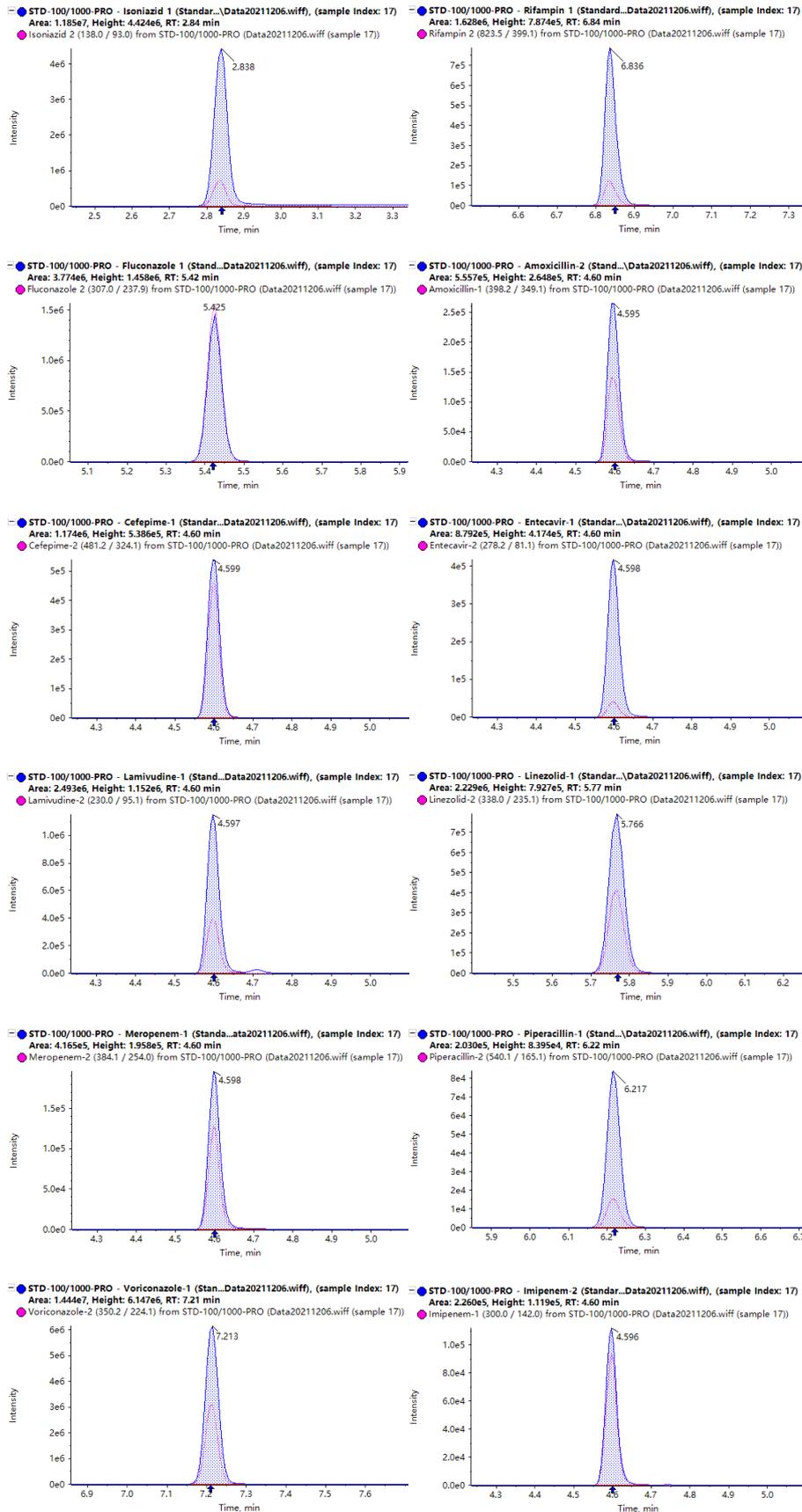


图 2. 牛血清基质加标总 XIC 色谱图





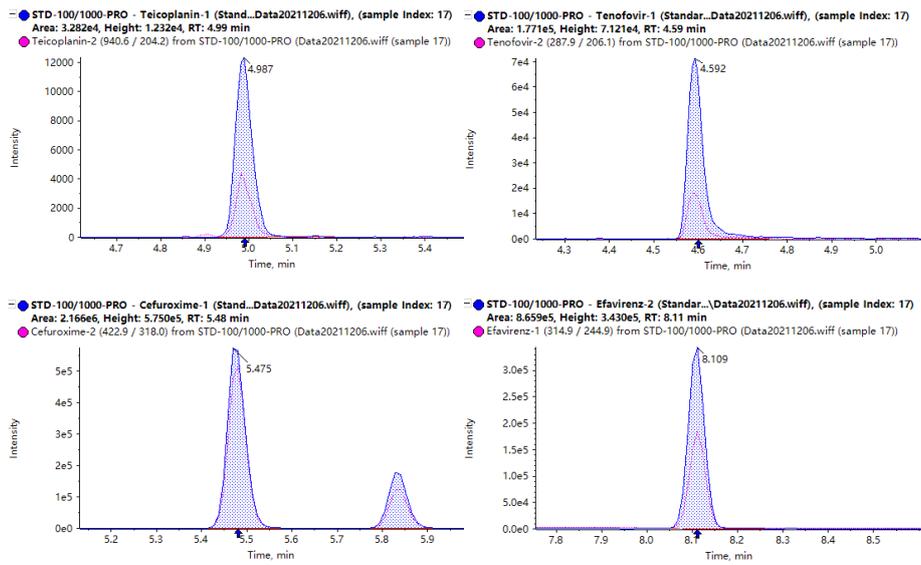


图 3.20 种抗生素提取色谱图

结论

建立经 Cleanert PPT 蛋白沉淀专用板沉淀蛋白，溶液直接上机，采用 Luna Omega Polar C18 色谱柱分离，LC/MS-MS 系统对 20 种抗生素类药物的血药浓度进行定性定量分析方法。该款色谱柱可满足极性差异较大的多组分抗生素的同时分析。且经过方法验证，血药浓度在 10~5000 ng/mL 范围内进行的 3 水平添加实验回收率均在 65.2%~115.8%间，RSD 值小于 9.6%，方法灵敏度稳定性良好。实验前处理步骤简单省时，可实现多种抗生素类药物 TDM 的自动化和高通量的同时处理。