

高效液相色谱串联质谱法测定血浆中的替加环素

周 亮

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

1. 引言

替加环素 (Tigecycline) 又名 9-叔丁基甘氨酸胺基米诺环素、丁甘米诺环素, 是首个被批准用于临床的静脉内给药的甘氨酸四环素类抗生素, 具有超广谱的抗菌活性, 包括革兰氏阳性和革兰氏阴性的好氧菌及厌氧菌等临床分离的重要致病菌。替加环素的作用机制与四环素类抗生素相似, 都是通过与细菌 30S 核糖体结合, 阻止转移 RNA 的进入, 使得氨基酸无法结合成肽链, 最终起到阻断细菌蛋白质合成, 限制细菌生长的作用。替加环素能够克服或限制细菌的外排泵和核糖体保护两种耐药机制的作用, 不易产生耐药性, 其广泛的组织分布和较长的清除半衰期的药动学性质令人乐观; 同时对于肾功能紊乱及需进行血液透析的患者, 不必进行剂量和时间上的调整。2005 年 6 月美国 FDA 批准用于成人复杂皮肤及软组织感染和成人复杂的腹内感染, 但在国内尚处于临床研究、申报生产阶段。本实验建立了测定血浆中替加环素的 LCMSMS 方法, 采用适当的样品前处理方法, 血浆中的杂质不干扰样品的测定, 具有灵敏度高, 重现性较好等特点。

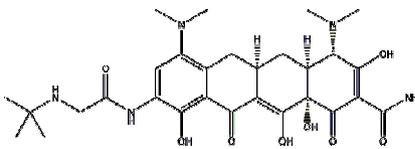
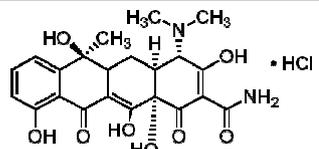


2. 实验部分

2.1 仪器与试剂:

TSQ Vantage 三重四极杆串联质谱仪 (赛默飞世尔科技 Thermo Fisher Scientific 公司), 配置有电喷雾电离源 (ESI); Dionex Ultimate 3000 RSLC 超高压液相色谱
标准品: 替加环素和内标盐酸四环素纯度均大于 98%, 信息见表 1。用甲醇溶解并配制成 1.0 mg/mL 标准储备液, 再根据需要稀释成适当浓度的混合标准工作液。其他试剂均为 HPLC 色谱纯。

表 1. 待测化合物信息

化合物名称	分子量	分子式	结构式
替加环素	585.65	$C_{29}H_{39}N_5O_8$	
盐酸四环素 (内标)	480.9	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	

2.2 仪器方法:

2.2.1 液相条件:

色谱柱: Hypersil GOLD C18, 100mm × 2.1mm;

梯度洗脱程序见表 2, 进样量 5 μ L。

表 2. 液相色谱梯度条件

时间 /min	水 (0.2% 甲酸 +5mM 甲酸铵)	乙腈	流速 / μ L/min
0.00	95	5	400
3.00	20	80	400
3.50	20	80	400
3.60	95	5	400
5.00	95	5	400

2.2.2 质谱条件:

电喷雾电离源 (ESI), 正离子模式; 选择反应监控 (SRM) 扫描模式, 喷雾电压: 3000V; 气化器温度 320 $^{\circ}$ C, 离子

传输管温度: 350 $^{\circ}$ C; 氮气作为鞘气和辅助气, 其中鞘气为 35arb, 辅助气为 10arb, 氩气用作碰撞气, 碰撞压力为 1.5mTorr; 选择反应监测 (SRM), 离子对信息见表 3。

表 3. SRM 模式中的离子对信息

化合物	母离子 (Parent)	子离子 (Product)	碰撞能量 (CE)	S-Lens 电压
替加环素	586.126	513.2	26	145
	586.126	569.2	19	145
四环素 (内标)	445.122	410.2	17	122

其中, 替加环素选取 m/z 513.2, 四环素选取 m/z 410.2 的离子作为定量离子。

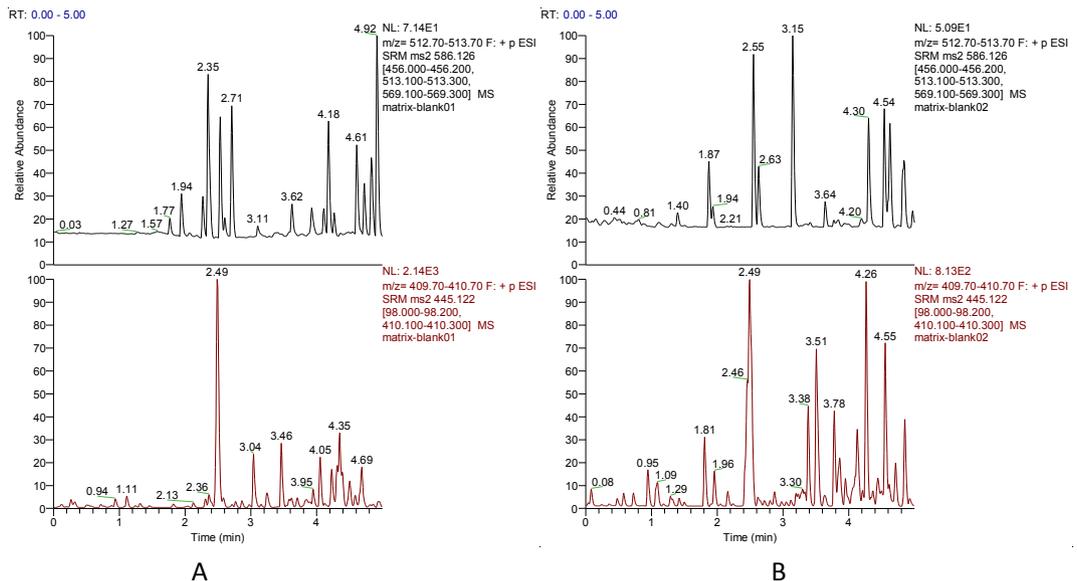
2.3 血浆样品处理方法:

向 0.2mL 血浆中加入 10 μ L 内标液 (100ng/mL 四环素溶液), 加入 100 μ L 20% 三氯乙酸 (TCA) 沉淀蛋白, 涡旋混合 1min, 离心 10min (13000r/min), 取 5 μ L 上清液进样分析。

3. 方法学验证结果分析

3.1 特异性:

本实验所用的检测条件下, 替加环素在 1.98min 左右出峰, 内标四环素在 2.49min 左右出峰, 峰形良好, 无杂质峰干扰测定, 基线平稳 (见图 1)。本方法具有较高的特异性, 能准确测定血浆中替加环素的浓度, 灵敏度较高。



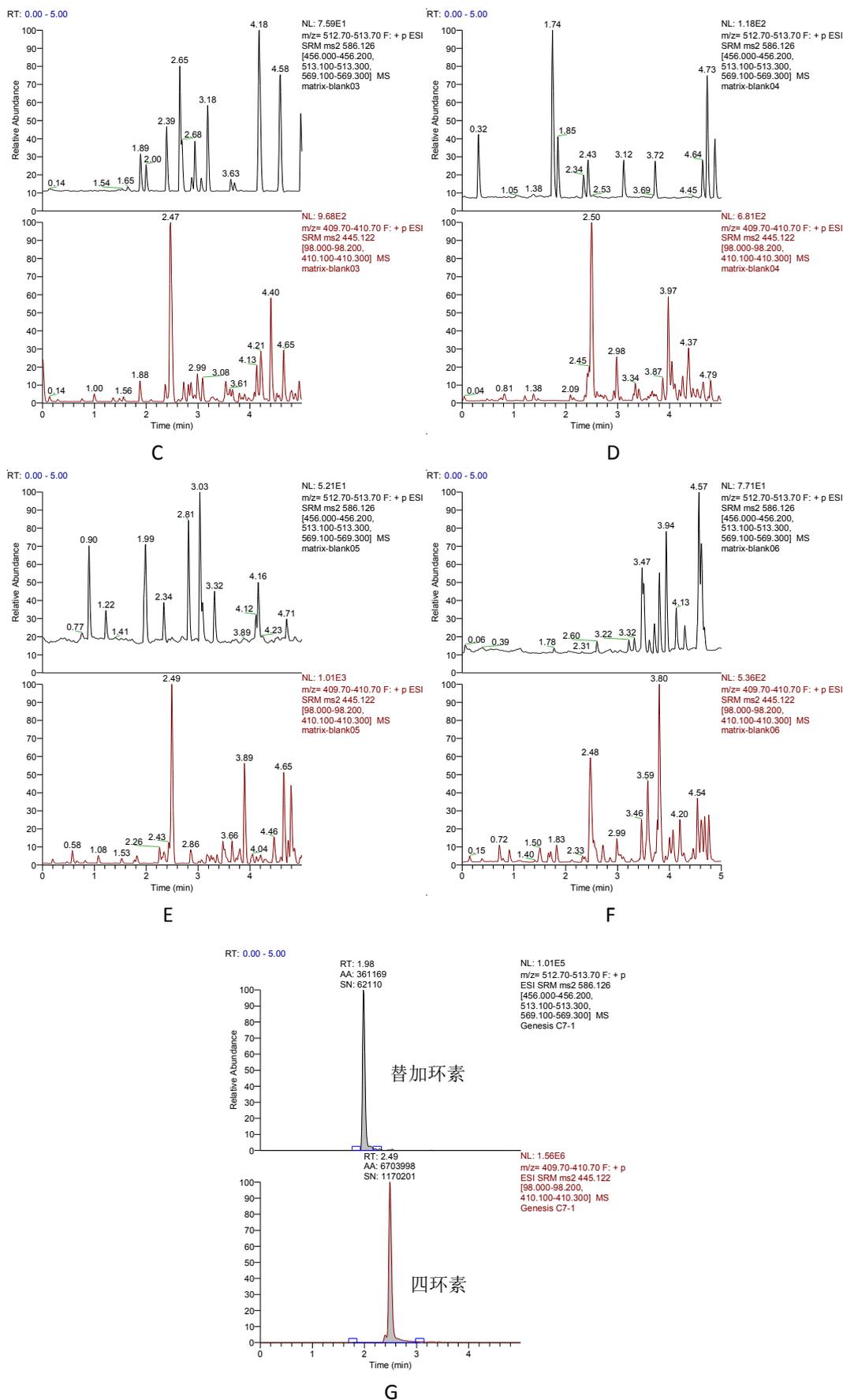


图 1. 血浆中替加环素及内标四环素的色谱图

(A-F) : 6 个不同来源的空白血浆的色谱图;

(G) : 空白血浆加入已知浓度替加环素和四环素的色谱图

3.2 最低检出限 (LLOD)

取 10 μ L 替加环素标准溶液加入到空白血浆中，配成 0.2mL 的浓度为 100ppt 的标准含药血浆，按“血浆样品处理”

项下操作，记录色谱图，得到替加环素血浆基质前加标的最低检出限，S/N=6，结果图 2。

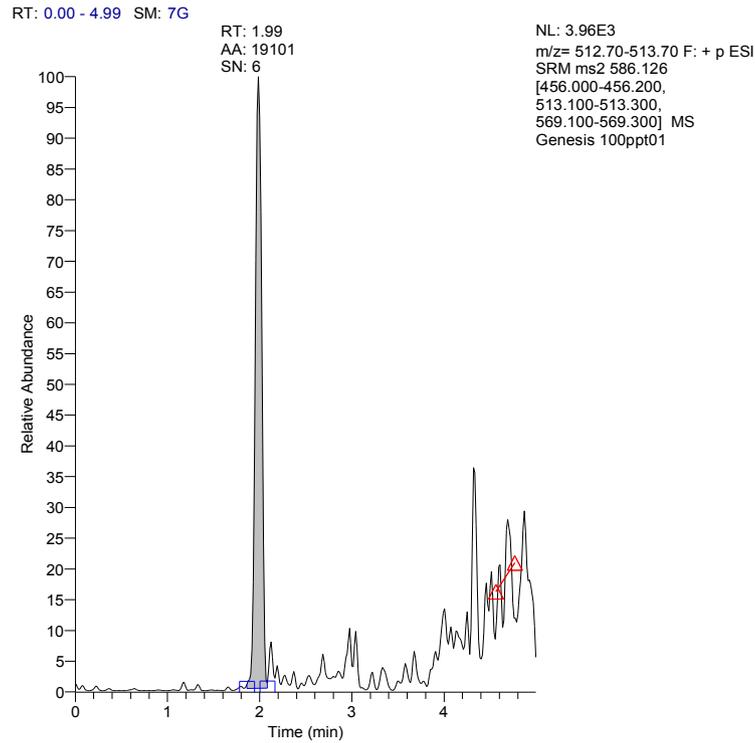


图 2. 替加环素 LLOD 的色谱图

3.3 标准曲线和定量范围

将 1mg/mL 替加环素溶液逐级稀释成一系列浓度，分别取 10 μ L 加入到空白血浆中，配成 0.2mL 的浓度分别为 5,10,50,100,500,1000,2000ppb 的标准含药血浆，按“血浆样

品处理”项下操作，记录各标准点和内标的峰面积，以浓度为横坐标，分析物与内标的峰面积比值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归计算，求得直线回归方程即为标准曲线，平行操作 3 次，结果见表 4，图 3。

表 4. 替加环素标准曲线 (n=3)

浓度 (ng/ml)	标曲 1	标曲 2	标曲 3
5	0.050	0.118	0.101
10	0.146	0.218	0.213
50	1.021	1.231	1.118
100	2.228	2.442	2.366
500	11.296	11.775	12.388
1000	24.949	25.327	26.023
2000	50.045	54.681	49.617
斜率	0.0234082	0.0249372	0.0244538
截距	-0.0722992	-0.0114345	-0.0243567
相关系数 r^2	0.9955	0.9957	0.9978

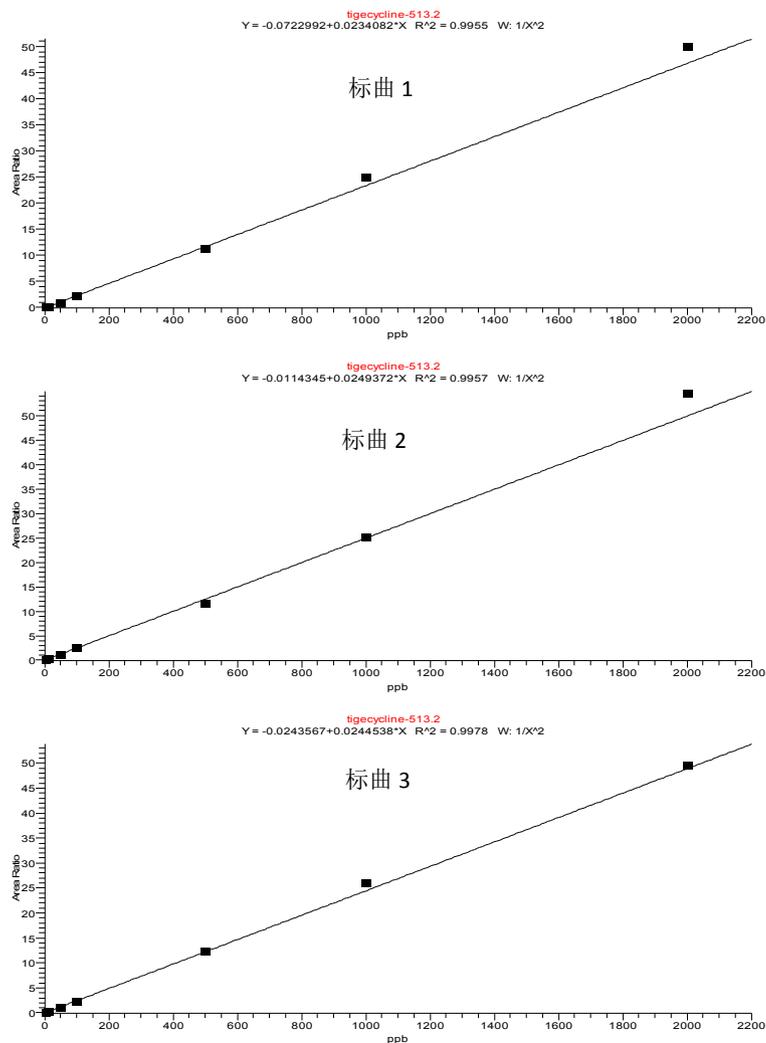


图 3. 替加环素标准曲线图

3.4 精密度和准确度

分别取不同量的替加环素加入到空白血浆中，配成 0.2mL 的浓度分别为 10，100，1600ppb 的标准含药血浆，按“血

浆样品处理”项下操作，在批内和批间对每种浓度各做 5 份样品，记录色谱图，计算浓度，求得批内和批间精密度的结果见表 5。

表 5. 血浆中替加环素日内和日间精密度的 (n=5)

浓度 (ng/ml)	10	100	1600
第一批	9.07	104.10	1578.55
	9.27	99.92	1537.86
	9.25	100.67	1553.10
	9.13	100.75	1491.25
	9.08	98.08	1540.97
第二批	9.30	99.00	1563.22
	9.30	97.04	1536.49
	9.41	96.88	1517.18
	9.07	99.11	1537.63
	9.20	98.32	1501.23

浓度 (ng/ml)		10	100	1600
第三批		9.03	98.43	1485.43
		9.54	96.66	1534.23
		9.60	97.44	1470.60
		9.24	92.56	1452.82
		9.62	89.87	1551.82
Mean		9.27	97.92	1523.49
批内	SD	0.09	2.18	31.78
	RSD%	1.03	2.17	2.06
批间	SD	0.19	3.36	35.96
	RSD%	2.10	3.43	2.36

分别取不同量的替加环素加入到空白血浆中，配成 0.2mL 5 份样品，记录色谱图，计算浓度，并与加入的标准浓度的浓度分别为 10，100，1600ppb 的标准含药血浆，按“血浆样品处理”项下操作，在日内和日间对每种浓度各做 5 份样品，记录色谱图，计算浓度，并与加入的标准浓度比较，结果见表 6。

表 6. 血浆中替加环素准确度 (n=5)

浓度 (ng/ml)	10	100	1600
准确度 (%)	101.26	106.11	95.59
	94.95	104.31	94.89
	96.48	101.34	99.75
	91.80	100.44	98.40
	90.78	99.55	96.54
Mean	95.05	102.35	97.03
SD	4.16	2.76	2.01
RSD (%)	4.38	2.70	2.07

3.5 稳定性

分别取不同量的替加环素加入到空白血浆中，配成 0.2mL 5 份样品，记录色谱图，计算浓度，并与加入的标准浓度的浓度分别为 10，100，1600ppb 的标准含药血浆，按“血浆样品处理”项下操作，对每种浓度各做 25 份样品，5 份处理后在自动进样器中放置 24h；5 份在室温放置 4h 后按“血浆样品处理”项下操作，在日内和日间对每种浓度各做 5 份样品，记录色谱图，计算浓度，并与加入的标准浓度比较，结果见表 6。

后 -20℃ 冷冻后取出自然解冻，再冷冻再解融（反复冻融 3 个循环）后按“血浆样品处理”项下进样分析；5 份在 -80℃ 冷冻两周后按“血浆样品处理”项下操作，进样分析；5 份在 -80℃ 冷冻四周后按“血浆样品处理”项下操作，进样分析，结果见表 7。

表 7. 血浆中替加环素的稳定性 (n=5)

浓度 (ng/ml)	10		100		1600	
□	实测值	偏差 %	实测值	偏差 %	实测值	偏差 %
冻融 3 次	9.76	2.37	104.04	-4.04	1618.47	-1.15
	10.22	-2.15	101.13	-1.13	1603.48	-0.22
	9.94	0.63	102.65	-2.65	1612.28	-0.77
	10.27	-2.66	99.82	0.18	1633.44	-2.09
	9.82	1.83	102.69	-2.69	1616.87	-1.05
室温 4h	10.27	-2.65	101.93	-1.93	1594.84	0.32
	10.18	-1.84	102.78	-2.78	1606.27	-0.39
	10.20	-1.98	100.90	-0.90	1624.87	-1.55
	10.07	-0.69	100.96	-0.96	1637.71	-2.36
	9.77	2.27	103.58	-3.58	1578.93	1.32

浓度 (ng/ml)	10		100		1600	
□	实测值	偏差 %	实测值	偏差 %	实测值	偏差 %
自动进样器 24h	9.83	1.69	102.39	-2.39	1607.97	-0.50
	10.19	-1.93	100.19	-0.19	1642.46	-2.65
	9.94	0.56	100.64	-0.64	1628.57	-1.79
	9.93	0.65	101.04	-1.04	1580.12	1.24
	10.23	-2.29	100.87	-0.87	1603.81	-0.24
冷冻两周	9.10	8.96	102.25	-2.25	1676.67	-4.79
	9.56	4.38	101.03	-1.03	1630.28	-1.89
	9.74	2.60	103.96	-3.96	1660.77	-3.80
	9.88	1.25	103.01	-3.01	1708.52	-6.78
	10.49	-4.87	101.44	-1.44	1627.99	-1.75
冷冻四周	9.48	5.16	102.92	-2.92	1689.90	-5.62
	9.96	0.35	94.86	5.14	1608.88	-0.56
	9.57	4.30	102.86	-2.86	1639.73	-2.48
	9.78	2.18	104.11	-4.11	1637.03	-2.31
	10.06	-0.58	101.81	-1.81	1628.94	-1.81

3.6 回收率

分别取不同量的替加环素加入到空白血浆中，配成 0.2mL 的浓度分别为 10, 100, 1600ppb 的标准含药血浆，按“血浆样品处理”项下操作，记录样品峰面积与内标峰面积

$f_x(f_x=As'/A_i)$ ；10, 100, 1600ppb 样品直接进样后记录峰面积与内标峰面积比值 $f_s(f_s=As/A_i)$ ，计算 f_x 和 f_s 的比值即得到替加环素的回收率，平行操作 5 次，结果见表 8。

表 8. 血浆中替加环素的回收率 (n=5)

浓度 (ng/ml)	10	100	1600
f_x	0.19	2.42	35.93
	0.19	2.47	36.34
	0.20	2.37	34.74
	0.20	2.40	35.61
	0.21	2.40	35.24
Mean	0.20	2.41	35.57
f_s	0.21	2.33	35.66
	0.21	2.23	36.94
	0.21	2.31	36.57
	0.21	2.32	36.64
	0.21	2.24	35.36
Mean	0.21	2.29	36.23
回收率 %	93.96	105.63	98.17

4. 方法学小结

本实验建立了测定血浆中替加环素的 LC-MS/MS 测定方法，采用适当的样品前处理方法，血浆中的杂质不干扰样品的测定，标准曲线线性范围为 5ppb-2000ppb，线性关系良好，最低定量限为 5ppb；方法学确证的高、中、低三种

浓度的批间和批内变异均小于 10%；准确度为 95.05%-102.35%；回收率为 93.96%-105.63%；血浆中的替加环素在室温放置 4h、反复冻融 3 次、处理后的样品在自动进样器放置 24h 以及在 -80℃ 冰箱冷冻两周和四周，样品依然稳定，符合生物样品测定要求。

5. 血浆样品测定结果

受试者连续多次给予药物替加环素后，血浆中的替加环素浓度见表 9。

表 9. 受试者的替加环素血浆药物浓度

样品编号	血药浓度 (ng/mL)
8-1	1226.84
8-2	973.62
8-3	774.70
8-4	630.62
8-5	323.14
8-6	418.15
8-7	281.33
8-8	228.94
8-9	345.12
8-10	876.75
8-11	976.61
8-12	695.42
8-13	572.79
8-14	556.31
8-15	416.21
8-16	1966.99
8-17	614.43
8-18	450.16

6. 结论:

TSQ Vantage 三重四极杆液质联用系统检测血浆中替加环素具有灵敏度高、特异性好的优点，检测限可以做到 100ppb；该方法具有宽的线性范围（5ppb-2000ppb），良好

的精密度和准确度；同时使用 20% 的三氯乙酸沉淀蛋白的方法处理血浆样品，简单快捷，空白基质没有干扰，回收率可以达 93.96%-105.63%，证明该方法检测血浆中的替加环素具有很好的适用性。

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC