

基于四极杆-线形离子阱串联质谱技术测量血清万古霉素

谢洁, 李姿颖, 屈子裕, 易可可, 刘梅英, 黄泽建, 江游, 戴新华, 方向

(中国计量科学研究院, 北京市, 100029)

摘要: 临床诊断领域对质谱精准测量需求日益增强, 面对国外垄断, 本团队研发了离子阱选择性富集复杂基质中痕量目标物的新技术新方法, 研制了拥有自主知识产权的四极杆-线形离子阱 (quadrupole-linear ion trap, Q-LIT) 串联质谱仪, 本研究采用自主研发 Q-LIT 液相色谱-串联质谱仪, 建立了准确测量血清中万古霉素的同位素稀释质谱法。样品经过蛋白沉淀和液液萃取后, LC-MS/MS 分析。万古霉素在 1.56~50 mg/L 线性范围内, 线性方程为 $y=0.4003x-0.26521$, 线性相关系数 $R^2>0.99$, 检出限和定量限为 12.19 和 24.38 ng/mL, 日内和日间精密度范围分别为 5.71%~6.41% 和 2.82%~7.09%, 血清样本添加回收率为 89.12%~96.89%, 变异系数 $\leq 7.92\%$ 。测定低、中、高质控品对方法进行了验证, 结果均在靶值范围内, 说明所建立的方法准确可靠。采用 QLIT-6610MD 和 AB API4000 两台液质联用仪测定 10 例真实临床血清样本, 万古霉素含量在 5.52~36.01 mg/L 范围内, 且两台仪器测定结果可比, 证明自主研发的 QLIT-6610MD 可达到三重四极质谱仪定量水平。

关键词: 四极杆;线形离子阱;串联质谱技术;万古霉素;血清

Determination of Vancomycin in Serum Based on Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry

Xie Jie, Li Ziyang, Qu Ziyu, Yi Keke, Liu Meiyang, Huang Zejian, Jiang You, Dai Xinhua, Fang

Xiang

(National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

Abstract: The demand for accurate mass spectrometry measurement in the field of clinical diagnosis is increasing. In the face of foreign monopoly, the team has developed new technologies and new methods for the selective enrichment of trace targets in complex matrices by ion traps, and has developed a quadrupole-linear ion trap (quadrupole-linear ion trap, Q-LIT) tandem mass spectrometer. In this study, a home-built Q-LIT liquid chromatography-tandem mass spectrometer was developed to accurately measure vancomycin in serum by isotope dilution mass spectrometry. After protein precipitation and liquid-liquid extraction, the samples were analyzed by LC-MS/MS.

Vancomycin was in the linear range of 1.56~50 mg/L, the linear equation was $y=0.4003x-0.26521$, the linear correlation coefficient $R^2>0.99$, and the limits of detection and quantitation were 12.19 and 24.38 ng/mL. Intra-day and inter-day precision ranges were 5.71%-6.41% and 2.82-7.09%, respectively. The recoveries of serum samples were 89.12%-96.89%, coefficient of variation $\leq 7.92\%$. The method was verified by the determination of low, medium and high quality control, and the results were all within the range of target values, indicating that the established method was accurate and reliable. QLIT-6610MD and AB API4000 were used to determine 10 real clinical serum samples. The content of vancomycin was in the range of 5.52~36.01 mg/L, and the results of the two instruments were comparable, which proved that the home-made QLIT-6610MD could reach the quantitative level of triple quadrupole-mass spectrometer.

Keywords: Quadrupole; Linear ion trap; Tandem mass spectrometry; Vancomycin; Serum

1 研究背景

万古霉素是一种糖肽类抗生素,对多种病原菌有杀菌作用,比如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠球菌、化脓链球菌等,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的一线用药^[1,2]。万古霉素是一种时间依赖型抗生素^[3,4],其杀菌作用与抗生素后效应及血药浓度高于最低抑菌浓度的持续时间有关。万古霉素的治疗窗口很窄^[5],个体化差异明显,相关研究表明,万古霉素血药谷浓度过低,病死率越高,可能与未达到治疗效果有关;而血药浓度过低($<10\text{ mg/L}$)与出现万古霉素中介金黄色葡萄球菌和异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌有直接关系。同时万古霉素治疗指数小,血药浓度过高,可导致耳毒性和肾毒性。因此,监测万古霉素血药浓度和指导临床用药显得尤为重要。

当前万古霉素的主要检测方法有免疫法^[6]、高效液相色谱法^[7]和液相色谱-串联质谱法^[8,9](liquid chromatograph-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。LC-MS/MS法具有高准确度、高特异性的特点,且当前主要基于三重四级杆串联质谱技术进行检测,而离子阱质谱构造简单、灵敏度高。中国计量科学研究院-国家市场监管技术创新中心(质谱)研发了一种新型的四极杆-线形离子阱质谱装置与技术^[10],用单个线形离子阱代替三重四极杆后端的碰撞池-四极杆 3,保证精确定量的基础上简化了仪器结构,有效降低了空间电荷干扰,显著提高了离子阱分析复杂基质样本的定量能力。

本研究拟采用自主研制四极杆-线形离子阱液相色谱质谱联用法测量血清万古霉素，并与进口三重四极杆串联质谱仪的测量结果进行对比，以期为临床质谱分析提供新选择，助力国产质谱仪技术和应用的快速发展。

2 LC-MS/MS 方法建立

万古霉素为糖肽类抗生素，其结构中含有多个苯环结构，及少量碱性基团，电离后产生的碎片离子显示出较差的相应强度^[11]。甲酸、乙酸、甲酸铵和乙酸铵是常用的可挥发性添加剂，用于提高 ESI 电离效率。为提高万古霉素在电喷雾离子源下的电离效率，本研究比较了在流动相体系中添加不同浓度甲酸、乙酸、乙酸铵对万古霉素响应强度的影响，响应强度如图 1 所示。与仅添加 0.1%甲酸相比，在添加 0.1%甲酸的基础上添加 0.5mmol/L 乙酸铵时相应反而显著下降。这可能是缓冲盐在 ESI 离子源内得失电荷的能力往往强于待测物，与待测物形成竞争，从而使样品中待测物离子相应强度降低^[12]。当添加 0.1%乙酸时，较添加 0.1%甲酸时相应响度增加 163.94%。由于建立液相方法时使用超纯水配制的万古霉素标品进行优化，但在进行人血清基质的实际样本检测过程中，发现添加 0.1%乙酸的流动相导致万古霉素在 0.5min 时部分出峰，难以准确定量。综上所述，使用 0.1%甲酸时，色谱峰形完整且尖锐对称。因此，本研究选择添加 0.1%甲酸作为流动相条件。

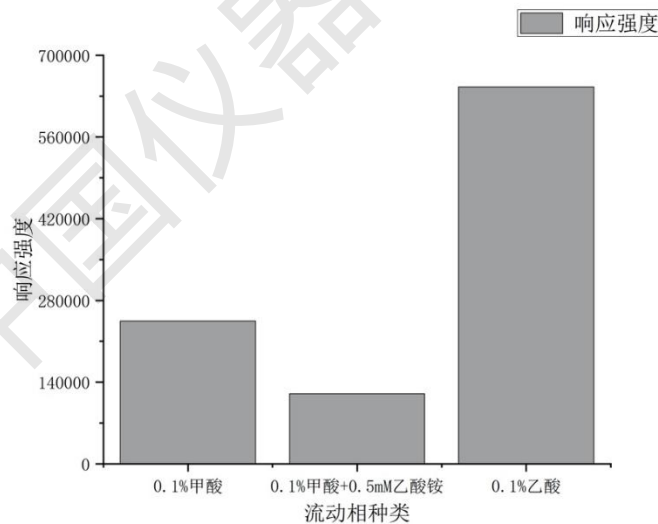


图 1 不同流动相种类对响应强度影响

在确定万古霉素的最优液相色谱方法后，为进一步提高万古霉素的响应强度，通过外置注射泵以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流动注射模式下对 QLIT-6610MD 进行质谱条件的优化。优化了离子源温度、大气压接口温度、碎裂 q 点和碎裂能量，根据目标离子的最佳响应强度值选择对应的参数。如图 2A、2B 所示，离子源温度和大气压接口温度在到达 300 $^{\circ}\text{C}$ 后依次降低。本方法

中选用电喷雾（ESI）离子源。溶液在离子源与大气压接口装置中加热后形成带电雾滴，并在电场作用下加速运动后去除溶剂，使溶液中分子所带电荷在去溶时被保留在分子上，形成的带电离子在真空与电场的作用下进入四级杆与线形离子阱中^[10]。因此，选择合适的离子化温度对提高万古霉素的离子化效率至关重要。离子光学碎裂参数为设置质谱条件的重要参数，其可使待测物中易脱落的结构掉落，最佳的碎裂参数使母离子经碎裂而产生最优子离子。碎裂 q 点如图 2C 所示，由 0.1 增加至 0.14 时响应值最佳，碎裂能量如图 2D 所示，为 35% 时万古霉素响应值达到峰值。综上所述，当选择离子源与大气压接口温度均为 300°C，碎裂 q 点为 0.14，碎裂能量为 35% 时可获得最优的响应值。

最优质谱参数见表 1，所得提取离子色谱图如图 3 所示。

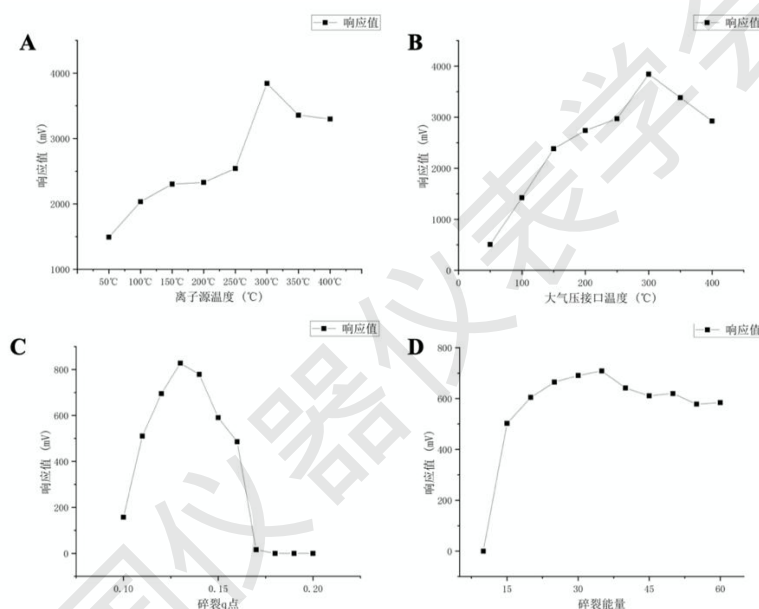


图 2 质谱参数优化

表 1 质谱参数

化合物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	QLIT-6610MD			AB API4000		
			富集时间	碎裂	碎裂能量	去簇电压	碰撞能量	驻留时间
			ms	q 点	%	V	V	ms
万古霉素	725.4	144.0	300	0.14	35	61	21	100
万古霉素内标	690.8	144.0	200			92	22	100

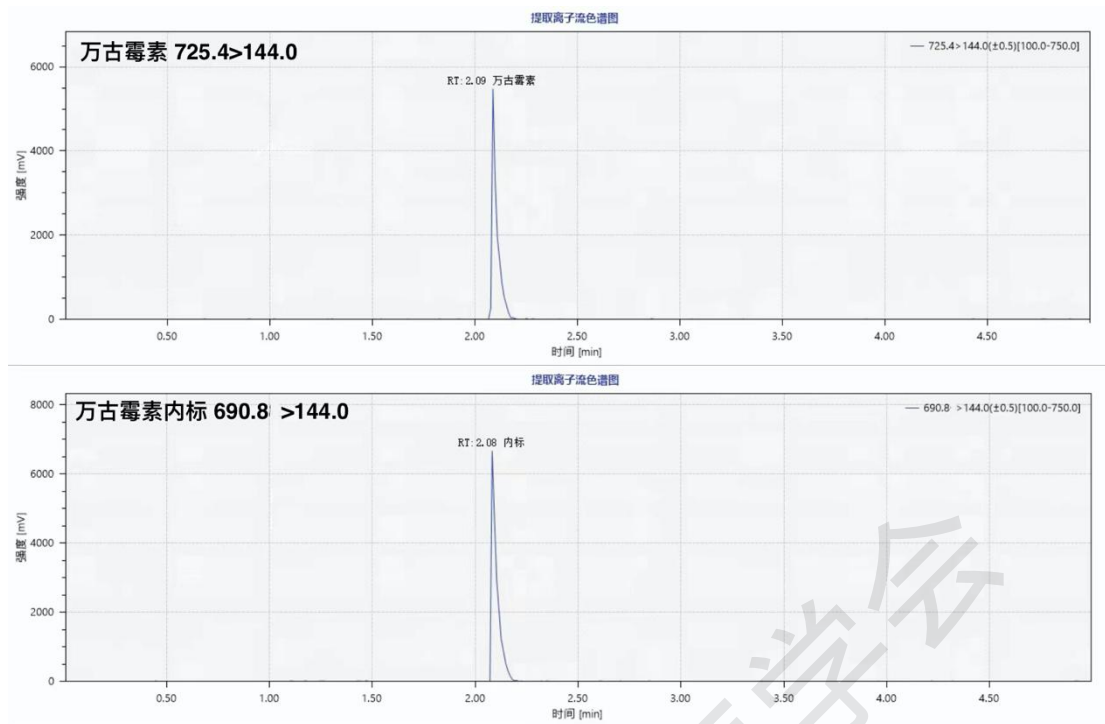


图3 万古霉素及其内标的提取离子色谱图

3 方法确证

线性关系 以标准品与内标含量的比为横坐标（x），标准品与内标峰面积的比为纵坐标（y），做线性回归分析，万古霉素线性范围为 1.56~50 mg/L，线性方程为 $y=0.4003x-0.26521$ ，决定系数 $R^2 \geq 0.99$ 。

精密度 精密度由变异系数（coefficient of variation, CV）表示，对低、中、高质控样品重复测定 3 次，连续测定 3 天，结果见表 2，万古霉素的日内和日间精密度范围分别为 5.71%~6.41%和 2.82%~7.09%。

准确度 准确度由回收率表示，将万古霉素标准品添加至人血清样本中获得浓度为 10、20、40 mg/L 的三个低中高回收率分析样本，并用未添加标准品的血清作为空白组，每个浓度分别测量 3 组样本，每组样本重复测定 3 次，从表 2 结果可见，万古霉素的低、中、高浓度样本回收率分别为 89.12%、91.68%和 96.89%，CV 值分别为 2.78%、7.92%、2.10%。

检出限（LOD）和定量限（LOQ） 以 3 倍信噪比（S/N）作为检出限（LOD），10 倍信噪比作为定量限（LOQ），且满足重复测定 5 次峰面积 $CV \leq 15\%$ ，如表 2 所示，万古霉素的 LOD 和 LOQ 分别为 12.19 和 24.38 ng/mL。

表 2 方法确证结果

化合物	精密度						回收率 (CV) %			检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
	低质控 CV, %		中质控 CV, %		高质控 CV, %		低	中	高		
	日内 (n=3)	日间 (n=3)	日内 (n=3)	日间 (n=3)	日内 (n=3)	日间 (n=3)					
万古霉素	6.41	2.82	5.71	4.79	5.93	7.09	89.12 (2.78)	91.68 (7.92)	96.89 (2.10)	12.19	24.38

4 方法验证

对低、中、高质控样品重复测定 3 组，每组重复进样 3 次，结果见表 3，低、中、高质控样品的测定结果分别为 4.71、10.94、39.59 mg/L，CV 值分别为 4.49%、5.71%、5.93%。因此，使用质控品对所建立的方法进行验证，结果均在靶值范围内，证明方法准确可靠。

表 3 质控品验证结果

化合物	类型	QLIT-6610MD		靶值 (mg/L)	靶值范围 (mg/L)
		检测结果 (mg/L)	变异系数 CV/%		
	低质控	4.71	4.49	4.13	3.31-4.97
万古霉素	中质控	10.94	5.71	9.48	7.58-11.37
	高质控	39.59	5.93	40.87	32.69-49.05

5 实际样本检测

分别采用自主研制 QLIT-6610MD 和 AB API4000 两台液质联用仪测定 10 例人血清样品，万古霉素含量在 5.52~36.01 mg/L 范围内，且两台仪器测定结果可比，说明自主研制的 QLIT-6610MD 可达到三重四极质谱仪定量水平。

6 结论

本研究采用自主研制的 QLIT-6610MD 液相色谱-串联质谱仪，建立了准确测量血清中万古霉素的同位素稀释质谱法。万古霉素在 1.56~50 mg/L 线性范围内，线性方程为 $y=0.4003x-0.26521$ ，线性相关系数 $R^2>0.99$ ，检出限和定量限为 12.19 和 24.38 ng/mL，精密

度优于 7.09%，血清样本添加回收率范围为 89.12%~96.89%，变异系数≤7.92%。测定低中高质量控品对方法进行了验证，结果均在靶值范围内。采用 QLIT-6610MD 和 AB API4000 两台液质联用仪测定 10 例临床血清样本，万古霉素含量为 5.52~36.01 mg/L，且两台仪器测定结果可比，说明自主研发 QLIT-6610MD 测定结果准确可靠，达到三重四极质谱仪定量水平。

参考文献:

- [1] Schmitt V, Szeitz A, Klassen T L, 等 . An Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Vancomycin Requiring Only 2 μ L of Rabbit Serum[J]. American Journal of Analytical Chemistry, Scientific Research Publishing, 2017, 8(9): 553–563.
- [2] Sauter M, Uhl P, Foerster K I, 等 . An ultra-sensitive UHPLC-MS/MS assay for the quantification of orally administered vancomycin in plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 174: 633–638.
- [3] Parker S L, Guerra Valero Y C, Ordóñez Mejía J L, 等. An LC–MS/MS method to determine vancomycin in plasma (total and unbound), urine and renal replacement therapy effluent[J]. Bioanalysis, 2017, 9(12): 911–924.
- [4] Chen X, Du L, Liu M. Development, validation, and application of an UPLC-MS/MS method for vancomycin, norvancomycin, methotrexate, paclitaxel, and imatinib analysis in human plasma[J]. Annals of Clinical Biochemistry, Thousand Oaks: Sage Publications Inc, 2022, 59(4): 253–263.
- [5] 康雯婷, 刘敬媛, 文江平, 等. LC-MS/MS 检测血清万古霉素浓度方法的建立及评价[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(06): 404–410.
- [6] 师亚玲, 丰航, 廉江平, 等. 酶放大免疫法与荧光免疫层析法检测万古霉素血液浓度的对比研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(01): 168–171.
- [7] 黄晓会, 刘艳, 张健. HPLC 法测定人血清中万古霉素及去甲万古霉素浓度及临床应用[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(02): 92–94.
- [8] da Silva A C C, de Lima Feltraco Lizot L, Bastiani M F, 等. Ready for TDM: Simultaneous quantification of amikacin, vancomycin and creatinine in human plasma employing ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Clinical Biochemistry, 2019, 70: 39–45.

- [9] 易可可, 谢洁, 龚晓云, 等. 液相色谱-串联质谱应用研究进展[J]. 计量科学与技术, 2021(02): 7-15+6.
- [10] Fang X, Xie J, Chu S, 等. Quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry system for clinical biomarker analysis[J]. Engineering, 2021: S2095809921000138.
- [11] 张雷, 姚鸿萍, 程晓亮. LC-MS/MS 法同时测定人血浆中万古霉素和去甲万古霉素的质量浓度[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(01): 29-35.
- [12] 谢洁, 易可可, 高文静, 等. 基于四极杆-线形离子阱串联质谱技术测量血清 25OHD[J]. 质谱学报, : 1-11.

中国仪器仪表学会