

LC-MS/MS法测定人血浆中替加环素的浓度及其临床应用^Δ

梅升辉^{1*}, 罗旭颖², 李倩², 杨莉¹, 赵志刚¹, 朱乐亭¹, 石广志^{2#}(1.首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100050; 2.首都医科大学附属北京天坛医院ICU, 北京 100050)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)05-0612-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.05.11

摘要 目的:建立测定人血浆中替加环素(TGC)浓度的方法。方法:血浆样品经乙腈沉淀后,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定,以d9-TGC为内标,色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为水(含0.05%三氟乙酸)-乙腈,梯度洗脱,流速为0.6 ml/min,柱温为40℃,采用电喷雾离子源,以多反应监测方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为m/z 586.3→513.2(TGC)、m/z 595.3→514.3(内标)。结果:TGC血药浓度在25~2 000 ng/ml范围内线性关系良好(r=0.999 8),定量下限为25 ng/ml;日内、日间RSD为3.15%~7.23%,相对偏差(RE)为-4.53%~10.48%;血浆样品在经历3次冻融循环、室温和自动进样器中各放置24 h、冷冻放置42 d等条件下均稳定,RSD<15%。临床检测1例泛耐药菌感染患者体内TGC血药浓度为0~438.0 ng/ml(给药后0~12 h)。结论:该方法准确、灵敏、专属性强,可用于临床TGC血药浓度监测及药动学研究。

关键词 液相色谱-串联质谱法;替加环素;血药浓度;临床应用

Determination of Tigecycline in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Clinical Application

MEI Shenghui¹, LUO Xuying², LI Qian², YANG Li¹, ZHAO Zhigang¹, ZHU Leting¹, SHI Guangzhi²(1.Dept. of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2.Dept. of Intensive Care Unit, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of tigecycline (TGC) in human plasma. METHODS: After precipitated by acetonitrile, the plasma sample was determined by LC-MS/MS. Using d9-TGC as internal standard, Kromasil C₁₈ column was used with mobile phase consisted of water (containing 0.05% TFA)-acetonitrile (gradient elution) at flow rate of 0.6 ml/min, column temperature of 40℃. The ion transitions were performed under ESI positive MRM model at m/z 586.3→513.2 and m/z 595.3→514.3 for TGC and internal standard, respectively. RESULTS: The linear range of TGC was 25-2 000 ng/ml (r=0.999 8), and lowest quantification limit was 25 ng/ml; intra-day and inter-day RSD was 3.15%-7.23%, and relative error was -4.53%-10.48%. Plasma sample kept stable after 3 times of freezing and thawing cycle, at room temperature for 24 h, in automatic sample injector for 24 h and freezing for 42 d (RSD<15%). Plasma concentration of TGC was 0-438.0 ng/ml in one patient with pan-drug resistant bacteria infection (0-12 h after administration). CONCLUSIONS: The developed method is accurate, sensitive and specific, and can be used for plasma concentration determination of TGC and pharmacokinetic study.

KEYWORDS LC-MS/MS; Tigecycline; Plasma concentration; Clinical application

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement: CLSI document M100-S22[J]. *Clinical And Laboratory Standards Institute: Wayne Pennsylvania*, 2012,32(3):1.

[6] 抗菌药物临床应用监测网.抗菌药物分类及规定日剂量(DDD):最新版[S].2011-08-01.

[7] 赵庆英,刘德梦.大肠埃希菌耐药机制研究进展[J].国外医药:抗生素分册,2010,31(4):190.

[8] Gruson D, Hilbert G, Vargas F, et al. Strategy of antibiot-

ic rotation: long-term effect on incidence and susceptibilities of Gram-negative bacilli responsible for ventilator-associated pneumonia[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(7): 1 908.

[9] 李耘,吕媛,薛峰,等.卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarlin)2011—2012年革兰阴性菌耐药监测报告[J].中国临床药理学杂志,2014,30(3):251.

[10] 产超广谱β-内酰胺酶细菌感染防治专家委员会.产超广谱β-内酰胺酶细菌感染防治专家共识[J].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(2):207.

[11] Liu WE, Chen LM, Li HL, et al. Novel CTX-Mβ-lactamase genotype distribution and spread into multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009,63(5):859.

(收稿日期:2015-02-23 修回日期:2015-03-30)

(编辑:晏妮)

Δ 基金项目:首都医科大学本科生科研创新项目(No. XSKY2015181)

* 药师,博士。研究方向:药物化学、药物分析。电话:010-67096857。E-mail: meishenghui1983@126.com

主任医师。研究方向:重症医学。电话:010-67096518。E-mail: shigzh@aliyun.com

替加环素(TGC)为甘氨酸四环素类抗菌药物,其通过与细菌核糖体30S亚基结合,阻断蛋白质的合成,从而发挥抗菌作用^[1]。TGC在临床上主要用于治疗革兰阳性菌和革兰阴性菌(铜绿假单胞菌除外)所致的多种严重感染,尤其是多耐药菌和泛耐药菌所致的严重感染^[2-6]。TGC进入人体后分布广泛,其剂量的59%通过胆汁排泄,33%通过肾脏排泄,肝功能不全的患者需调整剂量,而肾功能不全的患者则无需调整剂量^[1]。TGC在世界范围内的细菌耐药形势日益严峻^[7],目前已有对TGC耐药的菌株出现^[8]。此外,美国食品药品监督管理局(FDA)在TGC药品说明书中添加了黑框警告,警示此药有增加总死亡率的风险^[1]。因此,对于肝功能不全的患者,在使用TGC时应进行血药浓度监测以保证用药的安全性和有效性。本试验建立了测定人血浆中TGC浓度的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,为其临床合理应用及药动学研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Qtrap 5500型质谱仪(美国AB Sciex公司);LC-20AD型液相色谱仪(日本岛津公司);XS 105 DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);D2012型高速离心机(美国Scilogex公司);Direct-Q3型纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

TGC对照品(北京百灵威化学技术有限公司,批号:LK80N56,纯度:99%);d9-TGC对照品(内标,加拿大化学试剂有限公司,批号:30-SSR-24-1-PF2,纯度:96.84%);乙腈、三氟乙酸为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(50 mm×2.1 mm,5 μm);流动相:水(A,含0.05%三氟乙酸)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min,95% A;>0.5~1 min,95% A→10% A;>1~3 min,10% A;>3~3.1 min,10% A→95% A;>3.1~6 min,95% A);流速:0.6 ml/min;柱温:40℃;进样量:2 μl。

采用电喷雾离子源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测。去簇电压:50 V;入口电压:10 V;出口电压:30 V。用于定量分析的离子对分别为:*m/z* 586.3→513.2(TGC,碰撞电压:36 V)、*m/z* 595.3→514.3(内标,碰撞电压:37 V)。TGC和内标的结构及质谱图见图1。

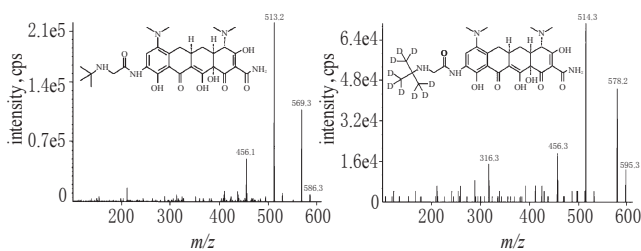


图1 TGC和内标的结构及质谱图

A.TGC;B.内标

Fig 1 Chemical structures and mass spectrum of TGC and internal standard

A.TGC;B. internal standard

2.2 溶液的配制

精密称取TGC对照品21.35 mg,加水定容至10 ml,得质量浓度为2.135 mg/ml的TGC贮备液;再用水将其稀释,配制所需质量浓度的TGC标准溶液,备用。

精密称取内标对照品1.00 mg,加水定容至10 ml,得质量浓度为0.1 mg/ml的内标贮备液;再用水将其稀释,配制成质量浓度为2 500 ng/ml的内标溶液。

2.3 血浆样品的处理

2.3.1 标准曲线及质控血浆样品的处理 取空白血浆100 μl,加入相应质量浓度的TGC标准溶液及内标溶液(质量浓度为2 500 ng/ml)各10 μl,涡旋混匀30 s,加入乙腈290 μl,涡旋混匀30 s,12 000×g离心2 min,取上清液2 μl,进样分析。

2.3.2 待测血浆样品的处理 取1例泛耐药菌感染患者的待测血浆100 μl,加入内标溶液(质量浓度为2 500 ng/ml)10 μl,涡旋混匀30 s,加入乙腈300 μl,涡旋混匀30 s,12 000×g离心2 min,取上清液2 μl,进样分析。

2.4 方法学考察

方法学考察按照生物样品定量分析指导原则进行,包括:专属性、残留效应、定量下限、标准曲线、准确度、精密密度、稀释效应、基质效应、稳定性和回收率^[9-10]。

2.4.1 专属性考察 在“2.1”项条件下,内源性物质对TGC和内标的测定均无明显干扰,TGC和内标峰形良好,保留时间均为2.39 min。其典型色谱图见图2。

2.4.2 残留效应 进样分析最高浓度标准溶液后,再进样分析空白溶剂,来考察方法的残留效应。结果表明,本方法几乎没有残留效应,符合指导原则要求^[9-10]。

2.4.3 标准曲线的绘制及定量下限的考察 取空白血浆、相应质量浓度的TGC标准溶液各适量,分别配制成质量浓度为2 000、1 000、500、250、100、25 ng/ml的血浆样品,按“2.3.1”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以待测物与内标质量浓度的比值(*x*)为横坐标、待测物与内标峰面积的比值(*y*)为纵坐标进行线性回归,权重系数为1/*x*,得回归方程为 $y=0.006x-0.00275(r=0.9998)$ 。结果表明,TGC血药浓度在25~2 000 ng/ml范围内线性关系良好,其定量下限为25 ng/ml。

配制TGC定量下限质量浓度(25 ng/ml)的血浆样品,按“2.3.1”项下方法处理后,进样分析,连续测定4 d,其日内相对偏差(RE)、日间RE、日内RSD、日间RSD分别为10.48%、3.01%、4.12%、4.58%。其典型色谱图见图2B。

2.4.4 准确度及精密密度试验 分别配制TGC定量下限质量浓度(25 ng/ml)的血浆样品和高、中、低质量浓度(1 500、400、50 ng/ml,下同)的质控样品,按“2.3.1”项下方法处理后,连续测定4 d,每浓度取5样本分析,根据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度,考察方法的准确度和精密密度。结果显示,各样品的RE为-4.53%~10.48%,日内、日间RSD为3.15%~7.23%,均符合生物样品定量分析指导原则要求^[9-10],表明本方法准确度、精密密度良好。准确度及精密密度试验结果见表1。

2.4.5 稀释效应 TGC血药浓度的个体差异较大,有时需对

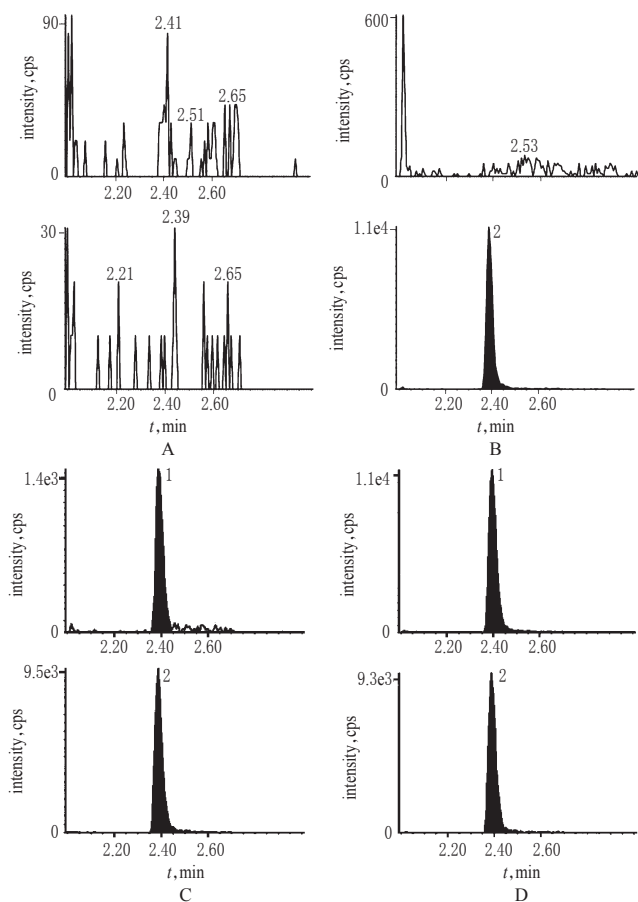


图2 典型色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+内标溶液; C. 空白血浆+TGC 标准溶液(25 ng/ml)+内标溶液; D. 患者给药 1.5 h 后的血浆样品+内标溶液; 1. TGC; 2. 内标

Fig 2 Representative MRM chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + internal standard; C. blank plasma + TGC (25 ng/ml) + internal standard; D. plasma sample 1.5 h after administration + internal standard; 1. TGC; 2. internal standard

表1 准确度及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of accuracy and precision tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

批次	加入质量浓度, ng/ml	实测质量浓度, ng/ml	RE, %	RSD, %
日内	25	27.62 ± 1.14	10.48	4.12
	50	50.38 ± 2.83	0.76	5.62
	400	391.00 ± 12.33	-2.25	3.15
	1 500	1 432.00 ± 62.61	-4.53	4.37
日间	25	25.90 ± 1.18	3.01	4.58
	50	48.96 ± 2.31	-1.73	4.70
	400	393.92 ± 17.73	-1.27	4.49
	1 500	1 474.00 ± 106.84	-1.44	7.23

高质量浓度样品进行稀释以考察方法的稀释效应。本试验考察了高质量浓度样品稀释 10 倍的稀释效应。取空白血浆 100 μ l, 加入乙腈 300 μ l, 涡旋混匀 30 s, 12 000 \times g 离心 2 min, 其上清液即为沉淀后的基质。将质量浓度为 15 000 ng/ml 的 TGC 标准溶液用沉淀后的基质稀释到 1 500 ng/ml 后, 进样测定, 其 RE 和 RSD 分别为 -7.82% 和 5.60%, 均在 \pm 15% 范围内, 表明稀释 10 倍不影响测定的准确度和精密度。

2.4.6 基质效应及回收率考察 分别用空白溶剂和沉淀后的基质配制高、中、低质量浓度的质控样品, 基质效应(%) = 沉

淀后基质配制的样品的峰面积/空白溶剂配制的样品的峰面积 \times 100%、内标归一化的基质效应(%) = TGC 的基质效应/内标的基质效应 \times 100%。取空白血浆 100 μ l, 按“2.3.1”项下方法配制高、中、低质量浓度的质控样品, 同时, 采用沉淀后的基质配制相应质量浓度的质控样品, 回收率(%) = 血浆配制的样品的峰面积/沉淀后基质配制的样品的峰面积 \times 100%、内标归一化的回收率(%) = TGC 的回收率/内标的回收率 \times 100%。结果表明, 本方法的基质效应很小, 回收率稳定。基质效应及回收率试验结果见表 2。

表2 基质效应及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of matrix effect and recovery tests($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测物	理论质量浓度, ng/ml	基质效应, %	内标归一化的基质效应, %	回收率, %	内标归一化的回收率, %
TGC	50	90.37 \pm 6.77	100.48 \pm 5.27	73.58 \pm 3.96	94.34 \pm 5.74
	400	89.27 \pm 3.37	96.46 \pm 5.65	81.21 \pm 2.03	103.07 \pm 6.44
	1 500	88.96 \pm 1.13	101.06 \pm 3.69	78.80 \pm 5.13	95.27 \pm 5.45
内标	250	89.69 \pm 5.54		79.97 \pm 4.64	

2.4.7 稳定性考察 配制高、中、低质量浓度质控样品, 考察室温(22 $^{\circ}$ C)放置 24 h、自动进样器中(22 $^{\circ}$ C)放置 24 h、冻融循环 3 次(-80 \sim 22 $^{\circ}$ C)和冷冻(-80 $^{\circ}$ C)放置 42 d 的稳定性。结果表明, 各质控样品的 RE 均在 \pm 15% 之内, RSD < 15%, 表明各样品在上述条件下稳定。稳定性试验结果见表 3。

表3 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

放置条件	理论质量浓度, ng/ml	实测质量浓度, ng/ml	RE, %	RSD, %
室温放置 24 h	50	44.42 \pm 1.25	11.16	2.81
	400	389.60 \pm 11.04	2.60	2.83
	1 500	1 416.00 \pm 98.64	5.60	6.97
自动进样器中放置 24 h	50	45.90 \pm 2.69	8.20	5.86
	400	391.80 \pm 31.00	2.05	7.91
	1 500	1 384.00 \pm 65.42	7.73	4.73
冻融循环 3 次	50	52.30 \pm 2.68	-4.60	5.13
	400	415.00 \pm 13.06	-3.75	3.15
	1 500	1 516.00 \pm 36.47	-1.07	2.41
冷冻放置 42 d	50	47.73 \pm 5.61	4.59	11.76
	400	399.29 \pm 14.80	0.09	3.71
	1 500	1 572.86 \pm 74.55	-4.80	4.74

2.5 临床应用

采用本方法测定 1 例泛耐药菌感染患者血浆中 TGC 的质量浓度。本研究方案经我院医学伦理委员会审核通过, 患者知情同意并签署知情同意书。患者的给药方式为静脉滴注, 剂量为 49 mg, q12 h, 于第一次给药后的 0、0.25、1.5、2、4、6、8、12 h 静脉采血。血浆样品经乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝后, 按“2.3.2”项下方法处理, 进样分析, 得各时间点 TGC 的血药浓度分别为 0、380.0、438.0、220.0、141.0、85.3、76.1、64.4 ng/ml。其典型色谱图见图 2D。

3 讨论

本试验建立了测定人血浆中 TGC 浓度的 LC-MS/MS 法, 样品处理采用一步沉淀法, 操作简便快捷, 适合临床大样本研究。方法不受内源性物质的干扰, 专属性好, 并且没有残留效应。标准曲线线性关系良好, $r > 0.999$ 。定量下限质量浓度血浆样品及高、中、低质量浓度质控样品的 RE 绝对值及日内、日

间RSD均<15%,表明该方法的精密度和准确度良好,且定量下限质量浓度低于目前报道的液质联用方法^[11]。由于本方法采用同位素标记物作为内标,因此内标归一化的基质效应接近100%,且回收率在不同质控浓度下较为稳定,有效地解决了质谱测定中的基质效应问题,但缺点是同位素内标较为昂贵,增加了血药浓度监测的成本。10倍稀释度不影响测定的准确性,可满足临床监测TGC血药浓度的要求。稳定性试验结果表明,TGC在室温放置24 h、自动进样器放置24 h、冷冻放置42 d、经历3次冻融循环等放置条件下均稳定。

随着抗菌药物的广泛应用,细菌的耐药性越来越强,尤其是多药耐药和泛耐药菌已成为威胁人类健康的重要因素^[4,12-15]。临床常见的耐药革兰阴性菌主要包括鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、屎肠球菌和粪肠球菌等^[12-14]。目前,临床上对于多药耐药和泛耐药革兰阴性菌缺乏足够的治疗药物,治疗起来十分棘手。有限的几个治疗药物包括多黏菌素、TGC、磷霉素及一些仍处于Ⅲ期临床试验的药物^[4,15]。由于多黏菌素尚无国产、磷霉素临床使用极少^[4,15],TGC成为治疗耐药革兰阴性菌的重要药物。TGC于2013年进入中国市场,用药经验十分有限,因其具有可能升高全因死亡率、需根据肝功能调整用法用量、治疗不同感染性疾病时所需的最小抑菌浓度(MIC)存在差异等特点^[1],故用药期间TGC血药浓度的监测显得尤为重要。高效的血药浓度监测方法为提高TGC治疗的有效性和安全性、降低耐药菌产生的风险提供了试验依据,也为医师调整给药方案、实现个体化用药提供了参考。

目前,TGC血药浓度的测定方法主要为高效液相色谱(HPLC)法和LC-MS/MS法^[12-14]。但HPLC法所需的检测时间较长,不适合临床大样本的测定,且容易受到内源性物质的干扰。本试验建立的LC-MS/MS法具有准确、稳定、灵敏、简便等特点,可用于TGC血药浓度监测和药动学研究。本试验采用的抗凝剂为EDTA,可能会影响到样品的检测结果,有待试验验证;本试验也只测定了1例患者的血浆样品,要得到TGC药动学数据及其特征,需增加样本量进一步考察。

参考文献

- [1] U.S. Food and Drug Administration. *Highlights of prescribing information: TYGACIL® (tigecycline) for injection for intravenous use*[EB/OL]. [2014-09-22]. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021821s026s0311bl.pdf.
- [2] 李泽,任天舒,樊蓉,等.1例冠状动脉旁路移植术后合并感染患者抗感染治疗的药学监护[J].中国药师,2014,17(12):2112.
- [3] 李红,周盛,许晶,等.1例合并多种疾病老年患者的药学监护[J].中国药师,2014,17(5):846.
- [4] Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010,36(2):S50.
- [5] Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, et al. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012,31(5):695.
- [6] 孙桂凤,陈岷,孙钊.新一代抗菌药物替加环素的研究进展[J].药品评价,2014,11(12):21.
- [7] Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial, 2004 to 2009[J]. *Clin Ther*, 2012,34(1):101.
- [8] 陈子晞,陈方慧.主动外排系统介导细菌对替加环素产生耐药的机制研究进展[J].中国药房,2014,25(21):2010.
- [9] 钟大放,李高,刘昌孝.生物样品定量分析方法指导原则:草案[J].药物评价研究,2011,34(6):409.
- [10] European Medicines Agency. *Committee for medicinal products for human use, guideline on bioanalytical method validation*[EB/OL]. [2012-01-05]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
- [11] Ozcimen M, Sakarya Y, Ozcimen S, et al. Pharmacokinetics of intravenously administered tigecycline in eye compartments: an experimental study[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014,252(12):1993.
- [12] Hanberger H, Giske CG, Giamarellou H. When and how to cover for resistant gram-negative bacilli in severe sepsis and septic shock[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2011,13(5):416.
- [13] Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2010,23(4):332.
- [14] Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008,32(2):106.
- [15] Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014,15(10):1351.

(收稿时间:2015-08-17 修回日期:2016-01-04)
(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅