

高效液相色谱-串联质谱法检测3种氨基糖苷类抗结核药的有效性评价

王 鹏 杨金美

(齐鲁制药有限公司 山东 济南 250100)

【摘要】目的：评估3种氨基糖苷类抗结核药应用高效液相色谱-串联质谱法检测的临床价值。方法：应用常规C18色谱柱将乙腈-0.1%甲酸水(20:80)作为流动相，对质谱参数进行调整的同时检测链霉素、阿米卡星及卡那霉素。结果：高效液相色谱-串联质谱法在链霉素、阿米卡星、卡那霉素检测种特异性较高，于1-40μg/mL浓度范围内线性关系良好($r > 0.997$)，检出限最低0.1μg/mL，定量限最低0.2μg/mL；方法的日间及日内精密密度RSD < 20%。结论：高效液相色谱-串联质谱法在3种氨基糖苷类抗结核药检测中具有一定价值，其方法易操作、简单准确且无污染，通常能较好的满足链霉素、阿米卡星、卡那霉素的检测要求。

【关键词】抗结核药；高效液相色谱-串联质谱法；特异性

Evaluation of the efficacy of three aminoglycosides in the detection of antituberculosis drugs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Peng Wang Jinmei Yang

(Qilu Pharmaceutical Co., LTD., Jinan, Shandong, 250100)

[Abstract] Objective: To evaluate the clinical value of three aminoglycoside anti-tuberculosis drugs by HPLC/MS. Methods: Conventional C18 column with acetonitrile-0.1% formic acid water (20:80) as mobile phase was used to detect streptomycin, amikacin and kanamycin at the same time the parameters of mass spectrometry were adjusted. Results: HPLC/MS showed high specificity for the detection of streptomycin, amikacin and kanamycin, and had good efficacy ($R > 0.997$) in the concentration range of 1-40μg/mL, with the lowest detection limit of 0.1μg/mL and the lowest quantitation limit of 0.2μg/mL. The intra-day and intra-day precision RSDs of

[Key words] Antituberculous drugs; High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; specificity

临床抗结核治疗中链霉素、阿米卡星及卡那霉素均为常用药，其在耐药结核、非结核分枝杆菌治疗中有着非常重要的作用。临床标准的治疗方法是应用一种氨基糖苷类注射液，而实际应用中在使用注射剂的同时还会应用雾化吸入的方法治疗，也可能会进行药敏试验联合应用药物或调整用药情况。这些药物很容易引发神经肌肉阻断、耳毒性、肾毒性等不良反应的发生，特别是对于长期抗结核治疗的患者要加强注意，治疗过程中很有必要对抗结核药物浓度进行检测以减轻其不良反应的发生率。氨基糖苷类药物水溶性较好，没有特征紫外吸收峰，采用高效液相色谱法检测时要将离子对试剂加入其中以延长其保留时间或进行复杂的衍生化，过程比较繁琐^[1]。高效液相色谱-串联质谱法能有效避免以上问题，且其检测限较低，比较适用于该类药物的检测。本文主要评估3种氨基糖苷类抗结核药应用高效液相色谱-串联质谱法检测的临床价值。

1 临床资料

1.1 材料

应用由安捷伦公司提供的信号为LC-MS/MS6460的三重四级杆LC-MS/MS仪；Sartorius公司提供的型号为BP121S的电子天平；Membrana公司提供的0.22μm过滤器。链霉素对照品批号308-200012，阿米卡星对照品批号0335-9403，卡那霉素批号319209，均由中国药品生物制品检定所提供。甲酸、乙腈为色谱纯，实验用水由Millipore公司提供的型号为Milli-QAcademic的Millipore超纯水仪制备。

1.2 方法

1.2.1 色谱及质谱条件

Phenomenex C18 柱(150mm×3.0mm, 5μm)为色谱柱；乙腈-0.1%甲酸水(20:80)为流动相；流速为0.2ml/

min；柱温20℃；进样量5μL。离子源选择电喷雾电离离子源，通过正离子扫描方式扫描；毛细管电压为4KV；气帘气压力30psi；干燥气流量10L/min；离子化温度330℃；以多反应检测扫描模式检测。

1.2.2 溶液配制

准确称取0.0040g链霉素、阿米卡星、卡那霉素，将其置于10mL容量瓶中，加水定容，另外再准确取1mL溶液，将其置于10mL容量瓶用超纯水定容，一次就得到40μg/mL样品溶液。

1.2.3 检测方法特异性

正离子模式下应用各样品单标准溶液进行母离子全扫描，于一级质谱图中选择有较大丰度的准离子峰位母离子，对各母离子展开二次分裂，确定个目标物特征离子对，在MRM模式下检测，经优化碰撞气压、能量、气帘气压力、离子化温度等，得到合适的参数。

1.2.4 线性关系考察

取上述的40μg/mL溶液，准确吸取0.25、0.5、1、2、5mL置于10mL容量瓶中，超纯水定容，配置成浓度为1、2、4、8、10、20、40μg/mL混合标准溶液，进样对各样品线性关系、定量限及精密度进行检测。

2 结果

2.1 质谱条件

对比不同离子源、喷雾电压、碰撞能量、扫描模式后，确定链霉素、阿米卡星、卡那霉素在正离子模式下质谱分析参数，见表1：

2.2 各样品线性关系

链霉素、卡那霉素线性范围2-40μg/mL，阿米卡星线性范围1-40μg/mL，相关系数超过0.997。根据特征质量色谱

表 1 链霉素、阿米卡星、卡那霉素在正离子模式下质谱分析条件

药物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
链霉素	582.4 > 263.2	582.4 > 263.2	80	35
	582.4 > 246.1			20
阿米卡星	586.3 > 162.5	586.3 > 162.5	40	34
	586.3 > 263.8			22
卡那霉素 15	485.6 > 162.4	485.6 > 162.4	40	24
	485.6 > 323.4			13

峰信噪比 S/N 超过 3 为检测限, S/N 超过 10 为定量限, 经检测链霉素检测限 0.3μg/mL, 定量限 0.8μg/mL; 卡那霉素检测限 0.1μg/mL, 定量限 0.2μg/mL; 阿米卡星检测限 0.5μg/mL, 定量限 1.0μg/mL。见表 2:

表 2 链霉素、阿米卡星、卡那霉素标准曲线及相关系数表

药物	线性方程	相关系数 (r)	线性范围 (μg/mL)
链霉素	y=x-0.173	0.998	2-40
卡那霉素	y=0.975x+0.642	0.999	2-40
阿米卡星	y=x-0.021	0.997	1-40

2.3 质谱条件精密度

分别检测低 (2μg/mL)、中 (6μg/mL)、高 (10μg/mL) 水平标准溶液, 每个浓度水平重复测定 5 次, 日渐精密度 RSD < 5.6%, 日内精密度 RSD < 3.2%, 不超过 20%。

3 讨论

链霉菌可治疗较多细菌感染性疾病, 其可作用于细菌体内核糖体对细菌蛋白质合成产生抑制作用进而发挥抑制细菌的作用, 阿米卡星是通过干扰细菌蛋白质合成而发挥抑制细菌的作用, 其抗菌谱包括较多革兰阴性菌及部分革兰阳性菌, 如大肠埃希菌、沙雷菌、变形杆菌等, 卡那霉素对沙门氏菌、革兰氏阴性菌、变形杆菌等具有较强的抗菌作用, 且其对金黄色葡萄球菌及结核杆菌也比较敏感, 但敏感菌对卡那霉素容易产生抗药性, 所以当前市场上卡那霉素已不直接用于临床中, 而是通过深加工后生成硫酸阿米卡星等应用于临床中。高效液相色谱-串联质谱法检测氨基糖苷类药物在一定程度上可提高分析方法的灵敏度, 同时将质谱仪作为检测器, 将化合物核比作为检测指标, 其通用性比较好, 对于没有紫外吸收的化合物不需要衍生化, 在极大程度上能避免操作繁琐及定量不准确等对结果造成影响的发生。氨基糖苷类的极性较强, 很容易溶于水, 在反相色谱中保留的时间比较短, 将离子对试剂加入后, 通过离子对试剂可与糖苷类药物离子结合形成疏水型离子对化合物的特点, 以此来延长其保留时间, 这是当前临床应用液质联用测定氨基糖苷类药物常用的方法^[2]。但是离子对试剂会对样品在离子源的离子化产生影响, 干扰定量的灵敏度及准确型。有研究资料显示离子对试剂对 MS 电离可产生抑制作用, 氨基酸等极性物质分析中电离抑制在总量中占比为 28%。且因为离子对试剂价格比较高, 毒性较大同时还会污染仪器, 这在较大程度上限制了质谱仪的应用。亲水性 HILIC 色谱柱可较好的保留正相色谱柱的特点, 但也可应用常规反相流动相, 如水、乙腈、甲醇等, 确保极性样品出峰时间与正相色谱柱一致, 避免应用昂贵正相流动相促使 HILIC 色谱柱在极性化合物分析时有明显优势。然而 HILIC 色谱柱的价格与普通 HPLC 色

谱柱相比明显较高, 这可能会限制其在临床中的应用。

结合上述两者的缺点, 此研究对常规 HPLC 色谱柱和不使用离子对情况下 LC/MS 对三种氨基糖苷类药物的检测效果进行考察。对于流动相选择上, 此研究中对甲醇-乙腈、乙腈-0.1% 甲酸水、甲醇-乙腈-冰醋酸等不同类型流动相展开实验, 其中乙腈-0.1% 甲酸水分离效果最好, 出峰时间更合适。链霉素、卡那霉素及阿米卡星都有一定碱性, 通常极性较强是很难在反相色谱柱中有合适保留, 但是碱性化合物一般都带正电荷, 应用乙腈-0.1% 甲酸水为流动相, 0.1% 甲酸及碱性化合物形成中性物质, 进而使物质在色谱柱上保留。该作用与用离子对试剂比较相似, 但是在未用离子对试剂情况下也能得到较好的分离^[5]。对于质谱参数, ESI 离子源比较适合氨基糖苷类急性较强且为离子态的药物, 且与负离子模式下相比在正离子模式下的灵敏度更高。临床实验中发现增加倍增电压可降低方法的检测限, 但是倍增电压的使用会对设备寿命造成较大影响, 常规情况下也会获得较为满意的检测限, 所以考虑到设备损耗未应用倍增电压。在 LC/MS 中检测三种氨基糖苷类药物最大紫外线吸收值都不相同, 应用紫外检测器并不能达到同时检测的目的, 此研究中应用 HPLC 串联 MS 可避免以上情况的发生, 最终其检测效果也比较好。高效液相色谱-串联质谱法简单快速、不使用离子对试剂, 且特异性较高, 出峰时间虽然有重合但定量离子对相互没有干扰。此方法有一定优点但也存在不足之处, 比如线性相关度比较低, 全部药物检测限比较高, 未能发掘液质联用检测限低的优点, 考虑到实际工作情况, 对于临床不要求极低检测限的氨基糖苷类样本而言, 高效液相色谱-串联质谱法具有较高的应用价值。此研究结果显示高效液相色谱-串联质谱法在链霉素、阿米卡星、卡那霉素检测种特异性较高, 于 1-40μg/mL 浓度范围内线性关系良好 (r > 0.997), 检出限最低 0.1μg/mL, 定量限最低 0.2μg/mL; 方法的日间及日内精密度 RSD < 20%。

综上所述, 高效液相色谱-串联质谱法在 3 种氨基糖苷类抗结核药检测中具有一定价值, 其方法易操作、简单准确且无污染, 通常能较好的满足链霉素、阿米卡星、卡那霉素的检测要求。

参考文献:

- [1] 段雯利, 王新科. 高效液相色谱法在药品检验中的应用效果观察及有效性分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(10): 408
- [2] 张艳萍, 周宗洲, 黄婉锋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定外用制剂中非法添加 13 种抗真菌化学成分 [J]. 北方药学, 2020, 17(09): 25-30
- [3] 胡佩, 崔萍, 杜云. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测药包 9 种抗氧剂含量 [J]. 塑料包装, 2020, 30(04): 62-65-31