

# 四极杆-线形离子阱串联质谱法 测量血清中万古霉素

谢 洁<sup>1</sup>, 李姿颖<sup>1,2</sup>, 屈子裕<sup>1</sup>, 易可可<sup>1</sup>, 刘 浩<sup>3</sup>, 李家练<sup>3</sup>,  
张 谛<sup>1</sup>, 黄泽建<sup>1</sup>, 王涵文<sup>3</sup>, 时正媛<sup>4</sup>, 鄢 丹<sup>4</sup>,  
俞晓平<sup>2</sup>, 江 游<sup>1</sup>, 戴新华<sup>1</sup>, 方 向<sup>1</sup>

(1. 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 国家市场监督管理总局技术创新中心(质谱), 北京 100029;  
2. 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 3. 安徽砾沐医疗器械有限公司, 安徽 六安 237001;  
4. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

**摘要:**本研究采用自主研制的 QLIT-6610MD 液相色谱-串联质谱系统, 建立了测量血清中万古霉素的高准确度方法。样品经蛋白沉淀和液液萃取后, 进入 QLIT-6610MD 系统分析。样本中的内源性物质在保留时间内对目标物无干扰。结果表明: 在 1.56~50.0 mg/L 范围内, 万古霉素的线性关系良好, 相关系数( $R^2$ ) $\geq 0.99$ , 检出限和定量限分别为 0.19、1.56 mg/L, 日内和日间精密密度范围分别为 1.62%~3.82% 和 2.07%~5.07%, 血清样本的加标回收率为 95.97%~97.74%, 基质效应归一化因子(CV) $\leq 7.60\%$ , 样品保存稳定性 CV $\leq 4.26\%$ , 进样长时稳定性优于 2.13%。通过测定低、中、高质控品对方法进行验证, 结果均在靶值范围内。采用 QLIT-6610MD、AB API4000 和 YS EXACT 9900MD 3 台液相色谱-串联质谱仪测定 42 例临床血清样本, 经过 Deming 回归、Bland-Altman 分析和 Pearson 相关性分析, 结果具有良好的一致性。本研究证明了自主研制的 QLIT-6610MD 液相色谱-串联质谱系统能够达到三重四极杆质谱仪的定量水平, 可为实时临床分析提供一种新型国产仪器方案。

**关键词:**四极杆; 线形离子阱; 串联质谱; 万古霉素; 血清

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2023)05-0602-12

doi: 10.7538/zpzb.2023.0017

## Determination of Vancomycin in Serum by Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry

XIE Jie<sup>1</sup>, LI Zi-ying<sup>1,2</sup>, QU Zi-yu<sup>1</sup>, YI Ke-ke<sup>1</sup>, LIU Hao<sup>3</sup>, LI Jia-lian<sup>3</sup>,  
ZHANG Di<sup>1</sup>, HUANG Ze-jian<sup>1</sup>, WANG Han-wen<sup>3</sup>, SHI Zheng-yuan<sup>4</sup>, YAN Dan<sup>4</sup>,  
YU Xiao-ping<sup>2</sup>, JIANG You<sup>1</sup>, DAI Xin-hua<sup>1</sup>, FANG Xiang<sup>1</sup>

(1. Technology Innovation Center of Mass Spectrometry for State Market Regulation,  
Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China;  
2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;  
3. Anhui Limu Medical Instrument Co., Ltd., Liuan 237001, China;  
4. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

**Abstract:** The demand for accurate mass spectrometry measurement in the field of clinical diagnosis is increasing. In the face of foreign monopoly, our 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 with independent intellectual property rights and a liquid chromatography tandem mass spectrometry system (model QLIT-6610MD), which have obtained a medical device registration certificate in China. In this study, a home-built Q-LIT liquid chromatography-tandem mass spectrometer QLIT-6610MD was developed to measure vancomycin in serum with high accuracy. After protein precipitation and liquid-liquid extraction, the samples were analyzed by QLIT-6610MD. The endogenous substances in the samples did not interfere with the quantification. The results showed that vancomycin has a good linear relationship of signal intensity *vs.* concentration in the range of 1.56-50.0 mg/L with the linear correlation coefficient ( $R^2$ )  $\geq 0.99$ , and the limit of detection and limit of quantitation are 0.19 and 1.56 mg/L, respectively. Intra-day and inter-day precisions are 1.62%-3.82% and 2.07%-5.07%, respectively. The recoveries of vancomycin in serum samples are 95.97%-97.74%. The coefficient of variability (CV) of matrix effect normalization factor is less than 7.60%, CV of sample stability is better than 4.26%, and CV of long interval sample analysis is better than 2.13%. The method was verified by the determination of low, medium and high quality controls, and the results were all within the range of target values. QLIT-6610MD, AB API4000 and YS EXACT 9900MD were used to determine 42 real clinical serum samples. The correlation and consistency of the data were analyzed by Deming regression, Bland-Altman analysis and Pearson correlation analysis. The results showed good consistency among the results obtained by the three spectrometers, indicating that the data of three instruments are comparable, which prove that the home-made QLIT-6610MD can reach the quantitative accuracy of triple quadrupole-mass spectrometer. The instrument can effectively reduce the interference of matrix ions and enhance the capture efficiency of target ions, based on quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometric technique. QLIT-6610MD has great potential to provide a new instrumentation solution for real-time clinical analysis in the future.

**Key words:** quadrupole; linear ion trap; tandem mass spectrometry; vancomycin; serum

万古霉素是一种三环糖肽类抗生素,对多种病原菌具有杀菌作用,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<sup>[1-2]</sup>,临床上常用于治疗外科手术后颅内感染或肺部感染<sup>[3-4]</sup>、新生儿败血症<sup>[5]</sup>等。万古霉素作为一种时间依赖型抗生素,其抗菌疗效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<sup>[6]</sup>,该药治疗窗较窄<sup>[7]</sup>,且重症患者、新生儿以及肾功能不稳患者之间的药代动力学参数差异较大。建议万古霉素目标谷浓度

为 10~15 mg/L,若血药浓度过低( $<10$  mg/L),可能会导致细菌对药物敏感性下降,即出现万古霉素中金黄色葡萄球菌和异质性万古霉素中金黄色葡萄球菌<sup>[8]</sup>;当患者血药浓度过高时会产生耳毒性和肾损伤<sup>[2,9]</sup>。因此,我国治疗药物监测指南<sup>[10]</sup>建议对使用万古霉素治疗的患者进行个体化血药浓度监测和临床用药指导,使药物能够最大程度地发挥疗效,并减少药物不良反应。

目前,万古霉素的血药浓度监测方法主要

有免疫法<sup>[11-13]</sup>、高效液相色谱法<sup>[14-15]</sup>和液相色谱-串联质谱(liquid chromatograph-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)法<sup>[16-17]</sup>。其中,免疫法操作简便、自动化程度高,但所用试剂盒价格昂贵,检测时易与药物代谢产物发生交叉反应,容易出现假阳性干扰测定<sup>[11]</sup>;高效液相色谱法的应用范围较广,但样本前处理流程复杂,无法区分结构类似物,单个样品的分析时间较长,且准确度和灵敏度有一定的局限性;而 LC-MS/MS 法具有高准确度、高特异性的优点<sup>[18]</sup>,临床上主要采用三重四极杆串联质谱进行检测。离子阱质谱构造简单、灵敏度高,有望成为质谱分析的新选择。基于此,中国计量科学研究院-国家市场监督管理总局技术创新中心(质谱)研发了一种新型的四极杆-线形离子阱质谱装置<sup>[19]</sup>,用单个线形离子阱代替三重四极杆后端的碰撞池和四极杆 Q3,在保证精确量的基础上简化了仪器结构。其中,四极杆筛选并分离目标母离子,以减少进入离子阱中的总离子数量,线形离子阱沿极轴储存目标母离子后进行碎裂,两部分的协同作用使离子捕获效率增强,有效消除基质离子背景干扰,降低空间电荷效应,提高检测灵敏度。四极杆-线形离子阱质谱显著提高了离子阱定量分析复杂基质样本中痕量或超痕量物质的能力。

本研究采用自主研发的 QLIT-6610MD 液相色谱-串联质谱系统,拟建立准确测定血清中万古霉素含量的方法,并与三重四极杆串联质谱仪的测量结果进行对比,旨在为实时临床诊断提供一种新的仪器方案,以助力国产质谱仪技术的快速发展。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

QLIT-6610MD 液相色谱-串联质谱系统(皖械注准 20222220215):安徽砾沐医疗器械有限公司产品;AB API4000 液相色谱-串联质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品;YS EXACT 9900MD 高效液相色谱-串联质谱检测系统(鲁械注准 20192220473):山东英盛生物技术有限公司产品;XPR205/A 电子分析天平:瑞士 Mettler Toledo 公司产品;5418R 型微量离心

机、微量可调移液器:德国 Eppendorf 公司产品;Vortex Genie 2 涡旋仪:美国 Scientific Industries 公司产品;PM4-1300TD 型超声仪:英国 PRIMA 公司产品;冰箱:韩国 LG 公司产品;Milli-Q 型纯水仪:美国 Millipore 公司产品;BEH C18 色谱柱、HSS T3 色谱柱:美国 Waters 公司产品;Kinetex C18 色谱柱:广州菲罗门科学仪器有限公司产品。

万古霉素标准品(编号 425992):北京百灵威公司产品;万古霉素测定试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法,注册证号:鲁械注准 20212400421):山东英盛生物技术有限公司产品;甲醇、乙腈、甲酸、超纯水:均为色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司产品;乙酸铵:色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

### 1.2 溶液配制

**1.2.1 血清样本的保存与使用** 每支人血清样本量不小于 500  $\mu\text{L}$ ,储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。为保证样品的稳定性,在运输过程中使用干冰,样品处理前在室温下平衡 1 h。

**1.2.2 标准品溶液的配制** 准确称取 1.0 mg 万古霉素标准品,加入 1 mL 超纯水溶解,振荡混匀;用超纯水稀释成浓度为 1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0、100、500 mg/L 的标准品工作液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光储存,标准品工作液可稳定保存 1 个月。

### 1.3 样品前处理方法

本研究使用山东英盛生物技术有限公司生产的“万古霉素测定试剂盒(高效液相色谱-串联质谱法)”,所用提取液、校准品和质控品均由该试剂盒提供,也可采用其他市售有证试剂盒或实验室自建方法。

取 100  $\mu\text{L}$  人血清于 1.5 mL 离心管中,加入 350  $\mu\text{L}$  提取液,涡旋振荡混匀 5 min 后,以 12 000 r/min 离心 5 min;取 100  $\mu\text{L}$  上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 100  $\mu\text{L}$  超纯水混匀,转移至进样小瓶中,待 LC-MS/MS 分析。校准品、质控品的制备过程与样品一致。

### 1.4 实验条件

**1.4.1 QLIT-6610MD 色谱条件:** Kinetex C18 色谱柱(2.6  $\mu\text{m}\times 50\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ );流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)和 0.1%甲酸甲醇溶液(B);流速 0.5 mL/min;柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量

5  $\mu\text{L}$ ;梯度洗脱:0~1 min(10% B), 1.01~3 min(99% B), 3.01~5 min(10% B)。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,子离子扫描(QTPIS);电喷雾电压5 000 V,

离子源温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ,大气压接口温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ,鞘气压强  $2.96 \times 10^5$  Pa,辅助气压强  $1.38 \times 10^5$  Pa,反吹气压强  $5.52 \times 10^3$  Pa。其他质谱参数列于表 1。

表 1 质谱参数

Table 1 Mass spectromic parameters

化合物 Compound	母离子 Parent ion ( $m/z$ )	子离子 Product ion ( $m/z$ )	QLIT-6610MD			AB API4000			YS EXACT 9900MD		
			富集时间 Enrichment time/ms	碎裂 q 点 q Point	碎裂能量 Fragmentation energy/%	去簇电压 Decluster potential/ V	碰撞能量 Collision energy/ eV	驻留时间 Dwell time/ ms	射频电压 RF lens/ V	碰撞能量 Collision energy/ eV	驻留时间 Dwell time/ ms
万古霉素	725.4	144.0	150	0.13	35	61.0	21.0	100	176.0	13.7	200
万古霉素内标	690.8	144.0	200	0.14	40	92.0	22.0	100	135.0	25.4	200

**1.4.2 AB API4000** 色谱条件同 1.4.1 节。质谱条件:ESI 源,正离子模式,多反应监测(multi reaction monitoring, MRM)模式;电喷雾电压 5 500 V,离子源温度 550  $^{\circ}\text{C}$ ,雾化气压强  $3.79 \times 10^5$  Pa,辅助加热气压强  $4.14 \times 10^5$  Pa,气帘气压强  $2.41 \times 10^5$  Pa,碰撞解离气压强  $6.89 \times 10^4$  Pa。其他质谱参数列于表 1。

**1.4.3 YS EXACT 9900MD** 色谱条件:英盛 C18 色谱柱(3  $\mu\text{m} \times 100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ );流动相、流速、柱温和进样量同 1.4.1 节;梯度洗脱:0~1 min(1% B), 1.01~3 min(98% B), 3.01~5 min(1% B)。

质谱条件:ESI 源,正离子模式,MRM 模式;电喷雾电压 4 500 V,离子源温度 400  $^{\circ}\text{C}$ ,鞘气压强  $4.14 \times 10^5$  Pa,辅助气压强  $1.38 \times 10^5$  Pa。其他质谱参数列于表 1。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LC-MS/MS 方法建立

万古霉素的相对分子质量为 1 449.2,经 ESI<sup>+</sup> 电离后,其分子离子峰位于  $m/z$  725.4,表明该物质产生  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  信号,带有双电荷。根据文献<sup>[20]</sup>报道,万古霉素经碎裂后分别产生  $m/z$  100.2、144.1 碎片,其中  $m/z$  100.2 信号强度更高。但在 QLIT-6610MD 中, $m/z$  144.0 响应强度最优,因此选择  $m/z$  725.4 > 144.0 作为定量离子对,其质谱峰信息与结构式示于图 1。这可能是由于四极杆串联线形离子阱与三重四极杆的结构、碎裂模式不同所导致的。在三重四极杆中,第一级四极杆(Q1)扫描并筛选后得到目标母离子,第二级四极杆(Q2)作为碰撞池进行目标母离子的碎裂,最终经第三级四极杆(Q3)滤质后得到目标子离子。在离子阱

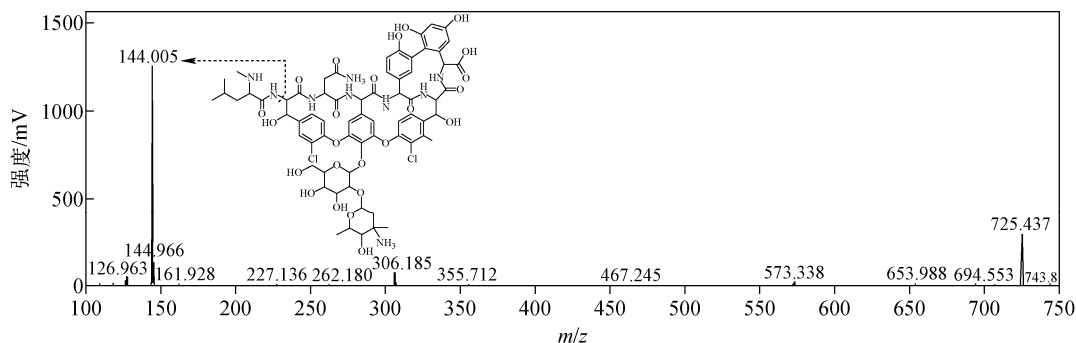


图 1 万古霉素质谱图及其结构式

Fig. 1 Mass spectrum and structural formula of vancomycin

中,母离子经共振激发与射频电场加速获得高能量,与碰撞气体分子发生碰撞后碎裂成子离子<sup>[21]</sup>。在相同的气体压力下,相对分子质量大的碰撞气体可获取更多的动能,并转化给母离子使其获得更高内能,从而产生更多的碎片离子<sup>[22]</sup>。与三重四极杆质谱所用的氮气不同,QLIT-6610MD离子阱中所用的碰撞气体为氦气,相对分子质量较小,碰撞能量小,产生的碎片相对较少,且在离子阱质谱中更易观测到较大的 $m/z$  144.0碎片离子。同时,离子阱倾向于捕获大于母离子质量1/3的子离子,在积累接近不稳定边界的子离子时效率降低。本研究中, $m/z$  144.0响应更强,这可能是因为在高质量范围内捕获子离子的射频电位跨度较小<sup>[23-24]</sup>。

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的碱性基团,电离后产生的碎片离子响应强度较弱<sup>[25]</sup>。甲酸、乙酸、甲酸铵和乙酸铵是常用的可挥发性溶剂,用于提高待测物在ESI源内的电离效率<sup>[26]</sup>。本研究比较了在流动相体系中加入不同浓度甲酸、乙酸、乙酸铵对万古霉素响应强度的影响,示于图2。与仅添加0.1%甲酸相比,在添加0.1%甲酸的基础上添加0.5 mmol/L乙酸铵时的响应显著下降。这可能是由于缓冲盐在ESI源内得失电荷的能力往往强于待测物,与之形成竞争,从而使样品中待测物的离子响应强度降低<sup>[27]</sup>。当添加0.1%乙酸时,较添加0.1%甲酸时的响应强度增加163.94%,但其色谱峰形变宽,稳定性较差。使用0.1%甲酸时,在实际样

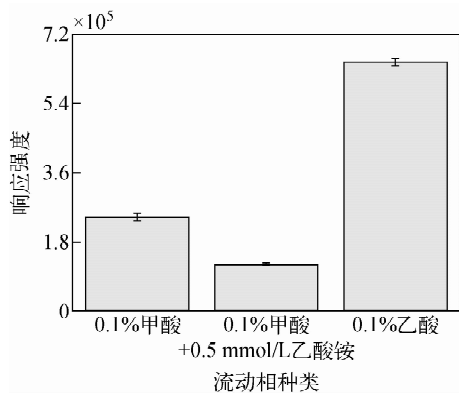


图2 不同流动相种类对万古霉素响应强度的影响  
Fig. 2 Effect of different mobile phases on response intensity of vancomycin

本检测中色谱峰形未受基质影响产生改变,峰形尖锐对称,且响应强度满足要求。因此,本研究选择向流动相中添加0.1%甲酸作为最优条件。

实验比较了不同色谱柱对万古霉素的响应强度与分离效果,包括Kinetex C18(2.6 μm×50 mm×3 mm)、BEH C18(1.7 μm×100 mm×2.1 mm)和HSS T3(1.8 μm×100 mm×2.1 mm)柱,结果示于图3。Kinetex C18色谱峰形对称,响应值最优,未出现色谱峰变宽、峰后拖尾等现象。同时,考虑到临床诊断的快速高效,缩短柱长有利于缩短分析时间,提高样本检测通量。因此,选择柱长50 mm的Kinetex C18柱作为分析色谱柱。

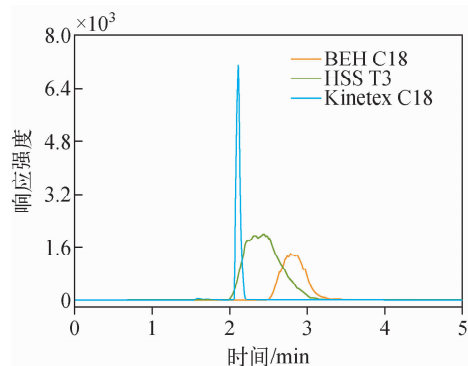


图3 不同色谱柱对万古霉素响应强度的影响  
Fig. 3 Effect of different chromatographic columns on response intensity of vancomycin

为进一步提高万古霉素的响应强度,通过外置注射泵,以5 μL/min流速在流动注射模式下对QLIT-6610MD的离子源温度、大气压接口温度、碎裂 $q$ 点和碎裂能量等条件进行优化,根据目标离子的最佳响应强度值选择对应的参数,结果示于图4。溶液在ESI离子源与大气压接口装置中受高电场作用而形成带电雾滴,并在电场作用下加速运动后去除溶剂,在静电斥力作用下,样品离子从非常小、电荷密度高的液滴中分离出来,形成的带电离子在真空与电场的作用下进入四极杆与线形离子阱中<sup>[28]</sup>。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。如图4a、4b所示,响应强度随着离子源温度和大气压接口温度升高而升高,到达300℃后,响应强度逐渐降低。离子光学碎裂参数是设置质谱条件的重要

参数,其可使待测物中易碎裂的结构断开,最佳的碎裂参数使母离子经碎裂而产生最优子离子。碎裂 $q$ 点对响应强度的影响示于图4c, $q$ 点值为0.13时的响应值最佳。响应强度随碎裂能量的变化趋势示于图4d,碎裂能量35%时

的万古霉素响应值达到峰值。综上,当选择离子源与大气压接口温度均为300℃、碎裂 $q$ 点为0.13、碎裂能量为35%时,可获得最优的响应值。最优的质谱参数列于表1,其提取离子色谱图示于图5。

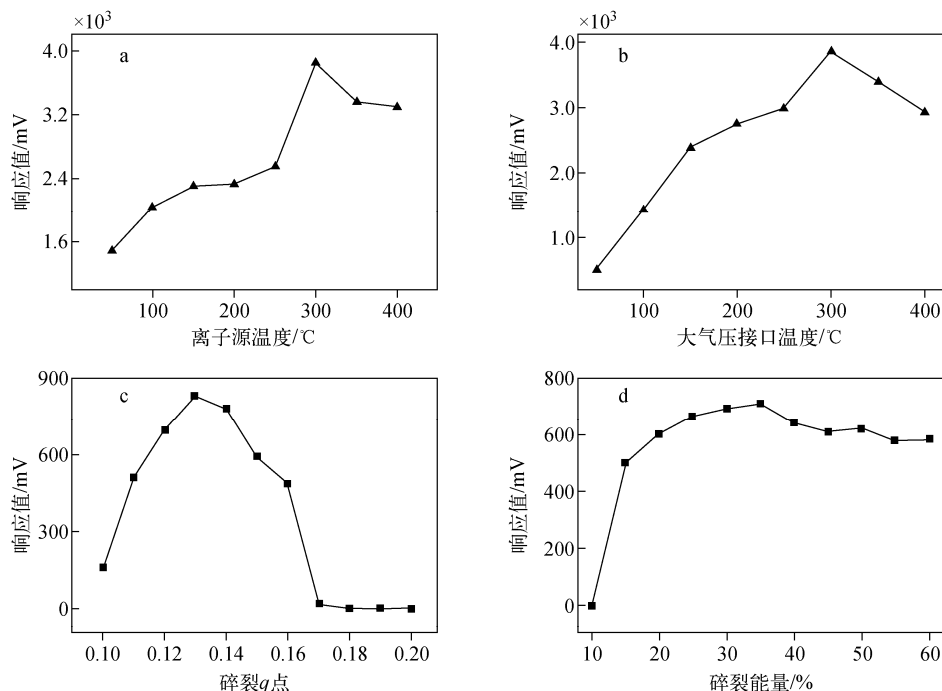


图4 质谱参数优化

Fig. 4 Optimization of mass spectrometric parameters

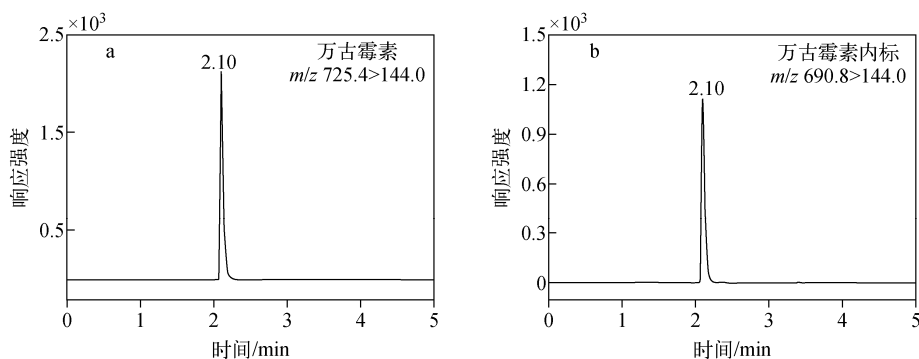


图5 QLIT-6610MD的万古霉素(a)及其内标(b)的提取离子色谱图

Fig. 5 Extracted ion chromatograms of vancomycin (a) and its internal standard (b) by QLIT-6610MD

同时,在商品仪器 AB API4000 和 YS EXACT 9900MD 上建立了万古霉素的液相色谱-质谱方法,优化了去簇电压、碰撞能量、RF 电压、驻留时间,以及雾化气、碰撞气、电喷雾电压和离子源温度等质谱参数,得到的提取离子色谱图

示于图6、7。

## 2.2 方法确证

**2.2.1 专属性** 取 100  $\mu$ L 空白人血清,按 1.3 节方法进行样品前处理。不加入内标,获得的空白血清样品提取离子色谱图示于图 8a,

无内源性物质干扰;将一定浓度的标准品及内标加入空白人血清中,处理后进样获得血清加

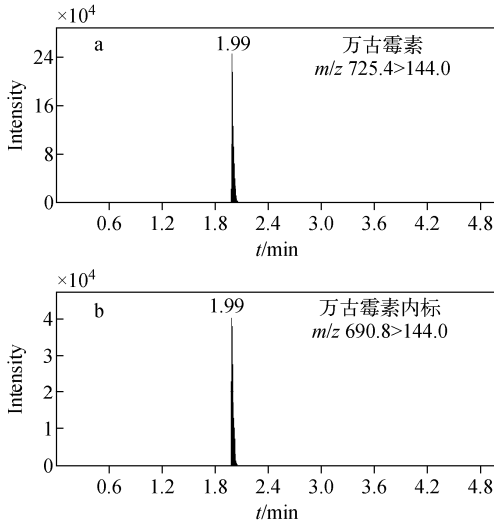


图 6 AB API4000 的万古霉素 (a) 及其内标 (b) 的提取离子色谱图

Fig. 6 Extracted ion chromatograms of vancomycin (a) and its internal standard (b) by AB API4000

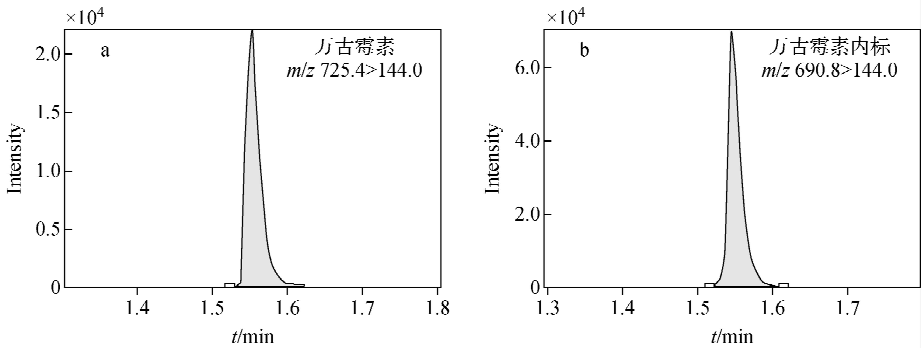


图 7 YS EXACT 9900MD 的万古霉素 (a) 及其内标 (b) 的提取离子色谱图

Fig. 7 Extracted ion chromatograms of vancomycin (a) and its internal standard (b) by YS EXACT 9900MD

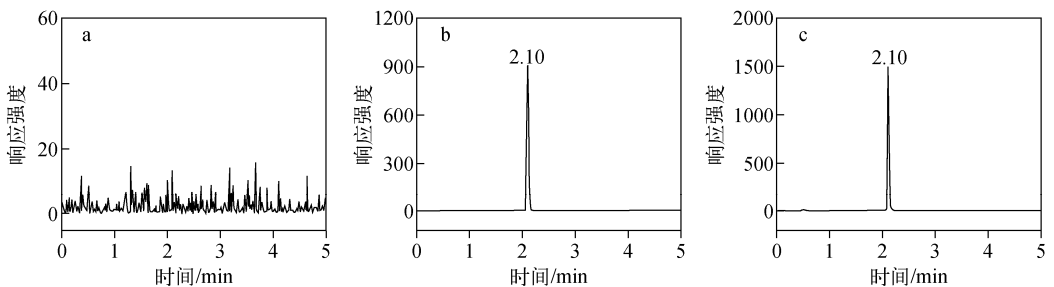


图 8 空白血清 (a)、血清加标 (b) 及临床样本 (c) 的万古霉素提取离子色谱图

Fig. 8 Extracted ion chromatograms of vancomycin in blank serum (a), serum standard (b) and clinical sample (c)

标样品的提取离子色谱图,示于图 8b;另取实际临床样本,处理后获得提取离子色谱图,峰形尖锐且对称,示于图 8c。万古霉素在血清加标样品及临床样本中的保留时间均为 2.10 min。综上,本方法对测定血清中万古霉素具有专属性。

**2.2.2 线性关系** 以标准品与内标的含量比为横坐标( $x$ ),标准品与内标的峰面积比为纵坐标( $y$ )做线性回归分析,万古霉素的线性范围为 1.56~50.0 mg/L,线性方程为  $y=0.4003x-0.2652$ ,相关系数( $R^2$ ) $\geq 0.99$ 。

**2.2.3 精密度和准确度** 精密度由变异系数(coefficient of variation, CV)表示,准确度由回收率表示。取万古霉素标准品添加至空白人血清样本中,获得 4、9、40 mg/L 的低、中、高 3 个浓度水平的血清加标样本,对分析后的样本重复测定 3 次,连续测定 3 天,结果列于表 2。万古霉素的日内和日间精密度范围分别为 1.62%~3.82%和 2.07%~5.07%,回收率在 95.97%~97.74%之间。

表 2 万古霉素的精密度和准确度  
Table 2 Precision and accuracy of vancomycin

化合物 Compound	浓度值 Concentration/(mg/L)			精密度 Accuracy/%	
	标示浓度 Nominal concentration/ (mg/L)	实测浓度 Measured concentration/ (mg/L)	回收率 Recovery/%	日内 Intra-day (n=3)	日间 Inter-day (n=3)
	万古霉素	4	3.89±0.15	97.36	3.82
	9	8.80±0.31	97.74	3.50	4.41
	40	38.38±0.62	95.97	1.62	2.07

**2.2.4 检出限和定量限** 分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)作为检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),且应满足重复测定 5 次峰面积 CV≤20%。在空白血清中加入一定浓度的万古霉素标准品,按 1.3 节方法进行样品前处理后进样分析。万古霉素的 LOD 和 LOQ 分别为 0.19、1.56 mg/L, CV 值分别为 12.10%、7.56%。

**2.2.5 基质效应** 取 3 份空白血清各 100 μL,加入 350 μL 试剂盒提取液用于沉淀蛋白,离心后取 100 μL 上清液于干净进样小瓶中,加入 80 μL 超纯水,再加入各 10 μL 相应浓度的万古霉素标准品溶液和内标溶液,得到低、中、高 3 个浓度的基质标准样品,每个样品重复进样 3 次,得到万古霉素峰面积 A<sub>1</sub> 及内标峰面积 A<sub>2</sub>。取 180 μL 超纯水,加入各 10 μL 相应浓度的万古霉素标准品溶液和内标溶液,得到

低、中、高 3 个浓度的溶剂标准样品,每个样品重复进样 3 次,得到万古霉素峰面积 B<sub>1</sub> 及内标峰面积 B<sub>2</sub>。分别计算万古霉素和内标的基质因子,即 A/B。通过万古霉素的基质因子 A<sub>1</sub>/B<sub>1</sub> 除以内标的基质因子 A<sub>2</sub>/B<sub>2</sub>,计算经内标归一化的基质因子,低、中、高浓度的归一化基质因子分别为 1.28、1.13、0.87, CV 值分别为 7.60%、6.14%、6.85%,优于 15% 要求。

**2.2.6 稳定性** 取万古霉素标准品添加至空白人血清样本中,获得 4、9、40 mg/L 低、中、高 3 个浓度的血清加标样本,考察样品经 4 °C 冷藏 24 h、反复冻融 3 次以及 -20 °C 冻存 30 天的稳定性,每个样品重复测定 3 次,计算每一浓度的均值与标示浓度的偏差,结果列于表 3。所有浓度样品 CV≤4.26%,优于 15% 要求,表明万古霉素样品在以上浓度及储存条件下的稳定性良好。

表 3 万古霉素的稳定性  
Table 3 Consistency of vancomycin

化合物 Compound	标示浓度 Nominal concentration/ (mg/L)	4 °C 放置 24 h 4 °C for 24 h		反复冻融 3 次 Freeze-thaw 3 times		-20 °C 冻存 30 天 -20 °C Frozen for 30 day	
		实测浓度 Measured concentration/ (mg/L)	精密度 Accuracy/%	实测浓度 Measured concentration/ (mg/L)	精密度 Accuracy/%	实测浓度 Measured concentration/ (mg/L)	精密度 Accuracy/%
		万古霉素	4	3.94±0.09	2.28	3.86±0.16	4.26
	9	8.89±0.28	3.13	8.59±0.24	2.73	9.59±0.27	2.85
	40	39.66±0.78	2.01	37.20±0.83	2.23	40.73±0.92	0.53



**2.2.7 长时稳定性** 取适量的空白血清,加入相应浓度的万古霉素标准品及内标溶液,获得10 mg/L血清加标样本,按1.3节方法处理,涡旋混匀后进样分析,重复测定200针,结果示于图9。峰面积比均值为9.72,CV值为2.13%,表明QLIT-6610MD在进行长时间进样分析时具有良好的仪器稳定性。

### 2.3 方法验证

使用试剂盒内质控品对所建立的方法进行验证,低、中、高质控样品重复测定3组,每组重复进样3次,结果列于表4。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%,均在试剂盒质控品的靶值范围内。

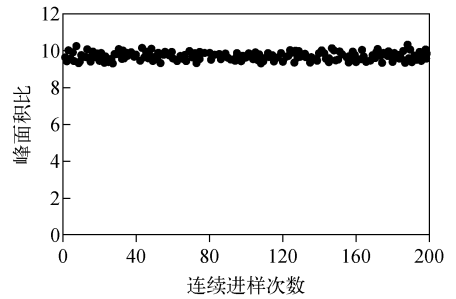


图9 QLIT-6610MD的万古霉素长时稳定性

Fig. 9 Long-term stability of vancomycin by QLIT-6610MD

表4 质控品验证结果

Table 4 Quantitative results of QC samples

化合物 Compound	类型 Type	QLIT-6610MD		靶值 Target value/ (mg/L)	靶值范围 Target value range/(mg/L)
		检测结果 Result of determination/(mg/L)	变异系数 CV/%		
万古霉素	低质控	4.71	4.49	4.13	3.31~4.97
	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

### 2.4 实际样本检测

分别采用自主研发的QLIT-6610MD、AB API4000和YS EXACT 9900MD 3台液相色谱-质谱联用仪测定42例人血清样品,万古霉素含量在2.14~35.94 mg/L范围内。利用Deming回归分析3台仪器测定结果的一致性,结果示于图10,所拟合的线性回归方程均接近标准的 $y=x$ ,展现出良好的一致性。Bland-Altman分析图中的散点基本落在95%一致性区间内,界外点数( $n=3$ )仅占7%,示于图11。经Pearson相关性分析,3台仪器间的 $R$ 值均

大于0.998 0,且呈现 $p<0.01$ 的显著性水平。上述分析结果表明,3台仪器的测定结果具有良好的 consistency,自主研发的QLIT-6610MD可达到三重四极杆质谱仪的定量水平。

### 3 结论

本研究采用自主研发的QLIT-6610MD液相色谱-串联质谱系统,建立了准确测量血清中万古霉素的方法。样本中的内源性物质在保留时间内对目标物无干扰,所建立的方法具有良好的专属性。在1.56~50.0 mg/L范围内,万

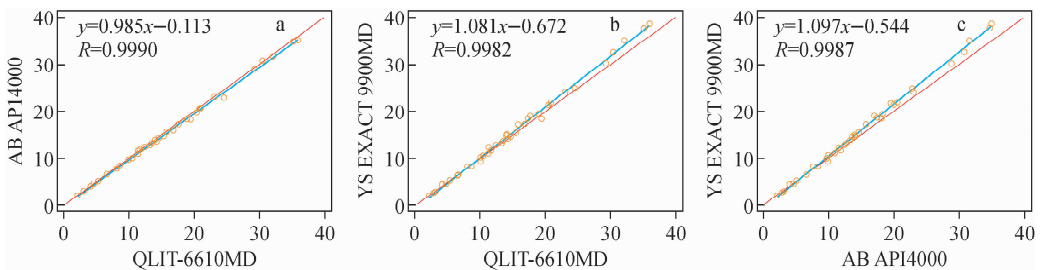


图10 实际血清样本的Deming回归分析

Fig. 10 Deming regression results of actual serum sample

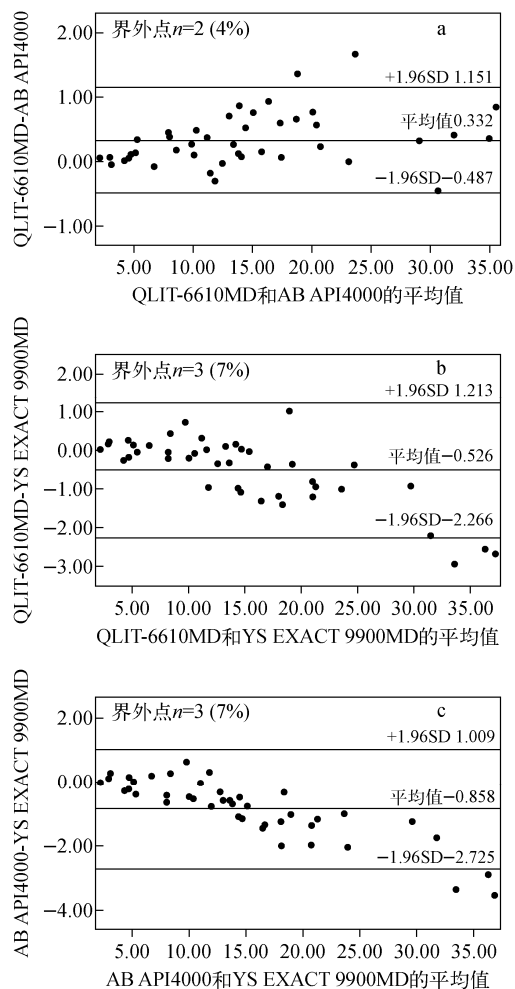


图 11 实际血清样本的 Bland-Altman 分析

Fig. 11 Bland-Altman analysis results of actual serum sample

古霉素的线性方程为  $y = 0.4003x - 0.2652$ ,  $R^2 \geq 0.99$ , LOD 和 LOQ 分别为 0.19、1.56 mg/L, 精密度优于 5.07%, 血清样本的添加回收率范围为 95.97%~97.74%, 基质效应归一化因子  $CV \leq 7.60\%$ , 样品保存稳定性  $CV \leq 4.26\%$ , 进样长时稳定性优于 2.13%。通过测定低、中、高浓度的质控品对方法进行验证, 结果均在靶值范围内。采用 QLIT-6610MD、AB API4000 和 YS EXACT 9900MD 3 台液相色谱-质谱联用仪测定 42 例临床血清样本, 万古霉素含量为 2.14~35.94 mg/L。采用 Deming 回归拟合实际血清样本数据曲线, 与标准曲线  $y = x$  几近重合, 经 Pearson 相关性分析, 相关系数  $R \geq 0.9980$ , 并呈现  $p < 0.01$  的显著性水平, 与 Bland-Altman 分析结果一致。上述分析表明, 3 台仪器的测

定结果具有良好的一致性, 自主研发的 QLIT-6610MD 测定结果准确可靠, 可达到三重四极杆质谱仪定量水平, 能够满足临床实时血药浓度监测的需求。

QLIT-6610MD 较三重四极杆质谱仪结构更为精简, 其内部四极杆轴向耦联线形离子阱, 通过筛选目标母离子控制进入离子阱中的离子数量, 有效消除生物基质中的基质干扰, 同时提高目标离子的捕获效率, 削弱空间电荷效应, 其独特的气相离子选择性富集能力, 未来在灵敏度方面将有较大的挖掘空间。但由于离子阱解离获得的碎片离子信息不够丰富, 且有低质量截止效应, 目前仍面临挑战。线形离子阱还可实现多级碎裂 ( $MS^n, n \geq 3$ ), 该技术在测定复杂基质中痕量或超痕量物质, 以及难以经色谱系统分离的同分异构体等物质方面具有较好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] PARKER S L, GUERRA VALERO Y C, ORDÓÑEZ MEJIA J L, ROGER C, LIPMAN J, ROBERTS J A, WALLIS S C. 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.
- [2] SCHMITT V, SZEITZ A, KLASSEN T L, HÄFELI U O. An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of vancomycin requiring only 2  $\mu$ L of rabbit serum[J]. *American Journal of Analytical Chemistry, Scientific Research Publishing*, 2017, 8(9): 553-563.
- [3] 李娟, 张峻, 郑巧玲, 冯朴琼, 何瑾. 神经外科万古霉素血药浓度监测结果及影响因素[J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(6): 110-114.  
LI Juan, ZHANG Jun, ZHENG Qiaoling, FENG Puqiong, HE Jin. Analysis of monitoring results and influencing factors of vancomycin blood concentration in neurosurgery department [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2021, 42(6): 110-114 (in Chinese).
- [4] 杨洁, 陈晴, 王磊, 王婧雯, 党欢, 张维. 万古霉素与利奈唑胺治疗神经外科术后颅内感染的疗效、安全性及经济性对比分析[J]. *中国药房*, 2018, 29(10): 1368-1371.  
YANG Jie, CHEN Qing, WANG Lei, WANG Jingwen, DANG Huan, ZHANG Wei. Comparative analysis of clinical efficacy, safety and econ-

- omy of vancomycin and linezolid in the treatment of intracranial infection after neurosurgery operation[J]. *China Pharmacy*, 2018, 29(10): 1 368-1 371(in Chinese).
- [5] 陈桂兰,游金兵,张雷,汤琼瑶,陈作武. 万古霉素治疗新生儿败血症的血药浓度监测与疗效[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022(7): 1 086-1 090. CHEN Guilian, YOU Jinbing, ZHANG Lei, TANG Qiongyao, CHEN Zuowu. Blood concentration monitoring and efficacy analysis of vancomycin for neonatal sepsis[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2022(7): 1 086-1 090(in Chinese).
- [6] 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*, 2022, 59(4): 253-263.
- [7] VERINGA A, STURKENBOOM M G G, DEKERS B G J, KOSTER R A, ROBERTS J A, PELOQUIN C A, TOUW D J, ALFFENAAR J W C. LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring of anti-infective drugs[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 84: 34-40.
- [8] 陈佰义,管向东,何礼贤,胡锦,黄仲义,李光辉,陆权,倪力强,倪语星,单爱莲,沈华浩,沈志祥,施毅,王椿,王睿,文富强,翁心华,肖永红,谢灿茂,徐英春,杨毅,俞云松,张菁,张文宏,张秀珍,周建新,周良辅. 万古霉素临床应用中国专家共识(2011版)[J]. *中国新药与临床杂志*, 2011, 30(8): 561-573. CHEN Baiyi, GUAN Xiangdong, HE Lixian, HU Jin, HUANG Zhongyi, LI Guanghui, LU Quan, NI Liqiang, NI Yuxing, SHAN Ailian, SHEN Huahao, SHEN Zhixiang, SHI Yi, WANG Chun, WANG Rui, WEN Fuqiang, WENG Xinhua, XIAO Yonghong, XIE Canmao, XU Yingchun, YANG Yi, YU Yunsong, ZHANG Jing, ZHANG Wenhong, ZHANG Xiuzhen, ZHOU Jianxin, ZHOU Liangfu. Chinese expert consensus on vancomycin clinical application (2011 edition)[J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2011, 30(8): 561-573(in Chinese).
- [9] CAO Y, YU J, CHEN Y, ZHANG J, WU X, ZHANG Y, LI G. Development and validation of a new ultra-performance liquid chromatographic method for vancomycin assay in serum and its application to therapeutic drug monitoring[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2014, 36(2): 175-181.
- [10] 何娜,苏珊,翟所迪,董亚琳,贺蓓,缪丽燕,王明贵,王睿,徐英春,张菁,张相林,赵维,周薇. 《中国万古霉素治疗药物监测指南(2020更新版)》解读[J]. *临床药物治疗杂志*, 2021, 19(1): 12-16. HE Na, SU Shan, ZHAI Suodi, DONG Yalin, HE Bei, MIU Liyan, WANG Minggui, WANG Rui, XU Yingchun, ZHANG Jing, ZHANG Xianglin, ZHAO Wei, ZHOU Wei. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin: 2020 update[J]. *Clinical Medication Journal*, 2021, 19(1): 12-16(in Chinese).
- [11] CHEN C Y, LI M Y, MA L Y, ZHAI X Y, LUO D H, ZHOU Y, LIU Z M, CUI Y M. Precision and accuracy of commercial assays for vancomycin therapeutic drug monitoring: evaluation based on external quality assessment scheme [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(8): 2 110-2 119.
- [12] ZHANG X, WANG D. The characteristics and impact indicator of vancomycin pharmacokinetics in cancer patients complicated with severe pneumonia[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 26(5): 492-497.
- [13] SYM D, SMITH C, MEENAN G, LEHRER M. Fluorescence polarization immunoassay: can it result in an overestimation of vancomycin in patients not suffering from renal failure? [J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2001, 23 (4): 441-444.
- [14] SHENG Y, ZHOU B. High-throughput determination of vancomycin in human plasma by a cost-effective system of two-dimensional liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1 499: 48-56.
- [15] JAVORSKA L, KRČMOVA L K, SOLICHOVA D, SOLICH P, KASKA M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography-a review[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(1): 6-20.
- [16] BROZMANOVÁ H, KACÍŘOVÁ I, UŘINOVSKÁ R, ŠIŠTÍK P, GRUNDMANN M. New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal functions and comparison with results of polarization fluorimunoassay in light of varying creatinine concentrations[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2017, 469: 136-143.
- [17] BIJLEVELD Y, de HAAN T, TOERSCHJE J, JORJANI S, van der LEE J, GROENENDAAL F, DIJK P, van HEIJST A, GAVILANES A W

- D, de JONGE R, DIJKMAN K P, van STRAATEN H, RIJKEN M, ZONNENBERG I, COOLS F, NUYTEMANS D, MATHÔT R. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014(951/952): 110-118.
- [18] 易可可, 谢洁, 江游, 黄泽建, 龚晓云, 翟睿, 乔晓婷, 刘梅英, 戴新华, 方向, 时国庆. 液相色谱-串联质谱技术在临床检验中的应用研究进展[J]. *质谱学报*, 2022, 43(6): 804-816.
- YI Keke, XIE Jie, JIANG You, HUANG Zejian, GONG Xiaoyun, ZHAI Rui, QIAO Xiaoting, LIU Meiyong, DAI Xinhua, FANG Xiang, SHI Guoqing. Progress in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical diagnosis [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2022, 43(6): 804-816(in Chinese).
- [19] FANG X, XIE J, CHU S, JIANG Y, AN Y, LI C, GONG X, ZHAI R, HUANG Z, QIU C, DAI X. Quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry system for clinical biomarker analysis[J]. *Engineering*, 2022, 16: 56-64.
- [20] SAUTER M, UHL P, FOERSTER K I, MOHR I, HÖNE R T, MERLE U, BURHENNE J, HAEFELI W E. 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.
- [21] 楚士颖, 谢洁, 江游, 王方军, 翟睿, 冯璐璐, 龚晓云, 戴新华, 田地, 方向, 邱春玲, 黄泽建. 四极离子阱内离子解离技术的研究进展[J]. *质谱学报*, 2019, 40(4): 391-400.
- CHU Shiyong, XIE Jie, JIANG You, WANG Fangjun, ZHAI Rui, FENG Lulu, GONG Xiaoyun, DAI Xinhua, TIAN Di, FANG Xiang, QIU Chunling, HUANG Zejian. Advances in ion dissociation within quadrupole ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2019, 40(4): 391-400(in Chinese).
- [22] 徐福兴, 党乾坤, 丁航宇, 黄正旭, 汪源源, 周振, 丁传凡. 碰撞气体的种类和压力对离子阱质谱性能的影响[J]. *分析化学*, 2017, 45(4): 587-592.
- XU Fuxing, DANG Qiankun, DING Hangyu, HUANG Zhengxu, WANG Yuanyuan, ZHOU Zhen, DING Chuanfan. Effect of collision gas type and pressure on ion trap mass spectrometry performance[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(4): 587-592(in Chinese).
- [23] MOL H G J, van DAM R C J, VREEKEN R J, STEIJGER O M. Determination of chlormequat in pears by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Aoac International*, 2000, 83(3): 742-747.
- [24] HOGENBOOM A C, NIESSEN W M A, BRINKMAN U A T. Rapid target analysis of microcontaminants in water by on-line single-short-column liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 794(1/2): 201-210.
- [25] KÖNIG K, KOBOLD U, FINK G, LEINENBACH A, DÜLFFER T, THIELE R, ZANDER J, VOGESER M. Quantification of vancomycin in human serum by LC-MS/MS[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2013, 51(9): 1761-1769.
- [26] 梁振. 多分离模式/电喷雾质谱联用方法发展及相关基础研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2005.
- [27] 谢洁, 易可可, 高文静, 刘浩, 李家练, 黄泽建, 刘梅英, 余青霓, 王涵文, 江游, 戴新华, 方向. 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*, 2023, 44(1): 13-24.
- XIE Jie, YI Keke, GAO Wenjing, LIU Hao, LI Jialian, HUANG Zejian, LIU Meiyong, YU Qingni, WANG Hanwen, JIANG You, DAI Xinhua, FANG Xiang. Determination of 25OHD in serum based on quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometric technique[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2023, 44(1): 13-24(in Chinese).
- [28] SUZUKI S, KAKEHI K, HONDA S. Comparison of the sensitivities of various derivatives of oligosaccharides in LC/MS with fast atom bombardment and electrospray ionization interfaces [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(13): 2073-2083.
- (收稿日期: 2023-02-19; 修回日期: 2023-06-05)