

White paper

— 减少HPLC/LC-MS的风险  
治疗和监测治疗性药物

# Reducing risk in HPLC / LC-MS therapeutic drug treatment and monitoring

Why water purity matters

# 内部

- 4 介绍
- 5 一、 治疗药物监测（TDM）和处理LC-MS/M
- 8 二、 抗精神病药物TDM的UHPLC-MS/MS法
- 10 三、 法医毒理学中的样品制备和处理
- 13 四、 测量严重感染时的抗生素
- 16 结论
- 17 参考文献
- 18 联系方式

“在所有高效液相色谱法研究难点中90%是由色谱柱问题引起的，其中大部分来自于污染的水”。

---

上述引文摘自LC/MS：《实际使用者指南》，作者M.C McMaster，反映了采用最高质量水进行HPLC分析的重要性。<sup>1</sup>

# 介绍

本白皮书有助于您理解超纯水对于HPLC和LC-MS/MS的重要性。我们将研究与其在不同应用中优化相关的挑战，这些挑战往往与使用水质相关，并找到一些克服这些挑战的关键方法。

我们研究的应用范围十分广泛，包括

- (一、) ISD监测和处理，
- (二、) 抗精神病药物监测，
- (三、) 法医毒理学药物监测和
- (四、) 调查严重感染时抗菌剂的循环水平。

研究人员早就认识到，水纯度对于HPLC监测取得成功起着决定性的作用。事实上，在最近一次关于HPLC应用的调查中，89.7%的受访者承认，水纯度对他们的HPLC应用能否取得成功起着决定性的作用，且在HPLC结果的质量受到质疑时，水中的微粒和有机污染物都被举证为误差的最可能的潜在来源（n=229，内部数据，ELGA 2019）。

既然水作为HPLC和LC-MS/MS中所谓的移动相或液相如此重要，由此得出结论，水纯度对于任何涉及这些技术的诊断或药物应用都是至关重要的。

这一点已经在以前的ELGA白皮书中讨论过：“如何由使用高纯水的HPLC获得最精准可靠的数据”，白皮书重点讨论了特定的水污染物对HPLC结果的影响，并强调HPLC中采用电阻率为18.2 MΩ.cm、总有机碳（TOC）<10ppb和细菌数<1 CFU/ml<sup>2</sup>的超纯（I类）水的必要性。



ELGA编辑团队

## 用于治疗药物监测 ( TDM ) 和处理的LC - MS/MS

### 挑战：不精确的药物剂量会导致死亡

全球器官移植活动的增长正驱动对监测免疫抑制药物更精确快速而又经济划算的方法的需求。

尽管免疫抑制药物 (ISDs) 存在固有的风险，但其广泛使用促进了每年数以万计的同种异体移植的移植手术，因此有降低病人发病率和死亡率的巨大的潜力。

窄治疗指数ISD的治疗药物监测 (TDM) 是日益受到欢迎的一款工具，可最小化药物毒性，并同时最大限度防止移植物损失和器官排斥。器官移植病人体内定期精确的TDM是减少与其使用有关的风险必不可少的步骤，

监测内容包括：

- 窄治疗范围的药物疗效极有可能造成病人用药量不足或过量，取决于病人当前的健康状况和治疗阶段，病人也可能会出现个体反应和变异反应

- 可变的药物动力学意味着，在病人的免疫系统内，在任何给定时间都有ISD可用

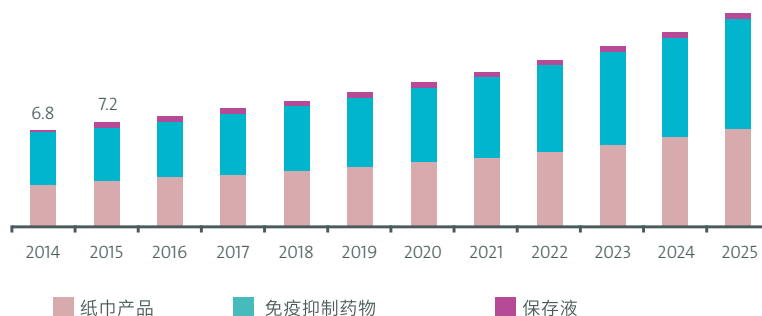


图1. 2014 - 2025年间美国器官移植增加趋势 (十亿美元)<sup>3</sup>。

- 如果剂量过高，有潜在的毒性：通过加速动脉粥样硬化、糖尿病、高血压等疾病伤害其它器官（例如，肾脏）以及增大对机会性感染和恶性肿瘤的敏感性
- 安全和法规合规：对于每个个体患者，必须遵循严格的指导方针

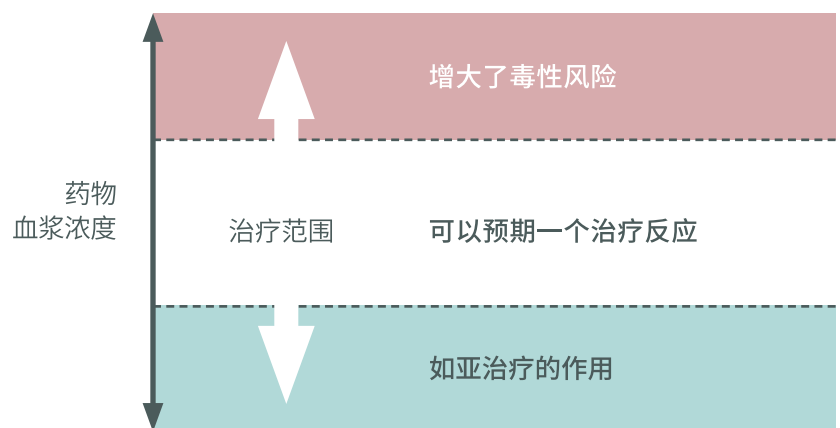
几十年来，免疫测定法一直是所有类型TDM的首选主要测定方法和技术。然而，免疫测定法伴随着很多缺点，其中包括与代谢物交叉反应，这会导致不精确的药物剂量、假阳性和假阴性，反过来又会产生可怕的后果，居于导致病人死亡最坏病例之首。<sup>4</sup>

为此，研究人员目前正在用LC-MS/MS等质谱分析（MS）方法取代免疫测定法，此分析方法比免疫测定法提高了特异度、灵敏度和精确度。LC-MS/MS快速灵活、适应性强和允许同时量化多个分析物。<sup>5</sup>

测定的药物浓度差异如此微小（ng/ml），对成功实施用LC-MS/MS进行药物监测提出了挑战，包括样品制备的分析前阶段和HPLC过程本身运行期间。

免疫抑制药物也用于治疗自体免疫疾病。这些药物弱化免疫系统，从而抑制人体内潜在有害的自体免疫反应的影响。已经用免疫抑制药物治愈的自体免疫疾病包括，但不限于，牛皮癣、红斑狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、多发性硬化症和斑秃。<sup>6</sup>

图2 精确测定ISD的重要性



五个最常见的处方免疫抑制药物是：环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司（雷帕霉素）、依维莫司和霉酚酸。最近的进展表明，液相色谱一串联质谱分析（LC-MS/MS）现在已经充分标准化，足以执行一直研究主要ISD的TDM，且现在可以取代免疫测定法。<sup>7</sup>

他克莫司可通过抑制混合淋巴细胞反应和生成细胞毒性T细胞产生体外免疫抑制作用。对通过含量实现的他克莫司血清测量的免疫测定法（ELISA）和LC-MS/MS方法之间的一致性的评价的一个令人关注的研究表明，ELISA方法的主体间变异系数高于LC-MS/MS的主体间变异系数，最终结论是，较低LC-MS/MS的主体间变异会导致较少的剂量变化和总体改善儿科肾移植病人体内的免疫抑制控制。

与ISD的精确的监测有关的挑战以样品类型和质量是整个LC-MS/MS过程期间讨论药物的相对稳定性。

特别是，在样品制备过程中使用的水必须超纯：非病人样品中固有的任何细菌或离子都可能摧毁其完整性，从而导致结果扭曲和假阳性或假阴性和不精确的配量<sup>1</sup>。鲜血可能是用于ISD分析的最常见的样品类型，因为鲜血是十分重要的某一特定ISD的实际循环浓度：即鲜血的生物利用度<sup>8</sup>。然而，最近利用干燥的血斑点进行的研究表明，鲜血也能用作一个样品类型，用于在LC-MS/MS前面监测ISDs<sup>9</sup>。

然而无论哪种样品类型，研究人员和QA科学家都要在一个极窄的治疗范围内频繁应付ISD的临界量。为了充分解决这一挑战，在制备病人TDM样品和MS前面的HPLC分析中使用的水必须超纯，以避免可能被误认为是活性药物成分的鬼峰值等产生的问题<sup>2</sup>。



用于治疗药物监测（TDM）和处理的LC - MS/MS



## 解决方案：确保您TDM化验的超纯水供应

实际上，一个含有标准化审计可追踪成分，足够纯的水必须用于这些临床化验，比如由一个内部水净化系统提供的纯水。由一个不可靠的水源引入的可变性越低，则开发的LC-MS/MS TDM化验就越有可能全局标准化和再现，而FDA等相应组织也因此更愿意批准此方法。

此整个工作流程标准化的深远影响是，更多的样品和更多的病人数据能有意地合并和比较和能够精简试验，其中包括HPLC和LC-MS中使用的水质量的标准化。这必将最终导致更成功的病人治疗效果和对全世界的人类医疗保健事业做出巨大贡献。🕒



## 抗精神病药物 TDM的U H PLC - MS/MS方法



### 挑战：检测的下限

治疗药物监测（TDM）的另一个诱发区域是，开发测量特定的抗精神病药物含量的方法。鉴于病人对此类药物反应的个体特征，此类方法可潜在用于优化药物释放和提高病人治疗效果<sup>10</sup>。鉴于此方法检测的抗精神病药物的较小（ng/ml）浓度，分析前阶段和HPLC检测使用的水的纯度至为关键<sup>10</sup>。

为此，开发了一个基于UHPLC-MS/MS的选择性灵敏方法，用于同时量化人血浆中七种典型的抗精神病药物（顺式-氯普噻吨、三氟噻吨、氟哌啶醇、左美丙嗪、匹泮哌隆、普马嗪和珠氯噻醇）。一个采用乙腈的简单的蛋白质沉淀程序用于进行样品制备。所有分析物都采用稳定的同位素标记内部标准可保持内部标准-正常基体效应在92–108%范围内。

方法经过充分的验证，涵盖了氟哌啶醇、三氟噻吨、左美丙嗪、普马嗪、珠氯噻醇、顺式-氯普噻吨和匹泮哌隆的大浓度范围。真实性（89.1–114.8%）、重复性（1.8–9.9%）、中间精密度（1.9–16.3%）和精确度轮廓（<30%）符合最新的国际建议。



## 治疗药物监测 ( TDM ) 和处理的 LC - MS/MS

### 解决方案：确保您的抗精神病药物化验的超纯水供应

随后监测了500多个病人的血浆样品。水纯度是成功开发和验证化验方法的关键，其中检测的下限约为ng/ml等级，尤其是在尝试再现实验室之间的结果时<sup>10</sup>。©





## 法医毒理学中的样品制备和处理

### 挑战：找到法医毒理学试验中可变性的来源

法医毒理学包含生物样本中酒精、药物和其它有毒物质的测量和在法医学背景中解释此类结果。在此，作为一个具体示例，我们考虑对毛发中的毒品进行测量，测量结果证明，水对测量结果的精确度有直接影响。

检测毛发样品的毒品或药物成分现在是临床和法医毒理学中一个完善的技术，但实验室之间的定量结果会变化。一项新的研

究提出了提高再现性的建议，这对于边界检测结果特别重要。

在很多情况下，确定一个人是否涉嫌滥用毒品或药物十分重要，其中包括法医学、临床应用或兴奋剂检测。药物分析通常在体液上执行，比如尿样或血样。

但近些年来，灵敏分析技术的突飞猛进已经扩展了在不太传统的样品中使用药物的机会，其

中包括毛发。

毛发分析提供很多优点，因为样品能在不侵袭和严密监视之下轻易收集，从而防止任何潜在的掺杂或替换。在取得了一个物质以后，毛发分析也能将药物检测的窗口期显著地扩展到周、月甚至于年。

由于这些原因，毛发分析正越来越广泛地用于回溯性药物监测。

但实验室之间的定量结果变化相当大，主要是由于缺少标准化的协议。

当药物浓度接近一个阳性结果的截断值时，这就会具有临界重要性，比如接近由包括欧洲工作场所药物检测学会（EWDTS）

在内的外部组织定义的截断值。

## 聚焦于溶剂

在项新的研究中，瑞士苏黎世大学的研究人员评估了使用不同的溶剂对来自于吸毒者的样品的毛发分析结果的影响<sup>11</sup>。

团队利用七种不同的溶剂，按照一步或两步协议，对从已知吸毒者身上收集的汇集毛发样品进行了萃取。他们接着利用液相

色谱串联质谱（LC-MS/MS）

检测和量化不同的毒品或药物，其中包括鸦片剂、氯胺酮、抗抑郁药和抗组胺药。

在制备用于检测过程的液相色谱阶段的流动相时，他们采用了由ELGA LabWater的PURELAB系统处理的水。





## 法医毒理学中的样品制备和处理

### 解决方案：用超纯水去除可变性的主要来源

研究人员发现，毒品产量取决于特定物质和溶剂萃取方法。对于很多毒品，用盐酸酸化甲醇的两步萃取法给出了最高的萃取率，而在其它情况下，选择的溶剂又很小的影响。然而，在一个一步协议中用乙腈作溶剂则普遍给出了低萃取率。

这一重要的新研究表明，萃取剂的选择是量化毛发样品中的

毒品的一个重要的因素。研究结果强调，萃取协议应在各个检测实验室间统一，特别是在解释某个人结果是否基于相同的截断值的情况下。

作者们还强烈建议，实验室应采用从已知吸毒者身上收集的真正的毛发样品验证他们的分析方法的精确度和精度，而不是用人工加入标准的样品。①

# 四、

## 测定严重感染中的抗生素

### 挑战：找到治疗严重感染的正确剂量的抗生素

当处理包括在他们的方案和他们的毒性水平之间有一个窄余裕的药剂时，精确测定抗菌剂的血清浓度十分重要，比如氨基甙类抗生素（尤其是庆大霉素）或在肾衰竭病人体内，他们积累了超出肾脏能正常排泄的异常高水平的抗菌剂。如果病人免疫功能低下，这尤为重要。

在此，我们对一个研究进行总结，其中，简单高效液相色谱-质谱分析方法被用于进行抗菌剂的TDM。

当处理低浓度的分析物（ng/ml）时，在最佳条件下执行HPLC和LC-MS分析，流动相制备使用的水需要高度纯化：水质对可达成的检测极限有直接影响<sup>12</sup>。

研究着眼于危重症病人体内治疗药物监测过程中LC-MS/MS使用的九种抗菌剂的同时量化，而且，在考虑抗生素的通用（或滥用）时，也很有用<sup>13</sup>。

适当的抗生素处理是成功治疗系统感染的一个先决条件。

基于积累的科学证据，一个固定剂量方案会导致不足和无效的

抗生素方案。研究的目的是因此是开发和验证一个简化而又敏感的方法，以使用LC-MS/MS同时量化抗菌剂，以此用于治疗药物监测开发个性化治疗方案。

本研究中监测的九种抗菌剂有：阿普洛韦、氨苄青霉素、头孢吡辛、环丙沙星、美罗培南、灭滴灵、哌拉西林、利福平和他唑巴坦，全部采样自肝素锂血浆。

一个简单的样品制备方法和色谱运行时间为10分钟能够快速处理样品。制备方法根据**欧洲药品管理局**的生物分析方法验证指导方针进行验证和解决了灵敏度、特异度、线性度、精确度、精度、稀释完整性、遗留、恢复、基体效应和稳定性问题。在色谱运行时间为10分钟时，洗脱的抗菌剂的保留时间范围在1.1到2.2分钟之间。所有抗菌剂的校正曲线在范围为

1-100 mg/L之间保持线性，样品的2倍或5倍稀释因此得以实现。未观察到干扰和遗留和样品在室温或自动取样器中稳定至少5小时。作者们得出如下结论，由于其分析时间短、需要少量的血浆和其特异度和精确度高，使得本研究开发的LC-MS/MS方法适用和实用于日常临床实验室实习中的抗菌剂的治疗药物监测。

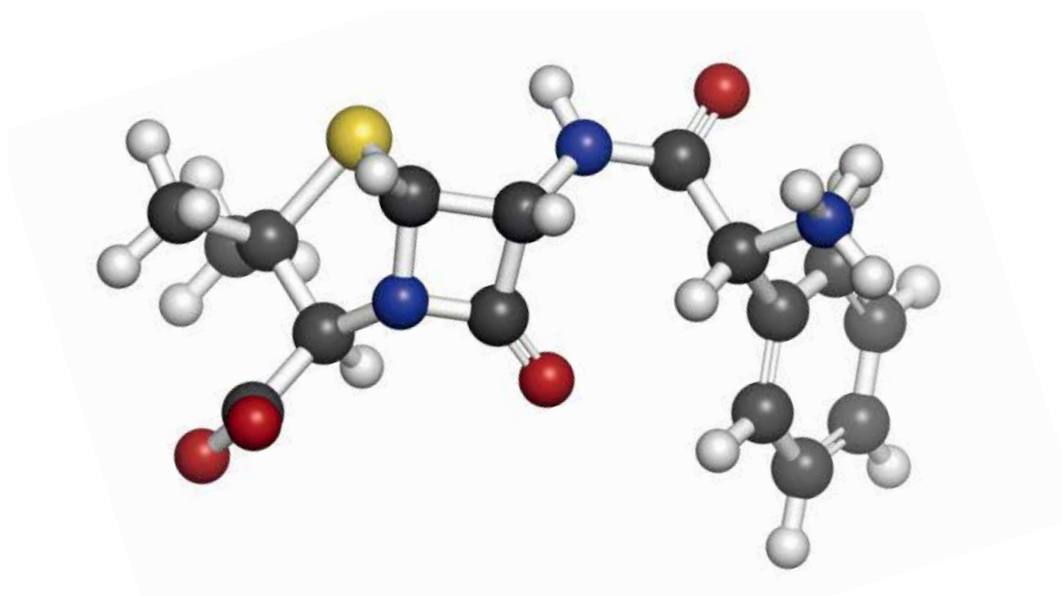


# 四、

## 测定严重感染中的抗生素

### 解决方案：在抗菌剂化验中使用超纯水

当处理低浓度的分析物 (ng/ml) 时，在最佳条件下执行HPLC和LC-MS分析，流动相制备使用的水需要高度纯化：水质对可达成的检测极限有直接影响<sup>12</sup>。④



# 结论

---

通过这些从免疫抑制剂处理中的治疗药物监测到吸毒者中违禁物的精确测定的具体示例，清楚表明，为了取得精确和成功的病人和法医检测结果，用于样品制备和MS前面的HPLC的水的纯度至为关键。

在这些HPLC相关的化验中，我们更多着眼于ng/ml级分析物的检测的下限，并不断寻求标准化试验和因此提高不同的实验室间取得结果的再现性。安装一个内部水净化系统是最小化与如此敏感的临床应用有关的风险的最好方法。

为探索如何优化您HPLC相关的临床应用中水的质量和深入讨论您的需求，请访问<https://www.elgalabwater.com/products>



# References

---

1. McMaster, M.C. (2005) HPLC and Column Maintenance (Chapter 4), LC/MS: A Practical User's Guide, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., Page 33.
2. ELGA LabWater, How to Get the Most Accurate and Reliable Data from HPLC using Ultrapure Water <https://www.elgalabwater.com/primer-hplc-ultrapure-water>. Accessed 6 Nov 2019.
3. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/transplantation-market>. Accessed 6 November 2019
4. Dasgupta, A. (2016) Personalized Immunosuppression in Transplantation: Role of Biomarker Monitoring and Therapeutic Drug Monitoring. Chapter 2 - Limitations of immunoassays used for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants, 29-56.
5. Héту, P.-O., Robitaille, R. and Vinet, B. (2012) Successful and cost-efficient replacement of immunoassays by tandem mass spectrometry for the quantification of immunosuppressants in the clinical laboratory. *Journal of Chromatography B*, Volumes 883–884, 95-101.
6. Kant V, Verma P K and Kumar P. (2009). Immunosuppressive drug therapy: An overview. *J. Immunol.Immunopathol.* 11(2): 21-32.
7. Paniagua-González, L., et al. (2019) A multidrug LC–MS/MS method for the determination of five immunosuppressants in oral fluid, *Bioanalysis* 11(6), pp1509-1521.
8. Tsiptis, E., Gupta, N. et al. (2016) Bioavailability, Efficacy and Safety of Generic Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Nephrology* 44(3):206-218
9. Vermeersch, P. et al., (2019) Preanalytical considerations in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants with dried blood spots *Diagnosis* v6, pp57–68.
10. Gradinarua, J., et al., (2014) Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 88, 25 January 2014, Pages 36-44 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.041>
11. Madry, M. M., Kraemer, T. and Baumgartner, M. (2018) Systematic assessment of different solvents for the extraction of drugs of abuse and pharmaceuticals from an authentic hair pool. *Forensic Science International* 282, 137-143.
12. Regnault C., et al., (2004) Ultrapure water for liquid chromatography-mass spectrometry studies. *J Chromatogr A.* 1030(1-2), 289-95.
13. Neugebauer, S., et al., (2019) Simultaneous quantification of nine antimicrobials by LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring in critically ill patients. *Therapeutic Drug Monitoring* 41, 29-37.

# 致力于 科研探索

ELGA Labwater 是水纯化系统工程、服务和支持方面的专家。

无与伦比的产品设计赢得了国际认可和众多奖项。

全球技术服务团队以专业知识为全世界的科学和医疗保健领域提供支持。

来自 AQUAVISTA 的全球数字性能监控确保实验室工作不间断。

要找到离您最近的 ELGA 代表，请访问 [www.elgalabwater.com](http://www.elgalabwater.com) 并选择您的国家/地区以获取详细联系信息。

#### ELGA LabWater

埃尔格——实验室纯水专家  
电子邮件: [elga.china@veolia.com](mailto:elga.china@veolia.com)  
网址: [www.elga.com](http://www.elga.com)

威立雅水处理技术(上海)有限公司  
上海市南京西路1168号中信泰富广场12层  
邮编: 200041  
服务热线: 400-616-8882



超过 70 项国际专利