

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.017

高效液相色谱-串联质谱法测定移植患者血浆泊沙康唑水平

王 磊, 孙文利, 刘红星[△]

(河北燕达陆道培医院, 河北廊坊 065201)

摘要:目的 建立测定血浆泊沙康唑水平的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法,并应用于临床治疗药物监测。**方法** HPLC 色谱柱为 Ultimate XB-C18。柱温 50 ℃,流速 0.8 mL/min,流动相为含 0.1% 甲酸,以及 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液和含 0.1% 甲酸的甲醇溶液,梯度洗脱。质谱检测方式为 ESI 正离子模式,MRM 扫描,监测泊沙康唑 m/z 701.5~683.4 作为定量离子,内标泊沙康唑-d4 m/z 705.4~687.5 作为定量离子。**结果** 泊沙康唑水平在 0.1~10.0 μg/L 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.993\ 0$),日内及日间精密度 <5%,平均回收率为 90%~103%。**结论** 该方法简便、准确、快速,适用于泊沙康唑的血药浓度测定。

关键词:泊沙康唑; 高效液相色谱-串联质谱; 治疗药物监测

中图分类号:R969.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2902-04

Determination of plasma posaconazole level in transplant patient by HPLC-MS/MS

WANG Lei, SUN Wenli, LIU Hongxing[△]

(Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei 065201, China)

Abstract: Objective To establish a HPLC-MS/MS method for determining of plasma posaconazole level in transplant patient, and to apply it in the drug monitoring of clinical treatment. **Methods** The HPLC chromatographic column was Ultimate XB-C18 column, the column temperature was 50 ℃, the flow rate was 0.8 mL/min, the mobile phase was the aqueous solution containing 2 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid, and methanol solution containing 0.1% formic acid. The gradient elution was performed. The mass spectrum detection method was ESI positive ion mode, MRM scanning, monitoring posaconazole m/z 701.5—683.4 served as quantitative ion. The internal standard substance posaconazole-d4 m/z 705.4—687.5 served as quantitative ion. **Results** The posaconazole level had good linear relation with the peak area during the range of 0.1—10 μg/L ($r=0.993\ 0$). The intra- and inter-day precision <5%, the average recovery rate was 90%—103%. **Conclusion** This method is convenient, accurate and rapid, and is suitable for the determination of posaconazole blood concentration.

Key words: posaconazole; HPLC-MS/MS; drug monitoring

泊沙康唑是新一代三唑类广谱抗真菌药物,是被美国食品药品监督管理局批准用于预防侵袭性曲霉感染的一线药物,可用于 13 岁以上严重免疫抑制患者侵袭性真菌感染和念珠菌感染的预防和治疗^[1],还可用于无法耐受常用抗真菌药物成人患者的侵袭性曲霉病、镰刀菌病、慢性芽生菌病、分枝杆菌病和孢子菌病的治疗^[2]。侵袭性曲霉感染是移植患者最危险的并发症之一,病死率高,常推荐口服泊沙康唑预防感染。药物低暴露量与泊沙康唑临床疗效不佳密切相关,药物高暴露量则可增加药物的毒性反应。美国传染病学(IDSA)2007 年更新的《组织胞浆病治疗指南》也指出,由于个体间变异和潜在的药物相互作用,测定稳态血药浓度有助于提高疗效^[3-4]。多数研究认为泊沙康唑血浆谷值与抗真菌疗效最相关的药动学/药效学参数 AUC₂₄/MIC 有较好的相关

性^[5-8]。因此,通过检测泊沙康唑血浆谷值可以有效提高用药的有效性与安全性,从而为临床合理使用泊沙康唑提供参考。目前,关于国内泊沙康唑血药浓度监测研究较少,可用于借鉴的方法更少,且检测方法多为色谱法。色谱法分析时间长,前处理繁琐,所需血样量多,污染大,而质谱法用于泊沙康唑血药浓度的检测耗时短,处理简单。因此,开发一种适合泊沙康唑血药浓度检测的质谱法用于临床血药浓度监测,就显得非常重要。本文作了这方面研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 岛津 20A 高效液相色谱系统(带自动进样器),配有 AB Sciex 4000 QTRAP 质谱仪,其林贝尔涡旋混合器,全自动高速冷冻离心机(Thermo Fisher),Analyst V1.5.2 工作站(AB 公司)。

1.2 试剂 甲醇(HPLC-Grade, fisher)、屈臣氏蒸馏

水(广州屈臣氏)、甲酸(色谱级, Mreda Technology INC)、乙酸铵(色谱级, Mreda Technology INC)、泊沙康唑及泊沙康唑-d4 (Standard Reference Material from qcc. USA)。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法的液相色谱及质谱条件 (1)色谱条件。采用 Ultimate XB-C18 色谱柱(4.6 mm×50.0 mm, 5 μm), 柱温 50 °C; 进样量 3 μL; 流动相 A: 0.1% 甲酸的甲醇溶液; 流动相 B: 2 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸的水溶液。流速: 0.800 0 mL/min; 洗脱方式: 梯度洗脱, 其中 0.1~

0.2 min, A 相水平 75%~90%, 保持 0.2 min, >0.2~0.5 min A 相水平 75%~90%, 保持 0.3 min, >0.5~0.9 min A 相水平 75%, 保持 2.1 min。(2)质谱条件。离子源: 电喷雾电离源(ESI); 离子极性: 正离子模式; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 喷雾电压(IS): 5 500.00; 温度: 425.00 °C; 源内气体 1(GS1, N2): 55; 气体 2(GS2, N2): 55; 气帘气体(CUR, N2): 20; 碰撞气压力: 中等; 用于定量分析的离子反应为泊沙康唑 m/z 701.5~683.4、泊沙康唑-d4 m/z 705.4~687.5。各种质谱条件参数见表 1。

表 1 质谱条件

项目	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间(ms)	去簇电压(V)	碰撞能量(V)	出口电压(V)	排除电压(V)
泊沙康唑	701.5	683.4	150	158	49	11	10
泊沙康唑-d4	705.4	687.5	150	130	35	11	10

1.3.2 对照品贮备液的配制 精确称取对照品泊沙康唑 10.00 mg, 置于小烧杯中, 用适量甲醇溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到 1 mg/mL 泊沙康唑母液, 作为贮备液。然后分别用甲醇水(1:1)依次稀释母液, 泊沙康唑对照品水平分别为 1、5、10、25、50、75、100 μg/mL, 作为系列标准工作液。

1.3.3 样品处理方法 精密量取标本血浆 100 μL 置于 1.5 mL 离心管中, 然后加入 2 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液 100 μL, 涡旋振荡 1 min, 再加入含有特定水平泊沙康唑-d4 的甲醇 800 μL, 涡旋振荡 1 min, 于 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 170 μL 置于自动进样器。

1.3.4 标准曲线的制备 分别在 7 个 1.5 mL 离心管中加入 10 μL 泊沙康唑各系列标准工作液, 并加入空白血浆 90 μL, 得到泊沙康唑水平为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10 μg/mL 系列质量浓度。按“1.3”项中样品处理方法处理后进样测定, 以泊沙康唑峰面积与泊沙康唑-d4 峰面积比为(Y)对泊沙康唑水平(X)进行线性回归, 得泊沙康唑标准曲线。

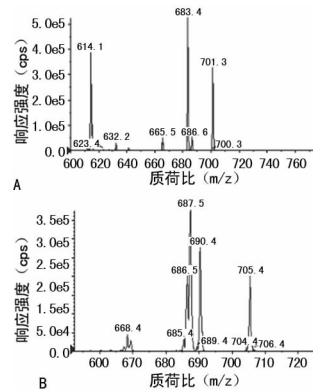
1.3.5 回收率、精密度试验 分别在 3 个 1.5 mL 离心管中加入泊沙康唑标准工作液 5、10、50 μg/mL 各 10 μL, 并加入空白血浆 90 μL, 得到泊沙康唑水平为 0.5、1.0、5.0 μg/mL 的样品。按“1.3”项中样品处理方法处理后进样测定, 各水平日内重复测定 5 次, 计算相对回收率及日内精密度, 并连续测定 5 d, 计算日间精密度。

1.3.6 稳定性试验 分别在 3 个 1.5 mL 离心管中加入泊沙康唑标准工作液 5、10、50 μg/mL 各 10 μL, 并加入空白血浆 90 μL, 得到泊沙康唑水平为 0.5、1.0、5.0 μg/mL 的样品。取 1 份样品按“1.3”项中血

样处理方法处理后置于 4 °C 冰箱中, 于放置时间为 72 h 分别测定各样品的水平; 其余样品于 4 °C 冰箱中放置 72 h 后取出放至室温, 按“1.3”项中样品处理方法处理后进样测定, 考察其稳定性。

2 结果

2.1 色谱质谱行为 在“1.1”项下的色谱、质谱条件下, 测得泊沙康唑及泊沙康唑-d4 质谱图, 见图 1; 泊沙康唑及泊沙康唑-d4 的色谱图, 见图 2。由图 2 可知, 血中没有物质干扰泊沙康唑的测定, 泊沙康唑的保留时间为 2.93 min, 峰型良好, 无杂质峰干扰。



注: A 为泊沙康唑; B 为泊沙康唑-d4

图 1 泊沙康唑、泊沙康唑-d4 质谱图

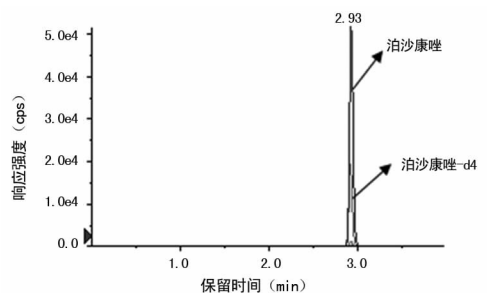


图 2 泊沙康唑及泊沙康唑-d4 色谱图

2.2 标准曲线回归方程 泊沙康唑的回归方程： $Y = 1.11 \times 105X + 2.78 \times 10^3$, $r = 0.993 0$, 表明泊沙康唑在 $0.1 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系较好, 可用于定量检测, 其最低定量限为 $0.025 \mu\text{g/mL}$ 。标准曲线见图 3。

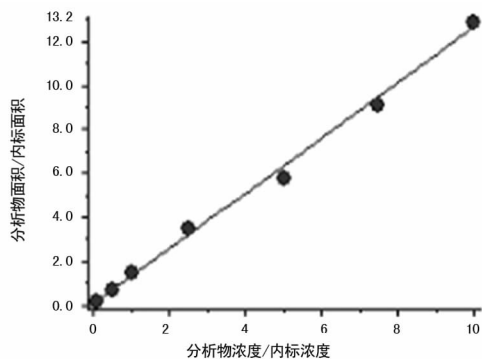


图 3 泊沙康唑标准曲线

2.3 方法学评价结果 泊沙康唑的相对回收率为 $90\% \sim 103\%$, 日内及日间精密度均小于 5% 。见表 2。

表 2 回收率和精密度试验结果 ($n = 5$)

水平 ($\mu\text{g/mL}$)	相对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
0.5	95.90 ± 4.52	4.75	4.95
1.0	98.24 ± 2.65	2.69	2.83
5.0	100.41 ± 2.35	2.34	2.42

2.4 稳定性考察结果 由表 3 可知, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 血中泊沙康唑放置 72 h 水平无明显下降; 血样经过处理后, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 泊沙康唑放置 72 h 水平基本保持不变。由此可以得出, 在此条件下测定血中泊沙康唑水平的稳定性良好, 能保证测定结果的准确性。

表 3 稳定性考察结果 ($n = 3, \bar{x} \pm s, 72 \text{ h}$)

项目	样品 ($\mu\text{g/mL}$)	泊沙康唑 ($\mu\text{g/mL}$)
未处理血浆 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.5	0.47 ± 0.07
	1.0	0.88 ± 0.10
	5.0	5.40 ± 0.15
已处理血浆 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)	0.5	0.49 ± 0.06
	1.0	0.98 ± 0.29
	5.0	5.51 ± 0.17

2.5 临床应用 收集 2015 年 12 月至 2016 年 8 月笔者所在医院检测泊沙康唑血药浓度的患者血浆标本 50 份, 其中男 23 份, 女 27 份; 患者年龄 $1 \sim 66$ 岁。标本采集时间为下次给药前, 采集静脉血 2 mL , 混匀, EDTA 抗凝。室温 ($20 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$) 下标本存放时间不超过 4 h, 当日检测。药物血药浓度结果见表 4。HPLC-MS/MS 法能满足临床对泊沙康唑血药浓度监测的需求, 同时

也可以反映出泊沙康唑临床应用血药浓度一般不会太高, 很少产生明显毒性及严重不良反应; 检测中血药浓度低值较多, 达不到预防和治疗真菌感染的效果。

表 4 血药浓度检测结果 ($n = 50$)

泊沙康唑 ($\mu\text{g/mL}$)	n	构成比 (%)
< 0.5	6	12
$0.5 \sim 1.0$	29	58
$> 1.0 \sim 5.0$	15	30
> 5.0	0	0

3 讨论

泊沙康唑有明显药代动力学参数个体差异, 口服泊沙康唑通过胃肠道吸收, 但吸收具有饱和性。口服剂量小于 800 mg 时, 其血药浓度和剂量呈线性关系, 达到或超过 800 mg 时吸收程度开始显著降低。泊沙康唑在体内的分布很广泛, 口服给药 $5 \sim 8 \text{ h}$ 后达峰值血药浓度。泊沙康唑的血浆蛋白结合率很高 (98.2%), 主要与清蛋白结合, 所以一般血药浓度检测采用血浆。泊沙康唑几乎不通过肝细胞色素 (CYP) 酶系代谢, 一般通过葡萄糖醛酸化反应代谢, 但它明显抑制肝酶 CYP3A4 的活性, 消除半衰期很长 (超过 35 h), 连续口服给药后 $7 \sim 10 \text{ d}$ 达稳态血药浓度^[9]。移植患者免疫功能弱, 容易感染^[9-11]。侵袭性曲霉菌感染是移植患者最危险的并发症之一, 病死率高, 常推荐口服泊沙康唑预防该类患者的侵袭性曲霉菌感染^[12], 建议其有效水平参考范围是 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$ 。最近研究指出, 泊沙康唑用于预防真菌感染时, 其血药浓度 $> 0.70 \mu\text{g/mL}$, 最佳有效浓度靶值为 $1.25 \mu\text{g/mL}$ ^[2-9, 13-16]。

本方案检测采用紫色试管 (EDTA), 需采集约 2 mL 全血, 离心取上清液, 通过甲醇沉淀蛋白和萃取泊沙康唑, 使泊沙康唑充分溶解于甲醇中。通过岛津 LC-20A 高效液相色谱进行分离和富集泊沙康唑, 用 AB Sciex 4000 QTRAP 型质谱仪进行监测。同时, 选用同位素泊沙康唑-d4 作内标, 进行定量, 结果线性良好, 回收率高, 日内、日间精密度符合生物样本的分析要求, 适于临床应用血药浓度监测。该处理方法简单、易操作和重复性好, 避免了批间和样本间的系统误差, 用于泊沙康唑的母体药物测定准确度高, 特异性强^[17-18]。

参考文献

[1] WARRILOW A G, MELO N, MARTEL C M, et al. Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14- α demethylase (CYP51) isoenzymes A and B[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (10): 4225-

- 4233.
- [2] NAGAPPAN V, DERESINSKI S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45 (12): 1610-1617.
- [3] WALSH T J, ANAISSIE E J, DENNING D W, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of america [J]. *Oxford journals CID*, 2008, 46(3): 327-60.
- [4] BRÜGGEMANN R J, TOUW D J, AARNOUTSE R E, et al. International interlaboratory proficiency testing program for measurement of azole antifungal plasma concentrations [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(1): 303-305.
- [5] HOPE W, BILLAUD E J, DENNING D. Therapeutic drug monitoring for triazoles [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(6): 580-586.
- [6] GOODWIN M L, DREW R H. Antifungal serum concentration monitoring: an update [J]. *J Antimicrob Chemother* 2008, 52(1): 17.
- [7] LEWIS R E. Antifungal therapeutic drug monitoring [J]. *Curr Fungal Infect Rep*, 2010, 4(3): 158-167.
- [8] ANDES D, PASCUAL A, MARCHETTI O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (1): 24-34.
- [9] KRISHNA G, MOTON A L. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(3): 958-962.
- [10] 宁书蔚, 臧彬. B 和 T 淋巴细胞活化因子在感染性疾病中的免疫作用 [J]. *实用检验医师杂志*, 2016, 8(2): 106-110.
- [11] 魏秀举, 马韬. 46 例老年肾移植患者疗效评价 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2014, 2(3): 153-156.
- [12] 徐思成, 董旭南, 拜合提尼沙·吐尔地, 等. 侵袭性肺曲霉病的初次 CT 特点 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (4): 229-232.
- [13] 孙禾, 苏欣, 施毅. 三唑类抗真菌新药泊沙康唑的药理基础 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2012, 31(11): 633-637.
- [14] 詹莹, 疏楠, 郭楠, 等. 三氮唑类抗真菌药的治疗药物监测研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(6): 706-710.
- [15] 李力, 项迎春, 韩奇. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中泊沙康唑的浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(2): 153-155.
- [16] 高宁舟, 沈杰, 宋钟娟, 等. 三唑类抗真菌药物治疗药物监测的研究进展 [J]. *药学服务与研究*, 2009, 9(5): 336-339.
- [17] 王磊, 刘红星, 孙文利. HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者他克莫司血药浓度测定中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(2): 126-130.
- [18] 王磊, 孙文利, 李培余, 等. 环孢素 A 血药浓度检测方法比较分析 [J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11 (3): 417-421.

(收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-04-06)

(上接第 2901 页)

- [8] MARQUES F Z, CAMPAIN A E, TOMASZEWSKI M, et al. Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs [J]. *Hypertension*, 2011, 58(6): 1093-1098.
- [9] CARDEN T, SINGH B, MOOGA V, et al. Epigenetic modification of miR-663 controls mitochondria-to-nucleus retrograde signaling and tumor progression [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(50): 48-54.
- [10] LIANG S, ZHANG N, DENG Y, et al. miR-663 promotes NPC cell proliferation by directly targeting CDKN2A [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4863-4870.
- [11] AGITA A, ALSAGAFF M T, ALSAGAF F. Inflammation, Immunity, and Hypertension [J]. *Acta Med Indones*, 2017, 49(2): 158-165.
- [12] GUZIK T J, TOUYZ R M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension [J]. *Hypertension*, 2017, 70(4): 660-667.
- [13] VEGA I L. ACE Inhibitors vs ARBs for Primary Hypertension [J]. *Am Fam Physician*, 2015, 91(8): 522-523.
- [14] ALLISON S J. Hypertension: role of renal ACE in response to hypertensive stimuli [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2013, 9(7): 372.
- [15] YANG S, GAO Y, LIU G, et al. The human ATF1 rs11169571 polymorphism increases essential hypertension risk through modifying miRNA binding [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(16): 2087-2093.
- [16] 张磊, 王春. MicroRNA 与血管内皮细胞功能调节机制进展 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2016, 23(3): 29-34.
- [17] 李巧琳, 冯建明, 李文倩, 等. MicroRNA210 和 microRNA486 与红系造血调控的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 45(15): 51-56.
- [18] 齐斌, 余丽梅. microRNA 概述及其研究进展 [J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2014, 10(6): 34-38.
- [19] GOYAL R, GOYAL D, LEITZKE A, et al. Brain Renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy [J]. *Reprod Sci*, 2010, 17(3): 227-238.
- [20] ESKILDSEN T V, JEPPESEN P L, SCHNEIDER M, et al. Angiotensin II regulates microRNA-132/-212 in hypertensive rats and humans [J]. *Inter J Mol Sci*, 2013, 14 (6): 11190-11207.

(收稿日期: 2018-01-28 修回日期: 2018-05-01)