

LC-MS/MS 同时测定人血浆中 6 种抗真菌药物浓度

杨旭萍, 邹素兰, 蒋艳, 凌静, 董露露, 胡楠* (常州市第一人民医院药学部, 江苏 常州 213003)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 方法同时测定人血浆中氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、卡泊芬净 6 种抗真菌药物的浓度。方法 向 50 μL 血浆样本中加入含同位素内标的甲醇沉淀蛋白后稀释进样分析。色谱柱为 Kinetex C_{18} (3 mm \times 100 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.1% 甲酸-水 (含 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵) 和 0.1% 甲酸-甲醇, 梯度洗脱, 流速为 0.6 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量为 5 μL , 分析时间为 5 min。采用电喷雾离子源, 正离子多反应监测模式扫描, 用于定量分析的离子对分别为 m/z 307.0 \rightarrow 220.2 (氟康唑)、 m/z 350.1 \rightarrow 224.1 (伏立康唑)、 m/z 701.4 \rightarrow 683.2 (泊沙康唑)、 m/z 705.2 \rightarrow 392.2 (伊曲康唑)、 m/z 721.5 \rightarrow 408.3 (羟基伊曲康唑)、 m/z 547.4 \rightarrow 131.1 (卡泊芬净)。结果 6 种抗真菌药物在 0.1~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好 ($r \geq 0.995$), 准确度为 90.35%~114.94%, 仪器精密度 RSD 均 $< 15\%$ (定量下限处 $< 20\%$)。提取回收率和基质效应分别为 71.99%~90.38% 和 96.78%~134.17%。稳定性符合生物样本分析方法验证要求。应用本方法测定 25 例侵袭性真菌感染患者的血浆谷浓度, 其中伏立康唑谷浓度 0.70~12.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 氟康唑 4.57~12.64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 个体间差异较大。结论 本方法操作简单快捷, 准确度和灵敏度高, 重现性良好, 适用于临床治疗药物监测。

关键词: 抗真菌药物; 治疗药物监测; 血浆; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)17-2093-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.17.007

引用本文: 杨旭萍, 邹素兰, 蒋艳, 等. LC-MS/MS 同时测定人血浆中 6 种抗真菌药物浓度[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2093-2099.

Simultaneous Determination of Concentration of Six Antifungal Drugs in Human Plasma by LC-MS/MS

YANG Xuping, ZOU Sulan, JIANG Yan, LING Jing, DONG Lulu, HU Nan* (Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS method for simultaneous determination of the concentration of six antifungal drugs (fluconazole, voriconazole, posaconazole, itraconazole, hydroxy itraconazole, caspofungin) in human plasma. **METHODS** The plasma samples (50 μL) were precipitated with methanol containing isotope internal standards. The chromatographic separation was performed on a Kinetex C_{18} column (3 mm \times 100 mm, 2.6 μm) using a mobile phase of 0.1% formic acid-water (containing 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution) and 0.1% formic acid-methanol, at a flow rate of 0.6 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. The injection volume was 5 μL and the analysis time was 5 min. The detection of the analytes was performed by electrospray ionization in positive mode by multiple reaction monitoring with the transition of m/z 307.0 \rightarrow 220.2 (fluconazole), m/z 350.1 \rightarrow 224.1 (voriconazole), m/z 701.4 \rightarrow 683.2 (posaconazole), m/z 705.2 \rightarrow 392.2 (itraconazole), m/z 721.5 \rightarrow 408.3 (hydroxy itraconazole), m/z 547.4 \rightarrow 131.1 (caspofungin). **RESULTS** The linear concentration ranges of calibration curves for six antifungal drugs were 0.1~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r \geq 0.995$). The accuracy ranged from 90.35% to 114.94%. The RSD of instruments precision were less than 15% (20% at the lower limit of quantification). The recovery ranged from 71.99% to 90.38% and the matrix effect was between 96.78% and 134.17%. The stability met the acceptance criteria for bioanalytical method validation. The plasma concentrations of antifungal drugs in 25 patients with invasive fungal infection were determined by this method. Tough concentration of voriconazole ranged from 0.70 to 12.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and fluconazole ranged from 4.57 to 12.64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Significant variance was found among patients. **CONCLUSION** This method is simple, accurate, sensitive and has a good reproducibility. It is suitable for clinical therapeutic drug monitoring.

KEYWORDS: antifungal drugs; therapeutic drug monitoring; plasma; LC-MS/MS

侵袭性真菌感染 (invasive fungal infection, IFI) 系指真菌侵袭深部组织、器官或血液所导致的感染性疾病, 近年来 IFI 的发病率逐年上升, 对人类的生命健康造成了严重威胁^[1]。目前已知的引起

IFI 最常见的致病真菌包括念珠菌、曲霉菌、新型隐球菌等。三唑类的氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑和棘白菌素类的卡泊芬净等^[2-3]是现阶段的常用药物。有研究显示这些抗真菌药物的

基金项目: 常州市科技计划(应用基础研究指导性)项目(CJ20199010, CJ20209011)

作者简介: 杨旭萍, 女, 硕士, 药师 Tel: (0519)68870870 E-mail: 1006363193@qq.com *通信作者: 胡楠, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0519)68870870 E-mail: hn_324@163.com

血药浓度和疗效以及不良反应具有显著相关性,且它们的血药浓度个体差异很大,因此有指南建议临床使用时需要进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),优化给药剂量,确保治疗的有效性和安全性^[4]。

目前应用于抗真菌药物 TDM 的方法主要包括免疫法、HPLC 和 LC-MS/MS。其中免疫法特异性较低,所测得的浓度较真实值偏高,有研究显示免疫法检测的伊曲康唑浓度是 HPLC 的 5 倍^[5]。HPLC 所需分析时间较长,灵敏度有限。而 LC-MS/MS 具有较高的特异性、灵敏度和准确度,且所需样本量少,检测时间较短,可同时检测多种药物,满足临床高通量检测的要求,在临床 TDM 中得到了日益广泛的应用^[6-7]。本研究旨在利用 LC-MS/MS 技术,建立一种简单、快速、准确的同时测定血浆中 6 种抗真菌药物(氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、卡泊芬净,见图 1)的方法,为临床 TDM 提供可靠方案。

1 仪器与试剂

Jasper HPLC 液相色谱仪(岛津); Triple Quad 4500MD 三重四极杆串联质谱仪(AB SCIEX); Vortex-Genie 2 涡旋混合器(Scientific industries); 5417R 低温高速离心机(Eppendorf); Direct-Q 纯水

仪(Millipore); BT25S 电子分析天平(Sartorius)。

氟康唑(批号: 22-SSR-67-1; 纯度: 99%)、伏立康唑(批号: 1-TTK-73-1; 纯度: 98%)、泊沙康唑(批号: 3-JLW-13-1; 纯度: 98%)、伊曲康唑(批号: 13-GHZ-186-1; 纯度: 98%)、羟基伊曲康唑(批号: 11-KSS-103-4; 纯度: 97%)、伏立康唑-d3(批号: 5-JUZ-42-1; 纯度: 98%)均购自 Toronto Research Chemicals 公司; 卡泊芬净(批号: 30-QCT-17-1; 纯度: 98%)、泊沙康唑-d4(批号: 1-161-MRS-12; 纯度: 98%)、伊曲康唑-d9(批号: 2-OMK-97-1; 纯度: 97%)均购自 Cmass 公司。其中,伏立康唑-d3 为伏立康唑、氟康唑、卡泊芬净的内标,泊沙康唑-d4 为泊沙康唑的内标,伊曲康唑-d9 为伊曲康唑、羟基伊曲康唑的内标。甲醇和乙腈为色谱纯,均购自 Merck 公司; 甲酸和乙酸铵为分析纯,均购自 Sigma-Aldrich 公司; 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Kinetex C₁₈(3 mm×100 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA); 柱温: 40 °C; 流动相: 0.1% 甲酸-水(含 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, A)和 0.1% 甲酸-甲醇(B); 梯度洗脱(0.01~0.80 min, 40% B; 0.80~

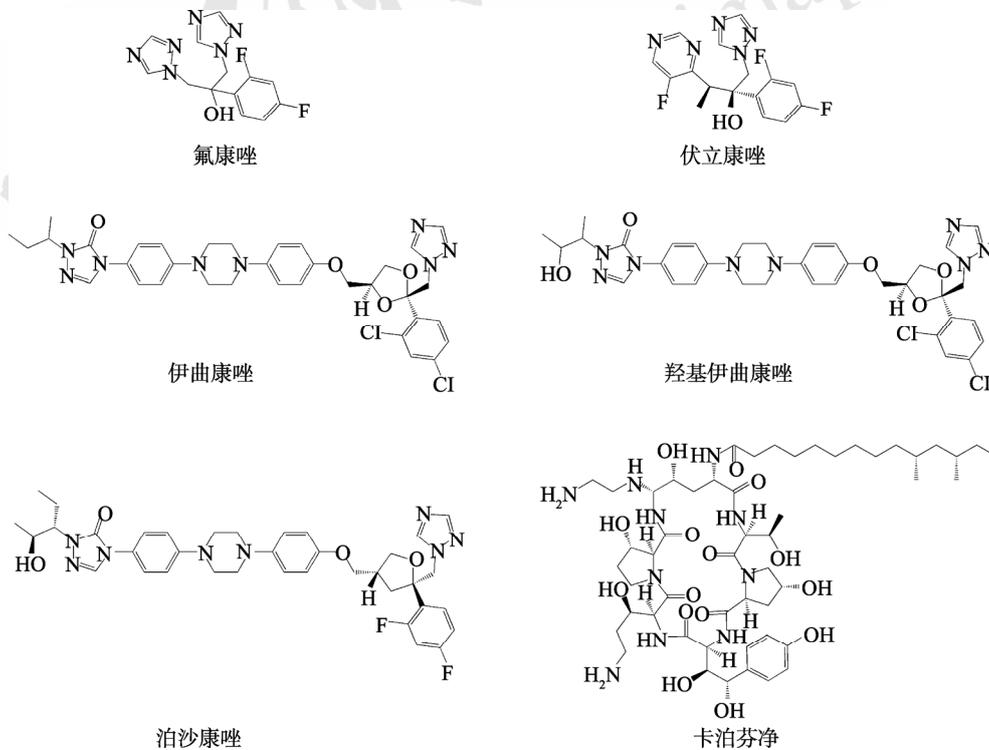


图 1 6 种抗真菌药物的结构式

Fig. 1 Chemical structures of six antifungal drugs

1.00 min, 40%→90% B; 1.00~3.50 min, 90% B; 3.50~4.00 min, 90%→40% B; 4.00~5.00 min, 40% B); 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL; 分析时间: 5 min。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 正离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描; 毛细管电压: 5 500 V; 离子源温度: 550 °C; 雾化气: 50 psi; 辅助气: 50 psi; 气帘气: 35 psi; 碰撞气: 8 psi; 6个抗真菌药物和3个同位素内标各自的监测离子对、去簇电压、碰撞电压等质谱参数及保留时间见表1。

表1 待测物 LC-MS/MS 测定参数

Tab. 1 LC-MS/MS measurement parameters of the determinand

化合物	母离子 质量/Da	子离子 质量/Da	碰撞 电压/V	去簇 电压/V	保留 时间/min
氟康唑	307.0	220.2	28	80	1.64
卡泊芬净	547.4	131.1	30	90	2.04
伏立康唑	350.1	224.1	27	85	2.14
泊沙康唑	701.4	683.2	45	170	2.23
羟基伊曲康唑	721.5	408.3	50	170	2.27
伊曲康唑	705.2	392.2	50	170	2.42
伏立康唑-d3	353.2	224.3	30	100	2.14
泊沙康唑-d4	705.2	687.1	45	170	2.23
伊曲康唑-d9	714.3	401.4	50	160	2.42

2.3 溶液配制

精密称取氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、卡泊芬净标准品适量, 分别用甲醇定量配制成 19.67, 10, 1, 0.5, 1, 5 mg·mL⁻¹ 的标准储备液。储备液于-20 °C 冰箱中保存, 临用前混合并用甲醇分别稀释成浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg·mL⁻¹ 的系列标准工作液和 3, 30, 150 μg·mL⁻¹ 的质控工作液。

精密称取伏立康唑-d3、泊沙康唑-d4、伊曲康唑-d9 标准品适量, 分别用甲醇、乙腈、乙腈定量配制成 500, 50, 200 μg·mL⁻¹ 的内标储备液, -20 °C 冰箱保存, 临用前混合并用甲醇稀释成浓度为 500 ng·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.4 血浆样品前处理

精密吸取血浆样品 50 μL, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 500 ng·mL⁻¹ 的内标工作液 150 μL, 涡旋 3 min, 16 400 r·min⁻¹ 离心 10 min, 精密吸取上清液 20 μL 转移到另一离心管中, 加入 180 μL

50% 甲醇水溶液稀释, 置于进样小瓶中, 按“2.1”和“2.2”项下条件进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 方法学考察

参考 FDA 和 CFDA 生物样品定量分析方法验证指导原则, 选取各待测物不同浓度水平的质控样品, 对所建立分析方法的专属性、线性、检出限、定量限、准确度、仪器精密度、提取回收率、基质效应和稳定性进行验证。

2.6 临床应用

重症患者使用抗真菌药物治疗侵袭性真菌感染, 给药 3 d 后, 于下次给药前 0.5 h 抽取外周静脉血 2 mL 至 EDTA-K2 抗凝管中, 4 °C 冷藏储存。检测前 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆待测。

3 结果

3.1 专属性考察

取 6 份不同个体的空白血浆, 分别加入适量的工作液, 配制成血浆浓度为 0.1 μg·mL⁻¹ 的定量下限标准血浆样本和 0.3, 3, 15 μg·mL⁻¹ 的质控样本。将上述样本按“2.4”项下方法处理后进样分析。结果见图 2, 不同来源的空白血浆中, 相应色谱峰保留时间内均无内源性组分的干扰, 方法特异性良好。

3.2 标准曲线、检出限与定量限考察

以人空白血浆为基质, 分别加入“2.3”项下的系列标准工作液, 配制成 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μg·mL⁻¹ 的标准血浆样本, 按“2.4”项下方法处理后进样分析。空白样本以等量甲醇代替标准工作液和内标溶液, 零浓度样本以等量甲醇代替标准工作液, 处理分析方法同上。以待测物与相应内标峰面积的比值(Y)为纵坐标, 以待测物浓度(X)为横坐标, 权重为 $W=1/X^2$ 进行回归分析。同时分别以信噪比(S/N)≥3 和 ≥10 确定各待测物的检出限和定量限。结果见表 2, 线性相关系数 $r \geq 0.995 0$, 表明血浆中各待测物在 0.1~20 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

3.3 准确度和仪器精密度试验

以人空白血浆为基质, 分别加入“2.3”项下的质控工作液, 配制成低、中、高 3 个水平(0.3, 3, 15 μg·mL⁻¹, 下同)的质控样本, 每个浓度水平 6 份, 列为一个分析批, 按“2.4”项下方法处理后进样分析, 根据当日随行标准曲线, 计算质控样本批内准确度和仪器精密度。于不同天制备并测定 3 个分析批, 计算批间准确度和仪器精密度。

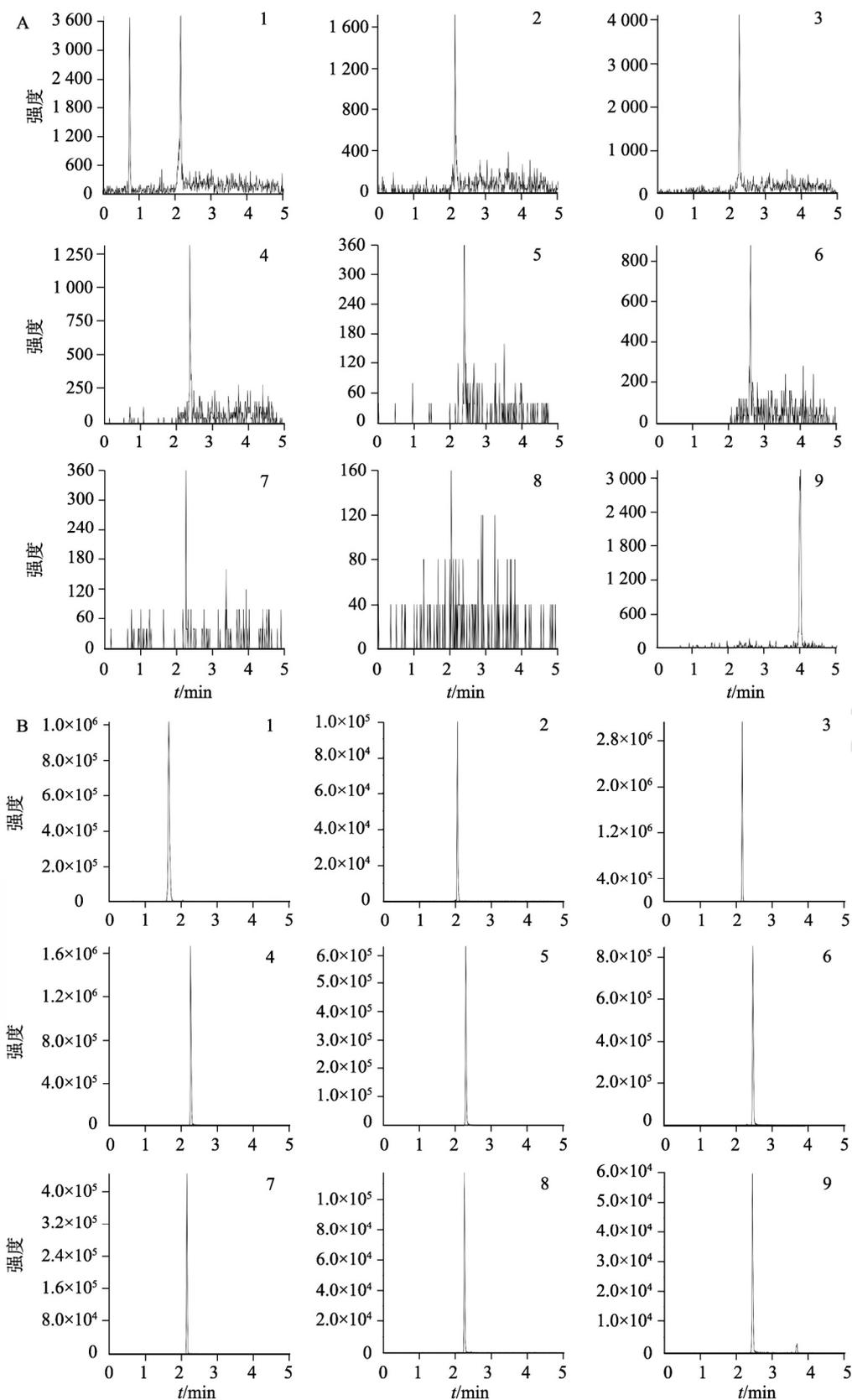


图2 6种化合物的提取离子色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆添加对照品($3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 1-氟康唑; 2-卡泊芬净; 3-伏立康唑; 4-泊沙康唑; 5-羟基伊曲康唑; 6-伊曲康唑; 7-伏立康唑-d3; 8-泊沙康唑-d4; 9-伊曲康唑-d9。

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of six compounds

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with standards($3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 1-fluconazole; 2-caspofungin; 3-voriconazole; 4-posaconazole; 5-hydroxy itraconazole; 6-itraconazole; 7-voriconazole-d3; 8-posaconazole-d4; 9-itraconazole-d9.

表2 人血浆样本中6种化合物线性范围、检出限与定量限结果

Tab. 2 Linear ranges, limit of detection and limit of quantitation of six compounds in human plasma samples

化合物	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	浓度范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
氟康唑	$Y=1.2017X+0.0008$	0.9990	0.1~20	0.0020	0.0050
卡泊芬净	$Y=0.0221X+0.0007$	0.9950	0.1~20	0.0200	0.0500
伏立康唑	$Y=1.6821X+0.0727$	0.9983	0.1~20	0.0002	0.0010
泊沙康唑	$Y=6.5217X+0.2268$	0.9978	0.1~20	0.0005	0.0020
羟基伊曲康唑	$Y=0.6091X+0.0172$	0.9962	0.1~20	0.0020	0.0050
伊曲康唑	$Y=0.6827X+0.0148$	0.9987	0.1~20	0.0020	0.0050

各待测物准确度为90.35%~114.94%，除定量下限处的仪器精密度RSD<20%外，其余各浓度均<15%。方法的准确度和仪器精密度符合生物样本的定量分析要求。

3.4 提取回收率和基质效应

以人空白血浆为基质，分别加入“2.3”项下的质控工作液，配制成低、中、高3个水平的质控样本，每个浓度水平6份，按“2.4”项下方法处理后进样分析，得到待测物的峰面积 A_1 ；另取人空白血浆，于蛋白沉淀后，向上清液中加入质控工作液，配制成低、中、高质控样本，每个浓度水平6份，后续操作同“2.4”项下所述，进样分析得到待测物峰面积 A_2 ，根据 A_1/A_2 求算提取回收率，结果为71.99%~90.38%，RSD均<15%，结果见表3，表明该样品前处理方法适用于待测物的提取分析。另以纯水代替人空白血浆作为基质，

表3 人血浆样本中6种化合物提取回收率和基质效应结果
Tab. 3 Recovery rate and matrix effect of six compounds in human plasma samples

化合物	理论值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率/($n=6$)	RSD/%	基质效应/($n=6$)	RSD/%
氟康唑	0.3	72.23	7.33	97.75	9.43
	3.0	75.56	6.09	115.08	11.66
	15.0	82.40	11.18	105.88	14.18
卡泊芬净	0.3	71.99	10.05	96.78	13.74
	3.0	75.48	10.49	115.55	13.34
	15.0	83.53	10.77	114.53	10.56
伏立康唑	0.3	83.16	3.54	127.98	14.06
	3.0	83.27	7.49	130.82	13.11
	15.0	82.30	3.09	115.49	9.36
泊沙康唑	0.3	82.16	4.39	133.32	8.72
	3.0	80.25	7.88	119.98	6.18
	15.0	87.89	4.75	111.23	14.83
羟基伊曲康唑	0.3	90.38	14.72	128.75	13.73
	3.0	83.56	12.88	125.48	12.52
	15.0	82.46	12.23	133.53	14.82
伊曲康唑	0.3	79.86	5.20	131.59	10.94
	3.0	82.05	7.09	130.36	14.80
	15.0	82.96	4.27	134.17	13.53

配制低、中、高3个水平的样本，每个浓度水平6份，按“2.4”项下方法处理后进样分析，得到待测物的峰面积 A_3 。根据 A_2/A_3 求算基质效应，结果见表3，结果为96.78%~134.17%，RSD均<15%，表明基质中内源性物质对待测物的影响稳定。

3.5 稳定性考察

以人空白血浆为基质，分别加入“2.3”项下的质控工作液，配制成低、中、高3个水平的质控样本，分别室温放置24h，4℃冰箱放置72h，56℃水浴30min以及3次冻融循环后，按“2.4”项下方法处理后进样分析，每个条件下各浓度水平6份，考察样本在上述条件下的稳定性。另取低、中、高3个水平的质控样本各6份，按“2.4”项下方法处理，将处理好的样本于自动进样器(15℃)中放置6h后进样分析，考察处理后样本在自动进样器中的稳定性。在不同条件下，6种化合物各浓度水平的测定值与理论值的平均偏差均在±15%范围内，表明人血浆中各待测物在实验涉及的条件稳定。

3.6 临床应用

应用本方法对25例侵袭性真菌感染患者进行治疗药物监测，其中男性16例，女性9例，年龄16~96岁，感染灶主要位于肺部、泌尿道、肠道等，真菌培养结果显示，曲霉菌、白色念珠菌、热带假丝酵母菌等为主要的病原体。19例采用伏立康唑进行抗真菌感染治疗，4例氟康唑，泊沙康唑和伊曲康唑各1例，具体用药方案及谷浓度检测结果见表4，测得伏立康唑谷浓度0.70~12.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，氟康唑4.57~12.64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其中有10例患者遵循伏立康唑静脉滴注200mg bid的用药方案，测得的谷浓度范围为0.70~12.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，根据《指南》^[8]推荐，伏立康唑目标血药谷浓度范围为0.5~5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，仅有5例患者满足此目标范围，其余患者谷浓度均高于上限，血药浓度监测结果可为临床合理化用药提供重要依据。

表 4 患者病情、用药方案和谷浓度检测结果

Tab. 4 Patients' condition, therapeutic regimen and results of trough concentration determination

序号	感染灶	病原体	用药方案	谷浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	肺部	白色念珠菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	12.94
2	肺部	曲霉菌	伏立康唑 p.o. 200 mg bid	3.17
3	肺部、泌尿道	曲霉菌	伏立康唑 p.o. 200 mg bid	4.13
4	肺部	热带念珠菌	伊曲康唑 p.o. 20 mL bid	0.88
5	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 300 mg bid	5.71
6	肺部	热带假丝酵母菌	氟康唑 i.v. 600 mg qd	12.64
7	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	0.70
8	肺部	白色念珠菌	伏立康唑 nasal 200 mg bid	7.91
9	肺部	白色念珠菌	伏立康唑 nasal 200 mg bid	5.01
10	肠道	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	6.20
11	泌尿道	近平滑假丝酵母菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	1.17
12	泌尿道	白色念珠菌	氟康唑 i.v. 400 mg qd	4.57
13	肺部、肠道	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	2.06
14	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	8.96
15	泌尿道	不明确	泊沙康唑 p.o. 5 mL tid	0.26
16	泌尿道	热带假丝酵母菌	氟康唑 i.v. 100 mg qd	8.40
17	肺部	曲霉菌	伏立康唑 p.o. 200 mg bid	1.47
18	肺部	曲霉菌	伏立康唑 p.o. 200 mg bid	2.40
19	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	4.60
20	肠道	光滑念珠菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	5.89
21	肺部	光滑念珠菌	氟康唑 i.v. 200 mg qd	6.13
22	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 160 mg bid	5.03
23	肺部、肠道	热带假丝酵母菌	伏立康唑 i.v. 400 mg bid	12.32
24	肺部	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	6.89
25	中枢神经系统、泌尿道	曲霉菌	伏立康唑 i.v. 200 mg bid	1.94

4 讨论

目前三唑类和棘白菌素类抗真菌药物血药浓度检测方法主要包括免疫法、HPLC 和 LC-MS/MS。为了满足临床检测对于准确性、时效性和简便性的要求,本研究建立了一种同时测定血浆中 6 种常用抗真菌药物浓度的 LC-MS/MS 方法,涉及氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑以及卡泊芬净。相较于已报道的 LC-MS/MS 方法^[6],该方法将检测对象拓展到棘白菌素类药物,提高了方法的实用性。

在样本前处理方面,本方法采用添加有机溶剂进行蛋白沉淀,相较于使用乙醚^[9]、乙酸乙酯^[10]、叔丁基甲醚^[11]液液萃取的方法,操作更加简单快捷,能够有效地减小误差和降低成本。此外,通过比较不同的沉淀试剂和沉淀比例,3 倍体积的甲醇沉淀效果良好,可满足检测灵敏度和稳定性要求。为了降低生物样本基质效应的影响,本方法利用同位素内标对待测物的测定进行校正。不同于其他化合物,稳定同位素的结构和性质与待测物更为相近,表现出相似的回收率、离子化效率

和色谱保留行为,且无内源性干扰,是最理想的选择^[12]。考虑到待测物的结构相似性、稳定同位素的可获得性和经济性,本方法选择伏立康唑-d3 为伏立康唑、氟康唑的内标,伊曲康唑-d9 为伊曲康唑、羟基伊曲康唑的内标,泊沙康唑-d4 为泊沙康唑的内标。卡泊芬净的对应同位素内标价格较为昂贵且难以获得,根据文献报道^[13],伏立康唑-d3 保留行为与其相似,可作为卡泊芬净的内标,结果可靠。鉴于待测物的结构特征,本方法选择 C₁₈ 色谱柱进行分离,通过优化流动相的组成和梯度洗脱程序,各待测物出峰时间适宜且峰形良好,分析时间缩短至 5 min,提高了分析效率,可实现临床样本高通量检测。

当下,新型冠状病毒肺炎疫情在世界范围内蔓延,截至 2021 年 8 月 19 日,全球累计确诊病例已超过 2 亿例,累计死亡病例接近 450 万例^[14]。根据最新发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)》^[15],重型、危重型病例的治疗需在对症治疗的基础上,预防继发感染。因此临床上需联用抗真菌药物以降低病死率^[16],

并通过 TDM 提高用药的有效性和安全性。TDM 药师作为防控一线人员,需要高度重视疫情防控和职业暴露。除了做好生物安全实验室搭建和个人防护之外,可考虑在不影响检测的前提下灭活病毒。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于 β 属冠状病毒。对紫外线和热敏感,除氯己定外,56 °C、30 min、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒^[15],56 °C、30 min 水浴加热样本是常采用的方式。鉴于热灭活法可能会影响药物的浓度及生物基质的组成,干扰 TDM 检测准确度,因此需考察该条件下的待测样本稳定性。赵博欣等^[17]的研究表明,56 °C、30 min 水浴灭活血浆样本对 LC-MS/MS 法伏立康唑血浆浓度检测影响较小,可用于疫情防控期间的 TDM 检测。张晓旭等^[18]考察 SARS-CoV-2 不同灭活方式对 HPLC 检测万古霉素血药浓度的影响,结果发现 56 °C 水浴加热 30 min 不会影响检测结果,但紫外照射 30 min 和 60 min 均会造成血样中万古霉素的降解。本研究对人血浆样本中 6 种抗真菌药物在 56 °C 水浴 30 min 条件下的稳定性进行了考察。结果表明,6 种抗真菌药物浓度均未受影响,该结果可为肺炎疫情环境下 TDM 药师的感染防控提供参考和帮助。

REFERENCES

- [1] KOBAYASHI R, HORI D, SANO H, et al. Risk factors for invasive fungal infection in children and adolescents with hematologic and malignant diseases: A 10-year analysis in a single institute in Japan[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2018, 37(12): 1282-1285.
- [2] HU D Y, JIANG W W, LI H, et al. Epidemiological status and advances in the treatment of invasive candidiasis[J]. *World Clin Drugs(世界临床药物)*, 2020, 41(5): 323-328.
- [3] HAN X Y, SONG Y L, BAI P, et al. Systematic classification of antifungal drugs, resistance mechanisms and development of new drugs[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(11): 1430-1436.
- [4] WANG L J, DUAN J L. Advance in therapeutic drug monitoring of antifungal agents[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2011, 20(3): 224-229.
- [5] LAW D, MOORE C B, DENNING D W. Bioassay for serum itraconazole concentrations using hydroxyitraconazole standards[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(7): 1561-1566.
- [6] WANG Z Z, LU H Y, NI X J, et al. Evaluation of the measurement uncertainty for the simultaneous determination of blonanserin and N-desethyl blonanserin in plasma using LC-MS/MS[J]. *Pharm Today(今日药学)*, 2020, 30(6): 394-398, 403.
- [7] ZHENG Y Z, WANG S. Advances in antifungal drug measurement by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Clin Chim Acta*, 2019(491): 132-145.
- [8] CHEN K, ZHANG X L, KE X Y, et al. Individualized medication of voriconazole: A practice guideline of the division of therapeutic drug monitoring, Chinese pharmacological society[J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(6): 663-674.
- [9] ZHONG J, HAO K, PEI Z J. Concentration determination of voriconazole in human plasma by UPLC-MS/MS and its clinical application[J]. *J China Pharm(中国药房)*, 2016, 27(29): 4064-4067.
- [10] PEI X X, LI P J, JIANG W J, et al. A robust LC-MS/MS method for the simultaneous determination of docetaxel and voriconazole in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies[J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(8): e4246. Doi: 10.1002/bmc.4246.
- [11] LIU Y, QIU T T, ZHANG C. Concentration determination of voriconazole in human plasma by HPLC-MS/MS[J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2018, 34(10): 1222-1225.
- [12] XIE J S, GE Q H. Matrix effects in bioanalysis by LC/MS[J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(8): 1386-1389.
- [13] DECOSTERD L A, ROCHAT B, PESSE B, et al. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide, anidulafungin, and caspofungin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(12): 5303-5315.
- [14] World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic[EB/OL]. (2021-08-09)[2021-08-09]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [15] General Office of National Health Commission. Diagnosis and treatment protocol for COVID-19(trial 8 th edition, revised version)[EB/OL]. (2021-04-14)[2021-08-19]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202008/0a7bdf12bd4b46e5bd28ca7f9a7f5e5a/files/a449a3e2e2c94d9a856d5faea2ff0f94.pdf>.
- [16] LIN B, CHEN J J. Keypoint of antifungal application for ECMO supported COVID-19 patients[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 37(7): 788-792.
- [17] ZHAO B X, LIU S J, LIU Y, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of voriconazole in heat-inactivated blood samples: Its application during COVID-19 pandemic[J]. *J South Med Univ(南方医科大学学报)*, 2020, 40(3): 342-345.
- [18] ZHANG X X, HOU L Z, JIANG H, et al. Effect of inactivation methods of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 on monitoring vancomycin blood concentration by HPLC[J]. *China Pharm(中国药业)*, 2020, 29(9): 27-29.

收稿日期: 2021-01-12
(本文责编: 陈怡心)