doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2022.23.009

高效液相色谱串联质谱法快速检测肾移植患者泊沙康唑血药浓度*

林冠丽[1],杨佳彬[1],尹　威[1],张其爱[2],曾彩芳[1△]

(1. 广州医科大学附属第二医院,广东 广州　510210;　2. 广州医科大学,广东 广州　511495)

摘要:目的　建立快速检测肾移植患者血清中泊沙康唑血药浓度的高效液相色谱串联质谱(HPLC－MS/MS)法。**方法**　采用蛋白沉淀法处理血清样本,以泊沙康唑－d_4为内标。色谱柱为Agilent Eclipse Plus C_{18}柱(150 mm×4.6 mm,3.5 μm),流动相为乙腈－10 mmol/L乙酸铵(85∶15,*V*/*V*),流速为0.5 mL/min,柱温为40 ℃;采用正离子、电喷雾电离源、多反应监测(MRM)模式进行定量扫描,定量分析离子对质荷比(*m*/*z*)分别为701.5→683.6(泊沙康唑)和705.5→687.6(内标)。**结果**　泊沙康唑的血药浓度在0.05～10.00 μg/mL范围内与分析物和内标峰面积的比值线性关系良好(R^2=0.990 2,*n*=8);平均提取回收率为82.75%～87.47%,*RSD*为1.99%～3.09%(*n*=6);基质效应的*RSD*<7.8%(*n*=6);批内、批间精密度的变异系数(*CV*)<7.3%(*n*=18);冷藏、冻融、室温、长期稳定性试验的*RSD*<8.0%。7例肾移植术后服用泊沙康唑口服混悬液的患者,泊沙康唑血药浓度均在0.13～1.27 μg/mL范围内。**结论**　该方法高效、快速、准确,有望进一步用于泊沙康唑的血药浓度监测,实现肾移植患者的个性化治疗。

关键词:高效液相色谱串联质谱法;泊沙康唑;血药浓度;肾移植

中图分类号:R969.1;R978.5　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1006－4931(2022)23－0040－05

Rapid Determination of Drug Concentration of Posaconazole in Patients with Kidney Transplant by HPLC－MS/MS

LIN Guanli[1], *YANG Jiabin*[1], *YIN Wei*[1], *ZHANG Qiai*[2], *ZENG Caifang*[1]

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 510210; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 511495)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry (HPLC－MS/MS) method for the rapid determination of the drug concentration of posaconazole in serum of patients with kidney transplant. **Methods**　The protein precipitation method was used to treat the serum samples, and posaconazole－d_4 was as the internal standard. The chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C_{18} column (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), the mobile phase was acetonitrile－10 mmol/L ammonium acetate (85∶15, *V*/*V*), the flow rate was 0.5 mL/min, and the column temperature was 40 ℃. The positive ion, electron spray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode were adopted for the quantitative analysis. The mass－to－charge ratios (*m*/*z*) of ion pairs for the quantitative analysis were 701.5→683.6 (posaconazole) and 705.5→687.6 (internal standard) respectively. **Results**　The linear range of posaconazole was 0.05－10.00 μg/mL (R^2=0.990 2, *n*=8). The average extration recovery rate of posaconazole was in the range of 82.75%－87.47% with an *RSD* of 1.99%－3.09% (*n*=6). The *RSD* of matrix effect was lower than 7.8% (*n*=6). The coefficients of variation (*CV*) of intra－and inter－batch precisions were lower than 7.3% (*n*=18). The *RSD*s of the stability tests under the conditions of cold storage, freeze thawing, room temperature and long time were lower than 8.0%. The drug concentration of posaconazole in seven patients who ungerwent the kidney transplant surgery and were treated with Posaconazole Oral Suspension was in the range of 0.13－1.27 μg/mL. **Conclusion**　This method is efficient, rapid and accurate, which is expected to be further used to monitor the drug concentration of posaconazole and achieve the personalized treatment for patients with kidney transplant.

Key words: HPLC－MS/MS; posaconazole; drug concentration; kidney transplant

泊沙康唑属第2代三唑类抗真菌药物,相较于三唑类与棘白菌素等抗菌药物,具有抗菌效果好、抗菌谱广、毒性低等优点[1－2],其血药浓度与临床疗效相关[3],是预防和治疗全身性真菌病的一线药物[4]。但口服三唑类药物泊沙康唑的生物利用度会受到食物摄入量的影响,同时个体间的药物代谢动力学差异显著[5]。目前,泊沙康唑主要剂型为口服混悬液,且需与食物(最好是高脂肪餐)同服才能提高生物利用度。肾移植患者常口服泊沙康唑以防治真菌感染[6],但肾移植术后并发侵袭性真菌感染导致移植肾失功和受体移植带功的死亡率达40%[7]。其主要原因为口服泊沙康唑的个体差异性,以及移植肾加剧了其个体差异性[8],导致患者用药后血药

*基金项目:广东省药学会临床用药研究基金——真菌专项基金项目[2020ZJ03]。

第一作者:林冠丽,女,硕士研究生在读,研究方向为治疗药物监测与药剂学,(电子信箱)3042590352@qq.com。

△通信作者:曾彩芳,女,大学本科,主任中药师,研究方向为医院制剂与医院药事管理,(电子信箱)gyfsyyjk@126.com。

浓度未达到有效治疗窗或预防浓度感染致死。此外，肾移植术后患者需服用免疫抑制剂，而泊沙康唑会影响其血药浓度。血药浓度超出治疗窗可能导致肝、肾功能损伤，神经毒性和胃肠道反应，甚至可能影响移植肾的恢复。因此，需实时、快速检测肾移植患者体内泊沙康唑的血药浓度，并通过个性化给药防治真菌感染，降低死亡率。目前，国内外定量检测泊沙康唑的方法有高效液相色谱串联质谱（HPLC - MS / MS）法[9-11]、超高效液相色谱串联质谱（UPLC - MS / MS）法[12-13]、还原氧化石墨烯（rGO）和荧光标记的适配体方法[14]。但方法专属性差，分析时间长，缺少肾移植患者临床实际用药指导的相关研究。为此，本研究中建立了精准、快速、高效检测肾移植患者体内泊沙康唑血药浓度的 HPLC - MS / MS 法，并对 7 例肾移植患者进行了临床用药指导，制订了个体化给药方案，及时调整给药剂量，缩短了病程，节约了治疗成本，临床疗效更好。现报道如下。

1 仪器、试药与研究对象

1.1 仪器

1200 - G6410B 型液相色谱 - 三重四极杆串联质谱仪（安捷伦科技 < 中国 > 有限公司）；CPA225D 型电子分析天平（德国赛多利斯有限公司，精度为十万分之一）。

1.2 试药

泊沙康唑口服混悬液（Patheon Inc.，Whitby Operations，进口药品注册证号为 H20181110，规格为每瓶 40 mg∶1 mL）；泊沙康唑标准品（批号为 3 - JLW - 13 - 1），泊沙康唑 - d_4（内标，批号为 12 - MRS - 161 - 1），纯度均为 98%，均购自美国 TRC 公司；乙腈、甲醇（德国默克股份两合公司）；乙酸铵（广州化学试剂厂，纯度为 98%）；试验用水为蒸馏水；空白血浆由广州医科大学附属第二医院提供。

1.3 研究对象

选取医院移植科 2020 年 12 月至 2021 年 4 月收治的确诊或高度怀疑侵袭性真菌感染、有侵袭性真菌感染高危因素的 7 例肾移植术后服用泊沙康唑口服混悬液的患者，其中预防用药 4 例、治疗用药 3 例，共完成 13 例次血样检测。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱（150 mm × 4.6 mm，3.5 μm）；流动相：乙腈 - 10 mmol / L 乙酸铵（85∶15，V / V）；流速：0.5 mL / min；柱温：40 ℃；进样量：5 μL。

2.1.2 质谱条件

正离子，电喷雾电离（ESI）源，多反应监测（MRM）模式进行定量扫描。离子源：ESI，电压为 4 000 V，温度为 300 ℃；雾化气流速：6 L / min；碰撞气压力：40 psi。其他参数：质荷比（m / z）泊沙康唑离子对为 701.5 → 683.6，内标离子对为 705.5 → 687.6；碎裂电压为 235 eV；碰撞能量为 37 eV；驻留时间为 200 ms。

2.2 样本采集与处理

采用蛋白沉淀法处理血清样本，患者首次口服泊沙康唑混悬液后第 5 天，于下一剂给药前 30 min 采集血样 5 mL，置无抗凝剂的采血管中，精密吸取 100 μL，置 2 mL 离心管中，加内标溶液 20 μL，涡旋混匀，加乙腈 1 mL，涡旋振荡 1 min，离心（温度为 21 ℃，转速为 15 000 r / min）5 min，吸取上清液 200 μL，即得供试品。在空白血清样本处理前加入适量待测物，其他操作与供试品一致，即得加标样品。取空白血清，按供试品处理方法处理，即得阴性样品。

2.3 溶液制备

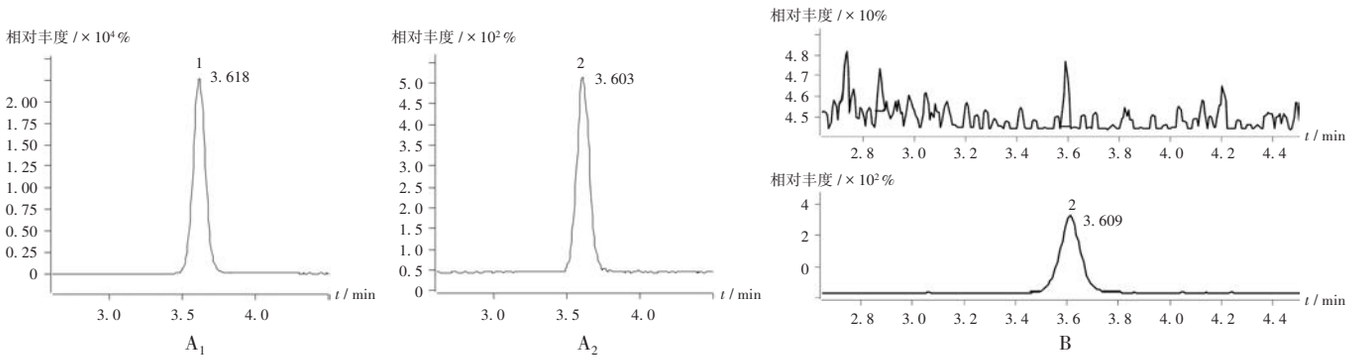
取泊沙康唑标准品 2.264 mg，精密称定，用少量 95% 甲醇超声溶解，转移至 5 mL 容量瓶中，用 95% 甲醇定容，即得质量浓度为 452.8 μg / mL 的泊沙康唑贮备液。4 ℃下保存，备用。取内标 0.50 mg，精密称定，加适量 95% 甲醇超声溶解，转移至 5 mL 容量瓶中，用 95% 甲醇定容，即得质量浓度为 100 μg / mL 的内标母液，用 50% 甲醇稀释成质量浓度为 2.00 μg / mL 的内标贮备液。4 ℃下保存，备用。

根据不同工作要求，泊沙康唑贮备液用 50% 甲醇稀释，配制成所需质量浓度。

2.4 方法学考察

专属性试验：分别取 6 例患者的空白血清和用药后的血浆（加入内标溶液），按 2.2 项下方法处理，得阴性样品和供试品，按 2.1 项下条件进样分析，色谱图见图 1。供试品色谱图中，泊沙康唑和内标的色谱峰峰形良好，保留时间分别为 3.618 min 和 3.603 min；阴性样品色谱图中，内标色谱峰峰形良好，泊沙康唑无信号响应。结果表明，方法专属性良好，待测物与内标的测定不受样品内源性物质的干扰。

线性关系考察：取空白血清，按 2.2 项下方法处理，精密加入 2.3 项下泊沙康唑贮备液适量，配制成泊沙康唑质量浓度分别为 0.05，0.10，0.20，0.50，1.00，2.00，5.00，10.00 μg / mL 的系列标准溶液，按 2.1 项下条件进样分析，以分析物泊沙康唑与内标峰面积的比值（Y）为纵坐标、泊沙康唑质量浓度（X，μg / mL）为横坐标进行线性回归，以 1 /（X^2）为权重系数，绘制泊沙康唑标准曲线，得回归方程 Y = 9.192 7X + 0.052 1（R^2 = 0.990 2，n = 8）。结果表明，泊沙康唑的血药浓度在 0.05 ~ 10.00 μg / mL 范围内与分析物和内标峰面积比值的线性关系良好，且标准曲线各点的质量浓度偏差均在标



1. 泊沙康唑　2. 泊沙康唑 - d_4

A_1, A_2. 供试品　B. 阴性样品

图1　高效液相色谱串联质谱图

1. Posaconazole　2. Posaconazole - d_4

A_1, A_2. Test sample　B. Negative sample

Fig. 1　Chromatograms of HPLC - MS / MS

示值的 ± 15% 范围内，符合要求。

定量下限确定：同时满足准确度和精密度要求的标准曲线最低质量浓度为定量下限，即0.05 μg / mL。

残留检测：一般情况下，检测高质量浓度后会存在一定残留效应，故检测定量上限（10.00 μg / mL）样本后，再检测3个空白血清样本，以评价残留效应。结果均未检出残留泊沙康唑，即残留未超过定量下限的20%[15]，符合要求。

批内、批间精密度试验[15]：在空白血清样本中加入相应质量浓度的泊沙康唑及内标，分别制成定量下限和低、中、高质量浓度（0.05，0.15，1.50，8.00 μg / mL）各6个参比样品，按2.1项下条件进样分析。结果批内、批间精密度试验结果的均值均在质控样品标示值的 ± 15% 范围内，变异系数（*CV*）分别为7.16%，3.46%，6.03%，2.67% 和 4.00%，3.28%，4.41%，2.78%（n = 18）。

基质效应测定：收集6例患者的空白血样，处理后得到空白血清基质，分别加入低、中、高质量浓度（0.15，1.50，8.00 μg / mL）的质控溶液和内标溶液，进样分析，记录峰面积；同质量浓度的质控溶液不经过处理直接进样分析，记录峰面积。结果质控溶液基质效应的*RSD*分别为4.92%，7.75%，2.34%（n = 6）；内标溶液基质效应的*RSD*分别为7.25%，4.94%，7.37%（n = 6）。表明基质干扰较小，符合要求[15]。

提取回收试验：分别配制低、中、高质量浓度（0.15，1.50，8.00 μg / mL）的质控血清样本，平行6份；空白血清样本处理后加入相应质量浓度的泊沙康唑及内标，制成低、中、高相应质量浓度的参比样品，平行6份，进样分析，记录峰面积。结果低、中、高质量浓度质控血清样本的平均提取回收率分别为83.08%，87.47%，82.75%，*RSD*分别为2.67%，3.09%，1.99%（n = 6），表明提取回收率良好。

稳定性试验：1）冷藏及室温条件稳定性。取提取回收试验项下低、中、高质量浓度（0.15，1.50，8.00 μg / mL）质控血清样本，分别在冷藏（4 ℃）和室温（10 ~ 30 ℃）条件下放置24 h和192 h进行预处理，定量分析测得实际浓度，与相应标示浓度对比。结果见表1，*RSD*均在 ± 15% 范围内[15]，符合要求。2）冻融稳定性。泊沙康唑血样低、中、高质量浓度（0.15，1.50，8.00 μg / mL）质控工作液于冷冻（- 12 ℃）条件下保存24 h，取出，置室温融化后进行预处理；或融化后再放回冷冻（- 12 ℃）条件保存，反复3次预处理，进行定量分析，测得实际浓度，与相应标示浓度对比。结果见表1，*RSD*均在 ± 15% 范围内[15]，符合要求。

表1　稳定性试验结果的*RSD*（%）

Tab. 1　*RSD*s of the stability test（%）

质量浓度	冷藏（4 ℃）		室温（10 ~ 30 ℃）		冻融（- 12 ℃）	
	24 h	192 h	24 h	192 h	1次	3次
0.15 μg / mL	5.14	4.08	2.83	5.89	6.81	6.81
1.50 μg / mL	2.74	1.33	1.88	1.97	7.13	7.13
8.00 μg / mL	3.96	2.16	3.58	2.63	3.52	2.81

2.5　临床应用

血药浓度分布：7例肾移植术后患者正常给药后，采用HPLC - MS / MS法测定泊沙康唑的血药浓度。结果显示，所有样本泊沙康唑血药浓度均在0.13 ~ 1.27 μg / mL范围内，4例预防用药患者的平均血药谷浓度为0.37 μg / mL，均未达预防有效浓度（> 0.70 μg / mL）；3例治疗用药患者的平均血药谷浓度为0.71 μg / mL，仅1例达到治疗有效浓度（> 1.00 μg / mL）[16]。泊沙康唑的吸收有个体差异，且易受多种因素影响，本研究中多数肾移植患者的血药浓度未达到有效浓度，故泊沙

康唑的血药浓度监测很有必要。

指导用药：针对上述问题，迅速调整给药剂量或次数，制订个性化用药方案，多数肾移植患者用药后均达到有效血药浓度。其中，1 例病情严重患者经个性化指导后，相较于传统给药方法，病程缩短。其临床资料：男，52 岁，体质量 52 kg，“慢性肾衰竭”诊断入院，入院后行肾移植手术，术后并发肺炎，痰培养白色念珠菌（+），给予“泊沙康唑混悬液 10 mL，po q12 h”治疗，用药第 5 天，于下一剂给药前 30 min 采血测得泊沙康唑血药浓度为 0.13 μg/mL，未达到有效治疗浓度。次日，询问患者用药情况，得知服药量不足 10 mL，且为餐前服药。随即对患者进行用药教育，量装药液前需充分振摇药瓶，混匀后立即倒入量匙，量匙量装药液时要装满，每次需服用 10 mL（2 勺），每日 2 次，随餐或餐后 20 min 内服用；并向患者说明随餐或餐后服用有利于增加泊沙康唑的吸收，提高血药浓度，达到有效治疗浓度。宣教后，患者用药依从性佳，5 d 后再次测得泊沙康唑血药浓度为 0.52 μg/mL，未达有效治疗窗（>1.00 μg/mL）。随即替换为“泊沙康唑混悬液 10 mL，po q 8 h”，达稳态后测得血药浓度为 1.27 μg/mL，继续治疗，效果较佳。胸片示肺部炎症基本消失，转归，出院回家休养。

3 讨论

本研究中对监测泊沙康唑血药浓度的 HPLC－MS/MS 法进行了优化和验证。结果表明，方法基质效应干扰低；血清中泊沙康唑的浓度在 0.05～10.00 μg/mL 范围内有良好的线性关系（R^2 = 0.990 2，n = 8），且定量限低，准确度和精密度均良好；方法耐用性好，残留效应小，提取回收率高。相较于外标法，以同位素泊沙康唑－d_4 为内标，能降低质谱检测过程中信号波动带来的影响。且样品前处理方便，具有快速、高效、准确的特点，有利于肾移植患者泊沙康唑血药浓度的快速分析。

由本研究结果可知，采用 HPLC－MS/MS 法检测患者的血药浓度，可快速、准确地掌握患者用药后的实际情况，并及时调整给药方案，使患者在调整用药剂量后均达治疗有效浓度，较好地控制病情。若未对泊沙康唑血药浓度进行监测，无法确定是否在有效治疗窗内发挥最佳药效，可能延误病情，从而累及移植肾甚至危及生命安全；且泊沙康唑口服混悬液价格高昂，若未能实现应有的治疗效果，无法发挥其药物经济效应，增加患者的经济负担。故需临床药师及时、快速掌握患者服用泊沙康唑后的血药浓度，进行个性化指导用药，以提高疗效，节约成本。

本研究具有以下局限性：1）受时间限制纳入样本量较少，未能很好地统计泊沙康唑的疗效及相关不良反应；2）肾移植患者的生理变化和所服用的其他治疗药物可能影响泊沙康唑的血药浓度。对于其他因素导致的泊沙康唑血药浓度的变化需结合临床具体分析，后期会收集更多的病例数据进行进一步分析。

参考文献

[1] 马培奇. 第二代三唑类抗真菌新药伏立康唑[J]. 国外医药（抗生素分册），2002，23（2）：90－92.
[2] MCKEAGE K. Posaconazole：a review of the gastro－resistant tablet and intravenous solution in invasive fungal infections[J]. Drugs，2015，75（4）：397－406.
[3] 泊沙康唑临床应用专家组. 泊沙康唑临床应用专家共识[J]. 国际呼吸杂志，2020，40（4）：241－261.
[4] MOUSSET S，BUCHHEIDT D，HEINZ W，et al. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients－updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party（AGIHO）of the German Society of Hematology and Oncology（DGHO）[J]. Ann Hematol，2014，93（1）：13－32.
[5] AKAN H，ANTIA VP，KOUBA M，et al. Preventing invasive fungal disease in patients with haematological malignancies and the recipients of haematopoietic stem cell transplantation：practical aspects[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy，2013，68（suppl 3）：i5－i16.
[6] 彭怀东，刘 英，冯 霞，等. 1 例肾移植术后严重根霉菌感染患者复杂药物治疗的药学服务[J]. 中国药学杂志，2017，52（2）：162－166.
[7] SKOV DALGAARD L，NØRGAARD M，POVLSEN JV，et al. Risk and prognosis of bacteremia and fungemia among first－time kidney transplant recipients：a population－based cohort study[J]. Infect Dis（Lond），2017，49（4）：286－295.
[8] COURTNEY R，SANSONE A，SMITH W，et al. Posaconazole pharmacokinetics，safety，and tolerability in subjects with varying degrees of chronic renal disease[J]. J Clin Pharmacol，2005，45（2）：185－192.
[9] JENKINS N，BLACK M，SCHNEIDER HG. Simultaneous determination of voriconazole，posaconazole，itraconazole and hydroxy－itraconazole in human plasma using LC－MS/MS[J]. Clin Biochem，2018，53：110－115.
[10] 张元元，刘 维，周从亚，等. LC－MS/MS 同时测定人血浆中伏立康唑和泊沙康唑的浓度[J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（12）：1697－1700.
[11] 王 磊，孙文利，刘红星. 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[J]. 检验医学与临床，2018，15（19）：2902－2905.
[12] DECOSTERD LA，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.