

文章编号 1006-8147(2022)02-0195-05

论 著

UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中泊沙康唑、氟康唑、伏立康唑的血药浓度

张飞雨¹, 张瑞霞², 高慧儿², 张弋²

(1.天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2.天津市第一中心医院药学部, 南开大学医学院, 天津 300192)

摘要 目的: 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定血浆中 3 个三唑类抗真菌药物(泊沙康唑、氟康唑、伏立康唑)的浓度。方法: 采用 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流速 0.5 mL/min, 流动相为甲醇(含 2 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸)和 2 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 柱温 40°C。质谱条件采用电喷雾离子源, 正离子多反应监测模式进行扫描分析。结果: 泊沙康唑、氟康唑、伏立康唑的专属性良好, 线性范围分别为 0.083~20.680、0.328~82.075、0.080~20.085 μg/mL, 范围内线性关系良好, r 均大于 0.99。批内、批间精密性(RSD)均小于 7.60%, 提取回收率和基质效应 RSD 值均小于 14.2%, 不同储存条件下稳定性良好, RSD 值均小于 10.69%。结论: 该方法准确度高, 重复性好, 简便快捷, 可同时测定 3 种血浆中三唑类抗真菌药的浓度, 适用于临床对氟康唑、泊沙康唑及伏立康唑的治疗药物监测。

关键词 泊沙康唑; 氟康唑; 伏立康唑; 超高效液相色谱-串联质谱法; 药物监测; 血药浓度

中图分类号 R9

文献标志码 A

Simultaneous determination of plasma concentrations of posaconazole, fluconazole and voriconazole in human plasma by UPLC-MS/MS

ZHANG Fei-yu¹, ZHANG Rui-xia², GAO Hui-er², ZHANG Yi²

(1. First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of Pharmacy, Tianjin First Central Hospital, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300192, China)

Abstract **Objective:** To establish an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of three triazole antifungal drugs (posaconazole, fluconazole, voriconazole) in plasma. **Methods:** The chromatographic separation was performed on BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) chromatographic column with methanol (containing 2 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid) and 2 mmol/L ammonium acetate Aqueous solution (containing 0.1% formic acid). The column temperature was 40°C. The flow rate was 0.5 mL/min with gradient elution. The mass spectrometry conditions adopt positive electrospray ionization together with multi-reaction monitoring mode for scanning analysis. **Results:** The specificity of posaconazole, fluconazole and voriconazole was good. The linear ranges were 0.083–20.680, 0.328–82.075, 0.080–20.085 μg/mL, respectively. The linear relationship is good within the range, and r was greater than 0.99. The RSD of intra-batch and inter-batch precision were all less than 7.60%. The RSD of extraction recovery rate and matrix effect were all less than 14.2%. The stability was good under different storage conditions, and the RSD were all less than 10.69%. **Conclusion:** The method is accurate, repeatable and simple. It can simultaneously determine the concentration of three triazole antifungals in plasma. It is suitable for clinical monitoring of fluconazole, posaconazole and voriconazole.

Key words posaconazole; fluconazole; voriconazole; UPLC-MS/MS; drug monitoring; plasma concentration

近年来,由于一些患者群体(如化疗、移植等)广泛地采用免疫抑制疗法,以及侵入性设备(如中心静脉导管)使用率的日益升高,真菌感染的发生率大大增加^[1-2]。目前三唑类抗真菌药物在临床应用广泛,两性霉素 B 和咪唑类抗真菌药由于严重的肝、肾毒性,限制了应用范围。泊沙康唑(posaconazole, POS)、氟康唑(fluconazole, FLU)和伏立康唑(voriconazole, VRC)作为侵袭性真菌感染初级预防的推荐用药,多用于异基因造血干细胞移植受者或其他中性粒

细胞缺乏的情况,在血液科应用广泛,在治疗真菌感染时功效显著,抗菌谱较广^[3]。

唑类抗真菌药物的药代动力学均受较多因素影响,导致患者服药后个体间及个体内血药浓度差异较大,如泊沙康唑的吸收与饮食、剂型、患者生理病理状态等因素有关^[4],氟康唑在中枢神经系统真菌感染的患者或肾功能不全的患者体内血药浓度会显著增加^[5],伏立康唑的代谢为非线性药代动力学特征,血药浓度变异性较大^[6]。在英国医学真菌学协会出版的《抗真菌治疗药物监测指南》中推荐 FLU、POS 和 VRC 均应根据患者实际用药情况进行血药

作者简介 张飞雨(1996-),硕士在读,研究方向:临床药学;通信作者:张弋, E-mail: wing_zh1821@sina.com。

浓度监测⁷。本研究旨在建立同时测定 3 种三唑类抗真菌药物的 LC-MS/MS 方法,节约成本,并为临床抗真菌药物的合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器、药品及试剂

1.1.1 仪器 Waters ACQUITY UPLC I-Class 系统和 Xevo TQD 质谱仪, BY-G20 普通高速离心机(北京白洋医疗器械有限公司); UMV-2 多管涡旋混合仪(北京优晟仪器有限公司); SB-5200DT 型数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.1.2 药品及试剂 FLU(中国食品药品检定研究院, 纯度 99.8%, 批号 100314-201906); POS(美国 TRC 公司, 纯度 98%, 批号 3-JLW-13-1); VRC(中国食品药品检定研究院, 纯度 99.8%, 批号 100862-201903); 泊沙康唑-D4(POS-D4, 美国 TRC 公司, 同位素丰度 96.3%, 批号 12-MRS-161-1); 氟康唑-D4(FLU-D4, 美国 TRC 公司, 同位素丰度 99.5%; 批号 7-MMH-92-2); 伏立康唑-D3(VRC-D3, 美国 TRC 公司, 同位素丰度 99.3%, 批号 5-JUZ-42-1); 乙酸铵(上海安谱科学仪器有限公司); 甲酸(上海安谱科学仪器有限公司); 甲醇(德国默克股份两合公司); 实验用水为广州屈臣氏蒸馏水。

1.2 色谱及质谱条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸, 2 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸, 2 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 进样量 10 μL。

1.2.2 质谱条件 采用多反应监测模式(MRM), 正离子模式, 电喷雾离子源(ESI)扫描。锥孔电压、碰撞能量、毛细管电压、离子源温度及脱溶剂气温度等质谱参数见表 1。

表 1 POS、FLU、VRC 及其内标的质谱检测参数

Tab 1 Mass spectrometric detection parameters of posaconazole, voriconazole, fluconazole and their internal standards

分析物	离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)	保留时间 (min)
POS	701.35/126.98	72	72	2.40
	701.35/148.00	72	72	2.40
POS-D4	705.35/127.05	74	73	2.40
FLU	307.07/219.97	34	20	1.34
	307.07/237.97	34	14	1.34
FLU-D4	311.10/242.00	32	22	1.34
VRC	350.10/126.90	28	39	2.15
	350.10/280.80	28	19	2.15
VRC-D3	353.10/127.05	28	56	2.15

注: POS: 泊沙康唑; FLU: 氟康唑; VRC: 伏立康唑

1.3 溶液及血样样品的配制

1.3.1 POS、FLU 和 VRC 标准品溶液的配制 精密称取 POS 0.041 36 g、FLU 0.164 15 g、VRC 0.040 17 g, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制浓度为 4 136、16 415、4 017 μg/mL 的标准品储备液。取适量储备液, 用甲醇稀释为质量浓度分别为 1 641.5、413.6、401.7 μg/mL 的混合对照品溶液。取混合对照品溶液, 用甲醇倍比稀释为梯度工作液, POS 浓度为 413.60、165.44、82.72、33.09、15.50、6.62、1.65 μg/mL, FLU 浓度为 1 641.50、656.60、328.30、131.32、65.66、26.26、6.57 μg/mL, VRC 浓度为 401.70、160.68、80.34、32.14、16.07、6.43、1.61 μg/mL。同时用甲醇配制质控样品溶液, POS、FLU、VRC 浓度分别为 330.88、66.18、2.65 μg/mL, 1 313.20、262.64、10.51 μg/mL, 321.36、64.27、2.57 μg/mL。所有溶液-20℃避光保存, 临用时取用。

1.3.2 内标工作液的配制 精密称取 POS-D4、FLU-D4、VRC-D3 各 1.0 mg 分别置于 100 mL 棕色容量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成含 POS-D4、FLU-D4、VRC-D3 均为 10 μg/mL 的内标储备液。取适量储备液, 100 μL 甲酸, 用甲醇稀释为浓度分别为 0.2、1.0、0.2 μg/mL 的混合内标工作液。-20℃避光保存备用。

1.3.3 标准曲线和质控样品的配制 分别精密量取“1.3.1”项下梯度工作液各 10 μL, 加入空白人血浆 190 μL, 涡旋 1 min, 制成 POS 浓度范围为 0.083~20.680 μg/mL, FLU 0.328~82.075 μg/mL, VRC 0.080~20.085 μg/mL 的混合血浆样品。分别精密量取“1.3.1”项下质控样品溶液各 10 μL, 加入空白人血浆 190 μL, 涡旋 1 min, 制成 POS、FLU、VRC 浓度分别为 0.132、3.309、16.544 μg/mL, 0.525、13.132、65.660 μg/mL, 0.129、3.214、16.068 μg/mL 低、中、高 3 个浓度的混合质控血浆样品。

1.3.4 血浆样品预处理 取血浆样品 200 μL, 加入 600 μL 内标工作液, 涡旋 1 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后取 300 μL, 加入 900 μL 纯水, 混匀置于进样小瓶中, 取 10 μL 进样分析。

1.4 方法学验证

1.4.1 专属性 分别取空白血浆, 空白血浆加入 POS、FLU、VRC 标准品和内标溶液, 患者服用 POS、FLU、VRC 后的血浆样品, 按照“1.3.4 项”处理后进样。

1.4.2 提取回收率和基质效应 用不同来源的空白血浆制备 POS、FLU、VRC 低、中、高 3 个浓度的质控样品, 按照“1.3.4 项”处理, 将对照品与内标峰

面积的比值记为 A;用甲醇替代上述过程中的血浆,加入内标,将混合标准品储备液稀释为与 A 中质量浓度相同的 3 个浓度的质控样品,将对照品与内标峰面积的比值记为 B;取不同来源的空白血浆按照“1.3.4 项”步骤处理后加入混合标准品储备液,用甲醇稀释为与上述质量浓度相同的 3 个浓度质控样品,对照品和内标峰面积比值记为 C。A/C 值为各化合物的提取回收率,C/B 为基质效应。

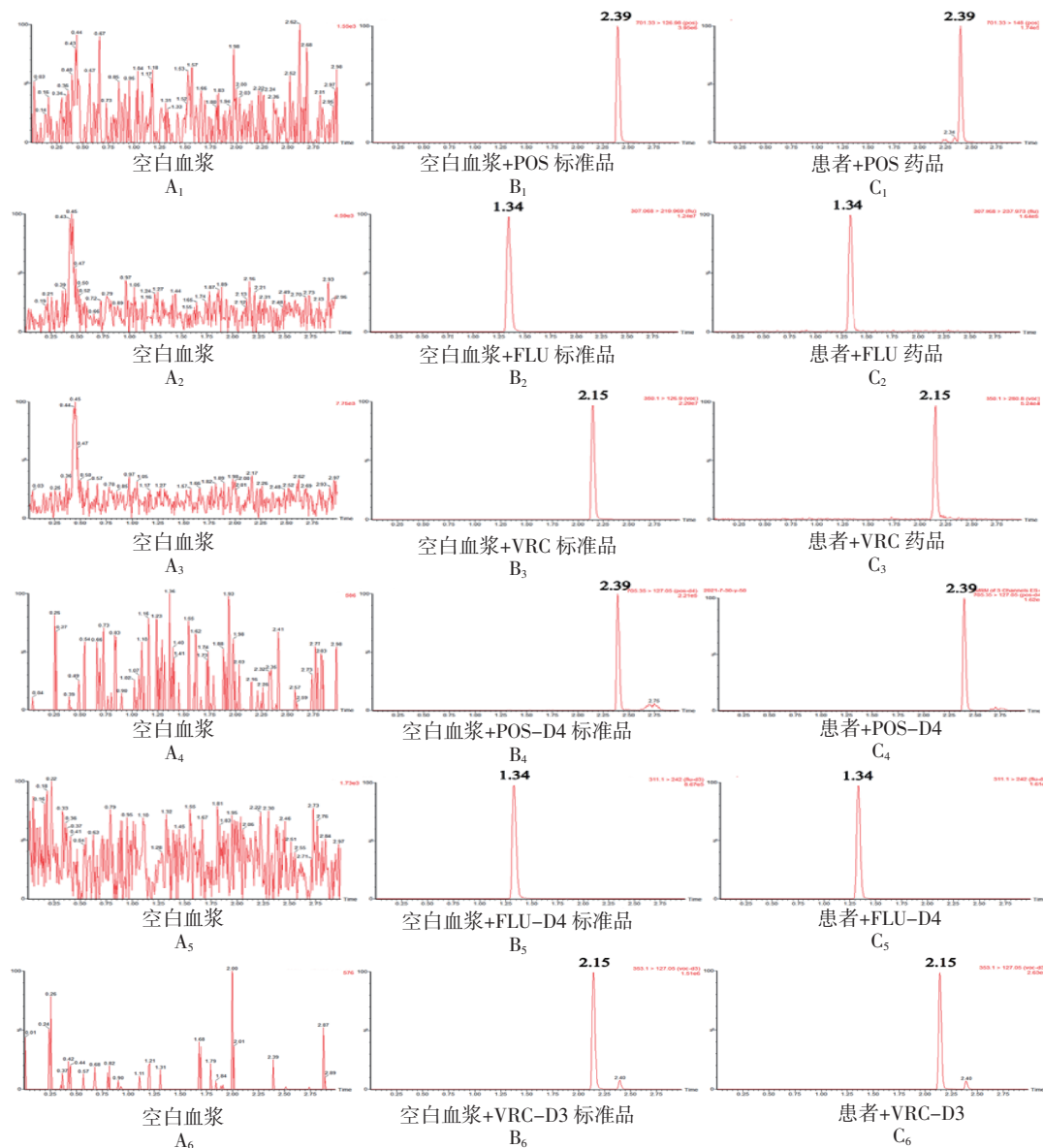
1.4.3 标准曲线和最低定量限 取含 POS 浓度范围为 0.083~20.680 $\mu\text{g/mL}$, FLU 为 0.328~82.075 $\mu\text{g/mL}$, VRC 为 0.080~20.085 $\mu\text{g/mL}$ 的混合血浆样品,每一浓度各制备 3 份,按照“1.3.4 项”处理后进样。分别以待测物与对应内标峰面积比值(Y)对 POS、FLU、VRC 质量浓度(X)作线性回归分析($W=1/C$)。

1.4.4 精密度和准确度 分别取 POS、FLU、VRC 低、中、高 3 个浓度的质控样品,每个浓度平行制备 5 份,按照“1.3.4 项”处理,连续 3 d 每天制备一批并进样分析,计算批内及批间精密度和准确度(RSD)和准确度(RE)。

1.4.5 稳定性 配制 POS、FLU、VRC 低、中、高 3 个浓度的质控样品,每个浓度平行制备 3 份,分别考察室温放置 24 h、进样器(10℃)放置 8 h、4℃放置 24 h、-20℃冻融循环 3 次和-20℃放置 30 d 后的稳定性。

2 结果

2.1 专属性 进样后色谱图显示,FLU、VRC、POS 的保留时间分别为 1.34、2.15、2.40 min。空白血浆中的内源性物质在相应药物及内标色谱峰保留时间内均无干扰峰,各物质色谱图见图 1。



注:A:空白血浆;B:空白血浆+标准品;C:患者给药后的血浆样品;POS:泊沙康唑;FLU:氟康唑;VRC:伏立康唑

图1 POS、FLU、VRC和内标 POS-D4、FLU-D4、VRC-D3在血浆中的色谱图

Fig 1 Representative chromatography of POS FLU, VRC and POS-D4, FLU-D4, VRC-D3 in plasma

2.2 提取回收率和基质效应 各待测物 3 种浓度的基质效应为 94.5%~148.8%, $RSD<14.2\%$;提取回收率在 59.7%~77.5%, $RSD<14.0\%$ 。结果见表 2。

2.3 标准曲线和最低定量限 结果表明,人血浆中 POS、FLU、VRC 浓度分别在 0.083~20.680、0.328~82.075、0.080~20.085 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系,标准曲线如图 2。

2.4 精密度和准确度 各待测物的批内及批间 RE 为-8.61%~10.16%, $RSD<7.60\%$,见表 3。

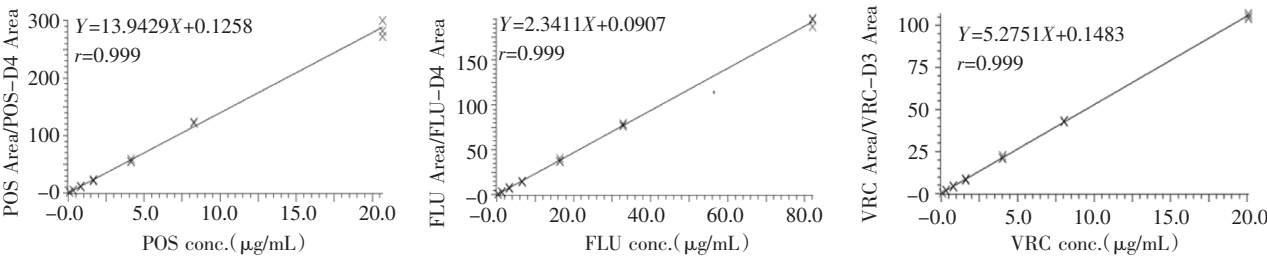
2.5 稳定性 各待测物 3 个不同浓度的质控样品分别在室温放置 24 h、进样器(10℃)放置 8 h、4℃冰箱放置 24 h、冻融循环 3 次、-20℃冰箱冷冻 30 d 后依然能够保持稳定, RSD 均 $<10.69\%$,见表 4。

表 2 POS、FLU、VOC 标准人血浆样品内标归一化的提取回收率及基质效应($n=6$)

Tab 2 The normalized extraction recovery rate and matrix effect of the internal standard of POS,FLU,VOC standard human plasma samples ($n=6$)

分析物	理论浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	提取回收率		基质效应	
		平均值 \pm 标准差(%)	RSD (%)	平均值 \pm 标准差(%)	RSD (%)
POS	0.132	75.3 \pm 4.6	6.1	122.7 \pm 13.9	11.3
	3.309	77.5 \pm 7.2	9.2	127.7 \pm 9.7	7.63
	16.544	75.7 \pm 10.6	14.0	148.8 \pm 21.0	14.1
FLU	0.525	71.6 \pm 3.7	5.2	99.3 \pm 14.1	14.2
	13.132	73.3 \pm 6.3	8.6	94.5 \pm 4.8	5.1
	65.660	63.3 \pm 1.5	2.4	108.5 \pm 5.2	4.8
VRC	0.129	59.7 \pm 5.3	8.9	119.5 \pm 12.5	10.5
	3.214	70.7 \pm 7.0	10.0	110.2 \pm 10.7	9.7
	16.068	62.3 \pm 6.2	10.0	128.2 \pm 12.4	9.7

注:POS:泊沙康唑;FLU:氟康唑;VRC:伏立康唑



注:POS:泊沙康唑;FLU:氟康唑;VRC:伏立康唑

图 2 POS、FLU、VRC 在血浆样品中的标准曲线

Fig 2 The standard curve for the plasma sample of POS,FLU,VRC

表 3 POS、FLU、VRC 在血浆中的批内及批间 RSD 、 RE ($n=5$)

Tab 3 The RSD and RE within and between batches for POS,FLU and VRC in plasma sample($n=5$)

分析物	理论浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	第一批		批内 RSD (%)	第二批		第三批	批间			
		实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RE (%)		实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RE (%)	实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RE (%)	平均值 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RE (%)	RSD (%)
POS	0.132	0.126	-4.61	3.34	0.126	-4.61	0.130	-1.45	0.127	-3.56	3.34
	3.309	3.456	4.45	2.45	3.377	2.05	3.463	4.66	3.432	3.72	3.46
	16.544	17.883	8.12	4.06	17.200	3.97	17.538	6.01	17.542	6.03	3.61
FLU	0.525	0.533	1.55	4.11	0.514	-2.03	0.532	1.31	0.527	0.28	3.42
	13.132	12.963	-1.28	2.95	12.670	-3.52	12.733	-3.04	12.789	-2.61	2.50
	65.660	66.646	1.50	5.22	66.625	-0.05	65.830	0.26	66.033	0.57	3.88
VRC	0.129	0.136	5.12	1.46	0.120	-7.24	0.119	-7.92	0.125	-3.35	7.60
	3.214	3.437	6.92	0.95	2.937	-8.61	3.140	-2.31	3.171	-1.33	7.21
	16.068	17.701	10.16	0.49	15.594	-2.95	17.097	6.40	16.707	4.54	5.92

注:POS:泊沙康唑;FLU:氟康唑;VRC:伏立康唑

表4 POS、FLU、VRC在不同条件下的稳定性($n=3$)Tab 4 Stability of POS, FLU, VRC at different storage conditions($n=3$)

分析物	理论浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD(%)				
		室温 24 h	10℃ 8 h	4℃ 24 h	冻融 3 次	-20℃ 30 d
POS	0.132	6.11	3.87	10.69	5.79	7.57
	3.309	2.27	4.55	0.84	5.11	3.46
	16.544	2.13	4.51	7.34	5.12	4.50
FLU	0.525	4.47	1.63	5.69	4.34	2.30
	13.132	0.95	4.31	2.52	3.65	2.34
	65.660	3.43	4.09	6.57	3.74	0.65
VRC	0.129	2.31	1.09	4.18	4.56	3.01
	3.214	2.21	5.04	0.87	3.53	2.84
	16.068	4.38	4.15	5.54	4.91	2.02

注:POS:泊沙康唑;FLU:氟康唑;VRC:伏立康唑

3 讨论

POS、FLU、VRC 均呈弱碱性,为改善使用纯水、纯甲醇作为流动相的色谱峰拖尾及响应强度弱等现象,两相中均加入 0.1%甲酸、2 mmol/L 乙酸铵以调节流动相 pH,促进分析物在 ESI 源下以正离子形式存在,响应强度增加,峰形良好。流动相中若甲醇比例过高时,最先被分离出峰的 FLU 峰形较宽,而增加水相比比例则导致出峰慢,分析时间较长,综合考虑选用梯度洗脱。

考虑到同位素内标作为 LC-MS/MS 定量分析方法的首选,本方法选用了 POS-D4、FLU-D4、VRC-D3 3 种同位素内标,与待测物 POS、FLU、VRC 的化学性质极为相似。同位素内标与待测物在前处理过程中,色谱分离、离子化过程中变化完全相同,只有在质谱的质量分析器中才可将它们分离,可最大限度的消除基质效应等分析方法的误差。方法学验证结果显示可将内标与待测物色谱峰完全分离且峰形较好。

由于 POS、FLU、VRC 均含三唑基团,具有一定的碱性,本实验选用适用于碱性化合物分析的 ESI 正离子源,结合自动及手动调谐结果,分别选择 3 种待测物及其相应内标化合物响应最强的离子对作为 MRM 扫描模式中的扫描离子对,分别手动优化各离子对的碰撞能量及锥孔能量使其灵敏度最高。

患者血浆样本中含有大量蛋白质,进样前需进行血浆样品前处理去除蛋白,以免污染堵塞色谱柱。目前常用的生物样本前处理方法有固相萃取法、液-液萃取法、蛋白沉淀法等。因固相萃取法成本较高、批次间重现性较差,液-液萃取法操作繁琐费时且需要消耗大量有机溶剂,本方法选择了操作简便的蛋白沉淀法,该法常用的沉淀剂有甲醇、乙腈、高氯酸等,因甲醇成本较低且方法学考察结果显示,患者血浆样本经甲醇沉淀蛋白处理后,待测物的液相图谱中无干扰峰存在,可达到生物样本分析要求。

笔者分别比较了加入 600、800、1 000 μL 内标溶液后的色谱峰,最终选取响应强度最高的 600 μL 作为本实验中内标溶液的加入量,同时可达到较好的蛋白沉淀效果。因样品溶剂甲醇与流动相初始梯度中的高比例水相极性相差较大,导致最先出峰的 FLU 出现前沿峰,故在进样前于样品中加入与初始流动相同比例的纯净水,混匀后进样,前沿峰消失。

本研究建立的液质方法可同时测定 POS、FLU、VRC 3 种三唑类抗真菌药在人血浆中的药物浓度,既节约成本,又操作便捷,凡服用以上 3 种药物的患者均可采用本方法进行血药浓度的测定,无需切换实验方法,节省了平衡色谱柱、配制新的流动相等时间;准确度高、重现性好、专属性强,可满足 POS、FLU、VRC 药动力学研究的需求,为临床药学服务提供参考。

参考文献:

- [1] ENOCH D A, YANG H, ALIYU S H, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 15(8): 17-65.
- [2] LAMOTH F. Epidemiology and risk factors of invasive fungal infections[M]. Germany: Infection Management in Hematology, Hematologic Malignancies, 2021: 1-12.
- [3] 中国医师协会血液科医师分会,中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)[J]. *中华内科杂志*, 2020, 59(10): 754-763.
- [4] 张飞雨,张瑞霞,宋学武,等. 影响泊沙康唑血药浓度相关因素的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(9): 971-976.
- [5] DAVIS M R, NGUYEN M H, DONNELLEY M A, et al. Tolerability of long-term fluconazole therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(3): 768-771.
- [6] LUONG M L, AL-DABBAG H M, GROLL A H, et al. Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring: a meta-analysis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(7): 1786-1799.
- [7] ASHBEE H R, BARNES R A, JOHNSON E M, et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(5): 1162-1176.

(2021-09-13 收稿)