

液相色谱-串联质谱法同时测定血清中5个三唑类抗真菌药物浓度及其治疗药物监测应用

张素洁¹, 孙贺伟¹, 郭君君¹, 陈梅¹, 袁想妹¹, 李水军^{2,3},
胡新华^{2,3}, 王艳煜^{2,3}, 余琛^{2,3}, 朱建民^{2,3}

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 上海市徐汇区中心医院 / 复旦大学附属中山医院徐汇医院, 上海 200031;
3. 中国科学院上海临床研究中心, 上海 200031)

摘要 目的: 建立同时测定血清中5个三唑类抗真菌药物(氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑)浓度的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法,并应用于临床三唑类抗真菌药物的治疗监测。方法: 50 μL 血清样品加入同位素内标,采用乙腈直接沉淀法处理样品后稀释进样分析。采用 XSELECTTM CSHTM C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm) 色谱柱进行色谱分离,流动相为 0.1% 甲酸 10 mmol \cdot L⁻¹ 乙酸铵水溶液-0.1% 甲酸乙腈水溶液,梯度洗脱,流速为 0.5 mL \cdot min⁻¹,进样量 5 μL ,色谱分析时间 5.5 min;采用电喷雾离子源,反应监测模式,正离子扫描进行测定。结果: 5个三唑类抗真菌化合物的线性范围为 0.02~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性相关系数均大于 0.998 6,各浓度的批内和批间相对标准差(RSD) < 10.6%,提取回收率为 80.5%~98.4%,方法准确度为 87.4%~111.0%,收集临床 ICU 和血液科严重侵袭性真菌病 20 例接受伏立康唑治疗的患者,伏立康唑的血药浓度 0.24~4.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,个体间差异较大。结论: 本方法同时定量检测 5 个三唑类抗真菌药物的血药浓度,可应用于临床治疗药物监测。
关键词: 氟康唑; 伏立康唑; 伊曲康唑; 羟基伊曲康唑; 泊沙康唑; 临床药物监测; 抗真菌治疗; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)06-1038-08
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.16

Quantitative determination of five azole antifungals in human serum by LC-MS/MS and its application to therapeutic drug monitoring

ZHANG Su-jie¹, SUN He-wei¹, GUO Jun-jun¹, CHEN Mei¹, YUAN Xiang-mei¹,
LI Shui-jun^{2,3}, HU Xin-hua^{2,3}, WANG Yan-yu^{2,3}, YU Chen^{2,3}, ZHU Jian-min^{2,3}

(1. Biological College, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Shanghai Xuhui Central Hospital/Fudan University affiliated ZhongshanXuhui Hospital, Shanghai 200444, China;
3. Shanghai Clinical Research Center, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China)

Abstract Objective: To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of five azole antifungals (fluconazole, voriconazole, itraconazole, hydroxitraconazole,

* 第一作者 Tel: (021) 31270810; E-mail: sjzhang@src.ac.cn

posaconazole) in human serum and then to apply it to clinical therapeutic drug monitoring. **Methods:** The serum samples (50 μL) were precipitated with acetonitrile after the addition of isotope internal standards. The chromatographic separation was performed on XSELECT™ CSH™ C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm) with the mobile phase of 10 mmol \cdot L⁻¹ ammonium acetate solution (containing 0.1% formic acid) – acetonitrile (containing 0.1% formic acid) at a flow rate of 0.5 mL \cdot min⁻¹. The injection volume was 5 μL and liquid chromatography duration was 5.5 min. The deprotonated ion of analyte was ionized by turbo ion spray and was detected in positive ionization by multiple reaction monitoring mode. **Results:** The linear concentration ranges of the calibration curves for five azole antifungals were 0.02–20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The coefficients of linearity were more than 0.998 6. Within-batch and between-batch RSD were less than 10.6%. The average recovery ranged from 80.5% to 98.4%. The accuracy ranged from 87.4% to 111.0%. Twenty patients received voriconazole therapy were collected from ICU and hematology department. Blood concentration of voriconazole ranged from 0.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to 4.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Significant variance was found among patients. **Conclusion:** The method is suitable for quantitative determination of five azole antifungals in clinical therapeutic drug monitoring practice.

Keywords: fluconazole; voriconazole; itraconazole; hydroxyitraconazole; posaconazole; clinical therapeutic drug monitoring; antifungal therapy; LC-MS/MS

近 20 年,人类真菌感染的发生率大幅度升高,其主要是由接受器官移植、免疫抑制疗法以及艾滋病的人群增加所导致的^[1-2]。三唑类化合物是应用最多的抗真菌药物,因为这类化合物是广谱抗真菌药物,没有严重的心脏毒性。目前,用于临床的三唑类抗真菌药物有 4 个,分别是氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑和泊沙康唑。虽然抗真菌药物的效用有了很大的进展,但是真菌感染的发病率和死亡率仍然很高。由于三唑类抗真菌药物的药代动力学特征、副作用(毒性)、药物相互作用和药物基因组学差异显著,所以在治疗过程中患者体内血药浓度个体差异很大,比如氟康唑对酵母有很强的抑制效果,而对霉菌的效果较弱。但对于肾功能不全的患者或者中枢神经系统真菌感染的患者,氟康唑的暴露量会大大改变,建议密切监测血药浓度^[3-5]。伊曲康唑可以用于很多侵入性真菌感染,有胶囊和口服溶液剂型。伊曲康唑生物利用度差异很大,胶囊和口服液利用度分别为 55% 和 70%,故其吸收难以预测^[6]。伏立康唑是抗曲霉菌的一线用药,但是由于其非线性药动学特征,伏立康唑的血药浓度的差异很大。当剂量增加 50% 时,血清浓度可以增加 150%,并且血清半衰期明显延长,这就使剂量和疗效之间的对应关系难以预测,推荐开展治疗药物监测^[7]。泊沙康唑是最近 FDA 批准的三唑类抗真菌药物,该药对大多数念珠菌、曲霉菌种属有强大抗菌活性,同时也改善了对新型接合菌的疗效。相关

实验证明,泊沙康唑有明显的药代动力学参数个体差异,在一个异体同种干细胞移植患者的临床研究中,AUC₀₋₂₄ 和 C_{max} 等药代参数的个体差异达到 68%^[8],故药动力学和药效学的评价对优化三唑类给药方案尤为重要。综上所述,临床治疗药物监测(TDM)在药物选择和给药方案的制定中具有重要的指导作用^[9-10]。

迄今为止的文献报道中,同时测定三唑类抗真菌药物的方法主要有微生物法、HPLC 法和 LC-MS/MS 法^[6-10]。由于氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑和泊沙康唑近几年在临床上应用广泛,所以本研究旨在建立一种能同时测定 4 个三唑类药物(氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑)及 1 个代谢物(羟基伊曲康唑)的 LC-MS/MS 方法,该方法操作简单,分析时间较短,且专一性强,灵敏度高,可以用于临床治疗药物监测。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 API 4000 串联质谱仪(Applied Biosystems 公司),Analyst 1.4.1 分析软件(Applied Biosystems 公司);液相色谱系统(由 LC-20AD 输液泵、DGU-20A3 在线脱气仪、SIL-HTc 自动进样器组成;Shimadzu 公司);Waters XSELECT™ CSH™ C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm ; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶, Waters 公司)。Vortex-2 涡旋混合器(Scientific Industries 公司),Mikro 22R 冷冻高速离心机(Hettich 公司),超声波清洗器(上海必能信超声波仪器厂)。

1.2 药品与试剂 氟康唑(TRC 公司,纯度 \geq 98%,

批号 22-SSR-67-1); 伏立康唑 (TRC 公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号 18-ANR-82-1); 伊曲康唑 (TRC 公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号 13-GHZ-186-1); 羟基伊曲康唑 (TRC 公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号 24-GHZ-39-1); 泊沙康唑 (TRC 公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号 1-MSW-3-1); 氟康唑-D4 (TRC 公司, 同位素丰度 98%, 批号 7-MMH-92-2); 伏立康唑-D3 (TRC 公司, 同位素丰度 97.92%, 批号 3-JUZ-110-1); 伊曲康唑-D5 (TRC 公司, 同位素丰度 98%, 批号 6-MMH-193-4); 羟基伊曲康唑-D5 (TRC 公司, 同位素丰度 99.4%, 批号 3-AXF-99-4); 泊沙康唑-D4 (TRC 公司, 同位素丰度 97%, 批号 6-JUZ-55-2); 乙酸铵 (ACS 纯)、甲酸 (液相色谱纯) 购自 Tedia 公司, 乙腈 (液相色谱纯)、甲醇 (液相色谱纯) 购自 Merck KGaA 公司, 实验用水为本实验室采用 Millipore 纯水系统自制。

2 LC-MS/MS 分析条件

2.1 色谱条件 采用 Waters XSELECT™ CSH™ C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸 10 mmol · L⁻¹, 流动相 B 为乙酸铵水溶液-0.1% 甲酸乙腈水溶液, 梯度洗脱 (流动相 B 起始比例为 0%, 1.1 min 升至 70%, 3 min 降至 30%, 并维持至 5.5 min), 流速为 0.5 mL · min⁻¹, 进样量为 5 μL 。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源, 正离子扫描, 离子源电压 2 000 V, 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气 551.6 kPa, 辅助气 482.7 kPa, 气帘气体 137.9 kPa。MRM 扫描分析, 5 个三唑类抗真菌药物定量、定性分析离子对以及分别优化去簇电压 (declustering potential, DP)、入口电压 (entrance potential, EP)、碰撞能 (collision energy, CE)、碰撞室出口电压 (cell exit potential, CXP) 等质谱参数见表 1。

表 1 三唑类抗真菌药的优化质谱参数及保留时间

Tab. 1 Optimization of mass spectrometry parameters and retention time of triazole antifungal agents

化合物 (compound)	母离子质量 (Q1 Mass) m/z	碎片离子质量 (Q3 Mass) m/z	去簇电压 (DP) /V	入口电压 (EP) /V	碰撞能 (CE) /V	碰撞室出口电压 (CXP) /V	t_R/min
氟康唑 (fluconazole)	307.2	237.0 [*]	65	5	22	16	1.47
	307.2	220.0 [#]	65	5	23	15	1.49
	350.2	281.0 [*]	65	5	23	21	3.22
伏立康唑 (voriconazole)	350.2	127.1 [#]	65	5	43	8	3.21
	705.3	392.3 [*]	120	6	50	11	4.83
伊曲康唑 (itraconazole)	705.3	432.5 [#]	120	6	46	13	4.82
	721.3	430.5 [*]	125	7	48	13	3.50
羟基伊曲康唑 (hydroxyitraconazole)	721.3	408.4 [#]	125	7	50	12	3.50
	701.2	614.4 [*]	120	8	75	25	3.74
泊沙康唑 (posaconazole)	701.2	127.1 [#]	120	8	48	25	3.74
	311.2	242.1	65	5	31	12	1.46
氟康唑 (fluconazole)-D4	353.2	284.2	60	5	23	21	3.20
伏立康唑 (voriconazole)-D3	710.5	397.4	125	7	48	12	4.79
伊曲康唑 (itraconazole)-D5	726.3	397.4	125	7	48	12	3.48
羟基伊曲康唑 (hydroxyitraconazole)-D5	705.4	345.2	120	8	48	25	3.73
泊沙康唑 (posaconazole)-D4							

*: 定量通道 (quantitative channel); #: 定性通道 (qualitative channel)

2.3 对照品储备液和内标储备液的配制 分别精密称取氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、羟基伊曲康唑、泊沙康唑的对照品适量, 分别用 50% 甲醇、50% 甲醇、0.5% 甲酸 80% 甲醇、乙酸乙酯、0.5% 甲酸甲醇制成 950.6、715.4、461.6、490 和 490 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。内标氟康唑-D4、伏立康唑-D3、伊曲康唑-D5、羟基伊曲康唑-D5、泊沙康唑-D4 分别用甲醇、50% 甲醇、0.5% 甲酸 80% 甲醇、50% 甲醇、0.5% 甲酸 50% 甲醇制成 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的

储备液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。

2.4 标准血清样品和质控样品的配制 分别精密量取“2.3”项下对照品储备液适量, 用甲醇稀释成为 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品工作液。取此工作液, 加入空白人血清适量, 制成 20、10、1、0.5、0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准血清样品和 15、5、0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控样品。

2.5 血清样品预处理 取血清样品 50 μL 置于 1.5 mL 塑料离心管中, 加入用甲醇配制的 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混合内标工作液 20 μL , 加入 500 μL 乙腈溶液后漩涡

振荡 30 s, $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 于进样瓶, 再加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇稀释, 进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 记录色谱图中 5 个化合物和各自内标的峰面积, 以内标法进行定量。

3 临床样品收集

三唑类药物治疗开始后 4~7 d 进行监测, 在下次给药前抽取静脉血 2 mL , $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液, 用 LC-MS/MS 法检测药物浓度。

4 结果

4.1 方法特异性考察 取 6 份不同来源的空白人血清, 加入适量“2.4”项下的混合对照品工作液, 配制成 0.3 、 $15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品, 并将空白血清、质控样品按“2.5”项下方法处理后进样。结果表明, 不同来源的空白血清在相应色谱峰保留时间内均无干扰峰, 5 个化合物测定结果一致, RSD 均小于 14.2%, 准确度均在 87.4%~111.0%, 方法特异性良好, 典型的图谱见图 1。

4.2 线性关系考察 在空白人血清中加入按“2.4”项下方法制成的 20 、 10 、 1 、 0.5 、 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准血清样品, 按“2.5”项下方法处理后进样。以待测物与内标峰面积比值 (Y) 对浓度 (X) 作线性回归分析, 得标准曲线方程, 见表 2。结果表明, 标准曲线的线性相关系数 r 均大于 0.99, 血清中 5 个化合物在各自的线性范围内线性关系良好。

4.3 精密度和准确度 试验按“2.4”项下方法配制成低浓度 ($0.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中浓度 ($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高浓度 ($15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的质控样品, 分别在同一天内和 2 周内不同的日期按“2.5”项下方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析, 计算准确度和批内、批间 (共 4 批) 精密度, 见表 3。结果表明, 各分析物的准确度为 87.4%~111.0%, 批内和批间 RSD 均小于 10.6%, 故该测定方法精密准确, 重复性好。

4.4 提取回收率和基质效应试验 分别配制低浓度 ($0.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高浓度 ($15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的质控样品各 6 份, 按“2.5”项下方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析, 得到峰面积 A_1 ; 同时取空白血清样品按照“2.5”项下方法进行处理后, 再加入混合对照品工作液制备成 0.3 及 $15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液进样分析, 得到峰面积 A_2 。根据 A_1 与 A_2 的比值可求算各待测物 2 种浓度的提取回收率, 结果为 80.5%~98.4%, RSD<10.4%。然后用甲醇配制低浓度 ($0.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高浓度 ($15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的混合对照品溶液各 6 份,

按“2.5”项下方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析, 得到峰面积 A_3 , 根据 A_2 与 A_3 的比值可求算各待测物 2 种浓度的基质效应, 结果为 95.1%~126.2%, RSD<6.7%。

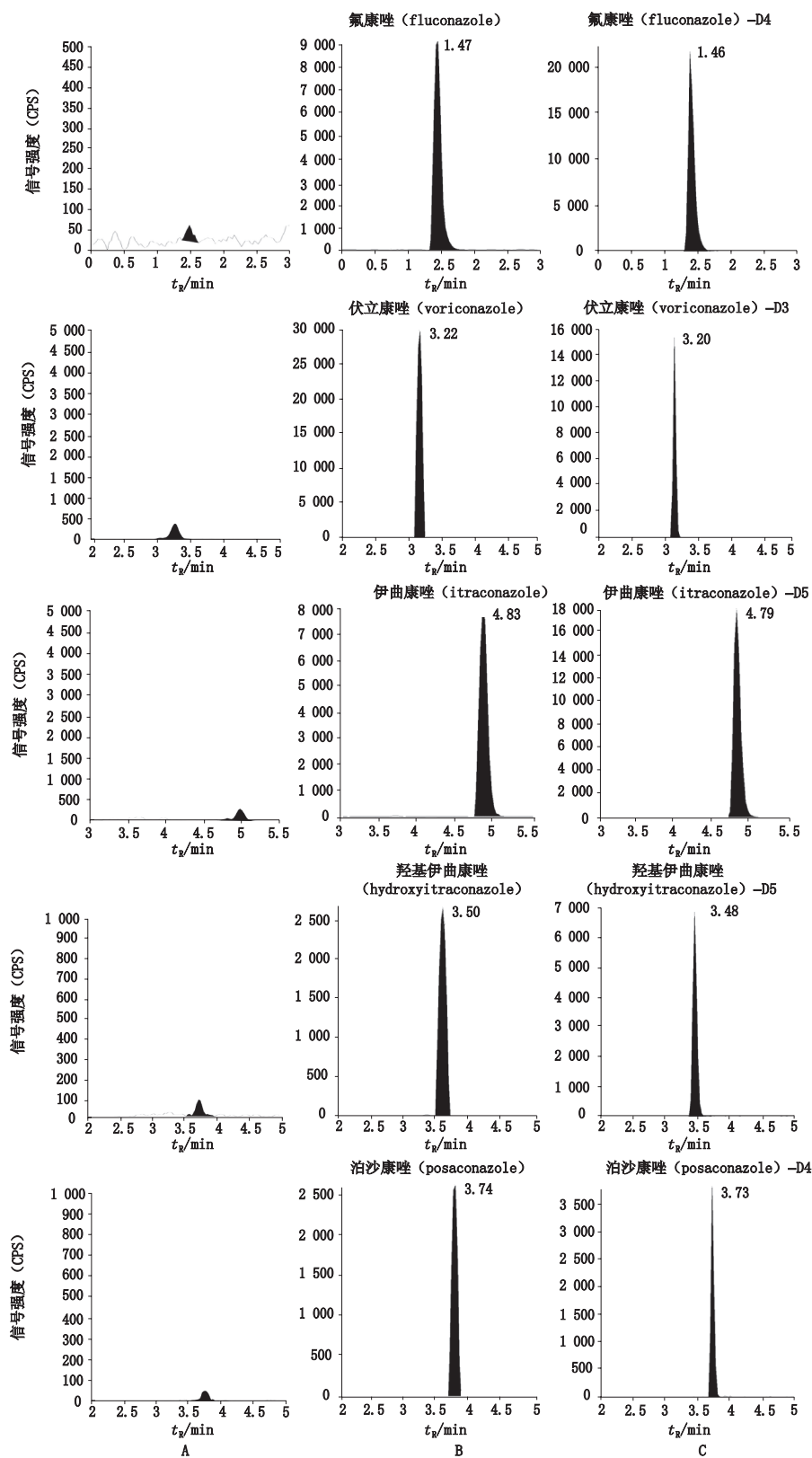
4.5 稳定性试验考察 血清样品处理后在室温下放置的稳定性以及在自动进样器 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 的稳定性, 样品冻融 3 次的稳定性。取低浓度 ($0.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高浓度 ($15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的质控样品, 按“2.5”项下方法处理后, 分别在 0、4、8、24 h 进样测定, 然后考察样品在自动进样器中的稳定性。样品冻融稳定性是将血清样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 然后在室温下自然解冻, 按“2.5”项下方法处理后进样, 如此反复 3 次, 以考察样品在 3 次冻融后的稳定性。通过测得浓度与初始浓度偏差百分比的结果表明血清样品在上述条件下均保持稳定, 见表 4。

5 方法应用

本研究从临床 ICU 和血液科严重侵袭性真菌病患者中选取 20 例患者男性 12 例女性 8 例, 平均年龄 (71 ± 19) 岁。病原体主要为白色念珠菌和热带念珠菌。20 例患者用药伏立康唑和氟康唑不同剂量 (除 15 号患者用药氟康唑外, 均用药伏立康唑), 给药间隔均为 12 h。治疗开始后 4~7 d 谷浓度时进行监测, 在下次给药前抽取静脉血 2 mL , $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液。测得伏立康唑给药前谷浓度范围为 $0.24\sim 4.06\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (氟康唑参考有效浓度范围 $>20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 伏立康唑参考有效浓度范围 $2\sim 6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [6]) 结果见表 5。从检测结果可以看出, 伏立康唑个体药代动力学差异较大, 需密切监测血药浓度。

6 讨论

目前已报道的检测三唑类抗真菌药物的方法中有微生物方法和 HPLC 方法, 且两者检测结果大致相同, 但是都有不足。对于微生物方法而言, 由于伊曲康唑代谢物羟基伊曲康唑会大大增强微生物活性, 所以伊曲康唑微生物检测结果要比 HPLC 方法高出 2~3 倍 [16], 使得结果准确度降低。对于 HPLC 方法而言分析时间较长, 也不适合用于治疗药物监测 (TDM) [6]。TDM 主要针对治疗指数低、个体差异大的药物, 其核心是以血药浓度为指标, 个体化调整用药方案, 变经验用药为科学用药, 实现安全、有效、经济合理的治疗目的。并且 LC-MS/MS 技术在靶向定量分析独具优势, 早期在药物生物分析领域得到成熟应用。



A. 空白血清 (blank serum) B. 空白血清添加对照品 (blank serum spiked with reference substances) ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) C. 空白血清添加内标 (blank serum spiked with internal standard) ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图1 典型MRM色谱图

Fig. 1 Typical MRM chromatograms

表 2 线性方程、相关系数及线性范围

Tab. 2 Linear equations, correlation coefficients and linear ranges

化合物 (compound)	线性方程 (linear equation)	相关系数 (r)	浓度范围 (concentration range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
氟康唑 (fluconazole)	$Y=0.548X+0.00712$	0.999 5	0.1~20
伏立康唑 (voriconazole)	$Y=0.387X+0.0125$	0.999 8	0.1~20
伊曲康唑 (itraconazole)	$Y=0.693X-0.00721$	0.998 6	0.1~20
羟基伊曲康唑 (hydroxyitraconazole)	$Y=1.32X-0.00946$	0.998 9	0.1~20
泊沙康唑 (posaconazole)	$Y=1.13X+0.0131$	0.997 7	0.1~20

表 3 5 种化合物的准确度和精密度。

Tab. 3 Accuracy and precision of five compounds

化合物 (compound)	添加浓度 (added concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy) / %	批内 (intra-day) RSD / % ($n=20$)	批间 (inter-day) RSD / % ($n=6$)
氟康唑 (fluconazole)	0.3	102.6	4.5	6.8
	5	98.9	3.5	4.4
	15	97.9	4.0	4.0
伏立康唑 (voriconazole)	0.3	104.6	2.0	4.2
	5	105.0	3.6	4.2
	15	101.9	5.5	3.4
伊曲康唑 (itraconazole)	0.3	111.3	4.6	6.0
	5	105.6	1.5	3.1
	15	105.0	1.7	3.9
羟基伊曲康唑 (hydroxyitraconazole)	0.3	108.9	6.5	7.1
	5	109.0	2.8	3.9
	15	105.2	2.7	3.3
泊沙康唑 (posaconazole)	0.3	107.6	5.8	8.0
	5	101.4	7.3	5.6
	15	99.7	4.3	6.2

表 4 稳定性结果

Tab. 4 Stability results

化合物 (compound)	添加浓度 (added concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	冻融 (freeze) 3 次 (3 times) / %	室温放置 (room-temperature) 24 h / %	自动进样器 (autosampler) 24 h / %
氟康唑 (fluconazole)	0.3	0.0	0.0	0.0
	15	-4.4	-2.1	-2.8
伏立康唑 (voriconazole)	0.3	0.0	-3.2	-9.7
	15	-2.7	-3.3	-4.0
伊曲康唑 (itraconazole)	0.3	6.5	6.5	-9.7
	15	-6.0	-10.1	-13.0
羟基伊曲康唑 (hydroxyitraconazole)	0.3	-0.21	-14.3	-0.10
	15	-4.8	15.0	-2.0
泊沙康唑 (posaconazole)	0.3	6.3	3.1	0.0
	15	-11.4	0.84	-10.3

表 5 患者病情、给药情况以及谷浓度测定结果

Tab. 5 Patient condition, drug administration, and results of trough concentration measurement

病人 (patient)	诊断 (diagnosis)	真菌检测 (fungal test) / 真菌培养 (fungal culture)	用药方案 (regimen)	谷浓度 (trough concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	肺炎,呼吸衰竭 (pneumonia, respiratory failure)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv200 mg q12 h	2.89
2	肺炎 (pneumonia)	非白色念珠菌 (<i>Candida</i>)	iv200 mg q 12 h	2.82
3	肺炎,呼吸衰竭 (pneumonia, respiratory failure)	热带念珠菌 (<i>Candida tropicalis</i>)	iv200 mg q12 h	4.06
4	肺炎 (pneumonia)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv200 mg q12 h	0.817
5	百日咳 (pneumonia)	热带念珠菌 (<i>Candida tropicalis</i>)	iv200 mg q12 h	0.665
6	肺炎 (pneumonia)	热带念珠菌 (<i>Candida tropicalis</i>)	iv200 mg q12 h	1.2
7	肺炎 (pneumonia)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv200 mg q12 h	0.24
8	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	不明确 (uncertain)	iv300 mg q12 h	2.2
9	非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)	阳性 (positive)	Po 200 mg q12 h	0.816
10	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	不明确 (uncertain)	iv200 mg q12 h	1.52
11	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv200 mg q12 h	3.37
12	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	不明确 (uncertain)	iv200 mg q12 h	1.56
13	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	阳性 (positive)	Po 150 mg q12 h	1.74
14	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv300 mg q12 h	4
15*	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	阳性 (positive)	po400 mg q12 h	25
16	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	阳性 (positive)	iv300 mg q12 h	1.56
17	非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)	阳性 (positive)	po150 mg q12 h	2.07
18	急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia)	不明确 (uncertain)	iv200 mg q12 h	1.96
19	非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)	不明确 (uncertain)	po300 mg q12 h	1.17
20	肺炎 (pneumonia)	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	iv200 mg q12 h	1.76

*: 15 号患者用药氟康唑 (Number 15 patient treated with fluconazole)

本文采用的 LC-MS/MS 法可以同时检测 5 种临床常用的三唑类抗真菌药物。本方法样本使用量少, 仅需 50 μL , 并且每个样品分析时间仅为 5.5 min, 达到高通量的要求。通过对方法特异性、线性关系、回收率等方面的验证, 该方法可确保血清中 5 种三唑类抗真菌药物浓度的准确检测, 适用于临床药物浓度监测。

本研究对 20 名接受伏立康唑和氟康唑治疗的患者进行了血药浓度监测, 其中用药伏立康唑的患者有 19 名, 从监测结果可以看出伏立康唑个体药代动力学差异较大, 目前有研究表明伏立康唑疗效和患者血药浓度的明显相关性, 浓度低于 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时很可能会导致治疗失败, 而浓度高于 4.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 很大程度上会发生不良反应^[17]。因此严重侵袭性真菌病患者用伏立康唑治疗过程中监测血药浓度有助于增加安全性和有效性。

参考文献

- [1] TUIITE NL, LACEY K. Overview of invasive fungal infections [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 968 (1): 1
- [2] CASTON-OSORIO JJ, RIVRO A, TORRE-CISNEROS J. Epidemiology of invasive fungal infection [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32 (s2): S103
- [3] ODDS FC, BROWN AJ, GOW NA. Antifungal agents: mechanisms of action [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11 (6): 272
- [4] BERL T, WILNER KD, GARDER M, *et al.* Pharmacokinetics of fluconazole in renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1995, 6 (2): 242
- [5] YAGASAKI K, DECOSTERD LA, MATSUDA N, *et al.* Pharmacokinetics and the most suitable dosing regimen of fluconazole in critically ill patients receiving continuous hemodiafiltration [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29 (10): 1844
- [6] STEVENS DA. Itraconazole in cyclodextrin solution [J]. *Pharmacotherapy*, 1999, 19 (5): 603
- [7] PASCUAL A, CALANDRA T, BOLAY S, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy

- and safety outcomes [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46 (2): 201
- [8] GUBBINS PO, KRISHNA G, SANSONE-PARSONS A, *et al.* Pharmacokinetics and safety of oral posaconazole in neutropenic stem cell transplant recipients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50 (6): 1993
- [9] GOODWIN ML, DREW RH. Antifungal serum concentration monitoring: an update [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61 (1): 17
- [10] ZONIOS DI, BENNETT JE. Update on azole antifungals [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2008, 29 (2): 198
- [11] ANDES D, PASCUAL A, MARCHETTI O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53 (1): 24
- [12] ALFFENAAR JW, WESSELS AM, van HATEREN K, *et al.* Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878 (1): 39
- [13] 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
- [14] BESTE KY, BURKHARDT O, KAEVER V. Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413 (1-2): 240
- [15] FAROWSKI F, CORNELLY OA, VEHRESCHILD JJ, *et al.* Quantitation of azoles and echinocandins in compartments of peripheral blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54 (5): 1815
- [16] PENNICK GJ, CLARK M, SUTTON DA, *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47 (7): 2348
- [17] TRIFILIO S, ORTIZR, PENNICKG, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 35 (5): 509
- (本文于 2016 年 6 月 26 日收到)