

LC-MS/MS法定量分析人血清中多黏菌素B的浓度

张 柳, 刘 亮, 吴建华, 吴东方

武汉大学中南医院药学部 (武汉 430071)

【摘要】目的 开发一种简单灵敏的液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 用于人血清中多黏菌素 B (PB) 的浓度测定。方法 用多黏菌素 E₂ (PE₂) 作为内标, 使用乙腈 (含 0.1% 甲酸) 沉淀蛋白质法处理样品。采用 Hypersil GOLD™ C₁₈ 色谱柱进行色谱分析。流动相 A 为 0.1% 甲酸-水, 流动相 B 为纯甲醇, 梯度洗脱; 流速: 0.4 mL·min⁻¹, 进样量: 2 μL, 分析时间: 3.3 min, 柱温: 40℃。采用多反应监测模式, 电喷雾离子源正离子模式进行定量分析。定量离子对分别为 m/z 402.10 > 101.10 (PB₁), m/z 397.45 > 101.10 (PB₂), m/z 578.50 > 101.10 (PE₂)。结果 人血清中 PB₁ 在 22~15 000 ng·mL⁻¹, PB₂ 在 5~1 700 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 0。PB₁ 和 PB₂ 的定量下限分别为 22, 5 ng·mL⁻¹。PB₁ 的准确度为 95.98%~104.60%, PB₂ 的准确度为 98.11%~105.59%; 批内和批间精密度的 RSD 均小于 15%。PB₁ 和 PB₂ 的提取回收率分别为 97.26%~103.31% 和 95.81%~101.22%; 基质效应分别为 96.52%~109.54% 和 93.29%~109.95%。样品稳定性试验的 RSD 均小于 15%。应用本方法测定的 6 例患者平均 AUC_{0-24h} 为 (72.85 ± 17.87) mg·h·L⁻¹。结论 建立的测定人血清中 PB 浓度的 LC-MS/MS 方法符合生物样本检测分析的要求, 适用于临床上 PB 血药浓度检测。

【关键词】多黏菌素 B; 液相色谱串联质谱法; 血药浓度

Quantitative analysis of polymyxin B in human serum by LC-MS/MS

Liu ZHANG, Liang LIU, Jian-Hua WU, Dong-Fang WU

Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Dong-Fang WU, Email: dfwu2010@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To develop a simple and sensitive LC-MS/MS method for the determination of polymyxin B in human serum. Methods Polymyxin E₂ was used as an internal standard and acetonitrile (0.1% formic acid) was used for protein precipitation. Chromatographic separation was performed on a Hypersil GOLD™ C₁₈ column. Mobile phase A was 0.1% formic acid in water, and mobile phase B was methanol. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, with gradient elution. The column temperature was 40℃. The injection volume was 2 μL and the analysis time was 3.3 min. Multiple reaction monitoring and electrospray ion source positive ion mode were applied for quantitative analysis. The quantitative analysis ion pairs were m/z 402.10>101.10 (polymyxin B₁), m/z 397.45>101.10 (polymyxin B₂), m/z 578.50>101.10 (polymyxin E₂). Results The linear relationship of polymyxin B₁

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202312008

基金项目: 武汉大学中南医院临床研发项目 (lcyf202206)

通信作者: 吴东方, 博士, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, Email: dfwu2010@whu.edu.cn

was at 22-15 000 ng·mL⁻¹ and B₂ was at 5-1 700 ng·mL⁻¹ in human serum, which achieved excellent linearity, and the correlation coefficient was higher than 0.999 0. The lower limit of quantification of polymyxin B₁ and B₂ were 22 ng·mL⁻¹ and 5 ng·mL⁻¹, respectively. The accuracies were 95.98%-104.60% for polymyxin B₁, 98.11%-105.59% for polymyxin B₂, respectively. The RSDs of intra- and inter-day precision were less than 15%. The recoveries of polymyxin B₁ and B₂ were 97.26%-103.31% and 95.81%-101.22%, respectively, and the matrix effects were 96.52%-109.54% and 93.29%-109.95%, respectively. The RSDs of the samples were all less than 15%. The mean AUC_{0-24h} was (72.85±17.87) mg·h·L⁻¹ in six patients.

Conclusion The established LC-MS/MS method for determining polymyxin B in human serum meets the requirements of biological sample analysis. It is suitable for determining polymyxin B in human serum.

【Keywords】 Polymyxin B; LC-MS/MS; Blood drug concentration

多黏菌素 B (polymyxin B, PB) 是一种由环七肽和三肽侧链组成的抗生素, 用于治疗革兰阴性细菌引起的感染^[1]。PB 易诱导以急性肾损伤和急性肾小管坏死为特征的肾毒性以及以感觉异常和呼吸抑制为特征的神经毒性^[2], 因此 20 世纪 60 年代后, 临床逐渐减少使用^[3]。但自 20 世纪 90 年代以来, 随着耐多药的铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌引起的感染日益流行, 在缺乏针对这些耐多药革兰阴性菌的新型抗菌药的情况下, PB 作为最后一道防线被重新启用^[4], 是耐多药革兰阴性菌引起感染的最后治疗方案之一^[5]。

PB 虽很早就发现, 但由于没有经过现代药物的开发程序, 其在人体中的药动学特征还没有完全定论^[6]。而血清中总的 PB 水平是决定临床疗效和毒性的重要因素^[7]。为了达到疗效同时避免毒性, 多个国际机构和学术组织联合发布的国际共识指南^[2], 推荐 PB 在稳态下 24 h 的血药浓度-时间曲线下面积 (AUC_{SS, 0-24h}) 为 50~100 mg·h·L⁻¹, 相当于药物的目标平均血药稳态浓度 (C_{SS, avg}) 为 2~4 mg·L⁻¹。若超过这个范围, 会显著增加急性肾损伤的发生和严重程度。因此有必要在使用 PB 治疗时进行严格的药物浓度监测^[8]。PB 的主要成分是多黏菌素 B₁ (polymyxin B₁, PB₁) 和多黏菌素 B₂ (polymyxin B₂, PB₂), 约占整体含量的 85%^[9]。PB 浓度监测主要侧重于对这两种主要成分浓度的测定。目前 PB 的分析方法包括微生物学、高效液相色谱 (HPLC) 法、液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 法、薄层色谱 (TLC) 法和免疫分析方法等, 每种方法都具有不同的灵敏度和适用性, 但根据 PB 治疗药物监测专家共识^[10] 推荐,

LC-MS/MS 是最合适的方法。过去开发的分析方法多侧重于传统的生物分析, 随着技术的发展, 目前的 PB 定量方法倾向于将液相色谱与质谱相结合^[11]。但目前已有的 LC-MS/MS 方法存在检测范围受限、耗时较长、忽略高浓度 PB 残留等问题。为了更好地满足临床需求, 本研究基于 LC-MS/MS 进行优化, 建立了一种更快速、灵敏、简单的测定人血中 PB 浓度的方法, 便于临床进行 PB 血药浓度监测及药动学研究, 优化给药方案, 实现合理用药。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LCMS-8050CL 三重四极杆质谱仪系统 (日本岛津公司); TGL-16 低温台式离心机、L530 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Clever-S 超纯水机 [芷昂仪器 (上海) 有限公司]; KQ5200E 型超声波清洗器 (昆山舒美超声仪器有限公司); AUW12D 电子分析天平 (日本岛津公司); MIX-2500 迷你混匀仪 (上海启前电子科技有限公司)。

1.2 试剂

PB 标准品 (加拿大 TRC 公司, 纯度: 95%; PB₁ 含量 73.4%, PB₂ 含量 9%, 批号: 19-JPO-184-1); 多黏菌素 E₂ 标准品 (polymyxin E₂, PE₂, 法国 LGC 公司, 批号: 1087078, 纯度 89.0%); 甲醇 (色谱纯, Thermo 公司, 批号: 22045156); 乙腈 (Thermo 公司, 色谱纯, 批号: 22035335); 甲酸 (迈瑞尔公司, 色谱纯, 批号: 70767118)。超纯水由 Clever-S 超纯水机制得。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

LC-MS/MS 分析在 LCMS-8050CL 系统上进行(日本岛津公司)。色谱柱为 Hypersil GOLD™ C₁₈ (30 mm × 2.1 mm, 3 μm), 柱温: 40 °C; 取 2 μL 样品注入 LC30A UPLC 系统。流动相 A 为 0.1% 甲酸-水, 流动相 B 为纯甲醇; 以 0.4 mL · min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱: 10%B (0.1 min) → 50%B (0.3 min) → 100%B (0.5 min) → 100%B (1.0 min) → 50%B (1.5 min) → 10%B (1.7 min); 分析时间为 3.3 min。采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 多反应监测 (MRM) 模式进行定量分析。各离子通道和相应的碰撞电压如下: PB₁: m/z 402.10 > 101.10, 碰撞电压 -31 V; PB₂: m/z 397.45 > 101.10, 碰撞电压 -26 V; PE₂: m/z 578.50 > 101.10, 碰撞电压 -30 V。样品分析采用以下接口设置: 雾化气流量 3 L · min⁻¹, 加热气流量 10 L · min⁻¹, 干燥气流量 10 L · min⁻¹, 接口温度 300 °C, DL 温度 250 °C, 蒸发器温度 400 °C。接口电压为 4.0 kV, 检测器电压为 1.94 kV。

2.2 标准溶液和质控溶液的配制

精密称取适量 PB 溶于超纯水中配制成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的储备液。取适量储备液用超纯水稀释成 PB₁ 浓度为 220, 2 200, 6 800, 17 000, 36 000, 74 000, 150 000 ng · mL⁻¹ 和 PB₂ 浓度为 50, 240, 780, 2 000, 4 000, 8 500, 17 000 ng · mL⁻¹ 的标准储备液。-80 °C 储存备用。

取适量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的储备液用超纯水稀释成 PB₁ 浓度为 600, 29 000, 120 000 ng · mL⁻¹ 和 PB₂ 浓度为 150, 3 300, 14 000 ng · mL⁻¹ 的质控储备液。-80 °C 储存备用。

吸取 20 μL 标准储备液于聚丙烯管中, 加入 180 μL 空白血清, 振荡 1 min, 配制成含 PB₁ 浓度分别为 22, 220, 680, 1 700, 3 600, 7 400, 15 000 ng · mL⁻¹ 和含 PB₂ 浓度分别为 5, 24, 78, 200, 400, 850, 1 700 ng · mL⁻¹ 的标准曲线样品。对于质控储备液进行同样的操作配制成含 PB₁ 浓度分别为 60, 2 900, 12 000 ng · mL⁻¹ 和含 PB₂ 浓度分别为 15, 330, 1 400 ng · mL⁻¹ 的质控样品。

2.3 内标溶液的配置

精密称取 PE₂ 适量溶于水中配制成浓度为

1 mg · mL⁻¹ 的储备液。取储备液适量用水稀释成 50 μg · mL⁻¹ 的内标溶液。-80 °C 存储备用。

2.4 血清采集

本研究已通过武汉大学中南医院伦理委员会批准(伦理批件号: 临研伦 [2022084]), 所有受试者均已签署知情同意书。血液样本取自武汉大学中南医院的健康志愿者(未用药, 空白血液)和由于革兰阴性菌感染而使用 PB 治疗的重症患者, 采集于分离胶促凝管中, 离心 (1 940 × g) 10 min 后, 取上清液 -80 °C 保存待分析。

2.5 血清样品处理

精密吸取 40 μL 血清于 1.5 mL 的聚丙烯管中, 再加入 10 μL 内标溶液, 最后加入 120 μL 乙腈 (0.1% 甲酸) 进行蛋白沉淀。振荡 1 min 后低温离心机离心 (20 120 × g, 4 °C) 8 min, 吸取 150 μL 上清液加入 96 孔板中, 再离心 (2 200 × g) 1 min, 上机进行分析, 每次进样 2 μL。

2.6 方法学验证

2.6.1 标准曲线和定量下限

将“2.2”项下制备的 PB₁ 和 PB₂ 标准曲线样品按照“2.5”项下方法进行处理后上机分析。以浓度为横坐标, 面积比为纵坐标, 应用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行线性回归分析, 拟合的 PB₁ 和 PB₂ 标准曲线方程分别为 $Y=5.847 \times 10^{-4}X-8.115 \times 10^{-2}$ ($r=0.9998$), $Y=1.223 \times 10^{-3}X+4.958 \times 10^{-2}$ ($r=0.9991$), 表明 PB₁ 和 PB₂ 在标准曲线浓度范围内线性良好。

定量下限通过信噪比 (S/N) 确定。当 $S/N \geq 3$ 时为检测限, 当 $S/N \geq 10$ 时可作为定量下限。PB₁ 和 PB₂ 的定量下限分别为 22 (21.76 ± 2.69) ng · mL⁻¹ 和 5 (5.23 ± 0.54) ng · mL⁻¹。

2.6.2 准确性与精密度

按照“2.2”项下方法配制低、中、高三个等级浓度的质控样品, 每个浓度的样品平行配制 6 份, 再按照“2.5”项下方法处理后上机检测。连续测定 3 d, 考察批内、批间准确度(测得值/理论值 × 100%) 和精密度(标准差/测得值均值 × 100%)。结果 PB₁ 的批内和批间准确度为 95.98%~104.60%; PB₂ 的批内和批间准确度为 98.11%~105.59%。见表 1。批内和批间的精密度 (RSD) 应均小于 15%, 准确度均值应在 ± 15% 之间才符合生物定量分析指导原则。

表1 PB₁和PB₂的批内、批间准确度及精密度

Table 1. Intra- and inter-day accuracy and precision of PB₁ and PB₂

成分	理论值 (ng · mL ⁻¹)	批内 (n=6)			批间 (n=18)		
		均值 (ng · mL ⁻¹)	准确度 (%)	精密度 (RSD) (%)	均值 (ng · mL ⁻¹)	准确度 (%)	精密度 (RSD) (%)
PB ₁	60	60.62	97.53	3.29	60.95	99.76	2.91
	2 900	2 792.41	95.98	5.53	2 804.85	96.41	4.78
	12 000	12 679.30	104.60	2.07	12 503.59	103.15	4.06
PB ₂	15	15.47	103.66	7.39	15.99	101.15	8.50
	330	339.09	102.39	2.03	324.93	98.11	4.68
	1 400	1 457.07	105.59	3.11	1 434.36	103.95	2.75

2.6.3 提取回收率和基质效应

取“2.2”项下制备的PB₁和PB₂低、中、高浓度的质控样品，每个浓度平行取6份，按照“2.5”项下方法对样品进行处理后上机分析，得到PB₁的峰面积A₁和PB₂的峰面积B₁。另取不含待测物质的空白血清，用乙腈（含0.1%甲酸）进行蛋白质沉淀，之后取上清液于聚丙烯管中，再加入“2.2”项下制备的PB₁和PB₂的质控储备液，配制成PB₁浓度分别为60, 2 900, 12 000 ng · mL⁻¹和PB₂浓度分别为15, 330, 1 400 ng · mL⁻¹的样品，再向样品中加入10 μL内标溶液，每个浓度的样品平行配制6份，振荡后上机测试。分析得到PB₁的峰面积A₂和PB₂的峰面积B₂。将不含待测物质的空白血清替换成超纯水，其余按照A₂和B₂对应的样品处

理方法进行操作，得到PB₁和PB₂的峰面积A₃和B₃。A₁/A₂和B₁/B₂分别为PB₁和PB₂的提取回收率，A₂/A₃和B₂/B₃分别为PB₁和PB₂的基质效应。结果PB₁和PB₂的提取回收率分别为97.26%~103.31%和95.81%~101.22%；基质效应分别为96.52%~109.54%和93.29%~109.95%。见表2。提取回收率和基质效应RSD均应小于15%才表明该方法符合生物样本分析要求。

2.6.4 专属性试验

测定6份不同来源的空白血清（不含待测物质，不加内标）、定量下限的血清样品以及重症患者给药后30 min的血清样品来评估方法的专属性。各血清样品均按照“2.5”项下方法进行处理，结果见图1。PB₁的保留时间约为1.75 min，PB₂的保留时间约为1.67 min，内标PE₂的保留时

表2 PB₁和PB₂的提取回收率和基质效应 (n=6)

Table 2. Extraction recovery and matrix effect of PB₁ and PB₂ (n=6)

成分	理论值 (ng · mL ⁻¹)	提取回收率 (%)	RSD (%)	基质效应 (%)	RSD (%)
PB ₁	60	101.06	6.41	96.52	2.23
	2 900	97.26	7.92	109.54	2.84
	12 000	103.31	6.32	109.25	1.50
PB ₂	15	95.81	8.11	93.29	5.79
	330	98.11	7.02	109.95	2.88
	1 400	101.22	4.41	107.72	3.58

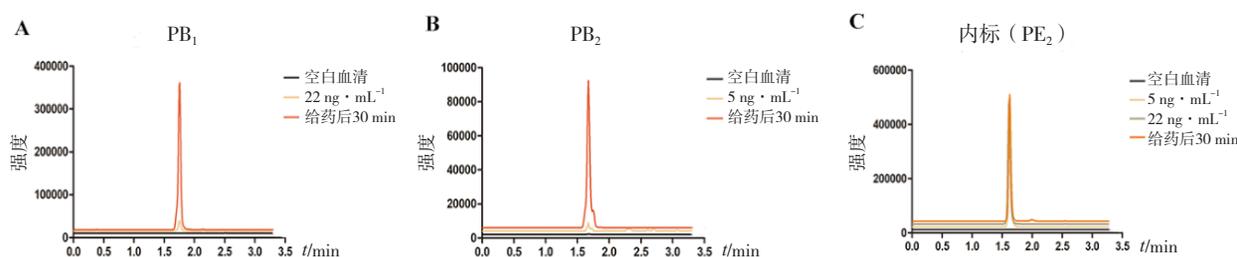


图1 PB₁、PB₂、PE₂色谱图

Figure 1. Chromatograms of PB₁, PB₂, and PE₂

间约为 1.62 min。各成分在保留时间内峰型良好，无杂峰干扰，表明血清内源性物质没有对待测成分产生干扰，方法专属性良好。

2.6.5 稳定性试验

取“2.2”项下制备的 PB₁ 和 PB₂ 的质控样品，每个浓度 6 份，按照“2.5”项下方法处理后进样分析。考察样品在室温下放置 8 h、自动进样器 4℃ 放置 48 h、-80℃ 反复冻融 3 次以及 -80℃ 下放置 30 d 的稳定性。结果如表 3 所示。在以上条件下的血清样品经检测，RSD 范围为 0.91%~11.02% ($n=6$)，表明样品稳定性良好。

2.6.6 残留性检测

将“2.2”项下制备的定量上限样品 (PB₁: 15 000 ng·mL⁻¹, PB₂: 1 700 ng·mL⁻¹) 和定量下限样品 (PB₁: 22 ng·mL⁻¹, PB₂: 5 ng·mL⁻¹)，按“2.5”项下方法进行处理后上机分析。在进样 1 针定量上限样品后连续进样空白样品进行评估。结果进样 3 针空白样品后，残留峰面积均小于定量下限峰面积的 20% 和内标峰面积的 5% (PB₁: 7.02%, PB₂: 6.26%, PE₂: 0.15%)，符合生物分析指导原则。为不影响准确度和精密度，在测试样品之间额外增加空白样品的进样数量。

2.6.7 稀释可靠性

为了确保稀释不影响结果的准确度和精密度，分别配制浓度为 50 000, 3 000 ng·mL⁻¹ 的 PB₁ 和 PB₂ 溶液，按照 1:9 的比例用空白血清稀释，按照“2.5”项下方法处理后进样分析。结果 PB₁ 和 PB₂ 的测得值分别为 (5 197.36 ± 293.49) ng·mL⁻¹ 和 (307.19 ± 23.81) ng·mL⁻¹，RSD 分别为 5.65% 和 7.75% ($n=6$)。PB₁ 和 PB₂ 的准确度和精密度均在 ±15% 之间，提示稀释对结果未产生影响。

2.7 临床应用

选取 6 例革兰阴性菌感染并使用 PB (上海上药第一生化药业有限公司, 规格: 50 万单位, 批号: 2309803) 治疗的重症患者, 给药剂量均为 75 万单位, ivd, q12h, 分别在血药浓度达到稳态后的下一次给药前 30 min、滴注完毕、给药后 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h 进行采样。按照“2.4”“2.5”项下方法对血样进行处理后, 应用已通过验证的方法进行血药浓度测定。结果 PB 半衰期为 (9.33 ± 7.62) h, 分布容积为 (21.58 ± 16.67) L, 清除率为 (2.06 ± 5.02) L·h⁻¹, 平均 AUC_{0-24h} 为 (72.85 ± 17.87) mg·h·L⁻¹。PB₁ 和 PB₂ 血药浓

表3 PB₁和PB₂在不同条件下的稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3. Stability results of PB₁ and PB₂ under different conditions ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	理论值 (ng·mL ⁻¹)	室温8 h		4℃ 48 h		反复冻融3次		-80℃ 30 d	
		测得值 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)						
PB ₁	60	60.52 ± 0.04	3.39	59.28 ± 1.38	2.29	59.05 ± 1.75	5.28	58.76 ± 1.63	2.72
	2 900	3 083.08 ± 191.02	6.20	3 056.20 ± 27.91	0.91	2 793.91 ± 94.32	3.38	2 744.65 ± 110.80	4.04
	12 000	13 041.21 ± 208.34	1.60	12 620.90 ± 224.51	1.78	12 282.40 ± 249.32	2.03	12 199.12 ± 444.20	3.64
PB ₂	15	16.10 ± 1.34	8.00	15.75 ± 1.54	11.02	15.03 ± 1.39	8.10	14.98 ± 0.95	10.26
	330	354.57 ± 18.47	5.21	348.80 ± 20.44	5.86	336.89 ± 11.73	3.48	311.59 ± 9.13	2.93
	1 400	1 419.81 ± 24.23	1.71	1 410.13 ± 27.41	1.94	1 370.22 ± 64.28	4.70	1 348.16 ± 53.12	3.94

度范围分别为 323.89~5 971.78 ng·mL⁻¹ 和 24.58~807.91 ng·mL⁻¹。所建立的方法能够满足患者血清中 PB 浓度检测要求。根据血药浓度结果, 建议将下一次给药前作为谷浓度采样点, 静滴完毕后作为峰浓度采样点。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

不同的色谱柱对 PB 的分离效果不同。在试验初期尝试了 Waters ACQUITY UPLC C₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 发现在低浓度时峰型较差, 存在严重的拖尾现象。进一步考察了 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1mm×50 mm, 1.8 μm)、Agilent ZORBAX Hilic Plus (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)、Agilent UHPLC Guard 3PK (2.1 mm×5 mm, 1.8 μm) 和 Hypersil GOLD™ C₁₈ (30 mm×2.1 mm, 3 μm), 最终发现 Hypersil GOLD™ C₁₈ 相对于其他色谱柱峰型更加对称且无杂峰, 保留时间也更加合适。在色谱分离方面, 流动相的选择也至关重要。首先对水相中甲酸的比例进行了调整 (0.1%~0.5%), 通过调节水相 pH 对峰型有一定改善作用^[12]。但由于原本峰型良好, 无需做较大改变, 且酸性过强会影响仪器使用寿命, 因此最后选择 0.1% 甲酸-水作为水相。对于有机相的选择, 考察了纯甲醇、纯乙腈和甲醇:乙腈 (1:1, v/v), 发现以纯甲醇作为有机相时得到的峰型对称且没有拖尾。

3.2 内标选择

查阅文献^[6,13-15]发现在检测时能作为内标使用的包括 PE₁、纤维蛋白肽 B、异亮氨酸-PB₁、PB₁-1 和 PE₂ 等, 其中最常用的是 PE₂。因此选取了与 PB 结构相似的 PE₂ 作为内标, 其能很好地降低基质效应和减少对待测物质的干扰^[16]。处理蛋白的常见方法包括固相萃取法、三氟乙酸去除法和有机溶剂沉淀法^[13,17-18]。综合考虑后选取了成本低、操作简单的有机溶剂沉淀法。由于 PB 在酸性环境中比较稳定, 因此考察了 0.1% 的甲酸在纯甲醇、纯乙腈以及不同比例的甲醇乙腈中的提取效果, 发现 0.1% 甲酸-乙腈作为沉淀剂效果更好。

3.3 质谱条件选择

PB₁、PB₂ 和 PE₂ 均在正离子模式下响应较好。本研究通过前体离子扫描和产物离子扫描确定了强度较高的离子对, 再通过设置不同碰撞电压选出了

以下离子对: PB₁: m/z 402.10 > 101.10, -31 V; m/z 402.10 > 120.15, -47 V。PB₂: m/z 397.45 > 101.10, -26 V; m/z 397.45 > 74.10, -50 V。PE₂: m/z 578.50 > 101.10, -30 V; m/z 578.50 > 227.2, -30 V。采用其中强度最高的离子对进行定量。各个化合物的离子对分别是 PB₁: m/z 402.10 > 101.10, -31 V; PB₂: m/z 397.45 > 101.10, -26 V; PE₂: m/z 578.50 > 101.10, -30 V。

3.4 临床应用

PB 基本结构是由一个聚阳离子肽环和一个通过酰胺键连接在肽环上的脂肪酸侧链组成^[19]。这种结构使其同时具有亲水和亲脂性, 能够很好地分布于水和非水环境中, 因此极易溶于水 (或血液) 以及原核和真核脂质膜^[20]。PB 的 $T_{1/2}$ 为 9~11.5 h^[21], 在健康个体中的 CL 为 2.922 L·h⁻¹, V 为 12.4 L^[22]。PB 在危重患者中 CL 为 0.460~0.504 mL·min⁻¹·kg⁻¹, V 为 0.14~0.33 L·kg⁻¹^[23]。与一般患者相比, 危重症患者的分布容积显著增加, 因此需要更大的剂量才能在感染部位达到最佳药物浓度^[23]。本研究中患者达到 AUC_{0-24h} 目标^[2] 的比例是 83.33%。由于危重症患者个体差异大, 按照说明书统一剂量经验给药可能会导致部分患者疗效未达标。另外对于危重症患者常需要体外器官支持, 如采用持续肾脏替代治疗或血液透析, 这可能会导致相对分子质量较小、低蛋白结合和亲水性的药物清除增加^[24]。而且危重症患者治疗方案常与其他抗菌药物联用, 可能存在药物相互作用影响疗效。因此, 应通过对危重症患者开展 PB 血药浓度监测进行剂量或给药频次调整, 实现个性化给药。

3.5 小结

本研究建立的 LC-MS/MS 法经过全面验证, 与现有方法相比有以下优点: ①应用新的高强度离子对, 检测范围增大, 提高了检测灵敏度 (PB₁: 22 ng·mL⁻¹, PB₂: 5 ng·mL⁻¹), 能覆盖更宽的浓度检测范围, 进一步增强临床血药浓度监测能力; ②采用乙腈结合甲酸溶液沉淀蛋白, 操作简单快速, 减少对色谱柱的损害, 降低成本, 提升沉淀效果; ③通过改变流动相组成, 调整洗脱程序, 将分析时间缩短至 3.3 min, 满足大量样本检测需求; ④ PE₂ 作为内标, 与待测物的化学性质、保留时间、碰撞压力等均相近, 很好地消除了基质效应, 增强离子化效率; ⑤增加空白洗脱, 避

免高浓度 PB 残留影响；⑥方法可重复性高，结果稳定性和准确性高。综上所述，本研究建立的 LC-MS/MS 方法具有高灵敏度、高特异性、简单、快速等优点，满足临床检测要求，适用于 PB 血药浓度监测及药动学研究。

参考文献

- Chen N, Guo J, Xie J, et al. Population pharmacokinetics of polymyxin B: a systematic review[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(4): 231. DOI: 10.21037/atm-22-236.
- Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins: endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP)[J]. *Pharmacotherapy*, 2019, 39(1): 10-39. DOI: 10.1002/phar.2209.
- Han L, Xu FM, Zhang XS, et al. Trough polymyxin B plasma concentration is an independent risk factor for its nephrotoxicity[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88(3): 1202-1210. DOI: 10.1111/bcp.15061.
- Auletta S, Galli F, Varani M, et al. In vitro and *in vivo* evaluation of (99m)tc-polymyxin B for specific targeting of gram-bacteria[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 232. DOI: 10.3390/biom11020232.
- Zhang B, Li X, Chen Y, et al. Determination of polymyxin B in human plasma and epithelial lining fluid using LC-MS/MS and its clinical application in therapeutic drug monitoring[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 227: 115291. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115291.
- Liang D, Liang Z, Deng G, et al. Population pharmacokinetic analysis and dosing optimization of polymyxin B in critically ill patients[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1122310. DOI: 10.3389/fphar.2023.1122310.
- Huang X, Liu X, Wang Y, et al. Determination of polymyxin B in dried blood spots using LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1192: 123131. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123131.
- Xia GL, Jiang RL. Efficacy and safety of polymyxin B in carbapenem-resistant gram-negative organisms infections[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 1034. DOI: 10.1186/s12879-021-06719-y.
- Avedissian SN, Liu J, Rhodes NJ, et al. A review of the clinical pharmacokinetics of polymyxin B[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8(1): 31. DOI: 10.3390/antibiotics8010031.
- Liu X, Huang C, Bergen PJ, et al. Chinese consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of polymyxin B, endorsed by the Infection and Chemotherapy Committee of the Shanghai Medical Association and the Therapeutic Drug Monitoring Committee of the Chinese Pharmacological Society[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2023, 24(2): 130-142. DOI: 10.1631/jzus.B2200466.
- Wang P, Zhang Q, Qin Z, et al. A simple and robust liquid chromatography with tandem mass spectrometry analytical method for therapeutic drug monitoring of plasma and cerebrospinal fluid polymyxin B₁ and B₂[J]. *Ther Drug Monit*, 2020, 42(5): 716-723. DOI: 10.1097/ftd.0000000000000754.
- Bladek T, Szymanek-Bany I, Posylniak A. Determination of polypeptide antibiotic residues in food of animal origin by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): 3261. DOI: 10.3390/molecules25143261.
- Yuan Y, Xu QM, Yu SC, et al. Control of the polymyxin analog ratio by domain swapping in the nonribosomal peptide synthetase of *Paenibacillus polymyxa*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47(6-7): 551-562. DOI: 10.1007/s10295-020-02275-7.
- Chen DJ, Cui AL, Chen JR, et al. The low-alkalinity polymyxin derivative, AL-6, shows high activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates *in vitro* and *A. baumannii* ATCC 19606 *in vivo*: Preliminary analysis of the antibacterial mechanism[J]. *Microb Drug Resist*, 2021, 27(7): 933-941. DOI: 10.1089/mdr.2019.0474.
- Liu X, Yu Z, Wang Y, et al. Therapeutic drug monitoring of polymyxin B by LC-MS/MS in plasma and urine[J]. *Bioanalysis*, 2020, 12(12): 845-855. DOI: 10.4155/bio-2020-0051.
- 郑香宜, 吴建华, 张柳, 等. HPLC-MS/MS 法测定人血清中达托霉素的方法研究及临床应用 [J]. *中国药师*, 2022, 25(12): 2259-2264. [Zheng XY, Wu JH, Zhang L,

- et al. Validation of HPLC-MS/MS for the determination of daptomycin in human serum and Its clinical application[J]. *China Pharmacist*, 2022, 25(12): 2259-2264.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.036.
- 17 Matar KM, Al-Refai B. Quantification of colistin in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8198. DOI: 10.1038/s41598-020-65041-w.
- 18 Mead A, Gillard N, Robert C, et al. Determination of colistin in luminal and parietal intestinal matrices of chicken by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2021, 44(6): 982-985. DOI: 10.1111/jvp.13022.
- 19 刘亮, 张冕, 刘雅楠, 等. 多粘菌素 B 血药浓度监测研究进展 [J]. *中国药师*, 2021, 24(3): 536-541. [Liu L, Zhang M, Liu YN, et al. Review of therapeutic drug monitoring of polymyxin B[J]. *China Pharmacist*, 2021, 24(3): 536-541.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2021.03.027.
- 20 Falagas ME, Kyriakidou M, Voulgaris GL, et al. Clinical use of intravenous polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant gram-negative bacterial infections: an evaluation of the current evidence[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021, 24: 342-359. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.12.026.
- 21 Manchandani P, Thamlikitkul V, Dubrovskaya Y, et al. Population pharmacokinetics of polymyxin B[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2018, 104(3): 534-538. DOI: 10.1002/cpt.981.
- 22 Xie YL, Jin X, Yan SS, et al. Population pharmacokinetics of intravenous colistin sulfate and dosage optimization in critically ill patients[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 967412. DOI: 10.3389/fphar.2022.967412.
- 23 Heavner MS, Claeys KC, Masich AM, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations of antibiotics of last resort in treating gram-negative infections in adult critically ill patients[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2018, 20(5): 10. DOI: 10.1007/s11908-018-0614-0.
- 24 Li L, Li X, Xia Y, et al. Recommendation of antimicrobial dosing optimization during continuous renal replacement therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 786. DOI: 10.3389/fphar.2020.00786.

收稿日期: 2023 年 05 月 08 日 修回日期: 2023 年 09 月 22 日
本文编辑: 周璐敏 杨燕