

LC-MS/MS 法同时测定人血浆中 4 种抗感染药物浓度



傅 遥¹, 钱正月¹, 敖 惠¹, 曹建峰², 李 静¹

1. 南京医科大学附属无锡人民医院/南京医科大学无锡医学中心/无锡市人民医院药学部 (江苏无锡 214023)

2. 南京医科大学康达学院药学院 (江苏连云港 222000)

【摘要】目的 建立同时测定人血浆中亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑和多黏菌素 E (黏菌素) 浓度的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 方法, 并初步评价其在临床血浆样本检测中的适用性。**方法** 采用蛋白沉淀法处理血浆样本, 使用反相 C₁₈ 色谱柱进行分离, 以多反应监测 (MRM) 模式进行定量分析。参照相关指导原则, 系统评价方法的选择性、线性、定量下限 (LLOQ)、精密度、准确度、回收率、基质效应和稳定性, 并采用去标识化临床血浆样本进行初步检测。**结果** 亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑、多黏菌素 E₁ 及多黏菌素 E₂ 在各自浓度范围内线性良好, 相关系数 r 均不低于 0.992 0; 除亚胺培南低浓度样本在室温放置 3 h 后的稳定性略超出可接受范围外, 其余稳定性结果及 LLOQ、精密度、准确度、提取回收率和基质效应均符合生物样本分析方法验证要求。临床血浆样本检测结果显示, 亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑、多黏菌素 E₁ 及多黏菌素 E₂ 检测浓度分别为 0.74~18.62、0.86~52.40、0.68~2.45、0.56~6.82 和 0.73~8.96 $\mu\text{g/mL}$, 均处于相应线性范围内。**结论** 所建立的 LC-MS/MS 方法可同时定量检测人血浆中亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑及多黏菌素 E 的浓度, 方法学性能符合生物样本分析要求, 并在少量真实临床血浆样本中显示出检测可行性, 可为后续开展抗感染药物血药浓度监测应用研究提供方法学基础。

【关键词】 液相色谱-串联质谱法; 血浆药物浓度; 亚胺培南; 美罗培南; 泊沙康唑; 多黏菌素 E; 治疗药物监测

【中图分类号】 R917

【文献标识码】 A

Simultaneous determination of 4 anti-infective drug concentrations in human plasma by LC-MS/MS

FU Yao¹, QIAN Zhengyue¹, AO Hui¹, CAO Jianfeng², LI Jing¹

1. Department of Pharmacy, The Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University; Wuxi Medical Center, Nanjing Medical University; Wuxi People's Hospital, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China

2. College of Pharmacy, Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: LI Jing, Email: lijingwuxi@sina.com

【Abstract】Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method capable of simultaneously determining the concentrations of imipenem,

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202605046

基金项目: 无锡市人民医院博士人才经费项目 (BSRC202113)

通信作者: 李静, 硕士, 主任药师, Email: lijingwuxi@sina.com

<https://yxqy.whuznhmedj.com>

meropenem, posaconazole and polymyxin E (colistin) in human plasma, and to preliminarily evaluate its applicability in the detection of clinical plasma samples. **Methods** Plasma samples were pretreated using a protein precipitation procedure. Chromatographic separation was achieved on a reversed-phase C_{18} column, and quantitative analysis was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. According to relevant guidelines, the method was systematically evaluated in terms of selectivity, linearity, lower limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy, extraction recovery, matrix effect, and stability. In addition, de-identified residual clinical plasma samples were analyzed to preliminarily assess the applicability of the method. **Results** Imipenem, meropenem, posaconazole, colistin E_1 , and colistin E_2 exhibited good linearity within their respective concentration ranges, with correlation coefficients r not lower than 0.992 0. Except for the stability of the low-concentration imipenem sample after storage at room temperature for 3 h, which slightly exceeded the acceptable limit, the remaining stability results and the LLOQ, precision, accuracy, extraction recovery, and matrix effect met the requirements for bioanalytical method validation. Analysis of residual clinical plasma samples showed concentration ranges of 0.74-18.62 $\mu\text{g/mL}$ for imipenem, 0.86-52.40 $\mu\text{g/mL}$ for meropenem, 0.68-2.45 $\mu\text{g/mL}$ for posaconazole, 0.56-6.82 $\mu\text{g/mL}$ for colistin E_1 , and 0.73-8.96 $\mu\text{g/mL}$ for colistin E_2 , all of which fell within the corresponding linear ranges. **Conclusion** The established LC-MS/MS method can simultaneously quantify the concentrations of imipenem, meropenem, posaconazole, and polymyxin E in human plasma. The method demonstrated satisfactory analytical performance in accordance with the requirements for bioanalytical method validation and showed good feasibility in a limited number of authentic clinical plasma samples. Therefore, it provides a reliable analytical foundation for future studies on therapeutic drug monitoring (TDM) of these anti-infective agents.

【Keywords】 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Plasma drug concentration; Imipenem; Meropenem; Posaconazole; Colistin E; Therapeutic drug monitoring

亚胺培南和美罗培南属于碳青霉烯类抗菌药物，多黏菌素E（黏菌素）主要用于治疗多重耐药革兰阴性菌感染；泊沙康唑为三唑类抗真菌药物，可用于侵袭性真菌病的预防和治疗^[1-3]。这些药物在重症患者中的药代动力学易受感染严重程度、器官功能及体外生命支持等因素影响，个体间药物暴露差异较大；暴露不足可能影响抗感染疗效，暴露过高则可能增加药物不良反应发生风险^[4-7]。治疗药物监测（therapeutic drug monitoring, TDM）可用于评估患者的药物暴露水平，并为调整给药方案提供依据^[8]。

目前，上述药物的血药浓度检测方法多针对单一药物或同类药物建立。当患者接受多种抗感染药物联合或序贯治疗时，分别进行样本前处理和仪器分析会增加样本用量及检测时间，也不利于在同一时间窗内获得多种药物的浓度信息^[7-8]。亚胺培南和美罗培南在生物样本中稳定性较差，多黏菌素E分子量较大且易出现色谱拖尾，泊沙康唑与前述药物的理化性质差异明显，将其纳入同一分析体系时需要兼顾样本处理、色谱分离和

质谱响应^[7, 9]。

针对上述临床检测需求，本研究采用蛋白沉淀法处理血浆样本，建立了同时测定人血浆中亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑和多黏菌素E浓度的高效液相色谱串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）法，完成系统的方法学验证，还采用临床检测后的去标识化剩余血浆样本进行初步检测，以评价该方法用于真实临床血浆样本分析的可行性，并为后续开展上述药物的TDM应用研究提供方法学基础。

1 试验材料

1.1 仪器与试剂

4500MD液相色谱-串联质谱系统（美国AB Sciex LLC）；BCE224i-1CCN电子分析天平（德国Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG）；VORTEX-5涡旋混匀仪（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；5425R高速冷冻离心机（德国Eppendorf SE）。

亚胺培南（批号：H3000913，纯度97.2%）、

美罗培南(批号: J3014227, 纯度 98.0%)、多黏菌素 E (批号: J3021654, 纯度 79.7%, 按证书计, 每 1 mg 硫酸多黏菌素 E 中含多黏菌素 E₁ 0.252 mg、多黏菌素 E₂ 0.323 mg)、泊沙康唑(批号: J3027227, 纯度 99.6%) 对照品均购自曼哈格(上海)生物科技有限公司。

亚胺培南-[d4] (批号: H3002252, 纯度 31.3%, 同位素纯度 99.0%)、美罗培南-[d6] (批号: H3011253, 纯度 98.3%, 同位素纯度 > 98.0%)、多黏菌素 E₁-[13C6, 15N]三氟乙酸盐(批号: J3030664, 纯度 98.0%, 同位素纯度 99.0%)、泊沙康唑-[d4] (批号: K3036099, 纯度 99.9%, 同位素纯度 > 98.0%) 等内标对照品均购自曼哈格(上海)生物科技有限公司。

其他试剂: 甲醇、乙腈、甲酸、异丙醇均为色谱级, 均购自美国赛默飞世尔科技公司; 纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 空白血浆来源与伦理声明

本研究所用空白血浆来源于本院临床检测后的去标识化剩余血浆, 经 LC-MS/MS 法检测确认不含亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑及多黏菌素 E 后用于标准曲线、质控样品及方法学验证。本研究已获得无锡市人民医院科研伦理委员会批准(伦理批件号: KY26134), 免除获取患者知情同意。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 标准储备液

分别精密称取亚胺培南、美罗培南和泊沙康唑对照品各 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 50% 甲醇水溶液溶解并定容至刻度, 充分混匀后制得质量浓度均为 1.0 mg/mL 的标准储备液。另精密称取硫酸多黏菌素 E 对照品 4.0 mg, 加入含 0.1% 甲酸的 50% 甲醇溶液溶解并定容至 10 mL, 充分混匀后制得硫酸多黏菌素 E 储备液。经折算, 该储备液中多黏菌素 E₁ 和多黏菌素 E₂ 的实际质量浓度分别为 100.8 μg/mL 和 129.2 μg/mL。

2.1.2 混合标准工作液

分别精密量取亚胺培南储备液 3.0 mL、美罗培南储备液 6.0 mL、泊沙康唑储备液 0.6 mL 及硫酸多黏菌素 E 储备液 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 以含 0.1% 甲酸的 50% 甲醇溶液定容至刻度, 充

分混匀后制得混合标准工作液。该混合工作液中各待测物的理论质量浓度分别为亚胺培南 300 μg/mL、美罗培南 600 μg/mL、泊沙康唑 60 μg/mL、多黏菌素 E₁ 10.08 μg/mL 和多黏菌素 E₂ 12.92 μg/mL。混合标准工作液置于 4 °C 保存, 并于当日使用。

2.1.3 校准标准品溶液

将“2.1.2”项下混合标准工作液按相应比例加入空白人血浆, 配制 6 个非零浓度水平的校准标准品溶液。各校准标准品中, 亚胺培南质量浓度分别为 0.5、1、2、5、10、30 μg/mL; 美罗培南质量浓度分别为 0.5、1、2、5、20、60 μg/mL; 泊沙康唑质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、3、6 μg/mL; 多黏菌素 E₁ 质量浓度分别为 0.5、1、2、5、8、10 μg/mL。多黏菌素 E₂ 的质量浓度根据硫酸多黏菌素 E 对照品中 E₁ 与 E₂ 的含量比例折算, 分别为 0.65、1.29、2.58、6.46、10.3、12.9 μg/mL。

2.1.4 质控样品溶液

质控样品采用与校准标准品相同的基质和配制方法, 在空白人血浆中独立配制, 分别记为低质控(low quality control, LQC)、中质控(medium quality control, MQC)和高质控(high quality control, HQC)。其中, 亚胺培南的 LQC、MQC 和 HQC 质量浓度分别为 1.5、8.0、25.0 μg/mL; 美罗培南分别为 1.5、15.0、45.0 μg/mL; 泊沙康唑分别为 0.3、2.0、5.0 μg/mL; 多黏菌素 E₁ 分别为 1.5、5.0、8.0 μg/mL; 多黏菌素 E₂ 分别为 1.9、6.4、10.2 μg/mL。

2.1.5 混合内标工作液

分别精密称取亚胺培南、美罗培南、多黏菌素 E 和泊沙康唑相应稳定同位素标记内标对照品适量, 以甲醇溶解并定容, 分别配制成质量浓度为 1 000.0 μg/mL 的内标储备液。精密量取各内标储备液各 100 μL, 按 1:1:1:1 的体积比例混合后, 以乙腈-甲醇(80:20, V/V, 含 0.1% 甲酸)稀释, 制得质量浓度为 0.5 μg/mL 的混合内标工作液, 用于后续血浆样品前处理。

2.2 样本前处理

将离心管置于冰盒上, 精密吸取 100 μL 血浆或标准曲线样品、质控样品及待测样品于离心管中, 加入 10 μL 混合内标工作液, 涡旋混匀 30 s 后, 加入 -20 °C 预冷的含 0.1% 甲酸乙腈溶液 300 μL 进行蛋白沉淀, 再次涡旋混匀 1 min 并在

冰上静置 5 min, 随后 4 °C 离心 (12 000×*g*) 5 min。取上清液 200 μL 用于 LC-MS/MS 分析。

2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件

采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温为 40 °C; 流动相 A 为含 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸甲醇, 梯度洗脱 (表 1); 流速为 0.6~1.0 mL/min; 进样量为 2 μL; 自动进样器温度为 4 °C, 总运行时间为 5.0 min。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1. Mobile phase gradient elution programme

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~1	0.6	75.0	25.0
1~1.5	0.6	75.0→57.0	25.0→43.0
1.5~2.0	0.6	57.0→5.0	43.0→95.0
2.0~3.0	1.0	5.0	95.0
3.0~4.0	0.6	5.0	95.0
4.0~4.1	0.6	5.0→75.0	95.0→25.0
4.1~5.0	0.6	75.0	25.0

2.3.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 在正离子模式下进行检测, 扫描方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。分别对亚胺培南、美罗培南、多黏菌素 E₁、多黏菌素 E₂、泊沙康唑及其相应稳定同位素内标的母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量进行优化。各离子对的驻留时间均设为 50 ms, 具体 MRM 离子对及优化后的质谱参数见表 2。

表 2 质谱 MRM 离子对条件

Table 2. MS MRM ion pair parameters

检测项目	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
亚胺培南	300.3	98.1	30	40
亚胺培南-[d4]	304.3	98.1	30	50
美罗培南	384.1	141.0	30	45
美罗培南-[d6]	390.1	147.1	30	40
多黏菌素 E ₁	390.9	101.3	70	23
多黏菌素 E ₂	386.2	380.4	70	16
多黏菌素 E ₁ -[13C6, 15N]	393.4	101.0	70	23
泊沙康唑	701.4	614.4	146	50
泊沙康唑-[d4]	705.4	618.4	146	50

2.4 方法学验证

参照国家药品监督管理局适用的国际人用药品注册技术协调会《M10: 生物分析方法验证及样品分析》指导原则^[10], 对方法的选择性、线性关系、定量下限、精密度、准确度、提取回收率、基质效应和稳定性进行验证。

2.4.1 特征图谱与选择性

在“2.3”项下色谱与质谱条件下, 对亚胺培南、美罗培南、多黏菌素 E₁、多黏菌素 E₂、泊沙康唑进行分离与检测。各药物及对应同位素内标均呈现良好色谱峰, 保留时间分别为: 亚胺培南 0.80 min、美罗培南 1.35 min、多黏菌素 E₁ 2.16 min、多黏菌素 E₂ 2.13 min、泊沙康唑 2.58 min。各药物峰形对称、分辨率高, 无明显拖尾或肩峰。空白对照、内标峰在对应药物附近且无干扰, 保证了定量的准确性和重复性, 典型色谱图见图 1。

本研究通过考察 6 个不同来源的空白血浆基质评价方法选择性。结果显示, 空白基质中待测物保留时间处干扰峰面积占定量下限 (lower limit

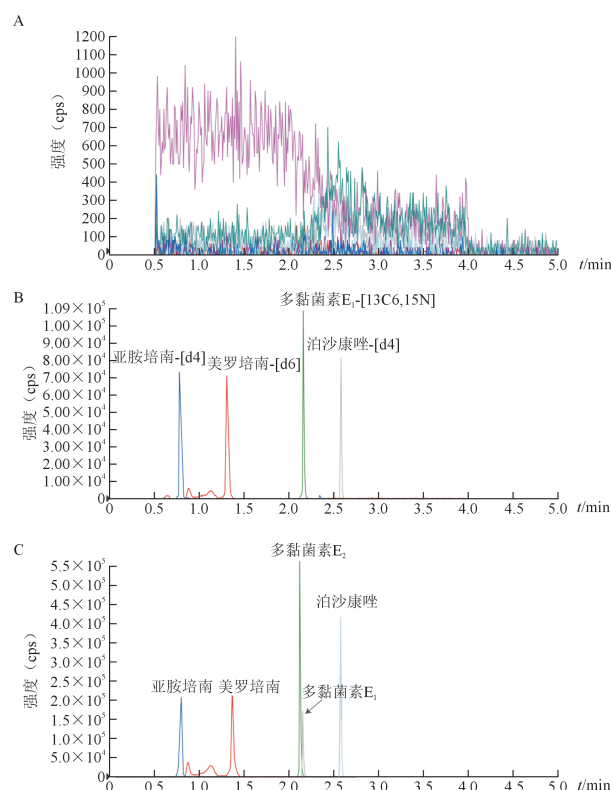


图 1 4 种抗感染药物的空白、内标、标准品典型色谱图

Figure 1. Typical chromatograms of the reference standards, internal standards, and reference solutions for 4 anti-infective antimicrobial drugs

注: A. 空白基质; B. 内标典型色谱峰; C. 标准品 S1 典型色谱峰。

of quantification, LLOQ) 样品峰面积的 2.39%~7.35%，均低于 20% 的规定限值；内标保留时间处于干扰峰面积占内标响应峰面积的比例均 $\leq 0.72\%$ ，低于 5% 的规定限值。上述结果表明，空白基质中内源性物质对亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑、多黏菌素 E₁ 和多黏菌素 E₂ 及其内标的测定干扰较小，方法选择性符合生物样本分析要求。

2.4.2 线性关系与定量下限

以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 (Y)，以待测物质量浓度为横坐标 (X, $\mu\text{g/mL}$)，采用加权最小二乘法进行线性回归，权重因子为 $1/x^2$ ，亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑、多黏菌素 E₁ 及多黏菌素 E₂ 分别在 0.5~30、0.5~60、0.1~6、0.5~10 和 0.65~12.9 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好，相关系数 r 为 0.992 0~0.999 0，结果见表 3。

亚胺培南、美罗培南、多黏菌素 E₁、多黏菌素 E₂ 及泊沙康唑在各自 LLOQ 水平均表现出良好

表 3 4 种抗感染药物的线性方程与相关系数

Table 3. Linear equations and correlation coefficients of the 4 antibacterial drugs

检测项目	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	r
亚胺培南	0.5~30.0	$Y=0.896X+0.053$	0.994 0
美罗培南	0.5~60.0	$Y=0.449X+0.007$	0.996 0
多黏菌素 E ₁	0.5~10.0	$Y=0.211X+0.034$	0.997 0
多黏菌素 E ₂	0.65~12.9	$Y=0.531X+0.056$	0.992 0
泊沙康唑	0.1~6.0	$Y=3.27X+0.021$	0.999 0

的重复性和准确性。各药物 6 次平行测定的平均值与理论值接近，准确度范围为 89%~113%，均满足国家药品监督管理局《M10：生物分析方法验证及样品分析》^[10] 对 LLOQ 准确度的要求。精密度方面，各药物变异系数 (coefficient of variation, CV) 介于 2%~9% 之间，其中亚胺培南 CV 为 9%，其余药物 CV 均 $\leq 5\%$ ，表明方法在 LLOQ 水平具有可接受的精密度和稳定性，见表 4。

表 4 4 种抗感染药物定量下限的准确度与精密度验证结果

Table 4. Validation results of accuracy and precision for the LLOQ of the 4 anti-infective drugs

检测项目	理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均检测值 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度范围 (%)	标准差 ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)
亚胺培南	0.500	0.500	89.4~112.4	0.046	9.2
美罗培南	0.500	0.500	94.4~104.8	0.019	3.9
多黏菌素 E ₁	0.500	0.500	94.4~103.8	0.017	3.5
多黏菌素 E ₂	0.650	0.658	94.8~106.5	0.031	4.6
泊沙康唑	0.100	0.099	96.0~102.0	0.002	2.3

2.4.3 精密度、准确度、回收率试验和基质效应

在低、中、高 3 个质量控制浓度水平下，对亚胺培南、美罗培南、多黏菌素 E₁、多黏菌素 E₂ 及泊沙康唑进行方法学精密度与准确度验证。批内精密度通过同一批次内连续测定 5 份样品进行评估，批间精密度通过连续 3 个分析批次、每个批次每一浓度水平测定 5 份样品进行评价。结果显示，各分析物在不同浓度水平下的批内和批间精密度良好，CV 均小于 15%。各质量控制样品的测定值与理论值偏差较小，准确度为 93.8%~103.5%，均在 85%~115% 的可接受范围内，见表 5。

将低、中、高 3 个质量浓度水平的质控血浆样品，平行制备 6 份，按“2.2”项下方法进行样品前处理并进样分析，测定质控血浆样品中各待测物的峰面积。另取 6 份不同来源的空白血浆，经前处理后取上清液，加入相应浓度的质控工作

溶液及内标溶液，按处理倍数配制提取后加标样品溶液并进样分析，测得提取后加标样品中待测物及内标的峰面积。同时，以纯水代替空白血浆，按相同方法配制样品纯溶液并测定其待测物及内标峰面积。

提取回收率按质控血浆样品待测物峰面积与提取后加标样品待测物峰面积之比计算；内标归一化基质效应按提取后加标样品中待测物与内标峰面积比与样品纯溶液中相应峰面积比之比计算。结果显示，亚胺培南提取回收率为 82.4%~88.7%，基质效应为 91.6%~97.2%；美罗培南提取回收率为 78.6%~86.5%，基质效应为 89.4%~96.1%；多黏菌素 E₁ 提取回收率为 76.8%~83.9%，基质效应为 87.2%~93.1%；多黏菌素 E₂ 提取回收率为 77.5%~84.6%，基质效应为 86.9%~92.7%；泊沙康唑提取回收率为 88.2%~93.6%，基质效应为 101.5%~105.4%。各待测物在不同浓度水平下

表5 4种抗菌药物质控三水平的准确度与精密度验证结果 ($n=5$)Table 5. Accuracy and precision results of the three levels of quality control for 4 types of anti-infective drugs($n=5$)

检验项目	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批内			批间		
		准确度 (%)	SD	CV (%)	准确度 (%)	SD	CV (%)
亚胺培南	1.5	96.8	0.07	4.8	95.9	0.11	7.3
	8.0	101.2	0.26	3.3	100.4	0.48	6.0
	25.0	103.5	0.78	3.1	102.1	1.45	5.8
美罗培南	1.5	94.6	0.09	6.0	93.8	0.14	9.3
	15.0	98.9	0.51	3.4	97.6	0.98	6.5
	45.0	102.4	1.32	2.9	101.1	2.70	6.0
多黏菌素 E ₁	1.5	97.3	0.08	5.3	96.2	0.12	8.0
	5.0	100.8	0.21	4.2	99.6	0.36	7.2
	8.0	103.1	0.29	3.6	101.9	0.62	7.8
多黏菌素 E ₂	1.9	95.4	0.10	5.3	94.7	0.16	8.4
	6.4	99.7	0.27	4.2	98.5	0.49	7.7
	10.2	102.6	0.33	3.2	101.4	0.82	8.0
泊沙康唑	0.3	96.1	0.02	6.7	95.0	0.03	10.0
	2.0	99.4	0.07	3.5	98.2	0.13	6.5
	5.0	103.2	0.15	3.0	101.8	0.32	6.4

提取回收率稳定, 基质效应处于可接受范围, 且精密度 CV 均小于 15%, 表明该方法基质干扰较小, 内标校正效果良好, 适用于生物样本中多种药物的同时定量分析, 见表6。

2.4.4 稳定性

稳定性评价涵盖了室温 (3 h)、4 °C (6 h)、-20 °C (7 d)、-80 °C (15 d)、反复冻融3次以及自动进样器 8 °C (24 h) 等条件。如表7所示, 各待测物在不同稳定性条件下的相对误差 (relative error, RE) 为 -15.21%~2.39%, RSD 均小于 6.0%。除亚胺培南低浓度样本在室温放置 3 h 后的 RE 为 -15.21%, 略超出 $\pm 15\%$ 的可接受范围外, 其余稳定性结果均符合生物分析方法学的评价要求。其中, 泊沙康唑表现出最佳稳定性, 在所有考察条件下 RE 均小于 $\pm 2.54\%$, RSD 均小于 2.5%; 亚胺培南稳定性相对较差, 其低浓度样品在室温放置 3 h、反复冻融3次以及自动进样器 8 °C 放置 24 h 后均出现一定程度降解, RE 分别为 -15.21%、-10.57% 和 -12.30%, 提示该药物样本在前处理及储存过程中应尽量避免长时间室温放置和反复冻融。美罗培南、多黏菌素 E₁、多黏菌素 E₂ 及泊沙康唑在所测试的各种处理和储存条件下均表现出良好稳定性。

2.5 临床样本检测

为初步评价本方法在真实临床样本中的适用性, 选取临床检测后的去标识化剩余血浆样本进

表6 4种抗感染药提取回收率和基质效应 ($n=6$)Table 6. Recovery and matrix effects of 4 anti-infective drugs ($n=6$)

检验项目	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	提取回收率		基质效应	
		平均值 (%)	CV (%)	平均值 (%)	CV (%)
亚胺培南	1.5	82.4	6.8	91.6	7.5
	8.0	85.9	5.2	94.8	6.1
	25.0	88.7	4.3	97.2	5.4
美罗培南	1.5	78.6	8.9	89.4	9.6
	15.0	83.2	6.1	93.7	6.8
	45.0	86.5	4.9	96.1	5.9
多黏菌素 E ₁	1.5	76.8	9.5	87.2	8.8
	5.0	80.4	7.2	90.6	7.1
	8.0	83.9	5.8	93.1	6.4
多黏菌素 E ₂	1.9	77.5	8.6	86.9	9.2
	6.4	81.3	6.7	90.8	7.4
	10.2	84.6	5.4	92.7	6.1
泊沙康唑	0.3	88.2	6.9	101.5	6.2
	2.0	91.4	4.8	103.2	4.9
	5.0	93.6	3.9	105.4	4.3

行检测, 结果见表8。共检测亚胺培南样本4份、美罗培南样本6份、泊沙康唑样本3份、多黏菌素 E 用药样本4份。结果显示, 亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑、多黏菌素 E₁ 及多黏菌素 E₂ 均可在临床血浆样本中检出, 检测浓度分别为 0.74~18.62、0.86~52.40、0.68~2.45、0.56~6.82 和 0.73~8.96 $\mu\text{g/mL}$, 均处于本方法相应线性范围

表 7 4 种抗感染药不同条件下的稳定性相对偏差结果 (% , n=6)

Table 7. Results of relative deviations in stability of 4 anti-infective drugs under different conditions (% , n=6)

检验项目	浓度 (μg/mL)	RE (RSD)					
		室温, 3 h	4 °C, 6 h	-20 °C, 7 d	-80 °C, 15 d	冻融 3 次	进样器, 8 °C, 24 h
亚胺培南	1.5	-15.21 (5.82)	-5.82 (4.36)	-8.36 (4.91)	-2.14 (3.28)	-10.57 (5.47)	-12.30 (5.36)
	25	-13.23 (4.75)	-4.17 (3.92)	-6.92 (4.28)	-1.79 (2.86)	-8.84 (4.63)	-8.60 (4.42)
美罗培南	1.5	-7.25 (4.18)	-3.05 (3.35)	-4.51 (3.76)	-1.26 (2.74)	-6.32 (4.05)	-6.70 (3.89)
	45	-4.73 (3.62)	-1.89 (2.91)	-3.27 (3.20)	-0.88 (2.31)	-4.15 (3.54)	-4.40 (3.21)
多黏菌素 E ₁	1.5	-6.80 (3.95)	-2.15 (2.84)	-3.42 (3.12)	-0.95 (2.26)	-5.72 (3.68)	-2.80 (3.16)
	8	-2.21 (2.86)	-0.93 (2.15)	-1.58 (2.43)	-0.42 (1.82)	-2.01 (2.74)	-1.30 (2.42)
多黏菌素 E ₂	1.9	-8.71 (4.36)	-3.28 (3.18)	-5.03 (3.69)	-1.37 (2.57)	-7.46 (4.22)	-4.10 (3.54)
	10.2	-5.10 (3.34)	-1.67 (2.52)	-2.89 (2.91)	-0.75 (2.13)	-4.38 (3.18)	-2.00 (2.76)
泊沙康唑	0.3	-1.93 (2.41)	0.85 (1.86)	-0.76 (2.04)	0.32 (1.53)	-2.54 (2.38)	-0.70 (2.05)
	5	2.39 (2.18)	1.22 (1.63)	0.41 (1.89)	0.59 (1.37)	1.97 (2.05)	0.80 (1.83)

表 8 临床血浆样本检测结果 (μg/mL)

Table 8. Detection results of clinical plasma samples (μg/mL)

检测项目	样本数 (n)	实测浓度点	实测浓度范围	方法线性范围
亚胺培南	4	0.74、2.36、7.85、18.62	0.74~18.62	0.5~30
美罗培南	6	0.86、1.86、6.74、18.35、42.60、52.40	0.86~52.40	0.5~60
泊沙康唑	3	0.68、1.12、2.45	0.68~2.45	0.1~6
多黏菌素 E ₁	4	0.56、1.38、3.74、6.82	0.56~6.82	0.5~10
多黏菌素 E ₂	4	0.73、1.85、4.62、8.96	0.73~8.96	0.65~12.9

内。提示本研究建立的方法可用于真实临床血浆样本中上述抗感染药物浓度的定量检测。

3 讨论

重症感染患者常需多药联合治疗，包含碳青霉烯类、多黏菌素类、三唑类等抗感染药物，其药代动力学个体差异大，且治疗窗相对狭窄，对血药浓度监测提出了更高要求^[11]。传统单药检测模式需分别完成样本前处理和仪器分析，检测周期长，且试剂与人力成本较高，难以及时满足重症患者用药调整的需求^[7]。因此，建立一种可同时测定多种抗感染药物的联合定量方法，有助于在保证检测质量的同时显著提高效率，降低检测成本，为临床快速决策提供更全面、同步的药物浓度信息。

亚胺培南和美罗培南属于对环境条件高度敏感的碳青霉烯类药物，其在血浆中易受温度和处理时间影响发生非酶促水解^[12]。本研究在样本前处理全过程中采取低温优先策略，包括样本全程冰上操作、蛋白沉淀剂及内标工作液经-20 °C 预冷后使用，使样品在接触有机溶剂的瞬间即处于低温环境。同时，蛋白沉淀后仅进行短时间涡

旋、静置和低温离心，迅速完成前处理并进样分析，最大程度缩短了碳青霉烯类药物暴露于不利环境中的时间。稳定性结果表明，该贯穿式低温与快速处理策略能够有效抑制碳青霉烯类药物在前处理阶段的进一步降解。

多黏菌素 E 为多组分混合物，其中 E₁ 与 E₂ 为主要活性成分，二者在结构特征、色谱行为及离子化效率方面高度相似^[13]。本研究选用稳定同位素标记的多黏菌素 E₁ 作为内标，对 E₁ 和 E₂ 同时进行定量校正，在保证定量准确性的同时降低了检测成本。多黏菌素 E₂ 校准曲线的 *r* 为 0.992 0，略低于其他待测物，可能与其未使用对应的稳定同位素内标有关；但其 LLOQ、准确度、精密度的提取回收率、基质效应和稳定性等验证结果均符合国际人用药品注册技术协调会 M10 指导原则要求，表明该共同内标校正策略在本研究条件下具有可接受的定量性能。相关系数仅反映校准曲线的线性相关程度，方法适用性仍需结合上述方法学指标及真实样本检测结果综合判断。

色谱条件方面，将初始有机相比比例设定为 25%，有效改善了亚胺培南和美罗培南的出峰速度和峰型；同时，针对多黏菌素 E 在约 2.0 min 出

峰且易产生拖尾的问题,在1.5~2.0 min时间段内将流速由0.6 mL/min提升至1.0 mL/min,加速其洗脱并减少系统残留。该内标策略与梯度、流速程序的协同优化,共同提升了方法的稳定性和重复性。针对亲水性碳青霉烯类、高分子量多肽类及脂溶性三唑类药物共存的复杂体系,本研究采用以乙腈为主的蛋白沉淀方案,在保证蛋白去除效率的同时控制基质效应。前处理体系中加入0.1%甲酸以改善多黏菌素E的溶解性和质谱响应,但其在有机溶剂体系中仅形成弱酸环境,结合低温和快速处理策略,有效避免了碳青霉烯类因pH变化而发生明显水解^[14]。整体方法在准确性、稳定性和经济性之间实现了良好平衡。少量临床剩余血浆样本的检测结果初步显示,该方法具备真实临床血浆样本检测的可行性,可为后续开展大样本TDM及个体化给药应用研究提供方法学基础。

本研究建立了4种抗感染药物同时测定的LC-MS/MS方法,并完成了系统的方法学验证。进一步采用少量去标识化临床剩余血浆样本进行初步检测,结果显示各待测物均可在真实临床样本中检出,且检测浓度处于相应线性范围内,提示该方法具备临床样本检测的可行性。但本研究纳入的临床样本数量有限,尚不足以全面评价该方法在不同疾病类型、不同肾功能状态及复杂联合用药背景下的实际适用性和临床获益。此外,三唑类抗真菌药物血药浓度受遗传因素、炎症状态及合并用药等多种因素影响,个体间差异明显。已有研究显示,Janus激酶2 (JAK2) rs10119004基因多态性及C反应蛋白水平可影响侵袭性真菌病患者伏立康唑血药浓度,进一步提示对此类药物开展TDM具有重要意义^[15]。同时,TDM服务的有效实施不仅依赖可靠的检测方法,也需要规范化流程和多学科协作支持^[16]。后续仍需结合更大样本量的TDM数据,进一步评估该方法在临床流程中的稳定性、检测时效性及对个体化给药决策的支持价值。

综上,本文建立并验证了一种可同时测定人血浆中亚胺培南、美罗培南、泊沙康唑和多黏菌素E的LC-MS/MS方法。该方法通过低温与快速前处理策略、合理的内标选择及色谱条件优化,在保证分析准确性和稳定性的同时,提高了检测效率并降低了检测成本。少量临床血浆样本的检

测结果初步显示,该方法具备真实临床血浆样本检测的可行性,可为后续开展大样本TDM及个体化给药应用研究提供方法学基础。

参考文献

- 1 Tamma PD, Heil EL, Justo JA, et al. Infectious Diseases Society of America 2024 guidance on the treatment of antimicrobial-resistant gram-negative infections[J/OL]. Clin Infect Dis, ciae403 (2024-08-07)[2026-07-01]. DOI: 10.1093/cid/ciae403.
- 2 中国医师协会感染科医师分会,中华预防医学会医院感染控制分会,中国医院协会临床微生物实验室专业委员会,等.高毒力碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌感染诊治与防控专家共识[J].中华临床感染病杂志, 2025, 18(5):321-338. [Infectious Disease Physician Branch of the Chinese Medical Doctor Association, Hospital Infection Control Branch of the Chinese Society of Preventive Medicine, Clinical Microbiology Laboratory Professional Committee of the Chinese Hospital Association, et al. Expert consensus on the diagnosis, treatment, prevention and control of highly virulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections [J]. Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases, 2025, 18(5): 321-338.] DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20257418.
- 3 中华医学会呼吸病学分会.侵袭性肺真菌病诊断与治疗指南(2025年版)[J].中华结核和呼吸杂志, 2025,48(12):1104-1126. [Respiratory Disease Branch of the Chinese Medical Association. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of invasive pulmonary fungal diseases (2025 Edition)[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Medicine, 2025,48(12): 1104-1126.] DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20250819-00501.
- 4 You X, Dai Q, Hu J, et al. Therapeutic drug monitoring of imipenem/cilastatin and meropenem in critically ill adult patients[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2024, 36: 252-259. DOI: 10.1016/j.jgar.2024.01.004.
- 5 Zhang Y, Wang C, Chen J, et al. Efficacy, safety, and therapeutic drug monitoring of polymyxin B sulfate and colistin sulfate in critically ill patients: a real-world retrospective study[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1466888. DOI: 10.3389/fphar.2024.1466888.
- 6 Wang S, Li C, Dong Y, et al. Approaches for posaconazole therapeutic drug monitoring and their clinical benefits[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2024, 80(12): 1845-1855. DOI: 10.1007/s00228-024-03756-9.
- 7 高瑶瑶.基于LC-MS/MS的ECMO支持下重症感染患者亚胺培南/西司他丁血药浓度动态监测及剂量优化研究[J].实验室检测, 2025, 3(19): 22-24. [Gao YY. Research on dynamic monitoring and dose optimization of imipenem/cilastatin plasma concentration in patients with severe infection under ECMO support based on LC-MS/MS [J]. Laboratory Testing, 2025, 3(19): 22-24.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/CihQZXJpb2RpY2FsQ0hJU29scjkyMDI2MDYxMDIwMjYwNjEwMTYxMjM4Eg5zeXNqeTlwMjUxOTAwNxoIYThlN3JkZ2c%3D>.
- 8 郑萍,赵博欣.美罗培南治疗药物监测中国专家共识[J].中国药房, 2025, 36(16): 1958-1967. [Zheng P, Zhao BX. Chinese expert consensus on meropenem therapeutic drug monitoring[J].

- Chinese Pharmacy, 2025, 36(16): 1958–1967.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.02](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.02).
- 9 陈焰, 黄晓岚, 李熠, 等. 液相色谱串联质谱法测定人血浆中多黏菌素 E 浓度及其在治疗药物监测中的应用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2025, 25(2): 155–161. [Chen Y, Huang XL, Li Y, et al. Determination of polymyxin E concentration in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in therapeutic drug monitoring[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2025, 25(2):155–161.] DOI: [10.16718/j.1009-7708.2025.02.006](https://doi.org/10.16718/j.1009-7708.2025.02.006).
- 10 国家药品监督管理局. 关于适用《Q3D(R2):元素杂质》《M10:生物分析方法验证及样品分析》国际人用药品注册技术协调会指导原则的公告(2023 年第 16 号)[EB/OL]. (2023–01–29)[2026–07–01]. <https://www.cfdie.org/zryyxxw/yaop/cfdatz/webinfo/2023/02/1668881822771348.htm>.
- 11 Abdul-Aziz MH, Alfenaar JC, Bassetti M, et al. Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a position paper[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(6): 1127–1153. DOI: [10.1007/s00134-020-06050-1](https://doi.org/10.1007/s00134-020-06050-1).
- 12 Zou L, Meng F, Hu L, et al. A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of imipenem and meropenem in human plasma and its application in TDM[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 169: 142–150. DOI: [10.1016/j.jpba.2019.01.039](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.039).
- 13 Zhao T, Liu L, Yang G, et al. Development of an LC–MS/MS method for quantification of colistin and colistin methanesulfonate in human plasma and its application to stability studies and therapeutic drug monitoring[J]. J Mass Spectrom Adv Clin Lab, 2025, 37: 39–48. DOI: [10.1016/j.jmsacl.2025.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2025.05.001).
- 14 de Souza Barbosa F, Capra Pezzi L, Tsao M, et al. Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: an analytical study focused on solutions for infusion[J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(4): e4471. DOI: [10.1002/bmc.4471](https://doi.org/10.1002/bmc.4471).
- 15 陈敬, 曾樱, 鲁虹, 等. JAK2 rs10119004 基因多态性与 C 反应蛋白对侵袭性真菌病患者伏立康唑血药浓度的影响[J]. 药学前沿, 2025, 29(11): 1914–1920. [Chen J, Zeng Y, Lu H, et al. Effects of JAK2 rs10119004 gene polymorphism and C-reactive protein on voriconazole plasma concentration in patients with invasive fungal disease[J]. Frontiers in Pharmaceutical Sciences, 2025, 29(11): 1914–1920.] DOI: [10.12173/j.issn.2097-4922.202503027](https://doi.org/10.12173/j.issn.2097-4922.202503027).
- 16 李芸, 杭永付, 顾继红. 课题达成型品管圈在治疗药物监测多学科团队合作模式构建中的实践和成效[J]. 药学前沿, 2025, 29(1): 131–137. [Li Y, Hang YF, Gu JH. Practice and effectiveness of a project-achieving quality control circle in constructing a multidisciplinary team cooperation model for therapeutic drug monitoring[J]. Frontiers in Pharmaceutical Sciences, 2025, 29(1): 131–137.] DOI: [10.12173/j.issn.2097-4922.202406113](https://doi.org/10.12173/j.issn.2097-4922.202406113).

收稿日期: 2026 年 05 月 13 日 修回日期: 2026 年 07 月 08 日

本文编辑: 周璐敏 洗静怡