

LC-MS/MS 法测定多黏菌素 E 甲磺酸钠 治疗患者血浆中活性成分多黏菌素 E 的浓度

Determination of the concentration of the active component polymyxin E in the plasma of patients treated with colistimethate sodium using LC-MS/MS

张淑婷^{1,2}, 王莉英¹, 陈 荣¹,
邓 阳³, 胡 楠^{1,3}, 杨旭萍¹

(1. 苏州大学附属第三医院/常州市第一人民医院 药理学部, 江苏 常州 213003; 2. 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215000; 3. 长沙市第三医院 抗耐药微生物湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410015)

ZHANG Shu-ting^{1,2},
WANG Li-ying¹, CHEN Rong¹,
DENG Yang³, HU Nan^{1,3},
YANG Xu-ping¹

(1. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Soochow University/Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213003, Jiangsu province, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu province, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Anti-Resistance Microbial Drugs, The Third Hospital of Changsha, Changsha 410015, Hunan Province, China)

基金项目: 江苏省药学会恒瑞医院药学科科研基金资助项目(H202301); 抗耐药微生物药物湖南省重点实验室基金资助项目(2023TP1013); 常州市科技基础设施建设项目-常州市临床药学重点实验室基金资助项目(CM20223005)

作者简介: 张淑婷(1999-), 女, 主要从事临床药学相关研究

通信作者: 杨旭萍, 主管药师

MP: 13584592904

E-mail: 1006363193@qq.com

摘要:目的 建立液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定多黏菌素 E 甲磺酸钠治疗患者血浆中活性成分多黏菌素 E 的血药浓度。方法 以多黏菌素 B1 为内标, 用固相萃取法处理样品。色谱柱为 Kinetex C₁₈(3 mm × 100 mm, 2.6 μm), 流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹。选用电喷雾离子源(ESI), 正离子多反应监测扫描检测(MRM), 用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 585.6 → 241.1 (多黏菌素 E1), *m/z* 578.6 → 227.2 (多黏菌素 E2), *m/z* 602.6 → 101.2 (多黏菌素 B1), 对方法的选择性、标准曲线、残留、精密度与准确度、回收率、基质效应和稳定性进行了考察。并测定使用多黏菌素 E 甲磺酸钠的患者血浆中多黏菌素 E1、E2 的血药浓度。结果 多黏菌素 E1、E2 分别在 0.02 ~ 3.86 μg · mL⁻¹ 和 0.03 ~ 5.65 μg · mL⁻¹ 与测定值线性关系良好, 多黏菌素 E1、E2 的定量下限分别为 0.02 μg · mL⁻¹ 和 0.03 μg · mL⁻¹ 标准曲线方程分别为 $Y = 4.55 \times 10^{-1} X - 2.92 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9942$)、 $Y = 8.61 \times 10^{-1} X - 1.38 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9964$)。多黏菌素 E1、E2 日内与日间精密性、准确度、提取回收率、基质效应、稳定性均符合方法学要求, 应用本方法测定接受多黏菌素 E 甲磺酸钠治疗的 26 例患者, 多黏菌素 E 的 AUC_{24h} 范围是 28.42 ~ 317.51 mg · h⁻¹ · L⁻¹。结论 本方法准确、灵敏、快速, 稳定性良好, 可用于检测人血浆中多黏菌素 E1、E2 的血药浓度。

关键词: 多黏菌素 E 甲磺酸钠; 多黏菌素 E1; 多黏菌素 E2; 液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 血药浓度

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.03.012

中图分类号: R9 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)03-0373-08

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determining the plasma concentration of the active component polymyxin E in patients treated with colistimethate sodium. **Methods** Polymyxin B1 was used as an internal standard, and solid phase extraction (SPE) was employed to process the samples. The chromatographic column was a Kinetex C₁₈ (3 mm × 100 mm, 2.6 μm). Mobile phase A was an aqueous solution containing 0.1% formic acid and 5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate, and mobile phase B was a methanol solution containing 0.1% formic acid. Gradient elution was performed at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. An electrospray ionization (ESI) source was used with positive ion multiple reaction monitoring (MRM) for detection. The ion pairs for quantitative

analysis were as follows: m/z 585.6 $\rightarrow$ 241.1 (polymyxin E1), m/z 578.6 $\rightarrow$ 227.2 (polymyxin E2), and m/z 602.6 $\rightarrow$ 101.2 (polymyxin B1). The selectivity, standard curve, residues, precision and accuracy, extraction recovery rate, matrix effect and stability of the method were investigated, and the plasma concentrations of polymyxin E1 and E2 in patients treated with colistimethate sodium were measured. **Results** The linear relationships of polymyxin E1 and E2 concentrations were good within the ranges of 0.02 – 3.86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 0.03 – 5.65 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The lower limits of quantification (LLOQ) for polymyxin E1 and E2 were 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The standard curve equations for polymyxin E1 and E2 are $Y = 4.55 \times 10^{-1}X - 2.92 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9942$)、 $Y = 8.61 \times 10^{-1}X - 1.38 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9964$), respectively. The within-day and day-to-day precision, accuracy, extraction recovery, matrix effects, and stability of polymyxin E1 and E2 all met the methodological requirements. Using this method, the AUC of polymyxin E in 26 patients receiving colistimethate sodium ranged from 28.42 to 317.51 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion** This method is accurate, sensitive, rapid, and stable, and can be used for the determination of the plasma concentrations of polymyxin E1 and E2 in human plasma.

Key words: colistimethate sodium; polymyxin E1; polymyxin E2; liquid chromatography – tandem mass spectrometry; solid phase extraction; plasma concentration

多黏菌素是20世纪50年代从多黏杆菌培养基中提取的多肽类抗生素,但由于其肾毒性限制了其临床应用。近年来耐药菌广泛蔓延,耐碳青霉烯革兰氏阴性菌(carbapenem-resistant gram-negative bacilli, CR-GNB)的发病率不断上升,而多黏菌素相关制剂对多重耐药及泛耐药的革兰氏阴性杆菌表现出显著的抗菌活性。由于缺乏抗CR-GNB的新药,2018年多黏菌素E重返临床一线^[1-2],而多黏菌素E甲磺酸钠(colistimethate sodium, CMS)于2021年在我国重新上市。

目前,国内外已上市的多黏菌素E包括硫酸黏菌素(colistin sulfate, CS)及CMS^[3]。CMS为前药,本身无活性,需在体内转化为有活性的多黏菌素E(polymyxin E, PME),其主要成分为多黏菌素E1(又称colistin A)和多黏菌素E2(又称colistin B)^[4],临床上主要用来治疗由多重耐药革兰氏阴性菌引起的脓毒症和严重感染,CMS 60%~70%经肾排出,在尿液中转化为多黏菌素E更适用于治疗尿路感染^[5]。CMS是浓度依赖性抗生素^[6],治疗窗窄,推荐平均稳态血药浓度($C_{ss,avg}$)靶值为2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[7],而高于此浓度,急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的发生率显著升高^[8]。因此,有必要开展治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)。

本研究用固相萃取(solid-phase extraction, SPE)的预处理方法,能够有效分离分析物与干扰组分,特别是对于在体外防止CMS转化为多黏菌素E有着极大的作用。利用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)测定人血浆中活性成分多黏菌素E中多黏菌素E1、E2的血药浓度,可用于使用CMS治疗的革兰氏阴性菌感染的重症患者的TDM,为临床用药提供参考。

材料与方法

1 药品、试剂与仪器

血液样本 多黏菌素E甲磺酸钠血液样本来自苏州大学附属第三医院(常州市第一人民医院)重症医学科接受CMS静脉滴注的26例重症患者,所有患者均采取静脉滴注联合雾化吸入的治疗方法。本研究经苏州大学附属第三医院(常州市第一人民医院)医学伦理委员会批准[伦理批号:(2025)科第003号]。

药品 注射用多黏菌素E甲磺酸钠(商品名:天韵),规格:150 mg(按多黏菌素E计),批号:240713115,批准文号:国药准字H20213773,江苏省正大天晴药业集团股份有限公司生产;多黏菌素E,纯度:93%(多黏菌素E1含量为39.32%、多黏菌素E2含量为57.56%),批号:5-MFI-165-1,加拿大TRC公司生产;多黏菌素B,纯度:98.14%(硫酸盐含量为16.8%,多黏菌素B1含量为77%,多黏菌素B2含量为22%),批号:19-JPO-184-1,加拿大TRC公司生产。

试剂 乙腈,LC级,批号:JB091230,美国Merck公司生产;甲酸,纯度:95%,批号:SHBL0331,德国Sigma-Aldrich公司生产;乙酸铵,纯度:98%,批号:BCCB9398,德国Sigma-Aldrich公司生产;纯水由Milli-Q纯水仪制得。

仪器 Triple Quad 4500MD三重四极杆串联质谱仪,美国SCIEX公司产品;Jasper高效液相色谱系统,美国SCIEX公司产品;5417R低温高速离心机,德国Eppendorf公司产品;Vortex-Genie2涡旋震荡仪,

美国Scientific Industries 公司产品;BT25S 电子分析天平,德国 Sartorius 公司产品;Milli-Q 纯水仪,美国 Millipore 公司产品;Welchrom[®] SPE 小柱 BRP(30 mg/1 mL),上海月旭科技股份有限公司产品;CNW24 位固相萃取真空装置,上海安谱实验科技股份有限公司产品;GM-0.33A 防腐型隔膜真空泵(含截留瓶),天津津腾实验设备有限公司产品。

2 测定方法

色谱条件 Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ 色谱柱(3 mm×100 mm,2.6 μm);流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的水溶液,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的甲醇溶液;梯度洗脱:0~1 min,20% B;1~2 min,20%→95% B;2~3.8 min,95% B;3.8~4.2 min,95%→20% B;4.2~5 min,20% B;流速 0.5 mL·min⁻¹;进样器温度 15℃;柱温 40℃;进样体积 5 μL;分析时间 5 min。

质谱条件 电喷雾离子化电离源(electro spray ionization,ESI),扫描方式为多重反应监测(multiple response monitoring,MRM),正离子模式;离子源温度 500℃;离子喷射电压:5 500 V;雾化气(GS1):345 kPa;辅助气(GS2):345 kPa;气帘气(curtain gas):207 kPa;碰撞气:55 kPa;多黏菌素 E1、多黏菌素 E2、内标多黏菌素 B1 离子对分别为 $m/z \rightarrow 585.6/241.1$, $m/z \rightarrow 578.6/227.2$, $m/z \rightarrow 602.6/101.2$,解簇电压(decustering potential, DP)分别为 90、90 和 100 V;碰撞能量(collision energy, CE)分别为 33、33 和 62 V。

3 溶液配制与血浆样本处理

对照品溶液配制 精密称取多黏菌素 E 对照品,用甲醇定容并稀释得 1 mg·mL⁻¹ 的工作液;精密称取适量多黏菌素 E 甲磺酸钠对照品,用甲醇定容并稀释得 1 mg·mL⁻¹ 的工作液;精密称取多黏菌素 B 对照品适量,用甲醇定容并稀释得多黏菌素 B 为 20.00 μg·mL⁻¹(多黏菌素 B1 为 12.60 μg·mL⁻¹)的内标工作液。所有工作液置于 -20℃ 冻存。

标准曲线和质控(quality control, QC)样品的制备 用甲醇稀释含多黏菌素 E 的工作液,制得混合标准品溶液(多黏菌素 E1 质量浓度为 0.19、0.39、0.77、1.93、3.86、7.72、19.31、38.62 μg·mL⁻¹,多黏菌素 E2 质量浓度为 0.28、0.57、1.13、2.83、5.65、11.31、28.27、56.54 μg·mL⁻¹)。考虑实际样品中含有 CMS,为了监测其在预处理过程中 CMS 是否有转化,将质控样品设置成含多黏菌素 E 和 CMS 的混合质控,即将多黏菌素 E 与 CMS 的工作液混合并用甲醇稀释成低、高浓度质控溶液(多黏菌素 E/多黏菌素 E 甲磺酸钠的质量浓度水平分别为 8/5、20/100 μg·mL⁻¹)。

取空白血浆 180 μL,加入上述不同浓度的含多黏菌素 E1 和 E2 的标准品溶液和质控溶液 20 μL,得到系列标准血浆样品(多黏菌素 E1 质量浓度为 0.02、0.04、0.08、0.19、0.39、0.77、1.93、3.86 μg·mL⁻¹,多黏菌素 E2 质量浓度为 0.03、0.06、0.11、0.28、0.57、1.13、2.83、5.65 μg·mL⁻¹),及低、高浓度的质控血浆样品(低浓度质控血浆样品中多黏菌素 E1 为 0.31 μg·mL⁻¹,多黏菌素 E2 为 0.45 μg·mL⁻¹;高浓度质控血浆样品中多黏菌素 E1 为 0.77 μg·mL⁻¹,多黏菌素 E2 为 1.13 μg·mL⁻¹)。

血浆样本前处理 预先用甲醇 1 mL、纯水 1 mL 将 SPE 小柱平衡,主要目的是对 SPE 小柱进行活化,以备后续使用。取使用了 CMS 的患者血浆样本 200 μL,加入内标 20 μL 混匀后,再加入的 5% 氨水溶液 200 μL,涡旋混匀,上述过程要注意的是均需在冰上进行操作,主要目的是防止 CMS 转化为多黏菌素 E。上样液混匀后,加至预先使用甲醇、纯水活化的 SPE 小柱中,并依次使用纯水 1 mL、甲醇 1 mL、乙腈/水(30/70, v/v, 含 2% 氨水)1 mL 和 0.5% 甲酸溶液 1 mL 洗净小柱,洗净的主要目的是去除血浆中的各种杂质。最后使用乙腈/水(30/70, v/v, 含 6% 甲酸)溶液 600 μL 洗脱,收集至 1.5 mL 的 EP 管中,洗脱的主要目的是洗脱出有活性的多黏菌素 E,最后取 5 μL 进样 LC-MS/MS。

4 方法学考察

参考美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)与国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)《生物样品定量分析方法验证指导原则》^[9]。

专属性 取 6 份不同个体的空白血浆,分别加入“标准曲线和质控样品的制备”项下的质控工作液,配制成 2 个质量浓度水平的质控样品。将上述样品按“血浆样本前处理”项下方法处理后进样分析。

标准曲线和定量下限 以人空白血浆为基质,采用“标准曲线和质控样品的制备”项下的方法制备一系列标准血浆样品,按照“血浆样本前处理”项下的步骤处理后进样,建立线性回归的标准曲线。待测物与内标物的峰面积比 Y 作为纵坐标,待测物浓度 X(μg·mL⁻¹)作为横坐标,利用加权($W = 1/X^2$)最小二乘法来进行线性回归运算。

准确度和精密度试验 以人空白血浆为基质,分别加入“标准曲线和质控样品的制备”项下制备的低、高浓度的质控样品,每个浓度平行做 5 份,列为一个分析批,按“血浆样本前处理”项下进行处理后进样分

析,根据当日随行标准曲线,计算批内准确度和仪器精密度。于不同天制备并测定3个分析批,计算批间准确度和仪器精密度。

提取回收率和基质效应 取“标准曲线和质控样品的制备”项下制备的低、高2个水平的质控样品各6份,按“血浆样本前处理”项下方法处理后进样分析,得到峰面积 A_1 ;另取不同个体的空白血浆,按“血浆样本前处理”项下方法进行固相萃取,在最后一步洗脱结束后得到的溶液中加入质控样品(使其浓度与低、高质控血浆样本浓度相同),配制成各水平样品各6份,取涡旋混匀后的溶液进样分析得到峰面积 A_2 。以峰面积比 A_1/A_2 计算提取回收率,提取回收率($\%$) $=A_1/A_2 \times 100\%$ 。以纯水代替空白血浆作为基质配制成低、高水平的质控样品各6份,按“血浆样本前处理”项下方法处理后进样分析,得到峰面积 A_3 。根据 A_2 与 A_3 的比值计算基质效应,基质效应($\%$) $=A_2/A_3 \times 100\%$ 。

稳定性试验 取“标准曲线和质控样品的制备”项下制备的低、高浓度的质控血浆样品6份,考察样品在常温6 h、4℃放置24 h、-20℃冻融3个循环、-80℃冷冻保存30 d及处理后在自动进样器放置24 h的稳定性。

5 临床应用

本研究对象是接受CMS静脉滴注的26例重症患者,所有患者均采用静脉滴注联合雾化吸入的治疗方法,每例患者采取给药前0.5 h内、给药后1 h、给药后6 h的血药浓度。CMS不稳定,在室温条件下可以转化为多黏菌素E,易导致测定多黏菌素E的浓度偏高^[10],因此在采集全血后需立即放置冰水浴中并尽快在低温(2~8℃)条件下离心分离血浆,于-80℃冰箱冷冻保存。本研究方案经苏州大学附属第三医院(常州市第一人民医院)医学伦理委员会审核,(伦理批件号为(2025)科第003号)。

血浆中多黏菌素E的血药浓度计算参考公式如下:

$$C_{(E)} = \left[\frac{C_{(E1)}}{Mol_{(E1)}} + \frac{C_{(E2)}}{Mol_{(E2)}} \right] * Mol_{avg(E)}^{\#} \quad (1)$$

其中, $Mol_{(E1)}$: 1169.48 g · mol⁻¹; $Mol_{(E2)}$: 1155.46 g · mol⁻¹;

$$Mol_{avg(E)} = \frac{E1\% * MV_{E1} + E2\% * MV_{E2}}{E1\% + E2\%} + 2.5MV_{H2SO4}^{\#} \quad (2)$$

其中, MV_{E1} : 1169.5; MV_{E2} : 1155.5; MV_{H2SO4} : 98; $E1\%$: 39.32%; $E2\%$: 57.56%。

结 果

1 方法学评价

专属性 结果表明多黏菌素E1和E2在相应色谱峰保留时间内均无内源性组分的干扰,说明该方法专属性良好。多黏菌素E1、多黏菌素E2、内标(多黏菌素B1)的保留时间分别为3.19、3.15、3.21 min,见图1。

标准曲线和定量下限 结果显示多黏菌素E1的标准曲线为 $Y = 4.55 \times 10^{-1}X - 2.92 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9942$);多黏菌素E2的标准曲线为 $Y = 8.61 \times 10^{-1}X - 1.38 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9964$),多黏菌素E1和E2的LLOQ分别为0.02 μg · mL⁻¹、0.03 μg · mL⁻¹。表明血浆中多黏菌素E1和E2分别在0.02~3.86 μg · mL⁻¹、0.03~5.65 μg · mL⁻¹范围内线性关系良好。

准确度和精密度试验 含多黏菌素E1和E2的质控样品(低、高浓度)的精密度与准确度结果显示均符合生物样品测定要求,结果,见表1。

提取回收率和基质效应 经内标归一化后得基质效应,含多黏菌素E1和E2的质控样品(低、高浓度)的提取回收率和基质效应,见表2。测定结果均值相对误差均在±15%范围内,结果表明样品前处理方法适用于待测物的提取分析。

稳定性 显示多黏菌素E1、E2在上述条件下保持稳定,血浆样品在室温条件下放置6 h后稳定性良好;血浆样品在4℃条件下室温放置24 h、-20℃经3次冻融循环、-80℃长期储存30 d,以及待测样品在4℃自动进样器中放置24 h的条件下均显示良好稳定性,各浓度测定结果的相对标准偏均在±15%范围内,见表3。

2 方法学应用

应用本方法对26名使用CMS的患者进行药物浓度监测, AUC_{24h} 的中位值为98.08 mg · h⁻¹ · L⁻¹ (28.42~317.51 mg · h⁻¹ · L⁻¹),住院天数为(36.31 ± 22.51) d,用药疗程为(12.35 ± 4.98) d。测得活性成分多黏菌素E在给药前0.5 h内、给药后1 h、给药后6 h的血药浓度折线图,见图2。

AUC_{24h} 数据不满足正态分布和方差齐性,故采用了Kruskal-Wallis H检验进行非参数统计分析。结果显示,不同肌酐清除率组的 AUC_{24h} 在统计学上差异有统计学意义($H = 21.93, P < 0.001$)。进一步分析显示,<80 mL · min⁻¹患者组的 AUC_{24h} 显著低于80~120 mL · min⁻¹患者组的 AUC_{24h} ($P < 0.01$);

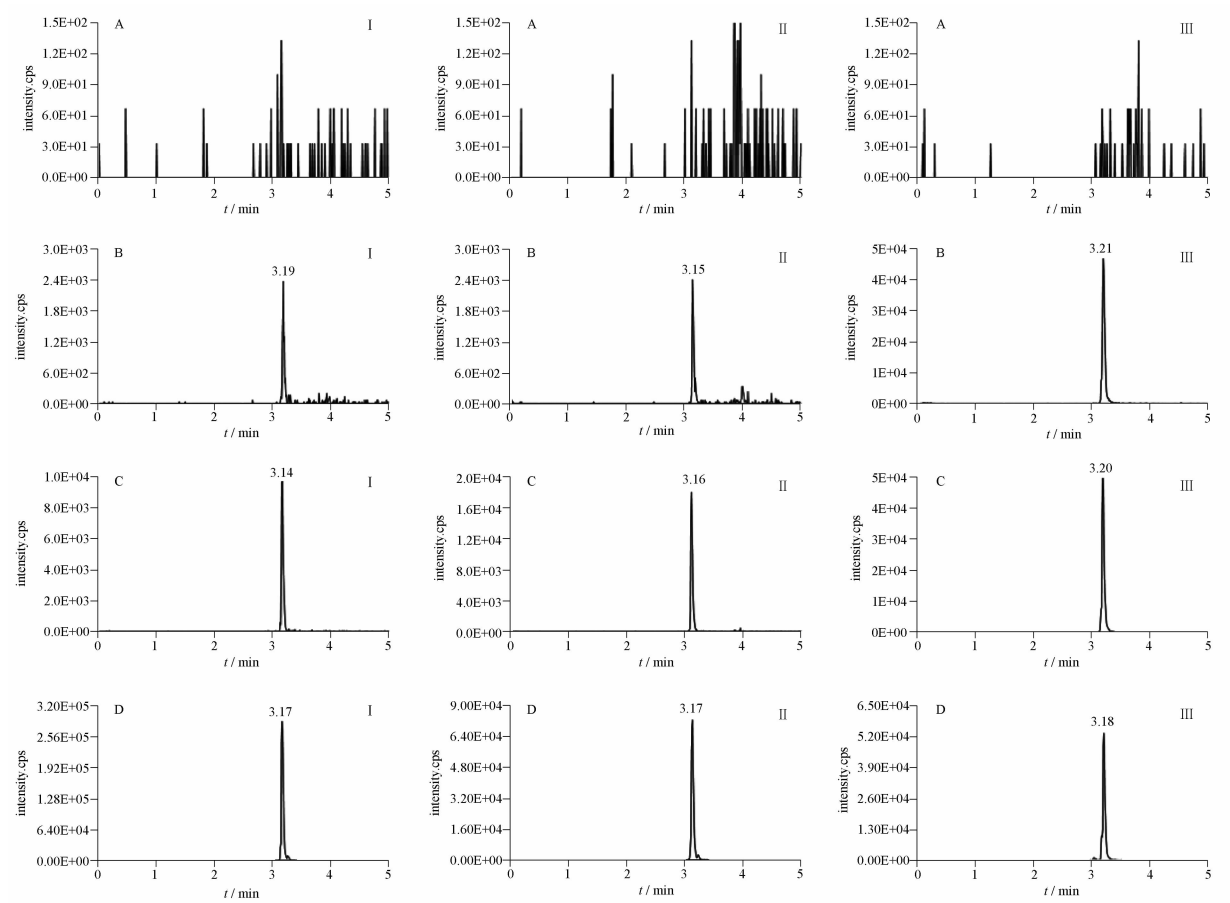


图 1 多黏菌素 E 甲磺酸钠患者血浆样品中多黏菌素 E1 (I)、多黏菌素 E2 (II)、内标多黏菌素 B1 (III) 的液相色谱 – 串联质谱法 (LC – MS/MS) 典型色谱图

Figure 1 The typical chromatogram of the liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) for polymyxin E1 (I) , polymyxin E2 (II) , and internal standard polymyxin B1 (III) in the plasma samples of patients treated with colistimethate sodium
A: Blank plasma sample; B: Blank plasma plus lower limit of quantification (E1: 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; E2: 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C: Blank plasma plus control substance (E1: 0.19 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; E2: 0.28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); D: Plasma samples from a patient after taking the drug. 1. Polymyxin E1; 2. Polymyxin E2; 3. Polymyxin B1

表 1 用 LC – MS/MS 法测定多黏菌素甲磺酸钠患者血浆样品中的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Accuracy and precision of compounds ($\bar{x} \pm s$)

Compound	Concentration/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Intraday precision			Interday precision		
		Measured / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Accuracy / %	RSD / %	Measured / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Accuracy / %	RSD / %
Polymyxin E1	0.31	0.32 $\pm$ 0.04	103.30	11.37	0.31 $\pm$ 0.03	99.34	9.96
	0.77	0.88 $\pm$ 0.03	114.19	3.49	0.83 $\pm$ 0.06	108.33	7.77
Polymyxin E1	0.45	0.47 $\pm$ 0.05	104.33	9.88	0.46 $\pm$ 0.04	101.10	9.07
	1.13	1.10 $\pm$ 0.07	97.05	6.81	1.06 $\pm$ 0.08	94.15	7.34

RSD; Relative standard deviation.

表 2 用 LC – MS/MS 法测定多黏菌素甲磺酸钠患者血浆样品中待测物的基质效应和提取回收率结果 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Recovery and matrix effect of compounds ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Compound	Concentration / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Matrix effect / %	RSD / %	Extraction Recovery / %	RSD / %
Polymyxin E1	0.31	116.38 $\pm$ 3.35	2.28	61.64 $\pm$ 6.01	9.74
	0.77	106.34 $\pm$ 3.95	3.23	42.85 $\pm$ 3.69	8.61
Polymyxin E2	0.45	129.73 $\pm$ 4.19	3.72	69.77 $\pm$ 5.49	7.86
	1.13	105.03 $\pm$ 4.38	4.17	48.34 $\pm$ 4.73	9.78

表3 用LC-MS/MS法测定多黏菌素甲磺酸钠患者血浆样品中待测物的稳定性结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Stability of compounds ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Compound	Concentration/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%				
		6 h at room temp	24 h at 4 °C	3 freeze – thaw cycles at –20 °C	30 d at –80 °C	24 h in sampler
Polymyxin E1	0.31	2.98	2.09	14.4	2.04	5.51
	0.77	3.34	2.36	2.75	3.56	7.30
Polymyxin E2	0.45	5.54	4.98	6.61	3.33	4.54
	1.13	1.57	2.55	9.15	3.06	2.74

< 80 mL · min⁻¹ 患者组的 AUC_{24h} 显著低于 >120 mL · min⁻¹ 患者组的 AUC_{24h} ($P<0.001$), 见表4。

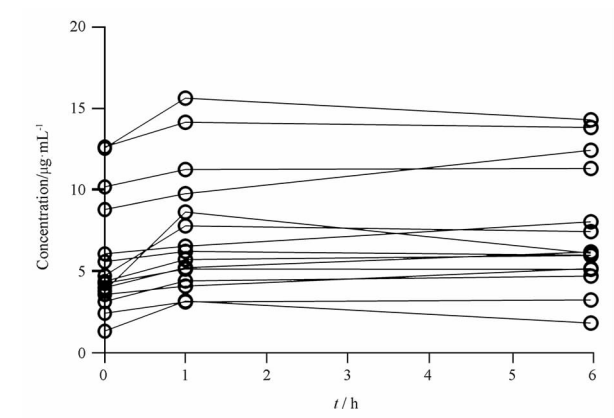


图2 26例患者的给药前0.5 h内、给药后1 h、给药后6 h的血药浓度折线图

Figure 2 The line graph of plasma concentrations at 1 h post – administration, 6 h post – administration, and 0.5 h before the next dose in 26 patients

表4 不同肌酐清除率组 AUC_{24h} 比较 [$M(P25, P75)$]

Table 4 Comparison of AUC_{24h} in different creatinine clearance groups [$M(P25, P75)$]

Creatinine clearance ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	<i>n</i>	AUC ($\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)
<80	11	45.12(35.54, 62.42)
80 ~ 120	8	100.44(98.33, 110.92) ^a
>120	7	150.42(130.64, 236.98) ^{b,c}

^a: Group 1 vs. Group 2, $P<0.05$, statistically significant difference;

^b: Group 1 vs. Group 3, $P<0.05$, statistically significant difference;

^c: Group 2 vs. Group 3, $P>0.05$, no statistically significant difference.

讨 论

本研究利用LC-MS/MS法测定CMS治疗的患者血浆中活性成分多黏菌素E的血浆浓度,该方法具

有特异性好、准确度高等优点,适合开展检测。CMS主要经肾排出,不同程度肾功能对CMS及其转化的多黏菌素E的药动力学影响较大,需进行剂量调整^[11]。CMS的稳定性较差,在酸性条件下易水解,存放过程中CMS也会发生降解,易在体外转化为多黏菌素E,这可能导致多黏菌素E血药浓度测量不准确。由于CMS不稳定,因此本研究方法学验证中采用了含多黏菌素E和CMS混合质控。通过观察质控中多黏菌素E1、E2的浓度测定值与真实值的接近程度来观察是否有CMS转化为多黏菌素E,准确度及稳定性考察结果均表明本方法对CMS的水解是稳定的。血浆样本预处理方法多样,包括亲水亲油平衡固相萃取、微柱正压固相萃取,其余采用的均是蛋白沉淀法^[12-19]。本研究使用的是固相萃取法预处理,它能有效去除CMS血浆中的干扰物质,分离CMS、保留活性成分多黏菌素E,具有较高的选择性,确保测定结果的准确性。固相萃取法的难点在于萃取条件的优化,条件选择不当可能导致目标物的损失或无法有效分离。因此,本研究考察了不同厂家的SPE小柱,以及不同溶剂、PH值、流速以保证萃取效果,有效地减缓CMS转化过程,确保测定浓度的真实性。

根据2019年的国际共识^[7],多黏菌素E的治疗窗与肾毒性浓度几乎重叠^[8, 20-21],推荐稳态平均血药浓度 $C_{ss,avg}$ 达到 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。既往研究多集中于大鼠血浆^[12-13, 16, 19]或人尿及人血浆^[14-15, 17-18]的测定,样本量偏少。先前报道使用CMS的患者,其PK特征存在很大差异。在健康人群中,COUET等^[22]研究结果显示,在使用了单次剂量1 MIU(相当于33 mg CBA)CMS的法国健康志愿者中,测得多黏菌素E的 C_{max} 平均值为 $0.83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;MIZUYACHI等^[14]研究结果显示在接受 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CBA($q12 \text{ h}$)CMS单次和多次给药的日本健康男性志愿者中,测得多黏菌素E的 C_{max} 的平均值分别为 (2.55 ± 1.28) 、 (4.38 ± 1.56)

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; FAN 等^[23] 研究显示,在接受 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CBA($q12\text{ h}$)CMS 的中国健康受试者中,测得多黏菌素 E 的 $C_{\max}$ 为 $(1.79 \pm 0.37) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $C_{\min}$ 为 $(0.67 \pm 0.22) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在危重患者中,KARAIKOS 等^[24] 研究显示在使用了 9 MU 负荷剂量、4.5 MIU, $q12\text{ h}$ (相当于 297 mg CBA 负荷剂量、149 mg CBA, $q12\text{ h}$)CMS 的希腊人群中,测得多黏菌素 E 的 $C_{\max}$ 为 $2.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;GARONZIK 等^[25] 研究显示,在使用了 2.5 ~ 13.6 MIU, qd (相当于 82.5 ~ 448.8 mg CBA)CMS 的泰国、美国人群中,测得多黏菌素 E 的 $C_{\max}$ 为 $2.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本研究对 26 例患者进行血浆浓度测定,结果显示 $\text{AUC}_{24\text{ h}}$ 为 $(100.63 \pm 65.41) \text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,个体差异大,推测可能与患者基础肾功能以及代谢能力的个体化差异密切相关,与文献中的结果差异较大,这种差异可能与研究对象不同及剂量不同有关,以及临床研究中可能存在的混杂因素(如用药时间、个体差异等)导致结果的不同,同时危重患者、肾功能异常、持续肾替代治疗对 CMS 的药代动力学有显著影响^[25]。此外,本研究通过分析不同肌酐清除率组的 $\text{AUC}_{24\text{ h}}$,发现肌酐清除率与 $\text{AUC}_{24\text{ h}}$ 存在显著关联,呈现出肌酐清除率越高, $\text{AUC}_{24\text{ h}}$ 越高的趋势,推测因肌酐清除率过低时,患者代谢功能受限,代谢缓慢,使得 $\text{AUC}_{24\text{ h}}$ 较低;而肌酐清除率过高的患者,可能存在多黏菌素 E 在体内蓄积的情况,使得 $\text{AUC}_{24\text{ h}}$ 较高,且不排除后续引发肾毒性的风险,但具体机制还需要进一步验证。

综上所述,本研究通过固相萃取法有效减少了多黏菌素 E 甲磺酸钠转化为多黏菌素 E 的干扰,同时利用 LC-MS/MS 法测定多黏菌素 E 甲磺酸钠治疗的患者血浆中活性成分多黏菌素 E 的血浆浓度,可为临床上治疗药物监测提供参考依据,并为患者的个体化治疗提供支持,以期减少不良反应发生的风险,提高治疗的安全性和有效性。

参考文献:

- [1] GRÉGOIRE N, ARANZANA - CLIMENT V, MAGRÉAULT S, *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of colistin [J]. *Clin pharmacokinet*, 2017, 56(12): 1441—1460.
- [2] RABANAL F, CAJAL Y. Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(7): 886—908.
- [3] 刘又宁. 应重视时间与浓度依赖性抗生素的合理应用 [J]. *中华医学杂志*, 2001, (1): 8.
- [4] 梅和坤, 王睿, 白楠, 等. LC-MS/MS 法同时测定多黏菌素 E 和左氧氟沙星的浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2013, 29(4): 296—298.
- [5] YAPA S W S, LI J, PATEL K, *et al.* Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: Targeting advantage of inhalational administration [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(5): 2570—2579.
- [6] 袁莹, 杨颖. 多黏菌素 B 和 E: 如何选择 [J]. *中国感染控制杂志*, 2017, 16(7): 677—682.
- [7] TSUJI B T, POGUE J M, ZAVASCKI A P, *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.
- [8] FORREST A, GARONZIK S M, THAMLIKITKUL V, *et al.* Pharmacokinetic/toxicodynamic analysis of colistin-associated acute kidney injury in critically ill patients [J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(11): e01367—17. 2017-10-24 [2025-07-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36297379/>.
- [9] 国家药品监督管理局. 中国药典通则 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466.
- [10] PLACHOURAS D, KARVANEN M, FRIBERG LE, *et al.* Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8): 3430—3436.
- [11] NATION R L, GARONZIK S M, THAMLIKITKUL V, *et al.* Dosing guidance for intravenous colistin in critically ill patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(5): 565—571.
- [12] MARCHAND S, LAMARCHE I, GOBIN P, *et al.* Dose-ranging pharmacokinetics of colistin methanesulphonate (CMS) and colistin in rats following single intravenous CMS doses [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1753—1758.
- [13] MATAR K M, 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.
- [14] MIZUYACHI K, HARA K, WAKAMATSU A, *et al.* Safety and pharmacokinetic evaluation of intravenous colistin methanesulfonate sodium in Japanese healthy male subjects [J]. *Curr Med Res Opin*, 2011, 27(12): 2261—2270.
- [15] WACHARACHAISURAPOL N, PHASOMSAP C, SUKKUMMEE W, *et al.* Greater optimisation of pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters through a loading dose of intravenous colistin in paediatric patients [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(6): 105940.
- [16] QI B, GIJSEN M, VAN BRANTEGEM P, *et al.* Quantitative determination of colistin A/B and colistin methanesulfonate in biological samples using hydrophilic interaction chromatography

- tandem mass spectrometry [J]. *Drug Test Anal*, 2020, 12(8): 1183—1195.
- [17] BIHAN K, LU Q, ENJALBERT M, *et al.* Determination of colistin and colistimethate levels in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38(6): 796—803.
- [18] GOBIN P, LEMAÎTRE F, MARCHAND S, *et al.* Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 1941—1948.
- [19] 郭晨雪, 刘笑芬, 曲星伊, 等. 液相色谱串联质谱测定大鼠血浆中多黏菌素E甲磺酸钠及多黏菌素E方法的建立及应用[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2023, 23(3): 347—355.
- [20] SORLI L, LUQUE S, GRAU S, *et al.* Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: A prospective observational cohort study [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13(1): 380.
- [21] HORCAJADA J P, SORLI L, LUQUE S, *et al.* Validation of a colistin plasma concentration breakpoint as a predictor of nephrotoxicity in patients treated with colistin methanesulfonate [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(6): 725—727.
- [22] COUET W, GRÉGOIRE N, GOBIN P, *et al.* Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89(6): 875—879.
- [23] FAN Y, LI Y, CHEN Y, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of colistin methanesulfonate in healthy chinese subjects after multi-dose regimen [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(6): 798.
- [24] KARAIKOS I, FRIBERG L E, PONTIKIS K, *et al.* Colistin population pharmacokinetics after application of a loading dose of 9 MU colistin methanesulfonate in critically ill patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(12): 7240—7248.
- [25] GARONZIK S M, LI J, THAMLIKITKUL V, *et al.* Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3284—3294.

(本文编辑:冀希炜 收稿日期 2025-08-14)

· 科学文摘 ·

危重病患者针对铜绿假单胞菌的黏菌素给药方案： 蒙特卡罗模拟的应用

引自: NGUYEN V T K, *et al.* Colistin dosing regimens against pseudomonas aeruginosa in critically ill patients: An application of monte carlo simulation [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(5): 595.

我们的目的是评估针对危重患者铜绿假单胞菌感染的不同黏菌素给药方案,并根据微生物学数据提出合适的方案。使用已发表的重症患者黏菌素药代动力学参数、已发表的小鼠大腿感染模型的药效学目标以及越南医院的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)结果进行蒙特卡罗模拟。使用80%的目标达成概率(probability of target attainment, PTA)和90%的累积缓解分数来评估每种方案的疗效。在121个铜绿假单胞菌实验室数据集中,耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌和耐黏菌素铜绿假单胞菌率分别为29.80%和0.80%。MIC₅₀、MIC₉₀均为0.50 mg·L⁻¹。模拟结果显示,在MIC为2.00 mg·L⁻¹时,大多数方案无法达到PTA目标,尤其是肾功能正常的患者。在MIC为0.50 mg·L⁻¹和1.00 mg·L⁻¹时,当前的建议仍然有效。根据这些结果,除了肺部感染外,我们的研究推荐了三种针对铜绿假单胞菌感染的方案, MIC分别为0.50、1.00和2.00 mg·L⁻¹。总之,较高的每日总剂量和分次黏菌素给药方案可能是(难以获得PTA病例的)策略,而在低MIC₅₀/MIC₉₀的情况下,较不激进的剂量可能适合经验性治疗。