

LC-MS/MS 检测干血点样品中泊沙康唑浓度的方法建立及其在治疗药物监测中的应用

Development of an LC-MS/MS method for determining posaconazole concentration in dried blood spot samples and its application in therapeutic drug monitoring

陈 焰^{1,2,3}, 丁 玺⁴, 吴 越⁵,
范亚新^{1,2,3}, 张 菁^{1,2,3}, 郭蓓宁^{1,2,3},
李 熠^{1,2,3}, 李 鑫^{1,2,3}, 李婉贞^{1,2,3},
刘笑芬^{1,2,3}

(1. 复旦大学 附属华山医院 抗生素研究所, 上海 200040; 2. 国家卫健委 抗生素临床药理重点实验室, 上海 200040; 3. 耐药菌感染病原诊断与创新药物研发联合实验室, 上海 200040; 4. 东台市人民医院, 江苏 东台 224200; 5. 深圳市儿童医院, 广东 深圳 518000)

CHEN Yan^{1,2,3}, DING Xi⁴,
WU Yue⁵, FAN Ya-xin^{1,2,3},
ZHANG Jing^{1,2,3}, GUO Bei-ning^{1,2,3},
LI Yi^{1,2,3}, LI Xin^{1,2,3},
LI Wan-zhen^{1,2,3}, LIU Xiao-fen^{1,2,3}

(1. Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Key Laboratory of Antibiotic Clinical Pharmacology of the National Health Commission, Shanghai 200040, China; 3. Joint Laboratory of Hospital & Enterprise for Pathogen Diagnosis of Drug-resistant Bacterial Infections and Innovative Drug R&D, Shanghai 200040, China; 4. Dongtai People's Hospital, Dongtai 224200, Jiangsu Province, China; 5. Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China)

基金项目: 上海申康医院发展中心临床三年行动计划 (SHDC2022CRW004); 复旦大学附属华山医院临床研究基金资助 (2023-YN009)

作者简介: 陈焰 (1999), 男, 初级药师, 主要从事抗菌药物治疗药物监测相关研究及工作

通信作者: 刘笑芬, 副研究员, 硕士生导师

Tel: (021) 52888189

E-mail: liuxiaofen227@163.com

摘要:目的 开发并验证一种测定干血点 (DBS) 样品中泊沙康唑药物浓度的液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS), 为干血点法的应用和泊沙康唑治疗药物监测 (TDM) 的临床实践提供一种可行的参考。方法 干血点样本通过将含泊沙康唑的全血样本滴加到 Whatman 903[®] 卡片上干燥获得。样本处理过程为裁取 3 mm 直径的圆孔得到分析样本, 通过添加 0.2% 甲酸-50% 乙腈水溶液 (含内标 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 提取, 经超声、离心, 取上清直接进样检测。用 LC-MS/MS 测定, 色谱柱选择 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ 柱, 梯度洗脱方式分离, 质谱检测模式为正离子多反应监测, 待测物泊沙康唑和内标 D₅-泊沙康唑监测离子对分别为 m/z 701.3 $\rightarrow$ 614.4 和 m/z 705.3 $\rightarrow$ 618.4。方法学验证包括选择性、特异性、线性、残留、准确度、精密度、提取回收率、基质效应、稳定性, 以及针对基于干血点分析的特殊参数验证。此外, 将所开发的 DBS 方法应用于泊沙康唑临床 TDM 样本的检测, 并与血浆方法进行比较, 对两种方法的一致性进行评价。结果 DBS 的 LC-MS/MS 测定方法具有良好的选择性和线性 (0.10 ~ 10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 无残留和交叉干扰的影响, 样本处理过程分析物的回收率在 70.67% ~ 75.66% 范围内, 批内准确度偏差、精密度分别在 -12.18% ~ -0.86%、3.05% ~ 8.75% 范围内, 批间准确度偏差、精密度分别在 -4.21% ~ 3.49%、8.57% ~ 12.21% 范围内。6 个不同来源的空白全血测试的基质效应, 准确度在 $\pm 15\%$ 以内, 精密度均 $< 15\%$, 稳定性结果显示泊沙康唑在干血点样本中室温 (20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$)、37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-70 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度条件下分别至少稳定 3、3、14、30、90 d。78 个临床验证样本的 Bland-Altman、Passing-Bablok 分析结果显示, 泊沙康唑在 DBS 和血浆中测定结果具有较好的相关性, 但具有显著偏差 ($P < 0.001$), DBS 测定结果较低于血浆测定结果, 平均偏差为 0.33 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在低 Hct 中更显著。结论 本研究开发并验证了一种简单、便捷的测定 DBS 中泊沙康唑浓度的 LC-MS/MS 方法, 检测所需样本量小 (全血最少 10 μL)、分析时间短 (2.00 min)、操作便捷、适用性高, 为泊沙康唑 TDM 的临床实践提供一种便捷可行的参考检测方法。

关键词: 泊沙康唑; 干血点法; 治疗药物监测; 液相色谱串联质谱法

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.11.012

中图分类号: R9 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821 (2026) 11-1573-08

Abstract: Objective To develop and validate a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determining the concentration of posaconazole in dried blood spot (DBS) samples, providing a feasible reference for the application of the dried blood spot method and the clinical practice of posaconazole therapeutic drug monitoring (TDM). **Methods** DBS samples were obtained by dropping

whole blood samples containing posaconazole onto Whatman 903[®] cards and drying them. The sample processing procedure involved cutting out a round hole with a diameter of 3 mm to obtain the analytical sample. The sample was extracted by adding 0.2% formic acid – 50% acetonitrile (containing an internal standard of 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), followed by sonication and centrifugation. The supernatant was directly injected for detection. LC – MS/MS was used for determination. The Phenomenex Kinetex XB – C₁₈ column was selected as the chromatographic column, and gradient elution was used for separation. The mass spectrometry detection mode was positive ion multiple reaction monitoring. The monitored ion pairs for the analyte posaconazole and the internal standard D₅ – posaconazole were 701.3 → 614.4 and 705.3 → 618.4, respectively. Full method validation was conducted in accordance with ICH Guideline M10 (Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis), covering selectivity, specificity, linearity, carryover, accuracy, precision, extraction recovery, matrix effect, analyte stability, together with DBS – specific validation parameters including hematocrit (Hct) impact, spotting volume effect and spot homogeneity. In addition, the developed DBS method was applied to the detection of clinical TDM samples of posaconazole and compared with the plasma method, and the consistency of the two methods was evaluated. **Results** The LC – MS/MS method for the determination of posaconazole in DBS had good selectivity and linearity (0.10 – 10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), without the influence of cross – talk and carry – over. The recovery rate of the analyte during the sample processing was in the range of 70.67% – 75.66%. The intra – batch accuracy and precision were in the ranges of –12.18% – –0.86% and 3.05% – 8.75%, respectively, and the inter – batch accuracy and precision were in the ranges of –4.21% – 3.49% and 8.57% – 12.21%, respectively. For the matrix effect tested with six blank whole blood samples from different sources, the accuracy was within $\pm 15\%$ and the precision was all $< 15\%$. The stability results showed that posaconazole was stable for at least 3, 3, 14, 30, and 90 days at room temperature (20 – 25 $^{\circ}\text{C}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ – 20 $^{\circ}\text{C}$, and –70 $^{\circ}\text{C}$ in DBS samples, respectively. The results of Bland – Altman and Passing – Bablok analyses of 78 clinically verified samples showed that there was a good correlation between the determination results of posaconazole in dried blood spots (DBS) and plasma. However, there was a significant deviation ($P < 0.001$). The determination results in DBS were lower than those in plasma (average difference = 0.33 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), and this was more significant in cases with low hematocrit (Hct). **Conclusion** A straightforward and practical LC – MS/MS method was successfully developed and fully validated for posaconazole quantitation in DBS samples. This method requires a minimal blood volume (minimum 10 μL whole blood), features a short analytical runtime (2.00 min per injection) and facilitates streamlined laboratory operation with robust practicability, which can serve as a convenient alternative analytical strategy for routine clinical TDM of posaconazole.

Key words: posaconazole; dried blood spot method; therapeutic drug monitoring; liquid chromatography – tandem mass spectrometry

泊沙康唑属第二代三唑类抗真菌药,具有广泛抗真菌活性,对念珠菌、曲霉、大多数接合菌、球孢子菌等均有作用。临床用于侵袭性真菌感染(Invasive fungal infection,IFI)的预防和挽救治疗,在各种血液肿瘤患者、移植患者以及免疫缺陷患者中预防和治疗IFI显示良好疗效^[1]。泊沙康唑口服通过胃肠道吸收,血药浓度受给药方案、进食和剂型等影响,药动学(pharmacokinetics,PK)、生物利用度差异大,尤其在儿童、孕妇、移植、肝肾功能不全以及其他特殊疾病患者等人群中更需注意,静脉给药PK受影响较小,但在特殊群体中仍需引起注意^[2-3]。相关临床研究显示,泊沙康唑用于IFI,谷浓度(C_{trough}) $> 0.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

时真菌突破性感染发生率仅为0% ~ 1.9%,而低于 $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时则达到3.9% ~ 6.5%^[4];用于挽救治疗时,泊沙康唑血药平均浓度为 $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.411 \sim 0.719 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.134 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时治疗应答率分别为75%、53%和24%^[5];因此,在临床使用泊沙康唑过程中积极开展治疗药物监测(therapeutic drug monitoring,TDM)以提高临床疗效和预防不良反应发生十分必要。目前,用于泊沙康唑TDM的检测方法多是实验室自建方法,以液相色谱串联质谱法(Liquid chromatography tandem mass spectrometry,LC – MS/MS)为主,凭借其灵敏度高、专属性强、检测高效等优点,视为泊沙康唑TDM主流分析技术和“金

标准”,但由于仪器设备昂贵和技术要求高,导致普及率较低。微量干血点采样结合 LC-MS/MS 分析,近年来在药物浓度检测方面表现出巨大优势,相较于传统的基于静脉采血的治疗药物监测方法,具有侵袭性低、采样量少、存储运输便捷等优势,尤其适用于居家监测、提高了监测的普及率^[6-7]。本研究旨在建立一种简便、高效的液质联用法检测干血点样品中泊沙康唑的浓度,为泊沙康唑临床个体化用药提供指导。

材料与方法

1 材料

药品与试剂 泊沙康唑标准品,规格:每支 1 mg,纯度:98%,批号:21J085-B2,上海甄准生物科技有限公司生产; D_5 -泊沙康唑标准品(内标),规格:每支 1 mg,纯度:99.6%、同位素纯度:99.5%,批号:2236-025A4,加拿大 TLC PharmaChem 有限公司生产;甲酸、乙腈、甲醇均由德国 Sigma-Aldrich 公司生产;Whatman 903 Protein Saver Card 样品采集卡,美国 GE Healthcare 公司生产。

仪器 高效液相色谱串联质谱仪由 JasperTM 高效液相色谱仪和 Triple QuadTM 4500MD 质谱仪组成,美国 AB SCIEX 公司产品;Mettler Toledo XS 20 电子分析天平,瑞士梅特勒公司产品;3510E-DTH 超声仪,美国 BRANSON 公司产品;Milli-QIQ7000 超纯水仪,美国 Millipore 公司产品。

2 检测条件、溶液配制与样品处理

色谱条件 色谱柱:Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm,2.6 μm),液相用 0.2% 甲酸乙腈溶液(A相):0.2% 甲酸水溶液(B相)梯度洗脱方法,0~0.5 min 维持 60% A,0.5~0.6 min 匀速升至 98% A,0.6~1.2 min 维持 98% A,1.2~1.3 min 匀速降至 60% A,1.3~2.0 min 维持 60% A,总洗脱时间 2.0 min。色谱柱为流速:0.40 mL·min⁻¹。

质谱条件 质谱用正离子多反应监测模式(multiple reaction monitoring,MRM),泊沙康唑和内标检测离子对分别为 m/z 701.3→614.4 和 m/z 705.3→618.4,碰撞能量(Collision Energy,CE)分别为 51V 和 46V,去簇电压(declustering potential,DP)、入口电压(Entrance Potential,EP)、出口电压(Collision Cell Exit Potential,CXP)均分别为 181V、10V、12V。

标准曲线与质量控制样品和内标溶液的制备 分别精密称量泊沙康唑和 D_5 -泊沙康唑标准品适量,制备成浓度 1 000.00 μg·mL⁻¹ 的标准曲线、质量控制储备液和内标储备液,将泊沙康唑储备液用超纯水

梯度稀释成浓度分别为 2.00、4.00、10.00、20.00、40.00、100.00、200.00 μg·mL⁻¹ 的标准曲线工作溶液和浓度分别为 6.00、30.00、160.00 μg·mL⁻¹ 的质控工作溶液,将工作溶液按 20 倍稀释添加至乙二胺四乙酸二钾(Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt, EDTA-K₂) 抗凝空白全血得到浓度分别为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 μg·mL⁻¹ 的全血标准曲线样品和浓度分别为 0.30、1.50、8.00 μg·mL⁻¹ 的全血质控样品,颠倒混匀,再将全血准确吸取 50 μL 至干血点卡片上,室温放置 2 h 干燥,得到干血点标准曲线和质控样品。内标工作液使用纯乙腈将 D_5 -泊沙康唑储备液稀释为浓度为 0.50 μg·mL⁻¹ 获得。

样本预处理方法 用打孔器从干燥完全的干血点卡片上裁取 3 mm 直径大小样品,加入 400 μL 的 0.1% 甲酸-50% 乙腈水溶液(含内标 0.50 μg·mL⁻¹) 超声 20 min,然后 4℃、4 300 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清至 96 孔板,5 μL 进样检测。

3 方法学考察

方法学验证主要参考 ICH:《M10:生物分析方法验证及样品分析》指导原则^[8],以及国际治疗药物监测学会(International Society of Therapeutic Drug Monitoring,ISTDM)发布的“基于干血点的治疗药物监测方法开发和验证指导原则”^[9]。验证内容包括完整方法学验证:选择性、特异性、残留、线性、批内和批间准确度、精密度、基质效应、提取回收率、稳定性和针对干血点分析的特殊参数验证:红细胞压积(hematocrit,Hct)、体积效应、均匀性,除 Hct 验证外,其他验证内容中制备的干血点样本所用的空白全血 Hct 均为正常范围内(约 0.40~0.50 L/L)。

特异性、标准曲线、定量下限和残留 通过选取 6 个不同来源的空白全血,分别进行检测分析来评价选择性,此外还应考察分析物(泊沙康唑)和内标(D_5 -泊沙康唑)在对应的离子通道中是否存在相互干扰以评估方法的特异性。在 0.10~10.00 μg·mL⁻¹ 的浓度范围内评估至少 3 条标准曲线线性,采用权重因子($w=1/X^2$),对泊沙康唑与内标的峰面积比和泊沙康唑的浓度进行线性回归。重复 6 个高浓度样本分析后紧接着进样空白样本,用于评价残留的影响。

准确度和精密度 批内准确度、精密度的考察在定量下限(lower limit of qualification, LLOQ)和低浓度质控(low quality control, QCL)、中浓度质控(median quality control, QCM)、高浓度质控(high quality control, QCH)4 个浓度水平上进行考察,每个浓度用至

少5个样本,验证结果要求除 LLOQ 以外,准确度(%)均值应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 偏差以内,LLOQ 应在标示浓度的 $\pm 20\%$ 偏差以内,精密度变异系数(coefficient of variation, CV%)要求 LLOQ 不能超过 20%、其他质控样本不能超过 15%。批间准确度、精密度的考察要求通过至少 3 个分析批,在至少 2 天内完成,所有结果的准确度、精密度要求同批内准确度、精密度。

提取回收率和基质效应、稳定性 在 QCL 和高 QCH 水平下,使用至少 6 个来自不同来源的空白全血制备干血点 QC 样本并测定,通过准确度、精密度进行评估基质效应。提取回收率的考察在 QCL、QCM、QCH 三个浓度水平进行,分别测定质控样本和空白处理后添加分析物和内标的样本,计算提取回收率 = 正常处理的质控样本峰面积/空白样本处理后添加分析物的峰面积 $\times 100\%$ 。

通过考察干血点质控样本 QCL、QCH 在室温($20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以及 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次等条件下的存储后测定的准确度、精密度,评估干血点样本的稳定性。

基于干血点分析的特殊参数验证 综合临床和实际采样情况,本研究考察 Hct = 0.15、0.3、0.4、0.5、0.6 和点样体积 = 10、20、30、40 及 50 μL 条件下对于干血点分析结果的影响,不同 Hct 全血制备通过将向全血中添加或吸取一定体积血浆获得。本部分验证在 QCL、QCH 浓度水平上进行,制备不同条件下的干血点质控样本,每个条件下测试 3 个重复且均来自同 1 个干血点样本中不同穿孔位置(中央、边缘区域打孔),从而实现对均匀性的同步考察,用平均准确度和精密度进行评估特殊参数的影响。

4 方法学应用

采集接受泊沙康唑治疗患者第五天给药前(达稳态血药浓度)30 min 内静脉全血(EDTA- K_2 抗凝),用移液器精密吸取静脉全血 50 μL 至干血点采集卡片上,室温放置 2 h 干燥后密封冻存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存待

测。剩余静脉全血离心取上层血浆,用于本实验室常规 TDM 检测(LC-MS/MS 检测)。本研究收集的泊沙康唑治疗药物监测样本均来自于复旦大学附属华山医院,经复旦大学附属华山医院伦理委员会批准[伦理批号:(2023)临审第(054)号]。

结 果

1 方法学评价

专属性 考察 6 个不同来源空白全血,泊沙康唑和内标的保留时间均在 0.90 min 左右,出峰处均无干扰峰出现,泊沙康唑定量上限样品按空白处理在内标出峰处和空白加内标处理在泊沙康唑出峰处均无干扰峰出现,证明该方法具有良好的选择性和特异性。空白全血、空白加内标、定量下限以及来自临床样品的典型色谱图,见图 1。

标准曲线与定量下限 考察 3 条标准曲线,线性相关系数(r^2)均 ≥ 0.99 ,代表性线性回归方程: $y = 7.18 \times 10^{-1}x + 1.18 \times 10^{-2}$ ($r^2 = 0.9966$)。干血点样本中泊沙康唑在 0.10 ~ 10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内具有良好的线性关系,定量下限为 0.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

精密度与回收率 在 2 天内测试 3 个准确度、精密度批次,结果均通过,定量下限和质控样本批内、批间准确度均在 $\pm 15\%$ 以内、精密度均 $< 15\%$ 。泊沙康唑在干血点样本中回收率在 70.67% ~ 75.66% 范围内,泊沙康唑内标回收率为 45.75%,CV% 均 $< 15\%$,见表 1。

基质效应 使用 6 个不同来源空白全血考察基质效应的平均准确度在 99.03% ~ 112.00% 范围以内,精密度在 1.11% ~ 12.50% 范围以内,准确度在 $\pm 15\%$ 以内,精密度 $< 15\%$,满足要求。

稳定性 考察干血点样本在室温放置 3 天、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 3 天、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 14 天、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 天、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 90 天、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次条件下稳定性,再测试平均准确度均在 $\pm 15\%$ 以内、精密度均 $< 15\%$,说明以上条件保存均稳定。

表 1 泊沙康唑在干血点样本中的精密度和回收率

Table 1 Precision and recovery of posaconazole in dried blood spot samples

Item	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Inter-batch ($n = 5$)			Intra-batch ($n = 15$)			Extraction recovery (%, $\bar{x} \pm s$)
		Concentration	RSD	RE	Concentration	RSD	RE	
		($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)	(%)	(%)	
LLOQ	0.10	$9.91 \times 10^{-2} \pm 8.67 \times 10^{-3}$	8.75	-0.86	$9.58 \times 10^{-2} \pm 8.82 \times 10^{-3}$	9.21	-4.21	/
QCL	0.30	$2.84 \times 10^{-2} \pm 1.89 \times 10^{-2}$	6.64	-5.28	$0.30 \pm 3.66 \times 10^{-2}$	12.21	-0.01	75.08 ± 6.30
QCM	1.50	1.32 ± 0.04	3.05	-12.18	1.39 ± 0.12	8.57	-7.58	70.67 ± 2.74
QCH	8.00	7.41 ± 0.30	4.07	-7.32	8.28 ± 0.82	9.97	3.49	75.66 ± 4.64

LLOQ: Lower limit of quantitation, QCL: Low quality control, QCM: Medium quality control, QCH: High quality control, RSD: Relative standard deviation; RE: Relative error.

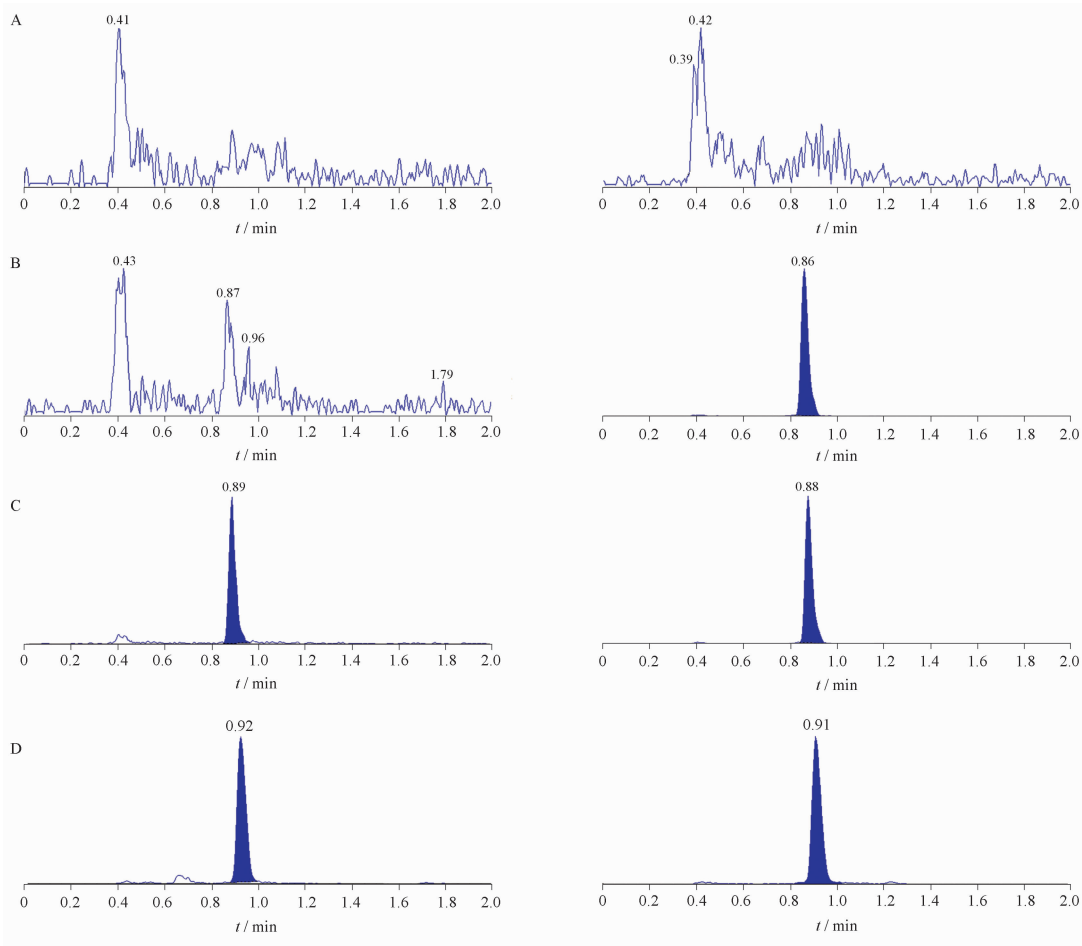


图 1 干血斑样本中泊沙康唑的典型色谱图

Figure 1 Typical chromatogram of posaconazole in dried blood spot samples

A: Control blank; B: Control blank with internal standard; C: Lower limit of quantitation; D: Patient sample (Left: posaconazole; Right: D₅ – posaconazole).

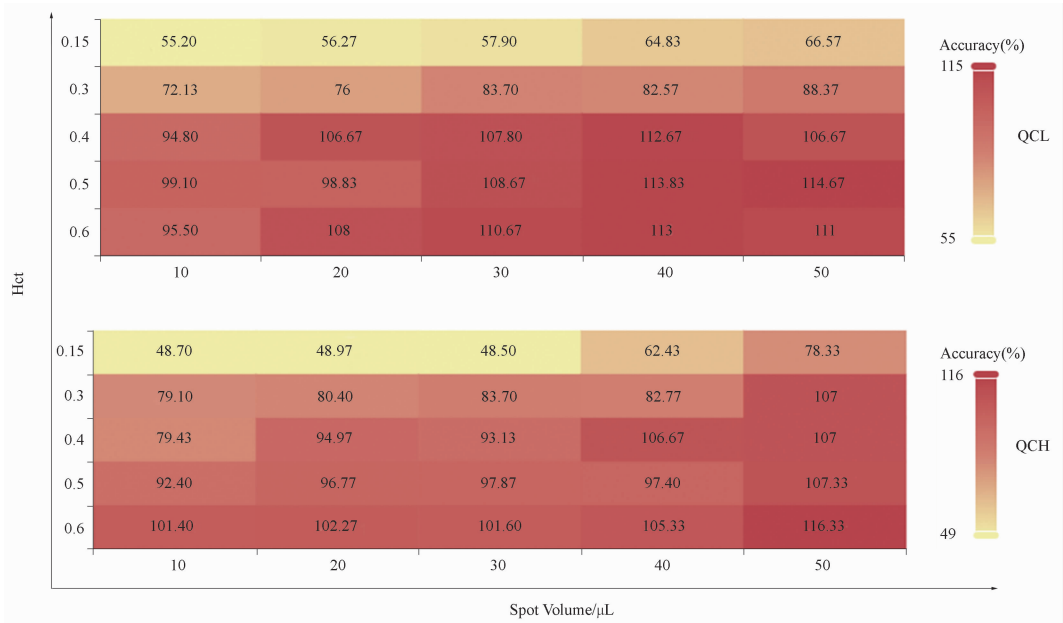


图 2 不同红细胞压积和点样体积下泊沙康唑在干血斑样本中 QCL 和 QCH 的平均准确度分布热图

Figure 2 The average accuracy distribution heat map of posaconazole in dried blood spot samples at QCL and QCH concentrations under different Hct and spotting volumes

Hct: Hematocrit.

残留评估 重复6个高浓度样本分析后紧接进样空白样本以评价残留,结果显示6个空白在待测物和内标出峰处均未见明显出峰,待测物峰面积小于LLOQ响应的20%,内标峰面积小于LLOQ内标响应的5%,均满足要求。

基于干血点分析的特殊参数验证 针对干血点的特殊参数验证,研究结果显示样品均匀性不受干扰,检测结果准确性受Hct和点样体积共同影响。对于不同Hct和点样体积条件,来自同一个干血点样本上3个不同穿孔位置的测试精密度均<15%,说明均匀性良好,点样的均匀性受点样体积和Hct影响可忽略。对于Hct和点样体积的考察,结果显示在同一个点样体积水平下,随着Hct的减小,测试结果将逐渐偏低,当Hct > 0.50 L/L时,高浓度质控准确度偏差>15%,当Hct ≤ 0.30 L/L时准确度偏差将<-15%;在同一个Hct水平下,随着点样体积的减小,准确度也存在降低趋势,与Hct共同

影响检测结果,但这种影响在高Hct(Hct > 0.30 L/L)时几乎可以忽略,在低Hct(Hct ≤ 0.30 L/L)时偏差将影响结果。不同Hct和点样体积下测试准确度分布,见图2和表2。

2 方法学应用

本研究共收集78例泊沙康唑治疗药物监测全血样本,同步检测静脉全血制备的干血点样本和血浆样本,采用Passing-bablok和Bland-Altman对两种方法检测结果进行相关性分析和一致性评价,Passing-bablok回归方程为 $y = 8.25 \times 10^{-1}x + 3.30 \times 10^{-3}$,斜率的95%置信区间:0.760~0.885,截距的95%置信区间:-0.0503~0.0700,线性度无明显偏差($P > 0.05$),回归图见图3。Bland-Altman一致性分析结果显示DBS和血浆测定结果平均差异为 $-0.334 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,平均差异95%置信区间: $-0.457 \sim -0.211 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,尽管96.2%(75例/78例)的样本测定差异在95%置信区间内,但该置信

表2 基于干血点(DBS)分析的特殊参数验证(点样体积和红细胞压积)

Table 2 Validation of special parameters based on dried blood spot (DBS) analysis (Spotting volume and Hct)

Hct(L/L)	Spotting volume (μL)	QCL($0.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			QCH($8.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
		Average conc ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Accuracy (%)	Precision (%)	Average conc ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
0.15	10	1.66×10^{-1}	55.22	4.39	3.90	48.71	7.14
	20	1.69×10^{-1}	56.22	12.03	3.92	48.96	7.35
	30	1.74×10^{-1}	57.89	5.32	3.88	48.54	13.31
	40	1.94×10^{-1}	64.78	10.72	4.99	62.38	3.78
	50	1.99×10^{-1}	66.44	11.80	6.26	78.29	4.69
0.30	10	2.16×10^{-1}	72.11	3.71	6.33	79.08	10.42
	20	2.28×10^{-1}	75.89	1.73	6.44	80.46	0.78
	30	2.51×10^{-1}	83.56	13.76	6.70	83.71	0.98
	40	2.48×10^{-1}	82.67	8.45	6.62	82.79	3.70
	50	2.65×10^{-1}	88.33	6.23	8.55	106.83	3.74
0.40	10	2.84×10^{-1}	94.78	4.13	6.36	79.46	5.89
	20	3.20×10^{-1}	106.67	4.33	7.60	94.96	6.38
	30	3.23×10^{-1}	107.67	12.79	7.46	93.21	12.42
	40	3.38×10^{-1}	112.56	6.42	8.53	106.67	3.90
	50	3.20×10^{-1}	106.56	5.16	8.54	106.71	4.86
0.50	10	2.97×10^{-1}	99.00	7.84	7.39	92.42	2.16
	20	2.96×10^{-1}	98.78	7.23	7.73	96.63	12.33
	30	3.26×10^{-1}	108.78	2.66	7.82	97.79	13.60
	40	3.41×10^{-1}	113.56	3.67	7.80	97.50	3.23
	50	3.44×10^{-1}	114.78	9.57	8.59	107.42	1.94
0.60	10	2.87×10^{-1}	95.56	9.54	8.11	101.38	4.44
	20	3.24×10^{-1}	108.11	4.63	8.17	102.17	8.34
	30	3.32×10^{-1}	110.56	5.45	8.11	101.38	3.56
	40	3.39×10^{-1}	113.11	4.06	8.44	105.50	1.98
	50	3.33×10^{-1}	111.11	8.87	9.31	116.42	5.04

区间不包含 0, 且 $P < 0.001$ (H_0 : 平均值 = 0), 说明 2 种测定结果差异间存在显著的平均差异, 见图 4。

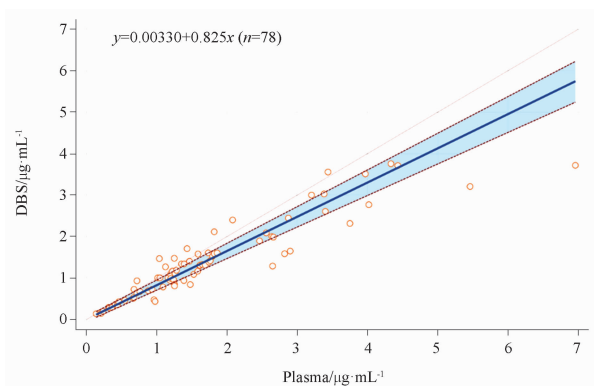


图 3 血浆和 DBS 样本中测定的泊沙康唑浓度的 Passing – Bablok 相关图

Figure 3 Passing – Bablok correlation plots for posaconazole concentration measured in plasma and DBS samples

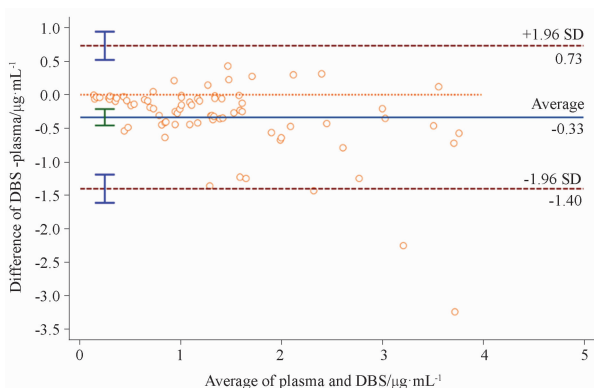


图 4 血浆和 DBS 样本中测定的泊沙康唑浓度的 Bland – Altman 图

Figure 4 Bland – Altman plots of posaconazole concentration measured in plasma and DBS samples

讨 论

基于干血点的分析方法开发大多参考已有的血浆或血清液体基质检测方法, 由于样本的特性, 其中样本预处理是重点需要考察的, 包括打孔、提取溶剂、提取过程等。本研究在方法开发过程, 考察了 3 mm、6 mm 大小打孔面积的影响; 根据泊沙康唑溶解性和最终进样溶剂的体系, 考察了 50% 乙腈水溶液、50% 乙腈 – 0.1% 甲酸水溶液、50% 乙腈 – 2% 甲酸水溶液提取溶剂的影响; 此外还考察了振摇 20 min、超声 10 min 对提取效率影响。最终结果显示, 添加不同提取溶剂和不同提取方式对检测结果的影响无明显差

异, 3 mm 穿孔灵敏度高可满足检测要求且需要样本量更少, 最终确定预处理方法为 3 mm 打孔样本添加 50% 乙腈 – 0.1% 甲酸后超声 10 min 提取, 开发的方法预处理简单, 分析时间短 (2.0 min), 线性范围宽 ($0.10 \sim 10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 可满足大通量和自动化检测需求。

参考相关指导原则, 本研究进行充分的方法学验证, 均通过验证要求, 所建立的分析方法稳健、精密度准确度高, 可用于真实样本检测。对于干血点分析, 由于全血自身的特性和以及全血在纸片上渗透、扩散的影响, Hct、体积效应、均匀性被认为是影响测定准确性的重要因素^[10–11]。一般男性和女性的 Hct 参考范围分别约为 (0.41 ~ 0.50) 和 (0.36 ~ 0.44) L/L, 住院患者 Hct 根据大样本统计 95% 在 (0.23 ~ 0.48) L/L 之间, 一般在 (0.30 ~ 0.40) L/L 之间, 在特殊情况下 (如烧伤患者、接受免疫抑制或化疗患者、新生儿或高原地区人群等), Hct 会异常偏高或偏低^[12]。在验证结果中发现, Hct 可能会影响测定结果的准确性, 这与既往发表的干血点相关研究一致, Hct 仍是限制干血点在实际推广应用中的一个重要因素^[13–14]。对于 Hct 正常患者群体 [男性: (0.40 ~ 0.50) L/L; 女性: (0.35 ~ 0.45) L/L], 经过本研究的 Hct 验证, 可以忽略 Hct 对检测结果影响, 但对于异常群体, Hct 将会影响检测结果。尤其应注意, 如需在器官移植、免疫抑制、血液病患者群体中进行干血点中泊沙康唑药物浓度检测, Hct 带来的检测误差应被评估, 因为这类患者群体常伴有较低的 Hct。点样体积的验证显示该方法可适应一定范围点样体积波动的影响, 可适用于指尖非定量体积采样的实践, 但在极低的情况下 (约 10 μL) 可能会影响检测结果, 导致结果偏低, 如果遇到 Hct 同样低的情况, 这种影响将被放大, 因此, 综合考虑建议实际采样应关注应用个体的 Hct, 且点样体积应尽可能 $> 30 \mu\text{L}$ 。

本研究共收集 78 例患者样品进行临床验证, passing – bablok 回归结果显示两种方法测定结果间成正相关 (Spearman 等级相关系数 = 0.940), 但斜率 < 1 且斜率的 95% 置信区间不包含 1 (95% CI: 0.760 ~ 0.885); Bland – Altman 一致性评价结果显示两种方法测定结果差异大部分都在平均差异的 95% 置信区间内 (75 例/78 例), 平均差异为 $0.334 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (95% CI: $-0.457 \sim -0.211 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。Passing – bablok 回归及 Bland – Altman 一致性评价均显示泊沙康唑在干血点样本和血浆样本检测结果之间存在一定的系统差异, 干血点样本测定结果较小于血浆测定

结果。导致2种测定结果间存在这种显著偏差的结果可能是由于Hct影响或全血中药物浓度自身分布差异造成,在回顾下检索到部分患者的血常规Hct检查结果后,发现部分患者Hct明显偏低(0.1~0.3),且均为器官移植后免疫抑制患者,其干血点样本测定结果部分也存在异常偏低(偏差>50%),但仍有部分Hct异常患者DBS测定结果与血浆一致,且Hct与两种方法测定结果偏差间相关性弱($r^2=0.493$),说明除Hct外,可能有其他因素导致两种方法的差异。

本研究临床验证结果与既往SIMEOLI^[15]、CHENG^[16]等发表的研究结果一致,说明低Hct情况下会影响泊沙康唑在干血点中药物浓度测定的准确度,在低Hct人群中应用于干血点测定应引起警觉。由于本研究为回顾性研究,纳入临床验证的样本数量有限,且未同时采集指尖全血干血点样本和测定采集静脉全血的Hct,无法准确评估Hct对测定差异的影响和指尖血与静脉血浓度差异,该差异可能是由Hct和其他因素共同导致,本研究尝试通过Passing-bablok回归方程校正和Hct校正均未能建立干血点样品与血浆样品中泊沙康唑浓度的数学转换关系。未来研究中应纳入更多样本量,进行前瞻性研究,同步采集静脉全血和指尖全血的干血点样本进行临床验证,并同步测定采集的静脉全血Hct,以准确评估泊沙康唑在不同样本中的测定差异和Hct影响,准确建立泊沙康唑在干血点样本与血浆中药物浓度关系。

本研究提示:开发并验证了1种高效、简便的LC-MS/MS测定干血点样本中泊沙康唑药物浓度的分析方法,可为泊沙康唑TDM检测及其在特殊人群(如儿童或居家患者)中的应用,提供一种便捷可行的参考方法,完整的方法学验证提示该方法在临床实际应用中应警惕低Hct的影响,以及需注意血浆和干血点样本中泊沙康唑浓度的系统偏差,必要的浓度校正是方法应用于临床的重要前提。

参考文献:

- [1] 计建军,张慧,查丽,等. 泊沙康唑预防侵袭性真菌感染疗效及安全性的Meta分析[J]. 实用药物与临床,2021,24(3):229—236.
- [2] KRISHNA G, MOTON A, MA L, et al. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009,53(3):958—966.
- [3] 泊沙康唑临床应用专家组. 泊沙康唑临床应用专家共识[J]. 国际呼吸杂志,2020(4):241—242.
- [4] JANG S H, COLANGELO P M, GOBBURU J V. Exposure - response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal

- infections: evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma [J]. *Clin Pharmacol Ther*,2010,88(1):115—119.
- [5] WALSH T J, RAAD I, PATTERSON T F, et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: An externally controlled trial [J]. *Clinical infectious diseases*,2007,44(1):2—12.
- [6] 周利娟,汪硕闻,石卫峰,等. 干血法及其临床应用进展[J]. 中国临床药理学杂志,2019,28(4):312—316.
- [7] LI W, TSE F L. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules [J]. *Biomed Chromatogr*,2010,24(1):49—65.
- [8] ICH. Guideline M10 - bioanalytical method validation and study sample analysis [EB/OL]. 2022-05-24 [2026-02-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guidelinedatabase.ich>.
- [9] CAPIAU S, VEENHOF H, KOSTER R A, et al. Official international association for therapeutic drug monitoring and clinical toxicology guideline: Development and validation of dried blood spot-based methods for therapeutic drug monitoring [J]. *Ther Drug Monit*,2019,41(4):409—430.
- [10] HALL E M, FLORES S R, DE JESÚS V R. Influence of hematocrit and total-spot volume on performance characteristics of dried blood spots for newborn screening [J]. *Int J Neonatal Screen*, 2015,1(2):69—78.
- [11] CHENG C N, PENG Y F, CHEN J Y, et al. Development of the dried blood spot preparation protocol for comprehensive evaluation of the hematocrit effect [J/OL]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1239: 340650. 2022-11-21 [2026-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36628747/>.
- [12] DE KESEL P M, SADONES N, CAPIAU S, et al. Hemato - critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions [J]. *Bioanalysis*,2013,5(16):2023 - 2041.
- [13] VAN DER ELST KC, SPAN LF, VAN HATEREN K, et al. Dried blood spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazole, fluconazole, and posaconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2013,57(10):4999—5004.
- [14] REDDY T M, TAMA C I, HAYES R N. A dried blood spots technique based LC-MS/MS method for the analysis of posaconazole in human whole blood samples [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2011,879(30):3626—3638.
- [15] SIMEOLI R, CAIROLI S, GALAVERNA F, et al. Utilization of volumetric absorptive microsampling and dried plasma spot for quantification of anti-fungal triazole agents in pediatric patients by using liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J/OL]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 236: 115688. 2023-11-30 [2026-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37683371/>.
- [16] CHENG C N, PENG Y F, CHEN J Y, et al. Development of the dried blood spot preparation protocol for comprehensive evaluation of the hematocrit effect [J/OL]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1239: 340650. 2023-01-25 [2026-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36628747/>.

(本文编辑:冀希炜 收稿日期 2026-02-11)