

# 多黏菌素 B 血药浓度的测定及其在重症患者中的应用<sup>△</sup>

甘雨\*, 喻明洁, 刘芳, 程林, 陈勇川<sup>#</sup>(陆军军医大学第一附属医院药学部, 重庆 400038)

中图分类号 R978 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)06-0704-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.06.12



**摘要** **目的** 建立测定多黏菌素 B 血药浓度的方法并应用于临床。**方法** 血浆样品经 5% 三氯乙酸溶液蛋白沉淀后, 以多黏菌素 E2 为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定多黏菌素 B1、B2 的质量浓度。以 BEH C<sub>18</sub> 为色谱柱, 以水(含 0.1% 甲酸)-乙腈(含 0.1% 甲酸)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μL。采用电喷雾离子源以多反应监测模式进行正离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  603.2→101.2(多黏菌素 B1)、595.7→101.1(多黏菌素 B2)、578.5→101.1(内标)。采用上述方法测定 79 例重症患者体内多黏菌素 B 的血药浓度, 记录患者急性肾损伤(AKI)的发生情况并分析多黏菌素 B 血药浓度与 AKI 发生的相关性。**结果** 多黏菌素 B1、B2 检测质量浓度的线性范围分别为 200~20 000、50~5 000 ng/mL( $r>0.995$ ), 定量下限分别为 200、50 ng/mL; 日内、日间精密度的 RSD 均不高于 12.06%, 平均提取回收率为 103.04%~117.44%(RSD≤10.45%), 基质效应、稳定性试验的 RSD 均不高于 7.42%。79 例患者的多黏菌素 B 稳态谷、峰浓度分别为(2.54±2.52)、(8.17±5.20)mg/L。在被纳入 AKI 评价的 27 例患者中, 有 18 例患者(66.67%)发生 AKI; 未发生 AKI 患者的多黏菌素 B 峰浓度显著低于 AKI 患者( $P<0.05$ ), 但两者谷浓度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 所建 UPLC-MS/MS 法操作简便、灵敏度高, 可用于患者体内多黏菌素 B 血药浓度的检测; 患者 AKI 的发生可能与体内多黏菌素 B 的峰浓度有关。

**关键词** 多黏菌素 B; 超高效液相色谱-串联质谱法; 血药浓度; 急性肾损伤

## Determination of polymyxin B concentration in plasma and its application in critically ill patients

GAN Yu, YU Mingjie, LIU Fang, CHENG Lin, CHEN Yongchuan (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish a method for the determination of polymyxin B concentration in plasma and apply it to clinical practice. **METHODS** After precipitated with 5% trichloroacetic acid solution, using polymyxin E2 as internal standard, the concentrations of polymyxin B1 and B2 in plasma sample were determined by UPLC-MS/MS. The determination was performed on BEH C<sub>18</sub> chromatographic column with water (0.1% formic acid)-acetonitrile (0.1% formic acid) as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The sample size was 10 μL. The detection was accomplished with electrospray ionization operated in positive ion scanning by multi-reaction monitoring mode. The ion pairs for quantitative analysis were  $m/z$  603.2→101.2 (polymyxin B1),  $m/z$  595.7→101.1 (polymyxin B2) and  $m/z$  578.5→101.1 (internal standard). The plasma concentration of polymyxin B in 79 critically ill patients was measured by the above method, the occurrence of acute renal injury (AKI) was recorded and the relationship of polymyxin B concentration in plasma with AKI was analyzed. **RESULTS** The linear ranges of polymyxin B1 and polymyxin B2 were 200-20 000, 50-5 000 ng/mL ( $r>0.995$ ), and the lower limits of quantification were 200 and 50 ng/mL, respectively. RSDs of intra-day and inter-day precision tests were not higher than 12.06%, the average extraction recovery was 103.04%-117.44%, and RSDs of matrix effect test and stability test were all not higher than 7.42%. Steady state trough and peak plasma concentration were (2.54±2.52) and (8.17±5.20) mg/L for 79 clinical patients using polymyxin B. Eighteen patients out of 27 included patients developed AKI, with an incidence of 66.67%. The peak concentration of polymyxin B of patients without AKI was significantly lower than that of patients with AKI ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference in the trough concentration between two groups ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS** The established UPLC-MS/MS has the advantages of simple operation and high sensitivity, and can be used to monitor the plasma concentration of polymyxin B in patients. The occurrence of AKI is correlated with the peak concentration of polymyxin B.

**KEYWORDS** polymyxin B; UPLC-MS/MS; plasma concentration; acute renal injury

△ 基金项目 重庆市科卫联合医学科研项目(No.2019ZDXM052)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 体内药物分析。E-mail: 276132043@qq.com

# 通信作者 副主任药师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 抗菌药物临床药理学。电话: 023-68754462。E-mail: zwmcy@163.com

多黏菌素是多黏类芽孢杆菌发酵的一类产物, 其中多黏菌素 B 的应用较为广泛。多黏菌素 B 由 30 多种脂肽组成, 主要成分为多黏菌素 B1 和 B2<sup>[1-2]</sup>, 可用于耐药铜绿假单胞菌感染的临床治疗<sup>[3]</sup>。由于多黏菌素所致肾

毒性和神经毒性发生率较高,因此随着氨基糖苷类药物(庆大霉素)以及第二、三代头孢菌素的问世,该药逐渐被替代<sup>[4]</sup>。近年来,多重耐药革兰氏阴性菌感染的防治已成为全球性的临床难题<sup>[5-6]</sup>,而几乎对所有耐碳青霉烯类革兰氏阴性菌均具有良好抑制活性的多黏菌素类药物重新受到临床的重视,并成为了多重耐药革兰氏阴性菌感染治疗的最后一道防线<sup>[7]</sup>。

临床实践显示,多黏菌素治疗窗窄,其常见不良反应包括肾毒性和神经毒性,以肾毒性最为常见,主要表现为急性肾损伤(acute renal injury, AKI)<sup>[8]</sup>。相关指南建议当多黏菌素类药物对病原菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)≤2 mg/L时,多黏菌素B的稳态血药浓度应维持在2~4 mg/L<sup>[2,9]</sup>。体外抗菌实验发现,多黏菌素易诱导耐药<sup>[2]</sup>,而达到有效的血药浓度是预防耐药菌产生的有效措施;同时,接受多黏菌素治疗的患者多为重症患者,早期达到有效治疗浓度是其治疗成功的关键,因此在治疗过程中进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)显得尤为必要<sup>[10]</sup>。超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)技术以特定的离子对作为信号记录对象,具有专属性强、灵敏度高的特点,是临床TDM的“金标准”<sup>[11]</sup>。本研究拟采用UPLC-MC/MC法测定人血浆中多黏菌素B1和B2的血药浓度,同时采用该法检测接受多黏菌素B治疗的重症患者的稳态峰、谷浓度,以分析用药剂量和血药浓度的分布情况,并初步评价血药浓度与AKI发生的相关性,旨在为临床安全用药提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC-30 AD型超高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司)、AB SCIEX Qtrap 5500型三重四极杆串联质谱仪(美国AB Sciex公司)、Biofuge primo R型低温离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Milli-Q plus型超纯水仪(美国Millipore公司)、GENIUS型涡流混匀器(德国IKA公司)、BP211DD型电子天平(德国Sartorius公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

多黏菌素B1对照品(批号P037-01BL,纯度93.431%)、多黏菌素B2对照品(批号P039-01,纯度92.757%)、多黏菌素E2对照品(内标,批号P056E2,纯度92.294%)均购自美国TOKU-E公司;乙腈、甲酸均为色谱纯,三氯乙酸为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 空白血浆

健康人空白血浆由陆军军医大学第一附属医院输血科提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 以BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)为色谱柱,以水(含0.1%甲酸)为流动相A、乙腈(含

0.1%甲酸)为流动相B进行梯度洗脱(0.01~1.0 min, 10%B; 1.0~2.0 min, 10%B→70%B; 2.0~3.0 min, 70%B→90%B; 3.0~3.1 min, 90%B→10%B; 3.1~5.0 min, 10%B);流速为0.5 mL/min;柱温为40 °C;自动进样器温度为4 °C;进样量为10 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)以多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM)模式进行正离子扫描;离子源电压为5 500 V;离子源温度为550 °C;用于定量分析的离子对分别为m/z 603.2→101.2(多黏菌素B1)、m/z 595.7→101.1(多黏菌素B2)、m/z 578.5→101.1(内标);多黏菌素B1、B2和内标的去簇电压分别为116.0、120.0、106.2 V,碰撞能量分别为36.3、36.0、34.1 eV。多黏菌素B1、B2和内标的质谱图见图1。

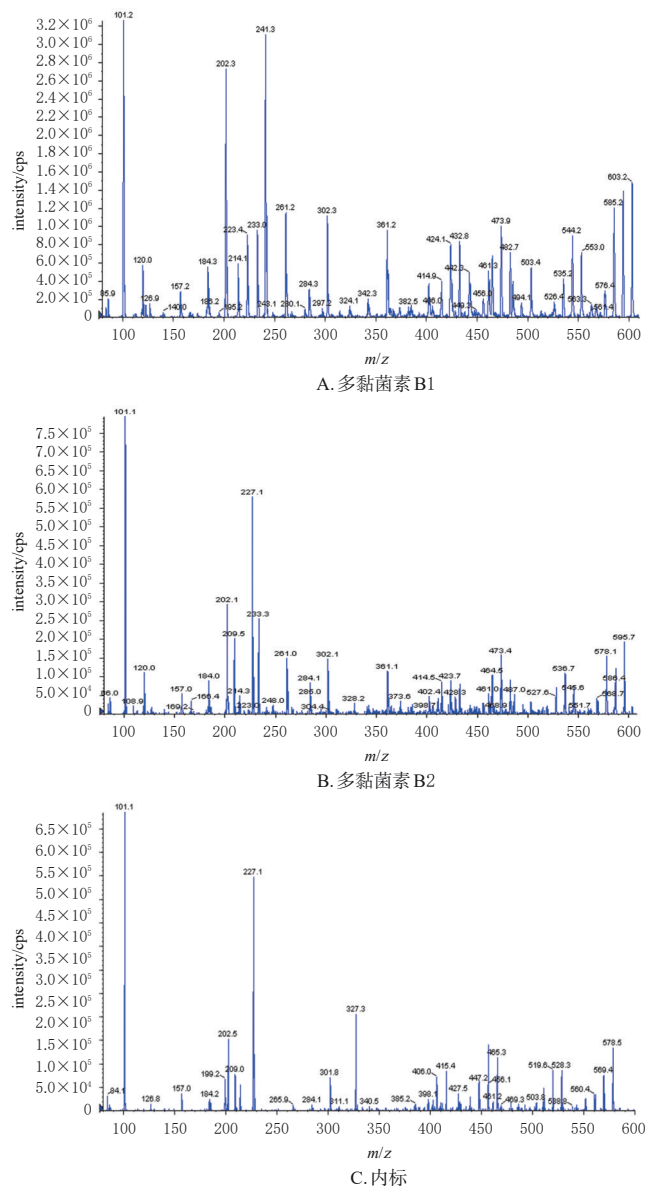


图1 多黏菌素B1、B2和内标的质谱图

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取多黏菌素B1、B2对照品,分别用0.2%甲酸溶液溶解并定容,制得多黏菌素B1、B2

质量浓度均为1.00 mg/mL的单一对照品溶液。

2.2.2 内标工作液 精密称取内标对照品,用0.2%甲酸溶液溶解并定容,制得内标质量浓度为1.00 mg/mL的储备液;取上述储备液适量,用0.2%甲酸溶液稀释,制得质量浓度为5 000 ng/mL的内标工作液。

2.2.3 标准曲线血浆样品和质控血浆样品 取“2.2.1”项下各单一对照品溶液,用0.2%甲酸溶液稀释,制得多黏菌素B1质量浓度分别为5.00、10.0、25.0、50.0、100、250、500 mg/L和多黏菌素B2质量浓度分别为1.25、2.50、6.25、12.5、25.0、62.5、125 mg/L的标准系列溶液,以及多黏菌素B1质量浓度分别为5.00、10.0、50.0、400 mg/L和多黏菌素B2质量浓度分别为1.25、2.50、12.5、100 mg/L的质控溶液。取上述标准系列溶液和质控溶液20  $\mu$ L,加入空白血浆480  $\mu$ L,制得多黏菌素B1质量浓度分别为200、400、1 000、2 000、4 000、10 000、20 000 ng/mL和多黏菌素B2质量浓度分别为50、100、250、500、1 000、2 500、5 000 ng/mL的系列标准曲线血浆样品,以及多黏菌素B1质量浓度分别为200、400、2 000、16 000 ng/mL和多黏菌素B2质量浓度分别为50、100、500、4 000 ng/mL的质控血浆样品。

### 2.3 血浆样品预处理方法

取血浆样品200  $\mu$ L,加入“2.2.2”项下内标工作液20  $\mu$ L,加入5%三氯乙酸溶液150  $\mu$ L,混匀2 min,以15 000 r/min离心20 min,取上清液120  $\mu$ L,加入水(含0.5%甲酸)360  $\mu$ L稀释,再次混匀2 min,以15 000 r/min离心5 min,取上清液进样测定。

### 2.4 方法学考察

参照2020年版《中国药典》(四部)通则“9012”<sup>[12]</sup>对方法的专属性、线性关系、定量下限、精密度、准确度、稳定性、回收率、基质效应进行验证。

2.4.1 专属性考察 取6个不同来源的空白血浆200  $\mu$ L,加入0.2%甲酸溶液(不含内标)20  $\mu$ L,按“2.3”项下“加入5%三氯乙酸溶液150  $\mu$ L……取上清液”操作,再按“2.1”项下检测条件进样分析,记录色谱图(图2A)。取“2.2.3”项下系列标准曲线血浆样品200  $\mu$ L(多黏菌素B1、B2质量浓度分别为200、50 ng/mL),按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下检测条件进样分析,记录色谱图(图2B)。取患者给药前后的血浆样品,分别按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下检测条件进样分析,记录色谱图(图2C、图2D)。结果显示,多黏菌素B1、B2和内标的保留时间均约为2.7 min,不同来源的空白血浆在待测成分保留时间附近均无干扰峰出现,表明在上述检测条件下,空白血浆中的内源性物质不干扰多黏菌素B1、B2和内标的测定,方法专属性良好,符合生物样品定量分析要求<sup>[12]</sup>。

2.4.2 线性关系和定量下限考察 取“2.2.3”项下系列标准曲线血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”

项下检测条件进样分析,记录峰面积。以待测成分的质量浓度为横坐标( $x$ )、待测成分与内标的峰面积比值为纵坐标( $y$ ),采用加权最小二乘法(权重系数为 $1/x^2$ )进行线性回归。结果显示,多黏菌素B1的回归方程为 $y=0.000\ 783x-0.009\ 61$ ( $r=0.997\ 8$ ),检测质量浓度的线性范围为200~20 000 ng/mL,定量下限为200 ng/mL;多黏菌素B2的回归方程为 $y=0.001\ 96x+0.010\ 1$ ( $r=0.995\ 6$ ),检测质量浓度的线性范围为50~5 000 ng/mL,定量下限为50 ng/mL。

2.4.3 精密度与准确度试验 取“2.2.3”项下定量下限质量浓度(多黏菌素B1、B2质量浓度分别为200、50 ng/mL)和低、中、高质量浓度(多黏菌素B1质量浓度分别为400、2 000、16 000 ng/mL,B2为100、500、4 000 ng/mL,下同)的质控血浆样品,各质量浓度平行5份,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下检测条件进样分析,考察日内精密度;连续测定3 d,考察日间精密度。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,以相对误差(relative error, RE)考察准确度。结果显示,多黏菌素B1日内( $n=5$ )、日间( $n=15$ )精密度的RSD均不高于7.21%,RE为-8.30%~3.38%;多黏菌素B2日内( $n=5$ )、日间( $n=15$ )精密度的RSD均不高于12.06%,RE为-10.88%~-1.20%。结果见表1。

2.4.4 提取回收率 取“2.2.3”项下低、中、高质量浓度质控血浆样品,各质量浓度平行5份,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下检测条件进样分析,记录峰面积( $A$ )。另取空白血浆,按“2.3”项下方法处理(不加内标)后,取上清液作为空白基质,加入一定质量浓度的多黏菌素B1、B2对照品溶液和内标工作液,使最终质量浓度分别与低、中、高质量浓度质控血浆样品对应,各质量浓度平行5份,按“2.1”项下检测条件进样分析,记录峰面积( $B$ )。按下式计算提取回收率:提取回收率= $A/B\times 100\%$ 。结果显示,多黏菌素B1、B2的平均提取回收率分别为103.04%~111.45%、111.73%~117.44%,RSD均不高于10.45%( $n=5$ )。结果见表2。

2.4.5 基质效应 分别取不同来源的空白血浆200  $\mu$ L,按“2.3”项下方法处理(不加内标)后,取上清液作为空白基质,加入一定质量浓度的多黏菌素B1、B2对照品溶液和内标工作液,使最终质量浓度分别与低、高质量浓度质控血浆样品对应各质量浓度平行5份,按“2.1”项下检测条件进样分析,记录峰面积( $C$ )。另按“2.2.3”项下方法用0.2%甲酸溶液替代空白血浆制备与上述质量浓度对应的多黏菌素B1、B2对照品溶液和内标工作液,按“2.1”项下检测条件进样分析,记录峰面积( $D$ )。按下式计算多黏菌素B1、B2和内标的基质效应因子:基质效应因子= $C/D\times 100\%$ 。以多黏菌素B1、B2与内标基质效应因子的比值作为内标归一化基质效应因子。结果显示,多黏菌素B1、B2内标归一化基质效应因子的RSD均不高于7.42%( $n=5$ )。结果见表2。

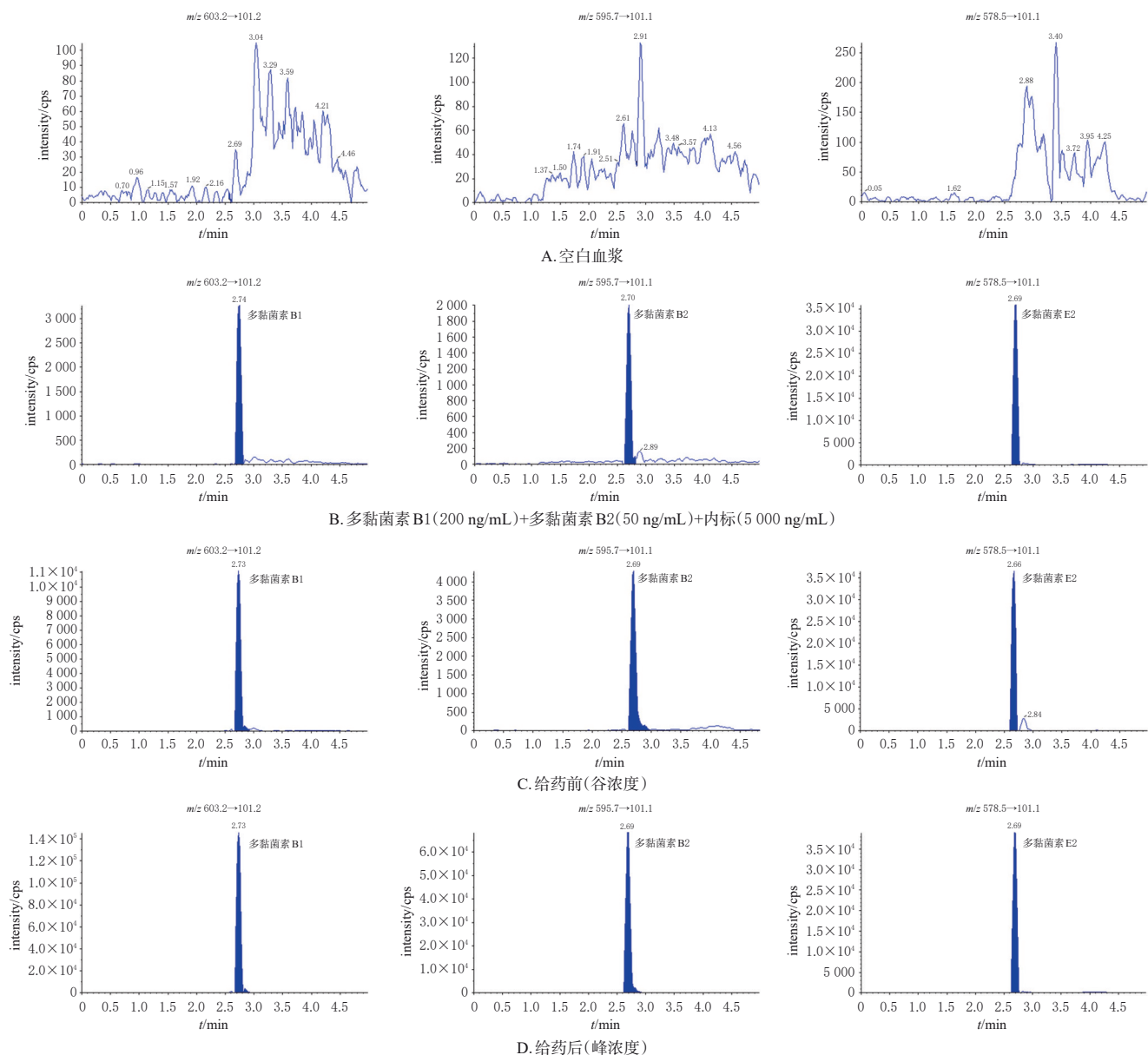


图2 多黏菌素B1、B2和内标的典型MRM图

表1 多黏菌素B1和B2的精密度与准确度试验结果

待测成分	理论质量浓度/ (ng/mL)	日内(n=5)			日间(n=15)		
		实测质量浓度/ (ng/mL)	精密度 RSD/%	RE/ %	实测质量浓度/ (ng/mL)	精密度 RSD/%	RE/ %
多黏菌素B1	200	203.40 ± 14.76	7.21	1.70	192.87 ± 13.30	6.90	-3.57
	400	384.40 ± 23.13	6.02	-3.90	373.40 ± 21.55	5.77	-6.65
	2 000	1 834.00 ± 75.70	4.13	-8.30	1 886.67 ± 106.75	5.66	-5.67
	16 000	16 540.00 ± 527.26	3.19	3.38	15 800.00 ± 778.28	4.93	-1.25
多黏菌素B2	50	46.20 ± 5.57	12.06	-7.60	44.56 ± 4.37	9.81	-10.88
	100	89.90 ± 6.92	7.70	-10.10	90.99 ± 5.45	5.99	-9.01
	500	466.20 ± 12.52	2.69	-6.76	458.80 ± 20.11	4.38	-8.24
	4 000	3 952.00 ± 113.23	2.87	-1.20	3 811.33 ± 177.03	4.64	-4.72

表2 多黏菌素B1和B2的提取回收率和基质效应试验结果(n=5)

待测成分	理论质量浓度/(ng/mL)	提取回收率/%		内标归一化基质效应因子/%	
		$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
多黏菌素B1	400	105.39 ± 7.95	7.54	109.61 ± 8.14	7.42
	2 000	111.45 ± 9.81	8.80		
	16 000	103.04 ± 3.54	3.43	109.57 ± 4.43	4.05
	多黏菌素B2	100	114.01 ± 6.98	6.13	114.81 ± 7.71
多黏菌素B2	500	117.44 ± 12.27	10.45		
	4 000	111.73 ± 3.33	2.98	105.72 ± 3.88	3.67
	内标	5 000	107.78 ± 12.85	11.92	

2.4.6 稳定性考察 按“2.2.3”项下方法制备低、高质量浓度的质控血浆样品,各质量浓度平行3份,分别于室温放置24 h、进样器(4 °C)放置27 h、反复冻融(-70 °C~室温)3次、-70 °C放置38 d后,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下检测条件进样分析,考察上述不同条件下

各样品的稳定性。结果显示,各样品在上述不同条件下的稳定性良好,RSD均不高于7.29%。

## 2.5 临床应用

2.5.1 纳入与排除标准 本研究的纳入标准为:(1)诊断为多重耐药革兰氏阴性菌感染;(2)采用多黏菌素B治疗,每天给药2次,连续2 d共4剂以上且已达稳态血

药浓度；(3)同意参加试验并已签署知情同意书。排除研究者认为不适合参加本研究的任何情况。

2.5.2 资料来源 收集2021年7月—2022年9月陆军军医大学第一附属医院收治的接受多黏菌素B静脉滴注的79例多重耐药革兰氏阴性菌感染重症患者,其中男性61例、女性18例,年龄(54.04±19.92)岁。本研究方案经该院医学伦理委员会审核批准,批件号为(A)KY2021064。

2.5.3 用药情况、检测方法及检测结果 注射用硫酸多黏菌素B(上海上药第一生化药业有限公司,国药准字H31022631,规格50万单位)的用法用量为50、75、100万单位,q12h,静脉滴注。待患者血药浓度达到稳态后,于下次给药前即刻和给药后即刻分别采集患者静脉血约2 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝管中,以3 500 r/min离心5 min,取上层血浆,置于EP管中,于-70℃保存,备用。取血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下检测条件进样分析,记录峰面积并根据随行标准曲线计算患者血浆中多黏菌素B的谷、峰浓度:多黏菌素B的血药浓度=(多黏菌素B1血药浓度/多黏菌素B1摩尔浓度+多黏菌素B2血药浓度/多黏菌素B2摩尔浓度)×多黏菌素B平均摩尔浓度。结果显示,79例患者多黏菌素B的谷、峰浓度分别为(2.54±2.52)、(8.17±5.20)mg/L。结果见表3。

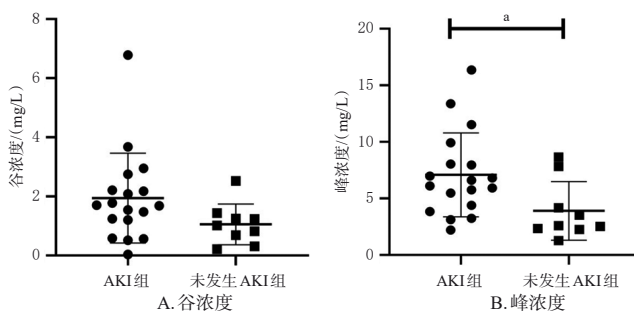
表3 不同剂量多黏菌素B的血药浓度检测结果

例数	给药剂量/单位	谷浓度( $\bar{x}\pm s$ )/(mg/L)	峰浓度( $\bar{x}\pm s$ )/(mg/L)
17	50万	2.48±2.56	6.57±4.18
24	75万	2.08±2.03	8.35±6.73
38	100万	2.85±2.77	8.77±4.44

2.5.4 AKI评价 因部分重症患者在接受多黏菌素B治疗前已存在肾脏功能不全,故先按如下标准纳入拟评价AKI的患者:(1)接受多黏菌素B治疗时肾小球滤过率 $\geq 80$  mL/min;(2)年龄 $> 18$ 岁;(3)住院期间未行连续肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy, CRRT)。AKI发生的评价标准如下:(1)血清肌酐水平48 h增加 $\geq 26.5$   $\mu\text{mol/L}$ ;(2)7 d内血清肌酐水平增加到基线值的1.5倍及以上;(3)每小时尿量小于0.5 mL/kg并且持续超过6 h<sup>[13]</sup>。

根据上述标准,79例患者中,27例被纳入AKI评价。结果显示,在这27例患者中,有18例患者(66.67%)发生了AKI。按是否发生AKI分为AKI组(18例)与未发生AKI组(9例)。采用SPSS 25.0软件对两组患者多黏菌素B的谷、峰浓度检测结果进行Mann-Whitney *U*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,未发生AKI组患者的谷、峰浓度分别为(1.06±0.69)、(3.91±2.59) mg/mL, AKI组患者的谷、峰浓度分别为(1.94±1.52)、(7.09±3.71) mg/L;未发生AKI组患者的峰浓度显著低于AKI组( $P=0.023$ ),而两组患者的谷浓度比较差异无统计学意

义( $P=0.067$ )。这表明AKI的发生与多黏菌素B的峰浓度具有相关性。结果见图3。



a: 与AKI组比较, $P<0.05$

图3 两组患者多黏菌素B谷、峰浓度分布图

### 3 讨论

#### 3.1 分析方法优化

多黏菌素B是一种多肽类物质,可在ESI正离子(ESI<sup>+</sup>)模式下表现出较强的响应度和满意的灵敏度<sup>[14]</sup>。本课题组前期发现,[M+2H]<sup>2+</sup>碎裂方式(多黏菌素B1  $m/z$  603.2→101.2、多黏菌素B2  $m/z$  595.7→101.1)有丰富的母离子信息和灵敏、稳定的碎片离子信息,故以 $m/z$  603.2→101.2、 $m/z$  595.7→101.1作为2种成分的定量离子对。同时,多黏菌素B是一种极性化合物,文献报道采用C<sub>18</sub>柱能获得最佳分离效能<sup>[15-16]</sup>。本课题组前期比较了ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ , 美国Agilent公司)、Shim-pack GIST C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 3  $\mu\text{m}$ , 日本Shimadzu公司)和BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国Waters公司)3种色谱柱的分离效果,结果显示,BEH C<sub>18</sub>的分离效果最好,且分析时间较短,适合临床血药浓度的高通量监测。

血浆样品预处理方法包括液-液萃取法、固相萃取法和蛋白沉淀法等<sup>[17]</sup>。液-液萃取法不适用于多黏菌素B这类水溶性物质;而与蛋白沉淀法相比,固相萃取法操作繁琐、耗时较长,不适用于临床大样本分析;因此,本研究选择蛋白沉淀法对多黏菌素B血浆样本进行前处理。本课题组前期研究发现,选择有机试剂(如乙腈)进行蛋白沉淀,存在明显的基质效应,故经查阅相关文献<sup>[15]</sup>和预实验,本研究选择5%三氯乙酸溶液为沉淀剂,当血浆样品与5%三氯乙酸溶液的体积比为4:3时,血浆蛋白沉淀效果较好,基质效应符合相关要求<sup>[12]</sup>,并能获得较好的峰形和较高的灵敏度。

#### 3.2 临床应用结果分析

多黏菌素B的临床应用剂量主要依据患者体质量调整<sup>[18]</sup>。本研究中,患者个体间多黏菌素B的谷、峰浓度差异较大,分析原因可能是患者病情危重、合并用药多、肝肾功能异常、生理状况复杂,加之多黏菌素B具有较高的蛋白结合率<sup>[19]</sup>,使得患者体内血药浓度个体差异明显。同时本研究结果显示,经多黏菌素B治疗后,有18例(66.67%)患者发生了AKI,该结果高于其他研究报告

(45%)<sup>[20]</sup>,分析原因可能与本研究纳入的样本量较小、样本来源存在偏倚有关。AKI组与未发生AKI组患者的血药浓度比较结果显示,AKI的发生与多黏菌素B的峰浓度相关,该结果与其他研究结果<sup>[21]</sup>基本一致。多黏菌素B的肾毒性制约了该药在多重耐药革兰氏阴性菌感染治疗中的应用,但由于本研究纳入的样本量较小,因此谷、峰浓度与多黏菌素致肾毒性发生的关联性还有待进一步分析。

综上所述,本研究建立了测定多黏菌素B血药浓度的UPLC-MS/MS法,并用于检测患者体内多黏菌素B的血药浓度;AKI的发生可能与多黏菌素B的峰浓度具有相关性。

### 参考文献

[1] NANG S C, AZAD M A K, VELKOV T, et al. Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(2):679-728.

[2] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会,中华医学会呼吸病学分会,中华医学会重症医学分会,等.中国多黏菌素类抗菌药物临床合理应用多学科专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2021, 44(4):292-310.

[3] Antibiotics: VI: neomycin, polymyxin B, bacitracin and tyrothricin[J]. *N Engl J Med*, 1958, 258(24):1213-1215.

[4] YANG Q W, POGUE J M, LI Z K, et al. Agents of last resort: an update on polymyxin resistance[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2020, 34(4):723-750.

[5] WILLYARD C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats[J]. *Nature*, 2017, 543(7643):15.

[6] HU F P, GUO Y, YANG Y, et al. Resistance reported from China antimicrobial surveillance network(CHINET) in 2018[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(12):2275-2281.

[7] RABANAL F, CAJAL Y. Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins[J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(7):886-908.

[8] JUSTO J A, BOSSO J A. Adverse reactions associated with systemic polymyxin therapy[J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35(1):28-33.

[9] 中国研究型医院学会危重医学专业委员会,中国研究型医院学会感染性疾病循证与转化专业委员会.多黏菌素临床应用中国专家共识[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(10):1194-1198.

[10] 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 Di-

seases Pharmacists (SIDP)[J]. *Pharmacotherapy*, 2019, 39(1):10-39.

[11] KAUFMANN A. High-resolution mass spectrometry for bioanalytical applications: is this the new gold standard? [J]. *J Mass Spectrom*, 2020;55(9):e4533.

[12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:466-472.

[13] Section 2: AKI definition[J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2012,2(1):19-36.

[14] MENG M, WANG L, LIU S, et al. Simultaneous quantitation of polymyxin B1, polymyxin B2 and polymyxin B1-1 in human plasma and treated human urine using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1012/1013:23-36.

[15] HEE K H, LEAW Y K J, ONG J L, et al. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method quantitative determination of polymyxin B1, polymyxin B2, polymyxin B3 and isoleucine-polymyxin B1 in human plasma and its application in clinical studies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140:91-97.

[16] COVELLI J, RUSZAJ D, STRAUBINGER R, et al. The development and validation of a simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for polymyxin B1 and B2 quantification in different matrices [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1065/1066:112-118.

[17] 董金材,曾麟栖,王曦,等.生物样品前处理技术在药动学研究中的应用进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(1):110-117.

[18] SANDRI A M, LANDERSDORFER C B, JACOB J, et al. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(4):524-531.

[19] ZAVASCKI A P, GOLDANI L Z, CAO G Y, et al. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(10):1298-1304.

[20] SISAY M, HAGOS B, EDESSA D, et al. Polymyxin-induced nephrotoxicity and its predictors: a systematic review and meta-analysis of studies conducted using RIFLE criteria of acute kidney injury[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163:105328.

[21] DENG Y, GU J Y, LI X, et al. Does monitoring total and free polymyxin B1 plasma concentrations predict polymyxin B-induced nephrotoxicity? A retrospective study in critically ill patients[J]. *Infect Dis Ther*, 2022, 11(4):1591-1608.

(收稿日期:2022-10-25 修回日期:2023-02-06)  
(编辑:陈宏)