

超高效液相色谱质谱联用法测定人痰液中抗结核药物乙胺丁醇和阿米卡星浓度

黄中依^{1,2}, 贾小芳¹, 席秀红¹, 焦萍², 尹林¹, 孙涛¹, 张丽军^{1*} (1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 湖北理工学院化学与化工学院, 湖北 黄石 435000)

摘要:目的 建立超高效液相色谱串联质谱法测定人痰液中乙胺丁醇(ethambutol, EMB)和阿米卡星(amikacin, AMK)2种抗结核药物浓度的检测方法,为指导临床用药提供帮助。方法 痰液样品经磷酸盐缓冲液(PBS)稀释匀浆后采用蛋白质沉淀法进行样品提取后进样分析。以含0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液(80:20)为流动相,流速 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,采用ACQUITY UPLC HSS T3 column柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$)分离;采用电喷雾电离源,以多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描模式进行正离子检测。结果 测定痰液中 EMB 和 AMK 分别在 $48\sim 12\ 000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.997\ 8$)、 $320\sim 80\ 000$ ($r=0.999\ 5$) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。日内和日间精密密度均小于9.2%,提取回收率处于96.65%~106.35%之间。同时该方法成功用于5例临床患者痰液样本分析,乙胺丁醇的浓度为 $148.5\sim 919\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,未服用阿米卡星。结论 该方法快速简便,灵敏度高,测定结果可靠,已能够服务于临床治疗药物监测。

关键词:乙胺丁醇;阿米卡星;结核;液质联用;痰液

doi:10.11669/cpj.2019.13.010 中图分类号:R969;R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)13-1092-07

Simultaneous Quantification of Ethambutol and Amikacin in Human Sputum by HPLC-MS/MS

HUANG Zhong-yi^{1,2}, JIA Xiao-fang¹, XI Xiu-hong¹, JIAO Ping², YIN Lin¹, SUN Tao¹, ZHANG Li-jun^{1*} (1. Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an LC-MS method for simultaneously quantifying two anti-tuberculosis drugs (ethambutol and amikacin) in human sputum thus to help guide clinical medication. **METHODS** The drugs in sputum were extracted by acetonitrile precipitation, and separated on ACQUITY UPLC HSS T3 column ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$) with mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) (80:20) at a flow rate of $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Multiple reaction monitoring (MRM) was performed in positive ionization mode with electrospray ionization source. **RESULTS** The liner calibration curves of ethambutol and amikacin were obtained in the concentration ranges of $48\sim 12\ 000$ ($r=0.997\ 8$) and $320\sim 80\ 000$ ($r=0.999\ 5$) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The intra- and inter-day precision RSD was less than 9.2% and the absolute recovery was between 96.65% and 106.35%. This method was successfully applied to analyze the drugs in sputum from five clinical samples, the concentration of ethambutol was 148.5 to $919\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, and no amikacin was detected. **CONCLUSION** The method is rapid, simple, sensitive and accurate, and can be applied to the therapeutic drug monitoring of ethambutol and amikacin.

KEY WORDS: ethambutol; amikacin; tuberculosis; LC-MS; sputum

结核病是一种严重危害人类健康的慢性传染病,可侵及许多脏器,主要以肺部结核感染为主。2016年全球新发结核病约1 040万例,死于结核病约130万例。我国2016年的新发肺结核人数为89.5万,占全球的8.6%。尽管异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇(ethambutol, EMB)(4种一线抗结核药)可以有效治疗结核病,但仍有部分患者

难以治愈,仅约87%的新发患者和41%的利福平耐药患者治疗成功^[1]。

导致患者治疗失败的主要原因是耐药甚至耐多药结核菌的产生。导致耐药的一个重要原因则是药物浓度低于有效治疗浓度。据目前研究,在耐药患者中,有约60%患者的二线药物的血药浓度低于治疗窗^[2-4]。可能的原因有药物-药物相互作用,患者

作者简介:黄中依,男,学士 研究方向:药动学 * 通讯作者:张丽军,女,博士,研究员 研究方向:药动学 Tel:(021)37990333-5368 E-mail:zhanglijun1221@163.com

个体代谢的差异等^[5]。导致治疗失败的另一个原因在于药物的毒副作用引起的依从性差甚至停药。如异烟肼、利福平等容易损害肝脏^[6],链霉素、卡那霉素(别名:阿米卡那霉素)、卷曲霉素损害肾脏功能^[7-8]。而药物毒副作用的很大一部分原因是药物过量。

对于这些药量不足或者过量的患者需要调整用药剂量,治疗药物监测(TDM)为调整临床用药剂量提供了快速直接的依据,已经成为结核治疗中的一个新的发展方向^[8]。目前结核耐药检测主要依靠痰培养方法,该方法所需时间较长,造成了对疗效的判断相对滞后。而TDM方法具有快速、通量大等优点更利于个体化给药研究的临床推广。在抗结核药物中,仅有文献^[9]报道血液中EMB、利福平、吡嗪酰胺几个药物测定的高效液相色谱(HPLC)或者液相色谱串联质谱(LC-MS)方法。

尽管基于血液的TDM能够从侧面快速地了解药物在体内的浓度情况^[10],然后由于肌体天然屏障的存在,血液中的药物浓度不能准确反映病灶(如结核患者肺部空洞)中药物浓度。痰液直接与结核肺部空洞相连,痰中药物浓度可能与结核空洞中的药物浓度一致^[11],与肺部疾病的疗效密切相关^[12]。在一项针对慢阻肺病(COPD)患者的阿莫西林研究中发现,在78%患者痰液中阿莫西林的药物浓度小于90%最小抑菌浓度(MIC₉₀),血中只有30%的患者小于MIC₉₀^[13]。患者痰液中阿莫西林的浓度大于MIC₉₀者其平均住院天数为7d,其住院天数比浓度小于MIC₉₀的患者少3d^[12]。因此,痰液中药物浓度不等同于血液中的,且其对结核耐药的预测与个体化用药的指导可能比血液中更有帮助。

然而目前笔者尚未见痰液中抗结核药物浓度检测方法报道,发展高灵敏、高通量的针对痰液中多种药物的抗结核药物同时定量的方法对指导结核患者的个体化给药具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(包括二维溶液管理系统、样品管理系统和柱温控制系统,美国Waters公司);API5500三重串联四极杆质谱仪,电喷雾电离源(ESI)以及Analyst 1.4.1数据处理系统(美国Applied Biosystems公司);Eppendorf 5415R低温高速离心机(德国艾本德公司)。

1.2 药品和试剂

盐酸EMB对照品(纯度为100%,批号:HZM489,美国药典会);阿米卡星(amikacin, AMK)对照品(纯度为74.91%,批号:200204,中国药品生物制品检定所);乙胺丁醇-*d*₄(EMB-*d*₄)对照品(化学纯度为98%,同位素纯度为99.3%,批号:1-WEN-51-4,加拿大多伦多研究化学);硫酸安普霉素(APM)对照品(89.6%,硫酸占27.2%,批号:31205-2017-3-24,德国DR公司);乙腈和甲酸为色谱纯。

1.3 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm column (2.1 mm × 100 mm, Waters公司); Serial No: 01883629135161(美国Waters公司);流动相:A:0.1%甲酸水溶液;B:0.1%甲酸乙腈;流速:0.35 mL · min⁻¹;柱温:35 °C;分析时间为每个样品5 min,进样量为2 μL,采用自动进样方式。

1.4 质谱条件

电喷雾电离源(ESI),正离子扫描,源喷射电压:5 500 V,温度:550 °C,碰撞气Medium,气帘气275.8 kPa,离子源气体1为413.7 kPa,离子源气体2为413.7 kPa,扫描方式为MRM,每种化合物的质谱仪扫描参数见表1。

1.5 储备液、工作液、质控样品和内标的制备

分别精密称取EMB 106.79 mg和AMK对照品16.28 mg分置于10 mL量瓶中,加入纯水定容至10 mL。精密量取各溶液适量混合加入体积分数20%甲醇制备成混合对照品溶液,最后用体积分数20%

表1 盐酸乙胺丁醇(EMB)、盐酸乙胺丁醇-*d*₄(EMB-*d*₄)、阿米卡星(AMK)及硫酸安普霉素(APM)质谱扫描参数

Tab. 1 MS Scanning parameters for the EMB, EMB-*d*₄, AMK and APM

Compounds	Q1	Q3	DP/volts	CE/volts	t/ms
EMB	205.1	116.1	70	19	100
EMB- <i>d</i> ₄	209.1	120.2	57	20	100
AMK	586.3	425.3	50	25	100
APM	540.1	217.1	16	33	100

甲醇梯度稀释得系列混合标准工作液,工作液的质量浓度为:EMB:120、48、24、12、6、3、0.96和0.48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;AMK:800、320、160、80、40、20、6.4和3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。质控样品:精密称取盐酸 EMB 21.71 mg和AMK 85.44 mg分置于10 mL量瓶中,加入纯水定容至10 mL。精密量取各溶液适量混合加入体积分数20%甲醇制备成混合对照品溶液,最后用体积分数20%甲醇梯度稀释得系列混合标准工作液,工作液的质量浓度为:EMB:96、9.6、0.96、0.48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;AMK:640、64、6.4、3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。内标工作液:精密称取APM 47.11 mg和10 mg EMB-d4分置于10 mL量瓶中,加入纯水定容至10 mL。分别量取0.5和0.2 mL上述2种内标储备液,转移至同一个10 mL量瓶中,用体积分数20%甲醇稀释,定容至10 mL,获得混合内标工作液(APM质量浓度为6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, EMB-d4为5.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.6 痰液样品处理

先匀浆使痰液液化后量取其体积,加入1.5倍体积的PBS匀浆,获得痰液样品。100 μL 痰液加入10 μL AMK和EMB混合工作液,再加入10 μL 内标工作液,加入190 μL 沉淀剂15%三氯乙酸(W/V),震荡混匀3 min,离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$, 5 min),吸取20 μL 上清,加入200 μL 稀释剂(20%乙腈,0.1%甲酸,2%七氟丁酸酐),震荡混匀3 min,再次离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$, 5 min),吸取100 μL 上清至进样瓶中,进样2 μL 。

1.7 选择性

取6个不同来源的空白痰液100 μL ,除不加对照品和内标外,其余按“1.6”项下方法操作,进行LC-MS/MS分析获得色谱图,考察空白痰液中的内源性物质是否干扰待测物及其内标的测定。

1.8 标准曲线

取空白痰液100 μL ,分别依次加入各浓度混合标准工作溶液10 μL 和混合内标溶液10 μL ,配制一系列质量浓度的标准曲线痰液样品,按“1.6”项下方法进行操作。以待测物质量浓度(ρ)为横坐标,以待测物与内标峰面积比值(A_s/A_i)为纵坐标,采用加权最小二乘法(权重因子 $1/\rho^2$)进行线性回归得到标准曲线。

1.9 精密度与准确度

取空白痰液100 μL ,用质控工作液和内标工作液各10 μL 配制2个化合物的定量下限、低、中、高4个浓度水平的质控样品,按“1.6”项下方法操作。

每个质量浓度的6份样品在同一分析批中进行分析,连续测定3个分析批,以当日的随行标准曲线计算样品的测定质量浓度,与配制的质量浓度对照,求得本方法的精密度与准确度。精密度由相对标准差(RSD)表示。

日内准确度和精密度由一个分析批中的每个质控样品浓度点的6个平行样计算得到。日间准确度和精密度由3个连续的分析批中的每个质控样品浓度点的18个平行样计算得到。

1.10 提取回收率

取空白痰液100 μL ,用质控工作液10 μL 和内标工作液10 μL 配制低、中、高3个浓度的样品,然后按“1.6”项下方法进行处理,每一浓度进行6样本分析得分析物峰面积(A_1)和对应的内标峰面积。同时另取空白痰液100 μL ,除不加对照品溶液和内标溶液外,按“1.6”项下方法操作,取190 μL 上清液,加入相应浓度的标准溶液5 μL 和内标溶液5 μL ,涡旋2 min混匀,转移100 μL 至进样瓶,2 μL 进样分析,获得相应分析物峰面积(A_2)和对应的内标峰面积。以前一种处理方法的分析物峰面积(A_1)与内标峰面积比值的平均值同后一种处理方法的分析物峰面积(A_2)与内标峰面积比值的平均值进行比值计算,得到提取回收率。

1.11 基质效应

取6份不同来源空白痰液,配制低、中、高3个浓度的样品,然后按“1.6”项下方法进行处理,每一浓度进行6样本分析得峰面积(A_3)。同时另外以流动相代替痰液,然后按“1.6”项下方法进行处理,每一浓度进行6样本分析得到峰面积(A_4)。以前一种处理方法的分析物峰面积(A_3)与内标峰面积比值的平均值同后一种处理方法的分析物峰面积(A_4)与内标峰面积比值的平均值进行比值计算,得到基质效应。

1.12 稳定性

冻融循环稳定性由测定2个浓度的质控样品(LQC、HQC)各3个平行样进行评价。经过3次冻融循环(-80 $^{\circ}\text{C}$),这些QC样品和新鲜配制的校正曲线样品同时分析,稳定性由测定值来评价。

样品制备后自动进样器(4 $^{\circ}\text{C}$)放置24 h稳定性由测定2个浓度的质控样品(LQC、HQC)各3个平行样进行评价。这些样品在处理及复溶后,在自动进样器放置24 h后,与新鲜配制的校正曲线同时进样分析,稳定性由测定值来评价。

长期冷冻存储稳定性由测定 2 个浓度的质控样品(LQC、HQC)各 3 个平行样进行评价。这些 QC 样品在冰箱中 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 25 d 后,分别与新鲜配制的校正曲线样品同时分析,稳定性由测定值来评价。

室温稳定性由测定 LQC、HQC 各 3 个平行样进行评价。这些 QC 样品在室温下放置 24 h 后,与新鲜配制的校正曲线样品同时分析,稳定性由测定值来评价。

1.13 方法学应用

在获得上海市公共卫生临床中心伦理批件后,志愿者签署知情同意书。收集 5 例结核患者的痰液

样本,并以当日的随行标准曲线测得痰液中目标药物的浓度。

2 结果

2.1 质谱分析

在选定的质谱条件下,AMK、APM、EMB 和 EMB-d4 主要生成 $[M + H]^+$ 离子峰,分别为 m/z 586.3、540.1、205.1 和 209.1。选择性对 $[M + H]^+$ 进行 MS2 产物离子全扫描质谱分析(图 1),AMK、APM、EMB 和 EMB-d4 的主要碎片离子分别为 m/z 425.3、217.1、116.1 和 120.2,将其作为多反应监测(MRM)扫描时监测的产物离子。

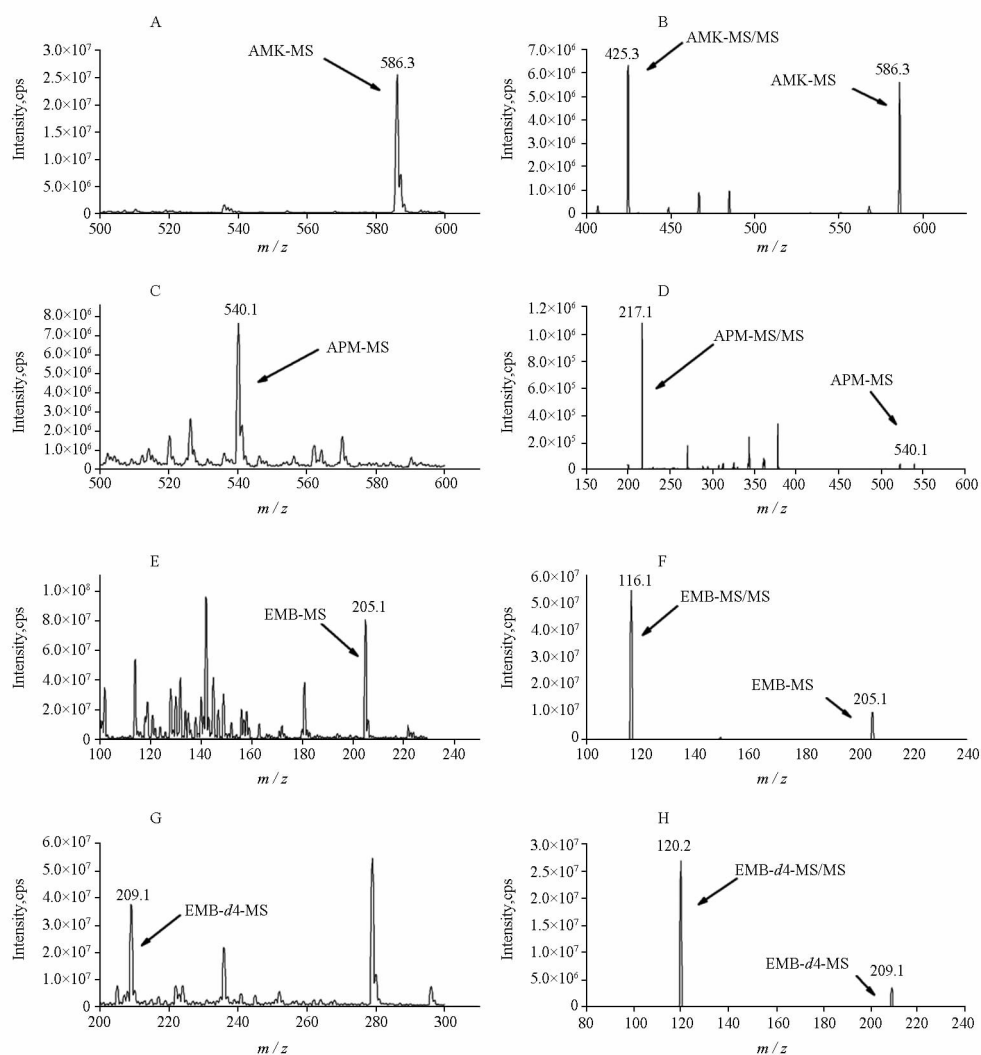


图 1 人痰液中抗结核药物及其内标的质谱图

一级质谱图:A,C,E,G:分析物的正离子峰用箭头指示;二级质谱图:B,D,F,H:箭头所指标记为-MS/MS的为各分析物的碎片离子,-MS为二级谱图中检测到的母离子

Fig. 1 The mass spectra of parent ion and product ion of antituberculosis drugs and their isotope internal standard in human sputum MS profiles: A, C, E, G, the peak of positive ion of each analysts highlighted by arrows, respectively; MS/MS profiles: B, D, F, H, the -MS/MS peak highlighted by arrows was the fragment ion of each analyst, the -MS peak of the parent ion of each analyst detected in product ion (MS2) was also highlighted by arrow in its MS/MS profile, respectively

2.2 方法学验证

2.2.1 选择性 各样品峰具有很好的分辨率,空白痰液中的内源性物质不干扰待测物和内标的测定,且同位素内标不干扰待测物的测定。空白痰液、空白痰液加待测物对照品溶液、空白痰液加内标对照品溶液及空白痰液加待测物对照品和内标对照品溶液的痰液样品色谱图,见图2。

2.2.2 标准曲线、线性范围和定量下限 用加权($W=1/\rho^2$)最小二乘法进行回归运算,求得的标准曲线的相关系数(r^2)均大于0.9900。EMB和AMK的典型回归方程分别为 $Y=0.000917\rho-0.00869$ ($r=0.9995$)和 $Y=0.00148\rho+0.0172$ ($r=0.9978$)。

其痰液药物浓度分别在48~12000和320~80000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,定量下限分别为48和320 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 精密度和准确度 本方法2种药物的日内准确度在98.93%~110.25%之间,精密度在1.8%~9.2%之间(表1)。日间准确度为99.60%~109.99%,日间精密度为2.1%~11.6%(表2)。

2.2.4 样品提取回收率 结果表明,EMB低、中、高质控样品提取回收率平均值分别为96.76%、106.53%和101.90%;AMK低、中、高质控样品提取回收率平均值分别为101.71%、108.62%和100.31%。

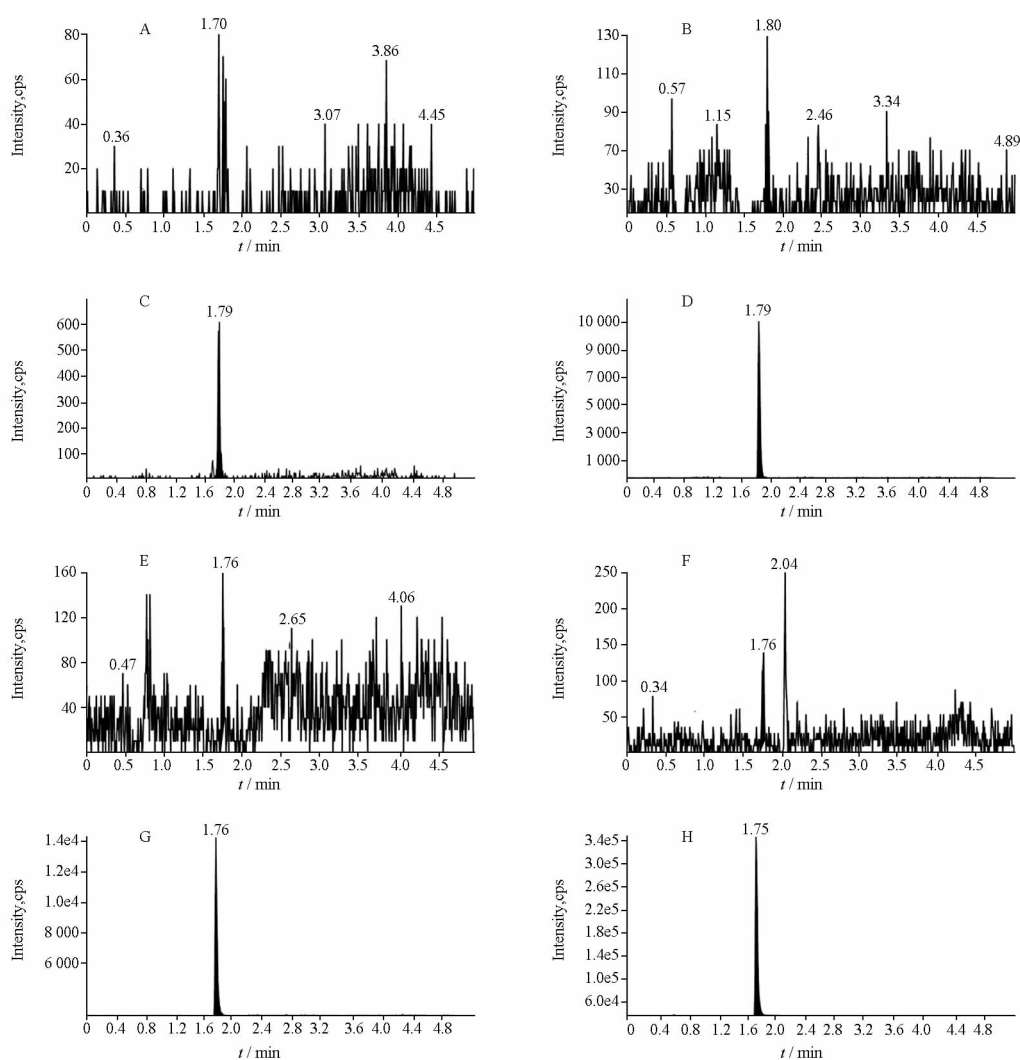


图2 AMK和EMB及其内标的多反应监测(MRM)色谱图

空白痰液提取物:A-阿米卡星;B-安普霉素;E-乙胺丁醇;F-乙胺丁醇-d4;空白痰液中加药物:C-阿米卡星0.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D-安普霉素0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;G-乙胺丁醇0.048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;H-乙胺丁醇-d4 0.596 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fig.2 MRM Chromatograms of AMK and EMB, and their internal standards

blank sputum without standards:A-AMK;B-APM;E-EMB;F-EMB-d4; blank sputum with standards:C-AMK 0.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;D-APM 0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;G-EMB 0.048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;H-EMB-d4 0.596 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

表1 痰液中 EMB 和 AMK 的日内准确度和精密度, $n=6$

Tab.1 The intra-day precision and accuracy of EMB and AMK in human sputum. $n=6$

Compound	$\rho/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		Accuracy /%	Precision /%
	Spiked	Measured		
EMB	48.99	54.0	110.23	2.4
	97.99	98.9	100.93	3.8
	979.9	983.6	100.38	1.8
	9799	9693	98.92	4.1
AMK	321.4	333.1	103.64	5.5
	642.8	611.3	95.10	9.2
	6428	6539	101.73	3.1
	64280	67490	104.99	2.9

表2 痰液中 EMB 和 AMK 的日间准确度和精密度, $n=18$

Tab.2 The inter-day precision and accuracy of EMB and AMK in human sputum. $n=18$

Compound	$\rho/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		Accuracy /%	Precision /%
	Spiked	Measured		
EMB	49	54.0	109.99	2.1
	98	98.3	100.23	2.7
	980	988	100.83	3.0
	9800	9759	99.60	4.1
AMK	320	350.9	105.18	11.6
	641	626.9	99.22	9.1
	6414	6494	100.99	3.9
	64140	66294	103.09	5.5

2.2.5 基质效应 结果表明, EMB 在低、中、高浓度经内标校准的基质效应分别为 100.38%、101.43% 和 100.75%, RSD 均小于 3.30%; AMK 在低、中、高浓度经内标校准的基质效应分别为 88.07%、100.50% 和 99.60%, RSD 均小于 6.78%。

2.2.6 稳定性 测定结果表明, 2 种抗结核药物的痰液样品室温放置 24 h、-80 °C 经过 3 次冻融循环、在 -80 °C 下放置 25 d 和自动进样器放置 24 h 均稳定, 准确度皆满足 85% ~ 115%, 精密度皆小于 9.4%, 相关数据见表 3。

2.3 临床样品分析结果

盲态分析了 5 份结核病人的痰液标本, 5 份标本中均含有抗结核药物 EMB, 不含有 AMK, 其中 EMB 质量浓度从 148.5 到 919 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见表 4。

3 讨论

EMB 为浓度依赖性抗菌药物, 药物浓度越高, 杀菌、抑菌作用越强, 在保证安全的前提下, 应使用大剂量、单次给药, 从而提高峰值浓度^[7-8], AMK 为氨基糖苷类抗生素, 二线药物, 疗效较差、毒性较大,

表3 不同贮存条件下痰液中 EMB 和 AMK 的稳定性, $n=3$

Tab.3 Stability of EMB and AMK in human sputum under various storage conditions. $n=3$

Compound	Storage condition	$\rho/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		Precision /%	
		Spiked	Measured		
EMB	Autosampler(24 h)	LQC(98)	98.5	1.7	
		HQC(9800)	9499.0	1.4	
	Bench(24 h)	LQC(98)	103.0	6.7	
		HQC(9800)	9557.0	0.9	
	Three-freeze-thaw	LQC(98)	95.9	2.2	
		HQC(9800)	9377	5.0	
25 days at -80 °C	LQC(98)	97.3	0.6		
		HQC(9800)	9733	3.2	
	AMK	Autosampler(24 h)	LQC(641)	673.1	6.0
			HQC(64140)	62607	1.6
	Bench(24 h)	LQC(641)	646.1	9.9	
		HQC(64140)	64630	2.6	
Three-freeze-thaw	LQC(641)	642.7	9.4		
	HQC(64140)	60166	8.4		
25 days at -80 °C	LQC(641)	654	3.5		
	HQC(64140)	66167	5.8		

表4 盲态测定 5 份结核患者痰液中 EMB 和 AMK 浓度

Tab.4 Results of blind simultaneous quantification of EMB and AMK in human sputum

Sample No.	$\rho_{\text{EMB}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho_{\text{AMK}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	454	0
2	260	0
3	358	0
4	148.5	0
5	919	0

用于对一线抗结核药产生抗药性或不能耐受的患者。开展病灶部位药物浓度检测对临床用药具有重要的意义。本试验开发了基于 LC-MS 同时定量 2 种抗结核药物痰液中药物浓度测定的方法。发现 2 种药物在正离子模式下均有较强的 MRM 信号响应且稳定。方法处理方法简单^[6,9]、快速、测得各化合物的最低检出限均较低, 且准确度、精密度和提取回收率良好。另外, 根据目前文献[10]资料, EMB 和 AMK 在成人患者血液中的峰值浓度 ρ_{max} 推荐范围分别为 2000 ~ 6000 和 35000 ~ 450000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过检测发现, 痰液中药物浓度远小于推荐的峰值浓度。因此, 不能用血浆浓度数据去推测痰液中的药物浓度, 监测痰液中抗结核药物浓度对结核患者的临床用药具有重要意义。基于高效液相色谱或者色谱串联质谱的方法因其高通量和高灵敏度的特点能为药物定量分析提供快速有

效的方法^[11]。本试验仅在4例临床样本中进行了方法验证,无法全面反馈患者痰液中药物浓度情况,方法尚需在更大标本量中进行应用与验证,但本试验开发的痰液中同时测定多种抗结核药物浓度方法已能服务于临床,为临床治疗药物监测提供技术支持。

REFERENCES

- [1] PASIPANODYA J G, MCILLERON H, BURGER A, *et al.* Serum drug concentrations predictive of pulmonary tuberculosis outcomes[J]. *J Infect Dis*, 2013, 208(9):1464-1473.
- [2] TOSTMANN A, MTABHO C M, SEMVUA H H, *et al.* Pharmacokinetics of first-line tuberculosis drugs in Tanzanian patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7):3208-3213.
- [3] HEYSELL S K, MOORE J L, PELOQUIN C A, *et al.* Outcomes and use of therapeutic drug monitoring in multidrug-resistant tuberculosis patients treated in virginia, 2009-2014 [J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2015, 78(2):78-84.
- [4] WEI X L, FANG R T, SHI Y F, *et al.* Analysis of results from monitoring serum concentration of anti-tuberculosis drugs [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2015, 35(21):1918-1921.
- [5] ALSULTAN A, PELOQUIN C A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update [J]. *Drugs*, 2014, 74(8):839-854.
- [6] VASAKOVA M. Challenges of antituberculosis treatment in patients with difficult clinical conditions [J]. *Clin Respir J*, 2015, 9(2):143-152.
- [7] REYNOLDS J, HEYSELL S K. Understanding pharmacokinetics to improve tuberculosis treatment outcome [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(6):813-823.
- [8] SHUKLA M, SHARMA A, JAISWAL S, *et al.* Insights into the pharmacokinetic properties of antitubercular drugs [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2016, 12(7):765-778.
- [9] LEE Y J, SHIN S, ROH E Y, *et al.* Acceptability of sputum specimens for diagnosing pulmonary tuberculosis [J]. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(6):733.
- [10] LIU Q H, ZHANG W H. Advances in PK/PD studies of anti-tuberculosis drugs [J]. *Chin J Infect Chemother* (中国感染与化疗杂志), 2016, 16(5):662-666.
- [11] BALDWIN D R, HONEYBOURNE D, WISE R. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: methodological considerations [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36:1171-1175.
- [12] BRUSSE-KEIZER M, TEN BOKUM L, MOVIG K, *et al.* Relation between amoxicillin concentration in sputum of COPD patients and length of hospitalization [J]. *COPD*, 2011, 8(2):66-70.
- [13] BRUSS-KEIHER M, VANDER VALK P, VANDER ZANDEN R W, *et al.* Amoxicillin concentrations in relation to betalactamase activity in sputum during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10(1):455-461.

(收稿日期:2018-11-20)