

## HPLC法测定人血浆中伏立康唑的浓度<sup>△</sup>

王幼林<sup>1\*</sup>,周露露<sup>1</sup>,杨凌飞<sup>2#</sup>(1.皖南医学院第二附属医院临床药学室,安徽芜湖 241000;2.皖南医学院第二附属医院心内科,安徽芜湖 241000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)32-4501-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.32.13

**摘要** 目的:建立一种快速、灵敏、准确、稳定的测定人血浆中伏立康唑浓度的方法,用于伏立康唑临床治疗药物监测。方法:采用高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法,以卡马西平为内标,乙腈蛋白沉淀法处理血浆样品。色谱柱为Phecda C<sub>18</sub>,流动相为20 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH=6.0)-乙腈(50:50, V/V),流速为1 ml/min,柱温为40℃,检测波长为255 nm,进样量为50 μl。结果:伏立康唑和卡马西平的保留时间分别为8.34和6.24 min;血浆中伏立康唑线性范围为0.10~20.00 μg/ml ( $r=0.9995$ ),定量下限为0.05 μg/ml,日内、日间RSD分别为≤1.57%、1.45%,低、中、高梯度浓度提取回收率在81.40%~128.29%之间。结论:该方法操作简便,结果准确,适用于伏立康唑的临床治疗药物监测。

**关键词** 伏立康唑;高效液相色谱法;治疗药物监测

### Determination of Voriconazole in Human Plasma by HPLC

WANG You-lin<sup>1</sup>, ZHOU Lu-lu<sup>1</sup>, YANG Ling-fei<sup>2</sup>(1. Dept. of Clinical Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241000, China; 2. Dept. of Cardiovascular Division, the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a rapid, sensitive, accurate and stable method for the determination of voriconazole in human plasma in order to monitor clinical use of voriconazole. METHODS: HPLC-UV detection method was applied using carbamazepine as internal standard. Plasma samples were treated with acetonitrile protein precipitation. The determination was performed on Phecda C<sub>18</sub> column with 20 mmol/L monopotassium phosphate buffer solution (pH 6.0)-acetonitrile (50:50, V/V) as mobile phase at flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 40℃ and detection wavelength was 255 nm. The injection volume was 50 μl. RESULTS: The retention time of voriconazole and internal standard were 8.34 and 6.24 min. The linear range of voriconazole in plasma were 0.10-20.00 μg/ml ( $r=0.9995$ ). The lowest limit of quantitation was 0.05 μg/ml. Intra-day and inter-day RSD were below 1.57% and 1.45%, respectively. The extraction recovery of low, medium and high concentrations were between 81.40% to 128.29%. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate for therapeutic drug monitoring (TDM) of voriconazole.

**KEYWORDS** Voriconazole; HPLC; Therapeutic drug monitoring

近年来,深部真菌病发生率呈持续上升趋势,患者病情大多严重,常危及生命,病原菌主要为条件致病真菌,如念珠菌和曲霉菌。伏立康唑(Voriconazole, VRC)是2002年5月在美国被批准上市的新一代三唑类广谱抗真菌药,有口服和注射两种制剂,其抗菌谱广,可治疗侵袭性曲霉病、侵袭性念珠菌病、足放线病菌属和镰刀菌属引起的严重感染以及尖端单孢子菌感染<sup>[1]</sup>。基于大量的临床证据,2008年美国感染病学会(IDSA)制定的曲霉病治疗指南中将伏立康唑列为用于侵袭性曲霉病的首选药物。由于伏立康唑在体内呈非线性药动学特征,血药浓度的个体差异很大,且伏立康唑经细胞色素P<sub>450</sub>酶

代谢容易发生药物间相互作用,可能由于合并用药而改变其血药浓度。临床多项研究表明<sup>[2-3]</sup>,伏立康唑的临床疗效或不良反应与血药浓度密切相关。因此,临床药师建议及时进行伏立康唑的治疗药物监测,调整给药方案,个体化给药,以提高伏立康唑应用的安全性和有效性。笔者拟建立一种快速、灵敏、准确、稳定的测定人血浆中伏立康唑浓度的高效液相色谱(HPLC)-紫外检测方法,用于伏立康唑临床治疗药物监测。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

高效液相色谱系统,包括1525二元泵、717自动进样器、2487紫外检测器(美国Waters公司);TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A涡旋混合器(上海精科仪器有限公司);PHS-2F pH计(上海雷磁仪器厂);FA1604S电子分析天平(上海光学仪器厂);DN-24W氮气吹干仪(上海垣逸实业有限公司)。

#### 1.2 药品、试剂与血浆

<sup>△</sup> 基金项目:皖南医学院中青年科研基金自然科学基金类项目(No. WK2013F32)

\* 药师,硕士。研究方向:分子药理学、治疗药物监测。电话:0553-2871876。E-mail:wangyoulin1219@163.com

# 通信作者:副主任医师。研究方向:心血管疾病的介入治疗。电话:0553-2863105。E-mail:yanglf888@126.com

伏立康唑(中国食品药品检定研究院,批号:100862-200701,纯度:100.0%);内标:卡马西平(中国食品药品检定研究院,批号:100142-201105,纯度:99.7%);磷酸二氢钾为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯化水;健康人空白血浆由我院血库提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Phceda C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);保护柱:国产 C<sub>18</sub>(4.6 mm×10 mm);流动相:20 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH6.0)-乙腈(50:50, V/V);流速:1 ml/min;柱温:40 °C;检波长:255 nm;进样量:50 μl。

### 2.2 标准品溶液的配制

2.2.1 卡马西平对照品溶液 准确称取卡马西平对照品适量,用甲醇溶液溶解并定量稀释成质量浓度为1 000 μg/ml的内标贮备液。精密量取该内标贮备液适量,用甲醇定量稀释成质量浓度为20.00 μg/ml的内标工作液,置于4 °C冰箱冷藏,备用。

2.2.2 伏立康唑对照品溶液 准确称取伏立康唑对照品适量,用甲醇溶液溶解并定量稀释成质量浓度为1 000.00 μg/ml的贮备液,用甲醇定量稀释成系列标准液,质量浓度分别为1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、40.00、100.00和200.00 μg/ml,低、中、高标准液浓度分别为1.50、15.00和150.00 μg/ml,置于4 °C冰箱冷藏,备用。

### 2.3 样本来源

本研究方案经我院医学伦理委员会批准,使用伏立康唑治疗侵袭性真菌感染或经验性治疗的住院患者均签署“知情同意书”,于连续给药后第4日给药前采静脉血2 ml,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,以转速为3 000 r/min离心10 min,吸取上清液置于2 ml的EP管中,于-20 °C冷冻保存,待测。

### 2.4 血浆样品处理

精密量取血浆样品300 μl,置于2 ml的EP管中,加入内标工作液20 μl,涡旋振荡1 min,加入乙腈600 μl,涡旋振荡3 min,于高速离心机中以转速为14 000 r/min离心10 min,吸取上清液。置于2 ml的EP管中,用30 °C恒温水浴氮气吹干,残渣用流动相200 μl复溶,涡旋振荡3 min,以转速为14 000 r/min离心10 min,吸取上清液150 μl,置进样瓶中,进样50 μl分析。

### 2.5 方法学验证

2.5.1 专属性考察 在本试验条件下,伏立康唑样品的保留时间为8.34 min,内标卡马西平的保留时间为6.24 min。考察了6份不同的空白血浆,结果表明,流动相和血浆中的杂质均不干扰样品峰和内标峰,且峰形良好。高效液相色谱图见图1。

2.5.2 标准曲线和定量下限 取健康人空白血浆270 μl,加入伏立康唑系列标准液各30 μl,制得伏立康唑质量浓度为20.00、10.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.20、0.10 μg/ml的血浆样品,按“2.4”项方法操作。以样品与内标峰面积比值(y)对浓度(x)进行线性回归(权重系数为1/c<sup>2</sup>),得血浆中伏立康唑标准曲线,回归方程为y=0.566 9x-0.001 1(r=0.999 5, n=5)。结果表明,伏立康唑血浆浓度在0.10~20.00 μg/ml范围内线性关系良好,预期可包括伏立康唑在人体内的血浆浓度,定量下限为0.05 μg/ml(信噪比>3)。

2.5.3 定量下限考察 取健康人空白血浆6份,各270 μl,加入

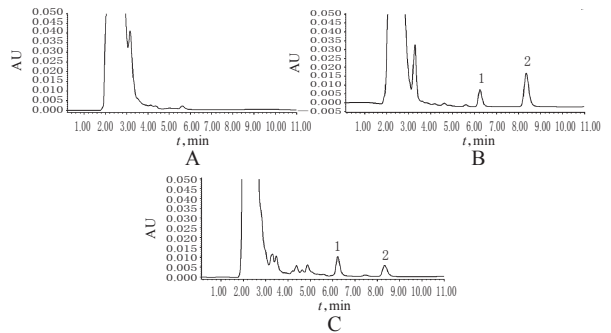


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+伏立康唑+内标;C.患者血样+内标;1.卡马西平;2.伏立康唑

### Fig 1 Special property investigation of voriconazole in plasma

A. blank plasma; B. blank plasma+voriconazole+internal standard; C. blood sample of patient+internal standard; 1. carbamazepine; 2. voriconazole

伏立康唑标准液30 μl,使血浆中药物浓度为0.05 μg/ml,按“2.4”项方法操作。经测定,本方法的定量下限为0.05 μg/ml,信噪比>3,准确度为(103.69±4.25)%,相对标准差(RSD)<5%。

2.5.4 精密度及回收率试验 分别配制高、中、低梯度浓度(0.15、1.50、15.00 μg/ml)的质控(QC)血浆样品,按“2.4”项方法操作,每一浓度取5个样本,连续测定3 d。根据当日的标准曲线测定QC样品浓度,计算得出各梯度浓度的日内、日间RSD均<5%,相对回收率在95%~105%之间,该方法符合生物样品分析要求,详见表1。

表1 精密度及相对回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 1 The lowest limit of quantitation of voriconazole( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

浓度, μg/ml	日内测得浓度, μg/ml	RSD, %	日间测得浓度, μg/ml	RSD, %	相对回收率, %
0.15	0.15±0.001	0.96	0.149±0.002	1.45	99.49±1.44
1.50	1.52±0.01	0.38	1.5±0.02	1.32	99.79±1.32
15.00	15.07±0.24	1.57	15.19±0.11	0.69	101.24±0.70

另取空白血浆270 μl,加入乙腈600 μl,涡旋振荡5 min,以转速为14 000 r/min离心10 min,吸取上清液,加入内标工作液20 μl,伏立康唑系列工作液(0.20、2.00、20.00 μg/ml)30 μl,涡旋混匀,于30 °C氮气吹干,残渣加流动相200 μl复溶,涡旋振荡3 min,以转速为14 000 r/min离心10 min,吸取上清液50 μl进样分析。每一浓度取5个样本,得到相应峰面积。与当日相应浓度的样本的峰面积比较,计算得出绝对回收率在81.40%~128.29%之间,详见表2。

表2 绝对提取回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 The precision test of voriconazole( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药物	浓度, μg/ml	绝对回收率, %					$\bar{x} \pm s, %$	RSD, %
		样本1	样本2	样本3	样本4	样本5		
伏立康唑	0.20	95.58	88.56	109.21	83.90	94.37	94.32±9.55	10.13
	2.00	90.17	90.81	88.95	128.29	92.37	98.12±16.91	17.24
	20.00	109.26	89.23	85.49	94.17	81.40	91.91±10.78	11.73
内标	0.20	101.82	100.16	90.18	99.77	103.39	99.06±5.17	5.22
	2.00	91.32	90.17	86.34	108.15	96.73	94.54±8.47	8.95
	20.00	112.30	97.25	90.88	101.44	92.09	98.79±8.65	8.76

2.5.5 稳定性试验 制备伏立康唑高、中、低梯度浓度(0.15、

1.50、15.00 μg/ml)的血浆样品,分别进行冻融(25℃与-20℃)3次稳定性试验、含药血浆-20℃放置20d稳定性试验、自动进样器4℃放置24h稳定性试验、室温放置4h稳定性试验,按“2.4”项方法操作,每一浓度取5个样本,将测定结果的峰面积代入相应的当天的标准曲线,计算准确度(准确度=实测值/加入量×100%),评估上述不同条件下伏立康唑的稳定性。结果表明在上述条件下伏立康唑是稳定的,详见表3。

表3 伏立康唑稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 The recovery test of voriconazole ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

浓度, μg/ml	冻融3次		自动进样器4℃放置24h		室温放置4h		-20℃放置20d	
	准确度,%	RSD,%	准确度,%	RSD,%	准确度,%	RSD,%	准确度,%	RSD,%
0.15	99.06±1.49	1.50	91.00±6.77	7.44	98.75±4.76	4.82	101.33±2.02	1.99
1.50	99.52±1.44	1.44	99.92±1.56	1.56	99.70±2.29	2.29	101.43±1.94	1.91
15.00	100.12±0.98	0.97	99.78±0.86	0.86	100.16±1.11	1.11	101.66±1.04	1.02

### 3 讨论

血浆中伏立康唑浓度的测定方法主要有HPLC荧光检测法、HPLC-紫外检测法和液-质联用法<sup>[4-7]</sup>。国外已有免疫分析法检测的相关文献<sup>[8]</sup>,国内未见有文献报道。其中质谱分析方法样品处理较复杂,且由于受仪器条件限制,难以在临床推广。文献报道的HPLC法血浆前处理方法复杂,且耗时较长,不适合临床标本快速检测的要求。

笔者在参考上述文献的基础上,通过优化色谱条件,调整流动相比,使伏立康唑的保留时间达8.34 min,消除血浆中内源性杂质的干扰且缩短保留时间。内标选择卡马西平,在选择色谱条件下,内标峰与样品峰分离度>2,且峰形良好。血浆样本处理方法采用乙腈蛋白沉淀法,该方法成本较低且简单易行,方法学验证结果证明提取回收率>80%。样本通过氮气吹干,定量下限可达到0.05 μg/ml,灵敏度较高。在0.10~20.00 μg/ml浓度范围内,在相应的生物样品中标准曲线的 $r>0.99$  ( $P<0.01$ ),质控样本及稳定性试验符合要求。此方法完全可以满足开展伏立康唑治疗药物监测工作的需求。

通过建立人血浆中伏立康唑HPLC检测方法,我院已在皖南地区首次开展了关于伏立康唑的治疗药物监测工作,根据血药浓度数据,结合患者具体情况进行综合分析,实现个体化给药。目前,关于治疗药物监测对伏立康唑治疗的重要性,研究结果并不完全一致,伏立康唑的有效治疗浓度范围也未有统一标准,国外推荐的谷浓度一般为1~5.5 μg/ml,也有研究显示伏立康唑浓度>4.80 μg/ml时更容易发生药品不良反应<sup>[9]</sup>。本试验的局限性在于试验对象均为侵袭性真菌感染或经验性治疗

的疑似真菌感染患者,且给药剂量并不一致,从而难以评价药物效应,明确有效治疗浓度。未来需要进一步明确和细分患者纳入标准,计划在累积一定样本量后,进行伏立康唑治疗药物监测的随机对照研究,比较伏立康唑治疗药物监测组与非治疗药物监测组在疗效和安全性方面的差异,系统性评价伏立康唑治疗药物监测的临床效应,为今后开展伏立康唑治疗药物监测提供循证医学理论支持。

### 参考文献

- [1] 沈海蓉,李中东,钟明康.新型抗真菌药伏立康唑[J].中国新药与临床杂志,2004,23(5):308.
- [2] Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(1): 24.
- [3] Pascual A, Calandra T, Bolay S, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(2): 201.
- [4] Richard Gage, David A. Stopher. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma[J]. *J Pharmaceu Biomed*, 1998, 17: 1 449.
- [5] 史卉妍,彭亮,谭志荣,等.高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J]. *中南药学*, 2007, 5(4): 305.
- [6] 武晓捷,董晓易,陈轶坚,等.伏立康唑治疗药物浓度监测方法的建立[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2009, 9(2): 118.
- [7] 张志华,易鸿,何周康,等.HPLC-MS/MS法测定伏立康唑的血药浓度及其在生物等效性研究中的应用[J]. *中南药学*, 2009, 7(12): 889.
- [8] Pascual A, Nieth V, Calandra T, et al. Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 137.
- [9] Miyakis S, van Hal SJ, Solvag CJ, et al. Clinician ordering practices for voriconazole therapeutic drug monitoring: experiences of a referral laboratory[J]. *Ther Drug Monit*, 2010, 32: 661.

(收稿日期:2014-10-24 修回日期:2015-10-01)

(编辑:李 劲)

## 国家卫生和计划生育委员会副主任王培安出席健康老龄化国际研讨会

本刊讯 2015年10月21日,“2015健康老龄化国际研讨会”在江苏南京开幕。国家卫生和计划生育委员会副主任王培安出席会议开幕式并讲话,人口与发展南南合作伙伴组织执行主任乔·托马斯博士、联合国人口基金驻华副代表巴素雅女士,主要来自发展中国家负责健康老龄事务的政府官员、专家学者,以及相关国际组织和非政府组织的代表共40余人参加了此次研讨会。

王培安副主任在开幕式讲话中指出,人口老龄化是当今世界共同面临的严峻挑战,积极推进健康老龄化是世界各国特别是南南各国正在或者即将面对的重要课题。他建议要从

战略高度深入探讨人口老龄化问题,重视并加强老年健康服务体系建设,逐步探索建立符合国情的老年长期护理保障制度,同时加强老年医学学科建设和人才培养。王培安副主任希望南南国家建立常态化合作机制,通过政策对话、经验共享、能力建设、技术交流等多种形式开展合作,特别是在医养结合、老年照料和老年病防治等领域进行深层次交流。他表示,中国政府将继续把积极应对人口老龄化作为南南合作的一项重要内容,推动南南各国开展实质性合作,共同实现健康老龄化。