

RP-HPLC法测定肾移植术后患者血浆中伏立康唑的浓度

王超^{1*}, 张弋²(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300070;2.天津市第一中心医院,天津 300192)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)18-1668-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.18.12

摘要 目的:建立一种快速检测肾移植术后患者血浆中伏立康唑浓度的方法。方法:血浆样品处理后,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)检测。色谱柱为Agilent HC-C₁₈,流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钠(pH 6)-乙腈(40:60),流速为1.0 ml/min,柱温为40 ℃,进样量为20 μl,测定波长为254 nm。结果:伏立康唑血药浓度在0.258~25.8 mg/L范围内线性关系良好($r=0.9998$),定量下限为0.258 mg/L;最低检测限为0.085 mg/L;3种浓度样的日内、日间RSD<6%;平均回收率在95%~120.0%之间。并采用此方法测定3例肾移植患者服用伏立康唑10 d血浆中的伏立康唑的浓度分别为4.826、4.045、1.564 mg/L。结论:本方法操作简便、结果准确,适用于人血浆中的伏立康唑药物浓度的检测。

关键词 伏立康唑;反相高效液相色谱法;血药浓度;肾移植;药动学

Determination of Voriconazole Concentration in Patients after Renal Transplantation by RP-HPLC

WANG Chao¹, ZHANG Yi²(1. The First Center Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid detective method for concentration determination of voriconazole in human plasma of renal transplantation patients. METHODS: Plasma samples were extracted, then RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent HC-C₁₈ column with mobile phase composed of 0.05 mol/L sodium dihydrogen phosphate (pH=6)-acetonitrile (60:40) at the flow rate of 1.0 ml/min and column temperature of 40 ℃. The sample size was 20 μl, and the detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: The linear range of voriconazole was 0.258-25.8 mg/L ($r=0.9998$); quantitative limit was 0.258 mg/L, and detection limit was 0.085 mg/L; RSDs of intra-day and inter-day of high, medium and low concentrations were all lower than 6%; average recoveries were 95%-120.0%. Drug concentration of voriconazole in 3 renal transplantation patients was determined by this method 10 days after voriconazole administration, the determination results were 4.826, 4.045, 1.564 mg/L respectively. CONCLUSIONS: The method is easy, accurate, and suitable for the concentration determination of voriconazole in patients.

KEYWORDS Voriconazole; RP-HPLC; Plasma concentration; Renal transplant; Pharmacokinetics

3TC极性强,NVP极性弱,AZT极性介于两者之间。单用乙腈、乙酸乙酯或叔丁基甲醚提取,难达到理想提取效果。用乙腈-乙酸乙酯混合体系(2:1、1:1、1:2)作提取溶剂,3种目标药物及内标皆能被提取。但仅采用一步液-液萃取后杂质始终较多,且杂质会随乙腈比例的增加而增加。故采取先用乙腈沉淀后再对上清液用乙酸乙酯进行萃取的方法,结果显示杂质明显减少,提取效果较好。

AIDS患者常因HAART和机会性感染治疗而需同时服用较多药物。本方法对9例门诊临床样本进行检测,3种目标药物及内标皆无干扰(见图1C),证明本法可应用于AIDS患者TDM。由表4可知,患者的3TC-AZT-NVP血药浓度存在较明显个体差异,有必要对HAART进行TDM以确保疗效稳定。

本方法仅需用0.25 ml血浆,低于文献报道的0.50 ml^[2],无需固相萃取^[3],对检测设备要求不高^[3-4],操作简单、快速、灵敏,检测结果准确、重复性好,是临床常规开展3TC、AZT和NVP血药浓度同时监测及药动力学研究的优选方法。

参考文献

[1] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组.中华医学会第五

次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国热带病学术会议论文汇编[C].2011:44.

[2] Nandi U, Das A, Roy B, *et al.* Development and validation of an HPLC-UV method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine, and nevirapine in human plasma and its application to pharmacokinetic study in human volunteers[J]. *Drug Test Anal*, 2013, 5(6): 485.

[3] Kumar VR, Reddy BR, Sreekanth K, *et al.* High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine and nevirapine in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013(921/922): 9.

[4] 李周,丁存刚,葛庆华,等.人血浆中拉米夫定、齐多夫定、奈韦拉平的LC-MS/MS法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(3): 200.

[5] Herve R, Bernard M, Corinne C, *et al.* Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850: 376.

(收稿日期:2013-12-30 修回日期:2014-01-10)

* 硕士研究生。研究方向:临床药理学。电话:022-23626463。
E-mail: moyan19880331@163.com

侵袭性真菌感染是器官移植术后常见的并发症,其发病率和死亡率持续增加^[1]。伏立康唑(Voriconazole)作为新一代的广谱的三唑类抗真菌药,由美国辉瑞公司研发,并于2002年5月份在美国批准上市。该药为氟康唑的衍生物,在氟康唑结构丙基骨架上加入1个甲基并用氟代噻唑环取代了三唑环,使其对作用靶位的亲和力及抗真菌活性显著增强^[2-3]。伏立康唑已经公布的临床数据表明其对多种致病真菌都有效,对曲霉属的抗菌活性尤为显著。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侵袭性曲霉病的首选药物。伏立康唑的代谢呈非线性药动学特性^[3],生物利用度高达96%,产物经胆汁和尿液排泄。伏立康唑在肝脏内主要通过细胞色素P₄₅₀(CYP)的同工酶CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4进行代谢,CYP2C19为主要代谢酶,其具有基因多态性,导致不同人种、不同基因型者伏立康唑代谢差异明显,服用相同剂量伏立康唑后血药浓度差异可能导致不良反应增多或者疗效不佳^[4]。为此国外学者建议条件许可时,应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。伏立康唑浓度的测定,目前在国内外主要采用液-质联用(LC-MS)法、高效液相色谱(HPLC)法进行血药浓度的测定。根据HPLC检测器的不同,还可以细分为HPLC-紫外(UV)法、HPLC-荧光(FLD)法等;根据色谱柱不同的还可以分为分子排阻色谱法、交换柱色谱法等^[5-8]。本研究结合实验室实际条件,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,建立了一种快速、灵敏、准确的测定伏立康唑血药浓度的方法,并应用此方法对肾移植患者体内的伏立康唑药物浓度进行检测。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1311A 四元泵、G1322A 真空脱气机、G1316A 柱温箱、G1314B 型可变波长检测器(VWD)、G1329A 型标准自动进样器、Agilent 化学工作站(H4033A,中文版B02.01C)(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

伏立康唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100862-200701);内标:尼群地平对照品(中国食品药品检定研究院);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钠为分析纯,水为Millipore去离子水。

2 方法与结果^[9-12]

2.1 色谱条件

色谱柱:AgilentHC-C₁₈(250 mm×4.5 mm,5μm);流动相:0.05 mol/L 磷酸二氢钠(pH 6)-乙腈(40:60),流动相经有机相微孔滤膜(0.45 μm)过滤后使用;柱温:40℃;流速:1.0 ml/min,进样量:20 μl;紫外检测波长:254 nm。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液:准确称取伏立康唑对照品0.0258 g,用乙腈溶解并定容至10 ml,制备成质量浓度为2580 mg/L的贮备液,精密量取该贮备液适量,用乙腈定量稀释成质量浓度为2.58、6.45、33.25、64.5、129、258 mg/L的稀贮备液,置于一20℃冰箱冷藏保存,待用。

2.2.2 内标溶液:准确称取尼群地平对照品21.00 mg至100 ml量瓶中,用乙腈稀释至刻度,得质量浓度为210 mg/L的内标溶液,置于一20℃冰箱冷藏保存,待用。

2.3 血浆样品处理

精密量取血浆样品0.2 ml,加入内标溶液10 μl,加入乙腈0.6 ml,加盖后于涡旋混合器上混匀,以离心半径为8 cm、13 000 r/min离心5 min,取上清液20 μl进样,进行色谱分析。

2.4 方法的专属性

分别取空白血浆、空白血浆+伏立康唑对照品+内标、受试者血浆样品+内标各20 μl,同法处理并进样测定,色谱见图1。结果表明,空白血浆中内源性杂质不干扰血浆中伏立康唑的分析。伏立康唑和尼群地平(内标)的保留时间分别约为4.7、7.7 min,各峰分离度均>2,理论板数均>2 000,血浆中的杂质峰与伏立康唑主峰的分离度>1.5,色谱见图1。

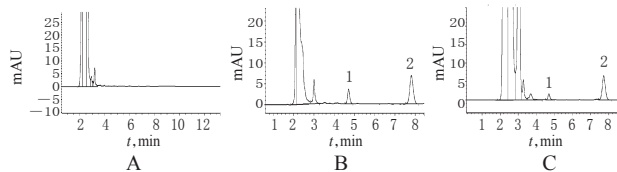


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+伏立康唑+内标;C.受试者血浆样品+内标;
1.伏立康唑;2.尼群地平

Fig 1 HPLC chromatogram

A. blank plasma; B. blank plasma+ voriconazole+ internal standard; C. blood sample+internal standard; 1. voriconazole; 2. nitrendipine

2.5 标准曲线的制备

精密量取不同质量浓度的伏立康唑对照品贮备液20 μl,加入内标溶液10 μl,分别加入空白血浆180 μl,混匀,制得含伏立康唑0.258、0.645、3.325、6.45、12.9、25.8 mg/L的系列血浆样品。取血浆样品各5份,按“2.3”项方法处理,进样测定,记录色谱。以伏立康唑色谱峰面积与内标峰面积之比(y)为纵坐标轴,伏立康唑的血药浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y=0.09479x+0.01824$ ($r=0.9998$),结果表明,伏立康唑血药浓度在0.258~25.8 mg/L范围内线性关系良好。按照信噪比为3得到最低检测限为0.085 mg/L。

2.6 回收率试验

分别配制伏立康唑低、中、高3种质量浓度的标准血浆样品各5份,按“2.3”项方法操作,进样测定,计算方法回收率,结果见表1。

表1 回收率及精密度试验结果

Tab 1 Results of precision and accuracy tests

质量浓度,mg/L	方法回收率,%	日内RSD,%	日间RSD,%
0.258	116.5±4.96	2.64	5.95
3.325	96.65±2.07	1.54	4.50
25.8	99.75±3.05	3.03	4.70

2.7 精密度试验

分别配制伏立康唑低、中、高3种浓度的标准血浆样品各5份,同日处理5批,连续测定3 d,计算得日内、日间RSD均<6%,结果见表1。

2.8 稳定性试验

配制伏立康唑低、中、高3种质量浓度(0.258、3.325、25.8 mg/L)血样,各20份。3种浓度各5份样品按照“2.3”项方法处理,立即进样测得血药浓度;5份在室温下放置24 h,同法处理测得血药浓度;5份反复冻融2次同法测得血药浓度;5份在一20℃下冻存7 d后同法测得血药浓度。结果表明,伏立康唑在上述条件下均稳定,RSD为3.57%~5.25%。

2.9 临床应用

3例肾移植术后随访患者,年龄29~50岁,口服伏立康唑400 mg/d(200 mg,q12h)治疗肺部真菌感染。患者服用伏立康唑后10 d,分别测定伏立康唑血药浓度为4.826、4.045、1.564 mg/L,3例患者均达到有效治疗浓度(伏立康唑的有效治疗浓度范围为1~5 mg/L^[6])。

3 讨论

3.1 血浆样品处理方法的选择

目前,国内测定人血浆中伏立康唑浓度时对于生物样品的处理过程十分繁琐。考虑到1.6倍体积的乙腈即可使蛋白质沉淀完全,遂采用加入2倍血浆体积的乙腈沉淀蛋白,但是血浆中有微小杂质峰干扰;采用加入3倍血浆体积的乙腈进行处理,血浆中微小杂质峰不干扰主峰、专属性好,同时最低定量限为0.258 mg/L,完全可以用于临床伏立康唑(有效治疗浓度范围为1~5 mg/L)血药浓度的测定。

3.2 内标的选择

考虑到伏立康唑是氟康唑的衍生物,在试验之初曾应用氟康唑为内标。但是蛋白质杂峰与内标氟康唑重合。综合考虑伏立康唑以及色谱柱的性质,选用尼群地平为内标,稳定性好,专属性高。

3.3 色谱柱的选择

试验之初曾选择AgilentHC-C₁₈(150 mm×4.5 mm,5 μm),但是当流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钠(pH 6)-乙腈(40:60),主峰保留时间在3 min内,且与蛋白质峰有干扰;当降低乙腈比例,主峰与内标峰间的时间间隔增大,且峰拖尾。为增大组分的保留遂采用AgilentHC-C₁₈(250 mm×4.5 mm,5 μm),主峰与杂质峰分离度>1.5且峰型对称,对称因子在0.9~1.2范围内。

应用本文方法测定肾移植术后患者体内伏立康唑的血药浓度,伏立康唑与血浆中内源性杂质峰得到良好的分离,并且峰形良好;最主要的是可结合现有的实验室条件,方法快速、简便、结果准确、灵敏度高,能够将器官移植术后患者血浆中伏立康唑的浓度及时反馈,满足临床需求。

参考文献

- [1] 朱有华. 解读《实体器官移植患者侵袭性真菌感染的诊断和治疗指南》[J/CD]. 中华移植杂志: 电子版, 2010, 4(1): 75.
- [2] Shan C, Feng Q, Jia H, et al. Development and validation

of a simple and rapid HPLC method for the quantitative determination of voriconazole in rat and beagle dog plasma[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2007, 45(8): 409.

- [3] 武晓捷,董晓易. 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.
- [4] Ina S, Heike O, Klaus-Dieter R, et al. Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2009, 68(6): 906.
- [5] 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(1): 137.
- [6] Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, et al. Determination of the antifungal agent voriconazole in human plasma using a simple column-switching high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study[J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(3): 328.
- [7] Alicia GL, Emilio CB, Isabel C, et al. Voriconazole serum levels measured by high-performance liquid chromatography: a monocentric study in treated patients[J]. *Medical Mycology Month*, 2011, 50(4): 439.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 547.
- [9] 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.
- [10] 黄成珂, 周伶俐, 邱相君, 等. 人血浆中伏立康唑的HPLC测定[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(6): 359.
- [11] 南志成. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(7): 836.
- [12] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 1版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 455-456.

(收稿日期:2013-11-27 修回日期:2013-12-08)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌出席第四届中国-加拿大卫生政策对话

本刊讯 2014年4月16日,第四届中国-加拿大卫生政策对话在北京举行。国家卫生和计划生育委员会(以下简称“卫生计生委”)主任李斌与加拿大卫生部部长安布罗斯共同出席会议并致辞。

李斌表示,自1995年两国签署卫生合作谅解备忘录以来,中加卫生合作务实高效,成果丰硕。近年来,两国在卫生政策制定、人力资源培养、疾病控制等领域开展了多层次、多渠道、全方位的合作。合作单位包括中央政府、省级和地方政府、大学、医疗机构、医学科研机构和企业等,充分展示了两国在卫生领域合作的广度和深度。

会议期间,李斌与安布罗斯部长进行了双边会谈,并共同签署了《中加2014-2016年度卫生合作执行计划》。中加双方

有关机构签署了多项合作协议,涉及食品安全、全科医学、医学护理、脊髓损伤、数据分析等多个领域。

本次对话会议上,中加双方就新发传染病防控、健康老龄化、卫生体制改革等专题进行了广泛深入的交流与讨论。国家卫生计生委副主任马晓伟出席对话开幕式并致辞。国家卫生计生委、部分省市卫生计生委、直属单位,以及加拿大卫生部等机构的约50余人参加。

中加卫生政策对话是两国间级别最高、参与最广泛的卫生交流机制。2009年,首届中加卫生政策对话在加拿大渥太华举行。第二和第三届对话分别于2010年和2011年在上海和多伦多举行。