

## HPLC-DAD 法同时测定孢子菌肺炎患者血浆中的磺胺甲噁唑与甲氧苄啶浓度

罗雪梅<sup>1</sup>, 徐媛<sup>1</sup>, 何雄雄<sup>2</sup>, 葛卫红<sup>1\*</sup>

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008; 2. 正大天晴药业集团股份有限公司, 南京 210042)

**【摘要】目的:** 建立 HPLC-DAD 法同时测定血浆中磺胺甲噁唑 (SMZ) 与甲氧苄啶 (TMP) 浓度, 用于临床肺孢子菌肺炎 (PCP) 患者治疗药物监测。**方法:** 200  $\mu\text{L}$  血浆样本经 60  $\mu\text{L}$  10% 高氯酸蛋白沉淀, 离心后取上清液 30  $\mu\text{L}$  进样。色谱柱为 Kromasil 100-5- $\text{C}_8$  ( $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇-0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵 (35:65), 流速为 0.9  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长为 240 nm。采集 20 名经口服复方新诺明 (0.48 g/次, 3 次/d) 的 PCP 患者不同时间点共 51 份血浆样本, 测定浓度。**结果:** 在所建立的色谱条件下, 磺胺甲噁唑、甲氧苄啶与各杂质分离良好, 单次分析时间为 6 min/样本。两待测物线性范围均为 1~300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 最低检测限为 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过 10 名 PCP 患者 (取血点  $n \geq 3$ ) 浓度测定结果确定 1 h 时间点为峰浓度取血点, 统计所有患者 1 h 时间点血药浓度结果, 磺胺甲噁唑峰浓度均值为 ( $131.9 \pm 41.3$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 甲氧苄啶峰浓度均值为 ( $6.3 \pm 2.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。参照目标范围浓度, 仅 55.0% 的患者达标, 其余需剂量调整。**结论:** 此法操作简单, 准确、精密度好, 适用于临床 PCP 患者复方磺胺甲噁唑的治疗药物监测。

**【关键词】** 磺胺甲噁唑; 甲氧苄啶; 治疗药物监测; 肺孢子菌肺炎

**【中图分类号】** R927.2

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-3384(2016)05-0024-005

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2016.05.005

## Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma in patients with *pneumocystis carinii* pneumonia by HPLC-DAD

LUO Xue-mei<sup>1</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, He Xiong-xiong<sup>2</sup>, GE Wei-hong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Medication, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Jiangsu Chiatai Qingjiang Pharmaceutical Co., Ltd, Nanjing 210042, China)

**【Abstract】 Objective:** A precise and rapid HPLC-DAD method has been developed and validated for the simultaneous determination of sulfamethoxazole (SMZ) and trimethoprim (TMP) in patients with *pneumocystis carinii* pneumonia (PCP). **Methods:** plasma sample (200 $\mu\text{L}$ ) was deproteinized with 60 $\mu\text{L}$  10% perchloric acid, and separated on a reversed phase  $\text{C}_8$  column with a mobile phase of methanol - 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ammonium acetate (35:65) using isocratic elution. The flow rate was 0.9  $\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$  and the detection wavelength was 240 nm. 51 plasma samples drawn from 20 patients with PCP were collected and quantified. **Results:** The calibration curves were linear over the range of 1-300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for both analytes. The run time for each sample of the method was within 6 min. The peak time was at 1.0h, which is obtained from the preliminary test of 10 PCP patients samples (3-5 time-point samples from each patient). The average plasma peak concentrations of SMZ and TMP were ( $131.9 \pm 41.3$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and ( $6.3 \pm 2.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Comparing with the target concentration range, only 55.0% patients met the criterion and the rest of them needed dose adjustment. **Conclusion:** This method can be used as an effective approach in clinic field.

**【Key words】** Sulfamethoxazole; Trimethoprim; therapeutic drug monitoring; *Pneumocystis Carinii* Pneumonia

肺孢子菌肺炎 (*pneumocystis carinii* pneumonia, PCP) 常见于各类先天或后天免疫功能不全者, 如骨髓移植, 实体器官移植, 肿瘤放化疗后及各种疾病使用糖皮质激素和免疫抑制剂治疗后<sup>[1-2]</sup>, 免疫

[收稿日期] 2016-03-24

[作者简介] 罗雪梅, 女, 主管医师; 研究方向: 治疗药物监测 Tel: 13915958238; E-mail: yixuejiai@sina.com

[通讯作者] \* 葛卫红, 女, 主任药师; 研究方向: 临床药学; Tel: 13915909299; E-mail: 6221230@sina.com

受损患者的PCP死亡率高达34%~49%<sup>[3]</sup>。复方磺胺甲噁唑,又称复方新诺明,是磺胺甲噁唑(SMZ)和甲氧苄啶(TMP)的复方制剂,是目前治疗PCP的一线药物<sup>[4]</sup>。

近年来,随着抗生素耐药、不良反应频发,抗生素治疗药物监测引起更广泛重视,使得一些新抗生素如伏立康唑、替考拉宁等<sup>[5-7]</sup>的治疗药物监测工作得以在临床上积极的开展,指导用药方案调整。复方磺胺甲噁唑早在20年前既已有文献[8]开始报道治疗药物监测的重要性,但由于其耐药性增加,临床使用减少,致使其在临床治疗药物浓度监测工作上的重视度一直不够。事实上,PCP患者病情危重,胃肠道功能紊乱,口服药物后血药浓度极不稳定<sup>[9]</sup>,一旦超出目标浓度范围,就有可能影响PCP患者的救治,浓度过高甚至会引起血液、肝肾功能等方面不良反应。

本试验建立HPLC-DAD法同时测定血浆中SMZ与TMP的药物浓度,采用高氯酸一次沉淀法,最低定量下限为 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,单针分析时长6min,适用于临床PCP患者血药浓度的测定。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200 Series (安捷伦) 高效液相色谱仪(G1322A脱气阀, G1312A泵, G1367B自动进样器, G1330B柱温箱, G1315B二级阵列管检测器)。

### 1.2 试剂

磺胺甲噁唑对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100582-200401);甲氧苄啶对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100031-201205);内标对乙酰氨基酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100018-200408)。甲醇、乙腈为色谱纯,乙酸铵、高氯酸为分析纯;实验用水为去离子纯净水。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5-C<sub>8</sub>( $4.6\times 150\text{ mm}$ ,  $5\mu\text{ m}$ );流动相:甲醇- $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵(35:65);检测波长:240 nm;柱温:35℃;流速: $0.9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样体积:30  $\mu\text{ L}$ 。

### 1.4 对照品溶液的制备

精密称取一定量磺胺甲噁唑与甲氧苄啶置于10 mL容量瓶中,加纯水溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。取该储备液适量,依次稀释至质量浓度为10、30、100、300、1 000、3 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准工作溶液。

### 1.5 血浆样品处理

取离心后所得血浆样品200  $\mu\text{ L}$ 于1.5 mL离心管中,加入20  $\mu\text{ L}$ 内标( $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),混匀。加入10%高氯酸60  $\mu\text{ L}$ 蛋白沉淀,震荡涡旋1 min,然后14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心6 min,取上清液30  $\mu\text{ L}$ 进样,完成HPLC分析。

### 1.6 方法学验证

观察磺胺甲噁唑与甲氧苄啶血药浓度测定时的方法特异性,计算待测物在血清样品中的回收率,在高、中、低质量浓度血浆样中的准确度、重复性。

### 1.7 病例选择及取血方案

选取本院2015年8月至2015年12月期间入院时诊断为PCP的呼吸科患者20例,患者年龄35~88岁,平均年龄( $59.4\pm 16.8$ )岁。初始复方磺胺甲噁唑管饲或口服剂量为0.48 g/次, tid。

用药达稳态后,患者给药后0(谷浓度)、0.5、1、1.5、2 h时间点采血收集血浆样本。10名患者取血点 $n\geq 3$ 分布在上述5个点中,其余10名患者取血1~2个点。

测定浓度并参照THOMAS与Hughes等<sup>[13,14]</sup>研究中指出的治疗PCP时,SMZ与TMP的治疗药物监测参考浓度范围(SMZ:100~150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , TMP:3~8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )以及复方磺胺甲噁唑说明书中指出的总磺胺血浓度不应超过200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,来共同评价目前本院临床PCP感染患者的给药方案。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法专属性试验

在本试验所采用的色谱条件下,磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的保留时间分别为2.66 min和5.08 min左右,内标(对乙酰氨基酚)的保留时间为2.37 min左右,待测物峰形良好,杂质峰对样品测定均没有影响(图1)。

### 2.2 线性关系考察

分别精密称取磺胺甲噁唑标准品10.21 mg和甲氧苄啶标准品10.37 mg,置于10 mL容量瓶中,加水溶

解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为  $1.021 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的磺胺甲噁唑储备液与  $1.037 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的甲氧苄啶储备液。分别在6份  $200 \mu\text{L}$  空白血浆中,加入一定量的标准储备液,分别配成含磺胺甲噁唑和甲氧苄啶质量浓度为1、3、10、30、100、300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准含药血浆。按“1.5”项下方法操作,并同时制备空白样品,进行HPLC分析,记录色谱图,制备标准曲线。计算磺胺甲噁唑与甲氧苄啶峰面积  $A_s$  和内标峰面积  $A_i$  的比值  $f$  ( $f = A_s/A_i$ ),以峰面积比值  $f$  对血药浓度  $C$  作权重回归计算,得磺胺甲噁唑回归方程:  $f_{\text{smz}} = 5.840 \times 10^{-2} C - 1.004 \times 10^{-2}$  ( $r=0.9987$ ) 与甲氧苄啶回归方程:  $f_{\text{tmp}} = 8.072 \times 10^{-2} C - 3.245 \times 10^{-2}$  ( $r=0.9991$ ),权重系数  $\omega = 1/C^2$ 。结果显示,磺胺甲噁唑与甲氧苄

啶浓度在  $1 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系均良好,最低定量限为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,信噪比  $> 10$ 。

## 2.3 精密度和准确度试验

首先制备含磺胺甲噁唑及甲氧苄啶浓度为2、25、250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准含药血浆样品,每个浓度各配制5份样品,按“1.5”项下操作,计算样品和内标峰面积的比值  $f$ ,将  $f$  代入随行标准曲线方程,计算各样品的浓度,连续测定3批样品,根据批样品浓度计算准确度与精密度。结果见表1,本方法的准确度与精密度符合生物样品分析要求。

## 2.4 回收率试验

配制并处理含磺胺甲噁唑与甲氧苄啶浓度为2、25、250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准含药血样,每个浓度平行5份,作为回收率样品;另取5个不同来源空白血浆同法处理,取沉淀后上清液,加入待测物和内标标准溶液,配制同上3个质量浓度水平的标准含药血浆,每个浓度平行5份,作为回收率对照样品。将上述样品进样,记录色谱图,回收率样品峰面积与相应对照品峰面积均值之比即为回收率。测得血浆中内标对乙酰氨基酚的回收率分别为  $(95.8 \pm 1.9)\%$ ,血浆中磺胺甲噁唑与甲氧苄啶回收率结果见表1,结果表明本实验条件下两待测物和内标的回收率均良好,测定无影响。

## 2.5 临床患者血药浓度的测定

**2.5.1 峰浓度时间点选择** 10名PCP患者(取血点  $n \geq 3$ )服用复方磺胺新诺明后血药浓度测定结果分析,SMZ血药浓度在0.5、1、1.5、2 h的达峰人数分别为3、5、1、1人,TMP血药浓度在0.5、1、1.5、2 h的达峰人数分别为0、4、4、2人。通过均值图(图2)选取1 h时间点作为其余10名患者1~2取血点中的必选取点。

表1 血浆磺胺甲噁唑与甲氧苄啶的精密度(RSD,  $n=5$ )、准确度和回收率( $n=5$ )

待测物	$\rho / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	批内精密 度 RSD/%	批间精密 度 RSD/%	准确度 /%	回收率 /%
SMZ	2	6.7	6.5	$98.1 \pm 6.8$	$84.5 \pm 3.3$
	25	2.8	3.4	$99.4 \pm 3.1$	$88.1 \pm 5.7$
	250	1.5	0.48	$99.7 \pm 1.4$	$90.7 \pm 2.6$
TMP	2	11.8	6.0	$98.8 \pm 5.2$	$91.4 \pm 2.5$
	25	5.1	2.4	$102.4 \pm 4.7$	$86.5 \pm 1.6$
	250	0.96	1.4	$99.6 \pm 1.1$	$90.1 \pm 4.7$

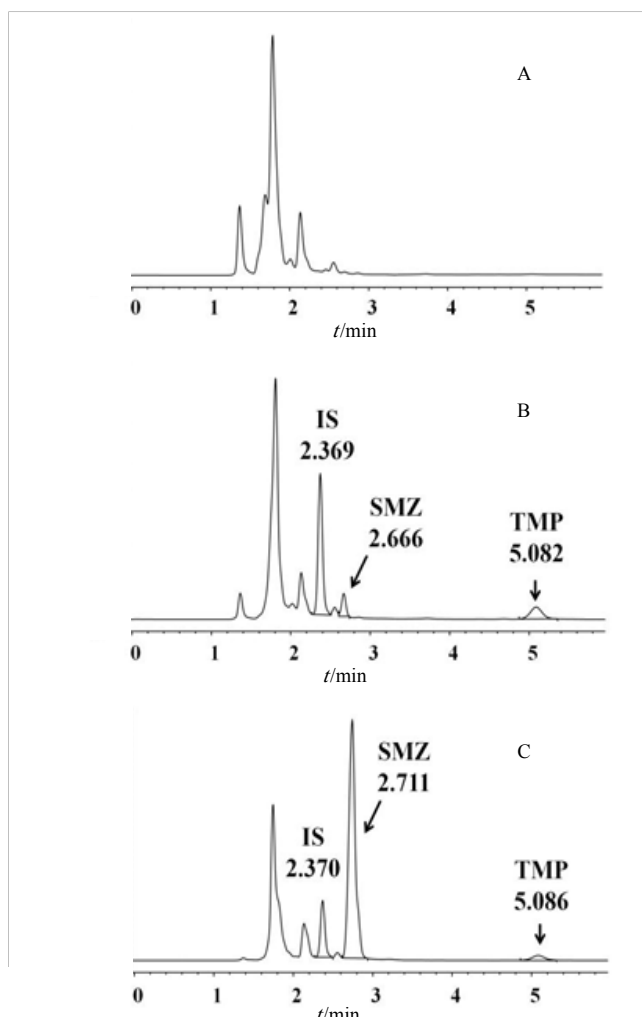


图1 待测物及内标色谱图

A-空白血样; B-空白血样中加入磺胺甲噁唑、甲氧苄啶和内标(LLOQ); C-肺孢子菌肺炎(PCP)患者服用复方磺胺新诺明(3片, tid)后峰浓度样品

**2.5.2 血药浓度监测结果** 20名PCP患者服用复方磺胺新诺明后, SMZ峰浓度均值为( $131.9 \pm 41.3$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $52.2\sim 245.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), TMP峰浓度均值为( $6.3 \pm 2.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $3.28\sim 11.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

参照THOMAS与Hughes等<sup>[13-14]</sup>研究中指出的治疗PCP时, SMZ与TMP的治疗药物监测参考浓度范围(SMZ:  $100\sim 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , TMP:  $3\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )以及复方磺胺甲噁唑说明书中指出的总磺胺血浓度不应超过 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 将20名PCP患者服用复方磺胺新诺明后峰浓度测定结果划分见表2。

### 3 讨论

已有的同时测定SMZ与TMP血中药物浓度的文献[10-12]中, Sayar等<sup>[10]</sup>建立的测定方法, 最低定量下限为 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 单针分析时长 $> 9 \text{ min}$ 。参照THOMAS与Hughes等<sup>[13-14]</sup>研究中指出的治疗PCP时, SMZ与TMP的治疗药物监测参考浓度范围为SMZ:  $100\sim 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , TMP:  $3\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 过低的定量下限并不必需, 简易、快速、稳定的测定方法更适用于临床患者监测。

SMZ与TMP结构极性存在一定差异, 要建立快速、准确的同时测定方法, 需要色谱条件进行优

化: ①有机相比比例增加, 加快两待测物整体出峰时间; ②使用乙酸铵溶液为水相, 改善待测物色谱峰拖尾现象的同时, 可有效缩短两峰出峰时间差; ③柱温提升至 $35^\circ\text{C}$ , 加快待测物与干扰物在色谱柱中的分离, 减少干扰。最终本研究中所建立SMZ与TMP同时测定的检测方法单针分析时间为 $6 \text{ min}$ 内, 且干扰少, 分离度较好。

复方磺胺甲噁唑用于敏感菌所致肠炎, 支气管炎等疾病治疗。由于目前细菌对SMZ与TMP耐药已经很严重, 临床上现主要用于PCP治疗。PCP病情危重, 及时充分和恰当的抗PCP治疗是成功关键。虽然复方磺胺甲噁唑口服吸收较少受食物及其他药物的影响, 但不同PCP患者之间服用复方磺胺甲噁唑后仍存在一定的PK/PD变化, 仅采用所谓标准治疗剂量方案会导致某些患者过高或过低治疗浓度<sup>[8]</sup>, 从而影响治疗效果。

复方磺胺甲噁唑说明书中指出SMZ与TMP两者给药后体内达峰时间为 $1\sim 4 \text{ h}$ 。在本研究中发现, 前10名PCP患者给药后采集的 $3\sim 5$ 个样本结果显示, 各患者间达峰时间差异, 这可能与患者用药方式为管饲或口服有关。管饲受胃肠道影响较少, 达峰时间早于口服给药。除此之外, SMZ与TMP两药物间达峰时间也有差异, SMZ达峰时间略早, 综合考虑两者达峰情况, 及各患者达峰时间均值, 最终选定给药后 $1 \text{ h}$ 时间点作为峰浓度时间采血点。这与美国梅奥诊所(Mayo Clinic)2015年发布的Test Catalog下关于复方磺胺甲噁唑的采血时间点 $1 \text{ h}$ 一致。

PCP感染患者所需SMZ与TMP血药浓度较其他感染高。在本研究中, 参照THOMAS与Hughes等<sup>[13-14]</sup>的研究及复方磺胺甲噁唑说明书中对总磺胺血浓度的限制, 将20名PCP患者血浆峰浓度结果分组, 结果显示, 分别有 $10.0\%$ 、 $85.0\%$ 、 $5.0\%$ 患者的SMZ浓度低于、包含于、高于目标范围, 以及 $5.0\%$ 、 $75.0\%$ 、 $20.0\%$ 患者的TMP浓度低于、包含于、高于目标范围, 而两者都在目标范围内的患者为11人, 占 $55.0\%$ 。这意味着按照标准治疗方案仍有 $45.0\%$ 的患者给药后剂量偏高或低, 需要调整。

因此, 综上所述, 通过给药后SMZ与TMP的血药浓度测定, 及时调整到合适的给药剂量, 有助于提高患者治愈率及避免因浓度过高而引起的不良反应。

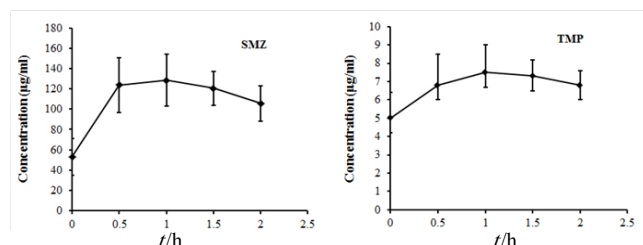


图2 10名PCP患者服用复方磺胺新诺明后血药浓度测定结果

表2 20名PCP患者服用复方磺胺新诺明后血药浓度测定结果

待测物	峰浓度 ( $\bar{x} \pm s$ ) $\rho / \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	分组 $\rho / \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	患者人数	百分比 (%)
SMZ	$131.9 \pm 41.3$	$<100$	2	10.0
		$100\sim 150$	12	60.0
		$150\sim 200$	5	25.0
		$>200$	1	5.0
		$<3$	1	5.0
TMP	$6.3 \pm 2.0$	$3\sim 8$	15	75.0
		$>8$	4	20.0

# 【参考文献】

- [1] Fishman J A. *Pneumocystis Carinii* and parasitic infection in transplantation[J]. Infect Dis Clin North Am, 1995(9): 1005-1044.
- [2] Rubin R H. Infection in the organ transplant recipient .In: RUBIN RH, YONG LS, eds. Clinical Approach to Infection in the Compromised Host(3rd edn)[M]. NewYork: Plenum Medical Book Company, 1994:629-705.
- [3] Luks A M, Neff M J. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia[J]. Respir Care, 2007, 52(1): 59-63.
- [4] Dworkin M S, Williamson J, Jones J L, et al. Prophylaxis with trimethoprim sulfamethoxazole for human immunodeficiency virusinfected patients[J]. Clin Infect Dis, 2001(33): 393-398.
- [5] Kang H M, Lee H J, Cho E Y, et al. The Clinical significance of voriconazole therapeutic drug monitoring in children with invasive fungal infections[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2015, 32(8):557-567.
- [6] Elewa H, El-Mekaty E, El-Bardissy A, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole in the management of invasive fungal infections: A critical review[J]. Clin Pharmacokinet, 2015, 54(12):1223-1235.
- [7] Nah S Y, Im J H, Yeo J Y, et al. Therapeutic drug concentrations of teicoplanin in clinical settings[J]. Infect Chemother, 2014, 46(1):35-41.
- [8] Chin T W, Vandenbroucke A, Fong I W. Pharmacokinetics of trimethoprim-sulfamethoxazole in critically ill and non-critically ill AIDS patients[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(1):28-33.
- [9] Fong I W, Struthers N, Honey RJ, et al. A randomized comparative study of the prophylactic use of trimethoprim-sulfamethoxazole versus netilmycin-metronidazole in transrectal prostatic biopsy[J]. J Urol, 1991, 146(3): 794-797.
- [10] Sayar E, Sahin S, Cevheroglu S, et al. Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in human plasma[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2010, 35(1): 41-46.
- [11] Gonzalez D, Melloni C, Poindexter BB, et al. Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in dried plasma and urine spots[J]. Bioanalysis, 2015, 7(9): 1137-1149.
- [12] 石大伟, 张春红. HPLC法测定人血浆中磺胺甲噁唑的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(6): 119-121.
- [13] Thomas W F. CHIN: Department of pharmacy, St. Michael's hospital, and faculty of pharmacy, university of toronto[J].Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1995: 28-33.
- [14] Hughes W T, LaFon S W, Scott J D, et al. Adverse events associated with trimethoprim - sulfamethoxazole and atovaquone during the treatment of AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. J Infect Dis, 1995, 171(5):1295-1301.