

## HPLC法测定1例肾功能衰竭患者血浆中更昔洛韦浓度

刘鑫<sup>a</sup>, 付强<sup>a</sup>, 范倩倩<sup>a</sup>, 张波<sup>a</sup>, 陈丽萌<sup>b</sup>, 梅丹<sup>a\*</sup>

(中国医学科学院北京协和医院 a. 药剂科; b. 肾内科, 北京 100730)

**【摘要】目的:** 建立人血浆中更昔洛韦的 HPLC 测定方法, 测定肾功能衰竭患者静脉滴注更昔洛韦的血浆药物浓度。**方法:** 取血浆样品 100  $\mu\text{L}$ , 以阿昔洛韦为内标, 10% 高氯酸沉淀蛋白后, 取 10  $\mu\text{L}$  进样。HPLC 分离采用 Shim-pak CLC-ODS (150 mm  $\times$  60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 柱, 流动相为 0.03 mol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 磷酸二氢铵水溶液: 乙腈 = 97 : 3 (磷酸调节 pH 至 3.0), 流速为 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长 254 nm。应用上述 HPLC 方法测定 1 例肾功能衰竭患者静脉滴注更昔洛韦 (75 mg) 后的血浆药物浓度。**结果:** 标准曲线在 0.5 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好 ( $r = 0.9999$ ), 低、中、高浓度质控样品 (1、8、30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的日内、日间精密度 (RSD) 1.01% ~ 5.55% ( $n = 5$ ), 准确度 -0.15% ~ 8.00% ( $n = 5$ ), 更昔洛韦的提取回收率为 98.60% ~ 100.36%。应用该方法成功测定了 1 例肾功能衰竭患者血浆更昔洛韦药物浓度。**结论:** 本方法灵敏度高, 准确性好, 简便快捷, 适用于临床患者血浆中更昔洛韦浓度的测定。

**【关键词】** 更昔洛韦; 血浆; 肾衰; 药物浓度; 高效液相色谱

**【中图分类号】** R978.7; R969.1

**【文献标志码】** B

**【文章编号】** 1672-3384(2019)04-0082-04

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2019.04.019

## Determination of ganciclovir in the plasma of a patient with renal failure by HPLC

LIU Xin<sup>a</sup>, FU Qiang<sup>a</sup>, FAN Qian-qian<sup>a</sup>, ZHANG Bo<sup>a</sup>, CHEN Li-meng<sup>b</sup>, MEI Dan<sup>a\*</sup>

(a. Department of Pharmacy; b. Department of Nephrology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**【Abstract】 Objective:** To develop a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ganciclovir in the plasma of a patient with renal failure. **Methods:** After addition of acyclovir (internal standard), 100  $\mu\text{L}$  plasma samples were prepared based on a simple protein precipitation by adding perchloric acid (10%), and then take 10  $\mu\text{L}$  as sample. The separation was performed on a Shim-pak CLC-ODS (150 mm  $\times$  60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) at 35  $^{\circ}\text{C}$  using 0.03 mol  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> ammonium dihydrogen phosphate in aqueous solution/ acetonitrile (97 : 3) (pH adjusted to 3.0 by  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> and the wavelength was 254 nm. The above HPLC method was used to determine the plasma concentration of ganciclovir after intravenous infusion at a dose of 75 mg in a patient with renal failure. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 0.5 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.9999$ ). The intra-run and inter-run RSDs were 1.01% ~ 5.55% ( $n = 5$ ) for the high, middle, and low check samples (1, 8, 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), and the accuracy was -0.15% ~ 8.00% ( $n = 5$ ). The extraction recoveries were 98.60% ~ 100.36% ( $n = 5$ ). The method was successfully applied to the determination of plasma concentration of ganciclovir in the patient with renal failure. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, and accurate, and it can be used for the measurement of the concentration of ganciclovir in plasma of clinical patients.

**【Key words】** ganciclovir; plasma; renal failure; drug concentration; high-performance liquid chromatographic

更昔洛韦是新一代开环核苷类抗病毒药, 其在体内可被转化为三磷酸更昔洛韦, 通过竞争性

抑制三磷酸脱氧鸟苷嵌入延伸的病毒 DNA, 从而抑制单纯疱疹病毒与巨细胞病毒的 DNA 聚合酶。

[收稿日期] 2018-12-14

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017-I2M-1-011)

[作者简介] 刘鑫, 女, 博士, 药师; 研究方向: 医院药学; Tel: (010)69156515; E-mail: twinsyuanxin@126.com

[通信作者] \*梅丹, 女, 硕士, 主任药师; 研究方向: 医院药学; Tel: (010)69156527; E-mail: meidanpunch@163.com

更昔洛韦对单纯疱疹病毒,尤其对艾滋病患者的巨细胞病毒具有强大的抑制作用<sup>[1-2]</sup>。临床上主要应用于巨细胞病毒感染的诱导期和维持期治疗。更昔洛韦在体内不代谢,以原形经肾排出体外<sup>[3]</sup>。目前,尚无文献报道肾功能衰竭患者静脉注射更昔洛韦后的血浆药物浓度及药代动力学特征,而了解更昔洛韦在肾功能衰竭患者体内的血浆药物浓度对于安全用药具有重要参考价值。为此,本文建立了人血浆中更昔洛韦的 HPLC 测定方法,并成功应用于 1 例肾功能衰竭患者的血浆更昔洛韦药物浓度测定,现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

高效液相色谱系统(日本 Shimadzu): LC-20AT 泵, DGU-20A 在线脱气机, SIL-20A 自动进样器, SPD-20A 可见紫外检测器, LC-solution 色谱处理系统;德国 Ping-Pong 7458 卧式震荡器;台湾 Vortex-Mixer 液体混合器;德国 Mikro 12-24 离心机。

### 1.2 药品与试剂

更昔洛韦对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100380-201103,含量 97.7%),阿昔洛韦对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140630-201403,含量 99.8%),磷酸二氢铵为分析纯,乙腈、磷酸为色谱纯,实验用水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Shim-pak CLC-ODS (150 mm×60 mm, 5 μm) 柱;流动相为 0.03 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢铵缓冲液水溶液:乙腈 = 97:3 (磷酸调节 pH 至 3.0);流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温: 35℃;紫外检测波长: 254 nm;进样量: 10 μL。

### 2.2 样品制备

**2.2.1 血浆标准曲线样品的制备** 称取更昔洛韦对照品 20 mg,置于 10 mL 容量瓶中,以蒸馏水溶解并定容,混匀得到 2000 μg·mL<sup>-1</sup> 更昔洛韦标准曲线储备液。量取储备液适量,用蒸馏水稀释,得到浓度为 100、1000 μg·mL<sup>-1</sup> 标准曲线工作液。分别移取不同浓度的工作液适量至 10 mL 容量瓶中,空白血浆加至刻度,摇匀,得到浓度为 0.5、2.5、

10、25、50 μg·mL<sup>-1</sup> 的血浆标准曲线样品,分装后冻存于 -60℃。

**2.2.2 更昔洛韦血浆质控样品制备** 以配制血浆标准曲线样品相同方法,另行配制更昔洛韦血浆质控样品,浓度分别为 1、8、30 μg·mL<sup>-1</sup>,分装后冻存于 -60℃。内标储备液:称取阿昔洛韦对照品 3 mg,置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解后定容,混匀得到 30 μg·mL<sup>-1</sup> 的内标储备液,分装后冻存于 -60℃。

**2.2.3 患者血浆样品处理** 患者,女,53 岁,体重 62 kg, eGFR 16.5 mL·min<sup>-1</sup>·1.73m<sup>-2</sup>,血 Cr 653 mmol·L<sup>-1</sup>,属于肾功能衰竭期且合并巨细胞病毒感染,未行透析治疗。采集该患者(给药方案为更昔洛韦 75 mg,静脉滴注 40 min,每周 2 次,患者已签署知情同意书)给药前(0 h)、静滴完毕后即刻及第 1、24、48、72 小时的静脉血 2 mL 于肝素钠抗凝管中,分离血浆。取待测血浆样品 100 μL 于 1.5 mL 离心管中,依次加入 10 μL 内标储备液、50 μL 10% 的高氯酸溶液,涡旋 30 s,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,移取上清液 10 μL 进样测定。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 专属性实验** 分别取更昔洛韦和内标标准溶液、空白血浆、空白血浆加更昔洛韦和阿昔洛韦对照品和患者给药后的血浆样品,按“2.2”项下方法处理样品,色谱图见图 1。血浆中更昔洛韦的测定不受杂质干扰,基线噪音较小。

**2.3.2 线性实验** 取血浆标准曲线样品,按“2.2”项下方法操作,以更昔洛韦浓度为横坐标,更昔洛韦浓度与内标的峰高比为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线回归方程为  $y = 0.3927x - 0.05434$  ( $r = 0.9999$ ),在 0.5 ~ 50 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好。

**2.3.3 方法精密度与准确度实验** 对人血浆中更昔洛韦低、中、高 3 个浓度(1、8 和 30 μg·mL<sup>-1</sup>) 的日内、日间精密度和准确度进行考察,日内精密度和准确度考察采取样品连续进样 5 次;日间精密度和准确度考察采取连续 5 d 进样分析。结果详见表 1。更昔洛韦测定的日内和日间精密度 RSD 在 1.01% ~ 5.55% 之间,日内和日间准确度在 -0.15% ~ 8.00% 之间,提示该方法准确、可靠、重现性好,符合药物临床生物样品定量分析的要求。

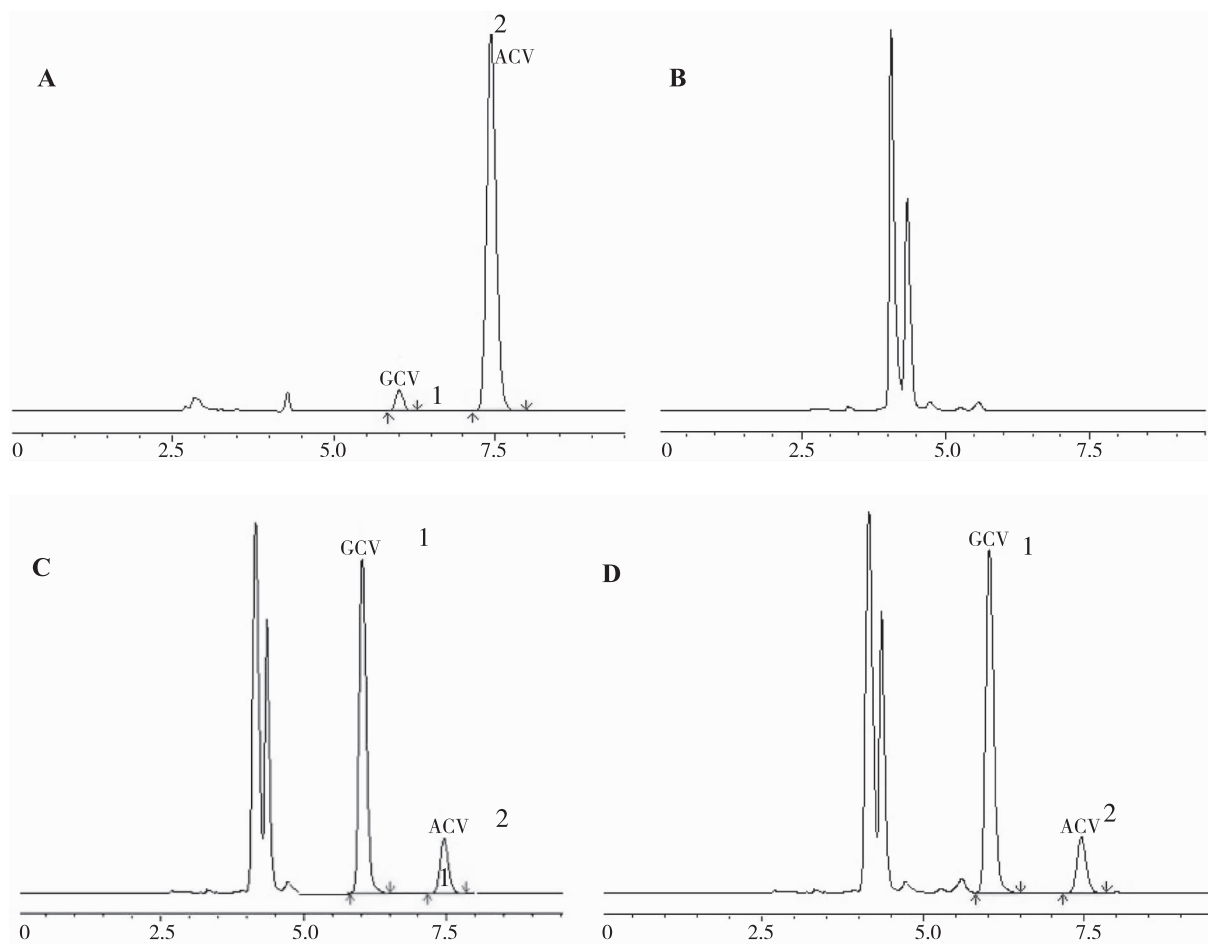


图1 更昔洛韦色谱图

注：A：更昔洛韦+内标对照品；B：空白血浆；C：空白血浆+更昔洛韦+内标对照品；D：患者血浆+内标对照品；ACV：阿昔洛韦；GCV：更昔洛韦

表1 更昔洛韦在人血浆中的精密度、准确度( $n=5$ )

更昔洛韦浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内			日间		
	测量浓度( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RE(%)	RSD(%)	测量浓度( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RE(%)	RSD(%)
1	$1.08 \pm 0.06$	8.00	5.55	$1.00 \pm 0.01$	-0.15	1.01
8	$8.23 \pm 0.14$	2.88	1.70	$8.33 \pm 0.24$	4.14	2.91
30	$30.19 \pm 0.48$	0.63	1.59	$31.39 \pm 0.57$	4.62	1.83

**2.3.4 提取回收率实验** 取浓度为1、8和30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质控样品，按“2.2”项下方法操作；另配制相同浓度的更昔洛韦及内标对照品溶液，直接进样。将2组峰高进行比较，计算提取回收率。更昔洛韦的提取回收率为98.60%~100.36%，RSD均<6.50% ( $n=5$ )。

**2.3.5 空白样品残留检测** 在标准曲线定量上限浓度检测后测定空白血浆样品，残留小于曲线最低定量限的10%，满足临床血浆样品分析测定的要求。

**2.3.6 肾功能衰竭患者血浆药物浓度测定** 采用本研究建立的HPLC方法，测定血浆样品中更昔洛韦的浓度。结果见图2。

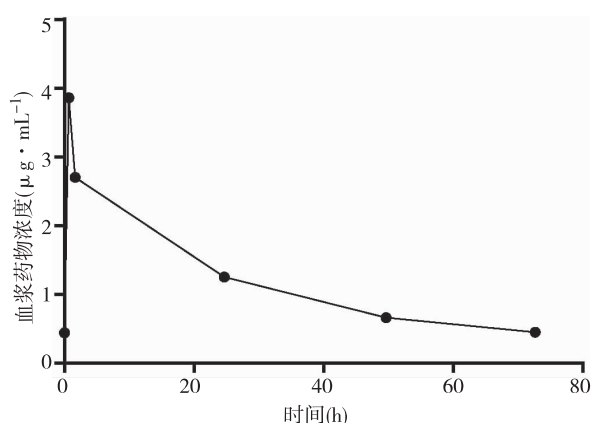


图2 肾功能衰竭患者静脉滴注更昔洛韦(75 mg)的血浆药物浓度-时间曲线

### 3 讨论

在方法学建立过程中,本研究比较了不同提取溶剂如甲醇、乙腈、高氯酸等对样品处理回收率的影响。与以往研究方法<sup>[4-8]</sup>相比,本研究以0.5倍体积的10%高氯酸沉淀血浆样品,不但操作快速、简便、回收率高,且小体积沉淀剂可提高样品测定的灵敏度。本研究还考察了流动相中0.03 mol · mL<sup>-1</sup>磷酸二氢铵水溶液与乙腈的比例分别为70:30、85:15及97:3时的出峰时间及干扰峰情况,结果显示二者比例为97:3时,出峰时间较合适且不受杂峰干扰。因以往研究<sup>[4-8]</sup>均表明更昔洛韦血浆样品稳定性好,因此本实验未进行更昔洛韦血样样品稳定性实验。

更昔洛韦是继阿昔洛韦之后开发的一种核苷类广谱抗病毒药,是第一个用于治疗人体巨细胞病感染的药物。更昔洛韦最常见的不良反应是骨髓抑制,发生率约为40%,其主要表现为中性粒细胞和血小板减少,严重者会引起出血和感染。更昔洛韦的其他不良反应还包括中枢神经系统异常(精神异常、紧张、震颤、头痛、失眠、抽搐、神志不清等)、消化道不良反应、过敏反应等<sup>[9]</sup>。由于更昔洛韦体内不代谢、经肾由尿排出体外,因此肾功能对于更昔洛韦体内血药浓度具有重要影响,说明书中也指出肾功能减退者使用剂量应酌减。因此,了解肾功能衰竭患者体内更昔洛韦血药浓度,对于指

导临床用药、调整药物剂量具有重要意义。但限于临床中使用更昔洛韦的肾功能衰竭患者较少,本研究仅测定了1例患者的血浆药物浓度,在今后研究中尚需要收集更多的临床样品数据,进一步阐明更昔洛韦在肾功能衰竭患者体内的动力学特征,为临床合理用药提供参考。

综上,本实验所建立的人血浆中更昔洛韦的HPLC测定方法灵敏度高、重现性好、操作简便、快速,能够满足临床对更昔洛韦血浆浓度测定的要求,为日后肾功能衰竭患者应用更昔洛韦的用药安全性奠定了基础。

### 【参考文献】

- [1] 张李峰,田金徽,移康,等. 更昔洛韦对防治肾移植后巨细胞病毒感染预防性治疗的系统评价[J]. 复旦学报(医学版), 2010,37(2):131-139.
- [2] Maffini E, Giaccone L, Festuccia M, et al. Treatment of CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Expert Rev Hematol, 2016,9(6):585-596.
- [3] Mareri A, Lasorella S, Iapadre G, et al. Anti-viral therapy for congenital cytomegalovirus infection: pharmacokinetics, efficacy and side effects [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(10):1657-1664.
- [4] 史桂玲,刘杰. HPLC法测定更昔洛韦血药浓度[J]. 天津药学, 2006,18(4):40-41.
- [5] 孔爱英,纪宏,韩杰,等. HPLC法同时快速测定伐昔洛韦、泛昔洛韦和更昔洛韦含量[J]. 中国抗生素杂志, 2015,40(8):607-610.
- [6] Padullés A, Colom H, Armendariz Y, et al. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography-UV detection [J]. Clin Biochem, 2012,45(4-5):309-314.
- [7] Chu F, Kiang C H, Sung M L, et al. A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999,21(3):657-667.
- [8] Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, et al. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2003,17(8):500-503.
- [9] 杜士明,冉培红,蔡华. 更昔洛韦的不良反应和药物相互作用 [J]. 中国药师, 2006,9(9):859-860.

(本文编辑:周园)