

伏立康唑血浆药物浓度高效液相色谱法的建立及应用

陈明,赵冠人,西娜*

中国人民解放军总医院 第八医学中心 药剂科,北京 100091

【摘要】目的 旨在开发一种测定伏立康唑血药浓度的方法,用于监测同时使用利福霉素类药物患者体内伏立康唑血药浓度的变化。**方法** 采用高效液相色谱法(HPLC)进行测定,色谱柱为Eclipse XDB-C18柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相为甲醇/0.2%醋酸溶液(V/V=65:35);检测波长为256 nm;流速为1.0 mL/min;血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,室温条件下进样分析。考察方法的专属性、线性、精密度与回收率等,并用建立的方法进行患者体内伏立康唑血药浓度的测定。**结果** 标准曲线在0.204~10.2 μg/mL浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$),伏立康唑保留时间为4.5 min,日内、日间精密度(RSD)与准确度(RE)均<10%,提取回收率为91.1%~95.1%。服用伏立康唑的21例结核患者中,17例患者联用利福霉素类药物,其中14例(82.4%)患者伏立康唑血药浓度低于有效范围下限;4例未联用利福霉素类药物的患者血药浓度在有效浓度范围内。服用伏立康唑的36例非结核患者中,仅5例(13.9%)患者伏立康唑血药浓度低于有效范围下限。**结论** 本方法准确度高、稳定性好,简便快捷,适合于临床伏立康唑体内样本的高通量测定。

【关键词】 结核;利福平;伏立康唑;血药浓度

【中图分类号】 R978;R945;R969.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3384(2020)11-0045-04

Doi: 10.3969/j.issn.1672-3384.2020.11.011

Establishment and application of HPLC method for blood concentration of voriconazole

CHEN Ming, ZHAO Guan-ren, XI Na*

Department of Pharmacy, the Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100091, China

【Abstract】 Objective The aim of this study was to develop a method for the determination of voriconazole concentration in plasma, which can be used to monitor the changes of voriconazole concentration in patients with tuberculosis after concurrent use of rifampicin. **Methods** The chromatographic column used was Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm * 150 mm, 5 micron) by HPLC. The mobile phase was methanol/0.2% acetic acid solution (V/V=65:35). The detection wavelength was 256 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. Plasma samples were injected and analyzed at room temperature after protein precipitation by methanol. The specificity, linearity, precision and recovery of the method were investigated and the plasma concentration of voriconazole was determined by the established method. **Results** The established method had a good linear relationship ($r=0.9999$) and a linear range of 0.204-10.2 μg/mL, which covered the effective concentration range of voriconazole. The retention time of voriconazole was 4.5 min. The intra-day and inter-day precision (RSD) and accuracy (RE) were less than 10%, and the recovery was 91.1%-95.1%. During the sample determination, 17 of 21 tuberculosis patients were treated with rifampicin. Among them, 14 patients (82.4%) had blood concentration of voriconazole lower than the lower limit of effective range, and the blood concentrations of 4 patients without the use of rifampicin were within normal ranges. Among 36 non-tuberculosis patients, only 5 (13.9%) patients had blood concentrations of voriconazole lower than the lower limit of effective range. **Conclusion** The established method was accurate, stable, simple and fast, and suitable for the high-throughput determination of voriconazole *in vivo*.

【Key words】 tuberculosis; rifampicin; voriconazole; blood drug concentration

*通信作者:西娜,E-mail: xxabc2012@163.com

结核患者由于自身免疫力下降,会存在继发感染的倾向,其中真菌感染比较常见^[1-2]。伏立康唑(voriconazole)由于对各种真菌的耐药率较低,常被用于控制真菌感染^[3]。利福霉素类药物利福平是临床常用的一线抗结核药物,其作为CYP酶强诱导剂,可通过提高CYP酶的活性或增加P糖蛋白的表达来降低其他药物的血药浓度。对于合并真菌感染的结核患者,常需要同时联用伏立康唑,而伏立康唑在体内需要维持一定的血药浓度才能发挥药效。因此,监测伏立康唑体内血药浓度显得尤为重要。本研究旨在建立一种准确、方便、快捷的方法,用于临床中测定同时使用利福霉素类药物的结核患者体内伏立康唑的血药浓度。

1 材料与方法

1.1 色谱条件

岛津高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统(日本Shimadzu公司);色谱柱:Eclipse XDB-C18柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);保护柱:ZORBAX SB-C18柱(2.1 mm×12.5 mm, 5 μm);室温;流动相:甲醇/0.2%醋酸溶液(V/V=65:35)(甲醇和醋酸,色谱纯,美国Fisher Scientific公司);超纯水由Milli-Q纯水仪制备,德国Merck公司);检测波长:λ=256 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。

1.2 样品配制

1.2.1 血浆标准曲线样品制备 精密称取(XP105DR分析天平,瑞士Mettler Toledo公司)伏立康唑标准品10.2 mg(中国食品药品检定研究院,含量:100%,批号:100862-2000701)置于10 mL容量瓶中,用50%甲醇溶液定容至刻度,得1020 μg/mL伏立康唑标准液,作为储备液备用。量取储备液适量,用50%甲醇溶液稀释为102.0、81.6、51.0、20.4、10.2、5.1、2.04 μg/mL的标准工作液。平行量取7份空白血浆(解放军总医院第八医学中心体检中心提供)各90 μL,分别加入上述标准工作液10 μL,得到伏立康唑浓度为10.2、8.16、5.1、2.04、1.02、0.51、0.204 μg/mL的血浆标准曲线样品。

1.2.2 血浆质控样品制备 平行量取3份90 μL空

白血浆,分别向其中加入81.6、20.4、5.1 μg/mL的标准液各10 μL,得到8.16、2.04、0.51 μg/mL高、中、低3种浓度的血浆质控样品。

1.2.3 血浆待检样品制备 取血浆样品100 μL于1.5 mL离心管中,加入200 μL甲醇沉淀蛋白,涡旋混合1 min,离心10 min(14 000 r/min, 4℃),取上清液20 μL进样分析。

1.3 方法学考察

1.3.1 专属性实验 分别取人空白血浆、伏立康唑标准品溶液和两者混合样品,按样品配制项下方法处理后,进样分析。

1.3.2 线性实验 取血浆标准曲线样品,按血浆待检样品制备方法处理后,进样分析。以样品峰面积(Y)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制回归曲线,求得直线回归方程即为标准曲线方程。

1.3.3 准确度与精密度实验 取高、中、低3种浓度的血浆质控样品,按血浆待检样品制备方法处理后,进样分析。每种浓度日内连续测定6次,连续测定6 d,每种浓度所测数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3.4 提取回收率实验 取高、中、低3种浓度的血浆质控样品,按血浆待检样品制备方法处理后,进样分析得峰面积 A_1 。另量取空白血浆1 mL,先用2 mL甲醇沉淀蛋白,经离心沉淀后得上清液。平行量取3份各90 μL该上清液,分别向其中加入81.6、20.4、5.1 μg/mL标准溶液各10 μL,得到8.16、2.04、0.51 μg/mL高、中、低3种浓度的上清液样品,进样分析得峰面积 A_2 。提取回收率= $A_1/A_2 \times 100\%$ 。

1.3.5 稳定性实验 取高、中、低3种浓度的血浆质控样品,按血浆待检样品制备方法处理后,分别考察室温放置24 h、经过3次冻融后的伏立康唑浓度变化。分别进样分析得峰面积 A_x ,其中各浓度0时刻峰面积为 A_0 ,变化率= $(A_0 - A_x)/A_0 \times 100\%$ 。

1.4 伏立康唑血药浓度测定

收集中国人民解放军总医院第八医学中心结核科确诊结核并伴真菌感染的患者及泌尿外科泌尿系真菌感染的患者。纳入标准:年龄18~65岁,服用伏立康唑,无基础代谢疾病的患者。排除标准:孕妇,酗酒患者,患有乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病及严重营养不良的患者。按照上述标准,共收集临床患者57例,其中结核患者21例,非结核患者36例。为保证所测均

为谷浓度(有效血药浓度 1.5~5.5 $\mu\text{g/mL}$), 采样时间均为患者下次服用伏立康唑前 2 h。本研究经过医院医学伦理委员会批准(20181211), 征得患者及家属同意, 并签署知情同意书。

2 结果

2.1 专属性实验

典型色谱图见图 1, 内源性物质对测定无干扰。伏立康唑保留时间: $R_t=4.5$ min。

2.2 线性实验

标准曲线方程为: $Y=9207.7C-166.12$, $r=0.9999$, 在 0.204~10.2 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 线性关系良好。

2.3 准确度与精密度实验

从表 1 中可以看出, 高、中、低 3 种浓度样品的日内及日间精密度良好, 均 $<10\%$; 准确度较高, 相对偏差均 $<10\%$ 。

2.4 提取回收率实验

结果见表 1。从表中可以看出, 高、中、低 3 种浓度样品的提取回收率为 91.1%~95.1%。

2.5 稳定性实验

结果见表 2。从表中可以看出, 高、中、低 3 种浓度样品的变化率均 $<10\%$, 表明伏立康唑的稳定性良好。

2.6 伏立康唑血药浓度测定

2.6.1 结核患者伏立康唑血药浓度 在 21 例结核患者中, 4 例没有联用利福霉素类药物的患者伏立康唑血药浓度分别为 1.80、3.23、2.12、2.10 $\mu\text{g/mL}$, 均在有效范围内。17 例联用利福霉素类药物的患者中, 14 例(82.4%)患者伏立康唑血药浓度低于有效范围下限(1.5 $\mu\text{g/mL}$), 其中 8 例患者伏立康唑血药浓度甚至低于线性范围下限(0.204 $\mu\text{g/mL}$), 6 例患者血药浓度为 0.24~0.74 $\mu\text{g/mL}$; 其余 3 例患者血药浓度分别为 1.85、4.59 及 5.64 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究中 1 例结核患者停用利福平 1 周后, 再次测定伏立康唑血药浓度, 由 0.34 $\mu\text{g/mL}$ 升至 3.86 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6.2 非结核患者伏立康唑血药浓度 在 36 例非结核患者中, 5 例患者伏立康唑血药浓度为 0.41~1.29 $\mu\text{g/mL}$, 低于有效范围下限(1.5 $\mu\text{g/mL}$); 6 例患者血药浓度为 5.85~7.31 $\mu\text{g/mL}$, 高于有效范围上限(5.5 $\mu\text{g/mL}$); 其余 25 例患者的血药浓度 1.96~5.3 $\mu\text{g/mL}$, 处于有效范围内。

3 讨论

机体免疫力低下时真菌会大量繁殖引发疾病, 结核患者由于受到结核杆菌侵袭导致机体免疫力低下, 容易诱发真菌感染。伏立康唑作为时间依赖型抗真菌药物, 体内的血药谷浓度需要维持在 1.5~5.5 $\mu\text{g/mL}$

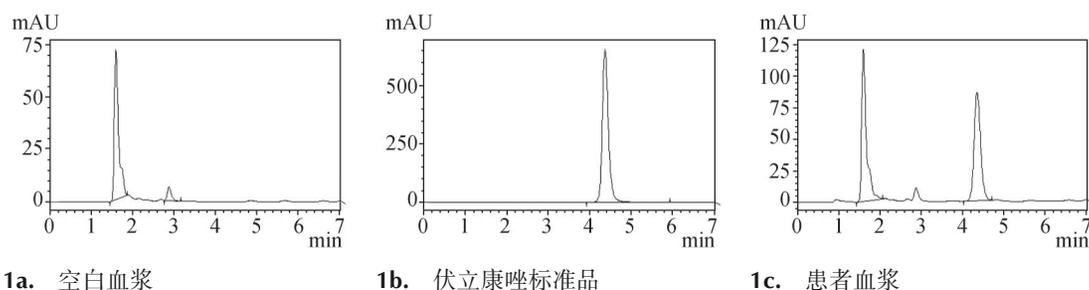


图 1 专属性实验色谱图

表 1 伏立康唑精密度、准确度及提取回收率($n=6$)

| 伏立康唑浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 实测值 ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x}\pm s$) | 精密度(%) | | 准确度(%) | 提取回收率(%) |
|--------------------------------|--|--------|------|--------|----------|
| | | 日内 | 日间 | | |
| 高浓度(8.16) | 7.89 \pm 0.28 | 3.55 | 5.20 | 3.31 | 95.1 |
| 中浓度(2.04) | 1.87 \pm 0.11 | 5.88 | 7.54 | 8.33 | 93.6 |
| 低浓度(0.51) | 0.56 \pm 0.04 | 7.14 | 9.97 | 9.80 | 91.1 |

表2 伏立康唑血浆样品稳定性(n=3)

| 伏立康唑浓度(μg/mL) | 放置时间(h)/ 处置 | 变化率(%) |
|---------------|----------------|--------|
| 高浓度(8.16) | 0 | 0.0 |
| | 4 | 1.2 |
| | 8 | 1.5 |
| | 12 | 1.7 |
| | 24 | 2.1 |
| | 冻融3次 | 3.4 |
| 中浓度(2.04) | 0 | 0.0 |
| | 4 | 2.4 |
| | 8 | 3.1 |
| | 12 | 2.9 |
| | 24 | 3.5 |
| | 冻融3次 | 4.1 |
| 低浓度(0.51) | 0 | 0.0 |
| | 4 | 3.5 |
| | 8 | 3.8 |
| | 12 | 3.9 |
| | 24 | 4.2 |
| | 冻融3次 | 4.5 |

才能起到有效杀菌作用。体外实验表明,伏立康唑不仅是CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4的底物,也是其抑制剂,其中对CYP2C19的亲合力最高。然而利福平作为CYP酶强诱导剂,会加速伏立康唑在患者体内的代谢。有研究表明,利福平合用伏立康唑,可以使伏立康唑稳态血药浓度显著降低,血药浓度-时间曲线下面积甚至可降低95.5%^[4]。即使应用负荷剂量的伏立康唑也不能使其恢复到正常水平。本研究结果中,利福霉素类药物联用伏立康唑,大幅降低了其稳态血药浓度水平,进而影响其药效。研究中有3例联用利福霉素类药物的结核患者血药浓度在有效范围内,其中2例给予常规剂量伏立康唑(200 mg bid),但2人体型均偏瘦,另外1例则给予高于常规剂量的伏立康唑(300 mg bid)。

当结核患者合并真菌感染时,鉴于利福霉素类药物与伏立康唑的相互影响,应禁止两者合用,可将伏立康唑更换为无相互作用的棘白菌素类药物或多烯类药物。确需使用伏立康唑时,建议暂停利福霉素类药物。同时,由于利福霉素类药物对伏立康唑的影响

一般在1周左右,在停用利福霉素类药物1周后,伏立康唑血药浓度才恢复至有效浓度范围内^[5]。因此在停用利福霉素类药物后的1周内暂不使用伏立康唑,1周后先给予负荷剂量的伏立康唑,其后调整为维持剂量,同时继续监测伏立康唑血药浓度,在真菌得到有效控制后,再继续使用利福霉素类药物。

伏立康唑血药浓度测定多采用HPLC^[6-8]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[9-10],也有使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)^[11]和毛细管电泳^[12]方法测定。本研究开发的测定结核患者伏立康唑血药浓度的HPLC方法,操作简单、用时较短,线性范围覆盖了伏立康唑的有效浓度范围,且在线性范围内线性关系良好,可以满足临床进行常规血药浓度监测。

【参考文献】

- [1] Cao B S, Liang Y M, Li X L, et al. Contrast-enhanced sonography of juxtapleural pulmonary tuberculoma[J]. J Ultrasound Med, 2013, 32(5):749-756.
- [2] Ou S M, Liu C J, Teng C J, et al. Impact of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis infection in kidney transplantation: a nationwide population-based study in Taiwan[J]. Transpl Infect Dis, 2012, 14(5):502-509.
- [3] 韩志娟, 郑玉兰, 黄巧新, 等. 肺结核患者感染真菌的药敏分析及预防措施[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20):4645-4647.
- [4] 孟现民, 张莉. 伏立康唑药物相互作用与处理对策[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(6):415-420.
- [5] 鲁虹, 史群志, 李玲, 等. 基于伏立康唑血药浓度监测的药物相互作用研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(7):864-867.
- [6] 李琳, 刘家鑫, 龙猜, 等. HPLC法测定伏立康唑眼用凝胶中有关物质的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(7):557-562.
- [7] 李敏, 陈超阳, 许俊羽, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(3):316-318.
- [8] 史长城, 楼江, 王飞, 等. HPLC法测定人血浆中VRC的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 27(4):235-238.
- [9] 向瑾, 余勤, 梁茂植, 等. HPLC-MS/MS测定人血浆中VRC质量浓度及其生物等效性研究[J]. 四川大学学报, 2018, 49(1):102-106.
- [10] 刘洋, 邱婷婷, 张昭, 等. HPLC-MS/MS法测定人血浆中VRC浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 264(5):1222-1225.
- [11] Alisha S, Van L P. Determination of voriconazole concentrations in serum by GC-MS[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(5):411-417.
- [12] Theurillat R, Zimmerli S, Thormann W. Determination of voriconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(5):1313-1318.

收稿日期:2019-08-09

本文编辑:周园