

· 论著 ·

HPLC 法测定人血浆中伏立康唑及其代谢物的浓度

王志君, 杨云云, 张文静, 王学彬, 宋洪杰, 王 卓 (海军军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433)

[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及其代谢物浓度的方法, 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(UV)检测法, 以罂粟碱为内标, 乙腈蛋白沉淀法处理血浆样品。色谱柱为 ACE5C₁₈-AR (150 mm×4.6 mm), 流动相为 0.025 mol/L 磷酸二氢钠(含三乙胺 400 μl/L, 用 0.25 mol/L 的氢氧化钠调至 pH=7.0)-乙腈(67:33), 流速为 1 ml/min, 柱温为 40 °C, 检测波长为 255、276 nm(双波长检测), 进样量为 20 μl。**结果** 伏立康唑氮氧化物、伏立康唑和罂粟碱的保留时间分别为 4.5、11.3、13.7 min; 血浆中伏立康唑、伏立康唑氮氧化物线性范围均为 0.5~20.0 μg/ml($r=0.9995$), 定量下限均为 0.5 μg/ml, 批内、批间 RSD 均<11%, 定量下限、低、中、高梯度浓度提取回收率在 90.3%~109.9%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和对其主要代谢物的测定。

[关键词] 伏立康唑; 伏立康唑氮氧化物; 高效液相色谱; 治疗药物监测

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0162-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.012

Determination of voriconazole and its metabolites in human plasma by HPLC

WANG Zhijun, YANG Yunyun, ZHANG Wenjing, WANG Xuebin, SONG Hongjie, WANG Zhuo (Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200433)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for the determination of the voriconazole concentration in human plasma, which can be used for voriconazole monitoring clinically. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC-UV) detection method was used with papaverine as internal standard. Acetonitrile protein precipitation method was employed to treat plasma samples. The chromatographic column was ACE5C₁₈-AR150 mm×4.6 mm with the mobile phase 0.025 mol/L sodium dihydrogen phosphate (containing triethylamine 400 μl/L, pH=7.0 adjusted by 0.25 mol/L sodium hydroxide) - acetonitrile (67:33). The flow rate was 1 ml/min, the column temperature at 40 °C, the detection wavelength at 255, 276 nm (double wavelength detection) and sampling amount 20 μl. **Results** The retention time of voriconazole nitrogen oxide, voriconazole and papaverine were 4.5, 11.3 and 13.7 min respectively. The linear ranges of voriconazole and voriconazole nitrogen oxides in plasma were 0.5-20.0 μg/ml ($r=0.9995$). The quantitative lower limits were 0.5 μg/ml with RSD<11%. The recovery rates of extraction were between 90.3% and 109.9%. **Conclusion** This simple and accurate method is suitable for clinical monitoring of voriconazole.

[Key words] voriconazole; voriconazole nitrogen oxide; HPLC; therapeutic drug monitoring

伏立康唑(voriconazole)为三唑类广谱抗真菌药, 2004年被FDA批准为曲霉菌或念珠菌血症的首选药物。其抑制麦角甾醇的合成, 导致细胞膜的通透性异常, 促使真菌细胞死亡, 从而发挥强大的抗真菌效应^[1]。与其他三唑类抗真菌药相比, 伏立康唑是一种耐受性良好的药物, 但有肝毒性、神经毒性, 同时伏立康唑的药动学个体间差异很大, 主要原因是人体内的

代谢酶 CYP2C19 具有遗传多态性, 特别是亚洲人中弱代谢者的发生率高达 15%~20%, 同时患者自身的疾病状态或合并用药可能增加伏立康唑代谢的差异^[2-7]。因此, 对伏立康唑及其主要代谢物伏立康唑氮氧化物进行血药浓度监测具有临床意义。目前, 用于伏立康唑血药浓度测定的方法主要包括微生物检测法、高效毛细管电泳(HPCE)法、高效液相色谱-荧光检测法和超高效液相色谱串联质谱法^[8-11], 考虑到临床应用的实用性和可行性, 本研究建立了样品沉淀蛋白, 并用 HPLC-UV 测定的方法, 使其具有快速、灵敏、准确、稳定的特点, 并可以同时测定伏立康唑及其氮氧化物, 以便于日常治疗药物监测(TDM)和个

[作者简介] 王志君, 硕士研究生, 主管药师, Email: wl19521957@126.com

[通讯作者] 王 卓, 博士, 主任药师, 研究方向: 临床药理学, Email: wangzhuo088@163.com

体化给药调整。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(包括 SPD-20A 紫外检测器、SIL-20AC 自动进样器、CTO-20A 柱温箱日本岛津公司); C_{18} -AR 色谱柱(ACE 150 mm \times 4.6 mm, 柱号:V12-6682);XW-80A 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司);离心机(Eppendorf AG 22331 Hamburg 5452ZR858343);SQP 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);pH 计(赛多利斯科学仪器北京有限公司);DL-180A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);1.5 ml 微型离心管(EP 管)。

1.2 药品与试剂

伏立康唑标准品(中国药品食品检定研究院,批号:100862-201402,含量 99.2%);罂粟碱(Cayman CHEMICAL 公司,批号:0476735-1,含量 \geq 98%);伏立康唑氮氧化物(Toronto Research Chemicals 公司,批号:7-dpm-64-3,含量 97%);甲醇、乙腈(色谱纯)、氢氧化钠、磷酸二氢钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);空白人血浆(长海医院血库)。

1.3 数据处理软件

LcSolution 版本 1.26 SP1(日本岛津公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 ACE 5 C_{18} -AR(150 mm \times 4.6 mm, 柱号:V12-6682),以 0.025 mol/L 磷酸二氢钠(含三乙胺 400 μ l/L,用 0.25 mol/L 的氢氧化钠调至 pH 为 7.0)-乙腈(67:33)为流动相,检测波长:255、276 nm(双波长检测),流速:1.0 ml/min,自动进样器温度:4 $^{\circ}$ C,柱温:40 $^{\circ}$ C,进样量:20 μ l。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取伏立康唑标准品、伏立康唑氮氧化物标准品适量,置 50 ml 棕色量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,即得 400 mg/L 的标准品储备液,置 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏保存,备用。

2.2.2 内标溶液

精密称取罂粟碱适量置 100 ml 棕色量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,得浓度为 100 mg/L 的内标储备液;取内标储备液 5 ml 置 100 ml 棕色量瓶中,用乙腈稀释至刻度,得浓度为 5 mg/L 的内标溶液,置 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏保存,备用。

2.3 血浆样品的预处理

取血浆 0.3 ml 于 1.5 ml 的 EP 管中,再加乙腈至 1.2 ml,涡旋振荡 0.5 min,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液 20 μ l 进样分析。

2.4 方法专属性试验

分别取空白血浆、加入内标溶液的空白血浆、加入伏立康唑和伏立康唑氮氧化物及内标溶液的空白血浆、使用伏立康唑的患者血浆样品,按“2.3”项下操作进行前处理,按“2.1”项下方法检测,结果发现伏立康唑氮氧化物、罂粟碱、伏立康唑保留时间分别为 4.5、11.3、13.7 min,各峰分离度均大于 2,理论塔板数均大于 1 000,空白血浆和流动相中干扰组分的响应低于分析物定量下限响应的 20%,并低于内标响应的 5%,结果见图 1。

2.5 线性关系考察

取空白血浆及伏立康唑和伏立康唑氮氧化物储备液以及罂粟碱储备液,将伏立康唑和伏立康唑氮氧化物浓度分别配制为 0.5、1、2、5、10、15、20 μ g/ml,内标罂粟碱浓度调为 3.75 μ g/ml 的混合血浆样品。按“2.3”项下血浆样品预处理,按“2.1”项下色谱条件测定,以伏立康唑氮氧化物和罂粟碱面积的比值(F_1)对血浆浓度(C_1)进行线性回归(权重系数:1/C),得回归方程为: $F_1 = 0.111 1 C_1 + 0.020 0$, $r = 0.999 5$;以伏立康唑和罂粟碱面积的比值(F_2)对血浆浓度(C_2)进行线性回归(权重系数:1/C),得回归方程为: $F_2 = 0.070 74 C_2 - 0.038 60$, $r = 0.999 5$ 。结果表明,伏立康唑和伏立康唑氮氧化物在 0.5~20.0 μ g/ml 浓度范围内呈良好线性关系。定量限浓度为 0.2 μ g/ml($S/N > 10$)。

2.6 准确度与精密度试验

2.6.1 批内回收率和精密度

分别配制定量下限及低、中、高浓度样品(0.5、1、5、15 μ g/ml)的质控(QC)血浆样品,每个浓度取 5 个样本,按“2.3”项方法操作,测定。根据当日的标准曲线测定 QC 样品的相对回收率,伏立康唑:101.3%、103.8%、94.2%、91.7%(RSD 分别为 6.2%、4.4%、4.7%、1.4%, $n = 5$),伏立康唑氮氧化物:106.8%、100.1%、94.3%、91.6%(RSD 分别为 6.2%、4.8%、4.7%、2.1%, $n = 5$)。

2.6.2 批间回收率和精密度

分别配制 3 批的定量下限及低、中、高浓度样品(0.5、1、5、15 μ g/ml)的 QC 血浆样品,每个浓度取 5 个样本,按“2.3”项方法操作,分 3 d 进行测定,测定结果的峰面积代入相应的当日标准曲线,计算 QC 样品的回收率,伏立康唑:97.9%、99.6%、

102.6%、101.6% (RSD 分别为 9.2%、5.9%、3.3%、3.6%), 伏立康唑氮氧化物: 100.9%、100.0%、97.3%、98.7% (RSD 分别为 9.3%、6.4%、5.9%、6.7%)。

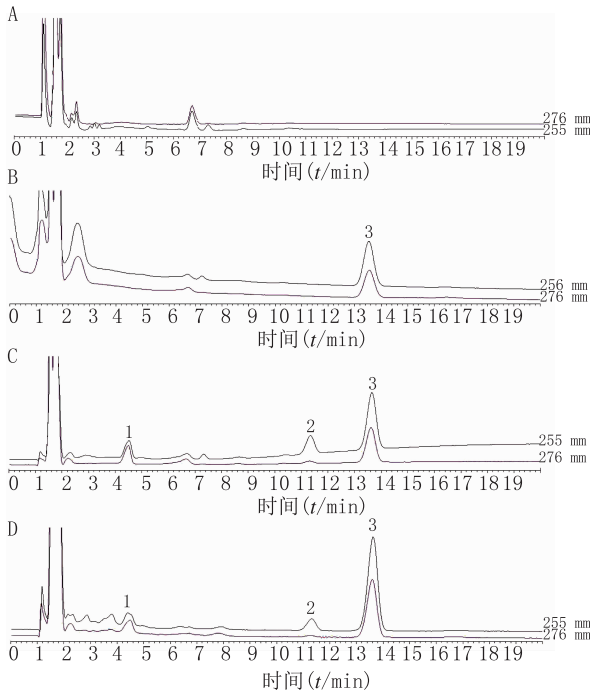


图1 伏立康唑和伏立康唑氮氧化物的专属性色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+内标; C. 空白血浆+伏立康唑对照品+伏立康唑氮氧化物对照品+内标; D. 患者血浆+内标 1. 伏立康唑氮氧化物; 2. 伏立康唑; 3. 罂粟碱

2.7 稳定性试验

2.7.1 工作溶液

取伏立康唑和伏立康唑氮氧化物乙腈溶液, 配成 0.5、2.0、15 $\mu\text{g/ml}$ 浓度系列, 以及罂粟碱乙腈溶液 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 按“2.1”项下方法处理进样, 分别于日内和日间进样测定, 计算日内和日间误差。结果显示, 伏立康唑日内(0、2、4、6、8 h)和日间(3 d)测得浓度的 RSD 分别为 1.6%和 1.2%; 伏立康唑氮氧化物日内(0、2、4、6、8 h)和日间(3 d)测得浓度 RSD 分别为 1.5%和 2.0%; 罂粟碱测得浓度 RSD 为 1.5%。伏立康唑、罂粟碱和伏立康唑氮氧化物的乙腈溶液 3 d 内稳定性良好。

2.7.2 血浆样品

制备伏立康唑和伏立康唑氮氧化物低、高浓度(含伏立康唑氮氧化物和罂粟碱)的血浆样品, 分别进行: ①反复 3 次冻融(-20~25 $^{\circ}\text{C}$)稳定性试验; ②含药血浆样品(-20 $^{\circ}\text{C}$)放置 1 个月稳定性试验; ③血浆样品处理后 48 h 稳定性试验; ④血浆样品自动进样器中(4 $^{\circ}\text{C}$)放置 24 h 稳定性试验; ⑤样品常温放置 24 h 稳定性试验。按“2.3”项方法操作, 每个浓度取 5 个样本, 测定结果的峰面积代入相应的当日标准曲线, 计算准确度。结果由表 1 可见: 血浆样品反复冻融 3 次后稳定性良好; 血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下至少可以保存 1 个月; 血浆样品处理后可在室温下保存 48 h; 处理后的血浆样品在自动进样器中(4 $^{\circ}\text{C}$)、室温中至少可保存 48 h。

表1 稳定性试验结果(n=5, %)

稳定性考察	伏立康唑				伏立康唑氮氧化物			
	低浓度回收率	RSD	高浓度回收率	RSD	低浓度回收率	RSD	高浓度回收率	RSD
冻融试验(-20~25 $^{\circ}\text{C}$ 反复 3 次冻融)	97.4 \pm 8.9	8.4	95.1 \pm 3.5	2.0	98.2 \pm 8.0	5.0	97.4 \pm 1.5	1.6
长期冷冻(-20 $^{\circ}\text{C}$ 1 个月)	95.6 \pm 10.6	8.1	106.7 \pm 2.8	2.3	91.2 \pm 4.3	3.3	97.1 \pm 6.1	4.7
血样处理后 48 h	102.2 \pm 4.9	3.1	95.5 \pm 7.1	4.0	103.7 \pm 2.4	2.1	107.0 \pm 6.0	3.7
样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h	101.4 \pm 4.9	3.2	107.4 \pm 7.1	1.7	94.3 \pm 7.8	4.6	96.3 \pm 6.9	4.5
样品常温放置 24 h	91.1 \pm 10.9	6.2	97.0 \pm 2.5	1.5	89.6 \pm 10.1	5.7	96.0 \pm 3.7	3.0

2.8 临床标本测定应用

取血液科服用伏立康唑(同时服用环孢素 A)的临床患者的血液样品(采用 EDTA 抗凝管, 取血量 2~3 ml), 3 000 r/min 离心 5 min, 取血浆 300 μl , 加 5 mg/L 的内标溶液至 1 200 μl , 涡旋振荡 0.5 min, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 20 μl 进样分析, 根据当日标准曲线定量。10 例患者中, 伏立康唑血药浓度在 0.49~5.2 $\mu\text{g/ml}$; 伏立康唑氮氧化物血药浓度在 0.43~5.5 $\mu\text{g/ml}$; 伏立康唑血药浓度/伏立康唑氮氧化物血药浓度的比值在 0.63~20 之间。在本研究过程中 1 名患者使用伏立康唑后, 临床医生根

据其血液样品监测结果对患者进行 2 次给药方案调整, 最终使伏立康唑血药谷浓度在有效浓度范围内(1~5 $\mu\text{g/ml}$), 具体监测结果见表 2。在此过程中, 通过 TDM 监测, 临床医生及时调整给药方案, 避免低效治疗并降低发生不良反应的风险。

表2 患者血药浓度监测结果($\rho_{\text{B}}/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

测定次数	伏立康唑	伏立康唑氮氧化物
第 1 次	0.7	1.2
第 2 次	5.3	4.8
第 3 次	1.4	0.7

3 讨论

3.1 检测指标成分的选择

伏立康唑主要在肝脏通过 CYP450 的同工酶 CYP2C19 代谢,主要代谢产物为无抗菌活性的伏立康唑氮氧化物,血浆中约占 72%。CYP2C19 酶呈基因多态性,其在不同人种、不同基因型患者的伏立康唑代谢具有明显差异。在给予相同剂量伏立康唑后,因代谢的明显差异,导致体内血药浓度变化较为明显,从而引起治疗效果不佳或者不良反应增加。本研究拟考察伏立康唑和伏立康唑氮氧化物的浓度来提高治疗效果,从而达到精准治疗的目的。同时为下一步拟合 CYP2C19 酶多态性及伏立康唑、伏立康唑氮氧化物浓度的关系提供数据基础。

3.2 流动相的选择

伏立康唑是三唑类化合物,采用甲醇-乙腈溶剂系统流动相,干扰现象比较严重,在流动相中加入适量盐和三乙胺可抑制其拖尾,改善峰形。本研究曾分别考察了加入不同比例三乙胺、磷酸二氢钠、氢氧化钠调节 pH 值对峰形的影响。发现 0.025 mol/L 磷酸二氢钠(三乙胺 400 μ l/L,用 0.25 mol/L 氢氧化钠调至 pH=7.0)-乙腈(67:33)作为流动相时,峰形对称,分离效果较好,检测时间适宜,从而选择其作为流动相。

3.3 提取溶媒的选择

本研究采用以乙腈为沉淀剂的蛋白沉淀法处理血液样品。采用此方法时,干扰组分的响应低于分析物定量下限响应的 20%,并低于内标响应的 5%,按照《中国药典》四部通则 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则,可作为提取方法。

3.4 检测波长的选择

255 nm、276 nm 分别为伏立康唑和伏立康唑氮氧化物的最大吸收波长,在测定部分患者血液样品时发现:检测波长为 276 nm 时,伏立康唑氮氧化物的干扰小,测定准确性好;检测波长为 255 nm 时,伏立康唑的响应值高,精密性好,所以选择双波长检测。

3.5 临床标本的测定

由于血液科用药品种多,用药方案多变,本研究采用常见的环孢素 A+伏立康唑的患者作为对象,文献报道^[12]:环孢素 A 和伏立康唑具有相互作用,伏立康唑影响环孢素 A 的血药浓度,同时两者均有肝毒性,本研究拟通过监测患者(同时使用环孢素 A 药物)伏立康唑和伏立康唑氮氧化物的血药浓度,为个体化给药方案提供数据支持,为降低血液科患者

这一特殊人群发生不良反应的风险做前期的研究准备工作。

【参考文献】

- [1] 郭天阳,杜安通,杨雅璐,等. 第二代三唑类抗真菌药物的研究进展[J]. 世界临床药物,2014,35(12):715-718.
- [2] CHUWONGWATTANA S, JANTARAROUNGTONG T, CHITASOMBAT M N, et al. A prospective observational study of CYP2C19 polymorphisms and voriconazole plasma level in adult Thai patients with invasive aspergillosis[J]. Drug Metab Pharmacokinet,2016,31(2):117-122.
- [3] XU G Q, ZHU L Q, GE T Y, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of voriconazole against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. in children, adolescents and adults by Monte Carlo simulation[J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 47(6): 439-445.
- [4] CABRAL-GALEANO E, RUIZ-CAMPS I, LEN-ABAD O, et al. Clinical usefulness of therapeutic drug monitoring of voriconazole in a university hospital[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(5):298-302.
- [5] LI Z W, PENG F H, YAN M, et al. Impact of CYP2C19 genotype and liver function on voriconazole pharmacokinetics in renal transplant recipients[J]. Ther Drug Monit, 2017, 39(4):422-428.
- [6] QI F, ZHU L, LI N, et al. Influence of different proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of voriconazole[J]. Int J Antimicrob Agents, 2017, 49(4):403-409.
- [7] WANG Y, WANG T, XIE J, et al. Risk factors for voriconazole-associated hepatotoxicity in patients in the intensive care unit[J]. Pharmacotherapy, 2016, 36(7):757-765.
- [8] BRESSÁN I G, MENDEZ M L, GIMENEZ M I. Validation of a reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatographic method with photodiode array detection for the determination of voriconazole in human serum and its application to therapeutic drug monitoring[J]. Ther Drug Monit, 2018, 40(2):276-283.
- [9] LIN S C, LIN S W, CHEN J M, et al. Using sweeping-micellar electrokinetic chromatography to sweeping-micellar electrokinetic[J]. Talanta, 2010, 82(2):653-659.
- [10] PEREA S, PENNICK G J, MODAK A, et al. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5):1209-1213.
- [11] 刘学松,何为群,陈文英,等. 肺部真菌感染患者伏立康唑血药浓度监测的临床应用[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(20): 1521-1526.
- [12] GROLL A H, TOWNSEND R, DESAI A, et al. Drug-drug interactions between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P450 3A4[J]. Transpl Infect Dis, 2017, 19(5): e12751.

【收稿日期】 2018-08-03 【修回日期】 2018-11-30

【本文编辑】 李睿曼