

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.006

双波长高效液相色谱法同时检测环孢素 A 及伏立康唑血药浓度

王林军

(新汶矿业集团有限责任公司中心医院药学部, 山东 泰安 271233)

摘要:目的 建立快速、同时测定人血中环孢素 A 及伏立康唑血药浓度的方法。方法 采用双波长高效液相色谱(HPLC)法,色谱柱为 Diamonsil RP-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵洗脱,检测波长环孢素 A 为 215 nm,伏立康唑为 256 nm,流速为 1 mL/min。结果 伏立康唑及环孢素 A 保留时间分别为 5.32 min 和 6.48 min,血药浓度线性范围分别为 30~1 500 ng/mL 和 200~10 000 ng/mL,准确度均在 95.0% 以上;日内、日间精密度的 RSD 均小于 15% (n=5)。结论 该方法灵敏、稳定,结果准确、可靠,可用于同时测定环孢素 A 及伏立康唑的血药浓度。

关键词:伏立康唑;环孢素 A;双波长高效液相色谱法;血药浓度

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)02-0017-04

Simultaneous Determination of Cyclosporine A and Voriconazole in Human Plasma by HPLC

WANG Linjun

(Department of Pharmacy, Central Hospital of Xinwen Mining Group Co., Ltd., Tai'an, Shandong, China 271233)

Abstract: Objective To establish a method for rapid and simultaneous determination of blood concentration of cyclosporine A and voriconazole in human plasma. **Methods** Dual-wavelength HPLC was adopted, the chromatographic column was Diamonsil RP-C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.01 mol/L ammonium acetate elution, the detection wavelength was 215 nm for cyclosporine A, 256 nm for voriconazole, and the flow rate was 1 mL/min. **Results** The retention time of voriconazole and cyclosporine A was 5.32 min and 6.48 min, respectively, their linear ranges of plasma concentration were 30-1 500 ng/mL and

第一作者:王林军,大学本科,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)linjunqf@163.com。

- tor-activated Smad localization in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Journal of Clinical Pathology, 2007, 60(3): 283-289.
- [2] 方鹏飞,常丽霞,宋 渊. 三七总皂苷临床应用研究进展[J]. 中医药学报, 2016, 44(3): 120-123.
- [3] 孙晓芳,段 斐,牛建昭. 三七总皂苷对肺纤维化小鼠肺组织 Fas/FasL 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 95-96.
- [4] 孙晓芳,段 斐,牛建昭,等. 三七总皂苷对肺纤维化小鼠细胞凋亡及 Bax/Bcl-2 表达的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(10): 1125-1127.
- [5] 孙晓芳,杨长福,黄春芳,等. 三七总皂苷对肺纤维化小鼠肺组织胶原影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2010, 38(5): 12-16.
- [6] 孙晓芳,段 斐,刘佳琳,等. 三七总皂苷对肺纤维化小鼠组织蛋白酶 B 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1134-1136.
- [7] 高 建,刘 干,李 俊. 肺成纤维细胞在肺纤维化进程中的作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1125-1128.
- [8] SONG JS, KANG CM, RHEE CK, et al. Effects of elastase inhibitor on the epithelial cell apoptosis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Experimental Lung Research, 2009, 35(10): 817-829.
- [9] BODAS M, VI N. The NFκB Signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential[J]. Discovery

- Medicine, 2010, 9(47): 346-356.
- [10] SHIBATA S, ISHIYAMA J. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is upregulated by transforming growth factor (TGF)-β and is required for TGF β-induced hydrogen peroxide production in fibroblasts[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013, 6(1): 6.
- [11] 崔 娜,段 斐,王晶晶,等. 川芎嗪对博来霉素致肺间质纤维化大鼠端粒酶表达的影响[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(4): 443-445.
- [12] 马跃文,佟振月,侯显明. 肺纤维化过程中不同种类胶原异常沉积及分布规律的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(6): 407-409.
- [13] 全 燕,夏前明,李福祥,等. 三七总皂苷对博来霉素致大鼠肺纤维化的干预作用[J]. 西南国防医药, 2005, 15(3): 235-238.
- [14] 姜 辉,高家荣,张家富,等. 三七总皂苷对肝纤维化大鼠的保护作用及机制[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 71-74.
- [15] 肖 敏,樊均明. 三七总皂苷在肾间质纤维化中的药理作用[J]. 中国临床康复, 2006(31): 139-141.
- [16] 胡伟平,张燕林. 三七总皂苷对腹膜纤维化大鼠转化生长因子-β₁的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(12): 1100-1102.

(收稿日期:2018-06-09)

200–10 000 ng/mL, their accuracy was over 95.0%, and RSDs of intra-day and inter-day precision were less than 15% ($n=5$).

Conclusion The method is sensitive, stable, accurate and reliable, which can be used for the simultaneous determination of blood concentration of cyclosporine A and voriconazole.

Key words: voriconazole; cyclosporin A; dual-wavelength HPLC; blood concentration

环孢素是目前移植领域最常用的免疫抑制药物,其抗排异作用与用药剂量密切相关,但该药品不良反应多且与用药剂量过大有关,故临床需要对其进行血液浓度监测,以保证用药安全有效^[1]。患者在造血干细胞移植后的并发症控制是提高恶性血液病疗效的重要环节,而感染是导致移植失败甚至致死的主要原因,因此,恶性血液病患者行造血干细胞移植后除了服用免疫抑制剂外,往往还需同时服用多种药物^[2-3]。当移植患者并发真菌感染时,多需联合使用抗真菌药物,其中伏立康唑属广谱三唑类抗真菌药物,用于治疗非中性粒细胞减少患者的念珠菌血症,可有效治疗原发性或急救性的亚急性侵袭性感染和慢性肺曲霉病等,美国感染病学会(IDSA)制订的曲霉病治疗指南中,伏立康唑是治疗侵袭性曲霉病的首选药物,移植患者出现该真菌感染后往往需合并使用该药物,而该药物在体内的代谢具有多态性,即使使用相同剂量,血药浓度也因人而异,因此,该药临床使用同样需要进行血液浓度监测^[4-5]。此外,其与环孢素 A 联合使用导致的药品不良反应多有报道^[6]。本研究中旨在建立一种快速、灵敏、准确且能同时测定两药血药浓度的分析方法,为临床监测其血药浓度提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);208 型 Milli-Q10 纯水器(美国 Millipore 公司);AEG-120 型电子分析天平(日本岛津公司);TGL-20M 型台式高速冷冻离心机(湘仪仪器有限公司)。

1.2 试药

环孢素 A 对照品(百灵威试剂公司,纯度为 99.7%);伏立康唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100862-201701);内标为醋酸可的松及熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 171217-201702,110709-201704);乙腈(美国 Fisher 公司)、醋酸铵(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20170208)为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

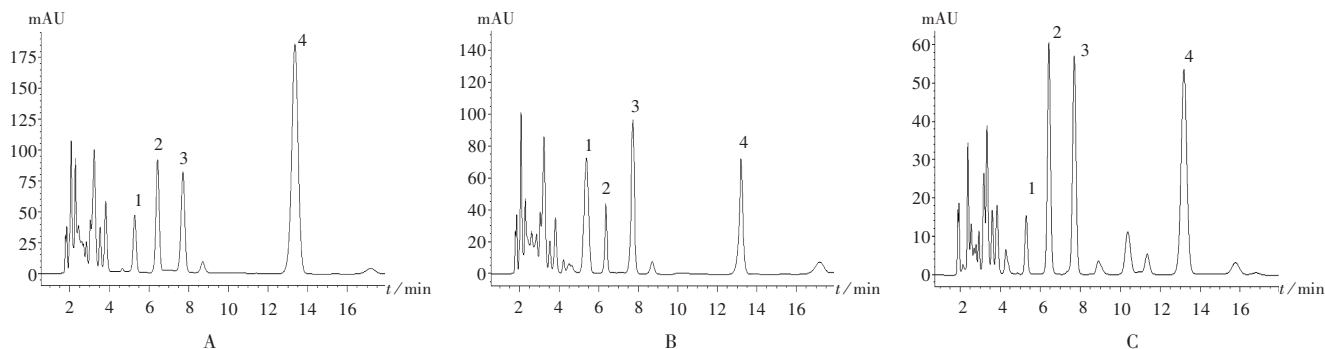
2 方法与结果

2.1 色谱条件及专属性试验

色谱柱:Diamonsil RP-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵水溶液(65:35);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:215 nm(环孢素 A),256 nm(伏立康唑);进样量:20 μL。在此色谱条件下,分别考察空白血清、环孢素 A、伏立康唑标准品及血清样品的色谱图,结果血清中内源性杂质不影响环孢素 A 与伏立康唑的分离度,内源性物质无干扰,伏立康唑及环孢素 A 保留时间分别为 5.32 min 和 6.48 min。详见图 1。

2.2 溶液制备

标准溶液配制:称取环孢素 A 10.00 mg,伏立康唑对照品 50 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,分别用甲醇溶解并定容,即得环孢素 A 质量浓度为 1 g/L,伏立康唑质量浓度为 5 g/L 的对照品贮备液,于 4℃ 下保存。取贮备液适量,用甲醇稀释,配制系列浓度的对照品工作液待用。称取熊果酸 10.00 mg、醋酸可的松 50 mg 为内标,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得内标溶液(质量浓度分别为 400 μg/mL 和 2 000 μg/mL),于 4℃ 下保存。



1. 伏立康唑 2. 环孢素 A 3. 醋酸可的松 4. 熊果酸
A. 空白血浆($\lambda=259$ nm) B. 空白血浆($\lambda=210$ nm) C. 血浆样品($\lambda=259$ nm)

图 1 高效液相色谱图

表1 精密度及准确度试验($n=5$)

样品	理论质量浓度 (ng/mL)	实测质量浓度($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)		精密度 $RSD(\%)$		准确度($\%$)	
		日内	日间	日内	日间	日内	日间
环孢素 A	30	30.4 $\pm$ 2.05	30.8 $\pm$ 3.33	6.74	10.81	101.3	102.7
	600	591 $\pm$ 40.66	607 $\pm$ 46.07	6.88	7.59	98.5	101.2
	1 500	1 511 $\pm$ 87.33	1 523 $\pm$ 123.70	5.78	8.12	100.7	101.5
伏立康唑	200	197 $\pm$ 12.71	210 $\pm$ 18.33	6.45	8.73	98.5	105.0
	4 000	4 021 $\pm$ 242.10	4 010 $\pm$ 326.40	6.02	8.14	100.5	100.2
	10 000	10 202 $\pm$ 578.50	10 311 $\pm$ 800.10	5.67	7.76	102.0	103.1

血清样品处理:量取血清样品 200 μL , 1.5 mL 离心管中,随即加入内标溶液 10 μL ,充分混匀,加入乙腈 400 μL ,涡旋振荡 2 min,沉淀蛋白,以 12 000 r/min 的速率,离心 15 min,取上清液,氮气吹干,200 μL 流动相复溶,待分析。

2.3 方法学考察

标准曲线绘制:分别取不同质量浓度的环孢素 A 及伏立康唑标准溶液各 100 μL ,加入 1 800 μL 血清中,混匀,配置环孢素 A 终质量浓度分别为 30, 90, 150, 300, 600, 1 000, 1 200, 1 500 ng/mL 的标准曲线样品;伏立康唑终质量浓度分别为 200, 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 6 000, 8 000, 10 000 ng/mL 的标准曲线样品。按血清样品处理方法处理,以环孢素 A 或伏立康唑质量浓度为横坐标、环孢素 A 或伏立康唑峰面积与内标面积比为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程,环孢素 A 为 $Y=68.7X+6.241$ ($r=0.9994$, $n=8$),伏立康唑为 $Y=264.1X+9.547$ ($r=0.9992$, $n=8$),环孢素 A 与伏立康唑质量浓度线性范围分别为 30~1 500 ng/mL 和 200~10 000 ng/mL[信噪比(S/N) ≥ 3]。

精密度试验:分别配制环孢素 A 质量浓度为 30, 600, 1 500 ng/mL,伏立康唑质量浓度为 200, 4 000, 10 000 ng/mL 的血浆样品,每个样品平行配制 5 份,按血清样品处理方法处理,按随行标准曲线计算样品浓度,考察方法学日内、日间精密度。结果见表 1。环孢素 A 及伏立康唑日内、日间精密度均符合生物样品检测标准, RSD 均小于 15% ($n=5$)。

准确度试验:血浆样品配制与操作方法同“精密度试验”,结果见表 1。可见,该方法准确度符合生物样品检测标准。

样品稳定性:血浆样品配制方法同“精密度试验”,于室温下放置 0, 6, 12 h 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 6, 12, 24 h 后,按血清样品处理方法处理。结果见表 2,可见,血清样品在室温存放 12 h 内和 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 24 h 内稳定性均良好, RSD 符合生物样品检测标准。

长期稳定性试验:血浆样品配制方法同“精密度试验”, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻贮存,分别于第 0, 3, 7 天取出,样品自

表2 室温及 4 $^{\circ}\text{C}$ 血清样品稳定性试验结果($n=5$)

样品质量浓度 (ng/mL)		25 $^{\circ}\text{C}$ $RSD(\%)$			4 $^{\circ}\text{C}$ $RSD(\%)$		
		0 h	6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
环孢素 A	30	3.46	4.67	8.89	4.41	6.27	7.85
	600	2.47	5.14	7.25	3.58	5.67	7.48
	1 500	5.22	5.13	9.12	4.12	6.14	9.46
伏立康唑	200	5.12	7.45	10.12	5.67	6.49	7.61
	4 000	4.18	5.83	7.67	5.66	7.09	6.43
	10 000	3.47	5.22	6.47	4.67	6.14	7.98

然溶解后,按血清样品处理方法处理。结果见表 3,血清样品在 0~7 d 内冷冻存放,稳定性良好,样品的 RSD 均小于 15% ($n=5$),符合检测标准。

表3 血清样品长期稳定性试验结果($n=5$)

样品质量浓度(ng/mL)		$RSD(\%)$		
		0 d	3 d	7 d
环孢素 A	30	6.35	5.78	4.85
	600	5.78	5.67	4.24
	1 500	4.87	6.37	4.78
伏立康唑	200	7.85	5.48	6.46
	4 000	5.43	6.66	6.71
	10 000	4.29	6.67	5.26

进样待测样品稳定性:血浆样品配制方法同“精密度试验”,按血清样品处理方法处理,分别于进样前将待测样品于室温下放置 0, 6, 12 h 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 6, 12, 24 h 后再进样检测。结果见表 4。可见,不同质量浓度进样待测样品在室温条件下存放 12 h 以内及 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放 24 h 的稳定性良好,样品 RSD 均小于 15% ($n=5$),符合检测标准。

表4 室温及 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进样待测样品稳定性试验结果($n=5$)

样品质量浓度 (ng/mL)		25 $^{\circ}\text{C}$ $RSD(\%)$			4 $^{\circ}\text{C}$ $RSD(\%)$		
		0 h	6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
环孢素 A	30	4.11	7.12	6.78	5.45	6.74	8.49
	600	3.28	5.77	8.27	5.78	9.34	7.48
	1 500	4.94	5.14	4.86	6.81	6.12	5.37
伏立康唑	200	6.21	7.49	10.73	6.12	8.64	11.21
	4 000	4.66	6.54	8.21	4.24	8.43	7.81
	10 000	5.76	8.78	7.16	6.45	6.45	9.17

3 讨论

环孢素 A 又称环孢菌素 A, 为临床常用免疫抑制剂, 主要给药途径为口服或静脉给药, 但口服吸收率低且不规则, 且有显著的肝、肾毒性, 不同人群及个体口服给药后血药浓度差异大, 临床疗效也有显著差异, 因此, 有效监测血药浓度是该药减毒增效的必要手段。环孢素 A 主要通过肝药酶 CYP3A 代谢, 而 CYP3A 家族主要参与环孢素 A 代谢的 CYP3A4 和 CYP3A5 存在基因突变, 可导致机体对环孢素的代谢加速, 致血药浓度降低, 显著降低疗效^[6-8]。此外, 由于其主要有 CYP3A4 及 CYP3A5 代谢, 因此环孢素 A 与影响 CYP3A 的药物合用时, 可引起药物相互作用, 影响疗效, 甚至发生毒副作用^[9-10]。伏立康唑是临床治疗危重真菌感染的一线用药, 移植患者易发生感染等并发症, 当发生真菌感染后多数患者使用伏立康唑。该药物主要通过肝脏细胞色素 P450 同工酶 CYP2C19, CYP2C9 和 CYP3A4 代谢^[11]。其中 CYP2C19 是主要代谢酶, 由于其基因多态性导致不同人群服用伏立康唑后体内血液浓度差异较大^[12]。同时, 该药经 CYP3A4 代谢, 当其与环孢素 A 联用时, 可导致环孢素 A 血药浓度升高, 引起毒性反应。有研究表明, 两药合用可导致高血钾反应^[13]或癫痫样反应^[14-15]。因此, 针对两药联用的患者应进行有效的血药浓度监测, 但现有监测方法均为独立监测 2 种药物^[16-18], 同一个血样需采用不同的监测方法, 效率低。此外, 部分医院不同的药物样品往往采取集中监测, 导致 2 种药物的监测结果存在时间差异, 不能有效、及时地指导临床治疗。

本研究中建立的双波长高效液相色谱法, 其精密度、准确度、稳定性等符合标准, 表明该方法可同时检测血清样品中环孢素 A 及伏立康唑的血药浓度, 节省检测时间, 为临床同时监测两药提供了有效手段。

参考文献:

- [1] VENUTA F, VAN RAEMDONCK D. History of lung transplantation[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(12): 5458 - 5471.
- [2] FENG HP, CARO L, FANDOZZI CM, et al. Pharmacokinetic Interactions Between Elbasvir/Grazoprevir and Immunosuppressant Drugs in Healthy Volunteers[J]. J Clin Pharmacol, 2018, 58(5): 666 - 673.
- [3] UCHIDA M, TAJIMA Y, KAKUNI M, et al. Organic Anion - Transporting Polypeptide(OATP) - Mediated Drug - Drug Interaction Study between Rosuvastatin and Cyclosporine A in Chimeric Mice with Humanized Liver[J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(1): 11 - 19.
- [4] TRAN PN, PINTER - BROWN LC. Everolimus - induced nephrotic syndrome precipitated by interaction with voriconazole in a patient with Hodgkin's lymphoma[J]. J Clin Pharm Ther, 2017, 42(6): 776 - 779.
- [5] HAHN J, CHOI JH, CHANG MJ. Pharmacokinetic changes of antibiotic, antiviral, antituberculosis and antifungal agents during extracorporeal membrane oxygenation in critically ill adult patients[J]. J Clin Pharm Ther, 2017, 42(6): 661 - 671.
- [6] GROLL AH, TOWNSEND R, DESAI A, et al. Drug - drug interactions between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P4503A4[J]. Transpl Infect Dis, 2017, 19(5): e12751.
- [7] ARCHER TM, BOOTHE DM, LANGSTON VC, et al. Oral cyclosporine treatment in dogs: a review of the literature[J]. J Vet Intern Med, 2014, 28(1): 1 - 20.
- [8] HAMMOUD SH, OMAR AG, EID AA, et al. CYP4A/CYP2C modulation of the interaction of calcium channel blockers with cyclosporine on EDHF - mediated renal vasodilations in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 334: 110 - 119.
- [9] LI M, DE GRAAF IA, SISSALO S, et al. The Consequence of Drug - Drug Interactions Influencing the Interplay between P - Glycoprotein and Cytochrome P450 3a: An Ex Vivo Study with Rat Precision - Cut Intestinal Slices[J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(5): 683 - 691.
- [10] SRIDHARAN K, SIVARAMAKRISHNAN G. Interaction of Citrus Juices with Cyclosporine: Systematic Review and Meta - Analysis[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2016, 41(6): 665 - 673.
- [11] LI TY, LIU W, CHEN K, et al. The influence of combination use of CYP450 inducers on the pharmacokinetics of voriconazole: a systematic review[J]. J Clin Pharm Ther, 2017, 42(2): 135 - 146.
- [12] 刘加涛, 宋 帅, 苏 涌, 等. 伏立康唑血药浓度监测及临床应用分析[J]. 安徽医学, 2018, 39(1): 74 - 77.
- [13] 丁雄芳, 陈江飞. 环孢素与伏立康唑联合应用引起的高血钾症[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(2): 146 - 147.
- [14] 曲彩红, 苏向阳. 伏立康唑致环孢素血药浓度升高相关癫痫样发作[J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(5): 354 - 356.
- [15] MASOUMI HT, HADJIBABAIE M, VAEZI M, et al. Evaluation of the Interaction of Intravenous and Oral Voriconazole with Oral Cyclosporine in Iranian HSCT Patients[J]. J Res Pharm Pract, 2017, 6(2): 77 - 82.
- [16] 李学娟, 刘四喜, 陈泽彬, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑的浓度[J]. 中国药房, 2017, 28(32): 4499 - 4502.
- [17] 陈 璐, 涂碎萍, 张丽娟, 等. HPLC 法测定伏立康唑血药浓度的临床应用[J]. 临床合理用药, 2017, 10(2): 1 - 2.
- [18] 王 磊, 孙文利, 李培余, 等. 环孢素 A 血药浓度检测方法比较分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(3): 417 - 421.

(收稿日期: 2018 - 07 - 07)