

中图分类号: R969.1; R978.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)13-0056-03

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.13.013



高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度*

朱丽莎^{1,2}, 苏强^{1,2}, 唐春梅^{1,2}

(1. 四川省南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院, 四川 南充 637000; 2. 个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川 南充 637000)

摘要:目的 建立测定人血浆中伏立康唑浓度的高效液相色谱(HPLC)法。方法 采用乙腈蛋白沉淀法对血液样本进行处理。色谱柱为 Shimadzu InertSustain C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(33:28:39, V/V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 262 nm, 进样量为 20 μL。结果 伏立康唑的质量浓度在 0.1~8 μg/mL 范围内与伏立康唑和酮康唑峰面积的比值线性关系良好($R^2 = 0.9998$, $n = 8$); 定量限为 0.07 μg/mL。低、中、高质量浓度(0.125, 1, 8 μg/mL)样品的日内及日间精密度、冻融及长期稳定性试验结果的 RSD 均小于 5%; 提取回收率分别为 (97.32 ± 1.71)%, (97.61 ± 1.22)%, (96.38 ± 0.84)%。60 例确诊为侵袭性真菌感染患者的血浆中, 伏立康唑的质量浓度为 0.278~9.129 μg/mL。结论 所建立的方法简单、快速、稳定性良好, 适用于伏立康唑的血药浓度监测。

关键词: 伏立康唑; 高效液相色谱法; 血药浓度

Determination of Concentration of Voriconazole in Human Plasma by HPLC

ZHU Lisha^{1,2}, SU Qiang^{1,2}, TANG Chunmei^{1,2}

(1. Nanchong Central Hospital · The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000;

2. Nanchong Key Laboratory of Individualized Drug Therapy, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of the concentration of voriconazole in human plasma. **Methods** Acetonitrile protein precipitation method was used to process blood samples. The chromatographic column was InertSustain C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-acetonitrile-phosphate buffer (33:28:39, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 262 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of voriconazole was 0.1-8 μg/mL ($R^2 = 0.9998$, $n = 8$). The limit of quantification was 0.07 μg/mL. The RSDs of the intra-day and inter-day precision, freeze-thaw, and long-term stability test results for samples with low-, medium-, and high-concentrations of 0.125, 1, 8 μg/mL were all lower than 5%. The extraction recovery rates were (97.32 ± 1.71)%, (97.61 ± 1.22)%, and (96.38 ± 0.84)%, respectively. In the plasma of 60 patients diagnosed with invasive fungal infections, the concentration of voriconazole was in the range of 0.278-9.129 μg/mL. **Conclusion** The established method is simple, rapid, and has good specificity, which is suitable for monitoring the blood concentration of voriconazole.

Key words: voriconazole; HPLC; blood concentration

伏立康唑为广谱三唑类抗真菌药, 临床用于治疗严重的侵袭性曲霉菌、侵袭性念珠菌属、足放线病菌属和镰刀菌属感染, 具有抗菌谱广、生物利用度高等特点。由于伏立康唑的药代动力学个体差异较大, 药物相互作用较多, 其血药浓度存在较大个体差异, 临床使用中需进行血药浓度监测^[1-3], 以保障临床疗效与安全。故本研究中建立了检测人血浆中伏立康唑浓度的高效液相色谱(HPLC)法, 为临床治疗提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC20A 型液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), 配有

SPD20A 型紫外检测器, SIL-20AC 型自动进样器, CTO-20A 型柱温箱; MS105DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为十万分之一); SA8 型自动漩涡振荡混合器(英国 Bibby 公司); TSE240V-ULTS 型超低温保存箱(美国 Thermo 公司); HC-2517 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); N-EVAP-111 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); RO/DI digital 实验室纯化水系统(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 试剂

伏立康唑对照品(批号为 201802, 含量为 99.7%), 酮康唑对照品(批号为 201803, 含量为 99.4%), 均购于

* 基金项目: 四川省南充市科学技术和知识产权局首批重点实验室建设项目[NCKL201711]; 川北医学院校级科研发展计划项目[CBY17-A-YB55]。

第一作者: 朱丽莎, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药代动力学与治疗药物监测, (电子信箱)1677136867@qq.com。

中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技<中国>有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu InertSustain C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(33:28:39, V/V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:262 nm;进样量:20 μL;进样运行时间:15 min。

2.2 溶液制备

取伏立康唑对照品10 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为1.0 mg/mL的对照品溶液,置4℃冰箱保存,备用。

取酮康唑对照品适量,精密称定,置10 mL容量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为100 μg/mL的内标溶液,置4℃冰箱保存,备用。

2.3 血浆样品预处理

取血浆,室温下融化,摇匀,精密量取500 μL,置2 mL EP管中,加1 mL乙腈,涡旋混合1 min,4℃下离心(21 913 g)5 min,取上清液,置1.5 mL EP管中,室温下氮气吹干,加200 μL流动相,振荡复溶,4℃下离心(21 913 g)5 min,取上清液,即得。

2.4 方法学考察

专属性试验:分别取空白血浆、加伏立康唑及内标的溶液、加伏立康唑及内标空白血浆,按2.3项下操作,进样分析。结果显示,血浆样品处理后,空白血浆无干扰,内标峰与目标峰分离良好,杂质峰不干扰分离与测定。色谱图见图1。

线性关系考察与定量限确定:取2.2项下伏立康唑对照品溶液,配制成质量浓度分别为0.1, 0.125, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/mL的系列溶液,取20 μL,加入500 μL空白血浆中,加入10 μL内标溶液,按2.3项下方法处理,取20 μL上清液,按2.1项下色谱条件进样

分析。以伏立康唑与酮康唑峰面积的比值(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.6273X + 0.0168$ ($R^2 = 0.9998, n = 8$)。结果表明,伏立康唑质量浓度在0.1~8 μg/mL范围内与伏立康唑和酮康唑峰面积的比值线性关系良好。以主峰高为基线噪音10倍时的质量浓度为定量限,结果定量限为0.07 μg/mL。

精密度试验:取伏立康唑对照品适量,加入空白血浆,按2.3项下方法处理,配制高、中、低质量浓度(0.125, 1, 8 μg/mL)的样品,每个浓度平行6份,加入10 μL内标溶液,取上清液,按2.1项下色谱条件进样分析,分别于同1 d内测定日内精密度,或连续3 d测定日间精密度。结果的RSD均小于5%,表明仪器精密度良好。详见表1。

表1 精密度试验、稳定性试验、加样回收试验结果(%)

Tab. 1 Results of the precision test, stability test, and recovery test (%)

伏立康唑浓度	精密度试验结果的RSD		稳定性试验结果的RSD		加样回收试验($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
	日内(n=6)	日间(n=18)	冻融(n=15)	长期(n=25)	相对回收率	提取回收率
0.125 μg/mL	0.94	3.21	3.24	3.57	98.31 ± 1.22	97.32 ± 1.71
1 μg/mL	2.21	2.76	3.19	3.47	96.22 ± 0.91	97.61 ± 1.22
8 μg/mL	1.93	3.01	4.08	4.02	98.13 ± 0.63	96.38 ± 0.84

稳定性试验:取精密度试验项下高、中、低质量浓度样品,每个浓度平行5份,分别于-40℃条件下放置0, 5, 10, 15, 30 d,测定长期稳定性;同法配置同浓度的样品,置-40℃冰箱内冷冻24 h,取出样品,室温下完全融化,反复冻融3次,测定冻融稳定性。按2.3项下方法处理,按2.1项下色谱条件进样分析,结果的RSD均小于5%,表明供试品溶液长期和冻融试验的稳定性良好。详见表1。

加样回收试验:取精密度试验项下高、中、低质量浓度的样品,每个浓度平行6份,按2.3项下方法处理,按2.1项下色谱条件进样分析,按标准曲线计算,以计

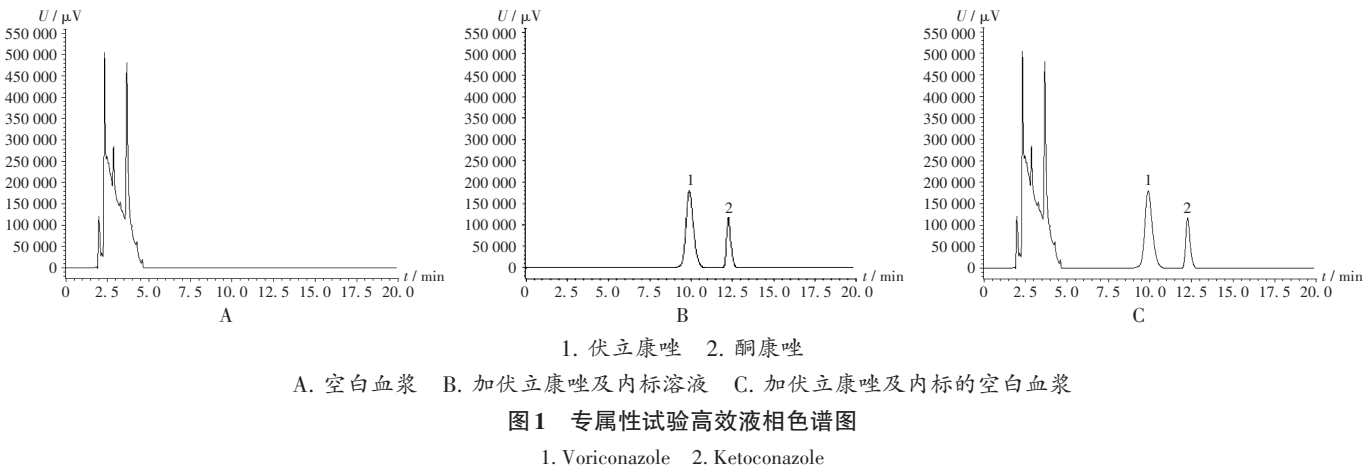


图1 专属性试验高效液相色谱图

A. Blank plasma B. Solution with voriconazole and internal standard C. Blank plasma of voriconazole with added internal standard

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

算浓度与实际浓度的比值计算相对回收率。取精密度试验项下高、中、低质量浓度的样品,每个浓度平行6份,按2.3项下方法处理,加入内标溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件进样分析,测得伏立康唑与内标峰面积的比值(A_1);取空白血浆,按2.3项下方法处理,加入等量伏立康唑对照品溶液及内标溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,测得伏立康唑与内标峰面积的比值(A_2);计算提取回收率,提取回收率($\%$) = $(A_1 / A_2) \times 100\%$ 。结果见表1。

2.5 样本采集与应用

依法测定60例明确诊断为侵袭性真菌感染患者的血液样本,患者给药剂量为首剂量6 mg/kg、每12 h 1次(q12 h),第2天4 mg/kg、q12 h维持治疗。结果60例患者的血药浓度范围为0.278~9.129 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中,36例患者的血药浓度范围为0.312~8.926 $\mu\text{g}/\text{mL}$;10例患者的血药浓度低于1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;1例患者的血药浓度为13.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,超出治疗范围。

3 讨论

3.1 检测方法选择

目前,伏立康唑血药浓度的检测方法包括串联质谱法、生物分析法、液质联用法等,检测费用昂贵,对检测环境、实验条件、仪器设备均有较高要求^[4-8]。临床治疗中,血药浓度的检测方法要求操作便捷、快速,利于指导临床进行剂量调整。为此,本研究中采用HPLC法测定血浆中伏立康唑的血药浓度。

3.2 色谱条件选择

参考文献^[9-11],选择甲醇-乙腈和乙腈-水作为流动相,但在实际操作中调节比例后对照品和内标色谱峰拖尾严重,无法较好分离。本研究中加入磷酸盐缓冲液对流动相pH值进行调节,酸性条件可使伏立康唑处于游离状态,抑制拖尾现象,改善峰形。通过调整流动相比比例,在甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(33:28:39, V/V/V)条件下,对照品及内标分离效果良好,检测时间适宜,故选择其作为流动相。

3.3 样品处理与内标物选择

样品处理:文献^[12-15]报道,曾考察高氯酸和三氟乙酸沉淀蛋白进行样品处理,但二者均为强酸性物质,易氧化伏立康唑及内标,导致检测条件下无法有效分离,且酸性物质易腐蚀色谱柱。故选择乙腈对血浆蛋白进行处理,结果蛋白完全沉淀,处理方式操作简便。

内标物选择:在检测条件下,考察内标物100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酮康唑峰形与分离效果,发现100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酮康唑与伏立康唑分离效果良好,且保留时间短。故选择质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酮康唑作为内标物。

3.4 方法评价

该方法简单、快速、稳定性良好,适用于伏立康唑

血药浓度的监测。

参考文献

- [1] THEURETZBACHER U, IHLE F, DERENDORF DH. Pharmacokinetic / pharmacodynamic profile of voriconazole [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(7): 649 - 663.
- [2] OWUSU OBENG A, ERIC FE, ABDULLAH A, et al. CYP2C19 Polymorphisms and therapeutic drug monitoring of voriconazole: are we ready for clinical implementation of 1pharmacogenomics[J]. Pharmacotherapy, 2014, 34(7): 703 - 718.
- [3] PENNICK GJ, CLARK M, SUTTON DA, et al. Development and validation of a high - performance liquid chromatography assay for voriconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(7): 2348 - 2350.
- [4] 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]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(2): 1 - 2.
- [5] 张永刚, 陈之遥. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(15): 1551 - 1554.
- [6] 刘亮, 郭美华, 陈岩. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度及其应用[J]. 中国药物应用与监测, 2017, 14(4): 205 - 208.
- [7] 史卉妍, 彭亮, 谭志荣, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J]. 中南药学, 2007, 5(4): 305 - 308.
- [8] 何高丽, 张菁. 伏立康唑治疗药物浓度监测的探讨[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(1): 77 - 81.
- [9] KAZUAKI M, KAZUO I, KAZUO A, et al. Correlation between voriconazole through plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34 (1): 91 - 94.
- [10] NATHAN PW, GENNETHEL JP, SHERYL AD, et al. A reference laboratory experience of clinically achievable voriconazole, posaconazole, and itraconazole concentrations with in the bloodstream and cerebral spinal fluid [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1): 424 - 431.
- [11] DOLTON MJ, RAY JE, CHEN SC, et al. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4793 - 4799.
- [12] 冯健男, 杜守颖, 白洁, 等. 生物样品前处理的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4143.
- [13] 陆振强, 董吉, 缪丽燕. 人血浆中伏立康唑血药浓度的测定[J]. 抗感染药学, 2016, 13(1): 25 - 27.
- [14] BRUIX J, RAOUL JL, SHERMAN M, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of phase III trial [J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 821 - 829.
- [15] ZACHARY H, ELIZABETH SDA, GEOFFREY AW, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 3(3): 270 - 271.

(收稿日期: 2022 - 08 - 10; 修回日期: 2024 - 01 - 08)