

二维液相色谱测定伏立康唑血药浓度的研究^{*}

史香芬, 刘帅兵, 孙志勇, 张晓坚^{*}

(郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

摘要 **目的:** 采用全自动二维液相色谱(2D-LC-UV)建立快速测定伏立康唑血药浓度的方法,并应用于临床。**方法:** 样品去除蛋白后直接进样,待测物在一维柱 Aston SC2(4.6 mm×25 mm, 5 μm)上初步分离,通过中间柱 Aston SH(3.0 mm×10 mm, 5 μm)截取保留,转移到二维色谱柱 Aston SCB(4.6 mm×100 mm, 5 μm)上进一步分离。一维流动相为 VCV-1D 移动相,流速 0.7 mL·min⁻¹;二维流动相为 OPI-1 有机移动相-BPI-1 碱性移动相-MPI-1 移动相(30:48:22),流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 40℃;紫外检测波长 262 nm。**结果:** 伏立康唑与各杂质分离良好,在 0.38~12 μg·mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系($r=0.9999$),可在 10 min 内完整出峰,方法回收率高于 95%;日内、日间的精密度 RSD 均小于 5%;稳定性试验 RSD 小于 5%。所建立方法对 79 名肾移植住院患者进行了伏立康唑血药浓度检测共 280 例次,常规剂量未达到治疗浓度的占 55%,超过安全浓度的占 10.4%,在治疗浓度内的占 34.6%。**结论:** 本方法简便快速,结果准确,稳定性良好,自动化程度高,不依赖于专门的技术人员,适用于临床伏立康唑快速检测。

关键词: 全自动二维液相色谱;伏立康唑;血药浓度;治疗药物监测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)08-1404-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.08.09

Determination of voriconazole blood concentration by two-dimensional liquid chromatography^{*}

SHI Xiang-fen, LIU Shuai-bing, SUN Zhi-yong, ZHANG Xiao-jian^{**}

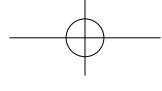
(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract **Objective:** To establish a method for rapid determination of voriconazole blood concentration by automated two-dimensional liquid chromatography (2D-LC-UV) and apply it to clinical practice. **Methods:** The sample was directly injected for determination after being deproteinized. The sample was preliminarily separated on one-dimensional Aston SC2 column, then was trapped on intermediate Aston SH column (3.0 mm×10 mm, 5 μm) and separated by two-dimensional Aston SCB column (4.6 mm×100 mm, 5 μm). The mobile phase of the one-dimensional and two-dimensional liquid chromatography were VCV-1D (flow rate was 0.7 mL·min⁻¹) and mixed mobile phase [VOPI-1 organic-VBPI-1 basic-VMPI-1 acidic (30:48:22)] (flow rate of 1.0 mL·min⁻¹), respectively. The column temperature was maintained at 40℃ and the UV adsorption wavelength was set at

^{*} 国家自然科学基金(No.81603204);常州四药临床药理学科研基金(No.CZSYJJ5029)

^{**} 通信作者 Tel:(0371)66913047; E-mail: zhxf0524@sina.com

第一作者 Tel:(0371)67966013; E-mail: 187235365@qq.com



262nm. The established method was applied to the patients with kidney transplantation to monitor the voriconazole blood concentration and the preliminary results were evaluated. **Results:** Under the established chromatographic conditions, voriconazole was separated well from other impurities and linear range was $0.38\text{--}12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$). Voriconazole had a complete chromatographic peak within 10 minutes. The recovery of the method was higher than 95%. Intraday and interday precisions were less than 5% and the RSD of stability test was less than 5%. A total of 280 voriconazole blood concentrations were measured in 79 patients admitted to the kidney transplant department. In the routine dose of voriconazole, 55% of the patients did not reach the therapeutic concentration, and 10.4% exceeded the safe concentration, accounted for 34.6%. **Conclusion:** The established method is simple, rapid, accurate, stable, highly automated, independent of specialized technicians, and is suitable for rapid detection of voriconazole in hospitals.

Keywords: automated two-dimensional liquid chromatography; voriconazole; blood concentration; treatment drug monitoring

近年来,随着免疫抑制治疗、化疗、实体器官移植的增多,中心静脉置管术以及心脏人工瓣膜植入术等介入性治疗的开展,发生侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)的患者人数逐年上升。伏立康唑是对氟康唑进行结构改造后合成的新型三唑类药物,属于第Ⅱ代三唑类广谱抗真菌药,伏立康唑主要对侵袭性曲霉菌、耐氟康唑侵袭性念珠菌属、足放线病菌属和镰刀菌属有很好的抗菌活性^[1],是治疗侵袭性曲霉病的首选药物^[2]。伏立康唑体内代谢呈非线性药代动力学,并且受CYP酶系的2C19、3A4、2C9等的基因多态性影响,使伏立康唑血药浓度个体差异较大^[3-6]。临床上经该酶系代谢的药物较多,联合用药对血药浓度影响较多。因此,建议进行伏立康唑的临床治疗药物监测,以便及时调整给药方案,实现个体化用药。本文采用二维高效液相色谱建立测定伏立康唑血药浓度的方法,已成功对79名肾移植受者进行了280次监测,并对监测结果进行初步评析。

1 材料

1.1 仪器 FLC 2420 2D-LC-UV 系统由全自动二维液相色谱耦合仪(湖南德米特仪器有限公司)及岛津液相色谱 LC-20AT 部件构成;GH-202 万分之一电子分析天平(AND公司);TDZ4-WS 低速离心机(湖南湘仪公司);Mini-15K 微型高速离心机(杭州奥盛公司);XW-80A 旋涡混合器(上海琪特公司);医用冰箱(合肥美菱公司)。

1.2 药品与试剂 伏立康唑对照品(批号100862-201402,含量99.7%,中国食品药品检定研究院);VCV-1D 移动相、OPI-1 有机移动相、BPI-1 碱性流

动相、MPI-1 流动相、ACP-1 去蛋白剂、ACG 保护剂(均购于湖南德米特仪器有限公司);纯净水为怡宝纯净水;空白马血清(购于北京政博伟业生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 第一维色谱系统中,采用 Aston SC2 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 25\text{ mm}, 5\ \mu\text{m}$),流动相为 VCV-1D 移动相,流速 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;采用 Aston SH 转移柱($3.0\text{ mm}\times 10\text{ mm}, 5\ \mu\text{m}$),流动相为纯水。第二维色谱系统中,采用 Aston SCB($4.6\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 5\ \mu\text{m}$)色谱柱,流动相为 OPI-1 有机移动相-BPI-1 碱性移动相-MPI-1 移动相(30:48:22),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。柱温 $40\ ^\circ\text{C}$,紫外检测波长 262 nm,采用等度洗脱,进样量 $200\ \mu\text{L}$ 。

本实验时间程序:0~1.89 min 完成样品进样和第一维色谱分离;1.90~2.85 min 目标物转移至中间柱;2.86~4.20 min 目标物转移至二维色谱;4.21~10.00 min 目标物在第二维色谱中完成分离。

2.2 对照品溶液的配制 称取伏立康唑对照品 6.00 mg,用 25% 异丙醇水溶液溶解并定容至 50 mL 得药物母液,质量浓度为 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

2.3 质控品的配制 量取“2.2”项下对照品溶液 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,用空白马血清定容至刻度,得高浓度质控品($6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。依次配得中浓度质控品($3.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低浓度质控品($1.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。质控品置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

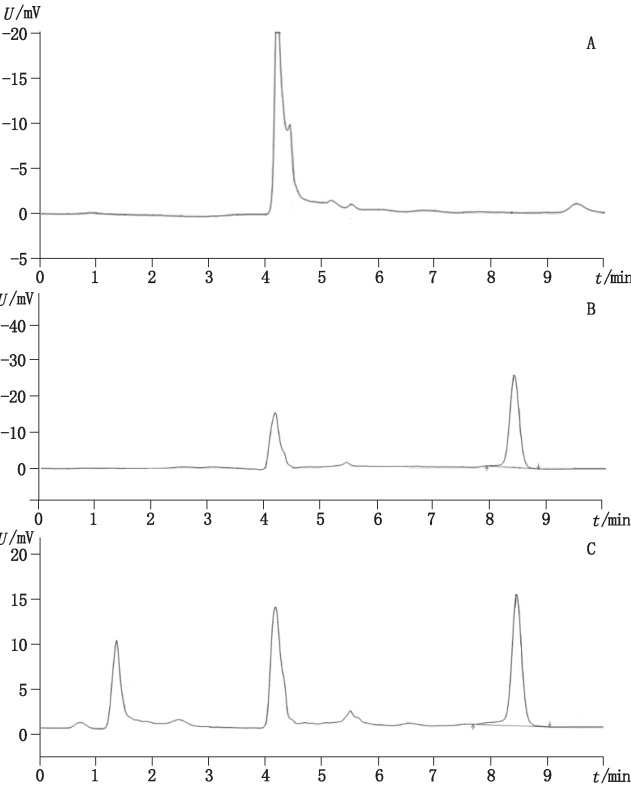
2.4 样品处理及测定

血液样品低速离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min,准确

吸取上层血清 300 μL 至 1.5 mL EP 管中,再准确吸取 ACP-1 去蛋白剂 900 μL 至 EP 管中,EP 管涡旋振荡 1 min 后,高速离心 ($14\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 8 min,取 1 000 μL 上清液至 1.5 mL 进样瓶中,再准确吸取 ACG 保护剂 100 μL ,震荡摇匀,备用。在“2.1”项色谱条件下,进样 200 μL ,记录色谱图和峰面积,采用外标工作曲线法定量,将样品峰面积代入标准曲线,计算所得浓度。每次样品测定随行测 1 个质控品,以保证结果的准确可靠。

2.5 色谱行为和专属性

在上述“2.1”项色谱条件下,分别对空白血清、中浓度质控品 ($3.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 以及服药患者样本 (患者服药期间,在下次给药前 30 min 内抽取静脉血,离心得血清样本) 按“2.3”项下处理,按“2.1”项色谱条件进行测定,色谱图见图 1,血清内源性物质及其它杂质均不干扰样品的分离测定。



A. 空白血清 (blank serum) B. 伏立康唑对照品 (voriconazole reference substance) C. 患者服药后血清样品 (serum sample after administration)

图 1 伏立康唑 2D-LC-UV 色谱图

Fig. 1 2D-LC-UV chromatograms of voriconazole

2.6 标准曲线及检测下限

用空白马血清将伏立康唑对照品溶液稀释成系

列浓度溶液 ($0.38, 0.75, 1.5, 3, 6, 12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.4”项下方法处理并测定,以质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程:

$Y=8.991\times 10^4X-1.332\times 10^4\quad r=0.999\,9$

参考美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 相关指南,所选线性范围 ($0.38\sim 12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 包含其治疗浓度参考范围和实验室危急值,满足临床测定范围的要求。

2.7 回收率和精密度

取“2.3”项下高、中、低质控品,每个浓度设置 6 组平行,按“2.4”项方法进行处理并测定,同日进样,计算回收率和日内精密度;每个浓度每天设置 5 个平行测定,取平均值,连续测定 5d,考察方法日间精密度,结果见表 1。

表 1 方法回收率及日内、日间精密度 ($\bar{x}\pm s$)

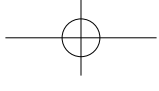
Tab. 1 The recovery, intraday precision and inter-day precision

组别 (group)	加入量 (added) / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) / (%) ($n=6$)	精密度 (precision)			
			日内 (intra-day)		日间 (inter-day) ($n=5$)	
			$C/(\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/ (%)	$C/(\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/ (%)
高 (high)	6	98.5 ± 2.0	5.91 ± 0.12	2.1	5.82 ± 0.13	2.3
中 (medium)	3.6	98.0 ± 2.5	3.53 ± 0.09	2.5	3.50 ± 0.06	1.9
低 (low)	1.2	98.3 ± 2.3	1.18 ± 0.03	2.3	1.15 ± 0.03	2.3

由表 2 结果可知,本研究建立的伏立康唑分析方法的回收率高于 95%,日内、日间的精密度 RSD 均小于 5%。该分析方法测定准确,重复性好,符合生物样品分析的要求^[7]。

2.8 样品稳定性

取“2.3”项下高、中、低质控品,按“2.4”项下方法处理并测定,分别考察室温放置 24 h、反复冻融 3 次以及 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存 30 d 的测试样品,结果见表 2。结果表明血清中伏立康唑稳定性良好, RSD 均小于 5%。

表 2 样品稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 The stability of blood samples

检测条件 (test conditions)	已知浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定平均值 (mean value) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
室温放置 24 h (stayed at room temperature for 24 h)	6.0	5.86 ± 0.14	2.4
	3.6	3.53 ± 0.08	2.2
	1.2	1.17 ± 0.41	3.6
反复冻融 3 次 (frozen and thawed 3 times repeatedly)	6.0	5.85 ± 0.12	2.1
	3.6	3.53 ± 0.07	2.0
	1.2	1.16 ± 1.14	3.1
-20 °C 保存 30 d (kept for 30d at -20 °C)	6.0	5.83 ± 0.12	2.0
	3.6	3.53 ± 0.05	1.5
	1.2	1.16 ± 0.04	3.9

2.8 临床应用

2017 年 6 月—2018 年 6 月期间,对肾移植科 79 名住院患者进行伏立康唑血药浓度监测,共 280 例。参考《中国实体器官移植受者侵袭性真菌病临床诊治指南(2016 版)》^[8-9]中推荐监测伏立康唑血浆浓度保持在 $2 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,依据此推荐对纳入的 280 例监测结果进行评析。154 例结果小于 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,占总样本量的 55.0%;97 例在推荐治疗窗 ($2 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 之内,占总样本量的 34.6%;29 例结果高于 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,占总样本量的 10.4%。以上结果分析,在肾移植科伏立康唑整体使用量不足,达到有效治疗浓度者仅有 1/3,临床上应予以重视,临床药师可根据治疗药物监测(TDM)结果更密切地参与伏立康唑临床用药,监测伏立康唑血药浓度对促进合理用药十分必要。

3 讨论

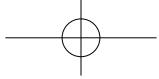
本研究所用全自动二维液相色谱系统与常规二维液相色谱不同^[10-15],该二维液相色谱运用自动化的中间柱作为转移接口,中间色谱柱不仅承担了捕获与转移功能,还承担拦截功能,使目标物从共洗脱物中得以分离;在该二维液相色谱柱体系中,中间柱的特异性拦截和透过性能,可以实现多种化学结构不同的药物共柱体系测定。日常工作中,每日随机抽取 1 份质控品与样品随行检测,一旦发生质控偏离情况,可通过检查 LC2 条件对照品色谱图,校验 LC1 窗口状态以及观察中间柱的捕获、洗脱效果等一系列措施进行失控回溯,这是目前其他二维液相色谱无法比拟

的,在长期的质量控制及运行过程中具有非常重要的意义。与其他二维液相色谱系统相比,该系统具有明显优势,样品前处理简单易行;样品测定完成后色谱柱无需清洗;流动相由于事先进行了灭菌和密封处理,可以长期放置,无需每日配置;系统采用热量智能补充技术,色谱柱通常 15 min 可以平衡完毕。这些技术大大节省仪器准备和维护时间,增加 TDM 的实时性能力。

方法学验证结果显示,回收率 >95%。在 $0.38 \sim 12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内,具有良好的线性关系 ($r=0.9999$),精密度及稳定性试验均符合要求。280 例临床血样监测结果,278 例均在标准曲线范围内,仅有 2 例低于 $0.38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,查明原因,为患者忘记服药所致。本研究建立的全自动二维液相色谱测定伏立康唑血药浓度的方法,具有前处理简单,测定快速,灵敏度高,准确性好,稳定性强等特点,能满足临床报告及时性、准确性和测定范围等要求,可以作为临床治疗药物浓度监测的有效方法。

参考文献

- [1] THEURETZBACHER U, IHLE F, DERENDORF H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(7): 649
- [2] PATTERSON TF, III GRT, DENNING DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America [J]. Clin Infect Dis Off Pub Infect Dis Soc Am, 2016, 63(4): e1
- [3] PURKINS L, WOOD N, GHAHRAMANI P, et al. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous-to oral-dose escalation regimens [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(8): 2546
- [4] DOLTON MJ, MCLACHLAN AJ. Clinical importance of the CYP2C19*17 variant allele for voriconazole [J]. Br J Clin Pharmacol, 2011, 71(1): 137
- [5] 王晶晶,王茜,何瑾,等. 伏立康唑血药浓度监测及其影响因素分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(23): 2402
WANG JJ, WANG Q, HE J, et al. Retrospective of voriconazole therapeutic drug monitoring [J]. Chin J Hosp Pharm, 2018, 38(23): 2402
- [6] 易文燕,刘滔滔,严汝庆,等. 基于基因多态性的儿童患者伏立康唑药代动力学研究进展 [J]. 中南药学, 2018, 16(6): 799.
YI WY, LIU TT, YAN RQ, et al. Advance in pharmacokinetics and pharmacodynamics of voriconazole in child patients based on genetic polymorphisms [J]. Cent South Pharm, 2018, 16(6): 799
- [7] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 363
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 363



- [8] 中华医学会器官移植学分会. 中国实体器官移植受者侵袭性真菌病临床诊治指南(2016年版)[J]. 中华器官移植杂志, 2016, 37(5): 300
The Transplantation Society of Chinese Medical Association, The Transplantation Society of Chinese Medical Doctor Association. The Clinical Guideline of Invasive Fungal Disease in the Solid Organ Transplantation Recipients in China (2016 Edition)[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2016, 37(5): 300
- [9] 中华医学会器官移植学分会. 中国实体器官移植受者侵袭性真菌病临床诊治指南(2016年版)(续)[J]. 中华器官移植杂志, 2016, 37(6): 368
The Transplantation Society of Chinese Medical Association, The Transplantation Society of Chinese Medical Doctor Association. The Clinical Guideline of Invasive Fungal Disease in the solid organ Transplantation Recipients in China (2016)[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2016, 37(6): 368
- [10] 张寒娟, 陈永妍, 王高彪, 等. 新型二维液相色谱快速测定丙戊酸血药浓度的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(13): 1394
ZHANG HJ, CHEN YY, WANG GB, *et al.* Measurement of valproic acid in blood by a novel two-dimensional liquid chromatographic system[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2018, 38(13): 1394
- [11] 萧伟斌, 蹇阳, 李桦. 二维液相色谱在药物和毒物分析中的应用进展[J]. 分析化学, 2014, 42(12): 1851
XIAO WB, SAI Y, LI H. Application of two-dimensional liquid chromatography analysis of drugs and toxicants[J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, 42(12): 1851.
- [12] 高辉, 温学森, 马小军, 等. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 616
GAO H, WEN XS, MA XJ, *et al.* The technique of two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) and its applications in drug analysis[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2007, 27(4): 616
- [13] 丁坤, 吴大朋, 关亚凤. 二维液相色谱接口技术[J]. 色谱, 2010, 28(12): 1117
DING K, WU DP, GUAN YF. Interface of two dimensional liquid chromatography[J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(12): 1117
- [14] 张素洁, 孙贺伟, 郭君君, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定血清中5个三唑类抗真菌药物浓度及其治疗药物监测应用[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1038
ZHANG SJ, SUN HW, GUO JJ, *et al.* Quantitative determination of five azole antifungals in human serum by LC-MS/MS and its application to therapeutic drug monitoring[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(6): 1038
- [15] 王峰, 朱运贵, 罗雪梅, 等. 新型二维液相色谱测定百草枯尿液浓度的研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(10): 871
WANG F, ZHU YG, LUO XM, *et al.* Measurement of paraquat in urine by a novel two-dimensional liquid chromatographic system[J]. *Chin Pharm J*, 2017, 52(10): 871

(本文于2018年11月8日收到)