

高效液相色谱法测定人血清中伏立康唑的质量浓度

张燕青 林雪玉 朱金平 费 燕

(中国人民解放军第一七五医院·厦门大学附属东南医院药学科,福建 漳州 363000)

摘要:目的 建立测定人血清中伏立康唑浓度的高效液相色谱法,用于临床该药的治疗药物浓度监测。方法 采用乙腈沉淀处理血清样品,采用高效液相色谱紫外检测法测定。以硝西泮为内标,色谱柱为 Hypersil ODS 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 25 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈(32:68),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 °C,波长为 256 nm。结果 伏立康唑质量浓度在 0.3~12 μg/mL 范围内与峰面积比线性关系良好($r=0.9993$),低、中、高质量浓度回收率分别为(105.0 ± 3.6)%、(101.9 ± 3.3)%、(101.1 ± 3.4)%;日内、日间精密度的 RSD 均小于 5%,定量限为 0.3 μg/mL。结论 该方法简便快速、准确,适用于伏立康唑血药浓度的临床监测。

关键词: 伏立康唑; 高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R969.1; R978.7; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2014)23-0006-03

Determination of Serum Voriconazole Concentration by HPLC

Zhang Yanqing, Lin Xueyu, Zhu Jinping, Fei Yan

(Department of Pharmacy, 175 Hospital of PLA/Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian, China 363000)

Abstract: Objective To establish a HPLC method to determine the concentration of voriconazole in human plasma for its clinical application in the curative drug concentration monitoring. **Methods** The serum sample was performed the precipitation treatment by acetonitrile, then HPLC-UV was adopted for detection. With nitrazepan as the internal standard, the chromatographic column was the Hypersil ODS column (200.0 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 25 mmol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution-acetonitrile (32:68). The detection wavelength was at 256 nm with a flow rate of 1 mL/min and the column temperature of 35 °C. **Results** The concentration of voriconazole in the range of 0.3-12 μg/mL ($r=0.9993$) showed the good linearity. The recovery rates of low, middle and high concentrations were (105.0 ± 3.6)%, (101.9 ± 3.3)% and (101.1 ± 3.4)%, respectively. The intra-day and inter-day RSD were both less than 5%. The limit of quantitation was 0.3 μg/mL. **Conclusion** The established method is fast, accurate and suitable for the determination of blood voriconazole concentration.

Key words: voriconazole; HPLC; blood drug concentration

伏立康唑(voriconazole, VRC)是第2代三唑类抗真菌药物,具有抗真菌谱广、生物利用度高、安全且可通过血脑屏障等特点,在真菌感染防治中发挥着重要作用。临床研究发现,伏立康唑的有效性和安全性与其血清质量浓度密切相关^[1-3],有效质量浓度范围为2~5 μg/mL^[3],大于6 μg/mL时肝脏毒性的发生风险显著增加^[4]。伏立康唑体内代谢呈非线性药物代谢动力学特征,血药浓度在不同患者间差异较大,临床可通过监测其血药浓度来提高临床疗效、减少不良反应的发生。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定人血清中伏立康唑浓度,方法简单可靠、相关性好,可用于伏立康唑的血药浓度常规检测。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 510 泵,717 自动进样器,996 二极管阵列检测器; Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司); XW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);电子分析天平(日本岛津 AEG-120 型); TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司)。伏立康唑对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 100862-200701); 内标为硝西泮对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 171217-200402); 乙腈、甲醇(Tedia 公司,色谱纯),其他试剂均为分析纯,水均为双蒸水(本实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 血清来源

采集健康体检者的静脉血,低速离心后,取上层血清制备空白血清,备用。采集诊断为侵袭性真菌感染,并使用伏立康唑进行治疗且达到稳态浓度的患者下次滴注伏立康唑前的静脉血,低速离心后,取上层血清备用,作为患者血清样品。

2.2 血药浓度测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 25 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈(32:68); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 256 nm; 进样量: 50 μL。

2.2.2 溶液配制

精密称取伏立康唑对照品 30 mg,置 25 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解至刻度,配成质量浓度 1 200 μg/mL 的对照品贮备液,4 °C 冰箱中保存备用。精密称取 25 mg 硝西泮对照品,置 25 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解至刻度,配成浓度 1 000 μg/mL 的对照品贮备液,将该贮备液用甲醇稀释成 25 μg/mL 工作液,作为内标液,4 °C 冰箱中保存备用。

2.2.3 血清样品处理

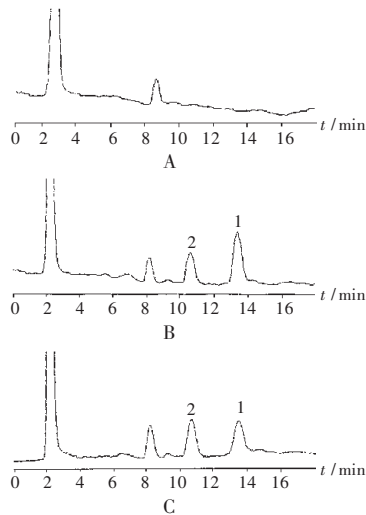
精密取血清样品 200 μL 于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 10 μL 内标溶液,混匀后,加入乙腈 400 μL 漩涡振荡 2 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 进样分析。

2.2.4 方法学考察

标准曲线制备与检测限确定:取空白血清 200 μL,置 1.5 mL Eppendorf 管中,精密量取不同质量浓度、相同体积的伏立康唑对照品溶液 10 μL,配成 0.3,0.6,1.0,1.5,3.0,6.0,12.0 μg/mL 标准血清样品,再分别加入 10 μL 内标液,按 2.2.3 项下方法处理,经 HPLC 分析,记录色谱图,测得伏立康唑峰面积 A_1 与内标峰面积 A_2 ,计算峰面积比 A_1/A_2 。以血清质量浓度 C (mg/L)与峰面积比经最小二乘法线性回归,得标准曲线方程 $Y=0.377X-0.0635$, $r=0.9993$ ($n=7$)。结果表明,伏立康唑质量浓度线性范围为 0.3~12 μg/mL。当信噪比(S/N)=3 时,伏立康唑的最低

检测限可达到 0.3 μg/mL。

分离度与专属性试验: 按拟订色谱条件对空白血清、伏立康唑标准品血清以及患者血清样品进行色谱分析, 色谱图见图 1。可见, 伏立康唑与内标峰无明显的内生杂质峰干扰, 两者的保留时间分别为 10.5 min 和 13.3 min。



1. 伏立康唑 2. 硝西洋
A. 空白血浆 B. 空白血浆加伏立康唑和内标 C. 患者血样
图 1 伏立康唑高效液相色谱图

准确度试验: 取空白血清 200 μL, 置 1.5 mL Eppendorf 管中, 配制成质量浓度为 0.6, 3.0, 6.0 μg/mL 的血浆样品各 5 份, 按 2.2.3 项下方法处理, 进样, 记录色谱图, 考察方法回收率。结果见表 1。

表 1 伏立康唑的方法回收率试验结果 (n = 5)

质量浓度	测得质量浓度 (μg/mL)	方法回收率 (%)
0.6	0.631 ± 0.022	105.0 ± 3.6
3.0	3.050 ± 0.090	101.9 ± 3.3
6.0	6.070 ± 0.24	101.1 ± 3.4

精密密度试验: 取空白血清 200 μL, 置 1.5 mL Eppendorf 管中, 配制成质量浓度为 0.6, 3.0, 6.0 μg/mL 的血浆样品各 5 份, 按 2.2.3 项下方法处理, 进样, 记录色谱图, 连续 4 d, 测定日内和日间精密密度。结果见表 2。

表 2 伏立康唑的日内、日间精密密度试验结果 (n = 5)

质量浓度	日内精密密度		日间精密密度	
	质量浓度 (μg/mL)	RSD (%)	质量浓度 (μg/mL)	RSD (%)
0.6	0.631 ± 0.022	3.61	0.590 ± 0.028	4.69
3.0	3.050 ± 0.090	3.24	3.060 ± 0.120	3.80
6.0	6.070 ± 0.24	4.07	5.970 ± 0.270	4.51

稳定性试验: 取空白血清 200 μL 配制成质量浓度为 0.6, 3.0, 6.0 μg/mL 的血清样品各 3 份, 室温放置, 分别于第 0, 6, 12 h 按 2.2.3 项下方法处理, 进样。结果的 RSD 分别为 6.06%, 4.21%, 4.68%, 说明血清样品在室温放置 12 h 内具有很好的稳定性。配制质量浓度为 0.6, 3.0, 6.0 μg/mL 的血清样品, 置 -20 °C 冰箱中, 于第 1, 3, 5, 7, 10, 14 d 按 2.2.3 项下方法处理, 测定。结果表明, 血清样品 14 d 内稳定性良好。配制质量浓度为 0.6, 3.0, 6.0 μg/mL 的血清样品各 3 份, 置 -20 °C 冰箱中, 冻融 2 次, 冻融时间间隔 24 h, 于冻融前、冻融后分别取样 200 μL, 按 2.2.3 项下方法处理。结果显示, 冻融 2 次, 质量浓度无显著性差异。

2.3 临床应用

采用本研究建立的方法为 10 例患者进行血药浓度监测, 其中侵袭性肺部曲霉菌感染 8 例, 骨髓炎 (霉菌感染) 2 例; 男 7 例, 女 3 例; 平均 (42.8 ± 3.6) 岁。测定的最大血药浓度达 5.5 μg/mL, 最小为 0.98 μg/mL, 平均值为 2.72 μg/mL; 其中在治疗窗之内 4 例, 占 40.00%; 低于治疗窗 5 例, 占 50.00%; 高于治疗窗 1 例, 占 10.00%。

3 讨论

色谱条件的选择: 采用二极管阵列检测器波长梯度方法, 得到三维色谱光谱图。三维立体图显示, 伏立康唑在 256 nm 波长处有最大吸收。以 256 nm 进行样本检测, 出峰良好, 出峰处无干扰, 因而选择 256 nm 作为检测波长。试验过程中, 试用文献 [5-6] 报道的氟康唑和酮康唑作为内标, 发现在本实验室条件下, 其保留时间在 3 min 内, 不适宜作为内标。选用硝西洋作为内标, 性质稳定, 不干扰主峰, 且保留时间合适; 伏立康唑和硝西洋的保留时间分别为 10.5 min 和 13.3 min, 且色谱峰不受内源性杂质干扰。由于伏立康唑的分子结构中含有三唑环、吡啶环等碱性基团, 因此采用磷酸盐缓冲液作为流动相, 保持流动相 pH 稳定, 故选用磷酸盐缓冲液/乙腈为流动相。

样品处理方法的选择: 血清样品的前处理一般采用固相萃取、液液萃取、高氯酸和三氟乙酸沉淀蛋白等方法, 但考虑到固相萃取、液液萃取方法操作较复杂烦琐, 高氯酸和三氟乙酸可能会对伏立康唑和内标造成氧化破坏, 故采用 2 倍乙腈直接沉淀蛋白, 蛋白沉淀较完全。

监测结果分析: 临床伏立康唑常用于治疗和预防侵袭性真菌感染, 常见的不良反应有神经功能障碍、视觉障碍、肝功能异常等 [7-8]。文献报道, 当伏立康唑血药浓度大于 6 μg/mL 时, 肝功能损伤的发生率将明显增加, 不良反应发生率升高, 而低于 2 μg/mL 时, 治疗效果不佳。伏立康唑主要通过肝脏细胞色素 P450 酶 CYP2C19 代谢。CYP2C19 基因是一个高度变异的多态基因, 具有显著种族差异, 在亚洲人群中造成慢代谢型最主要的突变基因为 CYP2C19*2 和 CYP2C19*3。研究发现, CYP2C19 慢代谢型组伏立康唑的稳态血药浓度是快代谢型组的 5 倍。本试验监测的 10 例患者伏立康唑谷浓度个体差异大, 1 例谷浓度高于治疗窗, 5 例谷浓度低于 2 μg/mL, 4 例谷浓度在治疗窗 2~5 μg/mL 之内。本试验中建立的检测人血清中伏立康唑质量浓度的高效液相色谱法灵敏、简单、专属性高, 分离完全, 峰形良好, 可用于伏立康唑的药代动力学和血清药物浓度监测。

作者简介: 张燕青, 女, 硕士研究生, 药师, 主要从事医院药学工作, (电话) 0596-2975804 (电子信箱) yanqing0108@163.com; 费燕, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事医院药学工作, 本文通讯作者, (电话) 0596-2975694 (电子信箱) feiyanfy@126.com。
参考文献:

- [1] Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 24-34.
- [2] Neely M, Rushing T, Kovacs A, et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(1): 27-36.
- [3] Troke PF, Hockey HP, Hope WW. Observational study of the clinical efficacy of voriconazole and its relationship to plasma concentrations in patients[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(10): 4782-4788.
- [4] Denning DW, Ribaud P, Milpied N, et al. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis[J]. Clin Infect

甲强龙联合咪达唑仑治疗腰骶部带状疱疹后神经痛 38 例临床研究

梁文娜

(山东省聊城市第三人民医院神经科, 山东 聊城 252000)

摘要:目的 观察甲强龙联合咪达唑仑治疗腰骶部带状疱疹神经痛(PHN)的临床疗效。方法 选择2012年1月至2013年12月接受治疗的腰骶部PHN患者114例,随机分为甲强龙组、咪达唑仑组与联合组,每组38例。甲强龙组硬膜外给予甲强龙、0.9%氯化钠注射液治疗;咪达唑仑组硬膜外给予0.9%氯化钠注射液联合鞘内给予咪达唑仑治疗;联合组硬膜外给予甲强龙联合鞘内给予咪达唑仑治疗。结果 3组患者治疗后疼痛视觉模拟评分(VAS)以及睡眠质量评分均明显改善,联合组患者治疗后28、56、84 d的VAS以及睡眠质量得分均显著优于甲强龙组、咪达唑仑组($P < 0.05$)。3组患者不良反应发生率比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论 甲强龙联合咪达唑仑治疗腰骶部PHN的长期镇痛效果良好,不良反应发生率低,安全有效,值得临床应用。

关键词: 甲强龙;咪达唑仑;腰骶部;带状疱疹后神经痛;临床疗效

中图分类号: R969.4; R977.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2014)23-0008-02

Analysis on Clinical Efficacy of Methylprednisolone Combined with Midazolam in Treatment of Lumbosacral Postherpetic Neuralgia in 38 Cases

Liang Wenna

(Department of Neurology, Liaocheng Municipal Third People's Hospital, Liaocheng, Shandong, China 252000)

Abstract: Objective To observe the clinical efficacy of methylprednisolone combined with midazolam in the treatment of lumbosacral postherpetic neuralgia (PHN). **Methods** 114 patients with lumbosacral PHN treated in our hospital from January 2012 to December 2013 were selected and randomly divided into the methylprednisolone group, midazolam group and combination group, 38 cases in each group. The methylprednisolone group was given methylprednisolone and 0.9% NaCl solution by epidural injection; the midazolam group was given 0.9% NaCl solution by epidural injection combined with midazolam by intrathecal injection; the combination group was given methylprednisolone by epidural injection combined with midazolam by intrathecal injection. **Results** The VAS and sleep quality scores after treatment in the three groups were significantly improved, the VAS and sleep quality scores on 28, 56, 84 d after treatment in the combination group were significantly superior to those in the methylprednisolone group and the midazolam group with statistically significant difference ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences in the occurrence situation of adverse reactions among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Methylprednisolone combined with midazolam in treating lumbosacral PHN has long term analgesic effect and low occurrence rate of adverse reactions with safety and effectiveness and is worthy of clinical application.

Key words: methylprednisolone; midazolam; lumbosacral PHN; clinical effect

带状疱疹后神经痛(postherpetic neuralgia, PHN)是带状疱疹并发症中最严重的一种,多发于胸段或腰骶段,临床表现主要为刀割样痛、持续性烧灼痛、持续性跳痛、闪电样痛、间隙性针刺痛以及痛觉、感觉异常等,严重影响患者正常的生活与工作^[1-2]。为探讨甲强龙联合咪达唑仑治疗腰骶部PHN的临床疗效,笔者于2012年1月至2013年12月开展了相关研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2012年1月至2013年12月在我院接受治疗的腰骶部PHN患者114例,均经患者及其家属知情同意,与患者及家属签订知情同意书,并报医院伦理委员会备案处理。其中男64例,女50例;年龄48~70岁,平均(57.50±1.49)岁;病程98~176 d,平均(169.72±14.23) d;疼痛视觉模拟评分(VAS)≥7分。排除其他部位疼痛、椎管内给予镇痛药物、凝血功能异常、穿刺位皮肤感染、神经系统疾病等患者。随机将所有患者分为甲强龙组(A组)、

咪达唑仑组(B组)与联合组(C组),各38例。3组患者一般情况比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,详见表1。

表1 3组患者一般资料比较表($n=38$)

组别	年龄 ($\bar{X} \pm s$, 岁)	性别[例(%)]		病程 ($\bar{X} \pm s$, d)	治疗前VAS 评分($\bar{X} \pm s$, 分)
		男	女		
A组	57.45±1.53	21(55.26)	17(44.74)	168.87±14.89	9.33±1.21
B组	56.74±1.42	21(55.26)	17(44.74)	170.65±13.96	9.40±1.22
C组	58.32±1.51	22(57.89)	16(42.11)	169.65±13.85	9.23±1.34

1.2 方法

所有患者于L₂₋₃间隙以18号穿刺针行硬膜外穿刺,并在出现空落感及无注射空气阻力后给予药物;于L₃₋₄间隙以25号腰麻针行蛛网膜下腔穿刺,发现流出脑脊液后给予药物。A组硬膜外给予甲强龙[规格为0.5 g(以甲波尼龙C₂₂H₃₀O₅计),国药集团容生制药有限公司,国药准字H20010098,批号为20111206]80 g/L联合鞘内给予0.9%氯化钠注射2 mL治疗;B组硬膜外给



Dis 2002, 34(5): 563-571.
[5] 辛月. 高效液相色谱法测定血浆中伏立康唑的浓度[J]. 中国医院药学杂志 2009, 29(4): 333-334.
[6] 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.

[7] 李明伟, 余丽梅, 张维. 伏立康唑治疗血液病合并侵袭性真菌感染42例[J]. 中国药业 2014, 23(1): 68-96.
[8] 朱萍, 蒋正立. 伏立康唑的不良反应综述[J]. 中国药业 2011, 20(23): 95-96.

(收稿日期: 2014-04-11)