

广西首例心脏移植术后环孢素 A 的药物监测

熊凤英, 吴敏, 吴洪文, 梁陈方 (广西医科大学第四附属医院药剂科, 广西 柳州 545005)

摘要: 目的 建立我院首例心脏移植术后环孢素 A 血药浓度监测方法, 分析药物浓度与剂量、疗效的关系, 建立最佳给药方案。方法 运用高效液相色谱法以环孢素 B 为内标, 214 nm 处紫外检测, 对心脏移植受者进行环孢素 A 血药浓度监测, 并及时给予用药剂量调整。结果 该患者至今存活, 生活质量良好, 环孢素 A 血药浓度控制得很好。结论 高效液相色谱法能满足环孢素 A 的临床常规血药浓度监测需求。

关键词: 心脏移植; 环孢素 A; 药物浓度监测; 高效液相色谱法

中图分类号: R 969.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06-0477-03

Therapeutic drug monitoring of cyclosporin A after the first heart transplantation in GUANGXI

XIONG Feng ying WU Min, WU Hong-wen, LIANG Chen-fang (Department of Pharmacy, Fourth Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To develop a method for determination of cyclosporine A in blood after the first heart transplantation in our hospital and analyse the relation between dosage, clinical effect and concentration, finally to develop a best curing scheme.

METHODS An HPLC was used with cyclosporine B as the internal standard and detected at 214 nm. Determine the patient's blood concentration of cyclosporine A and adjust the dosage in time. **RESULTS** The patient is still alive with a good life and the blood concentration of cyclosporine A was under well control. **CONCLUSION** HPLC can satisfy the demand of general clinic determination of blood concentration of cyclosporine A.

KEY WORDS heart transplantation; cyclosporine A; TDM; HPLC

心脏移植是治疗内外科无法治愈的终末期心脏病的重要疗法, 而正确地进行免疫抑制治疗是关系到心脏移植受者术后能否长期存活的关键因素之一^[1]。众所周知, 环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 是目前最有效的免疫抑制剂, 它广泛地用于肝、肾、骨髓等器官移植, 能显著地抑制免疫排斥反应, 提高移植器官的成活率^[2]。由于口服 CsA 的生物利用度和药动学个体差异大, 故进行药物血药浓度监测对安全、有效地用药和减少急性排斥反应具有重要临床意义。笔者经多次实验研究, 参考有关报道^[3~5], 建立了以环孢素 B (CsB) 为内标物并能简便、快速、准确测定 CsA 血药浓度的高效液相色谱法 (HPLC)。对我院 2003 年的广西首例同种异体心脏移植受者进行药物监测, 取得满意效果, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 试药与仪器

1.1.1 试药 CsA 对照品与 CsB 对照品 (福建微生物研究所), 氢氧化钠、乙醚、盐酸均为分析纯 (广东汕头新宁化工厂), 乙腈为色谱纯 (上海化学试剂公司), 水为双蒸水 (本院制剂室)。

1.1.2 仪器 LG-10A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SPD-10A 型可变波长紫外检测器; XW-80 型旋涡混合器 (上海第一医药试剂厂); 离心管 (上海化学试剂厂); 离心管 (上海化学试剂厂)。

厂)。

1.2 测定方法

1.2.1 色谱条件 SH-MADZU-C₁₈ (10⁴ m, 250 mm × 4.6 mm) 分析柱; 柱温 68℃; 检测波长为 214 nm; 乙腈-甲醇-水 (6:2:2 V/V/V), 流速 1.4 mL · min⁻¹; 进样定量管体积 20 μL。

1.2.2 血样处理 于受者早上服药前取静脉血 3 mL, 肝素抗凝, 混匀。在 10 mL 具塞玻璃试管内加入内标 CsB 贮备液 10 μL, 加入 1 mL 全血, 再加入 0.2 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 1 mL, 混匀, 静置 5 min 后加入 5 mL 乙醚, 振荡 1 min, 离心 10 min (3000 r · min⁻¹), 取上清液加入另一试管, 于 60℃ 水浴挥干, 冷却至室温, 残渣加入 0.05 mol · L⁻¹ 盐酸与乙腈混合液 (4:6) 100 μL 溶解, 再加入 400 μL 正己烷洗涤, 离心 5 min, 取下层液 20 μL 进样。

1.2.3 色谱图与标准曲线 在本色谱条件下样品和内标的色谱图见图 1。CsA 与 CsB 色谱保留时间分别为 14.4 min 和 18.08 min, 有很好的分离度, 并与血中的杂峰分离好。

于空白全血中加入 CsA 对照品, 使其浓度为 52.104、208.312、416.520、1040 ng · mL⁻¹, 再分别加入内标液 20 μL, 按“1.2.2”处理。以 CsA/CsB 的峰面积比对 CsA 浓度进行线性回归, 得方程 $y = 0.002327x - 0.019$, 相关系数 $r =$

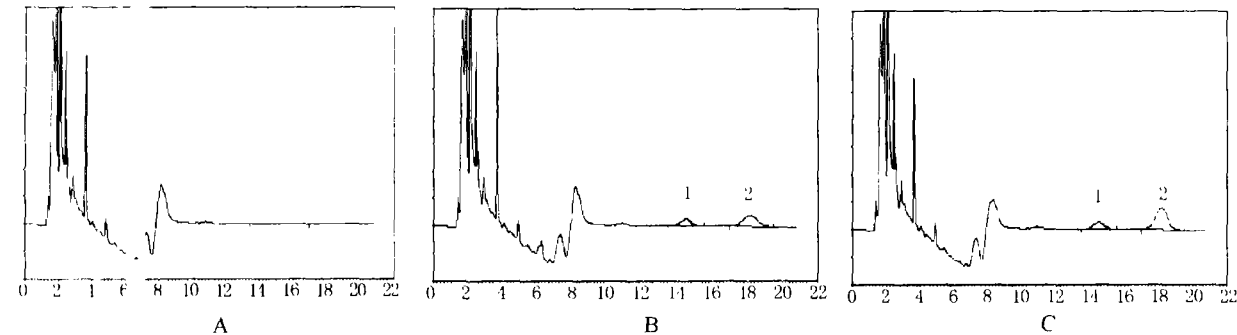


图 1 CsA 与 CsB 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of CsA and CsB

A 空白血样; B 血样; C 标准血样; 1 内标物 CsA 2 环孢素 A

A blank human blood; B human whole blood with CsA and CsB; C blank human whole blood with CsA, CsB standard

1.2.4 方法确证 计算方法精密度, 以低、中、高三种浓度, 按血样处理方法, 测其日内差 ($n=5$)、日间差 ($n=5$), RSD 均不超过 10%。

取空白全血准确配制成相当于血中 CsA 浓度为 104 416 1040 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品, 按“1 2 2”处理, 实测值与等浓度 CsA 对照品直接进样测定, 结果相比 ($n=5$)。绝对回收率较均不低于 75%。见表 1。

表 1 全血中 CsA 绝对回收率及 RSD ($n=5$)

Tab 1 The absolute recoveries of CsA in human whole blood ($n=5$)

| 浓度 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 回收率 % | RSD % |
|-------------------------------------|----------------|-------|
| 104 | 79.4 \pm 5.6 | 7.1 |
| 416 | 84.2 \pm 4.4 | 5.3 |
| 1040 | 87.3 \pm 2.9 | 3.4 |

取空白全血准确配制成相当于血中 CsA 浓度为 104 416 1040 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品, 按“1 2 2”处理, 测定结果用标准曲线方程计算, 求其相对回收率, 见表 2。

表 2 全血中 CsA 相对回收率及 RSD ($n=5$)

Tab 2 The relative recoveries of CsA in human whole blood ($n=5$)

| 浓度 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 回收率 % | RSD % |
|-------------------------------------|-----------------|-------|
| 104 | 94.7 \pm 3.9 | 4.2 |
| 416 | 103.6 \pm 5.7 | 5.5 |
| 1040 | 99.2 \pm 2.8 | 2.9 |

2 心脏移植受者血药浓度监测

心脏移植患者, 女, 54 岁, 于 2003 年 8 月 29 日进行心脏移植手术, 免疫抑制剂的使用为新赛斯平胶囊 (CsA 胶囊)、泼尼松、骁悉 (霉酚酸酯, mycophenolaten ofetil MME RS 61443) 的三联用药, 其中服用 CsA 胶囊 200~300 mg / d 经本法测定全血中 CsA 谷浓度最低为 85.7 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最高为 618.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均谷浓度为 278.3 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过分析, 认为最低浓度是因为术后患者各机能未恢复, 药物吸收少, 而最高浓度的产生在术后第 10 天, 是因为给药次数增加。

表 3 术后两星期内 CsA 的给药剂量与浓度

Tab 3 Dosage and concentration of CsA

| 日期 | 免疫抑制剂使用情况 | CsA 谷浓度 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|-------|--|--|
| 30/08 | CsA 100mg Bid 泼尼松 25mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 134.9 |
| 31/08 | CsA 100mg Bid 泼尼松 25mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 85.7 |
| 01/09 | CsA 150mg Bid 泼尼松 25mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 237.6 |
| 02/09 | CsA 100mg Bid 泼尼松 20mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 472.7 |
| 03/09 | CsA 100mg Bid 泼尼松 20mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 411.9 |
| 04/09 | CsA 100mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 133.1 |
| 05/09 | CsA 100mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 208.7 |
| 06/09 | CsA 150mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 116.0 |
| 07/09 | CsA 150mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 355.9 |
| 08/09 | CsA 100mg (早), 150mg (晚) 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 618.0 |
| 09/09 | CsA 100mg (早), 150mg (晚) 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 562.8 |
| 10/09 | CsA 100mg (早), 150mg (晚) 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 177.0 |
| 11/09 | CsA 100mg (早), 150mg (晚) 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 292.4 |
| 12/09 | CsA 100mg (早), 150mg (晚) 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 240.8 |
| 13/09 | CsA 125mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 204.4 |
| 15/09 | CsA 125mg Bid 泼尼松 15mg Bid 骁悉 0.5 Tid | 200.9 |

3 讨论

3.1 药物浓度测定方法 在 HPLC 方法中, 经多次研究, 找到最佳流动相组成, 即乙腈-甲醇-水 (6:2:2), 使得 CsA 与 CsB 能很好分离。柱温越高, 峰形越好, 但为保护色谱柱及保证基线的稳定, 我们选择柱温为 68 $^{\circ}\text{C}$ 。在碱化血样研究中, 发现氢氧化钠溶液浓度越高 (从 0.1~1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列浓度实验), 绝对回收率越高, 但色谱图中杂峰较多, 干扰主峰。实验结果分析, 认为 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度较好。本方法单步萃取, 试剂普遍易得, 测定周期短, 用 CsB 做内标, 报道较少见。与其他方法相比有简便、快速、数据准确、可靠等特点, 可以有效地指导 CsA 的临床应用, 提高医疗质量。

3.2 CsA 血药浓度监测 目前, 临床上常用的免疫抑制剂克服心脏排斥反应, 我院为确保首例心脏移植手术成功及术后病人生存质量, 对受者采取了术前、术中及术后予以 CsA、泼尼松和骁悉三联药物治疗, 并每日进行全血药物谷浓度监测, 依据监测数据进行药物剂量调整, 术后第 14 天谷浓度稳定在 200~300 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 受者未出现急性排斥反应。

浓度维持在 200~300ng·mL⁻¹内较适宜。

参考文献

- [1] 李家泰. 临床药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998 1327
- [2] 陈新德, 金有豫. 新编药物学[M]. 第14版. 北京: 人民卫生出版社, 1997 537.
- [3] 张毕奎, 李焕德. 单步萃取高效液相色谱法测定全血 CsA 浓

度及在肝、肾移植患者中的应用[J]. 中国临床药理学杂志, 1999 8(6): 357

- [4] 任斌, 黎曙霞, 陈孝, 等. 反相高效液相色谱法测定环孢素 A 血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2001 21(8): 407.
- [5] 王启斌, 涂自良, 王峰, 等. 液相色谱-电喷雾质谱联用测定器官移植患者全血中环孢素 A[J]. 中国医院药学杂志, 2003 23(4): 217.

收稿日期: 2004 05 19

离子对液相色谱法测定人血浆中替米沙坦的浓度及药动学研究

缪海均¹, 余佳红², 恽芸蕾¹, 刘泉林¹ (1 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003 2 第二军医大学新药评价中心, 上海 200433)

摘要: 目的 建立测定人血浆中替米沙坦浓度的高效液相色谱方法, 并用该法研究替米沙坦片在健康人体内的药动学。方法 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS (150nm×4.6mm), 流动相为乙腈-0.05% 戊磺酸钠-0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钾 (50:25:25), 荧光检测, 激发波长为 305nm, 发射波长为 365nm。结果 血浆样品在 3.05~610.0μg·L⁻¹内线性相关 ($r=0.9999$ $n=5$)。平均绝对回收率为 85.1% (RSD=1.63%), 相对回收率大于 95.0%, 日间和日内相对标准差小于 10.0%。10 名男性健康志愿者单次口服 80mg 替米沙坦片后, 其药代动力学参数分别为: $t_{1/2}$ (19.8±5.66)h c_{max} (310.7±91.6)μg·L⁻¹, t_{max} (1.01±0.40)h。结论 此方法准确, 灵敏, 适于体内药物分析; 药动学参数为临床合理用药提供理论依据。

关键词 替米沙坦; 高效液相色谱法; 药动学

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06 0479-03

Ion pair HPLC determination and pharmacokinetic study of telmisartan in human plasma

MIAO Haijun¹, SHE Jiahong², YUN Yunlei¹, LU Gaolin¹ (1 Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003 China 2 New Drug Evaluation Center, Shanghai 200433 China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of telmisartan concentration in plasma and to investigate the pharmacokinetics of telmisartan in Chinese healthy volunteers. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on a Shim-pack VP-ODS (150nm×4.6mm), the mobile phase was consisted of acetonitrile-0.05% pentanesulfonate-0.05mol·L⁻¹potassium dihydrogen phosphate (50:25:25), fluorescence detection (excitation at 305 nm, emission at 365 nm) was used for quantitation. **RESULTS** A good linearity was obtained from 3.05 to 610.0μg·L⁻¹ ($r=0.9999$ $n=5$). The mean recovery of plasma extraction was 85.1% (RSD=1.7%), relative recovery was more than 95%, the within-day and between-day RSD were less than 10.0%. The pharmacokinetic analysis of telmisartan after oral administration of 80mg telmisartan tablets was studied. Its pharmacokinetic parameters were as follow: $t_{1/2}$ (19.8±5.66)h c_{max} (310.7±91.6)μg·L⁻¹, t_{max} (1.01±0.40)h. **CONCLUSION** The method is rapid, simple and accurate. The pharmacokinetics of telmisartan in human provided a useful index for clinical trial.

KEY WORDS telmisartan; HPLC; pharmacokinetics

替米沙坦 (telmisartan) 是一种新型的口服非肽 AngII 受体拮抗剂。它选择性、不可逆地拮抗 AngII 的 AT₁ 受体而不影响包括心血管调节的其他系统^[1,2]。自 1997 年上市以来, 国内外的临床应用都证实了本品的安全性和有效性。

对于替米沙坦血药浓度的测定在国外只提及采用柱切换液相色谱, 但未作详细报道^[3]; 在国内还未见报道。为此笔者建立了一种简便、灵敏、快速检测人体中替米沙坦浓度的高效液相色谱分析方法, 可用于人体内替米沙坦血药浓度

1 仪器和试剂

Shimadzu 10A dvp 高效液相色谱仪, RF 10A_{XL} 荧光检测器, CTO-10A_{SVP} 柱温箱。替米沙坦对照品 (含量 99.3%, 上海医药工业研究院)。替米沙坦片 (美卡素, Micardis®, 规格: 80mg 批号: 202020); 乙腈为色谱纯, 戊磺酸钠、盐酸、磷酸二氢钾、乙醚均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

2 实验方法

2.1 色谱分离条件