

## LC-MS/MS 同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度

邹尚荣<sup>1</sup>, 李燕青<sup>1</sup>, 莫玉泉<sup>2</sup>, 周波<sup>1</sup>, 温预关<sup>2</sup> (1.广州市第八人民医院药剂科, 广州 510060; 2.广州市脑科医院国家药品临床研究基地, 广州 510370)

**摘要:** 目的 建立一种快速、灵敏并同时测定人体血浆中洛匹那韦(LPV)和利托那韦(RTV)浓度的液相色谱-质谱联用检测方法。方法 采用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), 流动相为乙腈-水(含 0.005 mol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵, 0.1% 甲酸)(90 : 10); 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温: 40 °C, 以乙酸乙酯为提取剂。采用选择反应监测(SRM)LPV(*m/z* 629.5→155.1)、RTV(*m/z* 721.4→296.1)和内标茚地那韦(IDV)(*m/z* 614.5→465.4)进行测定。结果 LPV 高(10 000 μg·L<sup>-1</sup>)、中(1 000 μg·L<sup>-1</sup>)、低(40 μg·L<sup>-1</sup>)3 个浓度的平均方法回收率 RSD 均<15%; 线性范围为: 20~20 000 μg·L<sup>-1</sup>, 回归方程为  $Y=1.669 9X-0.001 3$ ,  $r=0.998 4(n=7)$ , 定量下限为 20 μg·L<sup>-1</sup>。RTV 高(2 500 μg·L<sup>-1</sup>)、中(250 μg·L<sup>-1</sup>)、低(10 μg·L<sup>-1</sup>)3 个浓度的平均方法回收率 RSD 均<15%; 线性范围为 5~5 000 μg·L<sup>-1</sup>, 回归方程为  $Y=1.723 7X-3.274 8 \times 10^{-4}$ ,  $r=0.998 7(n=7)$ , 分析方法的定量下限为 5 μg·L<sup>-1</sup>。结论 该方法灵敏、准确、简单、快速, 可用于 LPV 和 RTV 同时应用时两者的临床血药浓度监测和药动学研究。

**关键词:** 洛匹那韦; 利托那韦; 血药浓度监测; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0661-05

### Simultaneous Determination of Lopinavir and Ritonavir in Human Plasma by LC-MS/MS

ZOU Shangrong<sup>1</sup>, LI Yanqing<sup>1</sup>, MO Yuquan<sup>2</sup>, ZHOU Bo<sup>1</sup>, WEN Yuguan<sup>2</sup> (1.Department of Pharmacy, Guangzhou No.8 People's Hospital, Guangzhou 510060, China; 2.Department of Clinical Pharmacology, Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou 510370, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To set up a rapid and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantitative determination of lopinavir(LPV) and ritonavir(RTV) in human plasma. **METHODS** LPV and RTV were extracted with ethyl acetate. The residues were analyzed with an Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile with 0.005 mol·L<sup>-1</sup> ammonium formate(0.1% formic acid)=90 : 10, with a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, temperature of 40 °C. Selected reaction monitoring(SRM) using the precursor to product ion combinations of *m/z* 629.5→155.1, 721.4→296.1 and *m/z* 614.5→465.4 was performed to detect LPV, RTV and the internal standard(indinavir, IDV), respectively. **RESULTS** The average recovery rate RSD for LPV of three levels of concentration of high (10 000 μg·L<sup>-1</sup>), medium (1 000 μg·L<sup>-1</sup>) and low (40 μg·L<sup>-1</sup>), were less than 15%. The calibration curves for LPV was  $Y=1.669 9X-0.001 3$ ,  $r=0.998 4$ , over the range of 20~20 000 μg·L<sup>-1</sup>. The limits of quantitation was 20 μg·L<sup>-1</sup>. Meanwhile, the average recovery rate RSD for RTV of three levels of concentration of high (2 500 μg·L<sup>-1</sup>), medium (250 μg·L<sup>-1</sup>) and low (10 μg·L<sup>-1</sup>), were also less than 15%. The calibration curves for RTV was  $Y=1.723 7X-3.274 8 \times 10^{-4}$ ,  $r=0.998 7(n=7)$ , over the range of 5~5 000 μg·L<sup>-1</sup>. The limits of quantitation was 5 μg·L<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The method provides a sensitive, accurate, precise and reliable analytical procedure for the therapeutic drug monitoring of LPV and RTV simultaneously in clinic and pharmacokinetic studies.

**KEY WORDS:** lopinavir; ritonavir; therapeutic drug monitoring; LC-MS/MS

洛匹那韦(lopinavir, LPV)是一种 HIV-1 和 HIV-2 的蛋白酶的抑制剂, 是第 1 个被批准临床使用的第 2 代蛋白酶抑制剂(PIs); 另一种 PI——利托那韦(ritonavir, RTV)可以抑制 CYP3A 介导的 LPV 代谢, 两者合用, 能提高血浆中 LPV 的药物

浓度。洛匹那韦利托那韦片(商品名: 克力芝<sup>®</sup>)是德国雅培公司研制开发的复方制剂, 该药联合其他抗逆转录病毒药物[核苷类(NRTIs)和非核苷类(NNRTIs)逆转录酶抑制剂], 在未经抗病毒治疗及经历过抗病毒治疗的 HIV 病人中, 都产生极好的

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(8151037001000001); 广州市医药卫生科技项目(201102A213157)

作者简介: 邹尚荣, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (020)83710515 E-mail: 627bgs@163.com \*通信作者: 温预关, 男, 主任药师 Tel: 13711603273 E-mail: wenyuguande@163.com

效果<sup>[1]</sup>。两药同时检测的方法,文献有采用 HPLC-UV 检测法<sup>[2-3]</sup>和 LC-MS/MS 检测法<sup>[4-7]</sup>。为便于进行血药浓度监测,本试验参照文献<sup>[6]</sup>建立了以茚地那韦(indinavir, IDV)为内标的同时测定人血浆中 LPV 和 RTV 浓度的 LC-MS/MS。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1379B 自动脱气机, G1310A 自动调配四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 可调柱温箱; Agilent 6410 Triple Quad LC/MS(美国 Agilent 公司), 图谱分析软件 MassHunter Workstation Software(版本号 B.01.03); XW-80A 型旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂); BP110S 型电子分析天平(德国 Sartorius); MIKRO12-24 型高速离心机(德国 Hettich); 111 型真空干燥箱(德国 MMM-GROUP)。

### 1.2 药物与试剂

LPV 对照品(德国雅培公司,批号:742498D,含量>99.5%), RTV 对照品(德国雅培公司,批号:65020VA,含量>99.5%)。内标物:硫酸茚地那韦(IDV,美国默沙东公司,批号:K0425,含量>99.6%)。乙腈(色谱纯,默克公司);甲酸铵(质谱纯,美国 Sigma 公司);甲酸(色谱级,迪马公司);醋酸乙酯(分析纯,广州化学试剂厂);水为重蒸去离子水。

### 1.3 对照品和内标溶液

分别精密称取 LPV, RTV, IDV 对照品各若干(分别含 LPV, RTV, IDV 各 10 mg),分别置于 10 mL 量瓶中,用流动相溶解定容至刻度,即配制浓度为 1 g·L<sup>-1</sup>的储备液,贮存于 4 °C 冰箱避光保存备用。LPV, RTV 储备液试验前按试验所需稀释成相应浓度并混合成 LPV-RTV 混合标准工作液。另稀释配制浓度为 2 000 μg·L<sup>-1</sup>的内标 IDV 流动相溶液。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-水(含 0.005 mol·L<sup>-1</sup>甲酸铵, 0.1%甲酸)(90:10); 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C。质谱条件: 电喷雾电离源(ESI), 正离子化, 毛细管电压 4 000 V, 喷雾气压力 344.8 kPa, 干燥气体流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 干

燥气体温度 350 °C。扫描方式为选择性离子监测, LPV *m/z* 629.5→155.1, 碰撞能量 38 单位, 裂解电压 135 V, 四级杆捕捉时间 0.2 s, 电子倍增器 100 V; RTV *m/z* 721.4→296.1, 碰撞能量 14 单位, 裂解电压 135 V, 四级杆捕捉时间 0.2 s, 电子倍增器 100 V; IDV *m/z* 614.5→465.4, 碰撞能量 23 单位, 裂解电压 150 V, 四级杆捕捉时间 0.2 s, 电子倍增器 100 V。进样量为 1 μL。LPV 和 RTV 的 Q2 全扫描图见图 1。

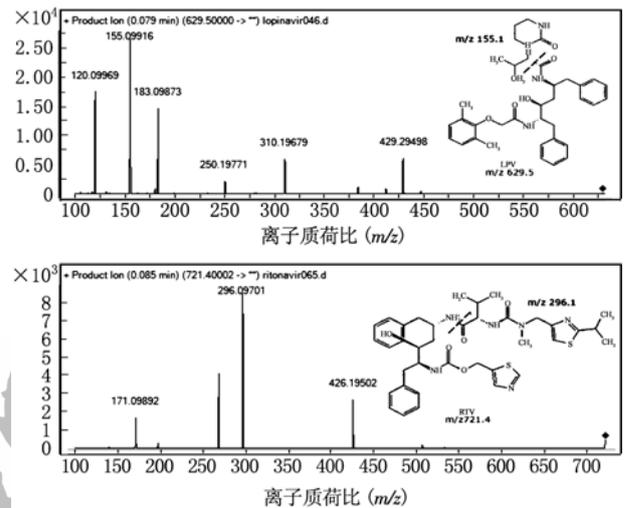


图 1 LPV 和 RTV 的 Q2 全扫描图

Fig 1 Q2-full of LPV and RTV

### 2.2 样品处理方法

取含药血浆 0.25 mL 置 2.0 mL 锥形离心管中,加入 2 000 μg·L<sup>-1</sup> IDV 流动相溶液 50 μL, 涡旋振荡 3 s, 再加乙酸乙酯 1 mL 密塞, 涡旋振荡 1 min, 离心(13 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min), 吸取上清液置 1.5 mL 的锥形离心管内, 38 °C 真空干燥至干。进样前加入流动相混合溶液 200 μL, 涡旋振荡 5 s 使残渣溶解, 离心(13 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min), 吸取上清液 1 μL 进样。

### 2.3 专属性试验

取空白血浆 0.25 mL 置 2.0 mL 锥形离心管中,除不加内标外,按“2.2”项下方法操作,获得空白血浆样品的色谱图,如图 2A;将一定浓度的 LPV-RTV 混合标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,同法操作获得色谱图 2B, LPV, RTV, IDV 的出峰时间分别约为 3.76, 3.70 和 3.18 min;取 HIV 感染者口服洛匹那韦利托那韦片(克力芝<sup>®</sup>, 德国雅培公司)后收集的血浆样品,按照“2.2”项下方法操作,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中内源

性物质不干扰 LPV, RTV 及内标 IDV 的测定, 本方法具有较高的专属性。

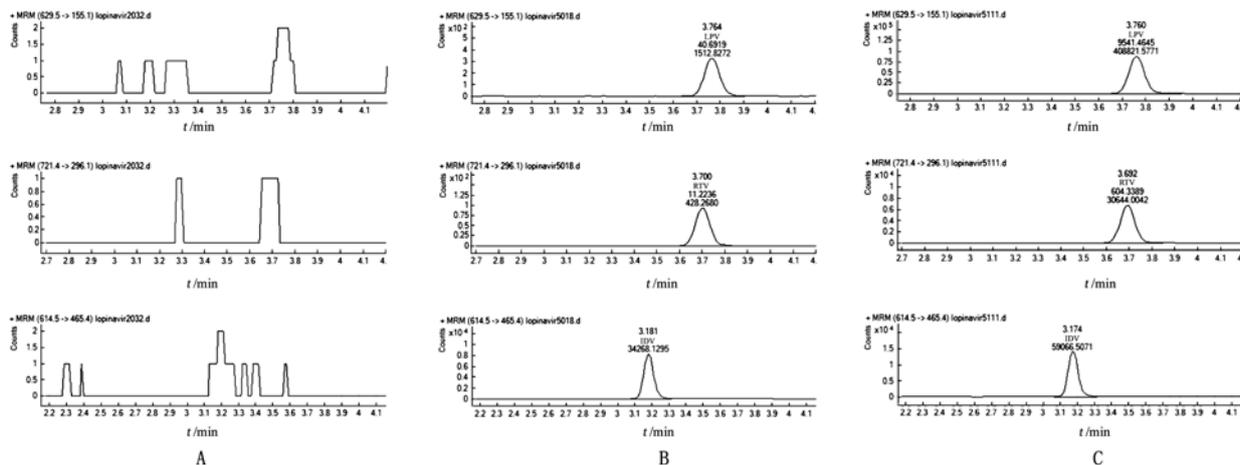


图 2 LC-MS/MS 同时测定血浆中 LPV 和 RTV 的典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+LPV( $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )+RTV( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )+IDV( $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); C-受试者口服洛匹那韦利托那韦片( $400 \text{ mg}/100 \text{ mg}$ )后收集的的血浆样品

Fig 2 LC-MS/MS chromatogram of LPV and RTV

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with LPV( $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), RTV( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and IDV( $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); C-plasma after a patient taking an oral single dose of LPV and RTV tablets( $400 \text{ mg}/100 \text{ mg}$ )

## 2.4 标准曲线的制备和定量下限的确定

取空白血浆  $0.25 \text{ mL}$ , 分别加入同时含有浓度为  $0, 100, 200, 1000, 5000, 20000, 50000$  和  $100000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPV 及相应浓度为  $0, 25, 50, 250, 1250, 5000, 12500$  和  $25000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  RTV 的 LPV-RTV 混合对照品溶液  $50 \mu\text{L}$ , 振荡  $5 \text{ s}$ , 使血浆药物浓度分别相当于  $0, 20, 40, 200, 1000, 4000, 10000$  和  $20000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (LPV) 及  $0, 5, 10, 50, 250, 1000, 2500$  和  $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (RTV), 其余项按“2.2”项下方法处理。经 LC-MS/MS 分析, 以 LPV 峰面积与内标峰面积之比( $Y$ )为纵坐标, 以血浆 LPV 浓度与内标 IDV 浓度之比( $X$ )为横坐标, 权重系数为  $1/x^2$ , 血浆中 LPV 浓度在  $20\sim 20000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内呈良好的线性关系, 线性方程为:  $Y=1.6699X-0.0013, r=0.9984(n=7)$ 。同法分析, 血浆中 RTV 浓度在  $5\sim 5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内呈良好的线性关系, 线性方程为:  $Y=1.7237X-3.2748 \times 10^{-4}, r=0.9987(n=7)$ 。血浆样品 LPV 和 RTV 的定量下限浓度分别为  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N>24$ ) 和  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N>15$ )。平行对  $5$  个同时含  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPV 和  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  RTV 的血浆样品处理后进行色谱分析, 得 LPV 方法回收率平均为  $113.0\%$ , RSD 为  $6.07\%$ ; RTV 方法回收率平均为  $110.6\%$ , RSD 为  $6.85\%$ 。

## 2.5 介质效应考察

取  $9$  管空白血浆各  $0.25 \text{ mL}$  平分为  $3$  组, 每组  $3$  管, 除不加混合标准系列溶液和内标外, 按“2.2”项下方法处理后, 取残渣复溶液  $0.1 \text{ mL}$ , 分别加入低(LPV  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中(LPV  $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV  $1250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、高浓度(LPV  $50000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV  $12500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 LPV-RTV 混合标准溶液和内标 IDV( $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )各  $50 \mu\text{L}$ 。以此种处理方法测得的 LPV, RTV 和内标峰面积与空白试管中加入  $0.1 \text{ mL}$  流动相后, 再加入相应浓度的 LPV-RTV 混合标准溶液和内标各  $50 \mu\text{L}$  混匀后测得的峰面积的比值计算百分比。

结果 LPV 低( $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中( $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度( $50000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的介质影响百分比分别为  $105.8\%$ ,  $103.1\%$ 和  $103.4\%$ 。RTV 低( $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中( $1250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度( $12500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的介质影响百分比分别为  $100.6\%$ ,  $104.2\%$ 和  $101.1\%$ 。内标 IDV( $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的介质影响百分比为  $103.7\%$ 。可见, LPV, RTV 和内标介质效应对测定影响程度基本一致, 对检测结果没有影响。

## 2.6 精密度与提取回收率试验

按“2.4”项下方法分别配制低(LPV  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中(LPV  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度(LPV  $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

RTV 2 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 LPV-RTV 血浆溶液各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并与每批的标准曲线同时进行, 按“2.2”项下方法处理后取 1  $\mu\text{L}$  进样, 计算质控样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的准确度和精密度。根据分析物提取回收率的含义: 从生物样本基质中回收得到分析物质的响应值除以纯标准品产生的响应值, 以从血

浆中提取回收得到 LPV, RTV 和 IDV 峰面积除以相应浓度的标准溶液峰面积计算提取回收率。精密度和准确度及提取回收率结果见表 1 和表 2。

结果显示, 低、中、高 3 种浓度药物的提取回收率对测定的结果影响程度基本一致; 准确性和重复性好。

表 1 LPV 回收率与日内、日间精密度( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Recovery rate and within-day and between-day precision of LPV( $\bar{x}\pm s$ )

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度( $n=5$ )		日间精密度( $n=3$ )		回收率			
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	相对回收率 ( $n=5$ )/%	相对回收率 RSD/%	绝对回收率 ( $n=3$ )/%	绝对回收率 RSD/%
40	41.70 $\pm$ 2.20	5.96	39.93 $\pm$ 3.49	8.74	99.83	5.52	70.37	6.94
1 000	992.62 $\pm$ 65.19	7.18	980.93 $\pm$ 83.90	8.55	98.09	6.65	68.63	3.19
10 000	9 728.75 $\pm$ 413.24	4.58	9 743.60 $\pm$ 732.61	7.52	97.44	4.24	70.32	2.88

表 2 RTV 回收率与日内、日间精密度( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 2 Recovery rate and within-day and between-day precision of RTV( $\bar{x}\pm s$ )

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度( $n=5$ )		日间精密度( $n=3$ )		回收率( $n=5$ )			
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	相对回收率 ( $n=5$ )/%	相对回收率 RSD/%	绝对回收率 ( $n=3$ )/%	绝对回收率 RSD/%
10	10.17 $\pm$ 0.58	5.67	10.25 $\pm$ 0.57	5.58	102.51	5.25	67.24	5.65
250	248.32 $\pm$ 16.03	6.56	244.46 $\pm$ 23.16	9.47	97.79	6.07	66.41	5.03
2 500	2 504.10 $\pm$ 98.52	3.91	2 519.09 $\pm$ 142.78	5.67	100.76	3.62	67.40	2.11

## 2.7 血浆样品的稳定性试验

按“2.4”项下方法分别配制低(LPV 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中(LPV 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度(LPV 10 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 2 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 LPV-RTV 质控血浆样品, 每个浓度 21 份样品分析, 分为 4 组。分别在加热 HIV 灭活(56  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min)、室温(放置 1 h, 24 h)、冻存(-20  $^{\circ}\text{C}$  冻存 1 d, 3 d)和冻融(冻融 1 次, 3 次)条件下进行色谱测定, 结果 LPV 高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 0.44%~2.14%, 3.43%~7.45%, 3.83%~6.96%; RTV 高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 0.68%~1.71%, 3.21%~4.68%, 3.10%~8.45%。

## 2.8 质控样品的监控

按“2.4”项下方法分别配制低(LPV 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、中(LPV 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度(LPV 10 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , RTV 2 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 LPV-RTV 血浆样品置-20  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用, 此即为血浆质控样品。检测每批血浆样品前需做随行标准曲线, 并随行检测质控样品低、

中、高 3 个浓度, 每个浓度至少双样本, 并应均匀分布在未知样品测试顺序中; 结果质控样品检测结果其 RSD 均在 15%(低浓度在 20%)内, 可认为仪器检测正常。

## 2.9 临床检测

2 例 HIV 患者, 男性, 年龄分别为 31 岁和 43 岁。单次口服洛匹那韦利托那韦片(200 mg/50 mg)2 片, 4 h 后, 测得 LPV 血药浓度分别为 9 541.46  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 11 763.67  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相应的 RTV 血药浓度分别为 604.34  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 1 229.41  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 3 讨论

笔者试用正离子模式对 LPV(100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行 ESI 离子扫描, 确定母离子为  $m/z$  629.5, 再以此进行碎片离子扫描, 其中子离子  $m/z$  155.1 丰度较高。选择  $m/z$  629.5 $\rightarrow$ 155.1 为检测离子对, 再对干燥气流速、干燥气温度、雾化气压力、毛细管电压, 以及四级杆停留时间、裂解电压和裂解能量等质谱条件进行优化, 同样做法优化 RTV 和内标 IDV 的质谱条件。与 HPLC 分析方法相比, 本试验所

建立的 LC-MS/MS 由于采用了 SRM 扫描方法,具有较强的抗干扰优势,特异性较好。LPV 浓度在 20~20 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  线性良好( $r^2>0.99$ ), RTV 浓度在 5~5 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  线性良好( $r^2>0.99$ ), 定量下限确证均符合《化学药物临床药代动力学研究技术指导原则》的规定要求,介质效应和提取回收率对测定结果基本不影响,准确度及精密度均符合要求,低、中、高 3 种浓度经稳定性考察,血浆样品分别在室温放置 24 h、冻融 3 次及 $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冻存 3 d 的条件下证明是稳定的。

本方法所得 LPV 的定量下限为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 低于文献报道的 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [7]和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [8]; RTV 的定量下限为 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 低于文献报道的 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [7]和 99  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [5]。LPV, RTV 的线性范围分别为 20~20 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 5~5 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比姚亚敏等[7]所得的 62.5~10 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LPV), 12.5~2 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (RTV)宽,更能满足临床血药浓度监测的需要。

袁霖等[9]认为, HIV 病毒对热敏感,  $56\text{ }^\circ\text{C}$  下作用 10 min 即可被迅速灭活。而  $56\text{ }^\circ\text{C}$  加热 30 min 则为 HIV 常用灭活方法之一,且不会影响多数生化指标检测项目结果[10]。出于对检测工作者的保护并兼顾药品热稳定性的考虑,本方法采用  $56\text{ }^\circ\text{C}$  加热 30 min 对病人的血浆标本先进行 HIV 灭活,再进行检测。加热处理后的血浆稳定性经过考察, LPV 和 RTV 的高、中、低 3 个浓度 RSD 均 $<15\%$ ,符合要求,准确度好,精密度高。

LPV 与 RTV 合并用药时,后者通过抑制肝脏 CYP3A 对前者的代谢,从而大大提高前者的血浆浓度。洛匹那韦利托那韦片(200 mg/50 mg)的抗病毒活性是由 LPV 产生的。研究表明[11],洛匹那韦利托那韦片 400 mg/100 mg, bid 给药,连续 3 周,结果 LPV 血浆平均稳态峰浓度( $C_{\text{max}}$ )为(9.8 $\pm$ 3.7) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,比 RTV 高 15~20 倍。本法应用于两例临床检测中所得 LPV 达峰时间附近的血浆浓度结果与药品说明书[11]及文献[12]所述相符。而作为 CYP3A 抑制剂的 RTV 自身代谢则个体差异较大,提示临床医生应个体化用药。

本试验检测一个标本仅需 0.25 mL 血浆,低于文献报道的 0.5 mL<sup>[2-3]</sup>;检测时间仅 4.2 min,远低于文献报道的 12 min<sup>[7]</sup>和 17 min<sup>[3]</sup>;无需固相

萃取<sup>[5,8]</sup>和梯度洗脱<sup>[6]</sup>,操作简单、快速,检测结果准确、灵敏度高、重复性好,可用作临床常规 LPV 和 RTV 血药浓度的同时监测和药动学研究。

## REFERENCES

- [1] LU J F, WU H. The protease inhibitor of HIV-lopinavir [J]. Int J Virol(国际病毒学杂志), 2007, 14(4): 107-110.
- [2] TAKAHASHI M, YOSHIDA M, OKI T, et al. Conventional HPLC method used for simultaneous determination of the seven HIV protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(7): 1286-1290.
- [3] VERBESSELT R, WIJINGAERDEN E V, HOON J D. Simultaneous determination of 8 HIV protease inhibitors in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography with combined use of UV and fluorescence detection: amprenavir, indinavir, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and M8-nelfinavir metabolite [J]. J Chromatogr B, 2007, 845(1): 51-60.
- [4] ESTREALA R C, RIBEIRO F S, SEIXAS B V, et al. Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(5): 657-664.
- [5] TIPPABHOTLA S K, THUDI N R, RAGHUVANSHI R, et al. A bioequivalence study comparing two formulations of lopinavir/ritonavir capsules [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2008, 46(4): 204-210.
- [6] ELSE L, WATSON V, TJIA J, et al. Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(19): 1455-1465.
- [7] YAO Y M, SUN J J, CHEN J, et al. LC-MS/MS method for simultaneous quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2010, 45(2): 279-282.
- [8] CHACHAD S, LULLA A, MALHOTRA G, et al. Bioequivalence study of two fixed dose combination tablet formulations of lopinavir and ritonavir in healthy volunteers [J]. Arzneimittelforschung, 2009, 59(5): 263-268.
- [9] YUAN L, MA L Y, DENG S Y, et al. Study on the sensitivity of HIV to different temperatures [J]. Chin J Nat Med(中国自然医学杂志), 2008, 10(2): 95-97.
- [10] ZHANG Y H, LIU Z F, WEI H Y. The effects of heat-inactivation of serum samples on HIV-antibody and biochemical detection [J]. J Youjiang Med Coll Nationalities(右江民族医学院学报), 2009, 31(5): 772-773.
- [11] Instruction of lopinavir and ritonavir tablets(洛匹那韦利托那韦片说明书) [Z]. 2007.
- [12] RIBERA E, AZUAJE C, LOPEZ R M, et al. Atazanavir and lopinavir/ritonavir: pharmacokinetics, safety and efficacy of a promising double-boosted protease inhibitor regimen [J]. AIDS, 2006, 20(8): 1131-1139.

收稿日期: 2010-09-28