

改良 RP-HPLC 测定全血中环孢素 A 的浓度

冯惠平, 李碧峰, 陈宜锋, 王育惠(福建医科大学附属漳州市医院药剂科, 福建 漳州 363000)

摘要: 目的 建立一种简便的 RP-HPLC 法测定全血中环孢素 A(CsA)的浓度, 为临床合理应用 CsA 提供依据。方法 全血样品 1 mL 经乙醚提取, 正己烷洗涤去干扰后, 采用 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) 分离, 流动相为乙腈-甲醇-水-异丙醇(60:10:29:1), 流速 1.5 mL·min⁻¹, 柱温 70 °C, 检测波长 210 nm; 环孢素 D(CsD)为内标。结果 CsA 全血浓度在 25~1 600 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 平均方法回收率 99.51%, 日内、日间 RSD 均小于 5%, 最低检测限 5 ng·mL⁻¹。结论 本法简便快速, 灵敏度高, 重复性好, 线性范围广。用于患者全血中 CsA 浓度监测, 效果良好。

关键词: 反相高效液相色谱法; 环孢素 A; 血药浓度监测

作者简介: 冯惠平, 女, 主管药师 Tel: (0596)2082381 E-mail: fenghp019@126.com

Determination of Cyclosporin A in Human Whole Blood by Improved RP-HPLC

FENG Huiping, LI Bifeng, CHEN Yifeng, WANG Yuhui (Zhangzhou Municipal Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a practical RP-HPLC method to determine the concentration of cyclosporin A (CsA) in the whole blood. **METHODS** CsA was extracted from whole blood with diethyl ether and removed the endogenous interference in blood with n-hexane ether and separated using Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm). Mobile phase was acetonitrile-methanol-deionized water-isopropyl (60:10:29:1). The flow rate was 1.5 mL·min⁻¹. The temperature of column was set at 70 °C. The detecting wavelength was 210 nm. The internal standard was cyclosporine D. **RESULTS** A good linear relationship was obtained between the concentration of CsA from 25 ng·mL⁻¹ to 1 600 ng·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$). The average method recovery rate of CsA was 99.51%. The intra- and inter-day RSD were less than 5%. The detection limit of CsA was 5 ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The established method was simple, accurate, sensitive, reproducible and large-scale of detection range and suitable for monitoring blood-drug concentration of CsA.

KEY WORDS: RP-HPLC; cyclosporin A; therapeutic drug monitoring

环孢素 A(cyclosporin A, CsA)为 11 个氨基酸组成的环状多肽,是一种强效高选择性的免疫抑制剂,临床上广泛应用于肝、肾、心、骨髓等器官移植的抗排斥反应和自身免疫性疾病的治疗^[1]。由于 CsA 治疗窗窄,药动学参数个体差异大,剂量不易准确把握,浓度过高可引起肝肾损害,过低则易引起排斥反应,而且 CsA 血药浓度水平易受种族、年龄、肥胖、肝功能、肾功能、胃肠功能、药物相互作用以及饮食等众多因素的影响。因此监测全血中 CsA 的浓度并调整其浓度在有效治疗范围内具有重要的临床意义。

目前国内外测定全血中 CsA 的方法主要有荧光偏振免疫法(FPIA)和高效液相色谱法(HPLC),FPIA 法因简便、快速、灵敏而受到临床欢迎,但其测定成本昂贵,且该法易受代谢产物等因素的干扰使测定结果偏高,而 HPLC 法虽然具有特异性强,准确度高,成本低廉,易于普及等优点,但仪器方法常受全血中内源性杂质的影响,基线漂移、灵敏度较低,为此本实验在原方法^[2]的基础上对色谱条件和样品提取方案进行改进,结果改良后的 RP-HPLC 法准确可靠,重复性好,基线稳定,灵敏度高,线性范围宽。

1 材料和方法

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),ChemStation A.10.OX.化学工作站,WH-861 旋涡混合器(太仓市科教器材厂),TP-300 超声波清洗机(北京天鹏电子新科技有限公司),SIGMA-3K15 离心机(德国),AE-240 型电子分析天平(梅特

勒托利多有限公司),185 个人型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

环孢素 A 对照品(CsD,纯度:98.8%,批号:060101),环孢素 D 对照品(纯度:99%,内标用),均由福建省微生物研究所提供,甲醇、乙腈、异丙醇为色谱纯,乙醚为重蒸分析纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 CsA 对照品溶液的配制

精密称取 CsA 对照品 12.50 mg 置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即为 CsA 对照品贮备液(250 μg·mL⁻¹),将 CsA 对照品贮备液以甲醇稀释定容,配制成浓度分别为 1.25, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00, 80.00 μg·mL⁻¹ 的 CsA 对照品工作液。

1.4 CsA 质控溶液的配制

精密称取 CsA 对照品 10.40 mg 置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即为 CsA 质控贮备液(104 μg·mL⁻¹),将 CsA 质控贮备液以甲醇稀释定容,配制成浓度分别为 1.30, 2.60, 41.60, 68.20 μg·mL⁻¹ 的质控工作液。

1.5 CsD 对照品溶液的配制

精密称取 CsD 对照品 12.00 mg 置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即为 CsD 内标贮备液(120 μg·mL⁻¹),精密吸取贮备液 5 mL,加甲醇稀释至 10 mL,即为内标工作液(60 μg·mL⁻¹)。(上述所有配制溶液均放置在 4 °C 冰箱中保存)

1.6 色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm ×

150 mm, 3.5 μm), 流动相采用梯度洗脱, 见表 1。流速为 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 70 $^{\circ}\text{C}$, 紫外检测波长 210 nm, 进样量 25 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 The mobile phase with a gradient elution condition

时间/ min	流动相组成	流动相比例	流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
0~15	乙腈: 甲醇: 水: 异丙醇	60: 10: 29: 1	1.5
15~16	甲醇	100%	2.0
16~24	甲醇	100%	2.0
24~25	乙腈: 甲醇: 水: 异丙醇	60: 10: 29: 1	1.5

1.7 血样处理

精密吸取全血样品 1.0 mL, 置 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入内标液 25 μL , 涡旋 30 s, 加入氟化钠 50 mg, 涡旋 30 s, 加入重蒸乙醚 4 mL, 混合提取 3 min, 5 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离乙醚层, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、氮气吹干。残渣中加入甲醇-50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(1: 1)重组液 200 μL , 涡旋 30 s; 加入正己烷 0.5 mL, 涡旋 30 s, 5 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取下层澄清液 25 μL 进样。

2 结果

2.1 色谱图

在上述色谱条件下, CsA 及 CsD 有足够的分离度, 且全血中内源性杂质对测定无干扰, CsA、CsD 的保留时间分别为 9.539, 13.557 min, 理论塔板数分别为 10 250, 9 890。空白全血、全血加对照品、服药后的患者全血样品色谱图, 见图 1。

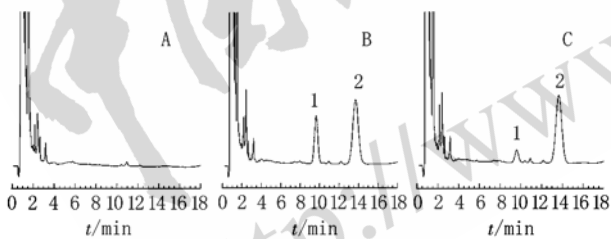


图 1 全血中环孢素 A 的 HPLC 图

A-空白全血; B-空白全血中加入环孢素 A 对照品和内标; C-患者服药后血样; 1-CsA; 2-CsD

Fig 1 HPLC chromatograms of CsA in whole blood

A-blank whole blood; B-blank whole blood with standard reference; C-blood sample after oral administration; 1-CsA; 2-CsD

2.2 标准曲线的绘制

精密吸取 CsA 对照品工作液, 加入全血配制浓度分别为 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准全血样品, 按“1.7”项下方法操作, 进样测定, 以 CsA 峰面积与内标 CsD 峰面积比值(Y)对浓度(C)进行线性回归, 得回归方程

$Y=0.000\ 645\ 001\ C-0.013\ 182\ 6(r=0.999\ 8)$, 结果表明 CsA 检测浓度在 25~1 600 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 最低定量浓度为 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按信噪比 3: 1 计本法最低检测限为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 方法回收率和精密度试验

精密吸取 CsA 质控工作液适量, 以空白全血稀释至 26, 52, 832, 1 364 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度, 按“1.7”项下方法操作, 分别在同一天内测定 5 次和连续 5 d, 每天测定 1 次, 测得的血药浓度, 计算方法回收率和日内日间精密度, 方法回收率=测得量/加入量 $\times 100\%$ 。结果见表 2。

表 2 方法回收率和精密度测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 2 The result of recovery and precision ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

加入浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	实测浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	平均回		RSD/%	
			收率/%		日内	日间
26	25.36 $\pm$ 0.62	97.54 $\pm$ 2.40		2.46	1.98	
52	51.42 $\pm$ 2.18	98.89 $\pm$ 4.20	99.51	4.25	0.62	
832	852.55 $\pm$ 14.80	102.47 $\pm$ 1.78		1.73	3.08	
1 364	1 352.40 $\pm$ 16.70	99.15 $\pm$ 1.38		1.37	2.60	

2.4 萃取回收率试验

精密吸取 CsA 质控工作液适量, 以空白全血稀释至 26, 52, 832, 1 364 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度, 按“1.7”项下方法操作, 每一浓度进行 5 样本分析, 以全血质控样品测得的峰面积与未经提取的相应浓度对照品峰面积之比计算萃取回收率, 结果 4 种浓度质控样品的萃取回收率分别为 65.50%, 68.71%, 70.60%, 70.01%, RSD 分别为 4.90%, 2.85%, 3.30%, 3.20%。

2.5 稳定性试验

精密吸取 CsA 质控工作液适量, 以空白全血稀释至 26, 52, 832, 1 364 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度, 按“1.7”项下方法处理血样后, 置室温样品室自动进样瓶中, 分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 进样测定, 结果 RSD 分别为 3.56%, 1.96%, 2.01%, 2.59%, 表明处理后的样品在室温下放置 36 h 稳定。

2.6 临床应用

本试验建立的改良环孢素 A 血药浓度监测的 RP-HPLC, 参加卫生部室间质量评价, 结果均符合规定, 相对偏差均在 $\pm 4\%$ 以内。用于我院血液科骨髓移植、再生障碍性贫血患者 CsA 血药浓度监测共 101 例, 效果良好。

3 讨论

3.1 色谱条件的改进

本实验对流动相的组成和比例进行摸索试

验,最后确定为乙腈-甲醇-水-异丙醇=60:10:29:1(原方法为乙腈-甲醇-水=72:6:22),流动相中加入1%的异丙醇^[3],有效的改善了峰形,解决了基线不稳定的问题。调低乙腈的比例,增加水的比例,大大的降低了成本和减少了系统对环境的污染。流动相采用梯度洗脱^[4],当样品及内标出峰后,以100%的有机相(甲醇)及较快的流速将内源性的强保留杂质较快的洗脱出来,有效的缩短了样品进样分析的时间。柱温对CsA测定影响较大,实验中笔者发现,随着柱温升高,保留时间相对缩短,峰形和分离效果都有较大改善,为此笔者分别对柱温60,65,70,75℃作对比实验,结果60℃与65℃时CsA、CsD及杂峰分离不完全,峰宽大,70℃时CsA、CsD及杂峰完全分离,且峰宽窄,峰形好,柱效高。但温度继续增加到75℃时,峰形改善不明显,考虑到柱温太高会影响色谱柱寿命,故最终确定柱温为70℃。选用Agilent zorbax SB-C₁₈柱(4.6 mm×150 mm,3.5 μm)最大耐受温度高达90℃,有利于延长色谱柱的寿命。

3.2 样品提取方法的优化

采用甲醇-50 mmol·L⁻¹HCl(1:1)为重组液(原方法为甲醇-25 mmol·L⁻¹HCl(1:1)),加大重组液的酸度有效的增强了正己烷的脱脂去除杂质能力。本实验曾分别对流动相乙腈-甲醇-水-异丙醇(60:10:29:1)、乙腈-50 mmol·L⁻¹HCl(1:1)、甲醇-25 mmol·L⁻¹HCl(1:1)、甲醇-50 mmol·L⁻¹HCl(1:1)为重组液进行对比实验研究,结果发现在用正己烷脱脂前,以流动相为重组液溶解残渣时,两相液面模糊,乳化现象严重,呈凝胶状。以乙腈-50 mmol·L⁻¹HCl(1:1)为重组液溶解残渣时,虽然无乳化现象,但进样后色谱图中有很

多杂峰干扰。以甲醇-HCl(1:1)为重组液溶解残渣时,既无乳化现象,进样后的色谱图杂质少。但随着重组液中盐酸浓度的增大,正己烷的脱脂去除杂质能力增强,两相液面更清晰,更便于分离,进样后的色谱图杂质更少,在该色谱条件下,CsA与内标有足够的分离度,且血液中内源性杂质对测定无干扰,故最后确定用甲醇-50 mmol·L⁻¹盐酸(1:1)做为重组液。随着方法灵敏度的提高,进样量减少为原来的一半,进样量为25 μL,原方法50 μL,最低定量浓度为25 ng·mL⁻¹,原方法50 ng·mL⁻¹,最低检测限为5 ng·mL⁻¹,原方法10 ng·mL⁻¹。

改进后的RP-HPLC法,灵敏度提高了一倍,基线更稳定,线性范围更宽,重复性好,柱效高,峰形对称尖锐,结果准确可靠。是一种优良的环孢素A血药浓度监测的反相高效液相色谱法,适合于临床治疗药物监测和药动力学研究。

REFERENCES

- [1] REN B, LI S X, CHEN X, et al. Determination of cyclosporin A in human whole blood by RP-HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2001, 21(8): 470-472.
- [2] LI B F, FENG H P, JIA J R, et al. Determination of cyclosporin A in human whole blood by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2007, 10(7): 649-651.
- [3] LI K, WANG P, YUAN H S, et al. Determination of cyclosporin A in human whole blood by reversed phase liquid chromatography with single-step extraction and its pharmacokinetics [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 1997, 32(3): 157-161.
- [4] GAO Z W, LI Z D, SHI X J, et al. Study on the bioavailability of 2 kinds of cyclosporin A in human body [J]. China Pharm (中国药房), 2005, 16(22): 1723-1725.

收稿日期: 2009-06-30