

抗 COVID-19 药物的临床分析研究进展

谢静¹, 唐铭擎^{1,2}, 丁立生², 梁健², 李羿^{1*} (1.成都医学院药学院, 成都 610500; 2.中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要: 洛匹那韦、利托那韦和利巴韦林是《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》的推荐药物。通过研究近年来洛匹那韦、利托那韦和利巴韦林临床药物分析的进展概况, 重点关注药物在血浆中的多种测定方法, 包括 HPLC、LC-MS、MS、分光光度法、毛细管电泳法、免疫法等, 为开展治疗药物监测工作提供参考。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 洛匹那韦; 利托那韦; 利巴韦林; 体内药物分析; 治疗药物监测

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)06-0646-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.002

引用本文: 谢静, 唐铭擎, 丁立生, 等. 抗 COVID-19 药物的临床分析研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 646-652.

Progress in Clinical Analysis of Anti-COVID-19 Drugs

XIE Jing¹, TANG Mingqing^{1,2}, DING Lisheng², LIANG Jian², LI Yi^{1*} (1.School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2.Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: Lopinavir, ritonavir and ribavirin are recommended in Diagnostic and Treatment Scheme for COVID-19(Trial Version 5). The research progress of clinical drug analysis of lopinavir, ritonavir and ribavirin in recent years is summarized. The focus is on a variety of methods for the determination of drugs in plasma, including HPLC, LC-MS, MS, spectrophotometry, capillary electrophoresis, immunoassay, etc., which provide a reference for the development of therapeutic drug monitoring.

KEYWORDS: COVID-19; lopinavir; ritonavir; ribavirin; biopharmaceutical analysis; therapeutic drug monitoring.

自 2019 年 12 月湖北省武汉市陆续发现多例新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染的肺炎(COVID-19)患者以来, COVID-19 已成为重大的公共卫生问题。SARS-CoV-2 属于 β 属的冠状病毒, 理化性质类比 SARS 病毒, 经呼吸道飞沫和接触传播, 临床感染者出现肺炎表征, 具体表现为发热、乏力、干咳, 严重者可能出现急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、代谢性酸中毒和出血功能障碍等症表征, 甚至能危及生命。SARS-CoV-2 的一般潜伏期为 1~14 d, 且无症状感染者也可能成为传染源, 因此具有极高的传染系数。

SARS-CoV-2 为新型病毒, 现无针对性的特效治疗药物。在探究可行的治疗方案时, 发现洛匹那韦和利托那韦作为蛋白酶抑制剂, 二药合用可有效干扰 HIV 病毒的装配过程; 而利巴韦林作为核苷类广谱抗病毒药, 可抑制磷酸次黄苷脱氢酶活性, 减少 DNA 或 RNA 病毒的复制。以上 3 种药物在 2003 年非典时期被发现对与 SARS-CoV-2

同类型的 SARS-CoV 病毒有明显抑制作用, 且随着疾病认识的深入和诊疗经验的积累, 国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》, 也明确提出可将洛匹那韦、利托那韦和利巴韦林作为抗病毒药治疗 COVID-19^[1]。随着这些药物在特殊情况下的大规模使用, 治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 必要性势必凸显。尤其是诊疗方案中已明确指出“要注意洛匹那韦-利托那韦相关腹泻、恶心、呕吐、肝功能损害等不良反应, 同时要注意和其他药物的相互作用”。通过 TDM, 可以在获得良好疗效的同时避免或减轻不良反应, 而且还可以为药物不良反应的诊断和处理提供有价值的实验室依据, 将临床用药从经验模式提高到比较科学的水平。本文综述了近年来洛匹那韦、利托那韦和利巴韦林临床药物分析的研究进展, 重点关注药物在血浆中的多种测定方法, 包括 HPLC、LC-MS、MS、分光光度法、毛细管

基金项目: 国家自然科学基金项目(21572219); 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(18PJ549); 抗生素研究与再评价四川省重点实验室开放课题(ARLKF19-13)

作者简介: 谢静, 女, 博士, 副教授 Tel: (028)62739561 E-mail: aggie-xj@163.com *通信作者: 李羿, 男, 博士, 教授 Tel: (028)62739561 E-mail: lychengdu@aliyun.com

电泳法、免疫法等,为本次 COVID-19 药物治疗的 TDM 提供参考。

1 洛匹那韦和利托那韦的体内药物分析

洛匹那韦: CAS 号 192725-17-0, 分子式 $C_{37}H_{48}N_4O_5$, 分子量 628.8, 化学名称为 (2S)-N-[(2R,4S,5S)-5-[[2-(2,6-二甲基苯氧基)乙酰]氨基]-4-羟基-1,6-二苯基-己-2-基]-3-甲基-2-(2-氧代-1,3-二氮杂环己-1-基)丁酰胺, 化合物的分子结构见图 1A。利托那韦: CAS 号 155213-67-5, 分子式 $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$, 分子量 720.96, 化学名称为 N-[(2S,3S,5R)-3-羟基-5-[[[(2S)-3-甲基-2-[[甲基-[(2-异丙基-1,3-噻唑-4-基)甲基]氨基甲酰]氨基]丁酰]氨基]-1,6-二苯基-己-2-基]氨基甲酸 5-噻唑基甲基酯], 化合物的分子结构见图 1B。这 2 种药物都属于蛋白酶抑制剂,能与 HIV 病毒壳蛋白结合,抑制逆转录病毒的组装过程,尤其是二药联合使用时,能大幅度减弱病毒逆转录活性,临床试验也证明,洛匹那韦和利托那韦针对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 也有抑制作用。

目前,对这 2 种药物在血浆中的定量分析研究较多。由于临床药物联用的需要,一般都是对这 2 种药物同时检测,当然,也不乏对单一药物,或者包含这 2 种药物在内的多个药物的同时检测。检测方法以 HPLC 为主,另有少量的薄层色谱法、光谱法等报道。

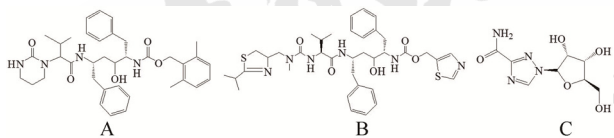


图 1 药物化学结构

A-洛匹那韦; B-利托那韦; C-利巴韦林。

Fig. 1 Chemical structure of drugs

A-lopinavir; B-ritonavir; C-ribavirin.

1.1 HPLC 及 LC-MS

HPLC 作为经典的药物体内分析方法,在洛匹那韦和利托那韦的测定中应用较早,国内外科工作者对此进行了大量的研究^[2-6]。随着 MS 技术的进步和仪器的普及化,LC-MS 分析越来越多地应用于洛匹那韦和利托那韦的体内浓度测定。LC-MS 体现了色谱和 MS 的互补优势,将色谱的高分离能力与 MS 的高选择性、高灵敏度充分结合起来,使得即使待检化合物在色谱上没有完全分离开,但通过 MS 也可定量测定,从而大大提高了测定结果的准确度和仪器分析效率;同时,质谱

的高灵敏度使得其检测限较之紫外检测器大大提高至少 3 个数量级。这些优势使得 LC-MS 非常适合于血浆等生物样品的定量测定,甚至逐渐表现出取代单液相色谱法的趋势^[7-12]。现有报道的 LC-MS 分析大多是利用电喷雾电离(electron spray ionization, ESI)来测定,Chu 等^[11]报道了一种使用大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)的 HPLC-APCI-MS/MS 分析方法:由于洛匹那韦和利托那韦的极性较低,Chu 等^[11]改用 APCI 离子源,有效地降低了基质效应引起的背景噪音,同时简化了样品前处理过程,获得了更好的分析效果。UPLC 虽然与 HPLC 的分离理论一样,但其涵盖了小颗粒填料、快速分离和极低死体积等全新技术,增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量,较之 HPLC 更适合与 MS 联用,使用 UPLC-MS/MS 测定洛匹那韦和利托那韦也有相应报道^[13-15]。LC-MS 定量分析需要使用内标化合物,一般使用结构类似物的情况较多,但 Yadav 等^[13]和 Djerada 等^[15]使用洛匹那韦和利托那韦的氘代同位素作为内标物获得了更好的测定效果。具有代表性的洛匹那韦和利托那韦 HPLC 及 LC-MS 的定量分析研究汇总见表 1。

除了定量分析,Marzinke 等^[16]还报道了一种高通量定性方法的开发与验证,该方法使用高分辨率质谱(exactive-MS)多重检测了 15 种抗逆转录病毒药物,包括 9 种蛋白酶抑制剂(Pis)、4 种核苷酸/核苷逆转录酶抑制剂(NRTIs)和 2 种非核苷酸/核苷逆转录酶抑制剂(NNRTIs)。在 Hypersil-Gold-PFP (100 mm×3 mm)柱上进行了分离,并在全扫描模式下对洗脱液进行了分析。使用临床血浆样品,通过对检测限、信号强度精度、保留时间分析、选择性和残留等研究,表明该方法与 LC-MS/MS 具有一致性^[16]。

样品的前处理上,较常规的是使用乙酸乙酯萃取或者用乙腈沉淀蛋白的方式将洛匹那韦和利托那韦从血浆中分离、富集出来。此外,有报道使用固相萃取法进行样品前处理,获得较好的效果^[7,13-14],特别是 Illamola 等^[7]通过固相萃取实现了血浆中游离洛匹那韦的测定,并对比了使用乙腈沉淀蛋白法测得的总洛匹那韦含量差异。

1.2 MS

基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)是一种新型的电离

表1 洛匹那韦和利托那韦的液相色谱及液相色谱-质谱联用的代表性分析方法

Tab. 1 Representative analysis methods of HPLC and LC-MS for lopinavir and ritonavir

方法	样品及前处理	化合物	色谱柱	流动相	UV 波长/MS 离子对	检测范围	LOD	文献
LC-UV	药片, 乙腈超声提取	LPV RTV	Luna C ₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm)	85%甲醇(磷酸调 pH 3.5)	240 nm	40~200 μg·mL ⁻¹ * 10~50 μg·mL ⁻¹ #	40 μg·mL ⁻¹ * 20 μg·mL ⁻¹ #	[2]
LC-UV	人血浆, 乙酸乙酯萃取	LPV	Eclipse XDB-C ₁₈ (150×4.6 mm, 5 μm)	80%甲醇(含 0.1 mol·L ⁻¹ 醋酸铵)	210 nm	1~12 mg·L ⁻¹		[3]
LC-UV	药片, 甲醇超声提取	LPV RTV	Phenomenex Gemini C ₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm)	55%乙腈(含 NaH ₂ PO ₄ 缓冲液, pH 5.3)	262 nm	5~30 μg·mL ⁻¹ * 2~10 μg·mL ⁻¹ #	1.47 μg·mL ⁻¹ * 0.79 μg·mL ⁻¹ #	[4]
LC-UV	人血浆, 乙腈沉淀蛋白	RTV	Hypersil C ₁₈ (4.6×200 mm, 5 μm)	50%乙腈(含 0.05 mol·L ⁻¹ 磷酸盐缓冲液 pH 5.6)	210 nm	0.078~40.0 μg·mL ⁻¹	0.02~40.0 μg·mL ⁻¹	[5]
LC-UV	人血浆, 叔丁基甲醚萃取	LPV RTV	Shim-pack CLC-ODS (6 mm×150 mm, 5 μm)	60% 乙腈 (含 0.01 mol·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 缓冲液, pH 4.8)	205 nm	0.5~20 mg·L ⁻¹ * 0.05~5 mg·L ⁻¹ #		[6]
LC-MS/MS	人血浆, 超滤(离心)乙腈沉淀(总)	LPV	Phenomenex Kinetex C ₁₈ (100×2.1 mm, 5 μm)	40%乙腈(含 0.1%甲酸)	629.41/447.30	0.1~15 μg·mL ⁻¹		[7]
LC-MS/MS	人血浆, 碱化沉淀蛋白后, 乙酸乙酯萃取	LPV RTV	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ (150×4.6 mm, 5 μm)	80%甲醇(含 0.1%甲酸)	629.6/155.2* 721.4/268.2#	62.5~10 000 ng·mL ⁻¹ * 12.5~2 000 ng·mL ⁻¹ #	15 pg·mL ⁻¹ * 8 pg·mL ⁻¹ #	[8]
LC-MS/MS	人血浆, 乙酸乙酯萃取	LPV RTV	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ (150×4.6 mm, 3.5 μm)	90%乙腈(含 0.005 mol·L ⁻¹ 甲酸铵、0.1%甲酸)	629.6/155.1* 721.4/296.1#	20~20 000 μg·L ⁻¹ * 5~5 000 μg·L ⁻¹ #		[9]
LC-MS/MS	人血浆, 乙腈沉淀蛋白	LPV RTV	Inertsil ODS (50×4.6 mm, 5 μm)	80%乙腈(含 5 mmol·L ⁻¹ 醋酸铵缓冲液, 调 pH 3.5)	629.3/447.1* 721.2/296.2#	50.67~10 008.82 ng·mL ⁻¹ * 5.066~1 000.693 ng·mL ⁻¹ #		[10]
LC-MS/MS	人血浆, 乙腈沉淀蛋白	LPV RTV	Thermo Hypersil GOLD (2.1×100 mm, 5 μm)	甲醇-水(含 0.1%甲酸)	629.3/155.0* 721.3/268.0#	20~1 000 ng·mL ⁻¹		[12]
LC-APCI-MS/MS	人头发, 甲醇提取	LPV RTV	Platisil ODS C ₁₈ (150×4.6 mm, 5 μm)	90%甲醇(含 2 mmol·L ⁻¹ 醋酸铵 pH 4.5)	629.0/155.4* 721.0/140.3#	10~50 000 pg·mg ⁻¹ * 12~12 500 pg·mg ⁻¹ #	5 pg·mg ⁻¹ * 6 pg·mg ⁻¹ #	[11]
UPLC-MS/MS	人血浆, 固相萃取	LPV RTV	Waters Acquity BEH C ₁₈ (50×2.1 mm, 1.7 μm)	UPLC 90%甲醇(含 10 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵, pH 4.0)	629.3/447.4* 721.3/296.3#	2.9~1 452 ng·mL ⁻¹ * 29.6~14 379 ng·mL ⁻¹ *		[13]
UPLC-MS/MS	人血浆, 固相萃取	LPV RTV	Waters Acquity BEH C ₁₈ (50×2.1 mm, 1.7 μm)	UPLC 60%甲醇(含 0.1%甲酸)	721.40/296.1* 629.40/447.4#	30~15 000 ng·mL ⁻¹ * 3~1 500 ng·mL ⁻¹ #	29.7 ng·mL ⁻¹ * 2.9 ng·mL ⁻¹ #	[14]
UPLC-MS/MS	人血浆, 固相萃取	LPV RTV	Waters Acquity HSS T3 (2.1×50 mm, 1.8 μm)	乙腈/水(含 0.1 甲酸)梯度洗脱	629.3/447.4* 721.2/296.2#	78.12~20 000 ng·mL ⁻¹ * 7.81~2 000 ng·mL ⁻¹ #	10 ng·mL ⁻¹ * 0.5 ng·mL ⁻¹ #	[15]

注: LPV-洛匹那韦; RTV-利托那韦; *-洛匹那韦对应的数据; #-利托那韦对应的数据。

Note: LPV-lopinavir; RTV-ritonavir; *-data corresponding to lopinavir; #-data corresponding to ritonavir.

技术手段, 具有快速、准确、易于自动化和耗费少等优点。MALDI-MS 相较于传统 LC-MS, 样品不需要复杂的前处理, 而且避免了液相分离过程, 成为定量分析的一个新领域。Notari 等^[17]用 MALDI-TOF/TOF 法测定了 HIV 感染者血浆中洛匹那韦和利托那韦的浓度: 将 600 μL 血浆样品固相萃取(二乙烯基苯和 N-乙基吡咯烷酮)后, 在氮气流下水浴蒸发, 再用 100 μL 甲醇复溶后与饱和基质溶液 1:1 混合, 然后点样于 MALDI-TOF/TOF 样品靶板上。采用外标法定量, 洛匹那韦和利托那韦在 0.002 5~0.50 pmol·μL⁻¹ 线性良好, 绝对回收率在 80%~110%。该 MALDI-TOF/TOF 法的测定结果与 LC-UV 和 LC-MS/MS 测定的浓度值非常一致; 同时, MALDI-TOF/TOF 还可用于利托那韦代谢物 R5 的检测。

Kampen 等^[18]开发了基于 MALDI-FTICR 质谱法的细胞裂解液中 5 种 HIV-1 蛋白酶抑制剂的定量检测方法: 向 2,5-二羟基苯甲酸基质溶液中加入 DMSO 可以显著提高定量精度, 向基质溶液中添加碘化钾可显著提高信噪比。洛匹那韦和利托那韦的平均定量精密密度(以相对标准偏差表示)分别为 7.3%和 8.5%, 平均定量准确度(以偏差百分比表示)分别为 6.0%和 5.9%, 细胞裂解物的定量下限分别为 16 fmol·μL⁻¹和 31 fmol·μL⁻¹, 用外标法测定蛋白酶抑制剂的平均质量准确度为 0.28 ppm。结果表明, MALDI-FTICR 质谱法可用于细胞裂解液中 HIV-1 蛋白酶抑制剂的精确、准确、选择性定量分析^[18]。

1.3 薄层色谱法

Sulebhavikar 等^[19]建立了一种快速简便的高效薄层色谱(high performance thin layer chromatography,

HPTLC)法测定药物中洛匹那韦和利托那韦的含量。以硅胶 60F₂₅₄ 铝板 HPTLC 为固定相, 甲苯、乙酸乙酯、甲醇和冰醋酸为流动相, 体积比分别为 7.0:2.0:0.5:0.5。显影后, 在 $\lambda_{263\text{ nm}}$ 下观察。洛匹那韦和利托那韦的线性范围分别为 6.67~20.00 μg 和 1.67~5.00 μg , 回收率分别为 98.23%~102.28%和 98.03%~103.50%。所述方法具有快速、简便的优点, 可用于制剂及稳定性研究中洛匹那韦和利托那韦的常规质量控制分析^[19]。

1.4 分光光度法

Phechkrajang 等^[20]建立了化学计量辅助分光光度法测定糖浆中洛匹那韦和利托那韦的含量。采用中心组合设计(central composite design, CCD)方法设计了一系列混合标准品溶液。分别用主成分回归(PCR)和偏最小二乘回归(PLS-1)法对标准品的紫外光谱进行分析, 从而建立未知样品中洛匹那韦和利托那韦的预测模型, 最后利用预测模型对糖浆中的 2 种药物进行了分析, 与 HPLC 比较, PCR 和 PLS-1 的结果与 HPLC 的结果一致^[20]。Nagulwar 等^[21]建立了同时测定复方片剂中利托那韦和洛匹那韦含量的简便、准确的吸收比法, 在 $\lambda_{257.4\text{ nm}}$ 处测得二者线性范围分别为 5~30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 20~120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对照品回收率分别 98.6%和 101.3%, 2 种药物在片剂中的含量分别为 98.3%和 99.9%^[21]。

2 利巴韦林的体内药物分析

利巴韦林, CSA 号 36791-04-5, 分子式 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, 分子量 244.2, 化学名称为 1- β -D-呋喃核糖-1,2,4-三氮唑-3-羧酰胺, 化合物的分子结构见图 1C。利巴韦林是 1972 年首次合成的嘌呤核苷类似物, 它对多种 DNA 和 RNA 病毒具有广谱活性。临床上, 利巴韦林与干扰素等其他药物的联合使用情况较普遍, 这也对利巴韦林的体内药物分析造成了一定的挑战。

2.1 HPLC 及 LC-MS

利巴韦林的体内药物分析方法主要是 HPLC 及 LC-MS。由于核苷类药物在水中极性高、溶解度高, 其生物分析尤其是在人血浆等复杂介质中的样品制备一直是一个挑战, 因此, 在样品前处理时, 除了经典的有机溶剂沉淀蛋白外, 固相萃取法(SPE)越来越多地被应用到定量分析中^[22-24], 样品的富集与净化同时完成, 工作效率高, 比液液萃取更快、更节省溶剂, 可自动化批量处理、

重现性好。同时, 亲水色谱柱也被应用于利巴韦林的分离^[22,25-26]。亲水色谱柱是专为亲水性和极性化合物具有更强的保留能力和选择性而设计的, 具有基线稳定、选择性高和保留时间长等优点, 可以在中性 pH 值条件下和没有缓冲溶液或离子对试剂条件下使用, 这对于 MS 尤为重要。其中, Waters Atlantis dC₁₈ 色谱柱是一种双功能键合硅胶反相色谱柱, 极性化合物保留率高, 它不仅可以在 100%的水流动相中使用, 而且不对疏水化合物过度保留。另外, 还有使用胶束色谱法(micellar chromatography, MC)对血浆和尿液中利巴韦林测定的报道^[27]。

利巴韦林与 α -干扰素联用是临床治疗丙肝病毒感染的一个标准用药方案, 但利巴韦林有可能导致溶血性贫血, 因此有必要测定血液细胞内中利巴韦林及其磷酸化代谢产物的水平。D'avolio 等^[28]用 5 倍体积的冰蒸馏稀释的全血进行酸性磷酸酶消化, 将磷酸化利巴韦林代谢物转化为游离利巴韦林, 然后进行反相高效液相色谱分析。全血利巴韦林浓度在 625~320 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈线性, 利巴韦林和磷酸化利巴韦林准确度、日内和日间准确度均<9.0%, 最后通过 13 例 HCV+患者接受 α -干扰素和利巴韦林联合治疗后的血液来检验了这一方法^[28]。类似, 有研究通过 LC-MS/MS 对外周血单核细胞中利巴韦林^[29]和 CEMss 细胞中一磷酸利巴韦林和三磷酸利巴韦林的含量^[30]进行了测定。Clemens 等^[31]探讨了采血后样品的存放温度和时间对利巴韦林血浆浓度的影响: 将 23 例患者的 2 份平行血样分别置于冰上和室温, 1~3 h 后从每个样本中离心 1.5 mL 血液获得血浆, 然后在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存直到检测。使用 HPLC-UV 分析血浆利巴韦林发现其在冷藏和室温下保存 1, 2, 3 h 后的平均浓度损失分别<3%, 9%, 13%, 表明用于利巴韦林测定的血液样本可在室温下保存 2 h^[31]。代表性分析方法^[22-23,25-27,29,32-34]见表 2。

2.2 毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)

HPLC 的一个常见的替代分析方法是 CE。CE 是基于各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离, 这种不同的分离机制为 HPLC 提供了明显不同的选择性, 通常分离难以用 HPLC 分离的成分。当与更高的分离效率相结合时, CE 通常比 HPLC 分析快, 在某些情况下可以减少甚至消除样品预处理。如 Breadmore 等^[35]建立的利巴韦林的

表 2 利巴韦林的 HPLC 及 LC-MS 的代表性分析方法

Tab. 2 Representative analysis methods of HPLC and LC-MS of ribavirin

方法	样本及前处理	色谱柱	流动相	UV 波长/MS 离子对	检测范围	LOD	文献
LC-UV	人血浆, 乙酸乙酯 萃取	Scharlau® C ₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm)	乙腈水梯度洗脱	207 nm	0.5~80 μg·mL ⁻¹		[32]
LC-UV	人血浆, 固相萃取	Waters Atlantis dC ₁₈ (150×3.9 mm, 5 μm)	乙腈水梯度洗脱	207 nm	0.05~10 μg·mL ⁻¹		[22]
LC-UV	人血浆, 乙腈沉淀 蛋白	Atlantis dC ₁₈ (150×4.6 mm, 3 μm)	乙腈水(含 50 mmol·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 3.23)梯度 洗脱	235 nm	78.125~10 000 ng·mL ⁻¹	78.125 ng·mL ⁻¹	[25]
LC-MC-UV	血浆和尿液	Shim-pack VP-ODS (150×4.6 mm, 5 μm)	0.1 mol·L ⁻¹ SDS、8%正丙 醇、0.02 mol·L ⁻¹ 磷酸(含 0.3%三乙胺), pH 6.0	214 nm	0.01~0.1 μg·mL ⁻¹		[27]
LC-MS/MS	人血浆, 甲醇沉淀 蛋白	Inertsil HILIC (2.1×150 mm, 3.5 μm)	乙腈水(含 0.1%甲酸)	245.1/113.1	1.029~1 029 ng·mL ⁻¹		[26]
LC-MS/MS	人血清, 超滤	Waters Atlantis® T3 (100×2 mm, 3 μm)	乙腈水梯度洗脱	245.1/113.0	0.2~10 mg·L ⁻¹		[33]
LC-MS/MS	人血浆、血清, 乙 腈沉淀蛋白	Betasil silica column (50×3 mm, 5 μm)	95%乙腈(含 0.05%三氟乙 酸)	245/113	10.0~10 000 ng·mL ⁻¹		[34]
SPE-LC-MS/MS	人血浆, 在线固相 萃取	Thermo Acclaim C ₁₈ (4.6×150 mm, 5 μm)	120 乙腈水梯度洗脱	245.1/113.2	10~2 000 ng·mL ⁻¹		[23]
UPLC-MS/MS	HIV 患者外周血单 核细胞	Waters Acquity UPLC HSS T3(150×2.1 mm, 1.8 μm)	乙腈水(含 0.05%甲酸)梯 度洗脱	245.10/113.05	0.1~200 ng	0.05 ng	[29]

CE 检测法, 通过加入精氨酸降低硼酸盐电解液电渗流量以实现反极性分离, 并利用苯基硼酸滤筒的固相萃取弥补传统乙腈蛋白沉淀法导致的低灵敏度和强干扰性缺陷, 其对 34 例临床样本测定后证实, CE 与传统 HPLC 的测定结果具有较强的相关性, 但 CE 的检测限更低, 可达 0.05 μg·mL⁻¹[35]。

2.3 免疫分析法

Austin 等^[36]报道了一种测量利巴韦林的放射免疫分析法, 该方法能够测定低至 0.01 μmol·L⁻¹ (2.45 ng·mL⁻¹) 的血浆浓度。但是, 该方法特异性不佳, 会与许多利巴韦林的代谢物发生交叉反应, 限制了其在药动力学研究中的应用。随后, 有报道用酶免疫法(enzyme immunoassay, EIA)直接在 HEp-2 细胞固定感染单层上测定利巴韦林对呼吸道合胞病毒的抗病毒活性, 并与传统的菌斑减少法(plaque reduction assay, PRA)进行比较。EIA 和 PRA 分别在 3.4 mg·L⁻¹ 和 5.9 mg·L⁻¹ 的药物下观察到病毒复制减少了 50%。该方法操作简单, 重现性好, 有客观的终点。此外, EIA 比 PRA 更具优势, 因为它可以更快地得到结果, 并且可以在不影响敏感度数据的情况下使用更广泛的接种量范围, 非常适用于大量临床分离菌的快速准确检测^[37]。

2.4 分光光度法

利巴韦林与达卡他韦、索非他韦和索拉非尼

联用常用于治疗由丙型肝炎病毒感染引起的肝细胞癌。由于这些化合物具有药物治疗作用, 因此测定它们是必要的。Hassan 等^[38]开发了一个基于单因素和多因素校正技术的紫外分光光度法同时测定它们的含量: 由于利巴韦林、达卡他韦、索非他韦和索拉非尼的光谱重叠, 采用单变量扩展导数比(EDR)法、多元偏最小二乘(PLS)法和 PCR 建立校正曲线。分别在 215.0, 310.5, 240.3, 284.5 nm 测定利巴韦林、达卡他韦、索非他韦和索拉非尼, 线性范围分别为 6~42 μg·mL⁻¹, 4~16 μg·mL⁻¹, 10~70 μg·mL⁻¹, 3~9 μg·mL⁻¹, 相关系数(r^2)分别为 0.999 7, 0.999 9, 0.999 9 和 0.999 7, 分别建立了测定利巴韦林、达卡他韦、索非他韦和索拉非尼的 PLS 和 PCR 模型。该方法可有效地应用于纯药物制剂和人血、尿中, 将所得结果与官方和报道方法进行比较, 结果无显著性差异。Hassan 等^[39]根据国际协调人用药品注册技术要求会议(ICH)指南, 开发并验证了基于分光光度法的联合用药时利巴韦林、索非他韦和达卡拉韦测定, 3 个药物在 6~42 μg·mL⁻¹, 10~70 μg·mL⁻¹ 和 4~16 μg·mL⁻¹ 内线性良好。该方法已成功地应用于药物、人尿和人血浆。该方法是, 无需预分离的同时测定二/三元混合体系的非常简单的方法, 所得结果与其他方法的准确度和精密度无显著性差异

($P=0.05$)^[39]。

3 小结

近年来, 针对血浆等生物样本中洛匹那韦、利托那韦和利巴韦林的分析方法研究较多, 其中以 HPLC 及 LC-MS 为主。临床上, 由于本次 COVID-19 感染的用药是基于经验开展的, 因此, 有必要借鉴现有的临床药物分析方法, 开展这 3 个药物的 TDM, 可以在获得良好疗效的同时避免或减轻不良反应, 同时为药物不良反应的诊断和处理提供参考, 以提高临床合理用药的水平。

REFERENCES

- [1] LI L, CHEN N, KONG L, et al. Antiviral therapeutics for 2019 novel coronavirus infection in special populations [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2020, 37(3): 257-263.
- [2] KUMAR K V, SUDHAKAR M, REDDY Y P, et al. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in dosage form and in plasma [J]. *Dig J Nanomater Bios*, 2010, 5(3): 771-778.
- [3] YAO Y M, JIA X F, MA F, et al. Determination of lopinavir in human plasma by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(6): 463-466.
- [4] SANGSHETTI J N, BHOJANES, DESHPANDE M, et al. Use of systematic approach for development of RP-HPLC method for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir [J]. *Anal Chem Let*, 2014, 4(2): 123-131.
- [5] HU Y R, LIU X Y, A Y M, et al. RP-HPLC determination of ritonavir concentration in plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(10): 1434-1436.
- [6] 寇惠娟, 叶敏, 付强, 等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度[J]. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42(4): 326-332.
- [7] ILLAMOLA S M, LABAT L, BENABOUD S, et al. Determination of total and unbound concentrations of lopinavir in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 965: 216-223.
- [8] 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*(药理学学报), 2010, 45(2): 279-282.
- [9] ZHOU S R, LI Y Q, MO Y Q, et al. LC-MS/MS method for simultaneous quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2011, 28(7): 661-665.
- [10] DAMARAMADUGU R, INAMADUGU J, RAVI KANNETI, et al. Simultaneous determination of ritonavir and lopinavir in human plasma after protein precipitation and LC-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(9): 815-824.
- [11] CHU L X, WU Y, DUAN C L, et al. Simultaneous quantitation of zidovudine, efavirenz, lopinavir and ritonavir in human hair by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2018(1097/1098): 54-63.
- [12] SHI M H, LI J, GAN H, et al. Development of LC-MS/MS method for rapid quantification of lopinavir/ritonavir(Kaletra) in human plasma [J]. *J Int Pharm Res*(国际药理学研究杂志), 2016, 43(1): 162-166.
- [13] YADAV M, RAO R, KURANI H, et al. Application of a rapid and selective method for the simultaneous determination of protease inhibitors, lopinavir and ritonavir in human plasma by UPLC-ESI-MS/MS for bioequivalence study in Indian subjects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 1115-1122.
- [14] MISHRA T D, KURANI H, SINGHAL P, et al. Simultaneous quantitation of HIV-protease inhibitors ritonavir, lopinavir and indinavir in human plasma by UPLC-ESI-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2012, 50(7): 625-635.
- [15] DJERADA Z, FELIU C, TOURNOIS C, et al. Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013(86): 100-111.
- [16] MARZINKE M A, BREAUD A, PARSONS T L, et al. The development and validation of a method using high-resolution mass spectrometry(HRMS) for the qualitative detection of antiretroviral agents in human blood [J]. *Clin Chim Acta*, 2014(433): 157-168.
- [17] NOTARI S, MANCONE C, TRIPODI M, et al. Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 833(1): 109-116.
- [18] VAN KAMPEN J J A, BURGERS P C, DE GROOT R, et al. Quantitative analysis of HIV-1 protease inhibitors in cell lysates using MALDI-FTICR mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(10): 3751-3756.
- [19] SULEBHAVIKAR A V, PAWAR U D. HPTLC method for simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in capsule dosage form [J]. *J Chem*, 2008, 5(4): 706-712.
- [20] PHECHKRAJANG C M, THIN E E, SRATTHAPHUT L, et al. Chemometrics-assisted UV spectrophotometric method for determination of lopinavir and ritonavir in syrup [J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4(Suppl 1): 492-496.
- [21] NAGULWAR V P, BHUSARI K P. Simultaneous estimation of ritonavir and lopinavir by absorption ratio(Q-analysis) UV spectrophotometric method in combined tablet dosage form [J]. *Der Pharm Let*, 2010, 2(1): 196-200.
- [22] LOREGIAN A, SCARPA M C, SILVANA PAGNI, et al. Measurement of ribavirin and evaluation of its stability in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 856(1): 358-364.
- [23] WANG M, MA P, XI X N, et al. Online solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometric determination of nucleoside drugs in plasma [J]. *Talanta*, 2016(161): 278-287.
- [24] SVENSSON J O, BRUCHFELD A, SCHVARCZ R, et al. Determination of ribavirin in serum using highly selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *Ther Drug Monit*, 2000, 22(2): 215-218.
- [25] D'AVOLIO A, IBAÑEZ A, SCIANDRA M, et al. Validation of liquid/liquid extraction method coupled with HPLC-UV for measurement of ribavirin plasma levels in HCV-positive patients [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 835(1): 127-130.
- [26] ZHANG C, MEI Q H, LU Q H, et al. Quantitative determination of amikacin dexamethasone and ribavirin in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2020 March, Vol.37 No.6

- 2016, 51(11): 920-924.
- [27] SHARAF EL-DIN M, EID M, TALAAT W. Micellar liquid chromatographic determination of ribavirin, silybin, interferon α 2a, lamivudine, and ursodeoxycholic acid in dosage forms and biological fluids [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2014, 37(13): 1785-1804.
- [28] D'AVOLIO A, DE NICOLÒ A, SIMIELE M, et al. Development and validation of a useful HPLC-UV method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in blood and erythrocytes of HCV+ patients [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66: 376-380.
- [29] AGNESOD D, DE NICOLÒ A, SIMIELE M, et al. Development and validation of a useful UPLC-MS/MS method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in peripheral blood mononuclear cells of HCV+ patients [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90: 119-126.
- [30] MELÉNDEZ M, ROSARIO O, ZAYAS B, et al. HPLC-MS/MS method for the intracellular determination of ribavirin monophosphate and ribavirin triphosphate in CEM ss cells [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1233-1240.
- [31] CLEMENS R K, AMANN-VESTI B R, THALHAMMER C. Influence of pre-analytical conditions on plasma ribavirin concentrations [J]. *Arzneimittelforschung*, 2010, 60(10): 636-639.
- [32] YOUSSEF A A, MAGDY N, HUSSEIN L A, et al. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination of ribavirin, sofosbuvir and daclatasvir in human plasma: a treatment protocol administered to HCV patients in Egypt [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(7): 636-643.
- [33] VAN DER LIJKE H, ALFFENAAR J-W C, KOK W T, et al. Determination of ribavirin in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012(88): 385-390.
- [34] WILSON Z S, ZHI B H, THOMAS A, et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry(LC/MS/MS) method for the determination of ribavirin in human plasma and serum [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 29(1/2): 83-94.
- [35] BREADMORE M C, THEURILLAT R, THORMANN W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(10/11): 1615-1622.
- [36] AUSTIN R K, TREFTS P E, HINTZ M, et al. Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 1983, 24(5): 696-701.
- [37] KANG J O, PAI C H. In situ enzyme immunoassay for antiviral susceptibility testing of respiratory syncytial virus [J]. *Am J Clin Pathol*, 1989, 91(3): 323-326.
- [38] ZIDAN D W, HASSAN W S, ELMASRY M S, et al. Novel spectrophotometric and factor-based multivariate calibration-prediction techniques for determination of two inhibitors of hepatitis C-virus and hepatocellular carcinoma in pure, human urine, and human plasma [J]. *Spectrochim Acta A*, 2019(213): 288-300.
- [39] HASSAN W S, ELMASRY M S, ELSAYED H M, et al. Comparative study of six sequential spectrophotometric methods for quantification and separation of ribavirin, sofosbuvir and daclatasvir: An application on Laboratory prepared mixture, pharmaceutical preparations, spiked human urine, spiked human plasma, and dissolution test [J]. *Spectrochim Acta A*, 2018, 202: 159-173.

收稿日期: 2020-02-18
(本文责编: 李艳芳)