

高效液相二极管阵列检测法测定人血浆中伏立康唑和 *N*-氧化伏立康唑浓度及其对儿童白血病的用药指导

罗兴献, 黄琳, 李泰锋, 胡蕾, 刘雪梅, 薛学财, 张海英, 陈月, 冯婉玉* (北京大学人民医院药剂科, 北京 100044)

摘要:目的 建立同时测定伏立康唑及其主要代谢物 *N*-氧化伏立康唑血药浓度方法,并用于监测 2~12 岁儿童白血病中伏立康唑和 *N*-氧化伏立康唑的血药浓度。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈、甲醇与醋酸铵缓冲液(10 mmol·L⁻¹,用醋酸调节 pH 值至 3.0)=27:23:50,流速为 1 mL·min⁻¹,波长为 262 nm。以卡马西平为内标,样品处理采用乙酸乙酯液液萃取。结果 伏立康唑和 *N*-氧化伏立康唑的血浆浓度在 0.1~8.0 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性,定量下限均为 0.1 μg·mL⁻¹,批内、批间精密度(RSD)均在 3%~10% 以内。准确度和方法回收率均符合要求。此次监测 29 例儿童白血病患者,共 100 个血样。伏立康唑浓度、*N*-氧化伏立康唑及 *N*-氧化伏立康唑与伏立康唑的比值中位数分别为 0.87 μg·mL⁻¹ (IQR, 0.32~1.65 μg·mL⁻¹)、1.15 μg·mL⁻¹ (IQR, 0.55~1.67 μg·mL⁻¹) 和 1.10 (IQR, 0.66~1.22)。伏立康唑浓度与 *N*-氧化伏立康唑浓度存在相关性($r=0.603$ 1, $P<0.000$ 1)。结论 本方法操作简单、准确、专属性高,满足临床同时监测伏立康唑和 *N*-氧化伏立康唑浓度,可用于伏立康唑药动学研究及临床上治疗药物监测。

关键词:伏立康唑;*N*-氧化伏立康唑;高效液相二极管阵列检测;儿童白血病;治疗药物监测

doi:10.11669/cpj.2019.14.009 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)14-1169-07

High Performance Liquid Chromatography Coupling with Photo-diode Array Detector Method for Monitoring Voriconazole and Its Main Metabolite *N*-oxidized Voriconazole and Its Application to Medication Guidance for Childhood Leukemia

LUO Xing-xian, HUANG Lin, LI Tai-feng, HU Lei, LIU Xue-mei, XUE Xue-cai, ZHANG Hai-ying, CHEN Yue, FENG Wan-yu* (Department of Pharmacy, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of voriconazole and its main metabolite *N*-oxidized voriconazole in blood, and monitor the levels of voriconazole and *N*-oxidized voriconazole in leukemia children aged 2-12 years.

METHODS Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the mobile phase was acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer (10 mmol·L⁻¹, pH adjusted with acetic acid to 3.0)=27:23:50, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the wavelength was set at 262 nm. The sample was extracted with ethyl acetate. Carbamazepine was used as the internal standard.

RESULTS The calibration curves of voriconazole and *N*-oxidized voriconazole were linear in the range of 0.1-8.0 μg·mL⁻¹, the lower limit of quantitation was 0.1 μg·mL⁻¹, and the intra-assay and inter-assay precision RSDs were between 2% and 10%. The accuracy, method recovery and stability all met the requirements. Twenty-nine patients were monitored with a total of 100 blood samples. The medians (IQRs) of voriconazole concentration, *N*-oxidized voriconazole concentration, and ratio of *N*-oxidized voriconazole to voriconazole were 0.87 μg·mL⁻¹ (0.32-1.65 μg·mL⁻¹) and 1.15 μg·mL⁻¹ (0.55-1.67 μg·mL⁻¹) and 1.10 (0.66-1.22), respectively. There was a correlation relationship between the concentrations of voriconazole and *N*-oxidized voriconazole ($r=0.603$ 1, $P<0.000$ 1).

CONCLUSION The method is simple, accurate, highly specific, and can simultaneously monitor the concentrations of voriconazole and *N*-oxidized voriconazole, thus can be used for the pharmacokinetic research of voriconazole and clinical drug monitoring.

KEY WORDS: voriconazole; *N*-oxidized voriconazole; HPLC-PDA; childhood leukemia; therapeutic drug monitoring

伏立康唑(voriconazole, VRCZ)是一种广谱三唑类抗真菌药,通过抑制真菌中细胞色素 P450 介导的 14α-甾醇去甲基化而抑制麦角甾醇的生物合成,广

泛用于侵袭性曲霉菌病、非中性粒细胞减少患者中的念珠菌血症及现有抗真菌药敏感性较低的菌属等感染^[1-2]。然而,由于 VRCZ 在人体内代谢具有饱和

作者简介:罗兴献,男,硕士,药师 研究方向:临床药学 *通讯作者:冯婉玉,女,博士,主任药师 研究方向:个体化给药和临床药理学研究 Tel:(010)88325525 E-mail:renminyaojike@sina.com

性和自身剂量依赖性抑制代谢酶,其药动学呈非线性变化,在不同的个体间和个体内呈显著的差异^[3]。有研究表明,VRCZ 的稳态血药浓度与临床疗效和安全性密切相关^[4-6]。最近有相关文献推荐维持 VRCZ 稳态血药浓度范围在 1~5.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内可显著提高临床疗效^[7]。当 VRCZ 稳态血药浓度大于 5.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其不良反应发生率也明显增加^[8]。因此,常规监测 VRCZ 稳态血药浓度具有重要的临床价值。

VRCZ 主要代谢产物为 *N*-氧化 VRCZ (*N*-oxidized voriconazole, VNO),在血浆中约占 72%,结构式见图 1。VNO 的生成主要经过人肝脏细胞色素 (CYP)2C19, CYP3A4 及含黄素单氧化酶 (flavin-containing mono-oxygenase, FMO) 生成^[9-10]。有研究表明,VNO 可抑制 CYP2C19 和 CYP3A4 酶的活性,这可能间接导致 VRCZ 疗效的差异^[11]。最近,有多项研究通过测定 VNO 生成比值 (metabolic rate, MR) 来研究炎症与 VRCZ 浓度之间的关系^[12-14]。Yan 等^[15]通过 MR 来评估质子泵抑制剂对伏立康唑代谢的影响。此外,Niioka 等^[16]证明 MR 还可用于评估患者 CYP2C19 酶的代谢类型。因此,同时测定 VRCZ 和 VNO 的血药浓度,可用于研究 VRCZ 的个体化差异机制、药物相互作用以及药物基因多态性等探讨,具有重要的临床运用价值。

目前关于同时测定人血浆中 VRCZ 和 VNO 浓度的高效液相方法学文献报道较少^[17-19]。此次试验旨在建立简便、准确、专属性高,能同时测定 VRCZ 及其主要代谢物 VNO 浓度的高效液相色谱法,并用于儿童白血病患者血药浓度监测,探讨儿童 (2~12 岁) 患者中 VRCZ、VNO 的浓度及 MR 之间的关系等,为优化 VRCZ 剂量和制定 VRCZ 个体化治疗提供理论依据。

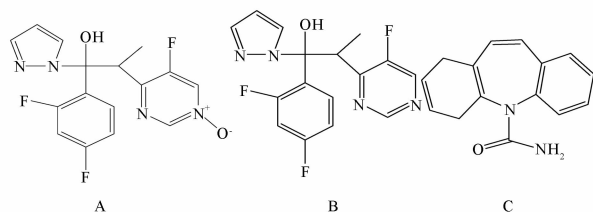


图 1 *N*-氧化 VRCZ (VNO), 伏立康唑 (VRCZ) 和内标卡马西平结构式

A - *N*-氧化伏立康唑; B - 伏立康唑; C - 卡马西平

Fig. 1 The structures of VNO, VRCZ and internal standard carbamazepine

A - VNO; B - VRCZ; C - carbamazepine

1 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (2695, Waters 公司); PDA-紫外检测器 (2998, Waters 公司); Empower 数据处理系统 (Waters 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水机。

1.2 药品与试剂

卡马西平对照品 (批号: 100142-201105, 中国食品药品检定研究院); VRCZ 对照品 (批号: 100862-201402, 中国食品药品检定研究院); VNO 对照品 (批号: 7-DPM-64-3, Toronto Research Chemicals 公司, 加拿大)。甲醇、乙腈为色谱纯。其他试剂均为分析纯。水为双蒸去离子纯净水。空白血浆来自健康受试者。

1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈、甲醇与醋酸铵缓冲液 (10 mmol · L⁻¹, 用醋酸调节 pH 值至 3.0) 比例为 27: 23: 50; 检测波长: 262 nm; 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温: 35.0 °C; 进样量: 20 μL 。

1.4 混合标准品储备液和内标液配制

分别称取 VRCZ 10 mg 和 VNO 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度, 获得质量浓度均为 1 mg · mL⁻¹ 混合储备液。准确称取卡马西平 10 mg, 并置于 10 mL 量瓶中, 同样用甲醇稀释至刻度, 获得质量浓度为 1 mg · L⁻¹ 储备液。将 VRCZ、VNO 和卡马西平储备液分装成若干份, 置于 -80 °C 冷冻保存。

1.5 标准曲线和质控样品配制

准确吸取空白血浆 180 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入混合储备液 20 μL 。采用空白血浆进行等比稀释, 配制标准曲线点为: 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另取 180 μL 空白血浆, 加入适量混合储备液, 配置低、中、高质控分别为 0.3, 1, 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.6 血浆样品处理

精密吸取血浆 200 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μL 内标液 (卡马西平 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入 1 mL 乙酸乙酯, 涡旋 5 min, 13 400 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取有机层 900 μL , 氮吹 10 min, 流动相 100 μL 复溶, 离心、取上清 20 μL 进样分析。

2 方法与结果

2.1 方法专属性

空白血浆、混合标准品及内标的空白血浆和患

者服用 VRCZ 达稳态时血样按“1.5”项下方法处理,结果见图 2,表明血浆内源性物质不干扰待测物。VNO, VRCZ 和内标出峰时间分别为 5.34、11.72 和 7.73 min。

2.2 标准曲线和定量限

按“1.5”和“1.6”项下方法处理样品和进样分析。以 VRCZ 或 VNO 浓度为横坐标(ρ),其峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i)之比为纵坐标(Y),权重系数为 $1/\rho^2$,进行线性回归。结果表明,VRCZ 和 VNO 在浓度 $0.1 \sim 8.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的线性关系,其线性回归方程分别为 $Y = 0.6715\rho - 0.0905$ ($r = 0.992$) 和 $Y = 1.8942\rho - 0.24$ ($r = 0.998$)。

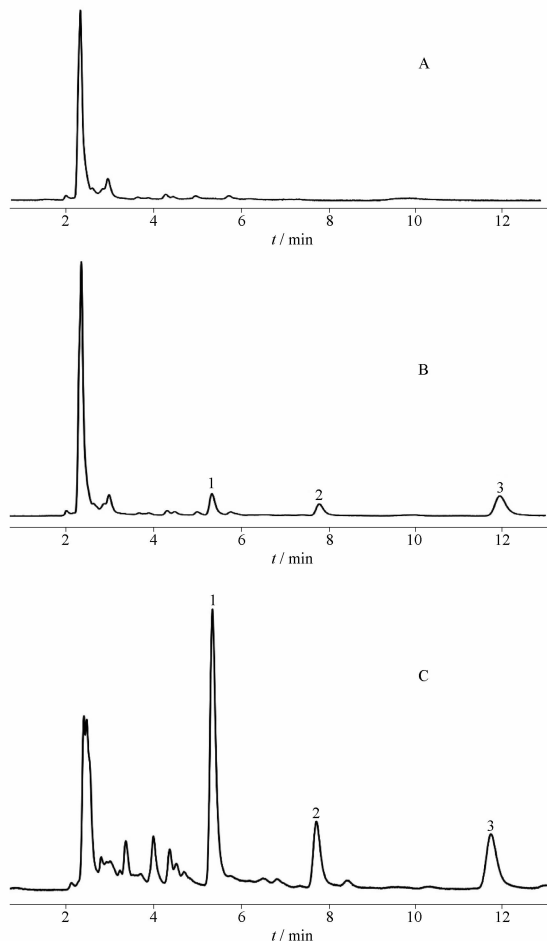


图2 血浆中 VRCZ 和 VNO 色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆 + VRCZ ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + VNO ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + 内标 ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C - 患者口服 VRCZ ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 第 12 个剂量后收集的血浆样品; 1 - VNO; 2 - 内标; 3 - VRCZ

Fig. 2 Chromatograms of VRCZ and VNO in plasma

A - blank plasma; B - blank plasma spiked with VRCZ ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and VNO ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + internal standard ($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C - plasma samples collected after oral administration of VRCZ ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 12 doses; 1 - VNO; 2 - internal standard; 3 - VRCZ

2.3 准确度和精密度

分别配制 VRCZ 和 VNO 最低定量浓度 (lower-limit of quantification, LLOQ)、低、中、高质控样品,每个浓度各进行 5 份样品进行分析,按“1.5”项下方法处理,并按“1.6”项下方法进样分析,连续测定 3 d,计算批间和批内变异。结果表明,精密度和准确度均符合要求,结果表 1。

2.4 提取回收率

配制 VRCZ 和 VNO 低、中、高质控样品,每个浓度各进行 5 份样品,按“1.5”项下方法处理。另取空白血浆,按“1.5”项下方法处理样品,取上清液后加入内标及相同浓度的 VRCZ 和 VNO 低、中、高质控样品,每个浓度平行 5 份样品进行检测。结果表明,低、中、高浓度的 VRCZ 和 VNO 提取回收率均大于 70%,满足生物样本分析的要求。

2.5 稳定性

配制 VRCZ 和 VNO 低、中、高质控样品,每个浓度平行 5 份, -80°C 冻存 28 d、反复冻融 3 次、 4°C 保存 7 d 情况下稳定 ($\text{RSD} < 9\%$)。配制混合标准储备液和内标各 5 份,室温放置 5 和 24 h,结果表明,VRCZ 浓度稳定 ($\text{RSD} < 5\%$)。而 VNO 室温放置 5 h 稳定,但 24 h 后低、中、高 VNO 浓度降解均超过 20%。

2.6 药物干扰性实验

患者服用 VRCZ 常与其他药物合用,包括质子泵抑制剂,抗菌类药物、免疫抑制剂等药物,可能对 VRCZ 和 VNO 产生干扰。因此,此次实验考察了相关药物对 VRCZ 及 VNO 测定的影响,具体药物见表 2。配制适当的浓度,按“1.6”项下方法处理血浆样品,按“1.3”项下色谱条件进样分析。结果表明,这些药物尚未观察到对 VRCZ 和 VNO 产生干扰。

表 1 VRCZ 和 VNO 准确度和精密度. $n = 5$

Tab. 1 Accuracy and precision for the determination of VRCZ and VNO. $n = 5$

Analyte	ρ (nominal) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Accuracy /%	Within-day (RSD)/%	Between-day (RSD)/%
VRCZ	0.10	90.23	6.32	8.35
	0.30	92.12	4.21	6.32
	1.00	94.23	5.52	8.23
	6.00	103.40	3.45	9.14
VNO	0.10	93.32	8.12	9.23
	0.30	93.42	6.21	7.21
	1.00	103.32	4.31	7.31
	6.00	105.34	5.23	6.29

表2 药物干扰性测试

Tab.2 Drug interference test

Imipenem	Itraconazole	Ciclosporin	Omeprazole	Imatinib
Meropenem	Fluconazole	Tacrolimus	Pantoprazole	Dasatinib
Cefazolin	Posaconazole	Hydroxy chloroquine	Lansoprazole	Nilotinib
Cefuroxime	Ketoconazole	Loxoprofen	Rabeprazole	
Metronidazole	Berberine	Diclofenac	Llaprazole	
Ornidazole	Bortezomib	Midazolam	Flurbiprofen	
Tinidazole	Vincristine	Phenytoin	Methotrexate	

2.7 临床运用

本试验通过北京大学人民医院伦理委员会审批,所有儿童患者于实验前签署知情同意书。此次纳入患者的标准为:①2~12岁儿童白血病患者;②患者以 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服或注射伏立康唑10次后采集患者晨起空腹血,血药浓度已达稳态血药浓度^[20]。收集患者静脉血2~3 mL于含EDTA的离心管,3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后,收集上清液,并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待测。

结果纳入29例儿童患者,共监测100例次。所有患者均合用免疫制剂环孢素。有部分患者合用糖皮质激素(18/29)和泮托拉唑(6/29),信息见表3。测定结果表明,VRCZ浓度呈明显差异,数值为小于 $0.1\sim14.46\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间(中位数浓度: $0.87\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;平均浓度: $1.63\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;四分位距: $0.32\sim1.65\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),其代谢物VNO浓度在 $0.1\sim4.98\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间(中位数浓度: $1.15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;平均浓度: $1.18\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;四分位距: $0.55\sim1.67\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。由VRCZ与VNO的比值可得MR值在 $0.03\sim5.73$ 之间(平均值:1.62;中位数:1.10;四分位距: $0.66\sim2.22$)。此次监测的血样中共有38例次的VRCZ稳态血药浓度达到 $1\sim5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,约占38%,其MR值中位数为0.99。有63%的血样VRCZ浓度小于 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,测得MR中位数值为1.90。还有7个血样VRCZ浓度超过 $5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,其MR中位数值为0.30。MR值在VRCZ不同浓度范围内呈显著差异,见图3。VNO浓度与VRCZ的浓度呈一定的相关性($r=0.61,P<0.0001$),见图4。

2.8 统计分析

采用SPSS20.0对VRCZ与VNO进行Spearman相关性分析。根据VRCZ稳态谷浓度,将VRCZ分成3组,分别为低浓度组($<1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,L组)、中浓度组($1\sim5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,M组)和高浓度组($>5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,H组)。通过Mann-Whitney U检验来比较各组中的MR值有无统计学差异。 $P<0.05$ 表明具有统计学意义。

表3 患者基本信息

Tab.3 Patient characteristics

Characteristic	Values (IQR, $n=29$)
Age	
Median (range)	7(4-10)
Sex	
Male/female	20/9
Body weight (kg)	22.5(13.0-41.5)
Administration purpose	
Prophylaxis	23
Empirical therapy	6
Underlying disease	
Aplastic anemia	12
Acute lymphoblastic leukemia	14
Others	4
Administration route	
Intravenous administration	48
Peroral administration	52
Laboratory test	
$\rho(\text{VRCZ})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.87(0.32-1.65)
$\rho(\text{VNO})/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1/}$	1.15(0.55-1.67)
$\text{ALT}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1/}$	32(17-63)
$\text{AST}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	37(24-47)
$c(\text{TB})/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	8(5.85-11.95)
$c(\text{DB})/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.8(2.0-4.3)
$c(\text{SCR})/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	21(17.5-26.5)
$c(\text{BUN})/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.82(3.37-6.43)

注:ALT-丙氨酸转氨酶;AST-天门冬氨酸转氨酶;TB-总胆红素;DB-直接胆红素;SCR-血肌酐;BUN-尿素氮;IQR-四分位距

Note: ALT-alanine transferase;AST-aspartate amino transferase;TB-total bilirubin;DB-direct bilirubin;SCR-serum creatinine;BUN-blood urea nitrogen;IQR-interquartile range

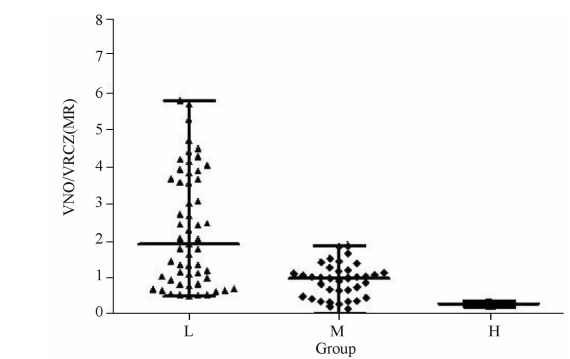


图3 不同组中VNO/VRCZ(MR)比值

L组-VRCZ $<1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=55$;M组- $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\leq\text{VRCZ}\leq5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=38$;H组-VRCZ $>5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=7$; $P<0.001$, LVSM, LVSH

Fig.3 VNO/VRCZ ratios in different groups

Group L-VRCZ $<1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=55$; Group M- $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\leq\text{VRCZ}\leq5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=38$; Group H-VRCZ $>5.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=7$; $P<0.001$, LVSM, LVSH

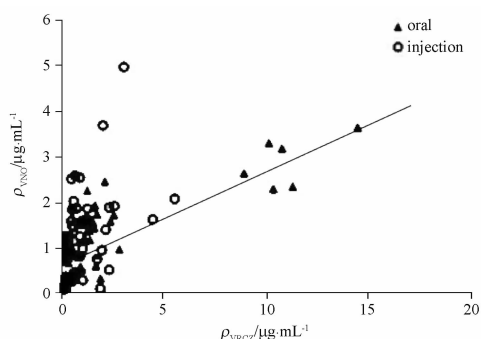


图4 VRCZ和VNO浓度之间的相关性

$n=100$; Spearman 相关系数: $r=0.6031$, $P<0.0001$

Fig. 4 Correlation between VRCZ and VNO concentrations

$n=100$; Spearman correlation coefficient: $r=0.6031$, $P<0.0001$

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

目前,大部分方法学主要集中于检测VRCZ的浓度。本室曾开发反相高效液相色谱法对VRCZ浓度进行监测,但未对VNO进行测定^[21]。基于该经验,我们初期选用流动相同样为乙腈-醋酸铵缓冲液(27:73, V/V)。结果表明,含VNO空白血浆的出峰时间在6.5 min,与空白血浆内源性未发生干扰。然而,采用患者实际血样进行分析时,发现出峰时间为6.5 min色谱峰峰面积远大于VRCZ的峰面积,因此推测该色谱峰可能并非是VNO。为进一步鉴定该峰是否为VNO,采用全波长扫描,发现该峰最大波长与含VNO的空白血样并不相符,因此推断VNO出峰时间可能与患者服用其他药物出峰时间发生了重叠。对乙腈的比例进行调整,均无法使从该色谱峰分离出来。参考以往文献,本室在流动相中调整一定比例的甲醇,当乙腈-甲醇-缓冲盐的比例为27:23:50时,VNO与其他物质互不干扰,并用PDA检测器对该组分进行波长扫描,证明其最大吸收波长为267 nm,进一步确认了该峰为VNO。对流动相在波长200~400 nm内进行扫描,VRCZ和VNO最大吸收波长分别为256和267 nm。通过调节不同的波长,观察基线及色谱峰的变化,确定最终的检测波长为262 nm,可得到较好的基线和峰型,且能满足定量下限要求。

有国外学者报道LC-MS^[22]测定VRCZ和VNO的血药浓度。然而,由于LC-MS仪器较为昂贵,所需成本较高,不利于VRCZ浓度监测常规的开展。Céline等^[17]报道采用HPLC同时测定VRCZ和VNO的血药浓度,但该方法中未采用内标且定量下限较高,不适用于VRCZ药动学研究。Yamada

等^[18]报道HPLC快速测定VRCZ和VNO浓度,然而该方法中的柱温高达60℃,流速较快,不利于柱子的长期使用。最近有文献^[19]报道通过梯度洗脱方法测定VRCZ和VNO浓度。与等度洗脱相比,梯度洗脱操作更为复杂且基线漂移等,不利于准确定量VRCZ和VNO浓度。本次实验通过建立HPLC-PDA,以等度洗脱的方式同时监测VRCZ和VNO浓度,具有简单、准确且专属性强,易于开展临床血药浓度常规监测。

以往有文献采用流动相为乙腈-水^[17,19],乙腈-甲醇-磷酸盐缓冲液^[18]。采用醋酸铵缓冲盐可有效的减少仪器及色谱柱的损害,并能保证待测物保留时间的稳定。调节醋酸铵缓冲盐PH值至3.0,可明显缩短VRCZ和VNO保留时间。基于以往经验,本方法采用卡马西平为内标,其保留时间刚好位于VNO和VRCZ之间,分离度较好,且不易受血浆内源性干扰,适用于VRCZ和VNO的测定。有文献采用VRCZ衍生物为内标,但VRCZ衍生物需要人工合成,不易获取,通常只在生产企业内部使用。其他抗真菌药如酮康唑、伊曲康唑和泊沙康唑等的保留时间均超过VRCZ,因此也不适用于该方法的内标。稳定性考察表明,VNO放置室温24 h后出现较大程度的降解,提示临床收集患者血样时应及时保存在-4℃或-80℃冰箱。

3.2 VRCZ的治疗药物监测

本次测得儿童白血病患者中的VRCZ稳态血药浓度呈较大差异,且有超过一半的患者未达到VRCZ有效治疗范围内(1~5.5 μg·mL⁻¹),与以往报道相似^[23]。造成VRCZ未达到有效治疗浓度范围的原因可能与VRCZ的剂量、CYP2C19基因多态性、药物相互作用等密切相关。以往文献^[24]表明儿童患者以VRCZ维持剂量为5~7 mg·kg⁻¹给药比以3~5 mg·kg⁻¹更能达到有效治疗范围(1~5.5 μg·mL⁻¹),提示临床可适当提高剂量来增加VRCZ的浓度。此次纳入患儿中VRCZ的平均维持剂量较低,可能由于此次纳入大部分患者使用VRCZ主要目的是为了预防真菌感染用药。Bartelink等^[23]报道只有1/3的患儿达到初次VRCZ稳态浓度为1~5 μg·mL⁻¹。同样,Bruggemann等^[25]报道有44%的患儿中VRCZ浓度小于1 μg·mL⁻¹。这些结果均表明监测儿童患者中的VRCZ浓度具有一定的必要性。

3.3 VNO的治疗药物监测

VNO浓度在不同个体间同样存在明显差异。

此次测得儿童的 VNO 浓度范围在 $0.1 \sim 4.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,中位数值为 $1.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且与 VRCZ 的浓度具有一定的相关性($r=0.61$, $P<0.0001$)。然而,Eiden 等^[26]报道患者中测得 VNO 浓度的中位数浓度 $2.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1.6 \sim 3.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),要比本次测得 VNO 浓度高。可能原因与此次监测的人群不同。本次实验纳入人群为儿童患者,而 Eiden 等^[27]纳入的成年人患者。另外,造成 VNO 的差异可能与种族、遗传密切相关。有研究显示亚洲人群比白种人有更高比例的 CYP2C19 慢代谢患者。Barter 等^[28]报道白种人 CYP2C19 慢代谢发生频率为 2.4%,而中国人群可高达 13%。有学者提出在 VRCZ 浓度低于检测线的条件下,可通过监测 VNO 的值可判断患者的依从性^[15]。此次试验我们也发现有 3 例患者的 VCRZ 浓度低于定量下线,但仍然可测到 VNO 浓度。因此,通过监测 VNO 浓度更适用于患者依从性研究,尤其对于 CYP2C19 快代谢型患者。

3.4 MR 值的临床运用

MR 值的变化意味 VRCZ 代谢的变化。此次试验发现患者 VRCZ 中浓度组 ($1 \sim 5.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 MR 值中位数要显著高于 VRCZ 高浓度组 ($>5.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),而小于 VRCZ 低浓度组 ($<1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),表明 MR 值有望作为一个新指标用于评价 VRCZ 的疗效。通常,在同一个患者内如果 MR 值出现比较大的波动,可能与 VNO 代谢途径密切相关。影响 CYP2C19 酶活性的药物均可能影响 MR 值的变化。以往有研究表明,部分质子泵抑制剂和激素可影响 VRCZ 代谢的变化,因此 MR 值的变化也可用于药物相互作用研究^[15,29]。然而,此次试验尚未观察到糖皮质激素和泮托拉唑对 VRCZ 的代谢有影响。其可能原因为此次纳入的人群为儿童患者。与成人相比,儿童对药物的代谢快,可能掩盖了药物相互作用所带来的影响。不同个体间 MR 值的变化还与遗传多态性(如 CYP2C19)等因素密切相关。Niioka 等^[16]探讨 CYP2C19 基因多态性和 MR 值的关系,发现 MR 值可作为一个指标来评价 CYP2C19 的代谢类型。此次研究不足包括儿童患者纳入人数不足,可能对此结果造成偏倚。因此仍需扩大患者样本量,通过前瞻性临床试验来进一步研究 VRCZ 及 VNO 浓度在不同个体间的差异。

此次建立 HPLC-PDA 同时测 VRCZ 和 VNO 浓度方法学,具有简单、准确、专属性高等优点,适合用

于临床常规监测 VRCZ 和 VNO 的浓度。我们也将该方法学用于临床监测 VRCZ 和 VNO 血药浓度,并首次报道中国 2~12 岁儿童人群中 VNO 稳态血药浓度及其 MR 值的分布。同时监测 VRCZ、VNO 及其 MR 值可用于评价患者体内 VRCZ 的代谢的差异、药物相互作用、疗效评价以及用于群体药动学等,为患者制定更加合理的个体化治疗提供新的思路。

REFERENCES

- [1] MARKS D I, LIU Q, SLAVIN M. Voriconazole for prophylaxis of invasive fungal infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2017, 15(5): 493-502.
- [2] SCOTT L J, SIMPSON D. Voriconazole; a review of its use in the management of invasive fungal infections[J]. *Drugs*, 2007, 67(2):269-298.
- [3] HOHMANN N, KREUTER R, BLANK A, et al. Autoinhibitory properties of the parent but not of the N-oxide metabolite contribute to infusion rate-dependent voriconazole pharmacokinetics[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(9):1954-1965.
- [4] JIN H, WANG T, FALCIONE B A, et al. Trough concentration of voriconazole and its relationship with efficacy and safety: a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(7):1772-1785.
- [5] UEDA K, NANNYA Y, KUMANO K, et al. Monitoring trough concentration of voriconazole is important to ensure successful antifungal therapy and to avoid hepatic damage in patients with hematological disorders[J]. *Int J Hematol*, 2009, 89(5):592-599.
- [6] WANG T, CHEN S, YOU H, et al. Hepatotoxicity study of voriconazole therapy in patients with invasive fungal infections[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2018, 53(4):290-294.
- [7] HU L, DAI T T, ZOU L, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole in children: experience from a tertiary care center in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(12): Doi: 10.1128/AAC.00955-18.
- [8] KARTHAUS M, LEHRNBECHER T, LIPP H P, et al. Therapeutic drug monitoring in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole in cancer patients--an evidence-based approach[J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(4):547-556.
- [9] HYLAND R, JONES B C, SMITH D A. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(5):540-547.
- [10] YANNI S B, ANNAERT P P, AUGUSTIJNS P, et al. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(6):1119-1125.
- [11] JEU L, PIACENTI F J, LYAKHOVETSKIY A G, et al. Voriconazole[J]. *Clin Ther*, 2003, 25(5):1321-1381.
- [12] ENCALADA VENTURA M A, SPAN L F, VAN DEN HEUVEL E R, et al. Influence of inflammation on voriconazole metabolism[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(5):2942-2943.
- [13] KUNISADA M, YAMANO N, HOSAKA C, et al. Inflammation due to voriconazole-induced photosensitivity enhanced skin photo-

- tumorigenesis in Xpa-knockout mice[J]. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(5):1077-1081.
- [14] VERINGA A, TER AVEST M, SPAN L F, *et al.* Voriconazole metabolism is influenced by severe inflammation: a prospective study[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(1):261-267.
- [15] YAN M, WU Z F, TANG D, *et al.* The impact of proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of voriconazole *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108:60-64.
- [16] NIIOKA T, FUJISHIMA N, ABUMIYA M, *et al.* Relationship between the CYP2C19 phenotype using the voriconazole-to-voriconazole N-oxide plasma concentration ratio and demographic and clinical characteristics of Japanese patients with different CYP2C19 genotypes[J]. *Ther Drug Monit*, 2017, 39(5):514-521.
- [17] CÉLINE E, OLIVIER M, HÉLÈNE P, *et al.* Simultaneous Quantification of Voriconazole and Its N - Oxide Metabolite in Human Plasma by an Easy and Rapid Isocratic LC Method with UV Detection [J]. *Chromatographia*, 2008, 67(3-4):275-280.
- [18] YAMADA T, MINO Y, YAGI T, *et al.* Rapid simultaneous determination of voriconazole and its N-oxide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography method and its clinical application[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(1-2):134-138.
- [19] GOMEZ-LOPEZ A, ALCAZAR-FUOLI L, BERNAL-MARTINEZ L. Simultaneous quantification of systemic azoles and their major metabolites in human serum by HPLC/PDA: role of azole metabolic rate[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 92(1):78-83.
- [20] THEURETZBACHER U, IHLE F, DERENDORF H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2006, 45(7):649-663.
- [21] LUO X X, HUANG L, LI T F, *et al.* Simultaneous detection of concentrations of imatinib and voriconazole in human serum by RP-HPLC[J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2018, 38(1):36-40.
- [22] ROFFEY S J, COLE S, COMBY P, *et al.* UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of imatinib, voriconazole and their metabolites concentrations in rat plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 166:6-12.
- [23] BARTELINK I H, WOLFS T, JONKER M, *et al.* Highly variable plasma concentrations of voriconazole in pediatric hematopoietic stem cell transplantation patients[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(1):235-240.
- [24] LIU L, ZHOU X, WU T, *et al.* Dose optimisation of voriconazole with therapeutic drug monitoring in children: a single-centre experience in China[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(4):483-487.
- [25] BRUGGEMANN R J, VAN DER LINDEN J W, VERWEIJ P E, *et al.* Impact of therapeutic drug monitoring of voriconazole in a pediatric population[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(6):533-534.
- [26] EIDEN C, COCIGLIO M, HILLAIRES-BUYS D, *et al.* Pharmacokinetic variability of voriconazole and N-oxide voriconazole measured as therapeutic drug monitoring[J]. *Xenobiotica*, 2010, 40(10):701-706.
- [27] NARITA A, MURAMATSU H, SAKAGUCHI H, *et al.* Correlation of CYP2C19 phenotype with voriconazole plasma concentration in children[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013, 35(5):e219-223.
- [28] BARTER Z E, TUCKER G T, ROWLAND-YEO K. Differences in cytochrome p450-mediated pharmacokinetics between chinese and caucasian populations predicted by mechanistic physiologically based pharmacokinetic modelling[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52(12):1085-1100.
- [29] NAITO T, YAMADA T, MINO Y, *et al.* Impact of inflammation and concomitant glucocorticoid administration on plasma concentration of triazole antifungals in immunocompromised patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441:127-132.

(收稿日期:2018-11-06)