

## 高效液相色谱法测定环孢素 A 血药浓度

余细勇\* 林曙光 (广东心血管病研究所临床药理学室, 广州 510100)

**摘要** 采用高效液相色谱法测定环孢素A(CsA)的血药浓度。色谱条件: 国产 YWG-C<sub>18</sub> 柱, 流动相为乙腈: 水(80:20, V/V), 流速 1.0 ml/min, 柱温 60℃, 紫外检测波长 214 nm, 内标法定量。结果显示, 简化的血样抽提方法回收率较高, 平均 76.3±1.7%, 最低检测限达 20 μg/L。此法应用于肾移植病人的血药浓度监测, 发现我国人群 CsA 的有效血药浓度范围较大。

**关键词** 高效液相色谱法 环孢素 A 治疗药物监测

环孢素 A (Cyclosporine A, CsA) 是一种有效的免疫抑制剂, 其血药浓度与疗效和毒副作用密切相关, 而且个体差异甚大。因此, 血药浓度监测对维持病人个体的最佳免疫抑制水平至关重要<sup>[1]</sup>。

目前 CsA 的测定方法主要有 RIA、荧光偏振免疫、高效液相色谱法 (HPLC) 等, 不同的测定方法因受其代谢物等因素的干扰, 血药浓度测定水平相差甚远。因此, 美国临床化学协会 CsA 监测小组推荐: (1) CsA 血药浓度监测应采用全血标本; (2) 测定方法应特异性针对母药<sup>[2]</sup>。我们用 HPLC 法特异性测定 CsA 的全血浓度, 并对色谱系统、抽提方法等进行较为系统的研究和改进, 使 CsA 的 HPLC 测定法更臻完善。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 岛津 HPLC 系统, LC-3A 泵, SPD-2A 可变波长紫外检测器, C-R1B 数据处理仪。

1.1.2 试剂 环孢素 A (白色粉末) 和内标环孢素 D (CsD, 白色粉末) 均为福建省微生物研究所提供。乙腈为光谱纯, 水为双蒸水, 其它试剂均为分析纯, 乙醚重蒸后使用。

#### 1.2 色谱条件

YWG-C<sub>18</sub> 柱 (5×150 mm), 流动相: 乙腈—

水 (80:20, V/V), 流速 1.0 ml/min, 柱温 60℃。紫外检测波长 214 nm。数据处理仪参数: 衰减 3, 纸速 2 mm/min。

#### 1.3 标准溶液及标准曲线

精密称取 1 mg CsA 和 3 mg CsD, 以甲醇为溶剂, 用 10 ml 容量瓶分别配制成 100 mg/L CsA 贮备液和 300 mg/L CsD 内标溶液, 贮存于冰箱备用。

取 CsA 贮备液适量, 氮气挥干甲醇后, 加 2 ml 空白全血, 使浓度分别为 50、100、250、500、750、1000 μg/L。按样品处理方法进行抽提, 以 CsA/CsD 峰高比值与 CsA 浓度求算直线回归方程。

#### 1.4 血样采集和样品处理

分别取口服 CsA 后谷浓度或峰浓度时的血样作为常规监测。血样处理过程如下:

取肝素抗凝全血 2 ml, 加内标溶液 20 μl, 加 25 mmol/L NaOH 液 2 ml, 在旋涡混合器上振摇 30 s, 离心, 分为 2 支试管。每管加乙醚 5 ml, 水平振摇 5 min, 离心 2000 rpm, 5 min, 合并有机层, 45℃ 水浴氮气流挥干。挥干试管加 1 ml 甲醇、0.5 ml HCL (25 mmol/L) 和 5 ml 正己烷, 水平振摇 3 min, 离心, 有机层弃去。水相加 0.5 ml NaOH (25 mmol/L) 和 6 ml 乙醚, 水平振摇 5 min, 离心 2000 rpm, 5 min, 有机层于 45℃ 水浴氮气流挥

\* 余细勇, 男, 31岁。1989年毕业于中山医科大学临床药理专业, 获硕士学位, 助理研究员。

于。残渣重溶于60 μl流动相，进样30 μl。

## 2 结果

### 2.1 色谱行为

在本实验条件下，CsA 和内标CsD得到了良好的分离，保留时间分别为6.8和9.0 min。图1为CsA及CsD标准品直接进样的色谱图，分离度R > 1.5；图2A为病人口服CsA后血样的色谱图，图2B为空白血样。

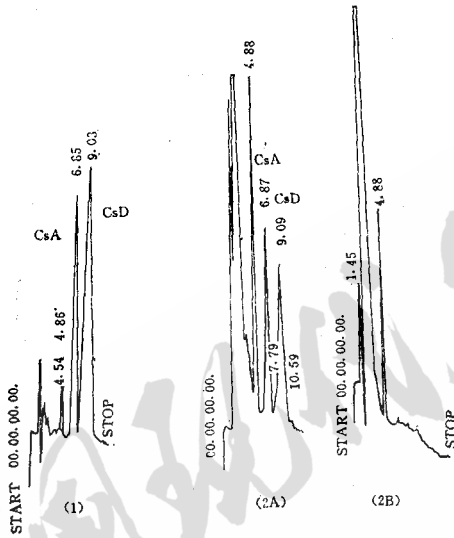


图1 标准对照品色谱图 图2 全血标本色谱图

(2A), CsA浓度为380 μg/L  
(2B): 空白血样

### 2.2 线性关系与灵敏度

本法测定全血CsA浓度从50 μg/L到1000 μg/L

范围内具有良好的线性关系，标准曲线  $h_A/h_D = 0.001278 + 0.002377C$ ,  $r = 0.99987$ 。

$$\text{灵敏度按下式计算: } S_0 = \frac{2N_D}{R_0}$$

$$\text{其中: } N_D = V * A, R_0 = \frac{hWQ}{sm}$$

式中V是记录仪测量基线的毫伏数标度，A为衰减倍数；h为CsA峰高(mV)，W为峰高0.607处的峰宽(cm)，m为进样量(g)，s为色谱图纸速(cm/min)，Q为洗脱液流量(ml/min)。计算后得到，CsA的最低检测浓度为20 μg/L。

### 2.3 回收率试验

在3支试管分别加入CsA标准液适量及空白全血2 ml，使CsA浓度为50、250和500 μg/L，按上述方法抽提后，残渣中加入20 μl内标液，氮气挥干甲醇，重溶于60 μl流动相，测得样品管中CsA与内标峰高比P<sub>1</sub>，同时于另外3支试管中加入相应的CsA标准液及内标液，摇匀，直接氮气挥干，溶于流动相中进样测定，测得对照管中CsA与内标峰高比P<sub>2</sub>，按下式计算绝对回收率：

$$\text{回收率} = P_1/P_2 \times 100\%$$

当CsA浓度为50、250和500 μg/L时，回收率分别为74 ± 3%、78 ± 4%和76 ± 4% (n = 5)。实验结果表明当CsA在高、中、低不同水平时均有相对稳定的回收率。

### 2.4 精密性

对高、低两种浓度的全血标本，分别于一天内(n = 5)和一个月(n = 5)分散测定，求算日内误差和日间误差，结果变异系数均不超过10%，见表1。

表1 精密性试验

	Conc. (μg/L)	$H_{CsA}/H_{CsD}$					$\bar{x} \pm s$	CV (%)
		1	2	3	4	5		
日 内	50	0.119	0.123	0.108	0.114	0.127	0.118 ± 0.007	5.9
	500	1.221	1.189	1.131	1.287	1.213	1.212 ± 0.058	4.8
日 间	50	0.099	0.115	0.124	0.109	0.120	0.113 ± 0.009	8.6
	500	1.172	1.248	1.199	1.301	1.140	1.214 ± 0.064	5.3

### 2.5 干扰试验

肾移植病人常用的强的松、硫唑嘌呤及其它14种药物在同样条件下检测，除胺碘酮外，均不干扰CsA及CsD的色谱峰，结果见表2。

### 2.6 血药浓度监测

对15例33次肾移植病人血药浓度进行监测，CsA谷浓度为233.1 ± 80.5 μg/L，均未出现明显的毒性反应，其中1例术后6 d，服药后5 h的浓度

表2 药物干扰试验

药 物	浓度(mg/L)	相对保留时间	备 注
环孢素 A		0.75	
环孢素 D		1.00	内 标
硫酸嘌呤	15	0.31	
强的松	20	0.36	
二苯胺	30	0.55	
普鲁卡因胺	10	0.12	
N-乙酰普鲁卡因胺	20	0.19	
伯氨喹	25	0.28	
异丙嗪	30	0.53	
奎 宁	5	0.19	
奎 尼 丁	5	No peak	
阿替洛尔	2	No peak	
美托洛尔	0.2	No peak	
普罗帕酮	1	0.20	
心 痛 定	0.4	0.18	
美 西 律	4	0.19	
胺 碘 酮	2.5	0.74	有干扰
索 普 生	10	0.21	

为322.9 µg/L时, 出现急性排斥反应。

### 3 讨论

用HPLC法测定CsA血药浓度已有文献报道<sup>[8,41]</sup>, 但多采用C<sub>8</sub>或CN柱分析及外标法定量。实验中, 我们比较了极性较大的CN柱(YWG-CN)和常用的C<sub>18</sub>柱(YWG-C<sub>18</sub>), 发现在相同的实验条件下, C<sub>18</sub>柱分析CsA的理论塔板数较CN柱约大2倍, 而且具有峰形尖锐、保留时间适中, 与内标CsD分离度较好以及全血提取物杂质峰干扰较少等优点。

采用重蒸乙醚作抽提液, 我们观察到最后重组的样品对柱污染甚小。利用环孢素具有不溶于正己烷这一特性, 在酸化的条件下用正己烷洗涤抽提样品, 能明显的除去全血样品抽提干扰物, 使色谱图更加清晰。

HPLC法测定CsA为原形药物浓度, 其结果不受代谢物的影响, 而RIA法及荧光偏振免疫法测定则为原形药和代谢物总量, 测得的血药浓度高于HPLC法1.5~15倍<sup>[6]</sup>。由于CsA代谢物的毒性目前还不清楚, 而且代谢方式根据不同的病人(不同疾病、不同治疗)而有差异, 因此HPLC测定值与药理效应之间具有更好的量效关系。

维持足够的CsA血药浓度是预防排斥反应的

重要条件。Keown介绍了世界上主要器官移植中心的血清CsA治疗浓度范围为150~250 µg/L<sup>[6]</sup>, Uchida认为肾移植病人可用谷浓度200±20 µg/L作为调整剂量的依据<sup>[7]</sup>。本文14例病人CsA全血谷浓度维持在106~385 µg/L范围内, 血清肌酐<265 µmol/L (3 mg%), 均获满意效果。1例病人血药浓度为322.9 µg/L, 血清肌酐354 µmol/L, 出现急性排斥反应, 说明国外文献所推荐的治疗浓度范围较窄, 对我国人群CsA血药浓度监测的指导作用受到一定的局限, 应引起临床用药的重视。至于我国人的合理CsA治疗浓度范围有待于今后对较多样本的监测和比较后方能确定。

### 参 考 文 献

- 1 Furlanut M, Plebani M and Burlina A. Cyclosporin monitoring: methodological considerations. *J Liquid Chromatogr* 1989; 12, 1759.
- 2 Grevel J. Cyclosporine pharmacokinetics. *Transplant Proc* 1988; 20 (suppl 2): 428.
- 3 Wilms HWF and Lison AE. Fast and specific measurement of cyclosporine A blood levels: a reliable high-performance liquid chromatography method. *Transplant Proc* 1988; 20 (suppl 2): 357.
- 4 卓海通. 用HPLC法测定肾移植病人的全血环孢素浓度. 色谱, 1989, 7, 222
- 5 Rosano TG, Pell MA, Freed BM, et al. Cyclosporine and metabolites in blood from renal allograft recipients with nephrotoxicity, rejection, or good renal function: comparative high-performance liquid chromatography and monoclonal radioimmunoassay studies. *Transplant Proc* 1988; 20(suppl 2): 330.
- 6 Keown PA. Clinical application of therapeutic drug monitoring. *Transplant Proc* 1988; 20(suppl 2): 382.
- 7 Uchida K. Minimal low dosage of cyclosporine therapy in renal transplantation by careful monitoring of high performance liquid chromatography whole blood trough levels. *Transplant Proc* 1988; 20(suppl 2), 394.

收稿日期: 1993-03-11

# A Modified High Performance Liquid Chromatographic Method for Measuring Cyclosporine A Blood Concentration

Yu Xiyong, Lin Shuguang

(Division of Clinical Pharmacology, Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100)

**Abstract** A simpler and more sensitive high performance liquid chromatographic method for measuring cyclosporine A (CsA) blood concentration was described. The domestic YWG-C<sub>18</sub> column was used, and mobile phase were acetonitrile, water (80, 20, v/v), flow rate at 1.0 ml/min, temperature of the column at 60°C and UV detector at 214 nm. The internal standard method was adopted in quantitative analysis. Our results demonstrated that the recovery of the simplified extraction process was better, average  $76.3 \pm 1.7\%$ , and the minimum detectable limit was 20 µg/L. This method has been taken to monitor the CsA concentration of renal transplantation patients, we find that the effective range of blood drug concentration is larger in Chinese people.

**Key words** HPLC Cyclosporine A Therapeutic drug monitoring

(Original article on page 26)