

# 用HPLC法测定肾移植病人的全血环孢素浓度

卓海通

(南京军区南京总医院)

环孢素(Cyclosporine A, CsA)是一种重要的免疫抑制剂药物。它用于器官移植,可延长移植后器官的成活率、预防移植器官的排斥反应,但CsA的血药浓度与疗效和毒副反应密切相关。监测血药浓度对提高安全有效的用药至关重要。

目前CsA的测定方法有RIA、荧光偏振免疫(TDX)、放免单克隆抗体等法<sup>(1-3)</sup>。但些方法易受代谢物影响,产生交叉反应<sup>(2)</sup>,且分析精度也不如HPLC法好<sup>(4)</sup>。用HPLC法测定CsA血药浓度国外已有报道<sup>(5-7)</sup>。但几乎都用C<sub>8</sub>或C<sub>18</sub>柱分析,以乙腈或甲醇与水二元溶剂为流动相,使用柱温(70~79℃)。国内对CsA的分析方法报道甚少,并选用C<sub>18</sub>或C<sub>8</sub>柱<sup>(8,9)</sup>。本文选用极性较大的CN柱,使柱温降到45~55℃,这样可提高柱寿命30%,用乙腈、甲醇、水三元溶剂可提高柱效、增加灵敏度2倍。本法已用于肾移植病人的血药浓度监测和药代动力学研究。

## 实验部分

(一) 仪器和试剂 贝克曼 114M 泵, 427 积分仪和 210A 进样阀, ZW-001 型可变波长紫外检测器(南分厂)、波长 210nm, 恒温水浴器(精度 ±0.1℃, 西德 Haake 产)。

甲醇、乙醚、己烷、盐酸、氢氧化钠均为 A.R. 级试剂, 乙腈为 HPLC 纯, 环孢素(Sandoz Basle Switzerland)。

色谱条件: 1. 柱 Ultrasphere Octyl 5μm 4.6×250mm, 柱温 60℃, 流动相: CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O(56:22:22); 2. 柱 Ultrasphere CN 5μm 4.6×250mm, 柱温 50℃, 流

动相: (1) CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (50:0:50); (2) 35:15:50; (3) 25:25:50; (4) 15:35:50; (5) 0:50:50 流速 1.05ml/min。柱温比较了 41、46、51、55℃ 四种。

(二) 标准溶液及标准曲线 精密称取 10mg CsA 用甲醇配制成 100μg/ml 浓度的贮备液, 分装于安瓶中置 -40℃ 备用。

工作标准溶液: 取上述贮备液用流动相配制成 50、100、200、400、800、1600ng/ml 浓度标准溶液, 按峰高或峰面积与浓度求算直线回归方程。

(三) 血样采集和样品处理 分别在口服 CsA 后取其谷和峰时的血样作为常规监测。做药代动力学取样为给药后 2、3、4、7、9、12h 血, 测定其各时间点药物浓度, 按 PKBP-N1 程序包中程序拟合和计算药代动力学模型及参数。

血样处理 (1) 取肝素抗凝全血 2ml, 加 2ml 0.025mol/L NaOH, 旋转混匀 30s 使其溶血; (2) 加入 5ml 无水乙醚提取两次, 乙醚提取液在 45℃ 空气下吹干; (3) 残渣中加入 0.025mol/L HCl 和甲醇各 2ml, 溶解后加入正己烷 5ml 洗涤两次; (4) 在上述水相中加入 2ml 0.025mol/L NaOH 和 4ml 乙醚提取两次, 醚提取液在 45℃ 空气下吹干。残渣用 100μl 流动相溶解后进样 20μl, 按外标法峰高定量。

## 实验结果

(一) CsA 在不同柱上的色谱特性。比较了 C<sub>8</sub> 和 CN 柱上对 CsA 的保留时间(t<sub>R</sub>)、峰高(H)、半峰宽(W<sub>1/2</sub>) 和理论塔片数(N) 的影响。结果如表 1。

表1 CsA在C<sub>8</sub>和CN柱上的色谱特性

柱	t <sub>R</sub> (min)	H(mm)	W <sub>1/2</sub> (mm)	N	温柱(℃)
C <sub>8</sub>	5.14	39.4	1.0	914.8	60
CN*	8.77	71.0	1.0	2663.1	50

\* 用2号流动相。

表1结果说明, CN柱优于C<sub>8</sub>柱, N提高近3倍, H增高近2倍。降低柱温可延长使用寿命, 而在C<sub>8</sub>柱上当柱温<50℃时CsA的t<sub>R</sub>>30min。

图1A为服药前空白血色谱图, B为服CsA后3h的血药浓度色谱图。

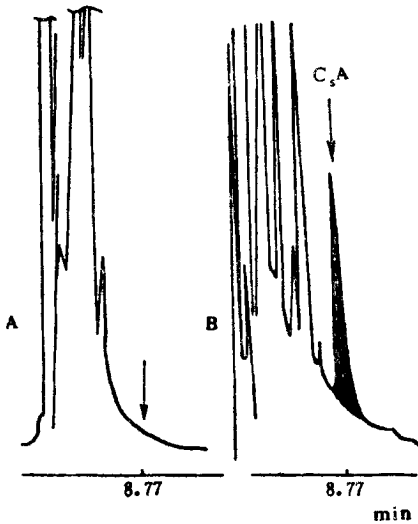


图1 病人全血在CN柱上CsA测定的色谱图  
A. 给药前血样色谱图;  
B. 口服CsA后3h血药浓度(含CsA 431ng/ml)。

(二) 在CN柱上不同流动相组分对CsA色谱行为的影响, 结果列于表2中。

表2结果说明(2)号流动相最理想。流动相中加入少量甲醇可改善分离度, 增加N

表2 不同流动相组分对CsA色谱特性的影响

流动相序号	t <sub>R</sub> (min)	H(mm)	W <sub>1/2</sub> (mm)	N
1	8.65	40	1.50	1151.4
2	8.77	71	1.00	2663.1
3	11.66	46	1.35	2582.9
4	14.72	40	2.00	1875.6
5	>24	—	—	—

数, 但随甲醇量增加 t<sub>R</sub> 延长, H、N显著降低。

(三) 在CN柱上不同柱温对CsA的色谱特性的影响。在(2)号流动相条件下, 分别在41、46、51、55℃柱温时对CsA的t<sub>R</sub>、H、W<sub>1/2</sub>和N和的影响, 结果如表3。

表3 不同柱温对CsA色谱行为的影响

温度(℃)	t <sub>R</sub> (min)	H(mm)	W <sub>1/2</sub> (mm)	N
41	9.67	52.0	1.10	2675.8
46	9.27	66.5	1.00	2975.4
51	8.70	72.0	0.90	3235.5
55	8.30	92.0	0.80	3727.1

(四) 回收试验和精度试验

1. 分别对164、205、410ng/ml三个浓度CsA血样进行回收试验, 其平均回收率98.43±3.71%。结果见表4。

表4 CsA回收试验结果

加入量(ng/ml)	实测量(ng/ml)	平均回收率(%)
410	408.85±2.90	99.72
205	203.57±2.95	100.76
164	155.5±6.05	94.82
$\bar{X} \pm SD$		98.43±3.17

注: n=5

2. 精度试验: 分别对102、205、410ng/ml三个浓度在日内(n=5)和日间(n=7)进行测定, 求算其CV分别为2.02%和2.83%。

(五) 干扰试验: 对肾移植病人常用的疏唑嘌呤和强的松在同样条件下不干扰CsA检测。它们的t<sub>R</sub>为2.90和3.84min。

(六) 病人血样监测: 对8例肾移植病人共监测血药浓度303次, 峰浓度652.8±158.3ng/ml, 谷浓度121.9±43.1ng/ml。并进行药代动力学研究。图2为病人的药-时曲线图。

### 讨论

(一) 采用CN柱和三元溶剂系统测定CsA是值得推广的。流动相中加入醋酸盐或

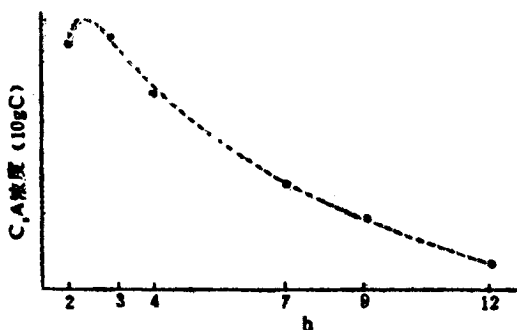


图 2 口服CsA后病人的药-时曲线图  
虚线为计算机拟合曲线;  
为实测的CsA浓度。

磷酸盐是很多文献采用的，但实验表明三元溶剂同样可取得满意效果。

(二) 在CsA测定中柱温至关重要。增加柱温可使溶剂粘度降低，传质速率加快，有利于样品洗脱。但过高柱温常产生气泡，影响测定。由于柱温对N和H影响显著，外标法定量时务必严格控制柱温，并每次用标准样品校正。

参 考 文 献

(1) T. G. Rosano et al., Transplantation Proceedings vol xx No 2 suppl. 330(1988).  
 (2) P. A. Keown., Transplantation Proceedings vol xx No 2 suppl. 382(1988).  
 (3) T. J. Schroeder et al., Transplantation

Proceedings vol xx No 2 suppl. 345(1988).  
 (4) S. Gibbons et al., Transplantation Proceedings vol xx No 2 suppl. 339(1988).  
 (5) J. Ranaid Sawchuk et al., Clin Chem., 27 (8), 1368(1981).  
 (6) S. G. Carruthers et al., Clin Chem, 29(1), 180(1983).  
 (7) W. Niederberger et al., J. Chromatogr., Biomed Appl., 182, 455, (1980).  
 (8) 陈秋朝、陈伟力, 中华器官移植杂志, 8(3), 118 (1987).  
 (9) 刘锡钧等, 药学报, 23(5), 397(1988).  
 (收稿日期: 1988年11月21日)

HPLC Determination of Cyclosporine in Whole Blood for Renal Transplantation Patients *Zhuo Haitong General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing*

An HPLC method for determination of cyclosporine (CsA) in whole blood for renal transplantation patients with high sensitivity, accuracy and reproducibility is described. We compared the chromatographic behavior of CsA on Octyl/silica and Cyano/silica columns and studied the influence of column temperature and mobile phase composition on the retention values. It is found that Ultrasphere CN column, 5µm, 250×4.6mm, is better than Ultrasphere C<sub>8</sub> column at 50°C, mobile phase acetonitrile:methanol:water(35:15:50, v/v), flow rate at 1.05ml/min and UV detector at 210nm, 0.02 aufs. The recovery was 98.43±3.13%. Average within day and day to day CV were 2.02% and 2.83%, respectively. The minimum detectable limit was <40 ng/ml.

对高效液相色谱用新填料STYVITE-OR的评价

董善年 华 俭  
 (北京医科大学药学院)

柴志宽等研制的高效液相色谱用新填料STYVITE-OR是交联苯乙烯-二乙烯苯-醋酸乙烯酯共聚物微球<sup>(1)</sup>。其特点是颗粒较细(5—8µm)，球形，中等极性，耐酸碱，该填料在药物分析中的应用尚未见报道。我们用以分离了两组药物，并与十八烷基键合的球形硅胶填料进行了选择性、传质阻抗等方面的比较。

实 验 部 分

(一) 仪器：高效液相色谱仪由YSB-2型平流泵(中国科学院上海分院科学仪器厂)，LC-15型254nm紫外检测器(PERKIN-ELMER公司)，3066型台式记录仪(四川仪表总厂)，SIL-1A型进样器(岛津制作所)组成，色谱柱：150mm×