

HPLC-MS/MS法测定大鼠血浆中伏立康唑和卡泊芬净及其药动学初步研究

李云峰, 贾欢欢, 李航, 陈桂江, 龚宝勇, 曾业文, 梁金强, 关业枝, 吴玉娥*

广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法同时测定大鼠血浆中伏立康唑和卡泊芬净的浓度, 并用于伏立康唑和卡泊芬净单独给药和联合给药后SD大鼠体内的药动学初步研究。方法 伏立康唑、卡泊芬净分别以氘代伏立康唑和氘代卡泊芬净为内标, 血浆样品经乙腈提取, 以0.1%甲酸-乙腈和0.1%甲酸-水为流动相, 用Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A柱进行梯度分离, 0.5 mL/min体积流量, 柱温为常温, 10 μ L进样量, 多级反应监测 (MRM) ESI正离子模式; 12只SD大鼠随机分成3组, 即伏立康唑 (ig, 40 mg/kg) 组、卡泊芬净 (iv, 5 mg/kg) 组、伏立康唑 (ig, 40 mg/kg) 与卡泊芬净 (iv 5 mg/kg) 联合给药组, 分别于给药后不同时间点颈静脉采血进行浓度测定, 并计算药动学参数。结果 伏立康唑在0.5~500.0 ng/mL、卡泊芬净在4~4 000 ng/mL线性关系均良好, 批内精密度 (RSD%) 和准确度 (RE%) 均小于10%, 伏立康唑和卡泊芬净提取回收率均大于90%; SD大鼠单剂量联合给予伏立康唑和卡泊芬净后, 伏立康唑消除变快, 卡泊芬净的消除变慢; 伏立康唑、卡泊芬净的 C_{max} 、AUC均高于单独用药。结论 HPLC-MS/MS法的专属性强、灵敏、准确、可靠, 可用于测定SD大鼠血浆中伏立康唑和卡泊芬净的浓度及药动学研究。伏立康唑延缓了卡泊芬净在动物体内的消除速度, 卡泊芬净通过促进伏立康唑的吸收, 增加了其在动物体内的血药浓度, 联用后二者生物利用度均提高。

关键词: 伏立康唑; 卡泊芬净; 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS); 药动学

中图分类号: R969.1, Q95-33 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 01-0070-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.01.010

Determination of voriconazole and caspofungin in rat plasma by HPLC-MS/MS and preliminary study on their pharmacokinetics

LI Yunfeng, JIA Huanhuan, LI Hang, CHEN Guijiang, GONG Baoyong, ZENG Yewen, LIANG Jinqiang, GUAN Yezhi, WU Yu'e

Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To determine the concentrations of voriconazole and caspofungin in SD rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and its pharmacokinetics in SD rats after single dose combination treatment with voriconazole and caspofungin. **Methods** The internal standards of Veconazole and Carpoferen were deuterated Vriconazole and caspofungin, respectively. Plasma samples were extracted with acetonitrile, 0.1% formic acid-acetonitrile and 0.1% formic acid-water were used as mobile phase to gradiently separate by Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A (30 $\times$ 2.0 mm, 4 μ m). with a flow rate of 0.5 mL/min, normal temperature, 10 μ L of injection volume, multilevel reaction Monitoring (MRM) ESI positive ion model. 12 mice were randomly divided into three groups: voriconazole (ig, 40 mg/kg) group; caspofungin (iv 5 mg/kg); combination group of two drugs (40 mg/kg voriconazole and 5 mg/kg caspofungin acetate). Finally, the blood was collected by jugular vein bleeding to measure the concentrations of voriconazole and caspofungin in SD rat plasma. **Results** The linear relationship between voriconazole at 0.5 -500.0 ng/mL and caspofungin at 4 — 4 000 ng/mL was good, and the intra-assay precision (RSD%) and accuracy (RE%) were less than 10 %, the recovery of voriconazole and caspofungin extraction were higher than 90%. After single dose of voriconazole and caspofungin, the elimination of voriconazole was faster, and the elimination of caspofungin was slower; the C_{max} and AUC of voriconazole and caspofungin were higher than those of single dose. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method is specific, sensitive, accurate and reliable. It can be used to determine the concentration and pharmacokinetics of

收稿日期: 2020-05-11

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A010107018、2017B030314171、2017A070702001)

第一作者: 李云峰(1975—),男,工程师,研究方向为药物的安全性评价。Tel:(020)84106823 E-mail:lyf@gdlami.com

*通信作者: 吴玉娥(1978—),女,副主任药师。Tel:(020)84106827 E-mail:wye@gdlami.com

voriconazole and caspofungin in the plasma of SD rats. Voriconazole delayed the elimination rate of caspofungin in animals. Caspofungin increased the blood concentration of voriconazole by promoting the absorption of voriconazole. The bioavailability of both drugs was improved after combination.

Key words: voriconazole; caspofungin; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); pharmacokinetics

伏立康唑(voriconazole)是一种广谱的三唑类抗真菌药,通过抑制细胞色素P450依赖性的14 α 固醇去甲基酶发挥抗真菌作用,对耐氟康唑的白色念珠菌有很好的抗菌活性^[1]。卡泊芬净(caspofungin)是一种棘白菌素类广谱抗真菌药物,是葡聚糖合成酶抑制剂,能有效抑制细胞壁的一种基本成份 $\beta(1,3)$ -D葡聚糖的合成,干扰真菌细胞壁的合成,从而发挥抗真菌作用。闫桂英等^[2]研究表明,伏立康唑与卡泊芬净在体外具有协同抗真菌作用,但尚未见在动物体内联合用药的药动学研究报道。本研究旨在建立一种同时测定大鼠血浆中伏立康唑和卡泊芬净的方法,并进行SD大鼠单剂量联合给予伏立康唑和卡泊芬净后体内的药动学初步研究,为探讨二者协同抗真菌作用与药动学之间的关系,以及研发其复方制剂提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

美国AB SCIEX API4000液相色谱/三重四极杆串联质谱联用仪;日本岛津Shimadzu LC-20AD液相色谱仪;德国Sartorius CPA225D电子精密天平;德国Eppendorf 5810R高速大容量离心机。

1.2 药品与主要试剂

伏立康唑对照品(广东省药品检验所,质量分数99.79%,批号100862-201402);醋酸卡泊芬净对照品(上海嵘威达实业有限公司,质量分数99.04%,批号15619);氘代伏立康唑(质量分数 $\geq 98\%$,批号3-JUZ-110-1, Toronto Research Chemicals);氘代醋酸卡泊芬净(质量分数 $\geq 98\%$,批号10-GJF-162-1, Toronto Research Chemicals);伏立康唑(成都华神集团股份有限公司制药厂,批号H20055840);卡泊芬净(Merck Sharp & Dohme Ltd,批号2190340);甲醇、甲酸、乙腈等均为色谱纯,购自德国默克公司;超纯水(美国Millipore公司)。

1.3 实验动物

SPF级雌性SD大鼠12只,体质量190~210 g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2013-0002。动物饲养在广东省实验动物监测所屏障动物房,实验动物使用许可证号SYXK(粤)2016-0122。动物实验开

展经过广东省实验动物监测所动物使用与管理委员会审批(编号IACUC2016020)。动物饲养环境温度20~26℃,相对湿度40%~70%,12 h/12 h明暗交替。

2 方法

2.1 分析方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A(30 mm $\times$ 2 mm,4 μ m),柱温为室温,体积流量0.5 mL/min,流动相A为0.1%甲酸-水,B为0.1%甲酸-乙腈。采用梯度洗脱:0.01~1.80 min,30% B;1.81~2.30 min,90% B;2.31~2.60 min,30% B,进样量为10 μ L。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子检测方式;喷雾电压(IS)5 500 V;喷雾气温度(TEM)450℃;雾化气(GS1)344.73 kPa;辅助加热气(GS2)413.68 kPa;气帘气(CUR)206.84 kPa;碰撞气(CAD)68.94 kPa;扫描方式为多反应监测模式(MRM);用于定量分析监测的离子对为 m/z 350.1 $\rightarrow$ 281.1(伏立康唑),碰撞能量20 eV; m/z 353.2 $\rightarrow$ 284.2(内标,氘代伏立康唑),碰撞能量20 eV; m/z 547.9 $\rightarrow$ 538.9(卡泊芬净),碰撞能量18 eV; m/z 549.6 $\rightarrow$ 540.7(内标,氘代卡泊芬净),碰撞能量15 eV。

2.2 溶液的配制

2.2.1 标准系列溶液和质控样品的配制 分别精密称取一定质量的伏立康唑和醋酸卡泊芬净对照品,加入少量甲醇将药物溶解完全后定容到10 mL量瓶中,得到质量浓度均为1 mg/mL的储备液,于2~8℃贮存。实验前取出伏立康唑和卡泊芬净储备液,用乙腈-水(1:1)稀释储备液,配制成伏立康唑标准系列工作溶液0.5、1.5、5.0、15.0、50.0、150.0、300.0、500.0 ng/mL;卡泊芬净标准系列工作溶液4、12、40、120、400、1 200、2 400、4 000 ng/mL。用大鼠空白血浆将伏立康唑和卡泊芬净储备液稀释,配制质控(QC)样品,伏立康唑血浆质量浓度分别为0.50(LLOQ)、1.00(LQC)、30(MQC)、240(SHQC)、400(HQC) ng/mL;卡泊芬净血浆质量浓度分别为4.00(LLOQ)、8.00(LQC)、240(MQC)、1 920(SHQC)、3 200(HQC) ng/mL。

2.2.2 内标溶液的配制 分别加入1 mL 甲醇将氘代伏立康唑和氘代卡泊芬净溶解,得到质量浓度分别为498、482 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液。用乙腈-水(1:1)将储备液稀释,配制成氘代伏立康唑(6 ng/mL)和氘代卡泊芬净(150 ng/mL)混合内标工作溶液。

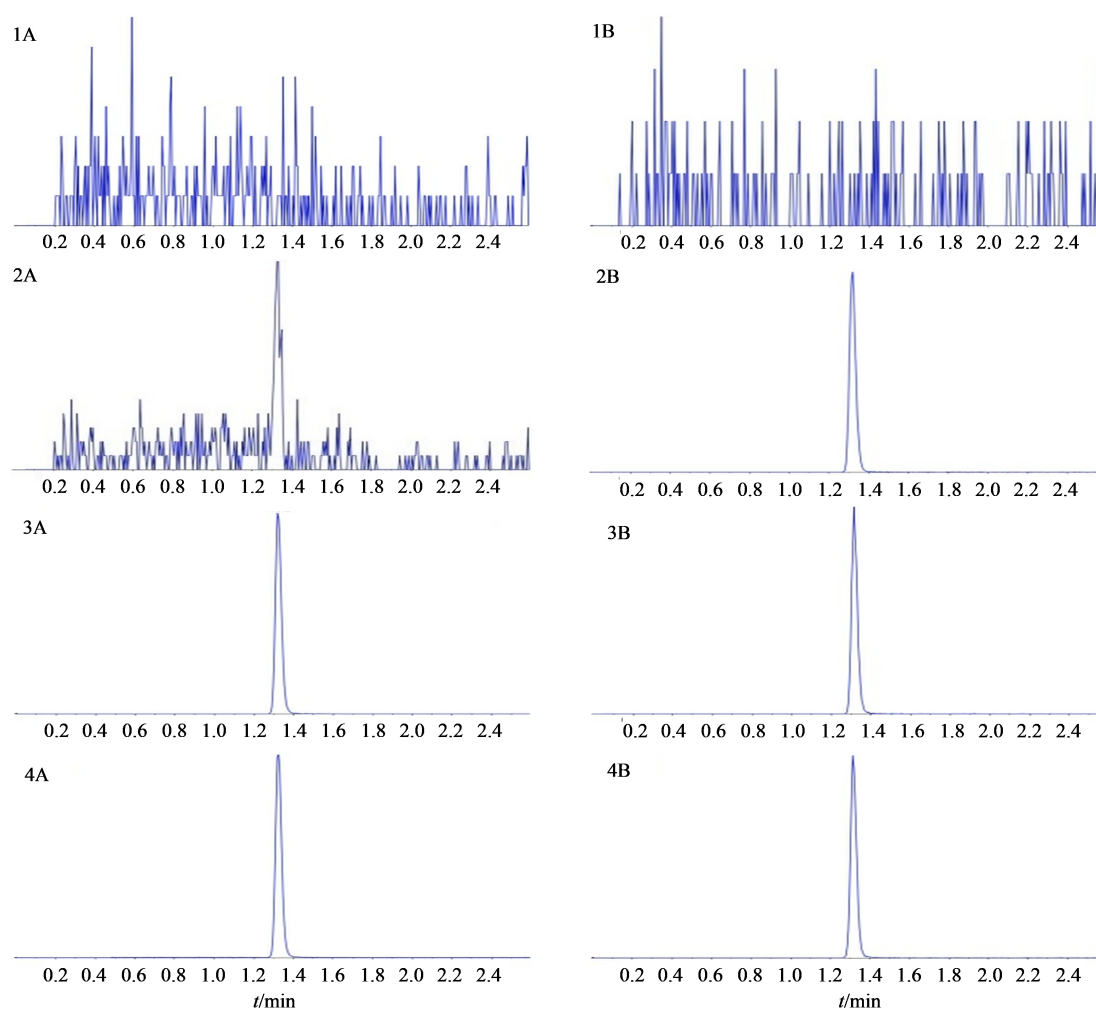
2.2.3 血浆样品的处理方法 取30 μL 血浆样品,加入30 μL 乙腈-水(1:1)和30 μL 混合内标工作溶液,再加入100 μL 乙腈,涡旋2 min后14 000 r/min离心5 min,取150 μL 上清与50 μL 超纯水混匀,进样分析。药动学样品用大鼠空白血浆按照1:200稀释后进样分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 在本实验条件下,伏立康唑和氘代

伏立康唑的色谱保留时间相同,均为1.3 min;卡泊芬净和氘代卡泊芬净的色谱保留时间相同,均为1.1 min。峰形良好,血浆内源性物质均不干扰含量测定,可以满足血浆样品的快速分析,具有良好的专属性。色谱图见图1、2。

2.3.2 标准曲线 取大鼠空白血浆30 μL ,加入30 μL 伏立康唑、卡泊芬净的标准系列溶液,按“2.2.3”项下方法处理。以待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,待测物质量浓度为横坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,分别求得伏立康唑和卡泊芬净的线性回归方程即为标准曲线。取伏立康唑、卡泊芬净LLOQ(0.50、4.00 ng/mL)样品,按“2.2.3”项下操作,重复6份,计算相对标准偏差(RSD)和相对偏差(RE)。

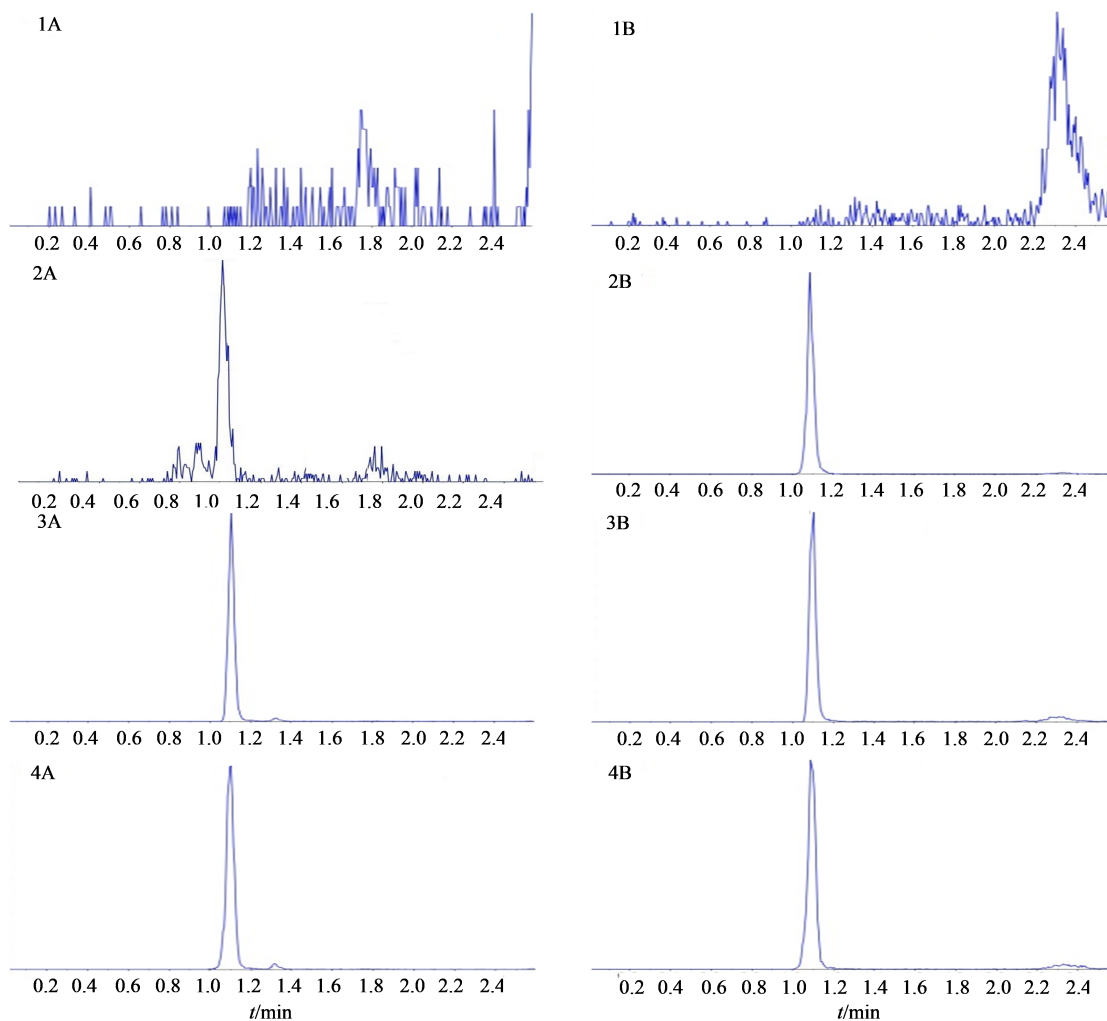


1-空白血浆;2-空白血浆+氘代伏立康唑(6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$);3-空白血浆+伏立康唑(15 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)+氘代伏立康唑(6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$);4-SD大鼠给伏立康唑后15 min 血浆+氘代伏立康唑(6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

1-blank plasma; 2-blank plasma + deuteriovoriconazole (6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); 3-blank plasma + voriconazole (15 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + deuteriovoriconazole (6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); 4-plasma from SD rats 15 min after administration with voriconazole+deuteriovoriconazole (6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

图1 伏立康唑(A)和内标氘代伏立康唑(B)的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of voriconazole (A) and deuteriovoriconazole (B)



1-空白血浆;2-空白血浆+氘代卡泊芬净($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);3-空白血浆+卡泊芬净($400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)+氘代卡泊芬净($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);4-SD大鼠给卡泊芬净后4.5 h血浆+氘代卡泊芬净($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

1-blank plasma; 2-blank plasma + deuterocaspofungin ($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); 3-blank plasma + caspofungin ($400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + deuterocaspofungin ($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); 4-plasma from SD rats 15 min after administration with caspofungin + deuterocaspofungin ($150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图2 卡泊芬净(A)和内标氘代卡泊芬净(B)的MRM色谱图

Fig. 2 MRM chromatogram of caspofungin (A) and deuterocaspofungin (B)

伏立康唑的标准曲线回归方程为 $y=0.155x+0.0144$ ($r^2=0.9978$), 在 $0.5 \sim 500.0 \text{ ng/mL}$ 线性关系良好, 定量下限质量浓度为 0.5 ng/mL ; 得卡泊芬净的标准曲线回归方程为 $y=0.00393x+0.00125$ ($r^2=0.9975$), 在 $4 \sim 4000 \text{ ng/mL}$ 线性关系良好, 定量下限质量浓度为 4 ng/mL 。

2.3.3 精密度和准确度 取伏立康唑、卡泊芬净QC样品(伏立康唑血浆质量浓度为 0.5 、 1.0 、 30.0 、 240.0 、 400.0 ng/mL , 卡泊芬净血浆质量浓度为 4 、 8 、 240 、 1920 、 3200 ng/mL), 按“2.2.3”项下方法处理, 每个浓度重复6份, 计算精密度(RSD)和准确度(RE)。

伏立康唑、卡泊芬净的5个质量浓度QC样品的批内RSD和RE均小于 7.1% , 结果见表1。

表1 伏立康唑和卡泊芬净的精密度和准确度

Table 1 Precision and accuracy of voriconazole and caspofungin

药物	质量浓度/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	RE/%
伏立康唑	0.5	3.08	-7.10
	1	2.36	2.47
	30	4.39	6.89
	240	2.42	-2.08
	400	2.85	-7.25
卡泊芬净	4	6.07	0.54
	8	6.47	4.63
	240	4.72	4.58
	1920	2.48	-1.91
	3200	3.16	-5.36

2.3.4 提取回收率 取低、中、高3个质量浓度(伏立康唑血浆质量浓度为1.0、30.0、400 ng/mL,卡泊芬净血浆质量浓度为8.0、240、3 200 ng/mL)的QC样品,按“2.2.3”项下方法处理,每一质量浓度重复6份。另取空白大鼠血浆30 μ L,按“2.2.3”项下方法处理,取全部上清液,加入30 μ L相应的QC溶液及30 μ L内标溶液,涡旋混匀后,取150 μ L上清,加入50 μ L超纯水混匀,进样分析,得到低、中、高3个质量浓度未经提取的QC样品,每个质量浓度重复3份,以各浓度2种处理方法测得的伏立康唑或卡泊芬净峰面积和内标峰面积比值计算百分比,作为提取回收率。

伏立康唑在1、30、400 ng/mL 3个质量浓度下平均提取回收率大于92%,RSD分别为3.06%、6.76%、2.91%;卡泊芬净在8、240、3 200 ng/mL 3个质量浓度下的血浆样品平均提取回收率大于94%,RSD分别为6.47%、4.67%、3.08%。

2.3.5 残留 在测完标准曲线定量上限样品浓度后测定空白血浆样品,以空白血浆样品和LLOQ样品中伏立康唑或卡泊芬净峰面积比值计算百分比。高浓度点后空白血浆样品的响应低于LLOQ峰面积的20%,无残留。

2.3.6 稳定性 考察伏立康唑、卡泊芬净高、低

质量浓度(伏立康唑1、400 ng/mL;卡泊芬净8、3 200 ng/mL)血浆样品室温放置3 h稳定性和样品经预处理后置于进样器中放置24 h稳定性,每个浓度重复3份,计算各浓度的RE和RSD。RE和RSD均小于8.3%,说明样品放置稳定,结果见表2。

2.3.7 稀释效应 配制伏立康唑、卡泊芬净血浆质量浓度为5 000、40 000 ng/mL的样品,然后分别用大鼠空白血浆按照1:20、1:200的比例进行稀释,即稀释20、200倍,各重复制备6份,计算RE和RSD,评价样品稀释对测定样品浓度的影响。

伏立康唑或卡泊芬净血浆样品经过稀释20和200倍后,其RSD和RE均小于15%,结果见表3。

2.4 药动学研究

2.4.1 大鼠血浆样品的采集 雌性SD大鼠12只,随机分成3组,分别为40 mg/kg伏立康唑组、5 mg/kg卡泊芬净组、40 mg/kg伏立康唑联合5 mg/kg卡泊芬净给药组,其中伏立康唑为ig给药,卡泊芬净为iv给药,每组4只。给药前禁食12 h,给药后4 h开始进食,期间自由饮水。伏立康唑组(给药后0.25、1.66、4.16、8.60、16.16 h)、卡泊芬净组(给药后0.083、1.500、4.000、8.000、16.000 h)和联合给药组(伏立康唑提前10 min给药,于卡泊芬净给药后0.083、1.500、4.000、8.000、16.000 h)分别于颈静脉

表2 伏立康唑和卡泊芬净样品的稳定性($n=3$)

Table 2 Stability of voriconazole and caspofungin in plasma samples ($n=3$)

药物	储存条件	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		RSD/%	RE/%
		理论	实测		
伏立康唑	室温放置3 h	1	1.08±0.02	1.4	8.3
		400	411.33±17.01	4.1	2.8
	进样器室温放置24 h	1	1.05±0.04	3.4	5.0
		400	379.33±7.64	2.0	5.2
卡泊芬净	室温放置3 h	8	8.65±0.59	6.8	8.1
		3 200	3 446.67±274.65	8.0	7.7
	进样器室温放置24 h	8	8.55±0.35	4.1	6.9
		3 200	3 160.00±60.83	1.9	1.3

表3 伏立康唑和卡泊芬净血浆样品的稀释效应($n=6$)

Table 3 Dilution effect of voriconazole and caspofungin in plasma samples ($n=6$)

药物	稀释倍数	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		RSD/%	RE/%
		理论	实测		
伏立康唑	20	250	245.00±8.81	3.60	-2.00
	200	25	27.57±0.98	3.54	10.27
卡泊芬净	20	2 000	2 040.00±74.57	3.66	2.00
	200	200	194.00±13.55	6.98	-3.00

采血 300 μL , 置于含有肝素钠的抗凝管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 3 000 r/min 离心 15 min 后取血浆, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 待测。

2.4.2 大鼠血样浓度的测定及药动学参数计算 大鼠血浆样品 30 μL , 按“2.2.3”项下方法处理, 其中超出了标曲定量范围的血浆样品, 分别采取稀释 20(卡泊芬净)~100倍(伏立康唑)后的血浆样品进行浓度测定。采用 DAS 3.0 药动学软件对药时数据

进行处理和分析, 计算药时曲线下面积(AUC)及最大血药浓度($C_{\max}$)、达峰时间($t_{\max}$)、消除半衰期($t_{1/2}$)等参数平均值, 并绘制平均血药浓度-时间曲线。

SD 大鼠单次给予伏立康唑(40 mg/kg)及伏立康唑和卡泊芬净联合给药后伏立康唑的平均药时曲线、单次给予卡泊芬净(5 mg/kg)及伏立康唑和卡泊芬净联合给药后卡泊芬净的药时曲线均见图3。药动学参数见表4。

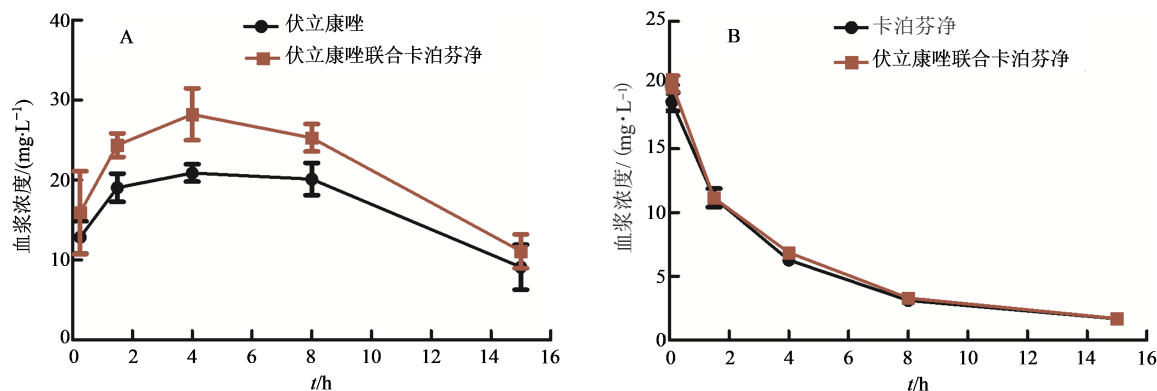


图3 大鼠给药后体内伏立康唑(A)和卡泊芬净(B)的平均药时曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 3 Time curve of voriconazole (A) and caspofungin (B) after administration ($\bar{x} \pm s, n=4$)

表4 大鼠给药后体内伏立康唑、卡泊芬净的药动学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of voriconazole and caspofungin

参数	单位	伏立康唑		卡泊芬净	
		伏立康唑	伏立康唑联合卡泊芬净	卡泊芬净	伏立康唑联合卡泊芬净
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	20 900	28 233	18 675	20 100
$T_{\max}$	h	4	4	/	/
$t_{1/2}$	h	11.4	7.8	3.6	4.8
MRT_{0-t}	h	6.6	6.4	4.1	4.1
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	255 869	329 441	80 030	84 992
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	408 886	461 838	84 786	96 789

4 讨论

国内外已有较多文献报道血浆中伏立康唑和卡泊芬净的测定, 主要方法有微生物法^[3]、高效液相色谱(HPLC)法^[4-6]、毛细管电泳法^[7-8]、液相质谱(LC/MS)法^[9-10]等。微生物法现已不提倡用于药动学研究, HPLC法存在操作复杂费时、样品检测时间长、灵敏度较低的问题, 毛细管电泳法也较少用于药动学研究。本研究采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法, 具有灵敏度高、检测时间短、操作简便等优点。

参照文献报道^[11-15]的方法, 在本实验过程中分别进行了液液萃取与蛋白沉淀2种方法处理样品, 结果发现, 采用乙腈直接沉淀蛋白法处理大鼠血浆

样品的提取回收率较高, 且能同时提取血浆样品中的伏立康唑和卡泊芬净, 操作简便, 稳定可靠。测定采用了HPLC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中的伏立康唑和卡泊芬净及其内标(氘代伏立康唑和氘代卡泊芬净), 色谱方法分别考察了甲醇和乙腈作为流动相, 试验结果表明选择乙腈作为流动相时, 采用梯度洗脱, 峰形对称性和分离度均更好。同时为提高待测物伏立康唑和卡泊芬净的离子化效率, 获得更好的峰形, 选择了在流动相中添加0.1%甲酸。在方法建立过程中还发现了卡泊芬净同时存在 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 和 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 离子峰, 且 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 的信号响应远高于 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$, 因此确定卡泊芬净选择 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 的离子峰作为定量离子。

本研究建立了灵敏、准确和可靠的定量检测伏立康唑和卡泊芬净在大鼠血浆中HPLC-MS/MS分析方法,血浆样品用量少(300 μ L);样品的处理过程仅需一步沉淀蛋白,操作简便快速;样品的分析时间仅需2.6 min,大大提高了样品通量;伏立康唑在0.5~500.0 ng/mL、卡泊芬净在4~4 000 ng/mL范围内线性关系均良好(r^2 分别为0.997 8、0.997 5),最低检测质量浓度分别为0.5、4.0 ng/mL;批内精密密度(RSD)和准确度(RE)均小于7.1%,伏立康唑提取回收率大于92%,卡泊芬净提取回收率大于95%。验证结果表明,该方法的专属性高、分离效果好、准确且重现性好,能满足伏立康唑和卡泊芬净在大鼠体内药动学研究的需要。经考察伏立康唑、卡泊芬净的血浆样品在室温放置3 h和样品经预处理后在进样器中放置24 h后,RE均小于10%,结果说明在本实验条件下样品的稳定性良好。经考察伏立康唑和卡泊芬净标准血浆样品分别稀释20和200倍后,其RSD在3.54%~6.98%、RE%在2.0%~10.27%,表明血浆样品稀释方法稳定可靠,说明超出了标曲定量范围的血浆样品采取稀释20~100倍后进行浓度测定的结果是可靠的。

SD大鼠单剂量联合给予伏立康唑(ig 40 mg/kg)和卡泊芬净(iv 5 mg/kg)后,伏立康唑消除变快($t_{1/2}$ 为7.8 h,单用时为11.4 h),卡泊芬净的消除变慢($t_{1/2}$ 为4.8 h,单用时为3.6 h);伏立康唑、卡泊芬净的 $C_{\max}$ 分别达282 33、20 100 ng/mL,AUC分别为461 838、96 789 μ g/L·h,伏立康唑的 $C_{\max}$ 和AUC均明显高于单独用药(20 900 ng/mL,408 886 μ g/L·h),分别增加了35%、14%;卡泊芬净的 $C_{\max}$ 和AUC也高于单独用药(18 675 ng/mL,84 786 μ g/L·h),分别增加了8%、13%。伏立康唑延缓了卡泊芬净在动物体内的消除速度,提高了其生物利用度;卡泊芬净通过促进伏立康唑的吸收,增加了其在动物体内的血药浓度,提高了其生物利用度;实验结果与二者体外联合使用的协同作用结果相一致。

本研究建立的HPLC-MS/MS法的专属性强、灵敏、准确、可靠,可用于同时测定SD大鼠血浆中伏立康唑和卡泊芬净的浓度,药动学初步研究结果表明了伏立康唑和卡泊芬净联合用药在SD雌性大鼠体内的吸收增加或消除减慢,药物 $C_{\max}$ 和AUC均有所增加,提高了生物利用度,为这2种药物联合应用提供了依据,但二者在真菌感染模型动物的体内联合应用效果和相互影响代谢的作用机制有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谢梅,骆艳妮,李娜.大蒜素注射液联合伏立康唑治疗肺部真菌感染的疗效观察[J].现代药物与临床,2019,34(1):105-109.
Xie M, Luo Y N, Li N. Clinical observation of Allitride Injection combined with voriconazole in treatment of pulmonary fungal infection [J]. Drugs Clin, 2019, 34(1): 105-109.
- [2] 闫桂英,张立新.一种药物增效组合预测方法及实验验证:中国,201110210508[P].2014.
Yan G Y, Zhang L X. A synergistic medicament combination forecast method and experimental Validation: China, 201110210508 [P]. 2014.
- [3] Perea S, Pennick G J, Modak A, et al. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5): 1209-1213.
- [4] Gage R, Stopher D A. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17(8): 1449-1453.
- [5] Pennick G J, Clark M, Sutton D A, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(7): 2348-2350.
- [6] 南志成.高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑浓度[J].中国医院药学杂志,2006,26(7):836-839.
Nan Z C. Determination of voriconazole concentration in human plasma by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm, 2006, 26(7): 836-839.
- [7] Crego A L, Marina M, Lavandera J L. Optimization of the separation of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2001, 917(1/2): 337-345.
- [8] Crego A L, Gómez J, Marina M L, et al. Application of capillary zone electrophoresis with off-line solid-phase extraction to *in vitro* metabolism studies of antifungals [J]. Electrophoresis, 2001, 22(12): 2503-2511.
- [9] Pauwels S, Vermeersch P, Van Eldere J, et al. Fast and simple LC-MS/MS method for quantifying plasma voriconazole [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413 (7/8): 740-743.
- [10] 许涛,王大为,武洁,等.人血浆中伏立康唑的LC-MS-MS法测定方法学研究[J].中国新药杂志,2008,17(2):165-168.
Xu T, Wang D W, Wu J, et al. Methodological study on determination of voriconazole in human plasma by LC-

- MS-MS method [J]. *Chin New Drugs J*, 2008, 17(2): 165-168.
- [11] Araujo B V, Conrado D J, Palma E C, et al. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed*, 2007, 44(4): 985-990.
- [12] Zhang M, Grant A, Moore B, et al. A simple high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of three triazole antifungals in human plasma [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2013, 57(1): 484489.
- [13] Rochat B, Bolay S, Pascual A, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry method for quantification of caspofungin in clinical plasma samples [J]. *J Mass Spectrom*, 2010, 42(4): 440-449.
- [14] Egle H, Trittler R, Klaus K. An advanced double column-switching technique (LC-LC) for liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry for fully automated analysis of caspofungin [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2004, 18(23): 2871-2877.
- [15] Decosterd L A, Rochat B, Pesse B, et al. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-Oxide, anidulafungin and caspofungin [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2010, 54(12): 5303-5315.

[责任编辑 兰新新]