

• 论 著 •

高效液相色谱法测定血液透析患者缬沙坦血药浓度*

王海焯¹, 许正锦¹, 赖源发², 郑凤伟¹, 陈 慧¹, 许勇镇¹, 吴玲艳¹, 蔡丽娜¹, 文 娱^{1△}

(1. 北京中医药大学厦门医院, 福建 厦门 361009; 2. 厦门华夏学院, 福建 厦门 361024)

[摘要] 目的 探讨血液透析对缬沙坦血药浓度的影响。方法 收集 2018 年 1 月至 2022 年 1 月于北京中医药大学厦门医院门诊就诊及住院的 55 例血液透析患者相关资料, 受试者在血液透析前 6 h 服用缬沙坦胶囊 80 mg, 采集透析开始时及透析结束时透析器中静脉血, 采用高效液相色谱法测定血药浓度。结果 缬沙坦低、中、高浓度的回收率分别为 $(100.75 \pm 1.36)\%$ 、 $(103.12 \pm 1.02)\%$ 、 $(101.68 \pm 2.37)\%$, 相对标准偏差分别为 1.35%、0.99%、2.33%。透析后缬沙坦血药浓度 $(0.47 \mu\text{g}/\text{mL})$ 低于透析前 $(0.67 \mu\text{g}/\text{mL})$, 差异有统计学意义 $(P < 0.01)$ 。患者年龄、血浆白蛋白、尿素氮、血肌酐与血药浓度均无相关性 $(P > 0.01)$ 。结论 缬沙坦在血液透析后血药浓度呈下降趋势。

[关键词] 缬沙坦; 血液透析; 高效液相色谱; 终末期肾病; 高血压

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.22.001 中图分类号: R459.5

文章编号: 1009-5519(2024)22-3781-05 文献标识码: A

Determination of valsartan plasma concentration in hemodialysis patients by high performance liquid chromatography*

WANG Haihua¹, XU Zhengjin¹, LAI Yuanfa², ZHENG Fengwei¹, CHEN Hui¹, XU Yongzhen¹, WU Lingyan¹, CAI Lina¹, WEN Yu^{1△}

(1. Xiamen Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Xiamen, Fujian 361009, China; 2. Xiamen Huaxia University, Xiamen, Fujian 361024, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hemodialysis on plasma concentration of valsartan.

Methods The relevant data of 55 hemodialysis patients in Xiamen Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine from January 2018 to January 2022 were collected. The subjects took 80 mg of valsartan capsule 6 hours before hemodialysis, and the venous blood was collected from the dialyzer at the beginning and end of dialysis, and the plasma concentration was determined by high performance liquid chromatography. **Results** The recovery rates of valsartan at low, medium and high concentrations were $(100.75 \pm 1.36)\%$, $(103.12 \pm 1.02)\%$ and $(101.68 \pm 2.37)\%$, respectively, and the relative standard deviation were 1.35%, 0.99% and 2.33%, respectively. The plasma concentration of valsartan after dialysis $(0.47 \mu\text{g}/\text{mL})$ was lower than that before dialysis $(0.67 \mu\text{g}/\text{mL})$, the difference was statistically significant $(P < 0.01)$. There was no correlation between age, plasma albumin, urea nitrogen, serum creatinine and plasma concentration $(P > 0.01)$. **Conclusion** The plasma concentration of valsartan shows a downward trend after hemodialysis.

[Key words] Valsartan; Hemodialysis; High performance liquid chromatography; End-stage renal disease; Hypertension

慢性肾脏病 (CKD) 已成为威胁人类健康的全球公共性健康问题, 目前在我国的患病率达 10.8%^[1]。尿毒症属于 CKD 终末期疾病, 未及时治疗, 可导致疾病进展, 引起并发症, 严重威胁患者生命安全^[2]。血液透析是尿毒症患者的主要治疗方法, 也是延续患者

生命的治疗方法之一^[3]。血液透析患者并发高血压的概率高达 50%~90%, 血液透析过程中的血压波动不仅严重影响血液透析患者主观耐受性, 同时可增加透析患者的心血管事件发生率及死亡率^[4]。而缬沙坦胶囊通过控制血液透析患者血压, 在改善患者心功

* 基金项目: 福建省卫生计生委青年科研课题资助项目 (2017-2-103)。

作者简介: 王海焯 (1987-), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事中西医结合诊治肾脏疾病的研究。△ 通信作者, E-mail: xiaanwen@

能、残余肾功能及微炎症状态等方面有良好的作用,能有效提高血液透析患者的生活质量及改善患者的远期预后^[5]。由于降压药物被清除是透析中发生高血压的因素之一。因此,本研究通过高效液相色谱法测定血液透析患者透析器中静脉血血药浓度,探讨血液透析患者缬沙坦的药代动力学特点,从服药这一环节控制血压,为血液透析患者制定合理个体化给药方案提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月至 2022 年 1 月于北京中医药大学厦门医院门诊就诊及住院的 55 例血液透析患者的相关资料。根据王海燕主编的《肾脏病学》2008 年第 3 版中“慢性肾功能衰竭——尿毒症期”诊断标准:(1)由原发肾小球肾炎疾病引起的慢性肾功能衰竭;(2)内生肌酐清除率 <15 mL/min;(3)血肌酐 >707 μ mol/L 评估及管理临床实践。本研究通过本医院伦理审查(审批号:2015-K020-01),患者签署知情同意书。

1.1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)年龄 18~70 岁;(2)血液透析每周 2~3 次;(3)服用缬沙坦胶囊(商品名:代文)降压;(4)每次血液透析 4 h;(5)身体质量指数 19~24 kg/m²。排除标准:(1)合并严重胃肠道疾病;(2)依从性差;(3)有严重精神病;(4)肾脏移植术后;(5)晚期恶性肿瘤;(6)重度肝功能不全,胆道梗阻及胆汁性肝硬化;(7)其他任何理由不参加临床试验。

1.2 方法

1.2.1 基本资料采集方法 采集入组患者基线特征,包括年龄(27~68 岁)、性别(男 33 例,女 22 例)、用药史(均稳定服用缬沙坦降压 3 个月)、治疗史(规律血液透析)、生命体征(体温、脉搏、血压均波动在正常范围内)、体格检查(无异常)、实验室检查(血清白蛋白、血肌酐、尿素氮)。

1.2.2 主要仪器 本研究所用主要仪器包括 LC-20A 型高效液相色谱仪(Shimadzu 岛津,日本)、RF-10AXL 型荧光检测器(Shimadzu 岛津,日本)、BSA224S 型万分之一电子天平(赛多利斯上海有限公司,中国)、XS205 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司,中国)、JB/T5374-1991 型电子天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司,中国)、CT15RT 型台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂,中国)、KQ-5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,中国)、GM-1.0A 型三联过滤器套装(津腾,中国)。

1.2.3 主要药品与试剂 缬沙坦标准品(批号:

Y0001132,CAS137862-53-4,纯度 $\geq 99.0\%$)购于上海玉博生物科技有限公司;主要试剂甲醇(批号:10014118,纯度 $\geq 99.5\%$)、二氯甲烷(批号:80047318,纯度 $\geq 99.5\%$)、乙酸铵(批号:10001216,纯度 $\geq 98.0\%$)、乙酸乙酯(批号:100094190,纯度 $\geq 99.5\%$)、乙醇(批号:80176961,纯度 $\geq 75.0\%$)、甲酸(批号:10010118,纯度 $\geq 88.0\%$)、乙酸(批号:10000218,纯度 $\geq 99.5\%$)、磷酸(批号:10015408,纯度 $\geq 85.0\%$)、盐酸(批号:10011018,纯度 $\geq 36.0\% \sim 38.0\%$)均购于上海沪试实验室器材股份有限公司;乙腈(批号:10014118,纯度 $\geq 99.5\%$)购于萨恩化学技术(上海)有限公司;实验所用甲醇、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈均为色谱纯;实验所用乙酸铵、甲酸、乙酸、磷酸、盐酸均为分析纯;实验用水为超纯水。

1.2.4 缬沙坦标准溶液的制备 精密称取 12.5 mg 缬沙坦粉末置于 250 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀制成浓度为 50 μ g/mL 的缬沙坦储备液。精密吸取 50 μ g/mL 缬沙坦储备液适量,用甲醇稀释,得到 50.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0.1 μ g/mL 的缬沙坦标准工作液,在 4℃ 冰箱中避光存放备用。

1.2.5 样本量估算 计算公式: $n = (U_a/\delta)^2 / P(1-P)$ 。统计分析处理,得出 P 为 0.2,代入公式计算:(1.96/0.05)²/0.2(1-0.2),得到 n 为 56。公式中: δ 为容许的误差,即允许样本率(P)和总体率(P)的最大容许误差为多少(P 为样本率)。本研究希望所得的样本率(P)和总体率(P)之差不超过 5%。 $\alpha = 0.05$,则 $U_a = 1.96$ 。本研究样本量为 56 例。

1.2.6 服药方法 患者在血液透析前 6 h 服用缬沙坦胶囊(商品名:代文;规格:80 mg);生产厂家:北京诺华制药有限公司。

1.2.7 样本采集 分别在患者透析开始、结束时采集透析器静脉端血标本 2 mL。透析过程中血液流速(Q_b)为 250 mL/min;透析液流速为 250 mL/min。血液离心(3 500 r/min)10 min,得到血浆,保存于 -20℃。

1.2.8 色谱条件 色谱柱:XY-C18(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m);流速:1.0 mL/min;流动相:0.2%磷酸:乙腈(40:60);荧光检测激发波长:265 nm;发射波长:378 nm;柱温:室温;进样量:10 μ L。

1.2.9 流动相的制备

1.2.9.1 0.2%磷酸水溶液 取 20%磷酸 10 mL 置于 1 000 mL 容量瓶,加超纯水稀释定容至刻度,摇匀,过滤,超声,于阴暗处存放备用。

1.2.9.2 0.1%甲酸水溶液 取 1 mL 甲酸置于 1 000 mL 容量瓶,加超纯水稀释定容至刻度,摇匀,过滤,超声,于阴暗处存放备用。

1.2.9.3 0.01 mol/mL 乙酸铵水溶液 称取 0.77 g 乙酸铵置于烧杯中,加水溶解,并转移至 1 000 mL 容量瓶,加超纯水稀释定容至刻度,摇匀,过滤,超声,于阴暗处存放备用。

1.2.9.4 1 mol/mL 盐酸 用量筒取 43 mL 盐酸置于 500 mL 容量瓶中,加超纯水稀释定容至刻度,摇匀,过滤,超声,于阴暗处存放备用。

1.2.10 精密度试验 取 200 μ L 空白血浆,加入浓度为 10 μ g/mL 的缬沙坦溶液 10 μ L,配置成相当于缬沙坦血药浓度为 10 μ g/mL 的质控样品,精密吸取 0.2 mL 样品,加入 0.8 mL 乙醇,涡旋震荡 3 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,微孔滤膜过滤,备用,进样分析,每浓度平行测定 6 份样品,计算精密度及相对标准偏差(RSD)。

1.2.11 稳定性试验

1.2.11.1 提取后稳定性 同“1.2.10”项下操作制备浓度为 10 μ g/mL 的样品,按照“1.2.10 项”的方法操作,分别于 0、8、16 h 进行色谱分析,计算各浓度的 RSD。

1.2.11.2 冻融后稳定性 同“1.2.10”项下操作制备浓度为 10 μ g/mL 的样品,即时测定;再冷冻保存 24 h 后,室温解冻后测定,如此冷冻、解冻连续 3 次,考察经 3 次冻融后样品稳定性,计算各浓度的 RSD。

1.2.12 回收率 同“1.2.10”项下操作制备低、中、高质量浓度(缬沙坦血浆质量浓度分别为 0.5、1.0、10.0 μ g/mL)的样品,每个浓度梯度标本各 3 份,按照

“1.2.10”项的方法操作处理,取 10 μ L 进样分析,以提取后得到有基质的峰面积与相同质量浓度的对照品工作液,直接进样得到无基质样品的峰面积之比,计算回收率。

1.2.13 标准曲线制备及线性关系考察 精密吸取缬沙坦标准品溶液,加入空白血浆,分别配置成 50.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0.1 μ g/mL 的系列对照品血浆,按“1.2.10”项的操作后进行色谱分析,并记录色谱峰面积,以对照品峰面积 A 和缬沙坦的浓度,计算缬沙坦的标准回归方程、线性范围血浆及最低检测度^[6]。

1.2.14 样品检测测定 患者单剂量口服 80 mg 缬沙坦胶囊,经过血液透析,采集所得血样分离血浆后置于冰箱保存待测。将所得血样 200 μ L,按“1.2.10”项的操作处理后进行色谱分析,记录对应的峰面积 S 样品。计算各样品浓度。

1.3 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析、t 检验及回归分析进行统计学处理。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液内缬沙坦精密度与回收率的测定 血液内缬沙坦浓度为 0.5 μ g/mL 时日内精密密度为(0.52 \pm 0.03) μ g/mL, RSD 为 5.81%, 日间精密密度为(0.51 \pm 0.01) μ g/mL, RSD 为 2.25%; 回收率为 101.23%。其余结果见表 1。

表 1 血液内缬沙坦精密度与回收率的测定

含药浓度(μ g/mL)	日内精密密度(μ g/mL)	RSD(%)	日间精密密度(μ g/mL)	RSD(%)	回收率(%)
0.5	0.52 \pm 0.03	5.81	0.51 \pm 0.01	2.25	101.23
1.0	1.31 \pm 0.06	4.54	1.12 \pm 0.04	3.63	104.58
10.0	10.6 \pm 0.12	1.13	11.1 \pm 0.26	2.35	103.52

2.2 稳定性试验 测定值与 0 h 的偏差分别为 7.31%、4.12%、2.10%。在自动进样器(4 $^{\circ}$ C)中放置 16 h,测定值与 0 h 的偏差分别为 2.43%、2.08%、1.16%。在 -20 $^{\circ}$ C 下反复冻融 3 次,测定值与 0 h 的偏差分别为 4.54%、7.44%、2.58%。表明缬沙坦在

实验条件下均具有良好的稳定性。见表 2。

2.3 血液中缬沙坦回收率及血液浓度 缬沙坦低、中、高浓度的回收率分别为(100.75 \pm 1.36)%、(103.12 \pm 1.02)%、(101.68 \pm 2.37)%, RSD 分别为 1.35%、0.99%、2.33%。见表 3。

表 2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s$, μ g/mL)

含药浓度(μ g/mL)	直接处理 0 h 后浓度	置进样器内 8 h 后浓度	置进样器内 16 h 后浓度	冻融 3 次后浓度
0.5	0.45 \pm 0.01	0.41 \pm 0.03	0.41 \pm 0.01	0.44 \pm 0.02
1.0	0.98 \pm 0.06	0.97 \pm 0.04	0.96 \pm 0.02	0.94 \pm 0.07
10.0	9.71 \pm 0.25	9.52 \pm 0.20	9.43 \pm 0.11	9.28 \pm 0.24

表 3 血液中缬沙坦回收率及血液浓度

含药浓度(μg/mL)	提取回收率(%)					血液浓度($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	RSD(%)
0.5	100.42	98.68	102.37	101.38	100.92	100.75±1.36	1.35
1.0	103.45	101.73	104.24	102.38	103.69	103.12±1.02	0.99
10.0	101.46	98.34	104.38	100.74	103.46	101.68±2.37	2.33

2.4 标准曲线制备及线性关系考察结果 缬沙坦的标准曲线方程为 $Y = 0.00120X - 0.0115$ ($r = 0.9996, n = 5$), 缬沙坦的血药浓度在 $0.1 \sim 50.0 \mu\text{g/mL}$ 时线性良好, 最低检测度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

2.5 高效液相色谱法测定血药浓度 高效液相色谱

法对采集的血浆样本进行血药浓度测定。分别得到以下参数:CC0 为透析开始时透析器静脉端血中药物浓度;CC4 为透析结束时静脉端血中药物浓度。透析过程中血药浓度下降率($\Delta C\%$) = $(CV_0 - CV_4) / CV_4$ 。见图 1、2。

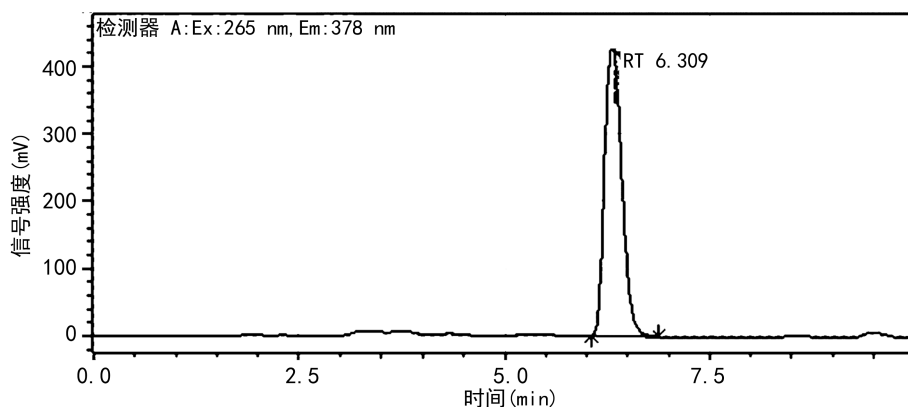


图 1 缬沙坦对照品浓度

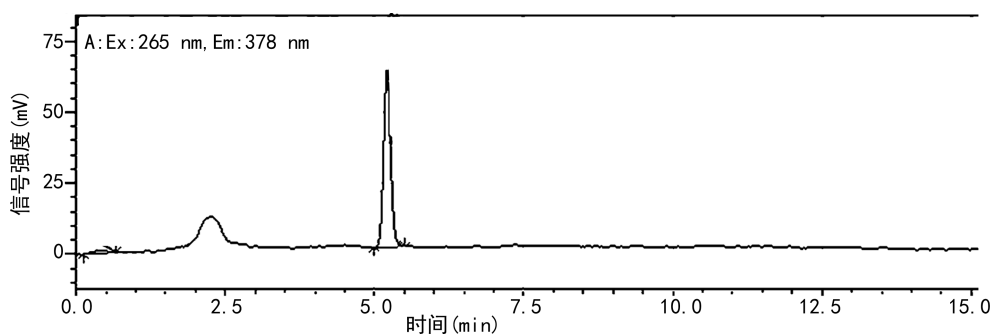


图 2 透析前后血药浓度

2.6 透析前后缬沙坦血药浓度比较 男、女患者性别比较, 差异无统计学意义($P = 0.887$)。缬沙坦平均丢失量为 $0.2 \mu\text{g/mL}$, 丢失比例为 $1/4$ 。透析后缬沙坦血药浓度 ($0.47 \mu\text{g/mL}$) 低于透析前 ($0.67 \mu\text{g/mL}$), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.7 血药浓度与年龄、血浆白蛋白、血肌酐、尿素氮的相关性 患者年龄、血浆白蛋白、尿素氮、血肌酐与血药浓度均无相关性($P > 0.01$)。

3 讨论

高效液相色谱法测定血药浓度, 简便、高效、准确^[6-7]。本研究高效液相色谱测定缬沙坦血药浓度, 分析方法研究成熟, 血样处理方法不断改进, 色谱条件清晰^[8-9]。缬沙坦胶囊蛋白结合率为 $94\% \sim$

97% ^[10]。血浆白蛋白结合率的高低, 能够显著影响其药效学与药动学特性, 对于药效发挥快慢、效价强度、血浆半衰期及代谢清除等过程有重要影响^[11]。说明书提到鉴于缬沙坦胶囊与血清白蛋白高度结合, 经透析清除的可能性低。但蛋白结合率受多种因素影响, 理论数值可能与实际情况有一定差异。本研究通过高效液相色谱法测定血液透析患者缬沙坦血药浓度, 初步探讨血液透析对缬沙坦浓度的影响。

本研究建立了一种测定血液透析患者缬沙坦血药浓度的高效液相色谱检测方法。经方法学验证缬沙坦在 $0.1 \sim 50.0 \mu\text{g/mL}$ 浓度时, 表现出良好线性关系。临床用药过程中, 考虑到联合用药及药物半衰期对检测结果的影响, 所有患者均在透析前 6 h 服用缬

沙坦。考察 0.2% 磷酸：乙腈(40：60)作为流动相对缬沙坦色谱峰的影响，峰形良好。为减少试验中的误差，分别检测低、中、高含药血浆样品，测定值与 0 h 的偏差数据表明缬沙坦在试验考察条件下稳定性良好。

缬沙坦是一种口服有活性的强力特异性血管紧张素 II 受体拮抗剂，2 h 后起到降压效果，4~5 h 后达到降压峰值，能持续 24 h 降压^[12-13]。本研究设置透析血液流速，采集透析器静脉端血液标本。样本进行离心处理得到血浆，优化流动相组成，快速检测缬沙坦血药浓度^[14]。透析过程中，血药浓度下降率无性别差异，说明服药剂量的调节不受性别影响。本研究结果显示，血液透析后患者缬沙坦平均丢失量为 0.2 μg/mL，丢失比例为 1/4。缬沙坦血药浓度明显下降，提示缬沙坦可能通过血液透析清除。临床服用缬沙坦胶囊的血液透析患者，如透析前服用缬沙坦胶囊，经过血液透析会清除药量，影响血药浓度，降低其降压效果，为预防透析结束后血压升高，建议补充服用缬沙坦。有研究证实，缬沙坦剂量增加至 160 mg/d，用于老年血液透析患者能较好地控制血压和血压变异性，尤其是对夜间血压和血压变异性的控制，能显著降低 24 h 蛋白尿量，保护患者肾功能^[15]。鉴于临床研究及本研究结果提示，透析前服用缬沙坦胶囊的患者，可以通过增加缬沙坦服药剂量，稳定血药浓度，也是稳定透析患者血压的一个较优的给药方案。对试验患者年龄与血浆白蛋白、血肌酐、尿素氮进行相关性分析，透析患者检验指标的变化与年龄均无相关性。因此，调整药物过程中，可以不考虑年龄因素对这些安全性指标的影响。但本研究还存在一些局限，如随访时间短、样本量较小等。后续还需增加样本量，进一步采用药物透析清除分数、药物透析清除率、药物经透析清除的药量、透析排药率深入研究血液透析对缬沙坦血药浓度的影响。

参考文献

- [1] 吴育莉. 高通量血液透析治疗尿毒症合并高血压的临床价值分析[J]. 中国实用医药, 2023, 18(12):46-49.
- [2] 高宝琨, 崔真, 王静雯. 尿毒症患者自体动静脉内瘘建立血管条件的彩色多普勒超声评估及其成熟的超声因素研究[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(12):1425-1429.
- [3] 刘倩, 蒲萌萌, 杨凯, 等. 长时间血液透析对尿毒症患者钙磷代谢及血压的影响[J]. 中国医药科学, 2023, 13(17):170-173.
- [4] 刘晨, 付平. α/β 受体阻滞剂在慢性肾脏病合并高血压患者中的应用[J]. 中华高血压杂志, 2023, 31(10):914-918.
- [5] 王海焯, 文斌, 许正锦, 等. 缬沙坦对维持性血液透析患者保护作用的研究进展[J]. 中国药物评价, 2022, 39(1):61-63.
- [6] 詹济华, 张春玲, 颜滢. HPLC 法测定癫痫患者丙戊酸钠血药浓度及临床应用[J]. 临床合理用药, 2023, 16(19):148-151.
- [7] 李赛, 李寿林, 苏凌璿. 高效液相色谱法测定新生儿咖啡因血药浓度及临床应用[J]. 儿科药学杂志, 2023, 29(8):31-34.
- [8] 许长江, 刘骁, 王海学, 等. 缬沙坦胶囊在人体的药物动力学及相对生物利用度[J]. 中国临床药学杂志, 2002, 11(2):91-94.
- [9] 赵志刚, 李晔, 陈旭, 等. 缬沙坦胶囊生物等效性研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(9):686-689.
- [10] 夏建平. 缬沙坦治疗心血管病患者的效果观察[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2021, 9(21):62-64.
- [11] 白玉, 范玉凡, 葛广波, 等. 色谱技术在药物-血浆蛋白相互作用研究中的应用进展[J]. 色谱, 2021, 39(10):1077-1085.
- [12] 焦宇. 缬沙坦联合氨氯地平治疗老年原发性高血压合并糖尿病的效果分析[J]. 中国社区医师, 2022, 38(30):25-27.
- [13] 平佳静. 缬沙坦胶囊处方工艺的筛选及其质量评价[J]. 抗感染药学, 2021, 18(8):1088-1092.
- [14] 郭影坤, 隋阳. 缬沙坦的血药浓度测定[J]. 当代化工, 2013, 42(2):249-252.
- [15] 血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂在慢性肾脏病患者中应用的中国专家共识专家组, 左力. 血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂在慢性肾脏病患者中应用的中国专家共识专家组[J]. 中国血液净化, 2023, 22(4):241-253.

(收稿日期:2024-03-04 修回日期:2024-07-22)