文章编号:1000-5404(2011)15-1651-02

技术方法

反相高效液相色谱法临床监测心脏瓣膜置换术后患者血浆华法林的含量

胡茂华[1],潘 峰[1],孙 玮[1],康 简[2],罗 婧[1],王丽婷[1],王 芳[1] (400038 重庆,第三军医大学科研部中心实验室[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心胸外科[2])

[摘要] **目的** 建立心脏瓣膜置换术后患者血中华法林浓度的快速、准确的高效液相色谱法(HPLC),便于华法林临床药物浓度监测,实现个体化给药。**方法** 收集西南医院、重庆医科大学附属第一医院人工机械瓣膜置换术后口服华法林抗凝治疗达稳态的患者100例的血浆样品,经正己烷-二氯甲烷(9∶1)萃取富集处理后,在310 nm紫外检测波长;流动相:甲醇∶水=75∶25(含0.2 ml冰乙酸);流速:0.9 ml/min;柱温:25 ℃条件下,经过Hypersil BDS C_{18}(200 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱分离测定。**结果** 华法林的保留时间为6.41 min,样品浓度线性方程为 $C=3.12\times10^{-3}\cdot R+0.038$,$r=0.999\ 8$,线性范围为20~2 000 ng/ml,平均回收率为97.5%,日内与日间相对精密度均小于5%。对重庆地区100例心脏瓣膜置换术后患者血浆华法林测定,其血药浓度是(845.48±388.16)ng/ml。**结论** HPLC法能快速、准确地测量心脏瓣膜置换术后患者血中华法林浓度,并能进行临床监测。

[关键词] 华法林;高效液相色谱法;血药浓度;心脏瓣膜置换术
[中图法分类号] R446.11 [文献标志码] B

华法林是一种双香豆素类抗凝血药,口服吸收完全,生物利用度达100%,与血浆蛋白的结合率为99.4%[1]。华法林通过抑制肝脏内凝血酶原和凝血因子的合成起到抗凝作用,已广泛用于血栓栓塞疾病的防治,是人工机械瓣膜置换术后预防血栓形成及体循环栓塞最常用的抗凝剂。对人工机械瓣膜置换术后血浆华法林浓度的检测,是判定口服华法林防治效果的重要指标。由于华法林用药量可以相差20倍,因此如何正确使用华法林,合理监测调整剂量,针对患者建立个体化给药方案尤为重要[2-3]。

对华法林检测的方法多采用化学方法,这些方法费时,最低检测限低[4-9],无法用于临床药物浓度监测,更不可能帮助医师建立合理的个体化给药方案。本研究将反相高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)采用甲醇和水(75∶25)作为流动相测定血浆华法林,是一种经济、快速、准确、易于操作的分析方法。该方法测定重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者血浆华法林浓度100例,其最低检测限为5 ng/ml,能快速、准确的监测抗凝治疗患者华法林血药浓度水平,帮助医师建立个体化给药方案。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

Waters公司高效液相色谱仪,510泵,Rheodyne 7725i进样器,484紫外检测器,EC2000色谱工作站。华法林标准品,购自美国Sigma公司,甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,实验用水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C18(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇∶水=75∶25(含0.2 ml冰乙酸);流速:0.9 ml/min;柱温:25 ℃;紫外检测波长:310 nm。

1.3 样品收集

选择2008年5月至2010年6月西南医院、重庆医科大学附属第一医院人工机械瓣膜置换术后口服华法林抗凝治疗达稳态,服药时间3个月以上,连续3次复查凝血酶原时间、国际标准比值在抗凝标准范围内,同时3次肝功能复查无异常的换膜患者100例,其中男性60例,女性40例,服药时间(33.83±29.36)个月,年龄4~73(45.68±13.77)岁,于末次服药15 h后采集静脉血3 ml,置枸橼酸钠抗凝管中,3 000 r/min,离心10 min,取血浆,-70 ℃冻存。入选病例在末次服药后均未发生抗凝相关的出血、溶血反应。

1.4 样品提取

取血浆1 ml置于10 ml玻璃管中,加0.5 ml 1 mol/L的HCl,混匀,加6 ml正己烷-二氯甲烷(9∶1),振荡5 min,4 000 r/min离心5 min,取有机相,室温下N_2吹干,残渣加200 μl流动相溶解,50 μl进样作色谱分析。

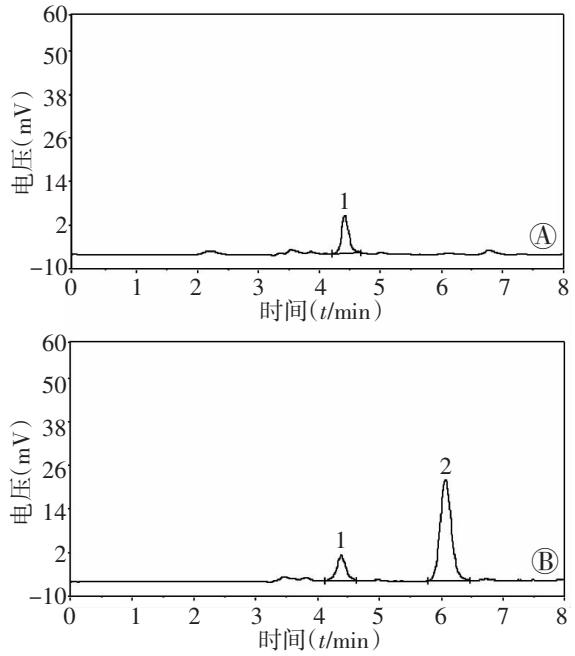
2 结果

2.1 标准曲线

准确称取华法林标准品5.00 mg,用含50%甲醇的纯水溶解,定容至5 ml,其浓度为1.00 mg/ml。稀释,加入空白血浆中,华法林浓度依次为20.00、50.00、200.00、500.00、1 000.00、

[通信作者] 潘 峰,E-mail:panfeng200609@163.com

2 000.00 ng/ml,按1.4样品提取方法处理,华法林的保留时间为6.41 min,峰面积(R)与相应浓度(C)进行线性回归,其方程为 $C = 3.12 \times 10^{-3} \times R + 0.038$,$r = 0.999\ 8$。50 μl 进样分析。见图1。



A:空白;B:样品;峰1:溶剂峰;峰2:华法林

图1 空白血浆与含华法林血浆高效液相色谱图

2.2 华法林的回收率及精密度

在空白血浆加入3种不同浓度(20.00、500.00、2 000.00 ng/ml)的华法林,求得加标准样品平均回收率为97.5%,不连续5次进样,日内相对标准偏差(rlative sandard deviation, RSD) = 2.53%(n=5),同样方法连续测定5 d,测得日间 RSD = 4.12%(n=5)。

2.3 血样分析

对重庆地区100例患者血浆华法林测定,其血药浓度是(845.48 ± 388.16) ng/ml。

3 讨论

3.1 流动相的选择

HPLC测定血中华法林含量,一般用缓冲溶液-甲醇(乙腈)作流动相,本实验用甲醇-水体系作流动相,在节约分析成本及减少环境的污染条件下达到同样的分离效果,并且色谱柱平衡快,易于清洗,在流动相加0.2%的冰乙酸,华法林峰形对称,与其他峰分离更好,该色谱条件更加值得推广。

3.2 萃取剂的选择

有报道用乙醚、乙酰乙酯、二氯甲烷及正乙烷-二氯甲烷提取血浆中的华法林[2-7],提取时发现:只有正己烷-二氯甲烷混合液提取时,杂峰少、回收率高,并且随着二氯甲烷比例的升高,华法林的回收率逐渐降低。本实验用正己烷与二氯甲烷按9∶1的比例混合后作萃取液,提取血浆中的华法林,回收率高,重现性好。

3.3 该方法建立华法林的临床药物浓度监测意义

华法林目前被广泛应用于多种疾病的抗凝剂,如非瓣膜病性房颤、瓣膜置换、电冠心病、复律、肺栓塞和深静脉血栓形成等。但是患者使用华法林疗效个体差异巨大,临床用药剂量可以相差20倍左右,而且其又易受其他因素影响其血药浓度,因此治疗窗很窄,即使很小的剂量变化都可能导致血栓或出血。因此如何正确使用华法林,合理监测调整剂量,已成为困扰临床医师的难题。华法林的剂量应因人而异,最低剂量和最佳剂量需要根据实际抗凝效果进行调整。建立不同患者的华法林依赖模型,及时调整华法林的给药剂量以避免不必要的出血或血栓形成,达到安全有效的长期抗凝效果。由于该方法从采血到结果分析,一共不到30 min,流动相采用甲醇和水(75∶25),因此该方法具有经济实惠、快速、易操作等特性,能用于华法林的临床药物浓度监测,方便医师建立患者个体化给药方案。

参考文献:

[1] 顾强,陈柏成,郝嘉,等. 重庆地区心脏机械瓣膜置换术后稳定华法林抗凝剂量的探讨[J]. 第三军医大学学报,2008, 30(7):647-649.

[2] 龚文辉,石开虎,张飞,等. 心脏机械瓣膜置换术后华法林抗凝的调整策略[J]. 临床医药实践, 2010, 19(4A): 259-262.

[3] 赵春玉, 雷霆. 华法林抗凝疗效监测的相关问题分析[J]. 中国医药指南, 2010, 8(7): 106-107.

[4] 何咏梅. 华法林临床应用研究概况[J]. 中国药师,2005, 8(2): 160-162.

[5] Malden N J, Santini A, Mather C I, *et al*. Minor oral surgery and interference with anticoagulation in patients taking warfarin: a retrospective study[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2007, 45(8): 645-647.

[6] 程司堃,张五龙,梅其炳. 极谱法测定华法林钠的含量[J]. 解放军药学学报,2002, 18(3): 178-180.

[7] 李毅. 高效液相色谱法测定人血浆中华法林浓度[J]. 中国中医药咨讯 , 2010, 2(1): 122.

[8] 张西果, 程丽霞, 董霞. 高效液相色谱法测定华法林钠有关物质[J]. 河北化工, 2009, 32: (11): 73-74.

[9] 陈纭, 黄晓晖, 唐海沁, 等. RP-HPLC法测定人血清中华法林浓度的方法学研究 [J]. 安徽医药, 2007, 11(12): 1065-1066.

(**收稿**:2011-02-17;**修回**:2011-03-02)

(编辑 王小寒)