

二维液相色谱法测定贝达喹啉血药浓度方法学的建立与临床应用^Δ

普琳梅^{1*}, 汪习成², 刘恒丽³, 王峰⁴, 宋贤^{1#} (1. 云南省传染病医院药剂科, 昆明 650301; 2. 云南省传染病医院结核科, 昆明 650301; 3. 云南省传染病医院感染科, 昆明 650301; 4. 湖南德米特仪器有限公司学术部, 长沙 410000)

中图分类号 R978.3 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)04-0430-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.04.011



摘要 目的: 为临床开展贝达喹啉的治疗药物监测工作提供可行的技术支持。方法: (1) 一维液相色谱, 一维色谱柱为 Aston SX1 (3.5 mm×25.0 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-甲醇-40 mmol/L 磷酸水溶液 (V: V: V=3: 1: 4), 二乙胺调 pH=7.0, 流速为 1.0 mL/min; (2) 二维液相色谱, 二维色谱柱为 Aston SCB (4.6 mm×100.0 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-异丙醇-45 mmol/L 磷酸水溶液 (V: V: V=7: 1: 5), 二乙胺调 pH=5.8, 流速为 1.2 mL/min; (3) 中间柱为 Aston SCB (4.6 mm×10.0 mm, 3.5 μm), 辅助流动相为纯水, 流速为 0.01 mL/min。样本检测波长为 235 nm/225 nm, 柱温为 40 ℃, 进样体积为 200 μL。结果: 贝达喹啉及其代谢产物 N-单甲基代谢物 (M2) 的浓度分别为 0.233~10.494、0.236~10.640 μg/mL 时, 与峰面积呈良好的线性关系, 其回归方程为 $Y = (2.913\ 94 \times 10^6)X - 21\ 600.2$ ($R = 0.999\ 8$); 贝达喹啉、M2 的定量下限分别为 0.233、0.236 μg/mL, 检测限分别为 0.046、0.047 μg/mL; 批内、批间精密度的考察结果显示, 贝达喹啉和 M2 的 RSD 均 <3%。准确度考察结果显示, 贝达喹啉实测浓度与理论浓度的偏差在 93.42%~104.06% 范围内, M2 的偏差在 95.86%~101.27% 范围内; 稳定性考察结果显示, 不同条件下的贝达喹啉和 M2 的 RSD 均 <3.00%; 贝达喹啉、M2 的提取回收率分别为 98.01%~98.56%、98.64%~99.01%, 转移回收率分别为 95.22%、99.00%。结论: 基于二维液相色谱法的贝达喹啉和 M2 血药浓度测定方法具有灵敏度高、重现性好、自动化程度高及样品前处理简单等特点, 符合血浆样品检测需求, 为临床患者治疗提供了崭新且实用的疗效监测手段, 也为减少抗结核新药贝达喹啉耐药性的发生提供了技术支持。

关键词 二维液相色谱法; 贝达喹啉; N-单甲基代谢物; 血药浓度; 方法学; 临床应用

Establishment and Clinical Application of Two-Dimensional Liquid Chromatography for Determination of Blood Concentration of Bedaquiline^Δ

PU Linmei¹, WANG Xicheng², LIU Hengli³, WANG Feng⁴, SONG Xian¹ (1. Dept. of Pharmacy, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Disease, Kunming 650301, China; 2. Dept. of Tuberculosis, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Disease, Kunming 650301, China; 3. Dept. of Infectious Disease, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Disease, Kunming 650301, China; 4. Dept. of Research, Hunan Demeter Instruments Company Limited, Changsha 410000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To provide feasible technical support for clinical therapeutic drug monitoring of bedaquiline. **METHODS:** (1) One-dimensional liquid chromatography, the one-dimensional column was Aston SX1 (3.5 mm×25.0 mm, 5.0 μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-40 mmol/L phosphoric acid aqueous solution (V: V: V=3: 1: 4), the pH was adjusted by diethylamine to be 7.0, with the flow rate of 1.0 mL/min. (2) Two-dimensional liquid chromatography, the two-dimensional column was Aston SCB (4.6 mm×100.0 mm, 5.0 μm), the mobile phase was acetonitrile-isopropanol-45 mmol/L phosphoric acid aqueous solution (V: V: V=7: 1: 5), the pH was adjusted by diethylamine to be 5.8, with the flow rate of 1.2 mL/min. (3) The intermediate column was Aston SCB (4.6 mm×10.0 mm, 3.5 μm), the auxiliary mobile phase was pure water, with the flow rate of 0.01 mL/min. The detection wavelength was 235 nm/225 nm, the column temperature was 40 ℃ with injection volume of 200 μL. **RESULTS:** The concentration of bedaquiline and metabolite N-monomethyl metabolite (M2) were respectively ranged from 0.233 to 10.494 μg/mL and 0.236 to 10.640 μg/mL, which showed a good linear correlation with the peak area, and the regression equation was $Y = (2.913\ 94 \times 10^6)X - 21\ 600.2$ ($R = 0.999\ 8$). The lower limits of

Δ 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (No. 2024J0317)

* 副主任药师。研究方向: 药物代谢学和临床药学。E-mail: 229065462@qq.com

通信作者: 副主任药师。研究方向: 药物代谢学和临床药学。E-mail: 57987586@qq.com

quantification of bedaquiline and M2 were respectively 0.233 and 0.236 $\mu\text{g/mL}$, and the limits of detection were respectively 0.046 and 0.047 $\mu\text{g/mL}$. Results of intra-batch and inter-batch precision investigations showed that the *RSD* of bedaquiline and M2 were both $<3\%$. Results of accuracy investigation showed that the deviation of the measured concentration from the theoretical concentration of bedaquiline was in the range of 93.42% to 104.06%, and that of M2 was in the range of 95.86% to 101.27%. Results of stability investigation showed that the *RSD* of bedaquiline and M2 under different conditions were both $<3.00\%$. The extraction recovery rates of bedaquiline and M2 were respectively 98.01% to 98.56% and 98.64% to 99.01%, the transfer recovery rates were respectively 95.22% and 99.00%. CONCLUSIONS: The determination method for blood concentrations of bedaquiline and M2 based on two-dimensional liquid chromatography has the characteristics of high sensitivity, good reproducibility, high automation and simple sample pretreatment, which meets the demand of plasma sample detection, provides new and practical means of efficacy monitoring for clinical patient treatment, and technical support for reducing the occurrence of resistance to the new anti-tuberculosis drug bedaquiline.

KEYWORDS Two-dimensional liquid chromatography; Bedaquiline; N-monomethyl metabolite; Blood concentration; Methodology; Clinical application

贝达喹啉(BDQ)是美国食品药品监督管理局过去 50 年来批准的第 1 个治疗耐多药结核病的药物,并于 2020 年 1 月 2 日正式在我国上市,该药可通过抑制结核分枝杆菌的三磷酸腺苷合成酶而破坏细菌的能量代谢,对复制和休眠的细菌均具有杀菌作用,能有效缩短结核病的治疗时间,可显著提高耐利福平结核病的治疗成功率^[1]。含有 BDQ 的化学治疗方案在我国被用于治疗耐多药结核病和广泛耐药结核病,并取得了较高的治疗成功率和良好的安全性^[2]。研究表明,BDQ 的加入明显加速了细菌的清除,且该效应的大小是由暴露量驱动的。有研究证实了足够的 BDQ 暴露水平对预期治疗反应的重要性^[3]。研究发现,BDQ 的代谢产物 N-单甲基代谢物(M2)具有很强的细胞毒性,M2 的浓度也与 BDQ 主要的药品不良反应 QTc 间期延长密切相关^[4-6]。因此,对 BDQ 开展血药浓度监测是非常必要的。由于 BDQ 上市时间较短,目前报道的血药浓度检测方法仅见于液相色谱-串联质谱法^[7]。未见其他检测方法的报道。本研究首次基于二维高效液相色谱(2 D-HPLC)法建立 BDQ 及其代谢产物 M2 的血药浓度检测方法,以期临床开展 BDQ 的血药浓度监测工作提供高效可行的技术支持。

1 材料

1.1 仪器

FLC2801 型全自动二维高效液相色谱仪(湖南德米特仪

器有限公司);HR-250A 电子分析天平(日本 AND 公司);TD-4Z 低速离心机,TG-16 S 高速离心机(四川蜀科仪器有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

BDQ、M2 对照品(瀚香生物科技有限公司),批号为(20220306、20220108);甲醇、乙腈、异丙醇(色谱纯),磷酸、二乙氨及二甲基亚砜,水为双重蒸馏去离子水(纯水仪制备,不低于 GB17323 执行标准)。空白血浆和患者血浆均由云南省传染病医院临床科室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

一维液相色谱采用一维色谱柱为 Aston SX1(3.5 mm $\times$ 25.0 mm,5.0 μm),流动相为乙腈-甲醇-40 mmol/L 磷酸水溶液($V:V:V=3:1:4$),二乙胺调 pH=7.0,流速为 1.0 mL/min。二维色谱柱为 Aston SCB(4.6 mm $\times$ 100.0 mm,5.0 μm),流动相为乙腈-异丙醇-45 mmol/L 磷酸水溶液($V:V:V=7:1:5$),二乙胺调 pH=5.8,流速为 1.2 mL/min。中间柱为 Aston SCB(4.6 mm $\times$ 10.0 mm,3.5 μm),辅助流动相为纯水,流速为 0.01 mL/min。样本检测波长为 235/225 nm,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,进样体积为 200 μL ,检测流程见表 1。

2.2 对照品溶液配制

精密称取 BDQ 对照品 5.247 mg、M2 对照品 5.32 mg,用

表 1 二维液相系统各工序的工作时间段与工作流程

项目	工序 1	工序 2	工序 3	工序 4
工作时间段	第 0—1.49 min	第 1.50—2.70 min	第 2.71—3.80 min	第 3.81—13.50 min
工作流程	第一维色谱柱工作,进行样品初级分离	第一维色谱柱与中间柱连通,样品中目标组分的捕获	第二维色谱柱与中间柱连通,洗脱样品至第二维色谱柱	样品中目标组分的分离与检测

3 mL 的 50%二甲基亚砜-甲醇溶液溶解,用甲醇溶液定容至 10 mL,配制浓度为 524.70 $\mu\text{g/mL}$ 的 BDQ 溶液、532.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 M2 母液。贝达喹啉、M2 母液各取 3 mL,混合后配置成 BDQ 浓度为 262.35 $\mu\text{g/mL}$ 、M2 浓度为 266.00 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液,母液及工作液置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 血浆样品处理

将血浆样品以 4 500 r/min 低速离心 5 min(离心半径为 12 cm),精密吸取血浆样品 400 μL 置于 1.5 mL EP 管中,加入

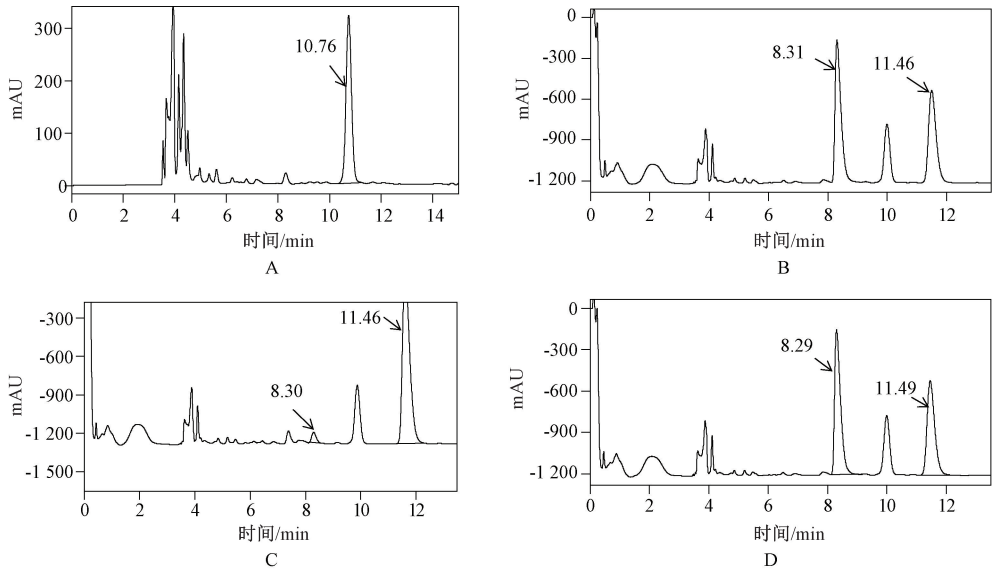
乙腈去蛋白剂 1 000 μL ,涡旋振荡 1 min,再以 14 500 r/min 高速离心 8 min(离心半径为 5 cm),然后取上清液 1 000 μL 至进样品中待测,每次进样 200 μL 。采用外标工作曲线法进行定量分析。

2.4 专属性考察

准备人空白血浆、BDQ、M2 对照品和服用 BDQ 后患者血浆,分别制备成人空白血浆溶液、人空白血浆加 BDQ 及 M2 对照品溶液、服用 BDQ 后患者血浆溶液及 BDQ 和 M2 对照品溶

液,按“2.3”项下的方法进行前处理后,按“2.1”项下色谱条件进行分析。色谱图结果显示,贝达喹林和 M2 的样本保留时间分别为 11.16 和 8.51 min,由图 1(A)—图 1(B)对照可知,在

目标峰处没有干扰的内源性物质,提示本方法可将目标峰、血浆内源性物质及其他杂质很好地分离开,以测定 BDQ 和 M2 的含量,见图 1。



A. 人空白血浆;B. 人空白血浆+BDQ、M2 对照品;C. 服药后患者血浆;D. BDQ 及 M2 对照品。

图 1 BDQ 及 M2 的二维液相色谱图

2.5 线性范围和定量下限

取包含 BDQ 浓度为 262.35 μg/mL、M2 浓度为 266.0 μg/mL 的工作液,分别用人空白血浆稀释成 BDQ 系列浓度为 0.233、1.049、3.148、5.247、6.996 及 10.494 μg/mL, M2 系列浓度为 0.236、1.064、3.192、5.320、7.093 及 10.640 μg/mL 的标准品溶液,按上述方法前处理前和色谱条件进行分析测定。分别以 BDQ、M2 的峰面积(Y)对 BDQ、M2 的浓度(X)进行线性

回归。结果显示,BDQ、M2 浓度分别为 0.233~10.494、0.236~10.640 μg/mL 时,与峰面积呈良好的线性关系,其回归方程为 $Y = (2.91394 \times 10^6)X - 21600.2$ ($R = 0.9998$)。BDQ、M2 的定量下限分别为 0.233、0.236 μg/mL (信噪比>10, $RSD < 11.00\%$),检测限为 0.046、0.047 μg/mL (信噪比>3, $RSD < 2.00\%$),完全满足 BDQ、M2 血药浓度临床检测要求,见表 2。

表 2 BDQ、M2 最低定量限和检测限

项目	实验	浓度/(μg/mL)	峰面积/(mAU × min)					平均值	标准差	RSD/%
			第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次			
定量下限(n=5)	BDQ	0.233	586 811	575 168	588 377	581 899	579 291	582 309.2	4 844.76	0.83
	M2	0.236	714 582	736 537	730 310	726 332	722 844	726 121.0	7 348.09	1.01
检测限(n=5)	BDQ	0.046	119 002	120 623	118 243	116 212	117 973	118 410.6	1 435.12	1.21
	M2	0.047	142 285	143 112	142 035	140 081	140 999	141 702.4	1 054.58	0.74

2.6 精密度与准确度考察

取含有 BDQ、M2 的工作液,用人空白血浆将其稀释成高、中及低 3 个浓度的质控品(BDQ 为 8.745、5.247 及 1.049 μg/mL, M2 为 8.867、5.320 及 1.064 μg/mL),进行方法学精密度与准确度的考察。每个浓度梯度设置 5 个平行组,测定浓度考察批内精密度的考察。连续 5 d 制备并测定浓度考察批间精密度。比较实测浓度与理论浓度的偏差。精密度考察结果显示,BDQ、M2 的 RSD 均<3%;准确度考察结果显示,BDQ 实测浓度与理论浓度的偏差在 93.42%~104.06% 范围内,M2 的偏差在 95.86%~

101.27% 范围内,表明本方法精密度与准确度的考察符合要求,见表 3。

2.7 稳定性试验

取高、中及低浓度的 BDQ(含 M2)质控溶液,不同处理,每种处理下高、中、低浓度各 5 份室温[(25±2)℃]放置 24 h;按照“2.3”项下方法预处理后室温放置 24 h;-80℃冷冻保存 10 d;反复冻融 3 次取出复温后,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果显示,BDQ、M2 的 RSD 均<3.00%,表明室温放置 24 h,预处理后室温放置 24 h,-80℃冷冻保存 10 d,反复冻融

表 3 贝达喹啉及 M2 精密度与准确度考察结果

项目	理论浓度/(μg/mL)	批内精密度(n=5)		批间精密度(n=5)		准确度(n=5)	
		实测浓度/($\bar{x} \pm s$, μg/mL)	RSD/%	实测浓度/($\bar{x} \pm s$, μg/mL)	RSD/%	实测浓度/($\bar{x} \pm s$, μg/mL)	偏差/%
BDQ	8.745	9.10±0.05	0.50	9.11±0.03	0.35	9.10±0.03	4.06
	5.247	5.07±0.02	0.43	5.09±0.01	0.22	5.10±0.03	-2.80
	1.049	0.98±0.01	0.86	0.99±0.02	1.60	0.98±0.02	-6.58
M2	8.867	8.95±0.06	0.62	8.99±0.06	0.63	8.98±0.06	1.27
	5.320	5.03±0.03	0.51	5.07±0.03	0.65	5.10±0.03	-4.14
	1.064	0.97±0.02	2.15	0.97±0.02	1.99	1.02±0.07	-4.14

3 次对 BDQ、M2 的测定结果均无影响,满足临床血药浓度监测的需求,见表 4—5。

表 4 室温放置 24 h 和预处理后室温放置 24 h 的稳定性
试验结果 (n=5)

项目	理论浓度/ (μg/mL)	质控品室温放置 24 h		质控品预处理后室温放置 24 h	
		实测浓度/($\bar{x}\pm s$, μg/mL)	RSD/%	实测浓度/($\bar{x}\pm s$, μg/mL)	RSD/%
BDQ	8.745	9.08±0.03	0.28	9.07±0.03	0.37
	5.247	5.08±0.02	0.39	5.10±0.02	0.43
	1.049	0.98±0.02	1.70	1.00±0.01	1.50
M2	8.867	8.96±0.06	0.62	8.93±0.06	0.64
	5.32	5.08±0.04	0.88	5.06±0.04	0.70
	1.064	0.97±0.02	1.99	0.99±0.03	2.58

表 5 反复冻融 3 次和-80℃保存 10 d 的稳定性
试验结果 (n=5)

项目	理论浓度/ (μg/mL)	质控品反复冻融 3 次		质控品-80℃保存 10 d	
		实测浓度/($\bar{x}\pm s$, μg/mL)	RSD/%	实测浓度/($\bar{x}\pm s$, μg/mL)	RSD/%
BDQ	8.745	9.09±0.03	0.37	9.12±0.02	0.36
	5.247	5.09±0.02	0.40	5.11±0.03	0.44
	1.049	0.99±0.02	1.37	0.97±0.02	1.59
M2	8.867	8.98±0.06	0.62	8.95±0.05	0.63
	5.320	5.11±0.04	0.99	5.09±0.04	0.70
	1.064	0.99±0.03	2.99	0.99±0.04	2.08

2.8 提取回收率

用人空白血浆及“2.1”中二维流动相配制相同浓度的高、中及低 3 个浓度质控品,按照“2.3”项下方法预处理后,保持进样量一致,每个浓度重复进样 5 次。用人空白血浆配制的峰面积平均值与二维流动相配制的峰面积进行比较,得到提取回收率,见表 6。

2.9 转移回收率(方法回收率)

2D-HPLC 系统将目标物从 LC1 转移至 LC2 的准确性和稳

表 6 贝达喹啉及 M2 的提取回收率				
项目	理论浓度/ (μg/mL)	峰面积/($\bar{x}\pm s$, mAU x min)		回收率/%
		空白血浆配制	二维流动相配制	
BDQ	8.745	22 134 056±107 197	22 457 443±113 456	98.56
	5.247	12 316 186±47 294	12 552 166±58 364	98.12
	1.049	2 341 658±16 632	2 389 203±15 687	98.01
M2	8.867	26 048 081±166 310	26 393 840±175 631	98.69
	5.320	14 638 623±75 534	14 784 994±78 531	99.01
	1.064	2 797 506±60 879	2 836 076±45 676	98.64

定性用转移回收率表示,将浓度为 26.235 μg/mL (BDQ) 及 26.60 μg/mL (M2) 的标准品溶液按照“2.1”项下色谱条件进行测定,进样体积为 10 μL,将得到的峰面积与 LC2 模式下单独通过分析柱所得到的峰面积进行比较,设置 5 个平行组,计算 BDQ、M2 的转移回收率,分别为 95.22%、99.00%,RSD 分别为 1.27%、0.35%,表明 2D-HPLC 系统的转移回收率高且稳定。

2.10 临床样本检测

选取云南省传染病医院接受 BDQ 治疗的耐药结核病患者 15 例,BDQ 采用口服给药的方式,具体剂量:第 1—2 周,1 日 400 mg;随后 6 个月,1 周服用 3 次,1 次 200 mg。治疗第 2 周结束时(即第 14 日)采集血液样本,在服药前及服药后 5 h 采集,以分别指示谷浓度和峰浓度^[8],最后计算平均浓度。血液样本按“2.3”项下方法处理,并按“2.1”项下色谱条件进行分析。结果显示,BDQ 给药负荷期结束(即第 14 日),患者血浆谷浓度范围为 0.84~3.30 μg/mL,血浆峰浓度范围为 1.47~9.99 μg/mL,平均浓度范围为 1.31~6.46 μg/mL,M2 血浆谷浓度范围为 0.15~0.51 μg/mL,血浆峰浓度范围为 0.18~0.59 μg/mL,平均浓度范围为 0.17~0.55 μg/mL,见表 7。

表 7 15 例耐药结核病患者贝达喹啉及 M2 血药浓度检测结果

样本编号	性别	年龄/岁	BDQ			M2		
			血浆谷浓度/(μg/mL)	血浆峰浓度/(μg/mL)	平均浓度/(μg/mL)	血浆谷浓度/(μg/mL)	血浆峰浓度/(μg/mL)	平均浓度/(μg/mL)
1	男性	61	1.59	7.27	4.43	0.37	0.27	0.32
2	男性	58	1.15	1.47	1.31	0.29	0.35	0.32
3	男性	18	1.57	2.52	2.05	0.22	0.29	0.26
4	男性	46	0.84	2.29	1.57	0.15	0.18	0.17
5	男性	55	2.92	9.99	6.46	0.24	0.35	0.30
6	男性	42	1.81	4.07	2.94	0.30	0.31	0.31
7	男性	45	0.89	3.23	2.06	0.20	0.28	0.24
8	男性	38	1.23	4.37	2.80	0.35	0.41	0.38
9	女性	39	3.30	4.76	4.03	0.51	0.58	0.55
10	女性	15	1.56	3.30	2.43	0.34	0.59	0.47
11	男性	60	1.77	4.36	3.07	0.26	0.48	0.37
12	女性	71	1.62	3.92	2.77	0.19	0.38	0.29
13	男性	50	1.82	6.32	4.07	0.19	0.39	0.29
14	男性	35	2.35	5.35	3.85	0.17	0.52	0.35
15	男性	36	1.74	2.60	2.17	0.33	0.39	0.36

3 讨论

有研究表明,BDQ 治疗早期的几个静态药动学指标(如治疗第 14 日的 AUC₀₋₂₄ 和药物谷浓度)与反应显著相关^[9];在负荷期结束时评估药物谷浓度是一个实际可行的选择^[10]。一项基于模型的Ⅱ期数据药动学/药效学分析发现,服药 14 d 结束后,每周平均浓度是最好的驱动因素,并估计 1.42 mg/L 的浓度会带来 50%的预期最大药物效应^[9]。这一关系在另一项研究中也得到了证实,要达到预期最大药物效应的 50%(即缩短细菌清除的半衰期),所需的典型 BDQ 平均浓度为 1.57 mg/L^[3]。

通过本研究建立的方法学,测定了 15 例耐药结核病患者服用 BDQ 14 d(负荷期结束时)的谷浓度和峰浓度,得到了平均浓度。结果显示,15 例患者中,除 1 例患者(编号 2)外,其余 14 例患者的平均浓度均达到了推荐的参考值(1.42 或 1.57 mg/L)。

另外,虽然 BDQ 可以有效治疗耐多药结核病,但使用中仍然存在许多不良反应,如 QT 间期延长、肝毒性、恶心和呕吐等。药动学研究发现,BDQ 可被细胞色素 P450 CYP3A4 代谢

(下转第 437 页)