



论文

高效液相色谱法同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度

寇惠娟^①, 叶敏^{②*}, 付强^②, 韩扬^①, 杜小莉^②, 谢静^①, 朱珠^②, 李太生^{①*}^① 中国医学科学院北京协和医学院, 北京协和医院感染内科, 北京 100730;^② 中国医学科学院北京协和医学院, 北京协和医院药剂科, 北京 100730

* 联系人, E-mail: ym6537@hotmail.com; litsh@263.net

收稿日期: 2012-01-17; 接受日期: 2012-03-09

国家科技重大专项(批准号: 2008ZX10001-006)和卫生部临床重点专项(批准号: 2010-2012)资助

摘要 为建立同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度的高效液相色谱方法, 取血浆样品 200 μL , 以地西洋为内标, 叔丁基甲醚液提取, 有机相室温下氮气吹干, 20%乙腈 100 μL 复溶, 振荡离心后取 20 μL 进样分析. 结果发现, 洛匹那韦在 0.5~20 mg/L 范围内、利托那韦在 0.05~5 mg/L 范围内线性良好($r=0.9995$ 和 0.9997). 低(1/0.25 mg/L)、中(10/2.5 mg/L)和高(18/4.5 mg/L)3 个质量浓度质控样品中, 洛匹那韦和利托那韦的日内变异分别为 2.16%~3.20%和 2.12%~2.60%, 日间变异分别为 2.34%~4.04%和 0.31%~4.94%. 方法学回收率为 99.88%~106.29%. 利托那韦、洛匹那韦和内标(地西洋)的绝对提取率分别为 79.17%, 52.26%和 91.35%. 稳定性考察结果良好. 结果显示, 本方法灵敏度高、经济简便、结果准确可靠, 为开展洛匹那韦和利托那韦的人体药代动力学研究提供了方法学基础.

关键词洛匹那韦
利托那韦
高效液相色谱法
紫外检测
血药浓度

洛匹那韦(lopinavir, LPV)是蛋白酶抑制剂的一种, 联合低剂量利托那韦(ritonavir, RTV)能够改善其药代特性, 主要通过抑制洛匹那韦在人体的代谢, 提高血浆药物浓度, 增强其抗病毒作用^[1~3]. 洛匹那韦联合低剂量利托那韦复合片剂(克立芝[®])于 2000 年被美国食品药品监督管理局批准上市, 其疗效可靠、副作用少、受食物影响小, 目前作为抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的一线或二线治疗药物实现了良好的病毒学抑制和免疫学应答, 且在发展中国家为发生耐药初治失败 HIV 患者的抗病毒治疗发挥重要作用^[4,5].

近年来, 许多研究已经证实洛匹那韦和利托那

韦的血浆浓度与临床疗效和药物相关毒副作用的发生具有显著相关性^[4~6]. 2009 年, DHHS (department of health and human services)指南指出, 洛匹那韦有效治疗血浆谷浓度阈值为 1 mg/L^[7]. Gutierrez 等人^[8]提出, 洛匹那韦血浆谷浓度与甘油三酯和胆固醇的改变有关, 患者在用药 4 周时的洛匹那韦血浆谷浓度 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 会导致其发生 2 级以上血脂异常的风险显著增加, 因此进行血药浓度监测对于提高患者依从性、减少药物不良反应、增强临床治疗效果具有重要意义^[9~12]. 已有检测方法存在仪器设备昂贵、操作步骤费时等缺点^[13~22], 在中国这样的资源有限地区普及存在困难. 因此本实验建立一个简便的高效液相色谱

英文版见: Kou H J, Ye M, Fu Q, et al. Simultaneous quantification of lopinavir and ritonavir in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with UV detection. Sci China Life Sci, 2012, 55, doi: 10.1007/s11427-012-4303-1

谱法同时测定血浆中洛匹那韦和利托那韦药物浓度, 为研究这两种药物在中国人体内的药代动力学特征提供方法学基础.

1 材料与方法

1.1 对照品与试剂

洛匹那韦对照品(上海迪塞诺公司, 批号: DH106-0706016, 纯度: 100.00%), 利托那韦对照品(上海迪塞诺公司, 批号: 090702, 纯度: 100.68%), 内标地西洋对照品(Sigma 公司, 批号: 34H0556, 纯度: 99.5%). 乙腈(SK Chemicals 公司, 纯度>99.9%), 叔丁基甲醚(TEDIA 公司, 纯度>99.8%), 甲醇(TEDIA 公司, 纯度>99.9%), 无水乙醇(TEDIA 公司, 纯度 89%~91%), 磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司, 纯度 $\geq$ 99.0%), 水为实验室超纯水.

1.2 仪器

高效液相色谱系统: LC-20AT 泵, DGU-20A 在线脱气机, SIL-20A 自动进样器, SPD-20A 可见紫外检测器以及 LC-solution 色谱处理系统(Shimadzu 公司, 日本), Ping-Pong7458 卧式震荡器(Block Scientific 公司, 德国), Vortex-Mixer 液体混合器(Upwards Biosystem 公司, 中国台湾); Mikro 12-24 离心机(Hettich 公司, 德国); Milli-Q RG 超纯水系统(Millipore 公司, 美国).

1.3 色谱条件

色谱柱为日本岛津 Shim-pack CLC-ODS(6 mm ID $\times$ 15 cm, 5 μ m)分析柱. 流动相为乙腈: 0.01 mol/L NaH_2PO_4 (pH 4.80)(60:40, 体积比), 流速 1 mL/min. 紫外检测波长为 205 nm. 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$.

1.4 样品处理

取 200 μ L 血浆样品, 加入 12 mg/L 地西洋内标溶液 20 μ L, 随后加入 1 mL 叔丁基甲醚, 400 次/min 震荡 5 min, 室温静置 5 min, 取上层有机相, 室温下氮气吹干, 20%乙腈 100 μ L 复溶, 12000 r/min 离心 5 min, 取 20 μ L 进样分析.

1.5 标准曲线和质控样品的制备

精密称取洛匹那韦标准品适量, 以水及乙醇

(50:50, 体积比)溶解后制成 400 mg/L 储备液. 精密称取利托那韦标准品适量, 以水及甲醇(70:30, 体积比)溶解后制成 100 体积比储备液. 用空白血浆和储备液配制洛匹那韦/利托那韦浓度为 20/5, 16/4, 12/3, 8/2, 4/1, 2/0.5 和 0.5/0.05 mg/L 标准系列溶液, 分装后于-60 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用. 按照 1.4 小节方法测定标准曲线样本浓度, 以浓度 $C(\text{mg/L})$ 为横坐标, 峰高比 (PHR) 为纵坐标绘制标准曲线, 并使用 SPSS13.0 统计软件进行加权最小二乘法线性回归计算. 同样方法另行配制低(1/0.25 mg/L)、中(10/2.5 mg/L)和高(18/4.5 mg/L)质量浓度质控样品, 分装后于-60 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用. 质控样品作为未知样品随同标准曲线测定, 并随机分散于待测样品中进行测定.

1.6 精密度和准确度

3 批低、中、高质量浓度质控样品分散于 1 周内测定($n=6$), 计算批间变异; 同批处理低、中、高质量浓度质控样品各 10 份, 计算批内变异. 以质控样品测定质量浓度与标示质量浓度的比值计算方法学回收率.

1.7 稳定性

将低、中、高质量浓度质控样品($n=3$)连续冻融 3 次后按照 1.4 小节方法处理, 考察其冻融稳定性; 随后, 复溶液在自动进样器中于室温下放置 0 和 24 h 后分别进样测定; 将低、中、高质量浓度质控样品($n=3$)于-60 $^{\circ}\text{C}$ 分别冻存 1 周、1 个月和 3 个月, 考察其低温状态下冻存稳定性.

1.8 药物干扰实验

配制临床上常与洛匹那韦和利托那韦合用的药物齐多夫定、拉米夫定、司他夫定、奈韦拉平、依非韦伦、替诺福韦、利巴韦林和氟康唑溶液, 直接进样, 考察其在本实验条件下是否干扰目标峰的测定.

1.9 临床标本的收集与测定

收集 HIV 感染者服用洛匹那韦和利托那韦复合片剂(克立芝[®])后 2~4 h(峰浓度)或 12 h(谷浓度)的血浆样品, 应用建立的 HPLC 方法进行测定. 给药方案为拉米夫定+替诺福韦+克立芝, 拉米夫定 300 mg/次/天, 替诺福韦 300 mg/次/天, 克立芝[®](洛匹那韦/利托那韦: 200/50 mg/片)2 片/2 次/天.

2 结果

2.1 色谱行为

在本方法色谱条件下, 处理后的空白血浆样品图谱在洛匹那韦和利托那韦峰位处背景干净, 无杂峰干扰, 洛匹那韦、利托那韦和内标地西洋峰形尖锐, 与各杂峰分离良好。内标地西洋与利托那韦和洛匹那韦的保留时间分别为 7.566, 8.838 和 9.835 min(图 1)。

2.2 线性关系

洛匹那韦在 0.5~20 mg/L 内线性良好, 线性方程: $PHR=0.2080C-0.001290(r=0.9995, n=6)$ 。利托那韦在 0.05~5 mg/L 内线性良好, 线性方程: $PHR=0.1983C-0.000931(r=0.9997, n=6)$ 。

2.3 精密度和准确度

洛匹那韦的日内和日间变异分别为 2.16%~3.20%和 2.34%~4.04%, 利托那韦的日内和日间变异分别为 2.12%~2.60%和 0.31%~4.94%, 低、中、高质量浓度质控样品的准确度在 98.77%~108.21%之间(表 1)。

2.4 回收率

利托那韦高、中、低质控样本($n=3$)的绝对回收率分别为 73.69%, 73.96%和 89.85%, 均值为 79.17%; 洛匹那韦高、中、低质控样本($n=3$)的绝对回收率分别为 50.04%, 50.27%和 56.48%, 均值为 52.26%; 内标地西洋绝对回收率为 91.35%($n=9$)。低、中、高质量浓度质控样品($n=16$)的方法学回收率在 99.88%~106.29%之间。

2.5 稳定性实验

(1) 冻融稳定性。低、中、高质量浓度质控样品($n=3$)连续冻融 3 次稳定性良好(表 2)。

(2) 提取后样本室温放置的稳定性。低、中、高质量浓度质控样品($n=3$)提取后于室温在自动进样器内放置 24 h 稳定性良好, $RSD<7\%$ (表 3)。

(3) 冻存稳定性。低、中、高质量浓度质控样品($n=3$)于 -60°C 冻存的 3 个月内稳定性良好, $RSD<8\%$ (表 4)。

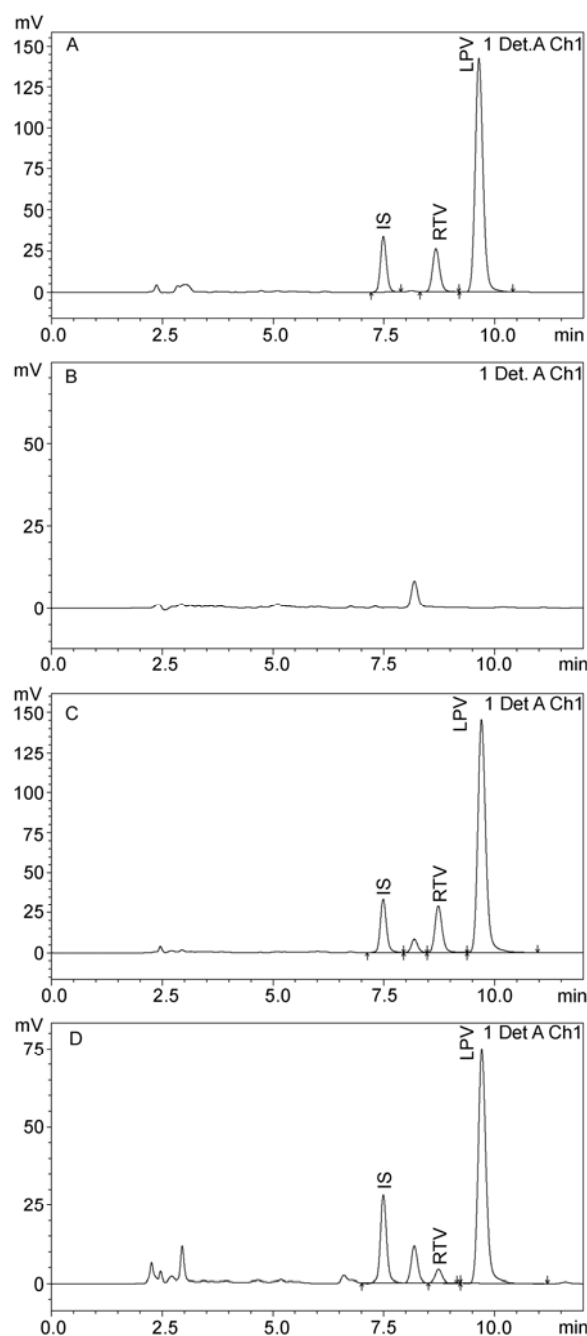


图 1 测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦的 HPLC-UV 方法图谱($\lambda=205\text{ nm}$)

A: 内标地西洋、利托那韦和洛匹那韦水溶液对照品; B: 空白血浆; C: 空白血浆加内标和对照品; D: 服用洛匹那韦和利托那韦患者血浆样本色谱图。洛匹那韦: 10.89 mg/L; 利托那韦: 0.79 mg/L。

2.6 药物干扰实验

齐多夫定、拉米夫定、司他夫定、奈韦拉平、依

非韦伦、替诺福韦、利巴韦林和氟康唑在本实验条件下均不干扰目标峰洛匹那韦和利托那韦的测定。

2.7 临床样本测定

共采集 3 名 HIV 感染者随访 48 周血浆样品, 每

3 个月随访一次, 患者基线资料详见表 5。血药浓度测定结果表明, 3 名患者洛匹那韦血浆谷浓度均值为 5.90 mg/L(3.18~12.66 mg/L), 利托那韦血浆谷浓度最小值为 0.28 mg/L, 已超过其定量下限 6 倍(表 6 和图 2)。患者 03 第 8 周采集的血浆样品为峰浓度标本, 第

表 1 方法精密度和准确度^{a)}

药品	质控样品浓度 (mg L ⁻¹)	日内变异(n=10)			日间变异(n=6)		
		$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)	$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)
LPV	18	19.45±0.48	108.07±2.68	2.48	18.34±0.46	101.91±2.57	2.53
	10	10.82±0.23	108.21±2.34	2.16	10.31±0.24	103.09±2.41	2.34
	1	0.99±0.03	98.92±3.16	3.20	1.01±0.04	101.47±4.10	4.04
RTV	4.5	4.70±0.11	104.40±2.52	2.41	4.49±0.01	99.83±0.31	0.31
	2.5	2.66±0.07	106.23±2.77	2.60	2.55±0.05	101.92±1.87	1.83
	0.25	0.25±0.01	98.77±2.10	2.12	0.25±0.01	101.74±5.03	4.94

a) 回收率(REC)=测定值/理论值×100; 相对标准差(RSD)=SD/测定值×100

表 2 冻融稳定性(n=3)

质控样品浓度 (mg L ⁻¹)	LPV			质控样品浓度 (mg L ⁻¹)	RTV		
	$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)		$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)
18	17.43±0.54	97.00±3.03	3.12	4.5	4.26±0.20	94.72±4.51	4.76
10	10.11±0.19	101.09±1.94	1.92	2.5	2.52±0.03	100.63±1.28	1.27
1	1.00±0.02	100.14±1.77	1.77	0.25	0.25±0.00	97.90±1.51	1.54

表 3 提取后样本室温放置的稳定性(n=3)

药品	质控样品浓度 (mg L ⁻¹)	0 h(n=3)			24 h(n=3)		
		$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)	$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)
LPV	18	19.57±0.21	108.74±1.17	1.08	18.09±0.32	100.51±1.77	1.76
	10	10.55±0.50	105.48±5.03	4.77	9.89±0.60	98.87±5.97	6.04
	1	1.00±0.07	100.42±6.69	6.66	0.94±0.04	94.17±4.29	4.55
RTV	4.5	4.71±0.10	104.63±2.16	2.06	4.50±0.07	99.88±1.49	1.49
	2.5	2.50±0.12	100.13±4.70	4.69	2.55±0.11	101.84±4.56	4.48
	0.25	0.25±0.01	101.12±3.63	3.59	0.24±0.01	97.60±5.18	5.31

表 4 冻存稳定性(n=3)

质控样品浓度		1 周			1 月			3 月		
		$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)	$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)	$\bar{x} \pm SD$ (mg L ⁻¹)	REC(%)	RSD(%)
LPV	18	18.09±0.61	100.52±3.39	3.37	17.70±0.42	98.31±2.34	2.38	16.87±1.13	93.75±6.27	6.69
	10	10.62±0.35	106.24±3.50	3.29	9.63±0.16	96.32±1.61	1.67	9.89±0.14	98.86±1.44	1.46
	1	1.05±0.07	104.80±6.59	6.29	1.04±0.03	104.10±2.67	2.57	1.08±0.03	108.28±3.50	3.23
RTV	4.5	4.64±0.16	103.05±3.52	3.42	4.31±0.12	95.83±2.59	2.71	4.49±0.32	99.73±7.17	7.19
	2.5	2.61±0.09	104.46±3.74	3.58	2.41±0.04	96.32±1.54	1.60	2.51±0.03	100.52±1.07	1.07
	0.25	0.25±0.01	101.39±3.42	3.37	0.27±0.00	107.30±1.39	1.29	0.25±0.01	100.22±2.50	2.50

表 5 患者基线资料

	患者 01	患者 02	患者 03
性别	男性	女性	女性
年龄(岁)	46	34	41
体质量指数(kg/m ²)	64	48	54
感染途径	血液	异性	异性
病程(年)	13	10	10
病毒载量(log ₁₀ C/mL)	4.41	4.73	3.91
CD4 细胞计数(细胞/mm ³)	155	272	254
合并乙肝病毒感染	—	—	—
合并丙肝病毒感染	+	—	—

表 6 患者血浆样品测定结果^{a)}

	LPV 谷浓度(mg/L)						RTV 谷浓度(mg/L)					
	4 周	8 周	12 周	24 周	36 周	48 周	4 周	8 周	12 周	24 周	36 周	48 周
患者 01	6.11	6.29	9.45	7.18	5.77	3.18	0.33	0.52	0.64	0.54	0.53	0.24
患者 02	9.91	10.79	12.66	6.63	8.04	7.75	0.75	0.48	0.75	0.74	0.70	0.98
患者 03	4.77	—	4.89	5.11	3.49	—	0.48	—	0.42	0.43	0.28	—

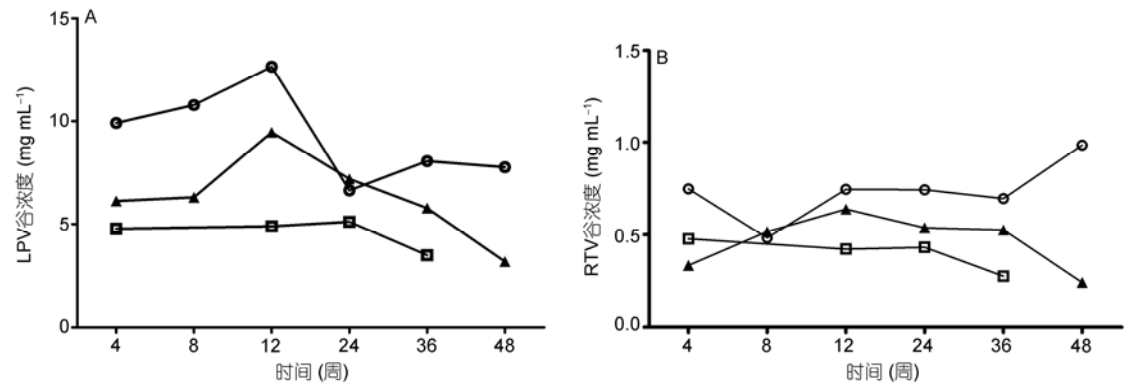


图 2 3 名 HIV 感染者随访 48 周内的洛匹那韦(A)和利托那韦(B)血浆谷浓度

▲: 患者 01; ○: 患者 02; □: 患者 03

48 周血浆样品未获得。

3 讨论

国外有研究报道同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦药物浓度的方法,但是质谱仪器设备无法广泛普及,及固相萃取方法昂贵费时等缺点都限制了这些测定方法在资源有限地区的应用。本实验采用液相萃取,对洛匹那韦和利托那韦同时进行处理,提高提取效率,减少操作成本,缩短检测时间,适合进行大批量样品检测。

通过比较乙腈、甲醇蛋白沉淀法以及观察叔丁基甲醚、乙醚和氯仿液提取的效果,发现叔丁基甲醚液

相提取效率高、杂峰出现少、灵敏度高,因此被选作本实验溶剂。

对于内标的选择,国外许多研究报道 A-86093^[19-24]作为内标物可以达到与目标峰很好的分离,但是该内标物目前国内无法获得,最终经过多种药物的筛选发现地西洋作为内标在本液相条件下可以与目标峰达到良好分离。

对于流动相的选择,最初采用不同比例的乙腈-水对样本进行分离,后经多次实验摸索发现调节乙腈与 NaH₂PO₄ 水溶液的配比以及改变 NaH₂PO₄ 水溶液的离子强度和 pH 都对目标峰的分离产生影响。最后发现乙腈:NaH₂PO₄(0.01 mg/L, pH 4.80)(60:40, 体积比)可以较好地洗脱内标与目标峰,使得洛匹那

韦和利托那韦峰形尖锐, 灵敏度高^[25].

4 结论

本实验建立了操作简便快速、灵敏度高、重现性

好的高效液相色谱法, 同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦药物浓度. 对临床标本的测定表明, 本方法能够满足治疗药物监测及临床药代动力学研究的要求, 为进一步研究其血浆药物浓度与药物疗效及毒副作用的相关性奠定了方法学基础.

参考文献

- 1 Barragan P, Podzamczar D. Lopinavir/ritonavir: a protease inhibitor for HIV-1 treatment. *Expert Opin Pharmacother*, 2008, 9: 2363–2375
- 2 Cvetkovic R S, Goa K L. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*, 2003, 63: 769–802
- 3 Kaplan S S, Hicks C B. Lopinavir/ritonavir in the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Expert Opin Pharmacother*, 2005, 6: 1573–1585
- 4 Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Amornnimit W, et al. Treatment outcomes and plasma level of ritonavir-boosted lopinavir monotherapy among HIV-infected patients who had NRTI and NNRTI failure. *AIDS Res Ther*, 2009, 6: 30
- 5 Josephson F, Andersson M C, Flamholz L, et al. The relation between treatment outcome and efavirenz, atazanavir or lopinavir exposure in the NORTHIV trial of treatment-naïve HIV-1 infected patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66: 349–357
- 6 Hsu A, Isaacson J, Brun S, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of lopinavir-ritonavir in combination with efavirenz and two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in extensively pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 350–359
- 7 DHHS. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. <http://AIDSinfo.nih.gov>, 2009
- 8 Gutierrez F, Padilla S, Navarro A, et al. Lopinavir plasma concentrations and changes in lipid levels during salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2003, 33: 594–600
- 9 Hammer S M, Eron J J Jr, Reiss P, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *Jama*, 2008, 300: 555–570
- 10 Thompson M A, Aberg J A, Cahn P, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *Jama*, 2010, 304: 321–333
- 11 la Porte C J, Colbers E P, Bertz R, et al. Pharmacokinetics of adjusted-dose lopinavir-ritonavir combined with rifampin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1553–1560
- 12 Sham H L, Kempf D J, Molla A, et al. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 3218–3224
- 13 D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M, et al. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 859: 234–240
- 14 Colombo S, Guignard N, Marzolini C, et al. Determination of the new HIV-protease inhibitor atazanavir by liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 810: 25–34
- 15 Droste J A, Verweij-Van Wissen C P, Burger D M. Simultaneous determination of the HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nelfinavir, the nelfinavir hydroxymetabolite M8, and nevirapine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit*, 2003, 25: 393–399
- 16 Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, et al. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33: 1426–1429
- 17 Proust V, Toth K, Hulin A, et al. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of the antiretroviral agents amprenavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, delavirdine and efavirenz in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 742: 453–458
- 18 Marzolini C, Beguin A, Telenti A, et al. Determination of lopinavir and nevirapine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction: application for the assessment of their transplacental passage at delivery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 774: 127–140
- 19 Ray J, Pang E, Carey D. Simultaneous determination of indinavir, ritonavir and lopinavir (ABT 378) in human plasma by high-performance

- liquid chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 775: 225–230
- 20 Takahashi M, Yoshida M, Oki T, et al. Conventional HPLC method used for simultaneous determination of the seven HIV protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1286–1290
- 21 Usami Y, Oki T, Nakai M, et al. A simple HPLC method for simultaneous determination of lopinavir, ritonavir and efavirenz. Chem Pharm Bull, 2003, 51: 715–718
- 22 Elens L, Veriter S, Di Fazio V, et al. Quantification of 8 HIV-protease inhibitors and 2 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors by ultra-performance liquid chromatography with diode array detection. Clin Chem, 2009, 55: 170–174
- 23 Remmel R P, Kawle S P, Weller D, et al. Simultaneous HPLC assay for quantification of indinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir in human plasma. Clin Chem, 2000, 46: 73–81
- 24 Solas C, Poizot-Martin I, Drogoul M P, et al. Therapeutic drug monitoring of lopinavir/ritonavir given alone or with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. Br J Clin Pharmacol, 2004, 57: 436–440
- 25 Gavard L, Gil S, Peytavin G, et al. Placental transfer of lopinavir/ritonavir in the *ex vivo* human cotyledon perfusion model. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195: 296–301