

万古霉素血药浓度监测方法的建立及稳定性考察

罗奕*, 刘文, 邓楠, 戴迎春
(湖南省人民医院药学部, 长沙 410005)

[摘要] 目的: 建立一快速、准确的 RP-HPLC 方法测定人血清中万古霉素血药浓度, 并考察方法的稳定性。方法: 以甲硝唑为内标, 采用 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 以 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为分析柱; 流动相为乙腈-0.01 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液 (7:93); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 236 nm; 柱温 30 °C。血浆样品用 30% 的硫酸锌溶液沉淀蛋白后, 取上清液 20 μL 进样分析, 对血样处理前后及标准溶液保存不同时间后的稳定性进行了考察。结果: 色谱峰分离良好, 无干扰。万古霉素最低检测浓度为 0.252 4 mg · L⁻¹, 线性范围 0.504 8 ~ 126.2 mg · L⁻¹, 线性方程为 $Y = -1.94 \times 10^{-2}X + 0.653$ ($r = 0.999\ 3$)。相对回收率大于 95%, 高、中、低 3 个浓度的样品萃取回收率均大于 78%, 血样未经处理前 4 °C 条件下能在 1 周内保持较好稳定性, 血样处理后 48 h 内样品能保持较好稳定性, 而标准溶液有效保存期为 6 个月。结论: 本方法是一种可靠、快速灵敏的检测方法, 适用于万古霉素的血药浓度监测。

[关键词] 万古霉素; 高效液相色谱法; 血药浓度监测; 稳定性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0133-03

Establishment of Method of Vancomycin in TDM and Study of Stability

LUO Yi*, LIU Wen, DENG Nan, DAI Ying-Chun

(Department of Pharmacy of People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method to determine the concentration of vancomycin (VAN) in human plasma and study the stability of vancomycin in different condition. **Method:** The metonidazole was used as inter standard (I. S.) The analytical column was a Kromasil C₁₈ column connected with the Agilent 1100 HPLC system. The isocratic mobile phase was the acetonitrile and buffer of KH₂PO₄ (0.01 mol · L⁻¹) with the rate of (7:93). The detective UV wavelength was 236 nm and the column temperature was 30 °C. The plasma samples, added metonidazole as internal standard, were deposited down the protein with 30% ZnSO₄ and 20 μL of the upper phase was injected into the sampler. The stability of the samples in different conditon were studied. **Result:** The chromatography was good and not interfered by the components of the plasma. The linear equation was $Y = -1.94 \times 10^{-2}X + 0.653$ ($r = 0.999\ 3$). The recovery of vancomycin in different concention were all >78%. The samples were stability in 4 °C for a week, the standard solution of vancomycin were stablity for a half year. **Conclusion:** This is a accurate, sensitive and conventient method for the dertermination of VAN in the therapeutic drug monitoring.

[Key words] vancomycin; HPLC; TDM; stability

万古霉素 (vancomycin, VAN) 属糖肽类抗菌药

物, 临床主要用于革兰阳性菌感染, 尤其是耐甲氧西林金葡菌和表皮葡萄球菌、肠球菌引起的感染, 是目前治疗此类耐药菌重症感染的首选抗菌药。万古霉素主要经肾小球滤过而排出体外, 它有一定肾毒性, 肾功能不全者, 药物的半衰期延长、血药浓度升高, 而使药物的肾毒性增加^[1-3]。万古霉素肾毒性的发

[收稿日期] 2011-01-21

[通讯作者] * 罗奕, 学士, 副主任药师, 研究方向: 医院药学,
Tel: 0731-82278323, Fax: 0731-82278321, E-mail:
hnryyjk@163.com

生与谷浓度过高有关,需要进行治疗药物监测。用高效液相色谱法进行万古霉素的血药浓度测定的报道不少。本试验参照有关文献^[4-6],建立了该药的人血清浓度测定方法,并考察了血样中万古霉素在不同条件下的稳定性。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,包括 Agilent G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1379B 检测器及手动进样器, Agilent 1100 化学工作站。

1.2 试剂与试药 万古霉素对照品(批号 100138-200603)和甲硝唑对照品(批号 110773-200611)由中国药品生物制品检定所提供,甲醇、己腈为色谱纯,购于 Sigma 公司,水为本院自制二重蒸馏水。健康人空白血清由本院输血科提供。磷酸二氢钾,硫酸锌为分析纯,购于长沙市有机试剂厂。

1.3 对照品溶液的配制 精密称取 VAN 对照品 6.31 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇-水(50:50)溶液溶解并稀释至刻度,配成 $252.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液,于 4°C 冰箱中保存,使用时用甲醇稀释至所需浓度。精密称取甲硝唑对照品适量,用甲醇-水(50:50)溶解配制成浓度为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液,于 4°C 冰箱中保存。

2 方法与结果

2.1 血样处理 取血清样品 200 μL ,加入内标溶液 50 μL ,涡旋混合 30 s,再加入 20% 的硫酸锌溶液 30 μL ,涡旋混合 60 s, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 20 μL 进样分析。

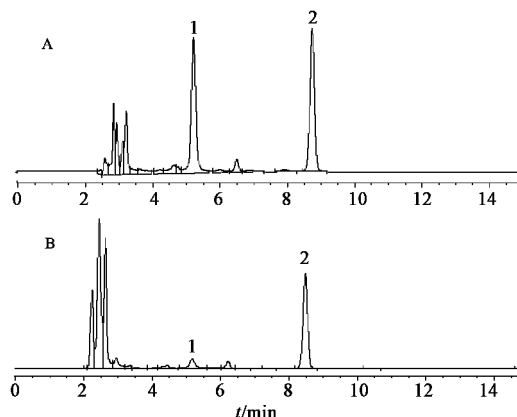
2.2 色谱条件及色谱行为 Kromasil C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.01 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 溶液(7:93),流速 1.0 mL $\cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 236 nm,柱温 30°C ,灵敏度 0.05 AUFS。

2.3 标准曲线的制备 用空白血清和 VAN 贮备液分别配制浓度为 0.504 8, 2.524, 12.62, 25.24, 50.48, 75.72, 126.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VAN 系列标准血清样品。同法配制浓度为 2.524, 25.24, 75.72 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控血清样品,分装于一塑料离心管中置 -20°C 冰箱保存备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 分别取空白血清、对照品溶液、标准血清样品及患者用药后的血清样品,按 2.1 项方法处理后进样分析,考察 VAN 的色谱行为。空白血

清图谱在 VAN 出峰处背景干净,无明显杂峰干扰;VAN 峰峰形尖锐且分离良好;保留时间为 5.05 min 左右,内标物甲硝唑的保留时间为 8.60 min 左右,内源性物质、合并用药等及万古霉素的代谢产物对 VAN 和内标的测定目标峰均无干扰,见图 1。



A. 万古霉素 + 空白血清; B. 病人血样;

1. 万古霉素; 2. 甲硝唑(内标)

图 1 各物质色谱

2.4.2 标准曲线绘制 用空白血清和 VAN 贮备液分别配制浓度为 0.504 8, 2.524, 12.62, 25.24, 50.48, 75.72, 126.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VAN 系列标准血清样品,按 2.1 项方法处理后进样分析,测定 MTX 的浓度。以 VAN 浓度(X)为横坐标, VAN 峰面积与内标峰面积比(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = -1.94 \times 10^{-2} X + 0.653$ ($r = 0.9993$)。表明本方法的 VAN 检测浓度在 0.504 8 ~ 126.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,血清最低检测浓度为 0.252 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N \geq 3$)。

2.4.3 精密度及方法回收率 用空白血清和 VAN 贮备液分别配制浓度为 2.524, 25.24, 126.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控血清样品,分别作精密度和回收率试验,见表 1。

表 1 VAN 回收率及精密度($n=5$)

标示浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	萃取回收率 $/\%$	方法回收率 $/\%$	RSD $/\%$	
			日内	日间
2.524	78.9 ± 6.4	95.2 ± 4.7	5.1	6.9
25.24	85.4 ± 4.9	98.2 ± 3.8	4.2	5.7
126.2	82.3 ± 5.9	97.8 ± 4.0	4.5	6.4

2.4.4 萃取回收率 取上述质控血清样品,按 2.1 项方法操作,测得 VAN 峰面积 M_1 ,同时配制与各浓度质控样品相同标示量的水溶液直接进样,测得 VAN 峰面积 M_2 ,计算各浓度样品提取回收率(萃取回收率 = $M_1/M_2 \times 100\%$)结果见表 1。

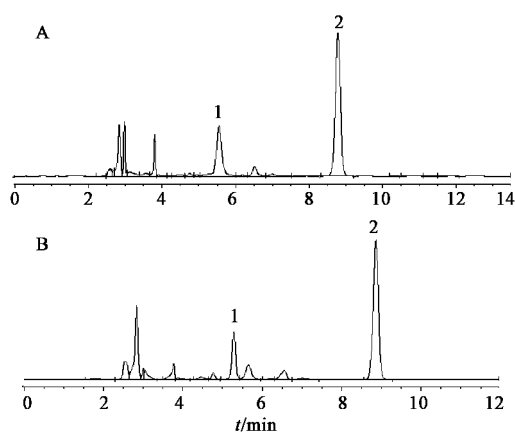
2.4.5 稳定性考察

2.4.5.1 血浆样品处理前稳定性考察 于 190 μL 空白血浆中精密加入万古霉素对照品储备液 10 μL , 配制质量浓度为 25.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品 5 份, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别放置 0, 24, 48 h 和 1 周后按 2.1 项下操作, 不加内标, 进样 20 μL , 记录峰面积, 计算此条件下与 0 h 峰面积比率, 分别为 100.7%, 98.7%, 99.3%, 峰面积平均 RSD 为 3.1%, 表明血浆样品在 1 周内保持稳定。

2.4.5.2 血浆样品处理后稳定性考察 于 190 μL 空白血浆中加入万古霉素对照品储备液 10 μL , 配制成质量浓度为 25.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品 5 份, 按 2.1 项下操作, 不加内标, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 0, 2, 4, 8, 48 h 后进样分析, 记录峰面积, 计算与 0 h 峰面积的比率, 8 h 内峰面积的平均 RSD 为 7.4%, 表明血浆样品经处理后在 8 h 内可保持稳定, 48 h 时样品含量下降至原来的 43.7%。

2.4.5.3 冻融稳定性考察 于 190 μL 空白血浆中加入万古霉素对照品储备液 10 μL , 配制成质量浓度为 25.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品 5 份, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻后于室温(25 $^{\circ}\text{C}$ 以下)解冻, 反复冷冻解冻 3 次, 按 2.1 项下操作, 不加内标, 进样 20 μL , 记录峰面积, 计算与未冻融血样的峰面积百分比率, 结果平均比值为 95.3%, RSD 8.4%。表明血样冻融后能保持稳定。

2.4.5.4 对照品溶液稳定性考察 取 VAN 标准溶液(156.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存 6, 12 个月后测定其含量, 见图 2, 可见在 -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存 12 个月后 VAN 发生了降解。



A. 万古霉素标准溶液放置 6 个月后; B. 万古霉素标准溶液放置 12 个月; 1. 万古霉素; 2. 甲硝唑(内标)

图 2 万古霉素标准溶液色谱

3 临床样品测定

对临床 50 例应用万古霉素进行治疗的儿童重

症感染患者进行监测, 其中有 19 例患儿在应用 VAN 治疗后 5 d 后的 VAN 血清浓度低于 5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中又有 14 例病人的血清浓度低于 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其余 31 例患儿中有 8 例浓度大于 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 停药后检测并未出现较明显的肾功能损害现象, 其他 23 例患者浓度在 5 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 由此说明 VAN 在患儿中具有较大个体差异, 对其进行血药浓度监测非常有必要。

4 讨论

血样处理方法的选择直接影响 HPLC 的应用效果, VAN 血样处理方法常用的有固相萃取法^[5]和直接沉淀法^[6], 其中以直接沉淀法更为简便、快捷。本文采用 30% ZnSO_4 沉淀蛋白后直接进样, 所用沉淀剂较少, 灵敏度较高。由于 VAN 相对不稳定, 见光易分解, 其标准品溶液应放置在 -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。VAN 血样处理前于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 周能保持相对稳定, 而经处理后, 血样在 8 h 内保持相对稳定, 48 h 后 VAN 发生了严重降解。因此, 血样处理后应尽快进样分析; 血样经反复冻融后 VAN 也能保持相对稳定; 标准溶液在 -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 6, 12 个月的稳定性情况, 发现标准溶液在保存 6 个月无明显变化而 12 个月发生了降解。因此, 我们设定了 VAN 标准溶液的有效期为 6 个月, 一个标准溶液配置后应用 6 个月需要从新配置新的标准溶液, 这样就能保证临床所测样本的准确性。

【参考文献】

- [1] 陆华, 何成章, 杨莹. 我院 41 例万古霉素血药浓度监测与临床用药分析 [J]. 中国药房, 2010, 21 (26): 2430.
- [2] 徐进, 许静, 李燕, 等. 新生儿的万古霉素血药浓度监测及安全性评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27 (9): 1200.
- [3] 朱曼, 郭代红, 刘皈阳, 等. 万古霉素血药浓度监测与临床用药行为分析 [J]. 中国药房, 2010, 21 (14): 1282.
- [4] 徐兵, 李昕, 张莉. 反相高效液相色谱法测定患者血浆中万古霉素的浓度 [J]. 中南药学, 2009, 7 (2): 100.
- [5] 路伟, 王蔓琳, 李成, 等. 固相萃取高效液相色谱法测定人血清中万古霉素浓度 [J]. 实用药物与临床, 2010, 13 (3): 188.
- [6] 袁孔现, 黄义泽, 毛名扬, 等. RP-HPLC 法测定万古霉素血药浓度 [J]. 安徽医药, 2010, 14 (2): 163.

【责任编辑 蔡仲德】