

• 药物与临床 •

危重症感染患者血清中替考拉宁浓度测定

胡萨萨, 庞成森, 董海燕, 董亚琳 (西安交通大学医学院第一附属医院药学部, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法快速测定人血清中替考拉宁浓度的方法, 并用于危重症感染患者治疗药物监测。方法: 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠乙腈-甲醇(70:25:5, pH 2.1), 流速1.0 mL·min⁻¹。紫外检测波长为 240 nm, 进样量 20 μL, 柱温25℃。结果: 替考拉宁在5.63~125.00 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r = 0.9995$), 最低定量限为 5.63 mg·L⁻¹, 提取回收率为95.13%, 方法回收率为98.13%, 日内、日间精密度的 RSD 分别为 3.2% 和 6.8%。另外, 所监测的 8 例肾功能不全患者中, 有 50% (4/8) 患者替考拉宁质量浓度小于 10 mg·L⁻¹。结论: HPLC 简便、灵敏、快速、重复性好, 可用于危重症感染患者替考拉宁的血药浓度监测; 危重症感染患者应用替考拉宁后血药浓度变化较大, 需要通过治疗药物监测的方法制定个体化给药方案。

[关键词] 高效液相色谱法; 治疗药物监测; 替考拉宁

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)09-0753-03

Determination of teicoplanin serum concentration in critically ill patients

HU Sa-sa, PANG Cheng-sen, DONG Hai-yan, DONG Ya-lin (Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Shanxi Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To validate a high performance liquid chromatography (HPLC) method for serum teicoplanin measurement and using the method for clinical monitoring the levels of teicoplanin in critically ill patients. **METHODS** HPLC analysis was performed using a Hypersil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was NaH₂PO₄ (0.01 mol·L⁻¹): acetonitrile: methanol = 70:25:5 (pH 2.1). The flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 240 nm. The injection volume was 20 μL and the temperature of column was about 25℃. **RESULTS** The concentration range of teicoplanin was 5.63~125.00 mg·L⁻¹ while the calibration curve showed good linearity ($r = 0.9995$), and the minimum limit of quantitation was 5.63 mg·L⁻¹. The coefficient of abstraction recovery and methods recovery were 95.13% and 98.13%, respectively. The relative standard deviations (RSD) of intraday and interday were 3.2% and 6.8%, respectively. Moreover, the concentration of teicoplanin was lower than 10 mg·L⁻¹ in fifty percent of those 8 patients with insufficient renal function. **CONCLUSION** This analytical method is simple, robust, rapid and highly reproducible, and it could be used in detecting the concentration of teicoplanin for critically ill patients. The concentration of teicoplanin has a large fluctuation in critically ill patients and their suitable individual dosage regimen need to be administrated through therapeutic drug monitoring.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; therapeutic drug monitoring; teicoplanin

替考拉宁(teicoplanin, TEC)是继万古霉素后研制的治疗革兰阳性球菌的糖肽类抗菌药物, 目前仍与万古霉素共同作为确诊或疑似的院内威胁生命的多重耐药革兰阳性菌感染的有力武器。替考拉宁较万古霉素具有特殊的优点, 如高的蛋白结合率(超过 90%), 半衰期显著延长(30~170 h), 除静脉给药外亦可肌肉注射, 药物不良反应(如肾毒性或红人综合征)发生率较低等^[1]。一般认为, 替考拉宁血浆谷值>10 mg·L⁻¹对多数重症感染是适当的, 但对于心内膜炎和骨或假体感染浓度应超过 20 mg·

L⁻¹^[2-3]。而危重症患者的病情随时变化, 用药后个体内血药浓度也可能发生较大变化, 故需考虑用药过程中血药浓度波动带来的高危影响。所以, 近年来对于危重症患者开展替考拉宁治疗药物监测的重要性已经凸现。

目前有 3 种方法可监测替考拉宁的血药浓度: 微生物法^[4]、HPLC 法^[5]、荧光偏振免疫法(FPIA)^[4]。HPLC 法相比其他两种方法具有专属性好、灵敏度高、费用合理等优点而广泛用于治疗药物监测。本研究建立了更为简便的监测替考拉宁血

[作者简介] 胡萨萨, 女, 硕士, E-mail: howtofly.00@gmail.com [通讯作者] 董亚琳, 女, 主任药师, 电话: 029-85323243, E-mail: dongyalin@medmail.com.cn

药浓度的 HPLC 法,并对部分应用替考拉宁的危重患者开展了治疗药物监测,以促进个体化给药,降低耐药的发生^[6-7]。

1 材料

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2996 型光电二极管矩阵检测器, Empower 色谱工作站; 替考拉宁对照品(意大利 Gruppo Lepetit S. P. A., 批号 A7698); 哌拉西林钠(华北制药集团北元有限公司, 批号 0610701); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为纯化水。

2 方法

2.1 色谱条件^[5] 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠-乙腈-甲醇(70:25:5)(磷酸调 pH 2.1); 柱温: 25℃; 检测波长: 240 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 样品处理与测定 精密吸取血清样品 0.40 mL, 加入 50 μL 100 mg·L⁻¹ 哌拉西林钠内标储备液, 加入 600 μL 乙腈, 混旋 20 s, 离心(10 000 r·min⁻¹, 5 min), 取上清 600 μL, 加入氯仿 400 μL, 混旋 20 s, 离心(10 000 r·min⁻¹, 5 min), 取上清液 20 μL 进样。

2.3 方法专属性 取空白血清、含替考拉宁对照品的血清、患者血样, 按“2.2”项下方法操作; 另取替考拉宁对照品溶液和哌拉西林钠内标溶液, HPLC 分析测定。

2.4 标准曲线的绘制 配制含替考拉宁 125, 90, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 5.63 mg·L⁻¹ 的系列血样。按“2.2”项下方法操作, 以替考拉宁峰组分 TA₂₂ 面积(A_替)与哌拉西林钠(A_哌)峰面积的比值(X=A_替/A_哌)对替考拉宁的浓度 Y 作图, 采用最小二乘法进行线性回归。

2.5 回收率与精密度 配制替考拉宁 90, 31.25, 7.81 mg·L⁻¹ 标准血清样品若干份, 按“2.2”项下方法操作, 测定其含量, 再与加入量相比即为方法回收率。以提取后的色谱峰面积与空白血清提取后加入相应浓度对照品进样所得的峰面积之比为提取回收率, 计算血清样品的提取回收率, 同时计算日内及日间精密度。

2.6 稳定性试验 配制替考拉宁 90, 31.25, 7.81 mg·L⁻¹ 标准血清样品若干份, 分别对室温放置稳定性(12 h), 长期冷冻稳定性(-20℃保存 15, 30 d), 冻融稳定性(反复冻融 3 次), 按“2.2”项下方法操作, 测定其含量, 考察样品在室温放置、冰冻、冻融时的稳定性。

3 结果

3.1 方法专属性 替考拉宁组分 TA₂₂ 的保留时间为 10.8 min, 血清中的内源性杂质不干扰替考拉宁和内标哌拉西林钠的测定, 其色谱图见图 1。选用哌拉西林钠为内标, 用该样品处理方法内标提取的重复性和稳定性良好。

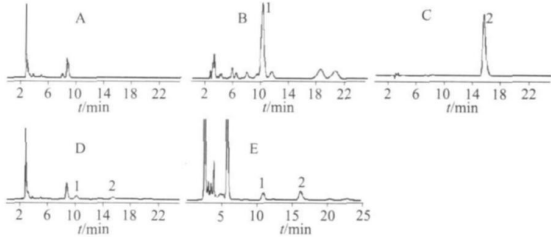


图 1 血清中替考拉宁的高效液相色谱图
A. 空白血清; B. 替考拉宁对照品溶液; C. 哌拉西林钠内标溶液; D. 空白血清加替考拉宁对照品溶液、哌拉西林内标溶液; E. 患者血样; 1 TA₂₂; 2 哌拉西林钠

Fig 1 HPLC chromatograms of teicoplanin in serum
A. blank serum; B. teicoplanin; C. piperacillin sodium; D. blank serum + teicoplanin + piperacillin sodium; E. serum sample of patient; 1 TA₂₂; 2 piperacillin sodium

3.2 标准曲线 以 X(A_替/A_哌) 对血清中替考拉宁的浓度 Y 作图, 采用最小二乘法进行线性回归, 线性回归方程为: Y = 24.694 7 X + 2.134 0, r = 0.999 5。在 5.63~125.00 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好。最低定量限为 5.63 mg·L⁻¹。

3.3 回收率与精密度 方法回收率、提取回收率、日内精密度和日间精密度结果见表 1。

表 1 替考拉宁测定方法的回收率和精密度($\bar{x} \pm s$, n = 5)
Tab 1 Recovery and precision of the method ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

替考拉宁质量 浓度/mg·L ⁻¹	方法回收率 /%	提取回收率 /%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
90.00	107.1±3.5	98.8±6.8	3.5	6.8
31.25	93.1±3.3	97.4±4.5	3.3	8.2
7.81	94.2±2.6	89.2±8.7	2.6	5.3

3.4 样品稳定性 样品在室温放置稳定性(12 h), 长期冷冻稳定性(-20℃保存 15, 30 d), 及冻融稳定性(反复冻融 3 次)时的稳定性结果见表 2。结果表明, 替考拉宁中、高浓度样品在冷冻 30 d 时所测得的替考拉宁浓度有所降低, 其余条件下均保持稳定。

表 2 替考拉宁稳定性试验($\bar{x} \pm s$, n = 5, mg·L⁻¹)
Tab 2 Stability studies($\bar{x} \pm s$, n = 5, mg·L⁻¹)

理论替考拉 宁质量浓度	实测替考拉宁质量浓度			
	室温 12 h	冷冻 15 d	冷冻 30 d	冻融 3 次
90.00	83.28±4.0	94.60±5.3	65.10±2.0	90.80±2.9
31.25	29.44±1.0	32.92±0.9	23.86±1.1	29.97±1.0
7.81	7.40±0.3	7.89±0.2	7.31±0.3	7.81±0.4

3.5 治疗药物监测 对 8 例疑似或确认的革兰阳性多重耐药菌感染的肾功能不全的危重患者, 均给

予替考拉宁 400 mg, q12 h × 3 剂的负荷剂量, 然后根据患者肾功能和 TDM 监测结果给予维持剂量。于第 4 次给药前采血, 采用已建立的 HPLC 法监测替考拉宁谷值浓度, 临床治疗结果分为: 有改进或症状缓解为临床有效, 持续存在和/或新症状出现或死亡为临床无效。将血清谷浓度 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 视为达到适宜浓度, 作为日常临床监测的谷值。所监测的 8 例危重患者平均谷值 $C_{\min}$ 为 $(12.8 \pm 6.2)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果见表 3。

表 3 替考拉宁的血药浓度监测结果
Tab 3 Results of serum teicoplanin monitoring

年龄 / 岁	替考拉宁质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	与参考范围 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较	肾功能评价 ^a	用药时间/d	临床结果评定 ^b
79	14.01	$> 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	中度受损	13	临床有效
68	9.21	$< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	重度受损	11	临床无效
51	8.90	$< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	重度受损	6	临床无效
80	5.91	$< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	中度受损	10	临床无效
71	9.54	$< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	中度受损	4	临床无效
81	11.27	$> 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	中度受损	4	临床无效
59	24.82	$> 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	重度受损	3	临床无效
94	18.47	$> 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	重度受损	9	临床有效

注: ^a肾功能评价标准: 以肌酐清除率 (creatinine clearance rate, CL_{CR}) 计, $\text{CL}_{\text{CR}} \geq 50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 为肾功能正常, $20 < \text{CL}_{\text{CR}} < 50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 为肾功能中度受损, $\text{CL}_{\text{CR}} \leq 20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 为肾功能重度受损。 ^b临床结果评定标准: 临床有效: 有改进或症状缓解; 临床无效: 持续存在和(或)新症状出现或死亡

实验结果表明, 在开展 TDM 的 8 例肾功能不全患者中, 4 例替考拉宁质量浓度 $< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 且治疗结果均为无效; 而 4 例达到替考拉宁浓度小于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 要求的患者中, 有 2 例 (2/4) 治疗结果为无效。

4 讨论

文献[5]中 HPLC 法测定替考拉宁浓度所用流动相有不同比例、不同 pH 下的乙腈-磷酸盐系统。结果发现加入一定比例的甲醇, 降低 pH, 则色谱峰能好分开且峰型变好, 经过优化, 发现 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠-乙腈-甲醇 (70: 25: 5) (磷酸调 pH 2.1) 流动相条件下, 保留时间合适, 峰型好且能很好的分离各峰。

应用建立的 HPLC 法对危重患者服用替考拉宁后的血清样本进行测定, 实验结果表明, 这 8 例不同程度肾功能不全的危重患者中有 6 例 (6/8) 治疗结果为无效, 其中 4 例 (4/6) 的替考拉宁浓度 $< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。参照国内外有关报道^[2,7], 替考拉宁的最

低有效浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 血药浓度未达到要求可能与危重患者病理生理条件下存在影响药物体内分布和排泄的多种因素 (如, 水肿、液体治疗、胸腔积液、腹水、腹膜渗出液、术后引流、低蛋白血症、烧伤等) 造成药物分布容积增大、药物稀释有关。

而 4 例达到替考拉宁浓度 $> 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 要求的患者, 有 2 例治疗结果为无效。其中其中第 6、7 例患者虽然谷浓度高于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 但两患者均存在重症肺炎, II 型呼吸衰竭, 感染性休克, 急性肾功能损伤 (第 6 例)、慢性肾功能不全 (第 7 例尿毒症期, 血液透析状态), 高血压病 2 级 (高危), 冠状动脉粥样硬化性心脏病等。在应用替考拉宁 3~4 d 后临床症状持续未改善, 合并其他疾病死亡。

总之, 本研究建立的 HPLC 法对于临床替考拉宁血样的测定, 准确、简单、快捷、灵敏、重复性好, 可满足血药浓度监测和药动力学研究的要求。危重症感染患者应用替考拉宁后血药浓度变化较大, 需要通过治疗药物监测的方法制定个体化给药方案。

参考文献:

[1] Wood MJ. Comparative safety of teicoplanin and vancomycin [J]. J Chemother, 2000, 12(5): 21-25.
[2] B Sato M, Chida K, Suda T, *et al.* Recommended initial loading dose of teicoplanin, established by therapeutic drug monitoring, and outcome in terms of optimal trough level [J]. J Infect Chemother, 2006, 12(4): 185-189.
[3] Rose WE, Kaatz GW, Sakoulas G, *et al.* Teicoplanin pharmacodynamics in reference to the accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus using an *in vitro* pharmacodynamic model [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(5): 1099-1102.
[4] Nobuo M, Keiko O, Tsuyoshi S, *et al.* Quantitative determination of individual teicoplanin components in human plasma and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. J Chrom B, 2007, 847(2): 78-81.
[5] 艾又生, 徐楚鸿, 陈志祥, 等. 高效液相色谱法测定替考拉宁的血药浓度 [J]. 中国医院药学期刊, 2005, 25(3): 254-256.
[6] Yano R, Nakamura T, Tsukamoto H, *et al.* Variability in teicoplanin protein binding and its prediction using serum albumin concentrations [J]. Ther Drug Monit, 2007, 29(4): 399-403.
[7] Federico P, Loris B, Pierluigi V, *et al.* Teicoplanin therapeutic drug monitoring in critically ill patients: a retrospective study emphasizing the importance of a loading dose [J]. J Antimicrob Chem, 2003, 51(4): 971-975.

[收稿日期] 2010-10-09

更正

更正: 本刊第 31 卷第 6 期 443 页文题、摘要、关键词中“生长因子”应为“转化生长因子”, “转录因子”应为“核转录因子”; 453 页作者简介中“袁海珍”应为“孟甸”, 特此更正。
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net