

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.07.003

高效液相色谱法测定人血清万古霉素浓度

李 容

(重庆市涪陵中心医院药学部, 重庆 408000)

摘要:目的 建立测定人血清中万古霉素浓度的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 VP-ODS C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 4.6 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液(pH=3.2)-甲醇(83:17), 流速为 1 mL/min, 紫外检测波长为 205 nm, 柱温为 25℃, 进样量为 20 μL, 血清样品经 10% 三氯乙酸-乙腈(1 200 μL:300 μL)蛋白沉淀剂沉淀蛋白离心后进行色谱分析。结果 万古霉素的最低检测限为 1.96 μg/mL, 万古霉素血清质量浓度在 4.90~58.80 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=26\,385X-19\,207$, $r=0.999\,6$ ($n=7$), 日内、日间精密密度均小于 4% ($n=5$)。结论 该方法提取率高、重复性好、操作简便、灵敏, 适用于万古霉素的血药浓度测定。

关键词: 万古霉素; 人血清; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.1; R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)07-0007-04

Concentration Determination of Vancomycin in Human Serum by HPLC

Li Rong

(Department of Pharmacy, Fuling Central Hospital of Chongqing City, Chongqing, China 408000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for concentration determination of vancomycin in human serum. **Methods** The column was VP-ODS C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 4.6 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate(pH=3.2)-methyl alcohol(83:17), the flow rate was 1 mL/min, the UV detection wavelength was 205 nm, the column temperature was 25℃, and the sample size was 20 μL. The protein precipitation of 10% trichloroacetic acid-acetonitrile(1 200 μL:300 μL) was added into serum samples to precipitate protein, and the protein was analyzed by chromatography after centrifugation. **Results** The minimum detectable concentration of vancomycin was 1.96 μg/mL, the linear range of vancomycin concentration was 4.90-58.80 μg/mL, the regression equation was $Y=26\,385X-19\,207$, $r=0.999\,6$ ($n=7$), the RSDs of intra-day and inter-day assays were less than 4% ($n=5$). **Conclusion** The method is highly efficient, reproducible, simple and sensitive, which is suitable for the concentration of vancomycin in human serum.

Key words: vancomycin; human serum; blood concentration; HPLC

万古霉素是有抗生素后效应的时间依赖性抗菌药物, 抗感染治疗成败与其血药谷浓度密切相关, 血药谷

浓度应控制在 10~20 mg/L, 至少要保持 10 mg/L 以上, 以避免发生耐药^[1]。万古霉素的用药人群包括新生

第一作者: 李容, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品检验及医院制剂, (电子信箱)lirong163163@163.com。

其内在质量的参考方法。

3.4 样品测定情况分析

结果显示, 栽培白及 2 年生样品与 3 年生样品相比, 白及多糖含量差异显著, 栽培白及 3 年生样品白及多糖含量与野生白及、市售白及相近, 表明栽培白及采挖时限至少 3 年; 结合其外在形态特征符合药典标准, 表明该种植基地从野外引种的白及栽培变异不明显, 植物形态稳定, 野生引种块茎繁殖的技术方法可行, 可加大规模种植和推广力度。同时, 将继续跟进该种植基地, 研究 4 年生、5 年生白及的白及多糖含量, 筛选效益最高、质量最优的种植方案。

参考文献:

[1] 肖培根. 新编中药志(第一卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 320.

- [2] 冯敢生, 李欣, 郑传胜, 等. 中药白芨提取物抑制肿瘤血管生成机制的试验研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 412.
- [3] 徐小炉, 尹刘, 程元芝, 等. 白芨栓塞治疗中晚期肝癌的临床观察[J]. 实用癌症杂志, 2000, 15(6): 640-641.
- [4] 罗新根, 刘文庸, 张卫东. 中药白芨的化学成分及临床研究进展[J]. 药学实践杂志, 1999, 17(6): 359.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 103.
- [6] 丁玲, 王东, 张中林, 等. 不同商品地山药多糖含量的分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 187-188.
- [7] 杨春, 杨金笛, 林帅. 菊花、野菊花中的总糖含量测定[J]. 山西中医, 2009, 24(6): 40-41.
- [8] 王雷, 杨新建, 寇欣. 紫外分光光度法在中药分析中的应用进展[J]. 天津药学, 2003, 15(5): 62-64.

(收稿日期: 2017-11-28; 修回日期: 2017-12-25)

儿、婴幼儿、老年人、肾功能不全及长期应用万古霉素的患者等特殊人群,应用时必须严格调整剂量,并进行血药浓度监测。本研究中用高效液相色谱(HPLC)法测定人血清中万古霉素浓度,不仅可以为临床万古霉素的血药浓度监测提供试验手段,为临床合理用药提供理论依据,还可为患者制订个体化给药方案,减少用药后的不良反应。目前,国内外对人血清中万古霉素的浓度监测方法有6类,即微生物检测法^[2]、酶放大免疫法(EMIT)^[3]、荧光偏振免疫法(FPIA)^[4]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)^[5]、离子对色谱法^[6]、高效液相色谱法。由于微生物检测法耗时较长且精密度低,EMIT和FPIA的专属性较差,LC-MS/MS法仪器价格昂贵致前期投入较大,而高效液相色谱法具有提取率高、重复性好、稳定性好、灵敏度高、操作简便等特点,因此,我院亦采用HPLC法测定万古霉素的血药浓度。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-2401PC型紫外分光光度计(日本岛津公司);高精度电子天平(上海光正医疗仪器股份有限公司);pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);TG16W型医用高速离心机(长沙平凡仪器仪表股份有限公司);TD4B型医用离心机(长沙平凡仪器仪表股份有限公司)。

1.2 试剂

万古霉素标准品(中国食品药品检定研究院,纯度为99%,批号为130360-201302);甲醇(批号为20160601),乙腈(批号为20151111),均为色谱纯,由美国Burdick&Jackson公司提供;磷酸二氢钾(批号为2016042801),三氯乙酸(批号为2016073101),均为分析纯,由成都市科龙化工试剂厂提供;磷酸(分析纯,重庆川东化工集团有限公司,批号为20160509);试验用水为本院自制重蒸馏水,空白血清为本院检验科采集。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:VP-ODS C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,4.6 μm);流动相:0.05 mol/L磷酸二氢钾缓冲溶液(pH=3.2)-甲醇(83:17);流速:1 mL/min;紫外检测波长:205 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液配制

流动相配制:取磷酸二氢钾6.805 g,精密称定,置1000 mL烧杯中,用1000 mL蒸馏水溶解,搅拌均匀,用磷酸调节溶液的pH,缓慢滴加,边滴加边用玻璃棒搅匀,直至溶液的pH达3.2,即配制成0.05 mol/L的磷酸二氢钾缓冲溶液(pH=3.2),置阴凉处保存,备用。

标准贮备液:取0.045 0 g万古霉素标准品,精密称

定,置50 mL容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,摇匀,即配制成质量浓度为980 μg/mL的标准贮备液,于冰箱中4℃冷藏,备用,使用时稀释为所需质量浓度。

蛋白沉淀剂:称取三氯乙酸10 g,用纯化水溶解至100 mL,摇匀,即得10%三氯乙酸溶液,用微量移液器分别移取1 200 μL 10%三氯乙酸溶液和300 μL乙腈置EP管中,震荡摇匀,置阴凉处保存,备用。

2.3 血清样品预处理

抽取使用过万古霉素患者的静脉血约3 mL,置普通抽血管中,以2 500 r/min的速率离心5 min,取上层血清样品200 μL,置2.0 mL EP管中,再加入150 mL蛋白沉淀剂[10%三氯乙酸-乙腈(1 200 μL:300 μL)],以12 000 r/min的速率离心15 min,取上清液20 μL进样。

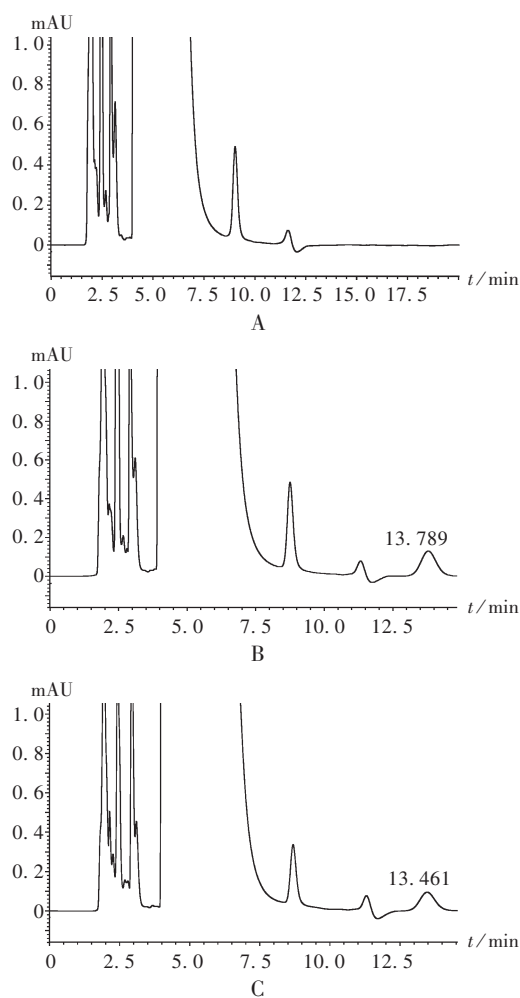
2.4 方法学考察

专属性试验:在选定的样品处理方法和色谱分离条件下,测定空白血清、空白血清加标准品及血清样品的色谱峰。按拟订色谱条件进样测定,血清中干扰物质峰主要出现在12.5 min前,故把万古霉素的保留时间(t_R)控制在14 min左右,万古霉素与血清中的干扰物质能得到良好分离,同时分离时间也不太长,保证了实验时间的合理性和可控制性。色谱图见图1。

线性关系考察:用微量移液管分别取10,20,40,60,80,100,120 μL万古霉素标准贮备液,置2.0 mL EP管中,分别加入纯化水190,180,160,140,120,100,80 μL,振荡3 min,摇匀;取上述溶液各20 μL置另一系列EP管中,各加入180 μL空白血清,振荡3 min摇匀,配置成质量浓度分别为4.90,9.80,19.60,29.40,39.20,49.00,58.80 μg/mL的溶液;再各加入150 μL蛋白沉淀剂,振荡3 min,摇匀;最后置离心机中,以12 000 r/min的速率离心15 min,取出;按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=26\,385X-19\,207$, $r=0.999\,6$ ($n=7$)。结果表明,血清质量浓度在4.90~58.80 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好;最低检测限为1.96 μg/mL($n=7$)。

精密度试验:取适量万古霉素标准溶液加至180 μL空白血清中,分别配制成质量浓度为9.80,19.60,29.40,39.20 mg/L的血清样品溶液,按专属性试验方法处理样品,吸取上清液20 μL直接进样,1 d内重复测定5次,每次分析17 min,连续测定5 d。结果见表1。可见该方法的日内、日间RSD均低于4%($n=5$)。

绝对回收率试验:精密吸取万古霉素对照品贮备液,配制质量浓度为9.80,19.60,29.40 mg/L的万古霉素血清样品,按2.2项下方法处理样品,每一质量浓



A. 空白血清 B. 万古霉素标准品 + 空白血清
C. 万古霉素血清样品
图1 高效液相色谱图

表1 日内、日间精密度试验结果($n=5$)

质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度		日间精密度	
	测定浓度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	测定浓度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)
9.80	9.31		9.23	
	9.84		9.68	
	9.77	3.86	9.84	3.34
	10.12		9.51	
	10.32		10.08	
19.60	18.70		19.63	
	18.11		20.24	
	18.84	3.26	19.52	2.41
	18.98		20.08	
	19.82		20.71	
29.40	28.01		29.76	
	29.41		29.41	
	30.20	2.99	31.18	2.93
	30.12		30.01	
	29.62		31.43	

度与实际配制质量浓度相比得方法回收率,详见表2。

表2 绝对回收率试验结果($n=5$)

实际质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	测定质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	绝对回收率(%)	RSD(%)
9.80	10.08	102.85	
	9.79	99.91	
	10.74	109.55	3.80
	10.34	105.48	
	9.87	100.73	
19.60	19.40	98.98	
	18.89	96.34	
	19.12	97.53	2.45
	19.86	101.34	
	20.01	102.08	
29.40	28.31	96.29	
	28.08	95.51	
	29.55	100.50	3.71
	29.41	100.03	
	30.78	104.68	

稳定性试验:制备4.9,39.2,58.8 $\mu\text{g/mL}$ 低、中、高3种质量浓度万古霉素血清样品各3份,于冰箱冷藏室($2\sim 8^\circ\text{C}$)冷藏1,2,4 d,考察其稳定性,结果见表3。

表3 稳定性试验结果($n=3$)

实际质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	测定质量浓度($\mu\text{g/mL}$)			RSD (%)
	第1天	第2天	第4天	
4.90	4.80	5.21	5.74	8.98
	4.74	5.61	5.29	8.44
	5.31	4.63	5.51	8.96
39.20	38.86	43.41	39.43	6.11
	42.64	44.48	38.85	8.94
	39.48	44.94	42.65	6.47
49.00	51.21	47.83	47.73	4.05
	48.25	54.72	52.65	6.37
	48.64	55.70	49.52	7.50

2.5 临床应用

2.5.1 病例分析

患者,男,50岁,体质量60 kg,因糖尿病伴多种并发症及肺部感染,于2017年1月23日入住重症监护室(ICU),入院后立即给予心电监护、吸氧、保留导尿、建立静脉通道、行床旁心电图。微生物检查报告导管血及导管尖端培养均有表皮葡萄球菌感染,痰培养提示有肺炎克雷伯菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌感染。结合患者病情考虑为导管相关脓毒症,给予万古霉素、氟康唑、哌拉西林他唑巴坦等抗生素进行抗感染治疗。在使用万古霉素前,患者的血清肌酐为417.7 $\mu\text{mol/L}$,肌酐清除率为15.80 mL/min,医师给予“万古霉素1 g,q12 h”静脉微泵输入,连用3 d后于再次给药前取患者血清,送

度平行操作5份,取20 μL 进样,将仪器检测到的质量浓

表4 FPIA法与HPLC法测定万古霉素标本的结果

监测单位	监测方法	监测结果(μg/mL)							
		临床标本1	临床标本2	临床标本3	临床标本4	临床标本5	临床标本6	临床标本7	临床标本8
重医附属儿童医院	FPIA法	9.24	5.92	5.65	29.89	20.46	11.65	14.88	14.41
涪陵中心医院	HPLC法	10.37	8.86	7.22	32.20	25.42	14.74	12.64	12.22

检,用HPLC法测定万古霉素的血药浓度,测定值为48.71 μg/mL(重症患者参考值为15~20 μg/mL),医师调整给药方式为“0.5 g, biw, ivgtt”,24 h后测定患者的血肌酐为686.1 μmol/L,肌酐清除率为9.62 mL/min,仍持续使用万古霉素等抗生素1周后,静脉导管尖端培养未见细菌生长,患者病情好转,一般情况尚可,肾功能损害较大,转出ICU,转入肾内科病房继续治疗。

2.5.2 FPIA法与HPLC法测定结果比较

标本来源为重庆医科大学附属儿童医院。利用SPSS统计软件分析,对数据进行两独立样本 t 检验,分析结果认为,两总体的方差无显著差异。说明我院用HPLC法与重庆医科大学附属儿童医院FPIA法2种方法测定人血清中万古霉素的浓度的结果无显著性差异,表明我院建立的HPLC法测定万古霉素血药浓度方法可行。详见表4。

2.5.3 我院临床标本的测定

2016年11月至2017年3月,我科为ICU监测万古霉素血药浓度5次,测定结果见表5。

表5 我院临床ICU标本万古霉素测定结果

编号	年龄(岁)	诊断	质量浓度(μg/mL)
1	82	感染性休克、重症脓毒血症、呼吸衰竭等	22.22
2	69	脓毒血症	11.55
3	50	糖尿病伴并发症及肺部感染	48.71
4	43	急性胰腺炎	6.78
5	62	有机磷中毒伴感染	23.12

3 讨论

3.1 测定波长选择

将质量浓度为10 mg/L的万古霉素标准品溶液,以水作为空白对照在UV-2401PC型紫外分光光度计下进行扫描。结果,万古霉素在280 nm波长处有最大吸光度,有末端吸收;高效液相色谱法试验表明,280 nm处的吸收峰面积为205 nm波长处的吸收峰面积的1/7,故选择检测波长为205 nm。

3.2 流动相选择

曾考察了流动相系统中两种成分的不同比例对有效成分分离的影响,甲醇-0.05 mol/L 磷

酸二氢钾缓冲液(pH=2)的比例分别为16:84和17:83,等度洗脱。结果表明,两种流动相系统都能使万古霉素与杂质峰分开,但当甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH=3.2)的比例为17:83时万古霉素有较好的分离,分离度为1.900,拖尾因子为1.052, t_R 为14 min,故最终选择后者(17:83)为流动相。

3.3 蛋白沉淀剂优化

选择4种蛋白沉淀剂考察沉淀蛋白的效果,分别为10%硫酸锌溶液、10%三氯醋酸溶液、10%高氯酸沉淀蛋白二氯甲烷萃取、10%三氯乙酸和乙腈(4:1)。结果显示,10%硫酸锌溶液沉淀蛋白不完全,离心后上清液浑浊无法直接进样;10%三氯乙酸沉淀蛋白二氯甲烷萃取,处理血样时操作烦琐,二氯甲烷萃取离心后水层不宜吸出;10%三氯乙酸溶液沉淀蛋白,离心后上清液澄清,但提取率只有33%,10%高氯酸和乙腈(4:1)沉淀蛋白,离心后上清液澄清,提取率可达70%,所以最终选择10%三氯乙酸和乙腈(4:1)作为血清蛋白沉淀剂。

3.4 研究价值

耳、肾毒性是万古霉素最严重的不良反应,其发生与血药浓度过高有关,临床应用时常通过监测血药浓度来降低耳、肾功能损害风险。HPLC法提取率高,重复性好,操作简便、灵敏,适用于临床患者使用万古霉素后的血药浓度测定。本研究使为患者进行个体化给药、优化给药方案和提高临床疗效成为可能。

参考文献:

- [1] 陈佰义,管向东,何礼贤,等. 万古霉素临床应用中国专家共识(2011版)[J]. 中国新药与临床杂志,2011,30(8):561-573.
- [2] 王 华,许 静,钱南萍,等. 微生物法测定血浆中万古霉素血药浓度的研究[J]. 现代医药卫生,2008,24(16):2390-2391.
- [3] 彭斯维,陈永刚,邹吉利. 酶放大免疫法测定去甲万古霉素的血药浓度[J]. 广东药学院学报,2014,30(5):553-558.
- [4] 肖 力,任 斌,陈小陆. 荧光偏振法测定去甲万古霉素血药浓度[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(3):315-316.
- [5] 张萌萌,史国兵,颜 鸣,等. LC-MS/MS法测定人血清中去甲万古霉素的血药浓度[J]. 中国药师,2013,16(7):990-993.
- [6] 鲁 军,史志华,赵永新. 用离子对HPLC法测定人血清中去甲万古霉素的血药浓度[J]. 药学服务与研究,2007,7(1):73-75.

(收稿日期:2017-11-12;修回日期:2017-12-15)

本栏目由
重庆英康医疗器械有限公司
协办