

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.007

新型冠状病毒灭活方式对高效液相色谱法监测万古霉素血药浓度的影响

张晓旭¹, 侯林中¹, 姜 晖², 张倩影³, 缴万里¹, 刘晓红^{1△}

(1. 河北省唐山市工人医院药学部, 河北 唐山 063000; 2. 河北省唐山中心医院药学部, 河北 唐山 063000;
3. 华北理工大学附属医院药学部, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 考察新型冠状病毒不同灭活方式对高效液相色谱(HPLC)法监测万古霉素血药浓度的影响。方法 经56℃水浴加热0 min和30 min,以及紫外照射0,30,60 min后,采用HPLC法测定质控液和患者血样中万古霉素的质量浓度。结果 56℃水浴加热30 min不会影响监测结果;紫外照射30 min和60 min后,质控液和患者血样中万古霉素均降解,对监测结果影响较大。结论 采用HPLC法监测新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者万古霉素血药浓度时,可用湿热法56℃水浴30 min灭活病毒,不可用紫外照射灭活病毒,且万古霉素质控液与患者血样均要注意避免紫外照射。

关键词:新型冠状病毒;灭活;高效液相色谱法;万古霉素;血药浓度;治疗药物监测

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0027-03

Effect of Inactivation Methods of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 on Monitoring Vancomycin Blood Concentration by HPLC

ZHANG Xiaoxu¹, HOU Linzhong¹, JIANG Hui², ZHANG Qianying³, JIAO Wanli¹, LIU Xiaohong¹

(1. Department of Pharmacy, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000; 2. Department of Pharmacy, Tangshan Central Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000; 3. Department of Pharmacy, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000)

Abstract: Objective To investigate the effect of different inactivation methods of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) on monitoring vancomycin blood concentration by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The HPLC method was used to determine the concentration of the quality control solution and the vancomycin blood concentration of the patients after heating at 56℃ for 0, 30 min and 0, 30, 60 min of UV irradiation. **Results** Heating in 56℃ water bath for 30 min did not affect the monitoring results of vancomycin blood concentration in patients. After 30, 60 min of UV irradiation, vancomycin quality control solution and blood samples of patients were degraded, which greatly affected the monitoring results. **Conclusion** To monitor the concentration of vancomycin in the blood of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) by HPLC, the virus can be inactivated by soaking in 56℃ water for 30 min, but not by UV irradiation. In addition, the vancomycin quality control solution and blood samples should avoid UV radiation.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; inactivation; high performance liquid chromatography; vancomycin; blood concentration; therapeutic drug monitoring

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情自2019年12月暴发以来迅速蔓延至全球,截至2020年3月24日,全球COVID-19患者已逾37万例^[1]。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)为β属冠状病毒,颗粒呈圆形或椭圆形并有包膜,其与蝙蝠严重急性呼吸综合征(SARS)样冠状病毒(bat-SL-CoVZC45)同源性超过85%^[2];对紫外线和热敏感,56℃30 min、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂可有效灭活病毒^[3]。

现有数据基本证实,SARS-CoV-2可经呼吸道飞沫、消化道和接触传播,且有传染性,COVID-19临床表现多样,病情反复多变^[4]。COVID-19目前以对症治疗为主,没有特效药^[3]。COVID-19重型患者一般较轻型患者合并更多基础疾病,同时可能合并细菌、真菌感

染,用药方案复杂,应通过治疗药物监测(TDM)优化用药^[5]。COVID-19重症患者的治疗方案中,糖肽类抗菌药物万古霉素为常用药,相关指南建议需监测其血药浓度^[6]。万古霉素血药浓度的监测方法有微生物法、酶放大免疫法(EMIT)、荧光偏振免疫法,以及更常用、专属性强、准确度高及成本低的高效液相色谱(HPLC)法^[7]。

对于SARS-CoV-2的灭活方式,TDM标本可考虑采用56℃30 min水浴加热样本,亦可考虑采用短波紫外线处理样本进一步保证病毒灭活效果^[8]。前期研究显示,经水浴56℃加热30 min处理后,不会影响免疫法监测万古霉素的血药浓度^[8],但湿热灭活及紫外灭活对HPLC法监测万古霉素血药浓度的影响尚未见研究报道。本研究考察了SARS-CoV-2不同灭活方式对

第一作者:张晓旭,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为血药浓度监测,(电子信箱)zhangxiaoxu198909@126.com。

△通信作者:刘晓红,女,博士研究生,主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)13930520000@163.com。

HPLC 法监测万古霉素血药浓度的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪,包括 G1329A 型自动进样器、G1311A 型四元泵、G1315D 型二极管阵列检测器和 G1316A 型柱温箱(美国 Agilent 公司)。万古霉素对照品(中国食品药品检定研究院,含量 100%,批号 130360-200301);甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为实验室自制超纯水。健康人血清(唐山市工人医院检验科提供)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2% 三乙胺缓冲液(磷酸调 pH 至 3.2)-甲醇(15:85, V/V);流速:1.2 mL/min;检测波长:236 nm;柱温:40 ℃。外标法计算得万古霉素血药浓度。

1.2.2 样品采集与制备

血样:选取唐山市定点医院——唐山市传染病医院收治的 COVID-19 患者 2 例(患者 1,男,64 岁;患者 2,女,67 岁),静脉滴注万古霉素(12 h 1 g,8 h 0.7 g),直至其达稳态血药浓度(半衰期约 6 h,至少 4 个固定剂量)^[9]。下次给药前 30 min 内抽取患者静脉血 3~5 mL,置红帽头普通采血管中,3 500 r/min 离心 10 min,吸取血清 300 μL(空白人血清 270 μL+万古霉素质控液 30 μL),加入沉淀剂 10% 高氯酸 100 μL,涡旋振荡 2 min,15 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 50 μL。

质控液:称取万古霉素对照品 11.60 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,超纯水溶解并定容至刻度,制成质量浓度为 1.16 mg/mL 的万古霉素贮备液,再经稀释,得质量浓度分别为 7.25 mg/L 和 29.00 mg/L 的万古霉素质控液 Q2 和 Q1。

1.2.3 血药浓度监测

56 ℃ 水浴:患者给药前 30 min 同时抽取血样,置 2 个红帽头普通采血管内,分别于 56 ℃ 水浴加热样本 0 min 和 30 min 后测定。

紫外照射:取质控液(Q2 和 Q1)和血样(血样 1 和血样 2),分别紫外照射 0,30,60 min 后测定。

2 结果

2.1 水浴后血药浓度

2 份血样 56 ℃ 水浴加热 0 min 和 30 min 后检测,万古霉素血药浓度均无明显变化。详见表 1。

2.2 紫外照射后血药浓度

质控液和血样紫外照射 0,30,60 min 后检测,万古霉素降解,且随照射时间的增长,降解率成倍增长。详见表 2。

表 1 血样 56 ℃ 水浴加热后万古霉素血药浓度监测结果(mg/L)

样品	0 min	30 min
血样 1	22.64	22.72
血样 2	11.90	11.45

表 2 紫外照射后质控液及血样万古霉素监测结果

样品	紫外照射时间(min)	检测结果(mg/L)	降解率/偏差
Q2 质控液	0	7.42	2.42
	30	5.91	-18.48
	60	5.03	-30.59
Q1 质控液	0	29.50	1.72
	30	23.93	-17.47
	60	19.47	-30.15
血样 1	0	22.15	-
	30	20.40	-7.90
	60	19.15	-13.54
血样 2	0	11.91	-
	30	9.82	-17.55
	60	8.53	-28.38

2.3 紫外照射后万古霉素 HPLC 图

结果见图 1。

3 讨论

对于用于 TDM 的样本,应考虑在不影响检测的前提下灭活病毒。可对 COVID-19 患者血样进行 56 ℃ 水浴加热 30 min 处理,或于短波紫外条件下静置 30 min,以保证病毒灭活。

有研究表明,万古霉素的稳定性不高,常温放置即可观察到颜色逐渐变红,可能是其分子结构中存在酚基及二酚基,酚类的水溶液遇光易水合或氧化成醌而呈粉红色^[10]。万古霉素监测血样处理前 4 ℃ 保存 1 周,能保持相对稳定,处理后 8 h 内能保持相对稳定,但处理后 48 h 则开始出现降解^[11]。

本研究结果显示,经 56 ℃ 水浴加热 30 min 处理后,不影响万古霉素血药浓度监测结果。因此,可采用湿热法 56 ℃ 水浴 30 min 灭活病毒后,以 HPLC 法监测 COVID-19 患者的万古霉素血药浓度。

对于 TDM 样本,也可在短波紫外条件下静置 30 min,进一步保证病毒灭活。由于 SARS-CoV-2 也可能通过气溶胶传播,故前处理操作尽可能在生物安全柜里完成,试验前后采用紫外线消毒 30~60 min^[9]。前期试验研究未提到万古霉素质控液^[12]、万古霉素监测样品(血样、脑脊液和关节液)^[13-15]需遮光保存,更未考察紫外照射对万古霉素血药浓度监测的影响。但同时发现,万古霉素质控液虽未遮光,但保存于 4 ℃ 冰箱、6 个月内未有明显降解。

本研究结果显示,紫外照射极大地加快了万古霉素

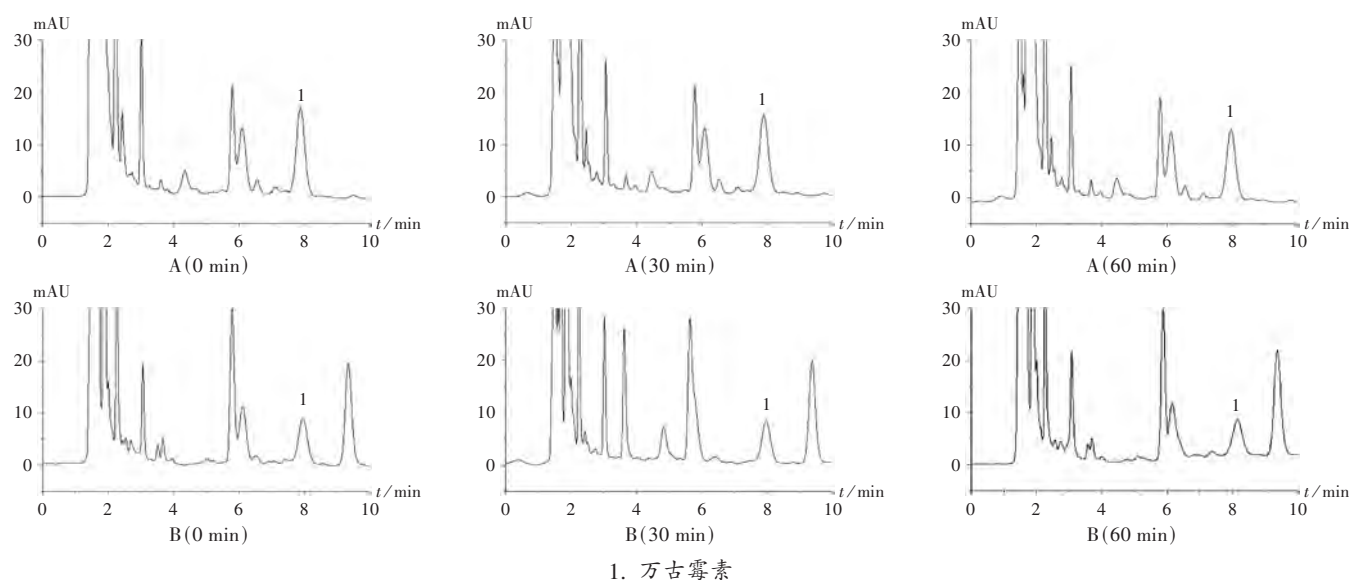


图1 万古霉素血药浓度高效液相色谱图

的降解。可能是由于万古霉素质控液存放于透明离心管内,而血样存放多了采血管帽头与标签的遮挡,故降解率不同。但即使有遮挡,血样暴露于紫外条件下,万古霉素的降解仍对监测结果有较大影响,故采用 HPLC 法监测 COVID-19 患者万古霉素血药浓度时,不可用短波紫外灭活样本病毒。同时,万古霉素血样、质控液在接受标本时(传递窗等地方)及生物安全柜内处理过程中常可能暴露于紫外线下,故应注意万古霉素质控液与血样均要避免紫外照射。

综上所述,HPLC 法监测 COVID-19 患者万古霉素血药浓度,可用湿热法 56 ℃ 水浴 30 min 灭活样本 SARS-CoV-2,不可用紫外灭活方式,且万古霉素质控液与血样均要注意避免紫外照射。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Coronavirus? disease 2019 (COVID-19) Situation report - 64[EB/OL]. (2020-03-24) [2020-03-25]. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200324-sitrep-64-covid-19.pdf?sfvrsn=703b2c40_2.
- [2] REN LL, WANG YM, WU ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J/OL]. Chin Med J (Engl), 2020, 133. (2020-01-29) [2020-03-25]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1179477.htm>. doi:10.1097/CM9.0000000000000722. [Epub ahead of print].
- [3] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. (2020-03-04) [2020-03-25]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [4] 李晓骄阳,李雅静,葛俊德,等. 注重新型冠状病毒肺炎(COVID-19)治疗中药物性肝损伤的预警与保护[J]. 中草药,

2020,51(4):851-859.

- [5] 姜赛平,李璐,茹仁萍,等. 2019 冠状病毒病(COVID-19)重型/危重型患者用药管理经验[J/OL]. 浙江大学学报(医学版), 2020, 49(1): 0-0. <http://www.zjujournals.com/med/CN/10.3785/j.issn.1008-9292.2020.03.01>.
- [6] YE ZK, CHEN YL, CHEN K, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: a Guideline of the Division of Therapeutic Drug Monitoring, Chinese Pharmacological Society[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(11):3020-3025.
- [7] 张照浩,张晓旭,姜晖,等. 空白基质对万古霉素血药浓度监测的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(12):956-960.
- [8] 广东省药学会. 新型冠状病毒肺炎患者血药浓度检测技术指引[Z].
- [9] 朱永红,黄蓉蓉,陈伯华. 万古霉素初始谷浓度影响因素及相关性研究[J]. 中国药业, 2020, 29(4):56-60.
- [10] 宋盼,邓佩佩. 万古霉素研究现状及发展[J]. 河北化工, 2012, 35(4):20-34.
- [11] 罗奕,刘文,邓楠,等. 万古霉素血药浓度监测方法的建立与稳定性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):133-135.
- [12] 葛卫红,陈志一. 万古霉素 TDM 质控血清的保存方法及稳定性考察[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 9(3):187-188.
- [13] 邹国芳,钱文璟,李巍,等. 高效液相色谱法和荧光偏振免疫法测定万古霉素血清浓度的比较[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(1):68-71.
- [14] 戴婷婷,蒋跃平,宋柏力,等. 高效液相色谱法检测脑脊液中万古霉素药物浓度方法学建立[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(17):1706-1708.
- [15] 何家伟,汪洋,纪保超,等. HPLC 测定人工关节假体感染患者关节液中万古霉素浓度[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(23):2949-2952.

(收稿日期:2020-03-28;修回日期:2020-04-15)