

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 concentration were all >78%. The samples were stability in 4 °C for a week, the standard solution of vancomycin were stability 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:
hnyyjk@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。

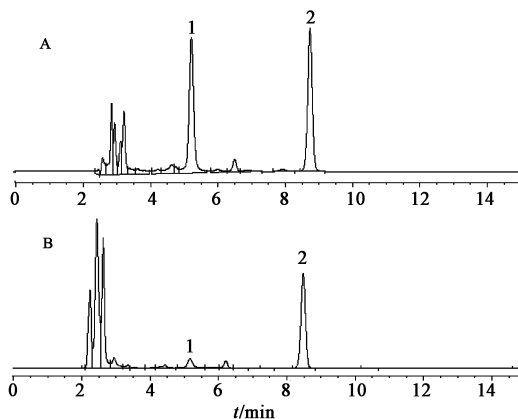
2.2 色谱条件及色谱行为 Kromasil C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 溶液(7:93),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 236 nm,柱温 30 °C,灵敏度 0.05 AUFS。

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 \pm 6.4	95.2 \pm 4.7	5.1	6.9
25.24	85.4 \pm 4.9	98.2 \pm 3.8	4.2	5.7
126.2	82.3 \pm 5.9	97.8 \pm 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。

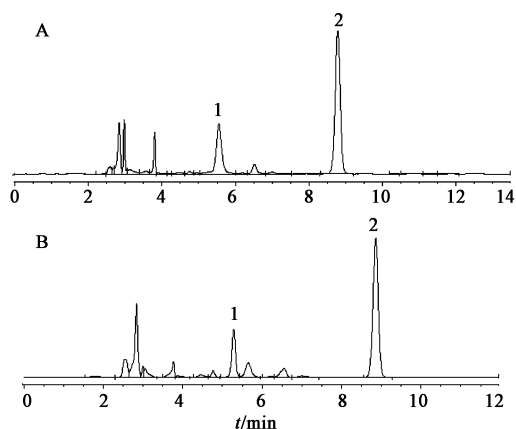
症感染患者进行监测,其中有19例患儿在应用VAN治疗后5 d后的VAN血清浓度低于5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其中又有14例病人的血清浓度低于1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其余31例患儿中有8例浓度大于10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,停药后检测并未出现较明显的肾功能损害现象,其他23例患者浓度在5~10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,由此说明VAN在患儿中具有较大个体差异,对其进行血药浓度监测非常有必要。

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个月后的无明显变化而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,刘饭阳,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.



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

[责任编辑 蔡仲德]