

• 经验交流 •

UHPLC 法检测血清中万古霉素的浓度

王宇凡, 张磊, 刘树业[△]

(天津市第三中心医院检验科, 天津 300170)

摘要: 目的 建立通过超高效液相色谱(UHPLC)检测血清中万古霉素浓度的方法, 指导临床安全合理用药。方法 使用 Agilent 1290 超高效液相色谱平台, 采用 Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 以乙腈:水(体积比为 10:90)为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 230 nm, 柱温 30 °C, 流速 0.4 mL/min, 进样量 1 μL。结果 万古霉素在 5~100 μg/mL 质量浓度范围内线性良好($r=0.9987$), 检测下限为 1 μg/mL。检测低浓度(5 μg/mL)、中浓度(60 μg/mL)、高浓度(90 μg/mL)三个浓度值的平均方法回收率均大于 90%, 各浓度值得日内、日内相对标准偏差(RSD)均小于 8%。结论 利用 UHPLC 可以快速准确的检测血清中万古霉素的浓度。

关键词: 超高效液相色谱; 万古霉素; 血药浓度分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.090

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2013)24-3432-01

在临幊上, 万古霉素主要用于治疗对甲氧西林具有抗药性之葡萄球菌所引起的严重或致命感染, 根据 2009 年美国感染病学会(IDSA)、美国卫生系统药师学会(ASHP)和感染病学会(SIDP)的联合专家组共同制定的《万古霉素治疗成人金黄色葡萄球菌感染的治疗监测实践指南》^[1], 推荐万古霉素在血清中的谷浓度需达到 10 μg/mL, 以避免产生具有万古霉素中介金葡菌(VISA)的风险。同时万古霉素的消除半衰期为 4~6 h, 静脉给药时几乎完全经肾排泄, 极易产生蓄积中毒, 因此对万古霉素药物浓度监测非常必要^[2]。

现在临幊上对万古霉素血药浓度检测的方法主要还是荧光偏振免疫分析法^[3]和高效液相色谱法(UHPLC)^[4], 前者的成本高, 给患者造成很大的经济负担, 不易推广; 而后者检测时间较长, 可能无法满足临幊的快速需要。而超高效液相色谱具有快速、准确、节约试剂成本等优点, 因此较为适宜进行临幊血药浓度监测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1290 超高效液相色谱(美国安捷伦公司), X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher), AB204-S 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore)。万古霉素标准品(美国 SIGMA 公司, 批号:1001011653), 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱采用 Agilent Zorbax SB-Aq C18 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相 A 为纯水, 流动相 B 为色谱纯乙腈, 色谱洗脱条件采用二维梯度洗脱, 全程 15 min, 0~2 min 保持流动相比例为 90% A 相及 10% B 相, 2~7 min 逐渐升高 B 相到 25%, 7.0~9.5 min 升高 B 相至 70% 并维持 3 min, 后迅速降低 B 相比例至 10% 直至洗脱过程结束, 洗脱过程流速设定为 400 μL/min, 柱温设定为 30 °C, 紫外检测器检测波长为 230 nm。

1.2.2 万古霉素标准溶液配制 精密称取万古霉素标准品至于 25 mL 容量瓶内, 加入超纯水溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的万古霉素标准溶液, 于 4 °C 避光保存。

1.2.3 血清样本制备 取混合血清样本(20 名健康志愿者血清样本混合制得)400 μL, 加入万古霉素标准溶液后, 以体积比 1:2 比例加入甲醇, 混匀后常温静置 10 min, 离心(10 000 r/

min)20 min, 吸取上清, 0.22 μm 孔径滤膜滤过即得。

1.2.4 标准曲线制备 在空白血清中加入不同体积的万古霉素标准溶液, 使血清万古霉素质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50、75、100 μg/mL, 按“1.2.3”项下方法进行处理后, 按“1.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录万古霉素积分峰面积, 平行操作 3 次, 以万古霉素色谱峰积分面积为纵坐标(Y), 以万古霉素血清质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线。

1.2.5 临幊标本的检测 选择 5 位使用了万古霉素的临幊患者(每日经静脉滴注给予万古霉素 1 克/次剂量治疗), 于第 2 次给药前 30 min, 经外周静脉采血 3 mL, 按“1.2.3”项下方法处理血样后, 依法测定谷浓度。

2 结 果

2.1 方法专属性 在“1.2.1”项色谱条件下, 空白血清与加入万古霉素血清色谱图, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。结果表明万古霉素分离度高且峰形良好, 空白血浆中未见干扰。

2.2 标准曲线的制备 在空白血清中加入不同体积的万古霉素标准溶液, 使血清万古霉素质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50、75、100 μg/mL, 按“1.2.3”项下方法进行处理后, 按“1.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录万古霉素积分峰面积, 平行操作 3 次, 以万古霉素色谱峰积分面积为纵坐标(Y), 以万古霉素血清质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 结果回归方程为 $Y=0.000112X+1.806$, $r=0.9987$, 万古霉素质量浓度在 5~100 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3 精密度实验 取空白血浆 400 μL, 加入万古霉素标准溶液, 制备成含万古霉素质量浓度分别为 5、60、90 μg/mL 的血清样品, 每一质量浓度均制备 6 份样品, 依法测定, 评价本方法的精密度, 见表 1。

表 1 精密度与回收率结果($n=6$)

质量浓度 (μg/mL)	日内精密度 (RSD%)	日间精密度 (RSD%)	方法回收率 (%)
5	5.70	5.11	105.8
60	4.01	5.76	100.2
90	4.05	4.28	101.0

2.4 方法的回收率实验 配制低、中、高 3 种浓度(下转插 II)

(上接第 3432 页)

(5、60、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素)标准血浆样品溶液,每种浓度 6 份,处理后检测。依据标准曲线计算各自的浓度,计算方法回收率。结果见表 1。

2.5 样品稳定性考察 取万古霉素质量浓度分别为 5、60、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品,分别在室温下存放 24 h 后,依法测定, RSD 值分别为 3.78%、4.56%、2.97%,表明血清样品在室温条件下放置 24 h 稳定。

2.6 临床患者血清药物浓度测定 选择 5 位使用了万古霉素的临床患者(每日经静脉滴注给予万古霉素 1 克/次剂量治疗),于第 2 次给药前 30 min,经外周静脉采血 3 mL,按“1.2.3”项下方法处理血样后,依法测定谷浓度。结果 5 份血样中万古霉素稳态血药浓度分别为 18.31、35.55、59.85、5.09、22.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据《万古霉素治疗成人金黄色葡萄球菌感染的治疗监测实践指南》中参考值,在所测样品中仅有 1 例患者血样的万古霉素谷浓度在 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的有效谷浓度范围内,其余 4 例患者均需要及时调整给药剂量,才能确保疗效及用药安全。

3 讨 论

超高效液相色谱万古霉素血液药物浓度监测是治疗药物监测(Therapeutic drug monitoring, TDM)的一个分支,其开展可以改变按常规剂量用药的传统做法。能够利用血药浓度来调整给药剂量^[5-6],达到提高疗效和减少不良反应的目的,使医生在用药时能够在很大程度上减少用药(包括加量、减量、换药、停药等)的盲目性,最终目的是设法使药物在患者中发挥最佳疗效,而不良反应最小。

UHPLC^[7-8]是在 HPLC 基础上开发的运用粒径低于 2 μm 的小颗粒色谱柱,能够耐受高压的新型色谱技术。该技术能够提高灵敏度、缩短分析时间、增加分离效果,提高分析效率,对于 TDM 更为有利。本研究中使用的 UHPLC 系统仅在 15 min 内即可完成一个样品的分析,大大缩短了分析时间,提高了检测效率。同时 UHPLC 对样品进样量需求很小,仅需 1~2 μL 即可满足分析需求,可以减轻患者的采血量,对一些特殊患者,尤其是儿童更为实用。与传统 HPLC 分析法相比,UHPLC 对流动相耗损量更低,一来可以节约试剂成本,二来可以减少一些有机流动相如乙腈等有毒试剂的使用,保护检验人员。在本研究中,血清中含有 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素也可被检测,但值得注意的是,根据《万古霉素治疗成人金黄色葡萄球菌感染的治疗监测实践指南》和《万古霉素临床应用中国专家共识》,要求万古霉素血清中谷浓度需达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,以避免发生细菌耐药性,取得良好的治疗效果,因此笔者在制定标准曲线和实际应用中,制定的下限为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

使用 UHPLC 进行药物浓度检测,可以指导临床医生合理用药,提高药物疗效,减少不良反应的发生,同时它对指导个体化药物治疗方案的设计和实施具有积极作用^[9]。比如使用一

些抗生素类药物,通过对 TDM 结果、实际治疗效果以及微生物耐药性鉴定等结果的综合与比对,可以在保证疗效的前提下尽可能的减少抗生素的使用量,减轻患者的负担,提高药物使用的安全性,使治疗方案个体化,合理化,同时避免微生物耐药现象^[10-11]。而运用 TDM 也可评估临床新药的治疗效果,观测其使用剂量、血药浓度和疗效之间的相关性,并能推测合用药物的相互作用机制,是验证新药或新的治疗方法可行性的重要依据。

参考文献

- [1] Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, et al. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(3):325-327.
- [2] 陈伯义,管向东,何礼贤.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.
- [3] 任婷麟,于春令.万古霉素血药浓度监测的临床应用[J].解放军药学学报,2012, 28(2):182-183.
- [4] Zhou JH, Maskaoui K, Lufadeju A, et al. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 731(1):32-39.
- [5] Esposito S, Deventera K, Tsjoen G, et al. Doping control analysis of desmopressin in human urine by LC-ESI-MS/MS after urine delipidation[J]. Biomed Chromatogr, 2012, 27(2):240-245.
- [6] Bohm DA, Stachel CS, Gowik P. Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(10):2943-2953.
- [7] Tsai IL, Sun HY, Chen GY, et al. Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2013, 116(2):593-603.
- [8] Baranowska I, Wilczek A, Baranowski J. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine[J]. Anal Sci, 2010, 26(7):755-759.
- [9] 蒙龙,方芸,丁选胜.低谷浓度和高谷浓度万古霉素疗效与安全性比较[J].药学与临床研究,2013,21(1):74-77.
- [10] Lee HG, Jang J, Choi JE, et al. Blood stream infections in patients in the burn intensive care unit[J]. Infect Chemother, 2013, 45(2):194-201.
- [11] 陈婷,梅义将.治疗药物监测临床应用现状[J].世界临床药物杂志,2012,33(6):380-383.

(收稿日期:2013-07-28)