

HPLC法与微生物法测定人血浆中去甲万古霉素浓度的差异比较

张开礼*,李成,李玉珍#,杨春智(深圳市福田区人民医院,广东深圳 518033)

中图分类号 R969.1;R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)26-3655-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.26.16

摘要 目的:比较高效液相色谱(HPLC)法与微生物法测定人血浆中去甲万古霉素浓度的差异。方法:分别使用HPLC法与微生物法对人血浆中去甲万古霉素浓度进行检测,回顾性分析两种技术的临床测试结果。结果:两种方法所测得结果的回归方程为 $y=0.9927x+0.1558$ ($r=0.9976$),比较去甲万古霉素血药浓度的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:HPLC法与微生物法均为较有效且可靠的去甲万古霉素血药浓度检测技术。各医院在对去甲万古霉素进行血药浓度检测时,可根据医院自身的条件选择相应的检测方法。

关键词 高效液相色谱法;微生物法;去甲万古霉素;血药浓度

Comparison of Plasma Concentration of Norvancomycin by HPLC and Microbiological Method

ZHANG Kai-li, LI Cheng, LI Yu-zhen, YANG Chun-zhi (The People's Hospital of Futian Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the differences of plasma concentration of norvancomycin by HPLC and microbiological method. METHODS: Microbiological method and HPLC were used to detect the plasma concentration of norvancomycin, and clinical test result of both techniques was retrospectively analyzed. RESULTS: There were no significant differences in the plasma concentration of norvancomycin by microbiological method and HPLC ($y=0.9927x+0.1558$, $r=0.9976$) ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Both microbiological method and HPLC are more effective and reliable for the plasma concentration detection of norvancomycin. The hospitals can choose corresponding method according to their condition when determining plasma concentration of norvancomycin.

KEYWORDS HPLC; Microbiological method; Norvancomycin; Plasma concentration

去甲万古霉素属于三环糖肽类抗生素,具有较为理想的革兰阳性菌抑制作用,特别有助于现阶段临床常见的表皮葡萄球菌和耐药金黄色葡萄球菌感染性疾病的治疗,且患者细

菌耐药性发生率较低,因而临床应用价值较高。然而,去甲万古霉素存在一定的肾毒性和耳毒性反应,因而患者临床治疗过程中需要加强血药浓度的监测。高效液相色谱(HPLC)法

- 植杂志,2003,24(5):274.
- [5] 任斌,邓斌,黎曙霞,等.197例肾移植患者环孢素A血药浓度监测数据分析[J].广东药学,2003,13(1):41.
- [6] 钱筠,刘复强,吴轶苹.血液病粒细胞缺乏症患者医院感染情况的调查[J].实用医学杂志,2009,25(3):475.
- [7] Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S, et al. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation[J].*Bone Marrow Transplant*, 2001,28(2):181.
- [8] 史天陆,孙言才,沈爱宗,等.他克莫司临床不良反应与防治[J].中国医院用药评价与分析,2009,9(1):67.
- [9] Wingard JR, Nash RA, Przepiorka D, et al. Relationship of tacrolimus (FK506) whole blood concentrations and efficacy and safety after HLA-identical sibling bone marrow transplantation[J].*Biol Blood Marrow Transplant*, 1998,4(3):157.
- [10] Przepiorka D, Nash RA, Wingard JR, et al. Relationship of tacrolimus whole blood levels to efficacy and safety outcomes after unrelated donor marrow transplantation[J].*Biol Blood Marrow Transplant*, 1999,5(2):94.
- [11] Filler G, Neuschulz I, Vollmer I, et al. Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion in paediatric renal transplant recipients[J].*Nephrol Dial Transplant*, 2000,15(6):867.
- [12] DiZerega CS. Contemporary adhesion prevention[J].*Fertil Steril*, 1994,61:219.
- [13] 李继芳,张翠欣,梁春慧.他克莫司药物相互作用的新进展[J].肝胆外科杂志,2008,16(6):472.
- [14] 吴悦,杨志豪,唐昆,等.肾移植病人食用葡萄柚后升高他克莫司血药浓度[J].中国药理学杂志,2008,43(12):957.
- [15] 徐芳,翟所迪,胡永芳.他克莫司发生药物相互作用的分子机制[J].中国药理学杂志,2007,42(13):965.
- [16] de Wluidt SN, van Schaik SN, Soldin OP, et al. The interaction of age, genetics, and disease severity on Tacrolimus dosing requirements after pediatric kidney and liver [J].*Transplantation*, 2011,67(12):1231.

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0755-8398222-88371。E-mail:zhangkl04@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学、药事管理。电话:0755-83982222-88377。E-mail:yuzhen628@126.com

(收稿日期:2015-04-30 修回日期:2015-05-20)
(编辑:李 劲)

与微生物法是现阶段临床常用的血药浓度检测方法,笔者分别利用两种方法对人血浆中去甲万古霉素浓度进行了检测,并对测定结果进行了比较。

1 材料

1.1 仪器

HPLC 仪,包括 Empower 色谱工作站、2487 紫外-可见分光光度检测器、1525 泵(美国 Waters 公司);抗生素效价测定仪(北京先驱威锋技术开发公司);TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:6.0 cm)。

1.2 试剂与菌株

去甲万古霉素标准品(日本 ELiLiLy 公司,批号:H20030375,纯度:99.2%);CMCC(B) 枯草芽孢杆菌(江苏省药品检验所,批号:63501);抗生素检定培养基Ⅷ号(北京三药科技公司,批号:070905);磷酸二氢钾为分析纯,异丙醇、三氯甲烷、乙腈为色谱纯。空白血浆由深圳市中心血站提供。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Symmetry-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm);流动相:乙腈-0.05 mmol/L 磷酸二氢钾(8:92, V/V);进样量:20 μl;检测波长:236 nm;流速:1 ml/min。

2.1.2 标准溶液的配制 准确称取去甲万古霉素标准品 5 mg,置于 25 ml 量瓶中,用纯水溶解并定容,配制成质量浓度为 200 μg/ml 的标准储备液,4 °C 冷藏,备用。临用时用空白血浆稀释成质量浓度为 5、10、20、40、60、80 μg/ml 的标准溶液。

2.1.3 血样处理 取血浆样品 500 μl,置于 5 ml 离心管内,加入 20% 硫酸锌(ZnSO₄)溶液 500 μl,涡旋混合 2 min,以转速为 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μl 进样测定。

2.1.4 标准曲线的制备 取系列浓度去甲万古霉素的血浆标准溶液,按“2.1.3”项下方法处理后,取 20 μl 进样测定,记录色谱图。以峰面积(A)对药物浓度(c)进行线性回归,得标准曲线方程: $A=134.35c+230.93$ ($r=0.9994, n=6$)。结果表明,去甲万古霉素血药浓度在 5~80 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.1.5 回收率及精密度试验 按照“2.1.2”项下方法,用空白血浆配制质量浓度为 10、20、60 μg/ml 的去甲万古霉素标准溶液,按照“2.1.3”项下方法进行样品处理,取样 20 μl 进样测定,通过标准曲线计算其实际浓度,并计算回收率。在空白血浆中加入去甲万古霉素标准溶液,分别配制质量浓度为 10、20、60 μg/ml 的血浆标准溶液,进行离心处理,进样 20 μl,24 h 内重复测定 5 次,同一浓度连续测定 5 d,并分别对高、中、低浓度的日间和日内相对标准差(RSD)进行计算^[1]。回收率及精密度试验结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of recovery and precision test($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 检测方法 | 理论浓度, μg/ml | 日间 RSD, % | 日内 RSD, % | 回收率, % |
|--------|-------------|-----------|-----------|--------------|
| HPLC 法 | 10 | 5.83 | 5.75 | 98.3 ± 2.21 |
| | 20 | 5.42 | 4.82 | 101.5 ± 4.33 |
| | 60 | 4.94 | 4.53 | 97.2 ± 4.34 |
| 微生物法 | 10 | 4.22 | 6.49 | 100.7 ± 2.32 |
| | 20 | 5.02 | 5.63 | 98.1 ± 1.22 |
| | 60 | 5.51 | 4.59 | 99.2 ± 2.22 |

2.1.6 稳定性试验 分别取 2 份质量浓度为 10、20、60 μg/ml 的去甲万古霉素血浆标准溶液,每份 4 ml,一份置于 -20 °C 冷冻,一份置于室温条件下,并分别于 0、2、4、8、12 h 取样,进行

离心处理,进样 20 μl,对去甲万古霉素的浓度进行测定,检测样品的稳定性。结果显示,置室温和冷冻条件下的测定结果基本一致。可知,在室温和反复冻融条件下去甲万古霉素血浆样本均具有良好的稳定性,测定过程中不需要加以特殊保护^[2]。

2.1.7 专属性试验 分别取患者血浆样品 400 μl 和空白血浆 400 μl,加入 20% ZnSO₄ 溶液 400 μl,涡旋混合 2 min,以转速为 500 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μl 进样测定,记录色谱图(图 1)。由图 1 可见,去甲万古霉素保留时间为 7.07 min,且色谱峰与空白血浆中内源物质分离度高,分离效果良好。

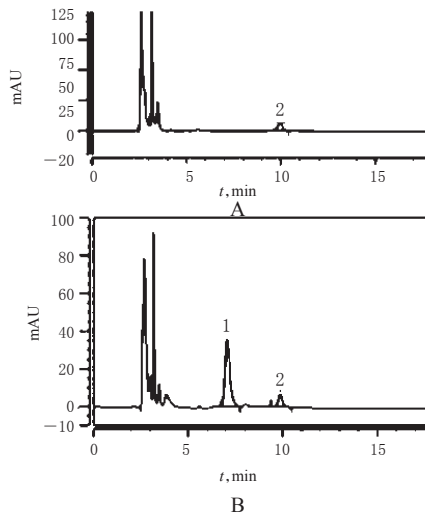


图 1 去甲万古霉素 HPLC 图

A. 空白血浆; B. 患者血浆; 1. 去甲万古霉素; 2. ZnSO₄

Fig 1 HPLC chromatogram of norvancomycin

A. blank plasma; B. patient's plasma; 1. norvancomycin; 2. ZnSO₄

2.2 微生物法

2.2.1 标准溶液的配制 准确称取去甲万古霉素标准品 50 mg,用灭菌的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)配制成质量浓度为 1 000 μg/ml 的溶液,并用空白血浆将其稀释成质量浓度为 5、10、15、20、40、60 μg/ml 的标准溶液^[2]。

2.2.2 菌悬液的配制 取 CMCC(B) 枯草芽孢杆菌,按《中国药典》2010 年版附录方法^[3]配制。

2.2.3 含菌平板制备 将已灭菌的抗生素检定培养基Ⅷ号加热融化,待冷却至 60 °C 时加入适量枯草芽孢杆菌悬液,摇匀,用灭菌吸管吸取 20 ml,注入已消毒的直径为 90 mm 的抗生素测定专用平皿中,摊布均匀,用陶瓦盖覆盖,静置待凝固。

2.2.4 打孔加样 制好的平皿冷却凝固后,用内径为 3 mm 的不锈钢管打 6 个孔,挑去孔内琼脂,将配制好的 5、10、15、20、40、60 μg/ml 系列浓度标准溶液,用微量移液器依次注入 6 个小孔中,每孔 25 μl,并予标记,用陶瓦盖覆盖。于(36 ± 1) °C 恒温培养 14~16 h,取出置抗生素效价测定仪扫描各抑菌圈直径(D),根据 D 大小对去甲万古霉素浓度的对数(c)作线性回归,计算得回归方程: $D=0.0179c+0.9455$ ($r=0.9974, n=6$)。结果表明,去甲万古霉素检测浓度在 5~60 μg/ml 内线性关系良好。

2.2.5 回收率及精密度试验 将去甲万古霉素标准溶液用血浆稀释,使其浓度分别为 10、20、60 μg/ml,24 h 内重复测定 5 次,同一浓度连续测定 5 d,计算回收率、日内和日间 RSD。回收率及精密度试验结果结果见表 1。

2.3 统计学方法

通过SPSS 17.0软件分析和处理所得数据。计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过单因素方差分析法进行统计学处理。如果所得分析结果示 $P < 0.05$,可以证实两组数据资料比较差异具有统计学意义。

2.4 HPLC法与微生物法实际血药测定结果比较

取30名应用去甲万古霉素患者的血液样本,分别通过HPLC法与微生物法进行血药浓度检测,结果见表2。以HPLC法测得的结果为横坐标,微生物法测得的结果为纵坐标作图,并进行线性回归分析,结果见图2。两种方法所测得结果的回归方程为 $y = 0.9927x + 0.1558$ ($r = 0.9976$),表明两种检测方法具有较为理想的相关性。对两种方法的检测结果进行统计学分析,得 $P > 0.05$,表明两种检测方法比较差异无统计学意义。

表2 两种检测方法血药浓度测定结果($\mu\text{g/ml}$)

Tab 2 Results of content determination of samples by 2 kinds of methods($\mu\text{g/ml}$)

| 序号 | HPLC法 | 微生物法 | 序号 | HPLC法 | 微生物法 | 序号 | HPLC法 | 微生物法 |
|----|-------|-------|----|-------|-------|----|-------|-------|
| 1 | 19.32 | 19.12 | 11 | 13.14 | 13.05 | 21 | 14.89 | 15.90 |
| 2 | 7.31 | 7.35 | 12 | 9.56 | 9.45 | 22 | 9.89 | 9.18 |
| 3 | 11.67 | 11.50 | 13 | 32.14 | 32.01 | 23 | 16.86 | 17.68 |
| 4 | 8.43 | 7.73 | 14 | 35.87 | 35.21 | 24 | 25.69 | 25.20 |
| 5 | 22.44 | 23.01 | 15 | 7.57 | 7.55 | 25 | 8.42 | 8.44 |
| 6 | 53.60 | 53.10 | 16 | 38.45 | 38.87 | 26 | 30.33 | 28.56 |
| 7 | 30.65 | 30.77 | 17 | 40.23 | 40.01 | 27 | 47.10 | 47.20 |
| 8 | 11.38 | 11.85 | 18 | 10.54 | 10.55 | 28 | 50.54 | 50.20 |
| 9 | 41.30 | 41.96 | 19 | 6.10 | 6.05 | 29 | 28.30 | 27.20 |
| 10 | 15.87 | 15.12 | 20 | 59.30 | 56.11 | 30 | 10.55 | 9.81 |

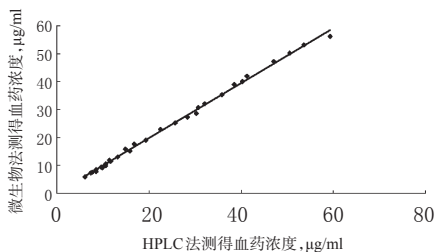


图2 两种检测方法的相关性

Fig 2 Correlation of the two detection method

3 讨论

血浆样品的预处理方法,文献报道主要采用沉淀法或沉淀后液-液萃取法^[4]。沉淀后液-液萃取法,如用乙腈-异丙醇沉淀蛋白后用二氯甲烷反提,所得样品杂质较少,但操作烦琐且易产生乳化。文献中以10% ZnSO_4 沉淀血浆后直接进样,但笔者经试验发现,采用10%的 ZnSO_4 沉淀血浆,以转速为10 000 r/min离心10 min,上清液仍有肉眼可见杂质,无法进样测定。经过一系列的摸索,笔者最终采用加入与样品等体积的20% ZnSO_4 溶液,涡旋混合2 min,以转速为3 500 r/min离心10 min,取上层清液进样,处理后的样品可以满足试验的需要。

采用HPLC法测定万古霉素和去甲万古霉素时,流动相一般都选择pH 3.2的磷酸二氢钾缓冲液和甲醇或乙腈^[5],故笔者选用pH 3.2的磷酸二氢钾-乙腈(92:8, V/V)为流动相。试验中发现,乙腈比例对去甲万古霉素保留时间影响大,经反复配比试验,最终确定0.05 mmol/L磷酸二氢钾-乙腈比例为92:8

(V/V)。这一色谱条件可以很好地使去甲万古霉素与其他杂质分离,符合生物样品测定的要求。

HPLC法和荧光偏振免疫法(FPIA)是现阶段临床上较为常用的两种去甲万古霉素药物浓度的检测方法。利用FPIA法检测去甲万古霉素浓度,样品预处理相对简单,测定快速,但存在不少因素制约其广泛应用。而HPLC法所需仪器为HPLC仪,一般的医院都具备,去甲万古霉素HPLC检测不需要试剂盒,花费仅为FPIA法的1/5。因此,对于一般的医院而言,临床监测去甲万古霉素血药浓度宜采用HPLC法^[6]。

采用HPLC法对去甲万古霉素血药浓度进行测定,具有较高的灵敏度、重现性、准确性,而且分析时长适中,适用于临床。然而,HPLC法测定技术需要专用耗材和仪器,因而操作成本相对较高;所用试剂有一定的毒性,操作过程中需要对自身进行必要的防护;对样品要求较严格,样品前处理较为复杂^[7]。采用微生物法对去甲万古霉素血药浓度进行测定,样品处理方法较为简单,且不需要特殊的仪器设备^[8]。然而,微生物法需要对相关微生物进行培养,比较烦琐耗时;检测过程中容易受到多种复杂因素的影响,若患者同时接受其他抗生素治疗,则该方法的准确性会受到较大影响;需要对测定时高浓度点超出线性范围上限的情况加以关注,稀释后再进行测定^[9]。但在排除其他抗生素干扰的条件下,单从对血药浓度测定的准确性来分析,两种检测方法的检测结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$),均可作为临床血药浓度的检测方法。各医院在对去甲万古霉素进行血药浓度检测时,可根据医院自身的条件选择相应的检测方法。

参考文献

- [1] 崔彦,周金玉,孙增先,等.酶放大免疫法与荧光偏振免疫法检测环孢素A血药浓度对比研究[J].中国药业,2013,22(19):17.
- [2] 彭思维,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.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:XI79.
- [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浓度[J].中南药学,2009,7(2):100.
- [5] 季闽春,薛杨勇,唐建国,等.反相高效液相色谱法测定人血清中万古霉素的浓度[J].中国临床药理学杂志,2009,25(4):338.
- [6] 熊磊,苏丹,辛华雯,等.HPLC法同时测定人血清中万古霉素和去甲万古霉素浓度[J].中国药师,2008,11(3):278.
- [7] 黄兰奇,周卫华,陈义旺,等.万古霉素键合固定相的分离性能[J].色谱,2013,31(9):821.
- [8] 乔晓云,朱怀军,王宇.酶放大免疫分析法监测万古霉素血药浓度的质控评估[J].药学与临床研究,2013,21(5):516.
- [9] 王伟忠,钱南平,陈斌,等.高效液相色谱法和化学发光酶免疫法测定万古霉素的血药浓度[J].中国药业,2012,21(20):27.

(收稿日期:2015-02-13 修回日期:2015-06-02)

(编辑:李 劲)