

UPLC法测定人血清中去甲万古霉素的浓度^Δ

吴健*,汪永忠,韩燕全,高家荣[#](安徽中医学院第一附属医院,合肥 230031)

中图分类号 R969.1;R978 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)30-2822-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.30.12

摘要 目的:建立测定人血清中去甲万古霉素浓度的方法。方法:血样采用乙腈-6%高氯酸(1:5)处理后,采用超高效液相色谱法(UPLC)进样测定、色谱柱为BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸氢二钾缓冲液(pH 3.2),进行梯度洗脱,检测波长为236 nm,柱温为35℃,流速为0.25 ml/min,内标为万古霉素。结果:去甲万古霉素的保留时间为4.16 min,其血药浓度在2~100 μg/ml范围内线性关系良好($r=0.9997$);日内、日间RSD均<2%;方法回收率为98.06%~99.82%。结论:该方法方便、准确、灵敏,适用于去甲万古霉素的临床血药浓度监测。

关键词 去甲万古霉素;血药浓度;超高效液相色谱法;药动学

Determination of Norvancomycin in Human Serum by UPLC

WU Jian, WANG Yong-zhong, HAN Yan-quan, GAO Jia-rong (The First Affiliated Hospital of Anhui TCM College, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of norvancomycin concentration in human serum. METHODS: After treated with acetonitrile-6% perchloric acid (1:5), UPLC method was adopted to determine the concentration of norvancomycin in blood sample. BEH C₁₈ column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.2, gradient elution) at the flow rate of 0.25 ml/min. The detection wavelength and column temperature were set at 236 nm and 35℃, respectively. Vancomycin was used as the internal standard. RESULTS: The linear range of norvancomycin was 2-100 μg/ml with recovery of 98.06%-99.82%. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is convenient, sensitive, accurate and suitable for the serum concentration monitoring of norvancomycin in the clinic.

KEY WORDS Norvancomycin; Serum concentration; UPLC; Pharmacokinetics

去甲万古霉素为糖肽类抗生素,主要用于葡萄球菌、肠球菌、难辨梭状芽孢杆菌等所致的系统感染和肠道感染^[1]。但其安全血药浓度范围窄,连续给药后药物在体内有蓄积现象,易出现耳毒性、肾毒性等不良反应^[2],临床在给药时需进行血药浓度监测。因此,本研究建立了一种简单、灵敏、快速地检测人血清中去甲万古霉素血药浓度的方法,用于其临床血药浓度监测,以指导临床安全、合理用药。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity H-Class UPLC 超高效液相色谱仪,包括四元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、PDA全波长检测器以及Empower2数据处理工作站(美国Waters公司);BP211D电子分析天平(德国赛多利斯公司);KDC-16H高速离心机(科大创新中佳公司)。

1.2 药品与试剂

去甲万古霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130338-200303,含量:83.4%);万古霉素对照品(中国食品药

品检定研究院,批号:130360-200301,含量:100%);乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、磷酸、高氯酸等试剂均为分析纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A为乙腈,B为0.05 mol/L磷酸氢二钾缓冲液(pH 3.2),进行梯度洗脱,流动相梯度洗脱程序见表1;检测波长:236 nm;柱温:35℃;流速:0.25 ml/min;进样量:2 μl。在此色谱条件下,去甲万古霉素和内标万古霉素分离良好,保留时间分别为4.16 min和4.67 min。UPLC图谱见图1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process for mobile phase

t, min	流动相A, %	流动相B, %
0	7	93
2	10	90
5	12	88
8	40	60
9	7	93
12	7	93

2.2 对照品溶液的制备

分别准确称取去甲万古霉素对照品和万古霉素对照品10 mg置于10 ml量瓶中,分别加入蒸馏水溶解并稀释至刻度,得

^Δ 基金项目:国家中医药重点学科(临床中药学)建设项目资助(No.国中医药人教发[2012]32号);国家中医药管理局“十二五”重点专科(临床药学)培育项目资助(No.国中医药医政发[2012]2号)

* 药师。研究方向:临床药学。电话:0551-62838553

[#] 通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:临床药学与新药开发。E-mail:zyfygj2006@163.com

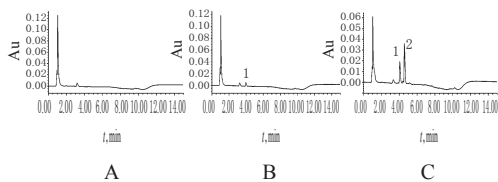


图1 UPLC图谱

A.空白血清; B.空白血清+去甲万古霉素; C.服用去甲万古霉素的患者血清样品+内标; 1.去甲万古霉素; 2.万古霉素

Fig 1 UPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank serum+norvancomycin; C. serum sample of patients after administration of norvancomycin+internal standard; 1. norvancomycin; 2. vancomycin

质量浓度为1 mg/ml的去甲万古霉素标准储备液和万古霉素标准储备液。

2.3 血清样品的处理

精密吸取血清400 μl于1.5 ml Ep管内,加入1 mg/ml的内标万古霉素储备液40 μl,涡旋振荡30 s,加入乙腈-6%高氯酸(1:5)溶液400 μl,涡旋混合3 min,12 000 r/min离心10 min,吸取上清液置进样瓶中,备用。

2.4 标准曲线的制备

取健康人空白血清,准确加入去甲万古霉素标准储备液,配制成0.002、0.004、0.008、0.02、0.05、0.1 mg/ml的标准血样,照“2.3”项下方法处理血样,进样,记录峰面积。每个浓度制作3份血样,每份测2次,取平均值。以不同浓度的平均峰面积为纵坐标(y),以标准浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $y=1\,543.1x+717.45$ ($r=0.999\,7, n=6$)。结果表明,去甲万古霉素血药浓度在2~100 μg/ml范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验

分别配制高、中、低(0.1、0.02、0.002 mg/ml)3种质量浓度的血清样品,照“2.3”项下方法处理血样,按“2.1”项色谱条件进样测定,各浓度同日内平行操作6次,计算日内RSD;连续测定5 d,计算日间RSD。结果日内、日间RSD均<2%,表明此方法测定去甲万古霉素精密度良好,详见表2。

表2 精密度与回收率试验结果

Tab 2 Results of stability tests under different conditions

质量浓度,mg/ml	日内RSD,%	日间RSD,%	方法回收率,%	提取回收率,%
0.002	0.9	1.0	99.82±3.4	96.29±2.8
0.02	1.1	1.1	99.16±3.7	97.42±1.6
0.1	1.2	1.3	98.06±4.1	97.96±1.9

2.6 回收率试验

分别配制高、中、低(0.1、0.02、0.002 mg/ml)3种质量浓度的血清样品各6份,照“2.3”项下方法处理血样,按“2.1”项色谱条件进样测定,通过测得量与加入量的比值,计算方法回收率。另分别配制高、中、低(0.1、0.02、0.002 mg/ml)3种质量浓度的血清样品各6份,不加内标万古霉素,余照“2.3”项下方法处理血样,按“2.1”项色谱条件测定,将样品峰面积除以进同一质量浓度的标准液所得峰面积,即得提取回收率,结果见表2。

2.7 稳定性试验

分别配制高、中、低(0.1、0.02、0.002 mg/ml)3种质量浓度的血清样品,照“2.3”项下方法处理血样,分别置于室内、4℃冰箱、-20℃冰箱,并于第1、7、14 d分别按“2.1”项色谱条件进样测定,考察去甲万古霉素血清样品在室温、冷藏及冻融条件下去甲万古霉素的稳定性。结果表明样本稳定性良好,RSD

均<1%。

2.8 验证试验

取使用去甲万古霉素的患者3例,分别静脉采集谷浓度血样2 ml,全血以3 000 r/min离心5 min,吸取血清,照“2.3”项下方法处理血样,按“2.1”项色谱条件进样测定。结果血药浓度分别为10.04、6.72、13.25 μg/ml,峰形良好,杂峰无干扰。

3 讨论

去甲万古霉素的半衰期为6 h,安全血药浓度范围较窄,谷浓度为5~10 μg/ml^[3],峰浓度也仅为20~40 μg/ml^[3];且个体差异大,毒性反应与血药浓度密切相关,剂量增加其血药浓度及有效浓度持续时间均延长;连续多次给药后,药物在体内有蓄积现象。因此,为评价疗效和确定给药方案,使给药方案个体化,以提高药物治疗水平,达到临床安全、有效、合理用药,临床有必要对去甲万古霉素进行血药浓度的监测^[4]。

目前用于去甲万古霉素血药浓度测定的方法有荧光偏振免疫(FPIA)法^[5]、高效液相色谱(HPLC)法^[6-8]、离子对色谱法^[9]、微生物法^[10]等。FPIA法样本预处理简单、方便快捷,但所需仪器和试剂价格较高,且无专用的去甲万古霉素试剂盒,只能使用万古霉素的试剂盒,其检测结果的可靠性存在争议。一般医院都使用HPLC法测定去甲万古的血药浓度,但由于患者可能使用多种药物,血清中的成分复杂、含量低,普通的液相色谱分离时间长,分离过程中不可避免的存在一定的干扰,使测定结果有所偏差。因此,本试验采用超高效液相(UPLC)法可有效避免上述不足,其具有高分离度、高灵敏度、速度快、出峰时间短,进样量少等特点。所采用的色谱条件可用于去甲万古霉素的临床血药浓度测定。

在血样的处理上,本试验结合文献^[11],分别考察了甲醇提取法和蛋白沉淀法,结果表明采用乙腈-6%高氯酸(1:5)溶液沉淀蛋白效果优于10%硫酸锌和10%三氯乙酸沉淀。沉淀后取上清液直接进样,样品峰和内标峰形良好、分离度较高,无杂质峰的干扰,可用于生物样品测定。

流动相的选择上,文献^[6-8]大多采用磷酸氢二钾缓冲液-甲醇,组成较为复杂,通过试验考察了各比例发现均不能有效分离样品峰和内标峰,存在峰形拖尾、重叠及出峰时间短等问题。后采用磷酸氢二钾-乙腈梯度洗脱较好地解决了上述问题,使峰形、出峰时间最佳,药物与内标峰分离完全。

综上所述,本试验条件下,样品处理简单、快速,去甲万古霉素的峰形对称性良好、分离完全,血液中内源性杂质无干扰,精密度和稳定性均符合生物样品的分析要求,可用于临床去甲万古霉素的血药浓度监测。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].17版.北京:人民卫生出版社,2011:85-86.
- [2] 徐叔云.临床药理学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2004:432.
- [3] 汪宝军,胡庭杰.HPLC法测定人血清中去甲万古霉素浓度[J].齐鲁药事,2011,30(8):468.
- [4] 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.
- [5] 肖力,任斌,陈小路.荧光偏振法测定去甲万古霉素血药

影响颅内恶性肿瘤患者体内苯妥英钠血药浓度的相关因素^Δ

李忠东^{1*}, 黄永安², 万经海³, 周 慧¹, 周晓丹¹(1.解放军空军总医院药学部, 北京 100142; 2.解放军空军总医院神经外科, 北京 100142; 3.中国医学科学院肿瘤医院脑外科, 北京 100142)

中图分类号 R969.3; R971*.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)30-2824-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.30.13

摘要 目的:探讨苯妥英钠预防颅内恶性肿瘤患者手术后癫痫的血药浓度与其体内病理生理因素及合并用药的相关性,为临床合理使用苯妥英钠提供参考。方法:收集133例次颅内肿瘤患者手术后使用苯妥英钠预防癫痫的病历资料,记录患者性别、年龄、体质量、血药浓度、CYP2C9和CYP2C19基因多态性,以及相应生化检验值。应用SAS软件(6.04 & 8.0版)对数据进行多元线性回归分析。结果:苯妥英钠血药浓度与年龄和体质量之间存在明显正相关性($P < 0.05$),但与CYP2C9基因多态性呈明显负相关性($P < 0.05$)。结论:应主要从患者年龄、体质量以及CYP2C9基因多态性的角度,设计苯妥英钠的个体化剂量方案。

关键词 苯妥英钠; 血药浓度; 多元线性回归

Associated Influential Factors of Blood Concentration of Phenytoin Sodium in Patients with Intracranial Malignant Tumor

LI Zhong-dong¹, HUANG Yong-an², WAN Jing-hai³, ZHOU Hui¹, ZHOU Xiao-dan¹(1. Dept. of Pharmacy, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China; 2. Dept. of Neurosurgery, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China; 3. Dept. of Cerebral Surgery, Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100142, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the relation between blood concentration of phenytoin sodium and patho-physiological factors and drug combination in patients with intracranial malignant tumor after surgery, and to provide reference for rational use of phenytoin sodium in the clinic. METHODS: Blood concentration of phenytoin sodium and clinical information data such as gender, age, body weight, gene polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19, the corresponding biochemical testing results were collected from 133 patients with intracranial malignant tumor after surgery and analyzed with multiple linear regression method by using SAS software(6.04 & 8.0 edition). RESULTS: Significant positive relation was found between blood concentration of phenytoin sodium and age or body weight($P < 0.05$), but significant negative relation was found between blood concentration of phenytoin sodium and gene polymorphisms of CYP2C9($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Individual dosage regimen may be designed according to patient's age, body weight and gene polymorphisms of CYP2C9.

KEY WORDS Phenytoin sodium; Blood concentration; Multiple linear regression

苯妥英钠是一种抗癫痫药,临床上可用于预防创伤后癫痫^[1],以及颅内肿瘤如额叶和颞叶恶性肿瘤等手术后癫痫^[2]。苯妥英钠药动学特征是非线性代谢,治疗窗窄,药动学过程存在个体间和个体内差异,易受人体病理生理因素和合并用药的影响。近年研究^[3]表明,苯妥英钠在肝脏的代谢受细胞色素P₄₅₀(CYP)2C9和CYP2C19等的影响,其严重的神经毒性常与CYP2C9和CYP2C19基因多态性有关。因此,监测其血药浓

度,分析影响其血药浓度的因素,对合理使用苯妥英钠、预防其不良反应意义重大。本文以多元线性回归方法分析颅内肿瘤患者手术后病理生理因素对苯妥英钠血药浓度的影响,为临床合理使用苯妥英钠提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集2010—2011年在解放军空军总医院神经外科和中国

- 浓度[J].齐齐哈尔医学院学报,2007,28(3):315.
- [6] 姜敏,罗丽芳,戴隶明,等.HPLC法测定去甲万古霉素血清药物浓度[J].实用临床医学,2011,12(11):1.
- [7] 陈方亮,余翠琴,刘海燕,等.HPLC法测定人血清中万古霉素和去甲万古霉素浓度[J].海峡药学,2012,24(6):260.
- [8] 林秀丽,朱金平,费燕.HPLC法快速测定万古霉素和去甲万古霉素的血药浓度[J].中国临床药理学杂志,2011,20

- (4):231.
- [9] 蒋国强,杨水新,叶勇.离子对色谱法同时测定万古霉素、去甲万古霉素血药浓度[J].中国现代应用药学,2006,23(4):322.
- [10] 张菁,胡瑾瑜,郁继诚,等.去甲万古霉素临床药代动力学及血药浓度测定[J].中国抗感染化疗杂志,2003,3(4):202.
- [11] 李洪亮,乔静,曹枚,等.6种不同沉淀试剂对万古霉素、去甲万古霉素血药浓度测定影响的比较[J].山西医药杂志,2009,38(12):1154.

(收稿日期:2013-04-12 修回日期:2013-05-20)

Δ 基金项目:首都医学发展科研基金资助(No.2009-2055)
* 主任药师。研究方向:临床药理学与临床药理学。电话:010-66928606。E-mail:zhdl009@126.com