

离子对色谱法同时测定万古霉素、去甲万古霉素血药浓度

蒋国强¹, 杨水新², 叶勇² (1. 湖州市药品检验所, 浙江 湖州 313000; 2. 湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

摘要:目的 测定盐酸万古霉素、盐酸去甲万古霉素血药浓度。方法 采用离子对高效液相色谱法。色谱柱为 Shimpack C₁₈ 柱 (150 × 6 mm, 5 μm), 加 Alltech C₁₈ 保护柱; 流动相为乙腈-离子对缓冲液 (115: 885, pH 3.1); 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 236 nm, 柱温 40 °C。结果 盐酸去甲万古霉素在 0.80 ~ 80.19 μg · mL⁻¹, 盐酸万古霉素在 1.08 ~ 108.00 μg · mL⁻¹ 浓度范围内呈良好的线性关系, 两者低、中、高回收率在 97% ~ 110% 之间, RSD 在 2% ~ 6% 之间。结论 本方法简便可行, 快速可靠, 适合于临床血药浓度监测。

关键词: 万古霉素; 去甲万古霉素; 离子对色谱法; 血药浓度监测

中图分类号: R917.795.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)04-0322-02

Determination of blood concentration of vancomycin and norvancomycin by ion-paired HPLC

JIANG Guo-qiang¹, YANG Shui-xin², YE Yong² (1. Huzhou Institution for Drug Control, Huzhou 313000, China; 2. Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the blood concentration of vancomycin and norvancomycin. **METHODS** HPLC was used. CH₃CN-ion paired buffer (115: 885, pH 3.1) was used as mobile phase on Shimpack C₁₈ (150 × 6 mm, 5 μm) with column temperature at 40 °C. The flow rate was 1 mL · min⁻¹. Detection wavelength was 236 nm. **RESULTS** The calibration curve was linear within the range of 0.80 ~ 80.19 μg · mL⁻¹ for norvancomycin and 1.08 ~ 108.00 μg · mL⁻¹ for vancomycin. The average recovery with high and low blood concentration of norvancomycin and vancomycin were 97% ~ 110% with RSD among 2% ~ 6%. **CONCLUSION** This method was simple, rapid and suitable for the clinical monitor of norvancomycin and vancomycin.

KEY WORDS: norvancomycin; vancomycin; ion-paired HPLC; drug blood concentration

万古霉素、去甲万古霉素同属三环糖肽类抗生素, 对革兰阳性细菌有强大抗菌作用, 尤其对目前临床较为棘手的严重耐药金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌感染性疾病有较好疗效, 且不易诱导细菌产生耐药性, 因而深受临床重视。但其具有耳、肾不良反应, 临床应用时常需进行血药浓度监测, 特别是老年患者和肾功能不全者, 可通过血药浓度监测, 及时调整给药方案, 以避免耳、肾功能损害。

万古霉素、去甲万古霉素血药浓度的测定方法, 已报道的有免疫法和高效液相色谱法, 其国内文献报道高效液相色谱法较多^[1-3], 但以离子对色谱法同时测定血清中万古霉素和去甲万古霉素的方法则未见报道, 笔者通过实验建立此方法, 可同时测定血清中万古霉素和去甲万古霉素浓度, 并能较好地排除了各有关物质的干扰。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (996 二极管阵列检测器, 515 泵, 7725 进样阀, Millennium 32 色谱管理系统); 漩涡混合器; 离心机。

1.2 试剂

盐酸万古霉素: 中国药品生物制品检定所, 批号为 3389302 (组份含量 81%); 盐酸万古霉素: 浙江新昌制药厂, 批号为 040305 (组份含量 > 99%)。磷酸二氢钾和三氯乙酸为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shimpack C₁₈ 柱 (150 mm × 6 mm, 5 μm), 加 Alltech C₁₈ 保护柱; 流动相为乙腈-离子对缓冲液 (取磷酸二氢钾 2.5 g, 三氯乙酸 1 g, 加水 850 mL 溶解, 调节 pH 3.1) (885: 115); 流速 1 mL/min; 检测波长 236 nm, 柱温 40 °C。

2.2 血样处理

取血清 0.2 mL, 加 6% 三氯乙酸-乙腈 (7:1) 0.2 mL, 漩涡混合, 4000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.3 标准曲线

取 1 mg · L⁻¹ 盐酸万古霉素和盐酸去甲万古霉素水溶液适量, 置离心管中, 氮气吹干, 用空白血浆配成标准系列浓度。结果如下: 盐酸去甲万古霉素 0.40, 1.00, 2.00, 4.01, 10.02, 20.05, 40.10, 80.19 μg · mL⁻¹; 盐酸万古霉素 1.08, 1.35, 2.70, 5.40, 13.50, 27.00, 54.00, 108.00 μg · mL⁻¹。依法处理, 以峰面积对相应血药浓度进行回归, 得如下方程: 盐酸去甲万古霉素: $C = 5.755 \times 10^{-5} A + 0.037$, $r = 0.9999$, $n = 8$; 盐酸万古霉素: $C = 5.993 \times 10^{-5} A + 0.039$, $r = 0.9999$, $n = 8$ 。用空白血等比稀释法测定, 以二极管阵列检测器能识别光谱图为依据, 去甲万古霉素检测限为 0.2 μg/mL, 万古霉素检测限为 0.5 μg/mL。

2.4 回收率和精密度测定

以空白血清配成低、中、高浓度标准血样, 每个浓度点测定 5 份。结果见表 1。

表 1 回收率和精密度测定结果

Tab 1 Results of recoveries and precision

Norvancomycin				Vancomycin			
加入 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 / %	RSD / %	加入 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 / %	RSD / %
4.01	3.92 \pm 0.17	97.84	4.3	5.40	5.41 \pm 0.25	100.18	4.7
20.05	19.38 \pm 0.62	96.65	3.2	27.00	27.10 \pm 0.81	100.36	3.0
40.10	39.62 \pm 1.58	98.79	4.0	54.00	53.55 \pm 1.07	99.16	2.0

2.5 稳定性

取对照品溶液 5 μL ,加水 0.2 mL,6%三氯乙酸 0.2 mL,混匀,于 8 h 内等量进样 5 次,测定峰面积。盐酸去甲万古霉素的相对标准偏差为 2.2%,盐酸万古霉素的相对标准偏差为 2.8%,即血样经处理后在 8 h 内测定相对稳定。另以空白血清配制标准血样 (20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),冰箱放置 (2 $^{\circ}\text{C}$),每 7 ~ 14 d 测定一次,于 5 个月内测定,按峰面积计算,去甲万古霉素和万古霉素的 RSD 均 < 10%。

3 讨论

3.1 色谱条件

在实验中发现,采用文献方法,较难分离去甲万古霉素峰前色谱峰,因而采用了离子对色谱法,不仅很好的解决了分离,而且可显著增加柱效。同时,流动相中加入离子对试剂高氯酸,与蛋白沉淀剂中的高氯酸相一致,可保持万古霉素和去甲万古霉素色谱行为稳定,减少测定误差。

3.2 空白血清为本实验室自临床血药浓度监测标本收集的剩余血清混合物,所含成分相对复杂,虽然方法开发时难度增加,但方法实用性较好,该方法已应用于本院呼吸科、ICU 和神经外科患者常规监测,未见明显干扰。

3.3 提取方法

文献报道有乙腈-异丙醇沉淀蛋白后用二氯甲烷萃取法,高氯酸直接沉淀后用二氯甲烷萃取法,固相萃取法等。本实验采用蛋白沉淀后上清液直接进样,沉淀剂中加入适量乙腈,即可降低高氯酸浓度,又可显著提高提取率,多次重复,万古霉素和去甲万古霉素的绝对回收率均 > 65%。

参考文献

- [1] Fen JJ, Gu JQ. HPLC method for determination of concentration of vancomycin in plasma [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacy (中国临床药理学杂志), 2000, 9(2): 107.
- [2] Xie JX, Li YZ, Wang P, et al. Pharmacokinetics and application of demethyl-vancomycin in treatment of neonatal septicemia [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 1999, 34(4): 258.
- [3] XU Xin min. Determination of norvancomycin in serum by high performance liquid chromatography with PT-C18 cartridge pretreatment [J]. China Journal of Modern Medicine (中国现代医学杂志), 2004, 14(14): 105.

收稿日期: 2005-11-22