

文章编号 1006-8147(2019)03-0296-04

论著

高效液相色谱法测定替考拉宁血药浓度

张荣格¹, 张瑞霞², 张弋², 张彦文³

(1.天津医科大学药学院药物化学教研室, 天津 300070; 2.天津市第一中心医院药学部, 天津 300192; 3.天津医学高等专科学校, 天津 300222)

摘要 目的:建立高效液相色谱(HPLC)法检测人血浆中替考拉宁浓度的方法。方法:采用 Waters System-C₁₈ 色谱柱,以乙腈:0.01mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(25:75, V/V, H₃PO₄ 调 pH 值为 2.53)为流动相,柱温 40℃,流速 1.2 mL/min;进样量 20 L;检测波长 215nm。结果:本方法得到标准曲线方程为 $y = 0.053x - 0.021$ ($R^2 = 0.998$),人血浆中替考拉宁浓度在 3.125~100 mg/L 范围内具有良好的线性关系。回收率大于 92%,精密度和稳定性的 RSD 均小于 8%。结论:本研究建立的替考拉宁血药浓度 HPLC 测定法专属性好、操作简单、准确度高、重现性好、回收率和灵敏度高,适用于生物样本分析研究,可满足替考拉宁药动力学研究的需要。

关键词 替考拉宁;高效液相色谱法;血药浓度

中图分类号 R9

文献标志码 A

Determination of concentration of teicoplanin in plasma by HPLC

ZHANG Rong-ge¹, ZHANG Rui-xia², Zhang Yi², ZHANG Yan-wen³

(1.Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Pharmacy, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China; 3.Tianjin Medical college, Tianjin 300222, china)

Abstract Objective: To establish a HPLC method to determine teicoplanin in human plasma. **Methods:** Chromatographic conditions included Waters C₁₈ column, acetonitrile-0.01 mol/L NaH₂PO₄ (25:75, V/V, pH adjusted to 2.53 with H₃PO₄) as mobile phase, 40℃ column temperature, 215 nm detective wavelength, and 1.2 mL/min flow rate. **Results:** This method generated a standard curve of teicoplanin with good linearity in the concentration of 3.125~100 mg/L ($R^2 = 0.998$), the recovery was over 92%, and the precision and the stability were also qualified as their RSD were below 8%. **Conclusion:** We believe this method is sensitive, simple, accurate, precisely, and stable. It could be used for the determination of teicoplanin in plasma and fulfill the needs of clinical pharmacokinetics for teicoplanin.

Key words teicoplanin; HPLC; plasma concentration

替考拉宁为糖肽类抗生素,通过与细菌细胞壁肽聚糖前体分子相结合,抑制细胞壁的合成,从而抑制或杀灭细菌。替考拉宁对革兰氏阳性需氧菌和厌氧菌具有活性,是目前临床上为数不多的对多重耐药性金黄色葡萄球菌和肠球菌有活性的药物之一,适用于治疗重症葡萄球菌(特别是甲氧西林耐药性葡萄球菌)感染,如脓毒症、脓毒性心内膜炎、急性骨髓炎和慢性骨髓炎急性发作、脓毒性关节炎、嗜中性粒细胞减少患者并发感染等^[1]。替考拉宁口服不吸收,除 2%~3%经肝代谢外,主要以原型经肾排泄,半衰期长达 83~168 h^[2]。由于替考拉宁的代谢特点,监测替考拉宁血药浓度的必要性已被越来越多的研究所证实,尤其是高龄老年患者、重症患者等特殊人群,其病理生理的改变等因素导致药物分布与清除发生变化,进而影响血药浓度及治疗效果,需对此类患者进行治疗药物监测^[3-4]。替

考拉宁的血药浓度的分析测定主要包括高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法、微生物检定法、液相色谱-串联质谱联用法 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 和胶束电动毛细管色谱法,其中 HPLC 法在医院药物浓度监测的应用较多^[5]。目前我国已开始规范替考拉宁的临床使用及给药方案,特别是肾功能不全患者的剂量调整,提升替考拉宁合理使用水平。已有多家医院开展了替考拉宁的血药浓度监测相关研究并强调了负荷剂量的重要性^[6-8]。足够的负荷剂量和维持剂量可以帮助患者迅速达到稳定的替考拉宁血药谷浓度。非复杂感染患者的替考拉宁稳态血药谷浓度需达到 10 mg/L 以上可以达到疗效,严重感染患者的血药浓度则需达到 15~30 mg/L^[9]。结合本实验室现有条件,采用 HPLC 法测定,准确、简单、灵敏度高,及时反馈患者体内的替考拉宁血浆浓度,实现治疗最优化,为临床合理用药提供一定的帮助,协助临床制定替考拉宁合理的给药方案。

作者简介 张荣格(1993-),女,硕士在读,研究方向:临床药学研究;
通信作者:张弋, E-mail: wing_zh1821@sina.com; 张彦文, E-mail: zhangyanwen@tjmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器

1.1.1 药品及试剂 替考拉宁对照品(纯度 $\geq 99.0\%$,中国食品药品检定研究院,批号:5S1N-Y5MJ);哌拉西林钠(纯度 $>98.0\%$,东京化成工业株式会社,批号:5C80B-CA);乙腈(HPLC级,天津市康科德科技有限公司);二氯甲烷(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);磷酸(分析纯,天津市佳兴化工玻璃仪器工贸公司);磷酸二氢钠(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);去离子水。

1.1.2 实验仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(包括 G1322A 脱气层, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314B 紫外检测器, 美国 Agilent 公司);XP105DR 分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);MX-F 涡旋混合器(北京大龙兴创实验仪器有限公司);Mini-14k 微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);Neofuge13 台式高速离心机(上海力申科学仪器有限公司);EASY pure[®] 超纯水仪(美国 Barnstead 公司);BCD-182D 型电冰箱(中国合肥美菱股份有限公司);100 μ L、1 000 μ L 移液枪(北京大龙兴创实验仪器有限公司);KZ01585 型移液枪(美国 Thermo Scientific 公司);pH 剂 F2-Standard(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 色谱条件 分析柱:Waters System-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);内标:哌拉西林;柱温:40 $^{\circ}$ C;流动相:乙腈:0.01 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(25:75, V/V, H₃PO₄ 调 pH 值为 2.53);流速:1.2 mL/min;进样量:20 μ L;检测波长:215 nm。

1.3 溶液及血浆样品的配制

1.3.1 替考拉宁对照品溶液和哌拉西林内标溶液的配制 精密称取替考拉宁样品 20.0 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,去离子水溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 2 mg/mL 的标准品储备液。 -80° C 避光保存,临用时取用。将准确称取哌拉西林钠标准品 7.5 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中,加甲醇溶解稀释

至刻度,摇匀,配制成 0.15 mg/mL 内标储备液,备用。 -80° C 避光保存,临用时取用。

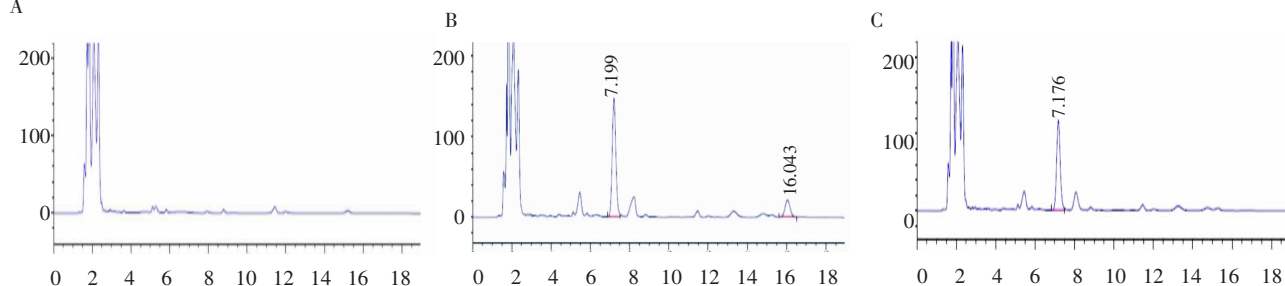
1.3.2 0.01 mol/L NaH₂PO₄ 缓冲溶液的制备 准确称取 1.56 g NaH₂PO₄·2H₂O;转移至烧杯中,加入 1 000 mL 去离子水;充分混匀,获得 0.01 mol/L NaH₂PO₄ 溶液;加入 H₃PO₄ 调 pH 值至 2.53,抽滤待用。

1.3.3 标准曲线和质控样品(QC)的制备 吸取标准品储备溶液 50 μ L,加入空白血浆 950 μ L,配制成浓度为 100 μ g/mL 样品 A;再采用空白血浆依次倍比稀释为 50、25、12.5、6.25、3.125 μ g/mL 的样品 B、C、D、E、F。吸取替考拉宁标准品储备溶液 50 μ L 置于 1.5 mL EP 管中,加入 950 μ L 空白血浆,涡旋混匀 30 s,配制成浓度为 100 μ g/mL 样品 A;吸取 A 溶液 250 μ L,加入空白血浆 500 μ L,涡旋混匀 30 s,配制成浓度为 33.33 μ g/mL 的高浓度样品 H;吸取 H 溶液 250 μ L,加入空白血浆 500 μ L,涡旋混匀 30 s,配制成浓度为 11.11 μ g/mL 的中浓度样品 M;吸取 M 溶液 250 μ L,加入空白血浆 500 μ L,配制成浓度为 3.70 μ g/mL 的低浓度样品 L。

1.4 血浆样品预处理 吸取血浆样本 0.4 mL 于 1.5 mL EP 管中,加入 0.05 mL 内标工作液,混匀,加入乙腈 0.6 mL,混匀;12 000 r/min,离心 5 min,转移上清液 0.9 mL 于离心管,加入二氯甲烷 0.4 mL,混匀,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液于进样瓶中,进样分析,进样量 20 μ L。

2 结果

2.1 专属性 分别取空白血浆(不加内标)、空白血浆加入替考拉宁对照品和内标溶液、患者滴注首剂替考拉宁 4 d 后血浆样品,按“1.4”项处理,进样分析,分别记录色谱图(图 1);由空白血浆、含对照品血浆及患者血浆的色谱图可知,在已确定的仪器条件下,替考拉宁与内标完全分离且峰形良好,替考拉宁和内标哌拉西林的保留时间分别约为 7.2、16.0 min。空白血浆中的内源性物质不干扰替考拉宁和内标哌拉西林的测定,表明本方法专属性良好。



A.空白血浆;B.空白血浆中加入替考拉宁对照品(左)和内标溶液(右);C.患者滴注首剂替考拉宁 4 d 后的血浆样品

图1 替考拉宁和内标在人血浆中的色谱行为

Fig1 Representative chromatography of teicoplanin and piperacillin in plasma

2.2 替考拉宁在血浆样品中的标准曲线与最低定量限 取含替考拉宁的浓度范围为 3.125~100 mg/L 的血浆样品,每一浓度各 3 份,按“1.4”项操作,记录替考拉宁和内标峰面积,采用内标法定量分析。以替考拉宁浓度(mg/L)为横坐标,替考拉宁峰面积(A)与内标峰面积(AI)的比值即 A/AI 为纵坐标,采用最小加权二乘法进行两者间线性回归运算($W=1/C^2$),得到标准曲线方程为 $y=0.053x-0.021$ ($R^2=0.998$),结果表明,人血浆中替考拉宁浓度在 3.125~100 mg/L 范围内具有良好的线性关系。替考拉宁在血浆样品中的标准曲线如图 2 所示。

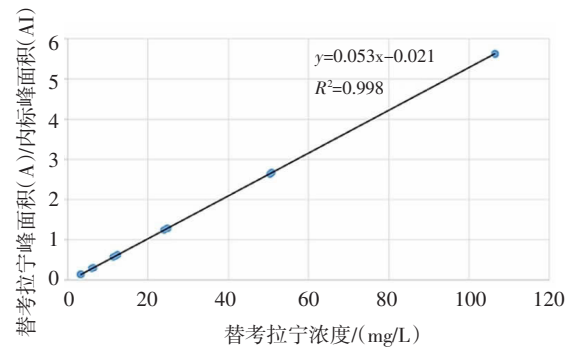


图 2 替考拉宁在人血浆样品中的标准曲线
Fig 2 The standard curve for plasma sample of Teicoplanin

2.3 精密度实验

2.3.1 日内精密度 配制低、中、高 3 种浓度(3.7、11.11、33.33 mg/L)的替考拉宁质控(QC)样品,每个浓度的样品平行制备 3 份,每隔 3 h 制备 1 批,连续做 3 批,按“1.4”项下处理,同一日内进样分析各浓度,计算日内精密度(表 1)。

2.3.2 日间精密度 配制低、中、高 3 种浓度(3.7、11.11、33.33 mg/L)的替考拉宁质控(QC)样品,每个浓度的样品各制备 5 份,连续 3 d 制备 3 批,按“1.4”项下处理,分别在连续 3 d 内进样分析各浓度,计算日间精密度,见表 1。低、中、高 3 个浓度的替考拉宁血浆样品的日内和日间精密度均 $\leq 10\%$,准确度在 $\pm 15\%$ 内,满足方法学验证要求,表明本方法精密度良好,准确度较高。

2.4 回收率实验 配制低、中、高 3 个浓度(3.7、11.11、33.33 mg/L)的替考拉宁质控样品(QC)各 5 份。按“1.4”项下操作,进样分析,将所得替考拉宁面积与内标峰面积比值带入标曲方程计算出浓度,以测得值与实际值比值作为相对回收率。相对回收率均大于 90%,RSD 均小于 2%。结果表明本实验建立的 HPLC 法测定替考拉宁血浆浓度的准确度良好,见表 1。

表 1 替考拉宁在血浆样品中的精密度和回收率($n=5$)

Tab 1 The precision and recovery of teicoplanin in plasma sample ($n=5$)

浓度/(mg/L)	RSD/%		回收率/%
	日内精密度	日间精密度	
3.7	1.23	6.82	93.39 \pm 2.1
11.11	1.04	6.18	92.15 \pm 3.1
33.33	1.34	6.95	95.57 \pm 2.5

2.5 血浆样品的稳定性考察

2.5.1 室温 24 h 稳定性 配制低、中、高 3 个浓度(3.7、11.11、33.33 mg/L)的替考拉宁质控样品各 3 份,室温放置 24 h 后,按照“1.4”项下处理后,进样分析,考察替考拉宁血浆样品室温放置 24 h 的稳定性。RSD 均小于 6%,RE 均小于 5%。实验结果表明,室温放置 24 h 后,低、中、高 3 个浓度的替考拉宁血浆样品均有良好的稳定性,测定结果见表 2。

表 2 替考拉宁在血浆样品中的稳定性($n=3$)

Tab 2 The stability of teicoplanin in serum samples($n=3$)

浓度/(mg/L)	RSD/%			
	室温 24 h	冻融 3 次 稳定性	-20 ℃ 14 d 稳定性	处理后 4 ℃ 放置 6 h
3.7	1.59	6.83	0.30	0.94
11.11	5.53	5.61	4.67	1.06
33.33	3.35	2.78	4.32	1.42

2.5.2 冻融稳定性 配制低、中、高 3 个不同浓度(3.7、11.11、33.33 mg/L)的替考拉宁质控样品各 3 份,涡旋混匀,置于-20 ℃冰箱冻存,24 h 后全部取出在室温下自然融化后,再放回-20 ℃冰箱冻存,24 h 后再次全部取出室温下自然融化后,继续放-20 ℃冰箱冻存,24 h 后取出在室温下自然融化,按“1.4”项下处理后进样分析,为 3 次冻融实验。考察了血浆样品经历 3 次冻融的稳定性。分析结果显示样品反复冻融 3 次依然能够保持稳定,测定结果见表 2。

2.5.3 长期稳定性 配制低、中、高 3 个不同浓度(3.7、11.11、33.33)的替考拉宁质控样品各 3 份,涡旋混匀后,置于-20 ℃冰箱冻存,14 d 后取出,按照“1.4”项下操作后,进样分析,考察血浆样品的长期稳定性。实验结果显示 3 个不同浓度的替考拉宁血浆样品在-20 ℃冰箱冻存 14 d 能保持稳定,测定结果见表 2。

2.5.4 血浆样品处理后 4 ℃放置 6 h 稳定性 配制低、中、高 3 个不同浓度的替考拉宁质控样品各 3 份,按照“1.4”项操作,吸取上清液于液相小瓶中在 4 ℃环境中放置 6 h 后,进样分析,考察不同浓度血浆样品处理后 4 ℃放置 6 h 的稳定性。分析结果

显示3个不同浓度的血浆样品处理后在4℃条件下放置6h,稳定性良好,测定结果见表2。

2.6 血药浓度监测结果 收集31例患者(给药方案均为负荷剂量400mg,q12h,3剂,维持剂量400mg,qd)的替考拉宁谷浓度血样(第4天给药前半小时取血样),按照“1.4”项操作后进行检测,测得替考拉宁C_{min}为(9.367±4.989)mg/L(0~23.53 μg/mL)范围。其中,<10 mg/L 19例,占61.29%,10~25 mg/L 12例,占38.71%。按照《中国国家处方集分析》^[10]中参考值,在所测样品中仅有12例患者血样的替考拉宁谷浓度在10~25 mg/L的有效谷浓度范围内,其余19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

3.1 流动相的选择 已有文献资料^[11]使用的替考拉宁测定方法,所需pH值过低,接近HPLC分析柱的测定极限,不适用于本实验室长期应用。于是对pH值进行了优化。在乙腈与0.01 mol/L磷酸二氢钠缓冲液的配比为25:75时,调节pH值为3.30、3.21、2.53分别进行实验。通过观察实验结果发现,pH值越低,替考拉宁出峰时间越早,哌拉西林出峰时间越晚。最后确定pH值为2.53时,各组分可以很好分离。为了探寻合适的柱温,分别在30℃、35℃、40℃条件下进行实验。发现在该温度范围内,温度越高,出峰时间越早,且温度不影响组分的分离情况。这与于晓佳的实验发现一致^[11]。为使出峰时间适当提前,将实验条件定为流速1.2 mL/min,柱温40℃。

3.2 内标物质的选择 内标物质应具有性质稳定、易获得等优点。本实验考察了氯霉素和哌拉西林等化合物作为内标物质的适宜性。氯霉素在血浆样品和溶液中的回收率均小于70%,不适用于做本实验的内标。哌拉西林在血浆样品及溶液中提取回收率较一致,最终选定哌拉西林为内标。哌拉西林保留时间适宜,出峰时间在其他组分出峰之后,且峰形较好。由于哌拉西林溶液的稳定性比较差,本方法学验证了血浆样品处理后4℃放置6h的稳定性,为规范操作提供了标准。

3.3 血浆样品预处理方式的选择 替考拉宁为糖肽类抗生素,主要由5个结构类似的化合物组成,可溶于水,也可溶于甲醇、乙腈等有机溶剂中。血浆样品中含有大量的蛋白质,不经处理直接进样会使色谱柱堵塞,影响柱效,因此应进行血浆样品前处理将蛋白去除。常用的生物样品前处理方法有液-液萃取法、固相萃取法、蛋白沉淀法等。萃取法对仪

器设备及试剂要求高,成本高、操作繁琐。蛋白沉淀法常用的沉淀剂有甲醇、乙腈、高氯酸等,操作较简便,但沉淀效果有差异。结合本实验室条件,采用蛋白沉淀法对血浆样品进行前处理。在通过用乙腈沉淀蛋白后,血样的高效液相图谱中仍有较多的杂峰,影响组分的区分,考虑为血样中蛋白成分未被合理清除所致。已有一些文献使用在乙腈沉淀蛋白之后,再加入三氯甲烷提取处理^[11-12]。但本实验换用对人体伤害略小的二氯甲烷来进行进一步的萃取处理。经两步处理后,组分被浓缩、峰型好。可以进行组分分析。

本研究建立的替考拉宁血药浓度HPLC测定法专属性好、操作简单、准确度高、重现性好、回收率和灵敏度高,适用于生物样本分析研究,为进一步实施替考拉宁血药浓度监测提供可靠的实验室分析条件,可满足替考拉宁药动力学研究的需要,为临床药学服务提供帮助。

参考文献:

- [1] 纪淳安. 替考拉宁的抗菌活性和临床应用[J]. 国外医药:抗生素分册, 2001, 22(3): 122
- [2] Wilson A, Peter R. Clinical pharmacokinetics of teicoplanin[J]. Clin Pharmacokinet, 2000, 39(3): 167
- [3] Roberts J A, Stove V, De Waele J J, et al. Variability in protein binding of teicoplanin and achievement of therapeutic drug monitoring targets in critically ill patients: lessons from the DALI Study[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43(5): 423
- [4] 邓晶晶, 卫薇. 糖肽类抗生素替考拉宁的分析方法研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(5): 925
- [5] 张谊芳, 石夏莹, 蒋杰. 替考拉宁临床应用98例合理性分析[J]. 中华危重症医学杂志:电子版, 2014, 7(5): 361
- [6] Matsumoto K, Kanazawa N, Watanabe E, et al. Development of initial loading procedure for teicoplanin in critically ill patients with severe infections[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(6):1024
- [7] 祖育娜, 张华, 周丽娟, 等. 不同剂量替考拉宁治疗老年重症革兰阳性菌感染患者的治疗药物浓度监测与疗效评估[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23):109
- [8] 石晓丽, 周丽娟. 血药浓度监测指导下的51例替考拉宁用药分析[J]. 中国药事, 2016, 30(8): 832
- [9] Yamada T, Kubota T, Nakamura M, et al. Evaluation of teicoplanin concentrations and safety analysis in neonates[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 44(5):458
- [10] 中国国家处方集编委会. 中国国家处方集:化学药品与生物制品卷[M]. 北京:人民军医出版社, 2010: 475
- [11] 孙渊, 周鹏, 杨建苗, 等. HPLC法测定替考拉宁血药浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2015, 24(3):173
- [12] 艾又生, 徐楚鸿, 陈志祥, 等. 高效液相色谱法测定替考拉宁的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(3): 254

(2018-07-31 收稿)