

用 HFCE – UF 联合 HPLC 法测定血浆中万古霉素游离浓度

Determination of free vancomycin concentration in plasma by HPLC after processed with HFCE – UF

任菲菲, 李相晨, 柳熠鑫,
李 珊, 张志清

(河北医科大学 第二医院 药学部, 河北 石家庄 050000)

REN Fei – fei, LI Xiang – chen,
LIU Yi – xin, LI Shan,
ZHANG Zhi – qing

(Department of Pharmacy, The Second
Hospital of Hebei Medical University,
Shijiazhuang 050000, Hebei Province,
China)

作者简介: 任菲菲(1996 –), 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学方向研究
通信作者: 张志清, 主任药师, 硕士生导师
Tel: (0311) 66002771
E – mail: 777yyy@sina.cn

摘要: 目的 建立人血浆中万古霉素游离浓度的测定方法, 并用于临床治疗药物监测(TDM)。方法 采用中空纤维离心超滤(HFCE – UF)分离血浆中的游离万古霉素, HPLC法进行浓度测定。色谱柱: Diamonsil C18柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇 – 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0) = 17: 83(v: v); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 236 nm; 进样量: 20 μL; 内标: 去甲万古霉素。考察方法的专属性、线性关系、精密度、回收率、稳定性, 并对患者的血浆样本进行测定。结果 人血浆中万古霉素游离浓度在0.25 ~ 50 μg · mL⁻¹呈线性关系, 标准曲线方程 $Y = 2.77 \times 10^{-2}X - 8.00 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9949$); 日内和日间精密度的RSD值均小于10%, 万古霉素的相对回收率和绝对回收率分别为95.10% ~ 101.00%和88.41% ~ 101.20%, 内标绝对回收率96.51%; 血浆样本反复冻融3次或-40 °C下保存7 d, 处理后样本室温下放置6 h、12 h, 稳定性良好。20例患者的万古霉素游离浓度为0.99 ~ 38.51 μg · mL⁻¹, 蛋白结合率为15.25% ~ 74.46%。结论 本研究所建立的HPLC方法简便易行、准确度高, 适用于临床标本中万古霉素游离浓度的测定。

关键词: 万古霉素; 游离浓度; 中空纤维 – 离心超滤; 高效液相色谱法

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.09.020

中图分类号: R97 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2023)09-1311-05

Abstract: Objective To establish a HPLC method for the determination of free vancomycin concentration in human plasma and applied to clinical therapeutic drug monitoring (TDM). **Methods** The free vancomycin in plasma was separated by hollow fiber centrifugal ultrafiltration (HFCE – UF) and analyzed by HPLC method. Diamonsil C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was selected and the column temperature was 30 °C. The mobile phase was methanol – 0.05 mol · L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 3.0) = 17: 83 (v: v) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The wave length was 236 nm, the injection volume was 20 μL and norvancomycin was selected as internal standard. The specificity, linearity, precision, recovery, and stability of the method were examined, and plasma samples from patients were measured. **Results** The free vancomycin concentration in human plasma was linear in the range of 0.25 – 50 μg · mL⁻¹, and the standard curve was $Y = 2.77 \times 10^{-2}X - 8.00 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9949$). The RSD values of intra – day and inter – day precision were less than 10%. The relative and absolute recoveries of vancomycin were 95.10% – 101.00% and

88.41% - 101.20%, respectively, and the absolute recovery of internal standard was 96.51%. The stability of plasma was good when repeatedly frozen and thawed for 3 times or stored at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 d, and processed samples was stable within 6 h or 12 h at room temperature. The free vancomycin concentration of 20 patients were $0.99 \sim 38.51\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the protein binding rates were 15.25% - 74.46%. **Conclusion** The established HPLC method is simple, easy to be performed with high accuracy which was suitable for the determination of free vancomycin concentration in clinics.

Key words: vancomycin; free concentration; hollow fiber centrifugal ultrafiltration; high performance liquid chromatography

万古霉素(vancomycin, VCM)是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的一线治疗药物,具有肾毒性、红人综合征等药物不良反应^[1],《中国万古霉素治疗药物监测指南》建议应用万古霉素期间进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)^[2]。目前关于万古霉素的TDM研究仅限于测定药物总浓度。然而,药物进入人体后部分与蛋白结合,只有游离药物能自由通过毛细血管,与其药理作用和毒性密切相关^[3]。此外,危重患者常伴有脓毒症和低蛋白血症,万古霉素在患者体内的游离分数存在明显的个体差异^[4],且总浓度与游离浓度相关性较差,因此不能根据总浓度推测游离药物浓度。

本文拟采用中空纤维离心超滤(hollow fiber centrifugal ultrafiltration, HFCE-UF)分离血浆中的游离万古霉素,建立HPLC测定方法并用于临床标本TDM,以期为个体化药物治疗提供参考。

材料与方法

1 材料

血浆 空白血浆和万古霉素血浆样本,均由河北医科大学第二医院提供。

药品 万古霉素对照品,规格:每支150 mg,批号:130360-202103;去甲万古霉素对照品,规格:每支150 mg,批号:130338-201704,均购自中国食品药品检定研究院。

仪器 e2695 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

2 色谱条件、溶液配制与 HFCE-UF 制备

色谱条件 色谱柱: Diamonsil C18 柱(150 mm \times 4.6 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$);柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相: 甲醇 - $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0) = 17:83(v:v);流速: $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;波长: 236 nm;进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$;内标: 去甲万古霉素。

溶液配制 取万古霉素对照品约10 mg,精密称定至10 mL量瓶中,流动相溶解定容,得 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

万古霉素对照品溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取上述对照品溶液适量,依次稀释成 2.5、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列质量浓度万古霉素溶液。同样方法配制 $40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 去甲万古霉素内标溶液。分别取系列质量浓度万古霉素溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$,加空白血浆超滤液 $90\text{ }\mu\text{L}$,涡旋混匀,得 0.25、0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列质量浓度万古霉素样本溶液。

HFCE-UF 制备 将中空纤维裁剪成约 15 cm 的小段,放入蒸馏水中超声 15 min 清洗,吐温-80 溶液处理后晾干,折成 U 字型放入玻璃管中,制成 HFCE-UF 装置。

3 非特异性吸附考察

采用不同浓度的吐温-80 溶液(0%、1%和2%)分别对中空纤维进行处理,考察表面活性剂浓度对 HFCE-UF 装置吸附情况的影响;用吐温-80 溶液将中空纤维处理不同时间(0.5、1、2 和 4 h),考察处理时间对 HFCE-UF 装置吸附情况的影响。以上处理后的 HFCE-UF 装置,分别加入低($0.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中($5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高($40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种质量浓度的万古霉素血浆样品 $500\text{ }\mu\text{L}$,以 $6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取中空纤维腔内、腔外溶液分别进行 HPLC 分析。

样品处理 冷冻血浆样本自然解冻,取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 至 HFCE-UF 装置中,以 $6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取中空纤维管腔内超滤液,加入内标,涡旋混匀,取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进行 HPLC 分析。

4 方法学考察

专属性 空白血浆超滤液、空白血浆超滤液加万古霉素及内标溶液、处理后临床患者万古霉素血浆样本,分别进行 HPLC 分析,记录色谱图。

标准曲线与定量下限 取系列质量浓度万古霉素样本溶液,按照“样品处理”方法处理并进样,以万古霉素与内标峰面积比值(Y)和万古霉素浓度(X)进行加权最小二乘法线性回归标准曲线方程。以信噪比(S/N) ≥ 10 计算定量下限(lower limit of

quantitation ,LOQ)。

精密度和回收率 制备低($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3种质量浓度的万古霉素质控样本,每个质量浓度5份,按照“样品处理”方法处理并进样,根据随行标准曲线计算测得浓度,同一日内处理并测定,计算日内精密度的连续3 d制备并测定,计算日间精密度。

制备低、中、高3种质量浓度的万古霉素质控样本,每个质量浓度5份,按照“样品处理”方法处理并进样,测得浓度与理论浓度的比值为相对回收率;质控样本峰面积与等量万古霉素对照品溶液和内标溶液直接进样峰面积的比值为绝对回收率。

稳定性 制备低、中、高3种质量浓度的万古霉素质控样本各5份,反复冻融3次后处理并测定,或 -40°C 下保存7 d后处理并测定,考察样本反复冻融和低温保存稳定性;样本处理后室温分别放置6 h和12 h后测定,考察处理后样品放置稳定性。

5 方法学应用

本研究由河北医科大学第二医院伦理委员会批准(审查决议编号:2019-R276)。所有受试者或法定代理人均签署知情同意书。入选标准:临床采用静脉注射万古霉素治疗的患者,用药超过48 h达稳态血药浓度,需要进行TDM的患者。排除标准:使用万古霉素未达到稳态血药浓度或不需要进行TDM的患者。

选取万古霉素进行治疗的患者20例,静脉滴注万古霉素超过48 h达到稳态血药浓度后,于下一次给药前30 min 静脉取血3 mL于抗凝管中,以 $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上层血浆, -40°C 保存。

血浆样本自然解冻,沉淀蛋白后HPLC法进行万古霉素全血浓度TDM^[5];按照“样品处理”方法处理并进样,测定万古霉素游离浓度,计算蛋白结合率。蛋白结合率=(总浓度-游离浓度)/总浓度 $\times 100\%$ 。

结 果

1 非特异性吸附考察

经考察,中空纤维用0%、1%和2%的吐温-80溶液处理0.5 h,HFCF-UF装置对万古霉素吸附明显,超滤液中的药物浓度低于实际浓度;中空纤维用2%吐温-80处理不同时间,HFCF-UF装置对万古霉素呈现不同的吸附作用,其中2%吐温-80处理2 h后吸附作用较小,中空纤维腔内、腔外万古霉素的回收率均大于90%。结果见表1。

2 方法学评价

专属性 万古霉素和内标的保留时间分别为16.87和13.14 min,分离完全,血浆内源性物质对万古霉素和内标的测定均无影响,表明该方法专属性良好。色谱图见图1。

表1 中空纤维腔内、腔外万古霉素回收率(% $n=3$)

Table 1 The recovery rate of vancomycin inside and outside the hollow fiber cavity(% , $n=3$)

$C(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		0% Tween-80		1% Tween-80		2% Tween-80		2% Tween-80		2% Tween-80			
		0.5 h		0.5 h		0.5 h		1 h		2 h		4 h	
0.5	Inside	29.88	70.86	78.59	86.12	90.79	91.64						
	Outside	57.73	91.83	95.24	100.5	95.88	82.48						
5	Inside	42.81	69.07	74.54	85.73	93.85	90.03						
	Outside	76.85	95.10	98.81	99.93	99.20	99.57						
40	Inside	48.63	80.55	83.80	91.51	91.55	89.67						
	Outside	85.68	99.84	99.54	99.90	99.64	99.87						

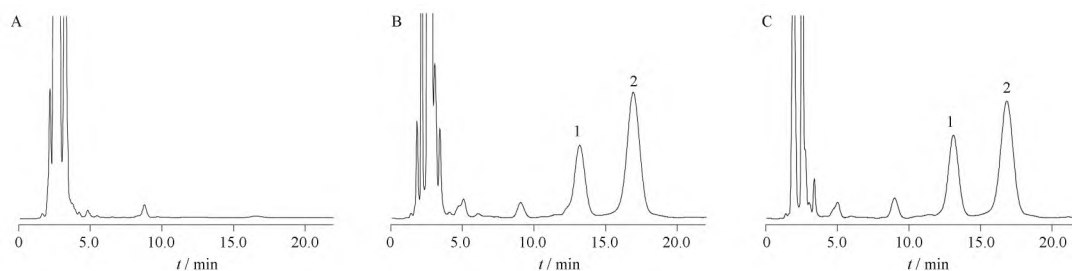


图1 万古霉素色谱图

Figure 1 Chromatogram of vancomycin

A: Blank plasma ultrafiltrate; B: Blank plasma ultrafiltrate spiked with vancomycin and internal standard; C: Clinical plasma sample; 1: Norvancomycin (NVCM); 2: Vancomycin (VCM).

线性关系和定量下限 万古霉素的标准曲线为 $Y = 2.77 \times 10^{-2} X - 8.00 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9949$), 万古霉素在 $0.25 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 定量限为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

精密度和回收率 万古霉素的日内和日间精密

度均小于 10%; 万古霉素的相对回收率为 95.10% ~ 101.00%, 万古霉素和内标的绝对回收率分别为 88.41% ~ 101.20% 和 96.51%, 均符合生物样本分析要求, 结果见表 2。

稳定性 低、中、高 3 种质量浓度的万古霉素质

表 2 精密度和回收率

Table 2 Results of precision and recovery

Drug	C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Intra-day precision		Inter-day precision		Relative recovery(%)	Absolute recovery(%)
		C($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)	RSD(%)	C($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)	RSD(%)		
VCM	0.5	0.50 ± 0.02	4.57	0.47 ± 0.04	8.56	98.63	101.20
	5	4.78 ± 0.07	1.42	4.78 ± 0.03	0.61	95.10	88.41
	40	43.20 ± 1.33	3.08	41.44 ± 1.53	3.70	101.00	95.74
NVCM	4	-	-	-	-	-	96.51

$n = 5$ 。

控样本, 反复冻融 3 次或 -40°C 下保存 7 d, 或处理后室温放置 6 h 和 12 h, RSD 均小于 10%, 表明在上述条件下稳定性较好。

3 方法学应用

20 例患者的万古霉素总浓度、游离浓度和蛋白结合率结果, 见表 3。对万古霉素总浓度与游离浓度进

表 3 临床标本中万古霉素总浓度和游离浓度

Table 3 Total and free concentration of vancomycin in clinical samples

No.	Total concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Free concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Protein binding rate(%)
1	49.34	38.51	21.95
2	9.90	7.16	27.68
3	43.32	15.16	65.00
4	32.33	27.40	15.25
5	17.16	6.93	59.62
6	18.26	9.31	49.01
7	4.44	2.39	46.17
8	1.37	0.99	27.74
9	11.98	4.89	59.18
10	56.08	18.57	66.89
11	34.22	8.74	74.46
12	13.22	6.24	52.80
13	15.13	5.18	65.76
14	15.57	7.17	53.95
15	15.64	5.70	63.55
16	14.32	6.42	55.17
17	21.23	10.08	52.52
18	13.42	7.57	43.59
19	16.92	10.21	39.66
20	24.25	13.04	46.23
	21.41 ± 14.51	10.58 ± 8.84	49.31 ± 16.11

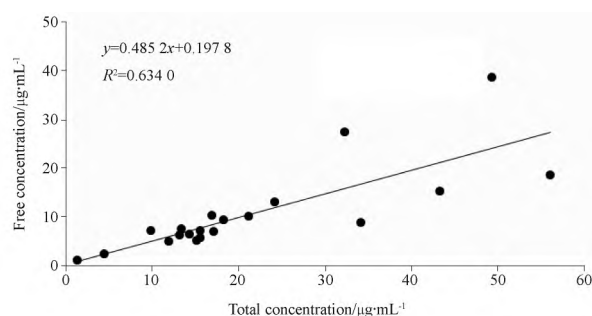


图 2 万古霉素游离浓度与总浓度的相关性 ($n = 20$)

Figure 2 Correlation between free and total concentration of vancomycin ($n = 20$)

行相关性分析 $R^2 = 0.6340$, 表明总浓度与游离浓度相关性不明显, 结果见图 2。

讨 论

目前, 测定游离药物浓度的标本预处理方法主要包括平衡透析法、离心超滤法、超速离心法、固相微萃取和凝胶过滤法等。平衡透析法被认为是测定药物游离浓度的“金标准”, 但该方法操作复杂、耗时^[6-8], 不适合用于临床大量样本的监测; 离心超滤法比平衡透析法操作简单、快速, 但该方法具有浓差极化等现象^[7]; 超速离心法和固相微萃取所需的设备昂贵^[7]; 凝胶过滤法需要对凝胶类型、洗脱剂类型及洗脱速度等因素进行考察^[9], 实验过程干扰因素较多。

本文所采用的 HFCE-UF 法, 操作时离心方向与中空纤维平行, 避免了浓度差极化现象, 操作简单且价格低廉, 但 HFCE-UF 的缺点是药物与中空纤维管的非特异性吸附。为了克服 HFCE-UF 装置对万古

霉素的吸附作用,可采用吐温-80对中空纤维进行改性。本研究发现,用2%吐温-80水溶液处理2h或4h后,万古霉素回收率大于90%,有效解决了中空纤维管对万古霉素的吸附,达到生物样本分析要求。延长中空纤维管在表面活性剂中的处理时间可以提高万古霉素的回收率,但处理时间过长会降低膜的通透性,减少超滤液体积,故选择处理时间为2h。

本实验测定了20例危重患者的万古霉素游离浓度,浓度范围 $0.99 \sim 38.51 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,血浆蛋白结合率为15.25%~74.46%,个体间差异较大;万古霉素游离浓度与总浓度的相关性较差,与以往文献报道的一致^[4],因此,为了提高疗效,降低药物不良反应的发生率,测定万古霉素的游离浓度尤为重要。

本实验建立并验证了人血浆中万古霉素游离浓度的测定方法,用HFCF-UF处理样本后HPLC进行分析,操作简便、准确度高、价格低廉、稳定性好,适用于常规TDM服务于临床。

参考文献:

- [1] JOSEPH K, RAMIREDDY K, MADISON G, et al. Outcomes of a pharmacist-driven vancomycin monitoring initiative in a community hospital[J]. *J Clin Pharm Ther* 2021, 46(4): 1103-1108.
- [2] HE N, SU S, YE Z, et al. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin: 2020 update by the division of

- therapeutic drug monitoring, Chinese Pharmacological Society [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(Suppl 4): S363-S371.
- [3] CIBOTARU D, CELESTIN M N, KANE M P, et al. Method for simultaneous determination of free concentration, total concentration, and plasma binding capacity in clinical samples [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(3): 1401-1411.
- [4] KEES M G, WICHA S G, SEEFELD A, et al. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54(3): 318-323.
- [5] JESÚS VALLE M J, LÓPEZ F G, NAVARRO A S. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 835-839.
- [6] MUSTEATA F M. Monitoring free drug concentrations: challenges [J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(15): 1753-1768.
- [7] SEYFINEJAD B, OZKAN S A, JOUYBAN A. Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: Analytical methods [J/OL]. *Talanta*, 2021, 225: 122052. 2020-12-27 [2022-06-20]. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122052>
- [8] VUIGNIER K, SCHAPPLER J, VEUTHEY J L, et al. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(1): 53-66.
- [9] Ó FÁGÁIN C, CUMMINS P M, O'CONNOR B F. Gel-filtration chromatography [J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1485: 15-25. 2016-10-12 [2022-06-23]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2.

(定稿日期 2023-03-01; 本文编辑 王超群)

· 小知识 ·

名词解释

引自: 国家药监局药品审评中心. 药物真实世界研究设计与方案框架指导原则(试行) [EB/OL]. 2023-02-16 [2023-03-23]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/14aac16a4fc5b5841bc2529988a611cc>.

1. 初治者 (New User): 纳入研究队列之前在充分的洗脱期内未使用研究用治疗的病例。
2. 单臂临床研究 (Single-arm/One-arm Study): 一种只设置试验组或治疗组的非随机临床研究,通常采用外部对照,如历史对照、平行对照或目标值对照等。
3. 观察性研究 (Observational Study): 又称非干预性研究,根据特定研究问题,不施加主动干预的、以目标人群为对象的、探索治疗与结局因果关系的研究。
4. 回顾性观察性研究 (Retrospective Observational Study): 在研究开始时确定目标人群,并根据历史数据研究开始前生成的数据)开展的观察性研究。
5. 前瞻性观察性研究 (Prospective Observational Study): 在研究开始时确定目标人群,并在研究开始前确定将要收集的治疗和结局数据的观察性研究。
6. 实用临床试验 (Pragmatic Clinical Trial/Pragmatic Trial, PCT): 又称实操/实效临床试验,指尽可能接近临床真实世界环境的临床试验,是介于RCT和观察性研究之间的一种研究类型。(王超群 摘录)