

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 962.
- [2] YANG T S, DANG W X, ZHANG W Y. Determination of Chonglou saponin contents in Gongxuening capsules by HPLC [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2009, 24(6): 435-436.
- [3] HUANG Y, CUI L JG, LIU W N, et al. Analysis of steroidal saponins in Chonglou medicine by HPLC-ELSD [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(15): 1230-1233.
- [4] XU L L, ZHAO L, XIA H, et al. Simultaneous determination of four steroidal saponins compounds in *Paris ployphylla* by RP-HPLC method [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2009, 27(3): 201-204.
- [5] SONG X N, XU Q L, MAO X J. Determination of Chonglou saponin I, Chonglou saponin II in Compound Yanlian capsules by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(2): 196-197.
- [6] WU S, WU W, ZHENG Y L. Simultaneous determination of four steroidal saponins compounds in *Paris ployphylla* by high performance liquid chromatography reversed-phase [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(8): 1896-1897.
- [7] JIANG Z J. Determination of Paridis saponins in Tongxuekang capsule by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2010, 22(8): 87-88.

收稿日期: 2013-03-09

## HPLC 测定人血浆中亚胺培南的浓度

王盈盈, 王陈翔, 胡卢丰, 周子晔, 张秀华\* (温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325000)

**摘要:** 目的 建立测定人血浆中亚胺培南浓度的 HPLC 方法。方法 以  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素为稳定剂, 以 5-溴脲嘧啶为内标, 血浆样品经乙腈沉淀蛋白, 二氯甲烷 2 次提取去杂质, 取水相进样。色谱柱为 Atlantis C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-10 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液(pH=6.0)(4:96); 流速为  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 25 °C; 检测波长: 300 nm。结果 亚胺培南在  $0.5\sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  内线性关系良好,  $r=0.9997$ ; 定量下限为  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 平均绝对回收率 82.72%, 方法回收率为 87.60%~96.36%; 日内、日间 RSD 均 <10%。结论 本方法简单、快捷、灵敏、准确, 适用于亚胺培南临床血药浓度的监测。

**关键词:** 高效液相色谱法; 亚胺培南; 人血浆

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)12-1349-04

### Determination of Imipenem in Human Plasma by HPLC

WANG Yingying, WANG Chenxiang, HU Lufeng, ZHOU Ziyue, ZHANG Xiuhua\* (Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the detection of imipenem in human plasma. **METHODS** Samples were spiked with  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  urea as stabilizer solution, 5-bromine urea pyrimidine as internal standard, proteins were precipitated with acetonitrile followed by extraction with dichloromethane and the upper aqueous phase was injected. Separation was achieved on an Atlantis C<sub>18</sub> column (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase composed of methanol and  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  monopotassium phosphate (pH=6.0)(4:96) with a flow rate of  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The column temperature was 25 °C. The UV detection wavelength was 300 nm. **RESULTS** Calibration curves of imipenem showed good linear regression in the range of  $0.5\sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ( $r=0.9997$ ). The lower limit of quantification of imipenem was  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The mean absolute recovery was 82.72%, and the method recovery was 87.60%~96.36%. Intra- and inter-day variations were <10%. **CONCLUSION** The established method is simple, sensitive and accurate for determining imipenem in human plasma.

**KEY WORDS:** HPLC; imipenem; human plasma

亚胺培南为碳青霉烯类广谱抗菌药物, 对β-内酰胺酶稳定, 临床用于耐β-内酰胺类的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌引起的感染<sup>[1]</sup>, 目前已成为治

疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一。作为时间依赖性抗菌药物, 亚胺培南的最佳抗菌活性通常在其有效抑菌浓度的时间不高于 2 次给药间隔

作者简介: 王盈盈, 女, 药师 Tel: (0577)88069551 E-mail: 15401297@qq.com  
(0577)88069699 E-mail: wzzhangxiuhua@163.com

\*通信作者: 张秀华, 女, 硕士, 主任药师, 硕士 Tel:

40% (40%T>MIC)的情况下才能获得。国外文献报道,在推荐剂量下使用亚胺培南治疗由铜绿假单胞菌或鲍曼不动杆菌引起的肺炎,约有15%~30%的患者无法达到最佳治疗效果<sup>[2-3]</sup>。而当大剂量给予亚胺培南治疗严重感染如心内膜炎、骨髓炎等,易引起惊厥、意识障碍等严重中枢神经系统不良反应<sup>[4]</sup>。此外,对于严重感染伴/或肾功能衰竭患者,其体内药物分布和半衰期因病理因素发生改变,血药浓度较难预测<sup>[5-7]</sup>。因此,在临床应用中有必要对亚胺培南进行浓度监测,以确保有效安全。

亚胺培南的检测方法国内外文献报道较少,主要采用HPLC-MS<sup>[8]</sup>和HPLC<sup>[9-11]</sup>。HPLC-MS检测对仪器要求高,国内难以普及。已报道的HPLC存在缺乏较好蛋白处理方法<sup>[9]</sup>,或基线不稳定<sup>[10-11]</sup>等不足。本实验在相关文献报道的基础上,克服以上不足,建立了适合人血浆中亚胺培南浓度测定的HPLC方法,并将其应用于临床患者的血药浓度监测。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司):包括 Waters600 泵,2487 紫外可见检测器,2695 在线脱气机,EmpowerZ 色谱管理系统;AB135-S/FACT 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);2500S-DTH 超声脱气机(上海必能信超声有限公司);台式离心机(上海安亭科学仪器厂);漩涡震荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

亚胺培南对照品(都莱生物公司,批号:P0015,纯度 $\geq 98\%$ );内标物:5-溴脲嘧啶(Sigma 公司,批号:MKBF5208V,纯度 $\geq 99.0\%$ );尿素(都莱生物公司);三乙醇胺(上海试剂总厂);甲醇为色谱纯;磷酸二氢钾等为分析纯;实验用水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Atlantis C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液(三乙醇胺调 pH=6.0)(4:96);柱温:25  $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;检测波长:300 nm。血浆中内源性杂质均不影响亚胺培南和内标物的分离测定,亚胺培南和内标的保留时间分别为 4.9 和 8.7 min,结果见图 1。

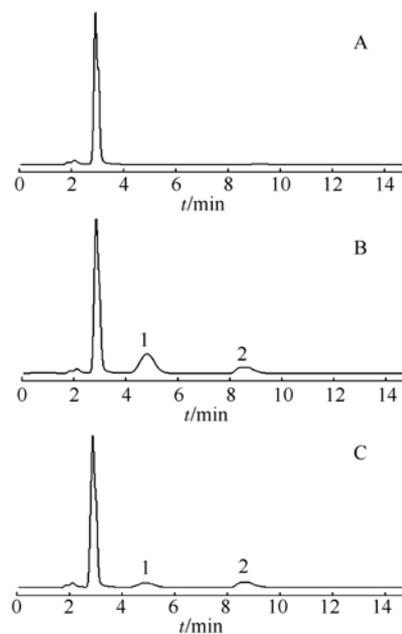


图 1 HPLC 色谱图

A-空白血浆; B-对照品; C-血浆样品; 1-亚胺培南; 2-5-溴脲嘧啶

### Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-control; C-plasma sample; 1-imipenem; 2-5-bromine urea pyrimidine

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 标准溶液的配制** 精密称取亚胺培南对照品适量,用稳定剂(尿素)配制成 1 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的亚胺培南储备液。取亚胺培南储备液用稳定剂稀释,配制浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>的亚胺培南系列对照品溶液,储备液及对对照品溶液均于-20  $^{\circ}$ C 保存。

**2.2.2 内标溶液的配制** 精密称取 5-溴脲嘧啶适量,用水稀释得 1 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的内标储备液。取内标储备液用水稀释,配制浓度为 500 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>的内标溶液于 4  $^{\circ}$ C 下保存。

**2.2.3 稳定剂的配制** 称取 3.0 g 尿素于 100 mL 量瓶中,加水溶解至刻度,摇匀,备用。

### 2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样品 180  $\mu$ L,置 1.5 mL EP 管中,加入浓度为 500 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 5-溴脲嘧啶 20  $\mu$ L,涡旋混匀 30 s 后加入乙腈 300  $\mu$ L,涡旋 1 min,13 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 15 min,吸取上清液 400  $\mu$ L 于 1.5 mL EP 管中,加入二氯甲烷 500  $\mu$ L,涡旋 1 min,13 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 15 min,吸取上清液 20  $\mu$ L 进样。

### 2.4 标准曲线及定量下限

精密移取不同浓度的亚胺培南系列对照品溶

液各 20  $\mu\text{L}$  于 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中, 使血药浓度分别相当于 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 按“2.3”项下方法处理, 以亚胺培南峰面积(A)与内标峰面积(A<sub>i</sub>)之比(Y)对亚胺培南浓度(X)进行回归, 得回归方程  $Y=0.0507X-0.0016$ ,  $r=0.9997$ 。结果表明, 亚胺培南浓度在 0.5~100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  内与峰面积呈良好线性关系, 取标准曲线的最小浓度值 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为定量下限。

## 2.5 回收率试验

在空白血浆中加入一定量的亚胺培南对照品, 配成浓度分别为 0.5, 1, 40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的样品各 5 份, 按“2.3”项下方法处理进样, 另取相应浓度的亚胺培南对照品和内标物质的纯溶剂溶液, 不经沉淀, 用稳定剂稀释进样, 将 2 组峰面积进行比较, 计算亚胺培南的绝对回收率。另取空白血浆, 分别配制浓度为 0.5, 1, 40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法处理进样, 将测得峰面积代入标准曲线得到浓度与已知浓度相比较, 计算亚胺培南的相对回收率。结果见表 1。

## 2.6 精密度试验

取空白血浆, 分别配制质量浓度为 0.5, 1, 40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法处理进样, 连续测定 5 d, 随行标准曲线, 考察日间精密度, 结果见表 1。

表 1 人血浆中亚胺培南和 5-溴脲嘧啶的精密度和回收率 (n=5)

Tab 1 Precision and recoveries of imipenem, 5-bromine urea pyrimidine(n=5)

药物	加入量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	精密度 RSD/%		相对回 收率/%	绝对回 收率/%
		日内	日间		
亚胺培南	0.5	6.12	9.13	87.60±8.27	77.90±7.20
	1.0	5.63	6.67	89.15±3.94	80.77±3.85
	40.0	5.90	5.70	96.36±7.32	85.50±5.01
	80.0	3.85	4.47	93.71±4.18	86.70±0.98
5-溴脲嘧啶	50.0	-	-	-	94.11±7.69

## 2.7 稳定性试验

取空白血浆, 配制浓度为 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的血浆标准品各 3 份, 分别考察不加稳定剂和加稳定剂, 室温放置和-20  $^{\circ}\text{C}$  放置, 于第 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 120, 180 h 测定, 将亚胺培南和内标的峰面积比与 0 h 峰面积比进行比较, 结果平均峰面

积比相当于 0 h 峰面积比 85% 认为是稳定的。结果室温不加稳定剂血浆标准品能保持 4 h 稳定; 室温加稳定剂血浆标准品能保持 15 h; -20  $^{\circ}\text{C}$  不加稳定剂血浆标准品能保持 30 h; 而-20  $^{\circ}\text{C}$  加稳定剂血浆标准品在 180 h 内仍保持稳定, 结果见图 2。

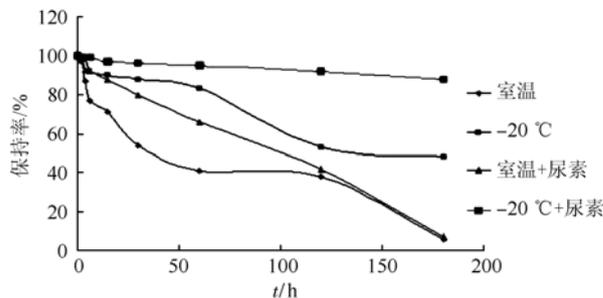


图 2 人血浆中亚胺培南在不同储存条件下稳定性考察  
Fig 2 Stability of imipenem at 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in plasma with or without stabilizer solution at -20  $^{\circ}\text{C}$  or room temperature

## 3 临床应用

测定 6 例静滴亚胺培南/西司他丁钠患者的血样。于静滴 4 h 后抽血, 血浆样品放入冰袋中, 送至实验室, 血样经离心后, 取上层血浆 180  $\mu\text{L}$ , 放入稳定剂 20  $\mu\text{L}$ , 放置冰箱-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。按本方法进行亚胺培南血药浓度测定, 结果血药浓度分别为 1.61, 3.01, 3.24, 4.85, 5.13, 6.28  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果显示测定的亚胺培南血药浓度值均在标准曲线的定量范围内。

## 4 讨论

### 4.1 稳定性考察

亚胺培南系碳青霉烯类抗菌药物, 在血浆中极不稳定<sup>[9]</sup>。本实验考察血浆标准品室温加稳定剂和不加稳定剂, -20  $^{\circ}\text{C}$  加稳定剂和不加稳定剂。结果发现不加稳定剂室温 4 h 内是稳定的。加入稳定剂后室温 15 h 内是稳定的。说明加入稳定剂可以增加其在室温的稳定性。不加稳定剂-20  $^{\circ}\text{C}$  30 h 内是稳定的, 加入稳定剂后-20  $^{\circ}\text{C}$  180 h 仍然稳定。说明温度是影响其稳定性的主要因素。故亚胺培南的血浆样品采用-20  $^{\circ}\text{C}$  加稳定剂保存。

### 4.2 稳定剂的选择

亚胺培南在血浆中极不稳定, 溶液的 pH 偏酸或偏碱均会加快其降解。尿素的 pH 在 7 附近, 采用尿素做稳定剂起到生物缓冲的作用, 有利于血浆样品的稳定。

### 4.3 沉淀方法选择

亚胺培南在血浆中极不稳定,若用强酸直接沉淀对其稳定性有影响,会发生降解而影响其回收率。本实验采用乙腈沉淀,二氯甲烷二次提取,达到浓缩血浆样品的作用。

### 4.4 流动相的选择

流动相由甲醇-10 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液组成(4:96),用三乙醇胺调 pH 可减少峰型拖尾。pH 先后采用 3.0, 4.5, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0, 8.5, 当 pH 太小或太大均可出现肩峰,当 pH 值为 6.0 时亚胺培南与内标 5-溴脲嘧啶峰型良好。

### 4.5 内标物的选择

文献采用头孢他定<sup>[11]</sup>作为内标。本法先后试验了多种内标,如帕尼培南、美罗培南、异烟肼、氟脲嘧啶、5-溴脲嘧啶、甲硝唑等。在该实验条件下美罗培南与甲硝唑不出峰。帕尼培南与亚胺培南出峰时间相近,有干扰。异烟肼与氟脲嘧啶出峰在亚胺培南之前,与血浆杂质峰相近,有干扰。5-溴脲嘧啶出峰在亚胺培南之后,且不干扰亚胺培南的检测。故选用 5-溴脲嘧啶为内标。

### 4.6 临床应用

临床上亚胺培南的有效血药浓度是相对每个细菌培养的 MIC 值而言的。根据病原学,认为 40%T>MIC 可获得亚胺培南的最佳抗菌活性。即当所测患者亚胺培南的血药浓度大于某一培养菌的 MIC 值时,即认为亚胺培南对该培养菌疗效好。如大肠杆菌的 MIC 值是 1,若患者血药浓度>1,则对大肠杆菌疗效好;如鲍曼氏不动杆菌的 MIC 值是 4,若患者血药浓度>4,则对鲍曼氏不动杆菌疗效好。因此,通过快速测定患者的血药浓度即可判断患者剂量是否足量。尤其对于严重感染伴/或肾功能衰竭患者,当其体内药物分布和半衰期因病理因素发生改变时,通过血药浓度监测即可迅速调整药量,防止严重不良反应的发生。

## 5 结论

本实验采用 5-溴脲嘧啶为内标,尿素为稳定剂,建立了亚胺培南的 HPLC 法,生物样本处理步骤简单,方法准确,灵敏,重复性好,线性范

围宽。将该方法应用于临床患者亚胺培南治疗药物监测,结果表明,这种方法满足临床亚胺培南血药浓度的快速监测。本实验为个体化给药方案的制定提供了技术检测依据。

## REFERENCES

- [1] ACAR J F, GOLDSTEIN F W, KITZIS M D, et al. Activity of imipenem on aerobic bacteria [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1983, 12(Suppl D): 37-45.
- [2] BURGESS D S, FREI C R. Comparison of beta-lactam regimens for the treatment of gram-negative pulmonary infections in the intensive care unit based on pharmacokinetics pharmacodynamics [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(5): 893-898.
- [3] DERYKE C A, KUTI J L, NICOLAU D P. Pharmacodynamic target attainment of six beta-lactams and two fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella species* collected from United States intensive care units in 2004 [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(3): 333-342.
- [4] YANG B F, SU D F. *Pharmacology(药理学)* [M]. 6th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 403.
- [5] BELZBERG H, ZHU J, CORNWELL E E, et al. Imipenem levels are not predictable in the critically ill patient [J]. *Trauma*, 2004, 56(1): 111-117.
- [6] MEHROTRA R, DE GAUDIO R, PALAZZO M. Antibiotic pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in critical illness [J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(12): 2145-2156.
- [7] LEMAIRE-HURTEL A S, GRAS-CHAMPEL V, HARY L, et al. Recommended dosage adaptation based on renal function is not always sufficient to avoid beta lactam antibiotics side effects [J]. *Nephrol Ther*, 2009, 5(2): 144-148.
- [8] XU Y, XIE W, MILLER-STEIN C M, et al. Hydrophilic interaction chromatography mass spectrometry for the simultaneous determination of three polar non-structurally related compounds, imipenem, cilastatin and an investigational beta-lactamase inhibitor, in biological matrices [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(14): 2195-2205.
- [9] LIU Q S, MA W X, DAI Q, et al. Determination of imipenem in human plasma by HPLC [J]. *Chin J Antibiotics(中国抗生素杂志)*, 1997, 22(5): 347-350.
- [10] VERDIER M C, TRIBUT O, TATTEVIN P, et al. Simultaneous determination of 12  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(10): 4873-4879.
- [11] DAILLY E, BOUQUIE R, DESLANDES G, et al. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(15/16): 1137-1142.

收稿日期: 2013-06-04