

重症感染患者亚胺培南检测方法的建立及临床应用^Δ

陈永妍*,孙迪迪,韩文超,王 前,张寒娟(郑州市第七人民医院药学部,郑州 450016)

中图分类号 R917;R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)16-2023-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.15



摘要 **目的** 建立适用于检测重症感染患者亚胺培南血药浓度的二维液相色谱法,并应用于临床。**方法** 基于全自动二维液相色谱仪建立亚胺培南血药浓度检测方法,以一维色谱柱Aston SNCB(50 mm×4.6 mm,5 μm)萃取分离目标物,再经二维色谱柱Aston SCB(250 mm×4.6 mm,5 μm)进一步分离测定。一维流动相为亚胺培南-1D移动相[乙腈-甲醇-水(15:10:75, V/V/V)],流速为1.0 mL/min;二维流动相为72%OPI-1有机移动相(色谱级甲醇)-20%BPI-1碱性移动相[水(含20.0 mmol/L的磷酸铵,用三乙胺调pH至7.2)]-8%API-1酸性移动相[水(含20.0 mmol/L的磷酸铵,用磷酸调pH至3.0)],流速为1.0 mL/min;柱温为40℃,紫外检测波长为310 nm,进样量为100 μL。洗脱程序:0~3.40 min,一维色谱柱(亚胺培南-1D移动相);3.40~11.00 min,二维色谱柱(72%OPI-1有机移动相-20%BPI-1碱性移动相-8%API-1酸性移动相)。**结果** 亚胺培南检测质量浓度的线性范围为0.171~18.570 μg/mL($R^2=0.999\ 9$),定量下限为0.171 μg/mL;回收率在93.47%~106.16%($n=5$),日内和日间精密度的RSD均低于15%($n=5$)。51例患者的亚胺培南谷浓度为0~19.57 μg/mL。**结论** 所建立的方法前处理简单、快捷,进样量大,可用于重症感染患者亚胺培南血药浓度的检测。

关键词 亚胺培南;血药浓度监测;重症感染;二维液相色谱

Establishment and clinical application of imipenem measurement method in patients with severe infection

CHEN Yongyan, SUN Didi, HAN Wenchao, WANG Qian, ZHANG Hanjuan (Dept. of Pharmacy, the 7th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450016, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish two-dimensional liquid chromatography method for the determination of imipenem blood concentration and apply it in clinical practice. **METHODS** The method for the determination of imipenem blood concentration was established based on automatic two-dimensional liquid chromatography. The targets were extracted by 1-dimensional column Aston SNCB (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) and further separated and determined by 2-dimensional column Aston SCB (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The 1-dimensional mobile phase was imipenem-1D mobile phase [acetonitrile-methanol-water (15:10:75, V/V/V)] with a flow rate of 1.0 mL/min; 2-dimensional mobile phase was 72%OPI-1 organic mobile phase (chromatographic grade methanol)-20% BPI-1 alkaline mobile phase [water (containing 20.0 mmol/L ammonium phosphate, pH adjusted to 7.2 with triethylamine)]-8%API-1 acidic mobile phase [water (containing 20.0 mmol/L ammonium phosphate, pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid)] with a flow rate of 1.0 mL/min; the column temperature was 40℃, UV detection wavelength was 310 nm and injection volume was 100 μL. Elution procedure: 1-dimensional column consisted of imipenem-1D mobile phase with eluting for 0-3.40 min; 2-dimensional column consisted of 72% OPI-1 organic mobile phase-20%BPI-1 alkaline mobile phase-8%API-1 acidic mobile phase with eluting for 3.40-11.00 min. **RESULTS** The linear range of imipenem was 0.171-18.570 μg/mL ($R^2=0.999\ 9$) with the lower limit of quantification for 0.171 μg/mL; the recovery rate ranged from 93.47% to 106.16% ($n=5$) and the RSDs of both intra-day and inter-day precision were below 15% ($n=5$). The minimum concentration of imipenem in 51 patients ranged from 0 to 19.57 μg/mL. **CONCLUSIONS** The established method is simple and fast with the large scale of sample, and can be used for the imipenem blood concentration monitoring in patients with severe infection.

KEYWORDS imipenem; blood concentration monitoring; severe infection; 2D-LC/UV

亚胺培南西司他丁是临床重症感染治疗的一线药物。相比普通患者,危重症、肥胖、烧伤、肾功能不全等特殊患者体内亚胺培南西司他丁的药代动力学(pharmacokinetics, PK)和药物效应动力学(pharmacodynamics, PD)会发生显著变化,表现出较大的个体差异^[1-2]。

亚胺培南是时间依赖性的β-内酰胺类抗菌药物,其疗效与超过最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的时间百分比(%fT>MIC)有关,在药品说明书推荐的常规用剂剂量下,危重症、肥胖、烧伤、肾功能不全等特殊患者血药浓度不能达到%fT>MIC的靶值,导致临床预后不佳^[1]。西司他丁为酶抑制剂,主要作用是维持亚胺培南在体内的稳定性。重症感染患者使用亚胺培南西司他丁治疗时,%fT>MIC达到90%甚至100%

Δ基金项目 河南省医学科技攻关计划项目(No.LHGJ20220851)

*第一作者 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0371-61203288。E-mail:chenyongyanzzu@163.com

是临床结局改善的靶向目标^[1,3]。亚胺培南血药浓度监测可以协助提高%FT>MIC的达标率,缩短药物诱导耐药突变窗的时间,减少细菌耐药的产生。目前,已报道的亚胺培南血药浓度检测方法多为传统的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法,临床使用后发现该方法具有检测灵敏度不理想、前处理复杂等缺点。二维液相色谱(2D-LC/UV)法具有操作简单、分析效率高、灵敏度高等优点。基于此,本研究采用2D-LC/UV法,建立适用于检测重症感染患者亚胺培南血药浓度的方法并应用于临床,旨在为临床重症感染者合理使用亚胺培南西司他丁提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括FLC 2420型全自动2D-LC/UV仪(湖南德米特仪器有限公司)、LC-20AT型液相色谱部件(日本Shimadzu公司)、XW-80A型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)、Mini-15K型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司)、GH-202型电子分析天平(日本A&D公司)、TDZ4-WS型低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

亚胺培南对照品(批号20221022,纯度98%)、亚胺培南-1D移动相、OPI-1有机移动相、BPI-1碱性移动相、API-1酸性移动相、ORG-1蛋白沉淀剂均购于湖南德米特仪器有限公司。

1.3 生物样品

马空白血浆(批号202202228)购于湖南德米特仪器有限公司。空白血样为郑州市第七人民医院(简称“我院”)收治的6个未使用亚胺培南西司他丁患者的混合血浆。血浆样品为我院院内使用亚胺培南西司他丁超过48 h的患者于用药前30 min内采血的血浆样品,患者的排除标准为:(1)测定的亚胺培南血药浓度为非稳态浓度;(2)测定的亚胺培南血药浓度为非谷浓度(c_{\min});(3)亚胺培南 c_{\min} 为调整用药复测浓度,而非首次稳态浓度。本研究经我院伦理委员会批准(伦理批号ZZSDQRMYY-2021-007)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用一维色谱柱Aston SNCB(50 mm×4.6 mm, 5 μ m),一维流动相为亚胺培南-1D移动相[乙腈-甲醇-水(15:10:75, V/V/V)],以1.0 mL/min的流速萃取除杂;使用二维色谱柱Aston SCB(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),二维流动相为72%OPI-1有机移动相(色谱级甲醇)-20%BPI-1碱性移动相[水(含20.0 mmol/L的磷酸铵,用三乙胺调pH至7.2)]-8%API-1酸性移动相[水(含20.0 mmol/L的磷酸铵,用磷酸调pH至3.0)],以1.0 mL/min的流速进一步分

离测定;柱温为40 $^{\circ}$ C,进样量为100 μ L,紫外检测波长为310 nm。洗脱程序如下:0~3.40 min,一维色谱柱;3.40~11.00 min,二维色谱柱。

2.2 溶液的配制

精密称取亚胺培南对照品18.57 mg,加入少量50%异丙醇使其溶解后,再加入纯水定容至100 mL,得质量浓度为185.70 μ g/mL的对照品储备液,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。本研究所用亚胺培南溶液由该储备液经空白血浆稀释至相应质量浓度所得。取亚胺培南对照品储备液适量,加空白血浆适量,分别制成亚胺培南质量浓度分别为0.171、0.713、1.783、4.457、11.142、18.570 μ g/mL的系列溶液,作为标准曲线样品;另取该对照品储备液适量,加空白血浆适量,分别制成亚胺培南低、中、高质量浓度(0.45、8.33、15.83 μ g/mL)的加标血样,作为质控样品。

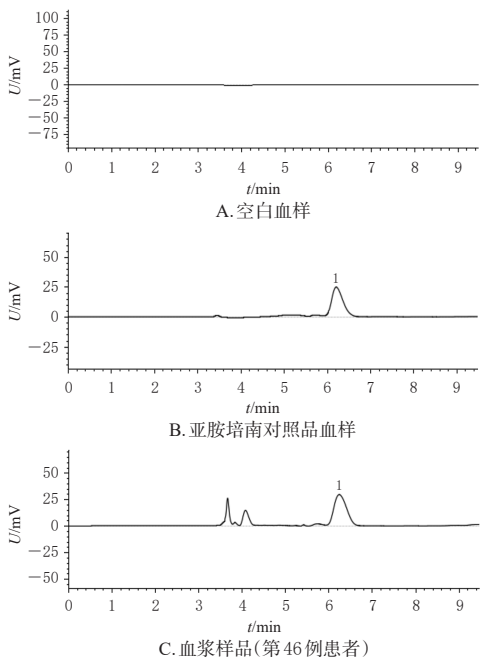
2.3 样品预处理

取样品适量,以3 000 r/min离心5 min,取上清液400 μ L,加入ORG-1蛋白沉淀剂1.0 mL,置于1.5 mL EP管中,涡旋混匀后,以14 500 r/min离心8 min,取上清液1.0 mL至进样瓶中,待测。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性

分别取空白血样、亚胺培南对照品血样(15.83 μ g/mL)和血浆样品(第46例患者),按“2.3”项下方法预处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,亚胺培南的出峰时间为6.2 min,与其他色谱峰的分离度良好,血浆内源性杂质对亚胺培南的测定干扰小,表明本方法具有较高的专属性。结果见图1。



1:亚胺培南。

图1 亚胺培南2D-LC/UV色谱图

2.4.2 标准曲线及定量下限考察

取“2.2”项下系列质量浓度(0.171、0.713、1.783、4.457、11.142、18.570 $\mu\text{g/mL}$)的标准曲线样品,按“2.3”项下方法预处理,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标绘制标准曲线,得亚胺培南线性回归方程为 $A=790.825+58\ 360.0c(R^2=0.999\ 9)$ 。结果显示,亚胺培南在0.171~18.570 $\mu\text{g/mL}$ 检测质量浓度范围内线性关系良好,定量下限为0.171 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.3 精密度与准确度试验

按“2.2”项下方法配制亚胺培南定量下限、低、中、高质量浓度(0.17、0.45、8.33、15.83 $\mu\text{g/mL}$)的质控样品,每个浓度平行5份,按“2.3”项下方法预处理,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,在同一天测定5次以及连续5 d每日测定1次,考察日内、日间精密度(以RSD计)和准确度(以回收率计)。结果见表1。

表1 准确度、精密度试验结果($n=5$)

亚胺培南质量 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	日内			日间		
	测得值 $(\bar{x}\pm s)/(\mu\text{g/mL})$	RSD/%	回收率/%	测得值 $(\bar{x}\pm s)/(\mu\text{g/mL})$	RSD/%	回收率/%
0.17	0.18 \pm 0.01	7.68	105.00	0.18 \pm 0.01	3.18	106.16
0.45	0.45 \pm 0.02	6.11	101.07	0.43 \pm 0.02	4.50	94.89
8.33	8.34 \pm 0.45	5.36	100.10	8.69 \pm 0.29	3.37	104.47
15.83	15.48 \pm 1.24	7.79	100.63	14.79 \pm 0.87	5.90	93.47

2.4.4 基质效应考察

分别取适量水和空白血样加入亚胺培南对照品储备液,制成低、高质量浓度(0.45、15.83 $\mu\text{g/mL}$)的亚胺培南标准液和质控样品,每个浓度平行6份,按“2.3”项下方法预处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算质控样品与标准液中亚胺培南的峰面积比值,评估基质效应。结果显示,低、高质量浓度质控样品的基质效应均大于92.86%,符合2020年版《中国药典》相关规定。

2.4.5 稳定性试验

分别取“2.2”项下质量浓度分别为0.45、15.83 $\mu\text{g/mL}$ 的质控样品,每个浓度平行5份,分别在室温(15~30 $^{\circ}\text{C}$)放置6 h、4~10 $^{\circ}\text{C}$ 放置24 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存30 d后冻融循环3次,再按“2.3”项下方法预处理,按“2.1”项下色谱条件进样分析,考察稳定性。结果(表2)显示,质控样品在上述条件下的稳定性良好。

表2 稳定性试验结果($n=5$)

亚胺培南质量 浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	室温放置6 h		4~10 $^{\circ}\text{C}$ 放置24 h		-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存30 d后冻融循环3次	
	测得值 $(\bar{x}\pm s)/(\mu\text{g/mL})$	RSD/%	测得值 $(\bar{x}\pm s)/(\mu\text{g/mL})$	RSD/%	测得值 $(\bar{x}\pm s)/(\mu\text{g/mL})$	RSD/%
0.45	0.44 \pm 0.03	5.71	0.44 \pm 0.02	5.02	0.45 \pm 0.03	6.85
15.83	14.96 \pm 0.27	1.82	15.36 \pm 0.01	0.04	15.40 \pm 0.97	6.27

2.4.6 稀释可靠性考察

取亚胺培南对照品储备液适量,加入空白血浆,制成5份质量浓度均为31.66 $\mu\text{g/mL}$ 的加标血样,再用空白血浆稀释1倍后,按“2.3”项下方法预处理,再按“2.1”

项下色谱条件进样分析,考察稀释可靠性。结果显示,精密密度为3.06%($n=5$),符合2020年版《中国药典》相关规定。

2.5 临床应用

本研究共纳入51例患者,采用本方法测定血浆样品中亚胺培南的 c_{min} 为0~19.57 $\mu\text{g/mL}$,其中3例患者的 c_{min} 超出线性范围(包括2例低于定量下限、1例高于定量上限),由此可见,本方法亚胺培南的线性范围可覆盖94.12%的临床血药浓度检测结果。

3 讨论

重症感染患者不可预测的亚胺培南PK变化会使此类患者存在极大的个体差异,导致临床治疗失败并诱导微生物耐药的发生^[4-5]。对于重症感染及多重耐药菌感染患者,100% $\text{fT}>\text{MIC}$ 是实现临床疗效的最低目标,而100% $\text{T}>(4\sim5)\times\text{MIC}$ 则是可优化临床疗效、避免筛选出耐药菌的靶值^[6],所以建立方便、快捷、高灵敏度的亚胺培南检测方法显得尤为重要。

目前许多技术和方法已经应用于治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),如免疫分析法、液相色谱法、HPLC法等。但免疫分析法容易受到干扰、缺乏敏感性;液相色谱法虽然可以鉴别药物种类,具有高特异性、高精准度和高灵敏度的特点,但其设备的初始成本较高,还需要稳定可靠的电力、通风和高纯度气体的供应,以及较高专业技术水平的工作人员操作,所以无法普遍开展^[5]。因此,HPLC法仍然是临床TDM经典且高性价比的方法。

已有多篇研究报道HPLC法测定人血浆中亚胺培南浓度,多采用 C_{18} 色谱柱完成萃取与分析过程,其进样量在10~30 μL 之间,定量下限为0.5 $\mu\text{g/mL}$ ^[7-9]。但由于重症感染患者的用药种类繁多,其血液样本成分复杂,于目标成分的测定干扰较大,传统HPLC法需要通过繁琐的前处理和大量的有机溶剂冲洗来除杂,导致检测灵敏度低,且易引起残留蛋白堵塞色谱柱。本研究采用2D-LC/UV法,以一维色谱柱萃取除杂净化,二维色谱柱进一步分离分析,将进样量提高到100 μL ,增加了检测的稳定性及灵敏度,结果证明,本方法在0.171~18.570 $\mu\text{g/mL}$ 的检测浓度范围内线性关系良好,定量下限达0.171 $\mu\text{g/mL}$,大大提高了检测灵敏度。

亚胺培南稳定性一直是限制临床血药浓度检测的因素之一,究其原因:一方面,亚胺培南在血浆中易降解,稳定性差;另一方面,HPLC法前处理繁琐、耗时,检测时间较长。亚胺培南的不稳定性主要是其化学结构中四元环引起的,此外,温度及pH也是影响其稳定性的主要因素。目前主要通过调节pH和低温保存来改善亚胺培南的稳定性,以延长亚胺培南血浆样品的检测时间。本研究的稳定性试验结果显示,血浆样品中亚胺培南在室温下保存6 h的稳定性良好,与既往研究数据相

同^[7-8]。另外,本研究采取2D-LC/UV法实现了前处理简化和检测分析自动化,可连续进样检测,缩短检测时间(11 min内完成单次样品检测),降低了对处理后样品稳定性的要求,满足临床高通量检测的需求。

亚胺培南为极性较大的药物,为了使其与血浆样品中的干扰组分快速有效分离,本研究采用反相色谱柱Aston SNCB(50 mm×4.6 mm, 5 μm)作为萃取柱,结合既往报道^[1, 7-9]亚胺培南液相检测中有机相与水相的比例一般在30:70至5:95之间,所以优化流动相比比例时,亚胺培南以低比例的有机相乙腈-水(20:80, V/V)作为流动相优化起点,结果显示,峰形为高尖峰,但出峰时间较早,不能与大部分的水溶性干扰组分有效分离;采用同比例甲醇-水为流动相时,峰形较差,洗脱时间较长。经调整,采用乙腈-甲醇-水(15:10:75, V/V/V)为流动相时,峰形为高尖峰,能够将亚胺培南组分有效转移到二维色谱柱上进行分析,同时亚胺培南在一维色谱柱的出峰时间为3.0 min,目标分析峰结束时间为3.3 min,可见在此流动相下,亚胺培南既能与血浆样品中大多数的极性组分分离,又能避免出峰较晚的非极性组分的干扰,保留因子 k 在1~10之间。为了最大限度将萃取得到的亚胺培南组分转移到二维色谱柱上,结合目标分析峰的结束时间,本研究选择0~3.4 min作为一维色谱柱的分析时间,使用低比例的有机相乙腈-甲醇-水(15:10:75, V/V/V)作为一维色谱柱的流动相。

综上,本研究采用全自动2D-LC/UV仪成功建立了亚胺培南血药浓度检测方法。该方法前处理简单、快捷,进样量大,可用于重症感染患者亚胺培南血药浓度的检测。

参考文献

- [1] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 抗菌药物药代动力学/药效学理论临床应用专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(6): 409-446.
- Infectious Disease Professional Committee of China Medical Education Association. Expert consensus on clinical application of pharmacokinetics/pharmacodynamics theory of antibacterial drugs[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2018, 41(6): 409-446.
- [2] DHAESE S, VAN VOOREN S, BOELENS J, et al. Therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics in the ICU[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2020, 18(11): 1155-1164.

- [3] STAŠEK J, KELLER F, KOČÍ V, et al. Update on therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics in critically ill patients: a narrative review[J]. Antibiotics, 2023, 12(3): 568.
- [4] DOWNES K J, GOLDMAN J L. Too much of a good thing: defining antimicrobial therapeutic targets to minimize toxicity[J]. Clin Pharmacol Ther, 2021, 109(4): 905-917.
- [5] GASPAR V P, IBRAHIM S, ZAHEDI R P, et al. Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine[J]. J Mass Spectrom, 2021, 56(11): e4788.
- [6] GUILHAUMOU R, BENABOUD S, BENNIS Y, et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients: guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique-SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Société Française d'Anesthésie et Réanimation-SFAR)[J]. Crit Care, 2019, 23(1): 104.
- [7] 蔡婕, 许金娜, 倪穗琴. HPLC法测定人血浆中亚胺培南浓度及建立临床标本采样流程[J]. 广州医药, 2022, 8(3): 18-21, 26.
- CAI J, XU J N, NI S Q. Determination of imipenem concentration in human plasma by HPLC and establishing the sampling process of clinical specimens[J]. Guangzhou Med J, 2022, 8(3): 18-21, 26.
- [8] 李逃明, 董李晨, 旷达彬, 等. HPLC法测定人血浆中美罗培南与亚胺培南的浓度[J]. 海峡药学, 2022, 34(7): 87-90.
- LI T M, DONG L C, KUANG D B, et al. Determination of the concentrations of meropenem and imipenem in human plasma by HPLC[J]. Strait Pharm J, 2022, 34(7): 87-90.
- [9] 邓阳, 徐兵, 李昕, 等. 基于亚胺培南稳定性考察的治疗药物监测临床采样流程建立[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 4(18): 2207-2210.
- DENG Y, XU B, LI X, et al. Establishing the clinical sampling process of therapeutic drug monitoring based on stability of imipenem[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 4(18): 2207-2210.

(收稿日期:2024-02-19 修回日期:2024-07-17)

(编辑:邹丽娟)