

大鼠血浆中厄他培南的 HPLC 法测定及初步药动学研究

刘秀菊, 董维冲, 王凌峰, 吴瑕, 何文娟

(河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

摘要 目的: 建立一种快捷、灵敏的高效液相色谱法测定大鼠血浆中的厄他培南, 并考察其在大鼠体内的药动学。方法: 以甲硝唑为内标, 血浆样品经过甲醇沉淀蛋白, 离心, 取上清液进行 HPLC 分析。使用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-10 mmol·L⁻¹ 醋酸钠溶液 (11.4: 88.6), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 295 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。结果: 血浆中厄他培南浓度在 2~200 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.9998$); 厄他培南的绝对回收率为 (96.4 ± 1.7)%~(99.3 ± 1.2)%, 方法回收率为 (87.6 ± 3.1)%~(107.9 ± 2.5)%; 内标甲硝唑的绝对回收率为 (98.1 ± 1.9)%; 日内、日间精密度均小于 5%; 中浓度的血浆样品在常温放置 3 h、-40 °C 保存 7 d 及反复冻融 3 次, 均能保持稳定; 稀释效应精密度为 0.4%。大鼠静脉注射厄他培南 100 mg·kg⁻¹ 后的主要药动学参数分别为 AUC_{0→t} (207.9 ± 19.7) μg·h·mL⁻¹, AUC_{0→∞} (209.1 ± 20.4) μg·h·mL⁻¹, $t_{1/2}$ (0.4 ± 0.05) h, CL (0.48 ± 0.05) L·(h·kg)⁻¹, V (0.29 ± 0.02) L·kg⁻¹。结论: 此 HPLC 法测定大鼠体内厄他培南浓度, 方法准确快捷, 灵敏度高, 重复性好, 适合该药的药动学研究。

关键词: 厄他培南; 碳青霉烯类; 高效液相色谱; 血药浓度; 药代动力学; 大鼠标准血浆

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 11-2082-05
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.11.26

Determination of ertapenem in rat plasma by HPLC and preliminary pharmacokinetics of ertapenem

LIU Xiu-ju, DONG Wei-chong, WANG Ling-feng, WU Xia, HE Wen-juan

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

Abstract **Objective:** To establish a rapid, sensitive method for the determination of ertapenem in rat plasma, and its preliminary pharmacokinetics in rats was also investigated. **Methods:** Taking metronidazole as an internal standard, the plasma samples were extracted by methanol to precipitate protein. After centrifugation, the supernatant was analyzed by HPLC. A Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm) column was used, with the mobile phase of acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ sodium acetate solution (11.4: 88.6), flow rate of 1 mL·min⁻¹, detection wavelength of 295 nm, column temperature of 35 °C, sample volume of 10 μL. **Results:** The method was validated over the concentration range of 2-200 μg·mL⁻¹ for ertapenem in rat plasma, and there was excellent linearity ($r=0.9998$). The extraction recoveries for ertapenem were (96.4 ± 1.7)%~(99.3 ± 1.2)%, while its method recoveries were (87.6 ± 3.1)%~(107.9 ± 2.5)%. The extraction recovery for the internal standard metronidazole was (98.1 ± 1.9)%;

第一作者 Tel: (0311) 66002778; E-mail: liuxiujv1@163.com

the intra-day and inter-day RSDs were both below 5%; All the analytes of medium concentrations in serum were stable at room temperature for 3 h at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days and after three-cycle freeze-thaw; Effect of dilution RSD was 0.4%. The major pharmacokinetic parameters after iv administration of ertapenem $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to rats were as follows: $\text{AUC}_{0\rightarrow 1}$ (207.9 ± 19.7) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}$ (209.1 ± 20.4) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ (0.4 ± 0.05) h, CL (0.48 ± 0.05) $\text{L}\cdot(\text{h}\cdot\text{kg})^{-1}$, V (0.29 ± 0.02) $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$. **Conclusion:** HPLC method for the determination of ertapenem concentration in plasma is rapid, simple, accurate and sensitive, which is also suitable for pharmacokinetic study.

Keywords: ertapenem; carbopenems; HPLC; blood concentration; pharmacokinetics; rat blood sample

注射用厄他培南(ertapenem for injection)是美国默克公司研制生产的新型碳青霉烯类抗生素^[1],化学名为(1R,5S,6S,8R,2S*,4S*)-2-[2-[3-羧基-苯基氨基甲酰基]-吡咯烷基-4-硫代]-6-(1-羟乙基)-1-甲基碳青霉烯-3-甲酸单钠盐^[2]。体外试验中,厄他培南对常见的革兰阳性、阴性需氧菌及厌氧菌均表现出极好的抗菌活性^[3]。厄他培南有着碳青霉烯类对治疗多重耐药菌感染可靠而且高效的优点,且不易产生耐药性,每日1次,使用方便^[4]。已获准用于治疗成人复杂性腹腔感染、社区获得性肺炎、复杂性皮肤和皮肤软组织感染、复杂性尿路感染和妇科感染等^[5-10]。

国外有研究从不同类型的生物基质中提取厄他培南,如血浆、尿液、支气管肺泡灌洗等组织,并通过一种窄孔柱测定厄他培南血药浓度的高效液相色谱/紫外法^[11]。另有用HPLC-UV和LC-MS法测定厄他培南的血药浓度^[12]。以上方法均需要很多固相萃取或液-液萃取,需要蒸发和重建,操作复杂,回收率低。目前,国内关于该药在生物基质中含量测定的方法学未见报道。本研究建立了HPLC法测定大鼠尾静脉注射后厄他培南的血药浓度,并考察其药动学。

1 仪器与试剂

高效液相色谱系统,包括2695型泵、2489型紫外检测器和Empower Application操作平台(美国Waters公司)。

厄他培南对照品(含量97.0%,批号181512009)由石家庄中诺药业有限公司提供,甲硝唑(内标)对照品(含量99.6%,批号20140112)购自湖北宏源药业有限公司;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,

水为蒸馏水。

健康雄性SD大鼠,清洁级,体重(220 ± 20)g,由河北医科大学实验动物中心(合格证:SCXK(冀)2013-1-003)提供,动物合格证编号:1607150。

2 方法与结果

2.1 血药浓度测定方法

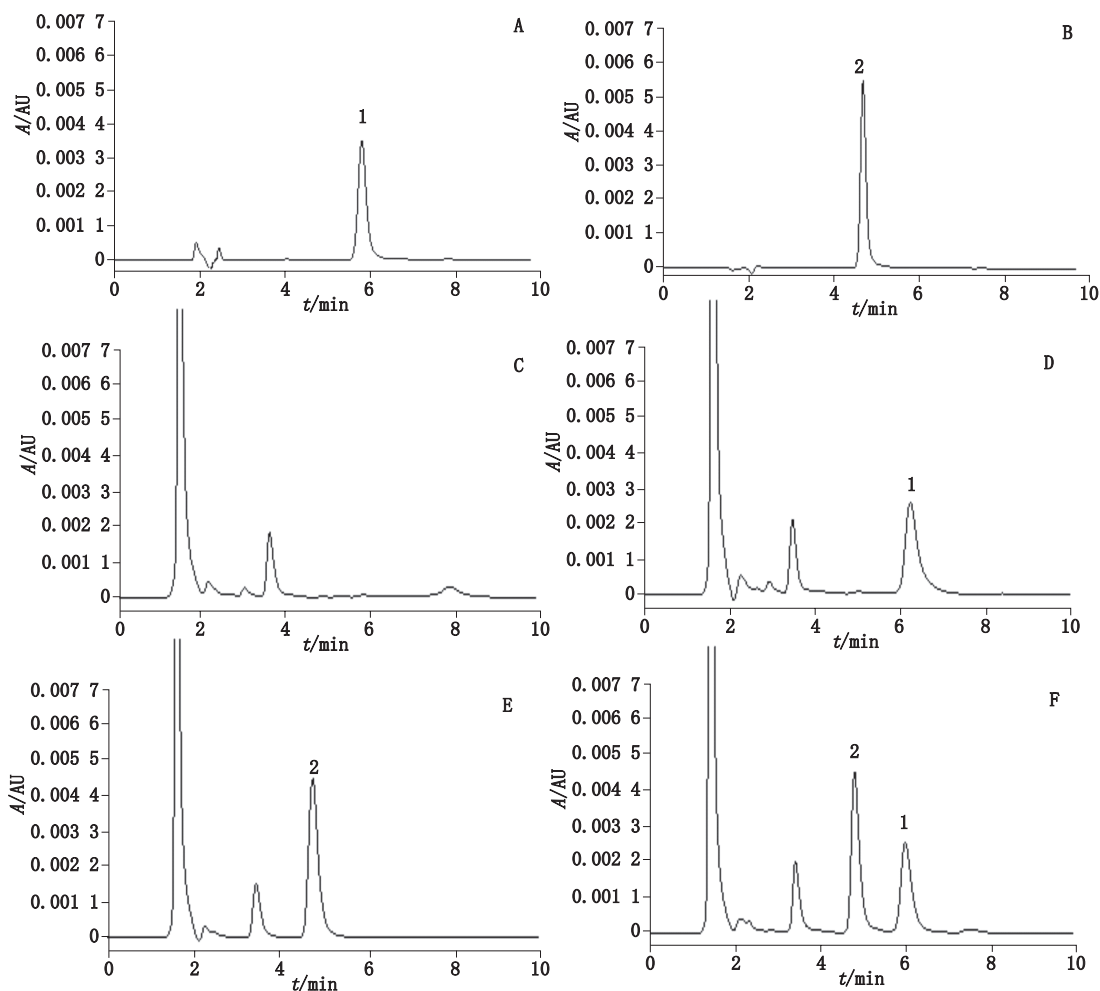
2.1.1 溶液配制 厄他培南对照品储备液:精密称取厄他培南对照品40 mg,置10 mL量瓶中,用甲醇水(1:1)定容,配制成浓度为4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的厄他培南储备溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

内标溶液:精密称取甲硝唑对照品16 mg,置50 mL量瓶中,用甲醇水(1:1)定容,再取5 mL于10 mL量瓶定容,配制成浓度为160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

2.1.2 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C_{18} 柱(十八烷基硅烷键合硅胶,4.6 mm $\times$ 150 mm, 5.0 μm);流动相乙腈:10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液(11.4:88.6);流速1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长295 nm;柱温35 $^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL 。

2.1.3 血样处理 取冷冻血样室温自然解冻,4 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液100 μL 置带塞离心管中,加入内标溶液10 μL ,涡旋混合30 s,加甲醇400 μL ,涡旋混合1 min,10 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液进样分析。

2.1.4 专属性试验 取厄他培南对照品溶液和内标溶液直接进样;另取空白血浆和给药后大鼠血浆,分别按“2.1.3”项下方法处理并测定,记录色谱图。结果显示,在该色谱条件下,厄他培南、内标峰形良好,分离完全,且大鼠血浆中内源性物质不干扰测定。色谱图见图1。



1. 厄他培南 (ertapenem) 2. 内标 (internal standard)

A. 对照品溶液 (reference solution, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) B. 内标溶液 (internal standard solution, $3.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) C. 空白血浆 (blank plasma) D. 对照品模拟标准血浆 ((reference simulation of blood sample) E. 内标模拟标准血浆 (internal standard of blood sample) F. 大鼠给药后血浆 (rat plasma after administration)

图 1 典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms

2.1.5 线性试验 取厄他培南储备液适量,用水稀释,分别制备浓度为 $2\,000$ 、 $1\,000$ 、 500 、 200 、 100 、 50 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的厄他培南对照品溶液。精密吸取 $10 \mu\text{L}$,各置 1.5 mL 塑料带塞离心管中,氮气吹干,分别加入空白血浆 $100 \mu\text{L}$,制得浓度为 $2 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的模拟标准血浆。分别按“2.1.3”项下方法处理并进样测定。以厄他培南、内标峰面积之比 R 为纵坐标,血药浓度 C 为横坐标,进行线性回归,得回归方程:

$$R = 0.0148C - 0.0209 \quad r = 0.9998$$

厄他培南在 $2 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,最低定量限 (LLOQ) 为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.6 回收率试验 取空白血浆,按“2.1.5”项下方法分别制备低、中、高浓度 (2 、 50 和 $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 厄他培南模拟标准血浆,各 5 份。均按“2.1.3”项下方法处理并进样测定,记录峰面积。取空白血浆,制备内标模拟标准血浆,共 5 份。以模拟标准血浆中厄他培南、内标的峰面积与等量厄他培南、内标对照品溶液直接进样的峰面积之比计算绝对回收率。根据标准曲线计算药物浓度,以测得药物浓度与已知药物

浓度之比计算方法回收率。结果厄他培南的绝对回收率($n=5$)分别为 $(98.3 \pm 6.4)\%$ 、 $(96.4 \pm 1.7)\%$ 和 $(99.3 \pm 1.2)\%$,方法回收率分别为 $(107.9 \pm 2.5)\%$ 、 $(87.6 \pm 3.1)\%$ 和 $(99.6 \pm 2.2)\%$ 。内标的绝对回收率为 $(98.1 \pm 1.9)\%$ 。

2.1.7 精密度试验 同上分别制备低、中、高浓度的厄他培南模拟标准血浆,各5份,分别室温放置1、2、3 h后按“2.1.3”项下方法处理并进样测定;另按“2.1.3”项下方法连续3 d处理并进样测定,结果计算得日内RSD分别为2.3%、3.5%和2.2%,日间RSD分别为1.0%、1.2%和2.6%。

2.1.8 稳定性试验 按“2.1.5”项下方法制备厄他培南模拟标准血浆($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),在常温放置3 h、 -40°C 保存7 d及反复冻融3次,然后按“2.1.3”项下方法处理,进样测定,结果RSD分别为4.6%、4.8%和3.6%,表明厄他培南在上述条件下稳定性良好。

2.1.9 稀释效应 取20 μL 的4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 厄他培南对照品溶液,各5份,吹干后用500 μL 空白血浆复溶制备厄他培南模拟标准血浆($160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),混匀后按“2.1.3”项下方法处理,进样测定,结果RSD为0.4%,表明厄他培南在上述条件下稳定性良好。

2.2 药动学试验

2.2.1 溶液的配制 精密称取厄他培南对照品400 mg,置10 mL量瓶中,用生理盐水溶解并定容,配成40 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的厄他培南溶液, 4°C 保存待用。

2.2.2 给药方案 5只大鼠给药前禁食12 h,自由饮水,给药前对大鼠编号并称重,按厄他培南 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对5只大鼠分别进行尾静脉注射给药。于给药前及给药后2、5、10、20、30、45 min和1、2和3 h于眼眶取血约0.4 mL(取血过程中给实验动物补充体液),置含有肝素的抗凝带塞塑料离心管中,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上层血浆, -40°C 冰箱保存待测。

2.2.3 血样测定和数据处理 取待测血样室温放置自然解冻,按“2.1.3”项下方法处理并进样测定。用标准曲线计算血药浓度,采用DAS2.0软件进行自动拟合处理。大鼠体内厄他培南的药-时曲线见图2,药动学参数见表1。

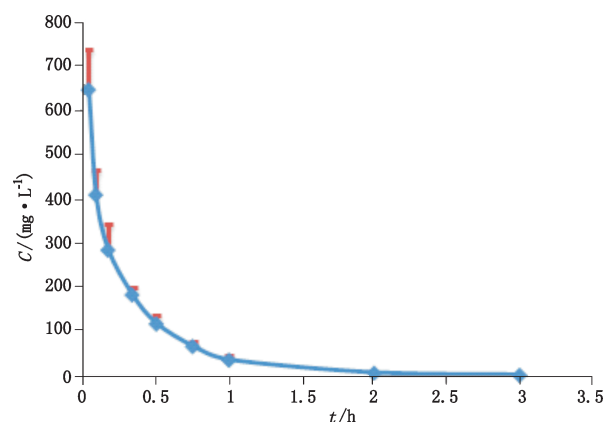


图2 大鼠静注给予厄他培南 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的药-时曲线($n=5$)

Fig. 2 Drug concentration-time curves after iv administration of ertapenem $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to rats

表1 大鼠体内厄他培南的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of ertapenem in rats

药动学参数 (pharmacokinetic parameters)	结果 (results)
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty} / (\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	207.9 ± 19.7
$\text{AUC}_{0 \rightarrow z} / (\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	209.1 ± 20.4
$t_{1/2} / \text{h}$	0.4 ± 0.05
$CL / [\text{L} \cdot (\text{h} \cdot \text{kg})^{-1}]$	0.48 ± 0.05
$V / (\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.29 ± 0.02

3 讨论

本实验建立了一种快速、灵敏的HPLC方法用于测定大鼠体内的厄他培南。在预实验时分别考察了流动相的组成、配比、pH^[13-15];选择血样处理方法时,用正丁醇、异丙醇、甲醇、乙腈等分别对血样进行蛋白沉淀,结果甲醇的效果最好,提取回收率高,并排除内源性干扰。

参考文献

- [1] 谢赞,白敏,王茉莉,等. HPLC测定注射用厄他培南的含量及有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(5): 431
XIE Z, BAI M, WANG ML, et al. Determination of ertapenem for injection and its related substances by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2012, 29(5): 431
- [2] 史颖,李坤,赵学斌,等. 厄他培南钠的合成研究[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(7): 519

- SHI Y, LI K, ZHAO XB, *et al.* Study on the synthesis of ertapenem sodium [J]. Chin J Antibiot, 2011, 36(7): 519
- [3] 周宇麒, 张天托, 谢灿茂, 等. 厄他培南静脉注射液治疗下呼吸道细菌性感染的有效性和安全性研究 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(1): 110
- ZHOU YQ, ZHANG TT, XIE CM, *et al.* Study of effectiveness and safety on ertapenem in the treatment of lower respiratory tract bacterial infection [J]. J Pract Med, 2013, 29(1): 110
- [4] 吕艳霞. 厄他培南——治疗多重耐药菌感染的新选择 [J]. 海峡药理学杂志, 2007, 19(1): 62
- LU YX. Ertapenem: A newly treatment for infection of severe drug-resistant Pathogens [J]. Strait Pharm J, 2007, 19(1): 62
- [5] 史颖, 谢赞, 张雅然, 等. 反相高效液相色谱梯度洗脱法测定厄他培南钠的含量和有关物质 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(10): 776
- SHI Y, XIE Z, ZHANG YR, *et al.* Determination of ertapenem sodium and its related substances by RP-HPLC gradient elution method [J]. Chin J Antibiot, 2012, 37(10): 776
- [6] 郭树栋, 白文钦, 孙秀玲. 厄他培南钠的合成 [J]. 药学研究, 2013, 32(7): 425
- GUO SD, BAI WQ, SUN XL. Synthesis of ertapenem sodium [J]. J Pharm Res, 2013, 32(7): 425
- [7] 董耘婷, 张永信. 碳青霉烯类抗生素的发展与展望 [J]. 上海医药, 2011, 32(7): 316
- DONG YT, ZHANG YX. The current development and prospects of carbapenems [J]. Shanghai Med Pharm J, 2011, 32(7): 316
- [8] 何忠, 张强, 谭明旗. 厄他培南治疗老年社区获得性肺炎的临床疗效和安全性 [J]. 实用药物与临床, 2013, 16(3): 229
- HE Z, ZHANG Q, TAN MQ. Efficacy and safety of ertapenem on community-acquired pneumonia in elderly patients [J]. Pract Pharm Clin Remed, 2013, 16(3): 229
- [9] 倪军, 胡国萍, 孙嵘. 厄他培南经验性治疗老年重症社区获得性肺炎的临床评估 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(6): 424
- NI J, HU GP, SUN R. Clinical evaluation of ertapenem as empirical treatment of severe community acquired pneumonia in elderly patients [J]. Chin J Infect Chemother, 2012, 12(6): 424
- [10] 刘宏博, 吴小街. 厄他培南治疗 36 例高龄患者肠杆菌科细菌感染 [J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(5): 416
- LIU HB, WU XJ. Effects of ertapenem on treatment of enterobacteriaceae infection in 36 aged patients [J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2013, 32(5): 416
- [11] MUNDKOWSKI RG, MAJCHER-PESZYNSKA J, BURKHARDT O, *et al.* A new simple HPLC assay for the quantification of ertapenem in human plasma, lung tissue, and broncho-alveolar lavage fluid [J]. J Chromatogr B, 2006, 832(2): 231
- [12] PICKERING M, BROWN S. Quantification and validation of HPLC-UV and LC-MS assays for therapeutic drug monitoring of ertapenem in human plasma [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(5): 568
- [13] CARDONE KE, GRABE DW, KULAWY RW, *et al.* Ertapenem pharmacokinetics and pharmacodynamics during continuous ambulatory peritoneal dialysis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(2): 725
- [14] ZAJAC M, CIELECKA PIONTEK J, JELITASKA A. Development and validation of UV spectrophotometric and RP-HPLC methods for determination of ertapenem during stability studies. [J]. Chem Anal, 2006, 51: 761
- [15] LA MARCA G, GIOCALIERE E, VILLANELLI F, *et al.* Development of an UPLC-MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 61: 108

(本文于 2016 年 9 月 20 日收到)