

• 论 著 •

肾功能亢进患者血浆中亚胺培南浓度 UPLC-MS/MS 测定方法的建立及药代动力学研究*

何 瑶, 李福书, 余志杰, 陈 肖[△]

(重庆市急救医疗中心药剂科, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 建立了测定肾功能亢进(ARC)患者血浆中亚胺培南(IMP)浓度的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法,并研究 IMP 在 ARC 患者体内的药代动力学特征。**方法** 血浆样品用乙腈沉淀蛋白处理,以阿莫西林为内标,采用 UPLC-MS/MS 法分析。筛选 IMP 的给药方案为 1 g,静脉滴注,每隔 8 h 的 ARC 患者,收集不同时间点的血药浓度,计算药代动力学参数。**结果** IMP 在 0.40~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好,精密度、准确度、基质效应、方法回收率和稳定性均符合要求。IMP 在 ARC 患者体内的半衰期为 $(0.97 \pm 0.06)\text{h}$,血药浓度-时间曲线下面积(AUC)为 $(48.49 \pm 14.93)\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$,表观分布容积为 $(16.15 \pm 7.90)\text{L}$,肌酐清除率为 $(18.30 \pm 5.70)\text{L/h}$,达峰浓度为 $(15.63 \pm 4.60)\mu\text{g/mL}$ 。**结论** UPLC-MS/MS 法准确度高、灵敏度高,可有效用于测定 ARC 患者血浆中 IMP 浓度。ARC 患者体内 IMP 的代谢速率和清除率可能发生变化,为临床用药提供重要参考。

[关键词] 亚胺培南; 肾功能亢进; 治疗药物浓度监测; 液相色谱串联质谱; 药代动力学

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.19.004

中图法分类号:R917

文章编号:1009-5519(2024)19-3259-05

文献标识码:A

Quantification of plasma imipenem in patients with augmented renal clearance
by UPLC-MS/MS method and its study on pharmacokinetics*

HE Yao, LI Fushu, YU Zhijie, CHEN Xiao[△]

(Department of Pharmacy, Chongqing Emergency Medical Center,
Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To establish a ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) assay to quantify plasma imipenem (IMP) in patients with Augmented Renal Clearance (ARC), and to investigate the pharmacokinetic characteristics of IMP in patients with ARC. **Methods** The plasma samples were treated with acetonitrile precipitated protein and analyzed by UPLC-MS/MS method with amoxicillin as the internal standard. ARC patients with IMP administration regimen of 1 g, intravenous drip, ARC patients at an interval of 8 h were screened, blood samples were collected at different times and plasma concentrations were detected, and pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** Linear calibration curves of IMP were generated over the range of 0.40—200.00 $\mu\text{g/mL}$, and the precision, accuracy, matrix effect, method recovery and stability all met the requirements. The half-life of IMP in ARC patients was $(0.97 \pm 0.06)\text{h}$, the area under the drug curve (AUC) was $(48.49 \pm 14.93)\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, the apparent volume of distribution was $(16.15 \pm 7.90)\text{L}$, and the creatinine clearance rate was $(18.30 \pm 5.70)\text{L/h}$. The peak concentration was $(15.63 \pm 4.60)\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** This method has high accuracy and high sensitivity, and can be effectively applied to the detection of IMP concentration in plasma of ARC patients. The metabolic rate and clearance rate of IMP may change in ARC patients, which provides an important reference for clinical drug use.

[Key words] Imipenem; Augmented renal clearance; Therapeutic drug monitoring; Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Pharmacokinetics

* 基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目(2023MSXM090);重庆市临床药学重点专科建设项目(渝卫办发[2023]2号)。

作者简介:何瑶(1983—),硕士研究生,副主任药师,主要从事临床药学、药理学、医院药事管理方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:

136143931@qq.com。

肾功能亢进(ARC)是指肾脏功能紊乱的一种特殊病理状态,其特征为肌酐清除率(CrCl)增加,肾脏对药物的清除增强,与患者药物亚治疗浓度的暴露、治疗失败甚至耐药性相关,对患者的预后有非常重要的影响^[1-2]。

亚胺培南(IMP)作为碳青霉烯类抗菌药物的经典药物之一,被广泛用于重症感染患者,是临床指南推荐的一线用药^[3]。当 IMP 的血药浓度达到致病菌的 4 倍最低抑菌浓度(MIC)以上,且该浓度的维持时间占给药间隔至少在 40%~50%时才能达到有效的杀菌活性,这一比率越高,药物药效越好^[4]。由于 IMP 主要经肾脏清除(70%~76%),当患者在 ARC 的特殊病理状态时,会严重影响 IMP 在体内的药物浓度,导致药物治疗失败^[5]。

因此,建立准确、稳定、可靠的 IMP 分析方法,从而了解 IMP 在 ARC 患者体内的药代动力学特征,结合患者体内 IMP 的血药浓度,及时给予个体化给药方案,对提高临床疗效,改善患者的预后具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 注射用亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东有限公司);对照品 IMP(纯度≥98%,批号 wkq20212310,四川省维克奇生物科技有限公司);内标阿莫西林对照品(AMX,纯度≥98%,批号 130409-202113,中国食品药品检定研究院);稳定剂 3-(N-吗啉基)丙烷磺酸(MOPS,纯度≥99%,批号 BCCB9738,德国 Sigma 公司);色谱纯乙腈和甲醇(美国 Honeywell 公司);色谱纯甲酸(东京化成工业株式会社);其他试剂均为分析纯及以上。

1.1.2 实验仪器 超高效液相色谱-串联质谱(UP-
LC-MS/MS)联用仪系统:Acquity UPLC 超高效液相

色谱仪、Quattro Premier XE 三重四级杆质谱仪、Masslynx4.1 数据处理系统(美国 Waters 公司);高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司)等。

1.1.3 研究对象 2022 年 6 月至 2023 年 6 月收治在本中心使用了 IMP 的 ARC 患者。入组条件:18~80 周岁患者、CrCl>130 mL/min·1.73 m²、急性生理和慢性健康评分(APACHE II 评分)≥15 分或序贯器官衰竭估计(SOFA)评分≥2 分。

1.2 方法

1.2.1 色谱与质谱条件

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50.0 mm,1.7 μm);A 相:0.1%甲酸溶液;B 相:乙腈;洗针液:乙腈-水(1:1,V/V);流速:0.20 mL/min,洗脱条件见表 1;柱温:40℃;自动进样器温度:10℃;进样量 1 μL。

1.2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾喷离(ESI)正离子模式;检测方式:多重反应选择离子监测(MRM)扫描;离子源温度:150℃;毛细管电压:3 kV,脱溶剂气温度:350℃;碰撞能电压:IMP 为 18 V,内标 AMX 为 28 V;锥孔电压:IMP 和 AMX 均为 27 V;定量分析离子对:IMP 为 300.37→142.00,AMX 为 366.12→114.14。IMP 及内标 AMX 的二级质谱图见图 1。

表 1 色谱柱梯度洗脱条件

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0.00	0.20	92	8
0.95	0.20	92	8
0.96	0.20	60	40
2.40	0.20	60	40
2.41	0.20	92	8
3.50	0.20	92	8

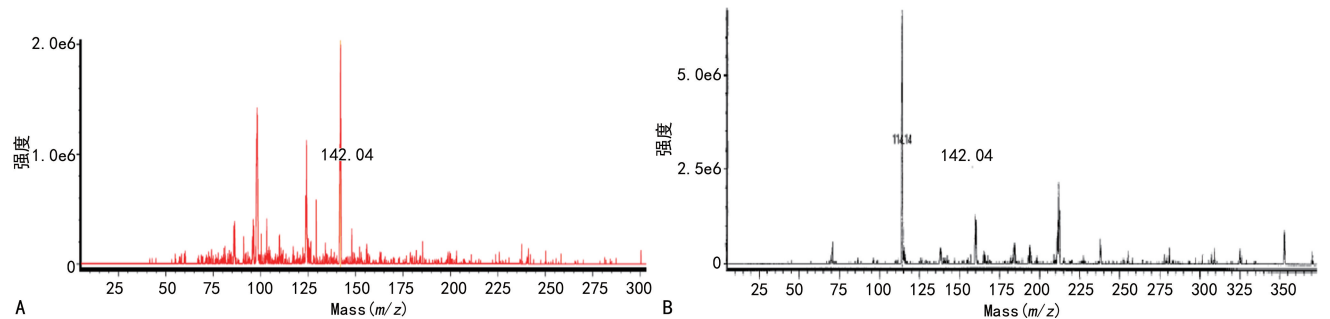


图 1 IMP(A)及内标(B)的二级质谱图

1.2.2 溶液的配制

1.2.2.1 IMP 储备溶液的配制 精密称量 IMP 对照品约 5.00 mg,至于 4 mL EP 管中,用超纯水溶解并稀释至约 5.00 mg/mL,于一 80℃ 冷冻保存。

1.2.2.2 内标溶液的配制 精密称量 AMX 对照品

5.06 mg(按纯度 98%计算),加入 4.96 mL 85%甲醇溶液溶解混匀,用 90%乙腈溶液继续稀释,配制成 1.00 mg/mL 的内标工作液。

1.2.3 标准溶液的制备 精密吸取 IMP 储备液 40 μL 于 1.5 mL 离心管中,吸取 960 μL 空白血浆,并用

空白血浆进行稀释,分别配制成质量浓度为 0.40、0.80、2.00、8.00、32.00、80.00、160.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准曲线溶液。另取空白血浆适量,加入 IMP 储备溶液,分别配制成质量浓度为 1.00、40.00、180.00 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质控血浆样品。

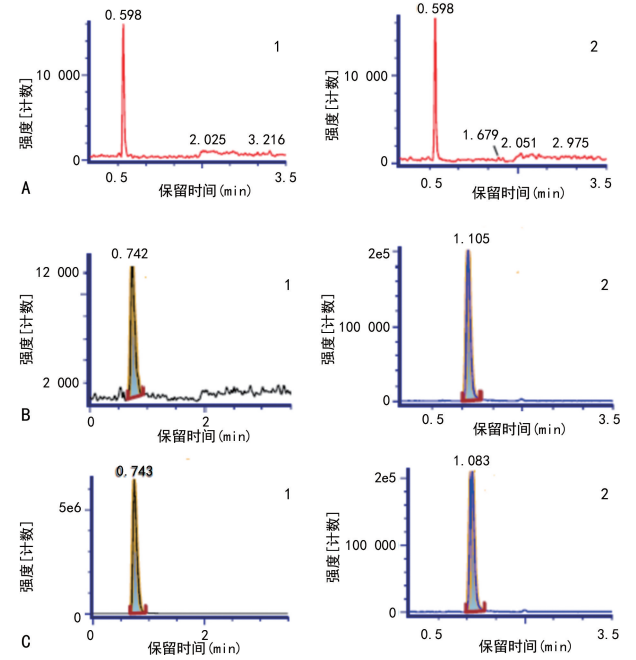
1.2.4 血浆样品处理方法 取 50 μL 血浆样本和 0.50 mol/L MOPS 混合物(2:1,V/V)加入 200 μL 内标工作液(AMX 浓度为 0.20 $\mu\text{g/mL}$,溶剂为 90% 乙腈溶液),充分混合,于 13 000 rpm、5 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后,取上清液 50 μL 与 200 μL 水混匀,进样 1 μL 。

1.2.5 药代动力学研究 筛选 IMP 的给药方案为 1 g,静脉滴注,每隔 8 h(按 IMP 计算)的 ARC 患者,待达到稳态后,分别收集 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 h 的血药浓度数据,采用 DAS3.0 非房室模型计算 IMP 的药代动力学参数。

2 结 果

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性考察 取空白血浆与 MOPS 混合物 50 μL ,加入 200 μL 90% 乙腈溶液,充分混合,按“1.2.4”项下操作,得到空白血浆色谱图(图 2A);另依法操作,得到 IMP 及 AMX 血浆样品色谱图(图 2B);将临床血浆样品依法处理后,得到临床样品色谱图(图 2C)。结果显示,IMP 和 AMX 的保留时间分别为 0.74 min 和 1.10 min,基质对测定无干扰。



注: A. 空白血浆; B. IMP[最低定量限(LLOQ)0.40 $\mu\text{g/mL}$]和 AMX(0.20 $\mu\text{g/mL}$)的血浆样品; C. 给药后 0.5 h 临床血浆样品; 1. IMP; 2. AMX。

图 2 血浆样品 IMP 与 AMX 的色谱图

2.1.2 标准曲线及最低定量限(LLOQ) 按“1.2.3”项下制备的标准曲线溶液,再按“1.2.4”项下方法处

理后检测,进行线性回归得标准曲线。以 UNIFI 1.8.2 软件进行色谱图采集和积分,采用内标法对 IMP 进行定量,以待测物浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值 Y 为纵坐标,用加权($W=1/X^2$)最小二乘法进行回归运算,得线性回归方程即为标准曲线: $Y=0.003\ 02X+0.00\ 637,r^2=0.996\ 3$ 。结果显示,本法定量范围为 0.40~200.00 $\mu\text{g/mL}$,LLOQ 为 0.40 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N>10$)。

2.1.3 精密度和准确度 低、中、高(1.00、40.00、180.00 $\mu\text{g/mL}$)浓度和 LLOQ 血浆样品(0.40 $\mu\text{g/mL}$)的质控血浆样品各 5 份,按“1.2.4”项下方法处理后进行分析,连续进样测定 3 d,计算批内和批间精密度($n=5$),结果见表 1。结果显示,不同浓度 IMP 的精密度及准确度均符合要求。

浓度($\mu\text{g/mL}$)	表 1 IMP 测定方法的准确度和精密度			
	批内($n=5$)		批间($n=5$)	
	准确度 ($\bar{x}\pm s$,%)	RSD (%)	准确度 ($\bar{x}\pm s$,%)	RSD (%)
0.40	91.43 $\pm$ 4.32	4.36	90.12 $\pm$ 9.11	8.61
1.00	92.01 $\pm$ 4.54	4.58	95.81 $\pm$ 4.66	4.95
40.00	99.67 $\pm$ 3.15	2.32	101.70 $\pm$ 4.58	3.22
180.00	103.15 $\pm$ 1.20	1.19	99.25 $\pm$ 2.69	2.71

注:RSD 为相对标准偏差。

2.1.4 基质效应和提取回收率 以低、中、高(1.00、40.00、180.00 $\mu\text{g/mL}$)浓度的质控血浆样品的峰面积/标准溶液样品的峰面积(%)表示基质效应。结果显示,各基质效应小于 15%,符合规定。另取空白血浆和 MOPS 混合物,处理后加入质控血浆样品,以质控血浆样品峰面积/处理后添加样品峰面积(%)表示提取回收率。结果显示,方法的提取回收率在 86.04%~91.96%。结果见表 2。

表 2 IMP 测定方法的基质效应和提取回收率($\bar{x}\pm s,n=5$)		
浓度($\mu\text{g/mL}$)	基质效应(%)	提取回收率(%)
1.00	103.01 $\pm$ 1.86	86.66 $\pm$ 3.12
40.00	104.11 $\pm$ 1.57	87.35 $\pm$ 5.52
180.00	110.02 $\pm$ 1.57	91.63 $\pm$ 5.88

2.1.5 稳定性考察 分别考察低、中、高(1.00、40.00、180.00 $\mu\text{g/mL}$)浓度血浆样品($n=5$)在白光条件下室温放置 3.1 h,常规室温放置 2 h,反复冻融 2 次,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 1 d,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 12、27 d,样品处理后自动进样器放置 18 h、冻融稳定性。结果表明,IMP 在各条件下均较稳定,RSD 均小于 8.4%,符合规定。IMP 全血样品分为稳定剂组和无稳定剂组($n=5$),置于室温和自动进样器(10 $^{\circ}\text{C}$)2、4、8、12、24 h。结果表明,IMP 血浆样品稳定剂组和无稳定性

组在室温条件下分别在 8 h 和 4 h 内稳定,在自动进样器(10 ℃)中分别在 12 h 和 4 h 内稳定。

2.2 体内药代动力学参数结果 8 例患者 IMP 给药后半衰期($t_{1/2}$)为(0.97±0.06)h、曲线下面积(AUC)为(48.49±14.93)mg/(L·h)、表观分布容积为(16.15±7.90)L、CrCl 为(18.30±5.70)L/h、达峰浓度为(15.63±4.60)μg/mL。平均血药浓度-时间曲线见图 3。

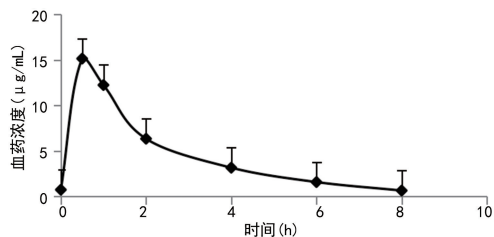


图 3 ARC 患者静脉滴注 IMP 后的平均血药浓度-时间曲线($n=8$)

3 讨 论

3.1 IMP 血药浓度测定方法的选择 目前,关于 IMP 血药浓度测定方法的研究已有报道^[6-12],本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法与已有研究相比,通过改良稳定剂的比例和选择更适宜的内标,在保证 IMP 稳定的前提下,能达到更低的检测限,并降低了检测成本。

3.1.1 稳定剂比例的选择 国内外文献报道显示,IMP 配置成溶液后,在室温下仅能在 4 h 左右稳定,在血浆中的稳定性就更差,且溶液 pH 值对其影响较大^[6-12]。因此,需要加入兼性离子缓冲液来保证其稳定性^[8-10],如 MOPS、2-吗啉基乙磺酸(MES)等。国内外文献报道中多为体液与稳定剂体积比为 1:1^[6,8,12],但稳定剂亦能对色谱柱产生损伤,缩短使用寿命。本研究加入的血浆与稳定剂 MOPS 的体积比进行了筛选和试验,且考察了 IMP 在不同条件下的稳定性,最终确定体积比为 2:1。该比例减少了稳定剂的加入量,既能达到更低的检测限,保证 IMP 稳定性,又能延长色谱柱的使用寿命。

3.1.2 内标的选择 为降低基质效应对测定方法准确度和精密度的影响,有研究报道显示,IMP 常选用美罗培南、法罗培南等及其类似物为内标,但存在价格较贵、可及性不佳等问题^[13]。因此,本实验选择阿莫西林为内标,与 IMP 的绝对基质效应较接近,能减弱基质效应,且价廉易获得,更适用于临床长期开展 IMP 血药浓度监测工作。

3.2 药代动力学特征分析 对 ARC 患者体内药代动力学研究结果显示,与文献报道的健康受试者相比^[14],ARC 患者体内 IMP 的 CrCl 增加,半衰期较前者缩短,表观分布容积增加,血药浓度-时间 AUC 和达峰浓度相差不大。由于 IMP 主要经过肾脏清除,

当患者在 ARC 的特殊病理情况下,IMP 在体内的清除率是明显升高的,半衰期缩短、表观分布容积增大。ARC 患者体内 IMP 的代谢速率和清除率发生变化,从而导致临床治疗失败。对于肾功能减退患者,临床医生为避免药物肾毒性,会关注药物剂量调整,但 ARC 对药物的影响常被忽视。有调查研究表明,仅有 15% 的医生在给予 ARC 患者药物时进行了剂量调整^[15-16],这说明 ARC 患者亟需个体化用药策略的必要性。因此,对于该研究中的 IMP 给药方案为 1 g,静脉滴注,每隔 8 h 的 ARC 患者,应适当增加给药剂量、增加给药频次、延长给药输注时间等方式进行个体化用药调整。根据临床治疗指南和药品说明书,结合 ARC 患者药代动力学特征和血药浓度监测情况,本文建议 IMP 的给药方案可调整为 1 g,静脉滴注,每隔 6 h,每次给药输注时间延长至 1 h,或者 1 g,静脉滴注,每隔 8 h,每次给药输注时间延长至 3 h。IMP 个体化给药策略的研究,能提高药物疗效,同时也降低了不良反应的风险,从而保证患者用药安全性和有效性。

综上所述,本研究建立的 UPLC-MS/MS 法测定 ARC 患者血浆中 IMP 的浓度准确度高、灵敏度强,并获得了 IMP 在 ARC 患者的药代动力学参数,可为进一步开展 IMP 在患者体内药代动力学研究和临床治疗药物浓度监测提供技术支持和参考。

参考文献

- [1] AVEDISSIAN S N, BRADLEY E, ZHANG D N, et al. Augmented renal clearance using Population-Based pharmacokinetic modeling in critically ill pediatric patients[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2017, 18(9): e388-e394.
- [2] CLAUS B O, HOSTE E A, COLPAERT K, et al. Augmented renal clearance is a common finding with worse clinical outcome in critically ill patients receiving antimicrobial therapy[J]. *J Crit Care*, 2013, 28(5): 695-700.
- [3] GATTI M, PEA F. Pharmacokinetic/pharmacodynamic target attainment in critically ill renal patients on antimicrobial usage: Focus on novel beta-lactams and beta lactams/beta-lactamase inhibitors[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2021, 14(5): 583-599.
- [4] 中国医师协会急诊医师分会, 中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. *临床急诊杂志*, 2018, 19(9): 567-588.
- [5] YADAV R, BERGEN P J, ROGERS K E, et al.

Meropenem-tobramycin combination regimens combat carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa in the hollow-fiber infection model simulating augmented renal clearance in critically ill patients[J]. Antimicrob Agents Chemother,2019,64(1):e01679-19.

[6] KULKARNI M V,TICHY A N,PYKA J S,et al. Use of imipenem to detect KPC, NDM, OXA, IMP, and VIM carbapenemase activity from gram-negative rods in 75 min using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol,2014,52(7):2500-2505.

[7] MARTENS L J,BODE S M. Quantification of meropenem inhuman plasma by HILIC-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2017,1(1046):13-17.

[8] 冯章英,邢冬,李斌,等. UPLC-MS/MS 法测定人血浆中亚胺培南浓度[J]. 药物分析杂志,2017,37(11):2076-2081.

[9] 钱敏燕,杨旭萍,蒋振伟,等. LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中亚胺培南浓度及其药动学研究[J]. 药学与临床研究,2023,31(2):119-123.

[10] 王晓雪,陈文清,孔旭东,等. 人血浆中亚胺培南和美罗培南的 UPLC-MS/MS 分析方法建立及治疗药物监测[J]. 中国药学杂志,2018,53(3):218-222.

[11] RAO Z,DANG Z L,LI B,et al. Determination of total and unbound meropenem, imipenem/cilastatin and cefoperazone/sulbactam in human plasma: Application for therapeutic drug monitoring in critically ill patients [J]. Ther Drug Monit,2020,42(4):578-587.

[12] HUANG L,HAAGENSEN J,VEROTTA D, et al. Determination of meropenem in bacterial media by LC-MS/MS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2014,961:71-75.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:466-472.

[14] 曹国颖,孙春华,万一英,等. 健康人静滴泰宁的药代动力学研究[J]. 中国新药杂志,1992,1(6):51-53.

[15] DUNNING J R. Assessment of renal function in dosing antibiotics in septic patients: A survey of current practice within critical care units in England[J]. Anaesthesia,2015,70:21-29.

[16] CARRIÉ C,CHADEFAUX G,SAUVAGE N, et al. Increased β -lactams dosing regimens improve clinical outcome in critically ill patients with augmented renal clearance treated for a first episode of hospital or ventilator-acquired pneumonia: A before and after study [J]. Crit Care,2019,23(1):379-388.

(收稿日期:2024-05-07 修回日期:2024-08-20)

(上接第 3258 页)

among octogenarians with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. Arch Gerontol Geriatr,2022,102:104737.

[24] SANCHIS J,SASTRE C,RUESCAS A,et al. Randomized comparison of exercise intervention versus usual care in older adult patients with frailty after acute myocardial infarction [J]. Am J Med,2021,134(3):383-390.

[25] ERCAN Z,BILEK F,DEMIR C F. The effect of aerobic exercise on Neurofilament light chain and glial Fibrillary acidic protein level in patients with relapsing remitting type multiple sclerosis[J]. Mult Scler Relat Disord,2021 ,55:103219.

[26] VIGORITO C,ABREU A,AMBROSETTI M, et al. Frailty and cardiac rehabilitation: A call to action from the EAPC Cardiac Rehabilitation Section[J]. Eur J Prev Cardiol ,2017,24(6):577-590.

[27] SANZ-CÁNOVAS J, LÓPEZ-SAMPALO A, CO-BOS-PALACIOS L,et al. Management of type 2 diabetes mellitus in elderly patients with frailty and/or sarcopenia[J]. Int J Environ Res Public Health,2022,19(14):8677.

[28] XUE Q L,VARADHAN R. What is missing in the validation of frailty instruments? [J]. J Am Med Dir Assoc,2014,15(2):141-142.

(收稿日期:2024-04-08 修回日期:2024-08-20)