

米卡芬净对厄他培南血浆蛋白结合率的影响

刘秀菊, 董维冲, 马金华, 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 HPLC 测定人血浆中游离厄他培南浓度的方法, 并研究米卡芬净对厄他培南血浆蛋白结合率的影响。方法 用超滤法进行样品处理, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-10 mmol·L⁻¹ 醋酸钠溶液(12.4 : 87.6), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 295 nm, 柱温为 35 °C, 进样量 10 μL。采用超滤法结合 HPLC, 测定未加和加入米卡芬净后厄他培南的人血浆蛋白结合率。结果 游离厄他培南浓度在 2~50 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999$); 低中高浓度厄他培南回收率分别为(102.3±2.5)%, (97.6±3.1)%和(98.6±2.2)%; 日内、日间精密度均<5%。与米卡芬净合用后, 厄他培南血浆蛋白结合率无显著变化。结论 该法可测定厄他培南游离浓度, 方法准确快捷, 灵敏度高。在人血浆中米卡芬净不影响厄他培南的体外蛋白结合率。

关键词: 厄他培南; 米卡芬净; 高效液相色谱法; 游离药物浓度; 蛋白结合率

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)09-1314-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.009

引用本文: 刘秀菊, 董维冲, 马金华, 等. 米卡芬净对厄他培南血浆蛋白结合率的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1314-1316.

Effect of Micafungin on Plasma Protein Binding Rate of Ertapenem

LIU Xiuju, DONG Weichong, MA Jinhua, WU Xia, HE Wenjuan(*The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining the concentration of free ertapenem in human plasma by HPLC. And to study the effect of micafungin on the plasma protein binding rate of ertapenem. **METHODS** Sample processed by ultrafiltration. 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(12.4 : 87.6) at the flow rate of 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 295 nm, column temperature was 35 °C and injection volume was 10 μL. Ultrafiltration was combined with HPLC to determine the plasma protein binding rate of ertapenem after undosing and adding micafungin. **RESULTS** The method was validated over the concentration range of 2-50 μg·mL⁻¹ for ertapenem in human plasma, and there was excellent linearity($r=0.999$). The recovery rates of low, middle, high dose of ertapenem were (102.3±12.5)%, (97.6±3.1)% and (98.6±2.2)%; the intra-day and inter-day RSD were both <5%. The protein binding rate of ertapenem was no significant change in association with micafungin. **CONCLUSION** The method for determining concentration of free ertapenem in plasma is rapid, accurate and sensitive. Micafungin has no effect on the *in vitro* protein binding rate of ertapenem in human plasma.

KEY WORDS: ertapenem; micafungin; HPLC; free drug concentration; plasma protein binding rate

厄他培南是碳青霉烯类抗菌药物, 作为广谱抗菌药物对革兰阳性菌、革兰阴性菌、需氧菌和厌氧菌均有良好的抗菌活性^[1-2]。厄他培南在临床上主要用于除非发酵菌之外的各种敏感细菌引起的复杂性腹腔感染、复杂性皮肤和皮下组织感染、社区获得性肺炎、复杂性尿路感染及急性盆腔感染(包括产后子宫内膜炎、流产相关感染和妇产科术后感染)^[3]。厄他培南血浆蛋白结合率为92%~95%。米卡芬净作为抗真菌药物具有抗菌谱广、抗菌活性强、极少耐药等特点, 主要用于治疗食道念珠菌感染、骨髓移植和患者中性粒细胞减少症的预防治疗^[4]。米卡芬净的血浆蛋白结合率达99.8%^[5]。

重症感染尤其是中性粒细胞缺乏、恶性肿瘤、器官移植术后的感染, 常伴有侵袭性真菌病, 因此广谱抗菌、真菌药物的联合应用通常为临床治疗所必需^[6]。厄他培南与米卡芬净血浆蛋白结合率均较高, 两药合用时可能会影响厄他培南的血浆蛋白结合率, 使厄他培南游离血药浓度升高或降低。目前国内外未见两药合用时血浆蛋白结合率相互影响的研究报道。因此, 本实验考察了米卡芬净对厄他培南血浆蛋白结合率的影响研究。

1 仪器与试剂

E2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Centrifree[®] UFC 501096 离心超滤管(美国 Millipore 公司)。

基金项目: 河北省科技计划项目(162777112D)

作者简介: 刘秀菊, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0311)66002778 E-mail: liuxiujv1@163.com

厄他培南对照品(石家庄中诺药业有限公司, 批号: 181512009, 含量: 97.0%); 米卡芬净对照品(河北三韵生物科技有限公司, 批号: SL20160123; 含量: 99.5%); 人血浆由河北省血液中心提供; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为蒸馏水。

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 160 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用水定容, 配制成浓度为 $16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的厄他培南贮备溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

米卡芬净对照品贮备液: 精密称取米卡芬净对照品 20 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用水定容, 配制成浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的米卡芬净贮备溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 色谱条件 DiamonsiL C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm}\times 150 \text{ mm}$, $5.0 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈- $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液(12.4 : 87.6); 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 295 nm ^[7]; 柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。

2.1.3 血样处理 取血浆样品 0.5 mL 于离心过滤装置中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 0.5 h 后, 该装置放入离心机中, $5\ 000\times g$ 室温离心 20 min , 未滤过的血浆和超滤液均弃掉; 另取同浓度的血浆样品 0.5 mL , 同上操作离心, 收集第 2 次离心的超滤液。取超滤液 $50 \mu\text{L}$ 用于 HPLC 测定。

2.1.4 专属性试验 取空白血浆超滤液、空白血浆超滤液加厄他培南以及空白血浆加厄他培南和米卡芬净按“2.1.3”项下方法处理并按“2.1.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果显示, 在该色谱条件下, 厄他培南峰形良好, 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。

2.1.5 线性试验 取厄他培南对照品储备液适量, 空白血浆超滤液倍比稀释, 得到 $50, 20, 10, 5$ 和 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度的厄他培南对照溶液, 各取 $10 \mu\text{L}$, 进行 HPLC 分析, 所得的峰面积(Y)与相应的浓度(X)做线性回归分析(权重因子 $1/c^2$), 标准曲线方程为 $Y=872.2X-466.3(r=0.999)$ 。结果表明, 厄他培南在 $2\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.1.6 非特异性结合 用蒸馏水配制质量浓度为 $5, 20, 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品, 比较厄他培南超滤前和超滤后的数据, 计算回收率, 评价药物的非特异性结合情况。

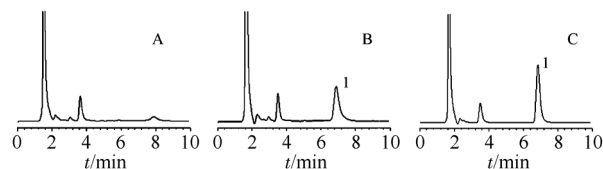


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆超滤液; B-空白血浆超滤液加厄他培南; C-空白血浆加厄他培南和米卡芬净后超滤液; 1-厄他培南。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma ultrafiltrate; B-blank plasma ultrafiltrate spiked with ertapenem; C-blank plasma added with ertapenem and micafungin after ultrafiltration; 1-ertapenem.

取空白血浆配制的质控样品, 用同一超滤管, 重复离心, 收集每次超滤液, 弃去未离心的血浆, 重复 3 次。通过测定每次离心后获得的超滤液浓度, 估计滤膜的吸附情况。

第 1 次超滤时, 由非特异性结合造成的厄他培南吸附损失可达到 $37\%\sim 56\%$; 第 2 次超滤时, 待测物的回收率很高, 对超滤膜的非特异性结合就可以忽略。超滤装置重复离心血浆 2~3 次后, 滤液药物的浓度变化很小。因此, 选择第 2 次离心的超滤液进行测定。

低、中、高 3 种质量浓度厄他培南回收率结果见表 1。

表 1 厄他培南的非特异性结合($n=3$)

Tab. 1 Non-specific binding of ertapenem ($n=3$)

厄他培南质量 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	
	第 1 次超滤	第 2 次超滤
5	36.79 ± 0.99	102.3 ± 2.5
20	48.21 ± 0.44	97.6 ± 3.1
40	55.72 ± 0.49	98.6 ± 2.2

2.1.7 精密度试验 分别取空白血浆超滤液配制低、中、高 3 种质量浓度($5, 20, 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的厄他培南对照溶液, 进行 HPLC 分析, 每种浓度重复 5 份, 记录峰面积, 按标准曲线计算真实浓度。在同一天内的 3 个不同时间点测定, 以所得峰面积计算 3 个浓度的日内精密度, 再连续 3 d 处理并测定, 计算日间精密度。结果, 日内精密度 RSD 分别为 $2.9\%, 2.4\%$ 和 2.5% , 日间精密度 RSD 分别为 $3.0\%, 2.9\%$ 和 2.7% 。

2.1.8 稳定性试验 取 $8\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的厄他培南对照品溶液 $50 \mu\text{L}$, 加入空白血浆 $950 \mu\text{L}$, 涡旋 15 s , 混合均匀, 制备成含有 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 厄他培南的血浆样品。分别将其在冰箱($2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$)内放置 1, 2, 3 h, 然后按“2.1.3”项下方法处理, 进样测定。结果 RSD 分别为 $2.8\%, 3.8\%$ 和 4.5% , 表明上述条件下厄他培南 3 h 内的稳定性良好。

2.1.9 平衡时间考察 配制血浆样品, 分别置于 37 °C 水浴 0.5, 1 和 2 h 后结束实验, 测定超滤液浓度, 计算其血浆蛋白结合率。结果表明, 厄他培南在 37 °C 水浴下 0.5 h 就可以达到平衡。

2.2 米卡芬净对厄他培南蛋白结合率的影响

在 950 μL 空白血浆中加入 2 000, 6 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的厄他培南对照品溶液 50 μL , 涡旋 15 s, 混合均匀, 制备成 100, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的厄他培南血浆样品, 置于 37 °C 水中温浴 0.5 h, 取温浴好的血浆样品 0.5 mL 于离心过滤装置中, 5 000 $\times g$ 室温离心 20 min, 未滤过的气浆和超滤液均弃掉; 另取同浓度的血浆样品 0.5 mL, 同上操作离心, 收集第 2 次离心的超滤液。取超滤液 50 μL 用于 HPLC 测定。代入标准曲线方程计算超滤液中厄他培南浓度, 计算其血浆蛋白结合率: 蛋白结合率= $(\rho_{\text{超滤前}}-\rho_{\text{超滤液}})/\rho_{\text{超滤前}}\times 100\%$ 。式中, $\rho_{\text{超滤前}}$ 为超滤前溶液中厄他培南的质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); $\rho_{\text{超滤液}}$ 为超滤液中厄他培南的质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

按上述方法分别测定加入米卡芬净前后厄他培南的血浆蛋白结合率, 结果见表 2。采用成对 t 检验进行统计分析, 结果显示无显著性差异, 表明米卡芬净对厄他培南的血浆蛋白结合率无显著影响。

表 2 米卡芬净对厄他培南血浆蛋白结合率的影响($n=3$)
Tab. 2 The protein binding rate of ertapenem in association with micafungin($n=3$)

厄他培南质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	对照组(不含米卡芬净)蛋白结合率/%	实验组(含米卡芬净 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)蛋白结合率/%
100	95.61 \pm 0.12	95.28 \pm 0.06
300	85.55 \pm 0.57	85.39 \pm 0.63

3 讨论

研究药物-蛋白结合的传统方法有平衡透析法、超滤法、凝胶过滤法和超速离心法等, 其中前 2 种方法最为常用^[7]。平衡透析法经济实惠, 但透析平衡时间长, 且操作繁琐。超滤法减少了非特异性设备表面的吸附, 缩短了平衡时间, 加速了待测样品的溶解时间, 并且不受稀释效应和体积迁移的影响^[8-10]。

本研究采用人体正常体温 37 °C 为温育温度, 温育 0.5 h 后, 药物即可与蛋白达到结合平衡。超滤时, 应根据样品性质和需要收集的超滤液体积确定超滤速度和时间, 一般超滤速度为 3 000~10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。超滤液与超滤前蛋白质溶液

体积之比不应太大, 否则蛋白质溶液因超滤而过分浓缩, 引起药物与蛋白结合常数变化^[11]。本研究经过多次测试, 确定血浆样品在本实验室离心机经 5 000 $\times g$ 室温离心 20 min 可以满足实验测定的要求。

本研究结果发现, 血浆浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时实验组和对照组的蛋白结合率为 95%左右, 而血浆浓度为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均降为 85%左右。本研究结果表明, 在人血浆中米卡芬净不影响厄他培南的体外蛋白结合率; 血浆中厄他培南血药浓度增高时, 其与蛋白的结合率则减低, 此结果与厄他培南(怡万之)说明书中内容一致。因此, 临床可根据厄他培南总浓度和蛋白结合率水平来确定给药剂量, 从而提高厄他培南的个体化治疗效果。

REFERENCES

- [1] LAI X D, LIU S Q, LIN C. Ertapenem: a new carbapenem [J]. China Pharm(中国药业), 2007, 16(23): 1-3.
- [2] ZHOU Y Q, ZHANG T T, XIE C M, et al. Study of effectivity and safety on ertapenem in the treatment of lower respiratory tract bacterial infection [J]. J Pract Med(实用医学杂志), 2013, 29(1): 110-113.
- [3] DONG Y T, ZHANG Y X. The current development and prospects of carbapenems [J]. Shanghai Med Pharm J(上海医药), 2011, 32(7): 316-319.
- [4] 董涛, 王睿. 新型抗真菌药米卡芬净[J]. 国外医药(抗生素分册), 2006, 27(3): 136-138.
- [5] SUN X M. Drug adverse event analysis combined with drug use [J]. Guide Chin Med(中国医药指南), 2016, 14(18): 298-299.
- [6] 王晓丽, 江锦红, 曲志刚, 等. 米卡芬净治疗老年恶性血液病患者合并侵袭性真菌感染 26 例临床分析[J]. 海峡药学, 2013, 25(6): 103-104.
- [7] TANG Y, ZHU H, ZHANG Y, et al. Determination of human plasma protein binding of baicalin by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(10): 1116-1119.
- [8] YE Y, ZHOU L L, YAN Y L, et al. Determination of plasma protein binding rate of tetramethylpyrazine phosphate by ultrafiltration [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2010, 33(8): 1282-1284.
- [9] HUANG Y, MOU J L, CHEN H, et al. Equilibrium dialysis, ultrafiltration combined with UPLC-ESI-MS/MS to determine the plasma protein binding rate of flavonoids in compound Hongcao freeze-dried powder for injection [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(20): 91-96.
- [10] HAN X Y, WANG W, TAN R Q, et al. Determination of plasma protein binding rate of arctiin and arctigenin with ultrafiltration [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(3): 432-434.
- [11] 曾焯泽. 生物药物分析[M]. 第2版. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 243.

收稿日期: 2017-08-18
(本文责编: 曹粤锋)