

通过某种途径敏化 8-NOChR 诱导凋亡的作用。这与 Ai 等^[3]报道的 8-NOChR 体外作用人胃癌 SGC-7901 细胞的结果相似。

bcl-2 癌基因是一种定位于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上的一种抑癌基因,它通过阻止细胞凋亡的早期环节而发挥作用的,可阻止或降低细胞皱缩、染色质浓缩和 DNA 裂解的发生^[10]。本实验表明:8-NOChR 组和 DDP+8-NOChR 组作用于 COC1 细胞裸鼠移植瘤后,移植瘤生长均受到抑制,细胞均出现凋亡,bcl-2 蛋白表达均降低,但 DDP+8-NOChR 组 bcl-2 蛋白降低的幅度大于 8-NOChR 组,提示 DDP 可能通过某种途径敏化 8-NOChR 诱导凋亡的作用。这与 Ai 等^[3]报道的 8-NOChR 体外作用人胃癌 SGC-7901 细胞的结果相似。

本研究表明,8-NOChR 在抑制肿瘤生长的同时,对裸鼠外周血 WBC 水平和血清 ALT、Cr 和 LDH 值无明显影响,也不影响小鼠体质量,而 DDP 有降低 WBC 的作用和肾毒性,同时使小鼠体质量明显减轻。DDP 联合 8-NOChR 作用于肿瘤细胞后,毒性没有增加,而肿瘤细胞的生长抑制作用却明显的提高,提示 DDP 具有敏化 8-NOChR 抗肿瘤生长作用,两种药物联合在抗肿瘤作用方面表现为协同作用,两种药物联合使用在肿瘤临床治疗方面有广阔的应用前景。但是 DDP 具有敏化 8-NOChR 体内的机制尚无报道,因此,有关 DDP 联合 8-NOChR 体内抗肿瘤作用的机制需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] LIU X H, DONG L, HOU X Y, et al. Enhancement of Aloe polysaccharide on inhibitory effects of cisplatin on growth of lung adenocarcinoma in nude mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(12): 1080-1084.
- [2] SU W, HUANG L, AO Q, et al. Noscaphine sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to inhibition of HIF-1 α [J]. Cancer Lett, 2011, 305(1): 94-99.
- [3] AI X H, ZHENG X, TANG X Q, et al. Induction of apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 cell line by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin *in vitro* [J]. 2007, 13(28): 3824-3828.
- [4] PALEM C R, GANNU R, YAMSANI S K, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of pioglitazone and felodipine in pig serum: application to pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(8): 952-958.
- [5] DALMO J, RUDQVIST N, SPETZ J, et al. Biodistribution of ¹⁷⁷Lu-octreotate and ¹¹¹In-minigastrin in female nude mice transplanted with human medullary thyroid carcinoma GOT2 [J]. Oncol Rep, 2012, 27(1): 174-181.
- [6] HUANG T, GONG W H, LI X C, et al. Induction of apoptosis by a combination of paclitaxel and carboplatin in the presence of hyperthermia [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 81-85.
- [7] NADIN S B, CUELLO-CARRION F D, SOTTILE M L, et al. Effects of hyperthermia on Hsp27 (HSPB1), Hsp72 (HSPA1A) and DNA repair proteins hMLH1 and hMSH2 in human colorectal cancer hMLH1-deficient and hMLH1-proficient cell lines [J]. Int J Hyperthermia, 2012, 28(3): 191-201.
- [8] LU B, XU Y, XU L, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl₄-induced acute liver damage in mice [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(2): 127-135.
- [9] WANG C M, LI H X, ZHANG X F. Effect of artesunate on the expression of caspase-3 in human embryonic lung fibroblasts [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(1): 11-14.
- [10] RÖTHIG A, SCHRECKENBERG R, WEBER K, et al. Effects of nicotine on PTHrP and PTHrP receptor expression in rat coronary endothelial cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(3/4): 485-492.

收稿日期: 2012-06-28

应用 UPLC 研究亚胺培南在大鼠体内的药动学

方洁^a, 张剑萍^b, 张建华^{a*} (上海交通大学附属第六人民医院, a. 儿内科; b. 药剂科, 上海 200233)

摘要: 目的 建立灵敏的超高效液相色谱法测定大鼠血浆中亚胺培南的浓度。方法 血浆样品采用乙腈蛋白沉淀方法, 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈; 以 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠(85%磷酸调 pH 至 7.0)-甲醇(45:55)为流动相; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 检测波长为 295 nm。结果 亚胺培南血药浓度在 0.5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.9997$), 最低检测限为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 日内、日间 RSD 均 $\leq 10\%$, 提取回收率在 80.5%~81.2%之间。6 只 SD 大鼠单剂量口服给予亚胺培南后药动学参数分别为: C_{max} (75.3 $\pm$ 6.2) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ (6.72 $\pm$ 1.58)h; AUC_{0-4} (694.1 $\pm$ 28.3)h· $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ (746.2 $\pm$ 32.9)

作者简介: 方洁, 女, 副主任医师 Tel: (021)64369181 E-mail: fangjiecy@yeah.net
(021)64369181 E-mail: zjh12195@163.com

*通信作者: 张建华, 男, 博士, 主任医师 Tel:

$\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 本方法简便、准确、灵敏、专属性强, 同样适用于人血浆中亚胺培南浓度的测定及其药动学研究, 对于评价亚胺培南疗效和安全性有重要意义。

关键词: 亚胺培南; 超高效液相色谱法; 药动学

中图分类号: R917.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0250-04

A Simple UPLC Method for Determination of Imipenem in Rat Plasma and Its Application in Pharmacokinetic Study

FANG Jie^a, ZHANG Jianping^b, ZHANG Jianhua^{a*} (Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, a. Department of Pediatrics; b. Department of Pharmacy, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The purpose of this study was to develop a simple and sensitive UPLC method to quantify imipenem in plasma. **METHODS** The chromatographic separation was carried out on a Dikma Diamonsil C₁₈ column with a mobile phase consisting of 0.1M Na₂HPO₄ (85% H₃PO₄ adjust to pH 7.0)-methanol (45 : 55) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of column was 35 °C. UV wavelength mode was used, with imipenem monitored at 295 nm. **RESULTS** The calibration was linear in the range of 0.5–100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for imipenem. Inter- and intra-day precision were less than 10% for imipenem, respectively. The recovery was 80.5%–81.2%. The pharmacokinetic parameters were: C_{max} (75.3 ± 6.2) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ (6.72 ± 1.58) h; AUC_{0-4} (694.1 ± 28.3) $\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ (746.2 ± 32.9) $\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** This simple, sensitive, accurate and cost-effective method can be used in routine clinical practice to monitor imipenem concentrations in plasma for patients.

KEY WORDS: imipenem; UPLC; pharmacokinetics

亚胺培南为具有碳青霉烯环的硫霉素类抗菌药^[1-2], 其抗菌作用和稳定性优于硫酶素, 对各种细菌青霉素结合蛋白(PBPs)均显示出良好亲和力, 故其抗菌谱广、抗菌作用强, 但其单独应用时, 在体内稳定性差, 约 80%以上可被肾细胞膜产生的肾脱氢辅酶 I(肾辅酶 I, DHP I)分解破坏^[3-4]。西司他丁是 DHP-I 抑制剂, 其本身无抗菌作用, 但可保护亚胺培南在肾脏免遭破坏, 使其原形药物在尿中回收率提高到 70%~80%。西司他丁还可阻止亚胺培南进入肾小管上皮组织, 减轻其肾毒性, 但对亚胺培南的药动学过程无影响。临床上将亚胺培南和西司他丁钠作为复方制剂使用^[4]。国外已有较多文献报道了亚胺培南的体内测定方法及临床药动学参数^[5-8], 但有些实验方法繁琐, 灵敏度不够, 临床应用略有不足。且目前国内尚少有文献报道其体内研究数据, 因此本文拟建立 UPLC 测定方法用于亚胺培南的体内样品测定, 并在大鼠体内初步研究其药动学参数。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 系列超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); N2000 色谱工作站(浙江大学)。

1.2 药品与试剂

亚胺培南(武汉丰竹化学科技有限公司, 批号: 20110103, 纯度: 99.3%); 内标: 头孢拉啶(上海

阳光试剂有限公司, 批号: 20101107, 纯度: 99.7%); 其他试剂均为分析纯, 水为注射用水。

1.3 动物

SD 大鼠, ♀ ♂ 兼半, 体质量(220 ± 20)g, 由本院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK 沪 2008-0033, 试验前未服用其他药物, 饲养 2 周后进行试验。

2 方法

2.1 标准溶液的配制

2.1.1 亚胺培南贮备液 精密称取亚胺培南标准品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加磷酸缓冲液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的亚胺培南贮备液。

2.1.2 头孢拉啶(内标)贮备液 精密称取索头孢拉啶标准品 0.1 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加磷酸缓冲液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的头孢拉啶贮备液, 置 4℃ 冰箱保存, 备用。

2.2 血浆样品的处理

取血浆 400 μL 置肝素抗凝离心管中, 加 100 μL ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 内标溶液后再加 1 mL 的乙腈溶液, 振荡混合 2 min, $5\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 20 μL 进 UPLC 分析。

2.3 测定方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ (200 mm ×

4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠 (85%磷酸调 pH 至 7.0)-甲醇(45 : 55); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 检测波长为 295 nm。
2.3.2 方法的专属性 在本色谱条件下, 亚胺培

南和内标分离良好, 血浆中杂质不干扰药物与内标的测定。亚胺培南与内标的保留时间分别为 4.1 min 和 6.3 min, 二者的分离度为 2.1, 色谱图见图 1。

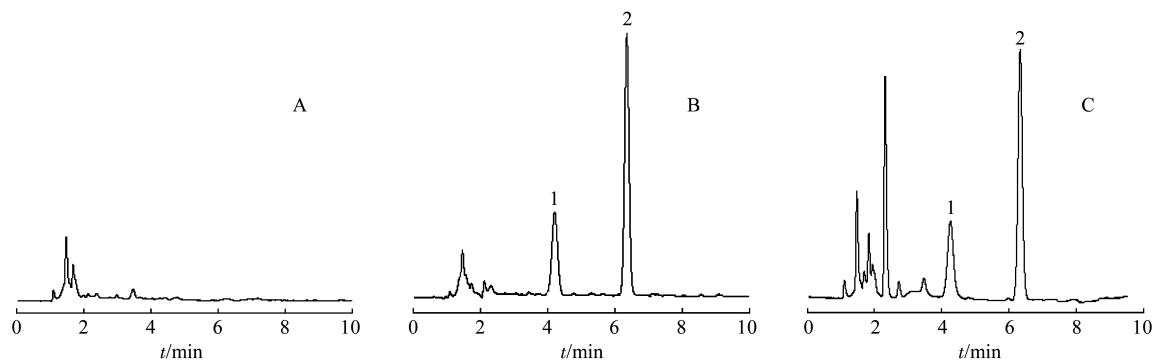


图 1 血浆中亚胺培南色谱图

A-空白血浆; B-标准血浆样品; C-给药后的血浆样品; 1-亚胺培南; 2-内标

Fig 1 Chromatograms of imipenem in plasma

A-blank plasma; B-standard plasma sample; C-plasma sample after dosing; 1-imipenem; 2-internal standard

2.3.3 标准曲线和最低检测浓度 取空白血浆 400 μ L, 准确加入亚胺培南标准液, 使其浓度分别为 0.5, 2, 5, 10, 25, 50, 100 μ g·mL⁻¹, 按“2.2”项下方法操作, 将测得的亚胺培南与内标峰面积比(R)对药物浓度(C)进行直线回归计算(加权系数为 1·c⁻²), 回归方程为 $R=31.22C-0.892(r=0.999\ 7)$, 在 0.5~100 μ g·mL⁻¹ 浓度内呈线性关系, 最低检测浓度为 0.5 μ g·mL⁻¹(S/N=5)。

2.3.4 精密度试验 配制 5, 25, 100 μ g·mL⁻¹ 的标准血样各 5 管, 于同一天按“2.2”项下方法处理后作 UPLC 分析, 计算测定数据的相对标准差,

即为日内精密度。以后连续测定 5 d, 每天测定上述浓度的样品, 计算日间精密度。以标准品对照法测得实测量, 以实测量与加入量之比求算方法回收率; 以血样中亚胺培南的峰面积与相同浓度亚胺培南标准溶液的峰面积的比值求算亚胺培南的提取回收率, 结果见表 1。

2.3.5 样品稳定性 本试验分别考察了亚胺培南血浆样品在-20 $^{\circ}$ C 的冰箱中放置 30 d 后的稳定性, 反复冻融 3 次以及生物样品用重组液重组后室温下保存 24 h 的稳定性。检测结果表明, 血浆中亚胺培南的含量没有发生明显变化, 结果见表 2。

表 1 精密度与回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of recovery and precision($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度/ μ g·mL ⁻¹	日内精密度	RSD/%	日间精密度	RSD/%	方法回收率/%	提取回收率/%
5	4.9 $\pm$ 0.3	6.1	4.8 $\pm$ 0.4	8.3	94.5 $\pm$ 2.4	80.6 $\pm$ 1.1
25	25.3 $\pm$ 1.7	6.7	25.1 $\pm$ 1.6	6.4	93.8 $\pm$ 1.7	81.2 $\pm$ 1.6
100	100.6 $\pm$ 8.5	8.4	101.5 $\pm$ 4.5	4.4	94.1 $\pm$ 2.3	80.5 $\pm$ 2.2

表 2 样品稳定性($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of the stability($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度/ μ g·mL ⁻¹	存放期间		反复冻融		重组液	
	0	第 30 天	冻融前	第 3 次冻融	0 h	第 24 h
5	4.9 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.2
25	25.1 $\pm$ 1.3	24.9 $\pm$ 1.9	24.9 $\pm$ 1.7	25.3 $\pm$ 1.4	25.1 $\pm$ 1.2	25.2 $\pm$ 1.8
100	101.1 $\pm$ 4.5	103.3 $\pm$ 7.5	101.6 $\pm$ 3.5	102.2 $\pm$ 4.5	102.6 $\pm$ 5.3	102.1 $\pm$ 6.1

2.4 统计学处理

用梯形法计算 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}=AUC_{0-t}+C_{tn}/\lambda$, tn 为最后 1 次可测浓度的取样时间, C_{tn} 为测定的最后一点的血药浓度, λ 为末端消除速率常数, $T_{1/2}=0.693/\lambda$ 。其他药动学参数采用 DAS 药动学统计软件计算。

2.5 血浆样品采集

实验按单剂量方案给药。取 6 只 SD 大鼠, 试验前 1 d 禁食 12 h, 试验当天口服给予亚胺培南溶液($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 给药后自由饮水。给药前取空白血, 给药后分别于 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 眼眶取血浆 0.4 mL, 血样分别置涂有肝素的离心管中, 于 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血浆, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

3 结果

3.1 血药浓度

6 只 SD 大鼠单剂量口服给予亚胺培南后体内的平均药-时曲线见图 2。

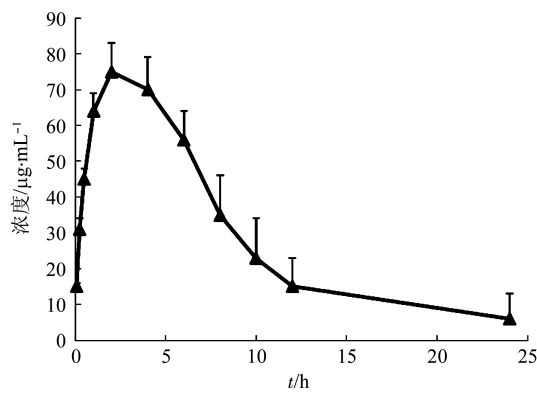


图 2 SD 大鼠单剂量口服给予亚胺培南药-时曲线图
Fig 2 Mean plasma concentration time curve of imipenem after p.o. administration

3.2 药动学参数

6 只 SD 大鼠单剂量口服给予亚胺培南后主要药动学参数见表 3。

表 3 SD 大鼠单剂量口服给予亚胺培南后的主要药动学参数
Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of imipenem after p.o. administration

参 数	实验数值
$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	75.3 ± 6.2
$t_{1/2}/\text{h}$	6.72 ± 1.58
$AUC_{0-t}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	694.1 ± 28.3
$AUC_{0-\infty}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	746.2 ± 32.9

4 讨论

本实验用超高效液相色谱法测定体内亚胺培南的样品浓度, 该方法灵敏、可靠、特异性强, 适用于药动学研究。在建立本定量分析的过程中, 对流动相的配比、比例、以及色谱参数等分析条件进行了优化。如, 对于流动相乙腈水的比例组成, pH 值的调节等, 最终确定此条件下具有良好的色谱行为和快速的出峰时间。此前已有文献报道了亚胺培南的药动学参数^[7-8], 但较局限在临床患者中, 并且是连续服用亚胺培南数天后的药动学参数, 并无单剂量口服亚胺培南的相关药动学参数报道, 因此本文不仅可以提供简便, 灵敏的测定方法, 更为临床用药提供基础实验数据, 以期更好为临床患者用药服务。

REFERENCES

[1] HELLINGER W C, BREWER N S. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam [J]. Mayo Clin Proc, 1999, 74(4): 420-434.

[2] KUO H Y, CHANG K C, KUO J W, et al. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(1): 33-38.

[3] CHASTRE J, WUNDERINK R, PROKOCIMER P, et al. Efficacy and safety of intravenous infusion of doripenem versus imipenem in ventilator-associated pneumonia: a multicenter, randomized study [J]. Crit Care Med, 2008, 36(4): 1089-1096.

[4] CHEN Z, WU J, ZHANG Y, et al. Efficacy and safety of tigecycline monotherapy vs. imipenem/cilastatin in Chinese patients with complicated intra-abdominal infections: a randomized controlled trial [J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 217-227.

[5] BARKER C W, ZHANG W, SANCHEZ S, et al. Pharmacokinetics of imipenem in dogs [J]. Am J Vet Res, 2003, 64(6): 694-699.

[6] HENGZHUANG W, WU H, CIOFU O, et al. *In vivo* pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2683-2690.

[7] FISH D N, TEITELBAUM I, ABRAHAM E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem during continuous renal replacement therapy in critically ill patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2421-2428.

[8] DAILLY E, KERGUERIS M F, PANNIER M, et al. Population pharmacokinetics of imipenem in burn patients [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2003, 17(6): 645-650.

收稿日期: 2012-05-30