

HPLC法测定人血浆中培美曲塞二钠的浓度及其临床应用[△]

刘磊*,王晖,高静[#](徐州医学院附属医院,江苏徐州 221006)

中图分类号 R969.1;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)23-3210-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.23.14

摘要 目的:建立测定人血浆中培美曲塞二钠浓度的方法。方法:血浆样品经强酸沉淀蛋白后采用高效液相色谱法进行测定,色谱柱为 Xterra[®]RP₁₈,流动相为乙腈-50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液(15:85),流速为 1.2 ml/min,检测波长为 225 nm。结果:培美曲塞二钠血药浓度在 1.0~32.0 mg/L 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=5$),提取回收率为 86.35%~87.25%,日内、日间 RSD 均 $\leq 4.21\%$ ($n=5$)。最低血浆检测质量浓度为 0.05 mg/L。血药浓度较高的患者在以后易出现较高的骨髓抑制,出现不良反应的血药浓度为 (18.56 ± 4.50) mg/L,无不良反应的血药浓度为 (14.05 ± 6.72) mg/L,两样本均数经 t 检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义。结论:该方法简便、快速、准确、灵敏,适用于培美曲塞二钠血药浓度监测及人体药动学研究。

关键词 高效液相色谱法;培美曲塞二钠;血药浓度

Determination of Pemetrexed Disodium in Human Plasma by HPLC and Its Application

LIU Lei, WANG Hui, GAO Jing (The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu Xuzhou 221006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for the determination of pemetrexed disodium in human plasma. **METHODS:** The plasma sample was determined by HPLC after protein were precipitated with strong acid. The determination was performed on Xterra[®]RP 18 column with mobile phase consisted of acetonitrile-50 mmol/L sodium dihydrogen phosphate buffer solution (15:85) at the flow rate of 1.2 ml/min. The detection wavelength was set at 225 nm. **RESULTS:** The linear range of pemetrexed disodium were 1.0-32.0 mg/L ($r=0.999\ 9$, $n=5$) with recoveries of 86.35% -87.25%. RSDs of inter-day and intra-day were lower than 4.21% ($n=5$). Minimum detection concentration of plasma was 0.05 mg/L. The patients with high plasma concentration easily suffered from arrest of bone marrow. The plasma concentration was (18.56 ± 4.50) mg/L, which could induce ADR; when the plasma concentration was (14.05 ± 6.72) mg/L, no ADR was found. There was statistical significance after t -test ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** The method is simple, quick, accurate, sensitive and suitable for the plasma concentration determination of pemetrexed disodium and human pharmacokinetics study.

KEYWORDS HPLC; Pemetrexed disodium; Plasma concentration

培美曲塞二钠(Pemetrexed disodium, PEM)是基于经典的抗代谢类药物甲氨蝶呤和氟尿嘧啶基础上研制的新一代抗代谢抗肿瘤药,它作用于叶酸依赖性代谢途径中的多个酶,为多靶点抗叶酸药物,具有较好的临床应用前景^[1-2]。美国 FDA 在 2004 年 2 月批准培美曲塞联合顺铂治疗恶性胸膜间皮瘤,后又陆续批准培美曲塞作为非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)的二线、一线以及维持治疗药物^[3]。PEM 在体内可引起多种毒副作用,最常见的为血液学毒性,主要是中性粒细胞的减少,常为剂量限制性毒性,限制了 PEM 的临床作用。文献报道 PEM 个体代谢差异较大^[4],因此有必要测定 PEM 的血药浓度以制定个体化给药方案,及时调整给药剂量,减少药品不良反应,对于 NSCLC 的治疗具有重要的临床意义。笔者建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定人血浆中 PEM 浓度的方法,用于快速测定患者血浆 PEM 浓度,为临床合理用药提供参考依据。

1 材料

[△] 基金项目:徐州市社会发展科技基金(No.XZZDY1304)

* 副主任中药师。研究方向:医院药学。电话:0516-85807659。

E-mail: 1174519536@qq.com

[#] 通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0516-

85807659。E-mail: dqzu@cumt.edu.cn

1.1 仪器

高效液相色谱(HPLC)仪,包括 1525 型分离系统(含二元梯度洗脱系统,柱温箱等)、717 自动进样器、2487 双波长紫外检测器、Empower 色谱数据工作站(美国 Waters 公司);UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司);Centrifuge 5418R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司,离心半径:5 cm);FA1004B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品、试剂与生物样品

PEM 对照品(江苏豪森药业股份有限公司提供,规格:1 g,批号:36-038CB0910);注射用培美曲塞二钠(江苏豪森药业股份有限公司,规格:0.5 g,批号:D1303011);乙腈、高氯酸等为色谱纯,蒸馏水为本院制剂室制备。健康人空白血浆由本院输血科提供,患者血浆样品由本院肿瘤科提供。

2 方法与结果

2.1 紫外检测波长的确定

取适量 PEM 对照品加水溶解,用流动相稀释后置于紫外-可见分光光度计中,以流动相溶液为空白对照,在 200~400 nm 波长范围内进行光谱扫描,记录紫外吸收光谱图(见图 1)。由图 1 可见,PEM 在 225 nm 波长处有吸收峰,故确定 PEM 的测定波长为 225 nm。

2.2 色谱条件

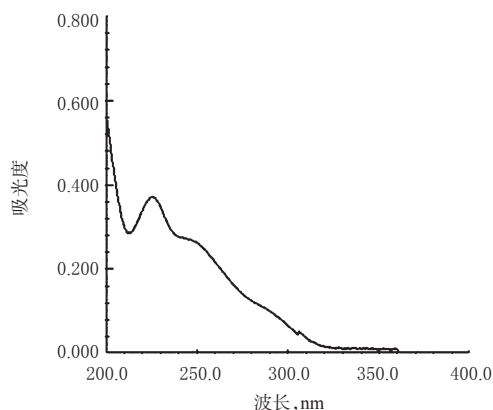


图1 PEM紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectrum of pemetrexed disodium

色谱柱: Xterra®RP₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液(15:85); 流速: 1.2 ml/min; 检测波长: 225 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μl。

2.3 对照品溶液的配制

准确称取PEM对照品50 mg, 用水溶解后移至100 ml量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀, 即得贮备液(500 mg/L)。以贮备液配制成质量浓度分别为10、20、40、80、160、320 mg/L的系列对照品溶液, 贮备液及对照品溶液均置于2~8 ℃冰箱中保存, 备用。

2.4 血浆样品的处理

精密吸取血浆样品200 μl, 加入10%高氯酸100 μl, 涡旋混匀40 s, 3 000 r/min 低温(4 ℃)离心5 min, 取上清液20 μl直接进样, 按外标法以峰面积计算样品含量。

2.5 方法学验证

2.5.1 系统适用性试验 按“2.4”项下方法处理并按“2.2”项色谱条件进样测定空白血浆、加药血浆及患者用药后的血浆样品。结果表明, 血浆中的内源性物质和患者在预处理期间使用的其他药物对PEM的检测无干扰, PEM峰形良好, 理论板数>8 000, 分离度>2.5, 保留时间约为6.8 min。高效液相色谱图见图2。

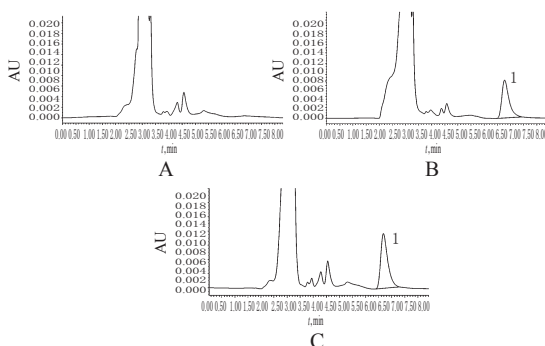


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of pemetrexed disodium

A. 空白血浆; B. 空白血浆+PEM; C. 血浆样品; 1. PEM

A. blank plasma; B. blank plasma+PEM; C. plasma sample; 1. PEM

2.5.2 标准曲线的制备 精密吸取空白血浆180 μl, 分别加入不同质量浓度的PEM对照品溶液20 μl, 旋涡振荡40 s, 制备成PEM质量浓度分别为1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L的系列

混合血样, 每种浓度各5份, 按“2.4”项下方法进行操作及“2.1”项色谱条件进样测定, 记录色谱。以各浓度下PEM峰面积(y)为纵坐标, 对应血药浓度(x)为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y=0.1024x+0.0205$ ($r=0.9999, n=5$)。结果表明, PEM血药浓度在1.0~32.0 mg/L范围内线性关系良好。

2.5.3 最低检测浓度 精密吸取血浆0.5 ml, 加入适量PEM贮备液, 按“2.3”项下方法操作并测定。结果表明, 血浆中PEM最低检测浓度为0.05 mg/L(信噪比为1/3)。

2.5.4 回收率试验 精密吸取空白血浆及对照品贮备液适量, 制备PEM低、中、高(4.0、8.0、16.0 mg/L)梯度浓度的对照品溶液各5份, 按“2.3”项下方法操作, 比较经处理后的加药血浆与未经处理的对照品溶液峰面积, 以前者的峰面积与后者的峰面积之比计算提取回收率, 结果见表1。

表1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

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

理论浓度, mg/L	日内测得浓度, mg/L	日内RSD, %	日间测得浓度, mg/L	日间RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
4.0	4.0±0.35	4.21	4.0±0.33	4.20	86.35±0.74	2.05
8.0	8.0±0.63	4.05	8.0±0.60	4.08	87.25±1.15	2.12
16.0	16.0±0.45	3.52	16.0±0.52	3.60	86.57±0.87	2.08

2.5.5 精密度试验 按照“2.4”项下方法操作制备质量浓度为4.0、8.0、16.0 mg/L的3种溶液重复进样5次, 连续进样5 d, 记录药物峰面积, 以标准曲线方程计算其浓度, 计算方法的日内及日间精密度, 结果见表1。

2.5.6 重复性试验 取同一份血样200 μl, 共6份, 按“2.4”项下方法制备成供试品溶液后进样测定。结果, RSD=3.57%($n=6$), 表明本方法的重复性较好。

2.6 样本测定

为考察PEM血药浓度和不良反应发生的相关性, 2014年1—10月间, 笔者测定了接受PEM治疗的NSCLC患者的血样50份, 所有血样都是在患者静脉滴注药物后约2 h抽血测定血药浓度。PEM主要严重不良反应为骨髓抑制, 尤其是中性粒细胞减少, 且骨髓抑制与剂量呈正相关^[5]。据报道, 培美曲塞骨髓抑制一般出现在用药后6~10 d, 第8~9天最为严重^[6]。因此, 患者用药后临床药师密切监护1~2周, 观察并记录所有发生的不良反应。

50例患者中有10例(20%)出现了不良反应, 其中血液学不良反应(包括贫血、嗜中性粒细胞减少、白细胞减少)5例(10%), 肝功能异常5例(10%), 胃肠道反应7例(14%), 皮肤病学不良反应2(4%)例。血药浓度较高的患者在以后易出现较高的骨髓抑制, 出现不良反应的血药浓度为(18.56±4.50) mg/L, 无不良反应的血药浓度为(14.05±6.72) mg/L, 两样本均数 t 检验, $P<0.05$, 差异有统计学意义。不良反应发生情况见表2。

3 讨论

血样处理方法的选择直接影响HPLC的测定效果。PEM血样处理方法常用的有固相萃取(SPE)法和直接沉淀法, 直接沉淀法更为简便、快捷, 其中沉淀剂的选择至关重要。PEM易溶于水, 难溶于乙腈和甲醇, 所以乙腈和甲醇不能用来沉淀蛋白质, 本试验使用过10%三氯醋酸作为蛋白沉淀剂, 血浆杂质峰较多, 用10%高氯酸沉淀蛋白质, 杂质峰较少, 但可引

表2 不良反应发生情况

Tab 2 Condition of patients with ADR

患者编号	血药浓度,mg/L	不良反应发生的临床表现
1	24.54	严重的骨髓抑制,白细胞最低 $0.8 \times 10^9 L^{-1}$;恶心、呕吐
2	25.57	骨髓抑制,血红蛋白85 g/L;肝功能异常,丙氨酸氨基转移酶 94 U/L;恶心、呕吐
3	14.05	骨髓抑制,血红蛋白92 g/L,白细胞 $1.5 \times 10^9 L^{-1}$;肝功能异常,丙氨酸氨基转移酶 101 U/L
4	25.32	骨髓抑制,白细胞 $1.2 \times 10^9 L^{-1}$,嗜中性粒细胞 $1.3 \times 10^9 L^{-1}$;恶心、呕吐
5	19.47	骨髓抑制,血红蛋白110 g/L;恶心、呕吐
6	22.87	肝功能异常,丙氨酸氨基转移酶 75 U/L
7	9.55	肝功能异常,丙氨酸氨基转移酶 78 U/L
8	15.20	肝功能异常,丙氨酸氨基转移酶 82 U/L;恶心、呕吐
9	20.85	有轻微的恶心想;脸部有干燥感和轻微痒感,前胸出现皮疹
10	12.32	第2天头晕和皮肤痒;轻微的恶心想和呕吐

起基线的漂移,经磷酸二氢钠加入流动相后,基线漂移可得到明显改善,并能够防止强酸对进样器造成腐蚀。试验过程中分别考察并综合比较了甲醇-水、乙腈-水为流动相时的保留时间、分离效果的差别,并参考文献在水相调节pH值用于改善峰形^[7]。经过反复比较,最终发现乙腈-50 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液(15:85)为流动相时,峰形尖锐,保留时间适宜,且与其他杂质分离最好,内源性物质不干扰测定。

据文献报道,PEM血药浓度的测定方法一般采用柱切换技术或液-质联用(LC-MS)法^[8-9],测定成本较高,且操作比较复杂。本试验建立了一种强酸沉淀蛋白后直接测定PEM的简便方法,比较以往发表的文献,此法更加简便、快速、准确和灵敏。这种以紫外(UV)检测器的HPLC方法技术对于测定血浆中微量PEM的测定有很高的准确性和重现性。用简单的预处理步骤和较短的色谱分析时间,可在有限的时间内完成大批量样本血药浓度的测定。

PEM在体内的吸收、分布、代谢和排泄等方面存在着一定的个体差异,由临床患者血药浓度测定结果可以看出更高的血药浓度,预示着PEM有不良反应发生的可能,这与PEM剂量限制性毒性性质相符合。本试验中观察到PEM的不良反应有骨髓抑制、肝功能损害、胃肠道反应和皮肤病学反应。当患者血药浓度在 (18.56 ± 4.50) mg/L范围内,易出现较高的骨髓抑制。在使用PEM治疗过程中,临床药师应密切观察,一旦出

现不良反应,应及时对症处理,以免造成不良后果。因此,为确保临床用药安全,临床应对PEM治疗进行血药浓度监测,实施个体化给药。

参考文献

- [1] Calvert H. An overview of folate metabolism; features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents[J]. *Semi Oncol*, 1999, 26 (Suppl): 3.
- [2] Adjei AA. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed[J]. *Clin Lung Cancer*, 2004, 5 (Suppl 2): S51.
- [3] Bai Y, Duan JL. Pemetrexed alone versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small lung cancer: a systematic review [J]. *China New Drugs*, 2011, 20(9): 1 926.
- [4] Rowinsky EK, Beeram M, Hammond LA, et al. A phase I and pharmacokinetic study of pemetrexed plus irinotecan in patients with advanced solid malignancies[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(2): 532.
- [5] 姚远兵, 王玲, 金桂兰. 培美曲塞的研究进展[J]. *中国药房*, 2008, 19(4): 301.
- [6] 陆丽娟, 谢娟, 严娜萍. 培美曲塞治疗老年晚期非小细胞肺癌患者不良反应的护理[J]. *临床肺科杂志*, 2009, 14(2): 279.
- [7] 顾嘉钦, 朱珺. 反相高效液相色谱法测定培美曲塞的血药浓度[J]. *中国新药与临床杂志*, 2011, 30(10): 782.
- [8] Hamilton CL, Kirkwwood JA. Column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of a thymidylate synthase inhibitor, LY231514, an investigational agent for the treatment of solid tumors, in human plasma[J]. *Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 654(2): 297.
- [9] Mita AC, Sweeney CJ, Baker SD, et al. Phase I and pharmacokinetic study of pemetrexed administered every 3 weeks to advanced cancer patients with normal and impaired renal function[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(4): 552.

(收稿日期: 2014-12-16 修回日期: 2015-06-16)

(编辑: 李劲)

国家卫生和计划生育委员会副主任金小桃出席非洲抗击埃博拉国际大会

本刊讯 2015年7月20-21日,应非盟委员会邀请,国家卫生和计划生育委员会副主任金小桃率中国政府代表团赴赤道几内亚的马拉博出席非洲抗击埃博拉国际大会,并分别在非洲领导人峰会、加强卫生体系专题论坛上发言。

金小桃指出,西非暴发的埃博拉疫情是对西非国家的威胁,同时也是推动非洲公共卫生建设的契机。此次疫情让国际社会充分认识到,既需要帮助非洲国家加强医院、实验室等硬件建设,也需要帮助非洲国家升级公共卫生系统、公共卫生应急管理机制、基层防控体系等软实力。

金小桃表示,2014年西非暴发埃博拉疫情后,中国开展了前所未有的最大规模的卫生援外行动,累计向疫区及周边共13个国家提供了4轮总价值超过1.2亿美元的援助,派遣了

1 200多名医护人员。向塞拉利昂运送了移动生物安全实验室,援建并投入运行了固定生物安全实验室。在利比里亚援建了100张床位的治疗中心。向几内亚、塞拉利昂、利比里亚等国派遣了30余批公共卫生、临床医疗和实验室检测专家组,与当地中国援非医疗队一起参加埃博拉防控。累计完成公共卫生培训12 471人次。中国的援助引领和带动了国际援非抗疫行动,受到非洲国家和国际社会一致高度赞誉。

非盟主席、津巴布韦总统穆加贝主持了非洲领导人峰会。赤道几内亚、塞拉利昂、埃及等非盟成员国元首和政府领导、卫生部长,西非国家经济共同体等国际组织,以及中国、美国、俄罗斯、古巴、欧盟等代表,约500人参加会议。