文章编号:1000-5404(2013)01-0069-04

论著

# 婴幼儿体外循环期间氨甲环酸血液浓度研究

孙国林[1],李生德[2],齐 萍[2],文仁国[1],肖颖彬[1] (400038 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所[1];266011 山东 青岛,青岛儿童医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 研究婴幼儿法洛四联症(tetralogy of fallot,TOF)根治术体外循环(cardiopulmonary bypaass,CPB)期间应用氨甲环酸(tranexamic acid,TA)的血液浓度。**方法** 5例先天性TOF患儿,体质量(7.36±2.08)kg,在开胸前应用TA 100 mg/kg,单次静脉缓慢注射(>10 min),CPB开始前再次注射100 mg/kg。应用磁共振波谱仪($^1$H-NMR)方法,检测不同时间段TA的血液浓度。**结果** CPB开始前(负荷剂量用药后约20 min)、CPB开始后1 h、手术结束时的血液TA浓度分别为(224.61±195.28)、(509.58±181.57)、(243.95±32.30)μg/mL。CPB开始前与CPB开始后1 h及手术结束时TA浓度比较均无统计学差异($P$=0.052、0.83);CPB开始后1 h与手术结束时TA浓度有统计学差异($P$=0.02)。**结论** $^1$H-NMR能够检测出TA的血液浓度。TA大于抑制有高度出血风险可能需要的血液浓度125 μg/mL时,提示可降低剂量。

[关键词] 氨甲环酸;婴幼儿;血药浓度;磁共振波谱仪
[中图法分类号] R654.1; R726.54; R969.11 [文献标志码] A

# Study of plasma concentration of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass in infants with tetralogy of Fallot

Sun Guolin[1], Li Shengde[2], Qi Ping[2], Wen Renguo[1], Xiao Yingbin[1] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Anesthesia, Qingdao Children Hospital, Qingdao, Shandong Province, 266071, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the plasma concentration of tranexamic acid (TA) during cardiopulmonary bypass in infants with tetralogy of Fallot (TOF). **Methods** Five TOF infants with body weight of (7.36±2.08) kg were given an slow intravenous injection of initial dose of TA (100 mg/kg, >10 min) before thoracotomy, following by another 100 mg/kg TA before the initiation of cardiopulmonary bypass (CPB). The concentration of TA was measured in blood plasma using $^1$H-NMR spectroscopy. **Results** Plasma TA concentrations were (224.61±195.28) μg/mL before CPB (at 20 min after TA administration), (509.58±181.57) μg/mL at 60 min after CPB initiation, and (243.95±32.30) μg/mL at the end of operation, respectively. The plasma TA concentration before CPB was not significantly different from that at 60 min after CPB initiation ($P$=0.052) and that at the end of operation ($P$=0.83), but there was significant difference between plasma TA concentration at 60 min after CPB initiation and that at the end of operation ($P$=0.02). **Conclusion** A 100 mg/kg initial dose of TA followed by an infusion of 100 mg/kg before the initiation of CPB is sufficient enough to provide an effective plasma concentration, which is higher than 125 μg/mL for patients with high risk of bleeding, indicating the dose of TA can be decreased.

[**Key words**] tranexamic acid; cardiopulmonary bypass; infant; $^1$H-NMR

Corresponding author: Xiao Yingbin, Tel: 86-23-68755114, E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

氨甲环酸(tranexamic acid,TA)(化学名:对氨甲基环己烷甲酸,分子式$C_8H_{15}NO_2$,相对分子质量157)是人工合成抗纤溶药,能竞争性阻抑纤溶酶原在纤维蛋白上的吸附,保护纤维蛋白不被纤溶酶降解,作用机制与6-氨基己酸相似,但作用更强。体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)后继发出血仍是心内直视术后的严重并发症之一。CPB术中使用TA可有效地

[通信作者] 肖颖彬,电话:(023)68755114,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0913.010.html(2012-11-28)

减少术中和术后失血量,减少患者对血液制品的需求量,已得到众多学者[1-4]的认同并在临床常规应用。TA的剂量和给药方式尚无统一定论。尽管TA不良反应少,也无研究表明不良反应随剂量增加而增加,但目前尚少该药的小儿药代动力学研究[1]。我们应用一维氢磁共振波谱仪($^1$H-NMR),检测婴幼儿法洛四联症(tetralogy of fallot,TOF)CPB期间应用TA的血液浓度。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

患儿5例,男性3例,女性2例,年龄4~17(11.0±6.3)个月,体质量4.5~9.0(7.36±2.08)kg。术前血氧饱和度90%~95%。均采用胸部正中切口,在全麻低温(28~30 ℃)CPB下行经典TOF根治术。经主动脉根部灌注冷血高钾停搏液,心脏表面置冰屑行心肌保护。同期纠治合并的房间隔缺损3例。术后常规应用多巴胺、硝酸甘油等血管活性药物。CPB时间(106±16) min,主动脉阻断时间(67±13)min,开胸至CPB前时间(30±5)min,关胸时间(30±12)min,总手术时间(165±22)min,均存活。在开胸前应用TA 100 mg/kg,单次静脉缓慢注射(>10 min),CPB开始前再次注射100 mg/kg。采集CPB开始前(负荷剂量用药后约20 min)、CPB后1 h、手术结束时的血液3 mL,分别3 000 r/min离心10 min后,取血清置于-20 ℃冰箱保存。本研究得到第三军医大学新桥医院伦理委员会批准,并得到患者家属签字同意。

### 1.2 研究方法

1.2.1 仪器与试剂 德国Bruker Avance Ⅲ 600 MHz超导核磁共振波谱仪,配三共振反式超低温探头。离心机德国Eppendorf MiniSpin Plus。强生VITROS 350全自动干生化分析仪。重水美国NORELL公司,99.8%;$K_2HPO_4$,$NaH_2PO_4$,为广东光华化学厂有限公司产品。

1.2.2 1D $^1$H-NMR谱 血样样品准备:溶液配制:0.9%氯化钠粉末,50%重水,50%双蒸水。配制核磁管内TA浓度分别为0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL的血样标本,用于制作TA的标准曲线。

取TA(10 mg/mL)6、30、60、90、120 μL,生理盐水分别为182、158、128、98、68 μL,分别加入同一志愿者血清200 μL(葡萄糖浓度6.52 mmol/L),重水200 μL,1.5 mol/L钠钾盐缓冲液12 μL加入1.5 mL Ep管中(缓冲液终浓度为30 mmol/L),4 ℃,10 000 r/min,10 min离心取上清约550 μL,置于5 mm核磁管中采集图谱。

血样配制:取血样200 μL,生理盐水重水388 μL,1.5 mol/L钠钾盐缓冲液12 μL加入1.5 mL Ep管中(缓冲液终浓度为30 mmol/L),4 ℃,10 000 r/min,10 min离心取上清约550 μL,置于5 mm核磁管中进行采集图谱。血样定标用α-Glu信号(峰谷定标5.23 ppm,低场峰尖定标5.233 ppm)。

1D谱重要采样参数:Cart-Purcell. Meiboom-Gill序列:采样点数TD=32K,SW=10 ppm,重复扫描次数NS=64,虚拟扫描次数DS=8,延迟时间D1=2 s,D20=350 μs,循环计数L4=100(2 nt=70 ms)。其余采样参数如90度脉宽值(P1)及其所对应的功率值(PL1),压水功率值(PL9),压水频率(O1),增益值(RG)根据具体样品进行测定,P1值以接近10 μs为佳。重要处理参数:谱宽SI=64 K,WDW EM,LB=1 Hz,PH_mod pk,Tdeff=0。

1.2.3 TA定量峰的选择和含量计算 采用NMR进行定量时应首先对样品的各个质子峰进行归属,明确每个质子峰所对应的质子数,选2.86~2.89 ppm含2个氢质子的双峰用于定量。测定样品和内标选定峰(α-Glu)峰面积的相对比值,按外标法计算含量。

外标法方法:将某组分的标准品制成一系列不同浓度的标准液,进行NMR测定。以所得图谱中某一指定基团上质子引起的峰面积对浓度作图,得标准曲线。再在平行条件下测得样品溶液该指定基团上质子的峰面积,代入标准曲线即得样品溶液浓度。

1.2.4 每个血样的葡萄糖含量 用干化学法测定。

### 1.3 统计学方法

数据处理采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较进行配对$t$检验。

## 2 结果

TA的谱图特征如表1。TA纯品(10 μg/mL)$^1$H-NMR谱图如图1所示。TA谱图可见到6个峰。核磁管内浓度100 μg/mL TA谱图如图2所示。CPB 1 h血液$^1$H-NMR谱图如图3所示。在图1、2中1.015~1.10 ppm、1.32~1.41 ppm、1.62~1.68 ppm、1.81~1.86 ppm、1.916~1.966 ppm、2.097~2.157 ppm,受到体内小分子如亮氨酸、乳酸、赖氨酸、γ-氨基丁酸等影响较大,所以选择2.86~2.89 ppm (d)作为定量峰。核磁管内TA浓度(μg/mL)$Y=0.057\ 6X-0.009\ 3$,$R^2=0.998$。X代表2.86~2.89 ppm含2个氢质子的双峰,与α-Glu内标峰峰面积的相对比值。应用制作标准曲线的血样葡萄糖含量是6.52 mmol/L。因此测定样品和内标选定峰峰面积的相对比值,需要进行校正,即葡萄糖浓度(mmol/L)/6.52。体内血清TA的浓度(μg/mL):$Y=[0.057\ 6\times C/6.52-0.009\ 3]\times 3=0.026\ 5\times C-0.027\ 9$[C为样本葡萄糖浓度(mmol/L)]。

不同时间段血液TA浓度见表2。CPB开始前(负荷剂量用药后约20 min)与CPB开始后1 h血药浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$);CPB开始前与手术结束时血药浓度比较,差异没有统计学意义($P=0.83$);CPB开始后1 h与手术结束时的血液TA浓度比较,差异有统计学意义($P=0.02$)。提示手术结束时血药浓度可以维持CPB开始前水平。

**表1 TA谱图特征**

| 化学位移(ppm) | 峰型 | 质子数 | 归属 |
|---|---|---|---|
| 1.015~1.100 | (qd) | 2 | 4,6-H |
| 1.320~1.410 | (qd) | 2 | 31,71-H |
| 1.620~1.680 | (m) | 1 | 5-H |
| 1.810~1.860 | (dd) | 2 | 41,61-H |
| 1.916~1.966 | (dd) | 2 | 3,7-H |
| 2.097~2.157 | (tt) | 1 | 2-H |
| 2.860~2.890 | (d) | 2 | 8-H |

**表 2 不同时间患儿血液 TA 浓度($\bar{x} \pm s$)**

| 时间 | 血清葡萄糖浓度(mmol/L) | TA/葡萄糖峰面积 | 血清 TA 浓度(μg/mL) |
|---|---|---|---|
| CPB 开始前 | 5.16 ±0.26 | 1.63 ±1.43 | 224.61 ±195.28 |
| CPB 后 1 h | 9.43 ±1.50[a] | 2.00 ±0.59 | 509.58 ±181.57 |
| 手术结束时 | 10.43 ±1.64[a] | 0.89 ±0.11[b] | 243.95 ±32.30[b] |

a:$P<0.05$,与 CPB 开始前比较;b:$P<0.05$,与 CPB 后 1 h 比较

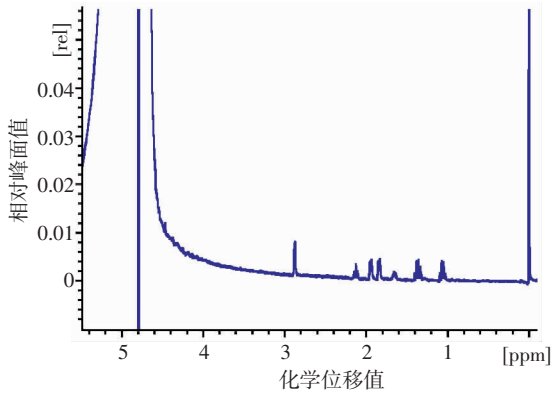



**图 1 氨甲环酸纯品(10 μg/mL)的$^1$H-NMR 谱图(DSS 定标)**

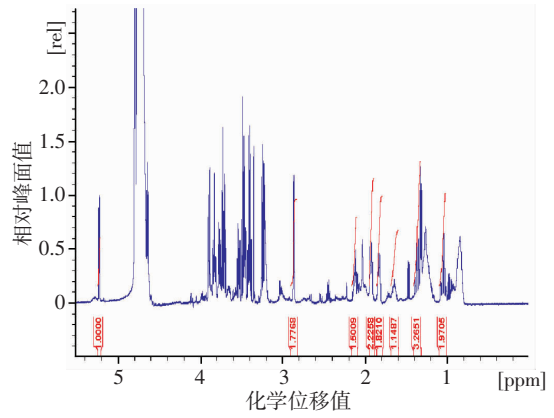



**图 2 核磁管内浓度 100 μg/mL TA 谱图**

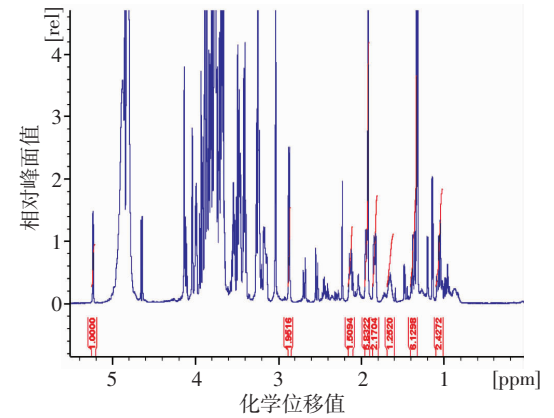



**图 3 体外循环 1 h 血液$^1$H-NMR 谱图**

## 3 讨论

本研究应用$^1$H-NMR 检测 TA 的血液浓度,并研究低体质量(<10 kg)婴幼儿法洛四联症体外循环期间的血液浓度。药物核磁共振定量分析在我国已见诸多篇报道[5-7],美、英、欧等国家和地区药典中都已先后引入了核磁共振定量分析方法。药物定量分析应用核磁共振方法已成趋势,这是因为核磁共振定量分析是以结构分析为基础的分析方法,在进行定量分析之前,必须进行药物的鉴定。与其他光谱方法相同,NMR 定量分析是通过比较不同的吸收峰强度实现的。在进行 NMR 定量分析时,对于确定的核(如质子),其信号强度与产生该信号的核(如质子)的数目成正比,而与核的化学性质无关,故一般只要对该化合物中某一基团上质子引起的峰面积进行比较,即可求出其绝对含量[6]。

当分析混合物时,利用内标法或相对比较法分析混合物中某一化合物时,无需该化合物的纯品作为对照标品。选择的内标应具有较高的纯度;含有多个质子,并在 NMR 图谱中表现为尖锐单峰;吸收峰与所测的样品峰之间应避免干扰。定量峰的选择采用 NMR 进行定量时应首先对样品的各个质子峰进行归属,明确每个质子峰所对应的质子数,并首选含多个氢质子的单峰用于定量。

内标法只要找一合适的内标物进行比较就可求出其绝对含量;而采用各个组分的各自指定基团上质子产生的吸收峰强度进行相对比较,便可求得其相对含量。样品的绝对重量(Wx)由下式求得:Wx = Ws × (Ax/As) × (E/Es),式中,Ws 为内标物质量,Ax 为样品峰面积,As 为内标物峰面积,E 为样品在该化学位移处的质子当量,即 E = 样品相对分子质量/产生该共振峰的基团中的质子数;Es 为内标物在该化学位移处的质子当量,即 Es = 内标物相对分子质量/产生该共振峰的基团中的质子数[6]。

用$^1$H 谱进行体液测定时,药物代谢物的浓度应高于检测界限(10 ~ 100 μmol/L),一般要求约为 50 mmol/L,所需样品约为 0.3 mL(5 mL 测试管)[7]。本次$^1$H 谱可以检测出 10 μg/mL 的 TA 纯品。用核磁共振仪对生物样品进行检测时存在灵敏度低的问题,主要不是由仪器本身带来的,而主要是“化学噪音”造成的。生物样品中在检测限度以上的化合物有几百个,如各种内源性小分子、大分子物质,药物和药物代谢产物。它们的信号共同构成了不规则的基线。尤其在尿液和血浆中产生的“化学噪音”比真正的“仪器噪音”大 10 ~ 100 倍。为了解决这一问题,早期主要使用高分辨核磁共振仪,由于它有较好的灵敏度,信号分散,使图谱容易解析。

影响 NMR 定量测定准确性的关键在于对选定质子峰的准确积分[7]。为保证积分结果的准确,测定中

样品浓度要适宜,使样品峰面积与内标峰面积相差不大,以减少测定误差。此外还应注意:测定前仪器应多次匀场,以保证磁场均匀;吸收峰应进行相位校正,使之呈吸收型正态分布,减少色散型信号对积分结果的影响;可采用不旋转样品管来避免旋转边带峰的产生;图谱基线应平直,积分时应进行基线校正,积分曲线两端应水平;对每一信号进行多次(不少于5次)积分,取平均值或去掉极值后取平均值进行计算,以提高积分的准确性和重现性;测定相对峰面积比时,将参比峰面积设定成较大的数值,以提高计算精度。影响核磁图谱的因素很多,如果发现吸收峰不符合上述要求,计算时应舍去不用。采用外标法定量时应尽量保证操作条件如磁场强度、样品管内径、样品配制方法和浓度、实验温度等一致,并采用母核上相同位置的氢来计算;采用同一种溶剂,可避免因在不同的溶剂中各原子核弛豫时间的不同而引入的定量误差。

先心紫绀患儿由于术前凝血功能障碍,术后出血问题更显突出。抑肽酶和TA是先心体外循环术中主要的抗纤溶药物。TA难以达到和维持治疗浓度,有必要监测TA应用中的血液/血浆浓度[8]。目前测定TA的方法有高效液相色谱法[9-10]等。由于TA没有发色团或荧光团,这些方法需要对样本进行入柱前后的衍生化;样本准备耗时、复杂。本法无需衍生化,可直接测定,操作较为方便。

TA是人工合成的赖氨酸同类物,通过竞争纤溶酶赖氨酸结合点防止纤溶酶形成。最近的研究还发现,TA和抑肽酶引起小儿术后肾功能障碍发生率均高达10%。另外,TA引起患儿术后抽搐的比例略高于抑肽酶,其机制可能包括血管收缩造成脑血流减少、拮抗GABA受体效应及术中微栓等多因素协同作用[12]。引起临床对该类药物安全性问题的重视,尤其在儿童研究领域。

儿童应用TA的研究显示TA有效剂量为30~300 mg/kg[13-14],对于出血风险较高的复杂先心病患儿采用较高的TA剂量以达到有效止血。我们采用的TA总剂量200 mg/kg,在有效剂量范围内。体内外研究表明,TA抑制纤溶的有效血液浓度为10~15 μg/mL。成人TA药动学研究显示,对于高度出血倾向患者,为使TA得血药浓度达到125 μg/mL,推荐负荷剂量30、2 mg/kg加入预充液,维持量16 mg/(kg·h)[8]。在CPB术中,根据药代动力学及使用最小有效剂量的科学用药原则,小剂量一次性给TA可以避免大剂量给药可能导致的不良反应及并发症,相对来说是安全有效的。我们认为在婴儿法洛四联症根治术中应用氨甲环酸总量200 mg/kg,减少术后出血效果显著并且也是安全的。

**志谢** 感谢青岛新能源研究所张景涛博士、黄少华博士、杨盈硕士在实验以及数据处理中给予的帮助

## 参考文献:

[1] 王丽红, 钟慧, 邓萌, 等. 氨甲环酸在婴儿先心手术中的应用[J]. 中国临床医学, 2010, 17(1): 123-125.

[2] Nuttall G A, Oliver W C, Ereth M H, *et al*. Comparison of blood-conservation strategies in cardiac surgery patients at high risk for bleeding[J]. Anesthesiology, 2000, 92(3): 674-682.

[3] Abul-Azm A, Abdullah K M. Effect of topical tranexamic acid in open heart surgery[J]. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23(5): 380-384.

[4] 王玉华. 围术期应用氨甲环酸有效减少心脏手术后渗血[J]. 临床麻醉学杂志, 2002, 18(9): 495.

[5] 刘英, 胡昌勤. 核磁共振在抗生素药物定量分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(6): 447-452.

[6] 王强, 汪茂田, 张志权. 核磁共振法定量测定替米考星含量[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 101-103.

[7] 胡敏, 胡昌勤, 刘文英. 核磁共振波谱法测定药物基准物质的绝对含量[J]. 分析化学, 2004, 32(4): 451-455.

[8] Dowd N P, Karski J M, Cheng D C, *et al*. Pharmacokinetics of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass[J]. Anesthesiology, 2002, 97(2): 390-399.

[9] 郑金凤, 朱迎军, 黄莉. 高效液相色谱法测定氨甲环酸片的溶出度[J]. 中南药学, 2009, 7(4): 280-282.

[10] Chang Q, Yin O Q, Chow M S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of tranexamic acid in human plasma[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 805(2): 275-280.

[11] Grassin-Delyle S, Abe E, Batisse A, *et al*. A validated assay for the quantitative analysis of tranexamic acid in human serum by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(5/6): 438-443.

[12] Martin K, Wiesner G, Breuer T, *et al*. The risks of aprotinin and tranexamic acid in cardiac surgery: a one-year follow-up of 1188 consecutive patients[J]. Anesth Analg, 2008, 107(6): 1783-1790.

[13] Chauhan S, Bisoi A, Kumar N, *et al*. Dose comparison of tranexamic acid in pediatric cardiac surgery[J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2004, 12(2): 121-124.

[14] Williams G D, Bratton S L, Ramamoorthy C. Factors associated with blood loss and blood product transfusions: a multivariate analysis in children after open-heart surgery[J]. Anesth Analg, 1999, 89(1): 57-64.

(**收稿**:2012-07-06;**修回**:2012-09-15)

(编辑 张 维)