婴幼儿体外循环期间尿液氨甲环酸浓度的研究

文仁国[1],齐 萍[2],彭晓波[1],马瑞岩[1],孙国林[1] (1. 第三军医大学新桥医院心外科,重庆 400037;2. 青岛儿童医院麻醉科,山东 青岛 266011)

[摘 要] **目的** 应用核磁共振波谱研究婴幼儿法洛四联症根治术体外循环期间尿液氨甲环酸浓度及排泄率。**方法** 5 例先天性法洛四联症患儿,年龄(11 ± 6.3)月,体质量(7.36 ± 2.08)kg,在开胸前应用氨甲环酸 100 mg/kg,单次静脉缓慢注射(注射时间 10 min 以上),体外循环开始前再次注射 100 mg/kg。应用核磁共振波谱方法,检测不同时间段尿液氨甲环酸浓度。**结果** 体外循环开始前、体外循环期间、关胸期间的尿液氨甲环酸浓度分别为(5.03 ± 2.93)、(4.85 ± 2.68)、(3.48 ± 2.24)mg/mL。体外循环开始前、体外循环期间、关胸期间氨甲环酸量分别为(199.7 ± 142.1)、(341.6 ± 302.3)、(400.1 ± 357.0)mg。至手术结束(用药后约 3 h)氨甲环酸排泄量为(57.48 ± 19.66)%。体外循环开始前排泄率为(6.5 ± 4.8)mg/min,体外循环期间排泄率为(4.5 ± 4.9)mg/min,关胸期间排泄率为(13.1 ± 9.6)mg/min,总排泄率为(6.2 ± 3.4)mg/min,各时间段均无显著性差异,$P > 0.05$。氨甲环酸在 0.03 ~ 6.0 mg/mL 具有良好的线性关系($r = 0.996$);平均回收率为 99.6%,相对标准差为 0.39%($n = 6$)。**结论** 核磁共振波谱能够检测出尿液氨甲环酸的浓度。该法灵敏、准确、迅速、重复性好、尿样品处理方法简单。

[关键词] 氨甲环酸;婴幼儿;核磁共振波谱;尿液;体外循环

[中图分类号] R654.1;R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)05-0472-03

Urine concentration of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass in infants

WEN Ren-guo, QI Ping, PENG Xiao-bo, MA Rui-yan, SUN Guo-lin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the urine concentration of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass in infants with tetralogy of Fallot detected by ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectrum. **Methods** Five infants with tetralogy of Fallot injected slowly with an initial dose of 100 mg/kg of tranexamic acid by the intravenous route for over 10 minutes and received another dose of 100 mg/kg tranexamic acid before the initiation of cardiopulmonary bypass. Tranexamic acid in urine was measured by ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectrum. **Results** Urine tranexamic acid concentrations before cardiopulmonary bypass, during cardiopulmonary bypass and sternal closure were respectively (5.03 ± 2.93) mg/mL, (4.85 ± 2.68) mg/mL, (3.48 ± 2.24) mg/mL. Total volume of tranexamic acid in urine before cardiopulmonary bypass, during cardiopulmonary bypass and sternal closure were respectively (199.7 ± 142.1) mg, (341.6 ± 302.3) mg, (400.1 ± 357.0) mg. The rate of tranexamic acid excretion were (57.48 ± 19.66)% by the end of operation. The excretion rate of tranexamic acid before cardiopulmonary bypass, during cardiopulmonary bypass and sternal closure were respectively (6.5 ± 4.8) mg/min, (4.5 ± 4.9) mg/min, (13.1 ± 9.6) mg/min . The total excretion rate was (6.2 ± 3.4) mg/min . There was a linear relationship when volume of tranexamic acid was 0.03 ~ 6.0 mg/mL ($r = 0.996$). The average recovery rate was 99.6%, relative standard deviation was 0.39% ($n = 6$). **Conclusion** This is an accurate, sensitive, specific and convenient method, which can be used for the determination of tranexamic acid in urine.

Keywords: tranexamic acid; infant; ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectrum; urine; cardiopulmonary bypass

法乐氏四联症根治术是当今外科手术中较复杂、危重系数较高的一类手术[1]。随着外科和体外循环技术的发展,手术死亡率越来越低,然而,体外循环术后渗血并发症时有发生。为了减少出血和大量异体血输入带给患者的危害,在体外循环过程中采取一系列血液保护措施[2],尽量减少血液中有效成分的丢失和功能的降低[3]。血液保护是外科发展的必然要求,如何减少术中出血及输血,防止输血传播性疾病及输血反应对机体的危害日益为医师所关注。体外循环术中使用氨甲环酸可有效地减少术中和术后失血量,减少患者对血液制品的需求量,已得到众多学者的认同并在临床常规应用[4-7]。目前,国际上儿童先心病患者,特别是体质量低于 10 kg 的先心病患儿,心脏手术中使用氨甲环酸的有效剂量和给药方式尚无统一标准。尽管氨甲环酸不良反应少,也无研究表明不良反应随剂量增加而增加,但目前尚无该药的小儿药代动力学研究[4]。本研究(经过第三军医大学新桥医院伦理委员会批准)应用一维氢核磁共振波谱仪,检测婴幼儿法洛四联症手术期间应用氨甲环酸的尿液浓度,

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201305004

[通讯作者] 孙国林,E-mail:sunguolin2005@163.com

[收稿日期] 2013-03-26 [修回日期] 2013-04-10

计算氨甲环酸的排泄率。为该检测方法的应用及小儿氨甲环酸的用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

5 例患儿,男性 3 例,女性 2 例。平均年龄(11 ±6.2)月,体质量 4.5 ~9.0 kg,平均(7.35 ±2.07)kg。均采用胸部正中切口,在全麻低温 28 ~30 ℃体外循环下行经典法洛四联症根治术。体外循环时间(107 ±156)min,开胸至体外循环前时间(30 ±4)min,关胸时间(31 ±11)min,总手术时间(166 ±23)min,均存活。在开胸前应用氨甲环酸 100 mg/kg,单次静脉缓慢注射(注射时间超过 10 min),体外循环开始前再次注射 100 mg/kg。收集每个时间段全部尿液并准确记录该时间段的总尿量,分别取各时间段尿液 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后,置于 -20 ℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 德国 Eppendorf MiniSpin Plus 离心机,德国 Bruker Avance Ⅲ 600MHz 超导核磁共振波谱仪,配三共振反式超低温探头。氨甲环酸注射液(0.1 g/mL)为日本一三株式会社产品(生产批号 JYA0268);重水(99.8%)为美国 NORELL 公司产品;DSS(2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid)为青岛腾龙微波科技有限公司进口分装;K_2HPO_4、NaH_2PO_4 为广东光华化学有限公司产品。

1.2.2 一维^{1}氢 - 核磁共振波谱 配制尿液样品时,尿样经 12 000 r/min 离心 10 min,取 500 μl 尿样,加入 250 μl 磷酸缓冲液(0.1 mol/L K_2HPO_4/NaH_2PO_4,pH = 7.4,30% D_2O)混合,以消除因 pH 变化所引起谱图化学位移漂移,静置 10 min,离心 10 min 后,取上层液 500 μl 移入直径 5 mm 核磁共振波谱仪样品管,采集图谱。参照 DSS 作为化学位移内标,对^{1}氢 - 核磁共振波谱仪谱的化学位移进行定标。核磁共振波谱仪样品管内 DSS 浓度 40 μg/mL。一维氢谱重要采样参数,CPMG:TD = 32 K,SW = 20 ppm,NS = 64,DS = 4,D1 = 2 s,D20 = 350 μs,L4 = 100(2nt = 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:SI = 64 K,WDW EM,LB = 1 Hz,PH_mod pk,Tdeff = 0。

1.3 定量峰的选择

采用核磁共振波谱仪进行定量时应首先对样品的各个质子峰进行归属,确定每个质子峰所对应的质子数。选 2.835 ~ 2.875 ppm 含 2 个氢质子的双峰用于定量。测定选定峰与 DSS 峰峰面积的相对比值,计算含量。样品的绝对含量(Wx)由下式计算:$Wx = Ws(Ax/As)(E/Es)$。其中 Ws 为内标物含量,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 = 样品分子量/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 = 内标物分子量/产生该共振峰的基团中的质子数。

1.4 统计学方法

所测得浓度乘以该时间段尿样体积得该时间段内排泄量,再除以时间间隔,计算出排泄率。数据处理采用 SPSS 13.0 软件,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间进行 t 检验,$P < 0.05$ 为有显著性差异。

1.5 方法学确证

1.5.1 方法的专属性 按前述一维^{1}氢 - 核磁共振波谱条件测定氨甲环酸纯品(10 μg/mL)谱图见图 1。不同时间段尿样谱图见图 2。

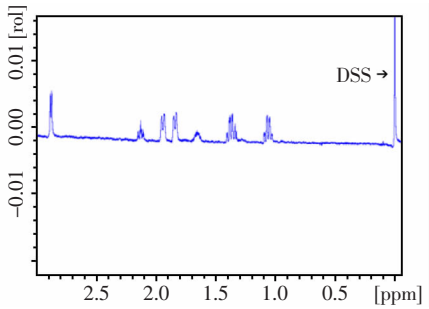
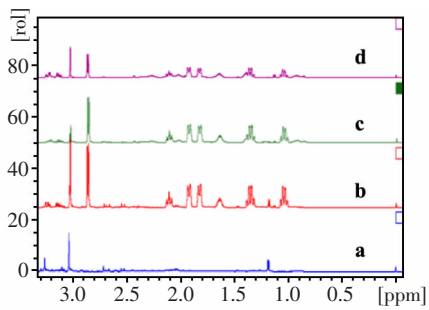


图 1 氨甲环酸纯品(10 μg/mL)^{1}H - 核磁共振波谱图



a:用药前;b:体外循环开始前;c:体外循环期间;d:关胸期间

图 2 不同时间段尿液^{1}H - 核磁共振波谱图

1.5.2 标准曲线的制备和定量下限的确定 取空白尿样 5 mL,分别置含氨甲环酸系列标准溶液的离心管中,制成相当于核磁管内氨甲环酸浓度为 0.3、0.8、1.0、1.5、2.0、6.0 mg/mL 的标准尿样,按前述一维^{1}氢 - 核磁共振波谱方法操作,进行每一浓度检测,记录谱图,以氨甲环酸浓度为横坐标(x),待测物(氨甲环酸)与 DSS(40 μg/mL)的峰面积比值(A/A.)为纵坐标(y),用加权最小二乘法(权重系数:$1/x^2$)进行线性回归运算,求得的线性回归方程即为标准曲线方程:$y = 6.9065x + 0.2103$,$r = 0.996$。

1.5.3 精密度实验 取适量的氨甲环酸样品,按照前述一维^{1}氢 - 核磁共振波谱方法制备供试品溶液,质量浓度为 1.0 mg/mL,连续测定 6 次,结果主峰面积的 RSD 为 0.29%($n = 6$),实验结果表明,进样精密度良好。

1.5.4 加样回收率 向已知含量的样品中(取相当于氨甲环酸 0.5 g 的样品),加入氨甲环酸对照品适量,依照前述方法,配制成含氨甲环酸约 0.8、1.0、1.2 g/L 的溶液,在本波谱条件下分别测定含量,计算回收率,分别为 99.7%、101.2%、101.5%;RSD 分别为 0.25%、1.18%、1.15%。

1.5.5 稳定性实验 取浓度为 1.0 g/L 的氨甲环酸对照品

溶液,在室温条件下,分别于 0、1、3、5、7 h 后进样测定,测得浓度的 RSD 为 0.46%。结果显示,室温下溶液在 7 h 内是稳定的。

1.5.6 重复性实验 取同一批样品,按前述方法和波谱条件平行测定 6 次,计算含量为标示量的 99.6%,RSD 为 0.39%($n=6$)。

2 结果

体外循环开始前(用药后约 30 min)、体外循环期间、关胸期间的尿液中的氨甲环酸浓度分别为(5.03 ± 2.93)、(4.85 ± 2.86)、(3.486 ± 2.24) mg/mL。体外循环期间与体外循环开始前浓度有显著性差异,$P=0.0084$;体外循环与关胸期间浓度无显著性差异,$P=0.341$。体外循环开始前、体外循环期间、关胸期间尿液氨甲环酸总量分别为(199.7 ± 142.1)、(341.6 ± 302.3)、(400.1 ± 357.0) mg。至手术结束(用药后约 180 min)氨甲环酸排出量为(57.48 ± 19.66)%。体外循环开始前排泄率(6.5 ± 4.8) mg/min,体外循环期间排泄率(4.5 ± 4.9) mg/min,关胸期间排泄率(13.1 ± 9.6) mg/min,总排泄率(6.2 ± 3.4) mg/min,各时间段均无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

采用核磁共振波谱仪方法进行药品定量分析,具有快速、简便、准确、专属性高的特点[8]。其用于对生物样品进行检测时存在灵敏度低的问题,主要不是仪器本身的原因,而是"化学噪音"造成。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[9]。

目前测定氨甲环酸的方法有高效液相色谱法[10]、液相色谱并质谱法[11]、液相色谱并结合电喷雾电离质谱法[12]等。氨甲环酸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,以消除支链氨基酸的干扰,样本准备耗时,并且复杂,需要用盐酸(强氧化剂)作为沉淀剂,并且应用反相色谱相分析氨甲环酸,导致这种极性化合物滞留差,以及一定的离子化抑制效应。

本研究首次应用核磁共振波谱仪检测氨甲环酸的尿液浓度,并研究低体质量(低于 10 kg)婴幼儿法洛四联症体外循环期间的氨甲环酸排泄率。患儿尿液中不仅含有药物及其代谢产物,还含有大量的内源性物质,如乳酸、氨基酸。有时在接近检出限附近,在2.835 ~ 2.875 ppm 双峰期间,尿液没有特殊内源性物质,所以将其作为定量特征峰。核磁共振定量分析由于影响峰面积的因素很多,其标准偏差在 1% 左右,即为满意结果。本研究 ^{1}H - 核磁共振波谱可以检测出 10 μg/mL的氨甲环酸纯品。

Andersson 等[13]首次研究人氨甲环酸的吸收、分布和排泄。其生物半衰期是 80 h。第 1 小时尿液中大约有 30%,前 3 h 有 55%,24 h 有 90%。提示氨甲环酸通过肾小球滤过排泄,肾小管既不吸收,也不排泄。本研究尿液排泄的结果支持以上的结果。

在体外循环术中,根据药代动力学及使用最小有效剂量的科学用药原则,小剂量一次性给氨甲环酸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。本文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,以减少术后出血,其效果显著并且也是安全的。

[参考文献]

[1] 袁 华 刘小莉. 法乐氏四联症根治术后呼吸道的管理[J]. 局解手术学杂志,2003,12,(2):159 - 160.

[2] 沈永霞,王桂闽,贺素云. 抑肽酶在体外循环手术中的应用[J]. 局解手术学杂志,1999,8(2):112 - 113.

[3] 曹 剑,陶国才,文欣荣,等. 抑肽酶血液麻醉在关节置换外科手术中的应用[J]. 局解手术学杂志,2007,16(3):158 - 160.

[4] 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.

[5] Nuttall GA, Oliver WC, Ereth MH, et al. Comparison of Blood conservation strategies in cardiac surgery patients at high risk for bleeding[J]. Anesthesiology, 2000, 92(3): 674 - 682.

[6] 肖敬波,汪卫兵,周 新,等. 氨甲环酸在心肺转流下心内直视手术麻醉中的应用[J]. 安徽医药,2011,15(5):615 - 617.

[7] 徐红梅,孙 杰,唐晓阳,等. 氨甲环酸对心肺转流患者手术出血量的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2009,25(10):874 - 876.

[8] 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.

[9] 张友杰,刘小鹏. 药物核磁共振定量分析参数的研究[J]. 波谱学杂志,2007,24(3):289 - 294.

[10] 陈娴瑛,邱 涵,王美芳,等. HPLC 法测定氨甲环酸胶囊中氨甲环酸的含量[J]. 中国临床药学杂志 2008,17(5):298 - 299.

[11] Chang Q, Yin OQ, Chow MS. Liquid chromatographytandem 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.

[12] 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.

[13] Andersson L, Nilsoon IM, Colleen S, et al. Role of urokinase and tissue activator in sustaining bleeding and the management thereof with EACA and AMCA[J]. Ann N Y Acad Sci, 1968, 146(2): 642 - 658.

(编辑:余汇洋)