doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.16.017

超高效液相色谱法测定激素性股骨头坏死患者血浆中甲泼尼龙质量浓度*

张丽藏[1],张 霞[1],刘 剑[1],张志清[1△],董维冲[1],范欣欣[2]

(1. 河北医科大学第二医院药学部,河北 石家庄 050000; 2. 河北医科大学药学院,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立测定激素性股骨头坏死患者血浆中甲泼尼龙质量浓度的超高效液相色谱(UPLC)法。**方法** 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BSH C_{18} 柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为乙腈－水(29∶71,*V*/*V*),流速为 0.3 mL/min,检测波长为 242 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 1 μL。**结果** 患者血浆中甲泼尼龙与血浆内源性物质分离良好,甲泼尼龙及内标(地塞米松)保留时间分别为 3.69,4.28 min;甲泼尼龙血药浓度在 0.125～3.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好;检测限和定量限分别为 0.05,0.125 μg/mL;日间、日内精密度的 *RSD* 均不大于 4.30%(*n*=5);室温放置 8 h、反复冻融 3 次、冷冻 7 d 的稳定性试验的 *RSD* 均不大于 4.00%(*n*=5);平均方法回收率为 95.93%,*RSD* 为 1.40%(*n*=5);平均提取回收率为 75.99%,*RSD* 为 2.57%(*n*=5)。**结论** 所建立的 UPLC 法运行时间短,待测物与血浆内源性物质分离度好,灵敏度高,可用于测定激素性股骨头坏死患者血浆中甲泼尼龙质量浓度。

关键词:超高效液相色谱法;甲泼尼龙;血药浓度;激素性股骨头坏死

中图分类号:R917 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)16－0065－04

Determination of the Plasma Concentration of Methylprednisolone in Patients with Steroid－Induced Femoral Head Necrosis by UPLC

ZHANG Licang[1], *ZHANG Xia*[1], *LIU Jian*[1], *ZHANG Zhiqing*[1], *DONG Weichong*[1], *FAN Xinxin*[2]

(*1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050000; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050017*)

Abstract: Objective To establish an ultra high－performance liquid chromatography(UPLC) method for the determination of the plasma concentration of methylprednisolone in patients with steroid－induced femoral head necrosis. **Methods** The chromatographic column was Waters Acquity UPLC BSH C_{18} column(50 mm×2.1 mm,1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile－water(29∶71, *V*/*V*), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelength was 242 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μL. **Results** Methylprednisolone in plasma was well separated from plasma endogenous substances. The retention time of methylprednisolone and internal standard(dexamethasone) was 3.69 and 4.28 min, respectively. The linear range of methylprednisolone was 0.125－3.0 μg/mL, the limit of detection(LOD) and limit of quantitation(LOQ) of methylprednisolone were 0.05 and 0.125 μg/mL, respectively. The *RSD*s of intra－day and inter－day precision tests were not higher than 4.30%(*n*=5). The *RSD*s of the stability test after 8 h at room temperature, three repeated freeze－thaw cycles and 7－day freezing were not higher than 4.00%(*n*=5). The average recovery of the method was 95.93% with *RSD* of 1.40%(*n*=5). The average recovery of extraction was 75.99% with *RSD* of 2.57%(*n*=5). **Conclusion** The established UPLC method has the advantages of short running time, good separation and high sensitivity, which can be used for the determination of the plasma concentration of methylprednisolone in patients with steroid－induced femoral head necrosis.

Key words: UPLC; methylprednisolone; plasma concentration; steroid－induced femoral head necrosis

甲泼尼龙属中效糖皮质激素,大量或长期使用可导致股骨头无菌性坏死、骨质疏松、高血压、高血糖等不良反应[1－2]。糖皮质激素可导致非创伤性股骨头坏死(又称激素性股骨头坏死)。遗传易感等个体差异也可能是股骨头坏死的原因之一。研究发现,PA－1 基因的 4G/5G 基因型发生股骨头坏死的风险高,5G 型风险最低。ABCB1 基因型的 3435C 发生股骨头坏死的风险比 3535T 高 2～3 倍[3]。通过探讨基因测序结果与患者体内甲泼尼龙血药浓度的相关性建立测定甲泼尼龙血药浓度的方法尤为重要。本研究中建立了测定血浆中甲泼尼龙质量浓度的超高效液相色谱(UPLC)法,现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);R18 型高速离心机(北京白洋医疗器械有限公司);XW－80A 型涡旋混合仪(上海医科大学仪器厂);KL512J 型恒温水浴氮吹仪(北京康林科技有限公司);CPA225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);

*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目[2021146]。

第一作者:张丽藏,女,硕士,药师,研究方向为药物分析与质量控制,(电子信箱)1121907695@qq.com。

△通信作者:张志清,女,博士,主任药师,研究方向为药物分析与质量控制,(电子信箱)777yyy@sina.com。

MDF－U2086S 型低温冰箱（日本 Sanyo 公司）；KQ－300B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

甲泼尼龙对照品（批号为 100828－201603，含量为 99.8%），地塞米松对照品（批号为 100129－201506，含量为 99.8%），均购自中国食品药品检定研究院；三氯甲烷为分析纯；高纯度氮气（石家庄京联实用气体有限公司，批号为 20171110）；乙腈、甲醇均为色谱纯；水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters Acquity UPLC BSH C_{18} 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：乙腈－水（29∶71，V/V）；流速：1 mL/min；检测波长：242 nm；柱温：30 ℃；进样量：1 μL。

2.2 溶液制备

称取甲泼尼龙对照品 100 mg，精密称定，置 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，制成质量浓度为 1 mg/mL 的甲泼尼龙对照品溶液，4 ℃冷藏，待用。称取地塞米松（内标）对照品 100 mg，同法制备成质量浓度为 1 mg/mL 的内标溶液。取适量，用甲醇制得质量浓度为 1 μg/mL 的工作液，置－40 ℃保存。采集患者清晨空白血浆，备用。

2.3 血浆样品及质控样品制备

取 2.2 项下甲泼尼龙对照品溶液适量，用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.125，0.25，0.5，1.0，1.5，2.0，3.0 μg/mL 的系列对照品溶液，置 4 ℃保存。分别取 20 μL，置 10 mL 试管中，40 ℃水浴下氮气吹干，加入空白血浆，制得系列对照品模拟血浆样品。制备 0.3，0.8，2.4 μg/mL 对照品模拟血浆样品、对照品和内标的模拟血浆样品。

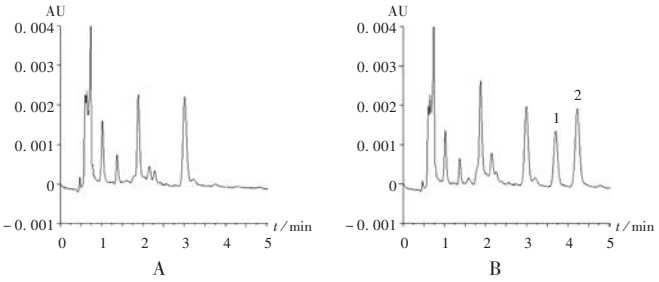
2.4 血浆样品处理

取血浆样品 200 μL，置 10 mL 试管中，加入地塞米松内标液 20 μL，涡旋，加入三氯甲烷 5 mL，涡旋 2 min 混匀，静置 10 min。取下层有机相（含药三氯甲烷）4 mL 置 5 mL 离心管中。40 ℃水浴下氮气吹干，残渣用 100 μL 甲醇复溶，取 80 μL 置进样小瓶中，备用。空白血浆处理同上。

2.5 方法学考察

专属性考察：取空白血浆及对照品和内标的模拟血浆样品，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定，色谱图见图 1。可见，人血浆中甲泼尼龙的分析不受空白血浆样品内源性物质的干扰，甲泼尼龙和内标的保留时间分别为 3.69，4.28 min，两峰分离较好。

线性关系与检测限、定量限考察：分别取 2.3 项下系列对照品模拟血浆样品，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以甲泼尼龙质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、甲泼尼龙与内标峰面积比值（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y=1.106\,2X-0.076\,8$（$R^2=0.998\,4$，$n=7$）。结果表明，甲泼尼龙质量浓度在 0.125～3.0 μg/mL 范围内与相对峰面积线性关系良好。以信噪比（S/N）为 3∶1 和 10∶1 计算得血浆中甲泼尼龙的检测限和定量限分别为 0.05 μg/mL 和 0.125 μg/mL。



1. 甲泼尼龙 2. 地塞米松（内标）

A. 空白血浆 B. 对照品和内标的模拟血浆样品

图 1 超高效液相色谱图

1. methylprednisolone 2. dexamethasone（internal standard）

A. Blank plasma B. Simulated plasma samples of reference substance and internal standard

Fig. 1 HPLC chromatograms

回收率试验：取 2.3 项下低、中、高质量浓度的对照品模拟血浆样品，各 5 份，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以实测浓度与理论浓度的比值作为方法回收率。取低、中、高质量浓度的对照品模拟血浆样品，各 5 份，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录甲泼尼龙和内标及甲泼尼龙对照品峰面积。以待测物及对应对照品峰面积的比值计算提取回收率。结果见表 1。

表 1 血浆中甲泼尼龙的回收率试验结果（%，$n=5$）

Tab. 1 Results of the recovery test of methylprednisolone in plasma（%，$n=5$）

模拟血药浓度	提取回收率		方法回收率	
（μg/mL）	$\bar{X}\pm s$	*RSD*	$\bar{X}\pm s$	*RSD*
0.3	77.00±2.00	2.60	95.00±0.90	0.90
0.8	74.87±0.90	1.20	94.89±1.20	1.30
2.4	76.11±2.90	3.90	97.90±2.00	2.00

精密度试验：取 2.3 项下低、中、高质量浓度的对照品模拟血浆样品，各 5 份，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定于 1 d 内测定，按标准曲线求得甲泼尼龙的实际浓度，计算日内精密度。连续 3 d 同法测定，计算日间精密度。结果见表 2。

表 2 血浆中甲泼尼龙的日内、日间精密度试验结果（$n=5$）

Tab. 2 Results of the intra－day and inter－day precision test of methylprednisolone in plasma（$n=5$）

模拟血药浓度	日内精密度		日间精密度	
（μg/mL）	测量值（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	*RSD*（%）	测量值（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	*RSD*（%）
0.3	0.28±0.01	2.30	0.28±0.01	2.00
0.8	0.75±0.03	4.20	0.76±0.03	3.80
2.4	2.32±0.10	4.30	2.34±0,09	4.00

稳定性试验：取 2.3 项下低、中、高质量浓度的对照品模拟血浆样品，各 5 份，按 2.4 项下方法处理，室温下放置 0，2，4，6，8 h 后按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算甲泼尼龙的血药浓度。结果的 *RSD* 不超过 4.30%（$n=5$），详见表 3，表明室温下对照品模拟血浆样品放置 8 h 稳定。取 2.3 项下低、中、高质量浓度的甲泼尼龙模拟血浆样品，各 5 份，反复冻融 3 次，按 2.4 项下方法处理，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算甲泼尼龙质量浓度。结果的 *RSD* 均不超过 4.00%（$n=5$），详见表 4，表明对照品模拟血浆样品反复冻融 3 次后仍稳定。同前文“反复冻融 3 次”及按 2.4 项下方法处理血样冰冻 7 d，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算甲泼尼龙质量浓度。结果的 *RSD* 均不超过 3.70%（$n=5$），详见表 4，表明对照品模拟血浆样品冰冻 7 d 后稳定性较好。

表 3 室温放置 8 h 的稳定性试验结果（$n=5$）

Tab. 3 Results of the stability test of methylprednisolone in plasma at room temperature within 8 h（$n=5$）

时间(h)	低质量浓度		中质量浓度		高质量浓度	
	测量值（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	*RSD*（%）	测量值（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	*RSD*（%）	测量值（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	*RSD*（%）
0	0.28±0.01	2.30	0.77±0.03	4.20	2.37±0.02	4.30
2	0.29±0.02	2.20	0.76±0.03	3.70	2.35±0.02	4.00
4	0.27±0.01	2.00	0.75±0.03	3.80	2.34±0.01	4.20
6	0.28±0.02	2.30	0.73±0.01	4.00	2.34±0.01	4.10
8	0.27±0.01	2.10	0.76±0.01	3.90	2.33±0.02	4.30

表 4 反复冻融 3 次、冰冻 7 d 的稳定性试验结果（$n=5$）

Tab. 4 Results of the stability test of methylprednisolone in plasma after three repeated freeze-thaw cycles and 7-day freezing（$n=5$）

质量浓度	初始		反复冻融 3 次		冰冻 7 d	
	测量值	*RSD*	测量值	*RSD*	测量值	*RSD*
（μg/mL）	（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	（%）	（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	（%）	（$\bar{X}\pm s$，μg/mL）	（%）
0.3	0.29±0.01	3.60	0.29±0.01	4.00	0.27±0.01	3.70
0.8	0.77±0.02	2.60	0.79±0.01	1.80	0.77±0.01	1.80
2.4	2.37±0.03	1.40	2.36±0.06	2.90	2.29±0.02	1.00

3 讨论

对于样品的处理，预试验中尝试了分别以乙腈-水、乙腈-甲酸铵水溶液、乙腈-甲酸水溶液为流动相。但观察到，在水相中加入甲酸铵盐会使出峰时间提前，但会升高柱压，峰形无明显变化，出于对色谱柱及经济环保考虑，故选择乙腈-水作为流动相。血浆样品处理常用蛋白沉淀法和液-液萃取法，由于 UPLC 仪对样品纯度要求极高，故试验中采用液-液萃取法。预试验中曾采用乙酸乙酯、叔丁基甲基醚、氯仿进行萃取，结果发现用氯仿萃取效果最好，样品分离度最高，峰形最好，故选择氯仿萃取。

甲泼尼龙又称甲泼尼龙琥珀酸钠，为人工合成的中效糖皮质激素，临床主要用于抗炎、免疫抑制、抗休克和抗过敏，还可通过联合用药达到治疗目的[4]。其作用机制包括减轻脂质过氧化反应，减少体内自由基，甲泼尼龙可穿过细胞膜，阻止核因子（NF）-κB 等转录因子的通路影响蛋白的转录[5]。在激素性股骨头坏死的研究中发现，激素的使用剂量与坏死范围和风险相关。此外，糖皮质激素受体的多样性可能也是导致股骨头坏死个体差异的一种因素[6-10]。miRNA 是一类内源的、基因编码长度为 20～24 个核苷酸的小分子 RNA，细胞的许多生理功能受其调节，它在激素性股骨头坏死中有显著作用，试验证实，激素尤其是中效激素甲泼尼龙干预后，miR-672-5pd 在大鼠成骨细胞的表达量最大，与此同时骨坏死的风险随之增加[11-12]。既往的文献多采用高效液相色谱法或气相色谱串联质谱法测定甲泼尼龙血药浓度[13-14]，考虑到样品量及经济成本，本研究中建立了快速、高效的 UPLC 法测定血浆中甲泼尼龙的质量浓度，拟用此方法测量使用甲泼尼龙患者的血药浓度，以更好地预防药品不良反应，为临床用药提供试验依据。本研究不足之处在于，仅建立了相关测定方法及进行了方法学考察，并未对患者的真实血样进行测定。后续需就此开展进一步研究。

参考文献

[1] SCHERHOLZ ML, SCHLESINGER N, ANDROULAKIS IP. Chronopharmacology of lucocorticoids[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, 151/152: 245-261.

[2] CUI QJ, JONES LC, CHEN CH, et al. Etiologic Classification Criteria of ARCO on Femoral Head Osteonecrosis Part 1: Glucocorticoid-Associated Osteonecrosis[J]. The Journal of Arthroplasty, 2019, 34(1): 163-168.

[3] 秦亚丽，沈 芸. ABCB1 基因多态性对糖皮质激素药物代谢动力学及疗效影响的研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志，2015，18(9)：175-178.

[4] 翟 沛，李鹏飞，梁正辉，等. 长效、中效、短效 3 种激素影响 miR-672-5p 在大鼠成骨细胞的差异表达[J]. 中国组织工程研究，2019，23(5)：809-814.

[5] XU J, FAN G, CHEN S, et al. Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-κB activation after spinal cord injury in rats[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 59(2): 135-142.

[6] POWELL C, CHANG C, NAGUWA SM, et al. Steroid induced osteonecrosis: An analysis of steroid dosing risk[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(11): 721-743.

[7] ZHANG NF, LI ZR, WEI HY, et al. Steroid-induced osteonecrosis: the number of lesions is related to the dosage[J]. J Bone Joint Surg Br, 2008, 90(9): 1239-1243.

[8] 汪 轩，张 琳，邢 婧，等. 激素剂量对激素性股骨头坏死模型建立的影响及系统评价[J]. 浙江中医药大学学报，2016，40(1)：19-25.