阿帕替尼血药浓度测定方法的建立及临床应用Δ

段贤春[1,2*]，薛苏君[1,2]，祝永福[3]（1.安徽中医药大学第一附属医院药学部，合肥 230031；2.安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室，合肥 230012；3.安徽中医药大学第一附属医院肿瘤一科，合肥 230031）

中图分类号 R979.1；R969.1　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2024）12-1500-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.15

摘　要　目的 建立测定阿帕替尼血药浓度的方法并进行临床应用。**方法** 采用超高效液相色谱（UPLC）法进行血药浓度测定，色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C_{18}，流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液（梯度洗脱），流速为0.2 mL/min，柱温为40 ℃，进样量为5 μL。收集26例服用阿帕替尼癌症患者的病例资料，检测其血药浓度，分析阿帕替尼血药浓度与患者年龄、给药剂量、不良反应及联合用药的相关性，并检测患者治疗前后血清肾损伤相关因子[胱抑素C（CysC）、肾损伤分子1（KIM-1）、白细胞介素18（IL-18）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]水平。**结果** 阿帕替尼检测质量浓度在500～2 000 ng/mL范围内线性关系良好，精密度试验RSD为3.7%，稳定性试验RSD为4.9%，平均加样回收率为96.0%（RSD为2.1%）。26例患者的阿帕替尼血药浓度最低为103 ng/mL，最高为1 932 ng/mL。患者的血药浓度随年龄呈波动降低趋势。在0.125或0.25 g给药剂量下，服用阿帕替尼的患者体内血药浓度集中在1 000～2 000 ng/mL范围内。26例癌症患者中有13例发生不良反应，其中血药浓度500～＜1 000 ng/mL者未见不良反应发生。20例患者同时联用了其他药物，其血药浓度高低不同。治疗后，患者的血清CysC、KIM-1、IL-18、TNF-α水平均显著高于治疗前（$P<0.05$）。**结论** 所建立的UPLC方法能快速检测阿帕替尼血药浓度。临床使用阿帕替尼时应综合考虑患者年龄和药物联用等情况，并注意防范阿帕替尼可能导致的急性肾损伤。

关键词 阿帕替尼；血药浓度监测；超高效液相色谱；肾损伤；不良反应

Establishment and clinical application of the method for the determination of blood concentration of apatinib

DUAN Xianchun[1,2], XUE Sujun[1,2], ZHU Yongfu[3] (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medical of Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. First Dept. of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish a method for determining the blood concentration of apatinib and apply it clinically. **METHODS** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was used for the determination of blood concentration. The chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C_{18} with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min; the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 5 μL. The data of 26 cancer patients taking apatinib were collected, and their blood concentrations were measured. The correlation between patient's blood concentration and age, dosage, adverse reactions, and combination therapy were analyzed; the levels of serum kidney injury-related factors [cystatin C (CysC), kidney injury molecule 1 (KIM-1), interleukin-18 (IL-18), tumor necrosis factor-α (TNF-α)] were determined before and after treatment. **RESULTS** The linear range of apatinib was 500-2 000 ng/mL, with a precision RSD of 3.7%, stability RSD of 4.9%, and an average sample recovery rate of 96.0% (RSD was 2.1%). The lowest blood concentration of apatinib was 103 ng/mL and the highest was 1 932 ng/mL among 26 patients. The blood concentration of apatinib in patients showed a fluctuating downward trend with age. At a dosage of 0.125 or 0.25 g, the blood concentration of patients taking apatinib was concentrated within the range of 1 000-2 000 ng/mL. Among 26 cancer patients, 13 experienced adverse reactions, and no adverse reaction was observed in those with blood concentrations ranging from 500 to ＜1 000 ng/mL. Twenty patients were simultaneously treated with other drugs, resulting in varying blood concentration. After treatment, the levels of serum CysC, KIM-1, IL-18 and TNF-α were significantly higher than before treatment ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The established UPLC method can quickly detect the blood concentration of apatinib. When using apatinib

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82074059）；安徽省卫生健康科研重点项目（No.AHWJ2022a013）；安徽省学术和技术带头人后备人选资助项目（No.2022H287）；安徽省高校自然科学研究重点项目（No. 2023AH050745）；安徽省卫生健康杰出人才项目（No. ahsjhmypygc20240074）

＊**第一作者** 副主任药师，副教授，博士。研究方向：医院药学。E-mail：duanxc@ahtcm.edu.cn

in clinical practice, comprehensive consideration should be given to the patient's age, drug combination, and the attention should be paid to preventing possible acute kidney damage caused by apatinib.

KEYWORDS apatinib; blood concentration monitoring; ultra-high performance liquid chromatography; kidney injury; adverse drug reactions

阿帕替尼是一种新型小分子酪氨酸激酶抑制剂[1]，目前已广泛应用于肺癌、食管癌、胃癌等多种癌症的治疗[2－4]。阿帕替尼在体内主要通过细胞色素P450（cytochrome P450，CYP）酶代谢[5]，与其他药物联合使用易导致患者血药浓度发生波动，且不同患者的给药剂量差异较大、不良反应较多，因此有必要对其进行血药浓度监测，进而指导临床进行个体化用药[6－8]。本研究采用超高效液相色谱（ultra-high performance liquid chromatography，UPLC）法建立了测定阿帕替尼血药浓度的方法，并结合临床病例分析阿帕替尼血药浓度与患者年龄、给药剂量、不良反应及联合用药之间的相关性，以期为提高阿帕替尼的合理用药水平提供参考。

1 材料

甲磺酸阿帕替尼对照品（纯度96.2%，批号101253-201101）购自中国食品药品检定研究院；甲磺酸阿帕替尼片（商品名艾坦，规格0.25 g/片）购自江苏恒瑞医药股份有限公司。

ACQUITY UPLC BEH C_{18}色谱柱、ACQUITY UPLC仪均购自美国Waters公司；ME55型十万分之一分析天平购自梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；TD4A型低速离心机购自长沙英泰仪器有限公司；XW-80A型涡旋混合器购自上海医大仪器有限公司；FTSY96型酶标仪购自山东风途物联网科技有限公司；DK-8D型电热恒温水槽购自上海一恒科技有限公司。

肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、肾损伤分子1（kidney injury molecule 1，KIM-1）、胱抑素C（cystatin C，CysC）、白细胞介素18（interleukin-18，IL-18）酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为KS10208、KS12070、KS13826、KS10711）均购自上海科顺生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 阿帕替尼UPLC检测方法的建立

2.1.1 色谱条件

以ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（C）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，10%A→97%A；10～12 min，97%A→10%A；12～15 min，10%A）；流速为0.2 mL/min；柱温为40 ℃；进样量为5 μL；检测波长为254、260 nm。

2.1.2 阿帕替尼标准溶液的制备

精密称取甲磺酸阿帕替尼对照品10.00 mg，用甲醇溶解后定容至100 mL，即得质量浓度为100 μg/mL的阿帕替尼标准溶液。

2.1.3 患者全血样本前处理

取一次性真空采血管（12 mm×100 mm，内含惰性分离胶和促凝剂），分别在患者服药前和服药4 h后采集静脉血5 mL，以3 000 r/min离心8 min后取上清液即得空白血清和含药血清，于－30 ℃冷冻保存，备用。

2.1.4 血清样本预处理

取患者血清样本100 μL至1.5 mL离心管中，加入800 μL乙腈，涡旋混合3 min，以13 000 r/min离心10 min，取上清液1.2 mL，氮气吹干后用150 μL 50%甲醇复溶，充分涡旋1 min，再以13 000 r/min离心10 min，取上清液100 μL进样测定。

2.1.5 方法学考察

（1）标准曲线的建立。将“2.1.2”项下阿帕替尼标准溶液用甲醇进行梯度稀释，制成质量浓度为2 000、1 500、1 000、500、200、100 ng/mL的标准曲线工作液。分别取上述6种质量浓度的工作液20 μL，加180 μL空白血清（患者接受治疗前采集的血清），混匀制成阿帕替尼血清样本。按照“2.1.4”项下方法进行预处理后，再按“2.1.1”项下色谱条件进样检测。以峰面积（Y）对质量浓度（X）进行线性回归，得回归方程Y=61.308X+1 444.2（R^2=0.999 5），表明阿帕替尼检测质量浓度在500～2 000 ng/mL范围内线性关系良好。

（2）精密度试验。取“2.1.2”项下阿帕替尼标准溶液，加入空白血清，配制成阿帕替尼质量浓度为2 000 ng/mL的含药血清，按照“2.1.4”项下方法进行预处理后，再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，连续进样6次，记录峰面积并计算RSD。结果显示，6次进样峰面积的RSD为3.7%（n=6），表明该仪器的精密度良好。

（3）稳定性试验。取“2.1.2”项下阿帕替尼标准溶液6份，分别加入空白血清，配制成阿帕替尼质量浓度为2 000 ng/mL的含药血清6份，在4 ℃条件下分别放置0、2、4、6、12、24 h，按“2.1.4”项下方法对样本进行预处理，再按“2.1.1”项下色谱条件进样检测，记录峰面积并计算RSD。结果显示，峰面积的RSD为4.9%（n=6），表明阿帕替尼含药血清的稳定性良好。

（4）加样回收率试验。取“2.1.2”项下阿帕替尼标准溶液，加入空白血清，配制成阿帕替尼质量浓度为450、750、1 000 ng/mL的含药血清，每种浓度平行配制3份，按“2.1.4”项下方法进行预处理，再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定并计算样本的加样回收率。结果显示，样本平均加样回收率为96.0%，RSD为2.1%（n=9），表明该方法具有良好的准确度。

2.2 临床应用

2.2.1 研究对象

以安徽中医药大学第一附属医院2022年9月至2023年12月服用过阿帕替尼的癌症患者为研究对象，收集患者全血样本、基本资料、生化检查结果、用药情况等进行回顾性分析。患者的纳入标准包括：（1）年龄＞18岁；（2）诊断为癌症；（3）原患疾病为肿瘤；（4）自愿进行阿帕替尼血药浓度监测；（5）阿帕替尼血药浓度已达稳态。患者的排除标准包括：（1）入院时间少于3 d；（2）对阿帕替尼过敏；（3）无法收集肿瘤标志物及血常规检查结果；（4）妊娠期、哺乳期患者。本研究通过安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会审查，伦理审查号：2022XJS-MZYY05。本研究为回顾性研究，患者均豁免知情同意。

最终，本研究共纳入了26例患者为研究对象，其中男性18例，女性8例；患者年龄32～82岁；服用阿帕替尼剂量为0.25 g（16例）或0.125 g（10例），均为餐后服药。不同癌症类型患者的治疗方案各异，具体如下——胆囊癌患者（1例）：替雷利珠单抗+阿帕替尼+替吉奥；贲门癌患者（2例）：单用阿帕替尼，或替吉奥+阿帕替尼；胃癌患者（11例）：单用阿帕替尼，或替吉奥+信迪利单抗+阿帕替尼，或信迪利单抗+阿帕替尼，或紫杉醇+替吉奥+阿帕替尼，或奥沙利铂+阿帕替尼，或信迪利单抗+阿帕替尼+卡培他滨；宫颈癌、十二指肠癌、胆管癌患者（各1例）：均单用阿帕替尼；肝癌患者（4例）：替雷利珠单抗+阿帕替尼+奥沙利铂，或卡瑞丽珠单抗+阿帕替尼；肺癌患者（2例）：单用阿帕替尼，或阿帕替尼+依托泊苷；食管癌患者（3例）：白蛋白紫杉醇+阿帕替尼，或阿帕替尼+派安普利单抗+卡培他滨，或伊立替康+替吉奥+阿帕替尼+信迪利单抗。

2.2.2 患者血药浓度监测结果

参考“2.1”项下方法进行样本处理及测定，监测26例患者的阿帕替尼血药浓度。结果显示，阿帕替尼血药浓度在不同患者中的差异较大，测得的最低浓度为103 ng/mL，最高浓度为1 932 ng/mL。其中，血药浓度＜500 ng/mL的患者有6例，500～＜1 000 ng/mL的患者有2例，1 000～＜1 500 ng/mL的患者有10例，1 500～2 000 ng/mL的患者有8例。部分患者血药浓度监测结果色谱图见图1。

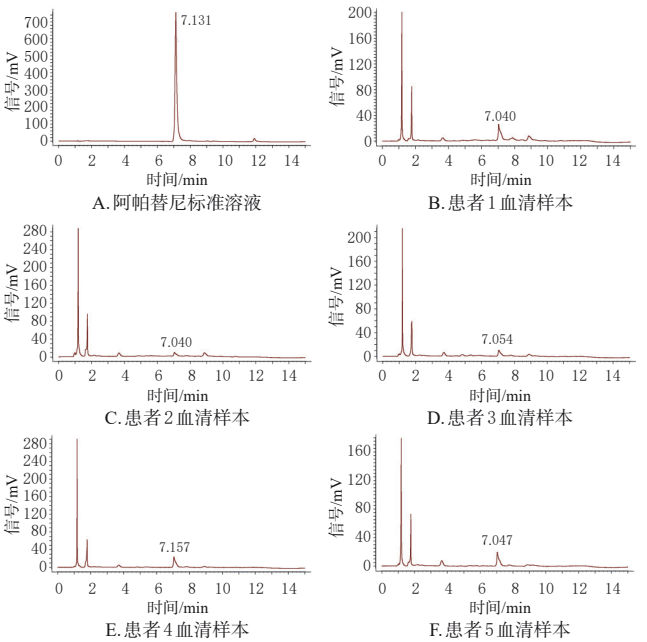


图1 部分患者的血药浓度监测色谱图

2.3 阿帕替尼血药浓度与年龄、给药剂量、不良反应及联合用药的相关性分析

2.3.1 阿帕替尼血药浓度与年龄的相关性

采用GraphPad Prism软件对26例癌症患者的血药浓度分布与年龄的相关性进行分析并作图，结果显示，30～39岁年龄段患者的血药浓度最高，随着年龄的增加血药浓度呈波动下降的趋势。结果见图2。

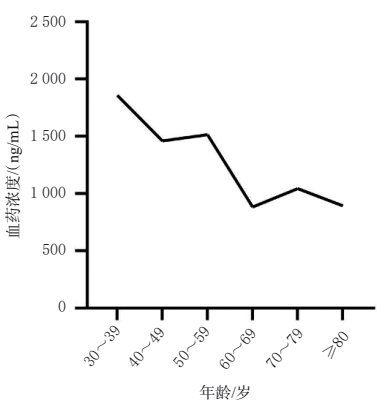


图2 阿帕替尼血药浓度与年龄的相关性

2.3.2 阿帕替尼血药浓度与给药剂量的相关性

给药剂量为0.125 g时，血药浓度为1 000～＜1 500 ng/mL的患者有4例，1 500～＜2 000 ng/mL的患者有2例，＜500 ng/mL的患者有3例，而500～＜1 000 ng/mL的患者有1例；给药剂量为0.25 g时，血药浓度为1 500～＜2 000、1 000～＜1 500 ng/mL的患者各有6例，＜500 ng/mL的患者有3例，500～1 000 ng/mL的患者有1例。在0.125 g或0.25 g给药剂量下，阿帕替尼血药浓度在1 000～＜1 500 ng/mL范围内的患者最多。

2.3.3　阿帕替尼血药浓度与不良反应的相关性

阿帕替尼临床应用中主要出现的不良反应包括高血压、蛋白尿、出血等[9]。本研究纳入的26例癌症患者，治疗前均未合并有高血压，但合并有蛋白尿4例、尿隐血9例；使用阿帕替尼后，有13例发生不良反应，包括高血压5例、蛋白尿6例、尿隐血10例。其中，血药浓度＜500 ng/mL者发生高血压3例、蛋白尿1例、尿隐血1例，血药浓度1 000～＜1 500 ng/mL者发生高血压2例、蛋白尿2例、尿隐血5例，血药浓度1 500～＜2 000 ng/mL者发生蛋白尿3例、尿隐血4例，血药浓度500～＜1 000 ng/mL者未见不良反应发生。

2.3.4　阿帕替尼血药浓度与联合用药的相关性

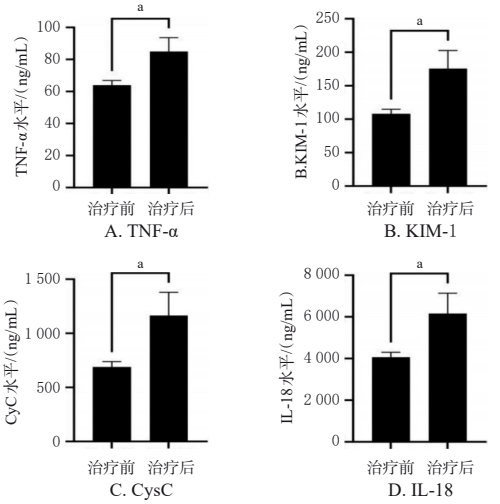
26例癌症患者中，有20例患者采用联合用药方案，其中有4例患者的血药浓度＜500 ng/mL，1例患者的血药浓度在500～＜1 000 ng/mL范围内，8例患者的血药浓度在1 000～＜1 500 ng/mL范围内，7例患者的血药浓度在1 500～2 000 ng/mL范围内。

2.4　肾损伤因子检测

由于蛋白尿和尿隐血与急性肾损伤密切相关[10]，推测服用阿帕替尼可能导致一定程度的急性肾损伤，因此本研究进一步检测了患者治疗前后血清肾损伤因子TNF-α、KIM-1、CysC、IL-18水平。

采用ELISA法，按试剂盒要求进行操作：从室温平衡20 min后的铝箔袋中取出所需板条，取不同浓度标准品溶液50 μL加至标准品孔中；依次将待测样本10 μL及样本稀释液40 μL加至样本孔中；除空白孔外，标准品孔及样本孔中各加100 μL辣根过氧化物酶标记的抗体，恒温箱孵育60 min；弃去液体静置1 min，每孔加入底物A、B各50 μL，37 ℃避光孵育15 min；每孔加入终止液50 μL，15 min后在450 nm波长处检测光密度值。采用Excel工作表绘制出标准品曲线，根据曲线方程（y=343.65x－46.309，R^2=0.989）计算样本中肾损伤因子的水平，其中y为光密度值，x为标准品浓度。

ELISA检测结果（图3）显示，患者治疗后血清TNF-α、KIM-1、CysC、IL-18水平均显著高于治疗前（P＜0.05），提示阿帕替尼可能导致一定程度的急性肾损伤。



a：治疗前后比较，P＜0.05。

图3　阿帕替尼治疗前后患者肾损伤因子水平检测结果比较

3　讨论

阿帕替尼是全球第一个治疗晚期胃癌的靶向抗血管生成小分子药物[11]，其能高选择性地竞争细胞内血管内皮细胞生长因子受体2的腺嘌呤核苷三磷酸结合位点，从而抑制肿瘤组织新血管生成[12]，延长患者的生存期。

肿瘤患者病情复杂，临床使用阿帕替尼时存在不同给药剂量及不同治疗方案，个体化差异明显。本研究对26例癌症患者服用阿帕替尼后的血药浓度进行了监测，结果显示，20例使用联合用药方案的患者血药浓度高低不同，这可能是由于阿帕替尼主要由CYP3A4、CYP3A5代谢，少量由CYP2D6、CYP2C9、CYP2E1代谢，当阿帕替尼与CYP3A4强诱导药或强抑制药联用时，可降低或提高阿帕替尼的血药浓度[13]。这提示，临床使用阿帕替尼时需综合考虑患者的生理情况，与其他药物联用时，需依据药物特性调整给药剂量。

阿帕替尼的常见不良反应为高血压、蛋白尿及出血等，本研究发现，血药浓度为500～＜1 000 ng/mL的患者未见不良反应发生，提示在该血药浓度范围内用药较为安全，500～＜1 000 ng/mL可能为阿帕替尼血药浓度安全性参考范围，不良反应发生风险升高可能与阿帕替尼血液浓度较高相关。

此外，本研究通过分析病例资料发现，治疗后发生高血压、蛋白尿、尿隐血的患者比例均较治疗前升高。同时，治疗后患者的血清TNF-α、KIM-1、CysC、IL-18水平均显著高于治疗前，表明阿帕替尼具有导致急性肾损伤的可能性，但其具体机制尚不清楚。年龄与血药浓度的相关性分析显示，总体来讲患者年龄越大，其体内阿帕替尼血药浓度越低，提示患者血药浓度可能受到年龄的影响。不同给药剂量与血药浓度的相关性分析显示，在0.125 g及0.25 g这两种不同给药剂量下，服用阿帕替尼的患者，血药浓度主要在1 000～2 000 ng/mL范围内。药物剂量通常与血药浓度成正比，但个体差异、年龄和体质等因素也会影响血药浓度，因此，临床使用阿帕替尼时需要个体化调整剂量。

综上所述，本研究所建立的UPLC方法能快速检测

阿帕替尼血药浓度。为保障患者用药的安全性、减少不良反应发生风险，临床使用阿帕替尼时应综合考虑患者的年龄和药物联用等情况，且应注意监测患者的肾损伤相关指标，防范阿帕替尼可能导致的急性肾损伤。

参考文献

[1] LI J, QIN S K, XU J M, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase Ⅲ trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(13): 1448-1454.

[2] XIE C F, ZHOU X, LIANG C H, et al. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 266.

[3] YANWEI L, FENG H, REN P, et al. Safety and efficacy of apatinib monotherapy for unresectable, metastatic esophageal cancer: a single-arm, open-label, phase Ⅱ study[J]. Oncologist, 2020, 25(10): e1464-e1472.

[4] LONG Y, WANG Z, FAN J L, et al. A hybrid membrane coating nanodrug system against gastric cancer via the VEGFR2/STAT3 signaling pathway[J]. J Mater Chem B, 2021, 9(18): 3838-3855.

[5] LIU X Y, ZHANG Y F, CHEN Q, et al. Pharmacokinetic drug interactions of apatinib with rifampin and itraconazole[J]. J Clin Pharmacol, 2018, 58(3): 347-356.

[6] 戚志平，马琳，游广辉. 126例丙戊酸钠血药浓度监测结果分析[J]. 临床研究，2020，28(3)：7-8.
QI Z P, MA L, YOU G H. Analysis of 126 cases of sodium valproate serum concentration monitoring[J]. Clin Res, 2020, 28(3): 7-8.

[7] 洪丽绵，吴水发，张清泉，等. 丙戊酸血药浓度与临床疗效、不良反应的相关性分析[J]. 海峡药学，2021，33(8)：79-82.
HONG L M, WU S F, ZHANG Q Q, et al. Correlation analysis of valproic plasma concentration with clinical efficacy and adverse reaction[J]. Strait Pharm J, 2021, 33(8): 79-82.

[8] 江艳，陈川，陶赟，等. 某院2022年丙戊酸钠血药浓度监测结果分析[J]. 中国处方药，2024，22(3)：76-78.
JIANG Y, CHEN C, TAO Y, et al. Analysis of blood concentration monitoring results of sodium valproate in our hospital in 2022[J]. J China Prescr Drug, 2024, 22(3): 76-78.

[9] XIAO Y, CHENG H J, WANG L, et al. Clinical response and safety of apatinib monotherapy in recurrent, metastatic cervical cancer after failure of chemotherapy: a retrospective study[J]. J Gynecol Oncol, 2020, 31(1): e2.

[10] 张俊丽. 珠海市2007－2016年136例肾综合征出血热临床特征分析[D]. 遵义：遵义医学院，2018.
ZHANG J L. Analysis on the clinical manifestations of 136 hemorrhagic fever with renal syndrome in Zhuhai city during 2007-2016[D]. Zunyi: Zunyi Medcial College, 2018.

[11] GENG R X, LI J. Apatinib for the treatment of gastric cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2015, 16(1): 117-122.

[12] YU G C, YANG J, YE B, et al. Apatinib in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. Math Biosci Eng, 2019, 16(6): 7659-7670.

[13] LOU D, CUI X, BAO S S, et al. Effects of ketoconazole, voriconazole, and itraconazole on the pharmacokinetics of apatinib in rats[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2019, 45(4): 689-693.

（收稿日期：2024-02-27　修回日期：2024-03-20）
（编辑：舒安琴）