

HPLC 法测定肾移植患者血浆中霉酚酸的浓度[△]

叶丽卡, 谢志红, 王若伦, 许欣, 张伟婷(广州医学院第二附属医院, 广州市 510260)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2008)17-1306-03

摘要 目的: 建立以高效液相色谱法测定霉酚酸血药浓度的方法, 并研究其在中国肾移植患者体内的多剂量药动学特征。方法: 血浆采用乙腈蛋白沉淀后进样。其中, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为乙腈-10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄(5:6), 流速为 1.1 mL·min⁻¹, 检测波长为 254 nm, 柱温为 40℃。此方法应用于测定 12 例肾移植患者的多剂量药动学。结果: 色谱中霉酚酸与内标分离良好, 血浆中的内源性杂质无干扰。霉酚酸检测浓度在 0.38~59.00 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 最低检测限为 0.38 μg·mL⁻¹; 回收率为 89.32%~97.63%, 日内、日间 RSD 均 < 8.00%。药动学结果显示患者服用霉酚酸酯后, 霉酚酸的药动学个体差异较大, 与文献报道基本一致。结论: 本方法结果准确, 操作简便, 适合于霉酚酸的药动学研究。

关键词 霉酚酸; 高效液相色谱法; 肾移植患者; 血药浓度; 多剂量; 药动学

Determination of Mycophenolic Acid in Kidney Transplantation Patients by HPLC

YE Li-ka, XIE Zhi-hong, WANG Ruo-lun, XU Xin, ZHANG Wei-ting(The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the plasma mycophenolic acid concentration by HPLC, and study the multidoses pharmacokinetics character of mycophenolic acid in Chinese kidney transplantation patients. METHODS: The samples were precipitated with acetonitrile before injection. Diamonsil C₁₈ column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ (5:6) at a flow rate of 1.1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 40℃. This method was used to determine the multidoses pharmacokinetics in 12 kidney transplantation patients. RESULTS: MPA was well-separated from internal standard in chromatography, and endogenous foreign substance in plasma had no interference on the determination. The liner range for MPA was 0.38~59.00 μg·mL⁻¹, and the lowest detectable concentration of MPA was 0.38 μg·mL⁻¹. The recovery rate stood at 89.32%~97.63%; Both intra-day and inter-day RSD were less than 8.00%. Significant individual difference was noted among the patients treated with MMF in pharmacokinetic results, which was in line with the literature. CONCLUSION: This method is accurate and simple and applicable for the pharmacokinetics study of mycophenolic acid.

KEY WORDS Mycophenolic acid; HPLC; Kidney transplantation patients; Plasma drug concentration; Multidoses; Pharmacokinetics

霉酚酸酯 (Mycophenolate mofetil, MMF) 是一种常用免疫抑制药物, 于 1998 年在我国上市, 被广泛应用于防治器官移植后的免疫排斥反应以及自体免疫性疾病的治疗。MMF 是霉酚酸 (Mycophenolic acid, MPA) 的 2-乙基酯类衍生物, 在体内脱酯化后形成具有免疫抑制活性的代谢产物 MPA。MPA 通过抑制次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 (IMPDH), 抑制鸟嘌呤的合成, 选择性阻滞 T 和 B 淋巴细胞的增殖, 发挥免疫抑制作用。由于 MMF 的免疫抑制作用机制有别于环孢素 A (CsA) 和他克莫司 (FK 506), 因而可与作用于免疫激活早期的其它免疫抑制剂 (CsA、FK 506 等) 发挥协同作用。近年来研究证实, MMF 与 CsA 和强的松 (Pred) 联合应用, 可显著降低肾急性排斥反应的发生率, 因而 MMF+CsA+Pred 的免疫抑制方案被广泛应用于临床。另有研究表明, MMF 的药动学个体差异较大, 且其药动学曲线下面积与药效及不良反应相关, 因此监测其血药浓度具有重要意义。文献报道的高效液相色谱 (HPLC) - 紫外检测法测定 MPA 时, 建立的方法往往采用外标法, 对操作过程准确性要求较高^[1-3], 或提取过程比较复杂, 需要液-液萃取^[4,5]。在现有研究文献报道中, 少有文献报道患者服用小剂

量 MMF (500 mg, bid) 后的药动学特征, 但国内不少肾移植术后患者长期服用 MMF (500 mg, bid)。本研究拟采用内标法, 建立快捷、简便、准确的 MPA 血药浓度 HPLC 测定法, 并用此方法进行肾移植患者服用小剂量 MMF 后的 MPA 药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

HPLC 系统, 包括 LC-10AT_{VP} 双泵、SPD-10A_{VP} 可变波长紫外检测器、CTO-10A_{VP} 柱温箱、SIL-10AD_{VP} 自动进样器、SCL-10A_{VP} 系统控制器、DGU-10A 脱气装置、LC-Solution 色谱工作站 (日本岛津公司); 5417R 小型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); XW-80A 漩涡混合器 (上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 试剂

MPA 对照品 (上海罗氏制药有限公司, 批号: 1150383); 内标: 扎莱普隆 (中国药品生物制品检定所, 批号: 10022-0101); 甲醇和乙腈均为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯, 所用超纯水为自制去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄(5:6); 流速: 1.1 mL·

[△] 广州市属高校科技项目 (61027)、广东省医院药学研究基金资助项目 (2008A 018)

主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理学、药事管理学。电话: 020-34152377。E-mail: yelika@163.com

min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 检测灵敏度: 0.005AU FS。

2.2 溶液的配制

2.2.1 MPA 贮备液: 准确称取 11.8 mg MPA 对照品至 10 mL 容量瓶, 用乙腈溶解定容至刻度, 得 1.18 mg · mL⁻¹ MPA 贮备液。

2.2.2 内标贮备液: 准确称取 1 g 扎莱普隆对照品至 100 mL 容量瓶, 用乙腈定容至刻度, 得 10 mg · mL⁻¹ 扎莱普隆贮备液, 置于 4 °C 冰箱储存待用。

2.3 血浆样品处理

取血浆 0.2 mL, 置于 1.5 mL 聚丙烯试管中, 加入内标溶液(250 μg · mL⁻¹ 扎莱普隆) 10 μL, 混匀, 加入乙腈 0.5 mL, 涡流振荡 1 min, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样。

2.4 标准曲线的绘制

取空白血浆 7 份, 分别加入由标准贮备液及乙腈配制的系列标准液适量并混匀, 使血浆中药物浓度分别为 0.38、0.76、1.89、3.78、9.44、23.60、59.00 μg · mL⁻¹, 按“2.3”项方法处理后测定。以 MPA 与内标峰面积的比值(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 0.0424X - 0.0049$ ($r = 0.9994$, $n = 7$)。结果表明, MPA 血浆浓度在 0.38~59.00 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。MPA 的最低检测限为 0.38 μg · mL⁻¹。

2.5 色谱行为

在本试验条件下, MPA 及内标峰形良好, MPA 与内标及血浆中的内源性物质能够较好地分离。MPA、内标保留时间分别约为 8.8、6.7 min。色谱见图 1。

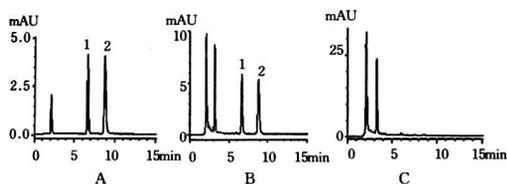


图 1 高效液相色谱

A. MPA 对照品 + 内标; B. 空白血浆 + MPA 对照品 + 内标; C. 空白血浆; 1. 扎莱普隆; 2. MPA

Fig 1 HPLC

A. MPA reference substance spiked with internal standard; B. blank plasma + MPA reference substance + internal standard; C. blank plasma; 1. zaleplon; 2. MPA

2.6 精密度及回收率试验

配制 MPA 低、中、高 (0.76、3.78、23.60 μg · mL⁻¹) 3 种不同浓度含药标准血浆, 按“2.3”项方法处理, 每个浓度进行 5 样本分析, 连续 3 d, 其日内、日间精密度及方法回收率试验结果见表 1。

表 1 精密度及方法回收率试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Precision and methodology recovery of MPA assay ($\bar{x} \pm s$)

| 理论浓度 /μg · mL ⁻¹ | 日内精密度 (n = 5) | | | 日间精密度 (n = 15) | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| | 测得浓度 /μg · mL ⁻¹ | 回收率/% | RSD/% | 测得浓度 /μg · mL ⁻¹ | 回收率/% | RSD/% |
| 0.76 | 0.73 ± 0.04 | 96.41 | 6.00 | 0.74 ± 0.05 | 97.63 | 7.39 |
| 3.78 | 3.37 ± 0.15 | 89.32 | 4.35 | 3.41 ± 0.22 | 90.28 | 6.46 |
| 23.60 | 21.55 ± 0.05 | 91.31 | 5.34 | 21.69 ± 1.05 | 91.91 | 4.86 |

2.7 稳定性试验

配制 0.76、3.78、23.60 μg · mL⁻¹ 系列浓度的血浆标样, 分别于室温和 -20 °C 冰箱中保存。于配制后即刻以及 6、12 h 时按“2.3”项方法操作、测定, 评价血浆样品在室温条件下的稳定性。另在 -20 °C 冰箱中保存 1 个月或经历 3 次冻融循环处理后, 按“2.3”项方法操作, 与即刻测定值进行比较, 评价血浆样品在 -20 °C 冰冻或反复冻融条件下的稳定性。结果, 血浆样品经处理后, 在室温下 12 h 内 MPA 浓度变化 < 10%, 稳定性良好。-20 °C 冰冻 1 个月或经历 3 次冻融循环处理后测定血浆 MPA 浓度的 RSD < 15% (分别为 5.36%~13.43%、4.13%~8.65%), 表明血浆样品经冰冻和 3 次冻融后稳定性良好。

3 临床试验

3.1 受试者选择及样品采集

本院首次接受同种移植术的肾移植患者 12 例 (男性 9 例, 女性 3 例), 年龄 (34.58 ± 0.25) a, 均 > 18 a, < 65 a。患者无可能影响 MMF 的吸收及肝肠循环的严重胃肠道疾病; 未同时服用含铝、镁等的胃黏膜保护剂、制酸剂等可能影响 MMF 吸收的药物; 无严重肝功能异常者。所有肾移植受者均采用三联免疫抑制方案: MMF + CsA/FK506 + Pred。所有参加试验的患者均签署知情同意书。

受试者分别于服药前 0 h 和服药后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12 h 时采集静脉血各 4 mL, 置于 5 mL 肝素抗凝管中, 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 后取血浆, 置于 -20 °C 冰箱中, 直至分析。血药浓度数据用 DAS 2.1.1 药动学软件处理, 以计算有关药动学参数。

3.2 药-时曲线

12 例肾移植患者术后口服 MMF (500 mg, bid) 的多剂量平均药-时曲线见图 2。

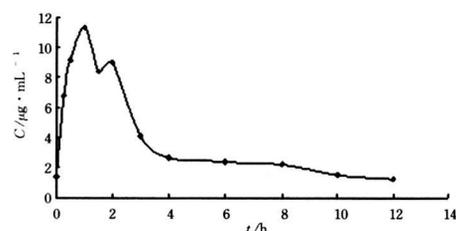


图 2 12 例受试者口服 MMF (500 mg, bid) 的平均药-时曲线

Fig 2 Mean concentration-time curve for 12 kidney transplantation patients after oral administration of MMF (500 mg, bid)

3.3 主要药动学参数

将 12 例肾移植患者口服 MMF 后的 MPA 血药浓度数据用 DAS 2.1.1 药动学软件进行处理, 计算药动学参数, 结果见表 2。表 2 显示, 各受试者的药动学参数个体差异很大, 其中 C_{max} 为 11.73~39.62 μg · mL⁻¹, AUC_{0-12} 为 17.84~59.14 μg · h · mL⁻¹。其中, 5 位受试者有明显的肝肠循环, 其时间为 4~10 h, 其肝肠循环分别占总 AUC 的 25.2%、55.8%、35.8%、28.2% 和 40.3%。由于本试验的样本量少, 患者个体差异较大, 准确的 MPA 在我国肾移植患者体内的药动学需要进一步加大样本的研究。

4 讨论

本文建立的 MPA 血浆浓度测定方法, 以扎莱普隆为内

HPLC 手性固定相法测定血浆中氟西汀对映体的浓度

郑志昌, 施宪宝, 杨继红, 孙为民(贵阳医学院附属医院, 贵阳市 550004)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2008)17-1308-03

摘要 目的:建立以高效液相色谱手性固定相法测定血浆中氟西汀对映体浓度的方法。方法:采用 Chirobiotic V 手性色谱柱,流动相为甲醇-冰醋酸-三乙胺(100:0.04:0.04),检测波长为 226 nm,流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,内标为氯氮平。结果:R-去甲氟西汀和 S-去甲氟西汀对氟西汀对映体和内标的分离没有干扰。R-氟西汀、S-氟西汀检测浓度分别在 $8.1\sim 432(r=0.9998)$ 、 $10.8\sim 432(r=0.9992)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好;其相对回收率分别为 $97.2\%\sim 101.9\%$ 和 $98.7\%\sim 102.2\%$,日内 RSD 分别为 $2.6\%\sim 5.3\%$ 和 $2.1\%\sim 6.7\%$,日间 RSD 分别为 $7.7\%\sim 8.9\%$ 和 $8.0\%\sim 10.6\%$ 。结论:本试验所建立的方法简便、可靠、灵敏度高,可用于血浆中 R-氟西汀和 S-氟西汀的血药浓度测定及对映体的药动学研究。

关键词 高效液相色谱法;手性固定相法;氟西汀;对映体;血药浓度

Determination of Enantiomers of Fluoxetine in Plasma by HPLC- Chiral Stationary Phase

ZHENG Zhi-chang, SHI Xian-bao, YANG Ji-hong, SUN Wei-min(The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an HPLC- CSP (chiral stationary phase) for the determination of plasma levels of enantiomers of fluoxetine. METHODS: Enantiomers of fluoxetine were separated on a Chirobiotic V column. The mobile phase consisted of methanol - acetic acid - triethylamine (100: 0.04: 0.04) with a flow rate of $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The detection wavelength was set at 226 nm. Clozapine was used as the internal standard. RESULTS: Under this chromatographic condition, both R- norfluoxetine and S- norfluoxetine had no interference on the enantiomers of fluoxetine and the internal standard. The calibration curve was linear in the range of $8.1\sim 432\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$) for R- enantiomer and in the range of $10.8\sim 432\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9992$) for S- enantiomer. The relative recovery of R- fluoxetine and S- fluoxetine in plasma were $97.2\%\sim 101.9\%$ and $98.7\%\sim 102.2\%$, respectively. RSD of intraday and interday ranged from 2.6% to 5.3% and from 7.7% to 8.9% for R- fluoxetine, and from 2.1% to 6.7% and from 8.0% to 10.6% for S- fuoxetine, respectively. CONCLUSION: The method is simple, reliable and sensitive, and applicable for the determination and pharmacokinetic study of the enantiomers of fluoxetine in plasma.

KEY WORDS HPLC; Chiral stationary phase; Fluoxetine; Enantiomers; Blood drug concentration

表 2 12 例受试者口服 MMF(500 mg, bid) 的药动学参数
Tab 2 Pharmacokinetic parameters for 12 kidney transplantation patients after oval administration of MMF(500 mg, bid)

| 参数 | 数值 |
|--|------------------|
| $C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 19.62 ± 9.01 |
| $C_{\min}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 1.46 ± 0.87 |
| t_{\max}/h | 1.10 ± 0.61 |
| $AUC_{0-12}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 44.52 ± 16.93 |
| $AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 69.78 ± 71.08 |
| $t_{1/2}/\text{h}$ | 9.53 ± 11.10 |

标,每个样品测定时间 < 10 min,处理方法采用乙腈蛋白沉淀法,方便、快捷、准确,适合应用于 MPA 药动学的研究。

12 位受试者中,有 5 位有明显的肝肠循环,但在平均药-时曲线中未能体现;在平均药-时曲线中有双峰现象,其原因为受试者的达峰时间个体差异较大(0.5~2 h)。国外文献报道的 MPA 肝肠循环时间为 6~12 h,国内无详细报道,但本研究中的 5 位患者中有 2 位患者肝肠循环时间从 4 h 开始,6 h 已

达到第 2 峰的峰浓度,这样的结果提示 MPA 肝肠循环可能与入种或其他因素有关。

参考文献

- [1] 石茹,文爱东,赵磊,等.HPLC 法测定肾脏移植患者血浆中霉酚酸浓度及其药代动力学[J]. 第四军医大学学报,2004,25(15):1416.
- [2] 师少军,李忠芳,万元胜,等.HPLC 法测定人血浆中霉酚酸的浓度及药动学研究[J]. 中国药房,2007,18(20):1558.
- [3] 戴青,陈勇川,夏培元.HPLC 法同时测定人血浆中霉酚酸与霉酚酸葡萄糖苷酸的浓度[J]. 中国药房,2007,18(14):1081.
- [4] 南峰,余勤,梁茂植,等.RP-HPLC 法测定肾移植病人血浆中霉酚酸浓度及其应用[J]. 药物分析杂志,2004,24(3):275.
- [5] Zheng J, Yan Z, Jie S, et al, Simple high-performance liquid chromatographic assay, with post column derivatization for simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma and urine[J]. *Chromatographia*, 2005, 62(7):363.

(收稿日期:2008-01-30 修回日期:2008-04-17)

副主任药师,硕士。研究方向:体内药物分析、药事管理。电话:0851-6833359, E-mail: zhengzc@hotmail.com