

HPLC法测定狼疮肾病患者口服吗替麦考酚酯后的血药浓度

徐 怡^{1,2*}, 陈 宪², 周 蕾², 袁恒杰², 李正翔², 巩 路², 娄建石^{1#}(1.天津医科大学基础医学院, 天津 300071; 2.天津医科大学总医院, 天津 300052)

中图分类号 R969.1; R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)18-1665-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.18.13

摘要 目的:建立测定狼疮肾病患者口服吗替麦考酚酯后血药浓度的方法。方法:狼疮肾病患者血样处理后采用高效液相色谱法测定吗替麦考酚酯体内代谢物霉酚酸。色谱柱为SGE Protocol C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.01%磷酸(23:37:40, V/V/V),检测波长为216 nm,流速为1.0 ml/min,进样量为20 μl,柱温为30 ℃。结果:霉酚酸血药浓度在0.125~10 mg/L范围内线性关系良好($r=0.9999$);方法回收率为98.67%~104.31%;萃取回收率为83.43%~97.54%,内标(尼美舒利)萃取回收率为79.35%;日内、日间RSD分别为2.6%~7.7%、2.3%~8.5%。结论:本法简单、准确,可用于狼疮肾病患者服用吗替麦考酚酯后霉酚酸的药浓度检测。

关键词 吗替麦考酚酯;高效液相色谱法;狼疮肾病;霉酚酸

Determination of the Blood Concentration of Mycophenolate Mofetil in Lupus Nephritis Patients by HPLC

XU Yi^{1,2}, CHEN Xian², ZHOU Lei², YUAN Heng-jie², LI Zheng-xiang², GONG Lu², LOU Jian-shi¹(1. Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300071, China; 2. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the blood concentration of mycophenolate mofetil (MMF) in the lupus nephritis (LN) patients. METHODS: HPLC was used for determining MMF metabolite mycophenolic acid (MPA) after blood sample of LN patients treated. SGE Protocol C₁₈ column was used with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.01% phosphoric acid (23:37:40, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 216 nm, and injection volume was 20 μl. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of MPA was 0.125-10 mg/L ($r=0.9999$) with method recovery of 98.67%-104.31% and extraction recovery of 83.43%-97.54%. The extraction recovery of internal standard (nimesulide) was 79.35%. RSDs of inter-day and intra-day were 2.6%-7.7% and 2.3%-8.5%, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for blood concentrations monitoring of MPA in LN patients after taking MMF.

KEY WORDS Mycophenolate mofetil; HPLC; Lupus nephropathy; Mycophenolic acid

相互作用^[6-7]。

CYP2D位于第22号染色体上,由CYP2D6、CYP2D7P、CYP2D8P 3个基因组构成,CYP2D6为其中唯一的真基因,广泛分布于肝、肠、肾、脑等组织之中。CYP2D6参与许多药物的代谢过程,对药物的临床疗效及毒副作用有一定的影响;同时CYP2D6基因受种族差异的影响,存在明显的个体差异,如转运体基因、受体基因、靶体基因的差异^[8-9]。因此在给药时需采用个体化给药方式,综合考虑个体的差异,预测用药风险^[10]。

本试验研究了泮托拉唑药动学与CYP2D6*10基因型的关系,结果表明不同CYP2D6*10基因型对个体泮托拉唑血药浓度没有显著影响。本研究还表明,3种基因型之间 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-12h} 虽有一些差异,但差异无统计学意义。因此,笔者认为应用泮托拉唑时无需考虑CYP2D6*10基因多态性的影响。

参考文献

- [1] 和凡,赵立子,毕惠嫦,等.6种细胞色素P₄₅₀酶亚型特异性底物的酶动力学研究[J].中国药房,2009,20(17):1310.
- [2] 李瑜,田鑫,乔海灵,等.泮托拉唑在不同CYP2C19基因型人体内的药动学[J].中国药理学杂志,2008,43(19):1495.

* 药师。研究方向:医院药学。电话:022-60362235。E-mail: selenaxy6666@163.com

通信作者:教授。研究方向:心血管药理学。电话:022-83336686。E-mail: jianshilou@163.com

- [3] 李军,部敬顺,张鉴.注射用泮托拉唑钠的稳定性考察[J].中国药房,2005,16(21):1655.
- [4] Blume H, Donath F, Warnke A, et al. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors[J]. *Drug Saf*, 2006, 29(9):769.
- [5] Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the eradication of *Helicobacter pylori*[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38(3):243.
- [6] Cheer SM, Prakash A, Faulds D, et al. Pantoprazole: an update of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acid-related disorders[J]. *Drugs*, 2003, 63(1):101.
- [7] Blume H, Donath F, Warnke A, et al. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors[J]. *Drug Saf*, 2006, 29(9):769.
- [8] de Leon J, Susce MT, Murray-Carmichael E. The AmpliChip CYP450 genotyping test: integrating a new clinical tool[J]. *Mol Diagn Ther*, 2006, 10(3):135.
- [9] 李健,文思远,王睿,等.细胞色素P₄₅₀ CYP2C9基因多态性对甲苯磺丁脲代谢动力学的影响[J].药理学报,2005, 40(8):695.
- [10] 范岚,王果,涂江华,等.表观遗传药理学与药物反应个体差异[J].中国药理学通报,2009,25(8):981.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-01-28)

狼疮肾病(Lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)累及肾脏所引起的一种免疫复合物性肾炎,表现有蛋白尿、血尿或伴肾功能不全^[1]。传统LN的治疗多采用激素联合环磷酰胺的方法,大多数可获得缓解,但对于部分LN患者,传统治疗方法仍然无效,性腺抑制的副作用较为突出。所以寻求新的治疗药物具有重要的临床意义。吗替麦考酚酯(Mycophenolate mofetil, MMF)是一种新型的免疫抑制剂,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^[2]。临床观察证实,MMF不良反应少,对中国LN患者具良好疗效及安全性。目前国内尚无明确的MMF剂量与血药浓度范围。患者服用MMF后,所测得的MPA血药浓度的个体差异大。本文采用高效液相色谱(HPLC)法快速测定人血浆中MPA的浓度,对LN患者MPA血药浓度进行监测。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);YKH-III 型液体快速混合器(江西医疗器械厂);H1650 型台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);KQ-200KDE 型大功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AR2140 型电子分析天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];BS60 型电热三用水箱(北京医疗设备厂);SHB-III A 型循环水式多用真空泵(陕西太康生物科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

MPA 标准品(SIGMA-ALDRICH,批号:011M4007V,纯度:>99%);MMF(上海罗氏制药有限公司分装,批号:SH0870,规格:每片 250 mg);内标:尼美舒利(中国食品药品检定研究院,批号:1012139);甲醇和乙腈均为色谱纯,磷酸和乙醚等试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SGE Protecol C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.01%磷酸(23:37:40, V/V/V);柱温:30 ℃;流速:1.0 ml/min;检测波长:216 nm;进样量:20 μl。

2.2 MPA 和内标溶液的制备

准确称取 MPA 标准品 25 mg,用甲醇稀释定容至 25 ml,配制成浓度为 1 000 mg/L 的标准贮备液作为母液;分别取适量体积,加入甲醇配制成质量浓度分别为 500、200、50、25、12.5 mg/L 的标准溶液,4 ℃ 冰箱保存。另准确称取尼美舒利 30 mg,用甲醇稀释定容至 10 ml,配制成 3 000 mg/L 的贮备液,临用前再用甲醇稀释至所需质量浓度。

2.3 血液样品处理

取人全血 1.0 ml 加至添加抗凝剂的具塞试管中,静置,12 000 r/min 离心 10 min,分离得到血浆样品,于 -80 ℃ 冷冻保存。测定时,精密吸取血浆 1 ml 置 10 ml 具塞离心管中,精密加入 30 mg/L 的尼美舒利内标溶液 10 μl,加入磷酸 5 μl 酸化,涡旋混合 1 min,加入乙醚 1 ml 萃取 2 次,振荡混合 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上层有机相于另一个 1.5 ml 离心管中,合并、挥干乙醚层,残渣用流动相 100 μl 复溶,12 000 r/min 离心 10 min,取 20 μl 进样。

2.4 方法专属性考察

在“2.1”项色谱条件下,内标尼美舒利的保留时间为 12.427 min,MPA 的保留时间为 10.586 min,MPA 与内标及血

浆中的干扰物质能得到良好分离,见图 1。

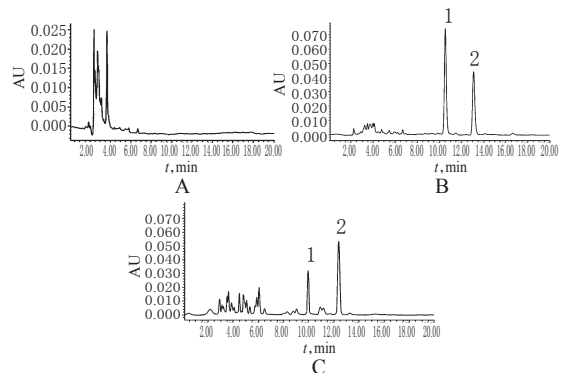


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 样品血浆; C. 患者口服 MMF 后血浆+内标; 1. MPA; 2. 尼美舒利

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. sample plasma; C. plasma after oral administration of MMF + internal standard; 1. MPA; 2. nimesulide

2.5 标准曲线制备

取空白血浆 5 份,分别准确加入由 MPA 系列标准溶液及内标溶液适量,混匀,使血浆中 MPA 质量浓度分别为 0.125、0.5、2.0、5.0、10.0 mg/L,内标质量浓度为 30 mg/L,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,记录色谱。以 MPA 峰面积与内标峰面积的比值(y)对质量浓度(x)作图,进行回归分析,得回归方程为 $y=1.042 5x+0.035 2$ ($r=0.999 9$)。结果表明,MPA 血药浓度在 0.125~10.0 mg/L 范围内线性关系良好。

2.6 内标萃取回收率

取空白血浆 1 ml,加入质量浓度为 30 mg/L 内标溶液 10 μl,配制成含内标的血浆样品,按“2.3”项方法处理血样,进样 20 μl,记录峰面积;另外,直接用质量浓度为 30 mg/L 内标溶液进样 20 μl,记录峰面积,以二者比值计算内标萃取回收率。结果分别为 82.56%、77.51%、79.20%、78.53%、78.93%,平均值为 79.35%,RSD 为 2.4%。

2.7 萃取回收率

在空白血浆 1 ml 中加入一定量的 MPA 标准溶液,配成低、中、高 3 个质量浓度的血浆样品,按“2.3”项方法处理,进样 20 μl,记录峰面积;另外直接用相应质量浓度的 MPA 标准溶液进样 20 μl,记录峰面积,以二者比值计算 MPA 萃取回收率,结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果

Tab 1 Results of recovery and precision test

质量浓度, mg/L	萃取回收率		方法回收率		日内 RSD, %	日间 RSD, %
	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %		
0.5	97.54	6.1	104.31	8.5	7.7	8.5
2.0	83.43	1.9	100.12	7.7	5.3	7.3
5.0	85.17	4.7	98.67	2.3	2.6	2.3

2.8 方法回收率及精密度试验

在 1 ml 空白血浆中加入适量 MPA 溶液和内标溶液,使 MPA 的质量浓度为 0.5、2.0、5.0 mg/L,内标质量浓度为 30 mg/L,按“2.3”项方法处理血样,进样分析,记录峰面积,计算方法回收率。另于单日内重复测定 5 次,考察日内精密度;重复测定 5 d,考察日间精密度,结果见表 1。

2.9 稳定性试验

本试验曾就MPA在血浆中的稳定性进行研究,结果样品在冷冻前及-20℃冷冻24h、30d后室温自然解冻,含量均未发生改变,表明MPA在血浆中稳定。

2.10 临床患者血药浓度测定

9例临床患者口服MMF片1g,每日2次,分别于服药前(0时)和给药后0.5、1、2、3、4h时取血,分离血浆。取血浆1ml,按“2.3”项下方法处理血样,进样分析,测定血药浓度,结果见表2。LN患者MPA平均药-时曲线见图2。

表2 LN患者MPA血药浓度测定结果(mg/L)

Tab 2 Results of the blood concentration of MPA in LN patients (mg/L)

患者编号	取样时间, h					
	0	0.5	1	2	3	4
P1	0	7.05	2.44	33.32	36.25	12.55
P2	0	8.21	6.82	13.63	15.28	6.21
P3	0	3.47	2.05	1.13	0.10	2.65
P4	0	13.35	15.39	1.82	3.70	1.63
P5	0	10.72	13.24	15.98	19.95	18.57
P6	0	15.59	12.09	13.02	17.21	13.54
P7	0	27.06	18.64	14.56	28.68	7.86
P8	0	8.89	6.57	9.76	10.34	5.35
P9	0	2.74	4.57	7.50	8.23	2.35

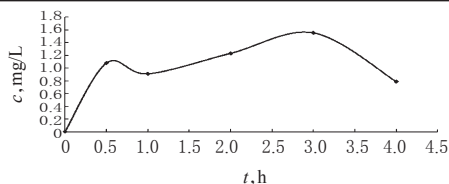


图2 LN患者MPA平均药-时曲线

Fig 2 Mean blood concentration-time curves of MPA in LN patients

3 讨论

试验中曾预试过的流动相乙腈-0.01%磷酸(pH=3.3)(34:66, V/V),当乙腈比例增大时,出峰时间早,拖尾严重,与其他杂质峰达不到完全分离;磷酸盐缓冲液比例增大时,出峰时间拖后,不易操作。最后确定甲醇-乙腈-0.01%磷酸为流动相。文献中^[3-5]以HPLC法测定MPA所用流动相有不同比例、不同pH值下的乙腈-磷酸盐系统。本流动相用乙腈-甲醇,加入磷酸,调节不同pH值进行比例选择,最终选择出较理想的分离条件。通过试验,用磷酸调pH为3.1左右,甲醇-乙腈-0.01%磷酸(23:37:40, V/V/V)作为流动相,MPA的保留时间约为10min左右,符合试验要求。

在实验室现有的内标物中,笔者针对MPA的出峰时间和空白血样的杂质峰影响,对萘普生、尼美舒利、环丙沙星、头孢地嗪、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢他啶、头孢吡肟、头孢曲松、普罗帕酮^[6]进行内标选择。其中,尼美舒利在12.427min出峰,较靠近MPA的色谱峰,在空白血浆中又能完全分离,故本试验选择尼美舒利作为内标。

MMF口服后被迅速吸收,并代谢为活性成分MPA和无活性成分霉酚酸葡萄糖苷酸(Mycophenolic acid glucuronide, MPAG)^[7];口服平均生物利用度为静脉注射的94%(根据MPA曲线下面积),口服后在循环中测不出MMF。在临床有效浓度下,约97%的MPA与血浆白蛋白结合。MMF代谢以后有极少量MPA(<1%)从尿液排出,多数(87%)以MPAG的形式从

尿液排出。MMF治疗LN的报道较多,但观察期短,其治疗优化方案尚处于起步及摸索阶段。肾功能损伤会降低MMF的主要代谢产物MPAG的清除率,引起MPA的药-时曲线下面积增加。血浆蛋白浓度的减少和内源性物质的蛋白竞争性,可降低MPA的蛋白结合率,使MPA的药-时曲线下面积增加。LN本身具有复杂性和多样性,使得LN患者服用MMF的血药浓度个体差异较大,因此对于此类患者血药浓度的检测是必要的。如本试验结果所示,9名患者药-时曲线符合MPA药动学曲线^[8-11]。患者服药后0~4h有双峰现象,相关文献^[9]有报道平均药-时曲线出现双峰现象,是由于患者服药后的 t_{max} 和 c_{max} 的不同造成的,但是本试验结果的双峰现象也存在于单一患者。有文献^[10-11]报道双峰现象的出现可能系由于存在肠道的多部位吸收,即在肠道各部分不同的pH环境下,药物的吸收程度不同;此外,胃部在进食和未进食情况下对药物的排空也不同,考虑可能存在进食干扰药物从胃部排空的原因。本试验由于患者的依从性,不能做到更密集的采血,样本数量有限,针对这种双峰现象的出现,笔者拟收集更多的样本,进行进一步研究。

综上,对于LN类似的自身免疫性疾病的治疗还处于初步研究阶段,具有很大的发展前景。目前国内尚无明确的剂量与有效血药浓度范围,还需要更多相关的研究。

参考文献

- [1] Mok CC. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options[J]. *Int J Womens Health*, 2012, 4:213.
- [2] Appel GB. New and future therapies for lupus nephritis[J]. *Cleve Clin J Med*, 2012, 79(2):134.
- [3] 陈岷,刘蕾,彭丹涛,等.重症肌无力患者吗替麦考酚酯的血药浓度监测[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(8):615.
- [4] 揭旭日,陈诗强,陶丽菊,等.吗替麦考酚酯联合糖皮质激素治疗伴抗核抗体阳性难治性特发性血小板减少性紫癜[J]. *广东医学*, 2011, 32(22):114.
- [5] 李健康,宋颖,贾艳艳,等.HPLC法测定人血浆中吗替麦考酚酸浓度的不确定度评定[J]. *中国药师*, 2012, 15(5):656.
- [6] 谭志荣,欧阳冬生,郭栋,等.简单灵敏的高效液相色谱法测定人血浆中吗替麦考酚酸的浓度[J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(10):1437.
- [7] de Winter BC, van Gelder T, Sombogaard F, et al. Pharmacokinetic role of protein binding of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in renal transplant recipients[J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2009, 36(6):541.
- [8] 邓素雄,费继光,刘龙山,等.不同剂型吗替麦考酚酯对肾移植后早期受者药物代谢动力学和疗效比较[J]. *中华移植杂志:电子版*, 2009, 3(3):200.
- [9] 许亮,蔡明,金海龙,等.麦考酚钠肠溶片与吗替麦考酚酯胶囊联合质子泵抑制剂对肾移植患者霉酚酸暴露的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(53):9901.
- [10] 叶丽卡,谢志红,王若伦,等.HPLC法测定肾移植患者血浆中霉酚酸的浓度[J]. *中国药房*, 2008, 19(17):1306.
- [11] 叶丽卡,谢志红.霉酚酸的药动学及其影响因素[J]. *今日药学*, 2009, 19(3):34.

(收稿日期:2013-02-16 修回日期:2013-03-03)