

HPLC法测定炎症性肠病患者红细胞中硫鸟嘌呤核苷酸浓度

黄燕^{1*}, 夏泉¹, 汪燕燕¹, 许杜娟^{1#}, 胡乃中², 胡静², 梅俏², 许建明²(1.安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022;2.安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022)

中图分类号 R969.1;R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)26-2436-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.26.14

摘要 目的:测定硫唑嘌呤与6-巯基嘌呤的活性代谢产物硫鸟嘌呤核苷酸(6-TGNs)在红细胞内的浓度,为提高临床疗效和降低副作用提供参考。方法:红细胞稀释液经高氯酸沉淀,6-TGNs在酸性条件下加热水解生成6-硫鸟嘌呤(6-TG),采用高效液相色谱法测定其含量。色谱柱为Hypersil ODS2,流动相为乙腈-20 mmol/L磷酸二氢钾溶液(磷酸调节pH 3.3)(5:95);流速为1.0 ml/min;柱温为30℃;检测波长为340 nm,以外标法定量。结果:6-TGNs在上述条件下水解生成6-TG,在7.87~787.40 pmol/(8×10⁸)红细胞浓度范围内线性关系良好($r=0.9997$);日内及日间RSD在0.46%~7.64%之间;平均方法回收率在99.10%~102.07%之间。结论:本方法准确,专属性和稳定性较好,灵敏度高,适用于接受硫唑嘌呤或6-巯基嘌呤治疗的炎症性肠病患者红细胞中6-TGNs浓度监测,可为临床在实施个体化治疗时提供参考。

关键词 炎症性肠病;硫唑嘌呤;6-巯基嘌呤;硫鸟嘌呤核苷酸;高效液相色谱法;血药浓度

Determination of 6-TGNs Concentrations in Red Blood Cells from Patients with Inflammatory Bowel Disease by HPLC

HUANG Yan¹, XIA Quan¹, WANG Yan-yan¹, XU Du-juan¹, HU Nai-zhong², HU Jing², MEI Qiao², XU Jian-ming²
(1. Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Dept. of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the concentrations of 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) in RBC, and to provide reference for improving clinical efficacy and reducing adverse drugs reaction. METHODS: The red blood cell samples were deproteinated by perchloric acid, 6-TGNs were hydrolyzed to 6-thioguanine (6-TG) by heating under acidic conditions. HPLC method was adopted. The separation was performed on a Hypersil ODS2 column with mobile phase consisted of acetonitrile-20 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 3.3 using phosphoric acid)(5:95) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 340 nm and column temperature was 30℃. RESULTS: The linear relationship range was 7.87-787.40 pmol/(8×10⁸) RBC for 6-TG ($r=0.9997$); the RSDs of intra-day and inter-day were between 0.46% and 7.64%; mean recoveries were 99.10%-102.07%. CONCLUSIONS: The method is accurate, specific, stable and sensitive, which could be applied to monitor 6-TGNs concentration in red blood cells from patients under azathioprine or 6-mercaptopurine therapy.

KEY WORDS Inflammatory bowel disease; Azathioprine; 6-mercaptopurine; Thioguanine nucleotide; HPLC; Blood concentration

硫唑嘌呤(Azathioprine, AZA)和6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)等嘌呤类药物为非特异性的免疫抑制剂,可用于急性慢性白血病、自身免疫性疾病如慢性炎症性疾病的治疗^[1-2]。AZA和6-MP为无活性的前体药物,需经体内代谢转变为硫鸟嘌呤核苷酸(6-TGNs)才能发挥疗效,这一代谢过程存在较大的个体差异。文献报道,建议体内6-TGNs的浓度在250~500 pmol/(8×10⁸)红细胞(RBC)计数^[3]。高水平的6-TGNs会增加骨髓毒性的风险,因此需要监测服用AZA或6-MP患者红细胞内6-TGNs浓度,通过调整AZA或6-MP给药剂量,在提高疗效的同时减少不良反应的发生^[4-5]。炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)。AZA作为诱导缓解和维持治疗IBD的常用药,剂量为1.5~2.5 mg/(kg·d)。但部分患者治疗后临床症状无缓解,甚至出现骨髓抑制。此研究旨在通过建立一种简单快速的监测方法,检测患者RBC内6-TGNs浓度,为临床接受AZA或6-MP

治疗的IBD患者的个体化治疗及用药安全提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD)(美国Agilent公司);FA2104电子天平(上海天平仪器厂);25BTS电子天平(德国塞多利斯公司);TGL-185小型低温离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);XW-80A涡旋振荡器(上海医科大学仪器厂);HH数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);-80℃超低温冰箱DW-HL328(中科美菱低温科技有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

6-硫鸟嘌呤(6-TG,美国Sigma公司);二巯代苏糖醇(DTT,美国Biosharp公司);生理盐水(中国大冢制药有限公司);乙腈为色谱纯,磷酸、高氯酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯;水为灭菌注射用水。

1.3 血样

健康人全血(供质控用,肝素抗凝静脉血);检测样本(服用AZA或6-MP患者全血,肝素抗凝静脉血,已知RBC计数及红细胞比容)。

2 方法^[6]与结果

* 药师。研究方向:治疗药物浓度监测。电话:0551-62922421。
E-mail:hyayd123@126.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0551-62922442。E-mail:xudujuan6365@yahoo.com.cn

2.1 色谱条件

色谱柱:大连依利特 Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-20 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调节 pH 3.3)(5:95);流速:1.0 ml/min;检测波长:340 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在此色谱条件下,6-TG 的出峰时间在 4.6 min,见图 1。

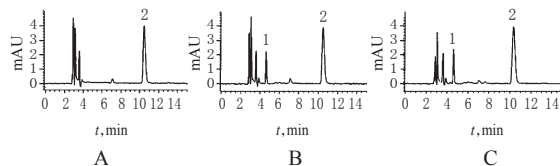


图 1 RBC 中 6-TG 的 HPLC 色谱图

A. 空白 RBC; B. 空白 RBC+6-TG; C. 患者样本; 1. 6-TG; 2. DTT

Fig 1 HPLC chromatograms of 6-TG in RBC

A. blank RBC; B. blank RBC+6-TG; C. sample; 1. 6-TG; 2. DTT

2.2 6-TG 贮备液的配制

准确称取 6-TG 对照品适量,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液配制成 6-TG 贮备液,浓度为 100 mmol/L,于 -80 ℃ 冰箱内保存。临用时用灭菌注射用水稀释成所需浓度的工作液。

2.3 RBC 稀释液的配制

精密取肝素抗凝静脉血 1 ml 于离心管中,4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min,弃上层血浆;RBC 加等体积生理盐水洗涤两次,同上离心,弃上层液。精密吸取 RBC 100 μl,加入 20 mmol/L 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)200 μl,涡旋混匀 1 min,即得。RBC 稀释液置于 -80 ℃ 冰箱内保存备用。

表 1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($\bar{x} \pm s$)

加入量, pmol/(8×10 ⁸) RBC	日内精密度		日间精密度		方法回收率, %
	测量值, pmol/(8×10 ⁸) RBC	RSD, %	测量值, pmol/(8×10 ⁸) RBC	RSD, %	
39.37	37.71 ± 1.44	3.81	36.21 ± 2.76	7.64	101.35 ± 3.25
157.48	153.31 ± 4.25	2.77	148.39 ± 5.31	3.58	99.10 ± 4.57
629.92	630.22 ± 2.92	0.46	631.35 ± 3.37	0.53	102.07 ± 3.89

2.8 稳定性试验

配制 39.37、157.48、629.92 pmol/(8×10⁸) RBC 3 个浓度的 6-TG RBC 稀释液于 -80 ℃ 冰箱中保存,0、24、48、72 h 后,按“2.4”项下方法处理,考察样品在 -80 ℃ 条件保存的稳定性。结果表明,6-TG RBC 稀释液于 -80 ℃ 冰箱中保存 72 h 仍能保持稳定(RSD 在 3.65%~6.71%之间)。

表 2 炎症性肠病患者 RBC 中的 6-TGN 浓度

Tab 2 Concentration of RBC 6-TGN in patients with inflammatory bowel disease

患者编号	性别	年龄, 岁	AZA 剂量, mg/d	白细胞计数, 6×10 ⁹ L ⁻¹	6-TGN 浓度, pmol/(8×10 ⁸) RBC
1	男性	41	50	4.82	148.46
2	男性	44	50	7.78	172.52
3	女性	52	50	6.56	154.53
4	女性	25	50	7.90	190.92
5	女性	38	50	4.88	327.98
6	男性	37	100	4.54	197.53
7	女性	50	100	7.62	452.45
8	男性	35	100	8.15	218.63
9	男性	46	100	-	313.59
10	男性	30	150	6.04	701.68

6-TGNs 浓度存在较大差异,10 例患者中暂未出现骨髓毒性。经随访了解,1 例患者浓度达到治疗浓度[701.68 pmol/(8×10⁸) RBC],但疗效不佳,可考虑该患者对 AZA 治疗无效,可建议更换药物。

3 讨论

本检测方法的原理是在高氯酸的酸性条件下,通过加热

2.4 样品处理

RBC 稀释液加入 0.5 mmol/L DTT 150 μl、70% 高氯酸 50 μl,涡旋混合 2 min,4 ℃ 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液移至另一离心管,100 ℃ 水浴加热 45 min。水浴后于冰水中冷却,再次以 14 000 r/min 离心 10 min。按“2.1”项色谱条件,取上清液 20 μl 进样。

2.5 专属性考察

分别取 6 个不同个体的空白全血(肝素抗凝静脉血),按“2.4”项下方法处理后按“2.1”项色谱条件,取上清液 20 μl 进样。结果,6-TG 保留时间处无干扰,见图 1。

2.6 标准曲线的制备

于空白 RBC 稀释液中分别精密加入 6-TG 系列工作液(浓度为 1、5、10、20、40、80、100 mmol/L),按“2.4”项下方法操作。浓度相当于 7.87、39.37、78.74、157.48、314.96、629.92、787.40 pmol/(8×10⁸) RBC。最终以外标法定量。以样品峰面积(A)对 6-TG 浓度(c)作加权线性回归,得方程 A=0.022 3c-0.032 5 (r=0.999 7)。结果表明,6-TG 在 7.87~787.40 pmol/(8×10⁸) RBC 检测浓度范围内线性关系良好。

2.7 回收率及精密度试验

配制 39.37、157.48、629.92 pmol/(8×10⁸) RBC 3 个浓度的 6-TG RBC 稀释液,分别按“2.4”项下方法处理后测定,所得峰面积代入标准曲线,计算得 6-TG 的回收率及日内、日间精密度。其中日内及日间精密度的 RSD 在 0.46%~7.64% 之间,方法回收率在 99.10%~102.07% 之间,该方法符合生物样品分析要求,结果见表 1。

2.9 样品测定

10 例长期服用 AZA 的 IBD 患者(AZA 日剂量为 50、100、150 mg),分别测定其服药后 RBC 内 6-TGNs 的浓度,按“2.3”、“2.4”项下方法处理,平均值为(287.83 ± 174.31) pmol/(8×10⁸) RBC(RBC 计数依据患者血常规参数推算),结果见表 2。

由表 2 可知,服用相同剂量 AZA 的 IBD 患者 RBC 中

使 6-TGNs 上的磷酸基团水解、脱落成 6-TG,通过外标定量计算 6-TG 浓度,从而对 6-TGNs 的浓度进行定量。与文献报道^[6]的方法相比,具有以下特点:(1)操作过程简化;(2)取样量少。对服用 AZA 的 IBD 患者的样本进行了监测,如能将此项监测推广到临床运用并与临床疗效及不良反应相结合,将对实施个体化用药具有参考价值。

种族对移植患者他克莫司药动学的影响

咎双江^{1*},朱立勤^{2#},段文越³,章袁⁴(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300070;2.天津市第一中心医院,天津 300192;3.天津中医药大学,天津 300193;4.天津医科大学,天津 300070)

中图分类号 R969.1;R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)26-2438-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.26.15

摘要 目的:考察口服他克莫司在不同种族移植患者群体中的药动学差异,建立他克莫司药动学模型,为制订他克莫司用于不同移植群体的个体化治疗方案提供科学依据。方法:检索PubMed与万方数据库中关于口服他克莫司药动学的文献,从文献中提取该药在移植患者中的药动学数据,采用非线性混合效应模型(NONMEM)法对获得数据进行统计分析,建立群体药动学模型,并对模型进行图形评价和Bootstrap法验证。结果:他克莫司在移植患者中的群体药动学过程符合一室模型。他克莫司在黄种人中表观清除率(CL/F)为15.7 L/h,高于白种人(11.1 L/h)。他克莫司清除率群体药动学模型为: $CL=[15.7 \times Race + 11.1 \times (1 - Race)] \times (Dose/10)^{0.116}$ 。结论:种族因素会影响移植患者他克莫司的药动学过程。

关键词 种族;他克莫司;群体药动学;非线性混合效应模型法

Effects of Race on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Transplantation Patients

ZAN Shuang-jiang¹, ZHU Li-qin², DUAN Wen-yue³, ZHANG Yuan⁴ (1. First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 4. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the population pharmacokinetics of the oral tacrolimus among transplant recipients of different ethnic background, to establish pharmacokinetics model of tacrolimus and provide scientific reference for individual therapy scheme of tacrolimus in different transplant recipients. METHODS: The literatures about the pharmacokinetics of tacrolimus were retrieved from PubMed and Wangfang database, and related pharmacokinetics data of transplant recipients were collected from published clinical trials literatures. Nonlinear mixed effects model (NONMEM) was used to analyze the collected data statistically to establish population pharmacokinetics model. Pattern evaluation and Bootstrap validation of model were conducted. RESULTS: The population pharmacokinetics of tacrolimus was in line with one-compartment model. The apparent clearance (CL/F) of tacrolimus was lower in the Caucasian subjects (11.1 L/h) than in the Asian subjects (15.7 L/h). The population pharmacokinetics of apparent clearance of tacrolimus: $CL=[15.7 \times Race + 11.1 \times (1 - Race)] \times (Dose/10)^{0.116}$. CONCLUSIONS: Population pharmacokinetics of tacrolimus can be affected by race.

KEY WORDS Race; Tacrolimus; Population pharmacokinetics; Nonlinear mixed effect model

试验中加入DTT是为了保护巯基基团不被氧化。笔者取3份不同RBC血样考察DTT加入量对浓度检测的影响,结果表明DTT加入150 μl时,提取回收率最高。此外,本方法是通过6-TGNs的水解产物6-TG定量,因此水解是否充分十分重要。试验中考察了两种加热方式(水浴100℃和烘箱100℃加热)对浓度测定的影响,其结果表明水浴能够使6-TGNs水解充分,而烘箱加热的提取回收率较低。

目前,国外在临床应用此类药物治疗过程中,通过同时测定代谢酶硫嘌呤甲基转移酶(Thiopurine methyltransferase, TPMT)活性和6-TGNs浓度进行临床个体化用药的指导,同时发现RBC中6-TGNs浓度与临床疗效及不良反应的发生有着较大联系^[4-5],国内也有类似报道^[7]。本方法中监测结果也反映了6-TGNs浓度的个体化差异较大,因此,监测RBC中6-TGNs浓度具有十分重要的意义。该方法简便、快捷、准确、灵敏度高、精密度好、回收率稳定、试验成本低,适用于服用AZA或6-MP患者RBC内6-TGNs的浓度监测,有助于指导个体化用药,最终达到提高疗效、减少不良反应发生的目的。

参考文献

* 药师,硕士研究生。研究方向:药理学。电话:022-26185414。
E-mail: shuangjiang10@126.com
通信作者:主任药师,博士。研究方向:药理学。电话:022-23626417。E-mail: zlq0713@yahoo.com.cn

- [1] Meyer V, Beissert S. Azathioprine in the treatment of autoimmune blistering diseases[J]. *Immunology and Clinics of North America*, 2012, 32(2): 295.
- [2] Barrett G, Levesque, Edward V, Loftus. Initiating Azathioprine for Crohn's Disease[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012(10): 460.
- [3] Andoh A, Tomoyuki T, Hiromitsu B, et al. Monitoring 6-thioguanine concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease[J]. *Journal Gastroenterology and Hepatology*, 2008(23): 1 373.
- [4] Stocco G, Londero M, Campanozzi A, et al. Usefulness of the measurement of azathioprine metabolites in the assessment of non-adherence[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2010(4): 599.
- [5] Pozler O, Chladek J, Maly J, et al. Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2010(4): 623.
- [6] 师少军, 刘亚妮, 吴健鸿, 等. 高效液相色谱法测定人红细胞硫鸟嘌呤核苷酸的浓度[J]. *医药导报*, 2011, 30(5): 5 810.
- [7] 邹亚伟, 王昭霞, 牟德海, 等. 硫鸟嘌呤核苷酸浓度检测在儿童急性淋巴细胞白血病6-巯嘌呤个体化治疗中的意义[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(21): 3 688.

(收稿日期:2013-02-28 修回日期:2013-05-16)