

超高效液相色谱串联质谱法测定肾移植患者体内霉酚酸的血药浓度^Δ

崔刚*,陈文倩,刘晓,李朋梅,赵莉,刘峻瑒,张相林*(中日友好医院药学部,北京 100029)

中图分类号 R969.1;R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)22-2046-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.22.11

摘要 目的:建立一种快速、准确测定肾移植患者体内霉酚酸血药浓度的方法。方法:肾移植患者的血样经处理后,采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法进行测定。色谱柱为Acquity UPLC[®] BEH-C₁₈,流动相为0.01 mol/L 甲酸铵水溶液-甲醇(梯度洗脱);以电喷雾离子源(ESI)模式的多离子反应监测(MRM)扫描方式进行分析测定。结果:霉酚酸血药浓度在0.10~30.02 μg/ml范围内线性关系良好($r=0.9945$),最低检测限为0.01 ng/ml;方法回收率为83.47%~99.20%,日内、日间RSD均<10%,稳定性试验RSD<10%。结论:本方法快速、准确、灵敏度高、专属性强,适用于肾移植患者体内霉酚酸的血药浓度监测。

关键词 超高效液相色谱串联质谱法;肾移植患者;霉酚酸;血药浓度;药动学

Determination of Blood Concentration of Mycophenolic Acid in Renal Transplant Patients by UPLC-MS/MS

CUI Gang, CHEN Wen-qian, LIU Xiao, LI Peng-mei, ZHAO Li, LIU Jun-yang, ZHANG Xiang-lin (Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid and accurate method for the determination of blood concentration of mycophenolic acid in renal transplant patients. METHODS: After treating blood sample, UPLC-MS/MS method was used for the content determination. The separation was performed on Acquity UPLC[®] BEH-C₁₈ column with 0.01 mol/L ammonium formate-methanol as mobile phase (gradient elution). ESI source was applied and operated in the ESI mode, and MRM scan mode was employed. RESULTS: The linear range of mycophenolic acid was 0.10-30.02 μg/ml ($r=0.9945$) and the limit of the quantitative detection was 0.01 ng/ml. The methodology recovery was 83.47%-99.20%, and RSD of intra-day and inter-day were less than 10%. RSD of stability test were all less than 10%. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate, sensitive and specific, and it is applicable for the blood determination of mycophenolic acid in renal transplant patients.

KEY WORDS UPLC-MS/MS; Renal transplant patients; Mycophenolic Acid; Blood Concentrations; Pharmacokinetics

生率高,药源性损害容易发生,因此在处理老年CAP时应用第3代头孢菌素比中青年CAP多。

3.2 抗菌药物应用方式

本次调查发现,我院老年组患者联合用药情况较常见。老年CAP易混合感染,重症感染也较中青年多^[9],在致病菌不明确的情况下,往往需要联合应用几种抗菌药物,以扩大抗菌范围,降低耐药性。待病情稳定后,根据病原学进行有针对性的治疗或降阶梯治疗。

3.3 住院时间和费用情况

本次调查显示,我院老年CAP患者的平均住院时间和抗菌药物疗程比中青年组长,差异无统计学意义($P>0.05$),平均住院时间低于文献报道^[9]。老年组患者平均住院费用、平均药品费用、平均抗菌药物费用均显著高于中青年组,药品费用占住院费用的比例与中青年组比较差异无统计学意义,与文献报道的接近^[9]。由于老年组患者应用第3代头孢菌素较中青年多,而且老年组联合用药较多,因此药品费用支出增多。老年组患者合并慢性疾病较多,住院期间除了应给与CAP的相关治疗外,还需

对其他各种疾病进行必要的检查和治疗,也会增加住院费用。目前推行的单病种收费制度,制定了肺炎的收费标准,但并未考虑年龄因素,似欠妥当,建议将老年肺炎单独立项。

3.4 老年CAP患者用药注意事项

老年人由于肝、肾功能自然减退或原有肝、肾功能不全,用药时应注意避免应用对肝、肾功能有损害的药物,入院及治疗时均应监测肝、肾功能。对于肝、肾功能不全者,应用头孢菌素类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类等时需注意肝、肾损害对药物代谢的影响,必要时调整剂量。老年CAP患者用药品种较多,易发生ADR,对老年人要加强ADR监测。

综上所述,我院老年CAP的治疗能根据指南要求合理选用抗菌药物。老年CAP与中青年相比,由于病情和患者的特点不同,用药有其特点,治疗费用也高,应引起重视,实施单病种收费时也应考虑年龄因素。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病分会.社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(10):651.
- [2] 顾文东,王翎.老年人和中青年人肺部感染的对照性研究[J].实用老年医学,2008,22(2):111.
- [3] 王伟,李鸿雁,孙海清,等.老年社区获得性肺炎的临床特征分析[J].华西药学,2012,27(6):863.
- [4] 席学莉,董压琼.老年社区获得性肺炎183例临床分析[J].临床肺科杂志,2009,14(10):1352.
- [5] 杨建南,高凌云,李世云.重症肺炎患者住院医疗费用的特征分析[J].中国病案,2010,11(1):4.

(收稿日期:2013-02-28 修回日期:2013-03-28)

^Δ 基金项目:首都医学发展科研基金(No.2009-3021);中日友好医院院级科研基金资助课题(No.2010-QN-29)

* 副主任药师。研究方向:药品分析、药品质量标准研究、治疗药物监测、新药临床试验及中药新药与医院制剂研发。电话:010-84205563。E-mail: cuigang0929@yahoo.com.cn

通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:临床药学、治疗药物监测。电话:010-84205370。E-mail: xianglin63@yahoo.com

霉酚酸酯又称麦考酚酸酯(MMF),是霉酚酸(MPA)的酯类衍生物,是由青霉素属真菌产生的具有抗代谢的MPA半合成物,具有独特的免疫抑制作用和较高的安全性。MMF口服给药后在血浆酯酶的作用下迅速水解为游离的活性代谢物MPA;后者通过抑制鸟嘌呤合成,选择性阻滞T和B细胞增殖,对移植排异和自身免疫疾病均有显著的疗效,且不良反应较少^[1]。研究表明,MMF的药动学个体差异较大,且其药动学药时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。另外,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,但是在临床实际应用中,国内不少肾移植术后患者长期服用MMF(500 mg, bid),因此建立检测更低MPA浓度的方法是必要的。MPA的血药浓度测定方法国内、外已报道很多,但以高效液相色谱(UPLC)紫外检测法或荧光检测法测定居多^[2-9]。由于上述方法内源性干扰大、灵敏度较低,不能满足更低定量下限的检测要求,因此本试验拟建立一种灵敏度高、特异性好的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定肾移植患者体内MPA的血药浓度,用于临床血药浓度监测及药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC超高效液相色谱仪(美国Waters公司);Quattro Premier XE三级串联四级杆质谱仪,配有电喷雾电离(ESI)离子源(美国Waters公司);Masslynx 4.1数据处理系统(美国Waters公司);JingLi LDZ5-2低温自动平衡离心机(北京医用离心机厂);Sigma 3K15高速冷冻离心机(美国Sigma公司);Vortex-Genie 2多功能旋涡混合器(美国Scientific Industries公司);Milli-Q Advantage A10纯水机(法国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

MPA对照品(美国Sigma公司,批号:011M4007V,纯度≥98.0%);试验用水均为Millipore超纯水,甲酸、甲酸铵、甲醇、乙腈均为色谱纯,硫酸锌为分析纯。空白血浆、空白全血由我院检验科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Acquity UPLC® BEH-C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A(含0.1%甲酸的0.01 mol/L甲酸铵水溶液)-B(含0.1%甲酸的甲醇)(采用梯度洗脱:0~3 min, A相55%、B相45%;3~5 min,以相同梯度变化速率变化至A相0、B相100%;5~8 min,维持A相0、B相100%;8~10 min,维持A相55%、B相45%);流速:0.2 ml/min;柱温:55℃;进样器温度:10℃;进样量:10 μl。

采用电喷雾离子源(ESI);毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:34 V;碰撞气能量:22 eV;脱溶剂气(N₂)流量:500 L/h;锥孔反吹气流量:50 L/h;离子源温度:110℃;脱溶剂气温度:300℃;采用子离子扫描模式(Daughters scan)检测,检测方式:多离子反应监测(MRM),[M-H]⁻ m/z 319.2/191.1,在进样后0~5.5 min以ESI⁻离子模式进行扫描,5.5~10 min以ESI⁺离子模式进行扫描。

2.2 标准溶液的制备

准确称取MPA对照品适量于量瓶中,加甲醇溶解定容成667 μg/ml的MPA贮备液,置于-20℃冰箱保存备用。取MPA贮备液用甲醇依次稀释成1.00、5.00、10.00、50.02、100.05、150.08、300.15 μg/ml系列质量浓度的标准工作溶液,

置于-20℃冰箱保存备用。

2.3 样本来源

收集我院肾移植患者接受MPA治疗的药物监测全血样本100例,血样的收集和检测均获得医学伦理委员会批准。

2.4 血液样本的处理

取全血样本80 μl于1.5 ml离心管中,加入0.4 mol/L硫酸锌(ZnSO₄)溶液200 μl、乙腈800 μl,涡旋混合3 min,12 000 r/min离心5 min;转移上清液至另一离心管中,60℃水浴空气吹干;加流动相[A-B(55:45)]80 μl复溶,涡旋混合3 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液10 μl进样检测。

取相同患者的全血样本离心(3 000 r/min离心5 min)分离血浆,取血浆样本80 μl于1.5 ml离心管中,按全血样本处理方法处理,取上清液10 μl进样检测。

2.5 方法学验证

2.5.1 标准曲线的制备和检测限考察:取空白血液样本(空白全血、空白血浆)180 μl,加入MPA系列标准溶液20 μl,配制相当于MPA质量浓度为0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、15.01、30.02 μg/ml的血液样本,按“2.4”项下方法处理,进样分析。记录峰面积,以MPA质量浓度(c)为纵坐标、峰面积(A)为横坐标进行线性回归,得到回归方程分别为: $c_{\text{全血}}=0.027A_{\text{全血}}-357.8$ ($r=0.9985$); $c_{\text{血浆}}=0.033A_{\text{血浆}}-840.6$ ($r=0.9945$)。结果表明,MPA的血药浓度在0.10~30.02 μg/ml范围内线性关系良好。最低检测限为0.01 ng/ml,信噪比均>3。

2.5.2 专属性考察:空白血液样本、空白血液样本加MPA标准溶液及肾移植患者血液样本分别按“2.4”项下方法处理,进样分析,色谱见图1、2。在本试验条件下,MPA峰形良好,无内源性物质峰干扰,基线平稳,MPA保留时间在4.64 min左右。

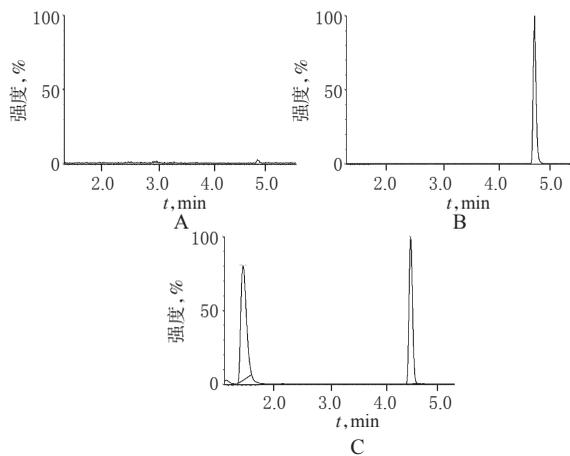


图1 全血样本中MPA典型提取离子流色谱图

A.空白全血;B.空白全血+MPA;C.肾移植患者全血样本

Fig 1 Typical ion source chromatograms of MPA in whole blood in MRM mode

A. blank whole blood; B. blank whole blood+MPA; C. whole blood sample of transplant patient

2.5.3 基质效应及回收率试验:(1)分别取低、中、高3个质量浓度的标准溶液80 μl,60℃水浴空气吹干后加流动相[A-B(55:45)]80 μl复溶,涡旋、离心,取上清液进样检测,各平行做5份;(2)制备与(1)中标准溶液质量浓度相同的低、中、高3个质量浓度的含药血液样本,按“2.4”项下方法处理,进样分析,各平行做5份;(3)空白血液样本按“2.4”项下方法处理,吹干后加入(1)中低、中、高3个质量浓度的标准溶液80 μl,再次吹干,加

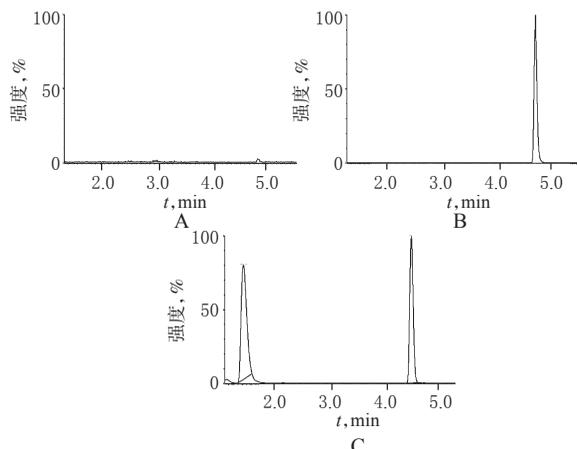


图2 血浆样本中MPA典型提取离子流色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+MPA; C. 肾移植患者血浆样本

Fig 2 Typical ion source chromatograms of MPA in plasma in MRM mode

A. blank plasma; B. blank plasma+MPA; C. plasma sample of transplant patient

表1 全血与血浆样本的准确度、精密密度、基质效应和回收率试验结果(n=5)

Tab 1 Results of accuracy, precision, matrix effect and recovery tests in whole blood and plasma(n=5)

样本类型	质量浓度, μg/ml	日内精密密度			日间精密密度			方法回收率		基质效应	
		$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$	RSD, %	准确度, %	$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$	RSD, %	准确度, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
全血	0.50	0.50 ± 0.05	9.43	100.71 ± 9.50	0.54 ± 0.05	8.68	108.30 ± 9.40	83.47 ± 7.19	8.61	109.28 ± 2.03	1.85
	5.00	5.00 ± 0.20	3.96	100.01 ± 3.96	5.70 ± 0.46	7.99	113.97 ± 9.11	91.19 ± 8.83	9.68	105.90 ± 1.14	1.08
	15.01	13.19 ± 0.29	2.23	87.84 ± 1.96	15.18 ± 1.45	9.58	101.14 ± 9.69	99.20 ± 8.84	8.91	107.14 ± 1.10	1.03
血浆	0.50	0.52 ± 0.02	3.42	104.65 ± 3.58	0.50 ± 0.01	1.66	99.83 ± 1.66	84.22 ± 2.21	2.63	94.60 ± 0.90	0.95
	5.00	5.30 ± 0.07	1.35	105.94 ± 1.43	4.92 ± 0.08	1.57	98.35 ± 1.54	96.20 ± 2.34	2.43	94.70 ± 1.66	1.75
	15.01	13.21 ± 0.12	0.95	88.01 ± 0.84	13.55 ± 0.17	1.28	90.27 ± 1.16	97.76 ± 1.25	1.28	93.49 ± 2.69	2.87

收集肾移植患者接受MPA治疗的药物监测全血样本100份,按“2.4”项下方法处理,进样分析,测得MPA血药浓度的平均值($\bar{x} \pm s$)分别为:全血(2.05 ± 1.82) μg/ml、血浆(3.99 ± 3.01) μg/ml。

3 讨论

UPLC法是分离分析科学中的一个全新类别,在全面提升高效液相色谱的速度、灵敏度及分离度等诸多指标的同时,还保留了其原有的实用性及原理,可在很短的时间内完成全部测定工作;借助MS极高灵敏度的特点,可满足体内MPA药物浓度测定以及相关研究需要。目前,国内MPA测定仍以采用高效液相色谱紫外检测法或荧光检测法的居多,这类方法内源性干扰大、灵敏度较低,不能满足更低定量下限的检测要求。本试验建立的UPLC-MS/MS法快速、准确、灵敏度高、专属性强、特异性好,可用于临床肾移植患者体内MPA血药浓度监测及其体内药动学研究。

本试验中建立的UPLC-MS/MS法不但可测定MPA,还能以ESI⁺和ESI⁻两种模式的多离子反应监测(MRM)扫描方式同时测定肾移植患者血中多种免疫抑制治疗的药物,包括环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司、泼尼松龙等,可以获得准确、全面的患者用药信息,这一点对于个体化给药方案的制订来说至关重要。

MPA血药浓度测定的血液样本通常采用全血或血浆,一般认为血浆在全血中的比例为50%左右。本试验中采用UPLC-MS/MS法测定了100例肾移植患者全血及血浆中的MPA浓度,其中全血中MPA的平均质量浓度为2.05 μg/ml,折算成血浆浓

度约为4.10 μg/ml;血浆中实测MPA的平均质量浓度为3.99 μg/ml。二者相比为102.76%,结果基本一致,相关性良好,说明单就MPA血药浓度测定而言,采用UPLC-MS/MS法时血液样本采用全血或血浆均可。但是由于环孢霉素A在全血中拥有相对较高的浓度,而且他克莫司与西罗莫司等在实际常规监测中均采用全血样本,故采用UPLC-MS/MS法同时测定肾移植患者血中多种免疫抑制治疗药物的浓度时还是需要采用全血样本。

2.5.4 精密密度及准确度试验:取“2.5.3”项中(2)所制备的低、中、高3个质量浓度的含药血液样本,按“2.4”项下方法处理,各平行做5份,连续测定5 d,考察本试验方法的日内、日间精密密度。结果如表1所示,本试验方法的准确度和精密密度均符合要求。

2.5.5 稳定性考察:(1)反复冻融试验:低、中、高3个质量浓度的含药血液样本,各平行做5份,-20℃冷冻保存24 h,融化放至室温,再次冷冻24 h,融化至室温后,按“2.4”项下方法处理,并进样分析,结果表明MPA冻融稳定性良好(RSD<5.68%);(2)进样器中稳定性试验:低、中、高3个质量浓度的含药血液样本,各平行做3份,分别置于自动进样器中0、2、4、8、12、18 h后进样检测,将测定结果与0 h的测定结果进行比较,结果表明MPA在自动进样器中稳定性良好(RSD<9.39%)。

2.6 肾移植患者体内MPA血药浓度测定

度约为4.10 μg/ml;血浆中实测MPA的平均质量浓度为3.99 μg/ml。二者相比为102.76%,结果基本一致,相关性良好,说明单就MPA血药浓度测定而言,采用UPLC-MS/MS法时血液样本采用全血或血浆均可。但是由于环孢霉素A在全血中拥有相对较高的浓度,而且他克莫司与西罗莫司等在实际常规监测中均采用全血样本,故采用UPLC-MS/MS法同时测定肾移植患者血中多种免疫抑制治疗药物的浓度时还是需要采用全血样本。

参考文献

- [1] 郭奕彤,谭志刚.肾移植与免疫抑制剂的应用研究:SCI数据库2001/2010年收录文献检索分析[J].中国组织工程研究,2012,16(5):885.
- [2] 陈岚,贺晴,温浩.HPLC-荧光法测定肾移植患者血浆中霉酚酸的浓度[J].中国药房,2009,20(17):1318.
- [3] 赵强,高峰.HPLC测定人血浆中霉酚酸及其代谢物浓度[J].中国现代应用药学,2010,27(9):836.
- [4] 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.
- [5] 胡岚岚,汤建林,周世文,等.UPLC-MS测定人血清中霉酚酸浓度的研究[J].局解手术学杂志,2010,19(4):266.
- [6] 郑国钢,郑怀宇,郑金琪.高效液相色谱-质谱联用法测定人血浆中霉酚酸的浓度[J].中国医院药学杂志,2008,28(7):522.

(收稿日期:2013-03-07 修回日期:2013-04-08)