

# 液相色谱-串联质谱法测定 肾移植患者的麦考酚酸血浆浓度及其药动学研究

袁学露<sup>1</sup>, 李水军<sup>2</sup>, 沈兵<sup>3</sup>, 张渊<sup>1</sup>, 余琛<sup>2</sup>, 刘皋林<sup>1</sup>

(上海交通大学附属第一人民医院 1. 药剂科; 3. 肾移植科, 200080; 2. 上海市徐汇区中心医院中心实验室, 200031)

**[摘要]** 目的 建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法评价免疫抑制剂麦考酚酸酯(MMF)在术后 2~3 周肾移植患者中连续口服的药动学特点。方法 受试者口服 MMF(0.75 g, bid), 2~3 周后用 LC-MS/MS 法测定血浆中活性代谢物麦考酚酸(MPA)的浓度, 并用非房室模型计算药动学参数。结果 MPA 在 0.1~51.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好, 批内、批间 RSD < 10%, 准确度在 90%~110%, 方法学验证符合生物样品分析方法的要求。MMF 的体内代谢呈明显的个体差异, 药动学参数:  $AUC_{0-1}$  为  $(36.65 \pm 11.42) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  为  $(43.34 \pm 18.02) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{max}}$  为  $(15.89 \pm 5.77) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t_{\text{max}}$  为  $(1.08 \pm 0.47) \text{ h}$ ;  $t_{1/2}$  为  $(3.34 \pm 1.63) \text{ h}$ ;  $MRT_{0-1}$  为  $(3.42 \pm 1.12) \text{ h}$ ;  $V_d$  为  $(194.88 \pm 156.45) \text{ L}$ ;  $CL$  为  $(41.02 \pm 18.19) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论 LC-MS/MS 法用于 MPA 血浆浓度测定, 操作简便, 结果灵敏、特异性好。

**[关键词]** 麦考酚酸; 液相色谱-串联质谱法; 药动学

**[中图分类号]** R979.5; R969.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2009)04-0447-03

麦考酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)是目前国内外常用器官移植的免疫抑制剂, 在体内快速完全地水解成具有免疫活性的麦考酚酸(mycophenolic acid, MPA)<sup>[1]</sup>。临床上通常与环孢素或他克莫司及糖皮质激素联用以降低器官移植后的急性排斥反应<sup>[2-4]</sup>。由于麦考酚酸的药动学特征具有明显的个体差异<sup>[1,5,6]</sup>, 加上用药期长、多药联用, 血药浓度与疗效甚至副作用密切相关, 现在临床上对麦考酚酸进行治疗药物监测<sup>[7,8]</sup>。笔者在本研究建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中麦考酚酸的药物浓度, 并应用于肾移植术后患者药动学研究。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药品与试剂** 麦考酚酸酯胶囊(商品名: 骁悉, 生产, 批号: M1081, 规格: 0.250 g)。麦考酚酸对照品(纯度 99.1%, 天津新美科技开发有限公司提供, 批号: 050201)。磺胺二甲氧基嘧啶(内标, 纯度 100%, 上海市食品药品监督管理局提供, 批号: 3057X)。乙腈和甲酸为色谱纯试剂, 购自美国 Tedia 试剂公司, 其他试剂均为分析纯, 水为自制重蒸水。

**1.1.2 仪器** API3000 串联质谱仪, 美国应用生物系统公司; 岛津系列液相色谱仪, 包括 20AD 泵两台、在线脱气仪、SIL-HTc 自动进样器, 日本岛津公司; XW-80 旋涡混合器, 上海医科大学仪器厂; TGL-16G 台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂。

**1.2 受试对象、给药方法与血样采集方法** 肾移植手术后 2~3 周患者 12 例, 其中男 9 例, 女 3 例。术后患者抗排斥方案采用连续使用免疫抑制剂联合治疗, 环孢素(CsA, 250~375 mg,

bid) 或他克莫司(3~6 mg, bid) + 麦考酚酸酯(0.75 g, bid) + 泼尼松(17.5~20.0 mg, qd)。在服药前和末次服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 h 自肘静脉采血 3 mL, 以 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 血浆置 -20  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存, 以备 LC-MS/MS 分析用。试验方案和知情同意书获上海交通大学附属第一人民医院医学伦理委员会批准。受试者均签署知情同意书。

### 1.3 血药浓度测定

**1.3.1 质谱条件** 电喷雾离子源, 正离子扫描; 雾化气压力: 0.56 MPa, 气帘气压力: 0.52 MPa, 碰撞气压力: 0.49 MPa, 辅助气压力: 0.6 MPa; 离子源电压: 1 800 V, 离子源温度: 400  $^{\circ}\text{C}$ ; MRM 扫描分析, 离子通道 m/z 分别选择为: 321.2/207.1(麦考酚酸), 311.1/156.1(内标), Q1、Q3 设置为中分辨率。

**1.3.2 色谱条件** 分析柱为 Allure PFPP (100 mm  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A: 含 0.1% 甲酸的乙腈, 流动相 B: 0.1% 甲酸水溶液; A : B = 45 : 55。等度洗脱, 流速为 0.3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。进样体积 2  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.3 样品配制** 取 6 份不同来源的空白血浆, 分别加入不同量的麦考酚酸贮备液, 配制含麦考酚酸浓度分别为: 0.1, 0.2, 0.4, 1.6, 6.4, 25.6, 51.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的血浆标准液。按同样方法, 配制 0.15, 22.50, 45.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的低、中、高 3 种浓度的血浆质控样品。

**1.3.4 样品处理方法** 取血浆 100  $\mu\text{L}$  置 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  的乙腈溶液(含内标 200  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 旋涡振荡处理 10 s 后, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  (半径 4 cm) 离心 3 min, 取上清液 20  $\mu\text{L}$  与流动相 60  $\mu\text{L}$  混匀, 进样供 LC-MS/MS 分析。

**1.4 统计学方法** 所有数据采用 SPSS11.5 进行处理, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。药时数据采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数, 达峰时间( $t_{\text{max}}$ )及峰浓度( $C_{\text{max}}$ )通过观察法获得; 酶酚酸  $AUC_{0-12}$  的计算采用梯形法。

**[收稿日期]** 2008-09-17

**[作者简介]** 袁学露(1974-), 男, 上海人, 主管药师, 学士, 研究方向临床药学。电话: (0) 13611816585, E-mail: yuanxuelu001@ yahoo.com.cn。

**[通讯作者]** 张渊, 女, 主任药师, 电话: 021-63240090-4201, E-mail: zhyuan05@ yahoo.com.cn。

## 2 结果

### 2.1 方法学考察与评价

**2.1.1 方法专属性** 取6份不同来源的空白血浆、空白血浆标准添加样品和服药后的实际生物样品,按生物样本处理方法处理后进样。麦考酚酸的保留时间为3.7 min;内标的保留时间为2.4 min。样品中的内源性物质和其他干扰物对分离测定无影响,说明本方法具有特异专一测定血浆中麦考酚酸的分析能力。

**2.1.2 线性方程和灵敏度** 以添加浓度为横坐标( $X$ ),麦考酚酸与内标的峰面积比为纵坐标( $Y$ ),进行线性回归,经“ $1/X$ ”权重得回归方程  $Y = 1.04 X - 0.004 87, r = 0.998 2$ 。结果表明,在  $0.1 \sim 51.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。灵敏度用定量下限(LLOQ)表示。本方法的最低检测浓度总麦考酚酸为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (S/N \geq 10)$ 。

**2.1.3 精密度和准确度** 取空白血浆,配制  $0.15, 22.50, 45.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的低、中、高浓度的血浆质控品。分3批,每批各取6份不同浓度的质控品,按样品处理方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析。计算批内、批间相对标准偏差(RSD)和准确度(%),测定结果见表1。本方法的批内、批间 RSD < 10%,准确度在 90% ~ 110% 之间,符合生物样品分析方法的要求。

表1 麦考酚酸的精密度和准确度

浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	批间 RSD/ %	批间准确度/ %	批内 RSD/ %	批内准确度/ %
0.15	2.69	93.8	4.54	94.7
22.50	2.88	93.1	6.84	98.4
45.00	6.95	92.3	7.09	96.7

**2.1.4 回收率、递质效应和样品稳定性** 取不同来源的空白血浆6份,配制中浓度的质控品,同时将该6份空白样品处理后再加标准品。按上述血清样品处理方法及 LC-MS 条件进行处理和分析,记录样品处理之前和之后峰面积,计算麦考酚酸及内标的绝对回收率。同时在空白样品理后的上清液中加入中浓度化学质控品,配成处理后加标样品,另外用流动相配成相应浓度的化学品6份。以加标样品与相应浓度的化学品峰面积比值、计算麦考酚酸及内标基质效应。结果表明,麦考酚酸、内标的平均绝对回收率分别为 91.0% 和 89.7% ( $n = 6$ ),递质效应分别为 90.7% 和 91.7% ( $n = 6$ ),均符合生物样品分析方法的相关要求。麦考酚酸的样品稳定性已经有文献报道<sup>[9-11]</sup>,含麦考酚酸的血样经反复冻融(-20 ~ 37 °C)3次、室温下放置24h、冷冻放置6个月、样品提取后在自动进样器(25 °C)放置24h,其稳定性结果良好。

**2.2 麦考酚酸酯药动学特征** 在每天1~2g连续口服给药的情况下,一般7d麦考酚酸即可达到稳态血药浓度。本研究对12例术后2~3周、口服麦考酚酸酯1.5g(0.75g, bid)达到稳态浓度的肾移植患者,测定其  $C_0 \sim C_{12}$  的麦考酚酸血药浓度。平均药时曲线见图1。 $C_0$  为  $(0.89 \pm 0.66) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $AUC_{0-4}$  为  $(36.65 \pm 11.42) \text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  为  $(43.34 \pm 18.02) \text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $C_{\text{max}}$  为  $(15.89 \pm 5.77) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $t_{\text{max}}$  为  $(1.08 \pm 0.47) \text{h}$ ,  $MRT_{0-4}$  为  $(3.42 \pm 1.12) \text{h}$ ,  $MRT_{0-\infty}$  为  $(5.05 \pm 3.07) \text{h}$ ,  $t_{1/2}$  为  $(3.34 \pm 1.63) \text{h}$ ,  $V_d$  为  $(194.88 \pm 156.45)$ , LCL 为  $(41.02 \pm 18.19) \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。麦考酚酸酯的体内代谢差异有显著

性,谷值浓度  $C_0$  变化范围为  $0.11 \sim 2.48 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $AUC_{0-12}$  为  $18.15 \sim 51.52 \text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因肠肝循环,麦考酚酸药时曲线呈双峰。

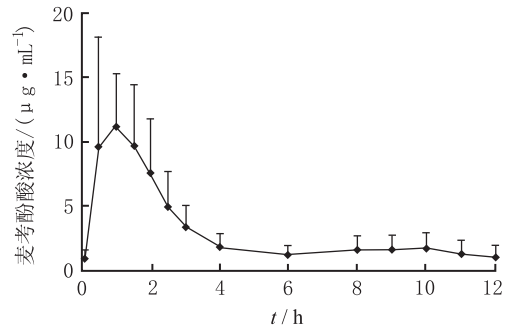


图1 肾移植患者口服麦考酚酸酯的平均血药浓度-时间曲线

## 3 讨论

麦考酚酸的检测方法很多,多见于免疫分析法<sup>[12-17]</sup>和 HPLC 法<sup>[5,6,11,18]</sup>。免疫分析法由于与代谢物的非特异性交叉反应,高估测定结果,因而结果的可靠性常被怀疑<sup>[19,20]</sup>。HPLC 法因其特异性明显优于免疫法,且技术成熟、操作简单、成本低廉,在临床中已被广泛使用;但其不足之处在于检测灵敏度较低、耗时较长。LC-MS/MS 法由于其灵敏度和特异性高,近年来在国外已越来越多地应用免疫抑制剂的治疗药物监测上<sup>[20-23]</sup>。与已有的方法比较,本方法操作简便,样品处理只需简单的蛋白沉淀后即可进样测定;灵敏度高,最低检测浓度为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (S/N = 156)$ ,是目前已报道方法中灵敏度最高者;方法特异性好,与内源性物质实现完全分离,无干扰,故适合人体内麦考酚酸治疗药物监测、药动学和生物等效性研究。

已有的研究表明,麦考酚酸酯的疗效和副作用与给药后的血药浓度时间曲线下面积(AUC)密切相关<sup>[24,25]</sup>;监测临床血药浓度,使 AUC 控制在靶值范围内,是科学合理、安全有效用药的前提<sup>[26,27]</sup>。由于麦考酚酸酯的药动学参数在不同受试者存在较大的个体差异,故采用有限采样法监测个别血药浓度点取代 AUC 监测指标在临床上具有重要的实用价值<sup>[8,28,29]</sup>。本研究通过相关分析发现,1.5, 4.0, 6.0, 8.0, 9.0 h 血药浓度与  $AUC_{0-12}$  间具有极显著的相关性( $r = 0.885, 0.721, 0.824, 0.782, 0.752, P < 0.01$ ),而 0, 2, 2.5 h 血药浓度与  $AUC_{0-12}$  也存在相关性( $P < 0.05$ ),为进一步确定有限采样方案提供参考。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.04.015

### [参考文献]

- [1] BULLINGHAM R E, NICHOLLS A J, KAMM B R. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 34(6):429-455.
- [2] RENZ J F, LIGHTDATA J, MUDGE C, et al. Mycophenolate mofetil, microemulsion cyclosporine, and prednisone as primary immunosuppression for pediatric liver transplant recipients[J]. *Liver Transpl Surg*, 1999, 5(2):136-143.
- [3] AKHLAGHI F, PATEL C G, ZUNIGA X P, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and metabolites in diabetic kidney transplant recipients[J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(1):95-101.
- [4] MOURAD M, MALAISE J, CHAID E D, et al. Pharmacokinetic

- basis for the efficient and safe use of low-dose mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus in kidney transplantation [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(7): 1241 - 1248.
- [5] 沈兵, 谭建明, 刘志宏, 等. 肾移植受者口服多剂霉酚酸酯的临床药理学特点 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2004, 13(5): 431 - 435.
- [6] 余自成, 张伟霞, 周佩军, 等. 霉酚酸在肝移植患者体内的药理学研究 [J]. 药学学报, 2006, 41(12): 1157 - 1160.
- [7] 焦正, 陆福明, 钟明康. 器官移植患者霉酚酸酯的治疗药物监测 [J]. 国外医学移植与血液净化分册, 2003, 1(2): 19 - 21.
- [8] MULLER H, SILARI S, ZUNIGA C, *et al.* Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in kidney transplant patients: a abbreviated sampling strategy [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(3): 596 - 599.
- [9] PATEL C G, AKHLAGHI F. High-performance liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human plasma [J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(1): 116 - 122.
- [10] 卢晓阳, 黄洪锋, 黄明珠, 等. 霉酚酸酯在肾移植患者的药理学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(16): 1246 - 1248.
- [11] 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理学 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(15): 1416 - 1418.
- [12] LU X Y, HUANG H F, SHENG-TU J Z, *et al.* Pharmacokinetics of mycophenolic acid in chinese kidney transplant patients [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, 6(9): 885 - 891.
- [13] ZICHENG Y, PEIJUN Z, DA X, *et al.* Investigation on pharmacokinetics of mycophenolic acid in chinese adult renal transplant patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62(4): 446 - 452.
- [14] HOSOTSUBO H, TAKAHARA S, IMAMURA R, *et al.* Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay [J]. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(6): 669 - 674.
- [15] VOGL M, WEIGEL G, SEEBACHER G, *et al.* Evaluation of the emit mycophenolic acid assay from dade behring [J]. *Ther Drug Monit*, 1999, 21(6): 638 - 643.
- [16] BRUNET M, OPPENHEIMER F, MARTORELL J, *et al.* Mycophenolic acid monitoring: evaluation of the EMIT MPA immunoassay in kidney and lung transplantation [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(6): 2275 - 2276.
- [17] BEAL J L, JONES C E, TAYLOR P J, *et al.* Evaluation of an immunoassay (emit) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay [J]. *Ther Drug Monit*, 1998, 20(6): 685 - 690.
- [18] YANG Z, PENG Y, WANG S. Immunosuppressants: Pharmacokinetics, methods of monitoring and role of high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Clin Appl Immunol Rev*, 2005, 5(6): 405 - 430.
- [19] SHIPKOVA M, SCHUTZ E, ARMSTRONG V W, *et al.* Overestimation of mycophenolic acid by emit correlates with mpa metabolite [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(1-2): 1135 - 1137.
- [20] YANG Z, WANG S. Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants [J]. *J Immunol Methods*, 2008, 336(2): 98 - 103.
- [21] STREIT F, SHIPKOVA M, ARMSTRONG V W, *et al.* Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(1): 152 - 159.
- [22] PREMAUD A, ROUSSEAU A, PICARD N, *et al.* Determination of mycophenolic acid plasma levels in renal transplant recipients: Comparison of an enzyme multiplied immunoassay technique (emit) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(2): 274 - 277.
- [23] BOGUSZ M J, ENAZI E A, HASSAN H, *et al.* Simultaneous lc-ms-ms determination of cyclosporine a, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 850(1-2): 471 - 480.
- [24] WYZGAL J, NIEMCZYK M, ZIKOWSHI J, *et al.* Results of a 6-month, multicenter, open-label, prospective study concerning efficacy and safety of mycophenolate sodium in de novo kidney transplant recipients [J]. *Transplantation Proceedings*, 2007, 39(9): 2730 - 2732.
- [25] MOURAD M, MALAISE J, CHAIB E D, *et al.* Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(1): 88 - 94.
- [26] 沈兵, 谭建明, 焦正, 等. 有限采样法监测肾移植受者的血霉酚酸浓度 [J]. 中华器官移植杂志, 2006, 27(7): 414 - 417.
- [27] 余自成, 王祥慧, 徐达, 等. 有限取样法估算中国成年肾移植受者霉酚酸血药浓度-时间曲线下面积 [J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(6): 452 - 455.
- [28] PAWINSKI T, HALE M, KORECKA M, *et al.* Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult renal transplant patients treated with concomitant tacrolimus [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(9): 1497 - 1504.
- [29] D SCH A O, EHLERMANN P, KOCH A, *et al.* A comparison of measured trough levels and abbreviated auc estimation by limited sampling strategies for monitoring mycophenolic acid exposure in stable heart transplant patients receiving cyclosporin a containing and cyclosporin a free immunosuppressive regimens [J]. *Clin Ther*, 2006, 28(6): 893 - 905.