UPLC-MS 测定人血清中霉酚酸浓度的研究

胡岚岚,汤建林,周世文,刘智远,刘 明,徐 颖 (第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 建立一种快速、准确测定人血清中霉酚酸浓度的超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)测定方法。**方法** 在血清中加入内标吲哚美辛,采用超高效液相色谱联合质谱的方法对血清中的霉酚酸进行分离测定。**结果** 霉酚酸在 0.05 ~ 100.00 μg/mL 的浓度范围内呈良好线性,$r = 0.9980$,最低检测线为 0.05 μg/mL,方法回收率大于 91.2%,日内、日间变异系数均小于 5%。**结论** 该方法准确、快速、灵敏,可用于霉酚酸的治疗药物监测、人体内药代动力学及生物等效性研究。

[关键词] 霉酚酸;超高效液相色谱-质谱;血清

[中图分类号] R979.5;Q503 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)04-0266-03

Determination of the content of mycophenolic acid in human serum by UPLC-MS

HU Lan-lan, TANG Jian-lin, ZHOU Shi-wen, LIU Zhi-yuan, LIU Ming, XU Ying (Base for Drug Clinical Trial, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate method using UPLC-MS for quantification of mycophenolic acid in human serum. **Methods** Indometacin was added to human serum sample and mycophenolic acid in human serum was determined by UPLC-MS. **Results** The calibration curve was linear ($r = 0.9980$) among the concentration range of 0.05 ~ 100.00 μg/mL and the limit of the quantitative detection was 0.05 μg/mL. The recovery of the method was higher than 91.2%. The coefficients of variation for inter-day and intra-day were both lower than 5%. **Conclusion** As an accurate, rapid and sensitive method, this assay can be used in the supervision of mycophenolic acid drug and the study of pharmacokinetics and bioavailability.

Keywords: mycophenolic acid; UPLC-MS; serum

马替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)是霉酚酸(MPA)的 2-吗啉代乙酯,在体内脱脂化后形成具有免疫抑制活性的代谢物 MPA,MPA 选择性作用于 T、B 淋巴细胞,抑制其增殖。临床上用于预防急性器官排异反应,治疗同种异体肾移植后难治性排异反应。霉酚酸的血药浓度测定方法国内外已有报道[1-7],但以高效液相色谱分离、荧光检测居多,且多数样品处理过程繁琐,分析时间长。本文在参考文献的基础上采用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)联用的方法,对血清中霉酚酸成功进行了分离测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters-Acquity 型超高效液相色谱质谱系统(配 QBA235 型 TQ 检测器,K07UPA468M 型 Sample Manager,K07UP8 450M 型 Binay Solvent Manager 及 Masslynx v4.1 色谱管理软件);色谱柱为 Acquity UPLC BEH C_{18}(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm);MC-210S 型电子天平(精度 0.01 mg);Abbott Diagnostics, Division 离心机;XH-86 多用途旋涡混合器,Millipore 超纯水系统。对照品为霉酚酸对照药(批号:080816,含量 99.3%),吲哚美辛内标物(含量大于等于 99.3%,批号:100258-200403),乙腈、甲醇均为色谱纯(Burdick & Jackson 公司);甲酸(纯度大于或等于 86.0%),实验用水均为 Millipore 超纯水。

1.2 方法

1.2.1 流动相的配制 准确吸取 1 mL 甲酸于 1 000 mL 容量瓶中,用超纯水定容,即得 0.1 % 的甲酸溶液,经 0.45 μm 的水性滤膜过滤后于室温保存即可。

1.2.2 标准溶液的配制 精密称取霉酚酸和吲哚美辛 0.25 g,用少量去离子水溶解后,再用去离子水稀释至 50 mL,配成浓度为 5 mg/mL 的霉酚酸和吲哚美辛标准储备液,4 ℃冰箱保存备用。取储备液用超纯水梯度稀释至浓度分别为 100.00、80.00、60.00、40.00、20.00、10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL 的标准工作液,4 ℃冰箱保存备用。将吲哚美辛标准储备液稀释至浓度为 100.00 μg/mL 的工作液,4 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 血清样品的处理 精密移取空白血清 0.5 mL,加入内标储备液 100 μl,混匀后加入乙腈 400 μl,旋涡提取 2 min 后,于 11 266 r/min 条件下离心 10 min,离心后吸取上清液于另一干燥离心管中,上清液经 0.22 μm 的滤膜过滤后进样,进样体积为 2 μl。

1.2.4 色谱条件 Acquity UPLC BEH C_{18}(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm)。流动相为(乙腈加 0.1% 甲酸)乙腈。梯度法洗

[作者简介] 胡岚岚(1984 -),女,安徽省岳西县人,在读硕士,主要从事药物分析方面的研究。电话:(023)68755311

[通讯作者] 汤建林,电话:(023)68755311,E-mail:jltang6317@163.com

[收稿日期] 2010-03-18 [修回日期] 2010-04-22

脱:乙腈 0 ~ 4 min 内比例由 40 :60 递增至 70 :30,4.1 ~ 6 min 乙腈比例恢复 40 :60。流速为 0.2 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 2 μl。

1.2.5 质谱条件 气动辅助电喷雾离子化(ESI);正离子检测(MRM);MPA[M + H]离子 m/z 321.16,碎片子离子 m/z 207.21,碰撞能量 25 eV。内标:吲哚美辛[M + H]离子 m/z 358.10,碎片子离子 m/z 312.12,碰撞能量 13 eV。

2 结果

2.1 分离特性

在选定的色谱条件和质谱条件下,分别考察了 7 个不同来源的空白血清、空白血清加对照品、对照品及实测样品的色谱分离情况。测得霉酚酸质谱图(图 1)。由图可见,被测物与内标物两者峰形良好,分离完全,无杂质峰干扰,血样中霉酚酸和吲哚美辛的保留时间分别为 1.97 min 和 3.30 min。

另外采用高效液相色谱紫外检测法(HPLC-UV)测定血清霉酚酸浓度,并与 UPLC-MS 法比较,结果见图 2。HPLC-UV 测定空白血清有干扰,待测物和内标物未分离。而 UPLC-MS 检测空白血清干扰小,待测物和内标物分离完全,分离特异性好。

2.2 标准曲线和线性范围

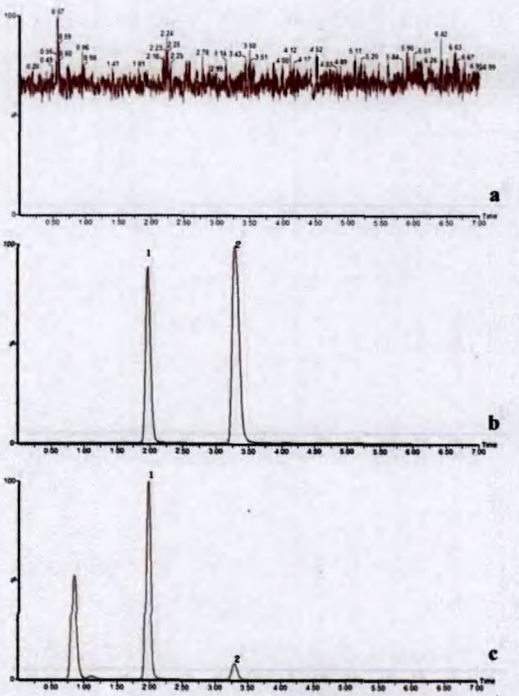
取空白血清 480 μl 加入不同浓度系列标准溶液 20 μl,配制成霉酚酸血清浓度分别为 100.00、80.00、60.00、40.00、20.00、10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL 的霉酚酸血样各两份,按上述血清样品处理方法操作,每一浓度进样 2 μl。记录质谱图,以浓度为横坐标,以霉酚酸与内标峰面积比为纵坐标进行线性回归,得回归方程:$y_1 = 0.715569x + 0.151809$ ($r = 0.997908$, level = 6, $n = 2$,各点 RSD < 15%),线性范围为 0.05 ~ 10.00 μg/mL;$y_2 = 0.34927x + 4.79164$ ($r = 0.990555$, level = 6, $n = 2$,各点 RSD < 15%),线性范围为 10.00 ~ 100.00 μg/mL,血浆中霉酚酸定量下线为 0.05 μg/mL(S/N = 10, $\bar{x} = 0.05 \pm 0.001$, RSD = 3%, $n = 5$)。

2.3 回收率试验

配制 0.1、1.0、10.0、40.0、80.0 μg/mL 霉酚酸血样各 6 份,按照上述血清样品处理方法操作,进样分析,计算低、中、高各种浓度的霉酚酸的方法回收率($n = 6$)分别为 109.8%、117.8%、91.2%、114.2% 和 98.0%;变异系数分别为 6.9%、6.3%、1.5%、3.9% 和 4.3%。结果表明,低、中、高各种浓度的回收率均符合要求,方法准确可靠。

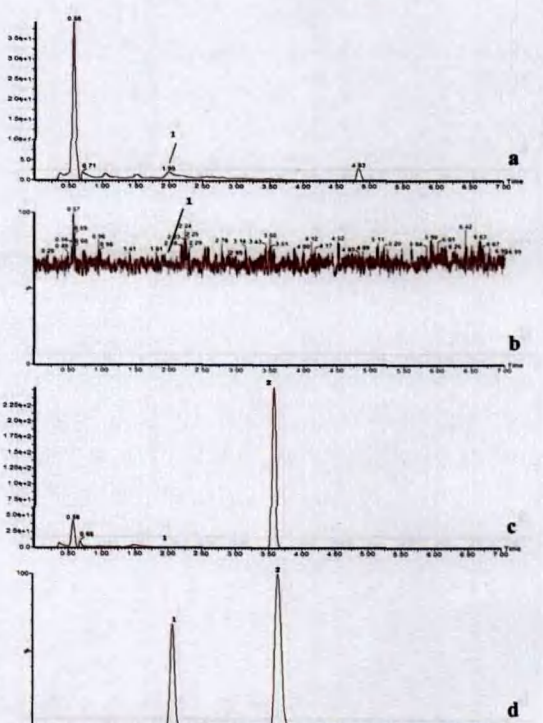
2.4 精密度试验

配制 0.1、1.0、10.0、40.0、80.0 μg/mL 霉酚酸血样各 5 份,按照血清样品处理方法操作,在 1 d 内不同时间处理测定,考察日内精密度;连续 4 d 于同一时间配制 0.1、1.0、10.0、40.0、80.0 μg/mL 等 5 种浓度的霉酚酸血样各 5 份,处理测定,考察日间精密度。计算得低、中、高各种浓度的日内变异系数($n = 5$)分别为 1.5%、2.5%、1.3%、1.0%、3.6%;日间变异系数($n = 5$)分别为 3.7%、4.4%、3.0%、1.6%、2.2%。结果表明日内、日间变异系数在允许范围内,方法精密度良好。



a:空白血清;b:霉酚酸与内标;c:霉酚酸血样;1:霉酚酸;2:内标吲哚美辛

图 1 空白血清、霉酚酸与内标、霉酚酸血样的 UPLC 质谱图



a:HPLC-UV 测定空白血清(有干扰);b:UPLC-MS 测定空白血清(无干扰);c:HPLC-UV 测定血清样品(未分离);d:UPLC-MS 测定血清样品(可分离);1:霉酚酸;2:内标吲哚美辛

图 2 HPLC-UV 与 UPLC-MS 方法测定空白血清与血清样品的质谱图

2.5 稳定性试验

配制 0.1、1.0、10.0、40.0、80.0 μg/mL 霉酚酸血样各 24 份，-80 ℃冰箱放置冻存，于 0、1、3、5、7、14、21、30 d 复管测定。考察冻存稳定性，结果见表 1。由表可见，血浆样品可于 -80 ℃冰箱至少保存 30 d。

表 1 霉酚酸稳定性试验

标准浓度 (μg/mL)	测定浓度(μg/mL)								RSD(%)
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d	30 d	
0.1	0.105	0.103	0.099	0.100	0.100	0.105	0.100	0.099	2.5
1.0	1.000	0.998	1.003	1.050	0.997	1.010	1.005	0.998	1.8
10.0	10.150	10.000	9.988	9.954	10.007	10.005	8.984	10.100	4.1
40.0	40.050	39.985	39.985	40.110	40.060	40.000	38.090	40.900	2.0
80.0	79.910	80.103	80.150	79.988	78.951	79.652	80.020	79.100	0.6

3 讨论

超高效液相色谱(UPLC)是分离分析科学中的一个全新类别，全面提升高效液相色谱(HPLC)的速度、灵敏度及分离度诸品质的同时，保留了其原有的实用性及原理，15 min 即可完成全部测定工作，借助质谱(MS)检测高灵敏特点，可满足体内霉酚酸药物浓度测定及相关研究需要。目前，国内多采用高效液相色谱紫外检测法，其灵敏度较低，不利于临床血样有效、快速测定。为了研究 HPLC-UV 与 UPLC-MS 两种方法对霉酚酸浓度测定的影响，本实验分别考察了两种方法的分离特性。结果显示，采用 UPLC-MS 法检测血清中霉酚酸的浓度，空白血清干扰小，待测物和内标物分离完全，分离特异性好。而 HPLC-UV 检测空白血清有干扰，待测物和内标物分离不完全。

此外，本实验采用乙腈除蛋白，离心，上清液经 0.22 μm 的滤膜过滤后直接进样，血样处理方法与文献[8]报道的采用先酸化，再萃取，萃取液用氮气吹干，最后再复溶的多步处理方法比较，大为简化，本实验从处理血样到得到样品图谱时间仅需 15 min 左右，且进样量低至 2 μl，大大减少了取血量，非常适合大样本量分析。实验药在 0.05 ~ 100.00 μg/mL 的浓度范围内线性良好，日内日间变异小，相对回收率大于 90%。因此该方法适用于 MPA 血清浓度的测定，特别是有关霉酚酸体内药代动力学的研究。

[参考文献]

[1] 章梅华，屠建中，刘 健. 吗替麦考酚酯胶囊人体生物等效性研究[J]. 中国药学杂志，2008，43(18)：1415 - 1419.

[2] Atcheson B, Taylor PJ, Mudge DW, et al. Quantification of free mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma by liquid-chromatography using mass spectrometric and ultraviolet absorbance detection[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 799(1)：157 - 163.

[3] 王健康，张福成，张华峰，等. 吗替麦考酚酯片在男性健康志愿者体内生物等效性研究[J]. 解放军药学学报，2006，22(1)：40 - 43.

[4] 黄海卫，李健和，彭六保，等. 吗替麦考酚酯分散片在中国健康男性志愿者体内的药动学和生物等效性研究[J]. 中国医药导报，2009，6(13)：24 - 26.

[5] Patel CG, 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.

[6] Premaud A, Debord J, Rousseau A, et al. A double absorption-phase model adequately describes mycophenolic acid plasma profiles in de novo renal transplant recipients given oral mycophenolate mofetil[J]. Clin Pharmacokinet, 2005, 44(8)：837 - 847.

[7] 师少军，李忠芳，万元胜，等. 吗替麦考酚酯分散片人体药动学和生物等效性研究[J]. 中国药学杂志，2008，43(10)：776 - 779.

[8] 宋 玲，胡拥军，胡 静，等. 高效液相色谱法测定人血浆中吗替麦考酚酯浓度[J]. 长江大学学报(自科版)医学卷，2007，4(1)：96 - 97.

(编辑：蒋登金)

《局解手术学杂志》编辑部成功主办局解手术学教学研讨会

由《局解手术学杂志》编辑部主办，天津医科大学基础医学院外科手术学教研室承办的局解手术学教学研讨会于 2010 年 5 月 17 日至 19 日在天津医科大学召开。会议深入探讨了局解手术学教学改革及发展方向，课题组及学组成员就如何办好《局解手术学杂志》并促进局解手术学学科发展的问题进行了深入细致的讨论。整个会议气氛浓烈，与会者对局解手术学未来的发展充满信心，并表示要在学术领域、学科发展等方面更加努力做出贡献。

《局解手术学杂志》编辑部