

高效液相色谱法测定咪唑立宾的血药浓度*

赵宇蕾, 芮建中, 孙胜利, 曹晓梅**, 周国华

南京军区南京总医院药理科, 南京 210002

摘要 目的:建立人血清中咪唑立宾(MZR)的高效液相色谱测定方法,为临床 MZR 的个体化用药提供方法学参考。**方法:**采用 10%高氯酸直接沉淀血清蛋白,色谱柱为 Megres C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-40 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH=3.5, 2:98, v/v),流速为 0.9 mL·min⁻¹,检测波长为 280 nm。**结果:**MZR 在 0.05~10 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好($r=0.9998$),批内、批间准确度偏差小于 4.6%,批内、批间精密度 RSD<7.9%,在室温放置、冰冻、反复冻融条件下考察样品稳定性,MZR 均保持稳定,偏差小于 4.9%。**结论:**高效液相色谱法测定 MZR 血药浓度的方法快速、准确、灵敏度高,适合在治疗药物监测中常规应用。

关键词 咪唑立宾;高效液相色谱法;血清浓度

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1673-7806(2016)02-125-03

咪唑立宾(mizoribine, MZR)是一种免疫抑制剂,由日本旭化成公司 1971 年从霉菌 *Eupenicillium brefediam* M-2166 培养液中分离出的一种咪唑类核苷,可竞争性地抑制核酸的嘌呤合成途径而达到免疫抑制作用,同时增加糖皮质激素受体的转录活性,达到激素减量效果^[1]。临床上主要用于预防和抑制肾移植的排斥反应、狼疮性肾炎、肾病综合征、IgA 肾病等。

MZR 易溶于水,口服吸收迅速,主要以原形通过肾脏排泄。肾衰竭的患者口服 MZR 后,血中 MZR 的高浓度状态可维持 24 h,肌酐清除率与药物消除速率之间呈高度相关性,提示肾衰竭患者要减少每次给药剂量或延长给药间隔时间。MZR 血药浓度与治疗效果及副作用密切相关。Kazunori^[2]研究在肾移植患者体内 MZR 的有效血浆浓度范围 $\geq 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,安全血浆浓度范围 $\leq 3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。冲击疗法抑制儿童肾病综合征复发时,MZR 血药浓度在 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上显著减少复发次数^[3]。因此,有必要对服用 MZR 的患者进行常规血药浓度监测,实施个体化用药,以保证用药的有效性和安全性。本文参考相关文献,建立了 HPLC 法测定血清中 MZR 的浓度,并已成功用于临床患者咪唑立宾的血药浓度常规监测。

* 基金项目 南京军区南京总医院院管课题(2011058)

**通讯作者 曹晓梅,女,硕士,副主任药师

E-mail: caoxiaomei08@sina.com

收稿日期 2015-12-21 修回日期 2016-02-06

1 仪器与试剂、试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统(G1322A 在线脱气机, G1311A 泵, G1314A 紫外检测器, Agilent ChemStation 化学工作站); 电子分析天平(XS205DU, Mettler Toledo); pH 计(PHS-3C 型, 上海仪电科学仪器股份有限公司)。

咪唑立宾对照品(纯度>99%,日本旭化成公司,批号:BDNA-1378);磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠(市售,药用级);甲醇(色谱纯);其它试剂为分析纯;试验用水为市售纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Megres C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-40 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH=3.5, 2:98, v/v); 检测波长: 280 nm; 柱温 25 °C; 流量: 0.9 mL·min⁻¹; 进样体积: 20 μL。

2.2 血清样品处理

取血清样品 200 μL 于 EP 管中,加入 10%高氯酸 100 μL,旋涡混合 15 s, 13000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,取上清液进样分析。

2.3 专属性试验

按“2.1”项色谱条件,咪唑立宾保留时间在 9.5 min 左右,样品峰形良好,无杂峰干扰测定。见图 1。

2.4 标准曲线和定量下限

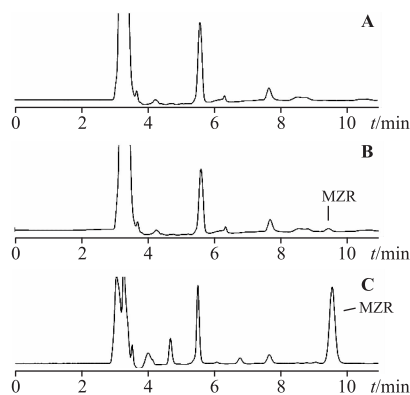


图1 咪唑立宾的色谱图

(A) 空白血清; (B) 空白血清+0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MZR;
(C) 患者血清(1.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

精密称取咪唑立宾对照品适量于5 mL量瓶中,加水溶解后定容至刻度,配成浓度为1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准储备液。取贮备液适量,加水稀释,配成1、2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列工作液。分别

在空白血清中加入工作液,使血清中药物浓度为0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按“2.2”项下方法操作,记录色谱图,以浓度为横坐标 X ,峰面积为纵坐标 Y ,用加权最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程: $Y=49.96X+0.018$ ($r=0.9998$)。

结果表明,MZR血药浓度在0.05~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。咪唑立宾在血清中的定量下限(LLOQ)为0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 准确度与精密度试验

分别于空白血清中加入工作液,精确配制成含低、中、高(0.1、1、8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种不同MZR浓度的血清样品,每种浓度5份,再按“2.2”项下方法处理,依据当日各自的标准曲线计算MZR的血清浓度,考察批内准确度、批内精密度;连续3天同法操作,考察批间准确度、批间精密度,结果见表1。批内、批间准确度偏差小于4.6%,批内、批间精密度RSD<7.9%,符合生物样品分析要求。

表1 批内、批间准确度和精密度试验结果

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	批内($n=5$)				批间($n=3$)			
	实测值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	偏差/%	精密度 RSD/%	实测值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	偏差/%	精密度 RSD/%
0.1	0.10±0.0017	98.1	1.9	1.7	0.10±0.0034	95.4	4.6	3.6
1	1.00±0.017	100.2	-0.2	1.7	0.99±0.078	99.2	0.8	7.9
8	8.17±0.129	102.1	-2.1	1.6	8.10±0.52	101.2	-1.2	6.4

2.6 回收率试验

分别于200 μL 空白血清中加入工作液,精确配制成含低、中、高(0.1、1、8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种不同MZR浓度的血清样品,每种浓度5份,按“2.2”项下方法处理后进样分析。用水代替空白血清配制对照品溶液,每种浓度5份,按“2.2”项下方法处理后进样分析。以每一浓度两者峰面积之比计算提取回收率,结果见表2。绝对回收率大于95.3%

表2 回收率试验结果($n=5$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率/%	RSD/%
0.1	96.5±1.6	1.7
1	96.7±1.6	1.7
8	95.3±1.5	1.6

2.7 稳定性考察

血清样品分别在室温放置8 h、3次冻融、-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置15天以及处理好后室温放置24 h进行测定,在上述考察条件下,MZR均保持稳定,偏差均小于4.9%,符合生物样品分析要求。见表3。

2.8 临床应用

本方法成功用于口服MZR患者的血药浓度检测。我院儿科送样患儿主要为肾病综合征,少量肾小球肾炎,年龄2~16岁,用药每日一次或隔日一次,

表3 样品稳定性考察结果($n=5$)

考察条件	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均测得浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	偏差/%
室温放置 8 h后处理	0.1	0.10	99.7	0.3
	1	0.95	95.1	4.9
	8	7.88	98.4	1.5
处理好的样品 室温放置24 h	0.1	0.10	101.7	-1.7
	1	0.99	99.4	0.6
	8	7.94	99.2	0.8
冻融3次	0.1	0.10	97.7	2.3
	1	0.99	99.2	0.8
	8	7.73	96.6	3.4
冷冻15 d	0.1	0.10	97.7	2.3
	1	1.00	100.0	0
	8	7.87	98.4	1.6

每次剂量50~300 mg。监测时间点为2 h或动态监测(0、2、3、6、8、12 h)。某病人服用200 mg MZR的药-时曲线图见图2, C_{max} 为3.18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, T_{max} 为3 h,其药理学特征与文献报道^[4]相符。

3 讨论

咪唑立宾极性很大,在普通 C_{18} 柱上几乎没有保留。Zhao等^[4]采用LC-MS/MS方法测定以增加其

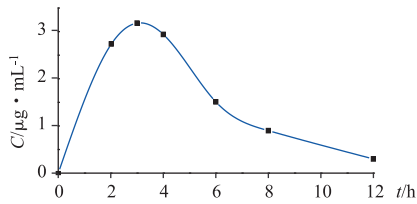


图2 儿科某肾病综合征患者口服 MZR 200 mg 后 12 h 内的药-时曲线

灵敏度。临床标本检测使用液质联用仪成本较高。焦正等^[5-7]建立的测定方法均采用氨基柱来增加咪唑立宾的保留时间。氨基柱主要用于分离极性大的物质,使用寿命短且价格较贵。Erdmann^[8]在流动相中增加了离子对试剂,但是离子对试剂会对色谱柱造成不可逆的损害,且离子对试剂的浓度、流动相 pH 与其样品的保留时间有直接影响,且需较长的平衡时间,重现性较差。

本实验参考 Kaji^[9]的方法,采用亲水性 C₁₈ 柱,以增加咪唑立宾的保留时间。实验中发现流动相甲醇的量及 pH 值的变化对咪唑立宾的保留时间影响较大。因 MZR 极性过大,采用高氯酸直接沉淀血清蛋白。

本实验方法具有简便、准确、成本较低的特点,能准确测定血清中 MZR 的浓度,适用于临床检测。

参考文献

[1] Takahashi S, Wakui H, Gustafsson JA, et al. Functional Interaction of the Immunosuppressant Mizoribine with the 14-3-3 Protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274(1): 87-92.

[2] Kazunori S, Kota T, Kazunari T, et al. Clinical pharmacokinetics study of mizoribine in renal transplantation patients[J]. *Transplant Proc*, 1996, 28(6): 3643-8.

[3] Goto M, Ikeda I, Hataya H, et al. Beneficial and adverse effects of high-dosage MZR therapy in the management of children with frequently relapsing nephrotic syndrome [J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 2006, 48 (4): 365-70.

[4] Zhao YN, Yang JJ, Li XH, et al. A sensitive and practical LC-MS/MS method for the determination of mizoribine in human serum and its bioequivalence study on Chinese healthy volunteers [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(9): 1149-54.

[5] 焦正,杨洁,张明,等. 高效液相色谱法测定人血浆中咪唑立宾的浓度[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25 (7): 489-91.

[6] 戴青,刘松青,夏培元,等. 高效液相色谱法测定人体血浆中咪唑立宾及其药动学研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(20): 1725-7.

[7] 张杰会,李潘,张莉,等. HPLC 法测定人体血浆中咪唑立宾的浓度[J]. *湖北民族学院学报*, 2015, 32(1): 12-4.

[8] Erdmann GR, Gruber SA, McGuiggan MM, et al. Determination of mizoribine in plasma using ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1989, 494(2): 354-60.

[9] Kaji H, Maiguma T, Inukai Y, et al. A Simple Determination of Mizoribine in Human Plasma by Liquid Chromatography with UV Detection [J]. *J Aoac Int*, 2005, 88(4): 1114-7.

Determination of Mizoribine in Human Serum by HPLC*

ZHAO Yu-lei, RUI Jian-zhong, SUN Sheng-li, CAO Xiao-mei**, ZHOU Guo-hua

Department of Pharmacology, General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method for determining mizoribine in human serum for clinical individualized medicine. **Methods:** After precipitation of serum proteins with 10% perchloric acid, mizoribine was determined by HPLC on a reversed phase Megres C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture of methanol and 40 mmol·L⁻¹ phosphate buffer adjusted to pH 3.5, in the ratio of 2:98 and delivered at a flow rate of 0.9 mL·min⁻¹. The UV detection was set at 280 nm. **Results:** The peak area for mizoribine was linearly related to its concentrations, which ranged from 0.05 to 10 μg·mL⁻¹ (r=0.9998). The intra- and inter-day relative standard deviation values were within 7.9%, the extraction recoveries were over 95.3%. The samples, unprocessed, processed, in store or after 3 cycles of freeze and thaw processes, were stable. **Conclusions:** The established HPLC method is fast, sensitive, and accurate. It could be applied to therapeutic drug monitoring.

KEY WORDS Mizoribine; HPLC; Serum concentration