

肾移植受者术后咪唑立宾血药浓度监测及肌酐清除率对其影响

尹航, 李哲, 耿芳, 王政, 杨春秀, 沈素, 余俊先 (首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立肾移植受者术后咪唑立宾浓度的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)分析方法, 测定咪唑立宾浓度并探讨肌酐清除率对咪唑立宾血药浓度的影响。方法: HPLC 色谱柱 XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~2 min 70%A, 2~4 min 40%A, 4~7 min 70%A; 流速 0.6 mL·min⁻¹; 电喷雾离子源 ESI 负离子模式。肾移植受者术后口服咪唑立宾(100 mg bid), 在初次服药后第 10 日与第 15 日分别于服药前半小时和服药后 3 h 测定血药浓度, 观察肌酐清除率对药物浓度的影响。结果: 目标化合物咪唑立宾与内标 BA-TPQ 的离子质荷比(*m/z*)分别为 258.2→126.1 和 278→91.1。二者分离完全, 保留时间分别为 2.14 min 和 2.74 min, 提取回收率稳定, 日内、日间精密度 RSD 低于 15%, 血浆样品在低温环境中稳定。肾移植受者血药浓度监测表明, 咪唑立宾浓度与肌酐清除率高度相关, 随肌酐清除率降低而升高, 不良反应可能与峰浓度高有关。结论: 肾移植术后监测咪唑立宾血药浓度, 根据肌酐清除率调整给药剂量, 有助于降低排斥反应, 减少不良反应的发生。

[关键词] 肾移植术后; 肌酐清除率; 咪唑立宾; 高效液相色谱串联质谱; 血药浓度

[中图分类号] R969 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2017)19-1933-04 DOI:10.13286/j.cnki.chinhosp pharmacy.2017.19.12

Mizoribine monitoring and the influence of creatinine clearance on renal transplant recipients

YIN Hang, LI Zhe, GENG Fang, WANG Zheng, YANG Chun-xiu, SHEN Su, YU Jun-xian (Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a HPLC-MS/MS method for the determination of mizoribine concentration after renal transplantation, and discuss the correlation between creatinine clearance and drug concentration. **METHODS** HPLC was performed on a XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B), gradient elution for 0-2 min 70%A, 2-4 min 40%A, 4-7 min 70%A; at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. Blood samples were collected from patients after renal transplantation receiving mizoribine (100 mg, bid) to determine mizoribine concentration 0.5 h before and 3 h after drug administration. **RESULTS** Mizoribine and internal standard (IS) were detected at *m/z* 258.2→126.1 and 278→91.1. Two compounds were completely eluted, retention times were 2.14 min and 2.74 min. The extraction recovery rate was stable, intra-day and inter-day precision RSD<15%. Plasma samples were stable in low temperature environments. The drug concentration monitoring showed that mizoribine concentration was highly correlated with creatinine clearance, increased as the creatinine clearance decreased. High peak concentration might lead to adverse drug reaction. **CONCLUSION** Mizoribine dose adjustment according to the creatinine clearance rate is helpful to reduce the rejection reaction and reduce the adverse reaction.

KEY WORDS: renal transplant recipients; creatinine clearance; mizoribine; HPLC-MS/MS; drug concentration

肾移植是终末期慢性肾衰竭患者最理想的肾脏替代疗法, 免疫抑制剂的发现与应用极大地推进了移植学科的发展。目前肾移植术后常用免疫抑制维持治疗方案是以 CNI 类(环孢素或他克莫司)为基础, 联合抗增殖类药物(如 MPA)加糖皮质激素的三联免疫疗法。CNI 及 MPA 类药物治疗窗窄, 同时移植受者受肾功能情况, 以及遗传、环境和药物间相互作用等多种因素的影响, 药物在受者体内的药动学过程差异较大, 导致其临床疗效不稳定且易发生不良反应^[1]。因此, 肾移植术后已常规监测 CNI 及

MPA 类药物浓度, 优化给药剂量, 确保有效预防排斥并减少不良反应的发生。

咪唑立宾(mizoribine, MZR)是由日本旭化成公司在 1971 年从霉菌中分离出的一种嘌呤核苷合成抑制剂, 其能特异性地抑制快速增长的淋巴细胞, 从而产生免疫抑制作用^[2]。与抗增殖类一线用药 MPA 类药物相比, 因其骨髓抑制作用弱、消化系统不良反应小等特点而受到肾移植学科的关注, 《中国肾移植受者免疫抑制治疗指南(2016 年版)》^[3]已把咪唑立宾列为 MPA 类药物出现消化道不良反应、

[作者简介] 尹航, 男, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学, 电话: 010-63138515, E-mail: Yinhang36512@126.com **[通讯作者]** 余俊先, 男, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 临床药学, 电话: 010-63138515, E-mail: junxianyu@ccmu.edu.cn

骨髓抑制或丙肝病毒(HCV)复制活跃、巨细胞病毒(CMV)、BK 病毒感染或术前 CMV 感染高危受者等情况时的替代用药。研究表明,咪唑立宾口服生物利用度较低(约 41%),且个体差异较大(12%~81%),临床应用须监测其血药浓度^[4]。查阅文献发现目前并没有针对中国人群肾移植术后咪唑立宾血药浓度监测的相关研究,为此我们建立了血浆中咪唑立宾浓度的分析方法,以测定肾移植受者术后咪唑立宾浓度并探讨肌酐清除率对咪唑立宾浓度的影响。

1 材料

1.1 试药 咪唑立宾(Asahi Pharma Corporation,批号 BDNA-1601,纯度 99.8%);内标物:BA-TPQ(纯度 98%)^[5];乙腈(分析纯,Merck,Germany);甲酸铵(分析纯,SIGMA-ALDRICH);甲醇(分析纯,Merck,Germany);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 HPLC-MS/MS(1200-6460,Agilent,USA);HPLC 含二元泵、脱气机、自动进样器、柱温箱等;超声仪(PS-20A,洁康有限公司);Milli-Q plus 超纯水器(Millipore 公司);分析天平(BS 124S,sartorius);涡旋器(MS-3,IKA);低温离心机(SIGMA 3-18K,sartorius)。

2 方法与结果

2.1 HPLC-MS/MS 参数设置 色谱柱为 XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为 0.1% 甲酸铵水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min 70% A,2~4 min 40% A,4~7 min 70% A;流速 0.6 mL·min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 2 μL。离子源为电喷雾离子源 ESI;毛细管电压 4.5 kV;干燥气流速 8 L·min⁻¹;干燥气温度 300 °C;雾化气压力 30 psi;碎裂电压 120 V;离子化模式为负离子模式;选择的检测离子荷质比(*m/z*):咪唑立宾:258.2→126.1;BA-TPQ:278→91.1(表 1)。

2.2 工作液、标准曲线及质控样品配置 工作液:精密称取咪唑立宾标准品和内标物 BA-TPQ,以 50% 甲醇为溶媒配成 1 mg·mL⁻¹ 的储备液及 1 μg·mL⁻¹ 的内标液。用 50% 甲醇将储备液分别稀释为质量浓度为 0.1,0.5,2,5,10,20 μg·mL⁻¹ 的工作液;取工作液 10 μL,用空白血浆稀释配置成标准曲线,血浆 L₁~L₆ 的标准曲线浓度分别为 10,50,

表 1 咪唑立宾和内标的 HPLC-MS/MS 参数
Tab 1 HPLC-MS/MS parameters of mizoribine and IS

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞能量/V	加速电压/V	离子化模式
咪唑立宾	258.2	126.1	120	11	3	负离子
BA-TPQ	278	91.1	170	25	4	正离子

200,500,1 000,2 000 ng·mL⁻¹。低、中、高 3 个质控样品的浓度分别为 20,200,1 600 ng·mL⁻¹。

2.3 血浆样品处理 取血浆样品 100 μL,加入 10 μL 内标液以及 300 μL 乙腈,涡旋 60 s,4 °C 高速离心 15 min(18 000×*g*),取上层有机相 200 μL 进行氮气吹干,用 50 μL 流动相复溶,取 2 μL 进样分析。

2.4 专属性考察 在上述条件下进行检测,咪唑立宾和 BA-TPQ 的保留时间分别为 2.14 min 和 2.74 min,无空白血浆和组织中内源性物质干扰,专属性较好。空白血浆及含药血浆色谱图见图 1。

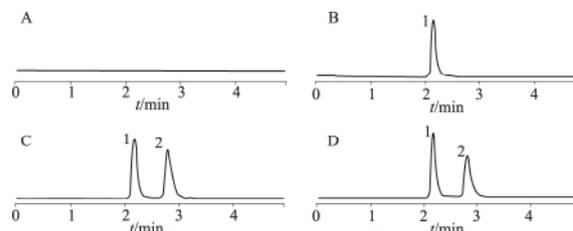


图 1 HPLC-MS/MS 色谱图
Fig 1 Chromatograms of HPLC-MS/MS

A. blank serum; B. blank serum + mizoribine (1 μg·mL⁻¹); C. blank serum+mizoribine (1 μg·mL⁻¹) + BA-TPQ (1 μg·mL⁻¹); D. serum sample of patient; 1-mizoribine; 2-internal standard (BA-TPQ)

2.5 线性范围、回收率和基质效应 空白血浆中咪唑立宾浓度在 10~2 000 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,线性方程为 $Y = 0.698\ 749 X + 5.366\ 811 \times 10^{-4}$ ($r^2 = 0.998\ 5$)。相对标准偏差(RSD)可评估回收率及基质效应,实验表明,咪唑立宾在血浆中的绝对回收率在 82.89%~86.81% 之间,相对回收率在 86.19%~95.74% 之间,RSD 在 ±15% 以内。基质效应在 88.89%~93.16% 之间,RSD 在 ±15% 以内,对 MS 信号无干扰。

2.6 准确度、精密度 考察低、中、高 3 种质控样品,各浓度分别平行处理 3 份和 5 份,按“2.3”项下方法预处理样品,考察提取回收率、日内和日间精密度;用流动相配制低、中、高 3 个浓度样品,加入内标,测得响应值 A;在空白血浆提取后加入相同质控和内标,测得响应值 B,基质效应 $ME(\%) = \text{响应值 B} / \text{响应值 A} \times 100\%$ (表 2)。

2.7 稳定性 考察低、中、高 3 个质控样品,考察反

表 2 精密度、回收率和基质效应

Tab 2 The precision, recovery and matrix effect

质控浓度/ ng·mL ⁻¹	日内精密度(n=5)		日间精密度(n=3)		绝对回收率/% (n=3)	相对回收率/% (n=3)	基质效应/% (n=3)
	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%			
20	5.45	97.9	2.17	99.1	86.81±5.56	86.19±4.36	88.89±4.68
200	7.93	96.8	6.05	90.5	83.97±5.87	95.74±2.30	93.16±2.39
1600	8.89	102.0	4.28	97.9	82.89±2.04	89.73±2.29	89.41±6.03

表 3 稳定性实验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The results of stability tests($\bar{x} \pm s$)

质控浓度/ng·mL ⁻¹	反复冻融稳定性/%	自动进样器稳定性/%	室温放置稳定性/%	长期稳定性(2周)/%
20	96.98±4.5	97.54±2.5	94.38±2.4	89.43±2.8
200	90.38±3.6	90.59±2.1	89.72±5.3	92.42±5.9
1600	102.58±1.8	96.92±4.3	97.47±3.2	93.89±4.1

复冻融 3 次、自动进样器放置 6 h、室温放置 24 h 及 -70 °C 放置 2 周的稳定性。实验结果表明,咪唑立宾稳定性良好,在本实验条件下咪唑立宾血浆样品的稳定性能够满足测定需要(表 3)。

2.8 受试者样品检测 临床试验经北京友谊医院伦理委员会批准,患者自愿签署知情同意书。纳入 8 例肾移植术后患者(编号 SampleA-SampleH),4 男 4 女,年龄集中在 33~47 岁,咪唑立宾服药方法均为 100 mg bid。排除了年龄、药物剂量、合并用药等影响。患者具体信息见表 4。咪唑立宾半衰期 2.7 h,在初次服药后的第 10 日与第 15 日,血浆药物浓度已经达稳态后,分别于服药前半小时和服药后 3 h 测定咪唑立宾谷浓度与峰浓度。取患者静脉血 2.0 mL 置于 EDTA 离心管中,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血浆 -70 °C 保存。血浆样品按“2.3”项下方法预处理。结果见表 5。

表 4 受试患者信息

Tab 4 The information of patients

患者编号	性别	年龄/岁	合并免疫抑制剂	肌酐清除率/mL·min ⁻¹
Sample A	男	41	他克莫司 醋酸泼尼松	89
Sample B	男	47	他克莫司 醋酸泼尼松	52
Sample C	女	33	他克莫司 醋酸泼尼松	131
Sample D	女	38	他克莫司 醋酸泼尼松	96
Sample E	男	39	他克莫司 醋酸泼尼松	56
Sample F	女	42	他克莫司 醋酸泼尼松	115
Sample G	女	37	他克莫司 醋酸泼尼松	45
Sample H	男	41	他克莫司 醋酸泼尼松	110

表 5 受试者血浆中咪唑立宾浓度

Tab 5 Concentrations of mizoribine in patient plasma

患者编号	咪唑立宾浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (I)		咪唑立宾浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (II)	
	谷浓度	峰浓度	谷浓度	峰浓度
Sample A	0.32	0.73	0.13	0.71
Sample B	0.61	0.77	0.59	0.88
Sample C	0.07	0.26	0.09	0.60
Sample D	0.28	0.61	0.22	0.46
Sample E	0.61	0.82	0.54	1.44
Sample F	0.16	0.50	0.04	0.57
Sample G	0.61	1.15	0.94	1.37
Sample H	0.05	0.34	0.04	0.85

考察不同肌酐清除率下血药浓度的分布情况,按照肾功能判定标准将患者分为肾功能正常组($\text{Ccr} > 80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、肾功能损害组($\text{Ccr} < 80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)。肌酐清除率均由 Cockcroft-Gault 公式计算所得。从图 2 中结果发现,8 例患者中 3 人肾功能损害,5 人肾功能正常。对于肾功能正常患者,咪唑立宾峰浓度主要在 $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下范围内,谷浓度分布在 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下范围内。当患者肾功能损害时,咪唑立宾峰浓度主要分布在 $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上范围内,谷浓度分布在 $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上范围内。在同一给药方案下(100 mg bid),咪唑立宾浓度随肌酐清除率降低而升高,肾功能损害与肾功能正常患者其平均谷浓度与峰浓度都具有显著性差异($P < 0.05$)。咪唑立宾常见不良反应为血尿酸升高,8 例患者中 1 例肾功能损害患者(Sample E)在用药后第 15 日出现了高尿酸血症的不良反应,当日测得咪唑立宾谷浓度 $0.54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,峰浓度 $1.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,峰浓度显著升高而谷浓度未见异常,提示咪唑立宾致尿酸升高的不良反应可能与峰浓度过高有关。因此,肾移植受者术后或肾功能损害患者在使用咪唑立宾时应加强血药浓度监测,对患者进行用药监护,动态监测患者肾功能指标,评估药物疗效,减少不良反应的发生。

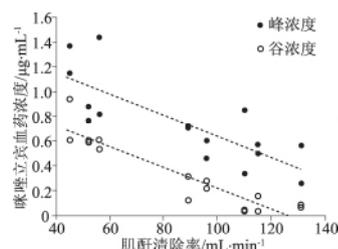


图 2 不同肌酐清除率患者咪唑立宾浓度分布图

Fig 2 Distribution figure of mizoribine concentrations in patients with different creatinine clearance rates

3 讨论

肾移植术后常用免疫抑制维持治疗方案是以 CNI 联合 MPA 加糖皮质激素。已有足够循证医学

证据支持 CNI 和 MPA 类药物应监测血药浓度并为 CNI 类药物提出了明确的监测频率及浓度目标值。但目前并没有针对中国人群的肾移植术后咪唑立宾血药浓度研究,现有方法^[6-11]主要是以健康志愿者或其他适应证患者为受试对象,且主要通过 HPLC 测定。考虑到肾移植术后患者肾功能变化,复杂的用药环境及患者的个体间差异,为了满足咪唑立宾血药浓度的测定需要,本课题组借助灵敏度更高的 HPLC-MS/MS 等仪器,参考了现有方法,并自己摸索使定量下限(LLOQ)达到 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,更适用于肾移植术后咪唑立宾血药浓度监测,为今后的相关研究提供参考。

本研究结果显示,血浆中咪唑立宾在 $10 \sim 2\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好, $r^2 = 0.9985$,日间精密度、日内精密度及稳定性均符合要求。所测定的所有样本数据均在线性范围内。患者肾功能情况是咪唑立宾血药浓度的重要影响因素,肾功能正常、肾功能损害患者的咪唑立宾浓度存在显著差异。1 例患者出现高尿酸血症不良反应,提示不良反应可能与峰浓度高有关。本研究入选患者年龄较集中,分布在 $33 \sim 47$ 岁,服药剂量相同,合并免疫抑制剂相同。可初步排除年龄、药物剂量及合并免疫抑制剂影响。因样本量较少,只有 8 例患者的数据,结论具有一定的局限性,为了更加明确地探究咪唑立宾浓度与肾功能、不良反应以及其他影响因素的关系,则需要更多的临床患者数据。

参考文献:

- [1] 刘可欣,徐珽,蒋学华. 肾移植患者吗替麦考酚酯药时曲线下面积与不良反应的相关性[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(8): 658-661.
- [2] 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.
- [3] 石炳毅,袁铭. 中国肾移植受者免疫抑制治疗指南(2016 版)[J]. *器官移植*,2016(5):327-331.
- [4] 张喆. 肾移植术后咪唑立宾的临床应用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*,2014,23(1):84-88.
- [5] Yu JX, Voruganti S, Li DD, *et al.* Development and validation of an HPLC-MS/MS analytical method for quantitative analysis of TCBA-TPQ, a novel anticancer makaluvamine analog, and application in a pharmacokinetic study in rats[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(7): 554-560.
- [6] 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]. *Yao Xue Xue Bao*, 2010, 45(9): 1149-1154.
- [7] 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):489-491.
- [8] 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): 1725-1727.
- [9] 张会杰,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(医学版)*,2015,32(1):12-14.
- [10] 赵宇蕾,芮建中,孙胜利,等. 高效液相色谱法测定咪唑立宾的血药浓度[J]. *药学与临床研究*,2016,24(2):125-127.
- [11] 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): 1114-1117.

[收稿日期]2016-11-14