

• 研究论文 •

干血点采样技术和干血浆采样技术在麦考酚酸药动力学分析中的应用

刘 勇, 魏广力*, 谷 元, 王新刚, 夏媛媛, 司端运

天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 探讨干血点采样技术(dried blood spots, DBS)和干血浆采样技术(dried plasma spots, DPS)在麦考酚酸药动力学分析中的应用。方法 色谱柱为Ecosil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.01 mol/L 甲酸水(0.1%甲酸)-乙腈-甲醇(25:45:30), 体积流量为0.4 mL/min, 柱温为30 °C, 进样量10 μL; 质谱检测采用ESI离子源, 正离子MRM方式检测; 考察可能的影响因素并进行临床研究。结果 DBS法和DPS方法学和临床实验数据均良好。结论 DBS方法和DPS法较一般处理方法简便, 用量少, 储存运输方便, 在一些药物的药动力学分析中能代替一般的处理方法。

关键词: 干血点采样; 干血浆采样; 麦考酚酸; 药动力学

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)06-0401-07

Application of dried blood spots and dried plasma spots technologies in pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid

LIU Yong, WEI Guang-li, GU Yuan, WANG Xin-gang, XIA Yuan-yuan, SI Duan-yun

State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the application of dried blood spots (DBS) and dried plasma spots (DPS) methods in the pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid (MPA). **Methods** HPLC was performed on an Ecosil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using 0.1% formic acid (0.01 mol/L)-acetonitrile-methanol (25:45:30) as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was 30 °C. Detection was carried out using an ESI interface operating in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Possible factors were studied and clinical trials were carried out. **Results** The results of DBS and DPS methods and the data of clinical trials were excellent. **Conclusion** DBS and DPS methods could be alternatives to conventional assays for simple method, with the advantages of comparable exposure data, small-volume sampling, and easy transportation and preservation.

Key words: dried blood spots (DBS); dried plasma spots (DPS); mycophenolic acid (MPA); pharmacokinetics

麦考酚酸(MPA)具有免疫调节作用, 常用于预防同种肾移植病人的排斥反应及治疗难治性排斥反应^[1-2]。将全血样品收集在卡纸上, 即干血点采样(DBS); 将血浆样品收集在卡纸上, 即干血浆采样(DPS)。DBS法和DPS法在血样采集方法上较传统方法有一定的优势。它需求血量较少, 可减少实验动物用量, 方便血样采集、存储运输, 简化样品前处理。到目前为止, DBS法和DPS法与LC-MS/MS技术联用在小分子定量分析中已成为一个重要的方法, 但还不完善, 国内相关研究较少^[3-6]。本实验目的在于通过探讨DBS法和DPS法在MPA药动

学分析中的应用, 完善DBS法和DPS法与LC-MS/MS联用技术。

1 材料和方法

1.1 材料

MPA(江苏康缘制药有限责任公司), 吡咯列酮(山东鲁南制药股份有限公司), 甲醇为色谱纯(Fisher公司), 乙腈为色谱纯(Fisher公司), 甲酸(天津市光复精细化工研究所), 甲酸铵(天津市光复精细化工研究所), 去离子水(天津药物研究院), 加入EDTA的空白人血(天津中医药大学第二附属医院), 加入EDTA的空白犬血(天

收稿日期: 2012-09-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB735602)

作者简介: 刘 勇(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药代动力学。Tel: (022)84845242 E-mail: sinkvine@gmail.com

*通讯作者 魏广力 Tel: (022)84845242 E-mail: weigl510@163.com

津药物研究院), Whatman FTA 卡 (欧洲 GE 医疗集团)。

1.2 LC-MS/MS 条件与系统适应性实验

1.2.1 液相条件 仪器配有 ESI 离子源及 Xcaliber 1.2 数据处理系统 TSQ HPLC-MS (美国 Finnigango 公司), 色谱柱为 Ecosil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相为乙腈-甲醇-0.01 mol/L 甲酸水 (0.1%甲酸) (45:30:25), 体积流量为 0.4 mL/min, MPA 和吡咯列酮的保留时间分别为 6.81、7.33 min, 仪器运行时间为 8.6 min (2 min 之前和 8.4 min 之后切换)。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源 ESI 源; 离子化方式为正离子扫描; 毛细管温度 280 °C; 鞘气压力 276 kPa; 辅助气压 69 kPa; 碰撞能 26 eV; 扫描方式为 SRM 定量检测; 选择离子: MPA m/z 338.2 $[M+NH_4]^+ \rightarrow m/z$ 207.2, 碰撞能 22 eV, 吡咯列酮 m/z 357.1 $[M+NH_4]^+ \rightarrow m/z$ 134.1 (图 1)。

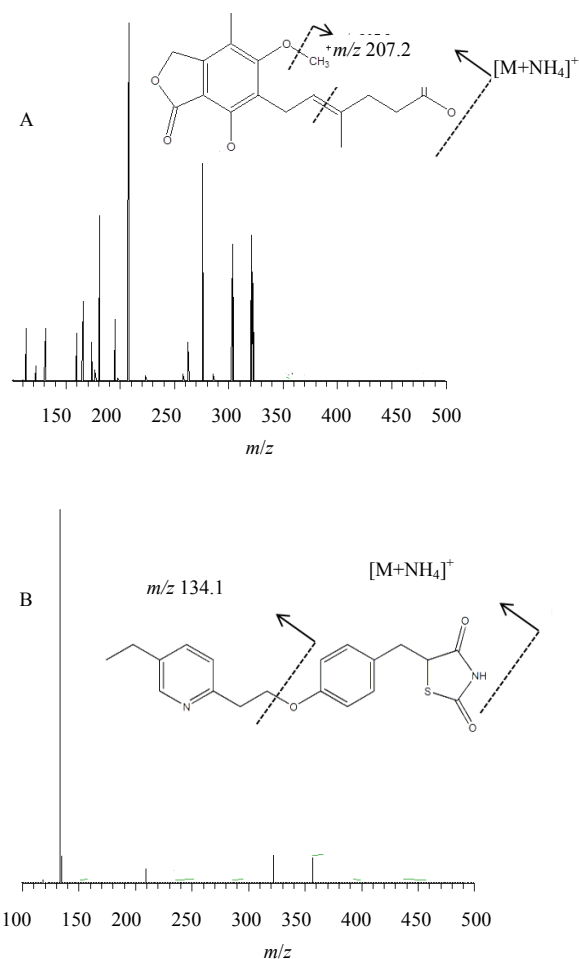


图 1 MPA (A) 和吡咯列酮 (B) 的二级全扫描图谱
Fig. 1 Full scan MS² spectra of MPA (A) and Pioglitazone (B)

1.2.3 系统适应性 每天在进行方法学确证前, 取 MPA 对照样品 1 μg/mL 及吡咯列酮 1 μg/mL 混合标准样 (1:1) 100 μL 进样 6 针测定, 至实验结束。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 化学沉淀法 精密称取 MPA 对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的 MPA 标准贮备液。用甲醇梯度稀释成质量浓度为 0.05、0.1、0.5、1、5、25、50 μg/mL 的标准溶液。

精密称取吡咯列酮对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的吡咯列酮标准贮备液, 并进一步用甲醇稀释为 1 μg/mL 标准溶液。所有溶液置于 4 °C 冰箱保存备用。QC 样品质量浓度 0.1、1、40 μg/mL。

1.3.2 DBS 法 精密称取 MPA 对照品 100 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 10 mg/mL 的 MPA 标准贮备液。随后用甲醇梯度稀释成质量浓度为 2 500、2 000、1 250、250、50、25、5、2.5 μg/mL 的系列工作液。

精密称取吡咯列酮对照品 1 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 0.1 mg/mL 的吡咯列酮标准贮备液, 并进一步用乙腈稀释为 0.1 μg/mL 标准溶液。QC 样品质量浓度 0.1、1、40 μg/mL。

1.3.3 DPS 法 同“DBS 法”。所有样品 4 °C 保存。

1.4 样品处理方法

1.4.1 化学沉淀法 取 50 μL 血浆依次加入 50 μL 系列标准样品, 100 μL 内标液 (1 μg/mL) 和 800 μL 甲醇-乙腈-水 (30:45:25), 涡旋振荡 2 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 120 μL, 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 进样 5 μL, 进行 LC-MS/MS 分析测定。

1.4.2 DBS 法 每张卡标记后, 取 EDTA 抗凝全血 20 μL, 快速流畅地点卡。室温干燥 2 h, 中心打孔 3 mm, 加入 100 μL 内标液 (乙腈配制, 0.1 μg/mL) 和 100 μL 水配置的混合提取液, 超声提取 10 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 进样 10 μL, 进行 LC-MS/MS 分析测定。

1.4.3 DPS 法 每张卡标记后, 取血浆 10 μL, 同“DBS 法”处理。

2 结果

2.1 提取溶液

对比甲醇-水 (25:75、50:50、75:25)。每

张卡标记完后,取 EDTA 抗凝全血 20 μL 点卡,室温干燥 2 h,用打孔器中心打孔 3 mm,分别按甲醇-水 (25:75、50:50、75:25, $n=6$) 配制内标液 (乙腈配制, 0.1 $\mu\text{g/mL}$) 和水的混合提取液 200 μL ,按“1.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定。结果见表 1, 甲醇-水 (25:75) 时回收率较高但提取液呈红色,可能水相比比例过高使提取过程中提取出一些基质,过固相萃取柱也不能滤去。对比加入适量甲酸 (0.1%) 和不含甲酸的提取率,显示不加甲酸的提取率高。所以提取液选为不含甲

酸的甲醇-水 (50:50)。

2.2 提取方法

对比超声提取法和涡旋提取法 ($n=3$),时间均为 10 min。取 EDTA 抗凝全血 20 μL 点卡,室温干燥 2 h,中心打孔 3 mm,加入 100 μL 内标液和 100 μL 水配制的混合提取液,分别用超声法和涡旋法各提取 10 min,按“1.4”项下方法处理后,进行 LC-MS/MS 分析测定。结果见表 2,超声法和涡旋法提取,结果差异无显著性 ($P>0.05$),增加提取时间,结果也无显著差异。本实验选择超声提取 10 min 为提取方法。

表 1 DBS 法不同提取液对响应值的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of different ratios of extraction solutions on analyte response values in DBS method ($n=3$)

提取液	测定质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SD / %	RSD / %	回收率 / %
甲醇-水 25:75	1.030	0.2	2.79	103.0
甲醇-水 50:50	0.991	0.1	1.52	99.1
甲醇-水 75:25	0.908	0.2	4.26	90.8
甲醇-水 50:50 (含 0.1% 甲酸)	0.885	0.2	5.05	88.5

表 2 DBS 法不同提取方法对响应值的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of different extraction methods on analyte response values in DBS method ($n=3$)

提取方法	提取时间/min	平均质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SD/%	RSD/%	准确度/%
超声	10	0.991	0.2	3.62	99.1
	30	0.992	0.2	3.17	99.2
涡旋	10	0.987	0.2	3.24	98.7
	30	0.997	0.2	5.11	99.7

2.3 点卡体积

DBS 法平行对比了 10、15、20 μL 全血点卡对响应值的影响 ($n=3$)。取质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 EDTA 抗凝全血 10、15、20 μL 点卡后按“1.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定。结果见表 3,各组间差异不显著,得出点卡体积对响应值基本没有影响。20 μL 较 15 μL 更易于点卡,因此选择 20 μL 点卡。由于血浆的黏度较全血低,故 DPS 法的点卡体积为 10 μL 。

2.4 打孔位置

为了对比中心打孔方法和边缘打孔方法对响应值的影响,分别在斑点的中心和边缘各打孔 3 mm,按“1.4”项下方法处理后,进行 LC-MS/MS 分析测定。结果见表 4,边缘打孔的响应值比中心打孔要高 10%左右,但其精密度要差 4%左右。根据实验重复性原则,打孔位置最终选择精密度较高的中心打孔。

表 3 DBS 法不同点卡体积对响应值的影响 ($n=3$)

Table 3 Effect of different spot volumes on analyte response values in DBS method ($n=3$)

点卡体积 / μL	平均质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SD/%	RSD/%	准确度/%
15	0.973	0.1	6.86	97.3
20	0.997	0.1	3.61	99.7
25	1.030	0.1	3.09	103.0

表 4 DBS 法不同打孔位置对响应值的影响 ($n=3$)

Table 4 Effect of different punching positions on analyte response values in DBS method ($n=3$)

打孔位置	平均质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SD/%	RSD/%	准确度/%
中心	0.997	0.1	4.83	99.7
边缘	1.097	0.3	8.51	109.7

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系及定量下限

(1) 化学沉淀法 取MPA对照品配制成0.05、0.1、0.5、1、5、25、40、50 $\mu\text{g/L}$ 的血浆溶液。按“1.4”项下方法处理后进行LC-MS/MS分析。

(2) DBS法 取空白全血490 μL 分别加入2.5、5、25、50、250、1 250、2 000、2 500 $\mu\text{g/L}$ 的MPA工作液10 μL 制成0.05、0.1、0.5、1、5、25、40、50 $\mu\text{g/L}$ 的MPA标准溶液,按“1.4”项下方法处理后进行LC-MS/MS分析。

(3) DPS法 取空白血浆490 μL ,同“DBS法”处理。

连续测定3 d,每天测量3条曲线。以MPA在血浆中的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,线性回归得校正曲线 $Y=A+BX$ (权重 $1/x^2$),得回归方程:化学沉淀法为 $Y=0.0564X+0.000395$, $r^2=0.998$;DBS法为 $Y=0.0564X+0.000395$, $r^2=0.998$;DPS法为 $Y=0.0557X+0.00179$, $r^2=0.998$ 。MPA在0.05~50 $\mu\text{g/L}$ 线性关系良好。该法定量下限为0.05 $\mu\text{g/L}$ 。LLOQ的响应值大于空白血的5倍。

2.5.2 选择性及灵敏度

(1) DBS法 分别按以下方法制得3种样品,空白组、对照组和样品组。

空白组:取20 μL 空白全血点卡,室温干燥2 h,中心打孔3 mm,加入100 μL 乙腈和100 μL 水配制的提取液,按“1.4”项下方法处理后进行LC-MS/MS分析测定。

对照组:取20 μL 空白全血点卡,室温干燥2 h,中心打孔3 mm,用100 μL 内标液和100 μL 水配制的提取液,按“1.4”项下方法处理后进行LC-MS/MS分析测定。

样品组:取20 μL ULOQ样品点卡,室温干燥2 h,中心打孔3 mm,加入100 μL 乙腈和100 μL 水配制的提取液,按“1.4”项下方法处理后进行LC-MS/MS分析测定。

(2) DPS法 方法同“DBS”法。

结果见图2,空白样品在MPA和吡咯列酮出峰处无干扰峰。MPA在吡咯列酮出峰处有干扰峰出现,但峰较低,对测定无影响。吡咯列酮在MPA出峰处无干扰峰出现。MPA的检测限为0.05 $\mu\text{g/mL}$,其响应值大于基质的5倍,检测限为0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.3 精密度和准确度 0.1、1、40 $\mu\text{g/mL}$ MPA按“1.4”项下方法处理后进样LC-MS/MS,分析测定

其批内和批间精密度,每个浓度各做6个样品,连续测定3 d,每批次做随行标准曲线,计算日内、日间RSD。结果见表5,化学沉淀法、DBS法和DPS法日内、日间精密度和准确度均小于15%,符合生物样品分析要求。所建立的LC-MS/MS分析方法精密度准确度令人满意,且重复性较好。

2.5.4 基质效应和回收率

(1) 化学沉淀法 标准液(样品A):取50 μL 去离子水,依次精密加入50 μL 系列标准样品(0.1、1、40 $\mu\text{g/mL}$),100 μL 内标液(1 $\mu\text{g/mL}$)和800 μL 甲醇-乙腈-水(30:45:25),涡旋振荡2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,取上清液120 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min,进样5 μL ,进行LC-MS/MS分析测定。测得MPA和吡咯列酮峰面积A。

空白基质提取后加入标准液(样品B):取50 μL 空白血浆,150 μL 甲醇,800 μL 甲醇-乙腈-水(30:45:25),涡旋振荡2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,取上清液200 μL ,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,200 μL 样品A复溶,涡旋振荡2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min,取上清液,进样5 μL ,进行LC-MS/MS分析测定。测得MPA和吡咯列酮峰面积B。

含基质样品提取液(样品C):取50 μL 血浆,依次加入50 μL 系列标准样品(0.1、1、40 $\mu\text{g/mL}$),100 μL 内标液(1 $\mu\text{g/mL}$)和800 μL 甲醇-乙腈-水(30:45:25),涡旋振荡2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,取上清液120 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min,进样5 μL ,进行LC-MS/MS分析测定。测得MPA和吡咯列酮峰面积C。

(2) DBS法 标准液(样品A):取MPA标准样品3.3 μL (0.1、1、40 $\mu\text{g/mL}$),加入100 μL 内标液和100 μL 水的混合液,超声提取10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,取100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min,进样10 μL 。测得MPA和吡咯列酮峰面积A。

空白基质提取后加入标准液(样品B):取空白全血3.3 μL 点卡,室温干燥2 h,中心打孔3 mm,加入100 μL 乙腈和100 μL 水配制的提取液,超声提取10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min,取上清液;取MPA标准液(0.1、1、40 $\mu\text{g/mL}$)3.3 μL 和内标液100 μL ,氮气吹干5 min,提取基质后加入上清液复溶,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min,进样10 μL 。测得MPA和吡咯列酮峰面积B。

含基质样品提取液(样品C):取EDTA抗凝

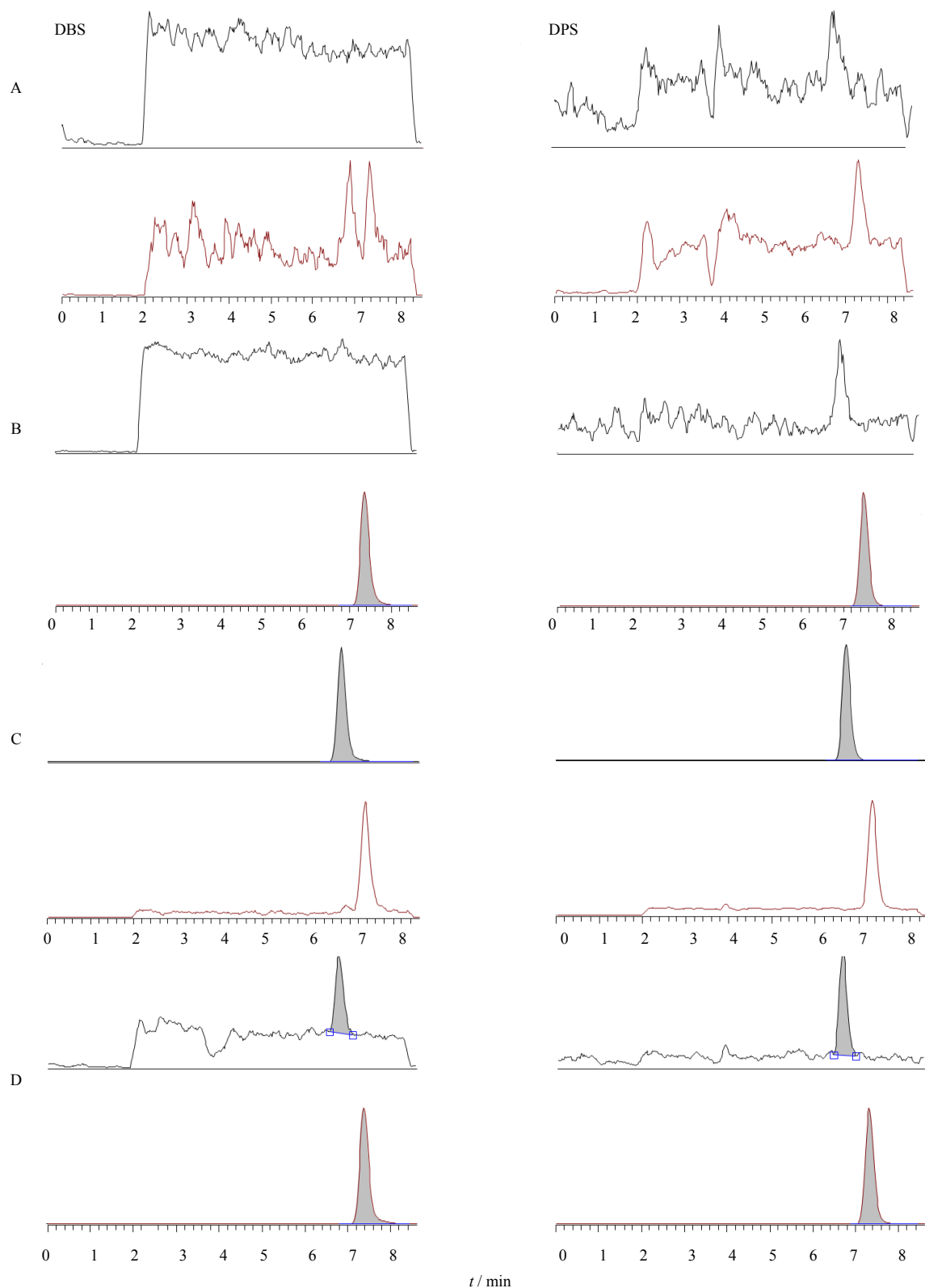


图2 DBS法和DPS法选择性及灵敏度检测的空白组(A)、对照组(B)、ULOQ(C)、LLOQ(D)色谱图

Fig. 2 Chromatograms of blank (A), control (B), ULOQ (C), and LLOQ (D) groups in selected reaction and sensitivity monitoring by DBS and DPS methods

表5 MPA的化学沉淀法、DBS法和DPS法精密度、准确度、基质效应和回收率($n=6$)
Table 5 Precision, accuracy, matrix efficacy, and recovery of MPA by chemical precipitation, DBS, and DPS methods ($n=6$)

方 法	标定质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内			日间			回收 率/%	基质效 应/%
		测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度/ %	准确度 /%	测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 /%	准确度 /%		
化学沉 淀法	0.05	0.049 5	5.0	99.0	0.049 1	3.7	98.2		
	0.1	0.102	3.1	102.0	0.104	2.0	104.0	98.5	97
	1	1.04	1.5	104.0	1.07	3.6	107.0	100	99
	40	40.0	1.3	100.0	41.1	2.4	102.8	97.6	100
DBS 法	0.05	0.050 1	10.4	100.0	0.049 0	6.3	98.0		
	0.1	0.113	4.7	113.0	0.107	6.4	107.0	61.2	106
	1	1.01	5.4	101.0	1.00	2.8	100.0	58.8	104
	40	38.4	2.7	96.0	41.4	6.4	103.5	60.9	102
DPS 法	0.05	0.051 1	7.3	102.2	0.052 4	2.8	104.8		
	0.1	0.094 3	6.4	94.3	0.101	6.7	101.0	60.9	104
	1	1.04	2.4	104.0	1.05	0.7	105.0	64.9	90
	40	38.4	1.7	96.0	38.3	1.3	95.8	55.3	85

全血 3.3 μL (0.1、1、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，点卡，按“1.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析，测得 MPA 和吡咯列酮峰面积 C。

(3) DPS 法 标准液(样品 A)：取 MPA 标准样品 2.0 μL (0.1、1、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，其余操作同“DBS 法”。

空白基质提取后加入标准液(样品 B)：取空白全血点卡 2.0 μL ，其余操作同“DBS 法”。

含基质样品提取液(样品 C)：取 EDTA 抗凝全血 2.0 μL (0.1、1、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，点卡，室温干燥 2 h，中心打孔 3 mm，加入 100 μL 内标和 100 μL 水配制的混合提取液，超声提取 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 100 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min，进样 10 μL 。测得 MPA 和吡咯列酮峰面积 C。

峰面积 B/A 即为基质效应，峰面积 C/B 即为相对回收率，结果见表 5。DBS 法相对回收率为 $(60\pm 1.2)\%$ ，DPS 法为 $(60.1\pm 4.8)\%$ ，高、中、低浓度的 DBS 和 DPS 的回收率相近，但均低于化学沉淀法，内标在分析测定中一直较稳定、精密且重现性好。可能因为 FTA 卡的特性，MPA 与 FTA 卡的结合较牢固，未能完全提取出来。FTA 卡的回收率较化学沉淀低，降低了最终响应值，如果样品的响应值低于检测限，可通过增大进样体积或者浓

缩样品来弥补，但是 FTA 卡还需要改进以提高其回收率。化学沉淀法与 DBS 和 DPS 法基质效应均较小，不会影响到样品分析。

2.5.5 稳定性 0.1、1、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPA 分别在室温下放置 0 (A)、24 h (B) 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 3 个月后 (C) 按“1.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定；样品按“1.4”项下方法处理，进样器中放置 48 h (D) 后进行 LC-MS/MS 分析测定。每份做 6 个样品。将 B、C、D 所测得的结果与 A 进行比较，考察样品稳定性。结果所有样品的 RSD 均小于 8%，表明 DBS 法和 DPS 法中 MPA 在 FTA 卡上稳定性良好，可以长期储存。

2.5.6 临床药动学研究 给药前，3 个健康受试者禁食 12 h，单次口服给药 1 g 麦考酚酸酯后分别于 0.17、0.33、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、36.0、48.0 h 上肢静脉取血 3 mL，立刻取 20 μL 全血点卡。剩余的全血 12 000 r/min 离心 10 min，取 10 μL 血浆点卡。剩余的血浆 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储藏用于化学沉淀法测定。

药-时曲线见图 3，药动学数据见表 6。第一位和第三位受试者 $t_{\max}$ 均为 0.5 h，第二位受试者为 0.33 h，存在个体差异。样本量少是本次研究的不足，不能消除个体差异带来的影响。DPS 法的 AUC 比化学沉淀法低 10% 左右， $C_{\max}$ 低 4.2% 左右，但是

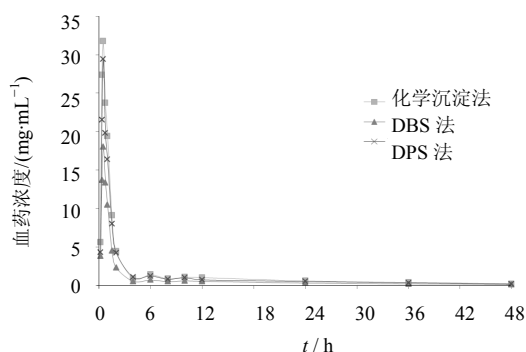


图3 3位健康志愿者单次口服给药1 g MPA后化学沉淀法、DBS法和DPS法的药-时曲线。

Fig. 3 Concentration-time curves after oral administration for three volunteer once with 1 g MPA by chemical precipitation, DBS, and DPS methods

DBS法AUC和 $C_{\max}$ 均低于化学沉淀法。

3 讨论

DBS法和DPS法对点卡体积的要求不必过于精确,效率更高。中心打孔比边缘打孔精密度好。在DBS法和DPS方法学确证前,确定提取液虽

较为繁琐,但可使所测得的响应值更高,结果更为准确、稳定。

DBS法和DPS法室温干燥条件下可长期存储,而化学沉淀法要求血浆冷冻储存运输。DBS法和DPS法对样品的存储和运输条件要求较低,可大量降低成本。化学沉淀法相较于DBS法和DPS法较为耗时,DBS法和DPS法增大了检测通量。

DBS法和DPS法在一些药物药动力学分析中可以替代化学沉淀法。本实验临床药动力学研究中,DPS法所得数据与化学沉淀法基本一致,在样品药动力学检测中可以替代化学沉淀法。DBS法响应值却偏低,可能是因为全血点样,红细胞比容的影响。可在实验前分析确定红细胞比容,用DBS所得药动力学数据除以(1-红细胞比容)所得结果类似于血浆药物浓度。DBS相较于DPS法,无需离心处理血样,更为方便快捷,在临床药动力学以及高通量的药动力学分析中,消除红细胞比容带来的影响,DBS法可以替代DPS和化学沉淀法成为主要的取样方法。

表6 3位健康志愿者单次口服给药1 g MPA后药动力学参数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Pharmacokinetic parameters after single oral administration for three volunteer once with 1 g MPA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

方法	$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$t_{\max}/\text{h}$	$t_{1/2}/\text{h}$	$\text{AUC}_{0-48\text{h}}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\text{CL}/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1})$	MRT/h
化学沉淀法	34.53 ± 8.66	0.44 ± 0.10	14.01 ± 6.79	63.70 ± 2.88	14.67 ± 1.79	8.92 ± 3.37
DBS法	18.85 ± 5.10	0.44 ± 0.10	13.97 ± 4.48	34.25 ± 1.35	27.47 ± 1.82	9.02 ± 2.43
DPS法	30.67 ± 7.27	0.44 ± 0.10	14.61 ± 5.23	55.40 ± 3.90	16.20 ± 1.18	9.10 ± 2.84

参考文献

- [1] David-Neto E, Pereira L M, Kakehashi E, *et al.* The need of mycophenolic acid monitoring in long-term renal transplants [J]. *Clin Transplant*, 2005, 19: 19-25.
- [2] Difrancesco R, Frerichs V, Donnelly J, *et al.* Simultaneous determination of cortisol, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 859(1): 42-51.
- [3] Wilhelm A J, den Burger J C, Vos R M, *et al.* Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(14-15): 1595-1598.
- [4] Hoogtanders K, van der Heijden J, Christiaans M, *et al.* Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(3): 658-664.
- [5] van der Heijden J, de Beer Y, Hoogtanders K, *et al.* Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(4): 664-670.
- [6] Kolocouri F, Dotsikas Y, Loukas Y L. Dried plasma spots as an alternative sample collection technique for the quantitative LC-MS/MS determination of gabapentin [J]. *Analyt Bioanal Chem*, 2010, 398: 1339-1347.