

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.009

HPLC-MS/MS 法同时测定白血病患者全血 环孢素 A、他克莫司和西罗莫司水平

王 磊¹, 王红春¹, 刘红星^{1,2△}

1. 河北燕达陆道培医院病理和检验医学科, 河北廊坊 065201; 2. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176

摘要:目的 建立高效液相色谱质谱法(HPLC-MS/MS)同时测定白血病患者全血中免疫抑制治疗药物环孢素 A(CsA)、他克莫司和西罗莫司血药水平的方法。方法 通过含有内标的甲醇对免疫抑制剂全血标本进行处理,利用 HPLC-MS/MS 以 ESI+模式的多离子反应监测(MRM)扫描方式同时对 CsA、他克莫司和西罗莫司进行监测,以 2 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸水溶液(B)-0.1%甲酸甲醇溶液(A)为流动相进行梯度洗脱。结果 该方法中 CsA、他克莫司和西罗莫司在检测范围内线性良好,各 r 均大于 0.99;各精密密度均小于 8.33%;3 个水平的标本稳定性均良好($RSD \leq 11.9\%$)。结论 该方法操作简便、检测效率高,稳定性好,适用于移植患者服用免疫抑制类药物的血药水平监测。

关键词:高效液相色谱质谱法; 环孢素 A; 他克莫司; 西罗莫司; 白血病

中图分类号:R733.7

文章编号:1672-9455(2019)21-3103-04

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Simultaneous determination of whole blood cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus levels by HPLC-MS/MS

WANG Lei¹, WANG Hongchun¹, LIU Hongxing^{1,2△}

1. Department of Pathology & Laboratory Medicine, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei 065201, China; 2. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To establish a HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of immunosuppressive drugs cyclosporin A (CsA), tacrolimus and sirolimus levels in whole blood of transplant patients with leukemia. **Methods** The whole blood samples of immunosuppressive agents were treated with methanol containing the internal standard, and CsA, tacrolimus and sirolimus were simultaneously monitored by ESI mode multi-ion reaction monitoring (MRM) scanning method in HPLC-MS/MS. The gradient elution was performed with 2 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid aqueous solution(B)-0.1% formic acid methanol solution as the mobile phase. **Results** In this method, CsA, tacrolimus and sirolimus had good linearity within the detection range, and the correlation coefficients (r) were >0.99 ; each precision was $<8.33\%$; the stability of CsA, tacrolimus and sirolimus at the three levels was good ($RSD \leq 11.9\%$). **Conclusion** This method is simple to operate with high detection efficiency and good stability, and is suitable for monitoring the blood levels of immunosuppressive drugs in transplant patients.

Key words: HPLC-MS/MS; cyclosporin A; tacrolimus; sirolimus; leukemia

环孢素 A(CsA)是一种选择性作用于 T 淋巴细胞的免疫抑制剂^[1-3],它由 11 个氨基酸组成的中性环状多肽组成,在临床上作为移植患者的首选药物,当患者出现效果不好或耐受时,改用他克莫司,因为他克莫司主要通过抑制白细胞介素-2 的释放,全面抑制 T 淋巴细胞的作用,其免疫抑制活性较环孢素强 100 倍。西罗莫司为 T 细胞活化和增殖抑制剂,具有优于 CsA、他克莫司的免疫抑制活性,其不仅可抑制 Ca^{2+} 依赖性 T、B 细胞的活化,也可抑制 Ca^{2+} 非依赖性 T、B 细胞的活化,还可抑制金黄色葡萄球菌引起的 B 细胞免疫球蛋白的合成及淋巴细胞激活的杀伤细胞、自然杀伤细胞和抗体依赖性细胞毒作用,故可治疗和逆

转发展中的急性排异反应,并可抑制生长因子导致的成纤维母细胞、内皮细胞、肝细胞和平滑肌细胞的增生,故对预防慢性排异反应也有效。临床上,为了达到良好的治疗效果,经常将 CsA 和西罗莫司同时应用。这 3 种免疫抑制剂是白血病患者常用的抗排斥药物,由于这类药物治疗窗窄、药动学个体差异较大,需进行治疗药物监测。

目前高效液相色谱质谱法(HPLC-MS/MS)逐步成熟,受到越来越多的广泛关注,此方法专属性好、灵敏度高,在一个分析过程中可以同时监测多种药物,在免疫抑制剂治疗药物监测中体现出巨大优势^[4-8]。目前虽有研究建立了关于 HPLC-MS/MS 同时监测

CsA、他克莫司和西罗莫司等多种免疫抑制剂的方法,但本实验室建立的同时检测 CsA、他克莫司和西罗莫司的方法与其他实验室不同,同时引进了德国 Recipe 公司的免疫抑制剂质控试剂盒,此方法更适用于白血病患者 CsA、他克莫司和西罗莫司血药水平测定,更有利于临床调整个体化治疗方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1 月 5 日至 6 月 5 日河北燕达陆道培医院收治并进行 CsA、他克莫司和 RAP 免疫抑制剂治疗药物检测的移植患者的全血标本,共 550 例,其中男 260 例、女 290 例,中位年龄 24 岁,其诊断主要是急性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病。在处理标本时,严格遵从对潜在生物传染性标本处理的相关规定。使用时遵循生物安全规则,并根据规定对废物进行处理。

1.2 仪器与试剂 4000Qtrap 质谱仪(AB Sciex), Analyst V1.5.2 工作站(美国 AB 公司);配有 Shimadzu 20A 高效液相色谱系统(日本岛津公司),色谱柱为 Ultimate XB-C18(上海月旭公司);VORTEX QI LIN BEI ER-5(其林贝尔涡旋混合器),全自动高速冷冻离心机(Thermo Fisher)。甲醇(HPLC-Grade, fisher),屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏);甲酸(HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC);乙酸铵(HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY

INC);裂解液 A1(七水合硫酸锌,AR,西陇化工股份有限公司);CsA、他克莫司和西罗莫司标准品(HPLC Grade, SIGMA);环孢素 D(Cyclosporin D; CsD, HPLC Grade, Toronto Research);子囊霉素(Ascomycin, HPLC Grade, Toronto Research);Clin Chek-Control;RECIPE(CHEMICALS+INSTRUMENTS GmbH)。

1.3 方法

1.3.1 色谱质谱条件 色谱条件:采用 Ultimate XB-C18 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 5 μm),柱温 65 °C;流速:0.8 mL/min;流动相:2 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸水溶液(B)-0.1%甲酸甲醇溶液(A),进样量 5 μL;洗脱方式:梯度洗脱,其中 0.01~0.1 min A 相水平从 50%~100%,保持 0.9 min,1.0~1.1 min A 相水平从 100%~50%,保持 1.9 min。质谱条件:电喷雾电离源(ESI);离子极性:正离子模式;监测模式为 MRM;离子喷射电压:5 000 V;温度:325 °C;喷雾气(GS1):65;辅助加热气(GS2):55;气帘气(Curtain gas):20;碰撞气压力:Medium;用于定量分析离子分别为:CsA 质荷比(m/z) 1 219.900~1 203.100,环孢素 D m/z 1 234.000~1 217.000,他克莫司 m/z 821.5~768.5,西罗莫司 m/z 931.7~864.6,子囊霉素 m/z 809.4~756.4;各种质谱条件参数如表 1。

表 1 质谱条件

药物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间(ms)	解簇电压(v)	碰撞电压(v)	出口电压(v)	射入电压(v)
CsA	1 219.9	1 203.0	200	73	27	12	10
环孢素 D	1 234.0	1 217.0	200	73	27	12	10
他克莫司	821.5	768.5	150	83	30	13.5	10
西罗莫司	931.7	864.6	150	79	25	8	10
子囊霉素	809.4	756.4	150	81	30	12.0	10

1.3.2 标准品溶液水平配制 精密称取各标准品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解成 CsA 105 μg/mL、他克莫司 100 μg/mL、西罗莫司 10 μg/mL、环孢素 D 100 μg/mL、子囊霉素 20 μg/mL 的储备液,均置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 血样的处理方法 取全血 100 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 裂解液 A1(100 mmol/L 硫酸锌水溶液),最后加入 300 μL 的内标混合液(环孢素 D 26 ng/mL 和子囊霉素 20 ng/mL),涡旋混合 1 min 后,13 000 r/min 离心 8 min;取上清液进样检测。

1.3.4 标准曲线和检测限 取标准品溶液适量与甲醇混合,配制成各标准品系列水平,按照 1.3.3 方法处理后进样检测。

1.3.5 回收率和精密度 利用 RECIPE 实验室提供的质控品(ClinChek-Control)(含低、中、高 3 个水

平),按照 1.3.3 的处理方法进行处理,分别于不同分析批、批内多次进样($n=5$),计算批内及批间精密度(CV%)和相对回收率,文献[6-7]报道批内、批间 CV%应<8.33%。

1.3.6 稳定性 由于河北燕达陆道培医院临床药理实验室的标本检测时间最多不超过 3 d,该院标本基本上是当天出报告,外院标本最多不超过 3 d。鉴于此,该院实验室的稳定性试验按以下处理:收集低、中、高 3 个水平的标本,室温放置,连续检测 3 d,每个水平平行做 5 份,按 1.3.3 方法处理后进样。

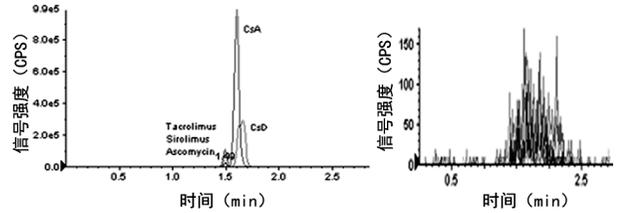
1.4 统计学处理 利用 SPSS 19.0 对数据进行分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表述,多组间比较采用单因素方差分析;非正态分布的计量资料以中位数(四分位距)[$M(Q_1\sim Q_3)$]表示,组间比较采用单因素方差分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 标准曲线和检测限 色谱图见图 1。由图 1 可知, CsA、环孢素 D 的出峰时间分别为 1.60 min、1.65 min, 他克莫司、西罗莫司和子囊霉素的出峰时间均为 1.49 min。CsA、他克莫司和西罗莫司均采用最小二乘法进行线性回归确立标准曲线, 采用内标法定量, CsA 内标是环孢素 D, 他克莫司和西罗莫司的共用内标是子囊霉素。其线性范围分别是 CsA 16~1 600 ng/mL, 他克莫司 0.5~50 ng/mL, 西罗莫司 0.5~50 ng/mL, 各相关系数(r) $\geq 0.998 5$, 见图 2(A、B、C); 最低检测限分别为 CsA 0.427 ng/mL, 他克莫司 0.078 ng/mL, 西罗莫司 0.153 ng/mL。

2.2 回收率和精密度 CsA、他克莫司和西罗莫司结果见表 2, CsA 批内精密度(CV%) 范围为 0.80%~1.29%, 批间精密度(CV%) 范围为 5.21%~6.73%; 他克莫司批内精密度(CV%) 范围为 0.24%~

1.35%, 批间精密度(CV%) 范围为 2.22%~3.26%; 西罗莫司批内精密度(CV%) 范围为 0.31%~1.32%, 批间精密度(CV%) 范围为 5.49%~5.66%; 均 $< 8.33\%$ 。由表 2 可知 CsA、他克莫司和西罗莫司的相对回收率在 90%~110%, 表明该方法的准确度较好。



注: 基质效应完全可以忽略

图 1 CsA、他克莫司和西罗莫司色谱图

2.3 稳定性 结果见表 3, 对日间数据结果进行单因素方差分析, 结果表明 3 个水平的标本稳定性均良好($RSD \leq 11.9\%$)。

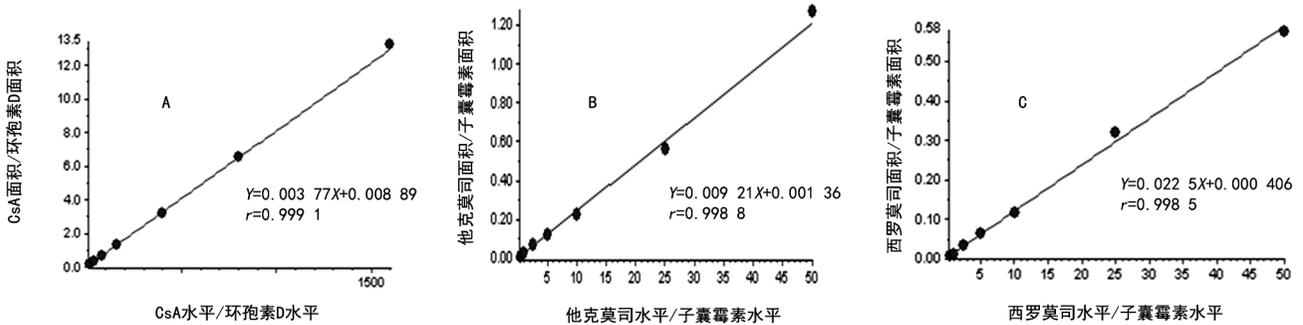


图 2 CsA、他克莫司和西罗莫司的线性图

表 2 CsA、他克莫司和西罗莫司的精密度和回收率

项目	n	质控水平	CsA			他克莫司			西罗莫司		
			水平 (ng/mL)	相对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	CV (%)	水平 (ng/mL)	相对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	CV (%)	水平 (ng/mL)	相对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	CV (%)
批内	5	低水平	57	98.2 \pm 5.5	0.80	3.46	100.3 \pm 3.7	0.24	3.69	98.4 \pm 7.8	0.31
		中水平	119	103.34 \pm 4.8	1.29	7.08	102.4 \pm 4.6	1.35	11.90	105.7 \pm 5.3	1.32
		高水平	237	104.2 \pm 2.6	0.68	14.60	98.5 \pm 2.5	0.58	20.30	99.1 \pm 5.1	0.74
批间	15	低水平	57	98.2 \pm 6.3	5.92	3.46	102.3 \pm 6.5	2.22	3.69	95.1 \pm 5.4	5.49
		中水平	119	99.2 \pm 5.9	6.73	7.08	100.4 \pm 5.4	3.26	11.90	96.8 \pm 6.4	5.53
		高水平	237	100.0 \pm 3.4	5.21	14.60	96.6 \pm 3.8	2.73	20.30	97.4 \pm 1.1	5.66

表 3 CsA、他克莫司和西罗莫司的稳定性试验($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

项目	CsA			他克莫司			西罗莫司		
	标本 1	标本 2	标本 3	标本 1	标本 2	标本 3	标本 1	标本 2	标本 3
第 1 天	79 \pm 12.66	131 \pm 7.23	250 \pm 7.37	3.56 \pm 0.04	7.13 \pm 0.17	14.27 \pm 0.50	3.51 \pm 0.14	11.23 \pm 0.81	19.57 \pm 1.91
第 2 天	89 \pm 9.29	162 \pm 10.15	304 \pm 20.66	3.49 \pm 0.05	7.11 \pm 0.28	14.00 \pm 0.50	3.55 \pm 0.38	11.27 \pm 0.40	19.37 \pm 0.99
第 3 天	80 \pm 5.69	143 \pm 12.50	248 \pm 11.15	3.53 \pm 0.04	7.10 \pm 0.17	14.13 \pm 0.31	3.51 \pm 0.16	11.53 \pm 0.76	20.00 \pm 1.30
总计	83 \pm 5.51	145 \pm 15.63	267 \pm 31.77	3.53 \pm 0.04	7.11 \pm 0.02	14.13 \pm 0.14	3.52 \pm 0.02	11.34 \pm 0.16	19.65 \pm 0.32
F	2.56	1.81	0.49	1.82	0.02	0.27	0.03	0.18	0.15
P	0.15	0.24	0.64	0.24	0.98	0.77	0.97	0.84	0.87

2.4 临床应用 利用软件 SPSS 19.0 对 CsA、他克莫司和西罗莫司的检测结果做统计分析, CsA 的平均水平为 106 ng/mL, 中位水平为 96 ng/mL, 低于四分位距的数据占 27.45%, 高于四分位距的数据占 24.00%; 他克莫司平均水平为 5 ng/mL, 中位水平为 4.6 ng/mL, 低于四分位距的数据占 25.27%, 高于四分位距的数据占 24.36%; 西罗莫司平均水平为 5.83 ng/mL, 中位水平为 4.6 ng/mL, 低于四分位距的数据占 26.00%, 高于四分位距的数据占 24.55%。因此, 通过对河北燕达陆道培医院标本进行四分位距分析可知, CsA、他克莫司和西罗莫司的 Q1~Q3 分别为 61~139 ng/mL、2.9~6.2 ng/mL 和 2.8~7.3 ng/mL, 提示该院患者抗免疫药物水平在此区间临床作用效果较好。

3 讨论

河北燕达陆道培医院临床药理实验室所建立的检测方法简单、快捷, 方法学稳定、可靠, 可以用于 CsA、他克莫司和西罗莫司的治疗药物检测。目前国内免疫抑制剂血药水平检测中主要采用免疫法^[2-4], 该方法自动化程度高, 适合批量处理样品, 但是由于选择性不佳, 存在交叉免疫反应, 导致检测结果偏高并且不能同时检测 CsA、他克莫司和西罗莫司, 同时免疫法试验成本较高, 增加实验室和临床困难。而 HPLC-MS/MS 法^[3-8]不存在免疫交叉反应, 其只检测母体药物本身且可以同时检测 CsA、他克莫司和西罗莫司, 不需要分离其各种代谢产物, 耗时短, 同时其标本处理简单, 检测灵敏度高, 利于临床快速、准确地检测血药水平。用本方法进行 CsA、他克莫司和西罗莫司血药水平检测的结果表明, 该方案能全面覆盖临床标本的检测需求, 可同时监测药物在患者体内的暴露量, 减少了患者临床血样采集, 对于个体化给药方案

调整更具有参考价值。

参考文献

- [1] CURTIS L M, PAVLETIC S Z, SALIT R B, et al. Alemtuzumab-cyclosporine versus tacrolimus-methotrexate-sirolimus for graft-versus-host disease prophylaxis in reduced intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: final results of a randomized trial[J]. *Blood*, 2015, 126(23): 65-76.
- [2] LI A, WU Q V, DAVIS C, et al. The association between transplant-associated thrombotic microangiopathy and calcineurin inhibitor and sirolimus levels[J]. *Blood*, 2018, 132: 814-826.
- [3] ZHANG Y, ZHANG R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs[J]. *Drug Test Anal*, 2018, 10(1): 81-94.
- [4] 王彬. 器官移植常用免疫抑制剂临床监测方法研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [5] 肖亚玲. 临床检验定量测定项目室内质量控制数据监测平台的开发与应用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [6] 王磊, 刘红星, 孙文利. HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者全血 CSA 及 AM1 浓度测定中的应用[J]. *重庆医学*, 2017, 46(23): 3234-3237.
- [7] VOGESER M, SHIPKOVA M, RIGO-BONNIN R, et al. Multicenter analytical evaluation of the automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine[J]. *Ther Drug Monit*, 2014, 36(5): 640-650.
- [8] 赵瑞, 李鹏飞, 杜萍, 等. 高效液相色谱串联质谱法和化学发光微粒子免疫分析法测定人全血中他克莫司浓度的一致性评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(15): 1469-1471.

(收稿日期: 2019-01-09 修回日期: 2019-08-27)

(上接第 3102 页)

- [13] TANG X, SUN R, HONG S, et al. Repeated intranasal instillation with staphylococcal enterotoxin B induces nasal allergic inflammation in guinea pigs[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2011, 25(3): 176-181.
- [14] NELSON H S. Mechanisms of intranasal steroids in the management of upper respiratory allergic diseases[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104(4Pt 1): S138-S143.
- [15] TOMIC R, LASSITER C C, RITZHENHALER J D, et al. Anti-tissue remodeling effects of corticosteroids; fluticasone propionate inhibits fibronectin expression in fibroblasts[J]. *Chest*, 2005, 127(1): 257-265.
- [16] VERDRENGH M, SPRINGER T A, GUTIERREZ-RAMOS J C, et al. Role of intercellular adhesion molecule 1 in the

pathogenesis of Staphylococcal arthritis and in host defense against Staphylococcal bacteremia[J]. *Infect Immun*, 1996, 64(7): 2804-2807.

- [17] PARIKH A, SCADDING G K, DARBY Y, et al. Topical corticosteroids in chronic rhinosinusitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial using fluticasone propionate aqueous nasal spray[J]. *Rhinology*, 2001, 39(2): 75-79.
- [18] YILMAZ F, KARABAY O, TALAY F, et al. The effect of triamcinolone acetonide aqueous nasal spray on the nasal carriage of Staphylococcus aureus[J]. *Am J Rhinol*, 2006, 20(3): 248-250.

(收稿日期: 2019-02-16 修回日期: 2019-06-16)