

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.021

HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者全血 CSA 及 AM1 浓度测定中的应用

王磊, 刘红星[△], 孙文利

(河北燕达陆道培医院临床药理室, 河北廊坊 065201)

[摘要] **目的** 建立同时测定骨髓移植患者全血环孢素 A(CSA)及 AM1 浓度的 HPLC-MS/MS 法,探索 CSA 及其主要代谢产物 AM1 在个体内及个体间的关系,为临床合理选用 CSA 血药浓度监测方法提供可靠依据。**方法** 采用环孢素 D(CSD)作内标,全血样品经含内标甲醇沉淀蛋白处理。色谱柱为 Ultimate XB-C18,柱温 65℃,流动相为含 0.1% 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水和含 0.1% 甲酸的甲醇,梯度洗脱。质谱检测方式为电喷雾离子阱正离子模式,质谱多反应监测(MRM)扫描,监测 CSA 1 219.9~1 203.1 m/z,AM1 1 236.1~1 219.1 m/z,CSD 1 234.0~1 217.0 m/z。**结果** CSA 浓度在 16~1 600 ng/mL 范围内线性关系良好, $Y=0.014 3X+0.021 3(r=0.997 6)$;AM1 浓度在 10~1 000 ng/mL 范围内线性关系良好, $Y=0.003 63X-0.005 28(r=0.997 3)$ 。CSA 与 AM1 个体间比率(AM1/CSA)范围为 32%~356%;CSA 与 AM1 个体内比率(AM1/CSA)范围为 27%~147%。**结论** 建立了同时检测 CSA 及 AM1 的 HPLC-MS/MS 法;CSA 在骨髓移植患者个体间及个体内代谢存在变异;HPLC-MS/MS 法可用于临床骨髓移植患者全血 CSA 浓度的监测。

[关键词] 环孢素 A;AM1;液质联用;药物监测

[中图分类号] R699.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)23-3234-04

The application of HPLC-MS/MS method in the determination of whole blood concentration of Cyclosporine A and AM1 in bone marrow transplant patient

Wang Lei, Liu Hongxing[△], Sun Wenli

(Clinical Pharmacology Laboratory, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei 065201, China)

[Abstract] **Objective** To develop a HPLC-MS/MS method for determination of cyclosporin A(CSA)and AM1 in bone marrow transplant patient,and explore the relationship of CSA and its main metabolite AM1 within individual and between individuals, and provide reliable basis for clinical rational use of monitoring in CSA blood drug concentration. **Methods** CSD was used as internal standard,and whole blood samples were treated with internal standard methanol precipitated protein. The column was Ultimate XB-C18 with a column temperature of 65℃ and the mobile phase was eluted with 0.1% of formic acid and 2 mmol/L ammonium acetate in water and methanol containing 0.1% formic acid. The mass spectrometry was detected by electrospray ion trap positive ion mode,MRM scanning,monitoring CSA 1 219.9 to 1 203.1 m/z,AM1 1 236.1 to 1 219.1 m/z,CSD 1 234.0 to 1 217.0 m/z. **Results** The concentration of CSA was linear in the range of 16 to 1 600 ng/mL, $Y=0.014 3X+0.021 3(r=0.997 6)$. The concentration of AM1 was linear in the range of 10~1 000 ng/mL, $Y=0.003 63X-0.005 28(r=0.997 3)$. The ratio of CSA to AM1 (AM1/CSA) between individual ranged from 32% to 356%. The ratio of CSA to AM1 within individual(AM1/CSA) ranged from 27% to 147%. **Conclusion** HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of CSA and AM1 was established. The variation of CSA exists in the bone marrow transplant patient between individuals and within individual;the HPLC-MS/MS method can be used for monitoring of whole blood concentration of CSA in bone marrow transplant patients.

[Key words] cyclosporin A;AM1;HPLC-MS/MS;drug monitoring

环孢素 A(cyclosporine,CSA)是由 11 个氨基酸组成的环状多肽,其相对分子质量为 $1 203.63 \times 10^3$,主要与体内的钙调磷酸酶(多基因亲环蛋白)结合,发挥免疫抑制活性,广泛应用于骨髓移植患者。在体内通过氧化和结合反应产生至少 30 种代谢产物^[1-3],其代谢产物总体活性小于 CSA 活性的 14%;AM1 为 CSA 在体内代谢的第一代代谢产物,也是其主要的代谢产物,其活性至少比 CSA 活性低 30 倍;AM1C 及 AM1A 为其次生代谢产物及半合成产物;AM1 在个体间的变异较大,在个体内的变异目前尚无详细数据可查,对其研究就显得尤为必要^[4-7]。使用 CSA 治疗需要监测血药浓度,其剂量调整取决于血药浓度水平及移植后间隔时间。由于 CSA 治疗窗窄,其口服制剂具有很高的变异率,临床主要通过监测其血药浓度谷值来调整患者给药剂量,达到较好的免疫抑制效果^[8-9]。

目前 CSA 血药浓度监测方法较多,主要有 EMIT、RIA、FPIA、HPLC、Elecsys、CMIA 及 HPLC-MS/MS。EMIT、RIA、

FPIA、Elecsys 及 CMIA 为免疫法,均存在免疫交叉反应,只是免疫交叉反应强弱不同^[10-12];而 HPLC 和 HPLC-MS/MS 法不存在免疫交叉反应,其只检测 CSA 母体药物本身^[10-15]。由于 HPLC 法检测 CSA 血药浓度需要分离 CSA 的各种代谢产物,耗时较长,同时其检测灵敏度较低,不利于临床快速、准确地检测 CSA 血药浓度;而 HPLC-MS/MS 法是根据待测物分子量的不同而实行检测,不需分离 CSA 各种代谢产物,其检测耗时较短,灵敏度较高,可满足临床快速、准确检测 CSA 血药浓度的需要^[13-15]。本文建立同时测定 CSA 和 AM1 在全血中浓度的 HPLC-MS/MS 法,同时对 CSA 在骨髓移植患者体内代谢进行研究,进而为临床选用 CSA 血药浓度检测方法提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1) CSA 与 AM1 个体间代谢研究:选择前来自本科室监测 CSA 血药浓度的骨髓移植患者 20 例,其中男 12 例,女 8 例,患者年龄 3~45 岁,平均 22.5 岁,骨髓移植后时间

未知。每位患者于清晨 8:00 服药前,抽取静脉血 2 mL,应用专用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管进行抗凝,应用 HPLC-MS/MS 法进行全血 CSA 及 AM1 浓度检测。(2)CSA 与 AM1 个体内代谢研究:选择前来本科室监测 CSA 血药浓度的骨髓移植患者潘某,女,年龄 5 岁,诊断为急性淋巴细胞白血病(ALL),共收集其用于监测 CSA 血药浓度全血标本 16 份,同时用 HPLC-MS/MS 方法进行全血 CSA 及 AM1 浓度检测。

1.2 仪器设备 岛津 20A 高效液相色谱系统(日本岛津公司),配有 AB Sciex 4000Qtrap 质谱仪,Analyst V1.5.2 工作站(美国 AB 公司);其林贝尔涡旋混合器(上海坤肯生物化工有限公司),全自动高速冷冻离心机(Thermo Fisher 公司)。

1.3 试剂 甲醇(HPLC 级,美国 Fisher 公司),屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏有限公司);甲酸、乙酸铵(HPLC 级,MREDA Technology 有限公司);CSA(HPLC 级,美国 Sigma 公司);AM1、环孢素 D(Cyclosporin D,HPLC 级,加拿大 Toronto Research 公司)。

1.4 方法

1.4.1 液相色谱及质谱条件 色谱条件:采用 Ultimate XB-C18 色谱柱(4.6 mm×150.0 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 0.01~0.50 min,A 相浓度从 50%~100%,保持 3.5~4.4 min,A 相浓度从 100%~50%,保持 3.6 min。

表 1 质谱条件

药物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	停留时间 (ms)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)	出口电压 (V)	排除电压 (V)
CSA	1 219.9	1 203.0	200	73	27	12	10
AM1	1 236.1	1 219.1	150	124	24	12	10
CSD	1 234.0	1 217.0	200	73	27	12	10

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;GS1:60;GS2:55;Curtain gas:20;碰撞气压力:Medium;用于定量分析的离子反应:CSA 1 219.9~1 203.1 m/z,AM1 1 236.1~1 219.1 m/z,CSD 1 234.0~1 217.0 m/z;各种质谱条件参数如表 1

1.4.2 样品处理方法 精密量取样本全血 100 μL 置于 1.5 mL EP 管中,然后加入 100 mol/L 硫酸锌溶液 100 μL,涡旋振荡 0.5 min,再加入 25 ng/mL CSD 300 μL,涡旋振荡 0.5 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 150 μL 置于自动进样器。

1.4.3 专属性 在上述色谱质谱条件下,CSA、CSD 及 AM1 的保留时间分别为 3.70、3.82 和 3.82 min。血样中的内源性物质对 CSA、CSD 及 AM1 的测定无干扰。考察了 6 份不同的空白全血,结果表明,流动相和空白全血中的杂质均不干扰样品峰和内标峰,且峰形良好。见图 2。

1.4.4 标准曲线的制备 分别在 7 个 1.5 mL EP 管中加入空白全血 90 μL,并加入 10 μL CSA 和 AM1 各系列混合标准

工作液,得到 CSA 为 16、40、80、160、400、800、1 600 ng/mL 和 AM1 为 10、25、50、100、250、500、1 000 ng/mL 系列质量浓度。按“1.4.2”项下样品处理方法处理后进样测定,以 CSA 峰面积与 CSD 峰面积比值为(Y)对 CSA 浓度(X)进行线性回归,拟合方式为加权最小二乘法,得 CSA 标准曲线;以 AM1 峰面积与 CSD 峰面积比值为(Y)对 AM1 浓度(X)进行线性回归,拟合方式为加权最小二乘法,得 AM1 标准曲线。

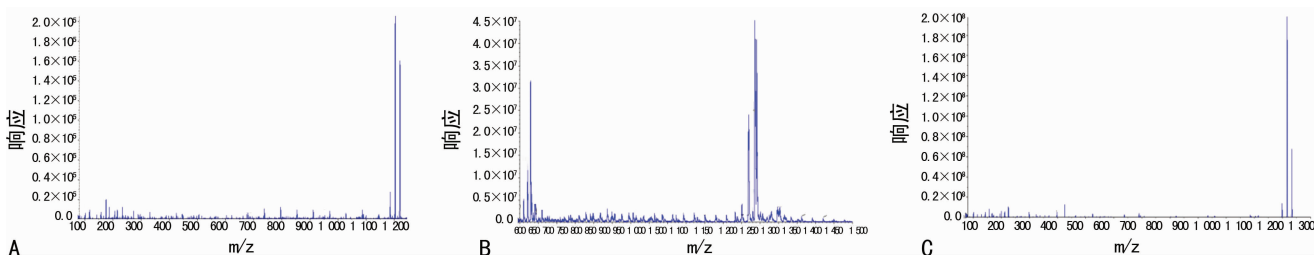
1.4.5 相对回收率、精密度、绝对回收率试验 分别在 3 个 1.5 mL EP 管中加入空白全血 90 μL,并加入含有 CSA 和 AM1 2、3、5 号系列混合标准工作液各 10 μL,得 CSA 对照品各浓度为 40、80、400 ng/mL;AM1 对照品各浓度为 25、50、250 ng/mL。按“1.4.2”项下样品处理方法处理后进样测定,各浓度日内重复测定 3 次,计算相对回收率及日内精密度,并连续测定 5 d,计算日间精密度。同时,分别在 3 个 1.5 mL 印管中加入空白甲醇 90 μL,并加入含有 CSA 和 AM1 2、3、5 号系列混合标准工作液各 10 μL,得 CSA 对照品各浓度为 40、80、400 ng/mL;AM1 对照品各浓度为 25、50、250 ng/mL。按“1.4.2”项下样品处理方法处理后进样测定,测得 CSA、AM1 与 CSD 峰面积,分别计算其比值, $R_{CSA全血} = A_{CSA全血} / A_{CSD全血}$; $R'_{AM1全血} = A_{AM1全血} / A_{CSD全血}$; $R_{CSA甲醇} = A_{CSA甲醇} / A_{CSD甲醇}$; $R'_{AM1甲醇} = A_{AM1甲醇} / A_{CSD甲醇}$; CSA 绝对回收率 = $R_{CSA全血} / R_{CSA甲醇} \times 100\%$; AM1 绝对回收率 = $R'_{AM1全血} / R'_{AM1甲醇} \times 100\%$ 。

1.4.6 稳定性试验 分别在 18 个 1.5 mL EP 管中加入空白全血 90 μL,并加入含有 CSA 和 AM1 2、3、5 号系列混合标准工作液各 10 μL,得 CSA 对照品各浓度为 40、80、400 ng/mL;AM1 对照品各浓度为 25、50、250 ng/mL,每个系列浓度 6 份样品。每个浓度样品各取 3 份按“1.4.2”项下血样处理方法处理后置于 4 °C 冰箱中,于放置时间 72 h 测定各样品的浓度;其余样品于 4 °C 冰箱中放置 72 h 后取出放置至室温,按“1.4.2”项下样品处理方法处理后进样测定,考察其稳定性。

2 结果

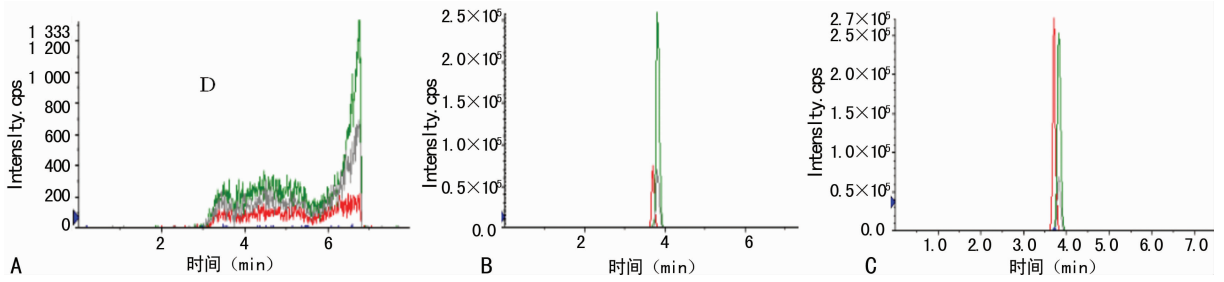
2.1 色谱质谱行为 在“1.4.1”项下的色谱质谱条件下,测得 CSA、AM1、CSD 二级碎片离子质谱图,见图 1;CSA、AM1、CSD 质谱色谱图见图 2。由图 2 可见,CSA、AM1、CSD 各个峰型良好,无杂质峰干扰,专属性较好。

2.2 标准曲线回归方程 分别以 CSD 为内标,CSA 峰面积与 CSD 峰面积比值为(Y)对 CSA 浓度(X)进行线性回归,得 CSA 的回归方程: $Y = 0.0143X + 0.0213 (r = 0.9976)$,表明 CSA 在 16~1 600 ng/mL 范围内线性关系较好,可用于定量,其最低检测限为 0.4 ng/mL;AM1 峰面积与 CSD 峰面积比值为(Y)对 AM1 浓度(X)进行线性回归,得 AM1 的回归方程: $Y = 0.00363X - 0.00528 (r = 0.9973)$,表明 AM1 在 10~1 000 ng/mL 范围内线性关系较好,可用于定量,其最低检测限为 0.1 ng/mL。



A: CSA; B: AM1; C: CSD 质谱图

图 1 CSA、AM1、CSD 质谱图



A: 空白全血; B: 空白全血 + AM1 + CSA + CSD; C: 患者血样 + CSD

图 2 CSA, AM1 和 CSD 色谱图

2.3 回收率和精密度试验结果 CSA 和 AM1 的回收率和日内、日间精密度测定结果如表 2。CSA 和 AM1 相对回收率为 95.26%~106.35%，绝对回收率 79.84%~90.35%，绝对回收率比相对回收率低，存在基质效应，但回收率都大于 70%，均符合药典分析定量要求，该方法可用于定量分析。同时，日内及日间精密度均小于 5%，说明该方法重现性及重复性好，较稳定。

表 2 CSA 和 AM1 精密度和回收率结果 (n=3)

药物	浓度 (ng/mL)	相对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)	绝对回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)
CSA	40	95.56 ± 4.52	3.45	4.05	87.35 ± 5.64
	80	101.24 ± 2.05	2.04	3.25	83.29 ± 3.87
	400	106.35 ± 1.85	1.17	2.01	80.26 ± 6.62
	25	95.26 ± 4.04	5.04	6.35	90.35 ± 5.38
AM1	50	97.15 ± 3.02	3.25	5.20	85.32 ± 4.25
	250	102.37 ± 4.82	2.15	5.12	79.84 ± 3.81

2.4 稳定性考察结果 由表 3 可知，在 4℃ 条件下，血中 CSA 和 AM1 放置 72 h 浓度稍微下降，但差异无统计学意义 (P > 0.05)；血样经过处理后，在 4℃ 条件下，放置 72 h CSA 和 AM1 浓度基本保持不变。由此可以得出，在此条件下测定血中 CSA 和 AM1 浓度的稳定性良好，能保证测定结果的准确性和重现性。由于 CSA 为多肽类药物，本身性质较稳定，不易降解，又由于临床血药浓度监测的及时性，故本实验只研究了 4℃ 条件下的 72 h 稳定性，可满足临床标本的检测。

表 3 稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}, n=3$)

药物	CSA			AM1		
	40	80	400	45	50	250
CSA	40 ± 5	78 ± 8	390 ± 30	24 ± 4	47 ± 8	252 ± 27
AM1	38 ± 3	81 ± 6	401 ± 26	23 ± 6	51 ± 8	249 ± 28

2.5 CSA 与 AM1 个体间代谢检测结果 20 例患者全血标本进行 HPLC-MS/MS 检测，对数据进行散点分析，结果如图 3；以个体内 AM1/CSA 为研究对象进行比率分析，结果如图 4、5。由图 3、4 可知，AM1 与 CSA 在个体间的代谢无相关性；由图 5 可见 AM1/CSA 的比率范围为 32%~356%，平均值为 147%。表明 CSA 在骨髓移植患者个体间代谢存在差异，代谢产物的量和比例不定，造成用免疫法检测 CSA 浓度时，不同患者的免疫交叉反应程度不同，质谱法检测结果与免疫法检测结果差别较大，二者无固定的换算系数。

2.6 CSA 与 AM1 个体内代谢检测结果 对 2016 年 3 月 11 日至 2016 年 4 月 10 日潘某的 CSA 全血标本进行回顾性检测

分析，对其检测结果进行比率分析和散点分析，结果如图 6、7。由图 6、7 可见，AM1/CSA 比率范围为 27%~147%，波动较大，表明 CSA 在骨髓移植患者个体内代谢存在差异，代谢产物的量和比例不确定，造成用免疫法检测 CSA 浓度时，同一患者的免疫交叉反应程度不同，质谱法检测结果与免疫法检测结果存在较大差别，二者无固定的换算系数。

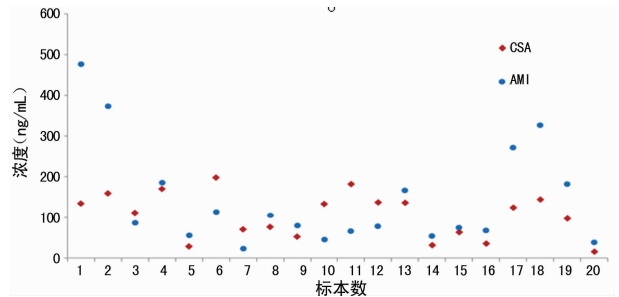


图 3 AM1 和 CSA 离散分析 (n=20)

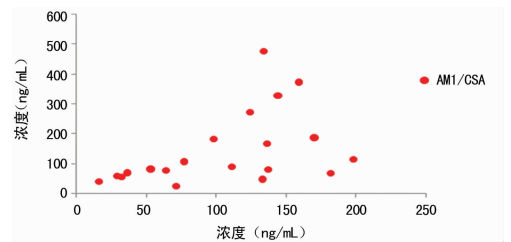


图 4 AM1/CSA 相关性分析

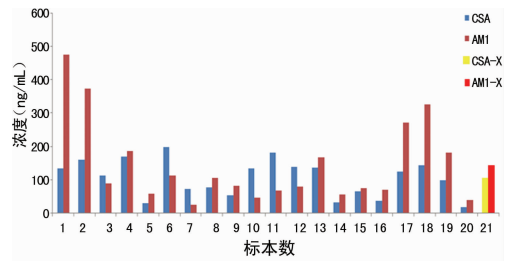


图 5 AM1/CSA 比率分析

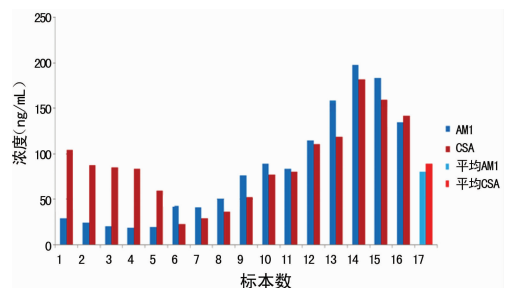


图 6 AM1 和 CSA 比率分析

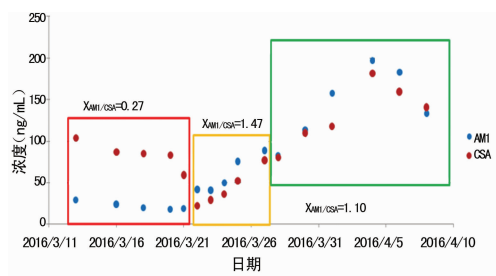


图7 AM1 和 CSA 离散分析

3 讨论

CSA 广泛应用于骨髓移植患者,由于 CSA 治疗窗窄,其浓度受移植后时间和其他药物代谢的影响显著,并且患者需长期服药,CSA 血药浓度监测就显得尤为重要。同时,CSA 口服生物利用度约为 30%,主要经肝脏代谢,代谢产物种类繁多、比例各异,决定了临床医师对 CSA 血药浓度检测方法的选择。CSA 浓度检测方法较多,有 HPLC、RIA、FPIA、CMIA 和 HPLC-MS/MS 法等,不同的 CSA 血药浓度检测方法所测得的 CSA 血药浓度水平不同,影响临床医师和临床药师对 CSA 结果的解读,进而影响患者的治疗,因此临床医师和临床药师在分析 CSA 结果时应该注意检测方法,各实验室在发放检测结果时也应注明检测方法,利于临床对结果进行分析,准确调整患者药物剂量,使骨髓移植患者应用 CSA 剂量更为合理,降低毒性反应和排斥反应的发生,提高患者的生存率。

本实验建立同时测定骨髓移植患者 CSA 及 AM1 血药浓度的 HPLC-MS/MS 法,能快速、准确及高灵敏地检测全血中 CSA 及 AM1 浓度。采用 CSD 作内标,通过七水硫酸锌裂解红细胞,用甲醇沉淀蛋白处理样品,线性良好,适于临床应用血药浓度监测。同时,该处理方法简单,易操作和重复,用于 CSA 和 AM1 母体药物测定准确度高,特异性强。

AM1 为 CSA 众多代谢产物中含量较多的一种代谢产物,通过检测 AM1 与 CSA 在个体间及个体内的变化,可为 CSA 血药浓度监测方法的选择提供依据。由本文可知,AM1 与 CSA 在骨髓移植患者个体间及个体内比例各异,进一步推测可知 CSA 代谢产物的比例在个体间及个体内代谢存在偏倚,并且 CSA 代谢产物的活性各异,免疫法如 RIA、FPIA、CMIA 均存在不同程度的免疫交叉反应,使 CSA 测量结果偏高,偏高的程度与 CSA 代谢产物的种类和量有关。因此,CSA 母体药物的准确检测就显得非常必要,而 HPLC-MS/MS 不仅能准确检测 CSA 母体药物含量而且耗时较短,能满足临床快速检测的需求。

参考文献

- [1] Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(3): 169-174.
- [2] Willemze AJ, Cremers SC, Schoemaker RC, et al. Cyclosporin kinetics in children after stem cell transplantation[J]. Br J Clin Pharmacol, 2008, 66(4): 539-545.
- [3] Vollenbroeker B, Koch JH, Fobker M, et al. Determination of cyclosporine and its metabolites in blood via HPLC-MS and correlation to clinically important parameters[J]. Transplant Proc, 2005, 37(4): 1741-1744.
- [4] Maza A, Montaudie H, Sbidian E, et al. Oral cyclosporin in psoriasis; a systematic review on treatment modalities,

risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011, 25 Suppl 2: 19-27.

- [5] Poquette MA, Lensmeyer GL, Doran TC. Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry(LC/MS) in the routine clinical laboratory for monitoring sirolimus, tacrolimus, and cyclosporine[J]. Ther Drug Monit, 2005, 27(20): 144-150.
- [6] Hinen DJ, ten Berge O, Timmer-de Mik L, et al. Efficacy and safety of long-term treatment with cyclosporin A for atopic dermatitis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2007; 21(1): 85-89.
- [7] Schultz KR, Nevill TJ, Balshaw RF, et al. Effect of gastrointestinal inflammation and age on the pharmacokinetics of oral microemulsion cyclosporin A in the first month after bone marrow transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(5): 545-551.
- [8] Barkholt L, Remberger M, Bodegard H, et al. Cyclosporine A (CSA) 2-h concentrations vary between patients without correlation to graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 40(7): 683-689.
- [9] Furukawa T, Kurasaki-Ida T, Masuko M, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of cyclosporine A (CSA) to find the best single time point for the monitoring and adjusting of CSA dose using twice-daily 3-h intravenous infusions in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Int J Hematol, 2010, 92(1): 144-151.
- [10] Lechuga-Ballesteros D, Abdul-Fattach A, Stevenson CL, et al. Properties and stability of a liquid crystal form of cyclosporine—the first reported naturally occurring peptide that exists as a thermotropic liquid crystal[J]. J Pharm Sci, 2003, 92(9): 1821-1831.
- [11] Jebabli N, Klouz A, Bahlous A, et al. Comparison of three methods for cyclosporine therapeutic monitoring [J]. Transplant Proc, 2007, 39(8): 2557-2559.
- [12] Kahan BD. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine: 20 years of progress [J]. Transplant Proc, 2004, 36 (2 Suppl): 378-391.
- [13] Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin a in whole blood [J]. Clin Chem, 2002, 48(6 Pt 1): 955-958.
- [14] Kacmaz RO, Kempen JH, Newcomb C, et al. Cyclosporine for ocular inflammatory diseases [J]. Ophthalmology, 2010, 117(3): 576-584.
- [15] Salm P, Taylor PJ, Lynch SV, et al. A rapid HPLC-mass spectrometry cyclosporin method suitable for current monitoring practices [J]. Clin Biochem, 2005, 38 (7): 667-673.