

高效液相色谱-质谱联用测定全血中环孢霉素 A 含量

王彬^{1,2}, 李翔², 柴逸峰², 张国庆^{1*}

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立高效液相色谱-质谱联用测定全血中环孢霉素 A 含量的方法。**方法:**色谱柱为 Hypersil C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-醋酸溶液 (pH 4.5) 70 : 30, 流速为 1.0 ml · min⁻¹, 柱后分流比 8 : 2, 柱温为 65℃, 进样量 10 μl; 质谱条件为电喷雾电离源 (ESI), 正离子选择离子监测, 毛细管电压为 4 000 V, 干燥气流速为 8.0 L · min⁻¹, 干燥气温度为 350℃, 雾化器压力为 30 psi, 裂解器电压为 140 V。**结果:**环孢霉素 A 在 26.68 ~ 1 067 μg · L⁻¹ 范围内线性方程为 $y = 0.001 1x - 0.004 6$ ($r = 0.999 3$), 最低检测浓度为 4.35 μg · L⁻¹, 低、中、高 3 种浓度的相对回收率分别为 (89.81 ± 4.91) %、(104.5 ± 3.73) %、(95.17 ± 2.33) %, 绝对回收率分别为 (77.64 ± 4.38) %、(78.01 ± 3.79) %、(83.02 ± 1.59) %, 日内、日间 RSD 均 < 6 %, 150 d 内稳定性试验结果, RSD 均 < 5 %。**结论:**该法操作快速、简便、灵敏度高、专属性强, 适用于环孢霉素 A 临床血药浓度监测。

[关键词] 环孢霉素 A; 色谱法, 高效液相; 光谱分析, 质量

[中图分类号] R 917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0899-03

High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for determination of cyclosporin A level in whole blood

WANG Bin^{1,2}, LI Xiang², CHAI Yi-feng², ZHANG Guo-qing^{1*} (1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS) method for determination of cyclosporin A level in the whole blood. **Methods:** A Hypersil C₈ column (65 °C, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-acetic acid (pH 4.50) 70 : 30 at a flow rate of 1.0 ml · min⁻¹. Atmospheric pressure electronic spray ionization was used to quantify cyclosporin A, with the capillary voltage being 4 000 V, the flow of drying gas being 8.0 L · min⁻¹, nebulizer pressure being 30 psi, and fragment voltage being 140 V. **Results:** The calibration curve of cyclosporin A was linear in a range of 26.68 - 1 067 μg · L⁻¹; $y = 0.001 1x - 0.004 6$ ($r = 0.999 3$). The lowest limit of detection was 4.35 μg · L⁻¹. The method recoveries of low, medium and high concentrations cyclosporin A were (89.81 ± 4.91) %, (104.5 ± 3.73) %, and (95.17 ± 2.33) %, respectively; the extraction recoveries of 3 concentrations were (77.64 ± 4.38) %, (78.01 ± 3.79) %, and (83.02 ± 1.59) %, respectively. The intra-day and inter-day RSD was less than 6 %, and the RSD was less than 5 % in 150 days. **Conclusion:** The present method is fast, sensitive and selective. It is suitable for clinical monitoring of cyclosporin A.

[KEY WORDS] cyclosporin A; chromatography, high pressure liquid; spectrum analysis, mass

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 899-901]

环孢霉素 A (cyclosporin A, CsA) 是由 8 种氨基酸组成的具有环状结构的 11 肽化合物, 临床广泛用于器官移植术后抗排斥反应。由于 CsA 临床治疗范围比较窄, 高于有效浓度会导致肝、肾、神经系统毒性^[1-3], 而低于有效浓度机体产生排斥反应。目前临床多监测 CsA 谷浓度, 有效谷浓度的参考范围为 100 ~ 400 μg · L⁻¹^[4,5], 因此, 需要进行血药浓度监测。目前常用的临床监测方法为免疫法和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。免疫法^[6,7] 同药物代谢物存在交叉反应, 易导致检测结果偏高; 而 HPLC 法^[8-10] 通常采用液-液萃取或固相萃取, 操作步骤繁琐, 不适用于批量样品的测定。本研究建立了高效液相-质谱联用测定全血 CsA 含量的方法, 同时具备了专属性

强、操作简便、快速等优点, 可用于临床 CsA 血药浓度监测。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 LC/MSD 系统 (在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、四极杆质谱检测器); 十万分之一电子天平 (梅特勒, 美国); 液体涡旋混合器 (XW-80 型, 上海医科大学

[基金项目] 第二军医大学青年启动基金 (05QN42)。Supported by Fund for Young Scientists of Second Military Medical University (05QN42)。

[作者简介] 王彬, 硕士, 主管药师。

* Corresponding author. E-mail: guoqing_zhang91@126.com

仪器厂);高速离心机(ABBORT,美国)。

CsA(中国药品生物制品检定所,纯度>99.0%),环孢霉素 D(CsD,福建省微生物研究所,纯度>95%),乙腈为色谱纯(Fisher),水为娃哈哈纯净水,醋酸为分析纯。

2 方法和结果

2.1 测定条件 色谱柱为 Hypersil C₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相为乙腈-醋酸溶液(pH 4.50)70:30,流速为 1.0 ml·min⁻¹,柱后分流比 8:2,柱温为 65℃,进样量 10 μl,运行时间 12 min。离子源为电喷雾源(ESI),正离子选择离子监测,CsA: m/z = 1 202. 8, 1 224. 8; CsD: m/z = 1 216. 8, 1 238. 8,毛细管电压为 4 000 V,干燥气流速为 8.0 L·min⁻¹,干燥气温度为 350℃,雾化器压力为 30 psi,裂解器电压为 140 V。

2.2 对照品与内标溶液的配制 精密称取 CsA 对照品适量,用甲醇配制成 213.4 mg·L⁻¹ CsA 对照品贮备液。同法配制 104.0 mg·L⁻¹ CsD 甲醇溶液,作为对照品贮备液,置冰箱 2~8℃保存。精密量取 CsA 对照品贮备液适量,分别配制成浓度为 53.35、106.7、213.4、426.8、1 067、2 134 μg·L⁻¹的对照品溶液。另精密量取 CsD 对照品贮备液适量,配制成浓度为 10.40 mg·L⁻¹的内标溶液。

2.3 全血样品的处理 取 200 μl 全血,置-35℃冰箱冷冻 30 min,取出 37℃解冻,加 15 μl CsD 内标液,加 400 μl 乙腈,涡旋 30 s,离心 10 900 r/min×5 min,取上清 10 μl 进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 本实验条件下,空白全血、全血中加入 CsA 和内标物的色谱图,见图 1,证明全血中的内源性物质不干扰测定。

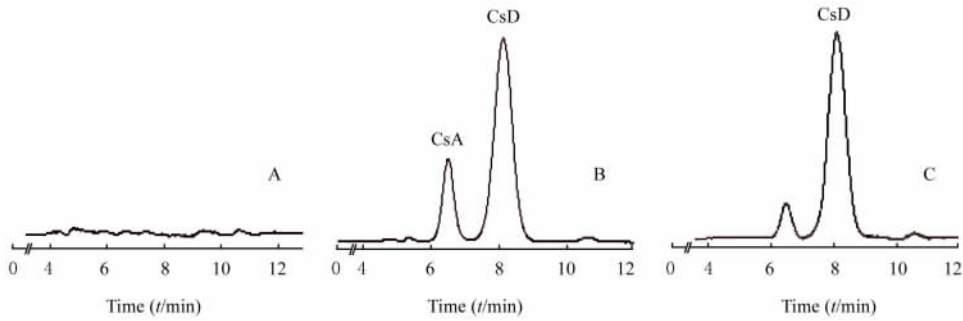


图 1 全血空白对照图谱

Fig 1 Graphs of blank and sample of whole blood

A: Blank blood; B: Blood with CsA and CsD; C: Blood sample

2.4.2 标准曲线的制备 分别取 CsA 对照品溶液 100 μl,常温氮气挥干后加入 200 μl 全血,配制成浓度为 26.68、53.35、106.7、213.4、426.8、853.6 μg·L⁻¹的全血标准溶液,按 2.3 项下条件提取并按 2.1 项下条件测定,以 CsA 浓度(x, μg·L⁻¹)为横坐标,CsA 与内标响应值之比(y)为纵坐标计算 CsA 线性回归方程为:y=0.001 1x-0.004 6, r=0.999 3。结果显示,CsA 在 26.68~1 067 μg·L⁻¹范围内呈良好线性。

2.4.3 精密度实验 分别配制浓度为 53.35、426.8、853.6 μg·L⁻¹的低、中、高不同浓度的 CsA 全血样品,于 1 d 内重复测定 5 次,连续测定 5 d,计算日内、日间精密度。日内 RSD 分别为 5.46%、3.57%、2.45%,日间 RSD 分别为 5.93%、4.61%、4.57%。

2.4.4 准确度实验

2.4.4.1 相对回收率 取浓度为 53.35、426.8、853.6 μg·L⁻¹的低、中、高不同浓度的 CsA 全血样品,按 2.3 项下条件提取并测定,全血标准曲线上求得浓度与实际配制的全血浓度相比,得到相对回收率分别为(89.81±4.91)%、(104.5±3.73)%、(95.17±2.33)%。

2.4.4.2 绝对回收率 分别配制浓度为 53.35、426.8、853.6 μg·L⁻¹的低、中、高不同浓度的 CsA 全血样品 200 μl,置-35℃冰箱冷冻 30 min,取出 37℃解冻,加入 400 μl 乙腈,涡旋 30 s,离心 10 900 r/min×5 min,取上清 400 μl,加入 15 μl CsD 内标液,混匀后 10 μl 进样,计算 CsA 与内标峰面积比(A_{s-r});另配制同上述各提取液浓度相同的 CsA 溶液,混匀后 10 μl 进样,计算 CsA 与内标峰面积比(A_{r-r}),按 A_{s-r}/A_{r-r}×100%计算全血样品处理方法的绝对回收率分别为(77.64±4.38)%、(78.01±3.79)%、(83.02±1.59)%。

2.4.5 稳定性考察 分别配制浓度为 53.35、426.8、853.6 μg·L⁻¹的低、中、高不同浓度的 CsA 全血样品 200 μl,置-35℃冰箱冷冻,分别在 0、15、30、60、90、120、150 d 按 2.1 项下条件检测,结果表明血液样品在 150 d 内基本稳定(RSD<5%)。

2.4.6 最低检测限 以信噪比(S/N)为 3:1 计,测定 CsA 的最低检测限为 4.35 μg·L⁻¹。

2.4.7 全血样品含量测定 肝移植术后患者 74 例,口服 CsA 100 mg,2 次/d,于再次服用 CsA 前(即谷浓度时)取血,肝素抗凝后,按 2.1 及 2.3 项下条件提取测定,结果各患者血

药浓度在 $38.50 \sim 448.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨 论

3.1 样品的预处理 国内文献^[9,10]均采用液-液萃取或固相萃取进行全血样品的预处理,此类方法操作繁琐、费时,本研究考察了不同体积甲醇和乙腈沉淀蛋白的方法,结果显示相当于血液样本 2 倍体积的乙腈沉淀蛋白效果较佳。

另外,为使红细胞内的 CsA 尽量释放出来,需要破坏红细胞,本研究选用冷冻破坏红细胞,并考察了不同冷冻时间(30 min、1 h、2 h)对血液样本的影响,结果显示冷冻 30 min 红细胞就能完全破坏,最终选用冷冻 30 min 破坏红细胞。

3.2 流动相溶剂选择 实验考察了甲醇-醋酸水系统和乙腈-醋酸水系统对 CsA 样品中峰形等因素的影响。结果显示,使用甲醇-醋酸水系统峰形较差,且要达到 CsA、CsD 基线分离需要延长保留时间至 13 min;乙腈-醋酸水系统中 CsA 峰形更好,分析时间缩短,最终选用乙腈-醋酸水系统。

3.3 盐浓度、pH 对质谱响应的影响 考察了 0、5、10、20 mmol · L⁻¹, pH 值 3.5~6.5 醋酸铵溶液对 CsA 质谱响应值的影响。结果显示,醋酸铵抑制 CsA 质谱响应,随着醋酸铵浓度的增加,CsA 质谱响应逐渐减小。而醋酸可增加 CsA 质谱响应,当 pH 为 4.5 时,CsA 质谱响应最高。

3.4 柱温对峰形的影响 柱温对 CsA 的峰形影响很大,随着柱温的升高,CsA、CsD 的峰形逐渐改善。实验考察了柱温为 55、60、65、70、75℃ 时 CsA、CsD 的峰形,结果显示柱温为 65℃ 时,CsA、CsD 的峰形均较理想,分离度佳,能够满足样品的分离分析,本实验设定温度为 65℃。

[参 考 文 献]

[1] 郑军华, 闵志廉, 朱有华, 等. 肾移植患者长期服用环孢素 A

后发生肝毒性的临床研究[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22: 250.

[2] 赵 谦, 张良甫. 环孢霉素 A 肾毒性研究进展[J]. 国外医学·移植与血液净化分册, 2004, 2: 46-48.

[3] 毕晓莹, 陶 忻. 环孢霉素的神经系统毒性[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 2004, 31: 519-522.

[4] 方 芸, 王 欣, 裴云萍. 环孢素 A 监测指标及治疗浓度的研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17: 307-309.

[5] 傅若秋, 孟德胜, 陈 亮. 肾移植术后环孢素 A 的使用及其血药浓度监测情况分析[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23: 160-161.

[6] Šafarčík K, Brozmanová H, Bartoš V, et al. Evaluation and comparison of therapeutic monitoring of whole-blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods [J]. Clin Chim Acta, 2001, 310: 165-171.

[7] Gulbis B, van der Heijden J, van As H, et al. Whole blood cyclosporine monitoring in liver and heart transplant patients: evaluation of the specificity of a fluorescence polarization immunoassay and an enzyme-multiplied immunoassay technique[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 1997, 15: 957-963.

[8] Khoschorur G, Semmelrock HJ, Rödl S, et al. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporine A and its metabolites M1, M17 and M21[J]. J Chromatogr B, 1997, 690: 367-372.

[9] 徐 霞, 纪松岗, 刘丽岚, 等. 反相高效液相色谱法测定全血中环孢素 A 的浓度[J]. 解放军药学学报, 2002, 18: 116-118.

[10] 王启斌, 涂自良, 王 峰, 等. 液相色谱-电喷雾质谱联用测定器官移植患者全血中环孢素 A[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23: 217-219.

[收稿日期] 2005-12-25

[修回日期] 2006-06-23

[本文编辑] 尹 茶

《泌尿生殖系统感染性疾病的诊断与治疗》已出版

泌尿生殖系统感染性疾病是泌尿生殖系统的常见病、多发病。本书由卢根生、潘进洪主编,主要介绍泌尿生殖系统感染性疾病近年的研究进展及主要成就,着重讨论疾病的诊断方法和治疗药物的选择及应用。内容主要包括肾脏感染、膀胱炎、尿道炎、男性生殖系统感染、性传播疾病、泌尿生殖系统结核、肾移植相关性感染、临床感染常见的微生物及临床意义、临床常用抗生素及其他抗微生物药物及各自的用法。

读者对象: 泌尿外科及其他科医师、进修生、临床见习与实习医师等。

由第二军医大学出版社出版、发行, ISBN 7-81060-523-2/R. 388, 定价 30.00 元。

订购电话: 021-65493093, 地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学出版社发行科, 邮编: 200433