

LC-MS/MS 法测定人全血中环孢素 A 浓度及 环孢素眼用乳剂健康人体药代动力学研究

王淑民¹, 李鹏飞², 赵秀丽¹, 马 萍², 刘丽宏²

(1. 首都医科大学附属北京同仁医院, 北京 100730; 2. 第二炮兵总医院药剂科, 北京 100088)

摘要:建立液相色谱-质谱联用法测定人全血中环孢素 A 浓度, 选用 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(20 mm×4.6 mm×5 μm), 以甲醇-1 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液为流动相, 采用梯度洗脱进行分离, 样品用沉淀蛋白法处理后进样, 流速 1.1 mL·min⁻¹, 柱温 60 ℃, 进样量 20 μL。选用 3200 QTrap 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行检测。环孢素 A 的线性范围为 0.2~20.00 μg·L⁻¹, 定量下限为 0.2 μg·L⁻¹。准确度与精密度结果显示, 方法日间、日内变异均小于 15%, 相对偏差为 -12.60%~12.80%, 方法提取回收率为(98.1±4.7)%, 稳定性较好。所建立的方法快速、灵敏、专属性强、重现性好, 可用于环孢素眼用乳剂健康人体药代动力学研究。

关键词:液相色谱-质谱联用法; 环孢素 A; 药代动力学

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2010)01-0053-06

LC-MS/MS Determination of Cyclosporin in Human Blood and Application in Pharmacokinetics

WANG Shu-min¹, LI Peng-fei², ZHAO Xiu-li¹, MA Ping², LIU Li-hong²

(1. *Beijing Tongren Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100730, China;*

2. *Pharmacy Department of the Second Artillery General Hospital, Beijing 100088, China*)

Abstract: The Cyclosporin in human blood was determined by LC-MS/MS. Cyclosporin and the internal standard were extracted from blood by methanol, which was used as deproteinated solvent, and then separated on a Kromasil-C₁₈ column (20 mm×4.6 mm×5 μm). The mobile phase was consisted of methanol-1 mmol·L⁻¹ ammonium formate maintained at 60 ℃. The flow rate was 1.1 mL·min⁻¹, and 20 μL aliquot of residues were injected into the LC-MS/MS system. Detection was carried out by multiple reaction monitoring on 3200 Qtrap LC-MS/MS system. The assay is linear over the range of 0.20—20.00 μg·L⁻¹ with a lower limit of quantitation of 0.20 μg·L⁻¹. Intra- and inter-day precision are less than 15%. The relative deviation is in the range of -12.60%—12.80%. The recovery of Cyclosporin is (98.1±4.7)%, and stability is good. It is a rapid, sensitive, selective and reli-

able method for the determination of Cyclosporin in human blood. The assay can be applied for the determination of Cyclosporin in human blood and the study on pharmacokinetics.

Key words: LC-MS/MS; Cyclosporin; pharmacokinetics

环孢素 A (Cyclosporin, CsA) 是一种新型的高效免疫抑制剂, 广泛用于肾、肝、心、骨髓等多种器官移植, 疗效显著。除了应用于器官和组织移植外, 还用于自身免疫疾病的治疗。环孢素 A 的生物利用度和药代动力学参数个体差异大, 其主要副作用与剂量相关。器官移植病人由于用药时间较长和用药量不足而影响疗效, 出现排斥反应, 这与用药过量而引起的肾功能损害、肝功能失调等毒性反应难以区别。因此其药代动力学过程在国内外都得到了广泛深入的研究^[1-3]。环孢素 A 乳剂可明显增加环孢素 A 用药的有效性和安全性, 降低患者的治疗成本。环孢素 A 滴眼剂大多数是环孢素 A 在油中的混悬液, 常用的油有蓖麻油和橄榄油, 其浓度有 0.5%、1% 和 2% 等。

由于环孢素 A 的治疗浓度范围狭窄, 个体差异较大, 剂量不易准确把握, 临床应用时需要进行血药浓度监测。目前环孢素 A 日常血药浓度监测定量范围为 $100 \sim 1\,500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最适合临床血药浓度监测的方法有微粒酶免疫分析法 (MEIA)、酶联免疫分析法 (ELISA) 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。ELISA 法和 MEIA 法对环孢素 A 的体内代谢产物产生交叉免疫反应, 实际测得结果为环孢素 A 及其代谢物之和; LC-MS/MS 法测定结果为环孢素 A 原型药物浓度, 不会对环孢素 A 体内代谢产物产生交叉反应, 使得测量值准确可信, 能更准确的说明环孢素 A 原型药物在体内的药代动力学特征。有文献报道^[4-12] 采用 LC-MS/MS 法同时监测多种免疫抑制剂, 如环孢素 A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司等。Koseki 等^[13] 报道了同时定量环孢素及其 3 种代谢产物的方法。由于试验剂量下环孢素眼用乳剂的体内血药浓度极低, LC-MS/MS 法的高专属性和高灵敏度更适合于定量分析。本实验拟建立 LC-MS/MS 法测定人全血中环孢素 A 的浓度, 并运用建立的方法对中国健康受试者进行环孢素眼用乳剂药代动力学研究。

1 仪器与试剂

3200 QTrap 型液相色谱-串联质谱仪: 美国 Applied Biosystems 公司产品, 配有电喷雾离子化源 (ESI) 以及 Analyst 1.4.1 数据处理软件; Agilent 1100 高效液相色谱系统: 美国 Agilent 公司产品, 包括四元输液泵、自动进样器、切换阀。

环孢素 A 对照品 (纯度 98.8%, 批号: 0495-200202): 由中国药品生物制品检定所提供; 子囊霉素对照品 (纯度 > 97.0%, 批号: 045K403): 由美国 Sigma 公司提供; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 空白人全血: 由第二炮兵总医院提供。

2 溶液的配制

对照品储备液的配制: 精密称取 10.00 mg 环孢素 A 对照品, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 并稀释至刻度, 配制成 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢素 A 储备液。

标准母液的配制: 取 100 μL 环孢素 A 储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 加入空白全血溶解, 并用空白全血稀释至刻度, 配制成 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢素 A 母液。

标准曲线样本的配制: 分别取适量环孢素 A 母液, 用空白全血稀释至标准曲线所需浓度的全血溶液, 浓度分别为 0.20、0.50、1.00、3.00、10.00、20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别取适量环孢素 A 母液, 用空白全血稀释至质控样本所需浓度的全血溶液, 分别为 0.50、3.00、16.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

内标溶液的配制: 精密称取 1.00 mg 子囊霉素对照品, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 并稀释至刻度, 配制成 $40.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。精密量取 250 μL 上述子囊霉素储备液, 置于 500 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 并稀释至刻度, 即为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 子囊霉素溶液。

红细胞破碎剂的配制: 精密称取 14.38 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 置于 500 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解, 并稀释至刻度, 即为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸锌溶液。

3 色谱条件及质谱条件

Kromasil-C₁₈ 色谱柱(20 mm×4.6 mm×5 μm);流动相甲醇-1 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液;洗脱方式:梯度洗脱;流速 1.1 mL·min⁻¹;柱温 60 ℃(50:50 V/V 分流);进样量 20 μL。

离子喷雾离子化源,正离子方式检测;离子喷射电压 5 500 V;温度 550 ℃;源内气体 1(GS1,N₂)压力 345 kPa,气体 2(GS2,N₂)压力 448 kPa;气帘气体(N₂)压力 103 kPa;碰撞气(N₂)压力:Medium;扫描方式为多重反应监测(MRM);环孢素 A、子囊霉素解簇电压(DP)分别为 100、55 V;碰撞能量(CE)分别为 70、31 eV;环孢素 A、子囊霉素用于定量分析的离子反应分别为 m/z 1 203.2→425.5 和 m/z 809.4→756.4;环孢素 A 用于定性分析的离子反应为 m/z 1 203.2→1 185.2。

4 全血样品处理

精密取 150 μL 全血样本,置于 1.5 mL EP

管中,加入 50 μL 红细胞破碎剂,300 μL 内标子囊霉素,涡旋 2 min,13 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液转移至另一 EP 管中,氮气吹干,150 μL V(甲醇):V(水)=2:1 复溶,涡流 2 min,13 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,进样 20 μL,进行 LC-MS/MS 分析。

5 分析方法确证

5.1 质谱分析

将环孢素 A、子囊霉素贮备液用甲醇稀释至一定浓度,采用蠕动泵进样模式进行碎片离子分析,相应的二级全扫描质谱图示于图 1。

5.2 方法的专属性

分别取 150 μL 空白全血、标准曲线样本、受试者给药后收集的全血样品,按上述全血样品处理方法及检测条件进行定量分析,其色谱图示于图 2。结果表明:内源性物质不干扰环孢素 A 和内标子囊霉素的测定。

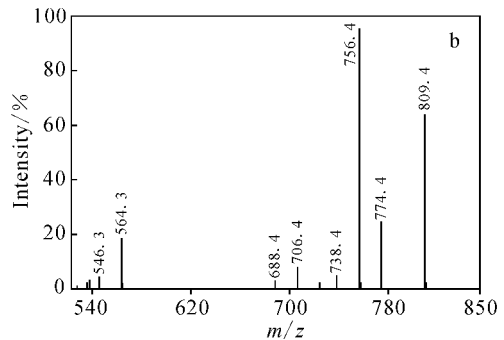
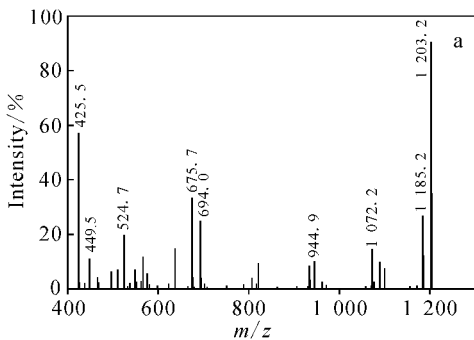


图 1 环孢素 A $[M+H]^+$ (a) 和内标子囊霉素 $[M+NH_4]^+$ (b) 的二级全扫描质谱图

Fig. 1 Full-scan product ion spectra of $[M+H]^+$ for Cyclosporin(a) and $[M+NH_4]^+$ for Ascomycin(internal standard) (b)

5.3 线性关系考察

分别取 150 μL 标准曲线样本,按 4 项操作,取上清液,进样 20 mL,进行 LC-MS/MS 分析。以全血中待测物浓度为横坐标 x (μg·L⁻¹),待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 y ,用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,求得直线回归方程为 $y=0.000\ 728x+0.000\ 00$, $r=0.998\ 5$ 。根据工作曲线,环孢素 A 的线性范围为 0.2~20.0 μg·L⁻¹,定量下限为 0.2 μg·L⁻¹,线性关系良好。

5.4 准确度与精密度

分别取 100 μL 质控样本,按 4 项操作,取上清液,进样 20 mL,进行 LC-MS/MS 分析,每浓度 6 样本,连续测定 3 天。根据当日的工作曲线,计算 QC 样品的测得浓度,该方法的准确度与精密度列于表 1。结果显示,日间、日内变异均小于 15%,相对偏差为 -12.60%~12.80%,表明此方法的精密度和准确度均较高,重现性较好。

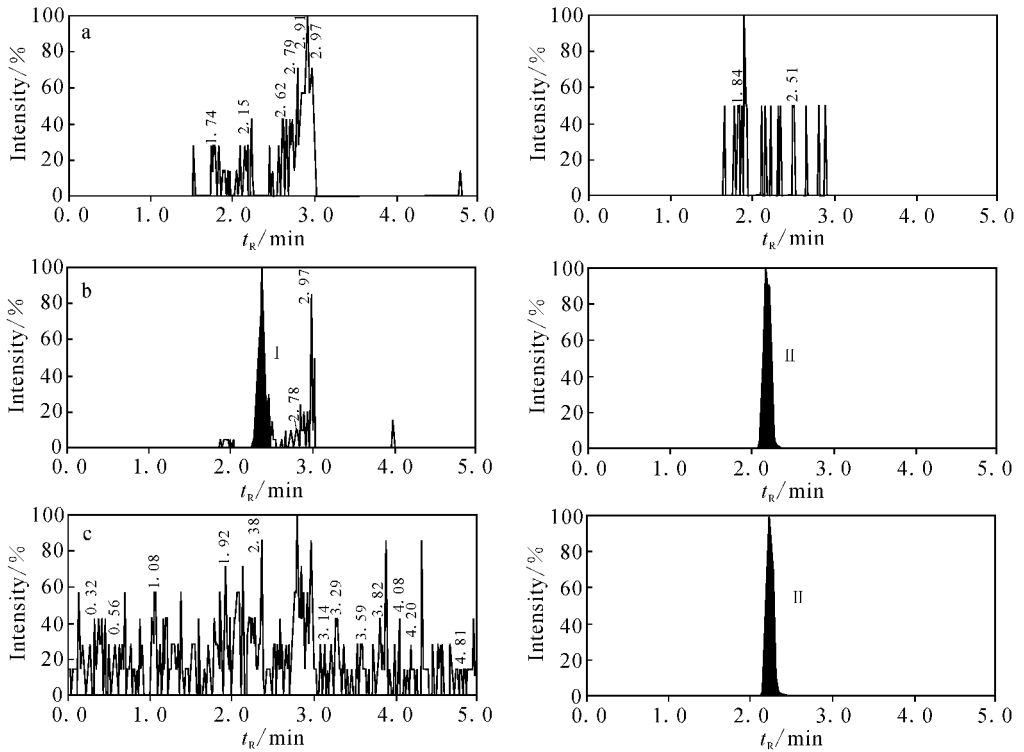


图 2 LC-MS/MS 法测定人全血中环孢素 A (I) 和内标子囊霉素 (II) 的典型色谱图

- a. 空白全血; b. $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢素 A 标准曲线样本和 $20.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标子囊霉素的色谱图;
c. 健康受试者右眼使用 1 滴 0.025% 环孢素 A 滴眼液后 30 min 的全血样品

Fig. 2 Chromatograms of Cyclosporin (I) and Ascomycin (II) (internal standard) in human blood

- a. blank blood; b. standard curve sample add intenal standard;
c. blood sample 30 min after using one drop 0.025% Cyclosporin to the volunteer

表 1 全血中环孢素 A LC-MS/MS 法的准确度与精密度 ($n=18$)

Table 1 Results of precision and accuracy in human blood by LC-MS/MS ($n=18$)

添加值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	标准差/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对偏差/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.50	0.50	0.04	0.51	7.58	7.01
3.00	3.07	0.16	2.30	5.23	4.80
16.00	14.95	0.70	-6.57	4.76	4.05

5.5 提取回收率和基质效应考察

分别取 $150 \mu\text{L}$ 质控样本,按 4 项操作,取上清液,进样 20 mL ,进行 LC-MS/MS 分析,每一浓度进行 3 样本分析。同时另取 $150 \mu\text{L}$ 空白全血,加入 $300 \mu\text{L}$ 乙腈沉淀剂,涡旋 1 min , $13\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,上清液转移至另一 EP 管中,氮气吹干。分别加入 $150 \mu\text{L}$ 相应浓度的质控标准溶液 ($0.20, 3.00, 16.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢素 A 的乙腈溶液), $300 \mu\text{L}$ 内标,涡流混匀, $13\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,上清液转移至另一 EP 管

中,氮气吹干, $150 \mu\text{L}$ V(甲醇):V(水)=2:1 复溶,涡流 2 min , $13\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清液,进样 $20 \mu\text{L}$,进行 LC-MS/MS 分析。获得相应峰面积,以每一浓度两种处理方法测得的浓度比值计算提取回收率,环孢素 A 的低、中、高 3 个浓度提取回收率分别为 $(98.8 \pm 6.2)\%$ 、 $(102.4 \pm 7.4)\%$ 、 $(93.0 \pm 4.2)\%$,内标提取回收率为 $(84.4 \pm 5.1)\%$ 。以蒸馏水代替空白全血,按上述条件进行样本前处理,并进行 LC-MS/MS 检测,低、中、高 3 个浓度基质效应

试验结果显示,相对偏差均小于 10%。表明此方法的回收率较高,且基质效应不影响样本的准确测定。

5.6 稳定性考察

分别进行长期稳定性(冰冻放置 30 d)和处理后上清液室温放置 12 h 稳定性的考察,将稳

定性测定结果与理论浓度进行比较,结果显示,所有稳定性试验中测定值与添加值的相对偏差均小于 12.9%。表明长期冰冻放置全血样品和处理后上清液室温放置过程中均较稳定,各种贮存条件不影响本方法对样品浓度进行准确测定,结果列于表 2。

表 2 环孢素 A LC-MS/MS 法的 2 种稳定性考察结果
Table 2 Results of stabilities in human blood by LC/MS/MS

添加值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	平均值			
	冰冻 30 d		室温放置 12 h	
	测得值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	相对偏差/%	测得值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	相对偏差/%
0.50	0.51	1.10	0.50	0.87
3.00	3.04	1.24	3.06	2.03
16.00	15.30	-4.40	14.76	-7.75

5.7 方法学应用

应用本研究所建立的方法测定 8 名中国成年健康志愿者单剂量使用 0.025% 环孢素 A 眼用乳剂 1 滴后的血药浓度,所有全血样本浓度均低于检测限。

6 讨论

采用 LC-MS/MS 法测定血药浓度,具有选择性好、灵敏度高、分析时间短等优点,已广泛应用于药物动力学研究。本研究选用 LC-MS/MS 法对中国健康志愿者全血样本进行定量检测,选用 MRM 模式定量环孢素 A 原型药物浓度,具有选择性好、灵敏高等优点。本研究定量下限为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,是临床血药浓度监测^[4-12]定量下限的 1/200。Small 等^[14]进行了相关眼用乳剂的体内药代动力学研究,LC-MS/MS 法定量下限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,比本研究所建立的方法低 1 倍,但其前处理使用 SPE 及氮吹干法,较为繁琐且成本较高。本试验在不影响灵敏度的前提下,全血样本的前处理采用了极其简便的沉淀蛋白法,与液-液萃取法、固相萃取法、在线柱萃取法相比,节省了大量的前处理时间,提高了工作效率。试验中选用子囊霉素作为内标,与文献所用内标子囊霉素、环孢素 D 一致,由于子囊霉素与分析化合物性质较近,能尽可能的消除系统误差和基质效应。另外,环孢素 A 主要分布在全血中,血浆药物浓度远低于全血药物浓度,因此,本研究选用全血作为分析测试对象。

研究发现,环孢素 A 在 ESI 源正离子方式下, $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 1 203. 2) 信号高于 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (m/z 1 219. 2),本研究选用 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 作为 MRM 扫描方式的母离子,二级碎片扫描时较高的特征碎片有 m/z 1 185. 2 和 m/z 425. 5,选用信号较高的碎片离子 m/z 425. 5 作为子离子进行定量, m/z 1 185. 2 进行定性考察或同步考察。流动相中加入醋酸铵可以提高质谱离子化效率,从而提高信噪比。由于本试验的定量限和检测限较低,研究初期进行等度洗脱很难达到目标定量限,为了提高信噪比,使用梯度洗脱是较为理想的选择。本研究所选用的色谱柱孔径和内径均较大,并采用分流模式,可以达到较高的流速,在此条件下采用梯度方式进行梯度洗脱,可以得到较好的色谱峰,降低梯度延迟效应,缩短分析时间。全血样品沉淀蛋白的方法可能会比较脏,试验中将色谱溶剂前沿切入废液罐,以免造成质谱仪的污染。

运用建立的方法进行健康人体环孢素眼用乳剂药物动力学研究,由于给药量极低(0.025% 环孢素眼用乳剂 1 滴滴于右眼),检测样本均低于定量下限,与文献^[14]报道一致。因此表明,试验剂量下,体内环孢素浓度远低于中毒水平。

7 结论

本研究所建立的方法灵敏度与文献报道相同,但前处理过程简单,分析时间短,快速、灵敏、专属性强;运用建立的方法进行健康人体环孢素

眼用乳剂药物动力学研究,由于给药量极低,检测样本均低于定量下限,也说明试验剂量下,环孢素浓度远低于中毒水平。

参考文献:

- [1] 郭涛,秦海旭,夏东亚. 3种不同厂家环孢素A胶囊在健康人体的药动力学和生物等效性[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(7): 536-538.
- [2] 钱方,邓渝林,王亚伟,等. 环孢素国产微乳胶囊与进口微乳胶囊的生物等效性研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(5): 564-565.
- [3] 苏佳,李海燕,高洪志,等. 环孢素软胶囊在健康人体生物等效性研究[J]. 中国药物应用与监测, 2008, 5(3): 25-27.
- [4] BOGUSZ M J, ENAZI E A, HASSAN H, et al. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 850(1/2): 471-480.
- [5] WANG S, MAGILL J E, VICENTE F B. A fast and simple high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for simultaneous measurement of whole blood tacrolimus and sirolimus[J]. Arch Pathol Lab Med, 2005, 129(5): 661-665.
- [6] POQUETTE M A, LENSMEYER G L, DORAN T C. 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(2): 144-150.
- [7] HATSIS P, VOLMER D A. Evaluation of a cyano stationary phase for the determination of tacrolimus, sirolimus and cyclosporin A in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 809(2): 287-294.
- [8] STREIT F, ARMSTRONG V W, 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: 955-958.
- [9] DETERS M, KIRCHNER G, RESCH K, et al. Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS)[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(3): 285-295.
- [10] TAYLOR P J, SALM P, LYNCH S V, et al. Simultaneous quantification of tacrolimus and sirolimus, in human blood, by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Ther Drug Monit, 2000, 22(5): 608-612.
- [11] OELLERICH M, ARMSTRONG V W, STREIT F, et al. Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients[J]. Clin Biochem, 2004, 37(6):424-428.
- [12] BRIGNOL N, MCMAHON L M, LUO S, et al. High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD 001) and cyclosporin a (CsA) in whole blood[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001, 15(12): 898-907.
- [13] KOSEKI N, NAKASHIMA A, NAGAE Y, et al. Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AM4N and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(5):733-740.
- [14] SMALL D S, ACHEAMPONG A, REIS B, et al. Blood concentrations of cyclosporin a during long-term treatment with cyclosporin a ophthalmic emulsions in patients with moderate to severe dry eye disease[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2002, 18(5):411-418.