

串联质谱用于全血中免疫抑制剂治疗药物监测应用

LCMSMS-556

摘要：使用串联质谱建立了全血中环孢素 A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司、霉酚酸 5 种免疫抑制剂同时测定方法。使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.997，质控品测定准确度结果与理论值接近，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于免疫抑制剂治疗药物监测。

关键词：串联质谱 免疫抑制剂 全血 治疗药物监测

免疫抑制剂是对机体的免疫反应具有抑制作用的药物，能抑制与免疫反应有关细胞（T 细胞和 B 细胞等巨噬细胞）的增殖和功能，能降低抗体免疫反应。免疫抑制剂主要用于器官移植抗排斥反应和自身免疫病如类风湿性关节炎、红斑狼疮、皮肤真菌病、膜肾球肾炎、炎性肠病和自身免疫性溶血贫血等，但是由于不良反应多，常常需要在低剂量发生移植排斥和高剂量产生毒性之间平衡。临床常用的免疫抑制剂如环孢素 A（Cyclosporine A, Cs A）、他克莫司（Tacrolimus, TAC）、西罗莫司（Sirolimus,

SRL）、依维莫司（Everolimus, RAD-001）、霉酚酸（Mycophenolic acid, MPA）这类药物治疗窗窄，药动力学个体差异大，需要进行治疗药物监测（TDM），以确保药物浓度处于安全有效的治疗范围。

本文使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8045，建立了全血中 Cs A、TAC、SRL、RAD-001 及 MPA 5 种免疫抑制剂同时测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于免疫抑制剂治疗药物监测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

输液泵：LC-40D XR×2

在线脱气机：DGU-405

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

系统控制器：CBM-40

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST 50 mm×2.1 mm I.D.,
2 μm; P/N: 227-30001-02; 岛津（上海）

实验器材有限公司

流动相：A：0.1% 甲酸水（含 2 mM 乙酸铵）

B：0.1% 甲酸甲醇（含 2 mM 乙酸铵）

进样量：5 μL

柱温：45°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，洗脱程序见表 1。

流速：0.4 mL/min

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	泵	B.Conc	50
1.00	柱温箱	CTO.RVL	0
1.30	泵	B.Conc	98
2.50	泵	B.Conc	98
2.60	泵	B.Conc	50

2.70	柱温箱	CTO.RVL	1
4.00	控制器	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045 CL

DL 温度: 250°C

离子源: ESI (+)

加热模块温度: 400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

离子源温度: 300°C

干燥气流速: 8.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热气流速: 12.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Cs A	1202.8	1184.8	-30	-30	-34
	1219.8	1202.8	-30	-20	-34
Cs A-IS	1233.8	1216.8	-38	-20	-36
TAC	821.5	768.5	-20	-23	-40
	821.5	786.5	-20	-23	-40
TAC-IS	826.5	773.5	-20	-23	-40
SRL	931.6	864.5	-22	-19	-24
	931.6	882.5	-24	-15	-24
SRL-IS	934.6	882.5	-24	-15	-24
RAD-001	975.6	908.6	-20	-20	-26
	975.6	926.6	-20	-26	-15
RAD-001-IS	979.6	912.6	-24	-20	-26
MPA	321.2	159.1	-25	-20	-25
	321.2	207.1	-25	-10	-25
MPA-IS	324.2	210.1	-25	-10	-25

1.3 标准品及样品制备

基质匹配标准曲线制备: 取 5 种免疫抑制剂混标母液, 用甲醇稀释成相应浓度混标液。内标溶液使用甲醇配置成内标工作液。取 180 μ L 空白全血, 20 μ L 混标液, 涡旋混匀 10 s, 得基质标准溶液, 混标基质标曲浓度见表 3。

标准品及样品溶液制备: 取 50 μ L 血浆标准品或样品, 加入 5 μ L 内标溶液, 50 μ L 100 mM 硫酸锌溶液, 150 μ L 甲醇, 涡旋混匀 3 min, 14000 rpm 离心 5 min, 取上清液上机分析。(如测定血浆中霉酚酸含量, 前处理可不加硫酸锌溶液)。

表 3 标准曲线浓度表 (ng/mL)

名称	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Cs A	20	40	100	500	1000	2000
TAC	1	2	5	25	50	100
SRL	1	2	5	25	50	100
RAD-001	1	2	5	25	50	100
MPA	200	400	1000	5000	10000	20000

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

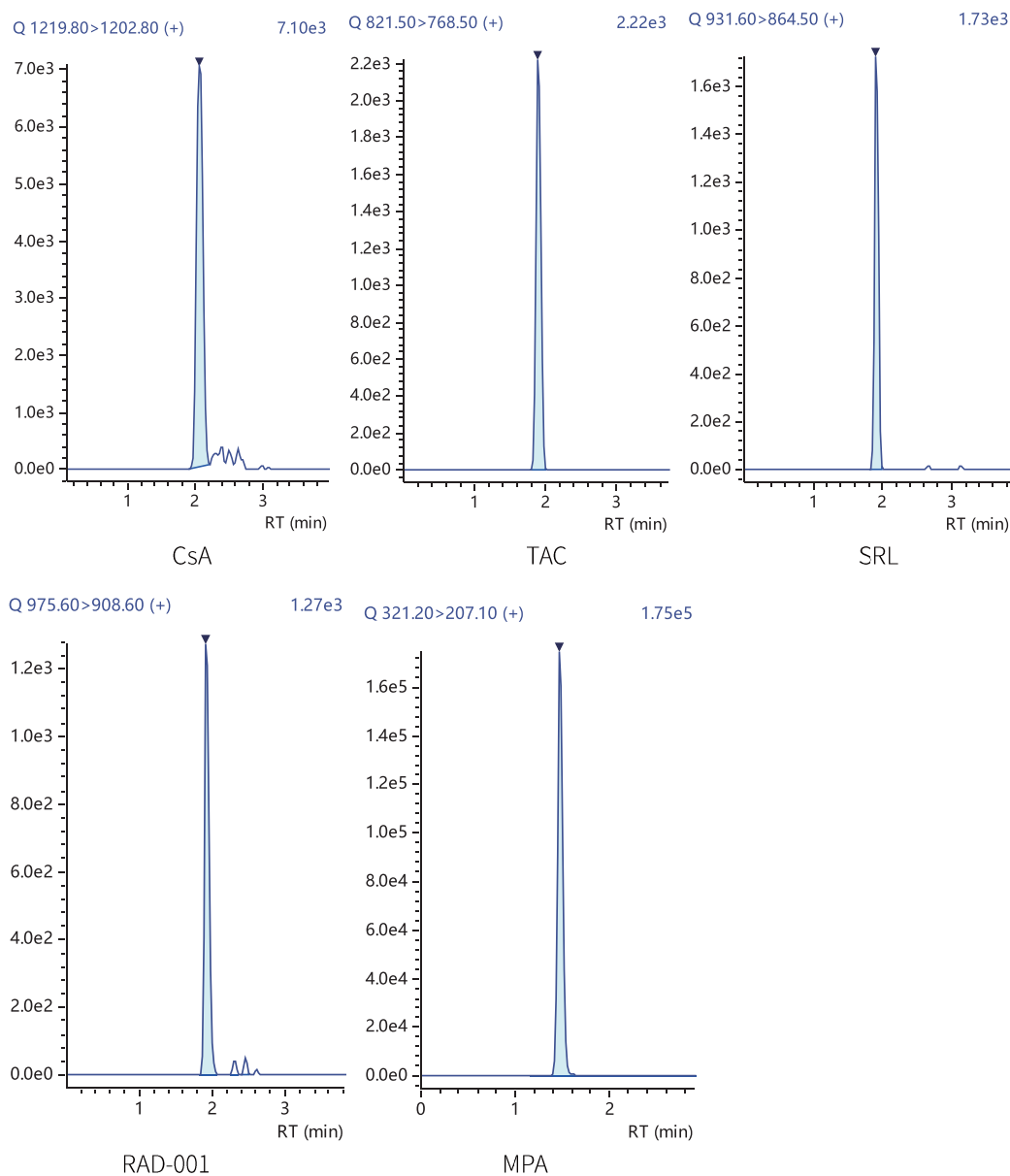


图1 标准曲线最低点谱图

2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作标准曲线。标准曲线结果见表 4，5 种免疫抑制剂在标准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.997，准确度在 88.4%~108.7% 之间，满足测定需求。

表 4 标准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	Cs A	$Y = (0.00273844)X + (0.00485637)$	20~2000	0.9988	94.2~102.0
2	TAC	$Y = (0.0329982)X + (-5.22501e-005)$	1~100	0.9992	94.8~106.4
3	SRL	$Y = (0.0167088)X + (0.00347111)$	1~100	0.9984	90.5~106.9
4	RAD-001	$Y = (0.0111589)X + (0.00151804)$	1~100	0.9980	91.0~108.7
5	MPA	$Y = (0.00777988)X + (0.157142)$	200~20000	0.9976	88.4~108.1

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对添加标准溶液的低中高浓度质控品进行前处理，每个浓度质控品重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度结果如表 5 所示，结果显示质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 89%~112% 之间，RSD 在 1.2%~8.6% 之间，满足临床测定需求。

表 5 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

质控	项目	Cs A	TAC	SRL	RAD-001	MPA
LQC	理论浓度	50	2.5	2.5	2.5	500
	测定浓度	55	2.6	2.8	2.7	531.4
	回收率 %	110	104	112	108	106
	RSD%	3.1	8.2	6.7	8.6	2.0
MQC	理论浓度	160	8	8	8	1600
	测定浓度	151.3	7.1	8.1	8.3	1496.2
	回收率 %	95	89	101	104	94
	RSD%	3.1	4.5	5.1	7.3	1.2
HQC	理论浓度	1500	75	75	75	15000
	测定浓度	1573.6	76.3	79.6	73.5	14295.8
	回收率 %	105	102	106	98	95
	RSD%	2.3	2.8	3.1	1.9	2.2

■ 结论

使用超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立了全血中环孢素 A (Cyclosporine A, Cs A)、他克莫司 (Tacrolimus, TAC)、西罗莫司 (Sirolimus, SRL)、依维莫司 (Everolimus, RAD-001)、霉酚酸 (Mycophenolic acid, MPA) 5 种免疫抑制剂同时测定方法。使用内标、标准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数均大于 0.997，质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 89%~112% 之间，RSD 在 1.2%~8.6% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于免疫抑制剂治疗药物监测。

岛津应用云

