

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2018.11.016

固相支持液-液萃取/液相色谱-串联质谱法测定人全血中环孢素A

利利¹, 贾叶青¹, 张倩影², 张爱国²,
王曼曼¹, 李冬梅^{1,3*}, 王学生^{1*}

(1. 华北理工大学 公共卫生学院, 河北 唐山 063210; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000;
3. 华北理工大学 药学院, 河北 唐山 063210)

摘要: 采用固相支持液-液萃取/液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术建立了人全血中环孢素A的分析方法。全血样品经蛋白沉淀后, 上样至固相支持液-液萃取柱, 经甲基叔丁基醚洗脱, Shim-pack XR-ODS色谱柱(75 mm × 3.0 mm i. d., 2.2 μm)分离, 电喷雾电离源、正离子模式和多反应监测模式下采集数据, 以环孢素D为内标物定量。结果表明, 环孢素A在1.5~500 μg/L范围内呈良好的线性关系, 相关系数(r)为0.998, 检出限和定量下限分别为0.5 μg/L和1.5 μg/L, 在50、100、400 μg/L 3个加标浓度下的平均回收率为78.6%~83.5%, 日内和日间相对标准偏差($n=3$)分别为3.1%~5.6%和4.5%~8.3%。该方法操作简便、灵敏度高, 可用于全血中环孢素A的分析。

关键词: 环孢素A; 全血; 固相支持液-液萃取; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: O657.63; R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)11-1370-05

Determination of Cyclosporin A in Human Whole Blood Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Solid Supported Liquid-Liquid Extraction

LI Li¹, JIA Ye-qing¹, ZHANG Qian-ying², ZHANG Ai-guo²,
WANG Man-man¹, LI Dong-mei^{1,3*}, WANG Xue-sheng^{1*}

(1. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China; 3. College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

Abstract: A method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with solid supported liquid-liquid extraction was developed for the determination of cyclosporin A in human whole blood. The whole blood sample was loaded on the solid supported liquid-liquid extraction column after protein precipitation, and then eluted with methyl tert-butyl ether. The extract was injected into a Shim-pack XR-ODS(75 mm × 3.0 mm i. d., 2.2 μm) column for separation, followed by detection of mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode via an electrospray ionization interface. The quantitation was achieved using cyclosporin D as the internal standard. There was a good linearity for the method toward cyclosporin A in the range of 1.5-500 μg/L with a correlation coefficient(r) of 0.998. The limits of detection and quantitation were down to 0.5 μg/L and 1.5 μg/L, respectively. The average recoveries for the analyte at three spiked levels ranged from 78.6% to 83.5% with the intra-day and inter-day relative standard deviations of 3.1%-5.6% and 4.5%-8.3%, respectively. This method is suitable for the determination of cyclosporin A in whole blood sample due to its advantages of simplicity, rapidness, accuracy and reliability.

收稿日期: 2018-07-03; 修回日期: 2018-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(21305028); 河北省自然科学基金(H2017209232, H2016209018); 河北省教育厅重点项目(ZD2018014); 华北理工大学培育基金项目(JQ201717)

* 通讯作者: 李冬梅, 博士, 讲师, 研究方向: 药物分析, E-mail: lidongmei12@iccas.ac.cn
王学生, 硕士, 教授, 研究方向: 卫生化学分析, E-mail: xswang64@163.com

Key words: cyclosporin A; whole blood; solid supported liquid – liquid extraction; liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS)

环孢素 A (Cyclosporin A, CsA, 图 1) 是一种强效、高选择性的免疫抑制剂, 临床上用于治疗肝、肾等器官移植的排斥反应和其他自身免疫性疾病, 但存在治疗窗窄、副作用多、口服生物利用度不稳定、个体间及个体内的药代动力学差异大等问题^[1]。在临床应用中, 肾脏和心脏移植患者的 CsA 安全用药浓度范围为 100 ~ 200 ng/mL, 肝脏移植患者为 100 ~ 400 ng/mL^[2]。因此, 在患者治疗过程中, 为提高 CsA 免疫抑制作用, 减少其毒性作用, 准确监测 CsA 的血药浓度具有重要的临床意义。

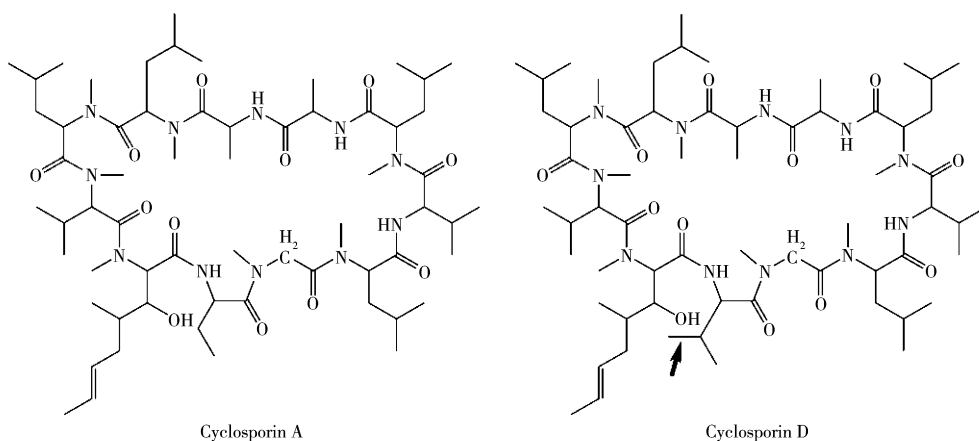


图 1 环孢素 A 和环孢素 D 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of CsA and CsD

目前, CsA 血药浓度分析方法主要包括光谱法、色谱法和免疫法等, 其中色谱法为常用方法^[3-6]。由于血液成分复杂, 所含杂质干扰测定, 且血液中待测组分含量较低, 难以检出, 因此在仪器分析前需对样品中的待测物进行富集和净化。目前, 生物样品中 CsA 的前处理方法主要有液 – 液萃取法 (LLE)^[7-9]和固相萃取法 (SPE)^[10], 但 LLE 法溶剂使用量大、耗时, 不适用于高通量分析检测; SPE 法通常需活化、上样、淋洗和洗脱, 步骤较多, 易出现操作误差和污染。因此, 建立简单、快速测定血液样品中 CsA 的方法具有重要的研究意义和实际价值。

固相支持液 – 液萃取 (Solid supported liquid – liquid extraction, SLE) 法作为一种新型前处理方法, 是在传统液 – 液萃取法的基础上, 采用硅藻土为吸附剂, 利用其吸水性强、性质稳定的特点, 快速吸附样品基质中的水分, 在吸附剂表面形成液膜, 从而使目标物与水相分离, 实现对目标物的富集与净化。SLE 不仅避免了活化和淋洗步骤, 操作简单, 且具有不易产生乳化、基质效应低和样品用量少等优点^[11]。Yoshikawa 等^[12]利用 SLE 前处理结合液相色谱 – 串联质谱分析, 建立了鸡肉中多种兽药残留的分析方法; Gao 等^[13]发展了一种 SLE 结合高效液相色谱 – 串联质谱法同时测定人尿中阿米他唑、杀螨甲菊酯、甲胎菊酯及其主要代谢物的方法。SLE 方法已成功应用于医药、食品和环境等^[12-16]样品的前处理。

本研究采用 SLE 对全血样品中 CsA 进行净化和萃取, 结合液相色谱 – 串联质谱法 (LC – MS/MS), 以环孢素 D (Cyclosporin D, CsD, 图 1) 为内标物进行定量, 建立了人全血中 CsA 的准确定量分析方法, 可为临床 CsA 血药浓度监测提供新的技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LCMS – 8040 液相色谱 – 串联质谱仪 (日本岛津公司): 液相色谱包括 CBM – 20A 控制器、LC – 30AD 泵、DGU – 20A_{SR} 脱气系统、SIL – 30AC 自动进样器和 CTO – 20AC 柱温箱; 质谱为三重四极杆串联质谱仪, 电喷雾电离源, 软件控制系统为 LabSolutions LCMS Ver. 5.53。ET – 3301A 型氮气浓缩仪 (天津恒奥科技发展有限公司); Sigma 3K – 15 型离心机 (上海精宏实验设备公司); Milli-Q 水纯化系统 (美国 Millipore 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Sigma - Aldrich 公司); 正己烷(*n*-Hex, 99.5%)、二氯甲烷(DCM, 99.8%)、甲基叔丁基醚(MTBE, 99.7%)均购自北京迪马科技有限公司; 乙酸乙酯(EA, 99.0%, 上海阿拉丁试剂公司); 石油醚(PE, 天津富宇精细化工有限公司); SLE 柱(1 mL)购自上海拜泰齐贸易有限公司。

标准物质 CsA(99.0%, Toronto Research Chemicals 公司(加拿大)), CsD(99.0%, 上海同田生物技术股份有限公司)。使用甲醇分别配制 1 g/L 的 CsA 和 CsD 标准储备溶液, 4 °C 下避光储存。

1.2 样品制备

收集河北省某医院 10 例骨髓移植术后患者的全血样品, 于 -80 °C 下冷冻保存, 使用前自然解冻至室温。本试验经医学伦理委员会批准。

取全血样品 200 μ L 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μ L 硫酸锌溶液(0.1 mol/L)涡旋 1 min 后, 2 500 g 离心 4 min, 转移上清液(约 120 μ L), 用甲醇-水(体积比 5 : 95)定容至 0.8 mL 待用。

1.3 SLE 方法

将 0.8 mL 样品上样至 SLE 柱, 静置 10 min, 使样品溶液充分浸润并均匀分布在吸附剂表面, 用 7 mL 甲基叔丁基醚对分析物进行洗脱。收集洗脱液, 25 °C 氮吹至干, 用甲醇定容至 200 μ L。

1.4 LC-MS/MS 条件

色谱条件: Shim-pack XR-ODS 色谱柱(75 mm \times 3.0 mm i. d., 2.2 μ m, 日本岛津公司); 流动相为乙腈-水(体积比 95 : 5); 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 10 μ L; 柱温 60 °C。

质谱条件: 电喷雾电离源, 正离子模式 ESI(+); 扫描方式: 多反应监测(MRM)模式; 雾化气流速: 3 L/min; 干燥气流速: 15 L/min; 离子源温度: 300 °C; 加热块温度: 450 °C; 碰撞气电压: 230 kPa。CsA 及其内标物 CsD 的保留时间分别为 2.1、2.5 min, 质谱分析参数离子对(*m/z*)分别为 1 219.8/1 202.7、1 233.8/1 216.6, 碰撞能量(eV)分别为 17、28。

2 结果与讨论

2.1 SLE 萃取条件的考察

SLE 进行样品前处理时, 无需活化和淋洗步骤, 水溶液样品直接上样, 完全吸附后, 利用有机溶剂洗脱, 即可达到快速萃取和净化的目的, 因此洗脱溶剂的选择决定了 SLE 的准确度。另外, 洗脱后需对样品进行氮吹浓缩。因此, 本实验对氮吹蒸发压力、洗脱溶剂种类及体积进行优化, 实验平行进行 3 次。

2.1.1 氮吹蒸发压力 在 25 °C 条件下, 考察了氮吹蒸发压力(21~55 kPa)对 5 mg/L CsA 标准溶液回收率的影响(图 2A)。结果显示, 氮吹蒸发压力为 28 kPa 时 CsA 的回收率最高, 因此最终选择氮吹蒸发压力为 28 kPa。

2.1.2 洗脱溶剂种类 SLE 的洗脱溶剂应与水不混溶, 且对 CsA 有良好的溶解性。在 CsA 上样质量浓度为 5 mg/L, 上样体积为 0.8 mL, 洗脱溶剂体积为 7 mL 的条件下, 分别考察了正己烷、石油醚、乙酸乙酯和甲基叔丁基醚作为洗脱溶剂时 CsA 的回收率(图 2B)。结果表明, 甲基叔丁基醚对目标物的回收率最高, 故采用甲基叔丁基醚作为 SLE 的洗脱溶剂。

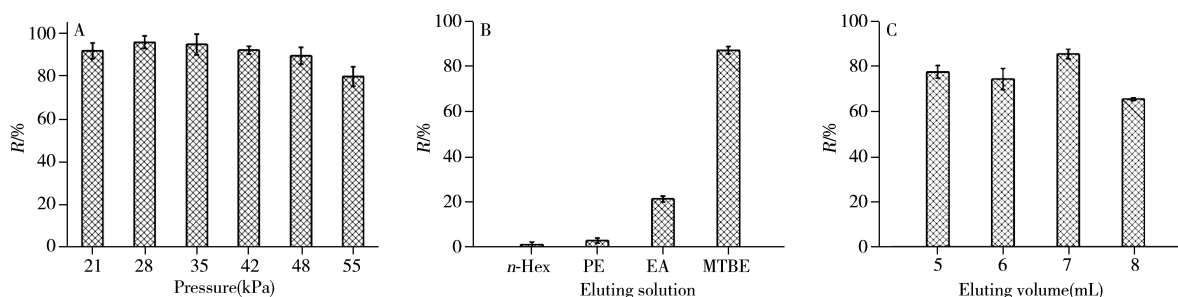


图2 氮吹蒸发压力(A)、洗脱溶剂种类(B)及体积(C)对环孢素 A 回收率的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen blowing pressure(A), eluting solution(B) and eluting volume(C) on recoveries of CsA

2.1.3 洗脱溶剂体积 在 CsA 上样质量浓度为 5 mg/L, 上样体积 0.8 mL 的条件下, 考察了甲基叔丁基醚体积(5、6、7、8 mL)对 CsA 回收率的影响(图 2C)。结果显示, 当甲基叔丁基醚用量为 7 mL 时 CsA 的回收率最高, 用量为 8 mL 时回收率反而降低, 可能是由于氮吹时间延长导致了 CsA 损失。因此, 实验选择甲基叔丁基醚的体积为 7 mL。

2.2 线性关系、检出限及定量下限

采用“1.4”条件对 0、1.5、5、15、50、150、500 $\mu\text{g/L}$ 的 CsA 和 200 $\mu\text{g/L}$ CsD 内标物溶液($n=3$)进行分析, 测定目标物峰面积, 以 CsA 与 CsD 峰面积的比值(y)为纵坐标, CsA 的质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)为横坐标, 建立标准曲线, 结果显示, CsA 在 1.5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性方程为 $y = 0.0046x + 0.003$, 相关系数(r)为 0.998, 检出限(LOD, $S/N=3$)为 0.5 $\mu\text{g/L}$, 定量下限(LOQ, $S/N=10$)为 1.5 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 回收率与相对标准偏差

以空白全血加标样品进行回收率和精密度实验, 分别添加 50、100、400 $\mu\text{g/L}$ 3 个水平的 CsA 标准溶液和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 CsD 标准溶液, 每组平行实验 3 次。CsA 的平均加标回收率为 78.6% ~ 83.5%, 日内和日间相对标准偏差(RSD)分别为 3.1% ~ 5.6% 和 4.5% ~ 8.3%。图 3 为空白血样加标和标准溶液的 MRM 谱图, 由图可见, 在最优条件下, 将加标 100 $\mu\text{g/L}$ CsA 和 200 $\mu\text{g/L}$ CsD 的健康人全血经 SLE 萃取后, 目标物在出峰位置无明显基质干扰, 特异性良好。表明本方法能够有效净化和萃取全血基质中的 CsA。

2.4 实际样品分析

在最优实验条件下, 使用 SLE 结合 LC-MS/MS 测定 10 例骨髓移植术后患者全血样品中 CsA 的浓度。结果显示 10 例样品的 CsA 质量浓度为 100 ~ 400 $\mu\text{g/L}$, 均在安全血药浓度范围内。分别向实际样品添加 100 $\mu\text{g/L}$ 的 CsA 标准溶液和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 CsD 标准溶液, 每组平行实验 3 次, 计算得 10 例骨髓移植术后患者的平均加标回收率为 $79.5\% \pm 2.1\%$ 。

2.5 方法比较

为进一步说明所建方法的可行性, 将本方法与文献方法进行对比(表 1)。与血样中 CsA 的常用前处理方法 LLE、SPE 法相比, 本方法的回收率与文献方法相当, 但灵敏度更高, 且避免了活化和淋洗步骤, 溶剂用量少, 操作简单。

表 1 本方法与文献方法的分析结果对比

Table 1 Comparison of the present method with the reported methods for determination of CsA in the whole blood samples

Sample	Pretreatment method	LOD($\mu\text{g/L}$)	LOQ($\mu\text{g/L}$)	Recovery/%	Reference
Beagle whole blood	LLE	-	20.16	63.8	[7]
Whole blood	LLE	7.5	10	78.6	[8]
Whole blood	LLE	1.0	-	84	[9]
Rat cornea	SPE	1.92	-	77	[10]
Whole blood	SLE	0.5	1.5	79.5	This work

3 结论

本研究建立了基于 SLE 前处理技术结合 LC-MS/MS 测定全血中 CsA 的分析方法, 该法简便快速, 灵敏度和准确度良好, 可为临床 CsA 血药浓度监测提供技术支持和个性化用药依据, 有助于更加准确指导临床进行剂量调整, 优化药物治疗方案。

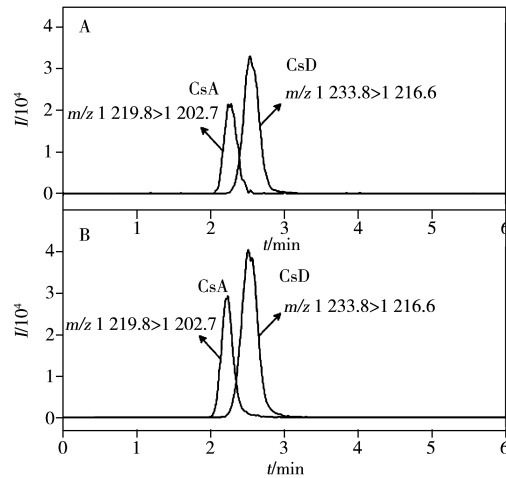


图 3 空白血样加标(A)和标准溶液(B)的 MRM 谱图
Fig. 3 MRM chromatograms of spiked samples of whole blood(A) and standard solution(B)
CsA: 100 $\mu\text{g/L}$; CsD: 200 $\mu\text{g/L}$

参考文献:

- [1] Liao X J, Wei L P. *Chin. Pharm.* (廖秀娟, 韦柳萍. 中国药房), **2015**, 26(4): 558-561.
- [2] Mika A, Stepnowski P. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 127: 207-231.
- [3] Vosough M, Tehrani S M. *J. Chromatogr. B*, **2018**, 1073: 69-79.
- [4] Sadilkova K, Busby B, Dickerson J A, Rutledge J C, Jack R M. *Clin. Chim. Acta*, **2013**, 421: 152-156.
- [5] Mei S H, Wang J Q, Chen D, Zhu L T, Zhao M, Hu X, Yang L, Zhao Z G. *Ther. Drug Monit.*, **2018**, 40(1): 69-75.
- [6] Mišlanová C, Příbojová J, Valachovičová M, Žilinská Z. *Anal. Lett.*, **2017**, 50(15): 2359-2368.
- [7] Zhao P, Zhang X Q, Jiang X H, Wang L. *Chin. J. Pharm. Anal.* (赵萍, 张晞倩, 蒋学华, 王凌. 药物分析杂志), **2015**, 35(11): 1965-1970.
- [8] Li L, Guan Y Q, Li H, Liu W. *Chin. J. Clin. Pharmacol. Ther.* (李力, 关业勃, 李贺, 刘炜. 中国临床药理学与治疗学), **2015**, 20(10): 1126-1130.
- [9] Wang Q B, Tu Z L, Wang F, Li H D, Li K Y. *Chin. Hosp. Pharm. J.* (王启斌, 涂自良, 王峰, 李焕德, 李坤艳. 中国医院药学杂志), **2003**, 23(4): 217-219.
- [10] Zhou T Y, Zhu L, Xia H Y, He J J, Zhang J J. *Chin. J. Pharm. Anal.* (周天洋, 朱玲, 夏慧云, 何继军, 张俊杰. 药物分析杂志), **2013**, 33(2): 263-267.
- [11] Gao X, Liu W W, Wang X M. *J. Instrum. Anal.* (高雪, 刘文文, 王星敏. 分析测试学报), **2017**, 36(4): 539-543.
- [12] Yoshikawa S, Nagano C, Kanda M, Hayashi H, Matsushima Y, Nakajima T, Tsuruoka Y, Nagata M, Koike H, Sekimura K, Hashimoto T, Takano I, Shindo T. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1057: 15-23.
- [13] Gao X, Tan Y L, Guo H. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1052: 27-33.
- [14] Dong Y, Wang Y, Lin Y, Chen J, Liu Q, Feng J L, Xie J W. *J. Instrum. Anal.* (董媛, 王颖, 林纓, 陈佳, 刘勤, 冯建林, 谢剑炜. 分析测试学报), **2010**, 29(9): 913-917.
- [15] Liu Q, Han F, Xie K, Miao H, Wu Y N. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1314(11): 208-215.
- [16] Peng X T, Xia H, Zhang X, Hu X Z, Peng L J, Shen J. *Chin. J. Chromatogr.* (彭西甜, 夏虹, 张仙, 胡西州, 彭立军, 沈菁. 色谱), **2016**, 34(4): 436-441.