

## HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者他克莫司血药浓度测定中的应用\*

王磊, 刘红星, 孙文利 (河北燕达陆道培医院, 河北三河 065201)

**摘要:**目的 建立测定骨髓移植患者全血他克莫司(FK506)血药浓度的高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)法,探索 HPLC-MS/MS 法与羧基金属免疫分析(CMIA)法和化学发光微粒免疫(Elecsys)法在 FK506 血药浓度检测中的关系,为临床合理选用 FK506 血药浓度监测方法提供可靠依据。**方法** 采用子囊霉素作内标,全血样品经含内标甲醇沉淀蛋白处理。色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub>,柱温 65℃,流动相为含 0.1 g/dl 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水和含 0.1 ml/dl 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,MRM 扫描,监测 FK506 m/z 821.5~768.5,子囊霉素 m/z 809.4~756.4。选取部分骨髓移植患者全血 FK506 样本,分别用 HPLC-MS/MS 法,CMIA 法和 Elecsys 法进行检测,对各种检测方法所检测的 FK506 浓度值进行比较。**结果** 建立的 HPLC-MS/MS 法检测 FK506 血药浓度在 0.5~50 ng/ml 范围内线性关系良好, $Y=0.228X-0.00308$  ( $r=0.9990$ )。HPLC-MS/MS 法与 CMIA 法和 Elecsys 法检测 FK506 血药浓度结果相关性较好,差异无统计学意义。**结论** 建立了检测 FK506 血药浓度的 HPLC-MS/MS 法,该法可用于临床骨髓移植患者全血 FK506 浓度的监测。

**关键词:** FK506; 子囊霉素; 液相色谱-质谱联用技术; 治疗药物监测

**中图分类号:** R617; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-126-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.035

## Application of HPLC-MS/MS Method in the Determination of Whole Blood Concentration of Tacrolimus in Bone Marrow Transplant Patient

WANG Lei, LIU Hong-xing, SUN Wen-li

(Hebei Yanda Lu · Daopei Hospital, Hebei Sanhe 065201, China)

**Abstract:** **Objective** To develop a HPLC-MS/MS method for determination of Tacrolimus(FK506) in bone marrow transplant patient, and explore the relationship of HPLC-MS/MS with CMIA and Elecsys in the measurement of FK506 blood drug concentration, and provide reliable basis for clinical rational use of monitoring method in FK506 blood drug concentration. **Methods** The separation was performed on a Ultimate XB-C<sub>18</sub> column with a mobile phase of water (containing 2 mmol/L ammonium acetate and 0.1 ml/dl formic acid) and methanol (containing 0.1 ml/dl formic acid). The way of eluting was gradient. Mass spectrum detection method was ESI positive ion mode and the MRM transitions of FK506 m/z 821.5~768.5 and Ascomycin m/z 809.4~756.4. Selected part of the whole blood samples of FK506 in bone marrow transplant patient and respectively were tested by HPLC/MS/MS method, CMIA method and Elecsys method. Then, three methods for the detection of FK506 density were compared. **Results** The standard curve of FK506 was linear over the range of 0.5~50 ng/ml,  $Y=0.228X-0.00308$  ( $r=0.9990$ ). FK506 blood concentrations were not significantly different in HPLC/MS/MS method, CMIA method and Elecsys method. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method in the detection of FK506 was established and can be used for monitoring of whole blood concentration of FK506 in bone marrow transplant patients.

**Keywords:** tacrolimus; ascomycin; HPLC-MS/MS; TDM

他克莫司为大环内酯类抗生素,属于钙调磷酸酶抑制剂,可与淋巴细胞内 FK506 结合蛋白(FKBP)结合形成 FKBP 复合物,抑制抗宿主反应和迟发性变态反应,广泛应用于器官移植和骨髓移植的抗排斥反应。但由于其具有肾毒性和神经毒性不良反应,且和用药剂量呈相关性。同时,该药用药

剂量较小,有效血药浓度范围窄,治疗剂量和中毒剂量相当接近,且个体间和个体内药物动力学差异大。因此,移植术后监测他克莫司血药浓度就显得尤为重要。目前 FK506 血药浓度监测方法较多<sup>[1~9]</sup>,主要有 EMIT, RIA, FPIA, HPLC, Elecsys, CMIA 及 HPLC-MS/MS 法, HPLC, Elecsys,

\* 作者简介:王磊(1984—),男,硕士,执业药师,主要从事医院药学研究工作, E-mail:rosie1982@163.com。

通讯作者:刘红星,男,硕士,执业医师,主要从事检验医学研究工作。

CMIA 和 HPLC-MS/MS 法目前应用较为广泛,由于 Elecsys 和 CMIA 免疫法试剂昂贵、操作繁琐,且不能单一检测,而 HPLC 法检测耗时较长,不能适应临床大规模样本检测,故开发用于 FK506 血药浓度检测的 HPLC-MS/MS 法就显得尤为迫切。本文通过建立检测 FK506 血药浓度 HPLC-MS/MS 法,进而与 CMIA 法和 Elecsys 法检测 FK506 血药浓度结果进行比较,验证 HPLC-MS/MS 法检测 FK506 血药浓度是否适合临床应用。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 4 月~5 月前来我科监测 FK506 血药浓度的骨髓移植患者 51 例,男性 26 例,女性 25 例,患者年龄 10~45 岁,其平均年龄 21.6 岁,骨髓移植后时间未知。每位患者于清晨 8 点服药前,抽取静脉血 2 ml,应用专用 EDTA 抗凝管进行抗凝。将 51 例患者随机分为 A、B 二组, A 组患者 15 例,同时应用 CMIA 法和 HPLC-MS/MS 法进行全血 FK506 浓度检测; B 组患者 36 例,同时应用 Elecsys 法和 HPLC-MS/MS 法进行全血 FK506 浓度检测。

## 1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂: 甲醇(HPLC-Grade, fisher), 屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏), 甲酸(HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC), 乙酸铵(HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC), FK506(HPLC Grade, SIGMA), 子囊霉素(HPLC Grade, SIGMA), Elecsys 试剂盒(罗氏公司), CMIA 试剂

盒(美国雅培公司)。

1.2.2 仪器: 岛津 20A 高效液相色谱系统(带自动进样器), 配有 AB Sciex 4000Qtrap 质谱仪, Analyst V1.5.2 工作站(AB 公司); VORTEX QILIN BEI ER(其林贝尔涡旋混合器), 全自动高速冷冻离心机(Thermo Fisher); cobas e411(罗氏公司); i1000SR(美国雅培公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 HPLC-MS/MS 方法建立

1.3.1.1 液相色谱及质谱条件: 色谱条件: 采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱[(4.6×50) mm, 5 μm], 柱温 65℃; 流速 0.8 ml/min; 流动相 2 mmol/L 乙酸铵-0.1 ml/dl 甲酸水溶液(B)-0.1 ml/dl 甲酸甲醇溶液(A), 进样量 5 μl, 洗脱方式: 梯度洗脱, 其中 0.01~0.1 min, A 相浓度为 100%, 保持 0.1 min, ~0.2 min A 相浓度从 100%~50%, 保持 0.3 min, ~0.6 min A 相浓度从 50%~100%, ~0.7 min A 相浓度从 100%~50%, 保持 0.3 min, ~1.1 min A 相浓度从 50%~100%, 保持 0.9 min。

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: 500℃; GS1: 60; GS2: 55; Curtain gas: 30; 碰撞气压力: Medium; 用于定量分析的离子反应为: FK506 m/z 821.5~768.5, 子囊霉素 m/z 809.4~756.4; 各种质谱条件参数, 见表 1。

表 1

质谱条件

药 物	初级离子(m/z)	产物离子(m/z)	停留时间(msec)	DP(v)	CE(v)	CXP(v)	EP(v)
FK506	821.5	768.5	150	83	30	13.5	10
子囊霉素	809.4	756.4	150	81	30	12.0	10

注: DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: cell exit potential; EP: exclusion potentation.

1.3.1.2 样品处理方法: 精密量取样本全血 100 μl 置于 1.5 ml Microtube 中, 然后加入 100 mmol/L 硫酸锌溶液 100 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 再加入 4 ng/ml 子囊霉素 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。

1.3.1.3 专属性: 在上述色谱质谱条件下, FK506, 子囊霉素的保留时间为 0.87 min。血样中的内源性物质对他克莫司及内标子囊霉素的测定没有干扰。考察了 6 份不同的空白血浆, 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。

1.3.1.4 标准曲线的制备: 分别在 7 个 1.5 ml

Microtube 中加入空白全血 90 μl, 并加入 10 μl FK506 各系列标准工作液, 得到 FK506 浓度为 0.5, 1, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 ng/ml 系列质量浓度。按“2.2.2”项下样品处理方法处理后进样测定, 以 FK506 峰面积与子囊霉素峰面积比值为(Y)对 FK506 浓度(X)进行线性回归, 得 FK506 标准曲线。

1.3.1.5 精密度与回收率: 按“2.1.2”项下处理质量浓度为 3.93, 8.13, 15.9 ng/ml 的质量控制样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 天, 根据当日的标准曲线, 计算样品的测得浓度。根据测得结果计算日内和日间精密度, 见表 2。

表 2

他克莫司精密度与回收率测定结果 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

加入浓度(ng/ml)	测得浓度(ng/ml)	日内 RSD(%)	日间 RSD(%)	回收率(%)
3.93	3.82±0.19	5.08	5.31	97.2±1.8
8.13	8.08±0.42	5.21	5.56	99.4±5.2
15.9	15.92±0.77	4.87	5.09	100.1±4.8

1.3.2 CMIA 方法:检测仪器型号为:i1000SR,由美国雅培公司提供,检测试剂盒为仪器配套产品,编号为:YZB/USA 0441-2012。严格按照说明书进行操作,共测量 1 个批次 15 例全血样品和质控监测,记录检测结果和仪器各项质控指标。

1.3.3 Elecsys 法:检测试剂盒由我院临检中心提供的免疫全血 Elecsys 试剂盒,批号为 092M4125V;测定仪器为 cobas e411,均由罗氏公司提供。严格按照说明书进行操作,共测量 1 个批次 36 例全血样品和质控监测,记录检测结果和各项质控指标。

1.4 统计学分析 对 A,B 二组各种方法检测 FK506 血药浓度结果进行相关性分析(配对  $t$  检验)和一致性分析。

## 2 结果

### 2.1 HPLC-MS/MS 方法学结果

2.1.1 色谱质谱行为:在“1.3.1.1”项下的色谱质谱条件下,测得 FK506,子囊霉素二级碎片离子质谱图,见图 1;FK506,子囊霉素质谱色谱图见图 2。由图 2 可见,FK506,子囊霉素的保留时间为 0.87 min,各个峰型良好,无杂质峰干扰。

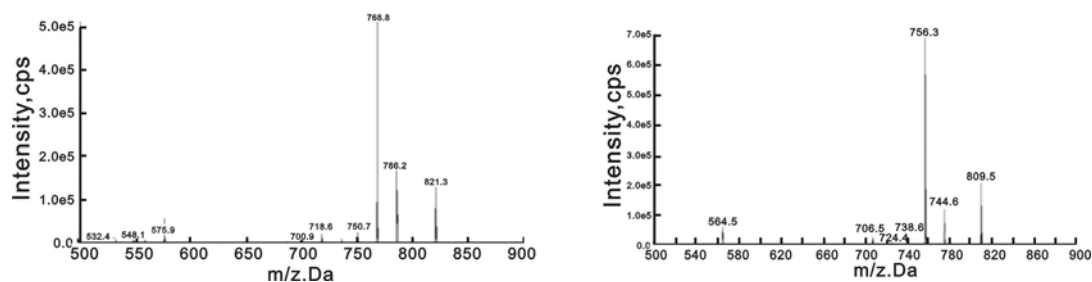
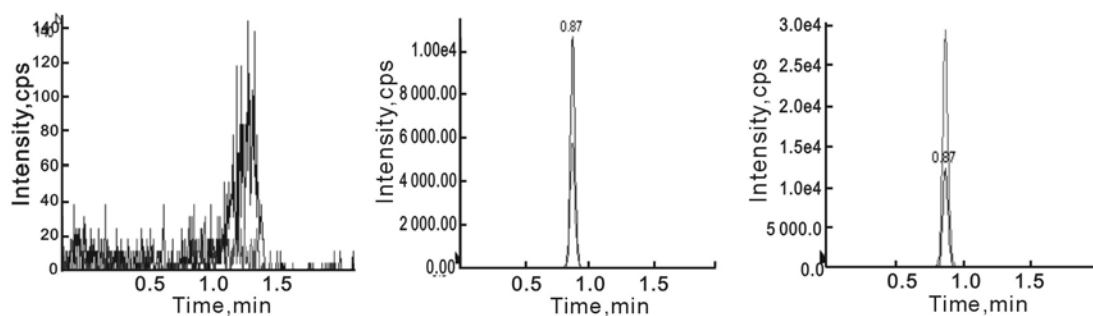


图 1 FK506(A)和子囊霉素(B)的二级扫描碎片离子图



A. 空白全血;B. 空白全血+他克莫司+子囊霉素;C. 患者血样+子囊霉素

图 2 FK506 和子囊霉素质谱图

2.1.2 标准曲线回归方程:以子囊霉素为内标,FK506 峰面积与子囊霉素峰面积比值为(Y)对 FK506 浓度(X)进行线性回归,得 FK506 的回归方程: $Y=0.228X-0.00308$  ( $r=0.9990$ ),表明 FK506 在 0.5~50 ng/ml 范围内线性关系较好,可用于定量。

2.2 HPLC-MS/MS 法与 Elecsys 法结果比较 36 例 FK506 检测结果见图 3;对其进行相关性分析和一致性分析,见图 4 和图 5。由图 3,图 4 和图

5 可知,HPLC-MS/MS 法与 Elecsys 法对 36 例 FK506 样本检测结果一致,相关性较好,经两组数据配对  $t$  检验, $t=2.93$ ,说明两种检测方法所检测的结果差异无统计学意义。

2.3 HPLC-MS/MS 法与 CMIA 法比较结果 15 例 FK506 检测结果见图 6;对其进行相关性分析和一致性分析,见图 7 和图 8。由图 6,图 7 和图 8 可知,HPLC-MS/MS 法与 CMIA 法对 15 例 FK506 样本检测结果一致,相关性较好,经两组数据配对  $t$

检验,  $t=1.65$ , 说明两种检测方法所检测的结果差异无统计学意义。

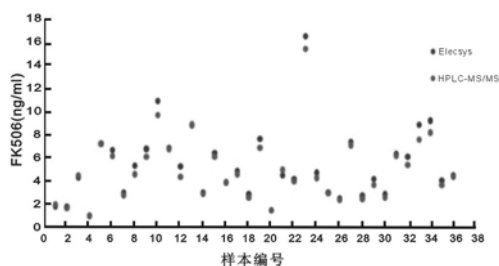


图3 HPLC-MS/MS法与 Elecsys 法检测结果

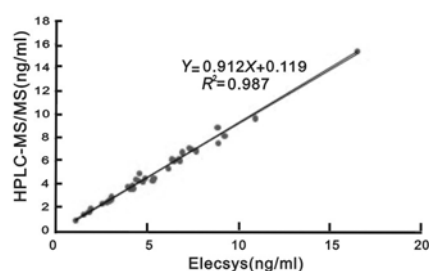


图4 HPLC-MS/MS法与 Elecsys 法相关性分析

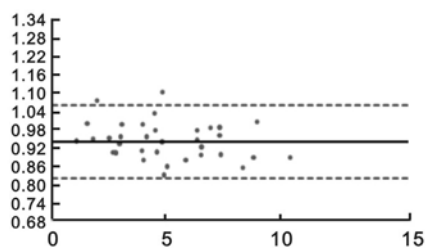


图5 HPLC-MS/MS法与 Elecsys 法一致性分析

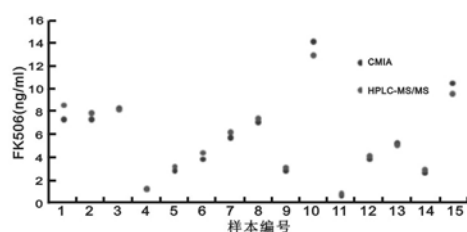


图6 HPLC-MS/MS法与 CMIA 法检测结果

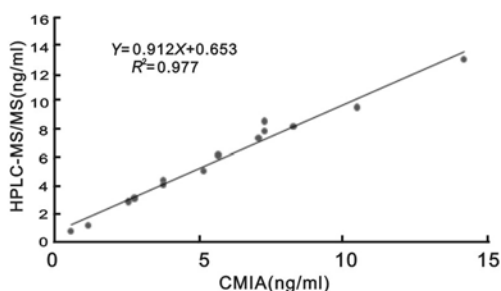


图7 HPLC-MS/MS法与 CMIA 法相关性分析

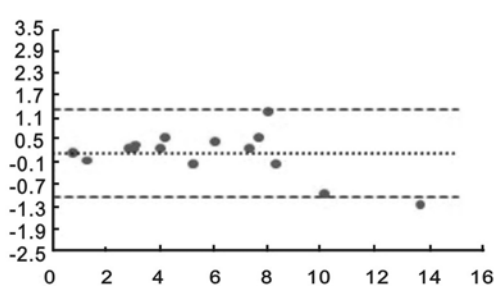


图8 HPLC-MS/MS法与 CMIA 法一致性分析

3 讨论 本方案建立的 HPLC-MS/MS 法具有很好的专属性,不会对 FK506 体内代谢产物产生交叉反应,使得测量值更准确可信。在血液中他克莫司大部分与红细胞结合,其余部分与血浆脂蛋白结合,所以测定血药浓度需用全血<sup>[1~4]</sup>。由于测定全血时干扰物质较多,本实验采用蛋白沉淀方法处理样品,超快速高效液相色谱分离,去除了全血中内源性物质的干扰,方法简便省时,方便临床诊断。

本文通过对 HPLC-MS/MS 法, Elecsys 法和 CMIA 法<sup>[5~9]</sup>所检测临床样本结果进行分析,可知这三种方法的检测结果一致,可以互换。Elecsys 采用 FK506 特异性生物素化抗体和钆标记的衍生物结合,经过与磁珠微粒竞争结合,通过复合体发光,来测量 FK506 浓度,交叉反应小,所测结果基本为原型药物浓度;CMIA 检测的 FK506 浓度包括原型药物浓度、体内代谢产物以及与其它药物交叉反应的产物等,由于 FK506 体内代谢产物少且与其它药物很少发生交叉反应,所以 CMIA 检测结果与 HPLC-MS/MS 法和 Elecsys 法检测结果差异无统计学意义;HPLC-MS/MS 法测定结果为

他克莫司原型药物浓度,能更准确的说明药物浓度-效疗-不良反应三者之间的关系,且具有分析时间短、样品处理快速、专属性强、准确度高、灵敏度高等优点,在国外,此项技术主要用于住院病人和多数门诊就诊病人的他克莫司血药浓度监测<sup>[10,11]</sup>。另外, Elecsys 法和 CMIA 法检测所需仪器专属性强且试剂成本高,同时其只适合于临床大样本的集中分析,而 HPLC-MS/MS 法所需试剂成本低,且适合于单个样本的实时分析,不受临床样本的数量和送检时间的限制,能更适合于临床样本的常规检测。

#### 参考文献:

- [1] Webb NJ, Roberts D, Preziosi R, et al. Fingerprick blood samples can be used to accurately measure tacrolimus levels by tandem mass spectrometry[J]. Pediatric Transplantation, 2005, 9(6): 729-733.
- [2] Wang S, Magill JE, Vicente FB. A fast and simple high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for simultaneous measurement of whole blood tacrolimus and sirolimus[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2005, 129(5):

- 661-665.
- [3] 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]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2005, 27(2):144-150.
- [4] Morris RG, Salm P, Taylor PJ, et al. Comparison of the reintroduced MEIA assay with HPLC-MS/MS for the determination of whole-blood sirolimus from transplant recipients [J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2006, 28(2):164-168.
- [5] 王磊, 周枫叶, 姜春菲, 等. HPLC-MS/MS法测定白血病患者血浆伊马替尼与达沙替尼浓度[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1):128-131.  
Wang L, Zhou FY, Jiang CF, et al. Determination of imatinib and dasatinib in leukemia patients plasma by HPLC-MS/MS [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(1):128-131.
- [6] 李霞, 刘小红, 杨乐. 不同年龄阶段癫痫患儿奥卡西平活性代谢产物血药浓度的临床价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(1):143-144, 148.  
LI X, Liu XH, Yang L. Clinical values of blood serum concentration of MHD in children with epilepsy of different ages [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(1):143-144, 148.
- [7] 胡森安, 艾红红, 严丽花, 等. 维生素D及日照量对单纯性肥胖儿童血清瘦素水平影响的研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(6):143-146.  
Hu SA, Ai HH, Yan LH, et al. Effect of vitamin D and sunlight on serum leptin levels in simple obese children [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(6):143-146.
- [8] 邓安彦, 蔡艳娟, 周守容, 等. ELISA法检测HBsAg (CMIA) 低值血清样本的结果分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(2):123-125.  
Deng AY, Cai YJ, Zhou SR, et al. Analysis of the results of ELISA by detecting low quantitative HBsAg (CMIA) in serums [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(2):123-125.
- [9] 刘立民, 李钰, 蒙雨明, 等. 化学发光微粒免疫分析技术检测输血四项的性能评估[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(2):107-110.  
Liu LM, Li Y, Meng YM, et al. Performance verification of chemiluminescent microparticle immunoassay for the four blood index [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(2):107-110.
- [10] Molinaro M, Regazzi MB, Pasquino S, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus during the early phase after heart transplantation [J]. *Transplantation Proceedings*, 2001, 33(3):2386-2389.
- [11] Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 41(5):542-551.
- 收稿日期: 2016-09-27  
修回日期: 2017-01-05
- 
- (上接 125 页)
- [14] 夏丽芳, 马锐, 黄一茜, 等. 健康人群糖化血红蛋白水平现状的调查[J]. *河北医药*, 2014, 36(9):1402-1403.  
Xia LF, Ma RL, Huang YQ, et al. Study on the status quo of glycosylated hemoglobin level in healthy people [J]. *Hebei Medicine Journal*, 2014, 36(9):1402-1403.
- [15] 施俊柱, 刘爱胜, 陈荣贵, 等. 深圳龙华新区人群全血糖化血红蛋白的情况研究分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(22):3033-3034.  
Shi JZ, Liu AS, Chen RG, et al. Analysis of whole blood glycosylated hemoglobin levels of people in Longhua New District of Shenzhen [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2013, 34(22):3033-3034.
- [16] 俞春芳, 葛军, 李静怡, 等. 糖化血红蛋白和空腹血糖用于早期筛查糖尿病的意义[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27(5):390-392.  
Yu CF, Ge J, Li JY, et al. Diagnostic value of HbA1c and fasting plasma glucose as early screening parameters for diabetes mellitus [J]. *Chin J Endocrinol Metab*, 2011, 27(5):390-392.
- [17] 王伟超, 张洁, 任巧华, 等. 糖化血红蛋白在老年人群诊断2型糖尿病标准的意义[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(5):1011-1014.  
Wang WC, Zhang J, Ren QH, et al. HbA1c in elderly people with type 2 diabetes diagnosis standard [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2013, 33(5):1011-1014.
- [18] 王群, 么伟, 安秀英, 等. 邢台市健康人群糖化血红蛋白参考区间的研究[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(22):2067-2068.  
Wang Q, Yao W, An XY, et al. Reference range of glycosylated hemoglobin in healthy population in Xingtai [J]. *Chinese General Practice*, 2009, 12(22):2067-2068.
- [19] 段顺元, 李毓琴, 刘玮. 永州市健康人群中年龄与糖化血红蛋白相关性的研究[J]. *中国社区医生: 医学专业*, 2012, 14(5):359.  
Duan SY, Li YQ, Liu W. Study on the correlation between age and glycosylated hemoglobin in healthy population of Yongzhou city [J]. *Chinese Community Doctors: Medical Science*, 2012, 14(5):359.
- 收稿日期: 2016-08-29  
修回日期: 2017-01-12