

HPLC-MS/MS 法检测 骨髓移植患者全血环孢素 A(CsA)浓度 及与 AM1 和 AM4N 代谢产物的相关性研究*

王磊¹, 孙文利¹, 刘瑞¹, 王红春¹, 刘红星^{1,2}

(1. 河北燕达陆道培医院, 河北三河 065201; 2. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176)

摘要:目的 探索环孢素 A(CsA)在骨髓移植患者代谢产物 AM1 和 AM4N 与母药 CsA 的关系,为 CsA 在临床合理使用提供支持。方法 用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)对骨髓移植患者个体内和个体间的全血样本进行 CsA, AM1 和 AM4N 血药浓度检测。结果 CsA 个体内代谢:AM1 与 CsA 相关性不好($r=0.79$), AM4N 与 CsA 和 AM1 相关性均较好($r>0.9$),代谢产物 AM1 和 AM4N 含量及比率各异;CsA 个体间代谢:个体间 CsA 和 AM1 的相关性较差($r=0.59$), AM4N 和 CsA 及 AM1 在个体间不存在相关性($r<0.5$),代谢产物 AM1 和 AM4N 含量及比率各异。结论 CsA 代谢存在个体差异;HPLC-MS/MS 法可用于骨髓移植患者 CsA 血药浓度检测。

关键字:环孢素;高效液相色谱-串联质谱法;血药浓度;代谢产物

中图分类号:R617;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)02-052-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.014

Correlation of the Concentration of Whole Blood Cyclosporine A(CsA) Detected by HPLC-MS/MS Method and Metabolites of AM1 and AM4N in Bone Marrow Transplant Patients

WANG Lei¹, SUN Wen-li¹, LIU Rui¹, WANG Hong-chun¹, LIU Hong-xing^{1,2}

(1. Hebei Yanda Ludaopei Hospital, Hebei Sanhe 065201, China;

2. Beijing Ludaopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective To explore the relationship among AM1, AM4N and CsA in bone marrow transplant patients, and provide support for the rational use of CsA in clinical practice. **Methods** HPLC-MS/MS method was used to detect the concentrations of CsA, AM1 and AM4N in whole blood samples (both within and between individuals) of bone marrow transplant patients. **Results** Internal metabolism of CsA: the correlation between AM1 and CsA was not good ($r=0.79$), the correlation between AM4N and CsA and AM1 was good ($r>0.9$), and the content and ratio of metabolites AM1 and AM4N were different. Interindividual metabolism of CsA: there was poor correlation between CsA and AM1 among individuals ($r=0.59$), and there was no correlation between AM4N, CsA and AM1 among individuals ($r<0.5$). The content and ratio of metabolites AM1 and AM4N were different. **Conclusion** There were individual differences in CsA metabolism. HPLC-MS/MS method can be used to detect the blood concentration of CsA in patients with bone marrow transplantation.

Keyword: CsA; HPLC-MS/MS; blood concentration; metabolite.

环孢素 A(cyclosporine A, CsA)为多肽结构,主要作为免疫抑制剂使用,用于骨髓移植患者的抗排异和移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的治疗和预防^[1-2]。由于 CsA 治疗窗窄,毒性反应大,易导致移植失败,进行 CsA 血药浓度监测就显得尤为重要。目前监测 CsA 血药浓度的方法较多^[3-10],高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS 法)^[6-10]作为 CsA 血药浓度监测的金标准,在欧美国家临床实验室被广泛使用,较为著名的有 Mayo clinic, Lab Test Directory,

Quest Diagnostics 和西雅图移植中心。但由于其仪器昂贵,自动化程度低,需要专业的人员操作,故在国内临床实验室应用较少。CsA 在患者体内有 30 多种代谢产物,代谢产物的量和活性各异,目前尚无相应的体内实验证明其差异^[1-10]。其体内代谢产物研究最多的有 5 种,分别为 AM1, AM1c, AM4N, AM9 和 AM19,含量最多的为 AM1,含量最少的为 AM4N,两者在患者个体内代谢情况目前尚无详细数据可查,对其研究就显得尤为必要。本文就 CsA 在骨髓移植患者体内代谢进行研究,

* 作者简介:王磊(1984—),男,硕士,助理研究员,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,医学硕士,副研究员,主要从事检验医学研究工作。

采用 HPLC-MS/MS 法对移植患者各时间点全血样本进行 CsA 和 AM1 及 AM4N 血药浓度检测, 确定其相应关系, 为研究 CsA 个体内代谢差异提供理论依据; 同时对不同移植患者全血样本进行 CsA 和 AM1 及 AM4N 血药浓度检测, 确定其相应关系, 为研究 CsA 个体间代谢差异提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 CsA 个体内代谢: 选择 2018 年 6 月 21 日前来我科做 CsA 药物代谢研究的骨髓移植患者黄某, 男, 年龄 15 岁, 诊断为急性淋巴细胞白血病 (ALL), 患者每天早 8 点晚 20 点服药, 分别于服药后 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 和 12 h 抽取静脉血, 共收集其 18 份全血样本用于 CsA 血药浓度测定, 用 HPLC-MS/MS 方法对其全血样本进行 CsA 及 AM1 和 AM4N 浓度检测。

1.1.2 CsA 个体间代谢: 随机选择 2018 年 6 月 21 日前来我科做 CsA 药物代谢研究的骨髓移植患者 20 例全血样本, 采用 HPLC-MS/MS 方法对其全血样本进行 CsA 及 AM1 和 AM4N 浓度检测。

1.2 试剂与仪器 试剂与仪器详见本实验室前期

建立的同时测定骨髓移植患者全血 CsA 和 AM1^[17]; AM4N (HPLC Grade, Toronto Research)。

1.3 方法 本实验室前期已建立同时测定骨髓移植患者全血中 CsA 和 AM1 的方法^[8], 同时 AM4N 的质谱条件为 AM4N: m/z 1 206.1 ~ 1 188.9, DP: 70V, CE: 19V; 其它质谱条件和色谱条件与 CsA 和 AM1 相同。

1.4 统计学分析 利用 SPP 16.0 分别对个体内与个体间全血 CsA, AM1 和 AM4N 进行相关性分析, 同时利用雷达图进行各自比率分析。

2 结果

2.1 色谱质谱行为 在以上色谱质谱条件下, 测得 AM4N 二级碎片离子质谱图, 见图 1。CsA, AM1, AM4N, CsD 质谱色谱图, 见图 2。AM4N 的保留时间为 3.57 min, 以 CsD 为内标, AM4N 峰面积与 CsD 峰面积比值(Y)对 AM4N 浓度(X)进行线性回归, 得 AM4N 回归方程: $Y = 0.00189X - 0.00965$ ($r = 0.9937$), 经方法学考察线性范围、回收率、精密性、基质效应及稳定性均符合检测要求, 最低定量限为 1.0 ng/ml, 可用于定量分析。各峰型良好, 无杂质峰干扰。

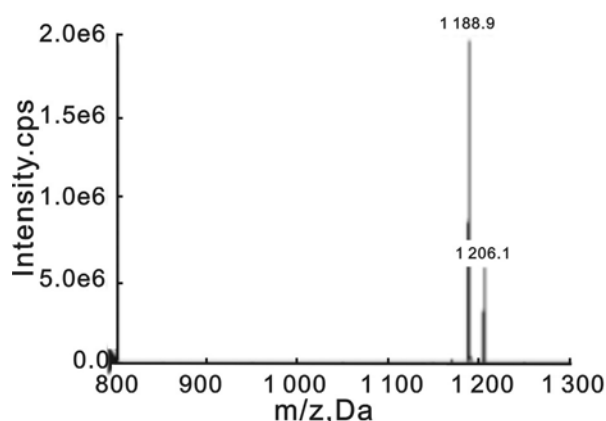


图1 AM4N的二级扫描碎片离子图

2.2 HPLC-MS/MS 法同时检测个体内 CsA, AM1 和 AM4N 血药浓度结果 该骨髓移植患者不同时间点的 18 例全血样本 CsA, AM1 和 AM4N 血药浓度检测结果, 见图 3。由图 3 可知, 该骨髓移植患者 CsA 代谢产物 AM1 在不同时间点含量均较大, 而代谢产物 AM4N 在不同时间点含量均较小, 这和以往研究结果一致^[1-8]。对不同时间点的 CsA, AM1 和 AM4N 比率结果作雷达图进行各自比率关系分析见图 4。可见, 该患者一天内不同时间点 AM1/CsA 的比率大, 同时波动也较

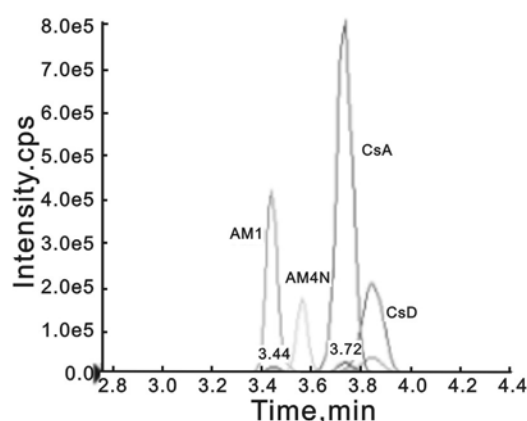


图2 CsA, AM1, AM4N 及 CsD 质谱色谱图

大(0.28~1.34), 而 AM4N/CsA 和 AM4N/AM1 相应的比率关系较好, 比率范围分别为 0.04~0.14 和 0.06~0.23。由图 4 可知, 也可进一步说明 AM1 在 CsA 代谢产物中占比较大, 而 AM4N 在 CsA 代谢产物中占比较小。对三者进行相关性分析(见图 5)可知 CsA 和 AM1 的相关性较差($r = 0.79$), 与本实验室前期研究结果一致^[7-8], 而 AM4N 和 CsA 及 AM1 在该患者体内一定程度上存在相关性($r > 0.9$)。

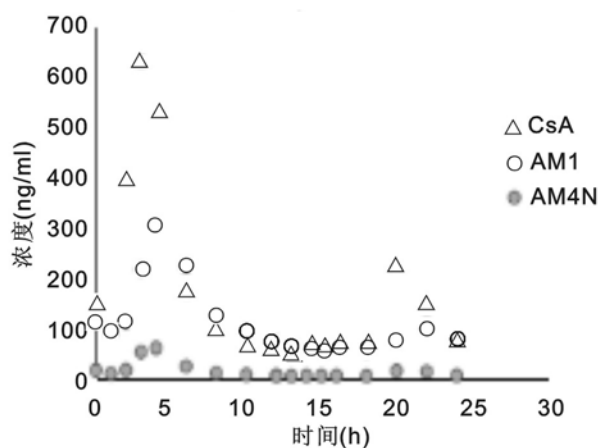


图3 HPLC-MS/MS法检测CsA,AM1和AM4N血药浓度结果

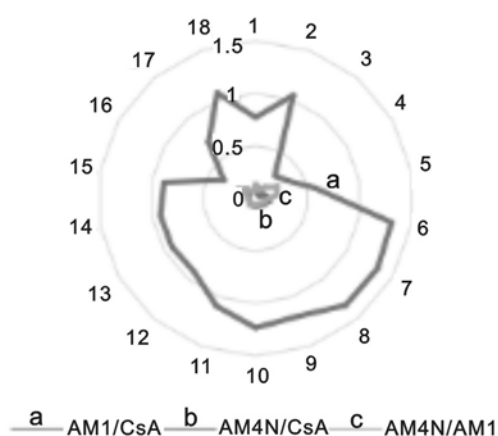


图4 CsA,AM1和AM4N比率

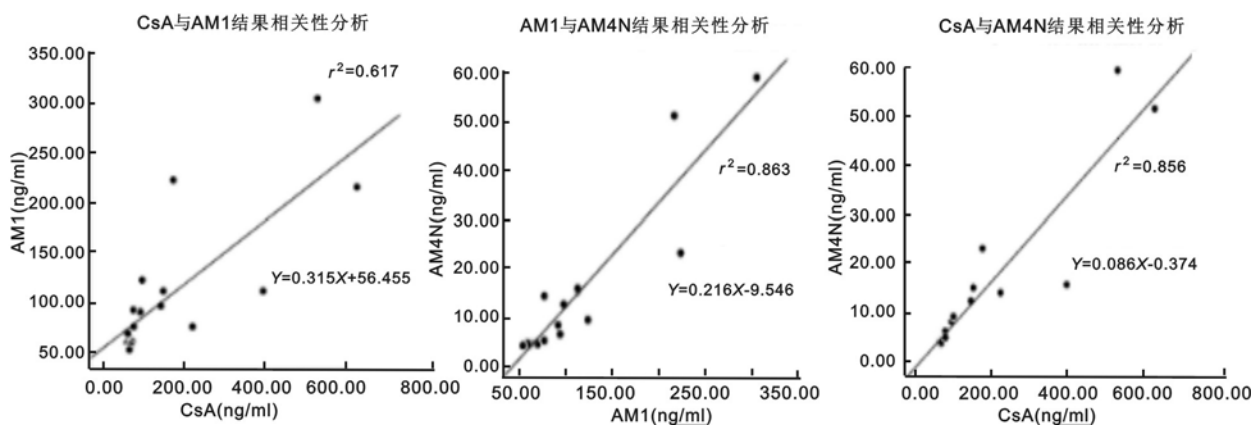


图5 相关性分析

2.3 随机选择的骨髓移植患者20例全血样本CsA,AM1和AM4N血药浓度检测结果见图6。由图6可知,随机选择的20例骨髓移植患者样本CsA代谢产物AM1在不同个体检测值波动较大(3~146),而代谢产物AM4N在不同个体检测值波动较小。对不同个体间的CsA,AM1和AM4N比率结果作雷达图进行各自比率关系分析见图7。可见,不同个体间AM1/CsA的比率波动也较大

(0.05~1.20),而AM4N/CsA和AM4N/AM1相应的比率关系较好,比率范围分别为0.009~0.05和0.01~0.39。由图7可知,也可进一步说明AM1在CsA代谢产物中占比较大,而AM4N在CsA代谢产物中占比较小。对三者进行相关性分析(见图8)可知,个体间CsA和AM1的相关性较差($r=0.59$),AM4N和CsA及AM1在个体间不存在相关性($r<0.5$)。

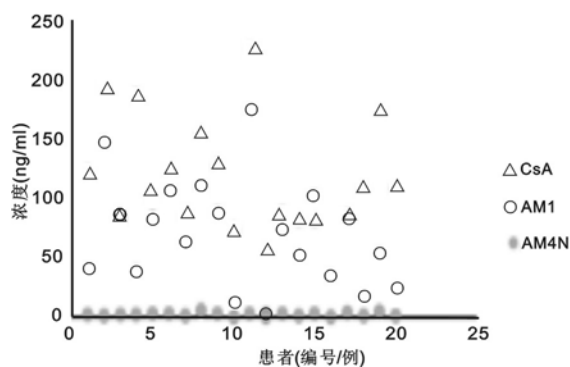


图6 HPLC-MS/MS法检测不同个体间CsA,AM1和AM4N血药浓度结果

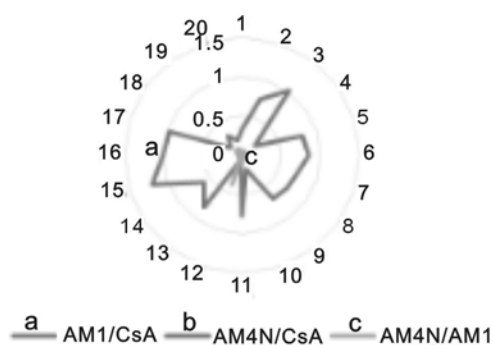


图7 不同个体间CsA,AM1和AM4N比率

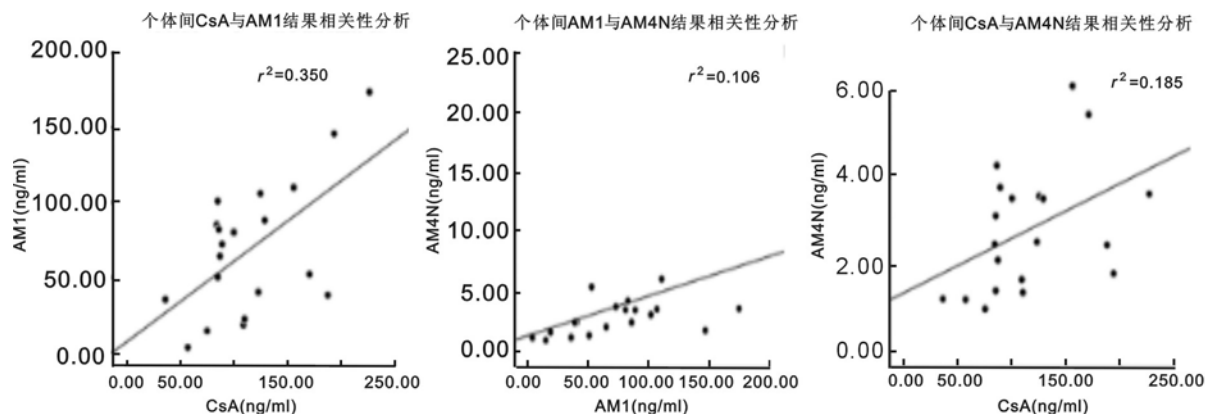


图8 个体间结果相关性分析

3 讨论 本文在王磊等^[8]人的“HPLC-MS/MS法在骨髓移植患者全血 CsA 及 AM1 浓度测定中的应用”一文的基础上,增加了 CsA 的代谢产物 AM4N 的检测,明确了 CsA 在骨髓移植患者个体内不同时间点的代谢差异,进一步确定了 AM1 是 CsA 在骨髓移植患者体内代谢的最主要代谢产物,其占比高,含量大,且与 CsA 浓度的相关性较差。同时发现 AM4N 在 CsA 代谢产物中占比小,含量低,但其与 CsA 和 AM1 的相关性却较好。同时,通过对个体间的 CsA, AM1 和 AM4N 血药浓度检测,也进一步证实了 AM1 是 CsA 的主要代谢产物,其含量大,但是与 CsA 的比例关系差别较大,同时有文献报道 AM1 又具有生物活性^[16-17],这就解释了为什么 CsA 在移植患者中有效浓度会有差异,AM4N 在个体间的代谢比率有差异,但其总含量小,生物活性也低,对 CsA 有效血药浓度范围的影响较小。总之,不论 CsA 在个体内还是个体间代谢,其主要代谢产物 AM1 含量都较高,且差异较大,严重影响 CsA 有效血药浓度范围,而 AM4N 含量都较小,不影响 CsA 有效血药浓度范围。本文通过对骨髓移植患者个体内和个体间的 CsA 和 AM1 及 AM4N 血药浓度的检测,说明了 CsA 在骨髓移植患者体内代谢存在个体差异,同时也要求检测 CsA 血药浓度的检测方法必须特异性强^[9-10],才能避免 CsA 代谢产物的干扰。

参考文献:

- [1] FURUKAWA T, KURASAKI-HIDA T, MASUKO M, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of cyclosporine A (CsA) to find the best single time point for the monitoring and adjusting of CsA dose using twice-daily 3-h intravenous infusions in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. International Journal of Hematology, 2010, 92 (1):144-151.
- [2] 朱愿超,梁良,赵明,等.再生障碍性贫血患者环孢素 A 血药浓度监测的回顾性分析[J].临床药物治疗杂志,2015,13(5):20-24.

- ZHU Yuanchao, LIANG Liang, ZHAO Ming, et al. Retrospective analysis of blood concentration monitoring of cyclosporine A in patients with aplastic anemia [J]. Journal of Clinical Pharmacotherapy, 2015, 13 (5):20-24.
- [3] 王翔岩,钟旭丽,宋泽亮,等.儿童造血干细胞移植后环孢素 A 血药浓度监测[J].临床药物治疗杂志,2015,13(6):21-24.
- WANG Xiangyan, ZHONG Xuli, SONG Zeliang, et al. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine A in children hematopoietic stem cell transplantation [J]. Medication Journal Clinical, 2015, 13(6):21-24.
- [4] 陈英,叶冬梅,蓝梅,等.急性抗宿主病细胞因子基因多态性与环孢素 A 的关联性研究[Z].广西壮族自治区人民医院,2017.
- CHEN Ying, YE Dongmei, LAN Mei, et al. Association between cytokine gene polymorphism and cyclosporine A in acute versus host disease [Z]. Guangxi Zhuang Autonomous Region People's Hospital, 2017.
- [5] 王磊,孙文利,李培余,等.环孢素 A 血药浓度检测方法比较分析[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2017,11(3):417-421.
- WANG Lei, SUN Wenli, LI Peiyu, et al. Comparative analysis of cyclosporine blood concentration detection methods [J/CD]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2017, 11(3):417-421.
- [6] 沈陈军,陈新贵,王勇.荧光偏振免疫分析法与高效液相色谱法检测环孢素 A 血药浓度的倒方差法 Meta 分析[J].安徽医药,2018,22(7):1256-1262.
- SHEN Chenjun, CHEN Xingui, WANG Yong. Comparison between FPIA and HPLC method in monitoring cyclosporin A blood concentration based on pearson correlation coefficient: a meta analysis [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2008, 22 (7): 1256-1262.
- [7] 孙搏,郭彦琨,高君伟,等.CYP3A 基因多态性与肾移植术后不同时期环孢素浓度剂量个体差异的相关性研究[J].中国药师,2017,20(1):91-93.
- SUN Bo, GUO Yankun, GAO Junwei, et al. Effect CYP3A polymorphism on cyclosporine individual dosage and blood concentration in renal transplant recipients [J]. China Pharmacist, (下转 129 页)

(上接 55 页)2017,20(1):91-93.

- [8] 王磊,刘红星,孙文利. HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者全血 CSA 及 AM1 浓度测定中的应用[J]. 重庆医学,2017,46(23):3234-3237.

WANG Lei,LIU Hongxing,SUN Wenli. The application of HPLC-MS/MS method in the determination of whole blood concentration of concentration of scyclosporine A and AM1 in bone marrow transplant patient [J]. Chongqing Medical Journal,2017,46(23):3234-3237.

- [9] 赵驻军,李亚,张翠欣. TDx 检测环孢素 A 血药浓度时探针冲洗步骤的简化[J]. 现代检验医学杂志,2005,20(4):39.

ZHAO Zhujun,LI Ya,ZHANG Cuixin. Probe flush-

ing procedure for TDx detection of cyclosporine A blood concentration[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2005,20(4):39.

- [10] 王磊,孙文利,李培余,等. Elecsys 与 HPLC-MS/MS 检测骨髓移植患者环孢素 A 血药浓度的相关性及其应用意义[J]. 中华临床实验室管理电子杂志,2018,6(2):99-103.

WANG Lei,SUN Wenli,LI Peiyu,et al. Correlation of Elecsys and HPLC-MS/MS method in the determination of blood cyclosporine A concentration in bone marrow transplant patients and its application [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management,2018,6(2):99-103.

收稿日期:2019-02-01

修回日期:2019-02-19