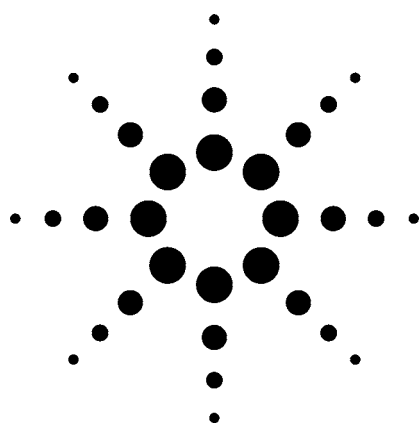




使用液相色谱/三重串联四极杆质谱联用系统 对血液中免疫抑制剂进行快速定量测定 应用

临床毒理学

作者

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
Englewood, CO
USA

Linda Côté
Agilent Technologies, Inc.
Montreal, Quebec
CA

Jeffrey Keever
Agilent Technologies, Inc.
Cary, NC
USA

Uwe Christians and Jamie Bendrick-Pearl
Clinical Research & Development
Department of Anesthesiology
University of Colorado Health Sciences Center
Denver, CO
USA

摘要

本文建立了使用 Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪(QQQ) 对人血中存在的免疫抑制剂进行快速确认、灵敏的分析方法。三重串联四极杆质谱仪具有良好的定量灵敏度，且除了简单的蛋白质沉淀步骤外无需进行样品处理。用 3.5 - μm 的安捷伦氟

基柱，在流动相流速为 450 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下，所有三种被测化合物（他克莫司、环孢素 A 和西罗莫司）的色谱洗脱保留都小于 3 分钟。使用含 0.1 % 醋酸的水和乙腈为流动相，获得了分析西罗莫司、他克莫司和依维莫司（内标）的加钠离子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 以及环孢素 A 的去质子峰 $[\text{M}-\text{H}]$ 的最佳灵敏度。获得了低至 800 fg 进样量的检出限 $[\text{S}/\text{N}=3:1]$ 。

引言

免疫抑制剂如西罗莫司和神经钙蛋白抑制剂环孢素和他克莫司是主要用于器官移植治疗的药物。这些药物用于抑制病人的免疫系统，以降低器官移植后发生排斥反应的风险。由于这些药物的临床用药浓度范围窄，且有潜在的毒性，因此需要对这些化合物在血液中的浓度进行准确的药物监测。

高通量分析中为了达到所要求的定量限（他克莫司和西罗莫司 $< 1 \text{ ng/mL}$ ），一般的分析方法是在固相萃取小柱上进行大体积进样 ($> 0.1 \text{ g}$)，即进行在线 SPE，进样过程需要用一个液相泵进行样品加载、净化和捕集，然后接第二个泵洗脱捕集到的化合物至分析柱中进行色谱分离[1]。在这样的配置下，分析处理时间可能少至 2.5 分钟[2, 3]。然而，当比较不同系统配

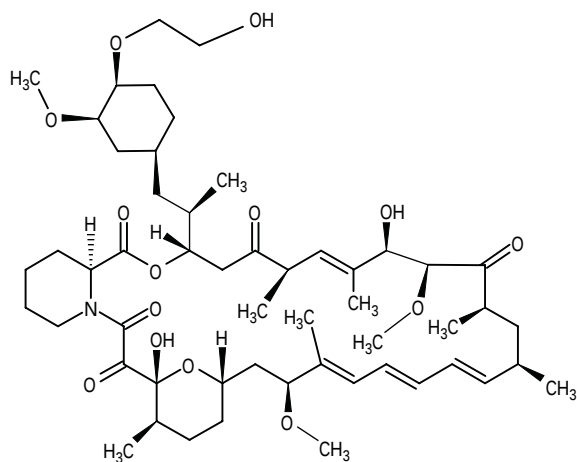


Agilent Technologies

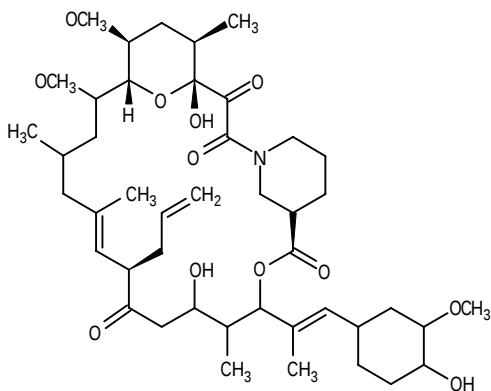
置的性能时，尤其考虑到灵敏度，实际的柱上进样量是一个重要的因素。该因素帮助分析者决定用于分析血液样品的量，以及样品萃取过程应进行到何种程度。

例如，作者(Christians)取全血中经过简单蛋白质沉淀步骤的 100 μL 上清液进样，其中含有 1 ng/mL 的免疫抑制剂化合物，相当于柱上进样量 20 pg。本文中，取 40 μL 上清液注入不包含 SPE 的液相色谱系统。结果是，本文中测试所需的样品量少于普通分析方法测试需要的样品量，而且省略了使用 SPE 进行的其它的样品处理步骤。

待测化合物



内标：
依维莫司, $\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{NO}_{14}$
[M + Na]⁺ = 980.6



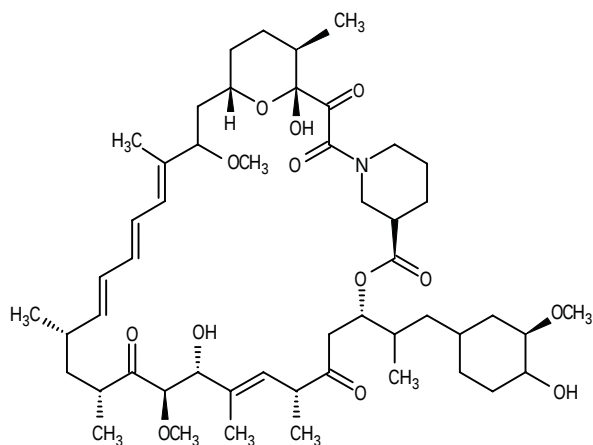
他克莫司, $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}$
[M + Na]⁺ = 826.5

实验部分

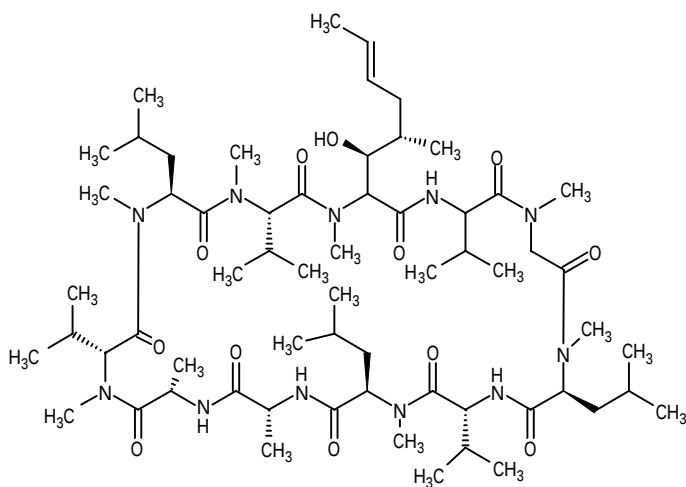
样品制备

本研究中的待测化合物包括他克莫司、西罗莫司和环孢素 A，其结构式如下所示。

免疫抑制剂分别加入 200 μL 人全血中。加入 800 μL 0.2 M ZnSO_4 /甲醇(30:70 v/v)混合液开始萃取。离心后，将约 800 μL 上清液转移至样品瓶中，然后进行 LC/QQQ 分析。内标依维莫司的浓度为 100 ng/mL。



西罗莫司, $\text{C}_{61}\text{N}_7\text{NO}_{13}$
[M + Na]⁺ = 936.5



环孢素 A, $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$
[M - H]⁻ = 1200.8

LC/MS/MS 仪器

本研究中使用的 LC/MS/MS 系统包括安捷伦 1200 系列真空脱气机，二元泵，多孔板自动进样器，柱温箱，Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪，和电喷雾离子源(ESI)。系统控制和数据分析由安捷伦 MassHunter QQQ Control Console 和定性定量数据分析软件程序承担。LC 和 MS 条件详见 LC/MS 方法详细说明。

本方法的目的在于对血液中免疫抑制剂进行快速灵敏的定量分析。在保持良好的色谱分离度和峰对称性的同时，对分析速度、不同的溶剂、流速和色谱柱参数进行了优化。结果表明，一个简单的包含水、乙腈和醋酸的溶剂体系以 450 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速在 3.5- μm 的氰基柱上进行等度洗脱，能够有效地分离这些化合物，与其它 LC/MS 方法相比，该方法很有竞争力。该色谱条件与 P. Hatsis 和 D. A. Volmer 的早期工作一致，减少了不同被分析物之间产生的离子抑制几率。[4]

在方法开发过程中还比较了不同 LC 溶剂条件下质子化分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、去质子分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 和加钠分子离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的多反应监测(MRM)的信号强度。在这些化合物的洗脱过程中，西罗莫司、他克莫司和依维莫司的加钠峰能产生最强的响应，即 2.3 分钟内采用正离子模式，化合物环孢素 A，其去质子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 有最佳响应，因此在环孢素 A 的分析时 QQQ 转为负离子模式。

LC/MS 方法详细说明

LC Conditions

Agilent 1200 系列二元泵 SL，多孔板自动进样器，柱温箱，针座毛细管和进样阀之间 0.5 μm 的在线过滤器。

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB-CN,
2.1 x 150 mm, 3.5 μm
(部件号 960967-905)
保护柱: Agilent ZORBAX XDB-CN,
2.1 x 12.5 mm, 5 μm
(部件号 821125-935)
柱温: 50 $^{\circ}\text{C}$
流动相: A = 含 0.1 % 醋酸的水溶液
B = 含 0.1 % 醋酸的乙腈溶液(ACN)

流动相中的钠盐量在实验室间可能存在差异。为增加被分析物加钠离子形成的可能性，可以添加多达 50 μM 醋酸钠。

流速: 0.45 mL/min
等度: 0–3 min @ 52% B
100% B, 3.1–4.0 min
停止时间: 3.0 min
后运行时间: 1.0 min
进样体积: 40 μL

必须注意的是后运行时间 1 分钟是用 100 % 流动相 B 清洗色谱柱。然而，Hatsis 和 Volmer 在文献 4 中指出，每 50 次进样仅需洗柱 1 次。

MS 条件条件

模式: Agilent G1948A ESI 正离子模式
雾化器: 40 psig
干燥气流速: 10 L/min
干燥气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$
 V_{cap} : 4,000 V
Q1 分辨率: 2.5 amu
Q2 分辨率: 0.7 amu
MRM: 多反应监测(MRM): 他克莫司、西罗莫司和环孢素 A 的 transition 条件如表 1 所示，包括碰撞诱导解离电压(Frag)、碰撞能量(CE)和驻留时间(Dwell)。

表 1. MRM Transition 的数据采集参数

化合物	母离子	子离子 (m/z)	碰撞电压 (V)	碰撞能量 (V)	驻留时间 (msec)
区段 1 (0–2.25 min)					
他克莫司	826.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	616.2	200	40	150
西罗莫司	936.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	409.2	360	60	150
依维莫司 (内标)	980.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	389.4	360	60	150
区段 2 (2.25–3 min)					
环孢素 A	1200.7 $[\text{M} - \text{H}]^-$	1088.6	260	30	250

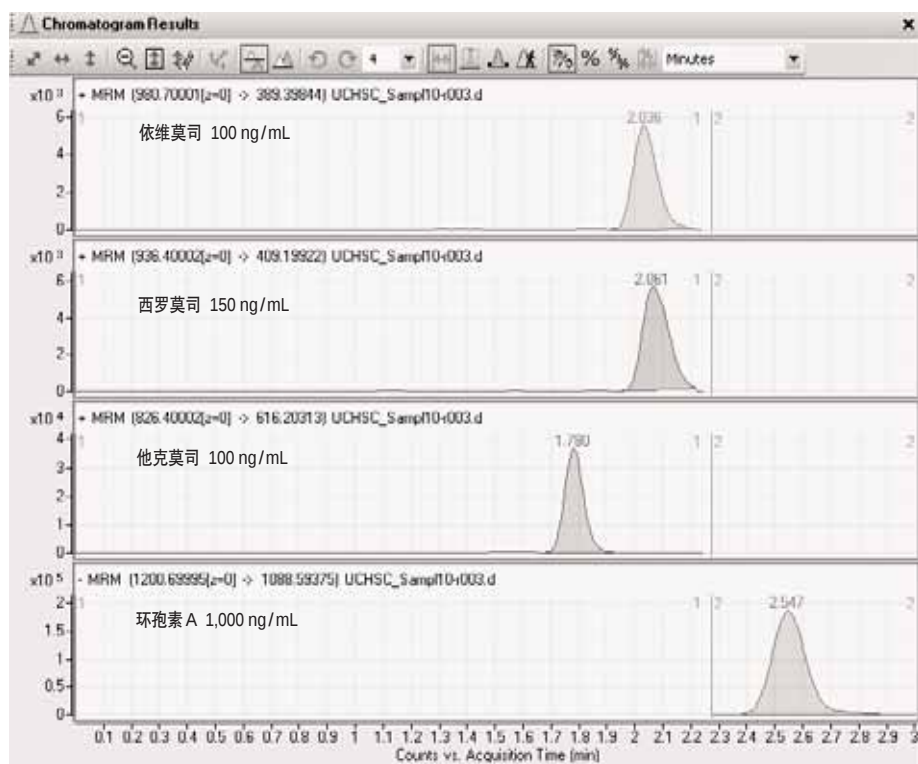


图 1. 最高浓度的四种免疫抑制剂化合物的色谱图。注意正离子模式(0-2.25 min)和负离子模式(2.25-3 min)之间的区段划分

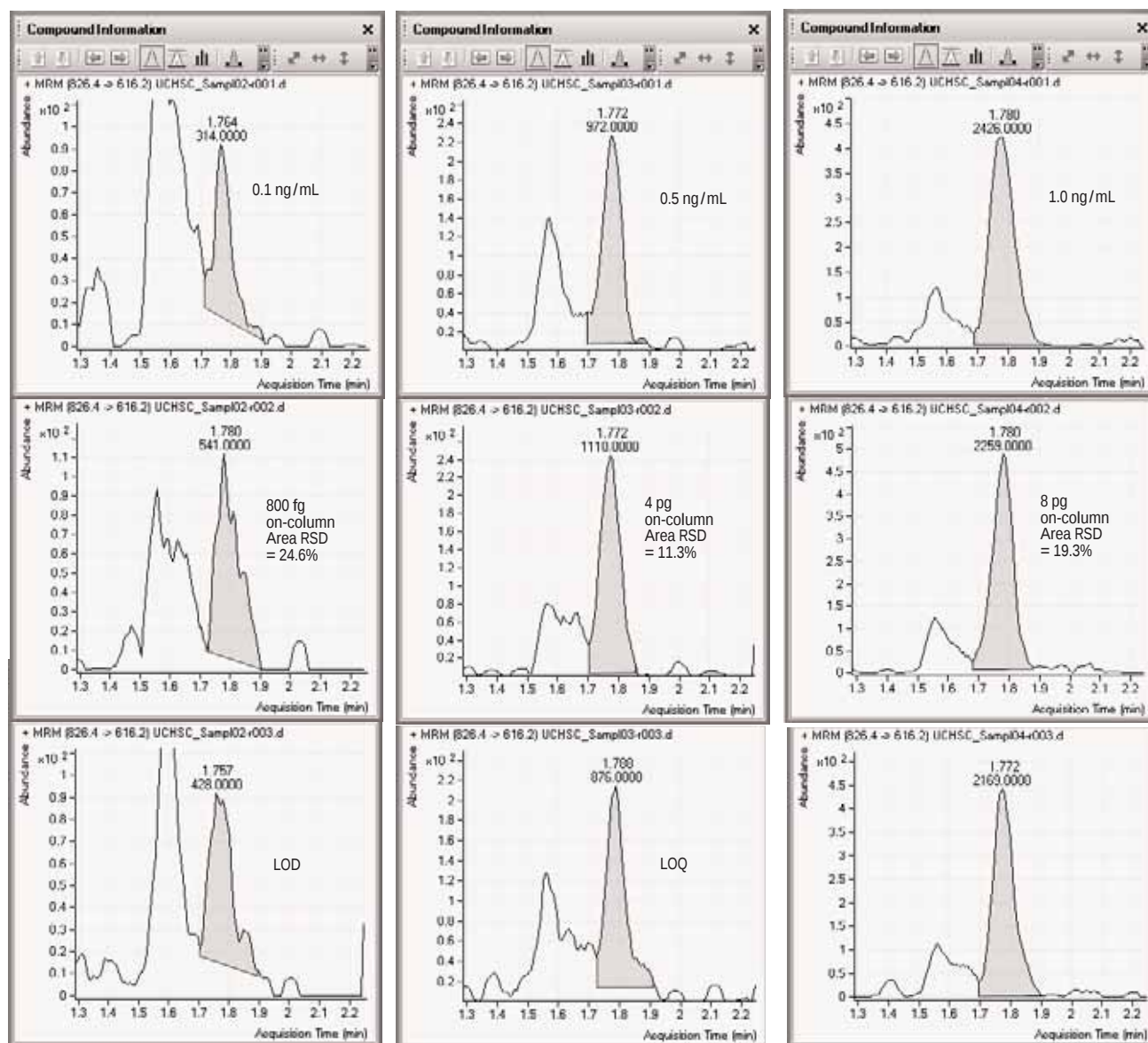


图2. 他克莫司的三个最低浓度水平的积分峰（三次进样）

结果与讨论

本文中，免疫抑制剂剂量测定的用药范围分别是他克莫司和西罗莫司均为 1~50 ng/mL、环孢素 A 为 10~1,000 ng/mL。最高浓度的四种化合物色谱图如图 1 所示。定量限定义为三次以上进样时，峰面积的相对标准偏差的百分数(% RSD)在浓度水平的 20 % 以内的浓度。他克莫司的定量限结果如图 2 所示，包括了三个最低浓度的三次进样情况。测得定量限(LOQ)为 0.5 ng/mL，基于图 2 中明显存在的色谱峰和图 3 中积分面积的线性，测得的检出限(LOD)为 0.1 ng/mL。如图 3 所示他克莫司的线性范围跨越了三个数量级，其相关系数 $R^2 > 0.997$ 。注意他克莫司的保留时间仅为 1.8 分钟。

对西罗莫司和环孢素 A 的分析如图 4 至 7 所示。线性范围跨越三个数量级的极好的线性是值得注意的。此外，与他克莫司一样，曲线拟合参数忽略原点，并且不加权同样适用于西罗莫司，得到的相关系数 $R^2 > 0.999$ 。对于环孢素 A 的线性，由于按强制包括原点计算，其相关系数为 $R^2 > 0.997$ 。

西罗莫司和环孢素 A 的保留时间分别为 2.0 和 2.5 分钟。西罗莫司的检出限为 0.1 ng/mL，定量限为 0.5 ng/mL。此外，虽然最低浓度的色谱峰已经明显在痕量水平，但它们的峰面积仍能得到良好的积分。

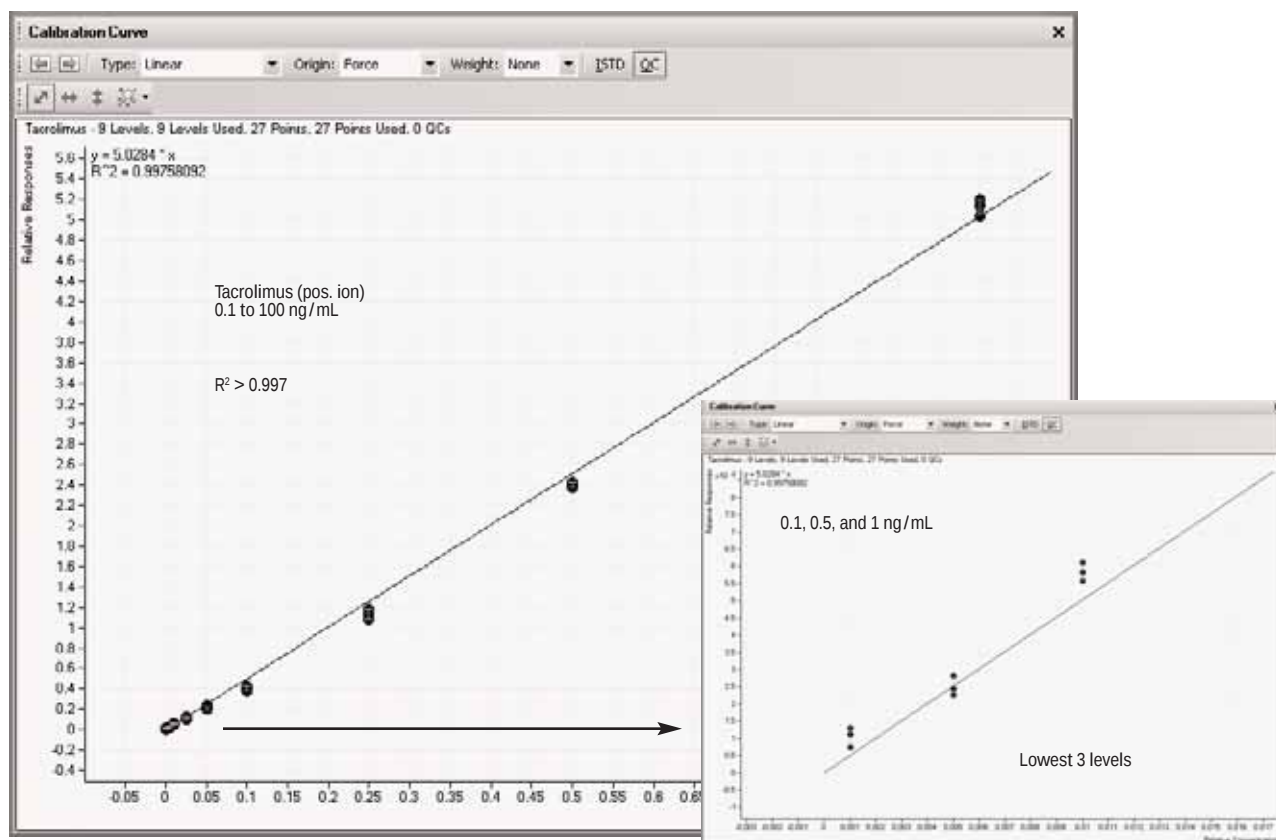


图3. 他克莫司跨越3个数量级的线性。放大的三个最低浓度水平的区域

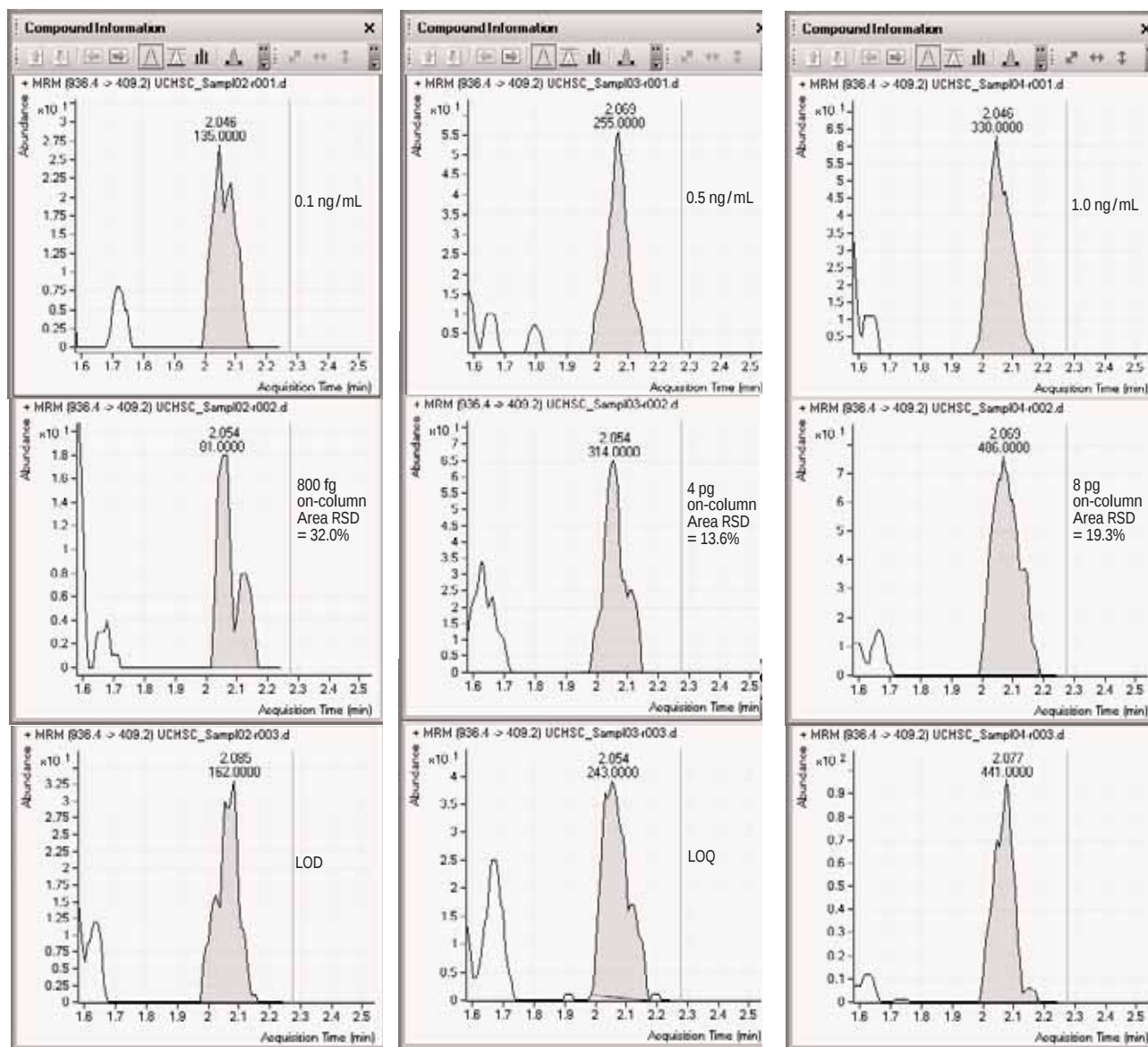


图4. 西罗莫司的三个最低浓度水平的积分峰（三次重复进样）

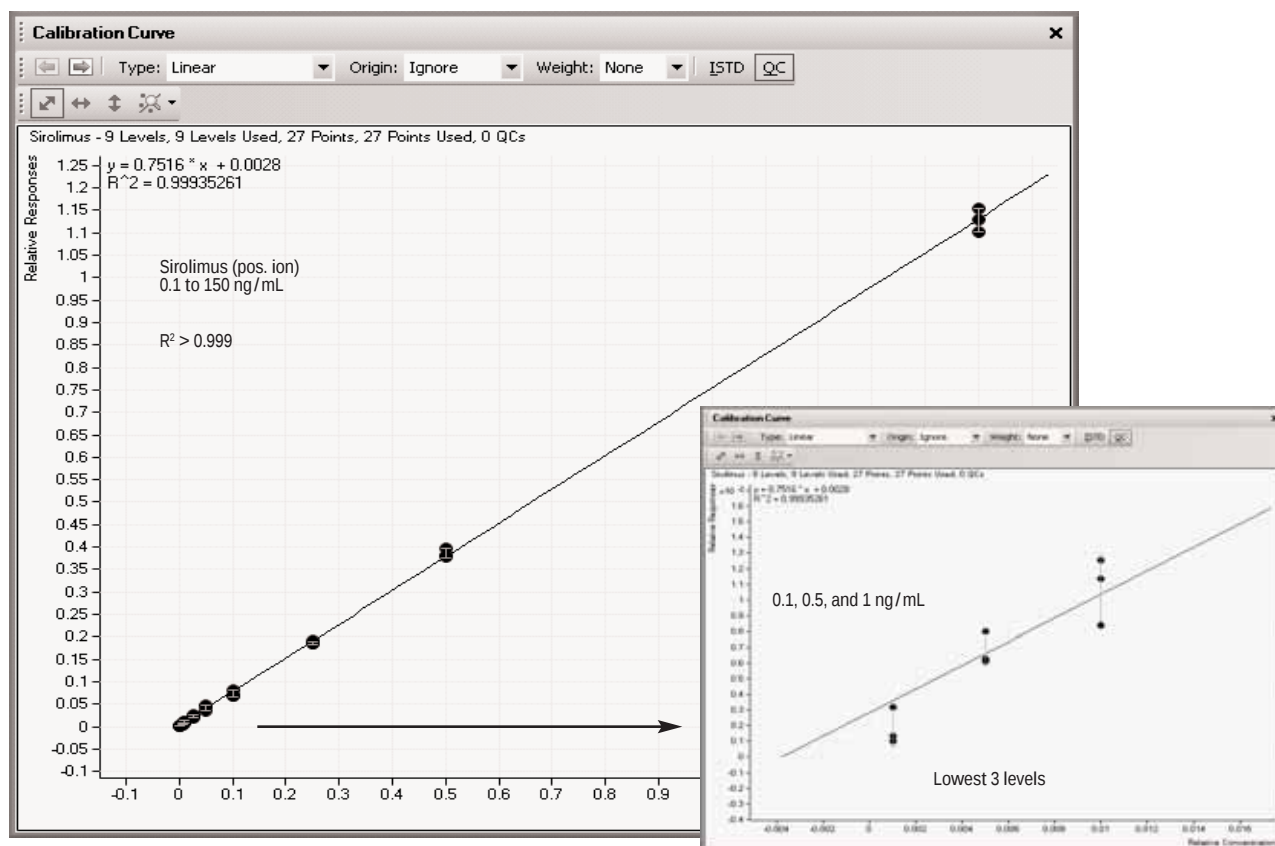


图5. 西罗莫司跨越3个数量级的线性。发达的三个最低浓度水平的区域

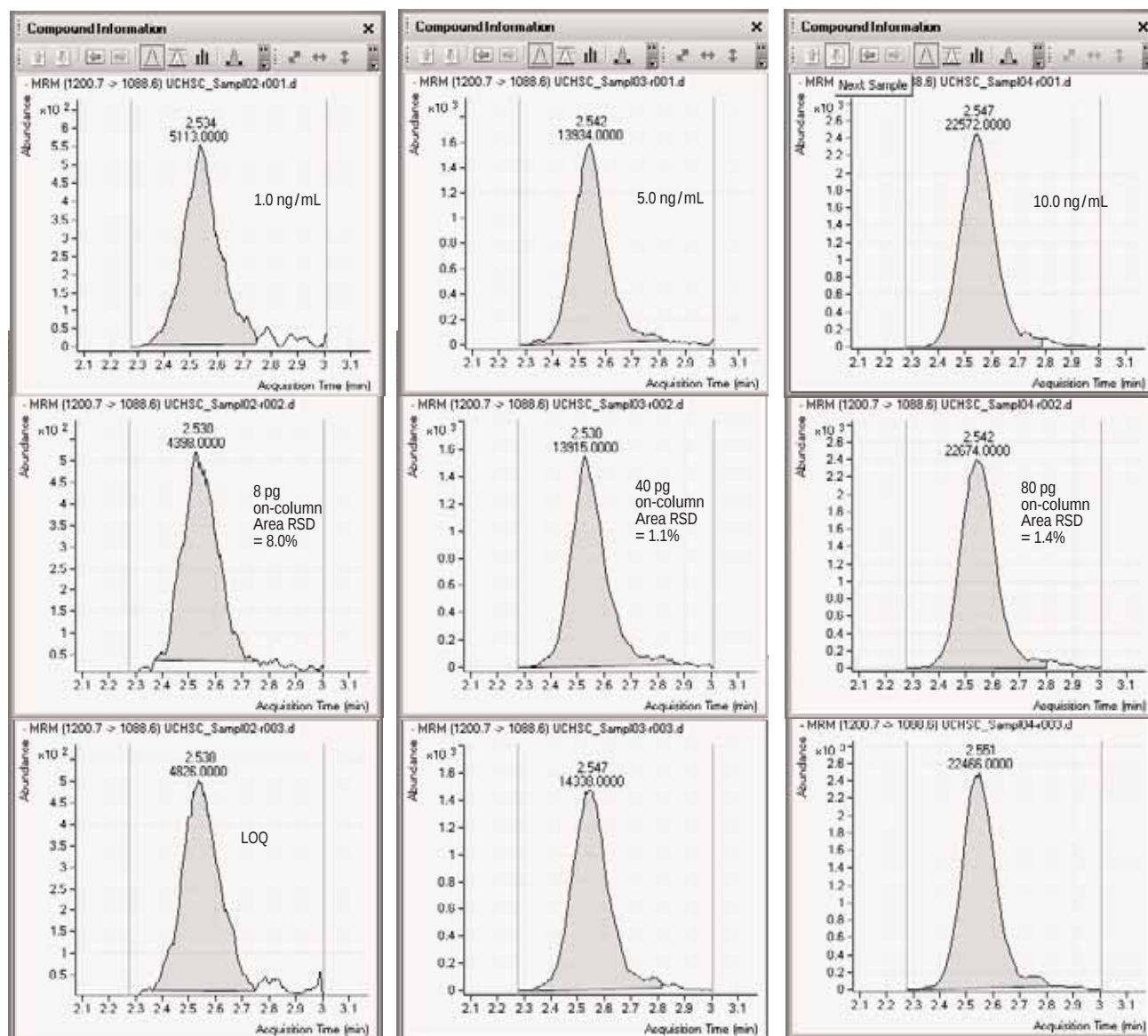


图6. 环孢素 A 的三个最低浓度水平的积分峰（三次重复进样）

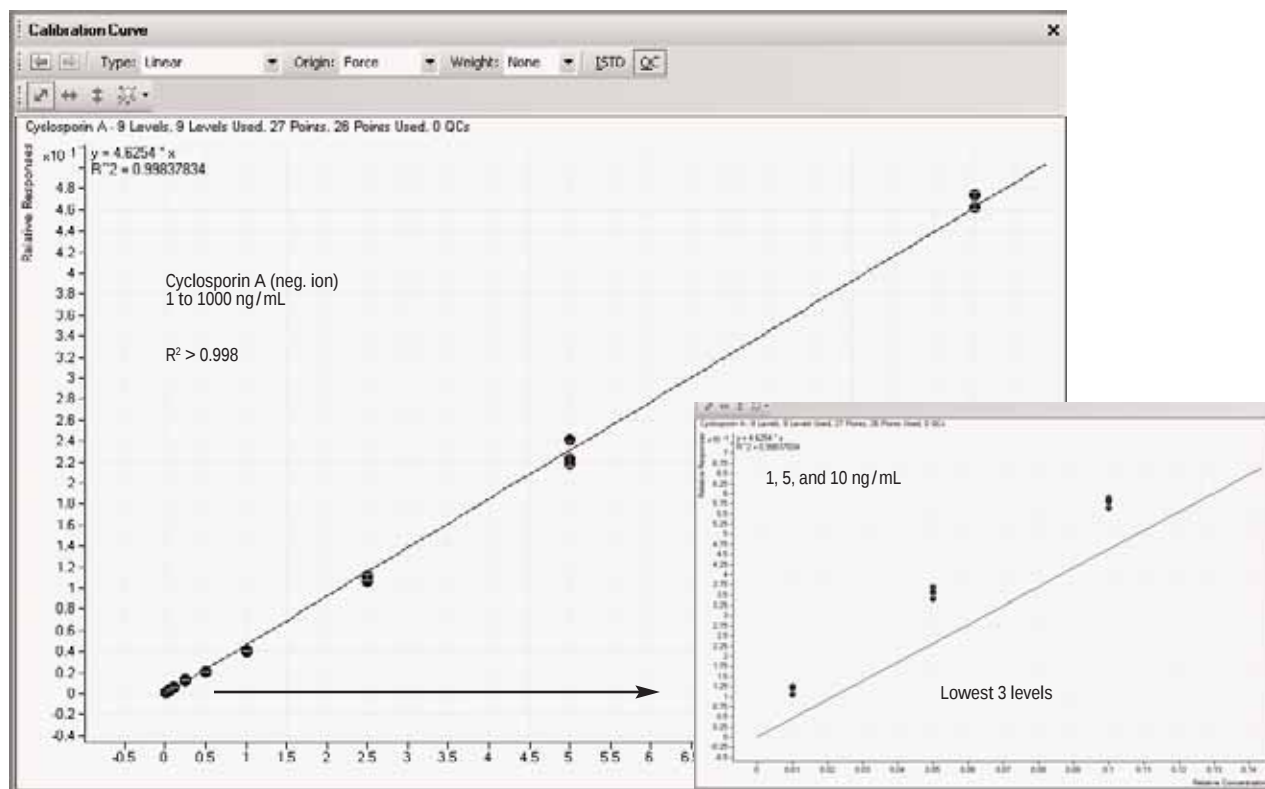


图7. 环孢素A跨越3个数量级的线性。放大的三个最低浓度水平的区域

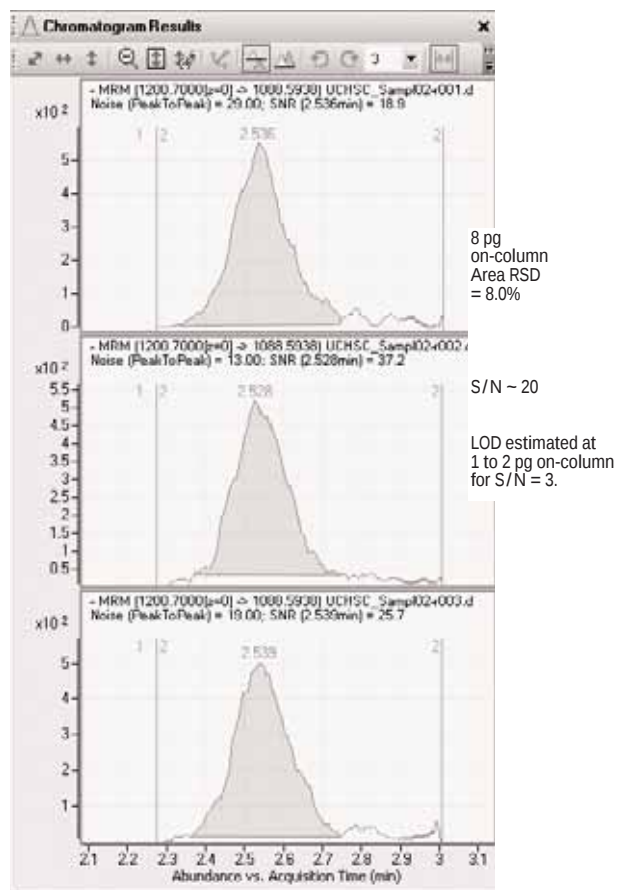


图8. 根据 $S/N=3$ 时的浓度值计算环孢素A的检出限

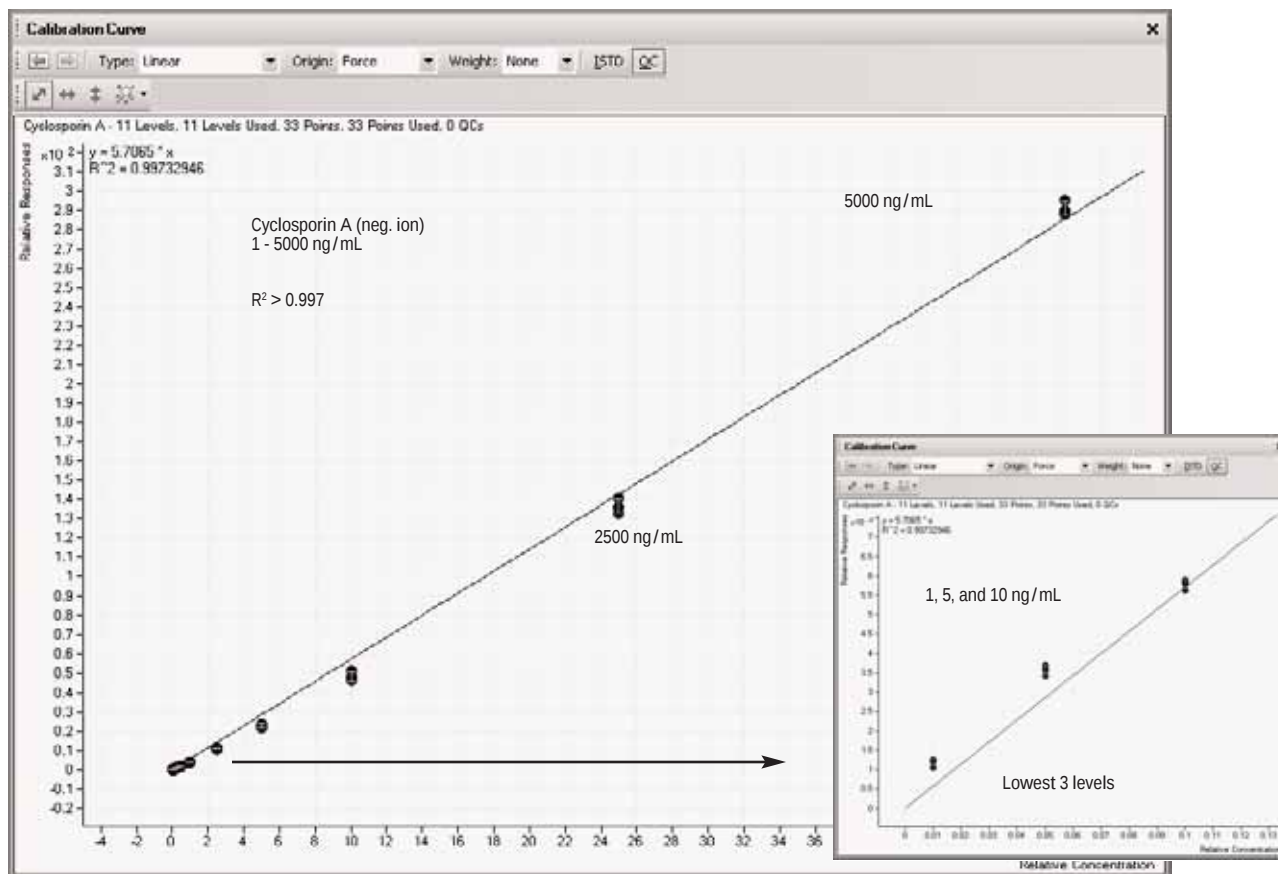


图9. 环孢素 A 另外的两个高浓度水平显示了跨越约 4 个数量级的出色的线性范围。三个最低浓度水平的准确度仍然很好

结论

如图 6 所示，环孢素 A 所要求的定量限(LOQ) 1.0 ng/mL 浓度水平能很容易地满足。然而，对于环孢素 A 的检出限(LOD)需要作更详细的说明。环孢素 A 的最低浓度水平 1 ng/mL 的三次重复进样的信噪比见图 8。平均信噪比(S/N)值约为 20:1。这表明其检出限约为柱上的 1-2 pg。

由于环孢素 A 的含量水平可能较高，因此，重要的是了解 QQQ 质谱仪能否在较高浓度如 2,500 和 5,000 ng/mL 保持线性。在图 9 中可见，较高浓度存在下，不仅线性保持在 $R^2 > 0.997$ ，而且最低的三个浓度水平仍然保持准确性。

本文建立的 LC/MS/MS 法可以作为大多数需要分析的免疫抑制剂如西罗莫司、他克莫司和环孢素 A 的柱上灵敏度的参考。他克莫司和西罗莫司的加钠峰和环孢素 A 的去质子峰能够得到最佳灵敏度。样品制备只有简单的蛋白沉淀步骤。同时得到了 0.997 以上的线性相关系数和低于 800 fg 的柱上检出限。所有的化合物在 3 分钟内得到分离，快速高效的特点使该方法能成为血液中免疫抑制剂的高通量分析的一种很好的备选方法。另外，氰基柱在 450 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速上表现出很好的分离度。

参考文献

1. G. I. Kirchner, C. Vidal, W. Jacobsen, A. Franzke, K. Hallensleben, U. Christians, and K. F. Sewing. "Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry." *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 285.
2. U. Christians, W. Jacobsen, N. Serkova, L. Z. Benet, C. Vidal, K. F. Sewing, M. P. Manns, and G. I. Kirchner. "Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants." *J. Chromatogr. B* 748 (2000) 41.
3. T. Koal, M. Deters, B. Casetta, and V. Kaefer. "Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 215.
4. P. Hatsis and D. A. Volmer, "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. Chromatogr. B* 809 (2004) 287-294.

如需详细信息

如需安捷伦产品与服务的详细信息，请访问：
www.agilent.com/chem/cn

如需本应用方法的详细说明，请与安捷伦科技公司的
Michael Zumwalt联系。

本文内容仅供研究参考

安捷伦对本材料中的错误与设备、性能或本品的使用有关的意外伤害或由此造成的损坏不负任何责任。

本文中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2007

2007年3月中国印刷
5989-5815CHCN



Agilent Technologies