

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.04.005

不同 HPLC-MS/MS 法检测骨髓移植患者雷帕霉素血药浓度的相关性及其意义^{*}

王 磊¹, 卢光泽¹, 孙文利¹, 刘红星^{1,2,3△}

1. 河北燕达陆道培医院检验科, 河北廊坊 065201; 2. 北京陆道培医院, 北京 100176;
3. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176

摘 要:目的 建立以雷帕霉素(RAP)稳定同位素(RAP-d₃)为内标的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法,并与以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法检测结果进行差异性分析。方法 以 RAP-d₃ 为内标,建立测定 RAP 血药浓度的 HPLC-MS/MS 法,并对其进行方法学性能验证。同时,收集服用 RAP 的骨髓移植患者送检血样 173 份,分别用以 RAP-d₃ 和子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法测定全血 RAP 浓度,并对两种方法检测结果进行分析。结果 建立的以 RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法,各方法学评价指标均符合要求。HPLC-MS/MS(RAP-d₃)法和 HPLC-MS/MS(子囊霉素)法检测结果均符合正态分布,且相关性较好(回归方程为 $Y=0.932X+0.158$, $r^2=0.915$),测定结果的均值分别为 4.30 ng/mL 和 4.16 ng/mL,差异无统计学意义($t=2.127$, $P=0.35$)。结论 以 RAP-d₃ 和子囊霉素为内标的两种 HPLC-MS/MS 法,其检测结果无差别,无须进行换算,可直接用于临床骨髓移植患者 RAP 血药浓度测定。

关键词:雷帕霉素; 子囊霉素; 同位素; 高效液相色谱-串联质谱

中图法分类号:R969.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)04-0451-04

Correlation between different HPLC-MS/MS methods in detecting rapamycin blood concentration in patients with bone marrow transplantation and their application significance^{*}

WANG Lei¹, LU Guangze¹, SUN Wenli¹, LIU Hongxing^{1,2,3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang, Hebei 065201, China; 2. Beijing Lu Daopei Hospital, Beijing 100176, China; 3. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China

Abstract: **Objective** To establish a HPLC-MS/MS method by using rapamycin(RAP) stable isotope (RAP-d₃) as the internal standard, and to conduct the difference analysis with the detecting results of HPLC-MS/MS method with ascomycin as the internal standard. **Methods** The HPLC-MS/MS method with RAP-d₃ as the internal standard for the determination of RAP blood concentration was established and its methodological performance was verified. At the same time, 173 blood samples were collected from the patients with bone marrow transplant taking RAP, and RAP-d₃ and ascomycin were used as the internal standard for the detection of whole blood RAP concentration by HPLC-MS/MS. The detection results of the two methods were analyzed. **Results** The various methodological evaluation indicators of HPLC-MS/MS with RAP-d₃ as the internal standard all met the requirements. The detection results of HPLC-MS/MS (RAP-d₃) method and HPLC-MS/MS (ascomycin) were in line with the normal distribution, moreover the correlation was good (the regression equation was $Y=0.932X+0.158$, $r^2=0.915$). The mean values of detection results by using the two methods were 4.30 ng/mL and 4.16 ng/mL, respectively, and the difference was not statistically significant ($t=2.127$, $P=0.35$). **Conclusion** The two kinds of HPLC-MS/MS method with RAP-d₃ and ascomycin as the internal standard have no difference in detection results without no need for conversion, which can be directly used for the determination of RAP blood concentration in clinical patients with bone marrow transplantation.

Key words: rapamycin; ascomycin; isotope; HPLC-MS/MS

^{*} 基金项目:河北省医学研究课题(20210319)。

作者简介:王磊,男,主管药师,主要从事临床药学方面的研究。△ 通信作者, E-mail:lhongxing@outlook.com。

本文引用格式:王磊,卢光泽,孙文利,等.不同 HPLC-MS/MS 法检测骨髓移植患者雷帕霉素血药浓度的相关性及其意义[J].检验医学与临床,2022,19(4):451-453.

雷帕霉素(RAP)作为大环内酯类免疫抑制剂,可减少骨髓移植后急性排斥反应和耐激素排斥反应的发生,亦可通过抑制 mTOR 激酶活性进而抑制肿瘤细胞生长,还兼具低肾脏毒性和糖代谢保护作用等优点^[1-2]。而 RAP 血药浓度过低易发生急性排斥反应,浓度过高又可导致血小板减少、白细胞减少等不良反应^[3]。1995 年, YATSCOFF 等^[4]就指出应监测 RAP 血药浓度,且推荐采用色谱法作为 RAP 血药浓度检测的标准方法;2001 年, MAHALATI 等^[5]又指出 RAP 血药浓度检测可选用高效液相色谱法(紫外检测器)或质谱法;2005 年, STENTON 等^[6]推荐了 RAP 血药浓度监测频率和范围,进一步推动了 RAP 血药浓度检测在临床的广泛应用。目前,用于 RAP 血药浓度检测的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法有采用同系物子囊霉素作内标,亦有采用 RAP 稳定同位素(RAP-d₃)作内标。本研究团队前期亦建立了以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法用于 RAP 血药浓度测定^[7]。由于 RAP-d₃ 色谱性能更接近于 RAP,为更好地避免基质效应及仪器等对 RAP 血药浓度测定的影响,本研究特建立以同位素 RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法,同时对两种内标的 HPLC-MS/MS 法检测结果进行分析,以确定哪种内标的 HPLC-MS/MS 法更适合用于骨髓移植患者的 RAP 血药浓度测定。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 10 月至 2021 年 2 月送河北燕达陆道培医院药理室检测 RAP 血药浓度的骨髓移植患者新鲜剩余全血标本,共 173 份。要求血标本无黄疸、无乳糜、无溶血及凝血,剩余全血量不小于 1 mL。

1.2 仪器与试剂 采用 4000 Q TRAP 质谱仪(美国 AB Sciex 公司),岛津 20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),AnalystV1.5.2 工作站(美国 AB 公司),涡旋振荡器(其林贝尔),微量台式低温离心机(Thermo Fisher)。RAP 校准品和质控品为 ClinCal®-Calibrator (RECIPE CHEMICALS + INSTRUMENTS GmbH) 和 ClinChek®-Control (RECIPE, CHEMICALS + INSTRUMENTS GmbH);RAP-d₃ (HPLC Grade, Toronto Research)。其余试剂及仪器详见本研究团队前期研究^[7]。

1.3 方法 分别采用内标为 RAP-d₃ 和子囊霉素的 HPLC-MS/MS 法同时对 173 份标本进行 RAP 血药浓度检测。RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法测定 RAP 血药浓度的参数:RAP-d₃ 质子数/电荷数(m/z) 为 934.6>864.6,其余质谱参数、色谱系统参数及性能验证方法同以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法^[7]。残留结果验证需符合 FDA 方法学验证的指导原则^[8-9]。根据 STENTON 等^[6]在 2005 年推荐的 RAP 血药浓度监测范围,并结合河北燕达陆道培医院实际监测情况,把两种 HPLC-MS/MS 法检测 RAP

血药浓度结果分成<4、4~10、>10 ng/mL。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 22.0 对两种方法检测 173 份标本 RAP 血药浓度的结果通过配对 t 检验进行差异分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义;同时对两种方法检测结果进行相关性分析,并把两种方法检测结果分布情况绘制成山峦图,以观察其数据分布及对比两种 HPLC-MS/MS 法检测结果的一致性。

2 结果

2.1 以 RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法性能验证结果 通过对 3 条标准曲线进行拟合,计算线性回归的相关系数(r)。方法确证曲线为 Y=0.126X+0.064 3, r²=0.998 8,结果表明, RAP 血药浓度在 0~54.9 ng/mL 线性关系良好。RAP 出峰保留时间为 1.73 min,内标 RAP-d₃ 保留时间为 1.73 min,二者峰高比恒定,确定 RAP-d₃ 作为 RAP 的内标较为合适。同时亦表明,全血中的基质对 RAP 及内标 RAP-d₃ 的测定不产生干扰,专属性较好,内标归一化的基质因子在 0.90~1.00,基质效应对最终结果影响较小。RAP 日内 CV 为 2.28%~2.89%,回收率为 98.52%~104.61%;日间 CV 为 2.37%~3.39%,回收率为 97.04%~103.52%;二者 CV 均小于 4%,回收率位于 98%~105%,回收率高。稳定性实验所测得结果回收率为 100%~110%,CV 均小于 5%。残留结果验证:空白标本的峰面积小于最低定量下限峰面积的 20%,内标残留结果为 0,符合 FDA 方法学验证的指导原则。

2.2 差异分析 以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法和以 RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法检测 173 例骨髓移植患者 RAP 血药浓度结果,两种方法检测结果数据均符合正态分布,其均值分别为 4.16 ng/mL 和 4.30 ng/mL,差异无统计学意义(t=2.127, P=0.35>0.05)。

2.3 相关性分析 根据两种 HPLC-MS/MS 法检测结果绘制散点图,以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法测定结果为自变量 X,以 RAP-d₃ 为内标的 HPLC-MS/MS 法测定结果为函数 Y,进行线性回归,回归方程为 Y=0.932X+0.158,两种 HPLC-MS/MS 法检测结果相关性较好(r²=0.915)。见图 1。

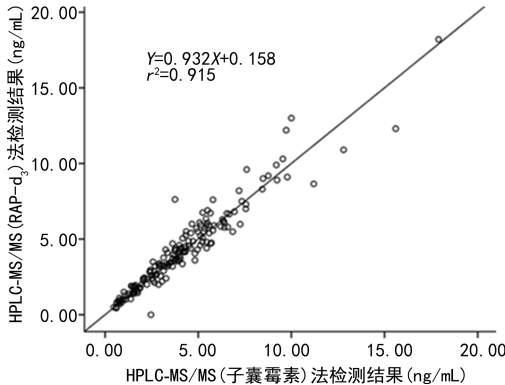
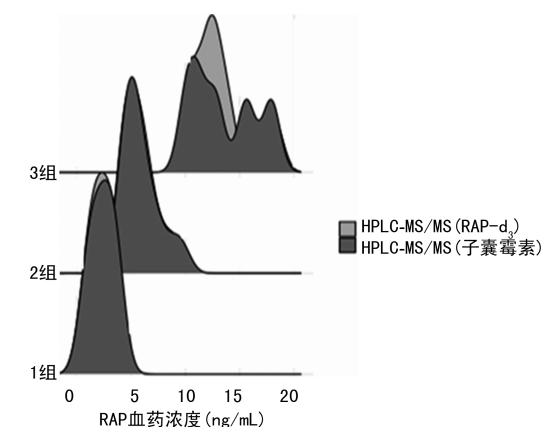


图 1 两种 HPLC-MS/MS 法检测结果相关性分析



注:1 组为 <4 ng/mL;2 组为 4~10 ng/mL;3 组为 >10 ng/mL。

图 2 一致性分析

2.4 一致性分析 HPLC-MS/MS(RAP- d_3)方法检测 RAP 血药浓度,173 份标本中,RAP 血药浓度 <4 ng/mL 的占 50.87%,4~10 ng/mL 的占 44.55%,>10 ng/mL 的占 4.58%。HPLC-MS/MS(子囊霉素)方法检测 RAP 血药浓度,173 份标本中,RAP 血药浓度 <4 ng/mL 的占 54.91%,4~10 ng/mL 的占 42.20%,>10 ng/mL 的占 2.89%。两种 HPLC-MS/MS 法检测结果主要集中于 <4 ng/mL 和 4~10 ng/mL 两部分,两种检测方法这两部分结果基本重叠,一致性较好,而 >10 ng/mL 数据比较分散,一致性较差,说明两种方法在检测高 RAP 血药浓度时可能存在差异。见图 2。

3 讨论

骨髓移植作为可能根治恶性血液病的一种有效治疗手段,其移植后的移植物抗宿主病(GVHD)是影响移植物存活和患者生存质量的主要原因^[10]。而 RAP 作为一种强效、低毒的免疫抑制剂,往往与环孢素或其他低效的免疫抑制剂联用于 GVHD 的预防和治疗^[11]。但 RAP 像其他免疫抑制剂一样,具有治疗窗窄、个体差异大等特点,须在用药的过程中进行血药浓度监测,避免不良反应,提高移植成功率。

目前 RAP 血药浓度检测方法主要有色谱法和 HPLC-MS/MS 法,内标的选择多为子囊霉素和同位素 RAP- d_3 ,鲜见关于此两种不同内标对 HPLC-MS/MS 法检测结果影响的报道。本研究建立的以 RAP- d_3 为内标的 HPLC-MS/MS 法特异性强,重现性好,能准确、灵敏、快速地检测骨髓移植患者全血 RAP 浓度。子囊霉素是一种 RAP 的乙基类似物,结构上与 RAP 相似^[12];而 RAP- d_3 拥有与 RAP 相同的物理化学性质,其离子化效率和分离度几乎一样,可以最大限度地消除分析方法的误差。就两者理化结构和化学性质进行比较,稳定性同位素为理想内标首选,而我国 2015 版《中华人民共和国药典》对生物样品定量分析中使用同位素内标也有相关规定:当在生物分析方法中使用质谱检测时,推荐尽可能使用稳定同位素标记的内标^[8]。稳定性同位素作为内标使用后,由于待

测组分与内标是同一种物质,两者离子丰度比相同,误判率极小,可以进一步确证化合物,所以,当两种内标法所测结果不一致时,推荐以稳定同位素内标法所测结果为准。

根据国内 RAP 临床试验结果,建议 RAP 全血谷浓度术后 0~3 个月控制在 5~10 ng/mL,术后 4~6 个月控制在 3~8 ng/mL,而本次试验随机选取 173 份骨髓移植患者的全血中 RAP 浓度(RAP- d_3 为内标的 HPLC-MS/MS 法)≤10 ng/mL 占 95.42%,说明河北燕达陆道培医院对 RAP 浓度控制较为理想^[13]。进一步对 173 份全血 RAP 血药浓度结果分析可看出,以 RAP- d_3 为内标的 HPLC-MS/MS 法检测结果与以子囊霉素为内标的 HPLC-MS/MS 法检测结果相关性较好,结果差异小,但是对于 RAP 血药浓度 >10 ng/mL 的患者标本而言,两种方法一致性较差,可能存在差别。究其原因,可能跟子囊霉素为 RAP 的结构类似物,其物理化学性质与 RAP 存在细微差别,导致其色谱行为为不一致有关;而 RAP- d_3 作为 RAP 的同位素,其物理化学性质和色谱学行为与 RAP 一致性更好,受仪器状态和前处理环节影响更小,结果相对更可靠。在针对 RAP 血药浓度监测内标的选择上,本研究选择的为氘代内标,可能不如¹³C 内标的检测效果,后期本研究团队会继续对氘代内标和¹³C 内标的选择做进一步研究,以期临床 RAP 血药浓度测定内标的选择提供参考,让检测结果更可靠。

参考文献

- [1] 邹静,肖洪涛,李晋奇,等.肾移植术后患者西罗莫司血药浓度的测定[J].实用医院临床杂志,2017,14(4):36-40.
- [2] 郑树森,徐骁,庄莉,等.西罗莫司在肝癌肝移植中应用的中国专家共识:2020 版[J].中华消化外科杂志,2020,19(6):589-597.
- [3] ALTAWIL L,NEEL N F,ALHEDYANI A,et al. Neutropenia in sirolimus treated patients of lymphatic malformation:a case series[J]. J Case Rep,2017,7:169-173.
- [4] YATSCOFF R W,BOECKX R,HOLT D W,et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of rapamycin; report of the consensus panel [J]. Ther Drug Monit,1995,17(6):676-680.
- [5] MAHALATI K,KAHAN B D. Clinical pharmacokinetics of sirolimus[J]. Clin Pharmacokinet,2001,40(8):573-585.
- [6] STENTON S B,PARTOVI N,ENSOM M H. Sirolimus: the evidence for clinical pharmacokinetic monitoring[J]. Clin Pharmacokinet,2005,44(8):769-786.
- [7] 王磊,王红春,刘红星. HPLC-MS/MS 法同时测定白血病患者全血环孢素 A、他克莫司和西罗莫司水平[J]. 检验医学与临床,2019,16(21):3103-3106.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2015 版. 北京:中国医药科技出版社,2015:363.
- [9] 中华医学会检验医学分会,国家卫生和计划生育委员会临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(10):770-779. (下转第 458 页)

平明显低于非依赖组($P<0.05$),提示肺癌患者尤其是肺癌半依赖组患者更易合并营养不良,身体功能更差。进一步分析显示,血清高 CYFRA21-1、低 ALB 水平是肺癌患者 KPS 评分变化的影响因素,对诊断肺癌半依赖组具有一定价值。

综上所述,通过对临床常用血清指标与肺癌患者 KPS 评分的分析,筛选出血清 CEA、CYFRA21-1、ALP、ALB 水平及 NRS 评分与肺癌患者 KPS 评分相关,其中,血清高 CYFRA21-1、低 ALB 水平是肺癌患者 KPS 评分变化的影响因素,可为临床治疗及判断预后提供一定参考依据。

参考文献

[1] MOLINA R, MARRADES R M, MARIAAUGE J A. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(4):427-437.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.

[3] MOLINA R, MARRADES R M, MARIAAUGE J A, et al. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(4):427-437.

[4] PÉUS D, NEWCOMB N, HOFER S. Appraisal of the Karnofsky performance status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation[J]. BMC Med Inform Decis Mak, 2013, 13:72-78.

[5] 吴剑,冯杰,高艳红,等.肝功能,凝血因子及血常规检测在肺癌诊断与治疗中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14):1706-1709.

[6] MOLINA R, FILELLA X, AUG&EACUTE J M, et al. Tumor markers (CEA, CA125, CYFRA21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors[J]. Tumour Biol, 2003, 24(4):209-218.

[7] 石远凯,孙燕,于金,等.中国晚期原发性肺癌诊治专家共识:2016 年版[J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(1):1-15.

[8] 熊新军,熊龙军.六君子汤联合 EP 化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效评估[J]. 临床医学, 2016, 22(15), 1714-1717.

[9] 吴克林,吴天英,许海.卡瑞利珠单抗联合化疗对老年非小细胞肺癌患者血清细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1,基质金属蛋白酶 9 表达及肿瘤生长转移的影响[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(20):2830-2833.

[10] YANG L, CHEN X, LI Y, et al. Declines in serum CYFRA21-1 and carcinoembryonic antigen as predictors of chemotherapy response and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(2):243-248.

[11] SONE K, OGURI T, ITO K, et al. Predictive role of CYFRA21-1 and CEA for subsequent docetaxel in non-small cell lung cancer patients[J]. Anticancer Res, 2017, 37(9):5125-5131.

[12] 田德全,徐婷,张燕,等.血清肿瘤标志物在晚期肺癌患者一线化疗疗效评估和生存预测中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(9):693-699.

[13] TOLOZA E M, HARPOLE L, MCCRORY D C. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2003, 123(1 Suppl):137-146.

[14] HUANG J D, GU T J, YING J. A meta-analysis survey of appropriate bone turnover markers in the detection of bone metastasis in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(6):1015-1025.

[15] KIM S H, SHIN K H, MOON S H, et al. Reassessment of alkaline phosphatase as serum tumor marker with high specificity in osteosarcoma[J]. Cancer Med, 2017, 6(6):1311-1322.

[16] 张苗苗,鲁培.清蛋白及前清蛋白水平与小细胞肺癌患者预后的关系研究[J]. 河南医学研究, 2017, 26(2):203-206.

[17] 徐小峰,戴宏宇,乔建兵,等.血清白蛋白对接受全身化疗的老年晚期非小细胞肺癌患者预后的预测价值[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(3):346-350.

[18] 赵秀梅,金玲,常春玲,等.术前纤维蛋白原/白蛋白比值、全身炎症反应指数对宫颈癌患者预后评估价值研究[J]. 创伤与急危重病医学, 2021, 9(1):21-24.

(收稿日期:2021-07-03 修回日期:2021-12-01)

(上接第 453 页)

[10] 林上闹,余建.异基因造血干细胞移植后中枢神经系统移植物抗宿主病的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2020, 13(5):100-104.

[11] 朱雯,冯一梅,陈婷,等.西罗莫司联合钙调磷酸酶抑制剂治疗糖皮质激素耐药/依赖广泛型慢性移植物抗宿主病临床观察[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(9):716-722.

[12] 翟晓慧,刘晓雪,陆佳倩,等. LC-MS/MS 法同时分析血

液中几种免疫抑制剂浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(8):774-780.

[13] 李婧. HPLC/MS/MS 法测定人全血中西罗莫司的浓度[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2012, 38(5):788-791.

(收稿日期:2021-06-03 修回日期:2021-12-06)