

免疫药物 FK506 在眼组织中含量的 LC/MS/MS 测定

汪国权 陈放* 盛耀华* 温忆敏

(上海市疾病预防控制中心, *上海新华医院眼科 上海 200336)

视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)移植, 因移植后具有一定的视功能而成为近年来眼科颇受关注的研究课题。但由于血-视网膜屏障的存在, 使异种或同种异体移植的 RPE 细胞几乎都因 T 细胞介导的迟发性超敏反应而不能长期存活。一般采用环孢霉素(Cyclosporin A, CsA)治疗, 但其在使用中会对人产生一些严重且不可逆的副作用, 如肾脏损害、神经毒性等。本文采用新型免疫抑制剂 Tacrolimus (FK506), 不仅副作用比 CsA 小, 且效力强, 其使用的药物剂量比 CsA 低 10—100 倍。现在 RPE 移植中, 将 FK506 制成控释药膜植入玻璃体腔来控制排异反应, 因此研究 FK506 在眼组织和体内代谢与分布有十分重大意义。本文采用液相色谱/质谱/质谱法测定 FK506 的药物浓度, 具有较好的精密度和灵敏度。

1 色谱条件

Symmetry C8 色谱柱(2.1mm×150mm, 5 μ m) (Waters); 流动相 A: 含 2mmol/L 醋酸铵水溶液-甲醇(5:95); 流动相 B: 含 2mmol/L 醋酸铵水溶液-甲醇-乙腈(5:80:15); 流速: 0.2ml/min; 梯度洗脱: 0.0min 93%B, 0.0-8.0min 100%B 8.0-10.0min 100%B 10.0-10.1min 93%; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样体积: 60 μ L。

2 质谱条件

电喷雾电离源 (ESI); 正离子方式; 电离电压: 4.08kvolts; 导入电压: 3ivolts; 离子源温度: 100 $^{\circ}$ C; 干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C; 电子倍增器电压: 650volts; 喷雾气流速: 60L/hr; 干燥气流速: 364L/hr; 四极杆区真空度: 2.4 \times mPa; 碰撞室气体: 氦气; 碰撞室真空度: 1.0 \times 10²mPa; 碰撞能量: 20volts;

检测通道 1 (FK506): 821.5>768.0; 检测通道 2 (Asomycin): 809.4>756.4;

3 样品处理

精确移取全血样本 1.0ml, 玻璃体与房水样本则精确移取 100—200 μ L, 并记录体积。在各样本中均加入 100 μ L 浓度为 100ng/ml Ascomycin 内标溶液, 和样本体积相等的含 70%乙腈的水溶液, 于旋涡混合器上混合 12 秒, 使其混合均匀; 再加入 4ml 含 1%异戊醇的二氯甲烷溶液, 加盖后将试管置于旋涡混合器上混匀 30 秒, 用振荡器振荡提取 15 分钟, 以 4000 转/分钟离心 10 分钟, 将有机相移入另一试管中, 剩余样本溶液中用 4ml 含 1%异戊醇的二氯甲烷溶液再次抽提, 合并有机相。将装有两次抽提所得的有机相试管置于 70 $^{\circ}$ C 恒温槽中, 用氮气吹干有机溶剂。残渣用 200 μ L 流动相溶解, 混匀后进样。

4 讨论

4.1 质谱条件的选择

FK506 和内标化合物 Ascomycin 均为大环内酯类化合物, 在现在流动相条件下会与铵根离子结合产生 $[M+NH_4]^+$ 离子, 其分子离子峰质量分别为 821.5 和 809.6。通过改变碰撞室的电压, 使分子离子峰发生不同层次的裂解。其中在碰撞电压为 20eV 时, 使分子离子峰裂解失 1 份 NH_3 和 2 份 H_2O , 使 FK506 和 Ascomycin 均分别产生特征裂解碎片 768.5 和 756.4。因此本文对 FK506 检测为 821.5(MSI)>768.5(MS2), 对 Ascomycin 检测 809.6(MSI)>756.4(MS2), 无相互干扰。

4.2 测定方法的线性范围、回收率和精密度

分别配制含 FK506 为 1.25ng/ml, 2.5ng/ml, 5.0ng/ml, 12.5ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 125ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml, 且均含内标 Ascomycin 为 50ng/ml 的标准溶液系列。以对照品浓度 X (ng/ml) 对照品与内标峰面积比 Y 进行线性回归, 得 FK506 的回归方程为: $Y=0.03332X-0.01425$, $r=0.9993$, 最低检测浓度为 0.4ng/ml。

在空白全血样品中加标, 使 FK506 浓度分别为 1.25ng/ml, 12.5ng/ml, 125ng/ml, 全血样品提取测定所得的 FK506 与 Ascomycin 峰面积比和水溶液样品直接测定所得的峰面积的比值, 即为 FK506 相对回收率, 结果 3 种浓度的回收率分别为 $85.7\% \pm 3.7\%$, $88.2\% \pm 3.0\%$, $91.4\% \pm 2.2\%$ 。

4.3 FK506 控释药膜的释药动力学指标

FK506 控释药膜植入 3 个月内, 测定玻璃体、房水、视网膜脉络混合组织及全血, 在各取样点的 FK506 平均浓度见下表。由表可见, 全血中的药物浓度很低, 而眼局部组织的药物浓度均显著高于全血浓度, 且保持稳定而持续, 其中玻璃体中药物浓度约为全血浓度的 100 倍。在实验期间, 动物未见毒性反应。该控释药膜可望成为控制 RPE 移植排异反应的有效途径。

各组织样本在不同时间点的 FK506 浓度 ($\bar{X} \pm s$)

| 时 间 | 玻璃体 (ng/ml) | 房水 (ng/ml) | 视网膜脉络膜 (ng/g) | 全血 (ng/ml) |
|------|----------------|---------------|------------------|---------------|
| 3 天 | 24.97±11.40 | 17.54±15.41 | 455.30±335.68 | 0.25±0.15 |
| 7 天 | 78.74±30.95 | 18.80±14.60 | 578.10±359.91 | 0.30±0.09 |
| 14 天 | 60.60±26.79 | 31.24± 5.81 | 645.31±176.47 | 0.23±0.09 |
| 28 天 | 19.23±19.26 | 12.14± 5.81 | 394.47±130.06 | 0.18±0.07 |
| 60 天 | 27.73±10.76 | 1.75±0.48 | 167.20± 50.08 | 0.22±0.03 |
| 90 天 | 25.53±18.78 | 4.59±5.05 | 511.83±657.04 | 0.31±0.10 |
| 平均值 | 41.57±30.67 | 13.81±11.37 | 413.81±236.72 | 0.25±0.10 |

Determination of Immunodrug FK506 in Eye Tissue by LC/MS/MS

Wang Guoquan, Chen Fang, Sheng Yaohua, Wen Yimin