

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.011

我院肝移植术后患者西罗莫司血药浓度监测结果与分析*

林志燕, 杨萍, 黄晓会[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092)

摘要:目的 建立测定人全血中西罗莫司浓度的超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)法,并用其监测医院肝移植术后患者的西罗莫司血药浓度。**方法** 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为水-乙腈(含 0.1% 甲酸),梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min,柱温为 40℃,进样量为 5 μL;以依维莫司为内标,电喷雾离子源,多反应离子监测模式,正离子模式检测。选取 2019 年 7 月至 2020 年 6 月在医院监测西罗莫司血药浓度的 126 例次肝移植术后患者为研究对象。**结果** 126 例次肝移植患者的稳态血药谷浓度中,53 例次在 3~8 ng/mL 范围内,68 例次低于该范围,5 例次高于该范围,患者用药后的血常规、肝肾功能、血脂指标与用药前相比总体无显著性差异。**结论** 西罗莫司在人体内的生物利用度存在个体差异,监测血药浓度有助于及时调整其用药剂量,确保临床用药安全、有效。**关键词:**西罗莫司;超高效液相色谱串联质谱法;肝移植;血药浓度监测

中图分类号:R969.1;R979.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)22-0043-04

Results Analysis of Blood Drug Concentration Monitoring of Sirolimus in Patients After Liver Transplantation in Our Hospital

LIN Zhiyan, YANG Ping, HUANG Xiaohui

(Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China 200092)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the determination of sirolimus in the human whole blood, and to monitor the blood concentration of sirolimus in patients after liver transplantation in our hospital. **Methods** The chromatographic column was Agilent SB C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was water-acetonitrile (containing 0.1% formic acid) with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 5 μL. Everolimus was used as the internal standard (IS), and the determination was performed by multiple reactions monitoring (MRM) mode via electrospray ionization (ESI) source. A total of 126 patients after liver transplantation who monitored the blood concentration of sirolimus in our hospital from July 2019 to June 2020 were selected as the research objects. **Results** Among 126 patients after liver transplantation, the steady-state blood drug valley concentrations of 53 cases were in the range of 3~8 ng/mL, those of 68 cases were lower than this range, and those of five cases were higher than this range. The blood routine, liver and kidney function, and blood lipid indexes of patients after medication were not significantly different from those before medication. **Conclusion** There are individual differences in the bioavailability of sirolimus in the human body. Monitoring the blood drug concentration is helpful to adjust the medication dose in time to ensure the safety and effectiveness of the clinical medication.

Key words: sirolimus; UHPLC-MS/MS; liver transplantation; blood drug concentration monitoring

西罗莫司又名雷帕霉素,属新型免疫抑制剂,为他克莫司同系物,虽作用于相同受体,但免疫作用机制不同。他克莫司抑制 T 淋巴细胞由 G0 期到 G1 期的增殖,西罗莫司是通过阻断不同细胞因子受体信号传导,从而阻断 T 淋巴细胞及其他细胞 G1 期到 S 期的进程^[1-3],与他克莫司相比,西罗莫司可阻断 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的钙依赖性和非钙依赖性信号传导通路。西罗莫司具有抗肿瘤作用,对肾功能影响更小,目前主要应用于肝移植术后出现肾功能异常、不可耐受钙调磷酸酶抑制剂(CNI)类药品不良反应及存在肿瘤复发风险的受者。西罗莫司虽具有服用方便、吸收好、起效快等优点,

但该药个体差异大、治疗窗窄,血药浓度过高易引发肝、肾功能损伤等毒副作用,而血药浓度过低会出现排斥反应^[4-6]。西罗莫司血药浓度监测对于指导临床调整用药剂量和频次,制订个体化治疗方案具有重要意义。超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)法是以超高效液相色谱(UHPLC)为分离手段,质谱(MS)为检测器的综合分析技术,集 UHPLC 的高分离性能和 MS 的高灵敏度、强专属性于一体,极大程度地满足了体内药物分析对高通量、高精密度和准确度的要求,在药物血药浓度监测中发挥了越来越重要的作用,成为临床西罗莫司血药浓度监测的有力工具,尤其适用于移植术后以西罗

*基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目[81603099]。

第一作者:林志燕,女,壮族,硕士,主管药师,研究方向为临床血药浓度的监测,(电子信箱)linzhiyan@xinhua.med.com.cn。

[△]通信作者:黄晓会,女,汉族,硕士,主管药师,研究方向为精准医疗与个体化用药,(电话)021-25077182。

莫司为辅助用药时血药浓度较低者。本研究中采用UHPLC-MS/MS法测定我院肝移植患者西罗莫司血药浓度。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪、Agilent 6460 型三重四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)、B05.00 Masshunter 色谱工作站(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂

西罗莫司对照品(Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,批号为 CA16970700,含量为 95.0%);依维莫司对照品(European Pharmacopoeia Reference Standard 公司,批号为 Y0002048,含量为 97.9%);乙腈、甲醇、甲酸等均为质谱纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为 Agilent SB_{C18} 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为水(A)-乙腈(B,含 0.1% 甲酸),梯度洗脱(0~2 min 时 95% A→20% A,2~4 min 时 20% A→5% A,4~5 min 时 5% A);流速:0.3 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL。

质谱条件:ESI,多反应离子监测模式,采用正离子模式检测;干燥气和雾化气均为氮气,干燥气温度为 320℃,干燥气流量为 7 L/min,雾化器压力为 45 psi,鞘气温度为 350℃,鞘气流量为 12 L/min,毛细管电压为 4 kV,喷嘴电压为 0 V。西罗莫司和依维莫司离子对分别为 m/z 936.5/409.5, 980.6/389.3,碎裂电压分别为 330 V 和 340 V;碰撞能量分别为 60 V 和 64 V。西罗莫司的二极全扫描质谱图见图 1。

2.2 溶液制备

取西罗莫司对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,并制成质量浓度为 1 mg/mL 的西罗莫司对照品溶液。称取依维莫司对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,并制成

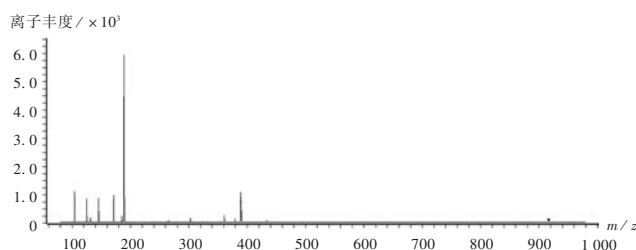


图 1 西罗莫司二级全扫描质谱图

Fig. 1 Secondary full scan mass spectrum of sirolimus

质量浓度为 70 ng/mL 的内标工作液。

2.3 内标全血样品处理

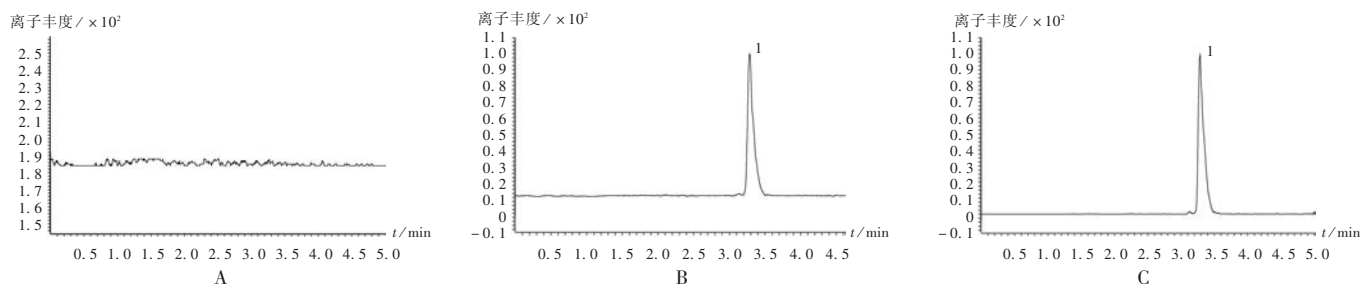
精密吸取全血 180 μL,置 1.5 mL 离心管中,加入 20 μL 内标工作液和 800 μL 沉淀剂(0.2 mol/L ZnSO₄-甲醇,3:7, V/V),涡旋混匀 5 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得内标全血样品。

2.4 方法学考察

专属性考察:分别按 2.3 项下方法处理空白全血、西罗莫司对照品全血和患者全血(供试品溶液),依法进样测定,记录色谱图。结果西罗莫司和依维莫司的保留时间分别为 3.266 min 和 3.285 min,空白全血内源性杂质不干扰西罗莫司和依维莫司的测定。详见图 2。

线性关系考察:制备西罗莫司质量浓度分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng/mL 的全血加标样品,按 2.3 项下方法处理,依法进样测定,记录峰面积。以西罗莫司峰面积与依维莫司峰面积的比值(Y)为纵坐标、西罗莫司质量浓度(X , ng/mL)为横坐标进行线性回归,得西罗莫司回归方程 $Y = 0.0391X + 0.0257$ ($R^2 = 0.9995$, $n = 7$)。结果表明,西罗莫司质量浓度在 0.625~40.000 ng/mL 范围内与西罗莫司峰面积和依维莫司峰面积的比值线性关系良好。

定量限考察:分别精密量取 2.2 项下西罗莫司对照品溶液适量,倍比稀释,依法进样测定,以信噪比(S/N) 10:1 计算定量限。结果西罗莫司定量限为



1. 西罗莫司

A. 空白全血 B. 含西罗莫司的全血 C. 供试品溶液

图 2 总离子流色谱图

1. sirolimus

A. Blank whole blood B. Whole blood containing sirolimus C. Test solution

Fig. 2 TIC chromatograms

0.625 ng/mL。

精密密度试验:分别制备低、中、高质量浓度的西罗莫司全血加标样品(2.00,9.00,30.00 ng/mL),按 2.3 项下方法处理,依法连续进样测定 6 次,记录峰面积,计算日内精密密度;每个质量浓度各制备 5 份处理全血加标样品,依法连续 3 d 每日 1 次进样测定,记录峰面积,计算日间精密密度。结果低、中、高质量浓度西罗莫司加标处理样品的日内精密密度分别为 5.68%,4.21%,3.20% ($n=6$),日间精密密度分别为 9.50%,6.10%,3.75% ($n=5$),表明方法精密密度良好。

稳定性试验:取精密密度试验项下 9.00 ng/mL 的西罗莫司全血加标样品,按 2.3 项下方法处理,分别于室温下放置 0,2,4,8,10,12 h 时,或自动进样器(4℃)放置 0,8,16,24,32,40,48 h 时,依法进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 均小于 10%,表明全血加标样品在室温放置 12 h 或 4℃放置 48 h 内基本稳定。

提取回收试验:分别制备低、中、高质量浓度的西罗莫司全血加标样品(2.00,9.00,30.00 ng/mL)各 3 份,按 2.3 项下方法处理,空白全血样品预处理后添加等量西罗莫司标准品(即 A 品),依法进样测定,记录峰面积,计算处理后的西罗莫司全血加标样品与 A 品的峰面积比值,即得提取回收率。西罗莫司低、中、高 3 个质量浓度的提取回收率分别为 102.53%,101.58%,101.85%, RSD 分别为 9.45%,9.63%,4.30%。

基质效应考察:取预处理后的空白全血适量,分别加入一定质量的西罗莫司对照品,即得质量浓度分别为 2.00,9.00,30.00 ng/mL 的空白全血加标样品;依法进样测定,以空白全血加标样品与相应西罗莫司对照品溶液的峰面积比值计算基质效应。结果低、中、高 3 个质量浓度的基质效应分别为 95.49%,99.33%,94.63%, RSD 分别为 9.18%,7.95%,9.98%。

2.5 我院肝移植患者西罗莫司血药浓度监测结果

选取 2019 年 7 月至 2020 年 6 月在医院住院或门诊监测全血中西罗莫司质量浓度的 126 例次肝移植术后患者为研究对象。其中,男 106 例次,女 20 例次;年龄 29~70 岁。患者晨起服药前取静脉血 2 mL,置含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,当日测定全血药物浓度。126 例次肝移植患者西罗莫司血药浓度测定结果见表 1,不同性别患者西罗莫司血药浓度测定结果见表 2,各年龄组患者西罗莫司药物浓度测定结果见表 3,服用西罗莫司后对肝移植患者的血常规、血脂指标和肝肾功能的影响见表 4 至表 6。

3 讨论

国外学者认为,5~15 $\mu\text{g/L}$ 是西罗莫司合适的血药浓度范围^[7]。国内多数学者认为,西罗莫司血药浓度

表 1 肝移植患者西罗莫司血药浓度测定结果($n=126$)

Tab. 1 Determination results of blood concentration of sirolimus in patients after liver transplantation($n=126$)

质量浓度 (ng/mL)	样本数 (个)	构成比 (%)	质量浓度 (ng/mL)	样本数 (个)	构成比 (%)
≤ 2.00	33	26.19	8.01~10.00	3	2.38
2.01~3.00	35	27.78	10.01~15.00	2	1.59
3.01~8.00	53	42.06	>15.00	0	0

表 2 不同性别患者西罗莫司血药浓度测定结果($n=126$)

Tab. 2 Determination results of blood concentration of sirolimus in patients with different genders($n=126$)

性别	例次	血药浓度 (ng/mL)	3~8 ng/mL [例(%)]	<3~8 ng/mL [例(%)]	>3~8 ng/mL [例(%)]
男	106	3.80±2.41	44(34.92)	57(45.24)	5(3.97)
女	20	3.66±1.58	9(7.14)	11(8.73)	0(0)
合计	126	3.77±2.27	53(42.06)	68(53.97)	5(3.97)

表 3 各年龄组患者西罗莫司血药浓度测定结果($n=126$)

Tab. 3 Determination results of blood concentration of sirolimus in patients with different age groups($n=126$)

年龄	例次	血药浓度值 ($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	稳态血药浓度 3~8 ng/mL [例(%)]		
			符合	低于	高于
18~45 岁	46	3.42±2.18	17(36.96)	27(58.70)	2(4.35)
46~69 岁	79	4.00±2.33	35(44.30)	42(53.16)	2(2.53)
>69 岁	1	3.84	1(100.00)	0(0)	0(0)

表 4 肝移植患者服用西罗莫司前后血常规比较($\bar{X} \pm s$, $n=126$)

Tab. 4 Comparison of blood routine before and after administration of sirolimus in patients after liver transplantation($\bar{X} \pm s$, $n=126$)

时间	WBC ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	RBC ($\times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)	Hb (g/L)	HCT (%)	PLT ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)
服用前	5.85±2.77	3.82±0.87	114.36±21.94	33.97±6.17	167.18±114.33
服用后					
1 个月	4.88±2.01	3.92±0.84	115.40±22.01	33.95±6.53	146.30±69.08
3 个月	4.42±1.56	4.34±0.71*	126.85±18.82	37.48±5.43	158.10±87.31
6 个月	4.62±1.69	4.08±0.90	121.75±23.24	35.76±6.60	158.50±96.20
12 个月	4.98±0.94	4.35±0.67	132.50±21.23	39.41±6.35*	146.00±92.85
>12 个月	4.74±2.61	4.15±0.37	127.17±10.26	37.73±3.84	160.17±103.49

注:与服用前比较,* $P<0.05$ 。

Note: Compared with those before medication,* $P<0.05$.

表 5 肝移植患者服用西罗莫司前后血脂水平比较
($\bar{X} \pm s$, mmol/L, $n=126$)

Tab. 5 Comparison of blood lipid levels before and after administration of sirolimus in patients after liver transplantation
($\bar{X} \pm s$, mmol/L, $n=126$)

时间	TC	TG	HDL	LDL
服用前	4.16±1.82	1.83±0.67	1.46±0.42	2.49±0.92
服用后				
1 个月	4.55±0.82	1.92±0.96	1.29±0.52	2.63±0.64
3 个月	5.68±0.91	2.30±1.47	1.57±0.45	3.67±1.09
6 个月	4.83±1.15	1.87±0.76	1.33±0.26	3.11±0.97

表 6 肝移植患者服用西罗莫司前后肝肾功能比较($\bar{X} \pm s, n=126$)

Tab. 6 Comparison of liver and kidney function before and after administration of sirolimus in patients after liver transplantation ($\bar{X} \pm s, n=126$)

时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	Cr(μ mol/L)	BUN(mmL/L)
服用前	44.23 $\pm$ 49.80	45.73 $\pm$ 33.49	119.98 $\pm$ 81.33	13.00 $\pm$ 11.18
服用后				
1 个月	34.76 $\pm$ 54.33	39.52 $\pm$ 37.17	104.05 $\pm$ 43.37	8.95 $\pm$ 4.36
3 个月	25.84 $\pm$ 19.06	35.89 $\pm$ 25.34	94.33 $\pm$ 28.15	7.74 $\pm$ 3.35
6 个月	30.88 $\pm$ 20.13	46.56 $\pm$ 39.72	87.34 $\pm$ 35.20	7.32 $\pm$ 4.63
12 个月	31.63 $\pm$ 22.15	44.75 $\pm$ 37.46	86.45 $\pm$ 21.69	7.29 $\pm$ 1.61
>12 个月	26.33 $\pm$ 12.53	29.00 $\pm$ 6.75	102.37 $\pm$ 28.66	9.08 $\pm$ 3.07

应维持在 4~8 ng/mL,可同时获得较高的疗效和较低的高脂血症发生率^[8-9]。熊樱等^[10]认为,术后 1~3 个月为 4~6 ng/mL,第 4~6 个月为 3~6 ng/mL,>6 个月 3~5 ng/mL,在此血药浓度范围内,通过与环孢素或他克莫司联用,可获得较好的免疫抑制作用及较少的药品不良反应^[10]。对于西罗莫司血药浓度稍低于有效血药浓度的患者,有文献报道西罗莫司和他克莫司稳态血药浓度之和在 6.1~15.5 ng/mL 范围内,总体免疫抑制疗效满意^[11]。西罗莫司在人体内的生物利用度存在个体差异,影响西罗莫司血药浓度的因素包括剂量/体重、年龄、疾病状态、器官移植类型等^[12],以及食物、腹泻、贫血状态、药物相关作用等其他因素^[13]。西罗莫司宜空腹、餐前 1 h 或餐后 2~3 h 服用,低脂饮食,利于药物最大吸收。联用抑制 CYP3A4 代谢的药物(如三唑类抗真菌药、红霉素、克拉霉素、钙通道阻断剂等)能增加西罗莫司血药浓度,CYP3A4 诱导剂(如利福平、卡马西平等)能降低西罗莫司的血药浓度^[14-15]。临床治疗过程中需密切监测其血药浓度变化。西罗莫司的半衰期较长,为 57~62 h,若给予负荷剂量,需 3~4 d 监测血药浓度,如不给予负荷剂量,应在 5~7 d 监测血药浓度,一旦调整维持剂量,应以新的维持剂量连用 7~14 d 后再在血药浓度监测下进一步调整剂量。获得稳定的血药浓度后可每月复查 1 次,移植时间较长、血药浓度稳定的患者可每 3 个月监测 1 次。

我院的 126 例次西罗莫司稳态血药浓度监测结果在 3~8 ng/mL 范围内的不足半数(53 例次,42.06%)。性别对西罗莫司稳态血药浓度无明显影响,而不同年龄段患者西罗莫司稳态血药浓度有一定差异。

除性别和年龄因素外,在今后的研究中还应考虑患者是否同时服用其他药物及其自身生理病理状况等因素对血药浓度的影响。本研究病例数较少,对西罗莫司血药浓度的影响因素还有待数据积累研究。虽然目前我院现有样本数还不足以解释各因素对西罗莫司血药浓度与疗效间的关系,但可为临床制订个体化给药方案提

供参考,为本地区肝移植患者血药浓度参考值的制订提供依据。本研究中患者在服用西罗莫司 3 个月的红细胞计数和 12 个月红细胞比容与服药前相比虽有显著差异,但均在正常范围内,故无临床意义。患者服药后与服药前的肝肾功能、血脂指标相比无显著差异,得出无差异的结果可能跟样本量较小有关。另外,由于此次观察的病例数较少,观察时间较短,故尚不能得出西罗莫司不同血药浓度与患者血常规、肝肾功能、血脂关系的结论,今后还有待进一步深入研究。

综上所述,西罗莫司在人体内的生物利用度存在个体差异,监测血药浓度有助于及时调整其用药剂量,确保临床用药安全、有效。

参考文献

- [1] BERETTA L, GINGRAS AC, SVITKIN YV, et al. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation [J]. EMBO J, 1996,15(3):658-664.
- [2] 谢培华,宋洪涛. 西罗莫司血药浓度监测的研究进展[J]. 中国药房, 2015,26(32):4604-4606.
- [3] 韩锐,贾立华,刘泽源,等. 几种常见免疫抑制剂的研究进展[J]. 中国药业,2011,20(13):1-4.
- [4] 王沫,郭颖. 西罗莫司在肾移植中的应用:理论与技术[J]. 中国组织工程研究, 2014,19(5):779-784.
- [5] 徐志强,万有贵,陈博,等. 西罗莫司在肾移植受者中的转换治疗[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(5):810-812.
- [6] 周静怡,沈毅,程军,等. 肾移植后应用西罗莫司和他克莫司的有效性与安全性的荟萃分析[J]. 中华器官移植杂志, 2014,35(10):584-589.
- [7] MACDOMALD A, SCAROLA J, BURKE JT, et al. Clinical Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus[J]. Clin Ther, 2000, 22(Suppl B):101-121.
- [8] 王长希,尚文俊,陈立中. 肾移植受者应用西罗莫司治疗窗的临床研究[J]. 中国新药与临床杂志,2005,24(1):41-45.
- [9] 蔡蕊,王军,张新乐. 西罗莫司不同血药浓度对肾移植患者肝肾功能的影响[J]. 中国实用医药,2016,11(4):124-125.
- [10] 熊樱,吴笑春,李馨. 肾移植术后患者全血西罗莫司浓度检测结果分析[J]. 中国药师,2011,14(7):941-944.
- [11] 张戈,王晓杰,沈中阳. 276 例次肝移植患者西罗莫司血药浓度监测及临床应用分析[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(24):2041-2044.
- [12] 陈瑜,张雷,王立明,等. 西罗莫司在肾移植术后远期各类并发症患者中的转换应用[J]. 中华器官移植杂志, 2010,31(4):223-226.
- [13] 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.
- [14] 石浩强,杨骏,张立群. 中国肾移植患者西罗莫司群体药动学模型研究[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(3):258-264.
- [15] 王伟霞,张翠欣,唐霄. 西罗莫司临床应用及药物相互作用的研究进展[J]. 临床合理用药,2018,11(11):173-177.

(收稿日期:2020-12-28;修回日期:2021-06-03)