

充分信赖校准品：MassTrak™免疫抑制剂校准品和质控品套装在环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司LC-MS/MS分析中的应用

Stephen Balloch, Lisa J. Calton, Gareth Hammond

Waters Corporation

用于体外诊断。仅在部分国家/地区销售。

摘要

免疫抑制药物环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司的测量历来都是使用免疫测定法。但这种方法在低浓度下的准确度不稳定，再加上由于抗体与其他成分（如代谢物）发生交叉反应而导致的专属性问题，结果的可信度会降低。这种现象在文献中多有报道。因此，许多临床实验室开始更多地使用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)联用技术来分析这些药物，为此他们需要可靠、可重现的校准品和质控品套装(QC)来提高结果的可信度。

使用经过验证的LC-MS/MS方法时，Waters™ MassTrak免疫抑制剂校准品和QC套装(IVD)可提高准确性并帮助整合结果。

使用ACQUITY™ UPLC™ I-Class FL与Xevo™ TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统和内部开发的LC-MS/MS方法证明了MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装的性能。

优势

- 赋值遵循ISO17511中描述的指导原则
- 对免疫抑制剂的分析准确度充满信心，并推进实验室方法的整合
- 冻干校准品和质控品(QC)可缩短样品前处理时间

简介

以免疫测定法常规分析全血样品中的免疫抑制剂药物具有较高的自动化程度和分析灵敏度，但在选择性和多用性方面仍然存在一些问题。因此，结果可靠性可能会偏低，特别是在低浓度条件下。最近，为了克服这些已知的局限，LC-MS/MS在免疫抑制剂分析中的应用愈发广泛。

临床实验室中的LC-MS/MS方法通常基于实验室自建项目(LDT)，并根据当地法规指南开展验证。这些指南不断发展，对临床方法的各方面遵守这些不断变化的法规提出了更高要求。例如，对用于生成和独立检查方法内校准准确度的校准品和质控品(QC)提出了要求。

Waters MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装(IVD) (图1) 的冻干全血样品中包含环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司，这些激素的来源可靠，因此具有高水平的计量学溯源性。为证明该产品中材料的质量，我们使用蛋白沉淀法，通过ACQUITY UPLC I-Class FL与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统分离和检测样品，以概念论证的方式展示了这些材料的性能。



图1. Waters MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装

实验

Waters MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装的冻干全血样品中包含以下免疫抑制剂药物：环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司。校准范围及质控品(QC)的赋值浓度见表1。

免疫抑制剂药物	校准品范围 (ng/mL)	标称QC浓度 (ng/mL)
环孢霉素	25-1500	150、400、900
依维莫司	1-30	2、8、22
西罗莫司	1-30	2、8、22
他克莫司	1-30	2、8、22

表1.MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装的浓度范围。执行样品前处理和分析之前，按照使用说明(IFU)复溶校准品和质控品(QC)。

样品描述：

使用蛋白沉淀法进行样品前处理

蛋白沉淀法：

向50 µL全血样品中加入200 µL 0.1 M硫酸锌水溶液，混合五秒。加入500 µL内标(ISTD)，然后混合20秒。然后将样品在4696 g下离心2 min。

液相色谱条件：

系统：	配备FL的ACQUITY UPLC I-Class
进样针：	20 µL
定量环：	50 µL
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ SB色谱柱；1.8 µm, 2.1 x 30 mm（部件号：186004117）
柱温：	55 °C

样品温度：	8 °C
进样体积：	20 µL
进样模式：	PLNO，启用预加载
流动相A：	水+ 2 mM醋酸铵+ 0.1%甲酸
流动相B：	甲醇+ 2 mM醋酸铵+ 0.1%甲酸
弱清洗液：	水:甲醇95:5 (v:v)，600 µL
强清洗液：	水:甲醇:乙腈:IPA 1:1:1:1 (v:v:v:v)，200 µL
密封件清洗液：	水:甲醇80:20 (v:v)

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.45	50	50	初始
0.2	0.45	50	50	1
0.6	0.45	0	100	6
1.2	0.80	50	50	11

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪
-------	-------------------------

电离模式：ESI+

毛细管电压：0.8 kV

MRM参数

分析物	MRM	ID	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
环孢霉素	1219.9>1202.8	定量离子	35	18
	1219.9>1184.8	定性离子	35	34
	1231.9>1214.8	内标	35	18
依维莫司	975.6>908.6	定量离子	35	16
	975.6>926.6	定性离子	35	10
	981.6>914.6	内标	35	16
西罗莫司	931.6>864.6	定量离子	35	16
	931.6>882.6	定性离子	35	10
	809.6>756.6	内标	35	20
他克莫司	821.6>768.6	定量离子	35	20
	821.6>786.6	定性离子	35	16
	809.6>756.6	内标	35	20

方法事件

时间 (min)	事件	操作
0	液流状态	废液
0.6	液流状态	液相色谱
1.4	液流状态	废液

结果与讨论

使用ACQUITY UPLC 2.1 mm x 30 mm HSS C₁₈ SB色谱柱对四种免疫抑制药物进行色谱分析。

图2是校准品1（含25 ng/mL环孢霉素以及1 ng/mL依维莫司、西罗莫司和他克莫司）的示例色谱图。

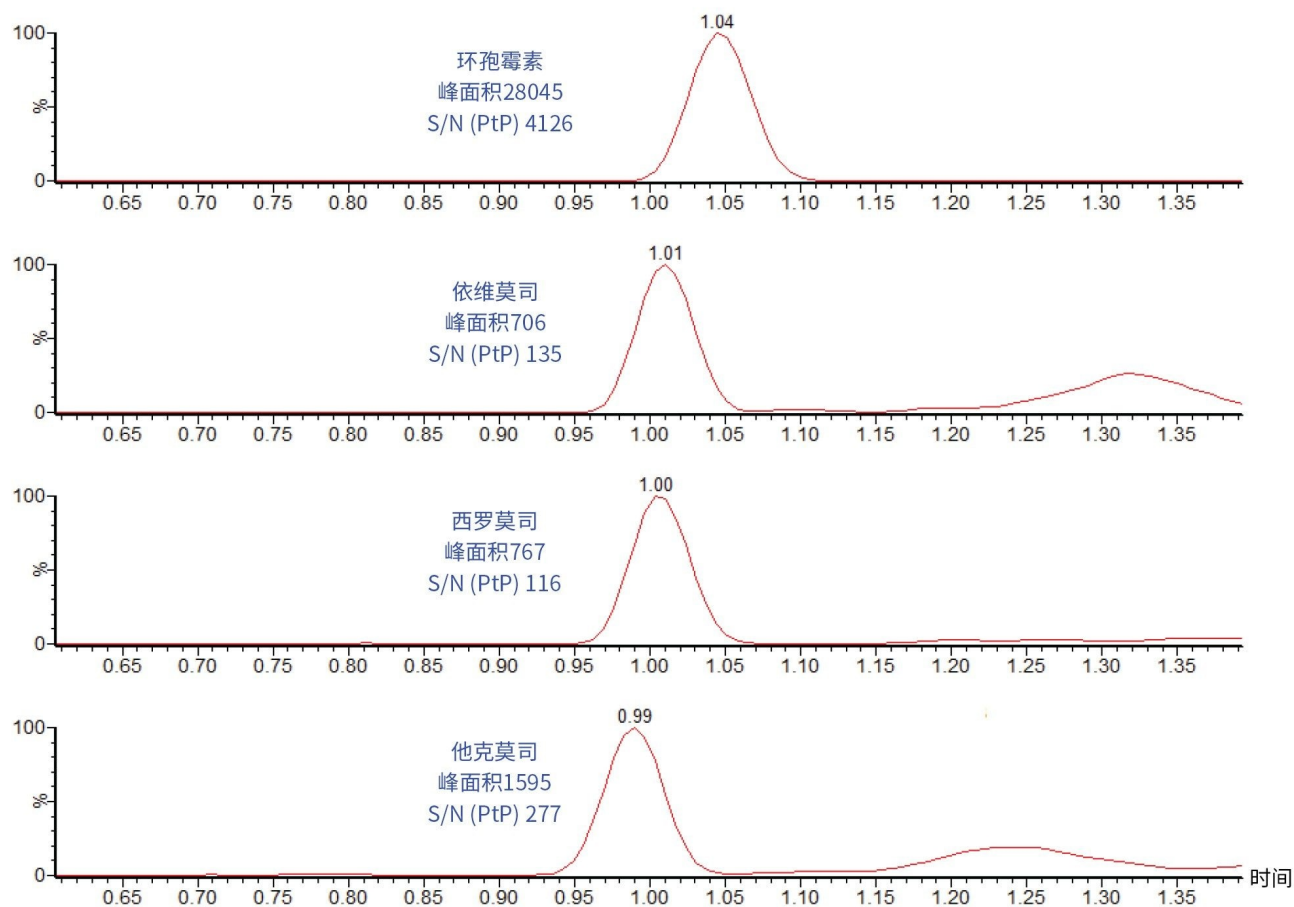


图2. 使用ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro系统分析MassTrak免疫抑制剂校准品套装中C1校准品提取物的性能特征。四种免疫抑制剂药物的校准曲线平均 r^2 值高于0.9988，证明在校准范围内呈线性。通过评估低浓度免疫抑制剂药物校准标样(C1)的信噪比(S/N)，确定该方法的分析灵敏度。在多次分析运行中，校准品1各浓度下的S/N (PtP)均高于10。结果汇总于表2中，图2中还显示了低浓度校准品的S/N示例。

分析物	校准品范围 (ng/mL)	平均 r^2	校准品1下的平均 S/N PtP
环孢霉素	25.2–1474.7	0.9996	4525
依维莫司	1.1–31.8	0.9990	77
西罗莫司	1.0–26.5	0.9988	95
他克莫司	1.1–31.5	0.9994	149

表2. MassTrak免疫抑制剂校准品套装中免疫抑制剂药物的校准线性和分析灵敏度性能汇总。

我们在五天内每天对三个浓度的质控品(QC)进行一次萃取和定量分析（每个浓度五个重复样， $n = 25$ ），以此确定该方法的总精密度和重现性。环孢霉素的低、中、高浓度分别为154.6、391.6和888.2 ng/mL；依维莫司的分别为2.2、8.4、22.6 ng/mL；西罗莫司的分别为1.9、7.3和19.4 ng/mL；他克莫司的分别为2.2、8.4和22.8 ng/mL。测得所有免疫抑制剂药物在三种QC浓度下的总精密度和重现性为 $CV \leq 7.1\%$ （图3）。

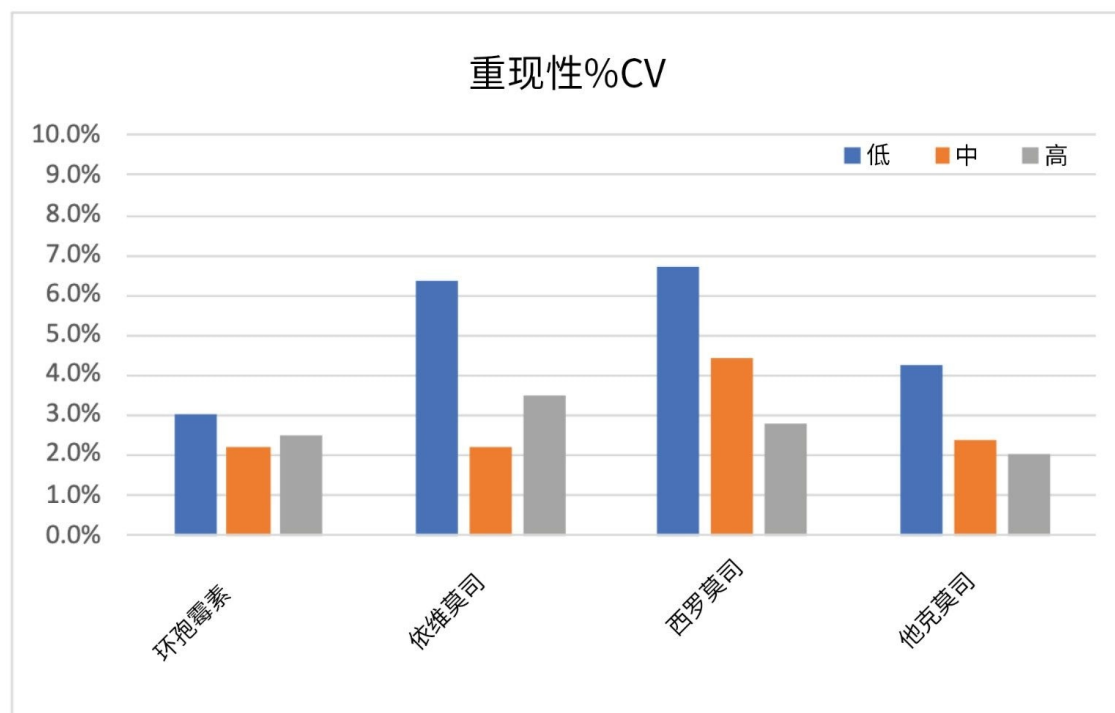
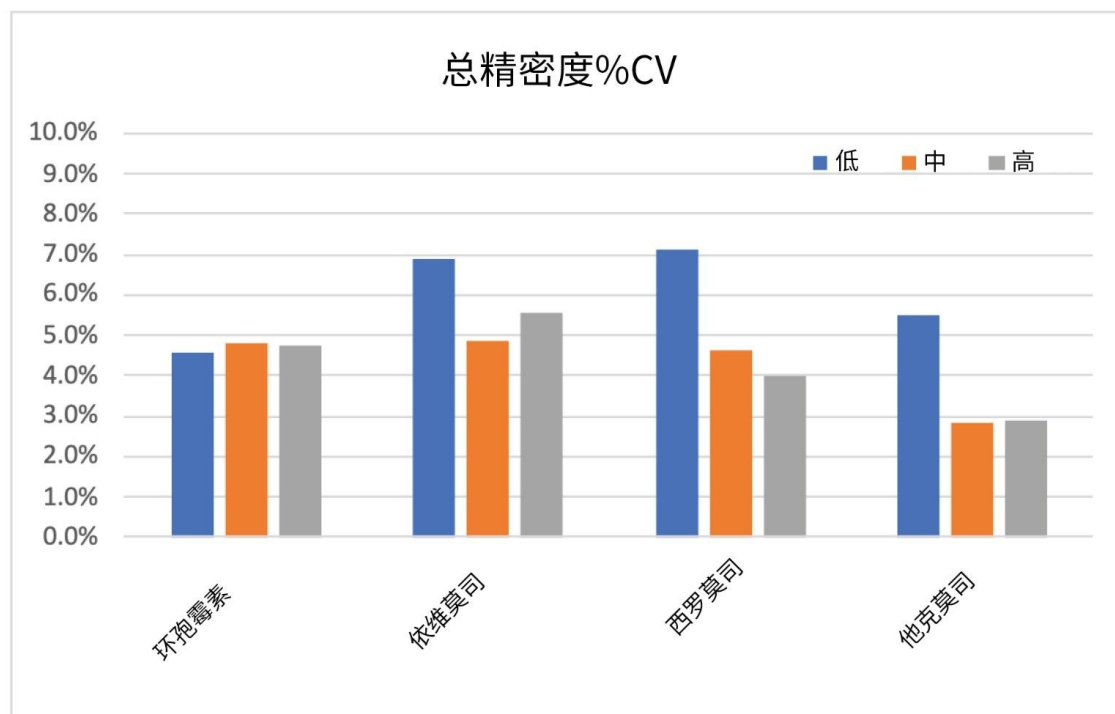


图3.MassTrak免疫抑制剂质控品套装中四种免疫抑制剂药物分析的总精密度和重现性

此外，我们评估了五次分析运行中质控品(QC)与校准品相比的准确度。四种免疫抑制剂药物的QC平均准确度为94.5–103.6%（表3）。

	QC准确度		
分析物	Q1	Q2	Q3
环孢霉素	99.6%	101.0%	102.7%
依维莫司	100.0%	103.6%	103.1%
西罗莫司	100.0%	94.5%	95.4%
他克莫司	100.0%	101.2%	103.1%

表3. Waters MassTrak免疫抑制剂质控品套装在五次分析运行中以三种浓度重复分析五次的准确度

通过分析英国NEQAS的EQA样品评估四种免疫抑制剂药物的分析准确度。然后将所得数据与样品的质谱法平均值进行比较，并对数据集进行Altman-Bland一致性分析。环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司数据的Altman-Bland一致性分析显示，平均方法偏差在±7.4%范围内，表明该方法分析免疫抑制剂药物所得的结果与EQA方法所得到的值相比，具有良好的一致性（图4a-d）。

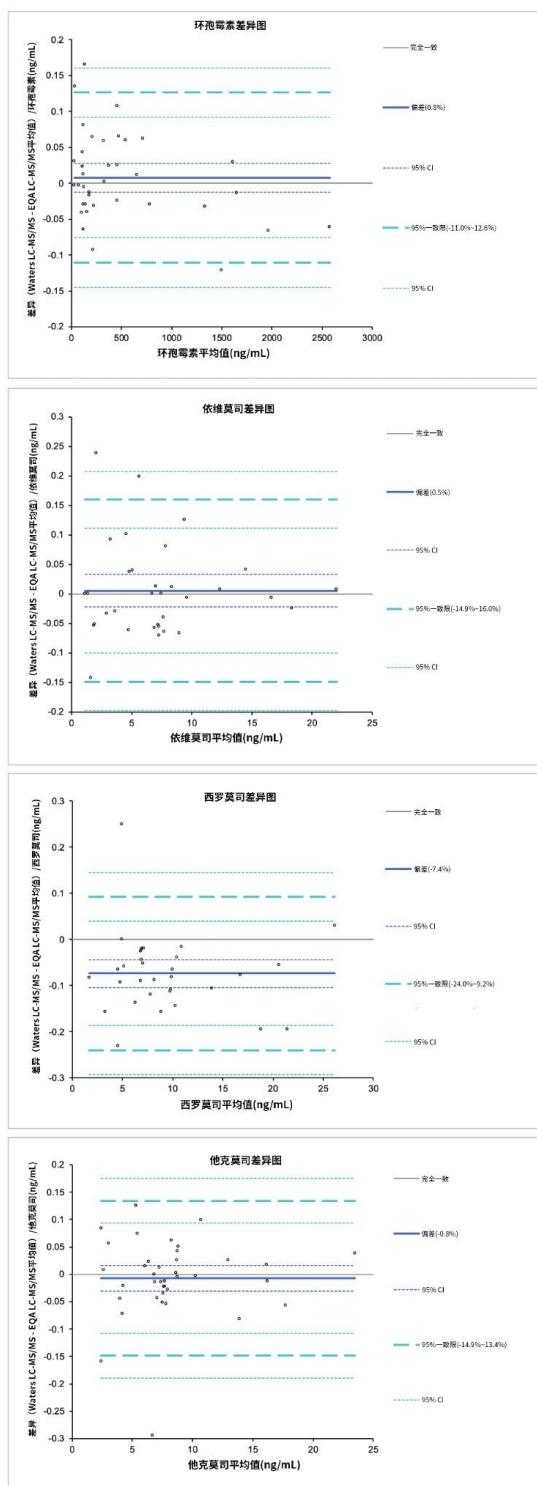


图4.Altman-Bland一致性分析，对比了采用Waters LC-MS/MS方法和EQA方案MS方法分析(a)环孢霉素、(b)依维

莫司、(c)西罗莫司和(d)他克莫司的结果。

结论

本性能论证评估表明，MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装(IVD)能够对全血样品中四种免疫抑制药物的定量提供优异的分析精密度和准确度。

ACQUITY UPLC I-Class FL与Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪联用系统能够提供足够高的分析灵敏度，只需使用50 µL样品即可分析该套装中最低要求浓度的样品。经证明，该套装在整个校准范围内具有优异的精密度水平，总精密度和重现性为 $CV \leq 7.1\%$ 。此外，QC套装的准确度范围为94.5–103.6%。还通过与EQA样品的一致性分析展示了计量学溯源性，该方法与EQA样品具有良好的一致性，与方案的方法平均值相比，平均方法偏差在 $\pm 7.4\%$ 范围内。

免责声明

该方法是本文所述仪器、软件和消耗品的一个应用示例。该方法尚未经任何监管实体许可用于诊断目的。最终用户须自行完成方法开发和验证。MassTrak免疫抑制剂校准品和质控品套装仅在部分国家/地区销售。详细订购信息请咨询您当地的销售代表。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassTrak免疫抑制剂校准品、质控品和内标套装 <[nextgen/cn/zh/products/standards-and-reagents/masstrak-immunosuppressant-calibrator--quality-control-and-inter.html](https://www.waters.com/nextgen/cn/zh/products/standards-and-reagents/masstrak-immunosuppressant-calibrator--quality-control-and-inter.html)>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007582ZH, 2022年3月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号