

## 应用纪要

# 在临床研究中同时分析全血样品中的环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司

---

Stephen Balloch, Lisa J. Calton, Gareth Hammond

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

## 摘要

本应用纪要介绍了一种临床研究方法，该方法可以简单、快速地从少量人全血中得到蛋白质沉淀。

## 优势

- 利用色谱和高选择性的质谱检测提高分析选择性
  - 样品制备过程简单、经济，仅使用极少量的样品
  - 分析运行所需时间更短，并且能够同时分析四种分析物
- 

## 简介

已知免疫抑制药物环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司个体间和个体内药代动力学差异性较高<sup>1</sup>。因此，一种准确、分析灵敏度高的方法可能有助于研究给药的药代动力学和药效学作用。

本文中介绍了一种临床研究方法，该方法可以简单、快速地从少量人全血中得到蛋白质沉淀。在配备FL的Waters

---

ACQUITY UPLC I-Class系统上使用Waters<sup>TM</sup> ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC<sup>TM</sup> HSS C<sub>18</sub> SB色谱柱，可在1.5分钟内完成色谱洗脱。同时分析所有四种分析物，然后使用Xevo<sup>TM</sup> TQ-S micro质谱仪进行检测（图1），进样间隔时间不到两分钟。



---

图1. 配备FL的Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S micro质谱仪。

---

## 实验

### 样品制备

使用含有环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司的全血校准品和质控样品。分别以<sup>2</sup>H<sub>12</sub>-环孢霉素、<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>2</sup>H<sub>4</sub>-依维莫司、<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-西罗莫司和子囊霉素作为内标。

校准品和QC样品浓度（低浓度、中浓度和高浓度）详见表1。

分析物	校准品范围 (ng/mL)	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.校准品和QC样品浓度。

## 样品萃取

用移液器将50 μL样品移入2 mL 96孔样品收集板（部件号：[186002482 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002482-96-well-sample-collection-plate-2-ml-square-well-50-pk.html)）中。加入200 μL 0.1 M的ZnSO<sub>4</sub>水溶液，涡旋混合，然后向乙腈溶液中加入500 μL内标(ISTD)并涡旋混合。将收集板以4696 g的离心力离心2分钟并分析上清液。

## UPLC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<sub>18</sub> 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

密封清洗液： 水:甲醇80:20 (v:v)

运行时间： 1.5 min (进样间隔1.9 min)

梯度洗脱： 表2

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

表2.免疫抑制剂的分析梯度。

## 质谱条件

系统： Xevo TQ-S micro

分辨率： MS1 (0.7 FWHM) MS2 (0.7

FWHM)

采集模式： 多反应监测(MRM) (详见表3)

极性： ESI+

毛细管电压： 0.8 kV

离子源温度： 120 °C

脱溶剂气温度： 400 °C

扫描间延迟时间： 0.01 s

通道间延迟时间： 0.01 s

## 数据管理

数据管理： MassLynx™软件4.2版自带的TargetLynx XS™应用  
管理软件

## MRM参数

分析物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)	驻留时间 (s)
环孢霉素（定量离子）	1219.8	1202.8	34	22	0.025
环孢霉素（定性离子）	1219.8	1184.8	34	34	0.025
$^{2}\text{H}_{12}$ -环孢霉素（内标）	1231.8	1214.8	34	22	0.025
依维莫司（定量离子）	975.6	908.6	32	18	0.020
依维莫司（定性离子）	975.6	926.6	32	14	0.025
$^{13}\text{C}_2\text{H}_4$ -依维莫司（内标）	981.6	914.6	32	18	0.025
西罗莫司（定量离子）	931.6	864.5	32	16	0.020
西罗莫司（定性离子）	931.6	882.5	32	12	0.025
$^{2}\text{H}_3$ -西罗莫司（内标）	934.6	864.5	32	16	0.025
他克莫司（定量离子）	821.5	768.5	40	22	0.025
他克莫司（定性离子）	821.5	786.5	40	18	0.025
子囊霉素（内标）	809.5	756.5	40	20	0.025

表3.本研究的分析物及内标的MRM参数。

## 结果与讨论

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。

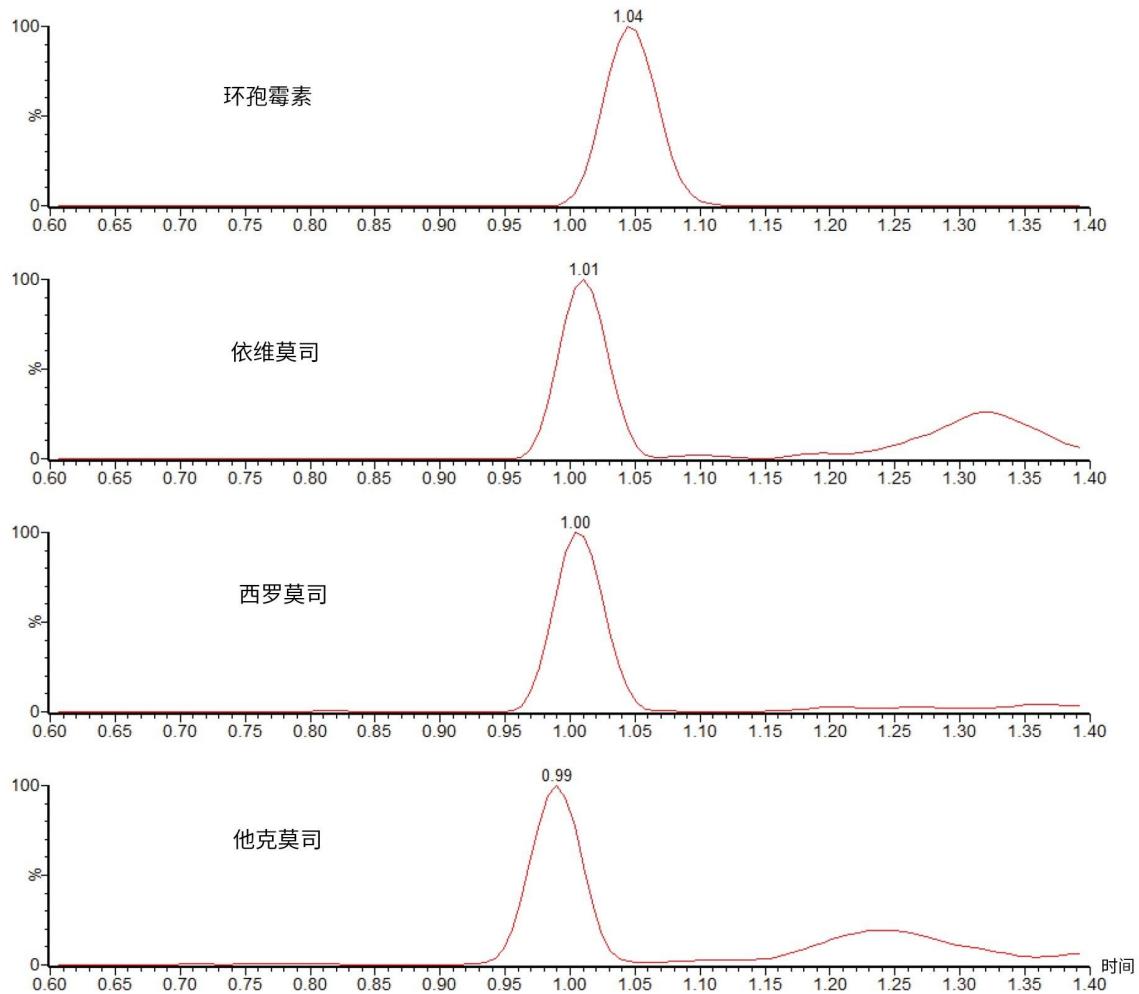


图2. 使用配备FL的ACQUITY UPLC I-Class/ Xevo TQ-S micro IVD系统分析含25 ng/mL环孢霉素以及1 ng/mL依维莫司、西罗莫司和他克莫司的样品得到的色谱图。

分析含3000 ng/mL环孢霉素及60 ng/mL依维莫司、西罗莫司和他克莫司的全血样品后，未观察到系统残留。

在五天内对用全血制备的10个低浓度重复样进行萃取和定量，评估分析灵敏度( $n = 50$ )。考察结果表明，该方法能够在表4所示的浓度下实现精确定量 ( $CV \leq 20\%$ ，偏差 $\leq 15\%$ ）。

分析物	LLMI (ng/mL)	精密度 (%CV)	偏差 (%)
环孢霉素	15.0	7.8	13.3
依维莫司	0.8	16.7	11.3
西罗莫司	0.8	19.4	11.3
他克莫司	1.0	6.3	10.0

表4.分析灵敏度汇总（LLMI是测量区间下限）。

在五天内每天萃取和定量分析三个浓度的全血样品（每个浓度五个重复样，n = 25），以此确定该方法的总精密度。每个QC水平设置五个重复样，以评估方法的重现性。表5显示了这些实验的结果，测得三个浓度水平下的总精密度和重现性为RSD≤8.4%。

分析物	总 QC 精密度 (%CV)			QC 重现性 (%CV)		
	低	中	高	低	中	高
环孢霉素	4.6	4.8	4.7	3.0	2.2	2.5
依维莫司	6.9	4.8	5.6	6.3	2.2	3.5
西罗莫司	8.4	4.8	2.9	6.7	4.4	2.8
他克莫司	5.5	2.8	2.9	4.3	2.4	2.0

表5.总精密度和重现性性能。

将高浓度和低浓度全血混合样品按不同比例混合并进行分析，所得结果表明，该方法在19.3-1500 ng/mL环孢霉素、0.77-39.0 ng/mL依维莫司、西罗莫司和他克莫司的浓度范围内呈线性。

使用空白全血按1:1比例稀释高浓度样品，使得分析物浓度落在方法校准范围内，稀释样品的定量结果偏差≤10.4%。

各QC浓度的回收率（提取效率）范围为93.2%~108.4%。

在低和高QC浓度(n = 5)全血样品中评估基质效应，计算为等量加标浓度提取溶剂样品的百分比。计算基于分析物:内标响应比，以补偿内标造成的信号增强或抑制效应（表6）。

分析物	加标浓度 (ng/mL)	基于峰面积平均值的 基质因子（范围）	基于响应平均值的 基质因子（范围）
环孢霉素	150	0.87 (0.82–0.91)	0.99 (0.99–1.01)
	800	0.87 (0.83–0.91)	0.97 (0.96–0.98)
依维莫司	4	1.36 (1.18–1.45)	0.99 (0.94–1.05)
	22	1.24 (1.14–1.42)	0.97 (0.95–1.00)
西罗莫司	4	1.35 (1.20–1.46)	1.01 (0.95–1.08)
	22	1.19 (1.09–1.31)	0.95 (0.93–0.99)
他克莫司	4	0.94 (0.92–0.97)	1.01 (0.99–1.02)
	22	0.88 (0.86–0.91)	0.97 (0.96–0.99)

表6. 定量基质效应总结。

此外，柱后灌注实验表明，分析物洗脱的区域没有明显的离子增强或抑制。

本研究将高浓度内源性化合物（白蛋白、胆红素、胆固醇、肌酸酐、甘油三酯和尿酸）加标到低浓度和高浓度混合全血样品中（150 ng/mL和900 ng/mL环孢霉素，4 ng/mL和22 ng/mL依维莫司、西罗莫司及他克莫司），然后测定回收率(n=3)，以此评估内源性化合物可能对分析造成的干扰。除加标120 mg/mL白蛋白的样品外，所有回收率均在85%~115%的范围内，加标白蛋白的样品回收率为84.1%~115%。

使用购自LGC（英国伯里）全血外部质量保证样品进行分析，评估方法的准确度。表7中展示了结果总结。

分析物	分析样品数量 (n)	范围 (ng/mL)	与方案 LC-MS ALTM 的 平均偏差百分比
环孢霉素	39	0–2658	+1.0%
依维莫司	35	0–21.9	+0.9%
西罗莫司	33	0–25.7	-11.6%
他克莫司	39	0–23.0	-0.5%

表7. 准确度总结（注：ALTM为实验室检测结果的截尾均值）。

## 结论

本方法可以在两分钟内（进样间隔）一次性同时分析免疫抑制剂药物环孢霉素、依维莫司、西罗莫司和他克莫司

，只需50 μL全血即可完成快速、经济的样品制备程序。

本方法的性能特征表明本方法在所有分析物和测试浓度中都具有良好的分析灵敏度、总体精密度和重现性(≤8.4% RSD)。基质效应可通过使用内标进行补偿，未观察到残留。

此外，在分析EQA样品时获得了良好的一致性，进一步印证了本方法的准确度。

---

## 参考资料

1. Crossart A, Isbel M, Schuder C, Campbell SB, and Staatz CE. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in Relation to Calcineurin Usage in Elderly Kidney Transplant Recipients. *Frontiers in Pharmacology*. April 2021; Volume 12; Article 635165.

---

## 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>>

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

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

720007586ZH, 2022年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

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

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号