

# 在中国心脏移植患者中高效液相色谱串联质谱法和化学发光微粒子免疫分析法测定他克莫司血药浓度的比较

## Quality consistency evaluation for determination of whole – blood tacrolimus concentration in heart – transplant recipients by two methods: High performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method and chemiluminescence microparticle immuno assay

金 瑛, 蒋娟娟, 段 兵,  
黄一玲, 蒋立新, 田 蕾

(北京协和医学院 中国医学科学院 阜外医院 卫计委心血管药物临床研究重点实验室, 北京 100037)

JIN Ying, JIANG Juan – juan,  
DUAN Bing, HUANG Yi – ling,  
JIANG Li – xin, TIAN Lei

(Key Laboratory of Clinical Trial  
Research in Cardiovascular Drugs, Fu  
Wai Hospital, Chinese Academy of  
Medical Sciences, Peking Union Medical  
College, Beijing 100037, China)

收稿日期: 2018 – 03 – 12

修回日期: 2018 – 04 – 11

基金项目: 重大新药创制基金资助项目  
(2012ZX09303 – 008 – 001)

作者简介: 金瑛(1992 – ), 女, 硕士研究生, 主要从事临床药理学和体内药物分析的相关研究

通信作者: 田蕾, 副研究员, 硕士生导师

MP: 13691070380

E – mail: tianlei0807@163.com

**摘要:** 目的 比较高效液相色谱 – 串联质谱法(HPLC – MS/MS)和化学发光微粒子免疫检测技术(CMIA)测定人全血他克莫司(FK506)浓度结果的相关性,以及2种方法在他克莫司浓度监测工作中的应用。方法 收集253例心脏移植患者( $n = 581$ )术后服用他克莫司的全血样本,采用HPLC – MS/MS法测定人全血他克莫司血药浓度,通过专属性、标准曲线与定量下限、精密度、准确度、基质效应和提取回收率以及稳定性试验进行方法学验证;并与CMIA法的测定结果进行比较,观察、比较2种检测手段的测定结果及相关性。结果 用HPLC – MS/MS测定人全血他克莫司浓度,线性范围 $2 \sim 30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,定量下限为 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;日内及日间精密度(RSD%)均小于15%。按照Bland – Altman法计算,95.52%LoA = (0.22, 5.62),95.52%的差值都位于一致限内,两种方法测定值一致性良好。回归方程为 $\text{FK506}_{\text{HPLC – MS/MS}} = 0.70 \times \text{FK506}_{\text{CMIA}} - 0.17$ ,Pearson相关系数为0.902 4( $P < 0.05$ ),说明两种方法具有良好的相关性。结论 HPLC – MS/MS法测定他克莫司血药浓度定量特异性强,灵敏度高。与CMIA法相比,HPLC – MS/MS测定值低,对他克莫司母药有高度的选择性。

**关键词:** 他克莫司; 高效液相色谱 – 串联质谱法; 化学发光微粒子免疫检测技术; 方法学比较

DOI: 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2018.015.047

中图分类号: R978.1 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821(2018)015 – 1902 – 04

**Abstract: Objective** To analyze the correlation between high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry(HPLC – MS/MS) method and chemiluminescence microparticle immuno assay(CMIA) for determination of tacrolimus concentration in human blood, and explore the application of the two methods in clinical therapeutic drug monitoring. **Methods** A total of 253 heart transplant patients( $n = 581$ ) were enrolled. The concentration of tacrolimus in whole blood was determined by HPLC – MS/MS. The specificity, standard curve and quantification limit, precision, accuracy, matrix effect and extraction recovery rate and stability test was performed. CMIA was used simultaneously, the results of two methods were observed and compared. **Results** The linear range by HPLC – MS/MS was  $2 \sim 30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the lower limit of quantification was  $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The intra – and inter – day precision(RSD%) by HPLC – MS/MS was less than 15%. According to the

Bland – Altman method the percentage of the limit can be obtained: 95.52% LoA = (0.22, 5.62). And 95.52% difference value was within the limit and the consistency of the two methods was good. According to the Pearson linear regression analysis the regression equation was  $FK506_{HPLC-MS/MS} = 0.70 \times FK506_{CMIA} - 0.17$  and correlation coefficient was 0.902 4 ( $P < 0.05$ ) with good correlation. **Conclusion** The method of HPLC – MS/MS for the determination of tacrolimus blood concentration shows a high specificity and sensitivity. Compared with the results of CMIA, the measured value by HPLC – MS/MS is low, but HPLC – MS/MS is highly selective for parent drug of tacrolimus.

**Key words:** tacrolimus; high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; chemiluminescence microparticle immuno assay; methodological comparison

他克莫司(FK506)是心脏移植患者的首选免疫抑制药。然而,该药有效血药浓度范围较窄,为了确保合适的暴露量,治疗药物监测是十分必要的<sup>[1-2]</sup>。本文旨在建立 HPLC – MS/MS 法检测人全血他克莫司血药浓度,并与化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)比较,考察两种方法的一致性和差异性,为临床治疗药物监测实验室间能力比对提供参考依据。

## 材料和方法

### 1 材料

他克莫司标准品,含量:98%,批号:104987 – 11 – 3,北京万佳首化生物科技有限公司提供;FK – 506 – <sup>13</sup>C<sub>2</sub>(Major)(内标),含量:85%,批号:2 – TMH – 154 – 2, Sigma – Aldrich 提供。ARCHITECT 普乐可复测定试剂盒(1L77), Abbott IMx 提供。

UFLC prominence 高效液相色谱仪,日本岛津公司产品;API 5500 电喷雾串联四极杆质谱仪, AB Sciex 公司产品。

### 2 研究对象

选取2016年10月10日至2017年4月27日在我院收集的需测定他克莫司血药浓度的心脏移植患者的全血样本581例。由于本研究旨在对2种检测方法测定同一样本的结果的一致性进行评价,因此对病例选择、给药方案、临床诊断等因素无限制要求。样本收集和检测获得阜外医院医学伦理委员会批准。采集受检者空腹静脉血3 mL,置于EDTA抗凝管中,血样采集后立即置于2~8℃冰箱保存。排除污染的样本。

### 3 实验方法

#### 3.1 HPLC – MS/MS 法

色谱条件 色谱柱: Poroshell C<sub>18</sub> (50 mm × 4.6 mm, 4 μm), 流动相 A: 甲醇含0.1%甲酸和2 mmol 醋酸铵, 流动相 B: 水含0.1%甲酸和2 mmol 醋酸铵, 流速为1 mL · min<sup>-1</sup>, 本实验用梯度洗脱, 洗脱方案为: 该系统在20% B 状态下预平衡5 min, 初始状态下使用60% B 的梯度洗脱0.10 min, 然后在0.11 min 改为

30% B, 随后进行线性梯度洗脱在1 min 内升至100% B, 然后在2.30 min 停止。柱温: 40℃。

质谱条件 用电喷雾离子源(ESI), 正离子电离, 多反应监测(MRM)的质谱扫描方式进行检测, 选择检测离子反应对为  $m/z$  821.5 →  $m/z$  768.5 (他克莫司),  $m/z$  824.5 →  $m/z$  579.4 (内标, IS)。喷雾电压(Ion Spray) 5.5 kV; 载气1(GS1) 70 units; 载气2(GS2) 60 units; 气帘气(CUR) 20 units; 去簇电压(DP) 100 eV; 碰撞能量(CE) 25 eV; 碰撞池电压(CXP) 25 eV; 离子源温度500℃。

全血样品处理 用反复冻融3次破碎血细胞, 固相萃取法(SPE)进行样本预处理。固相萃取小柱(Water Oasis HLB)先后用甲醇和纯水各1 mL 活化。在1.5 mL EP 管中, 加入100 μL 全血样品, 200 μL 去离子水稀释, 300 μL 甲醇(含IS 5 ng · mL<sup>-1</sup>) 涡旋混匀15 min, 静置5 min, 以12.5 × 10<sup>3</sup> r · min<sup>-1</sup> 离心5 min, 取上清液加入固相萃取小柱中, 初级洗脱液是2 mL 水, 最终用1 mL 甲醇洗脱。收集终级洗脱液转移至1.5 mL EP 管中, -60℃氮气吹干, 用100 μL 流动相(A: B = 1/1) 溶解, 以12.5 × 10<sup>3</sup> r · min<sup>-1</sup> 离心5 min, 取上清液5 μL 上样。

#### 3.2 CMIA 法

在离心管中加入200 μL 全血样本, 随后加入200 μL ARCHITECT 普乐可复全血沉淀试剂, 涡旋5~10 s, 以12.5 × 10<sup>3</sup> r · min<sup>-1</sup> 离心4 min, 上清液倒入处理管中, 涡旋5~10 s, 装入ARCHITECT 试管架中。

253例( $n = 581$ )接受他克莫司治疗的心脏移植患者全血标本(EDTA抗凝)在接受CMIA分析后, 储存在-20℃直到HPLC – MS/MS分析。

### 4 方法学考察

#### 4.1 HPLC – MS/MS 法方法学考察

专属性 分别取健康人空白全血, 健康人空白全血加他克莫司和他克莫司内标, 患者给药后他克莫司样品, 按“全血样品处理”项下操作, 取上清液进样分析。

标准曲线和定量下限 配制2, 3, 4.5, 9, 18, 30

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的含药全血。按“全血样品处理”操作,他克莫司与内标  $\text{FK} - 506 - ^{13}\text{C}, \text{D}_2$  (Major) 峰面积比值为纵坐标( $y$ ),他克莫司浓度为横坐标( $x$ ),权重系数为  $1/x$ 。

**精密度与回收率** 分别配制3个分析批的全血样品,每一批包含定量下限( $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低( $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中( $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和高质量浓度( $24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的他克莫司含药全血质控各5份,与标准曲线样品同时按“全血样品处理”操作后进样,与同日随行的标曲样品一同进样,考察同批内样品测试的准确度和精密度。另配制低( $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高质量浓度( $24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )2个质量浓度的待测物质控样品各6个,按“全血样品处理”操作,进样测定峰面积;同时取空白全血  $100 \mu\text{L}$ ,按“全血样品处理”后取上清液,分别加入  $5, 24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的他克莫司和内标溶液,进样分析得峰面积。前者的峰面积和后者峰面积均值的比值即为样品的相对提取回收率。

**基质效应** 取6份不同来源空白全血,按“全血样品处理”后取上清液,加入  $5, 24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  2个质量浓度的质控样品和内标,进样分析。用同样体积的纯水代替空白全血,按“全血样品处理”后,进样分析后得峰面积,计算基质效应。

**稳定性** 配制低( $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高质量浓度( $24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的全血质控样品,分别考察样品预处理后室温放置24 h、反复冻融3次、 $-20^\circ\text{C}$  冷冻保存50 d 的稳定性。

#### 4.2 CMIA 法质量控制

每24 h 将所有的质控品各检测1次,以保证所有实测质控值均在有效范围内,表示待测样品他克莫司浓度测定值可靠。

#### 5 统计学处理

用 Bland - Altman 法进行一致性分析。计算原始数据每一个配对的均值与差值,绘制 Bland - Altman 散点图。同时计算95%参考区间(即一致限 LoA)作为参考区域,若有至少95%的散点位于该一致限内,可认为两种方法的一致性较好。用 SPSS 19.0 软件进行 Pearson 线性回归分析两种方法的测定结果。

## 结 果

### 1 方法学评价

#### 1.1 HPLC - MS/MS 法方法学评价

**专属性** 他克莫司和内标  $\text{FK} - 506 - ^{13}\text{C}, \text{D}_2$  (Major) 的保留时间分别为1.75, 1.74 min, 患者给药

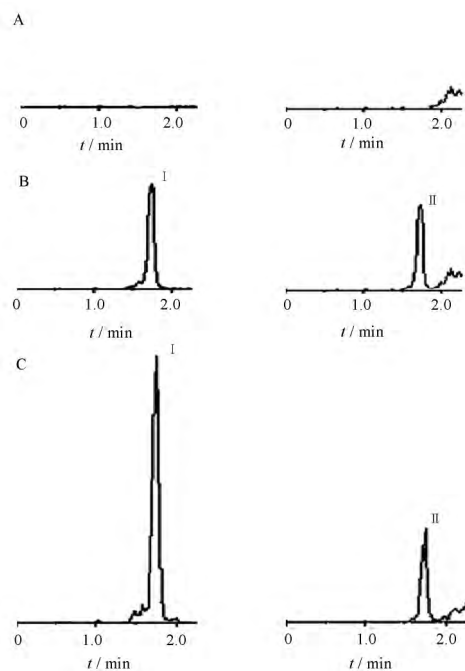


图1 全血中他克莫司浓度的色谱图

Figure 1 Chromatogram of tacrolimus concentration

A: Blank matrix; B: Lower limit of quantitation; C: Unknown sample; I: Tacrolimus; II:  $\text{FK}506 - ^{13}\text{C}, \text{D}_2$

后全血中他克莫司保留时间与标准样品一致,空白全血中的内源性物质不干扰他克莫司和内标的测定,方法专属性好,见图1。

**标准曲线与定量下限** 他克莫司线性方程为  $y = 0.63x + 0.20$  ( $r = 0.9999$ ),在  $2 \sim 30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好,定量下限为  $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**精密度与回收率** 日内标准偏差为  $1.69\% \sim 4.55\%$ ,日间标准偏差为  $3.45\% \sim 7.63\%$ ,绝对回收率可达  $68.50\%$  以上,见表1。

**基质效应** 基质因子的 RSD 均小于  $15\%$ ,基质效应不影响实验结果的测定,见表1。

**稳定性** 低、高质量浓度他克莫司测定结果的均值与理论浓度的偏差均不超过  $\pm 15\%$ 。

#### 1.2 CMIA 法方法学评价

用全自动免疫分析系统及其配套的校准品、人他克莫司试剂盒和质控品进行样品处理和检测。结果 CMIA 法检测他克莫司的检测限  $\leq 1.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。功能灵敏度  $\leq 1.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,精密度总 CV%  $\leq 10\%$ ,平均回收率理论值为  $(100 \pm 10)\%$ 。

#### 2 一致性与相关性分析

按照 Bland - Altman 法计算,95.52% 的差值都位于一致限内,可认为两种方法的一致性较好,见图2。

表 1 他克莫司的精密度、回收率和基质效应

Table 1 Precision, recovery and matrix effect data for the assays of tacrolimus

Concentration ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Intra-day ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \bar{x} \pm s$ )	RSD (%)	Inter-day ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \bar{x} \pm s$ )	RSD (%)	Relative recovery (%)	Matrix effect (%)
2	$1.82 \pm 0.08$	4.55	$1.90 \pm 0.14$	7.63		
5	$5.33 \pm 0.09$	1.69	$5.45 \pm 0.31$	5.61	68.50	99.08
15	$16.76 \pm 0.47$	2.82	$16.70 \pm 0.68$	4.08		
24	$26.84 \pm 1.12$	4.17	$26.33 \pm 0.91$	3.45	76.13	101.40

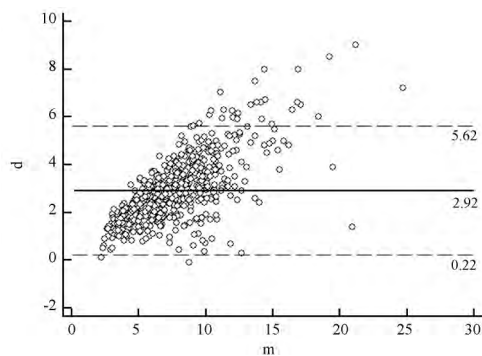
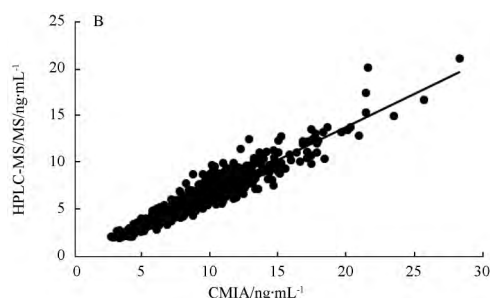


图 2 他克莫司浓度的 Bland - Altman 散点图

Figure 2 Bland - Altman bias plot of tacrolimus blood concentrations

图 3 高效液相色谱 - 串联质谱法 (HPLC - MS/MS) 和化学发光微粒子免疫检测技术 (CMIA) 检测值的相关性 ( $n = 581$ )Figure 3 Correlation of tacrolimus blood concentrations detected by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC - MS/MS) method and chemiluminescence micro-particle immuno assay (CMIA) ( $n = 581$ )

通过 HPLC - MS/MS 法测得的他克莫司平均血药浓度为  $(6.30 \pm 2.69) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n = 581$ ), 通过 CMIA 法测得的他克莫司平均血药浓度为  $(9.21 \pm 3.65) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n = 581$ ), CMIA 法测定值明显高于 HPLC - MS/MS 法, 两种方法差值的平均数为  $(2.91 \pm 1.38) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

进行 Pearson 线性回归分析, 线性回归方程为

$\text{FK506}_{\text{HPLC-MS/MS}} = 0.70 \times \text{FK506}_{\text{CMIA}} - 0.17$ ,  $P < 0.05$ , 相关系数为 0.902 4, 有良好的相关性, 见图 3。

## 讨 论

他克莫司的免疫抑制活性是环孢霉素 50 ~ 100 倍, 在临床上已广泛用于心脏移植术后的免疫抑制治疗; 但他克莫司的治疗窗窄, 其治疗剂量接近于中毒剂量, 要达到预期的药物浓度, 在治疗过程中往往需要对患者进行血药浓度监测<sup>[3]</sup>。CMIA 法和 HPLC - MS/MS 法监测他克莫司血药浓度各有优缺点。CMIA 操作简便, 重复性好; 但反应过程复杂, 平台价格昂贵、试剂盒成本高。HPLC - MS/MS 法有低成本、高准确度、特异性强、通量高等优点, 但是目前还不是他克莫司的常规监测方法, 一方面因为仪器比较贵, 一般实验室难以普及; 更主要的原因是 HPLC - MS/MS 法目前缺乏一个商业化的规范操作规程, 使得此方法无法得到广大医师的认可<sup>[4]</sup>。

## 参考文献:

- [1] PARK J S, CHO H R, KANG M J, *et al.* A rapid and sensitive method to determine tacrolimus in rat whole blood using liquid - liquid extraction with mild temperature ultrasonication and LC - MS/MS [J]. *Arch. Pharm Res*, 2016, 39(1): 73 - 82.
- [2] ZHANG Y F, CHEN X Y, DAI X J, *et al.* Pharmacokinetics of tacrolimus converted from twice - daily formulation to once - daily formulation in Chinese stable liver transplant recipients [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(11): 1419 - 1423.
- [3] 戴立波, 杨宏昕, 韩晓芳, 等. 他克莫司治疗药物监测与合理用药分析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(57): 109 - 112.
- [4] 李鹏飞, 刘丽宏, 马萍, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法在他克莫司临床血药浓度监测中的应用 [J]. *质谱学报*, 2008, 29(3): 137 - 143.

( 本文编辑 谢菁菁 )