



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110554123 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910856932.9

(22)申请日 2019.09.11

(71)申请人 深圳华大临床检验中心

地址 518083 广东省深圳市盐田区盐田街
道北山工业区11栋1、3、4、5楼

(72)发明人 云莉芬 廖云莉 饶维桥 任艳
警金 林梁

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 李小焦 彭家恩

(51)Int.Cl.

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/88(2006.01)

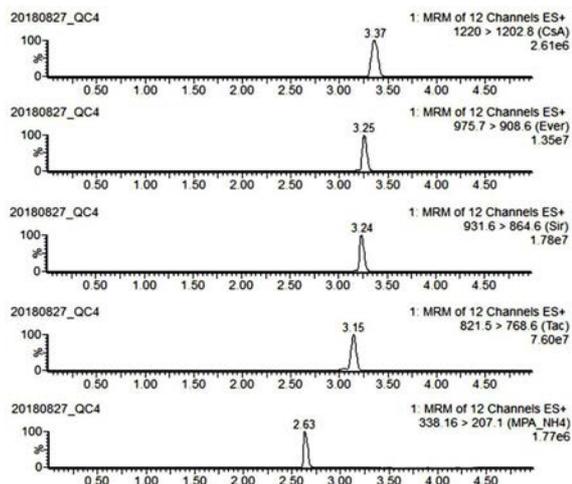
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法、试剂盒及其应用

(57)摘要

本申请公开了一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法、试剂盒及其应用。本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法包括对待测全血样品进行样本处理,然后进行液相色谱串联质谱法检测,实现同时检测五种免疫抑制剂;样本处理包括向待测全血样品中加入沉淀剂1进行第一次沉淀处理,再加入沉淀剂2进行第二次沉淀处理,离心,获取上清液;沉淀剂1为硫酸锌溶液,沉淀剂2为含已知量内标准品的甲醇乙腈溶液,内标准品包括环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标。本申请的方法和试剂盒,仅需少量全血样品就能一次性检测常涉及使用的五种免疫抑制剂,且方法简单、易操作,为制订个体化给药方案提供了参考依据。



1. 一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法,其特征在于:包括对待测全血样品进行样本处理,然后对样本处理的产物进行液相色谱串联质谱法检测,实现同时检测待测全血样品中的环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司和霉酚酸;

所述样本处理包括向待测全血样品中加入沉淀剂1进行第一次沉淀处理,然后再向其中加入沉淀剂2进行第二次沉淀处理,对第二次沉淀处理的产物进行离心,获取上清液,即完成所述样本处理;所述上清液用于后续的液相色谱串联质谱法检测;

所述沉淀剂1为硫酸锌溶液,所述沉淀剂2为含已知量内标准品的甲醇乙腈溶液,所述内标准品包括环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述硫酸锌溶液的浓度为0.05mol/L~0.15mol/L,所述甲醇乙腈溶液中甲醇的浓度为50%,所述沉淀剂2中内标准品的浓度为:环孢霉素同位素内标10ng/mL、依维莫司同位素内标0.5ng/mL、西罗莫司同位素内标1.2ng/mL、霉酚酸同位素内标10ng/mL。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述第一次沉淀处理的条件为涡旋混匀3~5分钟,所述第二次沉淀处理的条件为涡旋混匀5~15分钟,所述离心的条件为4000~4680rpm离心25~30分钟。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于:所述液相色谱串联质谱法中,流动相包括流动相A和流动相B;

流动相A由去离子水、乙酸铵和甲酸按体积比500:0.2:0.5混合而成;

流动相B由甲醇、乙酸铵和甲酸按体积比500:0.2:0.5混合而成;

优选的,所述液相色谱串联质谱法中,按照表1所示的洗脱梯度表进行梯度洗脱,

表1

洗脱时间 (分钟)	流速	流动相 A (体积%)	流动相 B (体积%)
初始	0.5mL/分钟	90	10
0.5	0.5mL/分钟	90	10
3.0	0.5mL/分钟	5	95
4	0.5mL/分钟	5	95
4.1	0.5mL/分钟	90	10
5.00	0.5mL/分钟	90	10

优选的,所述液相色谱串联质谱法中,色谱条件为,柱温50℃、样品池温度8℃、进样体积10.0μL。

5. 一种全血样品的样本处理方法,其特征在于:包括依序对待测全血样品进行第一次沉淀处理、第二次沉淀处理,然后对第二次沉淀处理的产物进行离心,获取上清液,即完成所述样本处理;所述上清液用于后续的液相色谱串联质谱法检测;

所述第一次沉淀处理包括,向待测全血样品中加入沉淀剂1进行3~5分钟的涡旋混匀;

所述第二次沉淀处理包括,向所述第一次沉淀处理的产物中加入沉淀剂2进行5~15分钟的涡旋混匀;

所述沉淀剂1为硫酸锌溶液,所述沉淀剂2为含已知量内标准品的甲醇乙腈溶液,所述内标准品包括环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标。

6. 根据权利要求5所述的样本处理方法,其特征在于:所述硫酸锌溶液的浓度为0.05~0.15mol/L,所述甲醇乙腈溶液中甲醇的浓度为50%,所述沉淀剂2中内标准品的浓度为环孢霉素同位素内标10ng/mL、依维莫司同位素内标0.5ng/mL、西罗莫司同位素内标1.2ng/mL、霉酚酸同位素内标10ng/mL。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于:所述离心的条件为4000~4680rpm离心25~30分钟。

8. 一种快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒,其特征在于:包括沉淀剂1、沉淀剂2溶剂、内标准品、标准曲线样品、质控样品、流动相添加剂A、流动相添加剂B和质量保证品;

所述沉淀剂1为硫酸锌溶液;所述沉淀剂2溶剂为甲醇乙腈溶液;

所述内标准品包含环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标;

所述标准曲线样品为若干个全血样品,每个全血样品中都同时含有五种免疫抑制剂,并且若干个全血样品中的各免疫抑制剂形成梯度浓度;

所述质控样品分别为低浓度全血样品、中浓度全血样品和高浓度全血样品,其中,低浓度、中浓度和高浓度是指全血样品中五种免疫抑制剂的浓度;

所述流动相添加剂A为乙酸铵,所述流动相添加剂B为甲酸;

所述质量保证品包含五种免疫抑制剂的纯标准品;

所述标准曲线样品、所述质控样品和所述质量保证品中,五种免疫抑制剂为环孢霉素A、他克莫司、依维莫司、西罗莫司和霉酚酸;

优选的,所述低浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为16~24ng/mL、依维莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、西罗莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、他克莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、霉酚酸的浓度为80~120ng/mL;所述中浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为80~120ng/mL、依维莫司的浓度为8~12ng/mL、西罗莫司的浓度为8~12ng/mL、他克莫司的浓度为8~12ng/mL、霉酚酸的浓度为800~1200ng/mL;所述高浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为160~240ng/mL、依维莫司的浓度为16~24ng/mL、西罗莫司的浓度为16~24ng/mL、他克莫司的浓度为16~24ng/mL、霉酚酸的浓度为6400~9600ng/mL。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于:还包括96孔板和相应的铝箔封口膜;优选的,所述96孔板为350 μ L的V型底96孔板。

10. 根据权利要求1-4任一项所述的方法,或权利要求8或9所述的试剂盒在五种免疫抑制剂检测中的应用,所述五种免疫抑制剂为环孢霉素A、他克莫司、依维莫司、西罗莫司和霉酚酸。

一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法、试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及免疫抑制剂检测技术领域,特别是涉及一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法、试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 免疫抑制剂是一类通过抑制细胞及体液免疫反应而使组织损伤得以减轻的化学或生物物质,可抑制机体异常的免疫反应,主要应用于器官移植抗排斥反应和自身免疫性疾病的治疗。自20世纪70年代免疫抑制剂发展以来,目前临床正在应用的免疫抑制剂基本上可以划分为五大类:第一类为细胞因子抑制剂,如环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司等;第二类是DNA合成抑制剂,如硫唑嘌呤、霉酚酸、咪唑立宾等;第三类是糖皮质激素类,如泼尼松、甲泼尼松等;第四类为抗淋巴细胞抗体,如抗淋巴细胞球蛋白、抗胸腺球蛋白等;第五类为其他免疫抑制剂,如AEB071、FTY720等。免疫抑制剂可通过影响机体的免疫应答反应和免疫病理反应来抑制机体的免疫功能,不同的免疫抑制剂作用于淋巴细胞激活的不同时期,可发挥协同作用,目前临床上也多采用联合用药的方法来提高治疗方案的整体有效性和安全性。例如,细胞因子抑制剂(环孢霉素A/他克莫司)+霉酚酸酯+糖皮质激素(泼尼松/泼尼松龙)组成的三联疗法是目前权威的器官移植免疫抑制治疗用药方案;其中霉酚酸酯在体内迅速吸收并代谢为活性成分霉酚酸,泼尼松经肝内代谢为泼尼松龙产生药效。由于免疫抑制剂这类药物治疗窗窄,药动学个体差异较大,当其用量过大时,可能引起严重的毒性反应;用量不足时,患者将发生免疫排斥反应,因此需进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),获得更为完整的治疗用药信息,便于调整个体化给药方案。其中,传统观点认为糖皮质激素的治疗窗较宽,并且泼尼松龙的生物半衰期比血浆半衰期长,血浆浓度并不能很好的反应药物治疗效的疗效性和毒性,不必要进行TDM。因此,除了泼尼松龙外,需对常用的5种免疫抑制剂药物环孢霉素A(CsA)、他克莫司(Tac)、西罗莫司(Sir)、依维莫司(Ever)、霉酚酸(MPA)进行TDM,以确保药物治疗的安全性和有效性。

[0003] 目前,免疫抑制剂的定量分析方法主要有免疫法、高效液相色谱法(HPLC-UV)和液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)。免疫法由于本身方法的限制,专属性相对较差,每次仅能够测定一种分析物,方法结果差异性较大,因此,在临床和TDM方面可靠性差,且单位样本测定费用高。高效液相色谱法由于其方法本身和检测器的限制,仅能够针对一种或几种分析物的测定,且方法本身的检测限较高,无法对含量极低的分析物进行准确定量。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)可以同时多种分析物进行精准的定量,满足临床和TDM对免疫抑制剂的精准检测,具有高通量、快速、低成本的特点,国内外也已有使用LC-MS/MS检测全血中免疫抑制剂浓度的相关报道和产品。例如,德国的Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH公司已经出售LC-MS/MS检测全血中四种免疫抑制剂的试剂盒,这四种免疫抑制剂包括CsA、Tac、Sir、Ever。国内,美康生物科技股份有限公司也披露了基于LC-MS/MS的“准确测定人全血中四种免疫抑制剂类药物浓度的试剂盒及检测方法”;其中,四种免疫抑制剂类药物也是CsA、Tac、Sir和Ever。

[0004] 因此,总的来说,现有的全血多种免疫抑制剂检测方法都只能有效检测CsA、Tac、Sir和Ever四种免疫抑制剂,没有能够同时检测CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂的方法,无法对常涉及使用的五种免疫抑制剂同时进行治疗药物监测,难以满足临床使用需求。

发明内容

[0005] 本申请的目的是提供一种新的能同时检测五种免疫抑制剂的快速检测全血中免疫抑制剂的方法,该方法使用的试剂盒,以及本申请方法和试剂盒的应用。

[0006] 本申请采用了以下技术方案:

[0007] 本申请的一方面公开了一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法,包括对待测全血样品进行样本处理,然后对样本处理的产物进行液相色谱串联质谱法检测,实现同时检测待测全血样品中的环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司和霉酚酸;样本处理包括向待测全血样品中加入沉淀剂1进行第一次沉淀处理,然后再向其中加入沉淀剂2进行第二次沉淀处理,对第二次沉淀处理的产物进行离心,获取上清液,即完成样本处理;上清液用于后续的液相色谱串联质谱法检测;沉淀剂1为硫酸锌溶液,沉淀剂2为含已知量内标准品的甲醇乙腈溶液,内标准品包括环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标。

[0008] 本申请中,由于他克莫司在前处理制备和质谱检测过程中比较稳定,受干扰较小,使用外标法定量,其检测结果均满足要求。在满足检测要求的条件下,使用外标法定量他克莫司,能减少样本检测的成本。因此,本申请的内标准品中可以不包含他克莫司内标。

[0009] 需要说明的是,本申请的全血中免疫抑制剂检测方法,通过对待测全血样品进行样本处理,使用蛋白沉淀的方法分离待测全血样品中的目标分析物,无需复杂的净化提纯步骤,使得待测全血样品中的目标分析物得以最大程度的保留,因此,仅需少量待测全血样品即可实现检测。并且,利用液相色谱串联质谱法高通量精准检测的优点,实现了CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂的同时检测,能够对常涉及使用的五种免疫抑制剂同时进行治疗药物监测,满足临床使用需求。

[0010] 可以理解,本申请的全血中免疫抑制剂检测方法中,样本处理为五种免疫抑制剂的同时检测奠定了基础;至于后续的液相色谱串联质谱法检测,可以参考常规的液相色谱串联质谱法检测;但是,为了确保五种免疫抑制剂的检测质量和效率,本申请优选的方案中对液相色谱串联质谱法的部分关键条件进行了详细说明,详见以下技术方案。

[0011] 优选的,硫酸锌溶液的浓度为0.05~0.15mol/L,甲醇乙腈溶液中甲醇的浓度为50%,沉淀剂2中内标准品的浓度为:环孢霉素同位素内标10ng/mL、依维莫司同位素内标0.5ng/mL、西罗莫司同位素内标1.2ng/mL、霉酚酸同位素内标10ng/mL。

[0012] 需要说明的是,硫酸锌溶液的作用是使蛋白质沉淀,一般硫酸锌的工作液浓度为0.1mol/L,例如本申请的一种实现方式中,将等体积的0.1mol/L硫酸锌溶液加入到待测全血样品中进行处理。沉淀剂2中,内标准品是在前处理步骤中加入,与待测全血样品一起进行制备,可以弥补待测全血样品提取、HPLC进样及色谱分离、离子化和检测中产生的偏差,也可校正基质效应的影响,可以理解,内标准品的浓度以所采用的检测设备的较佳检测浓度为准。

[0013] 优选的,第一次沉淀处理的条件为涡旋混匀3~5分钟,第二次沉淀处理的条件为涡旋混匀5~15分钟,离心的条件为4000~4680rpm离心25~30分钟。

[0014] 优选的,液相色谱串联质谱法中,流动相包括流动相A和流动相B;流动相A由去离子水、乙酸铵和甲酸按体积比500:0.2:0.5混合而成;流动相B由甲醇、乙酸铵和甲酸按体积比500:0.2:0.5混合而成。

[0015] 需要说明的是,流动相是确保各种目标分析物能够被有效分离和被检测到的基础,虽然本申请的检测方法中采用的样本处理使得待测对象中最大限度的保留了五种免疫抑制剂,但是,为了确保五种免疫抑制剂能够更有效的被区分检测,本申请特别研发了由流动相A和流动相B组成的流动相。

[0016] 优选的,液相色谱串联质谱法中,按照表1所示的洗脱梯度表进行梯度洗脱,

[0017] 表1

洗脱时间(分钟)	流速	流动相A(体积%)	流动相B(体积%)
初始	0.5mL/分钟	90	10
0.5	0.5mL/分钟	90	10
3.0	0.5mL/分钟	5	95
4	0.5mL/分钟	5	95
4.1	0.5mL/分钟	90	10
5.00	0.5mL/分钟	90	10

[0019] 优选的,液相色谱串联质谱法中,色谱条件为,柱温50℃、样品池温度8℃、进样体积10.0μL。

[0020] 需要说明的是,虽然本申请特别研发了由流动相A和流动相B组成的流动相,但是为了进一步保障液相色谱串联质谱法对五种免疫抑制剂的检测质量和效率,本申请进一步的研发了一种新的梯度洗脱方案,即表1所示的梯度洗脱;并对柱温、样品池温度和进样体积等都进行了详细限定。

[0021] 本申请的另一面公开了一种全血样品的样本处理方法,包括依序对待测全血样品进行第一次沉淀处理、第二次沉淀处理,然后对第二次沉淀处理的产物进行离心,获取上清液,即完成样本处理;上清液用于后续的液相色谱串联质谱法检测;第一次沉淀处理包括,向待测全血样品中加入沉淀剂1进行3~5分钟的涡旋混匀;第二次沉淀处理包括,向第一次沉淀处理的产物中加入沉淀剂2进行5~15分钟的涡旋混匀;沉淀剂1为硫酸锌溶液,沉淀剂2为含已知量内标准品的甲醇乙腈溶液,内标准品包括环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标。

[0022] 需要说明的是,本申请的样本处理方法实际上就是本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法中的样本处理方案;可以理解,基于本申请的样本处理方法,能够最大限度的保留待测全血样品中的CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂,为后续的检测奠定了基础;至于液相色谱串联质谱法只是本申请的一种实现方式中采用的检测方案,在本申请的样本处理方法基础上,不排除还可以采用其它检测方案实现五种免疫抑制剂的检测。

[0023] 优选的,本申请的样本处理方法中,硫酸锌溶液的浓度为0.05~0.15mol/L,甲醇乙腈溶液中甲醇的浓度为50%,沉淀剂2中内标准品的浓度为:环孢霉素A同位素内标10ng/mL、依维莫司同位素内标0.5ng/mL、西罗莫司同位素内标1.2ng/mL、霉酚酸同位素内标

10ng/mL。

[0024] 优选的,本申请的样本处理方法中,离心的条件为4000~4680rpm离心25~30分钟。

[0025] 本申请的再一面公开了一种快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒,包括沉淀剂1、沉淀剂2溶剂、内标准品、标准曲线样品、质控样品、流动相添加剂A、流动相添加剂B和质量保证品(缩写QA);

[0026] 沉淀剂1为硫酸锌溶液;沉淀剂2溶剂为甲醇乙腈溶液;其中,沉淀剂2溶剂用于制备沉淀剂2,具体的,根据需求向沉淀剂2溶剂中加入本申请试剂盒中的内标准品即制备获得沉淀剂2;

[0027] 内标准品包含环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标;本申请的一种实现方式中,内标准品是由环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标,四者的干粉组成,并且,环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标和霉酚酸同位素内标的重量比为10:0.5:1.2:10,内标准品复溶后按比例添加到甲醇乙腈溶液中制成沉淀剂2;

[0028] 标准曲线样品为若干个全血样品,每个全血样品中都同时含有五种免疫抑制剂,并且若干个全血样品中的各免疫抑制剂形成梯度浓度;标准曲线样品用于绘制标准曲线,以便于定量分析检测,其中,各免疫抑制剂形成梯度浓度,例如在7个全血样品中CsA以2倍、5倍或10倍的梯度浓度存在于各全血样品中,2倍梯度浓度时,例如在7个全血样品中CsA的浓度依序为20ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL、320ng/mL、640ng/mL、1280ng/mL;梯度浓度可以是成倍的浓度递增或递减,也可以是等比或其它方式递增或递减,梯度浓度的范围以最低浓度和最高浓度能够覆盖有效检测范围为准,在此不作具体限定;本申请中,若干个全血样品,其具体数量可以根据所需要的浓度梯度范围而定;对于相同的浓度梯度范围,标准曲线样品数量越多,即相邻浓度梯度的差越小,或者说单位梯度内标准曲线样品数量越多,则制备的标准曲线越准确,可以理解,标准曲线是以各浓度梯度的标准曲线样品的检测值为点进行拟合得到的曲线,检测值越多拟合曲线就越接近真实情况,但是相应的成本也会增加,因此本申请一般3-7个浓度梯度的标准曲线样品即可满足检测需求;其它免疫抑制剂的梯度浓度与CsA类似,具体的浓度递增或递减方式可以相同或不同,在此不作具体限定;

[0029] 质控样品分别为低浓度全血样品、中浓度全血样品和高浓度全血样品,其中,低浓度、中浓度和高浓度是指全血样品中五种免疫抑制剂的浓度;

[0030] 流动相添加剂A为乙酸铵,流动相添加剂B为甲酸;

[0031] QA包含五种免疫抑制剂的纯标准品;

[0032] 标准曲线样品、质控样品和QA中,五种免疫抑制剂为环孢霉素A、他克莫司、依维莫司、西罗莫司和霉酚酸。

[0033] 本申请的试剂盒中,内标准品是在前处理步骤中加入,与待测全血样品一起进行制备,可以弥补待测全血样品提取、HPLC进样及色谱分离、离子化和检测中产生的偏差,也可校正基质效应的影响。质量保证品不需经过前处理制备步骤,在分析待测全血样品前,需要先测试分析QA,确保系统性能和含量测定能够满足要求。

[0034] 需要说明的是,本申请的试剂盒实际上就是本申请快速检测全血中免疫抑制剂的

方法中采用的试剂,例如沉淀剂2溶剂用于制备沉淀剂2,沉淀剂1和沉淀剂2用于进行样本处理;流动相添加剂A和流动相添加剂B用于制备流动相A和流动相B,本申请的一种实现方式中,流动相A由去离子水、流动相添加剂A和流动相添加剂B按体积比500:0.2:0.5混合而成;流动相B由甲醇、流动相添加剂A和流动相添加剂B按体积比500:0.2:0.5混合而成;标准曲线样品用于定量分析,质控样品用于确保检测的正常进行,内标准品和QA用于参考分析。可以理解,硫酸锌溶液、甲醇乙腈溶液、内标准品、标准曲线样品、质控样品、乙酸铵和甲酸都可以通过市场购买,内标准品是分别购买五种免疫抑制剂同位素内标后自行配置,本申请为了使用方便并确保五种免疫抑制剂的检测质量,将其组装成快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒。

[0035] 优选的,本申请的试剂盒中,低浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为16~24ng/mL、依维莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、西罗莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、他克莫司的浓度为1.6~2.4ng/mL、霉酚酸的浓度为80~120ng/mL;中浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为80~120ng/mL、依维莫司的浓度为8~12ng/mL、西罗莫司的浓度为8~12ng/mL、他克莫司的浓度为8~12ng/mL、霉酚酸的浓度为800~1200ng/mL;高浓度全血样品中环孢霉素A的浓度为160~240ng/mL、依维莫司的浓度为16~24ng/mL、西罗莫司的浓度为16~24ng/mL、他克莫司的浓度为16~24ng/mL、霉酚酸的浓度为6400~9600ng/mL。

[0036] 优选的,本申请的试剂盒中还包括96孔板和相应的铝箔封口膜。优选的,96孔板为350 μ L的V型底96孔板。

[0037] 本申请的再一面还公开了本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法,或本申请快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒在五种免疫抑制剂检测中的应用,这五种免疫抑制剂为环孢霉素A、他克莫司、依维莫司、西罗莫司和霉酚酸。

[0038] 可以理解,本申请的快速检测全血中免疫抑制剂的方法和试剂盒,不仅能用于全血中五种免疫抑制剂的检测,也可以应用于其它的需要同时或者分别检测五种免疫抑制剂的情况。

[0039] 本申请的有益效果在于:

[0040] 本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法和试剂盒,仅需约40微升的全血样品就能够一次性检测常涉及使用的五种免疫抑制剂,且本申请方法简单、易操作,能够有效的检测五种免疫抑制剂的血药浓度,为制订个体化给药方案提供了参考依据。

附图说明

[0041] 图1是本申请实施例五种免疫抑制剂的色谱图。

具体实施方式

[0042] 现有技术中虽然已经有采用液相色谱串联质谱法检测CsA、Tac、Sir和Ever四种免疫抑制剂的研究报道和产品,但是,由于临床上常涉及使用的免疫抑制剂有五种,即CsA、Tac、Sir、Ever和MPA;现有技术的检测方案由于其设计和样本处理原因,不能直接实现CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂的同时检测。

[0043] 本申请创造性的提出CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂同时检测,将目标分析物由四种增加至五种,并非简单的随意增减目标分析物,需要发明人具备丰富的专业

知识和优秀的科研能力,开发能较好分离各种化合物的液相色谱方法及检测化合物的MRM质谱方法,克服待测化合物难分离,检测时间长等困难,解决现有技术不能同时检测全血中五种免疫抑制剂的难题。

[0044] 基于以上认识,本申请研发了一种快速检测全血中免疫抑制剂的方法,首先对样本处理进行改进,为五种免疫抑制剂的同时检测提供基础,使得液相色谱串联质谱法检测五种免疫抑制剂得以实现;在进一步的改进方案中,本申请还对流动性进行优化,并进一步优化改进梯度洗脱方案,确保五种免疫抑制剂的检测质量和效率。

[0045] 本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法,与现有的免疫分析法相比,单位样本检测成本更低,检测结果更准确;与HPLC法相比,样品处理更简便,灵敏度更高;与现有的LC-MS/MS方法相比,检测的指标更多更全面,能同时检测环孢霉素A、他克莫司、西罗莫司、依维莫司和霉酚酸这五种免疫抑制剂。因此,本申请检测方法具有单样本多指标同步检测功能,具有高灵敏度、高通量、高时效等特点。

[0046] 在本申请快速检测全血中免疫抑制剂的方法的基础上,本申请进一步的将检测方法中使用的试剂组装成一种快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒,以方便使用。

[0047] 下面通过具体实施例对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

[0048] 实施例

[0049] 本例用于快速检测全血中免疫抑制剂的试剂盒,其组成如表2所示。

[0050] 表2试剂盒组成

组成部分	数量	主要成分
内标准品	1瓶	含环孢霉素A同位素内标、依维莫司同位素内标、西罗莫司同位素内标、霉酚酸同位素内标的干粉
标准曲线样品 (blank cal1-cal7)	1套	含有五种免疫抑制剂的全血
质控样品 (低、中、高)	1套	含有五种免疫抑制剂的全血
流动相添加剂A	1瓶	乙酸铵
流动相添加剂B	1瓶	甲酸
QA	1瓶	含有五种免疫抑制剂纯标准品的干粉
沉淀剂1	1瓶	硫酸锌溶液
沉淀剂2溶剂	1瓶	甲醇乙腈溶液
V型底96孔板 (350 μ L)	2块	
铝箔封口膜	2张	
操作说明书	1份	

[0051] 表2中,1瓶内标准品干粉包含4种分析物同位素内标,即环孢霉素A同位素内标干粉200ng、依维莫司同位素内标干粉10ng、西罗莫司同位素内标干粉24ng、霉酚酸同位素内标干粉200ng。

[0052] 表2中,1套标准曲线样品包括不含CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂的全血样品200微升,即blank;以及7个同时含有五种免疫抑制剂的梯度浓度全血样品,即cal1至cal7,各全血样品100微升。其中,cal1全血样品中CsA的浓度为5ng/mL、Tac的浓度为0.5ng/mL、Sir的浓度为0.5ng/mL、Ever的浓度为0.5ng/mL、MPA的浓度为50ng/mL;cal2全血样品中CsA的浓度为25ng/mL、Tac的浓度为2.5ng/mL、Sir的浓度为2.5ng/mL、Ever的浓度为

2.5ng/mL、MPA的浓度为250ng/mL;cal3全血样品中CsA的浓度为50ng/mL、Tac的浓度为5ng/mL、Sir的浓度为5ng/mL、Ever的浓度为5ng/mL、MPA的浓度为500ng/mL;cal4全血样品中CsA的浓度为100ng/mL、Tac的浓度为10ng/mL、Sir的浓度为10ng/mL、Ever的浓度为10ng/mL、MPA的浓度为1000ng/mL;cal5全血样品中CsA的浓度为250ng/mL、Tac的浓度为25ng/mL、Sir的浓度为25ng/mL、Ever的浓度为25ng/mL、MPA的浓度为2500ng/mL;cal6全血样品中CsA的浓度为500ng/mL、Tac的浓度为50ng/mL、Sir的浓度为50ng/mL、Ever的浓度为50ng/mL、MPA的浓度为5000ng/mL;cal7全血样品中CsA的浓度为1000ng/mL、Tac的浓度为100ng/mL、Sir的浓度为100ng/mL、Ever的浓度为100ng/mL、MPA的浓度为10000ng/mL。

[0054] 表2中,1套质控样品包括低浓度全血样品100微升、中浓度全血样品500微升和高浓度全血样品100微升。其中,低浓度全血样品中CsA的浓度为20ng/mL、Tac的浓度为2ng/mL、Sir的浓度为2ng/mL、Ever的浓度为2ng/mL、MPA的浓度为100ng/mL;中浓度全血样品中CsA的浓度为100ng/mL、Tac的浓度为10ng/mL、Sir的浓度为10ng/mL、Ever的浓度为10ng/mL、MPA的浓度为1000ng/mL;高浓度全血样品中CsA的浓度为200ng/mL、Tac的浓度为20ng/mL、Sir的浓度为20ng/mL、Ever的浓度为20ng/mL、MPA的浓度为8000ng/mL。

[0055] 表2中,1瓶流动相添加剂A的体积为0.5mL,1瓶流动相添加剂B的体积为1.5mL。QA为包含五种免疫抑制剂纯标准品的干粉;其中CsA的浓度为10ng/mL、Tac的浓度为10ng/mL、Sir的浓度为10ng/mL、Ever的浓度为10ng/mL、MPA的浓度为10ng/mL。1瓶沉淀剂1的体积为5mL。1瓶沉淀剂2溶剂的体积为15mL,其中甲醇和乙腈的体积比为1:1。

[0056] 操作说明书中记载了本例试剂盒的使用方法,即本例的快速检测全血中免疫抑制剂的方法,具体如下:

[0057] (1) 工作液配置

[0058] a、准备内标准品溶液:取0.5mL甲醇加入到内标准品小瓶中进行复溶,制成环孢霉素同位素内标400ng/mL、依维莫司同位素内标20ng/mL、西罗莫司同位素内标48ng/mL、霉酚酸同位素内标400ng/mL的内标准品溶液;

[0059] b、配置沉淀剂2,即含内标准品的甲醇乙腈溶液,具体的,上述准备好的内标准品溶液0.3mL添加到11.7mL的沉淀剂2溶剂中,混合均匀,即获得本例的沉淀剂2。在沉淀剂2配置中,内标准品溶液被稀释了40倍,即沉淀剂2中含有的内标浓度为:环孢霉素同位素内标10ng/mL、依维莫司同位素内标0.5ng/mL、西罗莫司同位素内标1.2ng/mL、霉酚酸同位素内标10ng/mL。

[0060] (2) 样本处理

[0061] 避光,取待测全血样品40 μ L,加入40 μ L沉淀剂1,即0.1M的硫酸锌溶液,然后铝膜热封,涡旋混匀3分钟;再加入120 μ L沉淀剂2,铝膜热封,涡旋混匀10分钟;然后4000rpm离心30分钟,获取上清液,即完成样本处理。

[0062] 将100 μ L上清液转移到新的96孔板中,封膜,LC-MS/MS系统进样分析。

[0063] (3) 上机检测

[0064] 配制流动相A:500mL去离子水中加入200 μ L流动相添加剂A和0.5mL流动相添加剂B;

[0065] 配制流动相B:500mL甲醇中加入200 μ L流动相添加剂A和0.5mL流动相添加剂B;

[0066] 另外,用50%甲醇水500 μ L将QA复溶,采用QA检测系统的适配性。

[0067] (a) 色谱条件

[0068] 本例采用超高效液相色谱:WatersACQUITYi-classUPLC液相系统

[0069] 色谱柱:ACEExcel2C18-PFP2 μ m色谱柱(2.1 \times 50mm)

[0070] 柱温:50 $^{\circ}$ C

[0071] 样品池温度:8 $^{\circ}$ C

[0072] 进样体积:10.0 μ L

[0073] 洗脱梯度如表1所示:

[0074] 表1

[0075]

洗脱时间(分钟)	流速	流动相A(体积%)	流动相B(体积%)	Curve
初始	0.5mL/分钟	90	10	初始
0.5	0.5mL/分钟	90	10	6
3.0	0.5mL/分钟	5	95	6
4	0.5mL/分钟	5	95	6
4.1	0.5mL/分钟	90	10	6
5.00	0.5mL/分钟	90	10	6

[0076] (b) 质谱条件

[0077] 质谱检测的基本设备和配置信息如表3所示,离子对信息如表4所示。

[0078] 表3质谱条件

[0079]

Source Gas Parameters			
MS 方法	MRM	离子源	ESI+
Capillary (kV)	1.2	Desolvation Temp ($^{\circ}$ C)	400
Cone (V)	MRM 方法	Cone gas (L/hr)	120
Source Offset (V)	50	Desolvation (L/Hr)	900

[0080] 表4离子对信息

Compound	Transition	Dwell, s	Cone, V	Collision energy, eV	保留时间 (min)
MPA	338.16>303.19	Auto Dwell	15	10	2.62
	338.16>207.1*	Auto Dwell	15	7	
	338.16>275.19	Auto Dwell	15	5	
Tac	821.5>576.3	Auto Dwell	30	20	3.15
	821.5>768.6*	Auto Dwell	30	20	
Sir	931.6>864.4*	Auto Dwell	30	11	3.23
	931.6>882.6	Auto Dwell	30	13	
Ever	975.7>908.6*	Auto Dwell	30	18	3.25
	975.7>926.6	Auto Dwell	30	11	
CsA	1220.0>1184.7	Auto Dwell	30	31	3.37
	1220.0>1202.8*	Auto Dwell	30	21	
MPA-IS	341.2006>210.14*	Auto Dwell	15	10	2.62
	341.2006>278.23	Auto Dwell	15	7	
CsA-IS	1225.80>1190.6	Auto Dwell	20	31	3.37
	1225.80>1208.9*	Auto Dwell	20	21	
Ever-IS	979.53>930.4	Auto Dwell	26	11	3.25
	979.53>912.717*	Auto Dwell	26	16	
Sir-IS	1051.568>996.7	Auto Dwell	46	16	3.23
	1051.568>984.757*	Auto Dwell	46	16	

[0081] (4) 定量结果报告

[0082] 根据仪器设定程序自动输出CsA、Tac、Sir、Ever和MPA五种免疫抑制剂的浓度。

[0083] 以上步骤具体操作全部在避光条件下进行,避免分析物在光照下降解。

[0084] 本例的试剂盒中,还可以进一步包含甲醇和色谱柱等,本领域技术人员可以对此类耗材进行选择或直接购买,在此不赘述。

[0085] 本例的质控样品用于评估检测的稳定性,一般来说, CV% ≤ 15% 表示检测稳定,数据采集可靠。

[0086] 本例按照以上方法和参数,采用QA检测系统的适配性,结果如图1所示。图1为QA中五种免疫抑制剂的色谱图。图1的结果显示,本例的方法和试剂盒能够有效的检测出五种免疫抑制剂,与预期相符。

[0087] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

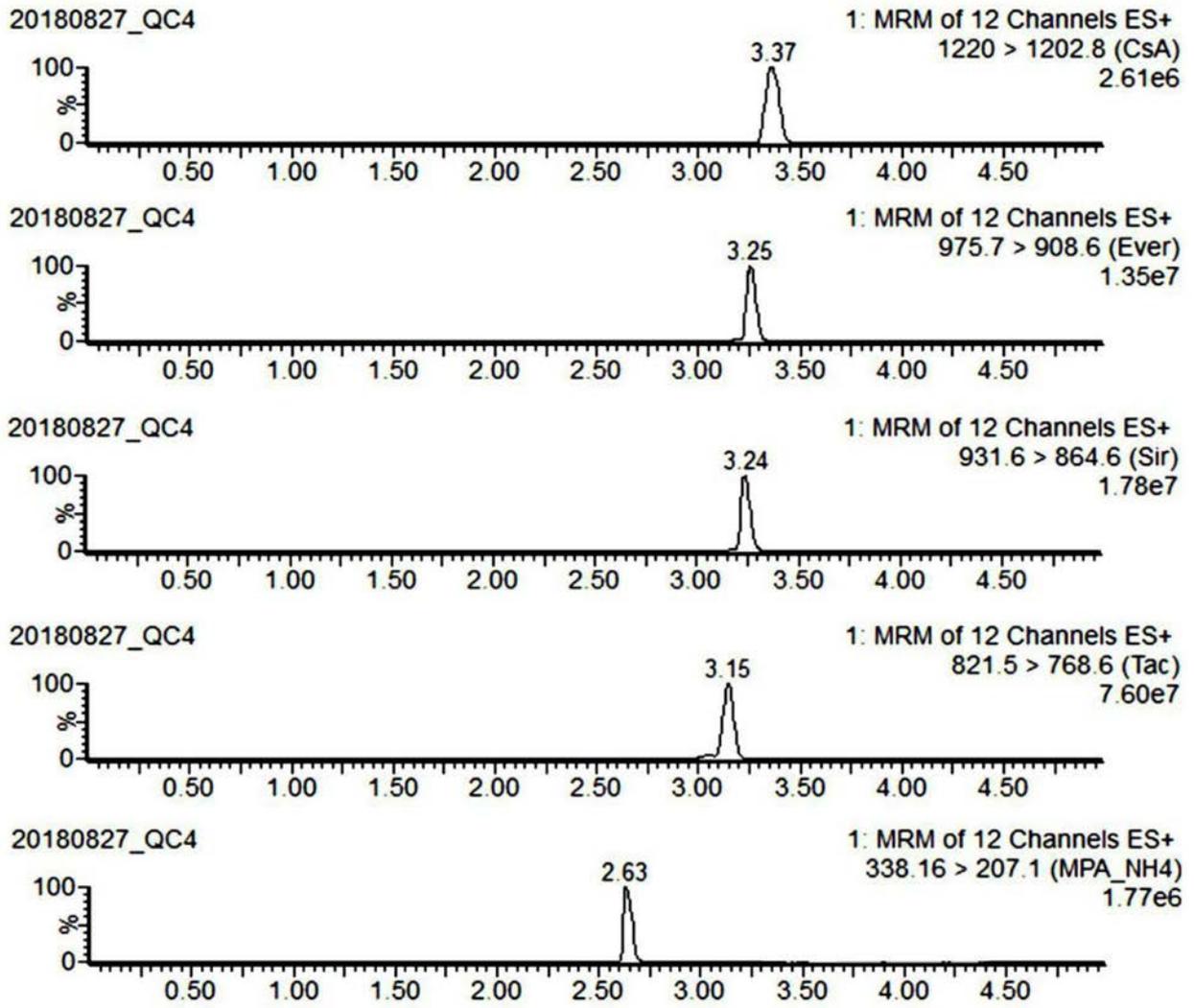


图1