

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP
ĐỊNH LƯỢNG TACROLIMUS TRONG MÁU NGƯỜI
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG KHỐI PHỔ

*Trần Bá Hiếu¹, Chử Văn Mến¹, Hoàng Xuân Sử¹
Đinh Thị Thu Hằng¹, Đào Đức Long¹, Nguyễn Đức Hạnh²
Lê Việt Thắng³, Phạm Văn Trân³, Phạm Quốc Toàn³
Vũ Quang Hợp³, Trương Quý Kiên³*

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng tacrolimus trong máu toàn phần người bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) để ứng dụng trên bệnh nhân (BN) ghép thận. **Đối tượng và phương pháp:** Tacrolimus và chuẩn nội được chiết từ máu toàn phần bằng cách sử dụng methanol/1,125M ZnSO₄ (66/34, v/v) và được tách bằng rửa giải gradient trên cột ACQUITY UPLC® BHE C18 (2,1x100 mm; 1,7 μm) ở 25°C sử dụng pha động là acetonitril và amoni acetat 5 mM. Tốc độ dòng là 0,2 mL/phút, phần dịch trong 5 μL được bơm vào phân tích trong hệ thống LC-MS/MS. Các ion được phát hiện bằng cách theo dõi đa phản ứng trên hệ thống MS/MS Xevo TQD. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của FDA và được ứng dụng để định lượng nồng độ tacrolimus trên BN ghép thận, đồng thời so sánh mối tương quan và sự khác biệt với phương pháp miễn dịch hóa phát quang (CLIA). **Kết quả:** Phương pháp có tổng thời gian sắc ký là 5 phút. Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng 1,0 - 100,0 ng/mL với giới hạn định lượng dưới là 1 ng/mL. Độ chính xác trong ngày và khác ngày lần lượt nằm trong khoảng 93,3 - 109,2% và 96,0 - 108,4%. Độ đúng trong ngày và khác ngày dao động trong khoảng 0,8 - 9,4%. Tỷ lệ thu hồi của tacrolimus dao động từ 102,6 - 107,8%. Các chỉ tiêu về độ đúng, độ chính xác và tỷ lệ thu hồi đáp ứng các tiêu chuẩn của FDA.

¹Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Người phản hồi: Chử Văn Mến (chuvanmen@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 12/12/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 27/12/2022

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i1.246>

Kết quả về mối tương quan và sự khác biệt nồng độ tacrolimus giữa hai phương pháp cho thấy phương pháp LC-MS/MS có độ tin cậy để ứng dụng trong theo dõi nồng độ tacrolimus trên lâm sàng. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng, thẩm định và ứng dụng được phương pháp định lượng tacrolimus trong máu toàn phần đạt được các tiêu chí nhanh, nhạy, tính chọn lọc và độ đặc hiệu cao, đáp ứng yêu cầu phân tích trong các nghiên cứu tương đương sinh học của tacrolimus.

* *Từ khóa:* Tacrolimus; Phân tích; Khối phổ; Phương pháp.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINING TACROLIMUS IN HUMAN WHOLE BLOOD FROM KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS

Objectives: To develop and validate an LC-MS/MS method for the determination of tacrolimus (FK506) in whole blood in kidney transplant recipients. **Subjects and methods:** Tacrolimus and the internal standard were extracted from human whole blood using methanol/1.125M ZnSO₄ (66/34, v/v) and separated using gradient elution on an ACQUITY UPLC® BHE C18 column (2.1x100 mm; 1.7 μm) kept at 25°C with acetonitrile and 5 mM ammonium acetate as mobile phase. The flow rate was 0.2 mL/min, and a 5 μL aliquot of residues was injected into the LC-MS/MS. Detection was carried out by multiple reactions monitoring on a MS/MS Xevo TQD system. The method validation was performed according to FDA guidelines and applied to determine tacrolimus concentration in kidney transplant patients. The method comparison of LC-MS/MS vs chemiluminescent microparticle immunoassay (CLIA) was performed using a standardized major axis regression analysis and Bland-Altman plots. **Results:** The method had a total chromatographic run time of 5 minutes. The calibration curves were linear over the range of 1.0 - 100.0 ng/mL with a lower limit of quantification of 1 ng/mL. The intra-day and inter-day accuracy were within the range of 93.3 - 109.2% and 96.0 - 108.4%, respectively, and the intra-day and inter-day precision ranged from 0.8 - 9.4%. The mean extraction recoveries of tacrolimus ranged from 102.6 - 107.8%. The methods of accuracy, precision, and recovery meet the acceptance criteria according to FDA guidelines. The results of the correlation and bias in tacrolimus concentrations between the two methods show that the LC-MS/MS method is reliable for application in clinical tacrolimus concentration monitoring. **Conclusion:** A rapid, sensitive, selective, and reliable method for the determination of tacrolimus in human whole blood has been successfully developed, validated, and applied.

* *Keywords:* Tacrolimus; Analysis; Mass spectrometry; Method.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tacrolimus là loại thuốc ức chế miễn dịch macrolide mới được phân lập từ việc nuôi cấy vi khuẩn *Streptomyces*. Tác dụng dược lý chính của tacrolimus là ức chế hiệu quả sự hoạt hóa của các tế bào lympho T và liên kết với các thụ thể tế bào nội sinh để tạo thành một phức hợp immunophilin. Tacrolimus có thể ngăn ngừa hiệu quả sự đào thải cấp tính sau khi ghép gan và thận. Hiện nay, tacrolimus được sử dụng rộng rãi trong điều trị chống đào thải và các bệnh liên quan đến hệ thống tự miễn dịch ở gan, thận, tim, tuyến tụy và các cơ quan cấy ghép khác [1].

Do cửa sổ điều trị hẹp của tacrolimus, mối tương quan giữa liều dùng và nồng độ tacrolimus trong máu toàn phần là thấp, do đó rất khó thực hiện các nghiên cứu dược động học lâm sàng. Hiện tại, các phương pháp phù hợp nhất để nghiên cứu dược động học lâm sàng của tacrolimus là xét nghiệm miễn dịch enzyme vi hạt (MEIA), xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA), và khối phổ kết hợp sắc ký lỏng (LC-MS/MS) [2, 3]... LC-MS/MS có ưu điểm là thời gian phân tích ngắn, xử lý mẫu nhanh, độ đặc hiệu cao, độ chính xác cao, độ nhạy cao, chi phí thấp...[4]. Nghiên cứu này nhằm: *Xây dựng và thẩm định một phương pháp LC-MS/MS nhanh, nhạy và chính xác*

để xác định nồng độ tacrolimus trong máu toàn phần và ứng dụng để tiến hành nghiên cứu tương đương sinh học trên BN ghép thận.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Nguyên liệu**

Chất chuẩn tacrolimus (QT193031186; 98,6%) và chuẩn nội roxithromycin (QT159060618; 95,5%) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Các dung môi pha động và dung môi xử lý mẫu đạt độ tinh khiết theo tiêu chuẩn LC-MS được mua từ công ty Merk (Đức). Máu toàn phần được cung cấp bởi Khoa Huyết học - Truyền máu, Bệnh viện Quân y 103. Kháng thể và hóa chất dùng cho phương pháp CLIA được cung cấp bởi công ty Abbott (Hoa Kỳ).

2. Thiết bị

Các mẫu được phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS Xevo TQD (Water, Hoa Kỳ) và máy Architect CI 16200 (Abbott, Hoa Kỳ). Các thiết bị bao gồm cân phân tích MS 205 DU (Mettler Toledo, Thụy Sĩ), máy lắc vortex (IKA labdancer, Đức), máy ly tâm Universal 320 (Hettich, Đức)... đều đạt tiêu chuẩn ISO/IEC 17025, GLP và được hiệu chuẩn theo quy định.

3. Lựa chọn các điều kiện định lượng tacrolimus trong máu toàn phần

Các ion mẹ, ion con dùng để định lượng, định tính được chọn bằng phương pháp khảo sát tự động. Các thông số MS/MS được tự động tối ưu bằng chế độ MS tune của thiết bị. Sử dụng cột phân tích pha đảo (C₁₈; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm) để tiến hành khảo sát và lựa chọn dung môi pha động. Nghiên cứu tiến hành khảo sát trên hệ pha động gồm 3 thành phần là MeOH, MeCN và CH₃COONH₄ bằng chế độ đẳng dòng và thay đổi tỷ lệ thành phần pha động. Pha động được chọn phải đảm bảo pic cần phân tích trong sắc ký đồ tách rõ ràng, không bị chập với các pic nhiễu khác, ít bị doãng pic, thời gian lưu hợp lý.

4. Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu kiểm soát chất lượng

Dung dịch chuẩn gốc của tacrolimus và roxithromycin được chuẩn bị chính xác trong acetonitril và methanol ở 250 μg/mL và sau đó được bảo quản ở -80°C. Các mẫu hiệu chuẩn được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong máu toàn phần người đến các nồng độ 1; 5; 10; 25; 50; 75 và 100 ng/mL. Bốn mẫu kiểm soát chất lượng (QC) được chuẩn bị ở nồng độ 5; 10; 50; và 75 ng/mL.

5. Phương pháp xử lý mẫu

Mỗi mẫu (100 μL) được kết tủa bằng cách sử dụng 200 μL methanol/1,125M ZnSO₄ trong nước (66/34, v/v) chứa 50 ng/mL chất chuẩn nội. Hỗn hợp được lắc xoáy trong 30 giây và để 5 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. 5 μL phần dịch trong được đưa vào phân tích trong hệ thống LC-MS/MS sử dụng bộ lấy mẫu tự động hoạt động ở 20°C.

6. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của FDA. Độ đặc hiệu được đánh giá bằng cách phân tích sáu mẫu trắng khác nhau. Tiêu chuẩn chấp nhận là đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của chất phân tích không được vượt quá 20% đáp ứng của chất phân tích ở nồng độ giới hạn định lượng dưới (LLOQ).

LLOQ được đánh giá đơn lẻ trong sáu mẫu khác nhau ở nồng độ 1,0 ng/mL.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính được xác định bằng cách phân tích năm đường chuẩn khác nhau với nồng độ từ 0,5 - 100 ng/mL trong năm ngày riêng biệt.

Độ đúng và độ chính xác được đánh giá bằng cách phân tích sáu lần lặp lại của mỗi mẫu QC trong một ngày và ba lần lặp lại của mỗi mẫu QC trong năm ngày khác nhau.

Tỷ lệ thu hồi được xác định bằng cách so sánh diện tích đỉnh của các mẫu QC thu được trong máu toàn phần với các nồng độ tương đương trong pha động.

Ảnh hưởng của nền mẫu (ME) được xác định bằng cách so sánh diện tích đỉnh của mẫu kiểm tra nồng độ thấp (LQC) và mẫu kiểm tra nồng độ cao (HQC) trong máu toàn phần với các mẫu có cùng nồng độ trong pha động. Sáu lô máu toàn phần khác nhau được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu và tỷ lệ (diện tích pic trong máu toàn phần/diện tích pic trong pha động) được gọi là hệ số nền (MF) để xác định ME.

Độ ổn định của tacrolimus trong máu toàn phần được đánh giá bằng cách phân tích sáu lần lặp lại các mẫu LQC và HQC trong các điều kiện bảo quản và quy trình khác nhau. Độ ổn định ngắn ngày được xác định bằng cách phân tích các mẫu QC này sau khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Các điều kiện đông lạnh và rã đông bao gồm ba chu kỳ đông lạnh ở -70°C và rã đông ở 37°C, mỗi chu kỳ 12 giờ. Độ ổn định của mẫu sau xử lý được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu này sau khi kết tủa protein và giữ chúng trong thiết bị lấy mẫu tự động trong 24 giờ. Độ ổn định dài ngày

được đánh giá khi bảo quản ở -70°C trong hai tháng. Tiêu chuẩn chấp nhận cho độ ổn định nằm trong khoảng 15% độ chính xác.

7. Định lượng và so sánh nồng độ tacrolimus trên BN ghép thận

Phương pháp LC-MS/MS sau khi được xây dựng và thẩm định được ứng dụng để định lượng nồng độ tacrolimus trong máu 96 BN tại các thời điểm 1, 3 và 6 tháng sau ghép thận tại Khoa Thận và Lọc máu, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y. Phân tích hồi quy trực chính chuẩn hóa và biểu đồ Bland-Altman được dùng để so sánh nồng độ tacrolimus định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS và phương pháp miễn dịch hóa phát quang (CLIA).

8. Phương pháp xử lý số liệu

Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối, phương trình hồi quy, hệ số tương quan hồi quy được xác định bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

9. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng Y đức của Học viện Quân y thông qua. Việc lấy máu và xét nghiệm chỉ được thực hiện khi có sự đồng ý bằng cam kết của người bệnh hoặc người nhà BN.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Lựa chọn điều kiện phân tích khối phổ

Để lựa chọn điều kiện phân tích khối phổ, dung dịch chuẩn tacrolimus ở nồng độ 100 ng/mL được tiêm trực tiếp vào khối phổ. Chế độ ESI (+) được chọn và ion mẹ của $[M + H]^+$ được phân mảnh để thu được ion con. Để định lượng, ion con có cường độ cao nhất đã được chọn. Các thông số khối phổ được xác định bằng phần mềm Water's Intellistart và được trình bày trong bảng 2.

Dung môi pha động được khảo sát và tối ưu hóa như sau:

Kênh A: Acetonitril (1% acid formic);

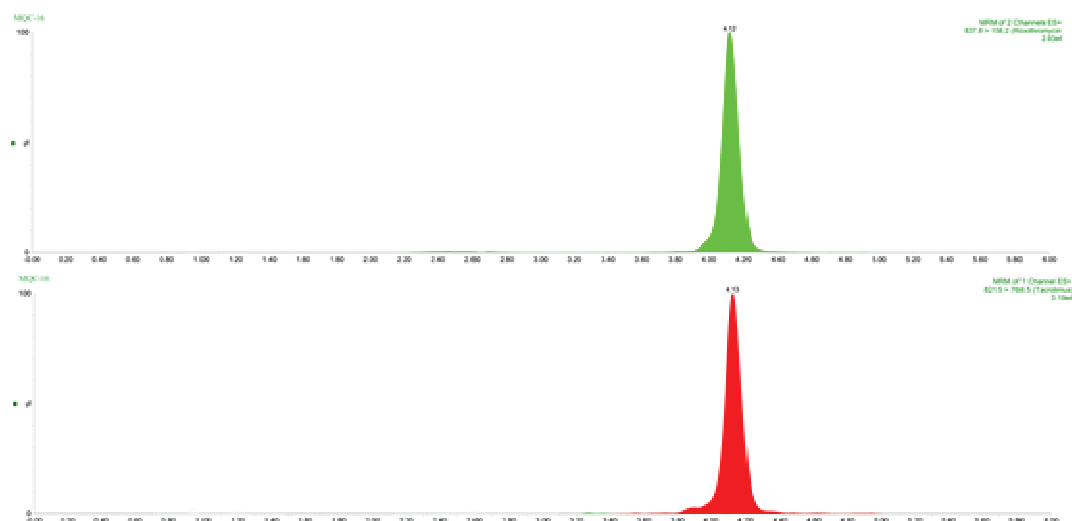
Kênh B: Amoni acetat 5 mM.

Bảng 1: Gradient dung môi pha động.

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)
0,00	60
1,25	60
1,26	98
3,00	98
3,01	60
5,00	60

Bảng 2: Thông số của detector khối phổ.

Điều kiện khối phổ	Tacrolimus	IS
Chế độ ion hóa	ESI (+)	ESI (+)
Capillary voltage (kV)	3,25	3,5
Cone voltage (V)	55	55
Desolvation temperature (°C)	350	350
Desolvation gas (L/H)	800	800
Cone gas (L/H)	10	20
Collision energy (V)	22	30
Parent ion (Dalton)	821,5	837,8
Product ion (Dalton)	768,5	158,2



Hình 1: Sắc ký đồ pha động tỷ lệ MeCN - CH₃COONH₄ 5 mM 60:40.

Kết quả cho thấy với các thông số khối phổ (Bảng 2), ion con của tacrolimus và chuẩn nội có cường độ cao nhất, được tách hoàn toàn và phân biệt rõ khỏi tạp chất.

2. Độ đặc hiệu

Trong sắc ký đồ của các mẫu trắng, mẫu tacrolimus chuẩn và mẫu chuẩn nội (IS) pic của tarcolimus và IS được phân biệt rõ, tách hoàn toàn khỏi pic tạp chất có trong mẫu. Tỷ lệ đáp ứng của tarcolimus và IS so với mẫu trắng < 20% và 5%, do vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc và độ đặc hiệu.

Bảng 3: Độ đặc hiệu và giới hạn định lượng dưới.

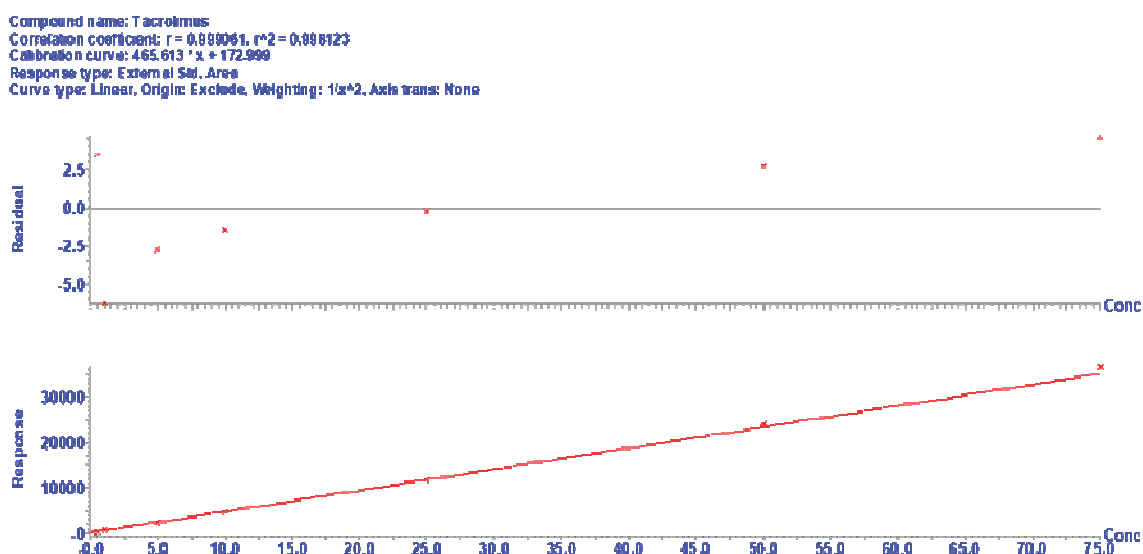
Lô mẫu	BL/LLOQ	BL/IS	Độ chính xác (%)
1	0,1248	0,0018	100
2	0,1222	0,0013	100
3	0,1407	0,0019	100
4	0,1302	0,0017	100
5	0,1407	0,0023	90
6	0,1558	0,0022	90
Trung bình	0,1357	0,0018	96,7
CV%			5,3

3. Giới hạn định lượng dưới

Kết quả bảng 3 cho thấy đáp ứng của mẫu LLOQ lớn hơn 5 lần so với đáp ứng của mẫu trắng. Ở nồng độ 1 ng/mL đạt yêu cầu về độ đúng (80 - 120% so với nồng độ thực) và độ chính xác khi tiến hành phân tích trên các mẫu LLOQ độc lập có hệ số biến thiên (CV) $\leq 20\%$. Mức nồng độ 1 ng/mL đáp ứng yêu cầu phân tích các nghiên cứu tương đương sinh học của tacrolimus với nồng độ C_{max} khoảng 0,6 - 0,7 $\mu\text{g/mL}$, do vậy đáp ứng các yêu cầu về giới hạn định lượng dưới.

4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng đáp ứng của tỷ lệ diện tích pic (y) so với nồng độ tacrolimus (x) với hệ số weighting phù hợp là $1/x^2$ xác định từ dữ liệu thẩm định. Kết quả cho thấy các đường chuẩn tám điểm của tacrolimus tuyến tính trong phạm vi nồng độ từ 0,5 - 100 ng/mL theo phương trình hồi quy dạng $Y = aX + b$ với $R^2 > 0,99$. Nồng độ tacrolimus được tính lại từ phương trình hồi quy trong khoảng 92,2 - 109,5% đều trong khoảng giới hạn cho phép là 85 - 115% và 80 - 120% đối với LLOQ. Như vậy, đường chuẩn được xây dựng đáp ứng các tiêu chuẩn quy định của phương pháp phân tích.



Hình 2: Đường chuẩn tacrolimus trong máu toàn phần.

5. Độ đúng và độ chính xác

Bảng 4: Độ đúng và độ chính xác.

Mẫu QC (ng/mL)	n	Mean \pm SD	CV (%)	Độ chính xác (%)
Độ đúng độ chính xác trong ngày				
LLOQ	6	0,9 \pm 0,1	5,5	93,3
LQC	6	5,1 \pm 0,1	2,4	101,3
SQC	6	10,0 \pm 0,1	1,2	99,7
MQC	6	52,8 \pm 0,4	0,8	105,6
HQC	6	81,9 \pm 0,6	0,9	109,2
Độ đúng độ chính xác khác ngày				
LLOQ	6	0,9 \pm 0,1	7,5	96
LQC	6	4,9 \pm 0,2	4,6	94,1
SQC	6	9,8 \pm 0,3	3,7	98,5
MQC	6	51,8 \pm 2,1	3,2	98,2
HQC	6	81,3 \pm 3,0	3,8	108,4

Kết quả bảng 4 cho thấy độ đúng trong ngày và khác ngày lần lượt nằm trong khoảng 93,3 - 109,2% và 94,1 - 108,4% đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận (85 - 115%). Độ chính xác trong ngày và khác ngày đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận với CV dao động từ 0,8 - 7,5%. Do đó, phương pháp này đáp ứng các tiêu chuẩn để phân tích tacrolimus trong dịch sinh học.

6. Tỷ lệ thu hồi và ảnh hưởng của nền mẫu

Bảng 5: Tỷ lệ thu hồi và ảnh hưởng của nền mẫu.

Mẫu QC (ng/mL)	n	CV (%)		Tỷ lệ thu hồi (%)
		Dung môi	Máu	
Tỷ lệ thu hồi				
LQC	6	2,4	4,6	106,6
SQC	6	2,1	1,5	104,0
MQC	6	1,4	3,1	107,8
HQC	6	5,3	2,1	108,1
IS	6	4,2	4,9	103,0
Ảnh hưởng của nền mẫu				
LQC	6	5,4		99,2
HQC	6	7,4		108,6

Kết quả về tỷ lệ thu hồi cho thấy CV của mỗi nồng độ được tính toán theo đáp ứng của diện tích đỉnh của tacrolimus < 15%. Tỷ lệ thu hồi chiết xuất trung bình của tacrolimus nằm trong phạm vi không quá 110% và không thấp hơn 30% với CV < 15% và phương pháp phân tích này phù hợp và đáp ứng các tiêu chuẩn về tỷ lệ thu hồi.

Ảnh hưởng của nền mẫu được khảo sát bằng cách sắc ký mẫu trong máu toàn phần. Hệ số biến thiên của các mẫu LQC và HQC thu được lần lượt là 5,4% và 7,4%, trong khi độ chính xác được tìm thấy ở các mẫu này lần lượt là 99,2% và 108,6%. Những kết quả này cho thấy ảnh hưởng của nền mẫu là có thể chấp nhận được và sẽ không ảnh hưởng đến tính lặp lại của phương pháp phân tích.

7. Độ ổn định

Bảng 6: Độ ổn định.

Quality control (ng/mL)	n	Mean \pm SD	CV (%)	Độ chính xác (%)
Nhiệt độ phòng				
LQC	6	4,6 \pm 0,1	2,5	96,2
HQC	6	69,8 \pm 0,4	0,9	91,4
Auto sampler				
LQC	6	4,8 \pm 0,1	2,4	95,4
HQC	6	80,2 \pm 0,3	0,9	97,9
Đông rã				
LQC	6	5,1 \pm 0,2	4,6	103,8
HQC	6	84,8 \pm 0,8	1,9	101,8
Dài ngày				
LQC	6	4,9 \pm 0,1	2,4	96,4
HQC	6	83,3 \pm 1,6	1,9	101,7

Hệ số biến thiên ở nhiệt độ phòng, trong bộ lấy mẫu tự động và sau ba chu kỳ đông-rã của mẫu LQC lần lượt là 2,5%, 2,4% và 4,6% và của mẫu HQC lần lượt là 0,9%, 0,9% và 1,9%. Hệ số biến thiên trong các điều kiện này đều < 15%, đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận.

Đối với độ ổn định lâu dài, CV của các mẫu LQC và HQC sau khi bảo

quản ở -70°C trong hai tháng lần lượt là 2,4% và 1,9%. Những kết quả này cho thấy tacrolimus ổn định trong máu toàn phần trong các điều kiện bảo quản khác nhau.

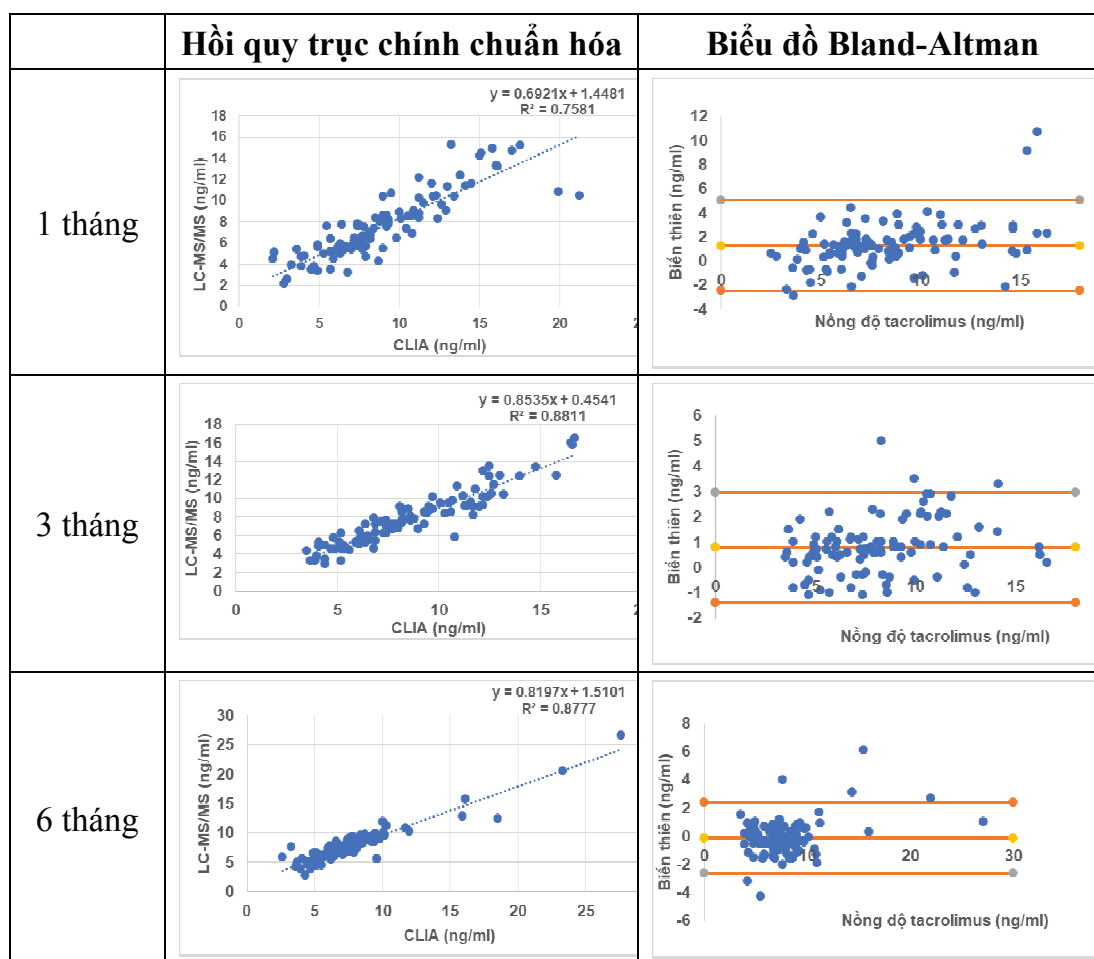
8. Kết quả định lượng và so sánh nồng độ tacrolimus trong máu BN ghép thận

Mối tương quan giữa nồng độ tacrolimus thu được từ phương pháp

CLIA và LC-MS/MS được đánh giá bằng phân tích hồi quy trực chuẩn hóa. Sự khác biệt nồng độ giữa hai phương pháp được so sánh bằng biểu đồ Bland-Altman.

Kết quả hình 3 cho thấy mối tương quan giữa nồng độ tacrolimus thu được từ phương pháp CLIA và LC-MS/MS tại các thời điểm 1, 3 và 6 tháng lần lượt là $R^2 = 0,7581$, $y = 0,6921x + 1,4481$

$1,4481$; $R^2 = 0,8811$, $y = 0,8525x + 0,4541$ và $R^2 = 0,8777$, $y = 0,8197x + 1,5101$. Biểu đồ Bland-Altman cho thấy mức độ biến thiên nồng độ giữa hai phương pháp ở thời điểm 1, 3 và 6 tháng lần lượt là $1,29$ ng/mL ($\pm 1,96$; SD: $-2,46 - 5,04$ ng/mL), $0,79$ ng/mL ($\pm 1,96$; SD: $-1,38 - 2,97$ ng/mL) và $-0,11$ ng/mL ($\pm 1,96$; SD: $-2,63 - 2,40$ ng/mL).



Hình 3: Đánh giá mối tương quan và sự khác biệt nồng độ tacrolimus giữa phương pháp LC-MS/MS và CLIA.

BÀN LUẬN

Theo dõi được nồng độ của tacrolimus là cần thiết để giảm thiểu tác dụng độc hại liên quan đến liều lượng và để ngăn ngừa thải ghép sau khi cấy ghép cơ quan, đặc biệt đối với liệu pháp đa thuốc bao gồm tacrolimus liều thấp. Trong nghiên cứu này sự kết hợp giữa phân tách bằng sắc ký lỏng và các lần lọc khối liên tiếp bằng cách theo dõi sự chuyển đổi của ion đã khử hóa thành ion sản phẩm đã cung cấp độ đặc hiệu cao cho tacrolimus và chất chuẩn nội.

Kỹ thuật MRM được chọn để phát triển phương pháp, các thông số trạng thái MRM được tối ưu hóa để tối đa hóa tín hiệu cho chất phân tích. Cách tiếp cận được áp dụng để phát triển phương pháp này dựa trên khảo sát tài liệu được thực hiện trên tacrolimus [5]. Cường độ tín hiệu bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của ion trong nồng độ pha động và các sản phẩm phụ được hình thành. Các pha động khác nhau được đánh giá để cải thiện sự phân tách HPLC và nâng cao độ nhạy trong MS. Kết quả khảo sát dung môi pha động cho thấy 60% acetonitril và 40% 5 mM dung dịch đệm amoni acetat là tối ưu cho chất phân tích liên quan đến hình dạng pic và đáp ứng phổ khối. Trong điều kiện này, thời gian lưu của cả chất

phân tích và IS lần lượt là khoảng 4,13 và 4,12 phút. Pha động được sử dụng đảm bảo độ lặp lại tốt của thời gian lưu. Tổng thời gian chạy cho mỗi mẫu là 5 phút.

Việc sử dụng chất chuẩn nội là bắt buộc trong định lượng bằng LC-MS/MS vì hai lý do: Để bù đắp cho những thất thoát trong quá trình chiết xuất và bù cho độ nhạy thay đổi khi phân tích. Khi chạy càng nhiều mẫu trên MS, nguồn MS càng dễ bị nhiễm bẩn và độ nhạy càng giảm. Trong nghiên cứu, roxithromycin được chọn làm chuẩn nội cho tacrolimus vì có nhiều tương đồng về cấu trúc hóa học, khả năng hòa tan trong pha động, các đặc tính sắc ký và chiết xuất của nó, tương tự như tacrolimus. Roxithromycin được kỳ vọng sẽ có tỷ lệ thu hồi tương tự khi chiết lỏng-lỏng và phản ứng MS/MS ở chế độ ion dương.

Các chỉ tiêu của phương pháp đều đáp ứng các tiêu chuẩn theo hướng dẫn của FDA. Phương pháp định lượng tacrolimus bằng LC-MS/MS sẽ hạn chế được các vấn đề về độ đặc hiệu kém bằng cách tách tacrolimus khỏi các chất chuyển hóa riêng lẻ. Một ưu điểm khác của phương pháp phân tích này là độ nhạy được cải thiện với độ chính xác cao, có tiềm năng trở thành

một quy trình phân tích tin cậy trong phân tích sinh học thông lượng cao, rất quan trọng để đáp ứng khuyến nghị của Hội nghị Đồng thuận châu Âu [6] về tối ưu hóa trong điều trị tacrolimus.

Một số phương pháp phân tích đã được phát triển và ứng dụng để định lượng tacrolimus trong máu toàn phần bao gồm xét nghiệm miễn dịch hóa phát quang [7]. Xét nghiệm miễn dịch hóa phát quang sử dụng các kháng thể đơn dòng chống lại tacrolimus. Tuy nhiên, tacrolimus được chuyển hóa bởi các enzyme CYP3A làm phát sinh các chất chuyển hóa có cấu trúc tương tự như thuốc mẹ và có thể phản ứng chéo với kháng thể xét nghiệm [8]. Trong khi các phương pháp xét nghiệm miễn dịch được FDA chấp thuận để định lượng tacrolimus, thì các phương pháp định lượng bằng LC-MS/MS lại được phát triển và ứng dụng trong phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu này lần đầu tiên chúng tôi đã ứng dụng trên lâm sàng phương pháp LC-MS/MS để định lượng nồng độ tacrolimus trong máu BN ghép thận và so sánh với phương pháp miễn dịch hóa phát quang. Kết quả về mối tương quan và sự khác biệt nồng độ tacrolimus giữa hai phương pháp cho thấy phương pháp định lượng LC-MS/MS có độ tin cậy để ứng dụng trong theo dõi nồng độ tacrolimus trên lâm sàng.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng và thẩm định thành công phương pháp định lượng tacrolimus trong máu toàn phần người bằng LC-MS/MS. Phương pháp có độ chọn lọc, độ đặc hiệu, độ đúng và chính xác cũng như đường chuẩn và tỷ lệ thu hồi đáp ứng các tiêu chuẩn của FDA. Phương pháp đã được ứng dụng trong theo dõi điều trị tacrolimus trên một số BN ghép tạng, đồng thời đối chiếu so sánh với phương pháp miễn dịch hóa phát quang.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 04//2020/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kino T., Hatanaka H., Hasimoto M., et al. (1987). FK-506, novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics*; 40: 1249-1255.
2. Jusko W.J., Thomson A.W., Fung J., et al. (1995). Consensus document: Therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Therapeutic Drug Monitoring*; 17: 606-614.

3. Beysens A.J., Wijnen R.M., Beuman G.H., et al. (1991). FK 506: Monitoring in plasma or in whole blood? *Transplant Proc*; 23:2745-2747.
4. Taylor P.J., Franklin M.E., Tai C.H., et al. (2012). Therapeutic drug monitoring of tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Is it truly a routine test? *Journal of Chromatography B*; 883-884: 108-112.
5. Matsunami H., Tada A., Makuuchi M., et al. (1994). New technique for measuring tacrolimus concentrations in blood. *Am J Hosp Pharm*; 51: 123.
6. Felipe C.R., Garcia C., Moreira S., et al (2001). Choosing the right dose of new immunosuppressive drugs for new populations: importance of pharmacokinetic studies. *Transplant Proc*; 33: 1095-1096.