

质谱法检测血液中免疫抑制剂的研究进展

潘菲^{1,2}, 谢洁², 屈子裕², 刘粮泽^{1,2}, 易可可²,
张谛², 方向², 江游², 叶子弘¹

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310000;

2. 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 国家市场监管技术创新中心(质谱), 北京 100029)

摘要: 免疫抑制剂主要用于对抗器官移植术后出现的排斥反应, 具有降低患者发病率和死亡率的重要作用。然而, 一些免疫抑制剂具有治疗范围窄、药动学个体差异大、药物间存在相互作用等特点。由于免疫抑制剂血药浓度与疗效和毒性密切相关, 因此, 检测血液中免疫抑制剂浓度以充分了解患者体内的药物暴露情况, 优化给药剂量以维持稳定的血药浓度, 对确保用药的有效性和安全性有着重要意义。质谱具有高灵敏度、高特异性、高选择性、快速、微量等特点。本文综述了液相色谱-串联质谱法和原位电离质谱法在免疫抑制剂血药浓度检测中的应用, 并对质谱技术检测血液中免疫抑制剂浓度进行展望。

关键词: 免疫抑制剂; 血药浓度监测; 质谱; 血液

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)02-0254-11

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0060

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0060

Advances in the Detection of Immunosuppressive Agents in Blood by Mass Spectrometry

PAN Fei^{1,2}, XIE Jie², QU Zi-yu², LIU Liang-ze^{1,2}, YI Ke-ke²,
ZHANG Di², FANG Xiang², JIANG You², YE Zi-hong¹

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310000, China;

2. Technology Innovation Center of Mass Spectrometry for State Market Regulation,
Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

Abstract: Immunosuppressive drugs are mainly used to fight against immune rejection after organ transplantation, and have great potential to reduce the incidence rate and mortality of patients. However, some drugs have characteristics such as narrow therapeutic range, significant individual differences in pharmacokinetics, and interactions between drugs. The blood drug concentration is closely related to efficacy and toxicity. Therefore, detecting the concentration of immunosuppressants in the blood can fully understand the drug exposure in the patient's body, optimizing the dosage can maintain a stable blood drug concentration, which are of great significance in ensuring the effectiveness and safety of medication. Mass spectrometry, as an analytical tool, has the characteristics of high sensitivity, high specificity, high selectivity, high speed, and low sample-

consumption. This article reviewed the applications of liquid chromatography tandem mass spectrometry and *in situ* mass spectrometry in the detection of immunosuppressants in blood. Liquid chromatography tandem mass spectrometry has the characteristics of high sensitivity and good repeatability. *In situ* mass spectrometry can directly detect blood samples without the need for sample pretreatment. Finally, the prospect of mass spectrometry technology in the detection of immunosuppressants in blood was discussed.

Key words: immunosuppressant; blood concentration monitoring; mass spectrometry; blood

目前, 器官移植已成为治疗器官衰竭的最佳选择, 但术后的免疫排斥反应是造成器官移植失败的主要原因, 严重时甚至会危及患者生命^[1]。免疫抑制剂的使用可以最大程度地发挥抗排斥作用, 使移植器官长期存活的同时还可减少不良反应的发生。

临床上常用的免疫抑制剂类药物有4种^[2]: 1) 钙调磷酸酶抑制剂(calcineurin inhibitor, CNI): 他克莫司(tacrolimus, FK 506)、环孢素A(ciclosporin, CsA)等; 2) 雷帕霉素靶蛋白抑制剂(mammalian target of rapamycin, mTOR): 西罗莫司(rapamycin or sirolimus, SRL)、依维莫司(everolimus, EVE)等; 3) 抗细菌增殖类药物: 霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)等; 4) 糖皮质激素: 氢化可的松、倍他米松等。常用的免疫抑制剂结构示于图1。

环孢素是最先用于抑制钙调磷酸酶的药物, 但在对肝、肾和神经系统损伤方面, 其不良反应较他克莫司大。目前, 国际指南均推荐他克莫司作为肾脏移植患者术后长期使用的首选钙调磷酸酶抑制剂^[3]。他克莫司是一种从链霉菌中分离的免疫抑制剂, 主要通过干扰T细胞活化发挥免疫抑制作用^[4-5]。他克莫司进入T细胞后与亲免疫素的细胞内蛋白结合, 药物-亲免疫蛋白复合物抑制钙调磷酸酶。钙调磷酸酶是一种参与活化

T细胞核因子(NF-AT)的酶, NF-AT是T细胞中细胞因子基因表达所需的转录因子。因此, 他克莫司对钙调磷酸酶的抑制导致T细胞衍生的细胞因子(如IL-2和IFN- γ)的产生完全阻断^[6], 从而发挥药理作用。他克莫司在体内分布广泛、清除率低, 口服后需数天才能达到稳态血药浓度。他克莫司有相对狭窄的治疗窗口并表现出较高的患者间药动学变异性及暴露-反应关系, 因此, 其免疫抑制程度及不良反应与血药浓度密切相关^[7-12]。临床上, 一般将他克莫司的血药浓度控制在5~15 $\mu\text{g/L}$ ^[13], 若浓度低于5 $\mu\text{g/L}$, 则免疫排斥反应增加, 若浓度高于15 $\mu\text{g/L}$, 肾毒性和神经毒性会增加。即使血药浓度在治疗窗范围内, 患者也常会发生肾毒性、消化系统不适等不良反应。

西罗莫司与他克莫司结构相似, 但作用机制不同。西罗莫司是结合并抑制哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白, 最终导致IL-2介导的信号通路阻断, 阻止细胞从细胞周期的G1期发展到S期^[14]。西罗莫司的血药浓度应控制在5~15 $\mu\text{g/L}$, 若浓度低于5 $\mu\text{g/L}$, 则免疫排斥反应增加, 若浓度高于15 $\mu\text{g/L}$, 则可能导致高血小板血症、血小板减少症和白细胞减少症等。

霉酚酸抑制T、B淋巴细胞在有丝分裂原和

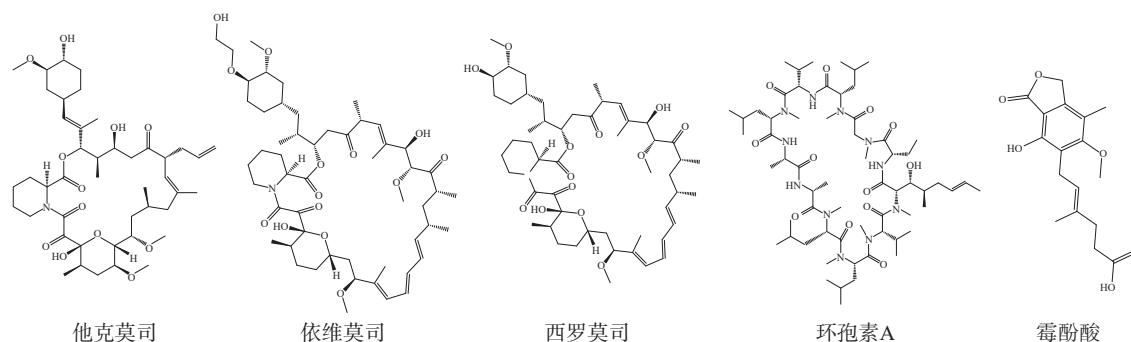


图1 常用的免疫抑制剂结构

Fig. 1 Chemical structures of common immunosuppressants

同种异体抗原刺激下引起的增殖,抑制B淋巴细胞生成抗体^[15]。霉酚酸的血药浓度监测范围为1 000~3 500 $\mu\text{g/L}$,如果患者的白蛋白水平改变,需测量游离霉酚酸^[16]。

目前,血液中免疫抑制剂的检测方法有免疫分析法^[17]、高效液相色谱(HPLC)法^[18]和质谱(MS)法,其中,质谱法包括液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法和原位电离质谱(AIMS)法。

免疫分析法是通过抗原和抗体之间的特异性结合发生不同的化学反应来检测药物^[19-20],具有快速、简单、价格低廉等优点。然而,由于目标药物会与结构相似的药物或药物代谢产物发生交叉反应,该方法在进行血药浓度检测时会导致药物浓度测定结果出现正偏倚,缺乏特异性和准确性^[21]。其次,当他克莫司与其他药物联合使用时,对多种免疫抑制剂的同时检测存在成本高、通量低的问题。尽管近年来免疫分析法得到了优化和改进,但仍不能完全弥补这些缺点。

HPLC法采用高压输液系统将不同极性或不同比例的流动相泵入色谱柱中,各成分在柱内被

分离后,进入检测器检测,从而实现对试样的分析^[22]。与免疫分析法相比,HPLC法提高了对药物检测的灵敏度和特异性。但在分析前,需从血液样品中提取药物,使得样本制备时间和分析时间均较长。此外,由于结构相似的化合物会共存^[23],在分析时可能存在干扰问题。

质谱法可以提供化合物分子质量和结构信息,具有高灵敏度、高选择性、强特异性、低检测限和高通量等优点,已成为免疫抑制剂治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)的金标准^[24-25]。

相比于单级质谱,串联质谱(MS/MS)^[26]具有更高的选择性、分辨率以及灵敏度,能够更好地应对复杂样本中目标物质的精准检测。现阶段,在临床生物样本分析方面,常使用三重四极杆串联质谱(QqQ-MS/MS)、四极杆-飞行时间质谱(Q-TOF-MS/MS)和四极杆-轨道阱质谱(Q-Orbitrap-MS/MS)等技术,一般与色谱联用,在免疫抑制剂检测、鉴定和定量方面发挥着重要作用,分析流程示于图2。

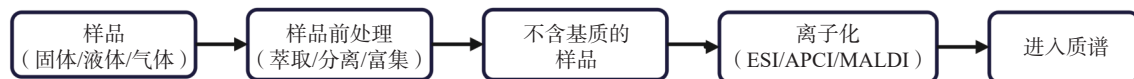


图2 质谱法分析流程

Fig. 2 Analysis process of mass spectrometry

AIMS是从原生环境直接采样和电离分析,无需样品制备,具有快速直接、高通量、高选择性、实时监测与分析等优势^[27]。

本文基于常用的免疫抑制剂的浓度监测及检测方法进行综述,希望为该类药物的临床合理用药提供指导。

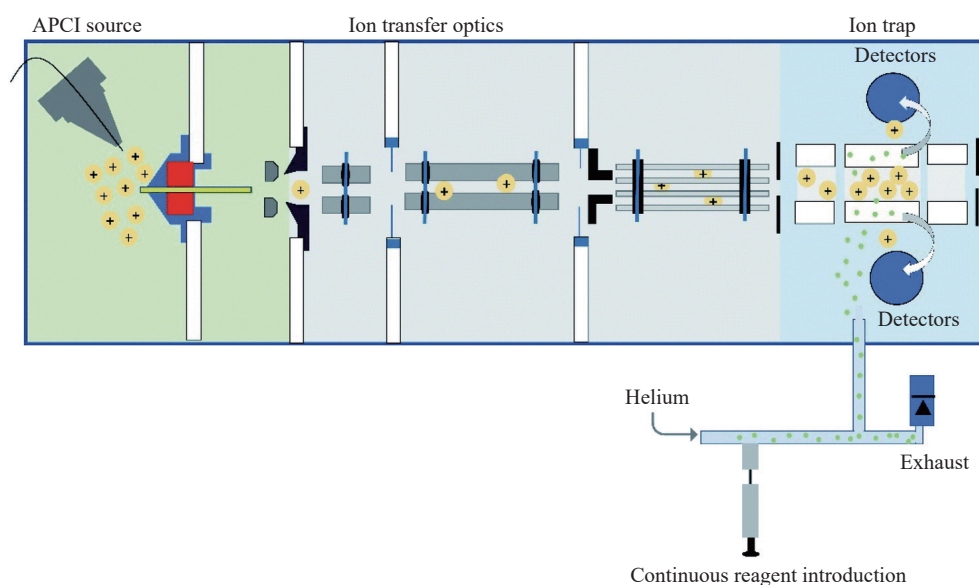
1 液相色谱-串联质谱技术

1.1 液相色谱-串联三重四极杆质谱

三重四极杆质谱^[28]使用3套四极杆分析器,是最常见的质谱仪之一,具有全扫描、选择离子监测、中性丢失扫描和多重反应监测等功能,能够快速扫描母离子和子离子,有助于化合物的定性和定量分析^[29]。第1组四极杆质量分析器通常被称为Q1,可以扫描或选择性地过滤特定 m/z 离子;通过Q1的离子进入第2组四极杆(Q2),作为碰撞池,将来自Q1的选定离子碎片化;最

后,由第3组四极杆(Q3)扫描在该过程中形成的产物离子从而获得质谱图,或者固定Q3以监测特定离子,其结构示于图3。

杨旭萍等^[30]采用液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定血液中他克莫司和西罗莫司,电喷雾离子源正离子多反应监测模式扫描,他克莫司和西罗莫司在1~40 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,准确度92.6%~114.4%,精密度 $\text{RSD} \leq 15\%$,提取回收率71.48%~94.88%,基质效应72.36%~102.80%,该方法可用于肾移植患者的临床血药浓度监测。Chen等^[31]采用电喷雾离子源正离子多反应监测模式测定人全血中他克莫司和环孢素A,仅2.5 min即可完成,他克莫司在0.1~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,他克莫司和环孢素A的定量下限(LLOQ)分别为0.10和2.00 $\mu\text{g/L}$,日内、日间准确度为8.3%~11.8%,精密度 $\text{RSD} \leq 15\%$,该方法简便、快速、准确、灵敏度高,具有

图3 三重四极杆质谱仪结构图^[28]Fig. 3 Structural diagram of triple quadrupole mass spectrometer^[28]

良好的重现性和稳定性,可用于临床全血中他克莫司的检测。谢以清等^[32]采用超分子溶剂萃取/高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定人血浆中他克莫司含量,通过单因素实验结合响应面设计对超分子溶剂一些变量进行优化,以正戊醇、四氢呋喃和水形成的超分子溶剂高效萃取血浆样本,在电喷雾质谱正离子多反应监测模式测定他克莫司,内标法定量。结果表明,他克莫司在0.5~30 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,检出限和定量限分别为0.1、0.5 $\mu\text{g/L}$, RSD为1.7%~5.7%,该方法快速、灵敏、稳定,适用于血浆中他克莫司的准确测定。翟晓慧等^[33]采用蛋白质沉淀和液-液萃取法处理血浆和全血中的霉酚酸等4种免疫抑制剂,回顾性收集常规监测肾移植患者的全血标本,比较LC-MS/MS法与酶增强免疫测定(enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT)法的检测结果;2种方法检测全血与血浆中环孢素A及他克莫司浓度的相关性良好,血浆中环孢素A及他克莫司浓度显著低于全血中,霉酚酸在血浆中的浓度约为全血中浓度的2倍,LC-MS/MS法具有方便快捷的特点,可同时测定几种免疫抑制剂。近年来,应用液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定血液中免疫抑制剂的情况列于表1。

与三重四极杆类似, Qtrap^[41-42]中的Q1同样用于选择性地过滤特定 m/z 离子,过滤的离子在

碰撞池区域产生碎片离子,然后在离子阱中选择性富集,或进一步筛选打碎,形成多级碎裂^[43],其结构示于图4。与其他质量分析器相比,离子阱质量分析器的优点是可以进行多级碎裂,缺点是随着离子阱捕获离子数的增加,空间电荷效应也增加,会改变单个离子的运动轨迹,降低离子的分析性能。因此,离子阱的定量能力不如四极杆^[44]。

Heike等^[45]开发了一种高灵敏度的简单在线提取方法,采用液相色谱-串联Sciex Qtrap[®] 6500质谱仪测量人血浆中未结合蛋白质的他克莫司,研究游离他克莫司对血药浓度监测的临床影响。采用正离子多反应监测模式,以他克莫司的锂加合离子作为母离子,大大提高了测定的灵敏度,定量下限为0.001 $\mu\text{g/L}$,且在0.001~0.2 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内呈线性关系。该方法可为更大规模的临床研究提供基础,从而改善免疫抑制药物治疗的个体化管理。

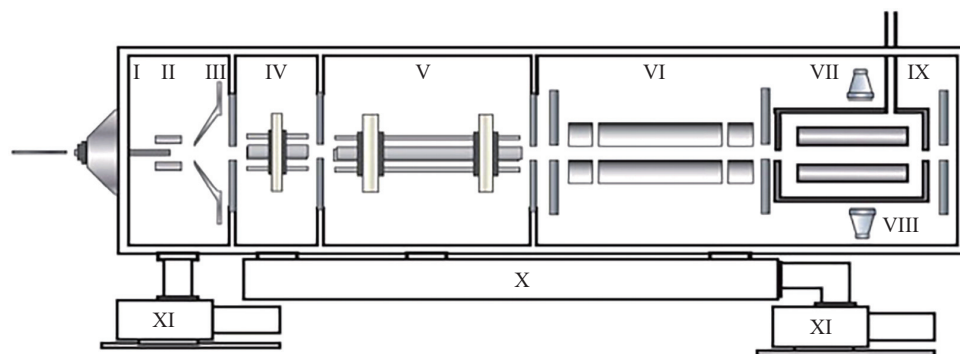
1.2 液相色谱-串联四极杆-飞行时间质谱

飞行时间质量分析器^[46]主要由飞行管和加速栅格组成,加速栅格用于将离子“包”从电离源加速到飞行管,使离子在无场飞行管中飞行后抵达检测器得到离子信号。具有相同速度的2个不同 m/z 离子从离子源加速,并允许漂移通过飞行管的无场区域,则它们到达检测器的时间不同^[47]。分子质量越大则离子飞行时间越长,且离子的质荷比与时间的平方成正比。因此,在理

表1 液相色谱-串联三重四极杆质谱法检测免疫抑制剂

Table 1 Detection of immunoinhibitors by liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry

检测物质 Compound	样本 类型 Sample type	样品前处理 Sample pretreatment	线性范围 Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)	准确度 Accuracy/%	精密度 Precision/%	参考文献 Reference
他克莫司、西罗莫司	全血	蛋白质沉淀	1~40	1	92.6~114.4	<15	[30]
他克莫司、环孢素A	全血	蛋白质沉淀	0.1~100	0.1	8.3~11.8	<15	[31]
他克莫司	血浆	超分子溶剂萃取	0.5~30	0.1	—	—	[32]
霉酚酸、环孢素A、他克莫司、西罗莫司	全血	蛋白质沉淀、 液-液萃取	4~1000	0.2	91.2~109.7	<15	[33]
他克莫司	全血	蛋白质沉淀	1.49~29.78	0.5	95.19~99.02	<10	[34]
他克莫司、环孢素A	全血	蛋白质沉淀	1~40	1	—	<10	[35]
他克莫司、西罗莫司、依维莫司、环孢素A	全血	蛋白质沉淀	0.5~40	0.5	—	—	[36]
他克莫司	全血	固相萃取	0.2~100	0.2	85~115	<10	[37]
他克莫司、环孢素A	全血	固相萃取	0.5~100	0.5	94.1~108	—	[38]
他克莫司	血浆	固相萃取	0.1~20	0.1	97.8~109.7	—	[39]
他克莫司、西罗莫司、环孢素A、霉酚酸	全血	蛋白质沉淀	0.5~100	0.22	—	<9.4	[40]

图4 离子阱结构图^[42]Fig. 4 Structural diagram of ion trap^[42]

想状态下,质量较小的离子将更早到达检测器。与四极杆质谱仪相比,飞行时间质谱仪的精密度和分辨率更高,扫描速度更快^[48-49]。

液相色谱-串联三重四极杆质谱已广泛用于临床实验室中内源性化合物、药物或代谢物的定量分析,高分辨质谱由于其有限的动态范围通常用于化合物鉴定。最近,由于高分辨质谱仪具有增强的线性动态范围和其他技术优势,被广泛应用于药物定量分析领域。Bruns等^[50]使用液相色谱-串联四极杆-飞行时间质谱法定量分析他克莫司等4种免疫抑制剂,并与UHPLC-MS/MS法的测定结果进行比较,该方法的总运行时间为3 min,他克莫司在1.0~41.1 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,相关系数(R^2)为0.99,低、

中、高3个浓度的他克莫司精密度分别为6.4%、5.5%和4.5%, Passing-Bablok回归分析显示,每种免疫抑制剂通过UHPLC-MS/MS测得的结果和高分辨质谱测得的结果之间具有良好的线性相关性。

1.3 液相色谱-串联四极杆-静电场轨道阱质谱

静电场轨道阱质谱是一种利用傅里叶变换将离子阱中离子振荡产生的时域信号转换为频域信号的分析仪^[51-52]。与传统意义上的离子阱不同,它没有使用磁场或射频电压来捕获离子^[53]。静电场轨道阱是通过直流电场捕获围绕中心电极轨道选装的离子,离子进入轨道阱后,围绕中心电极旋转振荡,该振荡被外部电极检测并放大,通过快速傅里叶变化获取不同质量的离子频

谱,从而转换成精准的质荷比谱图^[54-55],其结构示于图5。四极杆串联静电场轨道阱可将四极杆的筛选能力和 Orbitrap 的高分辨特点相结合,可同时获得全扫描质谱图和该分辨精确质量数的二级质谱图,为高通量检测提供便利^[56]。前体离子可通过施加高能碰撞解离作用实现离解。

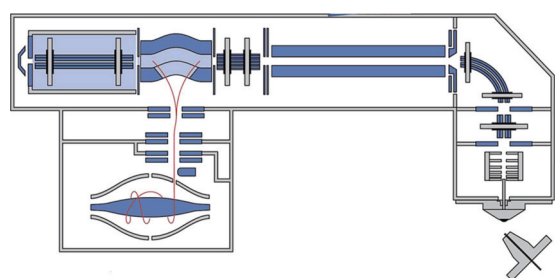


图5 四极杆静电场轨道阱质谱仪结构图^[55]

Fig. 5 Structural diagram of quadrupole electrostatic field Orbitrap mass spectrometer^[55]

Wei 等^[57]使用纳米液相色谱-串联四极杆轨道阱质谱法测定外周血单核细胞中他克莫司浓度,仅需 0.5~2 mL 样品,在 0.005~0.64 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,相关系数为 0.996,定量限为 0.005 $\mu\text{g/L}$ 。该方法的定量限以及低、中、高 4 个浓度水平在日内和日间精密度 RSD 均优于 10%。

综上,液相色谱-串联质谱法检测血液中他克莫司浓度时,具有检测限低、灵敏度高和通量高等优点,但在分析前须保证样品的纯净度,故需进行繁琐的样品前处理。

2 原位电离质谱技术

2.1 纸喷雾质谱

纸喷雾电离(paper spray ionization, PSI)^[58]是一种原位电离技术,将待测样品加在切割成尖锐角度的纸基材上,施加喷雾溶剂,以促使分析物在纸基上的提取和电离,通过在纸基上施加高压使纸尖端处产生电喷雾,进入质谱锥孔进行检测,示于图6。

Shi 团队^[59]建立了一种纸喷雾质谱(PS-MS)法快速定量分析干血斑(DBS)中他克莫司,不需要复杂的样品预处理和色谱分离,PS 离子源直接从纸质衬底上的 DBS 中自动完成样品的提取与电离过程,总分析时间仅需 3 min。该研究使用含 0.1% 醋酸钠的甲醇-氯仿溶液(4:6, V/V)作为喷雾溶剂,对 DBS 中他克莫司进行洗脱并将其送入质谱仪检测,利用定量离子(m/z 826>616)的曲线面积对他克莫司进行定量分析,该方法在 1.5~30 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,灵敏度为 0.2 $\mu\text{g/L}$,精密度为 0.7 $\mu\text{g/L}$ 。此外,该研究对血斑载血量、方法特异性等进行了较完备的评价,证明 PS-MS 可准确定量分析他克莫司,对缩短检测时间、提高检测效率具有重要意义。

纸作为基底还存在不足之处,如,不良的导电性、不明确的尖锐尖端、处理较大体积样品时纸张有变形的倾向,以及不能进行液体样品的直接浸没^[60]。谢以清等^[61]使用铝基硅胶薄层板作

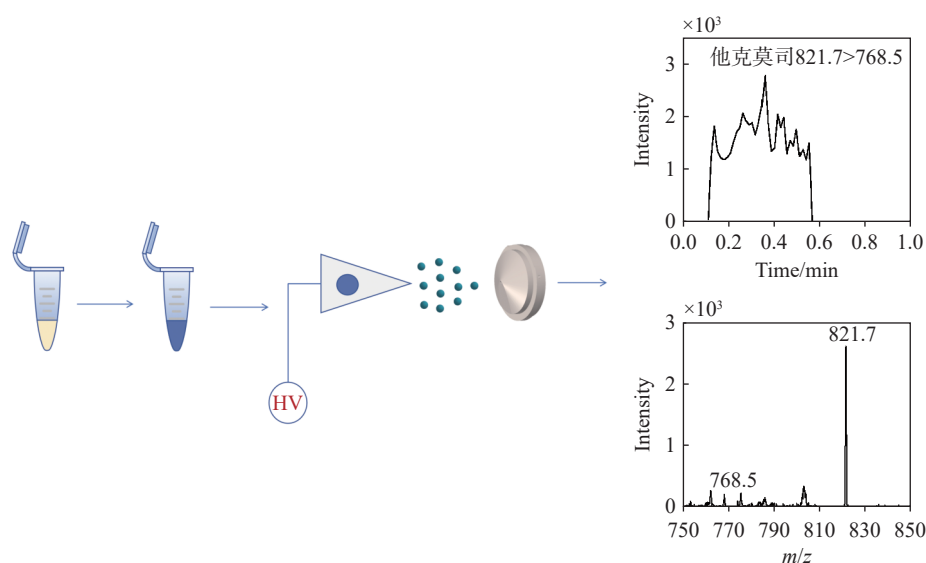


图6 纸喷雾质谱法检测流程图

Fig. 6 Flow chart of paper spray mass spectrometry

为纸喷雾离子源的基底材料,利用硅胶的吸附作用,在线完成样品的净化除杂过程,通过耦联小型便携式质谱仪,实现了血液中他克莫司、依维莫司、西罗莫司、环孢素 A、霉酚酸等 5 种免疫抑制剂的测定。结果表明,5 种免疫抑制剂在各自的线性范围内呈现良好的线性关系,相关系数(r)为 0.993 9~0.996 8,在低、中、高 3 个加标浓度水平下,平均回收率在 91.0%~114.3%之间, RSD $\leq$ 8.4%,检测周期小于 1 min。该方法简单快速、准确高效,适用于血液中免疫抑制剂的实时分析。

2.2 涂层刀片喷雾质谱

涂层刀片喷雾^[62](coated blade spray, CBS)是一种基于固相萃取的电离技术,可直接与质谱耦合,以实现复杂样品的快速定性和定量分析。CBS^[63-65]是一种由不锈钢制成的“剑状”器械,部分涂有基质相容性浸取相,其原理与纸喷雾相似。CBS 将取样和样品制备集成到单个步骤中,由于 CBS 所用涂层的生物相容性,可以实现目标分析物的快速提取/富集。分析步骤由 3 部分组成:1)分析物的提取/富集。将样品点样到 CBS 上,或从含有样品的容器中提取;2)涂层清洁。快速去除涂层表面上的任何基质;3)仪器分析。将洗脱溶剂滴加到涂层区域,几秒钟后,在刀片的非涂层区域施加高压,使其尖端产生泰勒锥,气态离子进入质谱进行分析。

Rickert 等^[66]将 CBS 与三重四极杆质谱联用测量他克莫司、依维莫司、西罗莫司、环孢素 A 等 4 种免疫抑制剂的浓度,评估了 10 天内重复测量的稳定性、线性和定量限,并与经验证的临床免疫测定结果进行比较。所有目标化合物的日间精密度 $\leq$ 5%,稳定性良好。该方法中,环孢素 A 在 2.5~1 000 $\mu\text{g/L}$,他克莫司、西罗莫司和依维莫司在 0.25~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好,环孢素 A、西罗莫司、依维莫司和他克莫司的定量限分别为 2.5、1.0、0.25 和 1.0 $\mu\text{g/L}$,与免疫法具有良好的一致性。

2.3 固相微萃取原位质谱

原位电离质谱法的灵敏度一般低于常规的液相色谱-串联质谱法,为实现复杂样品中痕量分析物的高灵敏度和选择性测定,研究人员开发了固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)同质谱联用的方法,为复杂的生物、环境、法

医、食品和个体小生物甚至单细胞样品中的痕量分析提供了直接、简单的分析手段。SPME 是一种集成了采样、分离与富集步骤的无溶剂预处理技术,与质谱联用可实现对分析物的有效分离、富集及检测^[67]。

Nazdrajic 等^[68]通过微流控开放接口将固相微萃取与质谱联用(Bio-SPME-MOI-MS/MS),快速测定人全血中他克莫司、西罗莫司、依维莫司和环孢素 A 等 4 种免疫抑制药物。通过对比分析基于荧光微粒免疫测定的临床验证的参考方法与 Bio-SPME-MOI-MS/MS 方法在监测接受免疫抑制药物治疗患者血液中的他克莫司和西罗莫司浓度时,这 2 种方法所得结果接近,且二者之间表现出显著的正相关性。相较于传统的荧光微粒免疫测定法,Bio-SPME-MOI-MS/MS 方法具有更快的分析速度、更好的选择性和灵敏度以及更宽的动态范围,因此,可作为测定全血中免疫抑制药物的替代方法。

3 总结与展望

免疫抑制剂的血药浓度质谱检测方法不断发展,灵敏度和准确度得到有效提升,为精准医疗提供了技术保障,对促进临床合理用药有着重要意义。LC-MS/MS 具有灵敏度高、准确性好、选择性强等优点,但也存在样品前处理过程繁琐、样品分析时间长、仪器设备昂贵和需要专业人员操作等问题。原位电离质谱的优点是减少了繁琐的样品预处理,但灵敏度较低,且存在基质干扰问题。因此,亟需开发一种既能简化样品预处理流程,又能显著提高检测灵敏度的质谱分析方法,以推动临床质谱技术的广泛应用和发展,为疾病的早期诊断和治疗提供更加有力的技术支持。

参考文献:

- [1] 张小燕,王国辉,韩士超,戚若晨,刘克普,魏迪,杨晓剑,马帅军,窦科峰,秦卫军.国内外异种器官移植的现状及进展[J]. [器官移植](#), 2024, 15(2): 276-281.
ZHANG Xiaoyan, WANG Guohui, HAN Shichao, QI Ruochen, LIU Kepu, WEI Di, YANG Xiaojian, MA Shuaijun, DOU Kefeng, QIN Weijun. Present situation and progress of xenotransplantation at home and abroad[J]. [Organ Transplantation](#), 2024, 15(2): 276-281 (in Chinese).
- [2] 吴灵洁,叶珍洁,张晓颖,俞晓玲,李超鹏,陈露露,刘小

- 龙. 免疫抑制剂治疗药物监测在器官移植领域的应用进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(3): 583-589.
- WU Lingjie, YE Zhenjie, ZHANG Xiaoying, YU Xiaoling, LI Chaopeng, CHEN Lulu, LIU Xiaolong. Application progress on therapeutic drug monitoring of immunosuppressants in organ transplantation[J]. Drug Evaluation Research, 2022, 45(3): 583-589(in Chinese).
- [3] 张金萍, 王相峰, 宋燕青. CYP3A5 多态性对肾移植术后患者他克莫司药代动力学的影响[J]. 实用器官移植电子杂志, 2020, 8(1): 68-70.
- ZHANG Jinping, WANG Xiangfeng, SONG Yanqing. Effect of CYP3A5 polymorphism on pharmacokinetics of tacrolimus in patients after renal transplantation[J]. Practical Journal of Organ Transplantation (Electronic Version), 2020, 8(1): 68-70(in Chinese).
- [4] KINO T, HATANAKA H, HASHIMOTO M, NISHIYAMA M, GOTO T, OKUHARA M, KOHSAKA M, AOKI H, IMANAKA H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics[J]. The Journal of Antibiotics, 1987, 40(9): 1 249-1 255.
- [5] 宋爱凤, 胡萍, 杨大伟. 他克莫司血药浓度检测方法的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3 497-3 500.
- SONG Aifeng, HU Ping, YANG Dawei. Research progress on detection methods of tacrolimus blood concentration[J]. Drugs & Clinic, 2019, 34(11): 3 497-3 500(in Chinese).
- [6] MIYATA S, OHKUBO Y, MUTOH S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis[J]. Inflammation Research, 2005, 54(1): 1-9.
- [7] 王意如. 免疫抑制剂研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(7): 512-515.
- WANG Yiru. Recent advances in immunosuppressive drugs[J]. Chinese New Drugs Journal, 2002, 11(7): 512-515 (in Chinese).
- [8] 黄金沐, 池慧琼, 张忠阳. 他克莫司的研究概况[J]. 海峡药学, 2010, 22(11): 148-150.
- HUANG Jinmu, CHI Huiqiong, ZHANG Zhongyang. General situation of tacrolimus research[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 22(11): 148-150(in Chinese).
- [9] 王立明, 闵志廉, 朱有华, 高春芳, 陆慧琦, 周梅生, 姚亚成. 肾移植受者应用他克莫司治疗窗浓度的探讨[J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(3): 145-146.
- WANG Liming, MIN Zhilian, ZHU Youhua, GAO Chunfang, LU Huiqi, ZHOU Meisheng, YAO Yacheng. Clinical research of FK506 therapeutic window concentration in renal transplant recipients[J]. Chinese Journal of Organ Transplantation, 2000, 21(3): 145-146(in Chinese).
- [10] ALAK A M. Measurement of tacrolimus (FK506) and its metabolites: a review of assay development and application in therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies[J]. Scientific Reports, 1997, 19(3): 338-351.
- [11] RODRÍGUEZ FABA O, BOISSIER R, BUDDE K, FIGUEIREDO A, TAYLOR C F, HEVIA V, LLEDÓ GARCÍA E, REGELE H, ZAKRI R H, OLSBURGH J, BREDA A. European association of urology guidelines on renal transplantation: update 2018[J]. European Urology Focus, 2018, 4(2): 208-215.
- [12] BANSAL S. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in kidney transplantation[J]. Indian Journal of Transplantation, 2020, 14(1): 8.
- [13] 孙艺哲, 张平安. 肾移植患者他克莫司血药谷浓度与肝肾功能及血常规指标的关系[J]. 贵州医药, 2019, 43(1): 79-82.
- SUN Yizhe, ZHANG Ping'an. Relationship between the concentration of tacrolimus in blood and liver and kidney function and blood routine indexes in renal transplant patients[J]. Guizhou Medical Journal, 2019, 43(1): 79-82(in Chinese).
- [14] 王雨, 叶学军, 何盛南, 戴一凡, 蔡志明, 牟丽莎. 异种器官移植过程中预防 T 细胞排斥反应的研究进展[J]. 器官移植, 2017, 8(4): 324-327.
- WANG Yu, YE Xuejun, HE Shengnan, DAI Yifan, CAI Zhiming, MOU Lisha. Research progress in preventing T cell rejection during xenotransplantation[J]. Organ Transplantation, 2017, 8(4): 324-327(in Chinese).
- [15] TSUNODA S M, AWEEKA F T. Drug concentration monitoring of immunosuppressive agents: focus on tacrolimus, mycophenolate mofetil and sirolimus[J]. Bio-Drugs, 2000, 14(6): 355-369.
- [16] JACOB S, NAIR A B. A review on therapeutic drug monitoring of the mTOR class of immunosuppressants: everolimus and sirolimus[J]. Drugs & Therapy Perspectives, 2017, 33(6): 290-301.
- [17] 陈惠芳, 刘锋, 吴丽荣, 苏丽婷. 环孢素 A 和他克莫司血药浓度检测方法比较分析[J]. 中国处方药, 2019, 17(9): 41-42.
- CHEN Huifang, LIU Feng, WU Lirong, SU Liting. Comparative analysis of detection methods of cyclosporine A and tacrolimus in blood[J]. Journal of China Prescription Drug, 2019, 17(9): 41-42(in Chinese).
- [18] 梁陈方, 王亚洲. 反相高效液相色谱法测定他克莫司的血药浓度[J]. 广西医学, 2009, 31(3): 425-426.
- LIANG Chenfang, WANG Yazhou. Determination of

- tacrolimus in plasma by RP-HPLC[J]. *Guangxi Medical Journal*, 2009, 31(3): 425-426(in Chinese).
- [19] 高英娇. 食品快速检测技术的研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2022(29): 159-161.
- GAO Yingjiao. Research progress of food rapid detection technology in China[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(29): 159-161(in Chinese).
- [20] 赵芸, 张乐, 柳爱春. 免疫分析技术在兽药残留检测中的应用[J]. *浙江农业科学*, 2017, 58(3): 489-492, 496.
- ZHAO Yun, ZHANG Le, LIU Aichun. Application of immunoassay technology in detection of veterinary drug residues[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2017, 58(3): 489-492, 496(in Chinese).
- [21] SHIPKOVA M, VALBUENA H. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: achievements, lessons and open issues[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 84: 23-33.
- [22] 刘素如. 高效液相色谱法在药品检验中的应用[J]. *中国现代药物应用*, 2023, 17(8): 173-175.
- LIU Suru. Application of high performance liquid chromatography in drug testing[J]. *Chinese Journal of Modern Drug Application*, 2023, 17(8): 173-175(in Chinese).
- [23] ZHENG Y, WANG S. Advances in antifungal drug measurement by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 491: 132-145.
- [24] BIANCHI F, RIBONI N, TERMOPOLI V, MENDEZ L, MEDINA I, ILAG L, CAPPIELLO A, CARERI M. MS-based analytical techniques: advances in spray-based methods and EI-LC-MS applications[J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, doi: 10.1155/2018/1308167.
- [25] 刘欢, 崔球. 原位电离质谱技术在微生物菌株筛选中的应用进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 980-999.
- LIU Huan, CUI Qiu. Advances and applications of ambient ionization mass spectrometry in screening of microbial strains[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 980-999(in Chinese).
- [26] THOMAS S N, FRENCH D, JANNETTO P J, RAPOLD B A, CLARKE W A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 2: 96.
- [27] KUO T H, DUTKIEWICZ E P, PEI J, HSU C C. Ambient ionization mass spectrometry today and tomorrow: embracing challenges and opportunities[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(3): 2 353-2 363.
- [28] FINE J, KUAN-YU LIU J, BECK A, ALZARIENI K Z, MA X, BOULOS V M, KENTTÄMAA H I, CHOPRA G. Graph-based machine learning interprets and predicts diagnostic isomer-selective ion-molecule reactions in tandem mass spectrometry[J]. *Chem Sci*, 2020, 11(43): 11 849-11 858.
- [29] 武杨柳, 李栋, 康露, 韩丽君, 潘灿平. 质谱技术在农药残留分析中的研究进展[J]. *质谱学报*, 2021, 42(5): 691-708.
- WU Yangliu, LI Dong, KANG Lu, HAN Lijun, PAN Canping. Research progress of mass spectrometry in pesticide residue analysis[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(5): 691-708(in Chinese).
- [30] 杨旭萍, 蒋振伟, 蒋艳, 凌静, 董露露, 邹素兰, 胡楠. LC-MS/MS法测定人全血中他克莫司和西罗莫司浓度及临床应用[J]. *中南药学*, 2022, 20(11): 2 514-2 519.
- YANG Xuping, JIANG Zhenwei, JIANG Yan, LING Jing, DONG Lulu, ZOU Sulan, HU Nan. Simultaneous determination of tacrolimus and sirolimus in human blood by LC-MS/MS and its clinical application[J]. *Central South Pharmacy*, 2022, 20(11): 2 514-2 519(in Chinese).
- [31] CHEN F, YANG X, LI H, ZENG X, DENG Z, WANG H, JIN Y, QIU C, SHI Z. Improved LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of tacrolimus and cyclosporine A in human blood and application to therapeutic drug monitoring[J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(12): e5751.
- [32] 谢以清, 吕悦广, 孟宪双, 雷海民, 马强. 超分子溶剂萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中他克莫司含量[J]. *分析测试学报*, 2023, 42(5): 559-567.
- XIE Yiqing, LYU Yueguang, MENG Xianshuang, LEI Haimin, MA Qiang. Determination of tacrolimus in plasma by supramolecular solvent extraction/ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2023, 42(5): 559-567(in Chinese).
- [33] 翟晓慧, 刘晓雪, 陆佳倩, 安会敏, 周佩军, 陈冰. LC-MS/MS法同时分析血液中几种免疫抑制剂浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(8): 774-780.
- ZHAI Xiaohui, LIU Xiaoxue, LU Jiaqian, AN Huimin, ZHOU Peijun, CHEN Bing. Establishment of LC-MS/MS assay for the determination of blood immunosuppressive agents level simultaneously[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2019, 39(8): 774-780(in Chinese).
- [34] 赵冠人, 申健, 彭明丽, 蒋南. HPLC-MS/MS法测定全血中他克莫司的浓度[J]. *中国药物应用与监测*, 2014, 11(5): 276-278.
- ZHAO Guanren, SHEN Jian, PENG Mingli, JIANG Nan. Determination of tacrolimus in human whole blood by

- HPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring, 2014, 11(5): 276-278(in Chinese).
- [35] HUO Y, ZHANG S, PAN C, SHAN H, XU Y, CAI X. A robust procedure for determination of immunosuppressants cyclosporine A and tacrolimus in blood samples with detection of LC-MS/MS[J]. *Chromatographia*, 2023, 86(3): 255-263.
- [36] GONG Z, WU Z, XU S, HAN W, JIANG X, LIU H, LI Y, HU W, WANG Y. A high-throughput LC-MS/MS method for the quantification of four immunosuppressants drugs in whole blood[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 498: 21-26.
- [37] 吴淑萍, 杨志晖. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定人全血中他克莫司浓度[J]. 空军医学杂志, 2015, 31(5): 299-301, 305.
- WU Shuping, YANG Zhihui. Determination of tacrolimus in human blood by online solid phase extraction column switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Medical Journal of Air Force, 2015, 31(5): 299-301, 305(in Chinese).
- [38] 杨飞, 纪元, 王颖, 范子彦, 唐纲岭. 通过式固相萃取柱净化-高效液相色谱-串联质谱法测定人全血中环孢素A和他克莫司的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(11): 1 254-1 259.
- YANG Fei, JI Yuan, WANG Ying, FAN Ziyang, TANG Gangling. Determination of cyclosporin A and tacrolimus in human whole blood by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after purification with pass-through solid phase extraction column[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2022, 58(11): 1 254-1 259(in Chinese).
- [39] BODNAR-BRONIARCZYK M, WARZYSZYŃSKA K, CZERWIŃSKA K, MARSZAŁEK D, DZIEWA N, KOSIERADZKI M, PAWIŃSKI T. Development and validation of the new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of unbound tacrolimus in the plasma ultrafiltrate of transplant recipients[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3): 632.
- [40] 贾永娟, 刘杏立, 刘春冉, 倪君君. 液相色谱-串联质谱法同时测定人全血中4种免疫抑制剂药物浓度[J]. 分析科学学报, 2024, 40(1): 70-74.
- JIA Yongjuan, LIU Xingli, LIU Chunran, NI Junjun. Simultaneous determination of four immunosuppressants concentrations in human whole blood by LC-MS/MS[J]. Journal of Analytical Science, 2024, 40(1): 70-74(in Chinese).
- [41] KARCH K R. Elucidation of histone modifications and nucleosomal structure using novel mass spectrometry approaches[D]. Pennsylvania: University of Pennsylvania, 2018.
- [42] FANG X, XIE J, CHU S, JIANG Y, AN Y, LI C, GONG X, ZHAI R, HUANG Z, QIU C, DAI X. Quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry system for clinical biomarker analysis[J]. Engineering, 2022, 16: 56-64.
- [43] 易可可, 谢洁, 龚晓云, 翟睿, 彭涛, 曾伟杰, 刘梅英, 黄泽建, 江游, 时国庆, 戴新华, 方向. 液相色谱-串联质谱应用研究进展[J]. 计量科学与技术, 2021, 65(2): 6,7-15.
- YI Keke, XIE Jie, GONG Xiaoyun, ZHAI Rui, PENG Tao, ZENG Weijie, LIU Meiyang, HUANG Zejian, JIANG You, SHI Guoqing, DAI Xinhua, FANG Xiang. Progress in the application study of liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Metrology Science and Technology, 2021, 65(2): 6,7-15.(in Chinese).
- [44] 杨宝坤, 姜婷, 向玉, 徐伟, 翟雁冰. 小型离子阱质谱技术研究进展[J]. 真空与低温, 2022, 28(4): 453-462.
- YANG Baokun, JIANG Ting, XIANG Yu, XU Wei, ZHAI Yanbing. Recent advances on miniaturized ion trap mass spectrometry[J]. *Vacuum and Cryogenics*, 2022, 28(4): 453-462(in Chinese).
- [45] BITTERSÖHL H, SCHNIEDEWIND B, CHRISTIANS U, LUPPA P B. A simple and highly sensitive on-line column extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of protein-unbound tacrolimus in human plasma samples[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1 547: 45-52.
- [46] CHERNUSHEVICH I V, LOBODA A V, THOMSON B A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. Gastroenterology & Hepatology, 2001, 36(8): 849-865.
- [47] MAMYRIN B A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects)[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001, 206(3): 251-266.
- [48] LACORTE S, FERNANDEZ-ALBA A R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2006, 25(6): 866-880.
- [49] 王聪, 梁瑞强, 曹进, 丁宏. 高分辨质谱在食品检测分析中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1 038-1 044.
- WANG Cong, LIANG Ruiqiang, CAO Jin, DING Hong. Application progress of high resolution mass spectrometry in food analysis[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(5): 1 038-1 044(in Chinese).
- [50] BRUNS K, MÖNNIKES R, LACKNER K J. Quantitative determination of four immunosuppressants by high resolution mass spectrometry (HRMS)[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(7): 1 193-1 200.

- [51] POLTASH M L, McCABE J W, PATRICK J W, LAGANOWSKY A, RUSSELL D H. Development and evaluation of a reverse-entry ion source orbitrap mass spectrometer[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(1): 192-198.
- [52] HU Q, NOLL R J, LI H, MAKAROV A, HARDMAN M, GRAHAM COOKS R. The Orbitrap: a new mass spectrometer[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, 40(4): 430-443.
- [53] 覃翔, 廖强. 静电场轨道阱高分辨质谱技术在中药分析中的应用进展[J]. *中国药师*, 2022, 25(7): 1 240-1 245.
- QIN Xiang, LIAO Qiang. Application progress in electrostatic field Orbitrap high resolution mass spectrometry in traditional Chinese medicine analysis[J]. *China Pharmacist*, 2022, 25(7): 1 240-1 245(in Chinese).
- [54] SCIGELOVA M, MAKAROV A. Advances in bioanalytical LC-MS using the Orbitrap™ mass analyzer[J]. *Bioanalysis*, 2009, 1(4): 741-754.
- [55] SUN B, KOVATCH J R, BADIONG A, MERBOUH N. Optimization and modeling of quadrupole orbitrap parameters for sensitive analysis toward single-cell proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(10): 3 711-3 721.
- [56] 胡明珠, 孟宪双, 王春, 王长海, 牛增元, 白桦, 马强. 质谱在高通量快速检测技术中的应用研究进展[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(2): 127-138.
- HU Mingzhu, MENG Xianshuang, WANG Chun, WANG Changhai, NIU Zengyuan, BAI Hua, MA Qiang. Advances in application of mass spectrometry in high-throughput and rapid detection[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37(2): 127-138(in Chinese).
- [57] QIN W, CHEN W, WANG X, ZHANG D, DU W, LI S, LI B, ZUO X, WANG X. A highly sensitive method for determination of tacrolimus in peripheral blood mononuclear cells by nano liquid chromatography-high resolution accurate mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2023, 1 706: 464 259.
- [58] BENEITO-CAMBRA M, GILBERT-LÓPEZ B, MORENO-GONZÁLEZ D, BOUZA M, FRANZKE J, GARCÍA-REYES J F, MOLINA-DÍAZ A. Ambient (desorption/ionization) mass spectrometry methods for pesticide testing in food: a review[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(40): 4 831-4 852.
- [59] SHI R Z, EL GIERARI E T M, MANICKE N E, FAIX J D. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry (PS-MS/MS)[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 441: 99-104.
- [60] MANICKE N E, BILLS B J, ZHANG C. Analysis of biofluids by paper spray MS: advances and challenges[J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(6): 589-606.
- [61] 谢以清, 郭项雨, 张文鹏, 欧阳证, 马强. 薄层纸喷雾离子化-小型便携式质谱法即时检验血液中免疫抑制剂[J]. *质谱学报*, 2023, 44(6): 762-769.
- XIE Yiqing, GUO Xiangyu, ZHANG Wenpeng, OUYANG Zheng, MA Qiang. Point-of-care testing of immunosuppressants in blood using thin-layer paper spray ionization and a miniature mass spectrometer[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2023, 44(6): 762-769(in Chinese).
- [62] GÓMEZ-RÍOS G A, TASCÓN M, PAWLISZYN J. Coated blade spray: shifting the paradigm of direct sample introduction to MS[J]. *Bioanalysis*, 2018, 10(4): 257-271.
- [63] GÓMEZ-RÍOS G A, PAWLISZYN J. Development of coated blade spray ionization mass spectrometry for the quantitation of target analytes present in complex matrices[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2014, 53(52): 14 503-14 507.
- [64] KONERMANN L, AHADI E, RODRIGUEZ A D, VAHIDI S. Unraveling the mechanism of electrospray ionization[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(1): 2-9.
- [65] REYES-GARCÉS N, GIONFRIDDO E, GÓMEZ-RÍOS G A, ALAM M N, BOYACI E, BOJKO B, SINGH V, GRANDY J, PAWLISZYN J. Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(1): 302-360.
- [66] RICKERT D A, GÓMEZ-RÍOS G A, NAZDRAJIC E, TASCÓN M, KULASINGAM V, PAWLISZYN J B. Evaluation of a coated blade spray-tandem mass spectrometry assay as a new tool for the determination of immunosuppressive drugs in whole blood[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(21): 5 067-5 076.
- [67] GUO T, YONG W, JIN Y, ZHANG L, LIU J, WANG S, CHEN Q, DONG Y, SU H, TAN T. Applications of DART-MS for food quality and safety assurance in food supply chain[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2017, 36(2): 161-187.
- [68] NAZDRAJIC E, TASCÓN M, RICKERT D A, GÓMEZ-RÍOS G A, KULASINGAM V, PAWLISZYN J B. Rapid determination of tacrolimus and sirolimus in whole human blood by direct coupling of solid-phase microextraction to mass spectrometry via microfluidic open interface[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1 144: 53-60.

(收稿日期: 2024-04-23; 修回日期: 2025-01-10)