AML患者血浆中维奈克拉、白消安和伏立康唑浓度测定方法的建立与应用Δ

张振华[1,2]*,张梦茹[1,2],郭傲翔[1,3],陈　卉[1,3],乡世健[1,3],周本杰[1,3],葛冰琛[1,3#][1.中山大学第七附属医院(深圳)药学部,广东 深圳　518107;2.中山大学药学院(深圳),广东 深圳　518107;3.深圳中药活性物质筛选与转化研究重点实验室,广东 深圳　518107]

中图分类号　R969　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2026)10-1323-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2026.10.15

摘　要　目的　建立同时测定急性髓系白血病(AML)患者血浆中维奈克拉、白消安和伏立康唑浓度的方法并应用于临床。**方法**　血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,分别以维奈克拉-D_8、白消安-D_8、泊沙康唑为内标,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测。以Phenomenex Kinetex® C_{18}为色谱柱,以0.1%甲酸溶液(含2 mmol/L乙酸铵)-0.1%甲酸乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱;流速为0.8 mL/min;柱温为40 ℃;进样量为5 μL;运行时间为3.10 min;采用电喷雾离子源,以多反应监测方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对包括*m/z* 868.4→636.3(维奈克拉)、*m/z* 264.1→151.1(白消安)、*m/z* 350.1→224.0(伏立康唑)等。采用上述LC-MS/MS法测定10例联合用药AML患者体内维奈克拉、伏立康唑的血药浓度和5例行异基因造血干细胞移植预处理患者体内白消安的血药浓度。**结果**　维奈克拉、白消安、伏立康唑检测质量浓度的线性范围分别为50～10 000、15～3 000、50～10 000 ng/mL(R^2≥0.999 0),定量下限分别为50、15、50 ng/mL;3种待测药物的日内、日间精密度的RSD均低于10%,准确度(相对误差)为−10.00%～12.96%;平均提取回收率为92.54%～100.95%,平均基质效应为89.98%～101.49%,稀释可靠性可覆盖试验样品所用的稀释倍数,稳定性试验的相对误差绝对值均不高于16.25%。纳入患者体内维奈克拉、白消安、伏立康唑的血药浓度分别为496.20～4 250.45、233.48～2 002.28、475.51～5 710.18 ng/mL。**结论**　所建LC-MS/MS法快速、灵敏、操作简便,可用于AML患者维奈克拉、白消安和伏立康唑血药浓度治疗药物监测。

关键词　维奈克拉;白消安;伏立康唑;急性髓系白血病;液相色谱-串联质谱法;治疗药物监测

Establishment and application of a determination method for plasma concentrations of venetoclax, busulfan and voriconazole in patients with acute myeloid leukemia

ZHANG Zhenhua[1,2], ZHANG Mengru[1,2], GUO Aoxiang[1,3], CHEN Hui[1,3], XIANG Shijian[1,3], ZHOU Benjie[1,3], GE Bingchen[1,3][1. Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 3. Shenzhen Key Laboratory of Chinese Medicine Active Substance Screening and Translational Research, Guangdong Shenzhen 518107, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of venetoclax, busulfan and voriconazole in plasma of patients with acute myeloid leukemia (AML), and apply it clinically. **METHODS** Plasma samples were subjected to protein precipitation using acetonitrile and subsequently analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using venetoclax-D_8, busulfan-D_8 and posaconazole as internal standards. The separation was performed on a Phenomenex Kinetex® C_{18} column with a mobile phase composed of 0.1% formic acid solution (2 mmol/L ammonium acetate)-0.1% formic acid in acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃, the sample size was 5 μL, and the total run time was 3.10 min. An electrospray ionization source was employed, and positive ion scanning was conducted using multiple reaction monitoring mode. The ion pairs used for quantitative analysis included *m/z* 868.4→636.3 (venetoclax), *m/z* 264.1→151.1 (busulfan), and *m/z* 350.1→224.0 (voriconazole). The above LC-MS/MS method was adopted to determine plasma concentrations of venetoclax and voriconazole in 10 AML patients, as well as plasma concentration of busulfan in 5 patients undergoing conditioning treatment for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **RESULTS** The linear ranges of venetoclax, busulfan and voriconazole were 50-10 000, 15-3 000 and 50-10 000 ng/mL, respectively (R^2≥0.999 0), with lower limits

Δ **基金项目** 深圳市重点实验室组建项目(No.ZDSYS20220606-100801003);中国医药教育协会2025年医院高质量发展与药物创新研究专项课题(No.2025-PJZXKT-31)

* **第一作者** 硕士。研究方向:临床药理。E-mail:zhangzhh-225@alumni.sysu.edu.cn

\# **通信作者** 主管药师,硕士。研究方向:体内药物分析及个体化给药。E-mail:gebingchen@sysush.com

of quantification of 50, 15 and 50 ng/mL, respectively. The RSDs of intra-day and inter-day precision tests for all three analytes were all less than 10%, with accuracy (relative errors) ranging from −10.00% to 12.96%. The average extraction recovery ranged from 92.54% to 100.95%, and the average matrix effect was 89.98%-101.49%. Dilution reliability covered all dilution factors used in the test samples, and the absolute values of relative errors in stability tests were all≤16.25%. The plasma concentrations of venetoclax, busulfan and voriconazole in enrolled patients were 496.20-4 250.45, 233.48-2 002.28 and 475.51-5 710.18 ng/mL, respectively. **CONCLUSIONS** The LC-MS/MS method established in this study is rapid, sensitive and easy to operate, and can be used for the therapeutic drug monitoring of venetoclax, busulfan and voriconazole.

KEYWORDS venetoclax; busulfan; voriconazole; acute myeloid leukemia; LC-MS/MS; therapeutic drug monitoring

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)是最常见的白血病类型之一。据统计,2019年我国AML的发病率约为每10万人口1.24例,占所有急性白血病患者数的54%[1]。目前,异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)被视为用于AML关键且有效的治疗手段[2]。白消安在allo-HSCT预处理中具有关键作用,可有助于清除骨髓[3]。然而,该药的血药浓度治疗窗窄且个体差异较大[4],故临床有必要对接受allo-HSCT预处理的患者体内白消安的暴露量进行监测,以防止疗效不佳(血药浓度过低所致)或发生不良反应(剂量过高所致)。另一种常用于AML患者的治疗药物是维奈克拉。该药是一种高度选择性的B细胞淋巴瘤2抑制剂[5]。已有多项研究表明,对于接受allo-HSCT治疗的特定人群(如老年、高危或复发/难治性AML患者),在移植前采用维奈克拉联合白消安+磷酸氟达拉滨预处理方案显示出可接受的安全性和潜在生存获益[6-8]。然而,维奈克拉的体内代谢受多种因素影响,包括饮食差异和与细胞色素P450 3A4(cytochrome P450 3A4,CYP3A4)抑制剂的联合使用[9];此外,AML患者大多免疫功能低下,发生真菌感染的风险很高,特别是侵袭性真菌病,故多接受伏立康唑治疗[10]。伏立康唑是一种CYP3A4抑制剂,可能导致维奈克拉体内暴露量显著增加;此外,维奈克拉药品说明书指出,当患者联用伏立康唑时,临床可能需要调整维奈克拉剂量。因此,对患者进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring,TDM)以精准调整药物剂量十分必要。

目前,已有研究者采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry,LC-MS/MS)法分别检测人血浆中维奈克拉[11-12]、白消安[13]或伏立康唑[14]的浓度。然而,这些方法存在预处理步骤复杂、灵敏度低以及不能同时定量3种药物等不足。基于此,本研究建立了一种可用于同时测定AML患者血浆中维奈克拉、白消安和伏立康唑浓度的LC-MS/MS法,并将其用于临床[研究方案经中山大学第七附属医院(深圳)医学伦理委员会批准,批件号为KY-2025-325-01、KY-2024-412-02],以期为AML患者的精准治疗提供TDM技术手段,为了解药物相互作用,确保患者安全、合理用药奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

CalQuant-S型LC-MS/MS系统购自杭州凯莱谱科技股份有限公司;EX125DZH型十万分之一天平购自奥豪斯仪器(上海)有限公司;5804R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;VORTEX-5型涡旋混合器购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 主要药品与试剂

维奈克拉对照品(批号271193,纯度99%)、维奈克拉-D_8对照品(维奈克拉的内标,批号288297,纯度95%)、白消安-D_8对照品(白消安的内标,批号263340,纯度99%)均购自美国MCE公司;伏立康唑对照品(批号CHB-F-80,纯度98%)、泊沙康唑对照品(伏立康唑的内标,批号CHB240124,纯度98%)均购自成都克罗玛生物技术有限公司;白消安对照品(批号SB8770,纯度98%)购自北京索莱宝生物技术有限公司。乙腈、乙酸铵、甲酸、二甲基亚砜(DMSO)均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

1.3 空白血浆

空白血浆来自本课题组成员职工体检剩余样本。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

以Phenomenex Kinetex® C_{18}(2.1 mm×50 mm,2.6 μm)为色谱柱;以0.1%甲酸溶液(含2 mmol/L乙酸铵)为流动相A、0.1%甲酸乙腈溶液为流动相B进行梯度洗脱(0～0.50 min,15%B;0.50～0.60 min,15%B→28%B;0.60～1.35 min,28%B→58%B;1.35～1.55 min,58%B→98%B;1.55～2.59 min,98%B;2.59～2.61 min,98%B→15%B;2.61～3.10 min,15%B);流速为0.8 mL/min;柱温为40 ℃;进样量为5 μL;运行时间为3.10 min。

采用电喷雾离子源,以多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)方式进行正离子扫描;离子喷射电压为5 500 V;电离温度为550 ℃;气帘气压力为25 psi;雾化气温度为50 ℃;辅助加热气压力为55 psi;碰撞气压力为4 psi;用于定量分析的离子对及其余MRM参数见表1。

2.2 相关溶液的制备

2.2.1 对照品溶液和质控溶液

精密称取维奈克拉对照品5.0 mg,置于5 mL容量瓶中,加DMSO溶解并定容,制成质量浓度为1 mg/mL的

表1　3种待测药物及其内标的MRM参数

待测药物/内标	母离子m/z	子离子m/z	去簇电压/V	碰撞电压/V	扫描时间/ms	保留时间/min
维奈克拉	868.4	636.3	185.1	36.0	80	1.76
维奈克拉-D_8	876.4	644.5	178.2	37.1	80	1.74
白消安	264.1	151.1	35.0	15.5	80	0.61
白消安-D_8	272.1	159.1	44.0	15.1	80	0.59
伏立康唑	350.1	224.0	185.1	36.0	80	1.31
泊沙康唑	701.4	614.4	146.0	53.0	80	1.68

储备溶液；精密称取白消安、伏立康唑各5.0 mg，分别置于5 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容，制成质量浓度均为1 mg/mL的储备溶液。将上述储备溶液于－40 ℃下保存。临用前，分别取上述维奈克拉、伏立康唑、白消安储备溶液100、100、30 μL，混匀，加入50%乙腈770 μL，制得质量浓度分别为100 000、100 000、30 000 ng/mL的混合标准品溶液。取该混合标准品溶液，用50%乙腈依次稀释，得维奈克拉和伏立康唑质量浓度分别均为100 000、50 000、25 000、12 500、2 500、1 000、500 ng/mL，白消安质量浓度分别为30 000、15 000、7 500、3 750、750、300、150 ng/mL的混合系列标准溶液。同时，同法配制维奈克拉、伏立康唑质量浓度分别均为80 000、16 000、1 333.3 ng/mL和白消安质量浓度分别为24 000、4 800、400 ng/mL的混合质控样品溶液。

2.2.2　内标溶液

精密称取维奈克拉-D_8对照品1.0 mg，置于1 mL EP管中，加DMSO溶解，制成质量浓度为1 mg/mL的内标储备溶液；精密称取白消安-D_8、泊沙康唑对照品各1.0 mg，置于1 mL EP管中，加甲醇溶解，制成质量浓度均为1 mg/mL的内标储备溶液。取维奈克拉-D_8、白消安-D_8、泊沙康唑内标储备液，用50%乙腈稀释，得上述内标质量浓度分别为0.01、0.02、0.2 mg/mL的混合内标溶液，于－40 ℃下保存，备用。

2.2.3　混合标准曲线血浆样品和质控血浆样品

精密量取空白血浆45 μL，分别加入上述混合系列标准溶液各5 μL，制成维奈克拉和伏立康唑质量浓度分别均为10 000、5 000、2 500、1 250、250、100、50 ng/mL，白消安质量浓度分别为3 000、1 500、750、375、75、30、15 ng/mL的系列混合标准曲线血浆样品。同法配制3种待测药物的混合定量下限（lower limit of quantification，LLOQ）、低质量浓度质控（low-level quality control，LQC）、中质量浓度质控（medium-level quality control，MQC）、高质量浓度质控（high-level quality control，HQC）血浆样品（维奈克拉和伏立康唑分别均为50.00、133.33、1 600.00、8 000.00 ng/mL，白消安分别为15.00、40.00、480.00、2 400.00 ng/mL），备用。

2.3　血浆样品预处理

取血浆样品50 μL，置于1.5 mL离心管中，加入含内标的混合沉淀剂（含“2.2.2”项下混合内标溶液10 μL和乙腈290 μL）300 μL，涡旋混匀1 min后，于4 ℃下以14 000 r/min离心8 min，取上清液5 μL进样分析。

2.4　方法学考察

按照2020年版《中国药典》（四部）通则的相关要求[15]，对所建LC-MS/MS方法进行方法学考察。

2.4.1　专属性

分别选取6个不同来源的健康人空白血浆，“2.2.3”项下的LLOQ、HQC血浆样品，以及实测血浆样品（某联用维奈克拉和伏立康唑患者的血浆样品），按照“2.3”项下方法处理（空白血浆不加内标），再按“2.1”项下条件进样分析，记录色谱图。结果显示，维奈克拉、维奈克拉-D_8、白消安、白消安-D_8、伏立康唑、泊沙康唑色谱峰峰形良好，内源性物质对上述成分的检测基本无影响，提示方法专属性良好（限于篇幅，具体MRM图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1）。

2.4.2　线性关系与LLOQ考察

取“2.2.3”项下系列混合标准曲线血浆样品，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样分析，记录峰面积。以各待测药物与对应内标的峰面积比值为纵坐标、待测药物质量浓度为横坐标，采用最小加权法（加权系数$1/X^2$）进行线性回归。结果（表2）显示，维奈克拉和伏立康唑检测质量浓度的线性范围均为50～10 000 ng/mL（R^2分别为0.999 0、0.999 9），LLOQ均为50 ng/mL；白消安检测质量浓度的线性范围为15～3 000 ng/mL（R^2＝0.999 0），LLOQ为15 ng/mL。

表2　3种药物定量分析的回归方程和线性范围

待测药物	回归方程	R^2	线性范围/(ng/mL)
维奈克拉	$Y=4.184\,42\times10^{-4}X+0.001\,97$	0.999 0	50～10 000
白消安	$Y=4.314\,01\times10^{-4}X-9.710\,52\times10^{-5}$	0.999 0	15～3 000
伏立康唑	$Y=4.524\,73\times10^{-4}X+1.015\,59\times10^{-5}$	0.999 9	50～10 000

2.4.3　精密度与准确度

取“2.2.3”项下3种待测药物的LLOQ、LQC、MQC、HQC血浆样品，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样分析，重复6次，考察日内精密度（以RSD表示）；连续测定3 d，考察日间精密度（以RSD表示）；以实测质量浓度与理论质量浓度进行比较，考察准确度[以相对误差（relative error，RE）表示]。结果（表3）显示，日内、日间精密度试验的RSD均小于10%（n＝6或n＝18），RE为－10.00%～12.96%。

2.4.4　提取回收率与基质效应

按“2.2.3”项下方法配制维奈克拉、白消安、伏立康唑的LQC、MQC、HQC血浆样品，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样测定，记录各待测药物与对应内标的峰面积比值（A）。以初始流动相为溶剂，配制相应质量浓度的待测药物溶液（最终质量浓度与上述质控样品一致），按“2.1”项下条件进样测定，记录各待测药物与对应内标的峰面积比值（B）。取6份不同来源的空白血浆，按“2.3”项下方法处理后，再加入维奈克拉、白消安、伏立康唑相应质量浓度对照品溶液（最终质量浓度与上述质控样品一致），再按“2.1”项下条件进样测定，记录各待测药物与对应内标的峰面积比值（C）。每质量浓

表3　3种药物定量分析的精密度与准确度试验结果

待测药物	理论质量浓度/(ng/mL)	日内(n=6)			日间(n=18)		
		实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	RSD/%	RE/%	实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	RSD%	RE/%
维奈克拉	50.00	48.85±3.62	7.41	−2.30	48.02±3.04	6.33	−3.96
	133.33	130.30±5.07	3.89	−2.27	129.10±5.69	4.41	−3.17
	1 600.00	1 598.28±42.62	2.67	−0.11	1 647.29±61.23	3.72	2.99
	8 000.00	7 754.55±364.33	4.70	−3.07	8 233.14±426.73	5.18	2.91
白消安	15.00	13.83±1.28	9.26	−7.80	14.67±1.23	8.38	−2.20
	40.00	36.00±1.51	4.19	−10.00	37.79±2.80	7.41	−5.53
	480.00	433.57±15.62	3.60	−9.67	471.43±43.39	9.20	−1.79
	2 400.00	2 242.27±95.53	4.26	−6.57	2 431.92±202.74	8.34	1.33
伏立康唑	50.00	56.48±2.12	3.75	12.96	54.00±3.00	5.56	8.00
	133.33	141.36±4.67	3.30	6.02	135.72±8.38	6.17	1.79
	1 600.00	1 684.57±78.65	4.67	5.29	1 682.19±83.87	4.99	5.14
	8 000.00	8 464.29±577.82	6.83	5.80	8 538.31±544.46	6.38	6.73

度平行6份，按下式分别计算提取回收率和基质效应：提取回收率(%)＝A/C×100%，基质效应(%)＝C/B×100%。结果(表4)显示，3种待测药物的平均提取回收率为92.54%～100.95%，平均基质效应为89.98%～101.49%(n=6)。

表4　3种药物定量分析的提取回收率与基质效应试验结果(n=6)

待测药物	理论质量浓度/(ng/mL)	提取回收率试验/%		基效效应试验/%	
		提取回收率($\bar{x}\pm s$)	RSD	基质效应($\bar{x}\pm s$)	RSD
维奈克拉	133.33	93.44±5.10	5.46	91.10±8.56	9.40
	1 600.00	92.54±4.67	5.05	90.34±3.68	4.07
	8 000.00	96.91±6.48	6.69	89.98±4.65	5.17
白消安	40.00	93.96±7.48	7.96	101.49±2.06	2.03
	480.00	97.33±4.02	4.13	99.57±4.11	4.13
	2 400.00	100.95±3.44	3.40	95.73±3.41	3.56
伏立康唑	133.33	94.83±5.96	6.28	100.59±7.60	7.56
	1 600.00	95.54±4.48	4.69	95.77±3.38	3.53
	8 000.00	99.66±5.39	5.41	92.36±11.36	12.30

2.4.5　稀释效应

按“2.2.3”项下方法配制超过线性范围上限的维奈克拉、白消安、伏立康唑血浆样品，再用空白血浆分别稀释2、5、10倍，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样分析，记录峰面积。每质量浓度平行6份。结果(表5)显示，稀释后各待测药物实测质量浓度与理论质量浓度的平均比值为90.17%～106.54%(RSD≤11.24%，n=6)，提示稀释可靠性可覆盖试验样品所用的稀释倍数。

表5　3种药物定量分析的稀释效应试验结果(n=6)

待测药物	稀释倍数	理论质量浓度/(ng/mL)	实测质量浓度与理论质量浓度比值($\bar{x}\pm s$)/%	RSD/%
维奈克拉	2	5 555.55	92.80±4.62	4.98
	5	2 222.22	93.02±2.17	2.33
	10	1 111.11	90.17±2.00	2.22
白消安	2	1 666.66	103.17±4.43	4.29
	5	666.66	98.78±1.68	1.70
	10	333.33	98.14±4.04	4.12
伏立康唑	2	5 555.55	106.54±2.75	2.58
	5	2 222.22	102.49±9.40	9.17
	10	1 111.11	101.72±11.43	11.24

2.4.6　稳定性

按“2.2.3”项下方法配制维奈克拉、白消安、伏立康唑的LQC、MQC、HQC血浆样品，分别考察其于室温下静置4 h、于自动进样器中静置4 h、反复冻融(−40 ℃～室温)3次、−80 ℃下放置15 d的稳定性。每质量浓度样品平行6份。结果(表6)显示，各样品在上述前3种条件下的稳定性普遍良好；仅维奈克拉HCQ血浆样品在−80 ℃下放置15 d的稳定性稍差(RE＝−16.25%)，提示在临床实践中，各样品宜现配现用。

表6　3种药物定量分析稳定性试验结果(n=6)

条件	待测药物	理论质量浓度/(ng/mL)	实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	精密度RSD/%	准确度RE/%
室温4 h	维奈克拉	133.33	124.18±3.81	3.07	−6.86
		1 600.00	1 491.91±48.65	3.26	−6.76
		8 000.00	7 640.88±275.63	3.61	−4.49
	白消安	40.00	39.19±3.26	8.32	−2.03
		480.00	461.05±18.43	4.00	−3.95
		2 400.00	2 391.28±114.20	4.78	−0.36
	伏立康唑	133.33	137.91±3.76	2.73	3.44
		1 600.00	1 694.18±99.27	5.86	5.89
		8 000.00	8 649.44±505.82	5.85	8.12
进样器4 h	维奈克拉	133.33	128.73±7.87	6.11	−3.45
		1 600.00	1 591.53±66.61	4.19	−0.53
		8 000.00	7 717.99±478.38	6.20	3.53
	白消安	40.00	41.64±3.57	8.57	4.10
		480.00	513.37±14.91	2.91	6.95
		2 400.00	2 597.04±127.41	4.91	8.21
	伏立康唑	133.33	140.52±7.06	5.02	5.39
		1 600.00	1 686.06±50.29	2.98	5.38
		8 000.00	8 786.56±600.93	6.84	9.83
冻融3次	维奈克拉	133.33	120.03±5.51	4.59	−9.98
		1 600.00	1 484.16±136.04	9.17	−7.24
		8 000.00	7 563.43±186.95	2.47	−5.46
	白消安	40.00	39.07±2.10	5.39	−2.33
		480.00	515.08±21.21	4.12	7.31
		2 400.00	2 556.78±89.01	3.48	6.53
	伏立康唑	133.33	120.03±5.51	4.59	−9.98
		1 600.00	1 484.16±136.04	9.17	−7.24
		8 000.00	9 130.54±714.68	7.83	14.13
冷冻15 d	维奈克拉	133.33	128.31±7.76	6.05	−3.77
		1 600.00	1427.26±78.38	5.49	−10.80
		8 000.00	6 700.29±345.78	5.16	−16.25
	白消安	40.00	35.16±0.76	2.16	−12.10
		480.00	438.51±6.35	1.45	−8.64
		2 400.00	2 163.87±41.44	1.92	−9.84
	伏立康唑	133.33	128.31±7.76	6.05	−3.77
		1 600.00	1 427.26±78.38	5.49	−10.80
		8 000.00	8 141.99±167.83	2.06	1.77

2.5　临床应用

以2025年5月27日－12月27日在中山大学附属第七医院(深圳)血液内科和造血干细胞移植中心就诊的15例AML患者为对象，其中10例患者接受维奈克拉联合伏立康唑治疗，5例患者使用白消安进行allo-HSCT预处理。患者所用药品包括维奈克拉片(国药准字HJ20200055，规格100 mg，AbbVie Ireland NL B.V.)、伏立康唑片(国药准字H20055751，规格50 mg，北京博康健基因科技有限公司)、白消安注射液(国药准字

H20213017，规格10 mL∶60 mg，健进制药有限公司）。

10例联合用药的AML患者均在服用维奈克拉6 h后，再服用伏立康唑。经连续用药2或3次后，于下次服用维奈克拉6 h后采集患者静脉血，血样于4 ℃下以4 000 r/min离心10 min，分离上层血浆；取血浆，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样测定，记录峰面积并以随行回归方程计算维奈克拉峰浓度和伏立康唑谷浓度。结果（表7）显示，纳入患者维奈克拉的峰浓度为496.20～4 250.45 ng/mL，伏立康唑的谷浓度为475.51～5 710.18 ng/mL。

表7　10例联合用药AML患者的基本信息及血药浓度测定结果

编号	性别	年龄/岁	用药剂量	维奈克拉峰浓度/(ng/mL)	伏立康唑谷浓度/(ng/mL)
1	女	69	维奈克拉100 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	2 674.00	2 246.29
2	女	56	维奈克拉200 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	2 856.00	1 837.29
3	女	69	维奈克拉100 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	496.20	3 117.92
4	男	45	维奈克拉400 mg，qd+伏立康唑100 mg，q12 h	3 611.80	3 611.58
5	男	55	维奈克拉100 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	3 251.25	1 335.68
6	男	55	维奈克拉100 mg，qd+伏立康唑150 mg，q12 h	2 437.02	599.96
7	男	61	维奈克拉100 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	945.97	5 710.18
8	男	61	维奈克拉400 mg，qd+伏立康唑200 mg，q12 h	2 519.97	2 874.36
9	女	61	维奈克拉200 mg，qd+伏立康唑100 mg，q12 h	2 301.51	475.51
10	男	56	维奈克拉200 mg，qd+伏立康唑100 mg，q12 h	4 250.45	989.93

5例使用白消安进行allo-HSCT预处理的患者，于第5剂给药前（0 h）及给药后1、2、2.5、3、4、6 h时采集静脉血，血样于4 ℃下以4 000 r/min离心10 min，分离上层血浆；取血浆，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下条件进样测定，记录峰面积，以随行回归方程计算白消安血药浓度，并计算$AUC_{0-6\,h}$（鉴于白消安暴露量与疗效、安全性之间的密切关联，临床有必要对此参数进行监测[16—17]）。结果（表8）显示，纳入患者白消安的血药浓度为233.48～2 002.28 ng/mL，$AUC_{0-6\,h}$为792.32～1 723.64 μmol·min/L。

表8　5例使用白消安进行allo-HSCT预处理的患者的基本信息及血药浓度测定结果

编号	性别	年龄/岁	用药剂量	白消安血药浓度/(ng/mL)							$AUC_{0-6\,h}$
				0 h	1 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	(μmol·min/L)
11	男	8	白消安60 mg，q6 h	440.59	1 034.57	1 153.68	1 002.56	781.56	657.93	367.13	1 111.28
12	女	4	白消安11.25 mg，q6 h	321.23	1 887.29	930.41	852.52	672.64	470.43	233.48	1 124.43
13	男	16	白消安50 mg，q6 h	396.72	741.32	1 023.07	1 021.05	878.84	671.78	418.54	1 048.24
14	男	16	白消安53 mg，q6 h	292.82	489.07	714.32	822.22	727.43	537.93	317.56	792.32
15	男	12	白消安27 mg，q6 h	587.56	2 002.28	1 437.57	1 341.18	1 146.85	1 003.21	665.48	1 723.64

可见，所有血药浓度检测结果都在线性范围内，提示该法可用于AML患者体内维奈克拉、伏立康唑、白消安血药浓度的测定以及白消安药动学的研究。

3　讨论

在开发针对AML患者常用的3种药物的定量分析方法过程中，本课题组先比较了不同填充物、不同长度的色谱柱的分离效果，这些色谱柱包括Phenomenex Kinetex® C_{18}（2.1 mm×50 mm，2.6 μm）、Phenomenex Kinetex® C_{18}（3.0 mm×100 mm，2.6 μm）、Acquity® HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）。结果显示，Phenomenex Kinetex® C_{18}（2.1 mm×50 mm，2.6 μm）对维奈克拉、白消安、伏立康唑的分离效果最优、分析时间较短，且3种待测药物的色谱峰峰形对称。对于内标的选择，本课题组分别为维奈克拉、白消安、伏立康唑匹配了适宜的内标物质（维奈克拉-D_8、白消安-D_8、泊沙康唑）以减少基质效应的影响，此举既符合内标选择原则，又优于已报道的方法[18]。对于流动相的选择，本课题组比较了甲醇与乙腈的差异，结果显示，以乙腈为有机相，可在4 min内完成3种待测药物的定量分析，而甲醇则需6 min。对于柱温的选择，本课题组比较了25、30、35、40 ℃下的色谱响应，结果显示，40 ℃下各待测药物的色谱响应最强，故将柱温设定为40 ℃。对于响应度与峰形优化，本课题组在流动相A中添加了不同浓度的乙酸铵（2、5、10 mmol/L），并对流动相中甲酸的比例（0.05%、0.1%、0.2%）进行了考察。结果显示，添加2 mmol/L乙酸铵后，各待测药物的色谱响应均明显提升；而随着乙酸铵浓度的增加，维奈克拉的色谱响应呈降低趋势。此外，与其他比例甲酸相比，流动相中加入0.1%甲酸可获得最强的色谱响应和最佳的色谱峰峰形；采用梯度洗脱后，整个检测过程仅需3.10 min。因此，本研究最终确立了“2.1”项下的检测条件。

研究指出，蛋白沉淀法具有操作简单、处理时间短的优点，在大量临床样品处理方面优势明显[19]。因此，本研究选用乙腈一步法进行蛋白沉淀。经方法学考察证实，用该法处理后，血浆中的内源性物质不会干扰各待测药物的检测，优于先前报道的固相萃取或液-液萃取方法；同时，该法操作简单，实际所用检测时间也短于先前报道的方法[20—21]，适用于大量临床样品的批量处理。此外，就灵敏度而言，本法的LLOQ分别为15 ng/mL（白消安）和50 ng/mL（维奈克拉、伏立康唑），亦优于先前报道的方法[18]，更适合日常TDM实践。

方法学考察结果显示，本研究开发的同时测定3种药物的方法专属性强、准确度高、稳定性良好，操作快速、简便，能满足临床检测的高灵敏度、高效率和高通量要求，适用于3种药物的监测和分析。临床应用结果表明，不同患者血浆中这3种药物的质量浓度差异较大，但都在线性范围之内，提示该法具有较好的临床实用性。此外，需要注意的是，白消安的治疗靶值通常通过AUC来确定。以儿童HSCT患者为例，$AUC_{0-6\,h}$的目标范围为800～1 200 μmol·min/L[16]。本研究检测结果显示，各有1例患者的白消安$AUC_{0-6\,h}$<800 μmol·min/L或>1 200 μmol·min/L，临床应警惕其移植失败、急性移植物抗宿主反应（AUC过低），或肝窦阻塞综合征、出血性膀胱炎、神经毒性（AUC过高）等不良反应的发生[16—17]。

本研究的局限性如下：对于接受allo-HSCT治疗的AML患者，移植前维奈克拉联合白消安+氟达拉滨预处理方案仍处于临床研究阶段，尚未形成成熟的指南建

议，故本研究未能纳入同时使用这3种药物的病例。但本研究能为未来联合使用维奈克拉、白消安、伏立康唑的患者的TDM或药动学研究提供可行的技术手段。此外，根据方法学考察结果，在进行临床血药浓度测定时，所用混合标准曲线和质控血浆样品宜现配现用。

综上，本研究所建LC-MS/MS法快速、灵敏、操作简便，可用于维奈克拉、白消安、伏立康唑血药浓度的TDM。

参考文献

[1] YIN W, YAN X Y, CAI J Y, et al. Incidence, mortality, and survival associated with acute leukaemia subtypes by age group in China: a population-based cancer registry analysis and cohort study[J]. Lancet Haematol, 2025, 12(10): e808-e822.

[2] CHIESA S, REGO E M, TEICH V, et al. Microcosting analysis of haematopoietic stem cell transplantation and chemotherapy with intermediate doses of cytarabine in the treatment of acute myeloid leukaemia[J]. Hematol Transfus Cell Ther, 2024, 46(Suppl 6): S136-S143.

[3] XIAO F, GUO H X, YAN X Q, et al. Efficacy and safety of cladribine in combination with busulfan and cyclophosphamide as an intensive conditioning regimen preceding allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed or refractory acute myeloid leukemia[J]. Transpl Immunol, 2024, 84: 102037.

[4] 李晋文，徐燕，王晓丹，等. 干细胞移植患者白消安暴露量的估算模型研究[J]. 中国药理学通报，2024，40(6)：1193-1198.

[5] FUKUMOTO A, NARITA K, IKEDA D, et al. Safety and efficacy of venetoclax for acute myeloid leukaemia in real-world clinical practice[J]. Jpn J Clin Oncol, 2023, 53(10): 991-995.

[6] GARCIA J S, KIM H T, MURDOCK H M, et al. Prophylactic maintenance with venetoclax/azacitidine after reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for high-risk MDS and AML[J]. Blood Adv, 2024, 8(4): 978-990.

[7] POPAT U, BASSETT R L, ALOUSI A M, et al. Myeloablative fractionated busulfan, fludarabine, cladribine, thiotepa and venetoclax (cladillac) conditioning regimen for very high-risk AML/MDS: a phase 2 trial[J]. Blood, 2024, 144: 506-506.

[8] GARCIA J S, KIM H T, MURDOCK H M, et al. Adding venetoclax to fludarabine/busulfan RIC transplant for high-risk MDS and AML is feasible, safe, and active[J]. Blood Adv, 2021, 5(24): 5536-5545.

[9] MUKHERJEE D, BRACKMAN D J, SULEIMAN A A, et al. Impact of multiple concomitant CYP3A inhibitors on venetoclax pharmacokinetics: a PBPK and population PK-informed analysis[J]. J Clin Pharmacol, 2023, 63(1): 119-125.

[10] DIELLA L, BAVARO D F, LOSETO G, et al. Current therapies for chronic lymphocytic leukemia: risk and prophylaxis strategies for secondary/opportunistic infections[J]. Expert Rev Hematol, 2023, 16(4): 267-276.

[11] YANG Y L, QIAN Z Y, ZHAO Y, et al. LC-MS/MS methods for determination of venetoclax in human plasma and cerebrospinal fluid[J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37(12): e5738.

[12] YANG X, MEI C, HE X Y, et al. Quantification of venetoclax for therapeutic drug monitoring in Chinese acute myeloid leukemia patients by a validated UPLC-MS/MS method[J]. Molecules, 2022, 27(5): 1607.

[13] CAFARO A, PIGLIASCO F, BAIARDI G, et al. Development and validation of a novel LC-MS/MS method for a TDM-guided personalization of HSCT conditioning with high-dose busulfan in children[J]. Biomedicines, 2023, 11(2): 530.

[14] PROMMAS S, PUANGPETCH A, JENJIRATTITHIGARN N, et al. Development and validation of voriconazole concentration by LC-MS-MS: applied in clinical implementation[J]. J Clin Lab Anal, 2017, 31(1): e22011.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[S]. 2020年版. 中国医药科技出版社，2020：466-472.

[16] ALOMARI N, KURDI A., ALGHAMDI M. et al. Therapeutic drug monitoring of busulfan in pediatric patients: a 5-year observational study[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2025, 26(1): 175.

[17] 贾兰舟，窦颖. 造血干细胞移植中儿童白消安群体药动学模型的建立及在治疗药物监测中的应用[J]. 中国临床药学杂志，2022，31(12)：940-945.

[18] GAO P, ZHANG W, FANG X S, et al. Simultaneous quantification of venetoclax and voriconazole in human plasma by UHPLC-MS/MS and its application in acute myeloid leukemia patients[J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 227: 115279.

[19] LIAO J, FAN L, LI Y, et al. Recent advances in biomimetic nanodelivery systems: new brain-targeting strategies[J]. J Control Release, 2023, 358: 439-464.

[20] EISENMANN E D, JIN Y, WEBER R H, et al. Development and validation of a sensitive UHPLC-MS/MS analytical method for venetoclax in mouse plasma, and its application to pharmacokinetic studies[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1152: 122176.

[21] ALNASSER A I, HEFNAWY M M, AL-HOSSAINI A M, et al. LC-MS/MS method for the quantitation of decitabine and venetoclax in rat plasma after SPE: application to pharmacokinetic study[J]. Saudi Pharm J, 2023, 31(9): 101693.

（收稿日期：2025-12-22　修回日期：2026-04-21）

（编辑：张元媛）