

## 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中的塞利尼索、 维奈克拉、伏立康唑及泊沙康唑

肖 雄<sup>1</sup>, 李 月<sup>2</sup>, 胡锦涛<sup>1</sup>, 万 青<sup>1</sup>, 彭洪薇<sup>1\*</sup>

(1. 南昌大学第一附属医院药学部, 江西 南昌 330000; 2. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330000)

**摘要:** 抗血液恶性肿瘤药物常具有治疗窗窄、个体差异显著及药物相互作用风险高等特点,需通过治疗药物监测(TDM)实现个体化给药。对于化疗期间因严重骨髓抑制而引发感染需联合抗真菌治疗的患者,TDM可同时优化抗肿瘤药物与抗真菌药物的血药浓度,在确保抗肿瘤疗效的同时有效控制侵袭性真菌感染风险,这一技术已成为血液系统恶性肿瘤个体化治疗的重要支撑。本研究建立了一种基于超高效液相色谱-串联质谱的分析方法,用于同时测定人血浆中抗肿瘤药物塞利尼索(selinexor, SEL)、维奈克拉(venetoclax, VEN)及抗真菌药物伏立康唑(voriconazole, VOR)、泊沙康唑(posaconazole, POSA)。色谱分离采用 Kinetex<sup>®</sup> XB-C18 色谱柱(50 mm×3.0 mm, 2.6 μm),流动相为甲醇-含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵溶液,流速 0.5 mL/min,梯度洗脱,进样量 2 μL,分析时间为 4.0 min。采用电喷雾离子源,正离子扫描,多反应监测模式进行测定。本研究对质谱参数进行了优化,并进行了方法学验证,结果表明,该方法线性关系良好,线性相关系数( $r$ )均大于 0.994,4 种药物的线性范围分别为 SEL 0.04~1.48 μg/mL、VEN 0.15~5.50 μg/mL、VOR 0.29~11.77 μg/mL 和 POSA 0.15~6.05 μg/mL;4 种药物在各浓度水平的日内精密度和日间精密度的相对标准偏差(RSD)≤7.1%,提取回收率均≥85.3%,方法准确度为 87.4%~109.0%。采集了 30 例接受 SEL 联合 VEN 治疗的急性髓系白血病患者的 81 份临床样本进行分析,测得 SEL 的血药浓度为 0.049~0.646 μg/mL,约 30% 的患者在相同疗程内 SEL 血药峰浓度( $C_{\max}$ )差异较大。本方法可为临床实践中存在药物相互作用及个体差异的血液系统恶性肿瘤患者的个体化精准治疗提供循证依据。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱;塞利尼索;维奈克拉;三唑类抗真菌药;治疗药物监测

中图分类号:O658

文献标识码:A

## Simultaneous determination of selinexor, posaconazole, venetoclax, and voriconazole in human plasma using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Xiong<sup>1</sup>, LI Yue<sup>2</sup>, HU Jinfang<sup>1</sup>, WAN Qing<sup>1</sup>, PENG Hongwei<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, China;

2. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330000, China)

**Abstract:** Drugs used to treat hematologic malignancies often exhibit narrow therapeutic windows, significant inter-individual variability, and high risks of drug-drug interactions, necessitating therapeutic drug monitoring (TDM) for individualized dosing. For patients requiring concomitant antifungal therapy due to infections arising from severe chemotherapy-induced myelosuppression, TDM can optimize plasma concentrations of both antineoplastic and antifungal agents. This concurrent optimization ensures anti-tumor efficacy while effectively mitigating the risk of invasive fungal infections, positioning TDM as a critical component of personalized management in hematologic malignancies. This study established and validated a rapid ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous

收稿日期:2025-05-07

\* 通信联系人.E-mail: wavypeng1985@126.com.

基金项目:国家自然科学基金(81860035).

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81860035).

quantification of the antineoplastic agents selinexor (SEL) and venetoclax (VEN), along with the antifungal agents voriconazole (VOR) and posaconazole (POSA) in human plasma. Chromatographic separation was achieved using a Kinetex® XB-C18 column (50 mm × 3.0 mm, 2.6 μm) with a mobile phase consisting of methanol and 10 mmol/L ammonium acetate containing 0.1% formic acid, delivered at a flow rate of 0.5 mL/min under gradient elution conditions. The injection volume was 2 μL, and the total run time was 4.0 min. Detection employed an electrospray ionization source operating in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM). Following optimization of mass spectrometric parameters, the method underwent comprehensive validation. Calibration curves demonstrated excellent linearity ( $r > 0.994$ ) over the ranges of 0.04–1.48 μg/mL for SEL, 0.15–5.50 μg/mL for VEN, 0.29–11.77 μg/mL for VOR, and 0.15–6.05 μg/mL for POSA. Intra-day and inter-day precisions (RSDs) were ≤7.1% at all concentration levels. Extraction recoveries were ≥85.3%, demonstrating efficient and consistent sample processing. Method accuracy, determined by the percentage deviation of measured concentrations from nominal values, fell within the acceptable range of 87.4% to 109.0% across all QC levels, confirming the method's trueness. The practical utility of the validated UHPLC-MS/MS method was demonstrated through its application to clinical specimens. We collected and analyzed 81 clinical samples from 30 patients with acute myeloid leukemia treated with the combination of SEL and VEN. Measured plasma concentrations of SEL in these patients ranged from 0.049 μg/mL to 0.646 μg/mL. Notably, significant inter-individual variability in the peak plasma concentration ( $C_{\max}$ ) of SEL was observed within the same treatment cycle for approximately 30% of the patient cohort. This study offers evidence-based support for personalized precision therapy in this patient population, which exhibits substantial inter-individual variability and complex drug-drug interactions in clinical practice.

**Keywords:** ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); selinexor; venetoclax; triazole antifungal agent; therapeutic drug monitoring

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)与急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)作为临床常见的恶性血液病种,其治疗策略的革新始终是肿瘤学研究的重要方向。近年来,以核输出蛋白(exportin 1, XPO1)为靶点的新型小分子抑制剂塞利尼索(selinexor, SEL)在复发/难治性 MM 治疗中展现出突破性疗效,并获得美国食品药品监督管理局的临床批准。值得注意的是,XPO1 蛋白在 AML 等恶性肿瘤中的异常高表达特征,促使研究者探索 SEL 联合 B 淋巴细胞瘤-2 基因(b-cell lymphoma-2, BCL-2)抑制剂维奈克拉(venetoclax, VEN)的协同治疗方案。据文献[1,2]报道,该联合用药可通过双重作用机制诱导肿瘤细胞凋亡,然

而,药物联用引发的复杂药代动力学相互作用及个体化剂量优化问题,成为制约临床疗效提升的关键问题。

AML 患者在强化化疗及靶向治疗过程中,中性粒细胞减少和骨髓抑制等治疗相关并发症的发生显著增加了侵袭性真菌感染风险。根据欧洲白血病感染会议指南<sup>[3]</sup>推荐,三唑类抗真菌药物如伏立康唑(voriconazole, VOR)和泊沙康唑(posaconazole, POSA)已成为侵袭性真菌感染(invasive fungal disease, IFD)预防与治疗的一线选择。然而,此类药物作为强效细胞色素 P450 3A4(cytochrome P450 3A4, CYP3A4)酶的抑制剂,可通过药物代谢酶介导的相互作用显著影响 VEN(CYP3A4

引用本文:肖雄,李月,胡锦涛,万青,彭洪薇.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中的塞利尼索、维奈克拉、伏立康唑及泊沙康唑.色谱,2026,44(3):349-356.

XIAO Xiong, LI Yue, HU Jinfang, WAN Qing, PENG Hongwei. Simultaneous determination of selinexor, posaconazole, venetoclax, and voriconazole in human plasma using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(3): 349-356.

底物)的体内暴露量。据文献[4-7]报道,VOR 与 VEN 联用可使后者血药浓度-时间曲线下面积增加,可诱发严重不良反应。

基于上述临床挑战,建立精准的治疗药物监测(TDM)体系对确保联合用药安全性至关重要。超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)技术凭借其高灵敏度、卓越的选择性及宽泛的线性范围,已成为复杂基质中多组分同步检测的金标准。但现有文献报道多局限于单一药物检测,缺乏可同步量化 SEL、VEN 及三唑类抗真菌药的多重分析方法。本研究旨在开发并验证一种高效、可靠的 UHPLC-MS/MS 方法,实现人血浆中 SEL、VEN、VOR 和 POSA 的同步定量分析。

本方法的建立不仅可为临床药物代谢动力学/药物效应动力学(pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD)研究提供可靠的技术支持,更有助于构建基于群体药理学模型的个体化给药方案,最终实现疗效优化与不良反应控制的精准平衡。同时有望推动血液肿瘤治疗向精准医学模式转变,为制定个体化治疗决策提供科学依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、药品及试剂

AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 SCIEX 公司);5810R 高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司);XW-80A 涡旋混合仪(上海琪特分析仪器有限公司)。

SEL、VEN、VEN-d8、VOR、VOR-d3、POSA、POSA-d5 等均购自美国 TargetMol 公司,纯度>99.0%;SEL 内标菲达替尼(fedratinib, FED)购自美国 MCE 公司,纯度 99.59%;甲醇及乙腈(质谱纯,中国赛默飞世尔科技有限公司);无水乙醇、二甲基亚砜(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲酸(质谱纯,上海麦克林生化科技股份有限公司);水为广州屈臣氏蒸馏水。

### 1.2 仪器条件

色谱条件 Kinetex® 2.6  $\mu\text{m}$  XB-C18 色谱柱(50 mm×3.0 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ),流动相 A 为含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱程序如下:0.01~1.0 min, 50%B~90%B; 1.0~2.0 min, 90%B~100%B; 2.0~2.1 min, 100%B~50%B; 2.1~4.0 min, 50%B。流速为 0.5 mL/min,柱温为 40  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件 采用电喷雾离子源,正离子模式,多反应监测扫描分析。离子对、去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞能(collision energy, CE)及保留时间( $t_{\text{R}}$ )等质谱参数见表 1。

表 1 4 种药物及其内标的质谱检测参数和保留时间  
Table 1 MS parameters and retention times ( $t_{\text{R}}$ ) of the four drugs and their internal standards

| Compound                  | Ion pair<br>( $m/z$ ) | DP/V | CE/<br>eV | $t_{\text{R}}/$<br>min |
|---------------------------|-----------------------|------|-----------|------------------------|
| Selinexor (SEL)           | 443.9/334.0           | 95   | 30        | 1.72                   |
| Fedratinib (FED)          | 525.4/97.9            | 95   | 67        | 1.55                   |
| Venetoclax (VEN)          | 868.4/636.3           | 210  | 39        | 2.02                   |
| Venetoclax-d8 (VEN-d8)    | 876.4/329.3           | 210  | 58        | 2.02                   |
| Voriconazole (VOR)        | 350.2/281.2           | 90   | 13        | 1.44                   |
| Voriconazole-d3 (VOR-d3)  | 353.2/284.2           | 90   | 13        | 1.44                   |
| Posaconazole (POSA)       | 701.3/614.4           | 181  | 51        | 1.85                   |
| Posaconazole-d5 (POSA-d5) | 705.3/618.4           | 181  | 51        | 1.85                   |

DP: declustering potential; CE: collision energy.

### 1.3 血浆样品采集和溶液的配制

#### 1.3.1 样品收集

血浆样本来源于服用 SEL 联合 VEN 药物的 AML 患者,采集自南昌大学第一附属医院血液科。所有样本的收集均在患者签署知情同意后书后进行,并得到了医院伦理委员会(IIT[2022]临伦审第 129 号-1)的批准。全血样本采集后,立即离心分离得到血浆,保存于-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

#### 1.3.2 SEL、VEN、VOR、POSA 标准溶液的配制

精密称取 SEL 14.78 mg 置于棕色容量瓶中,加入无水乙醇溶解并摇匀,配制质量浓度为 0.295 6 mg/mL 的标准储备液。

精密称取 VEN 10.01 mg 置于棕色容量瓶中,加入二甲基亚砜溶解并摇匀,配制质量浓度为 2.002 mg/mL 的标准储备液。

精密称取 VOR 11.77 mg 置于棕色容量瓶中,加入 50% 甲醇水溶液溶解并摇匀,配制质量浓度为 2.354 mg/mL 的标准储备液。

精密称取 POSA 15.13 mg 置于 25 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并摇匀,配制质量浓度为 0.605 mg/mL 的标准储备液。

取适量各标准储备液置于同一容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液稀释,得到 SEL、VEN、VOR、POSA 质量浓度分别为 14.78、55.00、117.70、60.50  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照溶液。取混合对照溶液,用 50% 甲醇水溶液倍比稀释为混合梯度工作液,其中 SEL 质量浓

度为 14.78、7.39、3.70、1.85、0.74、0.37  $\mu\text{g/mL}$ ; VEN 为 55.00、27.50、13.75、6.88、2.75、1.38  $\mu\text{g/mL}$ ; VOR 为 117.70、58.85、29.43、14.71、5.89、2.94  $\mu\text{g/mL}$ , POSA 为 60.50、30.25、15.13、7.56、3.03、1.51  $\mu\text{g/mL}$ 。同时用 50% 甲醇水溶液配制混合质量控制溶液(以下简称质控), SEL 高浓度质控(high concentration quality control, H-QC)、中浓度质控(medium concentration quality control, M-QC)、低浓度质控(low concentration quality control, L-QC)的质量浓度分别为 11.09、7.39、1.11  $\mu\text{g/mL}$ , VEN 的 H-QC、M-QC、L-QC 为 41.25、27.50、4.13  $\mu\text{g/mL}$ , VOR 的 H-QC、M-QC、L-QC 为 88.28、58.85、8.83  $\mu\text{g/mL}$ , POSA 的 H-QC、M-QC、L-QC 为 45.38、30.25、4.54  $\mu\text{g/mL}$ 。所有溶液 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

### 1.3.3 内标工作液的配制

精密称取 POSA-d5、VEN-d8、VOR-d3 及 FED 各 1.0 mg, 加入适量二甲基亚砷溶解, 用含 0.1% 甲酸的甲醇稀释成质量浓度均为 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合内标工作液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。SEL 药物暂无市售商品化的同位素内标, 本研究参考文献[8]采用 FED 为内标, 后续的方法学验证结果显示, FED 可作为 SEL 内标用于其血药浓度监测。

### 1.3.4 血浆基质匹配混合梯度工作液和血浆基质匹配质控溶液的配制

取 9 份 900  $\mu\text{L}$  空白人血浆于 1.5 mL 离心管中(编号 1~9), 向编号为 1~6 的离心管中分别加入 1.3.2 节系列质量浓度的混合梯度工作液(各 100  $\mu\text{L}$ )。制得 4 种药物的血浆基质匹配混合梯度工作液; 向编号为 7~9 的离心管中分别加入 1.3.2 节 3 个浓度水平的质控工作溶液(各 100  $\mu\text{L}$ ), 制得 4 种药物的基质匹配质控溶液。

### 1.3.5 血浆样品预处理

取 100  $\mu\text{L}$  血浆样品, 加入 400  $\mu\text{L}$  样本释放剂(含 0.1% 甲酸的乙腈)和 20  $\mu\text{L}$  内标工作液, 涡旋 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下以 13 000 r/min 离心 10 min。取 200  $\mu\text{L}$  上清液, 待进样分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

为了获得 4 种药物的最佳电离效果和色谱峰形, 考虑到使用质谱正离子模式进行分析时, 4 种药物在电离过程中需提供足够的质子, 参考文献[9, 10], 分别向甲醇-水和乙腈-水的基础流动相体

系中添加 10 mmol/L 乙酸铵缓冲盐、0.1% 甲酸。结果显示: 乙腈-水和甲醇-水作为流动相时, 4 种药物色谱峰形较差。在流动相体系中分别添加 10 mmol/L 乙酸铵缓冲盐, 色谱峰形得到一定改善, 但大部分药物响应仍较低。在流动相体系中添加 0.1% 甲酸后, 目标化合物响应提高。对比含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液-甲醇体系和 0.1% 甲酸 10 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈体系, 结果发现, 有机相为乙腈时 4 种药物的峰形和响应与甲醇体系无明显差异, 考虑到试剂的成本及毒性, 故选择含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液-甲醇为流动相。本研究中 4 种药物的极性均较小, 为提高质谱分析效率, 故设置流动相洗脱梯度程序初始有机相比例为 50%, 后梯度升高有机相比例, 使得 4 种药物能快速分离。同时 50% 有机相比例与血浆样本蛋白沉淀后溶液有机相比例接近, 可避免溶剂效应导致峰形异常。

### 2.2 质谱条件的优化

将质谱仪激活到 Mass only 状态, 分别在其正离子和负离子模式下, 使用针泵持续注射质量浓度为 500 ng/mL 的单个药物溶液至质谱仪中。发现 4 种药物在质谱正离子模式下灵敏度最佳, 因此选择在该模式下对  $m/z$  300~880 范围内的离子进行全扫描, 确定每种药物的母离子, 再进行子离子扫描, 每种药物选取响应值高的特征离子对为定量离子对。进一步对 DP、CE 值进行优化, 选择药物质谱响应最佳的参数, 初步建立质谱方法。

之后, 质谱仪切换到液相色谱-质谱联用状态, 采用 1.3.5 节下前处理方法处理血浆基质匹配混合梯度工作液样本(质量浓度分别为 SEL 1.48  $\mu\text{g/mL}$ 、VEN 5.50  $\mu\text{g/mL}$ 、VOR 11.77  $\mu\text{g/mL}$  和 POSA 6.05  $\mu\text{g/mL}$ ), 进样分析。同时不断调整质谱 DP、CE、离子源温度、气流量及进样体积的参数, 以 4 种药物质谱离子响应为评价指标, 优化出最佳质谱参数, 优化结果见表 1。

### 2.3 样品前处理条件的优化

本研究采用蛋白沉淀方式进行血浆样品前处理。在对人血浆中的多种药物进行同时定量检测时, 蛋白沉淀剂的选择至关重要。需考虑各种药物在有机溶剂中的溶解度以及溶剂对血浆基质的沉淀效率等因素。本研究参考已有报道<sup>[11, 12]</sup>, 选择极性溶剂乙腈作为蛋白沉淀剂, 其对血浆中蛋白的沉淀效率高, 并且能够有效减少对样品中磷脂及脂肪

的过多提取,降低基质效应。本研究实验过程中,通过对比 1:2、1:4、1:8、1:10 等比例的血浆-有机溶剂体积比处理血浆基质匹配混合梯度工作液样本(质量浓度分别为 SEL 1.48  $\mu\text{g/mL}$ 、VEN 5.50  $\mu\text{g/mL}$ 、VOR 11.77  $\mu\text{g/mL}$  和 POSA 6.05  $\mu\text{g/mL}$ )的质谱响应值,发现血浆-有机溶剂体积比为 1:4 是最佳蛋白沉淀体积比。

## 2.4 方法学验证

### 2.4.1 选择性

为验证该分析方法能够区分待测药物、内标、基质的内源性物质和样品中的其他物质,本研究取 6 个来自不同健康人的血浆样本 100  $\mu\text{L}$ ,加入 20  $\mu\text{L}$  含 0.1% 甲酸的甲醇替代内标工作液,按照 1.3.5 节下血浆样品预处理方法处理,进样检测,获得 6 份空白血浆样品色谱图。另取空白血浆样本 100  $\mu\text{L}$ ,按照 1.3.5 节下血浆样品预处理方法,进样检测,获得仅含内标的空白血浆样品色谱图。再另取上述空白血浆 90  $\mu\text{L}$  加入 10  $\mu\text{L}$  混合梯度工作液

(质量浓度分别为 SEL 1.48  $\mu\text{g/mL}$ 、VEN 5.50  $\mu\text{g/mL}$ 、VOR 11.77  $\mu\text{g/mL}$  和 POSA 6.05  $\mu\text{g/mL}$ )配成血浆基质匹配混合梯度工作液样品。按照 1.3.5 节下血浆样品预处理方法处理,进样检测,获得含待测药物及内标的血浆样品色谱图。通过分析上述所获得的色谱图发现,SEL、VEN、VOR 和 POSA 的保留时间分别为 2.02、1.72、1.44、1.85 min。6 个空白血浆样品在各待测药物离子检测通道相对应保留时间处均未出现色谱峰,仅含内标的空白血浆样品在各待测药物离子检测通道相对应保留时间处也均未出现色谱峰,表明该分析方法能够很好地区分待测药物、内标、基质的内源性物质和样品中的其他物质,方法选择性良好。其中一位健康人空白血浆样品色谱图与血浆基质匹配混合梯度工作液样品(加标血浆)中各待测药物的典型色谱图见图 1。

### 2.4.2 基质效应

取 6 个不同健康人的空白血浆 90  $\mu\text{L}$ ,按 1.3.5

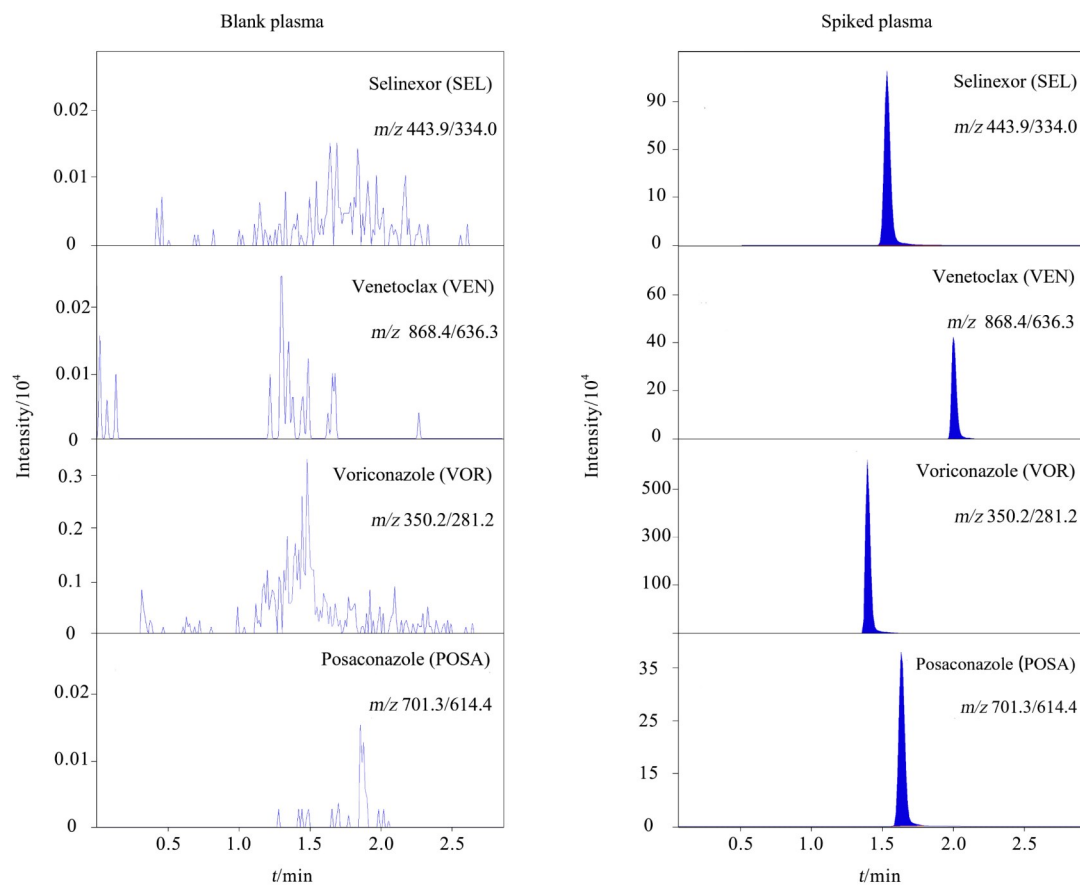


图 1 健康人空白血浆样品与血浆基质匹配混合梯度工作液样品(加标血浆)中各待测药物的典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of analytes in healthy human blank plasma and plasma matrix-matched mixed gradient working solution sample (spiked plasma)

节血浆样品处理方法处理得到不含待测药物的空白基质,加入 L-QC、H-QC 两个浓度水平的混合质量控制溶液 10  $\mu\text{L}$ ,制备血浆基质样品溶液;用去离子水代替血浆,加入 L-QC、H-QC 两个浓度水平的混合质量控制溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按 1.3.5 节血浆样品处理方法处理得到无基质样品溶液,进样测定。分别计算血浆基质样品溶液和无基质样品溶液中待测药物峰面积与其内标峰面积的比值,以血浆基质样品溶液待测药物峰面积与其内标峰面积比值除以无基质样品溶液待测药物峰面积与其内标峰面积比值计算内标归一化基质效应因子,然后计算其 RSD<sup>[13]</sup>。结果表明,SEL 在 L-QC 和 H-QC 两个浓度水平下的内标归一化基质因子的 RSD 值分别为 8.83% 和 2.38%,VEN 分别为 2.80% 和 1.25%,VOR 分别为 4.10% 和 2.18%,POSA 分别为 4.34% 和 4.12%,表明上述 4 种药物的测定不受基质效应的影响。

#### 2.4.3 标准曲线和定量限

取 1.3.4 节下血浆基质匹配混合溶液和血浆基质匹配质控溶液,按 1.3.5 节血浆样品前处理方法处理,进样分析。分别以待测物与对应内标峰面积比值( $Y$ )对 SEL、VEN、VOR、POSA 质量浓度( $X$ )作回归分析,权重为  $1/X$ 。在满足准确度和精密度要求下,结合临床实际应用,确定定量限(limit of quantification, LOQ)。结果表明,SEL 的回归方程为  $Y=16.26X+0.064$  ( $r=0.996$ ),线性范围为 0.04 ~ 1.48  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限为 0.04  $\mu\text{g/mL}$ ;VEN 的回归方程为  $Y=4.88X+0.096$  ( $r=0.998$ ),线性范围为 0.14 ~ 5.50  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限为 0.14  $\mu\text{g/mL}$ ;VOR 的回归方程为  $Y=6.48X+0.31$  ( $r=0.998$ ),线性范围为 0.29 ~ 11.77  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限为 0.29  $\mu\text{g/mL}$ ;POSA 的回归方程为  $Y=10.49X+0.23$  ( $r=0.999$ ),线性范围为 0.15 ~ 6.05  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限为 0.15  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2.4.4 精密度、准确度及提取率

分别配制 SEL、VEN、VOR、POSA 的 LOQ、L-QC、M-QC、H-QC 4 个浓度水平的血浆基质匹配质控溶液,每个浓度平行制备 5 份,按照 1.3.5 节下血浆样品前处理方法处理,进样测定,记录峰面积。同样方法连续 3 天制备 3 批 1.3.4 节下血浆基质匹配混合溶液和血浆基质匹配质控溶液并进样分析,计算日内及日间精密度(RSD)和准确度。同时配制 SEL、VEN、VOR、POSA 的 L-QC、M-QC、H-QC 3 个浓度水平的血浆基质匹配质控溶液各 6 份,其中 3 份于提取前加入样本释放剂,提取后加入内标,另

3 份于提取后加入样本释放剂和内标。进样分析,计算各个药物的提取率。结果见表 2,数据表明,4 种药物的日内、日间精密度均不超过 7.1%,准确度为 87.2% ~ 107.3%,提取回收率为 85.3% ~ 97.5%,符合生物样本分析的相关法规<sup>[14]</sup>要求。

表 2 4 种药物在 LOQ、L-QC、M-QC 和 H-QC 水平下的日内精密度、日间精密度( $n=5$ )及在 L-QC、M-QC 和 H-QC 水平下的提取回收率( $n=6$ )

Table 2 Intra-day, inter-day precisions ( $n=5$ ) at LOQ, L-QC, M-QC, H-QC levels and extraction recoveries ( $n=6$ ) at L-QC, M-QC, H-QC levels for the four analytes

| Analyte      | Content/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Intra-day<br>RSD/% | Inter-day<br>RSD/% | Extraction<br>recovery/% |
|--------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| Selinexor    | 0.0                              | 5.0                | 3.8                | /                        |
|              | 0.1                              | 5.3                | 5.7                | 87.9                     |
|              | 0.7                              | 5.9                | 6.6                | 90.3                     |
|              | 1.1                              | 3.5                | 3.1                | 96.1                     |
| Venetoclax   | 0.1                              | 5.7                | 6.4                | /                        |
|              | 0.4                              | 3.6                | 4.2                | 85.3                     |
|              | 2.8                              | 0.3                | 0.4                | 87.5                     |
|              | 4.1                              | 4.3                | 2.6                | 89.3                     |
| Voriconazole | 0.3                              | 1.9                | 0.7                | /                        |
|              | 0.9                              | 4.6                | 1.3                | 93.1                     |
|              | 5.9                              | 4.1                | 1.0                | 92.8                     |
|              | 8.8                              | 4.6                | 1.9                | 96.1                     |
| Posaconazole | 0.2                              | 0.6                | 1.5                | /                        |
|              | 0.5                              | 7.1                | 2.7                | 88.0                     |
|              | 3.0                              | 1.0                | 1.3                | 91.9                     |
|              | 4.5                              | 3.0                | 3.2                | 97.5                     |

L-QC: low concentration quality control; M-QC: medium concentration quality control; H-QC: high concentration quality control. /: the experiment was not conducted.

#### 2.4.5 稳定性

取 L-QC、H-QC 浓度水平的血浆基质匹配质控溶液,每个浓度平行 3 份,考察前处理后溶液在进样器(10  $^{\circ}\text{C}$ )放置 24 h 的稳定性以及血浆样品在 4  $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h、-80  $^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次和 -80  $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 d 等的稳定性,计算各药物的 RSD。结果表明,各待测药物在 L-QC、H-QC 水平下,测定结果均值与标示浓度的偏差均在  $\pm 15\%$  范围内,每个浓度平行测定结果的 RSD 值均  $\leq 6.43$  (见表 3),表明待测药物在上述条件下的稳定性良好。

#### 2.4.6 稀释完整性

取 1.3.2 节下标准储备液,用 50% 甲醇水溶液稀释最高浓度水平溶液 5 倍、3 倍、2 倍。取 10  $\mu\text{L}$ ,加入空白人血浆 90  $\mu\text{L}$ ,涡旋 1 min,制成高浓度血

表 3 低、高 2 个浓度水平下 4 种药物的血浆基质匹配质控溶液及血浆前处理后溶液放于指定温度环境时的稳定性( $n=3$ )

Table 3 Stability of four drugs in plasma matrix-matched quality control solution and processed plasma samples at low and high concentration levels under different temperature conditions ( $n=3$ )

| Analyte      | Content/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | RSDs/%             |                        |                      |                  |
|--------------|----------------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------|
|              |                                  | Freeze<br>and thaw | -80 $^{\circ}\text{C}$ | 4 $^{\circ}\text{C}$ | Auto-<br>sampler |
| Selinexor    | 0.11                             | 3.64               | 6.43                   | 0.58                 | 4.59             |
|              | 1.11                             | 2.30               | 5.27                   | 1.55                 | 3.54             |
| Venetoclax   | 0.41                             | 3.35               | 3.35                   | 3.89                 | 3.61             |
|              | 4.13                             | 3.77               | 3.77                   | 2.65                 | 1.28             |
| Voriconazole | 0.88                             | 0.67               | 1.07                   | 2.06                 | 4.56             |
|              | 8.83                             | 2.24               | 2.33                   | 1.23                 | 3.35             |
| Posaconazole | 0.45                             | 2.17               | 3.35                   | 5.13                 | 2.45             |
|              | 4.54                             | 2.96               | 3.43                   | 2.64                 | 2.87             |

浆基质匹配溶液,并用空白血浆稀释 5 倍、3 倍、2 倍( $n=5$ ),测定准确度和精密度。结果表明,准确度为 89.4%~105.2%,精密度(批内变异系数)均小于 15%,说明该方法稀释结果准确可靠。

#### 2.4.7 携带污染

进样 1.3.5 节方法处理后的血浆基质匹配混合梯度工作液样本(SEL 1.48  $\mu\text{g/mL}$ 、VEN 5.50  $\mu\text{g/mL}$ 、VOR 11.77  $\mu\text{g/mL}$  和 POSA 6.05  $\mu\text{g/mL}$ ),然后进样 1.3.5 节下前处理方法处理后的空白血浆样品,将空白血浆样品中的残留响应值和定量限血浆样本及仅加内标血浆样本响应值进行比较。结果表明,空白血浆样品中的残留响应低于定量限的 20%,并且低于内标的 5%,表明残留不影响 4 种待测药物的准确定量。

### 2.5 临床样本血药浓度检测结果分析

#### 2.5.1 VEN 血药浓度监测

本课题组前期监测了 56 例服用 VEN 联合 VOR、POSA 药物的白血病患者血药浓度。分析数据发现,VOR、POSA 可能通过抑制 CYP3A4 肝药酶活性从而影响 VEN 药物代谢,VEN 血药浓度升高可能会导致 VEN 药物不良反应发生率增加,患者遭受不良反应伤害风险增加,相关研究成果已发表在国际期刊上<sup>[15]</sup>。而 VOR、POSA 药物药代动力学个体差异大,血药浓度受年龄、基因、肝肾功能等因素影响。本研究建立的方法可同时对上述药物进行血药浓度监测,有助于及时调整剂量,确保有效浓度,避免浓度不足导致治疗失败或浓度过高引发毒性。

#### 2.5.2 SEL 血药浓度监测

本研究收集了 30 位服用 SEL 联合 VEN 药物的 AML 患者的血药浓度数据,30 位服用 SEL 联合 VEN 的 AML 患者,每周固定时间服药 2 次,于服药后 4 h 采血监测 SEL 峰浓度( $C_{\max}$ ),共计收集 81 份样本,其中合用 VOR 有 22 次,合用 POSA 有 5 次。将单用 SEL 组的  $C_{\max}$  与联用三唑类药物的各组  $C_{\max}$  进行独立样本 T 检验,联用 POSA 组的 SEL 的  $C_{\max}$  小于单用 SEL 组,且具有统计学意义,详见图 2。但局限于样本量小的原因,该结论可能需要后续更大样本论证。

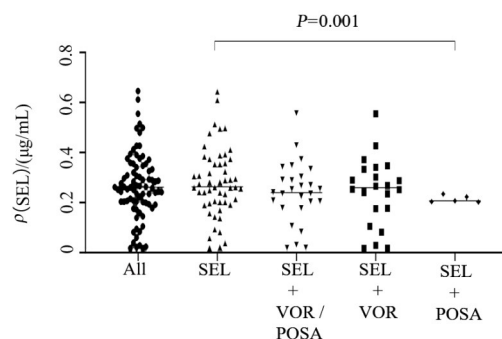


图 2 SEL  $C_{\max}$  独立样本 T 检验分析结果  
Fig. 2 Independent sample T-test analysis results for SEL peak concentration ( $C_{\max}$ )

本研究取服药后 4 h 浓度为  $C_{\max}$ <sup>[16,17]</sup>。监测了 30 位患者总计 81 份样本,30% 的患者在服用相同剂量的 SEL 药物后,其  $C_{\max}$  值出现 27.29%~71.43% 的波动,部分数据见表 4。通过分析患者病历数据,未发现 SEL  $C_{\max}$  值与血细胞分析相关指标及肝肾功能的相关性。对于  $C_{\max}$  值出现较大差异的原因,初步考虑是患者病情发生变化,如感染、低蛋白血症等因素导致药物 PK/PD 参数的变化,此问题将在后续的研究中继续关注。现阶段暂无明确的 SEL 联合 VEN 治疗 AML 的药物浓度窗,故推荐临床治疗过程中,通过观察临床患者的治疗效果及出现的不良反应,采用本研究所建立方法进行药物浓度监测,依据药物浓度与患者临床表现及时调整治疗方案。

#### 2.6 与已有方法比较

现有报道均是关于这 4 种药物中的 1 种药物或两种药物检测<sup>[12,18]</sup>,日常检测过程中需要单独对每种药物建立标准曲线,耗时耗力,检测效率低下,不能快速反馈检测结果至临床,对于临床治疗帮助有限。而本方法可以同时检测样品中的 SEL、

表 4 部分患者同一治疗周期多次血药浓度监测的 SEL  $C_{\max}$  值  
Table 4  $C_{\max}$  values of SEL in some patients with multiple blood drug concentration monitoring during the same treatment cycle  $\mu\text{g/mL}$

| Blood collection time | Patients |       |       |       |       |
|-----------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
|                       | #1       | #2    | #3    | #4    | #5    |
| Week 1, 1st day, C4h* | 0.252    | 0.376 | 0.049 | 0.355 | 0.347 |
| Week 1, 5th day, C4h  | 0.047    | 0.479 | 0.288 | 0.646 | 0.515 |
| Week 2, 1st day, C4h  | 0.427    | 0.095 | 0.105 | 0.276 | 0.612 |
| Week 2, 5th day, C4h  | 0.263    | 0.326 |       |       |       |
| Week 3, 1st day, C4h  | 0.084    | 0.243 |       |       |       |

\* Blood concentration at 4 h post-dose on the first day of Week 1.

VEN、VOR、POSA,缩短了报告发送时间,便于在患者出现治疗效果不佳或出现药物毒性反应时及时调整药物治疗方案。

### 3 结论

本研究建立了使用超高效液相色谱-串联质谱同时测定人血浆中 SEL、POSA、VEN 及 VOR 的方法。该法所需要的样本量少,选择性好,灵敏度高,准确稳定,符合临床高通量、快速检测的需求,适用于临床 MM 与 AML 患者药物浓度的监测。

### 参考文献:

- [1] Jiang J, Wang Y, Liu D, et al. Immunotargets Ther, 2023, 12: 135
- [2] Lin L H, Gao S Q, Mei X Q, et al. Journal of Experimental Hematology, 2024, 32(4): 1085  
林璐慧, 高孙巧, 梅序桥, 等. 中国实验血液学杂志, 2024, 32(4): 1085
- [3] Maschmeyer G, Bullinger L, Garcia-Vidal C, et al. Leukemia, 2022, 36(5): 1215
- [4] Khanina A, Tio S Y, Ananda-Rajah M R, et al. Intern Med J, 2021, 51: 18
- [5] Hall V G, Tang K, Kumar D, et al. Open Forum Infect Dis, 2023, 10(3): 134
- [6] Gao P, Zhang W, Fang X, et al. Pharm Biomed Anal, 2023, 227: 115279
- [7] Dong J, Liu S B, Rasheduzzaman J M, et al. Pharm Res, 2022, 39(8): 1921
- [8] Yang J, Wang H, Liu D, et al. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 3681
- [9] Fan W B, Zhuang J C, Fan J, et al. Chinese Journal of Clinical Pharmacy, 2023, 32(9): 692  
范伟斌, 庄嘉诚, 范菁, 等. 中国临床药理学杂志, 2023, 32(9): 692
- [10] Zhang F Y, Zhang R X, Gao H E, et al. Journal of Tianjin Medical University, 2022, 28(2): 195  
张飞雨, 张瑞霞, 高慧儿, 等. 天津医科大学学报, 2022, 28(2): 195
- [11] Wang Y Q, Wang H F, Fu Q, et al. Journal of Clinical Hematology, 2024, 37(9): 643  
王昀琪, 王慧芳, 付强, 等. 临床血液学杂志, 2024, 37(9): 643
- [12] Yuan Z L, Fan Y X, Gong Y Y, et al. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2023, 23(6): 777  
袁智龙, 范亚新, 龚媛媛, 等. 中国感染与化疗杂志, 2023, 23(6): 777
- [13] Zhang Y Y, Liu W, Zhou C Y, et al. Chinese Journal of Clinical Pharmacy, 2020, 36(12): 1697  
张元元, 刘维, 周从亚, 等. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(12): 1697
- [14] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidelines for Validation of Quantitative Analysis Methods of Biological Samples. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 466  
国家药典委员会. 生物样品定量分析方法验证指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466
- [15] Li Y, Wan Q, Wan J, et al. Pharmacogenomics J, 2024, 24(6): 37
- [16] Zhou C J, Wang H J, Zhou C Y, et al. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 1561
- [17] Yan X T, He X, Yang X, et al. Anal Methods, 2024, 16(7): 1050
- [18] Xu E G, Tong J, Wei W, et al. Chinese Journal of Clinical Pharmacy, 2023, 39(20): 2995  
徐尔高, 童娟, 魏伟, 等. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(20): 2995