

基于 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中泽布替尼药物浓度及其临床应用评价

涂志骏^{1,2}, 许贞书³, 郭江睿³, 吴灵洁⁴, 陈伊莹¹, 吴俊楠^{1,2}, 刘茂柏^{1,2}, 丘宏强^{1,2*}, 程 昱^{1,2*}

1. 福建医科大学 药学院, 福建 福州 350001

2. 福建医科大学附属协和医院 药学部, 福建 福州 350001

3. 福建医科大学附属协和医院 血液科, 福建 福州 350001

4. 福建医科大学孟超肝胆医院 福建省联合创新重点实验室, 福建 福州 350025

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 建立一种简单快速的测定人血浆中泽布替尼浓度的方法, 并用于临床治疗药物监测。**方法** 以伊布替尼为内标, 血浆样本经 90% 乙腈沉淀蛋白, 采用 Shim-pack GSP-HP C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 3 μm) 色谱柱, 0.1 % 甲酸水-0.1 % 甲酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 3 μL; 质谱检测采用电喷雾离子源, 正离子源, 多反应监测模式, 监测泽布替尼 m/z 472.2→290.2 (定量离子), m/z 472.2→455.2 (定性离子); 伊布替尼 m/z 441.2→138.1 的浓度。28 名受试者空腹口服泽布替尼 160 mg, 给药前 30 min 和给药后 2 h 收集血浆, 按建立的 UPLC-MS/MS 法测定血浆中泽布替尼浓度, 并将结果应用于临床治疗药物监测 (TDM)。**结果** 泽布替尼在 1~1 000 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好 ($R^2=0.9942$), 准确度在 97.4%~104.3%, 批内及批间精密度 (RSD) 均≤4.8%, 内标归一化基质效应在 100.8%~102.5%, 回收率为 96.9%~100.5%。泽布替尼血浆样品在室温放置 12 h, 4 °C 放置 12 h, 进样器 (8 °C) 放置 24 h, 反复冻融 (-20 °C) 3 次, -20 °C 放置 30 d, -80 °C 放置 30 d 的情况下均稳定。28 名患者泽布替尼平均稳态谷浓度为 (3.25±1.75) ng·mL⁻¹, 平均稳态峰浓度为 (110.09±52.53) ng·mL⁻¹。TDM 结果表明, 泽布替尼谷浓度与患者肝功能指标密切相关。**结论** 建立的一种 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中泽布替尼药物浓度, 适用于泽布替尼 TDM 及个体化用药。

关键词: 泽布替尼; 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS); 治疗药物监测; 血药浓度; 个体化用药

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)05-1273-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.019

Determination of zanubrutinib in human plasma using UPLC-MS/MS and evaluation of its clinical application

TU Zhijun^{1,2}, XU Zhenshu³, GUO Jiangrui³, WU Linjie⁴, CHEN Yiyang¹, WU Junnan^{1,2}, LIU Maobai^{1,2}, QIU Hongqiang^{1,2}, CHENG Yu^{1,2}

1. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

2. Department of Pharmacy, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

3. Department of Hematology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

4. The United Innovation of Mengchao Hepatobiliary Technology Key Laboratory of Fujian Province, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China

Abstract: Objective To establish a simple and rapid ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the determination of zanubrutinib concentration in human plasma and apply it to clinical therapeutic drug monitoring. **Methods** Ibrutinib was used as the internal standard. Plasma samples were precipitated with 90% acetonitrile. A Shim-pack GSP-HP C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 3 μm) column was used with a mobile phase of 0.1% formic acid water and 0.1% formic acid acetonitrile solution, gradient elution, a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, column temperature of 40 °C, and an injection volume of 3 μL.

收稿日期: 2024-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82270175); 福建省自然科学基金资助项目 (2021J01761); 福建省自然科学基金重点项目 (2021J02040)

作者简介: 涂志骏, 从事治疗药物监测研究。E-mail: 1439144486@qq.com

***通信作者:** 程 昱, 副主任药师, 从事临床药学及治疗药物监测研究。E-mail: chengyu@fjmu.edu.cn

丘宏强, 主任药师, 从事临床药学及治疗药物监测研究。E-mail: hongqiangqiu@fjmu.edu.cn

Mass spectrometry detection was performed using an electrospray ionization source, positive ion mode, and multiple reaction monitoring mode. The monitoring ions for zanubrutinib were m/z 472.2 $\rightarrow$ 290.2 (quantitative ion) and m/z 472.2 $\rightarrow$ 455.2 (qualitative ion), and the ion for ibrutinib was m/z 441.2 $\rightarrow$ 138.1. Twenty-eight subjects were given a single oral dose of 160 mg zanubrutinib after fasting. Blood samples were collected 30 minutes before administration and 2 hours after administration, and plasma was prepared. The plasma concentration of zanubrutinib was determined by the established UPLC-MS/MS method and the results were applied to clinical therapeutic drug monitoring (TDM). **Results** Zanubrutinib showed a good linear relationship within the range of 1—1 000 ng·mL⁻¹ ($R^2 = 0.994$), with accuracy ranging from 97.4% to 104.3%, and intra- and inter-batch precision (RSD) was $\leq 4.8\%$. The normalized matrix effect of the internal standard was between 100.8% and 102.5%, and the recovery rate was 96.9% to 100.5%. Zanubrutinib plasma samples were stable under conditions of room temperature for 12 hours, 4 °C for 12 hours, in the injector (8 °C) for 24 hours, after three freeze-thaw cycles at -20 °C, and at -20 °C for 30 days or at -80 °C for 30 days. The average steady-state trough concentration of zanubrutinib in 28 patients was (3.25 ± 1.75) ng·mL⁻¹, and the average steady-state peak concentration was (110.09 ± 52.53) ng·mL⁻¹. The TDM results indicated that the trough concentration of zanubrutinib was closely related to the liver function indicators of patients. **Conclusion** UPLC-MS/MS method was established for the determination of zanubrutinib concentration in human plasma, which is suitable for zanubrutinib therapeutic drug monitoring (TDM) and individualized medication. **Key words:** zanubrutinib; UPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring; plasma concentration; individualized medication

泽布替尼作为继伊布替尼、阿卡替尼之后全球获批上市的第 3 款布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTKs) 抑制剂, 于 2019 年底通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 优先审评批准上市, 2020 年获中国国家药品监督管理局 (NMPA) 批准上市。其适应症涵盖: 既往至少接受过一种治疗的慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症, 以及既往接受过至少二线系统性治疗的复发或难治性滤泡性淋巴瘤的成人患者^[1], 目前, 该药物已被国内外权威指南推荐为多种淋巴瘤亚型的一线及二线治疗首选方案^[2-4]。

临床研究表明, BTKs 抑制剂的疗效及不良反应与血药浓度相关^[5]。作为非受体酪氨酸激酶, BTKs 在 B 细胞恶性肿瘤的增殖、存活相关信号通路中发挥关键作用^[6], 由于患者体内 BTKs 激酶不断再生^[7], 需要通过维持 BTKs 抑制剂有效治疗浓度以确保疗效, 但同时需避免血药浓度过高导致的出血等不良反应^[8]。药动学研究表明, 泽布替尼主要经肝脏细胞色素 P450 酶 (CYP) 3A 代谢^[9]。然而, 其临床实践经验尚少, 现有报道的人血浆浓度检测方法流动相体系复杂、分析周期长、检测灵敏度低等问题^[10], 同时真实世界中影响泽布替尼药动学的因素尚不明确。因此, 本研究旨在建立快速、简便、灵敏、准确的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法, 测定人血浆中的泽布替尼药物浓度, 并将其应用于泽布替尼临床治疗药物监测 (TDM), 研究结果将为后续个体化用药方案优化及真实世界药物应用评价 (如患者依从性评估、疗

效分析等) 提供数据支撑。

1 材料

1.1 药品与试剂

泽布替尼胶囊 (百悦泽®) (批准文号: 国药准字 H20200005), 百济神州有限公司, 规格每粒 80 mg, 批号 S20241109。对照品泽布替尼 (质量分数 100%, 批号 M10025, 购自 AbMole BioScience); 伊布替尼 [内标 (IS)], 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 I124970, 购自 Toronto Research Chemicals]; 甲酸 (质量分数 98%~100%), 乙腈 (色谱级) 和甲醇 (色谱级) 均购自德国 Merck 试剂公司; 超纯水由法国 Millipore 超纯水系统制备。空白人血浆来源于健康志愿者捐献。

1.2 仪器与设备

Shimadzu Jasper TM 型超高效液相色谱系统 (日本岛津公司) 串联 AB SCIEX Triple QuadTM 4500MD 质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); CP114 型分析天平, 精度 0.000 1 g, 美国奥豪斯公司; XW-80A 型涡旋混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Legend Micro 21R 型高速冷冻离心机, 德国 Thermo Fisher 公司; MDF-U53V 型 -80 °C 低温冰箱, 日本 SANYO 公司。

2 方法与结果

2.1 样本采集

本研究遵循《赫尔辛基宣言》及其修正案, 研究方案获得福建医科大学协和医院机构伦理委员会批准 (No. 2021KJT051)。血液样本、病史资料采集均获得患者知情同意。纳入标准: 患者规律口

服泽布替尼,至少采集 1 个血药浓度点;排除标准:关键性信息缺失及采样时间不准确者排除。患者口服泽布替尼 160 mg,每天 2 次,达稳态后,于下次给药前 30 min (谷浓度)和给药后 2 h (峰浓度)^[11]采集抗凝血样本 1~2 mL,4 ℃下 3 500 r·min⁻¹ (1 200×g)离心 10 min,取上清血浆样本密封避光保存于-80 ℃冰箱,直至分析。准确记录采样时间,采用建立的 UPLC-MS/MS 法测定患者血浆中泽布替尼的浓度;记录患者实验室检查结果及治疗过程中的疗效和不良反应情况,进一步分析泽布替尼血药浓度与肝功能指标的相关性。

2.2 血浆样本预处理

血浆样品于室温条件下完全融化,混匀约 30 s。取 80 μL 血浆样本加入 240 μL 血浆样本预处理溶液,涡旋混匀 1 min,4 ℃下以 12 000 r·min⁻¹ (13 800×g)离心 5 min,取上清液 100 μL 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack GSP-HP C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 3 μm),流动相 0.1%甲酸-水溶液 (A)-0.1%甲酸-乙腈溶液 (B)。洗脱梯度:0~1.0 min,10%~40% B;1.0~1.3 min,40%~95% B;1.3~2.6 min,95% B;2.6~2.7 min,95%~75% B;2.7~3.5 min,75%~50% B;3.5~4.5 min,50% B。柱温 40 ℃,进样器温度 8 ℃,进样量 3 μL,体积流量 0.3 mL·min⁻¹。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源正离子模式 (ESI⁺),多反应监测方式 (MRM) 扫描,泽布替尼监测离子对为 m/z 472.2→290.2 (定量离子), m/z 472.2→455.2 (定性离子);IS 监测离子对为 m/z 441.2→138.1。离子源喷射电压为 5 500 V,离子源温度 550 ℃,泽布替尼和 IS 的去簇电压分别为 55 V 和 35 V,碰撞能量分别 110 V 和 114 V。

2.4 溶液配制

2.4.1 储备液配制 精密称取泽布替尼 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解定容,配制成质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的储备液,密封避光保存于-80 ℃。精密称取 IS 1.0 mg,用 1 mL 甲醇溶解,配制成 1 mg·mL⁻¹ 的 IS 储备液,密封避光于-80 ℃保存。

2.4.2 标准曲线和质控溶液配制 将泽布替尼储备液用甲醇稀释成质量浓度为 0.010、0.025、0.050、0.100、0.500、1.000、2.500、5.000、10.000 μg·mL⁻¹

的系列工作溶液,取 10 μL 工作溶液加至 90 μL 人空白血浆中配制成血浆药物质量浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0 ng·mL⁻¹ 的标准曲线溶液。取泽布替尼储备液适量,用人空白血浆稀释成为质量浓度为 1 ng·mL⁻¹ (LLOQ,定量下限)、2 ng·mL⁻¹ (QL,低质控浓度)、100 ng·mL⁻¹ (QM,中质控浓度)和 800 ng·mL⁻¹ (QH,高质控浓度)的质控样品,密封避光于-20 ℃保存。

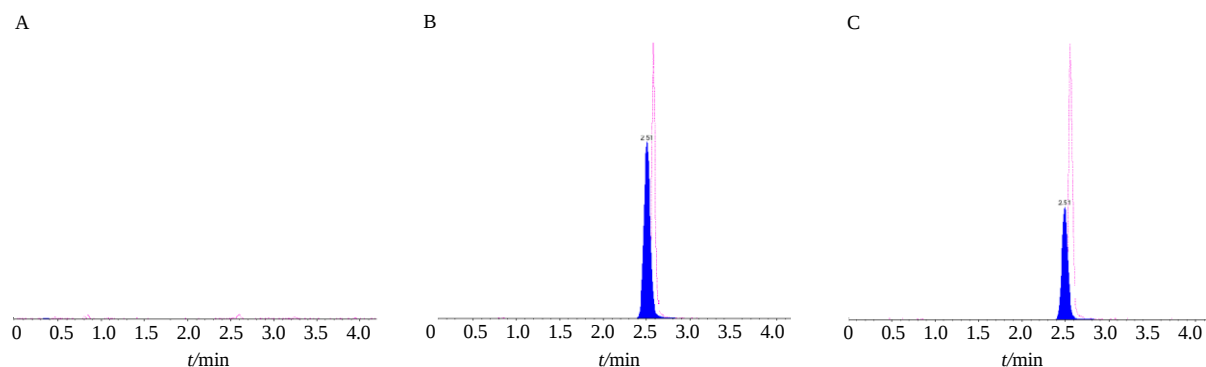
2.4.3 血浆样本预处理溶液配制 取 IS 储备液用 90%乙腈溶液配制成 50 ng·mL⁻¹ 的血浆样本预处理溶液,密封避光于-80 ℃保存。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取 6 份来源不同的空白血浆进行专属性考察。与泽布替尼 LLOQ 样品的出峰位置以及峰面积比较,观察空白血浆是否在泽布替尼及 IS 出峰处存在干扰。干扰组分的响应低于泽布替尼 LLOQ 响应的 20%,并低于 IS 响应的 5%时,可被接受。结果如图 1 所示,空白血浆在泽布替尼和 IS 出峰处均未见干扰峰,表明空白血浆中的内源性物质不干扰目标化合物的测定。泽布替尼和 IS 峰形对称,保留时间分别为 2.51 min 和 2.59 min,专属性良好。

2.5.2 标准曲线线性范围和定量限考察 按“2.4.2”项操作取含空白血浆的系列标准曲线溶液,及“2.4.3”项的血浆样本预处理溶液,按“2.2”项处理后按照“2.3”项下色谱方法进行样分析。以血浆中泽布替尼浓度为横坐标 (X),泽布替尼峰面积与 IS 峰面积比值为纵坐标 (Y),采用加权最小二乘法进行线性回归计算,零浓度点不参与计算标准曲线参数。结果表明,泽布替尼在 1~1 000 ng·mL⁻¹ 线性关系良好,线性方程为 $Y=0.002\ 37\ X+1.92\times 10^{-3}$, $R^2=0.994\ 2$,定量下限为 1 ng·mL⁻¹,定量下限信噪比>10。

2.5.3 准确度和精密度 取“2.4.2”项下 LLOQ、QL、QM 和 QH 质控样品,按“2.2”项处理后进样,每个浓度平行 6 份,连续制备 3 d 并进行测定,用于评估准确度和精密度。准确度均值应在质控样品标示值的±15%之内,定量下限准确度应在标示值的±20%范围内。批内、批间精密度其质控样本 RSD 不得超过 15%,定量下限的 RSD 不得超过 20%。质控样品的批内和批间精密度和准确度均符合生物样品接受标准。结果见表 1。



A-空白血浆; B-空白血浆+泽布替尼+IS; C-患者血浆+IS; 蓝色实心积分峰为泽布替尼, 红色空心积分峰为 IS。
A-blank human plasma; B-blank plasma spiked with zanubrutinib and internal standard; C-patient plasma spiked with internal standard; the blue solid integral peak is zanubrutinib; the red hollow integral peak is the internal standard.

图 1 泽布替尼和 IS 的代表性图谱

Fig. 1 Representative chromatogram of zanubrutinib and IS

表 1 人血浆中泽布替尼准确度和精密度结果

Table 1 Results of accuracy and precision of zanubrutinib in human plasma

理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	批内批间实测质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	批内 RSD/%	批间 RSD/%	RE/%
1.00	1.10±0.07	7.1	6.3	10.00
2.00	2.12±0.10	4.7	4.8	6.00
100.00	98.11±2.36	1.9	3.0	-1.89
800.00	798.63±9.57	1.4	1.1	-0.17

2.5.4 基质效应 取 6 份来源不同的空白血浆按“2.2”项下方法处理, 取上清, 按“2.4.2”项下方法制备成质量浓度为 2、100、800 ng·mL⁻¹ 的泽布替尼对照品血浆样品, 每个质量浓度平行制备 6 份, 按“2.4”项下方法处理, 按“2.2”项下条件进样分析, 分别记录泽布替尼和 IS 的色谱响应值 A_Z 、 A_{IS} ; 用 90%乙腈代替空白血浆, 制备以上 3 个质量浓度的对照品溶液, 每个质量浓度平行 6 份, 按“2.3”项下方法进样分析, 所得泽布替尼和 IS 的色谱响应值 B_Z 、 B_{IS} , 计算归一化基质效应因子 (MF), 待测物和 IS MF 的 RSD 应≤15%。

$$\text{泽布替尼基质效应} = A_Z/B_Z$$

$$\text{IS 基质效应} = A_{IS}/B_{IS}$$

$$\text{MF} = (A_Z/B_Z \text{ 均值}) / (A_{IS}/B_{IS} \text{ 均值})$$

结果表明, 泽布替尼上述 3 个质量浓度的基质效应分别为 (103.31±1.85)%、(100.42±2.78)%、(98.20±3.24)% ($n=6$), IS 基质效应分别为 (100.82±1.43)%、(99.58±2.41)%、(96.74±3.83)% ($n=6$), 泽布替尼 IS 归一化的基质效应为 (102.48±1.57)%、(100.80±2.65)%、(101.55±3.78)% ($n=6$), RSD 均小于 4%, 符合生物样本

测定要求。

2.5.5 提取回收率 按“2.4.2”项下方法制备成质量浓度为 2、100、800 ng·mL⁻¹ 的泽布替尼对照品血浆样品, 每个质量浓度平行配制 6 份, 按“2.2”项下方法处理, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 记录泽布替尼和 IS 各自色谱响应值分别为 C_Z 、 C_{IS} , IS 归一化的提取回收率的 RSD 不得大于 15%。

$$\text{泽布替尼提取回收率} = C_Z/A_Z$$

$$\text{IS 提取回收率} = C_{IS}/A_{IS}$$

$$\text{归一化提取回收率} = (C_Z/A_Z) / (C_{IS}/A_{IS})$$

结果表明, 血浆中泽布替尼上述 3 个质量浓度的提取回收率分别为 (103.51±7.96)%、(106.23±2.29)%、(104.60±3.05)% ($n=6$), IS 的提取回收率分别为 (106.83±9.12)%、(105.74±1.98)%、(107.21±3.38)% ($n=6$), 归一化的提取回收率为 (96.92±8.96)%、(100.51±2.13)%、(97.63±3.16)% ($n=6$), IS 归一化的提取回收率 RSD<10%, 满足生物样本分析要求。

2.5.6 稳定性 取 QL、QM 和 QH 3 个质量浓度的质控样品, 分别考察在室温放置 12 h, 4℃放置 12 h, 进样器 (8℃) 放置 24 h, 反复冻融 3 次,

-20 ℃放置 30 d, -80 ℃放置 30 d 的稳定性。每种质量浓度平行测定 5 份。不同储存条件下泽布替尼的稳定性评价见表 2, 泽布替尼在上述条件下的稳定性良好, 适用于临床常规 TDM。

表 2 稳定性结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 2 Results of stability ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

储存条件	理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	实际质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
室温 12 h	2	1.72±0.07	4.2
	100	86.13±1.03	1.2
	800	743.22±28.24	3.8
4 ℃ 12 h	2	1.92±0.11	5.6
	100	93.71±4.40	4.7
	800	780.03±18.72	2.4
自动进样器 (8 ℃) 24 h	2	2.17±0.14	6.3
	100	106.51±2.24	2.1
	800	880.14±14.08	1.6
3 次冻融循环	2	1.70±0.04	2.6
	100	100.50±1.51	1.5
	800	796.80±29.48	3.7
-20 ℃ 30 d	2	1.91±0.08	4.4
	100	102.21±3.68	3.6
	800	810.43±14.59	1.8
-80 ℃ 30 d	2	2.02±0.12	5.8
	100	97.70±3.91	4.0
	800	792.81±19.82	2.5

2.5.7 进样残留 选取标准曲线中最高质量浓度 1 000.0 ng·mL⁻¹ 和空白样本 (3 个来源、每个来源 3 个空白样本) 按照“2.3”项下方法进样分析, 以考察样本之间的进样残留。结果表明, 血浆中泽布替尼最高浓度点的残留限量为 (3.8±2.3) %, 信号响应限<LLOQ 的 20%; IS 的残留限量<0.5%, 信号响应限<血浆样品中 IS 的 5%, 表明高浓度样本不会对后续样品的测定产生显著影响。

2.5.8 稀释可靠性 标准溶液用血浆样品配制成 2 000.0 ng·mL⁻¹ 质量浓度的生物样本, 用空白血浆稀释 5 倍后进行样本处理, 平行处理 6 份。按照“2.3”项下条件进样分析, 结果显示, 泽布替尼测定的回收率为 98.8%~106.6%, RSD 值≤10%。表明稀释方法可靠。

2.6 统计学分析

统计分析采用 SPSS 24.0 及 GraphPad Prism7.0 软件, 对连续性定量资料使用 Shapiro-Wilks 检验进

行正态性检验, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对不符合正态分布的数据用中位数和范围表示。采用 Pearson 或 Spearman 检验分析变量间的相关性, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.7 TDM 临床应用

采用本研究所建立的方法, 收集福建医科大学附属协和医院服用泽布替尼达稳态后的 28 例患者共 38 例次泽布替尼 TDM 样本, 因 2 例次质量浓度低于定量下限, 不纳入分析。患者基本信息见表 3。患者治疗过程中未发生严重不良事件。TDM 检测结果如图 2 所示, 泽布替尼平均谷浓度为 (3.25±1.75) ng·mL⁻¹ (RSD=53.91%), 平均峰浓度为 (110.09±52.53) ng·mL⁻¹ (RSD=47.71%)。通过相关性分析发现, 泽布替尼谷浓度、峰浓度与患者肝功能指标间均存在正相关, 其中泽布替尼谷浓度与丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和 γ 谷氨酰转肽酶 (GGT) 显著相关 ($P<0.05$), 其余指标与泽布替尼谷浓度、峰浓度均无显著相关性 (图 3)。

3 讨论

本研究建立快速、简便、灵敏、准确的 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中的泽布替尼药物浓度, 并成功应用于临床 TDM 实践。Sun 等^[10]采用 LC-MS/MS 检测人血浆中泽布替尼的浓度, 流动相含甲酸铵, 运行时间为 6.5 min, 泽布替尼定量下限为 2 ng·mL⁻¹。为缩短分析时间, 同时简化流动相, 提高检测灵敏度, 本研究在此基础上对色谱条件及质谱条件等均进行了优化考察。色谱条件比较了水-甲醇和水-乙腈两种流动相系统, 乙腈为流动相时泽布替尼的响应较高。为提高离子化效率添加了低浓度甲酸, 最终流动相系统为简单的甲酸水-甲酸乙腈进行梯度洗脱, 避免了缓冲液流动相对系统的污染以及内源性物质对目标物的检测干扰, 同时保证了出峰迅速, 峰形对称。质谱条件选择了 $[M+H]^+$ 母离子的离子对, 响应稳定, 灵敏度好, 适合常规检测。分析时间在 4 min 内, 定量下限为 1 ng·mL⁻¹, 满足临床 TDM 需求。

此外, 生物样品的前处理方法选择简单方便的蛋白沉淀法, 有效简化操作程序, 缩短样品制备时间, 降低实验成本。在此过程中, 比较了甲醇和乙腈的沉淀效率, 提示乙腈作为沉淀剂平均回收率更高。相比其他的前处理方式, 如液液萃取和固相萃取, 蛋白沉淀需考虑基质效应的影响^[12]。本研究在蛋白沉淀后使用微孔滤膜过滤, 一方面降低了内源性物

表 3 患者人口统计学及临床信息

Table 3 Patient demographics and clinical information

参数	数值
年龄/岁[中位数(范围)]	66(47~78)
性别, (男/女)/例(占比/%)	19.0(67.9)/9(32.1)
体质量/kg [中位数(范围)]	68(53~89)
身高/cm [中位数(范围)]	165(155~178)
CLL、WM、MCL、DLBCL/例(占比/%)	8.0(28.6)、8.0(28.6)、7.0(25.0)、5.0(17.9)
TBIL/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	11.4(3.7~65.4)
DBIL/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	3.5(0.5~34.2)
AST/($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	22.0(10.0~58.0)
ALT/($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	23.0(11.0~66.0)
GGT/($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	48.0(9.0~168.0)
ALP/($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	105.0(30.0~181.0)
ALB/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	39.0(35.1~49.3)
UREA/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	5.7(3.8~8.5)
CLcr/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) [中位数(范围)]	75.0(53.8~98.1)
CREA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [中位数(范围)]	80(59~98)

ALB-血清白蛋白; ALP-碱性磷酸酶; ALT-丙氨酸氨基转移酶; AST-天冬氨酸氨基转移酶; CLL-慢性淋巴细胞白血病; CLcr-肌酐清除率; CREA-血清肌酐; DBIL-直接胆红素; DLBCL-弥漫大 B 细胞淋巴瘤; GGT- γ 谷氨酰转肽酶; MCL-套细胞淋巴瘤; TBIL-总胆红素; UREA-尿素; WM-华氏巨球蛋白血症。

ALB-serum albumin; ALP-alkaline phosphatase; ALT-alanine aminotransferase; AST-aspartate aminotransferase; CLL-chronic lymphocytic leukemia; CLcr-creatinine clearance rate; CREA-serum creatinine; DBIL-direct bilirubin; DLBCL-diffuse large B-cell lymphoma; GGT-gamma-glutamyl transpeptidase; MCL-mantle cell lymphoma; TBIL-total bilirubin; UREA-urea; WM-Waldenström macroglobulinemia.

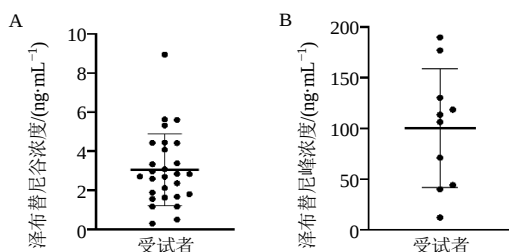
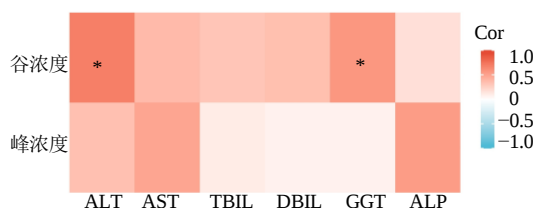


图 2 受试者谷浓度 (A) 和峰浓度 (B) 分布图

Fig. 2 Distribution map of trough concentration (A) and peak concentration (B) of subjects



ALT-丙氨酸氨基转移酶; AST-天冬氨酸氨基转移酶; TBIL-总胆红素; DBIL-直接胆红素; GGT- γ 谷氨酰转肽酶; ALP-碱性磷酸酶; $P < 0.05$ 。

ALT-alanine aminotransferase; AST-aspartate aminotransferase; TBIL-total bilirubin; DBIL-direct bilirubin; GGT-gamma glutamyltranspeptidase; ALP-alkaline phosphatase; $P < 0.05$ 。

图 3 泽布替尼浓度与肝功能指标的相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis between zanubrutinib concentrations and liver function index

质的基质效应的干扰, 另一方面也避免了采取水稀释操作的目标物响应降低的缺陷。尽管同位素内标是质谱方法的首选, 但由于泽布替尼暂无法获取同位素内标, 因而选择其结构类似物作为内标, IS(分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$) 与泽布替尼同为 BTKs 抑制剂类, 具有相似的化学结构, 在本研究中的出峰时间与泽布替尼也较接近, 重复性好, 因而选择其作为泽布替尼的 IS, 进行方法学考察, 结果显示泽布替尼线性范围适宜, 准确度、精密度、回收率、稳定性结果等均符合要求, 可用于临床泽布替尼 TDM。泽布替尼 TDM 结果显示, 泽布替尼的谷浓度和峰浓度的变异度较大, 提示泽布替尼存在较明显的个体间变异。

泽布替尼浓度相关性分析结果显示泽布替尼谷浓度与肝功能指标 ALT 和 GGT 显著正相关。这与 1 项纳入 632 例健康受试者和 B 细胞恶性肿瘤患者的群体药动力学研究结果相一致^[12], 提示 ALT 和患者健康状况可能是影响泽布替尼药物清除率的主要协变量。泽布替尼主要经肝脏代谢, 体外研究结果表明, CYP3A 是负责泽布替尼代谢的主要 CYP 亚型^[13]。肝损伤发生时, 肝内参与药物 I 相代谢的

CYP450 酶的活性和基因表达可有显著改变,使得药物经肝脏代谢的能力和速度受到影响,进而影响药物暴露,导致药效变化^[14]。有研究报道,轻、中、重度肝损伤患者的泽布替尼平均暴露量和未结合药物暴露量较正常患者增加 11%~194%^[15]。基于此,说明书提及轻度至中度肝损伤患者不建议进行泽布替尼剂量调整,而重度肝损伤患者建议剂量减少 50%^[16]。此外,当 CYP3A 基因突变或合用 CYP3A 强效/中效抑制剂(如伊曲康唑)以及 CYP3A 强效诱导剂(如利福平)时,泽布替尼血浆暴露量将受影响^[17],因此对于肝损、合并使用肝酶诱导剂/抑制剂的患者建议实施泽布替尼 TDM。泽布替尼患者人群多为老年人,用药周期长,实施 TDM 也有助于患者依从性判断。值得注意的是,目前基于 TDM 的泽布替尼个体化用药和临床应用评价研究仍较为局限,影响泽布替尼的药动学因素尚不完全清晰,未来有待于进一步扩大样本量采用模型引导下的精准用药模式评估泽布替尼在中国人群中药物应用情况,以及建立基于酶动力学机制的生理药动学模型,以定量评估泽布替尼在特殊患者中的药物暴露。

综上,本研究建立了一种简单、快速、灵敏度高和准确性好的 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中泽布替尼的血药浓度,执行严格的方法学验证,并成功应用于泽布替尼临床 TDM,为泽布替尼临床个体化用药和临床应用评价提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Geethakumari P R, Awan F. An evaluation of zanubrutinib, a BTK inhibitor, for the treatment of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Expert Rev Hematol*, 2020, 13(10): 1039-1046.
- [2] Wierda W G, Byrd J C, Abramson J S, et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 4.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18(2): 185-217.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 淋巴瘤诊疗指南(2022 年版) [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2023, 30(3): 135-158.
National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment guideline for lymphoma(2022 version) [J]. *Chin J Clin Oncol Rehabil*, 2023, 30(3): 135-158.
- [4] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016 年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(10): 837-845.
Hematology Oncology Committee, Chinese Anti-Cancer Association; Leukemia & Lymphoma Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia (2016) [J]. *Chin J Hematol*, 2016, 37(10): 837-845.
- [5] Walter H S, Rule S A, Dyer M J S, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies [J]. *Blood*, 2016, 127(4): 411-419.
- [6] Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks R W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 57.
- [7] Daryaei F, Zhang Z, Gogarty K R, et al. A quantitative mechanistic PK/PD model directly connects Btk target engagement and *in vivo* efficacy [J]. *Chem Sci*, 2017, 8(5): 3434-3443.
- [8] Song Z W, Jiang D, Yu L L, et al. Evidence-based expert consensus on clinical management of safety of Bruton's tyrosine kinase inhibitors (2024) [J]. *Chin J Cancer Res*, 2024, 36(3): 240-256.
- [9] Hillmen P, Eichhorst B, Brown J R, et al. Zanubrutinib versus ibrutinib in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: Interim analysis of a randomized phase III trial [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(5): 1035-1045.
- [10] Sun L N, Zhao Y, Qian Z Y, et al. Simultaneous determination of orelabrutinib, zanubrutinib, ibrutinib and its active metabolite in human plasma using LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1205.
- [11] Tuzimski T, Petruczynik A. Review of chromatographic methods coupled with modern detection techniques applied in the therapeutic drugs monitoring (TDM) [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 4026.
- [12] Ou Y C, Liu L, Tariq B, et al. Population pharmacokinetic analysis of the BTK inhibitor zanubrutinib in healthy volunteers and patients with B-cell malignancies [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, 14(2): 764-772.
- [13] Zhang H, Ou Y C, Su D, et al. In vitro investigations into the roles of CYP450 enzymes and drug transporters in the drug interactions of zanubrutinib, a covalent Bruton's tyrosine kinase inhibitor [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2021, 9(6): e00870.

- [14] 张钰, 彭英, 王广基, 等. 疾病状态下Ⅱ相代谢酶表达和活性的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(6): 686-700.
Zhang Y, Peng Y, Wang G J, et al. Advances in study of phase II metabolic enzyme expression and activity under diseases status [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2020, 25(6): 686-700.
- [15] Ou Y C, Preston R A, Marbury T C, et al. A phase I, open-label, single-dose study of the pharmacokinetics of zanubrutinib in subjects with varying degrees of hepatic impairment [J]. Leuk Lymphoma, 2020, 61(6): 1355-1363.
- [16] FDA. FDA approves zanubrutinib for chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma [EB/OL]. (2023-01-19) [2024-07-15]. https://www.accessdata.fda.gov/drug_satfda_docs/label/2023/213217s007lbl.pdf.
- [17] Mu S, Tang Z Y, Novotny W, et al. Effect of rifampin and itraconazole on the pharmacokinetics of zanubrutinib (a Bruton's tyrosine kinase inhibitor) in Asian and non-Asian healthy subjects [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85(2): 391-399.

[责任编辑 孙英杰]