超高效液相色谱-串联质谱法测定儿童患者血浆中的白消安

柴慧霞[1]，张海凤[2]，邵端芳[3]，权　力[4]，崔小岱[2]*，刘　嵘[3]
（1. 潍坊医学院，山东潍坊 261053；2. 首都儿科研究所实验中心，北京 100020；
3. 首都儿科研究所血液科，北京 100020；4. 北京大学分子医学研究所，北京 100871）

摘要：建立了超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定儿童患者血浆中的白消安（**1**）。采用 ACQITY UPLC® HSS T_3 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.8 μm），多反应监测模式，结合电喷雾离子源正离子分段扫描分析。结果显示，**1** 在 20 ～ 3 000 ng/ml 内线性关系良好，方法定量限为 5 ng/ml。日内、日间精密度均小于 5%，平均提取回收率为 90%～110%，残留效应为 0.01%。**1** 的标准血浆样品于室温条件保存 24 h 后 **1** 的浓度下降了 22%，提示不稳定，而其他贮存条件下（4、－20 和 －80 ℃），1 周内 **1** 的浓度基本无变化。建立的方法所需的血浆样品量少，即使 1 μl 血浆也可用于检测。该法快速、准确、可靠，可为 **1** 的儿科临床治疗和药动学研究提供参考。

关键词：白消安；UPLC-MS/MS；血药浓度监测；儿童患者
中图分类号：R969.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)06-0876-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.06.016

Determination of Busulfan in Plasma from Pediatric Patients by UPLC-MS/MS

CHAI Huixia[1], ZHANG Haifeng[2], SHAO Duanfang[3], QUAN Li[4], CUI Xiaodai[2]*, LIU Rong[3]
(1. Weifang Medical University, Weifang 261053; 2. Experiment Center of the Institute, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020; 3. Dept. of Hematology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020; 4. Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT: An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of busulfan (**1**) in plasma from pediatric patients. The ACQITY UPLC® HSS T_3 column (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) was used, and the multiple reaction monitoring mode was adopted with the electrospray ion source for positive ion segmental scanning analysis. The results showed that it was linear for **1** in the range of 20 – 3 000 ng/ml, and the quantification limit of the method was 5 ng/ml. The intra- and inter-day precisions were below 5%. The average extraction recoveries were 90% – 110%, and the residual effect was 0.01%. The concentration of **1** decreased by 22% after storage at room temperature for 24 h, indicating that the plasma sample was unstable under this condition. While under the other storage conditions (4, –20 and –80 ℃), the concentrations of **1** were basically unchanged within one week. The established method required a small amount of plasma sample, and even 1 μl of plasma could be used for detection. This method was fast, accurate and reliable, which provided a reference for pediatric therapy and pharmacokinetic studies of **1**.

Key Words: busulfan; UPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring; pediatric patient

白消安（busulfan，**1**）是一种细胞周期非特异性双功能烷基化抗肿瘤药，主要用于治疗慢性髓细胞性白血病，在造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplantation，HSCT）前作为大剂量预处理化疗方案使用，具有良好的骨髓抑制效果。**1** 的

收稿日期：2022-01-25
基金项目：国家自然科学基金项目(81501838)、北京市人才基金项目(2014000021469G229)
作者简介：柴慧霞(1993—)，女，硕士研究生，专业方向：脂质组学。
通信作者：崔小岱(1961—)，男，硕士，从事儿童感染免疫研究。E-mail：xdcui61@sina.com

治疗效果与其血药浓度有关，血药浓度过高会产生细胞毒性，增加肝静脉闭塞性疾病、黏膜炎、神经毒性等不良反应的发生率[1—3]；但相对较低的血药浓度可能会引起移植排斥反应和白血病复发[4—5]。因此，适宜的**1**血浆浓度对提高**1**预处理方案的临床效果、提高患者骨髓移植成功率具有重要意义。**1**在移植预处理化疗方案中具有治疗窗窄、毒性大、个体间和个体内的药动学差异大的特点，特别是在幼龄儿童中，不同疾病儿童的血液清除率差异甚大[6—8]，因此非常有必要实时监测**1**的血浆浓度。

已有研究建立了**1**血浆浓度的检测方法，例如：GC-MS法，虽检测灵敏度高，但在样品制备过程中需要复杂的衍生化过程[9]；HPLC法能够灵敏、准确地检测**1**的血浆浓度，但由于**1**缺乏紫外吸收和荧光基团，需要对样品进行柱前衍生化，而衍生化条件不易控制且成本高昂，限制了HPLC法的应用[10—12]；液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）法因高灵敏度、高选择性，以及不需对样品进行衍生化操作，已被应用于血浆中**1**浓度的监测，但存在样品用量多（100 ～ 200 μl）、检测时间长等问题，不适于大规模临床检测[13—15]。

为解决上述问题，本研究拟建立一种简单、快速、灵敏的超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定儿童患者血浆中的**1**浓度，以期为临床药物治疗、药动学研究以及血药浓度的常规监测提供参考。

1 仪器与试药

TQS型三重四极杆质谱仪和Ⅰ-Class型超高效液相色谱仪均购于美国Waters公司；XS205DU型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝管（德国Greiner Bio-One公司，批号D2102346）。

1对照品（美国Sigma公司，含量≥98%，批号BCBN8120VPCode）；内标（同位素标记的**1**，**1**-d_8）的甲醇溶液（美国Cerilliant公司，100 μg/ml，批号FN04211605）；乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵、甲酸铵均为色谱纯，水为超纯水。

人空白血浆（来自10名体检儿童，于晨起抽取其空腹静脉血）和临床患儿血浆样本［来自首都儿科研究所血液科采用**1**预处理化疗方案的20名患者，分别在d1和d2首次给药前和给药后的2、3、6 h采集血样2 ml，置EDTA抗凝管中，分别标记为0、2、3、6、24、26、27、30 h样品，采样后2 h内离心（3 616×*g*）5 min分离血浆］，本试验方案获得首都儿科研究所伦理委员会批准，伦理审查编号SHERLL 2016057。

2 方法与结果

2.1 质谱与色谱条件

色谱条件：色谱柱ACQITY UPLC® HSS T_3柱（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）；*流动相* A为含0.1%甲酸的2 mmol/L甲酸铵溶液，B为含0.1%甲酸和2 mmol/L甲酸铵的98%甲醇溶液，梯度洗脱（0—0.5 min，A 93%；0.5—1.5 min；A 93%—0；1.5—2 min，A 0；2—2.01 min；A 0—93%）；*流速* 0.6 ml/min；*柱温* 30 ℃；*进样量* 1 μl。

质谱条件：*离子源* 电喷雾离子化电离源（ESI），正离子模式，多反应监测（MRM）模式；*离子源温度* 150 ℃；*毛细管电压* 3.3 kV；*锥孔电压* 30 V；*脱溶剂气* 氮气；*流速* 550 L/h；*温度* 450 ℃；*碰撞气体* 氩气；*流速* 0.22 ml/min；*碰撞能量* 10 eV；*定量离子对* **1** *m*/*z* 264.032→150.937，*内标* **1**-d_8 *m*/*z* 272.03→159.00；*锥孔电压* 2 V；*碰撞能量* 8 eV。

2.2 溶液配制

对照品贮备液：精确称取**1**对照品1 mg，加入乙腈1 ml溶解，即得质量浓度为1 mg/ml的对照品贮备液，于 -80 ℃贮存备用。

对照品溶液：取对照品贮备液，依次用乙腈稀释为300、100、50、10、5、2.5 μg/ml的系列对照品溶液，于 -80 ℃贮存备用。

内标贮备液：精密量取100 μg/ml的同位素标记的**1**（**1**-d_8）的甲醇溶液50 μl，加入甲醇950 μl，稀释得质量浓度为5 μg/ml的内标贮备液，于 -80 ℃贮存备用。

内标工作液：精密量取5 μg/ml的内标贮备液10 μl，加入甲醇990 μl，即得质量浓度为50 ng/ml的内标工作液，现用现配。

标准血浆样品：取系列对照品溶液，分别加入空白血浆，即得**1**质量浓度为3 000、1 000、500、300、100、50、25、20 ng/ml的系列标准血浆样品。

2.3 血浆样品的预处理方法

吸取血浆样品 50 μl，置 1.5 ml EP 管内，加入“**2.2**”项下内标工作液 250 μl，涡旋振荡 1 min，然后离心（15 667×*g*）15 min，取上清液 50 μl 加入水 950 μl 中，涡旋混匀后取 1 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验

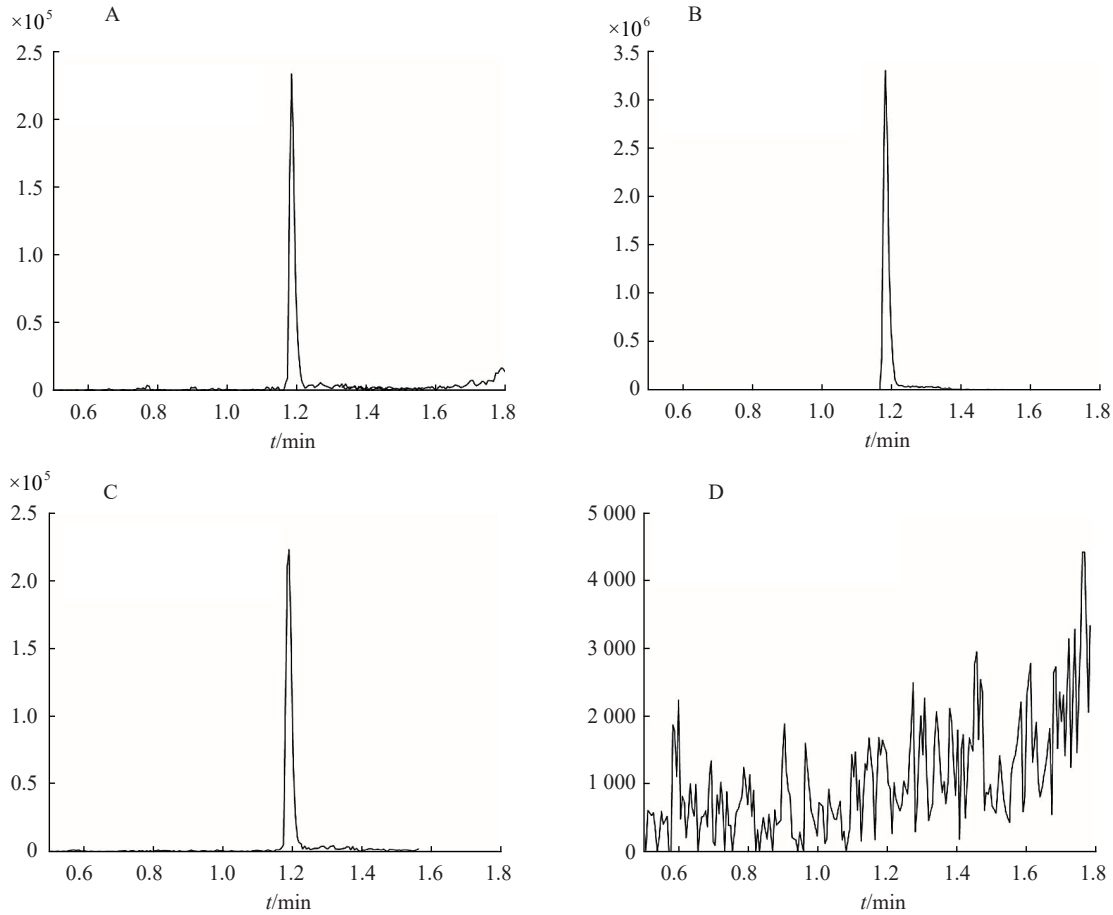
分别精密量取人空白血浆、临床患儿血浆样本（3 h 样品）和“**2.2**”项下标准血浆样品（20 ng/ml）各 50 μl，按“**2.3**”项下方法进行预处理，并按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果见图 1，**1** 和内标（**1**-d_8）的保留时间均为 1.2 min，且血浆样本中的内源性物质不会影响 **1** 及内标的检测。

2.4.2 线性试验

取“**2.2**”项下系列标准血浆样品，按“**2.3**”项下方法进行预处理，并按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，每个样品连续进样 5 针。以 12 d 独立试验得到的 **1** 峰面积与内标峰面积的比值（*Y*）为纵坐标、**1** 的质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归。得到线性回归方程为 Y=0.002 8c+0.012 7，R^2=0.995 7，说明 **1** 在 20 ～ 3 000 ng/ml 内线性关系良好。

2.4.3 定量限（LOQ）

取“**2.2**”项下对照品溶液，分别加入空白血浆，制备 1、1.5、2、3、4、5、10 ng/ml 的系列浓度标准血样，按“**2.1**”项下色谱质谱条件重复测定 3 次，并根据“**2.4.2**”项下得到的线性回归方程计算浓度，得到低浓度血样（5 ng/ml）的偏差为 5.2%，



A：标准血浆样品中 **1** 的色谱图，B：标准血浆样品中内标（**1**-d_8）的色谱图，C：临床患儿血浆样本（3 h 样品），D：人空白血浆

图 1　典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms

变异系数（CV%）<15%，且信噪比 *S*/*N*>10，故可作为 LOQ。

2.4.4 基质效应、准确度、精密度和回收率试验

按“**2.2**”项下标准血浆样品制备方法分别向空白血浆中添加 300 μg/ml 的对照品溶液，使 **1** 终浓度为 30、300、3 000 ng/ml，标记为低、中、高浓度质控血浆样本，按“**2.3**”项下方法进行预处理；同时准备 3 份空白血浆样品，按“**2.3**”项下方法预处理后取上清液，向每份上清液中加入 300 μg/ml 的对照品溶液，使其中 **1** 的终浓度分别与低、中、高质控血浆样本相同；另取水与甲醇，按一定比例混合，向其中加入 300 μg/ml 的对照品溶液至 **1** 终浓度分别与低、中、高质控血浆样本相同。取上述 3 种质控样品，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，获得的 **1** 与 **1**-d_8 峰面积比，分别标记为 *A*、*B*、*C*；以 *A* 与 *B* 的比值计算 **1** 的回收率，以 *B* 与 *C* 的比值计算基质效应。

根据标准曲线计算样品中 **1** 的实际浓度，再计算日间（取上述 3 种质控样品连续 5 d 进样，每天每个浓度连续进样 5 次）、日内（取 3 个质控样本每天早、中、晚各进样 1 次，每个样本连续进样 5 次）精密度 [16]。准确度采用质控的检测浓度与添加浓度之间的误差来计算 [17]，计算公式见式①。

$$\text{准确度}=\frac{\text{质控标准品测定浓度}-\text{添加浓度}}{\text{添加浓度}}\times 100\% \quad \text{式①}$$

结果见表 1，**1** 的基质效应为 98%～100%，基本可忽略；质控血浆样本中 **1** 的提取回收率为 100%～105%，说明该方法的提取回收率良好；3 个质控样品的日内准确度为 1.05%～6.67%，日间准确度为 －2.14%～2.82%，除低、中浓度质控样品的日内准确度大于 5%外，其他质控样品的准确度均在 5%以内，而日内和日间的 RSD 都小于 5%，说明方法精密度良好。

2.4.5 稳定性试验

为考察血样在不同贮存温度下的稳定性，取添加 **1** 的标准血浆样品（**1** 的终浓度为 300 ng/ml），分成 4 份，分别贮存于室温及 4、－20、－80 ℃的环境中，分别于 0、1、2、4、7 d 取样后进行预处理，再按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定血浆中 **1** 的含量。结果显示，于室温条件下贮存时，**1** 浓度显著下降，24 h 时已下降了 22%，1 周后 **1** 的浓度仅约为 70 ng/ml，损失 75%以上；而于其他贮存条件下，1 周内 **1** 的浓度基本无变化，仅于 4 ℃条件下贮存的 **1** 浓度损失约 5%。

2.5 残留效应

残留效应用于评价高浓度样品对下一个样品的污染程度。本研究照 MOON 等描述方法分别取“**2.4.4**”项下高浓度（3 000 ng/ml）和低浓度（30 ng/ml）质控血浆样本 [14]，按“**2.3**”项下方法预处理，将高浓度质控血浆样本连续进样 4 次后再连续进样低浓度质控血浆样本 4 次，所得浓度分别标记为 H1、H2、H3、H4 和 L1、L2、L3、L4，按式②计算残留效应。

$$\text{残留效应}=\frac{\text{L1}-(\text{L3}+\text{L4})/2}{(\text{H3}+\text{H4})/2-(\text{L3}+\text{L4})/2}\times 100\% \quad \text{式②}$$

结果显示，高、低浓度质控血浆样本的平均检测浓度分别为 2 953.86、29.57 ng/ml，计算得残留效应为 0.01%。此外，本研究又根据 DANSO 等的研究准备了 3 000 ng/ml 的高浓度质控血浆样本和空白血浆样品用于评价残留效应 [18]：在 4 次重复测定高浓度质控血浆样本（3 000 ng/ml）后测定空白血浆样品，结果在空白血浆样品中没有检测到任何峰值响应，表明该方法几乎没有残留效应，适用于临床样本的检测。

表 1 血浆中 1 的精密度、准确度、提取回收率与基质效应结果

Tab.1 Results of Precision, Accuracy, Recovery and Matrix Effect of **1** in Plasma

质量浓度/ng·ml^{-1}	日内精密度（*n*=3）			日间精密度（*n*=5）			提取回收率（*n*=3）/%		基质效应（*n*=3）/%	
	实测值/ng·ml^{-1}	RSD/%	准确度/%	实测值/ng·ml^{-1}	RSD/%	准确度/%	均值	RSD	均值	RSD
30	32.00	1.93	6.67	30.85	3.80	2.82	104.77	2.75	98.92	1.41
300	315.63	0.13	5.21	301.36	4.03	0.45	102.64	4.85	99.90	4.28
3 000	3 031.55	1.19	1.05	2 935.75	4.90	－2.14	104.23	7.39	99.34	3.37

2.6 建立的方法与现有方法的比较

本研究将新开发的 UPLC-MS/MS 法与现有文献报道的 LC-MS/MS 法进行比较[19]。取临床儿童患者血液样本（2、3、6、24、26、27 h 的临床血浆样品各 14 份，标记为 30 h 的临床血浆样品 13 份）共 97 份，分别采用本研究中建立的方法与文献中报道的 LC-MS/MS 法检测血浆中 **1** 的浓度，并对结果采用 Deming 回归和 Bland-Altman 分析进行比较。利用 MedCalc_20.0.26 统计软件进行 Deming 回归，所得回归曲线方程为 Y=0.953x+18.094，r=0.990 0；在 Bland-Altman 图的线性范围内，平均偏倚为 21.7 ng/ml，平均偏倚百分比为 1.4%，97 个样品的偏倚百分比均在 ±20% 内。说明本研究建立的 UPLC-MS/MS 法与已有文献中报道的 LC-MS/MS 法在测定血浆中 **1** 的浓度上结果一致，表明本法在检测血浆中 **1** 的浓度上具有可靠性。

2.7 药动学研究与临床应用

采用 5 名经 **1** 预处理化疗方案（静脉滴注 **1** 0.8 mg/kg，每隔 6 h 注射 1 次，共计 16 剂，连续 4 d）治疗的儿童患者血液样本。由于儿童患者采血不宜，本研究中只在治疗方案执行首日进行采血，具体如下：在首次静脉滴注 **1** 前及给药后的 1、2、2.5、3、6 h 采集血样，置 EDTA 抗凝管中，于 1 h 内离心（1 000×g）10 min，随后将血浆转移至 2 ml EP 管中，预处理后按“**2.1**”项下色谱质谱条件测定血浆中 **1** 的浓度。血药浓度数据采用 DAS 2.0 软件处理。5 名患儿的平均药 - 时曲线见图 2，主要药动学参数如下：末端消除半衰期（$t_{1/2}$）为（2.32±0.49）h；峰浓度（c_{max}）为（826.36±174.58）ng/ml；达峰时间（t_{max}）为（2.2±0.45）h；药时曲线下面积（$AUC_{0\to t}$）为（3 045.44±475.46）ng·ml^{-1}·h；$AUC_{0\to\infty}$ 为（3 814.40±1 294.58）ng·ml^{-1}·h。

此外，本研究同时测试了建立的方法在小样本量中的应用。取 7 份临床患儿血浆样本，从同一份临床患儿血浆样本中分别取 1、2、20、50 μl，预处理后按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样检测。结果显示，1、2、20 μl 血浆样本中测到的 **1** 浓度与 50 μl 血浆样本中测到的 **1** 浓度基本一致，其比值为 95%～115%，说明采用血浆样本 1 μl 即可对血浆中的 **1** 进行定量，且结果与采用 50 μl 血浆得到的结果一样准确。

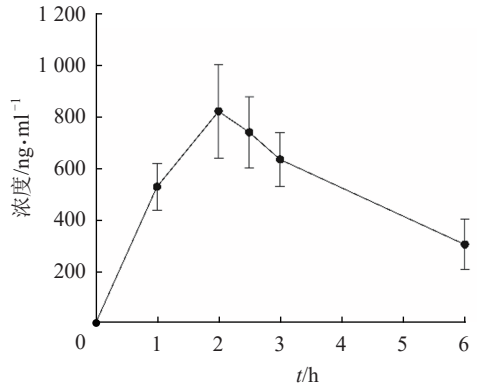


图 2　1 的平均药 - 时曲线（$\bar{x}\pm s$，n=5）

Fig.2　Mean Plasma Concentration-time Profile of **1** ($\bar{x}\pm s$, n=5)

3　讨论

本研究比较了流动相中分别添加甲酸铵与乙酸铵对 **1** 响应的影响。结果显示，在其他条件相同的情况下，流动相中添加 2 mmol/L 甲酸铵时，**1** 的响应明显优于添加 2 mmol/L 乙酸铵，峰值增加了 23%，这种效果在内标 **1**-d_8 中也得到了验证。此外，柱温对 **1** 的分离也有一定的影响，本研究比较了不同柱温（25、30 与 40 ℃）下 **1** 的响应，观察到随着柱温升高，**1** 的出峰时间后延，并且柱温为 30 ℃ 时 **1** 的响应最强。

目前，UPLC-MS/MS 法已被广泛应用于代谢组学、药物检测、食品安全等各个领域[20—22]。相对于已有文献报道的 HPLC 法，样品要先经过一系列衍生化处理，检测时间需要 18 min 左右[23]；LC-MS/MS 法检测每个样品的时间需要 5 或 8 min[24—27]。本研究建立的 UPLC-MS/MS 法仅需 2 min 即可对血浆中的 **1** 进行定量检测，显著缩短了分析周期。与朱丽娜等建立的 UPLC-MS/MS 法测定血浆中 **1** 浓度相比（定量限为 0.1 μg/ml），本法的定量限（5 ng/ml）显著降低[28]。此外，本法使用稳定同位素标记的 **1** 作为内标，与非同位素内标相比，内标与 **1** 具有同步丢失、同步出峰的特点，避免了因不

同步丢失导致的偏差。王磊等建立的HPLC-MS/MS法测定**1**血浆浓度的线性范围为10～1 000 ng/ml[29]，而本法线性范围为20～3 000 ng/ml，线性范围更宽，高浓度样本也能进行检测。并且与以上文献方法相比，本法血浆样品需求量少，即使1 μl血浆也可用于检测血浆中**1**的浓度。

在临床应用中，针对儿童血浆中**1**浓度分析的文献目前相对较少，SATO等对成人HSCT前**1**药动学特征进行了研究[30]，结果显示首次注射**1**与第4次注射**1**的最大药物浓度中位数分别为3 592 ng/ml(2 741～5 133 ng/ml)和3 954 ng/ml(2 949～4 900 ng/ml)。在另一项LC-MS/MS法检测血浆中**1**的研究中[19]，**1**血浆浓度为676～6 985 ng/ml，静脉滴注后0、1、2、4 h血浆**1**浓度中位数分别为4 776 ng/ml(2 567～6 985 ng/ml)、3 646 ng/ml(1 810～5 482 ng/ml)、3 110 ng/ml(1 497～4 722 ng/ml)和1 969 ng/ml(676～3 262 ng/ml)；这与本研究中儿童血浆中**1**浓度有很明显的差异。相对于儿童，成人的**1**血药浓度范围更大，这可能与体质量、体表面积、疾病类型等因素有关[7]。由此可见，对儿童患者进行**1**血药浓度的监测很有必要。

综上所述，本研究建立了一种快速、简便、精确度高、重复性好的UPLC-MS/MS法，可用于HSCT前儿童血浆中**1**浓度的定量测定。该法分析时间短、前处理步骤简单、所需样本量小，可节约时间与人力成本。低至1 μl的血浆需求量，使采血相对容易，对患儿的影响较小，更易被家长接受。另外，结合较短的分析时间，单次或批量监测均可在较短的时间内得到结果，说明该方法在实时监测血浆药物浓度方面具有应用潜力，也为今后的血浆药物浓度监测提供了参考依据。

参考文献：

[1] STROUSE C, ZHANG Y, ZHANG M J, *et al*. Risk score for the development of veno-occlusive disease after allogeneic hematopoietic cell transplant [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, **24**(10): 2072-2080.

[2] EDUARDO F P, BEZINELLI L M, GOBBI M, *et al*. Retrospective study of the digestive tract mucositis derived from myeloablative and non-myeloablative/reduced-intensity conditionings with busulfan in hematopoietic cell transplantation patient [J]. *Support Care Cancer*, 2019, **27**(3): 839-848.

[3] THEBAULT S, LEE H, BOSE G, *et al*. Neurotoxicity after hematopoietic stem cell transplant in multiple sclerosis [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, **7**(5): 767-775.

[4] BARTELINK I H, LALMOHAMED A, VAN REIJ E M L, *et al*. Association of busulfan exposure with survival and toxicity after haemopoietic cell transplantation in children and young adults: a multicentre, retrospective cohort analysis [J]. *Lancet Haematol*, 2016, **3**(11): e526-e536.

[5] SORA F, GRAZIA C D, CHIUSOLO P, *et al*. Allogeneic hemopoietic stem cell transplants in patients with acute myeloid leukemia(AML) prepared with busulfan and fludarabine(BUFLU) or thiotepa, busulfan, and fludarabine(TBF): a retrospective study [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, **26**(4): 698-703.

[6] 黄菁菁, 陈 冰, 杨婉花. 谷胱甘肽转移酶基因多态性对白消安体内代谢的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, **28**(11): 869-871.

[7] 冯新颖, 吴云娇, 李佳朋, 等. 白消安个体化给药的群体药代动力学研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, **34**(24): 2884-2888.

[8] 郑 萍, 刘世霆, 李春富, 等. 白消安在儿童和成人造血干细胞移植预处理患者体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2013, **48**(13): 1088-1093.

[9] ZEKI Ö C, EYLEM C C, REÇBER T, *et al*. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **190**: 113509.

[10] DAVID V, MOLDOVEANU S C, GALAON T. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, **35**(1): e5008.

[11] BAIG M A, SWAMY K B, BAKSH A D, *et al*. Evaluation of role of HPLC(merits & pitfalls), in the diagnosis of various hemoglobinopathies & thalassemic syndromes [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2021, **64**(3): 518-523.

[12] MATAR K M, ALSHEMMARI S H, REFAAT S, *et al*. UPLC-Tandem mass spectrometry for quantification of busulfan in human plasma: application to therapeutic drug monitoring [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 8913.

[13] IALONGO C, MOZZI A F, BERNARDINI S. An LC-MS assay with isocratic separation and on-line solid phase extraction to improve the routine therapeutic drug monitoring of busulfan in plasma [J]. *J Med Biochem*, 2017, **36**(2): 113-121.

[14] MOON S Y, LIM M K, HONG S, *et al*. Quantification of human plasma-busulfan concentration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Ann Lab Med*, 2014, **34**(1): 7-14.

[15] XIAO Y, LI X H, FU X W. A rapid and simple LC-MS/MS method for personalized busulfan dosing in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, **479**: 190-195.

[16] ZHANG H F, QUAN L, PEI P, *et al*. Simultaneous determination of vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D α-tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, **1079**: 1-8.

[17] Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry applications covered by section 505(b) [EB/OL]. [2021-12-23]. https://webarchive. library. unt. edu/eot2008/20080920150033/http://www. fda. gov/cder/guidance/2853dft. htm.

[18] DANSO D, JANNETTO P J, ENGER R, *et al*. High-throughput validated method for the quantitation of busulfan in plasma using ultrafast SPE-MS/MS [J]. *Ther Drug Monit*, 2015, **37**(3): 319-324.

[19] LEE E J, PARK N, LEE S H, *et al*. A simple and accurate liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for therapeutic drug monitoring of busulfan in plasma [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2019, **49**(2): 212-217.

[20] WILEY M B, PEREZ P A, ARGUETA D A, *et al*. UPLC-MS/MS method for analysis of endocannabinoid and related lipid metabolism in mouse mucosal tissue [J]. *Front Physiol*, 2021, **12**: 699712.

[21] YE Z J, WU L J, ZHANG X Y, *et al*. Quantification of sorafenib, lenvatinib, and apatinib in human plasma for therapeutic drug monitoring by UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **202**: 114161.

[22] SUN D L, QIU N N, ZHOU S, *et al*. Development of sensitive and reliable UPLC-MS/MS methods for food analysis of emerging mycotoxins in China total diet study [J]. *Toxins*, 2019, **11**(3): 166.

[23] 黄菁菁, 陈　冰, 杨婉花. HPLC法测定人血浆中白消安的浓度[J]. 中国药师, 2013, **16**(3): 395-397.

[24] PARISE R A, COVEY J M, HOLLINGSHEAD M G, *et al*. Development and validation of an LC-MS/MS generic assay platform for small molecule drug bioanalysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **203**: 114185.

[25] PUNT A M, LANGENHORST J B, EGAS A C, *et al*. Simultaneous quantification of busulfan, clofarabine and F-ARA-A using isotope labelled standards and standard addition in plasma by LC-MS/MS for exposure monitoring in hematopoietic cell transplantation conditioning [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, **1055**: 81-85.

[26] 谢何琳, 庄波阳, 吴雪梅, 等. HPLC-MS-MS法测定白消安的血药浓度[J]. 海峡药学, 2014, **26**(11): 243-246.

[27] JINJIE Y, SUN N, ZHANG S, *et al*. A rapid HPLC-MS/MS method for determining busulfan in hemolytic samples from children with hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, **34**(9): e4898.

[28] 朱丽娜, 董　吉, 缪丽燕. 人血浆中白消安血药浓度的测定[J]. 抗感染药学, 2016, **13**(6): 1216-1219.

[29] 王　磊, 孙文丽, 刘红星. HPLC-MS/MS法测定白血病患者血浆白消安浓度[J]. 医学检验与临床, 2018, **29**(3): 36-39.

[30] SATO M, KAKO S, MATSUMOTO K, *et al*. Pharmacokinetics study of once-daily intravenous busulfan in conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Int J Hematol*, 2015, **101**(5): 497-504.