

HPLC-MS/MS 法测定白血病患者 血浆伊马替尼与达沙替尼浓度^{*}

王磊¹, 周枫叶¹, 姜春菲¹, 陶蓓蓓², 刘红星¹ (1. 河北燕达医院陆道培血液肿瘤中心, 河北三河 065201; 2. 北京化学化工大学分析测试中心, 北京 100029)

摘要:目的 建立测定慢性粒细胞白血病(CML)患者血浆伊马替尼与达沙替尼浓度的 HPLC-MS/MS 法,并应用于临床治疗药物监测,为临床合理用药提供可靠依据。**方法** 血浆经甲醇沉淀蛋白处理,采用外标法定量。色谱柱为 Ultimate XB-C18,柱温 65℃,流动相为含 0.1 ml/dl 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水和含 0.1 ml/dl 甲酸的甲醇,梯度洗脱。质谱检测方式为电喷雾离子阱正离子模式,MRM 扫描,监测伊马替尼 m/z 494.5>394.3,达沙替尼 m/z 488.3>401.3。**结果** 伊马替尼浓度在 0.05~7.5 μg/ml 范围内与峰面积线性关系良好, $Y=5.6\times10^5X+5\times10^3$ ($R=0.999\ 8$)。达沙替尼浓度在 5~250 ng/ml 范围内与峰面积线性关系良好, $Y=211X+66.6$ ($R=0.999\ 6$);日内及日间 RSD 均小于 10%,平均回收率为 96%~105%。**结论** 该方法简便、准确、快速,检测的特异度及灵敏度高,适用于血浆伊马替尼与达沙替尼血药浓度测定。**关键字:**达沙替尼;伊马替尼;液质联用;治疗药物监测
中图分类号:R557;R969 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-128-04
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.037

Determination of Imatinib and Dasatinib in Leukemia Patients Plasma by HPLC-MS/MS

WANG Lei¹, ZHOU Feng-ye¹, JIANG Chun-fei¹, TAO Bei-bei², LIU Hong-xing¹ (1. *Lu Daopei Hematology and Oncology Center, Yanda Hospital of Hebei Province, Hebei Sanhe 0655201, China*; 2. *Beijing University of Chemical Analysis and Test Center, Beijing 100029, China*)

Abstract: **Objective** To develop a HPLC-MS/MS method for determination of Imatinib and Dasatinib in CML patient, and make it used in clinic trial. **Methods** The separation was performed on a Ultimate XB-C18 column with a mobile phase of water (containing 2 mmol/L ammonium acetate and 0.1 ml/dl formic acid) and methanol (containing 0.1 ml/dl formic acid). The way of eluting was gradient. Mass spectrum detection method was ESI positive ion mode and monitoring Imatinib m/z 494.5>394.3 and Dasatinib m/z 488.3>401.3. **Results** The standard curve of Imatinib was linear over the range of 0.05~7.5 μg/ml, $Y=5.6\times10^5X+5\times10^3$ ($R=0.999\ 8$). The standard curve of Dasatinib was linear over the range of 5~250 ng/ml, $Y=211X+66.6$ ($R=0.999\ 6$). The relative recovery was among the range of 90%~107%. RSDs of intra- and inter-day validation were less than 10%. **Conclusion** This method is convenient, accurate and rapid, and can be used for the determination of Imatinib and Dasatinib in clinic test.

Keywords: dasatinib; imatinib; HPLC-MS/MS; TDM

慢性粒细胞白血病(CML),是伴有获得性染色体异常的多能干细胞水平上的恶性变而引起的一种细胞株病,伊马替尼(Imatinib)与达沙替尼(Dasatinib)是治疗 CML 有效的一代及二代酪氨酸激酶抑制剂(TKI),在临床广为使用^[1~3]。Imatinib 作为一种成功的分子靶向治疗药物已显著提高 CML 患者的总体生存率和无事件生存率,但仍有一部分患者疗效不佳或治疗失败,在考虑存在耐药、依从性差、药物间相互作用等可能的原因之外,还应考虑标准剂量是否为该患者的最佳治疗剂量,是否实现了 Imatinib 治疗效益最大化,则需要通过检测药物浓度来判断患者体内药物的暴露^[2~8]。Dasatinib 作为 CML 二线治疗用药,其可抑制 BCR-Abl 激酶和 SRC 家族激酶以及多种其他肿瘤

中异常活化的激酶,包括 KIT,EPH 受体激酶和 PDGFR β 受体,可克服以下原因导致的 Imatinib 耐药:BCR-Abl 过表达、BCR-Abl 激酶区域突变、激活包括 SRC 家族激酶在内的其他信号通路和多药耐药基因过表达^[3~11]。Dasatinib 主要经 CYP3A4 代谢,其代谢产物基本无药理学活性,CYP3A4 酶活性是影响患者体内真实血药浓度的重要因素之一。多数研究认为 Imatinib 及 Dasatinib 血浆浓度监测对 CML 患者使用 Imatinib 及 Dasatinib 治疗有一定的指导意义,提示一定范围内的血药浓度水平有助于提高 CCyR 和 MMR 率^[4~12]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 岛津 20A 高效液相色谱系统

^{*} 作者简介:王磊(1984—),男,硕士,药师,主要从事医院药学研究工作,E-mail:rosie1982@163.com。

通讯作者:刘红星,男,硕士,执业医师,主要从事检验医学研究工作。

(带自动进样器),配有 AB Sciex 4000Qtrap 质谱仪;VORTEX QI LIN BEI ER(其林贝尔涡旋混合器),全自动高速冷冻离心机(Thermo Fisher),Analyst V1.5.2 工作站(AB 公司)。甲醇(HPLC-Grade, fisher),屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏);甲酸、乙酸铵(HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC);Imatinib, Dasatinib(HPLC Grade, Toronto Research)。

表 1		质谱条件				
药物	母离子(m/z)	产物离子(m/z)	采集时间(msec)	去簇电压(v)	碰撞能量(v)	出口电压(v)
伊马替尼	494.5	394.3	150	81	35	11
达沙替尼	488.3	401.3	150	140	40	11

质谱条件:电喷雾电离源(ESI);离子极性:正离子模式;监测模式为 MRM;离子喷射电压:4 500V;温度:325℃;GS1:55;GS2:55;Curtain gas:25;碰撞气压力:Medium;用于定量分析的离子反应为:Imatinib m/z 494.5>394.3, Dasatinib m/z 488.3>401.3 各种质谱条件参数见表 1。

1.3 对照品贮备液的配制 精密称取对照品 Imatinib 2.5000 mg, Dasatinib 1.0000 mg, 分别置于两个小烧杯中,用适量甲醇溶解,分别转移至两个 10.0 ml 容量瓶中,用甲醇定容,得 0.25 mg/ml Imatinib 母液和 0.1 mg/ml Dasatinib 母液,作为贮备液。然后分别用甲醇-超纯水(50/50)依次稀释贮备液,得 Imatinib 对照品各浓度为 0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 和 75 μg/ml; Dasatinib 对照品各浓度为 10, 50, 100, 250, 500, 1 000 和 2 500 ng/ml, 作为 1~7 号系列标准工作液。

1.4 样品处理方法 精密量取样本血浆 100 μl 置于 1.5 ml Microtube 中,然后加入 2 mmol/L 乙酸铵-0.1 ml/dl 甲酸水溶液 100 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 再加入甲醇 800 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 150 μl 置于自动进样器。

1.5 标准曲线的制备 分别在 7 个 1.5 ml Microtube 中加入空白血浆 90 μl, 并加入含有 Imatinib 和 Dasatinib 各系列标准工作液 10 μl, 得 Imatinib 对照品各浓度为 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 和 7.5 μg/ml; Dasatinib 对照品各浓度为 1, 5, 10, 25, 50, 100 和 250 ng/ml。按“1.4”项下样品处理方法处理后进样测定,分别以 Imatinib 峰面积为(Y)对 Imatinib 浓度(X)和 Dasatinib 峰面积为(Y)对 Dasatinib 浓度(X)进行线性回归,得 Imatinib 和 Dasatinib 标准曲线。

1.6 回收率、精密度试验 分别在 3 个 1.5 ml Microtube 中加入空白血浆 90 μl, 并加入含有 Imatinib 和 Dasatinib 2, 3, 5 号标准工作液各 10

1.2 液相色谱及质谱条件 色谱条件:采用 Ultimate XB-C18 色谱柱(4.6×50 mm, 5 μm), 柱温 65℃;流速:0.8 ml/min;流动相:2 mmol/L 乙酸铵-0.1 ml/dl 甲酸水溶液(B)-0.1 ml/dl 甲酸甲醇溶液(A),进样量 5 μl,洗脱方式:梯度洗脱,其中 0.01~0.5 min, A 相浓度为 77.5%, ~1.0 min A 相浓度从 77.5%~25%, 保持 0.5 min, ~2.0 min A 相浓度从 25%~77.5%, 保持 1.0 min。

μl, 得 Imatinib 对照品各浓度为 0.25, 0.5, 2.5 μg/ml; Dasatinib 对照品各浓度为 5, 10, 50 ng/ml。按“1.4”项下样品处理方法处理后进样测定,各浓度日内重复测定 5 次,计算相对回收率及日内精密度,并连续测定 5 天,计算日间精密度。

1.7 稳定性试验 分别在 3 个 1.5 ml Microtube 中加入空白血浆 90 μl, 并加入含有 Imatinib 和 Dasatinib 2, 3, 5 号标准工作液各 10 μl, 得 Imatinib 对照品各浓度为 0.25, 0.5, 2.5 μg/ml; Dasatinib 对照品各浓度为 5, 10, 50 ng/ml。取一份样品按“1.4”项下样本处理方法处理后置于 4℃自动进样器中,于放置时间为 0, 12, 24, 72 h 分别测定各样品的浓度;其余样品于 4℃冰箱中放置 24, 48, 72 h 后取出放至室温,按“1.4”项下样品处理方法处理后进样测定,考察其稳定性。

1.8 临床应用 收集 2013 年 7 月~2013 年 10 月河北燕达医院服 Imatinib 和 Dasatinib 的 CML 患者血浆样本 83 份,标本采集时间为下次服药前,采集静脉血 3 ml, EDTA 抗凝。混匀,室温(20~25℃)下标本存放时间不超过 4 h, 当日进行 HPLC-MS/MS 法检测。

2 结果

2.1 色谱质谱行为

在“1.2”项下的色谱质谱条件下,测得 Imatinib, Dastinib 二级碎片离子质谱图,见图 1; Imatinib 和 Dastinib 质谱色谱图见图 2。由图 2 可见,血中没有物质干扰 Imatinib, Dastinib 的测定, Imatinib, Dastinib 的保留时间分别为 1.65 和 1.62 min, 各个峰型良好, 无杂质峰干扰。

2.2 标准曲线回归方程 以 Imatinib 峰面积为(Y)对 Imatinib 浓度(X)和 Dasatinib 峰面积为(Y)对 Dasatinib 浓度(X)进行线性回归,得 Imatinib 的回归方程:Y=5.6×10⁵X+5×10³ (R=0.999 8), 表明 Imatinib 在 0.05~7.5 μg/ml 范围内线性关系较好, 可用于定量, 其最低定量限为

0.01 μg/ml; Dasatinib 的回归方程: $Y = 211X + 66.6 (R = 0.999\ 6)$, 表明 Dasatinib 在 1~250 ng/

ml 范围内线性关系较好, 可用于定量, 标准曲线见图 3。

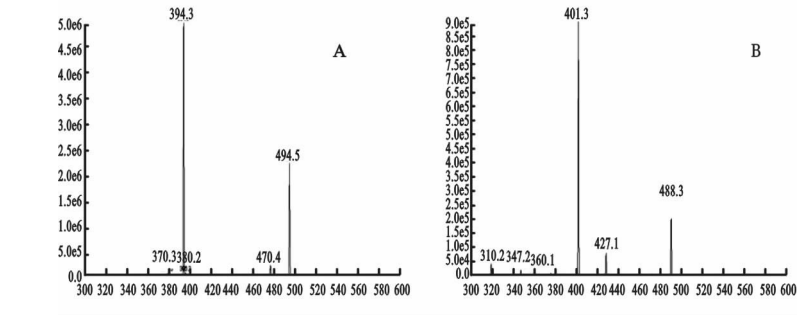


图 1 Imatinib(A)和 Dastinib(B)的二级扫描碎片离子图

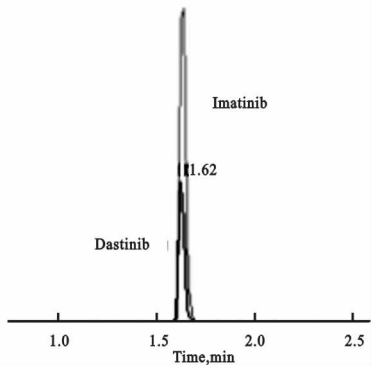


图 2 Imatinib 和 Dastinib 质谱色谱图

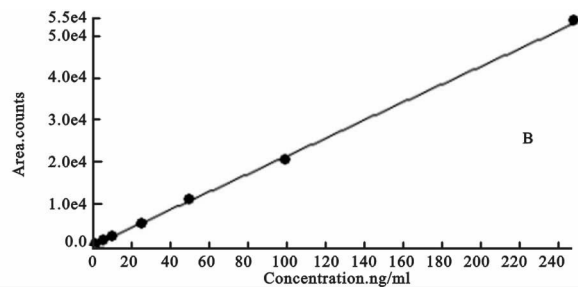
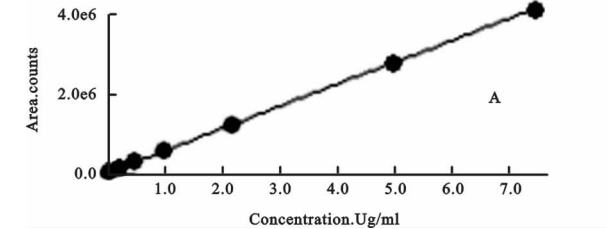


图 3 Imatinib(A)和 Dastinib(B)的标准曲线图

2.3 方法学评价结果 Imatinib 和 Dasatinib 的相对回收率和日内、日间精密度测定结果见表 2 和表 3。由表 2 和表 3 可知, Imatinib 和 Dasatinib 相对回收率在 96%~105% 之间, 日内及日间精密度 RSD 均小于 5%。

表 2 Imatinib 回收率和精密度试验结果 (n=5, $\bar{x} \pm s$)				
药物	浓度 (μg/ml)	相对回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
伊马替尼	0.25	97.56±1.52	1.45	2.05
	0.5	101.24±2.55	2.34	2.75
	2.5	100.35±1.85	1.97	3.31

表 3 Dasatinib 回收率和精密度试验结果 (n=5, $\bar{x} \pm s$)				
药物	浓度 (μg/ml)	相对回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
达沙替尼	5	99.56±2.52	1.15	1.25
	10	102.24±4.55	2.04	2.01
	50	103.35±2.85	3.17	4.12

2.4 稳定性考察结果 HT5SS 见表 4。

由表 4 可知, 在 4℃ 条件下, 血中 Imatinib 和 Dasatinib 放置 72 h 浓度稍微下降, 但无显著差异; 血样经过处理后, 在 4℃ 条件下, 放置 72 h Imatinib 和 Dasatinib 浓度基本保持不变。由此可以得出, 在此条件下测定血中 Imatinib 和 Dasatinib 浓度的稳定性良好, 能保证测定结果的准确性和重现性。

表 4 稳定性考察结果 (n=3, $\bar{x} \pm s$, 72 h)				
条 件	伊马替尼 (μg/ml)		达沙替尼 (ng/ml)	
	标准值	测定值	标准值	测定值
血浆保存温度 4℃	0.25	0.24±0.03	5	4.5±0.6
	0.5	0.47±0.05	10	9.8±0.5
	2.5	2.6±0.72	50	51±3
制备血浆保存温度 4℃	0.25	0.23±0.05	5	4.6±0.3
	0.5	0.45±0.66	10	10±1
	2.5	2.51±0.32	50	50±5

2.5 临床应用结果 进行 Imatinib 和 Dasatinib 血药浓度测定的 CML 患者样本 83 份, 其中 Imatinib 样本 31 例, Dasatinib 样本 52 例。样本血药浓度统计结果见表 5。由此可见, HPLC-MS/MS 法能满足临床对 Imatinib 和 Dasatinib 血药浓度监测的需求。

表 5 血药浓度结果表					
药物	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	C 平均值 (ng/ml)	C 中位数 (ng/ml)
伊马替尼	31	18/13	8~61	1 154	1 130
达沙替尼	52	25/27	7~60	13.9	7.6

3 讨论 本实验采用外标法, 通过蛋白沉淀法进行甲醇沉淀蛋白和释放 Imatinib 及 Dasatinib, 使其充分溶解于有机溶剂中。通过岛津 LC-20A 高

效液相色谱进行分离和富集 Imatinib 及 Dasatinib, 用 AB Sciex 4000 QTRAP 型质谱仪进行含量测定。由于 AB Sciex 4000 QTRAP 型质谱仪测定灵敏度和质量精度高, 用于 Imatinib 及 Dasatinib 血药浓度测定准确度高。

Imatinib 在体内外均可在细胞水平上抑制 BCR-Abl 酪氨酸激酶, 能选择性抑制 BCR-Abl 阳性细胞系细胞、Ph⁺ 的 CML 和 ALL 患者的新鲜细胞的增殖和诱导其凋亡^[5~8]。此外, Imatinib 还可抑制 PDGF 受体、干细胞因子(SCF)、c-Kit 受体的酪氨酸激酶, 从而抑制由 PDGF 和 SCF 介导的细胞行为和 GIST 细胞的增殖并诱导其凋亡。Imatinib 的平均绝对生物利用度为 98%, 其口服后, 约 95% 与血浆蛋白结合, 大部分与清蛋白结合, 少部分与 α 酸性糖蛋白结合, 红细胞内分布比率较低, 因此选择监测其在血浆中的药物浓度, 其血药浓度的变异系数波动在 40% ~ 60% 之间; Imatinib 是 CYP3A4 的底物, 又是 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 和 CYP2C19 的抑制剂, 其在体内主要循环代谢产物是 N-去甲基哌嗪衍生物, 具有一定活性; 消除半衰期为 18 h, 大约 20% 原药经粪便排泄^[6~10]。国内外关于 Imatinib 血浆谷浓度与临床疗效的相关性尚存在争议, 但多数研究认为 Imatinib 血浆谷浓度与 CML 患者疗效相关, 获得 CCyR 或 MMR 患者 Imatinib 血浆谷浓度水平明显高于未获得者, 提示一定范围内较高的血药浓度水平有助于提高 CCyR 和 MMR 率^[9~12]。CML 患者进行 Imatinib 血药浓度监测可有效评估治疗效果, 对于早期发现耐药及时更换治疗方案有一定参考价值, 对于部分患者的治疗有一定指导意义。

Dasatinib 口服可快速吸收, 在 0.5 ~ 3 h 内达到峰值浓度。在 25 ~ 120 mg/bid 的剂量范围内, 平均暴露的增加与剂量的增加呈正比, 其总体平均终末半衰期为 5 ~ 6 h^[3~8]。具有较大的表观分布容积, 可广泛分布于血管外, 与血浆蛋白结合率大约为 96%。Dasatinib 主要经 CYP3A4 代谢, 代谢产物基本无药理学活性, 是 CYP3A4 的一种较弱的时间依赖性抑制剂, 不能抑制 CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6 或 2E1^[5~10]。Dasatinib 的应用可显著提高 CML 患者的总体生存率和无事件生存率, 但仍有一部分患者疗效不佳或治疗失败^[7~12]。当患者疗效不佳时, 除考虑服药依从性、药物相互作用等因素外, 还应考虑标准剂量的 Dasatinib 是否为该患者的最佳治疗剂量, 则需要通过检测药物浓度来判断患者体内真实的 Dasatinib 浓度。

参考文献:

- [1] Agrawal M, Garg RJ, Cortes J, et al. Tyrosine kinase inhibitors; the first decade[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2010, 5(2): 70-80.
- [2] Le Coutre P, Schwarz M, Kim TD. New developments in tyrosine kinase inhibitor therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(6): 1771-1780.
- [3] Saglio G, Baccarani M. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: new horizons and an update[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2010, 10(3): 169-176.
- [4] Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(3): 469-471.
- [5] Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib[J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 18292-18302.
- [6] Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2010, 362(24): 2260-2270.
- [7] Cortes JE, Jones D, O'Brien S, et al. Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(3): 398-404.
- [8] Shah NP, Cortes JE, Schiffer CA, et al. Four-year follow-up of patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia (CP-CML) receiving 100 mg of dasatinib once daily[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15): 6512.
- [9] Masiello D, Gorospe G, Yang AS. The occurrence and management of fluid retention associated with TKI therapy in CML, with a focus on dasatinib[J]. J Hematol Oncol, 2009, 2(20): 46.
- [10] Atallah E, Durand JB, Kantarjian H, et al. Congestive heart failure is a rare event in patients receiving imatinib therapy[J]. Blood, 2007, 110(4): 1233-1237.
- [11] Breccia M, Cannella L, Frustaci A, et al. Cardiac events in imatinib mesylate-treated chronic myeloid leukemia patients: A single institution experience[J]. Leuk Res, 2008, 32(5): 835-836.
- [12] Gratapac MP, Martin V, Valera MC, et al. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo[J]. Blood, 2009, 114(9): 1884-1892.

收稿日期: 2015-07-31

修回日期: 2015-10-09