

# 高效液相色谱 - 串联质谱法测定血液病患者 血液甲泼尼龙浓度的应用

郭进艳, 孙文利, 刘红星, 王磊 (河北燕达陆道培医院检验医学科, 河北廊坊 065201)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱 - 串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定血液病患者血浆甲泼尼龙浓度, 并应用于指导临床合理用药。**方法** 以甲泼尼龙-d3 为内标, 甲醇沉淀血浆蛋白和萃取甲泼尼龙。月旭 Ultimate XB-C18 柱 [4.6mm × 50mm, 5 μm] 为色谱柱, 流动相为含 0.1%(v/v) 甲酸的甲醇溶液 (1 : 1 000) - 水溶液 [含 0.1% (v/v) 甲酸 + 2 mmol/L 乙酸铵], 流速 0.8 ml/min, 柱温 60℃, 进样量 5 μl。采用电喷雾离子源, 正离子模式下进行多反应监测, 同时监测甲泼尼龙质荷比 (m/z) 375.4 → 339.4 (定性离子), 甲泼尼龙 m/z 375.4 → 357.3 (定量离子), 甲泼尼龙-d3 m/z 378.2 → 360.3。以甲泼尼龙和甲泼尼龙-d3 峰面积比为定量依据, 计算血浆甲泼尼龙浓度, 并评价其性能。**结果** 甲泼尼龙在 10 ~ 1 000ng/ml 范围线性关系良好 ( $r^2 = 0.9967$ ), 定量下限为 10ng/ml; 日内、日间精密度实验结果相对标准差 (RSD) 均小于 15%; 提取回收率为 99.52% ~ 104.79%; 甲泼尼龙样品在经历 3 次反复冻融 (-20℃ ~ 室温) 循环条件下稳定, 处理后的样品在室温、4℃ 环境中放置 24h 均稳定 (RSD < 15%)。16 例患者甲泼尼龙血药浓度在 0 ~ 258 ng/ml 范围内。**结论** 该方法可准确、快速、简便地检测甲泼尼龙浓度, 适用于临床甲泼尼龙血药浓度检测。

**关键词:** 甲泼尼龙; 高效液相色谱 - 串联质谱; 治疗药物监测

**中图分类号:** R552; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 06-211-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.037

## Application of HPLC-MS/MS in the Determination of Methylprednisolone Concentration in Patients with Hematological Diseases

GUO Jinyan, SUN Wenli, LIU Hongxing, WANG Lei (Department of Laboratory Medicine, Hebei Yanda Ludaopei Hospital, Hebei Langfang 065201, China)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for determining the plasma concentration of methylprednisolone in patients with hematological diseases, and apply it to guide the clinical application. **Methods** Plasma samples were subjected to methanol-precipitated protein containing internal standard methylprednisolone-d3. The HPLC system was equipped with an Ultimate XB-C18 (4.6mm × 50mm, 5 μm particle size), maintained at 60℃, and 5 μl of the supernatant was injected. Mobile phases consisting of 0.1% (v/v) formic acid (1 : 1 000) and 2 mmol/L ammonium acetate in water (B) and 0.1% (v/v) formic acid (1 : 1 000) in methanol at a flow rate of 0.8 ml/min was used. The electrospray ionization (ESI) source was operating in positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) was applied for the detection of the components: Methylprednisolone mass-to-charge ratio (m/z) 375.4 → 339.4 (qualitative ions), methylprednisolone m/z 375.4 → 357.3 (quantitative ions), methylprednisolone-d3 m/z 378.2 → 360.3. The peak area ratio of methylprednisolone to methylprednisolone-d3 was used as the quantitative basis. The concentration of methylprednisolone in plasma was calculated and its performance was investigated. **Results** The linear range of methylprednisolone was 10~1 000ng/ml ( $r^2 = 0.9967$ ), and the lower limit of quantification was 10 ng/ml. The RSDs of intra-day and inter-day precision results were less than 15% and the relative recovery ranged from 99.52% ~ 104.79%. For methylprednisolone, the samples were stable at -20℃ after three repeated freeze-thaw cycles. The prepared samples were stable at room temperature and 4℃ for 24h (RSDs < 15%). The steady-state blood drug concentrations of methylprednisolone in 16 patients were in the ranges of 1 ~ 258 ng/ml. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method can accurately, rapidly and simply detect the concentration of methylprednisolone, and be suitable for clinical application.

**Keywords:** methylprednisolone; HPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring

甲泼尼龙 (methylprednisolone) 是一种人工合成的中效糖皮质激素, 可进入细胞合成酶蛋白发挥抗炎和免疫作用, 在异基因造血干细胞移植患者中常与吗替麦考酚酯、环孢素 A 及他克莫司等免疫抑

**基金项目:** 河北省卫生健康委医学科学研究课题 (编号: 20210319)。

**作者简介:** 郭进艳 (1995-), 女, 本科, 初级药师, 研究方向: 血药浓度监测及药学研究, E-mail: 1281216267@qq.com。

**通讯作者:** 王磊 (1984-), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 血药浓度监测及医院药学研究, E-mail: rosie1982@163.com。

制剂联用用于预防和治疗移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD) [1-5]。由于甲泼尼龙是细胞色素 P450 酶 (CYP) 的底物, 主要经细胞色素 P4503A4 酶 (CYP3A4) 代谢, 易与环孢素 A、他克莫司、三唑类抗真菌药及抗病毒药发生药物相互作用, 引起甲泼尼龙血药浓度升高或降低, 导致不良反应或疗效变化, 且有时易发生急性重度肝毒性 [6-11]。因此, 对联用甲泼尼龙预防或治疗 GVHD 患者进行甲泼尼龙血药浓度测定就显得尤为重要, 根据甲泼尼龙血药浓度测定结果调整甲泼尼龙剂量, 在保证疗效的同时可减少不良反应。目前甲泼尼龙浓度测定方法主要有液相色谱法 [12] 和液相色谱-串联质谱法 [13], 主要用于中药、保健品和食品等方面的甲泼尼龙含量测定, 存在前处理复杂, 检测耗时长等问题, 均未对临床患者甲泼尼龙血药浓度进行测定。故本文拟建立一种简便快速测定临床血液病患者甲泼尼龙血药浓度的高效液相色谱-串联质谱 (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 法, 为临床合理使用甲泼尼龙提供参考, 避免急性肝毒性等不良反应发生, 实现临床甲泼尼龙个体化用药。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2021 年 1 月 ~ 2022 年 12 月就诊于河北燕达陆道培医院服用过甲泼尼龙药物的血液病患者血浆样本 16 例, 剔除乳糜、溶血、凝血、血量过少的样本, 记录患者的一般人口学资料, 包括年龄、性别、身高、服药剂量、生化结果等, 该研究经河北燕达陆道培医院医学伦理委员会批准 [道培伦理审批 (2020) 第 39 号]。

1.2 仪器与试剂 岛津 LC-20A 液相色谱串联 AB Sciex 4000 QTRAP 型三重四级杆质谱仪 (美国 AB

SCIEX 公司), 旋涡混合器 (其林贝尔), 赛默飞小型台式离心机, 湘仪大型台式离心机。甲泼尼龙 (上海甄准生物科技有限公司, 批号: zzs-21-J028-A1, 纯度 >99%); 甲泼尼龙-d3 (Toronto Research Chemicals 公司, 批号: M325937, 纯度 >99%); 甲泼尼龙片 (规格: 4mg \* 30 片 / 盒, 生产企业: Pfizer Italia Srl); 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 (规格: 40mg, 国药集团容生制药有限公司); 色谱级甲酸, 分析级乙酸铵 (北京迈瑞达科技有限); 色谱级甲醇 (美国 Fisher 公司); 屈臣氏蒸馏水。

## 1.3 方法

### 1.3.1 质谱条件和液相色谱条件

1.3.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Ultimate XB-C18 柱 (4.6mm × 50mm, 5 μm); 流动相: 甲醇溶液 [含 0.1% (v/v) 甲酸, 1 : 1000]-水溶液 [含 0.1% 甲酸 (v/v) + 2mmol/L 乙酸铵], 流速: 0.8ml/min; 柱温 60℃; 梯度洗脱: 0.01 ~ 0.5min, B 为 35% ~ 75%; 0.5 ~ 1.0min, B 为 75% ~ 35%; 1.0 ~ 1.5min, B 为 35%; 1.5 ~ 2.0min, B 为 35% ~ 75%; 2.0 ~ 2.5min, B 为 75% ~ 35%; 2.5 ~ 3.0min, B 为 35%; 进样量 5 μl。

1.3.1.2 质谱条件: 质谱条件同文献 [14] 采用电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正离子模式下进行多反应监测; 离子源参数如下: 离子喷射电压 5 500v, 离子源温度 550℃, 源内气体 1 (GS1, N<sub>2</sub>): 55psi, 气体 2 (GS2, N<sub>2</sub>): 55psi; 气帘气: 25psi。同时监测甲泼尼龙质荷比 (mass-to-charge ratio) (m/z) 375.4 → 339.4 (定性离子), 甲泼尼龙 m/z 375.4 → 357.3 (定量离子); 甲泼尼龙-d3 m/z 378.2 → 360.3。质谱条件见表 1, 甲泼尼龙和甲泼尼龙-d3 碎片离子质谱图见图 1。

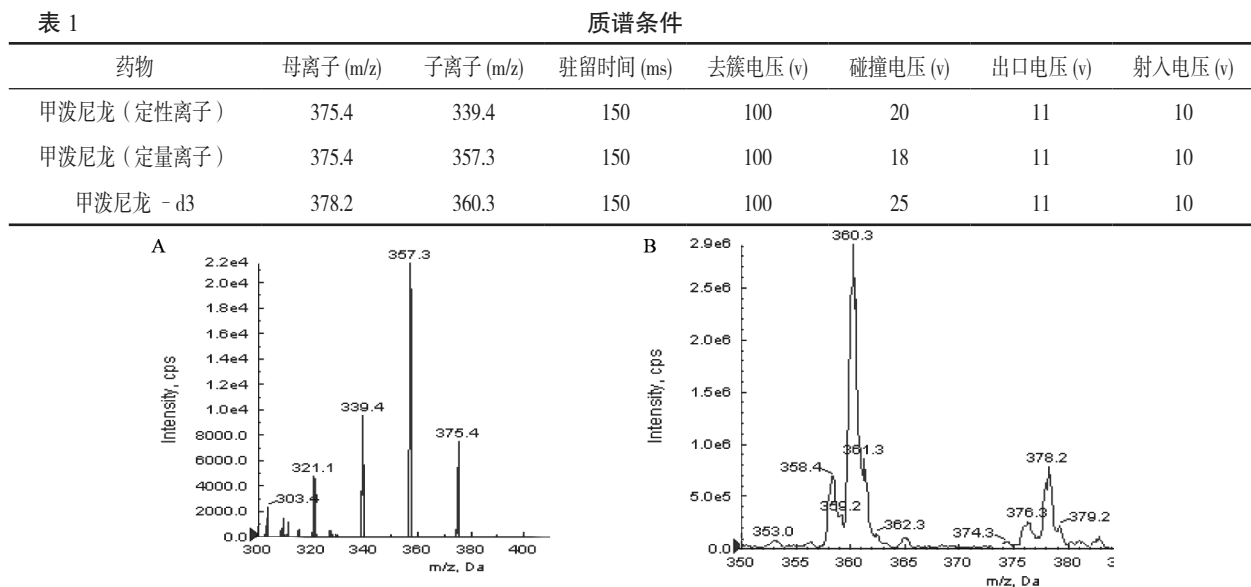


图 1 甲泼尼龙 (A) 和甲泼尼龙-d3 (B) 二级质谱图

### 1.3.2 溶液配制

1.3.2.1 储备液的配制：分别精密称取 5.000mg 甲泼尼龙标准品、1.000mg 甲泼尼龙-d3 标准品，分别用甲醇进行溶解稀释，转移至 10.0ml 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，充分混匀即得 0.5mg/ml 甲泼尼龙储备液和 0.1mg/ml 内标储备液。

1.3.2.2 内标溶液与标准曲线工作液的配制：取 1.3.2.1 配制的甲泼尼龙-d3 储备液，用甲醇稀释成浓度为 50ng/ml 甲泼尼龙-d3 内标溶液，用于沉淀血浆蛋白，作为样本前处理液；取 1.3.2.1 配制的甲泼尼龙储备液，用甲醇依次稀释成浓度为 10 000, 5 000, 2 500, 1 000, 500, 250 和 100ng/ml 甲泼尼龙系列标准曲线工作液。

1.3.2.3 质控工作液配制：取 1.3.2.1 配制的甲泼尼龙储备液，用甲醇依次稀释成浓度为 7 500, 1 500 和 300ng/ml 甲泼尼龙系列质控工作液。

1.3.2.4 标准曲线和质控血浆样品制备：取 10  $\mu$ l 系列标准曲线工作液（或系列质控工作液）置 1.5ml 离心管中，再平行加入 90  $\mu$ l 空白血浆，涡旋混匀，即得浓度为 1 000, 500, 250, 100, 50, 25 和 10ng/ml 的甲泼尼龙系列标准曲线血浆样本和浓度为 750, 150, 30 ng/ml 甲泼尼龙系列质控血浆样本。

1.3.3 血浆样品处理方法：取 100  $\mu$ l 血浆样本和 100  $\mu$ l 样本萃取液 [含 0.1%(v/v) 甲酸 2mmol/L 乙酸铵的水溶液] 于 1.5ml 离心管中，再加入样本释放剂（50ng/ml 甲泼尼龙-d3 内标溶液）300  $\mu$ l，充分涡旋混匀，离心 10min（转速 13 200 r/min），吸取 150  $\mu$ l 上清液于进样瓶中进行检测，进样量 5  $\mu$ l。

### 1.3.4 方法学验证<sup>[14-20]</sup>

1.3.4.1 专属性试验：分别取纯水、空白血浆样本（不含内标溶液）、空白血浆样本（加入特定浓度甲泼尼龙和内标溶液）、临床血液病患者服用甲泼尼龙药物后血浆样本，按“1.3.3”项进行处理，进样分析。比较四者色谱图，查看色谱峰保留时间，得出空白血浆中的内源性物质是否干扰甲泼尼龙和甲泼尼龙-d3 的检测。

1.3.4.2 分析物和内标的残留验证：取最高浓度 1 000ng/ml 的甲泼尼龙标准曲线血浆样品和空白屈臣氏蒸馏水样品，按照 1.3.3 项进行样品处理，按照最高浓度样品到空白样品的顺序依次进样检测，通过分析空白基来评估甲泼尼龙和内标的残留。空白基质的甲泼尼龙在保留时间处的峰面积响应值小于定量下限峰面积的 20%，内标峰面积响应值小于定量下限峰面积的 5%。

1.3.4.3 标准曲线和定量下限试验：取 10  $\mu$ l 浓度为 10 000, 5 000, 2 500, 1 000, 500, 250 和 100ng/ml 的甲泼尼龙系列标准曲线溶液分别加入

1.5ml 离心管中，再平行加入 90  $\mu$ l 空白血浆，按照 1.3.3 项进行处理，进样分析。以甲泼尼龙与内标甲泼尼龙-d3 峰面积比值为纵坐标（Y），以血浆甲泼尼龙浓度为横坐标（X），采用加权（ $W=1/x^2$ ）最小二乘法进行回归和线性拟合。连续测三天，每天 1 条校准曲线。通过评价 3 条标准曲线，计算线性回归相关系数  $r^2$ （要求  $r^2 \geq 0.9900$ ）。以信噪比（ $S/N$ ）=10 计算定量下限。

1.3.4.4 基质效应评价：通过评价甲泼尼龙（甲泼尼龙-d3）在血浆基质和无血浆基质中的信号值来评价基质效应。分别取空白血浆、50%(v/v) 甲醇水（50 : 50），制备高、中、低（750, 150 和 30ng/ml）三种浓度的甲泼尼龙血浆质控样品、纯溶剂质控样品各 6 份，按 1.3.3 项进行处理，通过血浆中目标化合物（内标）的信号强度与纯溶剂中目标化合物（内标）的信号强度来计算内标归一化基质因子，进而评价基质效应，要求内标归一化基质因子在 85% ~ 115% 之间，计算公式参照中国药典<sup>[19]</sup>。

1.3.4.5 精密度与准确度试验：取空白血浆制备高、中、低（750, 150, 30ng/ml）三种浓度甲泼尼龙血浆质控样品（QC）各 6 份，按照 1.3.3 项进行处理，每天一条标准曲线，连续测定三天，计算质控样品浓度，并根据质控样品的测定浓度计算日内和日间精密度和准确度，要求变异系数（ $CV$ ）<15%。

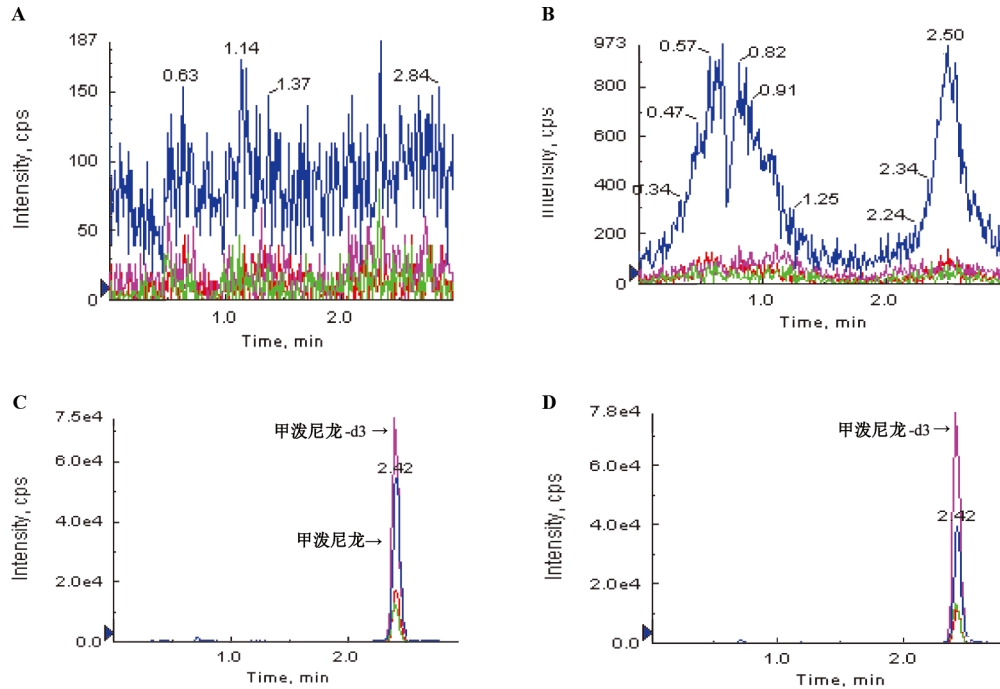
1.3.4.6 回收率试验：取空白血浆，制备高、中、低（750, 150, 30ng/ml）三种浓度的甲泼尼龙 QC 血浆样品各 6 份，按 1.3.3 项进行处理，分析得峰面积  $A_1$ （甲泼尼龙峰面积 / 内标甲泼尼龙-d3 峰面积）；取空白血浆加入甲醇进行蛋白沉淀，高速离心得血浆上清液，用血浆上清液制备高、中、低（750, 150, 30 ng/ml）3 浓度甲泼尼龙血浆上清 QC 样品各 6 份，按 1.3.3 项进行处理，分析得峰面积  $A_2$ （甲泼尼龙峰面积 / 内标甲泼尼龙-d3 峰面积），根据  $A_1, A_2$  计算回收率，回收率 =  $A_1/A_2$ 。

1.3.4.7 稳定性试验：取空白血浆，制备高、中、低（750, 150, 30ng/ml）三种浓度的甲泼尼龙 QC 血浆样品若干份，分别考察不同条件下甲泼尼龙的稳定性，每种试验条件下高、中、低浓度 QC 样本各 6 份，按 1.3.3 项进行处理，考察血浆样品在 -20℃ 到室温循环条件下反复冻融三次的稳定性，考察处理后的样品在室温、4 ~ 8℃ 环境中放置 24h 的稳定性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较采用独立样本  $t$  检验，多组间比较采用单因素方差分析；计数资料以  $n$ （%）表示，采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 专属性结果 由1.3.4.1可得色谱图,见图2。甲泼尼龙与甲泼尼龙-d3保留时间均为2.42min,



A. 空白纯水; B. 空白血浆; C. 空白血浆+甲泼尼龙+甲泼尼龙-d3; D. 患者血浆+甲泼尼龙-d3。

图2 甲泼尼龙和甲泼尼龙-d3 色谱图

2.2 残留验证 见表2。高浓度样品后甲泼尼龙连续两个空白样品的残留分别为15.31%和3.78%,小于分析物定量下限20%;高浓度样品后内标甲泼

二者色谱行为一致,说明甲泼尼龙-d3作为甲泼尼龙的內标较为合适,表明血浆中内源性物质不干扰甲泼尼龙及內标甲泼尼龙-d3测定,专属性好。

表2 甲泼尼龙和甲泼尼龙 d3 残留验证结果

样品类型	峰面积	甲泼尼龙		甲泼尼龙-d3		残留 (%)
		最低点峰面积	残留 (%)	峰面积	最低点峰面积	
高浓度样本	333 000	-	-	235 000	-	-
空白样品1	677	4 420	15.31	238	277 000	0.09
空白样品2	167		3.78	132		0.05

2.3 标准曲线与定量下限结果 由1.3.4.3得,连续检测三天的标准曲线为: $Y=0.001\ 55X+0.000\ 308$  ( $r^2=0.997\ 3$ ), $Y=0.001\ 61X+0.002\ 08$  ( $r^2=0.997\ 5$ ), $Y=0.001\ 48X+0.006\ 35$  ( $r^2=0.995\ 4$ ),采用內标法对三天的检测结果进行线性拟合,得方程 $Y=0.001\ 55X+0.002\ 42$  ( $r^2=0.996\ 7$ ),且标准曲线各质量浓度值与理论值的偏差均在 $\pm 15\%$ 内,表明甲泼尼龙在 $10\sim 1\ 000\text{ng/ml}$ 内线性关系良好;定量下限为 $10\text{ng/ml}$ ,其准确度为 $94.55\%$ ,RSD为 $7.68\%$ ,准确度和精密度均符合中国药典<sup>[19]</sup>要求。

2.4 基质效应结果 由1.3.4.4计算得,高、中、低三种浓度的甲泼尼龙在有血浆和无血浆基质中不同加标浓度的內标归一化基质因子分别为:99%,106%和105%,CV分别为4.25%,3.17%和2.84%,

低于15%,符合中国药典<sup>[19]</sup>规定。

2.5 精密度与准确度结果 见表3。由1.3.4.5得,甲泼尼龙日内RSD为 $3.48\%\sim 5.53\%$ ,日间RSD为 $4.88\%\sim 6.93\%$ ,二者均小于 $15\%$ <sup>[19]</sup>。表明精密度好,数据较集中。

表3 甲泼尼龙的日内、日间精密度和准确度测定结果 [ $\bar{x}\pm s$ , ng/ml, %]

理论值 (ng/ml)	日内 (n=6)			日间 (n=3)		
	测量值	RSD	RE	测量值	RSD	RE
30	29.77 $\pm$ 1.65	5.53	-0.78	29.77 $\pm$ 2.06	6.93	-0.78
150	159.39 $\pm$ 7.48	4.66	6.26	159.39 $\pm$ 10.34	6.49	6.26
750	723.06 $\pm$ 25.32	3.48	-3.59	723.06 $\pm$ 35.25	4.88	-3.59

2.6 回收率试验结果 见表4。由1.3.4.6得,通过计算 $A_1/A_2$ 比值,得回收率为 $99.52\%\sim$

104.79%，位于85%~115%之间，表明回收率较高，准确度好<sup>[19]</sup>。

表4 甲泼尼龙回收率测定结果 (n=6)

类别	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> (30ng/ml)		A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> (150ng/ml)		A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> (750ng/ml)	
	血浆加标	血浆上清液加标	血浆加标	血浆上清液加标	血浆加标	血浆上清液加标
平均值	0.05	0.05	0.24	0.24	1.15	1.10
s	0.002	0.002	0.006	0.005	0.018	0.043
RSD (%)	3.99	3.48	2.41	1.90	1.56	3.97
回收率 (%)	102.29		99.52		104.79	

2.7 稳定性试验结果 见表5。由1.3.4.7得，在相应考察的稳定条件下，对结果数据进行单因素方差分析，甲泼尼龙稳定性数据RSD在0.99%~6.17%，

小于<15%<sup>[19]</sup>。表明甲泼尼龙样品较为稳定，在血中稳定性好，可进行临床常规血药浓度检测。

表5 甲泼尼龙稳定性结果 [n=3,  $\bar{x} \pm s$ , ng/ml, %]

理论浓度 (ng/ml)	室温放置24h		冰箱4℃放置24h		24h内冻融3次	
	测得浓度	RSD	测得浓度	RSD	测得浓度	RSD
30	28.40 ± 1.75	6.17	30.93 ± 1.68	5.43	28.97 ± 0.59	2.02
150	155.00 ± 2.00	1.29	154.33 ± 6.51	4.22	154.67 ± 1.53	0.99
750	692.00 ± 12.53	1.81	697.00 ± 12.77	1.83	711.33 ± 15.18	2.13

2.8 临床应用 应用上述HPLC-MS/MS法对16例河北燕达陆道培医院血液病患者进行甲泼尼龙浓度检测，其中9例血液病患者口服甲泼尼龙预防，7例患者静注甲泼尼龙治疗GVHD。见表6。患者给予同等剂量甲泼尼龙，体内甲泼尼龙血药浓度存在

较大差异，且甲泼尼龙浓度与给药剂量之间呈非线性关系，结合病历资料分析发现甲泼尼龙与环孢素或三唑类药物联用时易导致患者ALT升高(7/16)，提示当甲泼尼龙与CYP3A4抑制剂联用时易发生肝毒性。

表6 血液病患者血浆中甲泼尼龙浓度结果 (n=16)

患者编号	性别/年龄 (岁)	体重/身高 (kg/cm)	日剂量 (mg)	甲泼尼龙浓度 (ng/ml)	ALT (U/L)	AST (U/L)	UA (mmol/L)	UREA (mmol/L)	CREA (μmol/L)
1	女/38	35/150	12 po	258	41 ↑	28	254	6.4	67
2	男/39	54/166	8 po	11.9	65 ↑	32	453 ↑	0.03 ↑	73
3	女/16	17.1/115	7 po	3.12	22	21	108 ↓	3.64	23 ↓
4	男/5	31.8/120	5 po	<0.1	21	15	171	6.46	40 ↓
5	男/6	18.1/123	4 po	43.6	12	25	116 ↓	4.02	29 ↓
6	男/9	20.9/126	4 po	14.7	13	18	162	7.54	29 ↓
7	女/42	50.5/153	2 po	1.07	100 ↑	53 ↑	257	5.22	60
8	男/42	60/165	1 po	1.93	39 ↑	28	263	3.67	73
9	女/58	35.15/145	1 po	0.369	14	22	332	5.77	52
10	男/16	50/164	30 iv	<0.1	6	6	96 ↓	4.69	53
11	女/38	52.4/162	25 iv	0.237	16	9	88 ↓	2.77 ↓	42 ↓
12	女/38	52.4/162	25 iv	54	13	8	72 ↓	1.55 ↓	45 ↓
13	男/8	23.2/130	25 iv	1.99	44 ↑	23	107 ↓	2.84	28 ↓
14	女/52	78.9/159	20 iv	25.2	61 ↑	19	259	8.07 ↑	58
15	女/67	60/166	20 iv	<0.1	14	23	232	12.17 ↑	45 ↓
16	男/11	29.6/137	13 iv	35.2	36 ↑	28	168	4.17	30 ↓

注：↑表示患者生化值高于正常值，↓表示患者生化值低于正常值；Po表示口服给药，iv表示静脉注射给药。

### 3 讨论

治疗药物监测能测量特定药物在患者血液中含量, 确保适当的药物暴露和限制剂量相关毒性, 从而实现个体化给药。近年随着方法学不断进展, HPLC-MS/MS 技术作为更加灵敏、特异、高效的浓度测定方法, 在医学检测领域被广泛应用, 如维生素 D 和体内类固醇激素检测、新生儿遗传代谢病筛查、药物中毒与药物滥用分析以及治疗药物监测等。2019 年治疗药物监测工作规范专家共识指出从药物專屬性上推荐采用 HPLC-MS/MS 法测定生物样本中药物浓度。以往 HU 和 SRIDHAR 等<sup>[21-22]</sup>人采用固相萃取和液相萃取法进行甲泼尼龙浓度检测, 存在样本处理过程复杂、成本高、检测耗时长等特点; 且两者均选用结构类似物作为内标, 其色谱行为存在差异, 不能很好地减小基质效应及仪器带来的干扰。亦有研究<sup>[12-13, 23-24]</sup>采用色谱法检测人或大鼠血浆中甲泼尼龙浓度, 以外标法或非同位素内标法进行定量, 存在检测时间长, 内标选择不合适等问题, 影响临床血液样本甲泼尼龙浓度检测。本研究采用同位素甲泼尼龙-d<sub>3</sub> 定量, 从离子监测、色谱柱、流动相组成、样本前处理等方面对质谱检测条件进行优化。首先, 对甲泼尼龙进行多反应离子监测, 通过信号响应值确定锥孔电压、碰撞能量及子离子, 选择响应强度高, 稳定性好的 m/z 375.4 ~ 357.3 作为甲泼尼龙定量离子, 而 m/z 375.4 ~ 339.4 作为甲泼尼龙定性离子。后通过考察不同比例甲酸、乙酸铵的流动相体系及选择梯度洗脱和等度洗脱时的实验结果, 确定 0.1%(v/v) 甲酸甲醇溶液 (1 : 1 000) 作为有机相, 0.1%(v/v) 甲酸+2mmol/L 乙酸铵水溶液作为水相, 进行梯度洗脱时, 甲泼尼龙和甲泼尼龙-d<sub>3</sub> 出峰时间为 2.42min, 峰型较好, 保留时间较适宜, 总检测时间 3min。亦对甲醇和乙腈两种溶剂萃取甲泼尼龙及沉淀血浆蛋白效果进行比较, 二者对甲泼尼龙萃取效果和对血浆蛋白沉淀效果无明显差异, 相同质谱条件下甲泼尼龙峰形和出峰时间及信号响应无明显差异, 综合选择性价比更高的甲醇作为样本前处理液。与以往研究相比, 本研究选择同位素内标 HPLC-MS/MS 法对血液病患者甲泼尼龙血样进行甲泼尼龙浓度测定, 简化了样本前处理过程, 采用甲醇萃取甲泼尼龙和沉淀血浆蛋白, 有效地降低基质效应, 缩短检测时间, 结果准确和稳定, 提高了甲泼尼龙浓度检测效率。

综上所述, 本文建立的 HPLC-MS/MS 法适合血液病患者血浆甲泼尼龙浓度检测, 该方法具有分析时间短、特异度强、准确度高、稳定性好、样本前处理简单、样本用量少等优点, 适用于临床大批

样本检测。同时, 本研究也存在临床数据较少, 对不同血液疾病患者服用甲泼尼龙后血药浓度与临床疗效和副作用的相关性尚需进一步研究等不足, 后续会就此开展进一步研究。

### 参考文献:

- [1] KAIDA K, IKEGAME K, INOUE T, et al. Peritransplantation glucocorticoid haploidentical stem cell transplantation is a promising strategy for AML patients with high leukemic burden: comparison with transplantations using other donor types [J]. *Transplantation and Cellular Therapy*, 2023, 29(4):273.e1-273.e9.
- [2] YANG Jingjing, PENG Bo, WANG Lu, et al. Elevated REG3  $\alpha$  predicts refractory aGVHD in patients who received steroids-ruxolitinib as first-line therapy[J]. *Annals of Hematology*, 2022, 101(3): 621-630.
- [3] HOU Cheng, DOU Liping, JIA Mingyu, et al. Ruxolitinib combined with corticosteroids as first-line therapy for acute graft-versus-host disease in haploidentical peripheral blood stem cell transplantation recipients[J]. *Transplantation and Cellular Therapy*, 2021, 27(1): 75.e1-75.e10.
- [4] 黄慧娟, 刘丹, 吴源兵, 等. 供者 CD7 CAR-T 细胞治疗异基因造血干细胞移植后急性 T 淋巴细胞白血病复发 1 例 [J]. *中华血液学杂志*, 2023, 44(1): 79. HUANG Huijuan, LIU Dan, WU Yuanbing, et al. CD7 CAR-T cells treat T-ALL relapsed after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a case report[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2023, 44(1): 79.
- [5] 许慧敏. 人脐带间充质干细胞治疗难治性急性移植抗宿主病的临床研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021. XU Huimin. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the treatment of refractory acute graft-versus-host disease: a clinical study[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021.
- [6] AYYAR V S, DUBOIS D C, NAKAMURA T, et al. Modeling corticosteroid pharmacokinetics and pharmacodynamics, part II: sex differences in methylprednisolone pharmacokinetics and corticosterone suppression[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019, 370(2): 327-336.
- [7] POOLA N, DUE B, WRIGHT D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of repository corticotropin injection compared with synthetic ACTH1-24 depot and methylprednisolone in healthy subjects [J]. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 2022, 11(4): 502-515.
- [8] SUETSUGU K, MURAKI S, FUKUMOTO J, et al. Effects of letermovir and/or methylprednisolone coadministration on voriconazole pharmacokinetics in hematopoietic stem cell transplantation: a population pharmacokinetic study[J]. *Drugs in R&D*, 2021, 21(4): 419-429.
- [9] ROTONDO E, GRAZIOSI A, DI STEFANO V, et al. Methylprednisolone-induced hepatotoxicity in a

- 16-year-old girl with multiple sclerosis[J]. *BMJ Case Reports*, 2018, 11(1): e226687.
- [10] KIMURA H, TAKEDA A, KIKUKAWA T, et al. Liver injury after methylprednisolone pulse therapy in multiple sclerosis is usually due to idiosyncratic drug-induced toxicity rather than autoimmune hepatitis[J]. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2020, 42: 102065.
- [11] VAN SAET A, ZEILMAKER-ROEST G A, VEEN K M, et al. Methylprednisolone plasma concentrations during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in pediatric patients[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021, 8: 640543.
- [12] 张丽藏, 张霞, 刘剑, 等. 超高效液相色谱法测定激素性股骨头坏死患者削减中甲泼尼龙质量浓度[J]. *中国药业*, 2021, 30(16): 65-67.  
ZHANG Licang, ZHANG Xia, LIU Jian, et al. Determination of the plasma concentration of methylprednisolone in patients with steroid-induced femoral head necrosis by UPLC [J]. *China Pharmaceuticals*, 2021, 30(16): 65-67.
- [13] 吴凡, 刘继华, 陈祖芬. 高效液相色谱法及超高效液相色谱-质谱联用法在多种肾上腺皮质激素检测中的应用价值[J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14(11): 166-167.  
WU Fan, LIU Jihua, CHEN Zufen. Application value of HPLC and ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry in the detection of multiple adrenal corticosteroids[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2021, 14(11): 166-167.
- [14] 位宁, 郭进艳, 孙文利, 等. HPLC-MS/MS法测定血液病患者血浆中伊布替尼血药浓度的方法学研究及临床应用[J]. *中国合理用药探索*, 2021, 18(10): 89-95.  
WEI Ning, GUO Jinyan, SUN Wenli, et al. Methodological study and clinical application on the determination of the plasma concentration of ibuprofen in plasma of patients with hematological diseases by HPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Rational Drug Use*, 2021, 18(10): 89-95.
- [15] 王磊, 刘瑞, 孙文利, 等. HPLC-MS/MS法在检测慢性粒细胞白血病患者帕纳替尼血药浓度中的应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(2): 39-42, 52.  
WANG Lei, LIU Rui, SUN Wenli, et al. Application of HPLC-MS/MS in the detection of blood concentration of ponatinib in patients with chronic myelogenous leukemia[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(2): 39-42, 52.
- [16] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(10): 770-779.  
Chinese Society of Laboratory Medicine, Chinese Medical Association, National Health and Family Planning Commission. Clinical application recommendations for HPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2017, 40(10): 770-779.
- [17] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会, 曹正, 李水军, 等. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. *检验医学*, 2019, 34(3): 189-196.  
Clinical Mass Spectrometry Committee, Chinese Medical Doctor Association of Laboratory Medicine, CAO Zheng, LI Shuijun, et al. Consensus of method development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry in clinical laboratories[J]. *Laboratory Medicine*, 2019, 34(3): 189-196.
- [18] 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会. 治疗药物监测工作规范专家共识(2019版)[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2019, 19(8): 897-898, 902.  
Division of Therapeutic Drug Monitoring, Chinese Pharmacological Society. The expert consensus on the standards of therapeutic drug monitoring (2019 Edition) [J]. *Evaluation and Analysis of Drug-use in Hospitals of China*, 2019, 19(8): 897-898, 902.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.  
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China - Part IV [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [20] 王磊, 代玉超, 李梦, 等. 测定血液病患者血浆 Venetoclax 浓度的 HPLC-MS/MS 方法[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(3): 413-417.  
WANG Lei, DAI Yuchao, LI Meng, et al. HPLC-MS/MS method for the determination of plasma Venetoclax concentration in patients with hematological diseases[J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*, 2021, 13(3): 413-417.
- [21] HU Xingjiang, ZHENG Yunliang, WU Guolan, et al. An economical online solid-phase extraction LC-MS/MS method for quantifying methylprednisolone[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2015, 53(6): 1013-1019.
- [22] SRIDHAR S, MERCY L, LAL P, et al. A novel LC-MS/MS assay for methylprednisolone in human plasma and its pharmacokinetic application[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 11(3): 459-468.
- [23] 楼英彪, 陈菲, 王建美. 反相高效液相色谱法测定大鼠血清中的甲泼尼龙及琥珀酸甲泼尼龙的浓度[J]. *浙江实用医学*, 2017, 22(5): 313-314, 321.  
LOU Yingbiao, CHEN Fei, WANG Jianmei. Determination of methylprednisolone and methylprednisone succinate concentrations in rat serum by RP-HPLC[J]. *Zhejiang Practical Medicine*, 2017, 22(5): 313-314, 321.
- [24] 杨梅. 超高效液相色谱法测定注射用甲泼尼龙琥珀酸钠含量的不确定度评定[J]. *今日药学*, 2019(3): 182-185.  
YANG Mei. Uncertainty assessment for the assay determination of methylprednisolone sodium succinate for injection by UPLC[J]. *Pharmacy Today*, 2019(3): 182-185.

收稿日期: 2023-11-30

修回日期: 2024-04-15