

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

王磊¹, 刘瑞¹, 孙文利¹, 刘红星^{1,2,3}

(1. 河北燕达陆道培医院病理和医学检验科, 河北 廊坊 065201; 2. 北京陆道培血液病研究院, 北京 100176; 3. 北京陆道培医院病理和医学检验科, 北京 100176)

摘要: 目的 建立测定慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)患者血浆帕纳替尼浓度的高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS), 并应用于帕纳替尼血药浓度日常监测, 为帕纳替尼合理使用提供实验室依据。方法 采用含内标(帕纳替尼-d8)的甲醇对患者血浆进行沉淀蛋白处理。色谱柱为 Ultimate XB-C18, 柱温 60℃, 流动相为甲醇相(0.1% 甲酸)和水相(0.1% 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵), 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, 同时监测帕纳替尼 m/z 533.1>260.1 和帕纳替尼-d8 m/z 541.2>260.1。采用内标法定量, 以帕纳替尼和帕纳替尼-d8 峰面积比为定量依据, 计算血浆帕纳替尼浓度, 并分别对其线性、专属性、精密度、准确度及稳定性进行考察。结果 帕纳替尼浓度在(1~250) ng/ml 范围内与峰面积线性关系良好, $Y = 0.0193X + 0.0284$ ($r = 0.9991$)。专属性较好, 血浆中的内源性物质不干扰帕纳替尼及其内标的测定; 日内及日间 RSD 均小于 5%; 相对回收率为 100.91%~105.18%; 室温放置稳定性及冻融稳定性 RSD 均小于 5%。结论 该文建立的 HPLC-MS/MS 法, 前处理简单, 特异度及灵敏度高, 能准确、快速地检测血浆帕纳替尼浓度, 适合慢性粒细胞白血病患者帕纳替尼血药浓度的日常监测。**关键词:** 帕纳替尼; 高效液相色谱-串联质谱法; 慢性粒细胞性白血病; 治疗药物监测
中图分类号: R557.3; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)02-039-05
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.02.012

Application of HPLC-MS/MS in the Detection of Blood Concentration of Ponatinib in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia

WANG Lei¹, LIU Rui¹, SUN Wen-li¹, LIU Hong-xing^{1,2,3}

(1. Department of Pathology & Medical Clinical Laboratory, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital Hebei Langfang 065201, China; 2. Beijing Lu Daopei Institute of Hematology, Beijing 100176, China; 3. Department of Pathology & Medical Clinical Laboratory, Beijing Lu Daopei Hospital, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective To develop a HPLC-MS/MS method for determination of Ponatinib in CML patient, and make it used in clinic trial providing a laboratory evidence for clinical rational use of Ponatinib. **Methods** Patients plasma protein was precipitated by methanol containing internal standard (ponatinib-d8). 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% formic acid) and methanol (containing 0.1% formic acid). The way of eluting was gradient, and electrospray ion trap positive ion mode and MRM scan were used to simultaneously monitor palatinib m/z 533.1>260.1 and Palatinib-d8 m/z 541.2>260.1. The internal standard method was used for quantitative analysis. Ponatiniband Ponatinib-d8 peak area ratio were used to calculate the plasma Ponatinib concentration and the performance verification(linearity, specificity, precision, accuracy and stability) was also investigated. **Results** The standard curve of Ponatinib was linear over the range of 1 ~ 250ng/ml, $Y = 0.0193X + 0.0284$ ($r = 0.9991$). The endogenous substances in plasma did not interfere with the determination of Ponatinib and Ponatinib-d8. The average recovery was among the range of 100.91%~105.18%, and RSD of intra-and inter-day validation were less than 5%. RSD of room temperature stability and freeze-thaw stability were less than 5%. **Conclusion** This HPLC-MS/MS method had the advantages of simple pretreatment, high specificity and sensitivity, and could accurately and quickly detect the concentration of plasma Ponatinib, which was suitable for daily monitoring of plasma Ponatinib concentration in patients with chronic myelogenous leukemia.

Keywords: Ponatinib; HPLC-MS/MS; chronic myelogenous leukemia (CML); therapeutic drug monitoring (TDM)

作者简介: 王磊(1984-), 男, 硕士, 助理研究员, 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, 医学硕士, 副研究员, 主要从事检验医学研究工作。

慢性粒细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 是一种克隆性多能造血干细胞增生恶性疾病, 在国内的发病率约为 0.36/10 000, 多发于中年人。费城染色体异常为该病的特征性遗传学标志, BCR-ABL 融合基因是致病的分子基础^[1-4]。作用于 BCR-ABL 靶向的酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI) 是 CML 患者临床治疗的首选药物^[4-6], 帕纳替尼 (Ponatinib) 作为第三代多靶点 TKI, 主要用于治疗携带有 T315I 突变阳性成人 CML 或者携带有 T315I 突变阳性的费城染色体阳性急性淋巴细胞性白血病 (Ph+ALL)^[7-8], 但存在个体间药物代谢动力学差异^[4,7-9], 且由于患者长时间服药, 存在依从性、耐药性、药物间相互作用等因素, 标准剂量未必适用于每个患者, 为实现 Ponatinib 治疗效益最大化, 避免由于耐药或剂量不足而耽误治疗, 则需要通过检测 Ponatinib 血药浓度来进一步规范治疗, 达到较好的治疗效果。目前, 市场上还没有 Ponatinib 免疫法检测试剂盒, 且无成熟的色谱质谱检测方法, 因此, 建立一种适合血液病患者 Ponatinib 的血药浓度检测方法对临床及实验室就显得尤为重要^[4,7-9]。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 Jasper 高效液相色谱系统 (Sciex 公司), 4500MD 三重四级杆质谱检测器 (Sciex 公司), Analy V1.6.3 (Sciex 公司), VORTEX-2 GENIE (Scientific industries), LEGEND MICRO

21R (Thermo)。甲醇 (HPLC-Grade, fisher), 屈臣氏蒸馏水 (广州屈臣氏), 甲酸 (HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC), 乙酸铵 (HPLC Grade, MREDA TECHNOLOGY INC), Ponatinib (SHANGHAI ZZBIO CO, LTD), Ponatinib-d8 (SHANGHAI ZZBIO CO, LTD), Ponatinib 质控品 (北京豪思生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 液相色谱及质谱条件

1.2.1.1 色谱条件: 采用 Ultimate XB-C18 色谱柱 (4.6 × 50 mm, 5 μm), 柱温 60℃; 流速: 0.8 ml/min; 流动相: 2 mmol/L 乙酸铵 -0.1% 甲酸水溶液 (B)-0.1% 甲酸甲醇溶液 (A), 进样量 3 μl, 洗脱方式: 梯度洗脱, 0.01 ~ 0.5 min, A 相浓度为 60%~95%, ~1.5min A 相浓度 95%, 保持 1.0 min, ~2.0 min A 相浓度从 95%~60%, ~3.0 min A 相浓度 60%, 保持 1.0 min。

1.2.1.2 质谱条件: 见表 1。电喷雾离子源 (ESI); 以多重反应监测方式 (MRM) 进行正离子检测; 离子喷射电压 (IS): 4 500V; 离子源温度 (TEM): 450℃; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力: 55; 气体 2 (GS2, N₂) 压力: 55; Curtain gas: 25; 碰撞气压力: Medium; 用于定量分析的离子反应为: Ponatinib m/z 533.1 > 260.1, Ponatinib-d8 m/z 541.2 > 260.1。Ponatinib 和 Ponatinib-d8 的碎片离子质谱图见图 1。

表 1 质谱条件

药物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (msec)	去簇电压 (v)	碰撞电压 (v)	出口电压 (v)	射入电压 (v)
Ponatinib	533.1	260.1	100	100	31	11	10
Ponatinib-d8	541.2	260.1	100	100	31	11	10

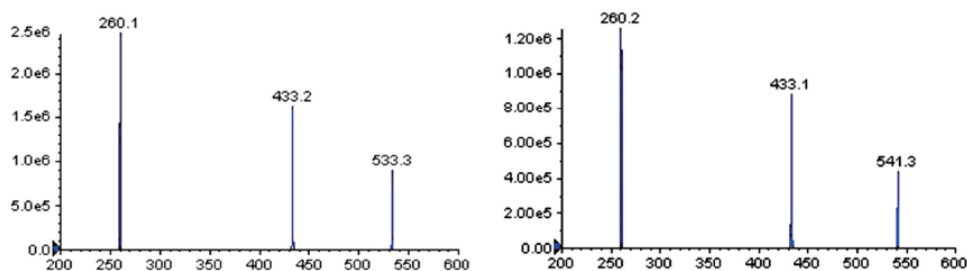


图 1 帕纳替尼 (A) 和帕纳替尼-d8 (B) 的二级质谱图

1.2.2 溶液配制: Ponatinib 标准液的配制: 分别用适量甲醇水 (50 : 50) 溶解标准品 Ponatinib 1.0 mg 和 Ponatinib-d8 1.0 mg, 转移至不同的 10.0 ml 容量瓶中, 用甲醇定容, 混匀, 得 100 μg/ml Ponatinib 和 100 μg/ml Ponatinib-d8 母液, 作为储备液, -80℃冰箱备用。然后用甲醇水 (50 : 50) 依次稀释 Ponatinib 储备液, 得 Ponatinib 标准品各浓度为 10, 50, 100, 250, 500, 1 000 和 2 500 ng/ml, 作为 1~7 号

系列标准工作液; 另外, 以甲醇为溶剂, 制备了 10 ng/ml Ponatinib-d8 内标液。

1.2.3 样品处理方法: 精密移取患者含药血浆 100 μl 置于 1.5 ml Microtube 中, 然后加入 2 mmol/L 乙酸铵 -0.1% 甲酸水溶液 100 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 再加入 Ponatinib-d8 内标液 300 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 再加入空白甲醇 500 μl, 涡旋振荡 0.5 min, 1 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 150 μl, 进样检测。

1.2.4 方法学验证^[9]

1.2.4.1 专属性考察：采用本实验方法，分别取自6份不同健康人体的空白血浆、加入 Ponatinib 及 Ponatinib-d8 的空白血浆、受试者给药后的血浆，按“1.2.3”项方法操作。

1.2.4.2 标准曲线的绘制和定量限：分别取空白血浆 90 μl 7份，各加入浓度为 10, 50, 100, 250, 500, 1000 和 2 500 ng/ml 的 Ponatinib 系列标准工作液 10 μl，按“1.2.3”处理方法处理。经 HPLC-MS/MS 分析，以 Ponatinib 与 Ponatinib-d8 面积之比 (Y) 为纵坐标，以血浆 Ponatinib 浓度 (X) 为横坐标，以最小二乘法进行线性回归。同时以信噪比 (10 : 1) 为标准，计算最低定量限。

1.2.4.3 精密度与回收率试验：取高、中、低 (150, 30, 3 ng/ml) 3种浓度的 Ponatinib 质控品各6个，按 1.2.3 项进行处理，1天内连续测定6次，连续3天，根据当天的标准曲线，计算质控样品的测定浓

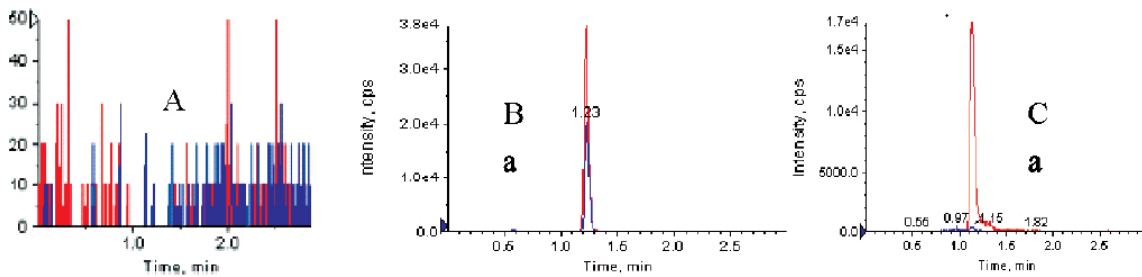
度，根据质控样品结果计算日内和日间相对标准偏差 (RSD)。将相应测量浓度与理论质量浓度进行比较，计算相对回收率。

1.2.4.4 稳定性试验：取高、中、低 (150, 30, 3ng/ml) 3种浓度 Ponatinib 质控品，按 1.2.3 项进行处理，每个浓度3个样品，考察其在室温放置4h、反复冻融3次、处理后室温放置4h稳定性。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计学分析，计算平均值和方差。

2 结果

2.1 专属性结果 由“1.2.4.1”可得到色谱图，见图2。结果表明，血浆中内源性物质不干扰 Ponatinib 及内标 Ponatinib-d8 的测定，专属性良好。Ponatinib 及 Ponatinib-d8 的保留时间均为 1.23 min，说明该色谱和质谱方法选择较好，且内标选择亦合适。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 +Ponatinib+Ponatinib; C. 患者血样

图2 Ponatinib 和 Ponatinib-d8 色谱图

2.2 标准曲线和定量限 由“1.2.4.2”得到直线方程为 $Y=0.0193X+0.0284$ ($r=0.9991$) 见图3。表明 Ponatinib 血药浓度在 1~250 ng/ml 内线性关系良好，可用于定量，其最低定量限为 0.1 ng/ml。

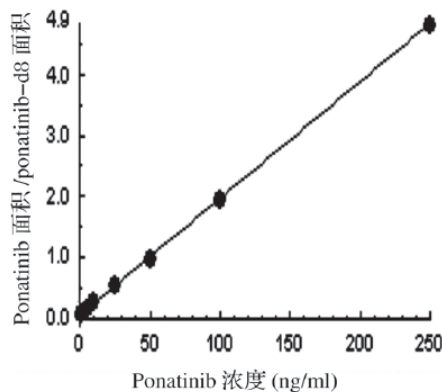


图3 Ponatinib 标准曲线

2.3 精密度结果 由“1.2.4.3”可得 Ponatinib 精密度和回收率，见表2。Ponatinib 日内 RSD 为 1.27%~3.06%，日间 RSD 为 1.34%~3.32%，一般回

收率在 (100.91 ± 1.8)%~(105.18 ± 0.7)% 之内，符合药典规定。

表2 Ponatinib 精密度与回收率测定结果 (n=61, $\bar{x} \pm s$)

浓度 (ng/ml)	日内精密度			日间精密度		
	测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)	回收率 (%)	测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)	回收率 (%)
3.0	3.03 ± 0.09	3.06	103.03 ± 1.8	3.0 ± 0.10	3.32	100.91 ± 1.8
30.0	30.37 ± 0.39	1.27	104.56 ± 0.5	30.4 ± 0.42	1.40	104.41 ± 0.9
150.0	150.90 ± 2.02	1.34	105.18 ± 0.7	150.9 ± 2.03	1.34	104.91 ± 0.6

2.4 稳定性结果 由“1.2.4.4”可得 Ponatinib 稳定性结果，见表3。在以上考察的稳定性条件下，Ponatinib 浓度均显示了可靠的稳定性，基本可满足临床常规检测 Ponatinib 血药浓度对稳定性的需求。

2.5 临床应用 男性患者，39岁，CML 急变期，BCR-ABL 阳性。过往口服伊马替尼、达沙替尼效果一直不好，疾病持续进展，改换口服 Ponatinib 45 mg/d，口服2个月后，送检血药浓度，结果为：16 ng/ml。2017年文献报道^[5,8]指出 Ponatinib 血药

浓度谷浓度大于 34.2 ng/ml, 临床治疗效果较好, 因此建议患者加量 15 mg/d, 同时做基因耐药检测, 加量后 Ponatinib 浓度检测结果为: 71 ng/ml, 检测结果符合临床要求, 但病情仍未见好转。该患者基

因检测结果为 T315I 突变和 E255K 突变, 携带复合突变, 说明该患者使用 Ponatinib 治疗效果不好可能与该患者携带复合突变有关。

表 3 Ponatinib 稳定性结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

浓度 (ng/ml)	室温放置 4 h		冻融稳定性		处理后室温放置 4 h	
	测得浓度 (ng/ml)	RSD(%)	测得浓度 (ng/ml)	RSD(%)	测得浓度 (ng/ml)	RSD(%)
3.0	3.0 ± 0.09	2.98	3.1 ± 0.10	3.37	3.0 ± 0.08	2.84
30.0	30.6 ± 0.55	1.79	30.4 ± 0.24	0.78	30.1 ± 0.38	1.25
150.0	151.7 ± 1.86	1.23	151.0 ± 2.10	1.39	150.0 ± 2.10	1.40

3 讨论

CML 遗传学致病的分子基础是 BCR-ABL 融合基因, 该基因的编码产物具有较强的酪氨酸激酶活性, 使大量底物磷酸化, 激活下游信号通路, 干扰造血干细胞增生、凋亡及黏附信号, 导致血细胞过度增殖、凋亡受阻及不成熟细胞提前释放至外周血, 进而引起 CML 的发生。伊马替尼作为第一代 TKI, 可靶向抑制 BCR-ABL 的表达, 迄今仍是 CML 的一线治疗药物^[5], 但是仍有部分患者疗效不佳, 易产生耐药及不耐受而毒性较大^[6]。第二代 TKI (达沙替尼、尼洛替尼和伯舒替尼) 和第三代 TKI Ponatinib 的陆续上市, 为治疗伊马替尼耐药或不耐受以及既往治疗无效的费城染色体阳性 CML 患者提供了新的选择^[5]。

Ponatinib 是第三代酪氨酸激酶强效抑制剂, 能有效抑制 BCR-ABL 磷酸化, 进而抑制 CML 恶性细胞增殖, 主要用于 T315I 突变的 CML 患者。同时, Ponatinib 又是多靶点的药物, 一种靶点的改变会引起多种疾病的发生, 其在个体间及个体内代谢差异大, 其谷浓度与临床疗效有一定的相关性^[6-8,10-12]。其血药浓度过低, 达不到理想的治疗浓度, 会延误病情, 导致疾病进展, 威胁生命; 并且易于耐药混淆, 不易于临床治疗。其血药浓度高, 易致严重及致死性血凝块和严重血管狭窄等不良反应。因此, 对使用一代、二代 TKI 治疗效果不好的患者, 使用 Ponatinib 进行移植前的挽救治疗, 对其血药浓度进行检测, 以获得理想的治疗效果就显得尤为重要。本文建立的 Ponatinib 血药浓度检测方法采用甲醇沉淀蛋白, 前处理相对简单、方便; 采用非放射性同位素 Ponatinib-d8 作为内标, 使用内标法定量, 能很好地避免及减小基质效应对检测结果的影响; 分析时间为 4min, 检测速度快, 适合临床大样本检测; 同时其灵敏度及专属性均较好, 能满足临床对 Ponatinib 血药浓度检测需求^[9]。本实验室前期^[13]已建立了 CML 患者伊马替尼与达沙替尼的血药浓度检测方法, 并已经成功用于临床 CML 的常规检

测, 加上本文建立的 Ponatinib 血药浓度检测方法, 本实验室的 TKI 血药浓度检测方法已基本可满足 CML 患者临床常规用 TKI 的血药浓度监测, 可协助临床更好地使用 TKI 进行治疗, 为患者调药及更换 TKI 和治疗方案提供了实验室依据。

参考文献:

- [1] 王品, 王雪娇. TKI 时代造血干细胞移植在慢性粒细胞白血病治疗中的地位 [J]. 重庆医学, 2018, 47 (22): 2956-2958, 2962.
WANG Pin, WANG Xuejiao. Role of hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of chronic myelogenous leukemia in the TKI era [J]. Chongqing Medical Science, 2018, 47(22): 2956-2958, 2962
- [2] 陈晓鹏, 曹真睿, 胡晶. 慢性髓系白血病异基因造血干细胞移植的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27 (4): 1334-1338.
CHEN Xiaopeng, Cao Zhenrui, Hu Jing. Advances in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia-Review [J]. Journal of Experimental hematology, 2019, 27(4): 1334-1338.
- [3] MIURA M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2015, 38(5): 645-654.
- [4] YU Huixin, STEEGHS N, NIJENHUIS C M, et al. Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: focus on the pharmacokinetic targets [J]. Clinical Pharmacokinetics, 2014, 53(4): 305-325.
- [5] National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: chronic myeloid leukemia: Version 2, 2017 [S]. NCCN, 2017-01-19.
- [6] 金洁, 阴秀峰. 慢性髓性白血病患者 BCR-ABL 激酶区突变的检测及临床意义 [J]. 中华血液学杂志, 2014, 35 (2): 95-97.
JIN Jie, YIN Xiufeng. Clinical significance of analysis of BCR-ABL kinase domain mutation in chronic myeloid leukemia patients [J]. Chinese Journal of Hematology, 2014, 35(2): 95-97.
- [7] Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research, application number: 203469Orig1s000, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review (2012). (下转 52 页)