

LC-MS/MS 检测人血浆中 15 种酪氨酸酶抑制剂类抗肿瘤药物含量

LCMSMS-655

摘要：本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪内标法测定人血浆中 15 种酪氨酸酶抑制剂类抗肿瘤药物含量分析方法。血浆样品经含同位素内标物的甲醇进行蛋白沉淀后，取上清加水稀释后即可进样分析，一针进样，5 分钟即可完成 15 种酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）抗肿瘤药物分析，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.999，方法准确度在 90%~110% 之间，精密度 RSD 均在 0.9%~9.36% 之间，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词：LC-MS/MS 酪氨酸激酶抑制剂 抗肿瘤

根据世界卫生组织的数据，2012 年全球新增癌症病例 1410 万例，癌症死亡 820 万例，癌症患者 3260 万。乳腺癌、肺癌和结直肠癌是女性死亡率最高的癌症，而肺癌、肝癌和胃癌是男性死亡率最高的癌症。癌症是全球第二大死因，在几个发达国家甚至是第一大死因。

酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）的研究始于 2000 年代初。自从 2001 年第一个 TKI 伊马替尼应用于慢性髓系白血病的治疗以来，到 2020 年，FDA 共批准 52 个 TKIs 用于治疗各种恶性肿瘤。尽管它们有效，但 TKI 药代动力学特征似乎没有引起足够重视。所有这些药物都是口服给药且仅以一个起始剂量给药，而有些药物显示出广泛的个体内部和个体间变异性。这种药代

动力学变异性导致患者之间的药物暴露高度不同，导致许多人血浆浓度过高或过低。其他因素也会降低 TKI 的有效性，例如预后不良或其他临床因素、药效学因素（如受体突变）或缺乏依从性。考虑到疾病的严重预后、广泛的药代动力学变异性、长期使用和药物的高成本，治疗药物监测（TDM）可能是帮助临床医生进行个体剂量调整的非常有用的工具，具有重要意义。

本文应用多项 TKIs 抗肿瘤药物测定试剂盒，使用岛津 LCMS-8045 CL 液相色谱三重四级杆质谱仪开发了其治疗药物监测方法。血浆样品经含同位素内标物的甲醇进行蛋白沉淀后，取上清加水稀释后即可进样分析，一针进样，5 分钟即可完成 15 种 TKIs 抗肿瘤药物分析，该方法简易快捷，适合自动化及高通量检测分析。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL，具体配置如下：

输液泵：LC-40D XR CL

检测器：LCMS-8045 CL

自动进样器：SIL-40C XR CL

柱温箱：CTO-40C CL

系统控制器：CBM-40 CL

工作站软件：LabSolutions LCMS CL Ver. 1.30

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Scepter C18-120 (50 × 2.1 mm, 3 μm), SGLC, 货号：227-31014-03

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水 5 mM 醋酸铵，B 相 -0.1% 甲酸甲醇

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 25%。时间程序见表 1

流速：0.4 mL/min

进样器温度：8°C

柱温：45°C

进样量：5 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
2.00	20	80
2.01	5	95
3.50	5	95
3.51	75	25
5.00	75	25

质谱条件

离子化模式: ESI+

离子源温度: 300°C

加热气: 空气 10.0 L/min

DL 管温度: 250°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400°C

干燥气: 氮气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 10 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 化合物 MRM 参数

#	化合物	英文名	CAS 号	离子对	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	伊马替尼	Imatinib	152459-95-5	494.10>217.20	-17	-25	-23
2	伊马替尼 -d8	Imatinib-d8	1092942-82-9	502.10>394.20	-24	-28	-19
3	索拉非尼	Sorafenib	284461-73-0	465.10>252.20	-16	-34	-12
4	索拉非尼 -d3	Sorafenib-d3	1130115-44-4	468.10>255.10	-16	-34	-12
5	帕唑替尼	Pazopanib	444731-52-6	438.10>357.20	-15	-30	-25
6	帕唑替尼 -d3	Pazopanib-d3	N/A	441.10>360.20	-15	-30	-25
7	拉帕替尼	Lapatinib	231277-92-2	581.10>350.10	-20	-37	-10
8	拉帕替尼 -d4	Lapatinib-d4	1184263-99-7	585.10>365.10	-20	-37	-10
9	阿帕替尼	Apatinib	811803-05-1	398.20>212.20	-14	-27	-23
10	阿帕替尼 -d8	Apatinib-d8	N/A	406.20>212.20	-14	-27	-23
11	吉非替尼	Gefitinib	184475-35-2	447.10>128.10	-10	-25	-27
12	吉非替尼 -d6	Gefitinib-d6	1228664-49-0	453.10>134.10	-10	-25	-27
13	依鲁替尼	Ibrutinib	936563-96-1	441.10>138.10	-15	-27	-29
14	依鲁替尼 -d5	Ibrutinib-d5	N/A	446.10>138.10	-15	-27	-29
15	达沙替尼	Dasatinib	302962-49-8	488.00>401.00	-17	-30	-19
16	达沙替尼 -d8	Dasatinib-d8	302962-49-8	496.10>406.10	-17	-30	-19
17	克唑替尼	Crizotinib	877399-52-5	450.10>259.10	-15	-23	-27
18	克唑替尼 -d5	Crizotinib-d5	1395950-84-1	455.10>264.20	-15	-23	-27
19	尼罗替尼	Nilotinib	641571-10-0	530.10>289.10	-24	-30	-20
20	尼罗替尼 -d6	Nilotinib-d6	1268356-17-7	536.10>295.10	-24	-30	-20
21	厄洛替尼	Erlotinib	183321-74-6	394.10>278.00	-14	-32	-29
22	厄洛替尼 -d6	Erlotinib-d6	183319-69-9	400.10>278.00	-14	-32	-29
23	鲁索替尼	Ruxolitinib	941678-49-5	307.10>186.10	-11	-27	-19
24	鲁索替尼 -d9	Ruxolitinib-d9	N/A	316.20>186.10	-11	-27	-19

25	普纳替尼	Ponatinib	943319-70-8	533.20>260.10	-36	-28	-18
26	普纳替尼 -d8	Ponatinib-d8	N/A	541.20>260.10	-36	-28	-18
27	阿西替尼	Axitinib	319460-85-0	387.10>356.10	-14	-20	-26
28	阿西替尼 -d4	Axitinib-d4	N/A	390.10>356.10	-14	-20	-26
29	N- 去甲伊马替尼	N-YMTN	404844-02-6	480.10>203.10	-16	-25	-21
30	N- 去甲伊马替尼 -d8	N-YMTN-d8	N/A	488.10>211.10	-16	-25	-21

1.3 样品配制和前处理

1.3.1 样品配制

(1) 将试剂盒（多项激酶抑制剂类抗肿瘤药物联合测定试剂盒，豪思生物）和血浆样品于冰箱取出后回复至室温。

(2) 校准品及质控品配制：在室温下精密移取 2 mL 超纯水至各水平校准品及质控品瓶中，轻微震荡，混合 30-60 分钟，使内容物完全溶解，冷藏备用。

表 3 校准品 & 质控品浓度信息

#	化合物	校准品 (ng/mL)					质控品 (ng/mL)		
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	LQC	MQC	HQC
1	伊马替尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
2	尼罗替尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
3	索拉非尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
4	帕唑替尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
5	拉帕替尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
6	阿帕替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
7	吉非替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
8	依鲁替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
9	N- 去甲伊马替尼	50	250	500	2500	5000	75	750	3750
10	克唑替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
11	达沙替尼	2	10	20	100	200	3	30	150
12	厄洛替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
13	鲁索替尼	20	100	200	1000	2000	30	300	1500
14	阿西替尼	1	5	10	50	100	1.5	15	75
15	普纳替尼	2	10	20	100	200	3	30	150

1.3.2 样本前处理

- (1) 移取 100 μ L 校准品 / 质控品 / 待测血清样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 300 μ L 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋 2 min；4°C 下，10000 rpm 离心 5 min；
- (3) 取 100 μ L 上清于进样小瓶并加入 900 μ L 纯水混匀；进样 5 μ L 测定。

■ 实验结果

2.1 线性关系

将 5 个标准浓度的校准品按 1.3.2 中前处理条件进行分析测定，以浓度比为横坐标，面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线得到相关系数、线性范围和校准品准确度见表 4。

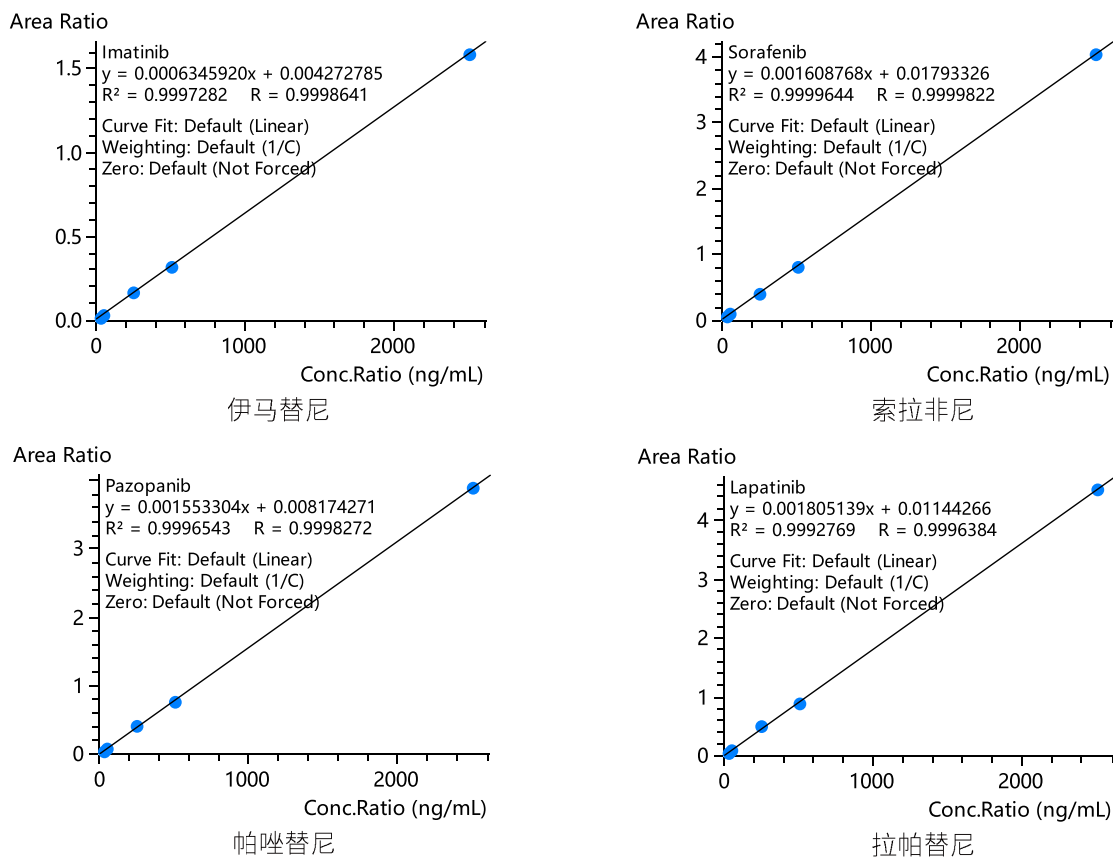


图 1 部分校准曲线

表 4 校准曲线参数

#	化合物	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	伊马替尼	0.99986	50-5000	93.3~104.9
2	索拉非尼	0.99998	50-5000	97.3~103.0
3	帕唑替尼	0.99983	50-5000	96.2~105.0
4	拉帕替尼	0.99964	50-5000	95.3~107.5
5	阿帕替尼	0.99971	20-2000	94.9~103.5
6	吉非替尼	0.99978	20-2000	94.2~105.7
7	依鲁替尼	0.99999	20-2000	97.5~101.3
8	达沙替尼	0.99991	2-200	92.9~108.4
9	克唑替尼	0.99921	20-2000	91.0~112.8
10	尼罗替尼	0.99997	50-5000	94.4~106.6
11	厄洛替尼	0.99994	20-2000	97.8~102.3
12	鲁索替尼	0.99990	20-2000	92.7~105.4
13	普纳替尼	0.99971	2-200	97.1~105.1
14	阿西替尼	0.99993	1-100	95.8~103.1
15	N- 去甲伊马替尼	0.99933	50-5000	95.8~111.1

2.2 精密度及准确度

本实验分别对低、中、高浓度质控品进行 6 次重复测定，精密度及准确度数据结果见表 5 至表 7。方法准确度在 90%~110% 之间，精密度 RSD 均在 0.9%~9.36% 之间，可满足临床日常检验需求。

表 5 LQC 精密度 & 准确度结果 (n=6)

#	化合物	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	准确度
1	伊马替尼	75.46	4.19	75	100.6%
2	索拉非尼	69.25	2.64	75	92.3%
3	帕唑替尼	77.25	1.64	75	103.0%
4	拉帕替尼	76.00	0.99	75	101.3%
5	阿帕替尼	30.35	1.10	30	101.2%
6	吉非替尼	29.48	3.46	30	98.3%
7	依鲁替尼	29.13	2.93	30	97.1%
8	达沙替尼	2.77	3.36	3	92.2%
9	克唑替尼	29.19	2.87	30	97.3%
10	尼罗替尼	73.14	0.90	75	97.5%
11	厄洛替尼	29.05	3.59	30	96.8%
12	鲁索替尼	28.24	3.32	30	94.1%
13	普纳替尼	3.12	7.93	3	104.0%
14	阿西替尼	1.52	5.93	2	101.5%
15	N- 去甲伊马替尼	74.31	1.72	75	99.1%

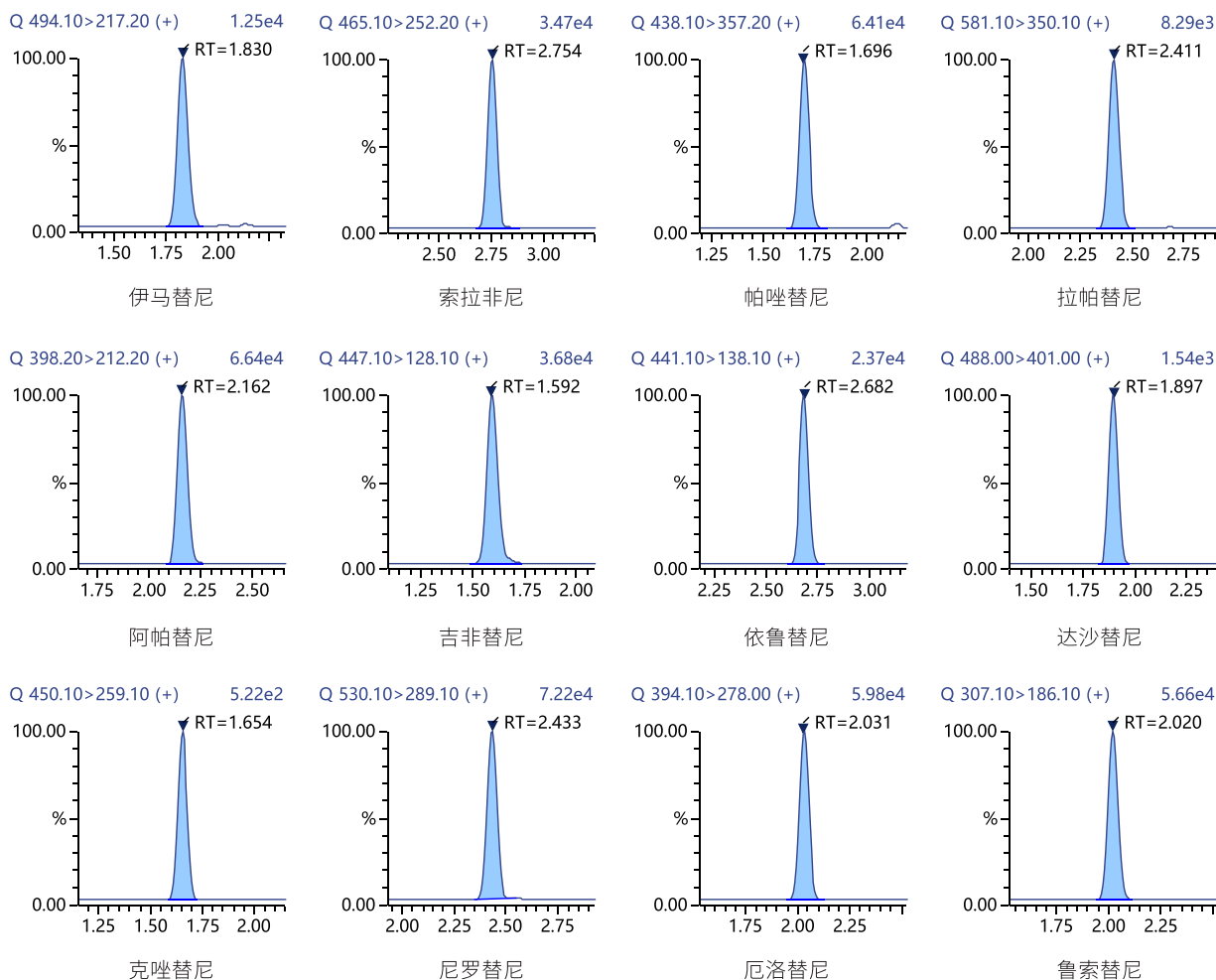
表 6 MQC 精密度 & 准确度结果 (n=6)

#	化合物	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	准确度
1	伊马替尼	756.73	1.80	750	100.9%
2	索拉非尼	748.68	1.74	750	99.8%
3	帕唑替尼	714.77	2.41	750	95.3%
4	拉帕替尼	751.41	4.94	750	100.2%
5	阿帕替尼	288.90	3.42	300	96.3%
6	吉非替尼	314.41	4.60	300	104.8%
7	依鲁替尼	307.51	2.57	300	102.5%
8	达沙替尼	27.29	2.40	30	91.0%
9	克唑替尼	289.85	2.57	300	96.6%
10	尼罗替尼	802.90	5.04	750	107.1%
11	厄洛替尼	304.42	1.15	300	101.5%
12	鲁索替尼	300.22	6.53	300	100.1%
13	普纳替尼	27.70	4.10	30	92.3%
14	阿西替尼	14.80	2.56	15	98.6%
15	N- 去甲伊马替尼	807.17	1.69	750	107.6%

表 7 HQC 精密度 & 准确度结果 (n=6)

#	化合物	均值 (ng/mL)	%RSD	靶值 (ng/mL)	准确度
1	伊马替尼	3529.20	1.10	3750	94.1%
2	索拉非尼	3377.85	1.73	3750	90.1%
3	帕唑替尼	3573.19	1.59	3750	95.3%
4	拉帕替尼	3798.23	2.52	3750	101.3%
5	阿帕替尼	1440.93	2.27	1500	96.1%
6	吉非替尼	1447.90	2.07	1500	96.5%
7	依鲁替尼	1371.31	4.20	1500	91.4%
8	达沙替尼	139.16	8.48	150	92.8%
9	克唑替尼	1411.01	7.63	1500	94.1%
10	尼罗替尼	3503.83	4.12	3750	93.4%
11	厄洛替尼	1439.83	1.20	1500	96.0%
12	鲁索替尼	1352.30	1.68	1500	90.2%
13	普纳替尼	137.33	9.36	150	91.6%
14	阿西替尼	78.19	7.17	75	104.3%
15	N- 去甲伊马替尼	3657.86	3.76	3750	97.5%

2.3 最低浓度校准品色谱图



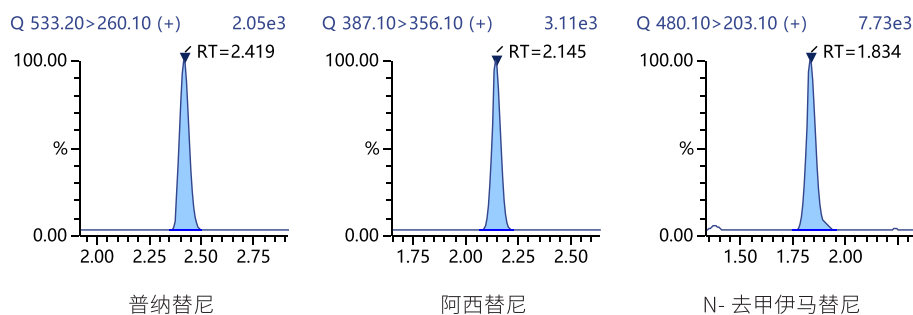


图2 15种TKIs药物色谱图(校准品1)

■ 结论

本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪内标法定量测定人血浆中15种酪氨酸酶抑制剂类抗肿瘤药物含量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能，验证结果优异，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

