

研究论文

高效液相色谱质谱串联法检测厄洛替尼血浆浓度

黄逸生^{1,3}, 周志凌^{2,3}, 雷丽婵^{1,3}, 赵建华³, 黄楚权³, 邓海媚⁴, 吴一龙^{1,3*} (1. 广东省肺癌研究所, 广州 510080; 2. 广东省人民医院医学研究中心, 广州 510080; 3. 广东省人民医院, 广东省医学科学院, 广州 510080; 4. 广东药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定人血浆中厄洛替尼的浓度。方法 血浆样品经甲醇蛋白沉淀后, 以甲醇-(0.1%甲酸+5 mmol·L⁻¹ NH₄Ac) (60:40, v/v) 为流动相, 采用 Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱进行分离, 流速为 0.9 mL·min⁻¹, 通过电喷雾离子化串联质谱, 以多反应监测 (MRM) 方式进行检测。结果 厄洛替尼的线性范围为 1~2 000 ng·mL⁻¹, 平均方法回收率在 103.5%~109.0%, 日内和日间变异均<15%。结论 本法简单、快速、灵敏、重现性好, 成功应用于厄洛替尼的血药浓度监测。

关键词: 厄洛替尼; 高效液相色谱质谱串联法; 电喷雾

中图分类号: R969.1, R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981 (2011) 11-0801-04
doi: 10.3969/j.issn.1672-2981.2011.11.001

Determination of erlotinib in human plasma by HPLC-MS/MS

HUANG Yi-sheng^{1,3}, ZHOU Zhi-ling^{2,3}, LEI Li-chen³, ZHAO Jian-hua³, HUANG Chu-quan³, DENG Hai-mei⁴, WU Yi-long^{1,3*} (1. Guangdong Lung Cancer Institute, Guangzhou 510080; 2. Medical Research Center of Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080; 3. Guangdong General Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080; 4. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

Abstract: Objective To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine erlotinib in human plasma. **Methods** After protein precipitation with methanol, erlotinib and internal standard were chromatographically separated on an Ultimate XB C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with the mobile phase containing (0.1% formate and 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer) and acetonitrile (40:60, v/v) at 0.9 mL·min⁻¹. The electronic spray ion tandem mass spectrum with the positive mode and multitude reaction monitor (MRM) were used to detect the analytes. **Results** The linear range of the calibration curves was 1-2 000 ng·mL⁻¹ for erlotinib. The intra- and inter-day precision was less than 15%. The methodology recovery ranged from 103.5% to 109.0%. **Conclusion** The present method is sensitive, effective and reliable, which has been successfully used in the pharmacokinetic studies of erlotinib after oral administration in healthy Chinese volunteers.

Key words: erlotinib; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; electronic spray ion

肺癌已成为严重威胁人们生命和健康的疾病, 其中非小细胞肺癌占肺癌总数的 75%~80%, 约 1/3 的患者一经确诊即为晚期肺癌。厄洛替尼 (erlotinib) 是近年上市的治疗晚期非小细胞肺癌药物, 在国际及国内肺癌指引中厄洛替尼均被列为晚期非小细胞肺癌二线治疗药物之一^[1-2]。与另一个同样作用表皮生长因子受体 (EGFR) 通路的靶向药物吉非替尼相比, 厄洛替尼具有抑瘤活性高、药物暴露浓度高、半衰期较短、可以应用最大耐受剂量进行治疗等特点。

与常规化疗相比, 厄洛替尼的耐受性较好, 其不良反应

较少而轻, 但作为其主要不良反应如皮疹、腹泻、肝功能损害、间质性肺炎也不能被低估。文献报道 15 例服用厄洛替尼治疗的患者其血药浓度相差 8 倍^[3-4]。可见其药物动力学存在明显的个体差异, 有必要对其进行血药浓度监测。为此, 建立一个快速、灵敏、可靠的方法检测人血浆中厄洛替尼的浓度, 对于指导临床用药, 实施个体化治疗尤为重要。

1 仪器与试剂

厄洛替尼对照品 (Selleck 公司, 纯度: 99%); 普奈洛尔对照品 (中国药品生物制品检定所, 纯度: 99%); 甲醇

基金项目: 广东省科技计划 (编号: 2010B031500031); 广州市科技计划 (编号: 2010YI-C931)。

作者简介: 黄逸生, 男, 副主任医师, 主要从事肺癌多学科综合治疗, Tel: (020) 83827812-50810, E-mail: hysd@sohu.com

* 通讯作者: 吴一龙, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事肺癌多学科综合治疗, Tel: (020) 83827812, E-mail: syylwu@live.cn

(色谱纯, 默克公司); 乙酸铵(质谱纯, 美国 Sigma 公司); 甲酸(色谱级, 迪马公司); 水为重蒸去离子水。厄洛替尼片(规格: 150 mg · 粒⁻¹, 商品名为特罗凯, Schwarz Pharma Manufacturing Inc.)。

Shimadzu 20A 高效液相色谱仪系统(日本岛津公司); API 4000 QTrap 串联质谱仪(美国 ABSCIEX 公司); Beckman GS-6R 离心机(美国 Beckman 公司); Analyst 1.4.2 数据处理工作站。Glas-Col 数字脉冲旋涡混合仪(美国 Glas-Col 公司)。

2 方法和结果

2.1 色谱和质谱条件

色谱柱: Ultimate XB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-(0.1% 甲酸 + 5 mmol · L⁻¹ NH₄Ac) = 60 : 40; 流速: 0.9 mL · min⁻¹; 柱温: 室温; 进样体积: 5 μL。

离子源为电喷雾离子源(ESI 源), 正离子方式检测, 用于定量分析的离子对厄洛替尼为 m/z 394.2 - m/z 336.1 [裂解能量(CE)为 34 V]。内标为 m/z 260.2 - m/z 116.1 (CE 为 26 V), 解簇电压(DP)值为 105 V, 扫描时间为 100 ms, 入口电压(EP)为 10 V, 出口电压(CXP)为 8 V, 气帘气(CUR)为 20 psi (高纯氮), 碰撞气(CAD)为中度, 源电压(IS)为 5 500 V, 源温度(TEM)为 400 °C, 雾化气(GS1)为 55 psi (高纯氮), 加热辅助气(GS2)为 65 psi (高纯氮)。

2.2 储备液及工作溶液配制

精密称取厄洛替尼 10 mg, 用甲醇配成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的厄洛替尼储备液; 然后将储备液用甲醇稀释成 10 μg · mL⁻¹ 的工作液。

精密称取普奈洛尔(内标) 10 mg, 用甲醇配成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的普奈洛尔储备液; 将储备液用 60% 甲醇溶液稀释成浓度为 0.03 μg · mL⁻¹ 的内标工作液。

2.3 样品处理方法

取含药血浆 0.1 mL 至 1 mL 的尖底 EP 管中, 精密加入 0.03 μg · mL⁻¹ 的内标工作液 0.05 mL, 快速振荡 5 s, 加入 100 μL 甲醇, 涡旋 30 s, 离心 10 min (15 000 r · min⁻¹), 吸取上清液即得。

2.4 方法专属性

取受试者的空白血浆, 按“2.3”项下方法操作, 获得空白血浆样品的色谱图 1A; 将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依法操作获得相应的色谱图 1B, 厄洛替尼、内标的出峰时间分别为 4.1 min 和 3.0 min 左右; 取健康受试者给药后收集的血浆样品, 依法操作得色谱图 1C。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰厄洛替尼及内标的测定。

2.5 标准曲线及线性范围

以 10 μg · mL⁻¹ 的厄洛替尼工作液配成浓度为 2 000 ng · mL⁻¹ 的厄洛替尼血浆样品, 以空白血浆逐步稀释成浓度分别为 500、100、25、5、1 ng · mL⁻¹ 的血浆样品, 然后按“2.3”项下方法处理。以厄洛替尼峰面积与内标峰面积之比(y)为纵坐标, 以血浆厄洛替尼浓度(x)为横坐标, 血浆

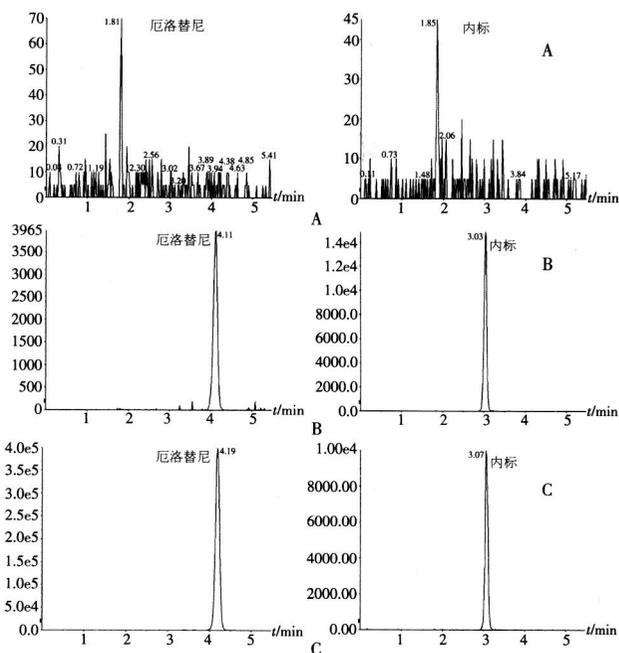


图 1 空白血浆(A)、空白血浆中加入厄洛替尼对照品(5 ng · mL⁻¹)和内标(100 ng · mL⁻¹)(B)及服药后血浆样品(厄洛替尼浓度: 433 ng · mL⁻¹)(C)的色谱图

Fig 1 Representative chromatograms for erlotinib and the IS in human plasma samples: (A) blank plasma sample; (B) blank plasma spiked with erlotinib (5 ng · mL⁻¹) and IS (100 ng · mL⁻¹); and (C) a plasma sample taken from a volunteer (erlotinib concentration: 433 ng · mL⁻¹)

中厄洛替尼浓度在 1~2 000 ng · mL⁻¹ 呈良好的线性关系, 典型代表方程为: $y=0.0682x-0.00506$ ($r=0.9993$, 权重系数为 $1/x^2$)。

2.6 基质效应及绝对回收率

通过比较 3 个不同条件下信号峰面积的平均值来考察基质效应和绝对回收率, 其中, Set1: 对照品用流动相配成低、中、高 3 个浓度样品, Set2: 用空白血浆来配制低、中、高 3 个浓度, 然后再进行处理, Set3: 将空白血浆用血浆处理方法得到的上清液来配成低、中、高 3 个浓度样品, 则绝对回收率(RE) = Set2/Set1, 基质效应比值(ME) = Set3/Set1, 选取不同来源的空白基质, 厄洛替尼采用低(1 ng · mL⁻¹)、中(50 ng · mL⁻¹)、高(1500 ng · mL⁻¹) 3 个浓度点, 内标采用一个浓度点(100 ng · mL⁻¹), 各条件下重复测定 5 个样品。结果低、中、高浓度的厄洛替尼和内标的基质效应分别为 (108.9 ± 4.4)%、(102.3 ± 2.5)%、(104.0 ± 3.5)% 和 (96.3 ± 3.4)%。可见血浆基质对低中高 3 种浓度药物的测定影响程度基本一致; 厄洛替尼低、中、高质控的绝对回收率分别为 (108.3 ± 7.0)%、(110.4 ± 1.1)%、(109.4 ± 1.2)%。内标的绝对回收率为 (103.9 ± 4.8)%。

2.7 方法回收率及精密度

分别配制低、中、高浓度的厄洛替尼血浆质控样品各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并于每批的标准曲线同时进行, 依“2.3”项下方法处理后取 2 μL 进样, 计算质控样品的测得浓度, 求得本法的方法回收率和精密度, 厄洛替尼

低、中、高浓度的质控样品日内 RSD 分别为 6.2%、4.4% 和 2.8%，日间 RSD 分别为 8.9%、8.8% 和 5.1%，方法回收率分别为 103.5%、109.0% 和 103.7%。

2.8 稳定性考察

分别考察了厄洛替尼低、中、高浓度的质控血浆样品室温放置 24 h，冻融 3 次，-20℃ 冻存 4 个月以及经预处理后置于 6℃ 自动进样器 24 h 的稳定性。每个浓度 15 份样品，稳定性 = (测定值/加入值) × 100%。结果表明厄洛替尼低、中、高浓度的质控样品在上述 4 种条件下是稳定的，RSD 均 < 9.6%。

3 应用

建立的 HPLC-MS/MS 方法主要应用于厄洛替尼血药浓度的测定，根据测定的结果指导临床用药。8 位患者（男 5 人，女 3 人，年龄为 56 ± 10 岁）均口服厄洛替尼 1 月以上，1 次 · d⁻¹，150 mg · 次⁻¹。给药第 30 日达稳态后，于服药前采集肘静脉血 3 mL 于 EDTA 抗凝管，离心后分离血浆，于 -20℃ 保存备用。血浆样品照“2.3”项下方法操作，以随行的标准曲线分别计算厄洛替尼的血药浓度。样品测定时随行 6 支质控（低、中、高浓度各 2 支）以进行质量控制。如所测样品浓度超出标准曲线的最大范围则用空白血浆将该样品按一定比例稀释，得到的结果再乘以稀释倍数即为未知样品浓度。结果表明实验的标准曲线的线性良好，各浓度的质控都在允许范围之内，8 个样品所得到的结果分别为 1 844、1 340、394、2 460、517、433、871、605 ng · mL⁻¹。

4 讨论

目前检测血浆中厄洛替尼的方法主要有液相色谱质谱联用法^[5-7]，然而有些检测方法存在样品处理过程冗长复杂，灵敏度较低，样品采集时间或分析周期较长等缺陷，本文在这些文献的基础上进行了改进，建立了一个快速灵敏、稳定可靠、线性范围更宽的液相色谱质谱联用方法，提高了灵敏度，缩短了样本分析时间，并且成功应用于厄洛替尼的血药浓度监测。

我们的结果证实厄洛替尼血药浓度有较大的个体差异，与文献^[3]报道吻合，这表明厄洛替尼的血药浓度监测是必要的。代谢酶的遗传变异、性别、年龄、合并用药、是否吸烟等因素也许是造成这些差异的原因，需要进一步的研究。

目前，已有证据显示吸烟史是厄洛替尼的疗效预测因子^[8-9]。在一项厄洛替尼治疗非小细胞肺癌的临床研究 (BR 21) 发现，吸烟史为唯一一个与厄洛替尼疗效显著相关、可预测疗效的因素：与目前或既往吸烟者相比，厄洛替尼在从不吸烟者中的疗效更好^[10-13]。另一方面，在药物动力学 (PK) 和代谢研究中，进一步探讨了吸烟状态对治疗结果的影响。一项采用 PK 分析的研究检测了患者基线特征、人口学特征、CYP450 诱导剂/抑制剂伴随治疗、实验室化学参数对厄洛替尼暴露的影响作用，在所有检测变量中，吸烟状态对厄洛替尼暴露的影响最大^[14]。在 BR 21 研究中，当前吸烟者显示稳态谷浓度中位值仅为非吸烟者的 50%^[15]。除了保持较高的药物暴露程度之外，非吸烟者还显示药物有关不良事件的发生率较高，如皮疹和腹泻^[16]。这些结果显示吸烟状态通过降低厄洛替尼暴露程度而直接影响治疗结

果。目前认为吸烟对厄洛替尼血浆浓度的影响主要是通过增加药物代谢酶活性引起的。在肝脏等多种组织中，厄洛替尼通过 CYP3A4、CYP1A2 和 CYP2C8 进行代谢、清除。在吸烟者中，多种参与多环芳香烃代谢的细胞色素酶 CYP1A2、CYP1B1 和 CYP1A1 等高表达可能导致药物血浆浓度降低^[17-20]。因此，通过药物动力学研究，特别是血药浓度监测，明确个体药物代谢特点，是肿瘤患者实现个体化治疗的重要途径之一。

参考文献

- [1] 吴一龙, 陆舜, 周清华, 等. 2010 中国肺癌临床指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 78.
- [2] NCCN Non-small Cell Lung Cancer Practice Guideline [M]. Practice Guideline in Oncology (v2), 2009: 20-21
- [3] Tan AR, Yang X, Hewitt SM, et al. Evaluation of biologic end points and pharmacokinetics in patients with metastatic breast cancer after treatment with erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor [J]. J Clin Oncol, 2004, 22 (15): 3080-3090.
- [4] 韩宝惠. 肿瘤生物免疫靶向治疗 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2006: 6.
- [5] Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, et al. Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412 (12): 11-12.
- [6] Chahbouni A, den Burger JC, Vos RM, et al. Simultaneous quantification of erlotinib, gefitinib, and imatinib in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Ther Drug Monit, 2009, 12 (6): 683-687.
- [7] Roche S, McMahon G, Clynes M, et al. Development of a high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cellular levels of the tyrosine kinase inhibitors lapatinib and dasatinib [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877 (31): 3982-3990.
- [8] Clark GM, Zborowski DM, Santabarbara P, et al. Smoking history and epidermal growth factor receptor expression as predictors of survival benefit from erlotinib for patients with non-small-cell lung cancer in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR. 21 [J]. Clin Lung Cancer, 2006, 7 (6): 389-394.
- [9] Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer -molecular and clinical predictors of outcome [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (2): 133-144.
- [10] Shepherd FA, Rodrigues PJ, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (2): 123-132.
- [11] Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. [J]. Cancer, 2001, 92 (6): 1525-1530.
- [12] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and

- are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (36): 13306-13311.
- [13] Carey KD, Garton AJ, Romero MS, et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib [J]. Cancer Res, 2006, 66 (16): 8163-8171.
- [14] Lu JF, Eppler SM, Wolf J, et al. Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small cell lung cancer [J]. Clin Pharmacol Ther, 2006, 80 (2): 136-145.
- [15] Hamilton M, Wolf JL, Rusk J, et al. Effects of smoking on the pharmacokinetics of erlotinib [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (7 Pt 1): 2166-2171.
- [16] Hamilton M, Wolf JL, Zborowski D, et al. Tarceva™ (erlotinib) exposure effects (EE) analysis from a phase III study in advanced NSCLC: effect of smoking on the PK of erlotinib [J]. Proc Am Assoc Cancer Res, 2005, 46: 1451.
- [17] Penning TM, Lerman C. Genomics of smoking exposure and cessation: lessons for cancer prevention and treatment [J]. Cancer Prev Res, 2008, 1 (2): 80-83.
- [18] Bartsch H, Petruzzelli S, De Flora S, et al. Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case-control multicenter study on lung cancer patients [J]. Environ Health Perspect, 1992, 98 (11): 119-124.
- [19] Kroon LA. Drug interactions with smoking [J]. Am J Health Syst Pharm, 2007, 64 (18): 1917-1921.
- [20] Osawa Y, Osawa KK, Miyaishi A, et al. NAT2 and CYP1A2 polymorphisms and lung cancer risk in relation to smoking status [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2007, 8 (1): 103-108.

(收稿日期: 2011-08-19; 修回日期: 2011-09-28)

高效液相色谱-示差折光检测法 测定补中益气丸中蜂蜜的含量

刘雁鸣¹, 彭飞城^{2*}, 龙海燕¹, 陈得雨¹ (1. 湖南药用辅料检验检测中心, 长沙 410014; 2. 湖南省药品检验所, 长沙 410001)

摘要: 目的 建立补中益气丸(蜜丸)蜂蜜中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖含量测定方法, 以监控补中益气丸质量。方法 采用高效液相色谱-示差折光检测(HPLC-RD)法; 色谱柱为 Prevail Carbohydrate ES (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(75:25); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C。结果 葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖对照品分别在 17.868~179.14、16.144~161.44、3.016~30.16、6.565~98.475 μg 线性关系良好, 4 种成分加样回收率分别为 97.1%、101.9%、102.6%、95.9%, RSD 分别为 0.8%、2.0%、0.8%、1.3% (n=6)。结论 该方法操作简便, 灵敏度高, 重复性好, 可用于补中益气丸中蜂蜜的含量测定。

关键词: 补中益气丸; 高效液相色谱法; 蜂蜜; 葡萄糖; 果糖; 蔗糖; 麦芽糖

中图分类号: R927.1, R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981 (2011) 11-0804-04
doi: 10.3969/j.issn.1672-2981.2011.11.002

HPLC-RD determination of honey in Buzhong Yiqi Wan

LIU Yan-ming¹, PENG Fei-cheng^{2*}, LONG Hai-yan¹, CHEN De-yu¹ (1. Hunan Inspection and Testing Center of Pharmaceutical Excipients, Changsha 410014; 2. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001)

Abstract: Objective To evaluate the quality of Buzhong Yiqi Wan (honey pills) to determine the contents of glucose, fructose, sucrose and maltose. **Methods** An HPLC-RD system was adopted with a Prevail Carbohydrate ES (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water (75:25), the flow was 1.0 mL · min⁻¹, and the column temperature was 35 °C. **Results** The standard curves of glucose, fructose, sucrose and maltose showed good linearity over 17.868—179.14, 16.144—161.44, 3.016—30.16, and 6.565—98.475 μg, respectively. The average re-

基金项目: 国家科技部支撑计划子课题“重大新药创制-中药质量标准研究和信息化体系建设平台”(编号 2009ZX09308-004)。

作者简介: 刘雁鸣, 女, 主任药师, 主要从事药品、辅料质量控制研究及新药研究, E-mail: ymliu68@yahoo.com.cn * 通讯作者: 彭飞城, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中成药检验及标准研究, E-mail: fyules@sina.com