

肿瘤药学专题

• 基础研究与进展 •

二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及其代谢产物浓度的方法学研究*

董馨蔚, 蒋刚, 马松涛, 陈燕[△]

610500 成都, 成都医学院 药学院 (董馨蔚、马松涛); 610041 成都, 四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院 临床药学部 (蒋刚、陈燕)

[摘要] 目的: 建立一种同时、快速检测人血浆中甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate, IM)及其代谢产物浓度的二维液相色谱法,并应用于临床。方法:血浆样品经过蛋白沉淀、离心后直接进样,通过使用二维液相色谱仪进行检测。一维萃取柱:型号为 Aston SX1(3.5 mm×25 mm, 5 μm),流动相为 V(甲醇):V(乙腈):V(磷酸铵水溶液)=25:20:55,流速=0.8 mL/min;中间柱:型号为 Aston SCB(4.6 mm×10 mm, 3.5 μm);二维分析柱:型号为 Aston SCB(4.6 mm×125 mm, 5 μm),流动相为 V(乙腈):V(磷酸铵盐溶液)=38:62, pH=6.9, 流速=1.2 mL/min;柱温:40℃,检测波长:264 nm,进样量:500 μL。结果:色谱图显示 IM 及其代谢产物与杂质分离良好;IM 与 N-去甲基伊马替尼(N-Desmethyl imatinib, NDI)血药浓度线性范围分别是 13.44~1 400.00 ng/mL($R^2=0.9999$)与 13.17~1 372.00 ng/mL($R^2=0.9999$),线性关系均良好,定量下限变异系数分别为 5.79%和 2.77%,灵敏度良好;二者均可在 12.80 min 内完全出峰,方法回收率均高于 90%,日内、日间精密密度均小于 6%,稳定性试验相对标准偏差均小于 5%。所建立方法对 10 位口服 IM 的胃肠间质瘤患者进行了 IM 及 NDI 血药浓度检测,结果 IM 血药浓度结果为 300.34~1 392.07 ng/mL 不等;NDI 血药浓度在 122.44~446.34 ng/mL 之间。结论:该方法简便、快捷、灵敏度高、重现性好,结果准确且成本低廉,且适用于临床 IM 血药浓度检测。

[关键词] 二维液相;伊马替尼;N-去甲伊马替尼;血药浓度;临床应用**[中图分类号]** R969 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.10.006

引文格式: Dong XW, Jiang G, Ma ST, et al. Simultaneous determination of imatinib mesylate and its metabolites in human plasma by two-dimensional liquid chromatography: A methodological study[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(10): 918-925. [董馨蔚, 蒋刚, 马松涛, 等. 二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及其代谢产物浓度的方法学研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(10): 918-925.]

Simultaneous Determination of Imatinib Mesylate and Its Metabolites in Human Plasma by Two-Dimensional Liquid Chromatography: A Methodological Study

Dong Xinwei, Jiang Gang, Ma Songtao, Chen Yan

Department of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan, China (Dong Xinwei, Ma Songtao); Department of Pharmacy, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China (Jiang Gang, Chen Yan)

Corresponding author: Chen Yan, E-mail: cyfy1112@163.com**[收稿日期]** 2020-08-26 **[修回日期]** 2021-09-09**[基金项目]** * 四川省卫生健康委员会科研课题(编号: 20PJ110); 四川省医学会青年创新科研课题(编号: Q20058); 四川省中医药管理局(编号: 2020JC014); 希思科—齐鲁肿瘤研究基金项目(编号: Y-QL202101-0125)**[通讯作者]** [△]陈燕, E-mail: cyfy1112@163.com

This study was supported by grants from Health Commission of Sichuan Province (No. 20PJ110), Sichuan Medical Association (No. Q20058), Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 2020JC0114) and Beijing Xisike Clinical Oncology Research Foundation (No. Y-QL202101-0125).

[Abstract] Objective: To establish a system of two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet detection for simultaneously and rapidly detecting the concentration of imatinib mesylate (IM) and its metabolites in human plasma, and apply it in clinical practice. **Methods:** Plasma samples were injected directly onto the system after protein precipitation and centrifugation, and were detected by two-dimensional liquid chromatography. The first-dimension column was in version Aston SX1 (3.5 mm × 25 mm, 5 μm), with the mobile phase of a solution of methanol, acetonitrile and ammonium phosphate aqueous solution [V (methanol): V (acetonitrile): V (ammonium phosphate aqueous solution) = 25: 20: 55], and the flow rate of (0.8 mL/min); the middle column was in version Aston SCB (4.6 mm × 10 mm, 3.5 μm); the second-dimension column was in version Aston SCB (4.6 mm × 125 mm, 5 μm), with the mobile phase of a solution of acetonitrile and ammonium phosphate salt solution [V (acetonitrile): V (ammonium phosphate salt solution) = 38: 62, PH = 6.9], and the flow rate of 1.2 mL/min; the column temperature was 40 °C; the detection wavelength was 264 nm; and the injection volume was 500 μL. **Results:** The chromatogram showed that IM and its metabolites were well separated from impurities. The linear ranges of plasma IM and N-Desmethyl imatinib (NDI) concentrations were 13.44 ~ 1,400.00 ng/mL ($R^2 = 0.9999$) and 13.17 ~ 1,372.00 ng/mL ($R^2 = 0.9999$), respectively, indicating a good linear relationship; the variation coefficients of the lower limit of quantification were 5.79% and 2.77%, respectively, suggesting a good sensitivity; both IM and NDI could completely peak within 12.80 min, with the recovery rates of over 90%, with intra-day and inter-day precision of less than 6%, with stability of less than 6% (relative standard deviation). The established method was performed on 10 gastrointestinal stromal tumor patients who received IM orally. The concentration of plasma IM ranged from 300.34 to 1,392.07 ng/mL, and that of plasma NDI was between 122.44 and 446.34 ng/mL. **Conclusion:** The method is simple, fast, highly sensitive, reproducible and accurate with low cost, which is suitable for clinical detection of plasma IM concentration.

[Key words] Two-dimensional liquid; Imatinib mesylate; N-Desmethyl imatinib; Plasma concentration; Clinical application

甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate, IM)是一种小分子蛋白酪氨酸激酶抑制剂,分子式为 $C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_4SO_3$,可有效抑制 *BCR-ABL* 酪氨酸激酶及 c-Kit 等的活性,其作为靶向药物,临床用于治疗慢性粒细胞白血病、不可切除/或发生转移的胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)、急性淋巴细胞白血病等。IM 在人体内主要循环代谢产物是 N-{4-甲基-3-[(4-吡啶-3-嘧啶-2-基)氨基]苯基}-4-(哌嗪-1-甲基)-苯甲酰胺(N-去甲基伊马替尼, N-Desmethyl imatinib, NDI),其药效与原型药相似,且 IM 作为口服小分子靶向药物,存在巨大的个体内差异及个体间差异^[1],而多项研究表明 IM 血药浓度与患者临床反应及获益存在相关性^[2-4],故 IM 及其代谢产物的血药浓度监测在临床科学制定合理用药方案及精准个体化治疗中具有重要意义。

二维液相色谱(two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet detection, 2D-LC-UV)系统由全自动 2D-LC-UV 耦合仪与岛津高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)仪组成进行药物浓度测定。所有部件由耦合仪连接,包括自动进样器,一维色谱泵,中间转移系统,二维色谱泵,紫外检测器等模块;血液样品经自动化处理后,传递至后级 HPLC 进行定量分析。具体结构见图 1。本文采用其二级单工模式建立一种同时测定人血浆中 IM 和 NDI 浓度的方法,主要经过一维液

相色谱系统(以下简称 LC1)进样、目标物转移、二维液相色谱系统(以下简称 LC2)进样三个步骤;LC1 进样:样品从自动进样器进入流路系统中,首先经过一维萃取柱进行第一次分离(图 1A);目标物转移:样品经过萃取柱的一级分离后,含有目标物的物质或成分被捕获之后转移至中间柱(图 1B);LC2 进样:中间柱捕获到一级分离目标物后与分析柱相连,目标物最后进入二维分析柱再次分离并到达检测器进行测定(图 1C),该方法分离能力强^[5],已有研究者采用 2D-LC-UV 建立了测定伏立康唑、氯氮平、丙戊酸、氨磺必利等药物血药浓度的方法^[6-9],但基于 2D-LC-UV 建立的 IM 及其代谢产物人血药浓度的检测方法国内未见报道。

1 材料与方法

1.1 仪器

2D-LC-UV 检测系统:由全自动多级 2D-LC-UV 耦合仪 MLC2420(湖南德米特仪器有限公司)与 HPLC 仪 LC-20AT(日本岛津公司)组成;GH-202 型电子天平(上海右一仪器有限公司);TG-16 高速离心机(四川蜀科仪器有限公司);XW-80A 漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司);Mini-15K 微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);四川优普超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 药品与试剂耗材

IM 标准品(纯度 > 99%, 北京中科质检生物技

术有限公司, 420020); NDI 标准品(纯度 > 99%, 中国食品药品检定研究院, 批号: A8029); IM(格列卫, 瑞士诺华制药公司, WMY83); 空白马血浆(美国 Gibco 公司, 批号: 16050-122); 乙腈(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 磷酸(色谱纯, 天津市

科密欧化学试剂有限公司); 氨水(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: F2026012); 磷酸铵三水(含量 > 98%, 大连美仑生物技术有限公司, MB0216); ORG-1A 去蛋白剂(湖南德米特仪器有限公司)。

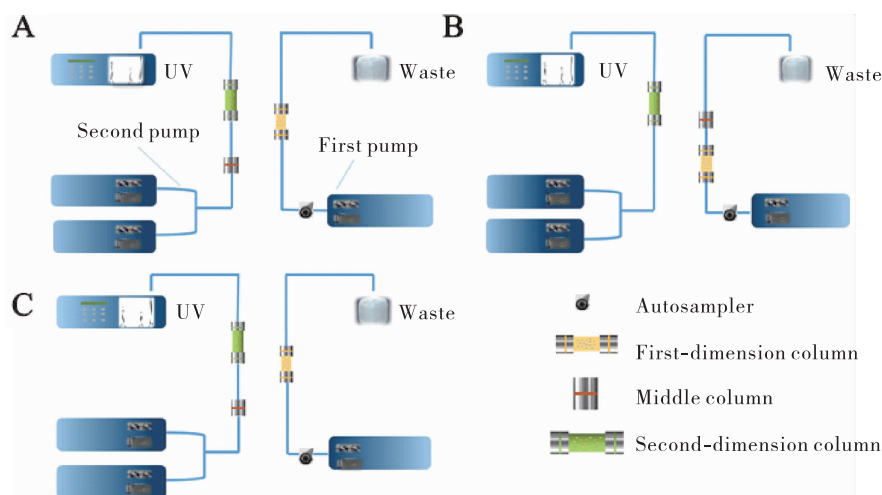


图 1 二维液相色谱仪二级单工模式工作流程图

Figure 1. Work Flow of Two-Dimensional Liquid Chromatograph in a Two-Level Simplex Mode

A. LC1 injection; B. Target transferring; C. LC2 injection.

UV: Ultraviolet detection.

1.3 色谱条件

一维萃取柱: 型号为 Aston SX1 (3.5 mm × 25 mm, 5 μm), 流动相为 V(甲醇): V(乙腈): V(磷酸铵水溶液) = 25: 20: 55, 流速 = 0.8 mL/min; 中间柱型号为 Aston SCB (4.6 mm × 10 mm, 3.5 μm), 辅助流动相为纯水; 二维分析柱: 型号为 Aston SCB (4.6 mm × 125 mm, 5 μm), 流动相为 V(乙腈): V(磷酸铵盐溶液) = 38: 62, 流速 = 1.2 mL/min; 柱温: 40 °C, 检测波长: 264 nm; 进样量: 500 μL。

1.4 溶液配制

1.4.1 标准曲线工作溶液的配制 IM 标准曲线工作液的配制: 精确称取 IM 标准品 1.40 mg, 用 50% 甲醇的水溶液溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, 得到 0.14 mg/mL 的 IM 标准储备液。精密吸取 IM 储备液, 并用 50% 的甲醇进行稀释, 得到 IM 六个浓度校准品溶液, 分别为: 134.4、448.0、1120.0、2800.0、7000.0 和 14000.0 ng/mL, 并在 -20 °C 条件下保存, 作为标准曲线工作液。

NDI 标准曲线工作液的配制: 精确称取 NDI 标准品 6.86 mg, 用 50% 甲醇的水溶液溶解并定容于 5 mL 容量瓶中, 得到 1.372 mg/mL 的 NDI 标准储备液。精密吸取 NDI 储备液, 并用 50% 的甲醇进行

稀释, 得到 NDI 六个浓度校准品溶液, 分别为: 131.7、439.0、1097.6、2744.0、6860.0 和 13720.0 ng/mL, 并在 -20 °C 条件下保存, 作为标准曲线工作液。

1.4.2 质控品溶液的配制 IM 质控品溶液的配制: 精密吸取 1.4.1 中 IM 储备液, 并用 50% 的甲醇进行稀释, 得到 IM 低、中、高三种质控品溶液, 分别为: 336.0、8400.0、11200.0 ng/mL, 以备质控品配制。

NDI 质控品溶液的配制: 精密吸取 1.4.1 中 NDI 储备液, 并用 50% 的甲醇进行稀释, 得到 NDI 低、中、高三种质控品溶液, 分别为: 329.3、8232.0、10976.0 ng/mL, 以备质控品配制。

1.5 血浆样品制备

标准曲线血浆样品制备: 用移液枪分别移取 1.4.1 配制的若干种不同浓度的 IM 及 NDI 标准曲线工作溶液 100 μL, 加入 900 μL 空白血浆混合制成不同浓度 IM 及 NDI 的标准曲线血浆样品, (IM: 13.44、44.80、112.00、280.00、700.00 和 1400.00 ng/mL; NDI: 13.17、43.90、109.76、274.40、686.00 和 1372.00 ng/mL)。

质控品制备: 用移液枪分别移取 1.4.2 配制的低、中、高浓度 IM 及 NDI 质控品溶液 100 μL, 加入

900 μL 空白血浆混合,分别得到 IM 及 NDI 低、中、高 3 个浓度质控品样品, (IM:33.60、840.00、1 120.00 ng/mL;NDI:32.93、823.20、1 097.60 ng/mL)。

1.6 样品处理

取 1 000 μL 有机处理剂 (ORG-1A 去蛋白剂) 于 2 mL 无菌 Ep 管中,加入 400 μL 待测血浆样品,涡旋仪涡旋 60 s 后,高速离心 (145 000 rpm, 8 min),用移液枪取上清液至进样瓶中,待进样分析。若为人血液样品,则先进行离心 (5 000 rpm, 5 min),取其上清液再进行上述操作,将上清液置于 -20°C 的条件下进行保存。

1.7 方法学考察

1.7.1 专属性 分别对空白血浆、空白血浆加入 IM + NDI 标准品以及患者口服 IM 后血浆样品,在 1.3 的色谱条件下进样检测。

1.7.2 标准曲线与定量下限 取 1.5 所制备的 IM 及 NDI 标准曲线血浆样品,在 1.3 色谱条件下进行检测分析,以质量浓度为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y 进行线性回归,拟合得到相应的 IM 和 NDI 标准曲线方程。并取 1.5 所制备的 IM 及 NDI 标准曲线最低点浓度的血浆样品各 6 组平行组,在 1.3 的色谱条件下同日进样,计算其定量下限的变异系数。

1.7.3 回收率与精密度 取 1.5 所制备的 IM 及 NDI 定量下限、低、中、高质控品样品,每个浓度设置 5 组平行组,在 1.3 的色谱条件下同日进样,并计算回收率及日内精密度;每个浓度再设置 5 组平行组,

连续进样 3 天,计算方法日间精密度。

1.7.4 稳定性 取 1.5 制备的 IM 及 NDI 低、中、高质控品样品,每个浓度设置 3 组平行组,分别考察样品在 4°C 条件下 12 h、反复冻融 3 次以及 -80°C 环境放置 20 d 的稳定性。

1.8 统计学方法

所有样本均为独立样本,且重复 3 次实验。数据处理采用 Lab Solution 工作站,数据分析采用 Excel 软件计算均值、标准差,数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,日内、日间精密度用相对标准偏差进行评价。

1.9 血药浓度检测的临床应用

根据上述所建立的同时测定人血浆中 IM 及其代谢产物浓度的方法,选择口服 IM 的 GIST 患者血样进行验证与应用。患者选择条件为长期、稳定服用 IM 超过一个月,并在患者第二日服药前 2 ~ 3 h 进行采血。本论文课题已获得四川省肿瘤医院伦理委员会的批准 (批件号:SCCHE-02-2020-044),涉及的血样采集患者均签署了《知情同意书》。

2 结果

2.1 方法学考察结果

2.1.1 专属性 按照上述条件测定,其专属性结果见图 2,血浆样品分离测定不受内源性物质等杂质干扰;IM 和 NDI 保留时间分别为 10.8 min、7.5 min 左右。

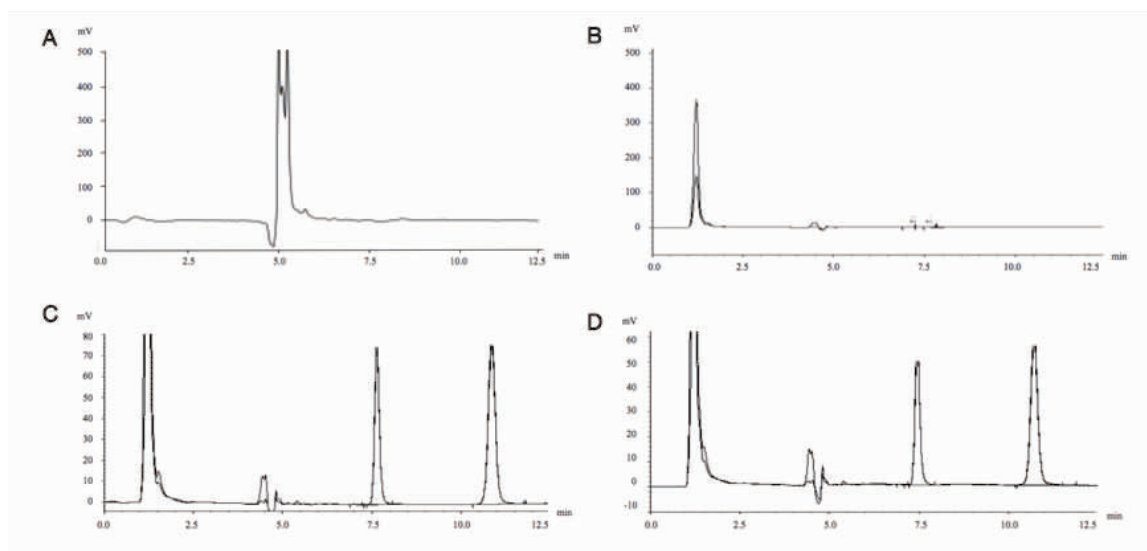


图2 伊马替尼与 N-去甲伊马替尼 2D-LC-UV 色谱图

Figure 2. 2D-LC-UV Chromatograms of Imatinib and N-Desmethyl Imatinib

A. Blank horse plasma; B. Blank human plasma; C. Plasma sample spiked with IM + NDI; D. Serum sample after administration.

IM: Imatinib mesylate; NDI: N-Desmethyl imatinib.

2.1.2 标准曲线与定量下限 拟合得到相应的 IM 和 NDI 标准曲线方程分别为: $Y = 1\,011.48X - 3\,526.20$ ($R^2 = 0.9999$), 定量下限: 13.44 ng/mL; Y

$= 670.901X - 914.774$ ($R^2 = 0.9999$), 定量下限: 13.17 ng/mL; IM 与 NDI 定量下限的变异系数测定结果分别为 5.79% 和 2.77%, 均小于 6% (表 1)。

表 1 最低定量限 ($N=6$)

Table 1. Lowest Limit of Quantification ($N=6$)

Ingredient	Concentration (ng/mL)	Measurement (ng/mL)						Average	SD	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
IM	13.44	14.13	15.27	15.03	14.71	13.19	15.41	14.47	7.66	5.79
NDI	13.17	13.98	14.42	14.35	15.03	14.11	14.78	14.38	9.19	2.77

IM: Imatinib; NDI: N-Desmethyl Imatinib; SD: Standard deviation; RSD: Relative standard deviation.

2.1.3 回收率与精密度 结果表明, IM 和 NDI 的日内、日间精密度相对标准偏差均小于 6%, 回收率

均在 90% ~ 110% 之间, 回收率与精密度良好, 具体结果见表 2。

表 2 方法回收率与精密度结果 ($N=5$)

Table 2. Recovery and Precision ($N=5$)

Ingredient	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	Precision			
			Intra-day		Inter-day	
			Average measurement (ng/mL)	RSD (%)	Average measurement (ng/mL)	RSD (%)
IM	13.44	107.66 ± 6.99	14.47 ± 0.84	5.79	14.27 ± 0.29	2.01
	33.60	102.66 ± 2.97	34.49 ± 0.91	2.63	34.98 ± 0.48	1.38
	840.00	102.46 ± 2.89	860.67 ± 13.79	1.79	851.07 ± 11.02	1.29
	1,120.00	100.42 ± 0.54	1,124.69 ± 6.21	0.62	1,128.68 ± 3.51	0.31
NDI	13.17	109.19 ± 3.03	14.38 ± 0.40	2.77	13.91 ± 0.45	3.21
	32.93	95.29 ± 2.43	31.38 ± 1.17	3.73	32.05 ± 0.98	3.07
	823.20	102.11 ± 1.89	840.57 ± 18.62	2.22	763.64 ± 17.77	2.33
	1,097.60	96.09 ± 4.56	1,054.72 ± 36.84	3.49	1,021.70 ± 32.05	3.14

Abbreviations as indicated in Table 1.

2.1.4 稳定性 结果显示, 所有稳定性实验考察结果相对标准偏差均小于 5%, 表明该方法稳定性良

好, 短期、长期、反复冻融的储存条件并不影响本方法对样品的准确测定 (表 3)。

表 3 样品稳定性结果 ($N=3$)

Table 3. Sample Stability ($N=3$)

Ingredient	Condition	Group	Average measurement (ng/mL)	RSD (%)
IM	4 °C, 12 h	Low	34.26 ± 0.04	0.10
		Medium	826 ± 8.22	0.99
		High	1,074.81 ± 1.09	0.10
	Be frozen and defrosted 3 times repeatedly	Low	32.50 ± 0.09	0.27
		Medium	833.45 ± 4.60	0.55
		High	1,090 ± 12.52	1.15

(Table 3 continues on next page)

(Continued from previous page)

Ingredient	Condition	Group	Average measurement (ng/mL)	RSD (%)
NDI	-80 °C, 20 d	Low	33.97 ± 0.44	1.32
		Medium	829.18 ± 4.19	0.51
		High	1,078.95 ± 4.76	0.44
	4 °C, 12 h	Low	31.38 ± 1.14	3.62
		Medium	779.24 ± 14.99	1.92
		High	1,056.40 ± 7.62	0.72
	Be frozen and defrosted 3 times repeatedly	Low	32.06 ± 0.07	0.21
		Medium	800.59 ± 10.35	1.29
		High	1,070.19 ± 4.43	0.41
	-80 °C, 20 d	Low	31.89 ± 0.41	1.30
		Medium	784.06 ± 8.19	1.04
		High	1,063.32 ± 2.16	0.20

Abbreviations as indicated in Table 1.

2.2 血药浓度检测临床应用

本研究选择了 10 位口服 IM 的 GIST 患者进行验证与应用。样品测定随行一个中浓度质控品,结

果其变异系数均 < 5% (IM 变异系数小于 3.11%, NDI 变异系数小于 0.78%), 患者血药浓度结果见表 4。

表 4 以 2D-LC-UV 法检测临床 GIST 患者血药浓度
Table 4. Plasma Drug Concentration in GIST Patients Detected by 2D-LC-UV

No.	Gender	Age	Dosage	Measurement (ng/mL)	
				IM	NDI
1	Male	59	400 mg/d	1,392.07	216.45
2	Male	72	400 mg/d	1,335.21	336.51
3	Female	52	400 mg/d	1,184.79	446.34
4	Male	49	400 mg/d	1,164.25	271.25
5	Male	81	400 mg/d	1,056.06	289.60
6	Female	58	400 mg/d	932.18	243.03
7	Male	48	400 mg/d	727.79	249.16
8	Male	52	400 mg/d	706.79	173.97
9	Male	64	400 mg/d	467.62	155.40
10	Female	65	400 mg/d	300.34	122.44

GIST: Gastrointestinal stromal tumors; other abbreviations as indicated in Table 1.

3 讨论

目前,关于 IM 血药浓度的检测方法主要有 HPLC 法^[10]、反相高效液相色谱 (reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)^[11]、液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[12]、超高效液相色谱-质谱 (ultra-performance liquid chroma-

tography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 法^[13]等;其中 HPLC 法虽操作要求不高,价格较为低廉,但分析时间较长、重现性较差,血液样品前处理过程复杂;LC-MS/MS 法在上述方法中较为成熟、专属性好且准确度高,常作为首选方法^[14],但其成本昂贵,“基质效应”影响大且对操作人员要求较高。本研究所采用的 2D-LC-UV 可综合 HPLC 法与 LC-MS/MS 法的优点,较 HPLC 法精准度高、重现性

好,较质谱法及 LC-MS/MS 法无“基质效应”等,具体特点如下:1)本方法进样体积为 500 μL ,是 HPLC 和 LC-MS/MS 等方法进样量的 25 倍左右,可有效提高灵敏度与准确度;2)待测血浆样品处理步骤简单、操作简便,有机处理剂沉淀蛋白离心后上清液可直接进样,无需氮吹、复溶、萃取等操作;3)通过文献查阅,暂未发现使用 HPLC 法和 RP-HPLC 法建立同时测定 IM 及 NDI 血药浓度的方法,UPLC-MS/MS 法可同时检测 IM 及其代谢物浓度,但仅限于大鼠血浆^[15]。本研究应用的是全自动 2D-LC-UV 系统,其中间柱所具有的拦截与透过作用可实现不同化学结构药品或成分的共同测定^[6],故本方法可同时测定 IM 及 NDI 的血药浓度,且成功应用于临床患者的血药浓度检测;4)其他:本研究方法无“基质效应”,进样前色谱柱平衡仅需 15 ~ 20 min,样品定量分析完成过后也无需冲洗色谱柱,且操作简单,成本低廉。这些特点可在保证检测精准度的情况下大大提升临床应用的简便度,并降低成本。

IM 血药浓度与患者药物反应密切相关。B2222 回顾性研究中,有关 IM 患者血药浓度与药效关系的分析结果显示,获得完全缓解、部分缓解或者疾病无进展患者的血药浓度比未起上述疗效患者的血药浓度高,且 IM 血浆药物谷浓度 $C_0 > 1\ 100\ \mu\text{g/L}$ 的患者可获得更明显的临床获益,其无进展生存期要明显长于 $C_0 < 1\ 100\ \mu\text{g/L}$ 的患者^[16]。而 NDI 作为 IM 的活性代谢产物,具有与 IM 相似的药理活性^[17]。研究表明,患者服用 IM 后,其血药浓度、疗效及毒副反应表现存在较大的个体差异^[18],不同国家与地区患者人群的血药浓度及对 IM 的临床效应也有所不同^[19-21];本研究根据所建立的 2D-LC-UV 进行了临床应用,结果显示服用相同剂量 IM 的 GIST 患者,其 IM 血药浓度结果却 300.34 ~ 1 392.07 ng/mL 不等。IM 血药浓度的高低受多种因素影响,有研究结果表明白细胞数、体表面积、粒细胞数、酸性糖蛋白、肌酐清除率、白蛋白以及血红蛋白水平均有可能是改变 IM 药动学参数的重要协变量^[14];除此之外,肝肾功能等患者自身病理状况也是导致 IM 血药浓度产生个体化差异的关键因素之一:挪威专家进行回顾性研究^[22]发现,IM 稳态血药谷浓度随疾病进展而降低;一项评估不同肝功能水平的口服 IM 晚期肿瘤患者的药动学研究^[23]结果显示,不同程度的肝功能不全患者在使用平均剂量时,其稳态血药浓度比肝功能正常患者有所增加;赵曼等^[18]研究显示,轻中度肾功能异常的患者较肾功能正常的患者

调整药物剂量后的 $C_{\max}$ 和 AUC 均明显增加。近几年,愈来愈多研究发现,CYP 家族代谢酶、多药耐药蛋白、乳腺癌耐药蛋白、有机阳离子转运体 1 和有机阴离子转运蛋白等药代动力学相关基因多态性可导致 IM 在体内的药代动力学参数发生改变,故而引起个体间临床效应的差异^[24-27],如 CYP3A5 * 5 (6986A > G) 基因多态性研究中,携带 GG 基因型的个体与 AA 基因型相比,CYP3A5 酶的表达降低至少 0.1%,患者具有相对更高的 IM 血药浓度水平^[28]。故而 IM 血药浓度检测可体现个体药物治疗反应特点,为临床科学合理制定用药方案及实现个体化治疗、提高疗效以及降低不良反应风险起到重要作用。

关于 IM 有效血药浓度范围还未有明确指定,但现阶段较为公认的是慢性粒细胞白血病患者 IM 血药浓度大于 1 000 ng/mL、GIST 患者血药浓度大于 1 100 ng/mL 可作为最低有效治疗参考^[28-29],由于每个国家和地区患者人群的血药浓度存在差异,故关于中国患者有效血药浓度范围有待进一步研究。本研究主要建立了一种同时检测人血浆中 IM 及其代谢产物浓度的 2D-LC-UV,并于临床进行验证与应用。方法学研究结果显示专属性、灵敏度、日内、日间精密性(相对标准偏差 < 6%)及稳定性(相对标准偏差 < 5%)良好;回收率 > 90%;IM 线性范围 13.44 ~ 1 400.00 ng/mL ($R^2 = 0.9999$),NDI:13.17 ~ 1 372.00 ng/mL ($R^2 = 0.9999$),线性关系良好。该方法较传统 HPLC 法准确度高、重现性好,较 LC-MS/MS 法操作简便、无“基质效应”,2D-LC-UV 样品前处理简单,检测时间短且成本较为低廉,可用于临床 IM 血药浓度检测。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

[1] Herviou P, Thivat E, Richard D, et al. Therapeutic drug monitoring

- and tyrosine kinase inhibitors[J]. *Oncol Let*, 2016, 12(2): 1223-1232.
- [2] Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, *et al*. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(19): 3141-3147.
 - [3] Miura M, Takahashi N. Therapeutic drug management of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia patients[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2013, 54(10): 1720-1729.
 - [4] Picard S, Titier K, Etienne G, *et al*. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2007, 109(8): 3496-3499.
 - [5] 于悦. 阿帕替尼血药浓度检测方法的建立与验证以及真实世界应用分析[D]. 济南: 济南大学, 2019.
 - [6] 史香芬, 刘帅兵, 孙志勇, 等. 二维液相色谱测定伏立康唑血药浓度的研究[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(8): 1404-1408.
 - [7] 曲衍衍, 张晨宁, 王姝娜, 等. 基于全自动二维液相色谱的精神疾病靶症状的氯氮平有效血药浓度实验研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2019, 36(10): 926-933.
 - [8] 钟彩妮, 曾环思, 蒋家兵, 等. 二维液相色谱法测定人血清中丙戊酸浓度的不确定度[J]. *中南药学*, 2020, 18(7): 1181-1186.
 - [9] 尚翔, 姚树永, 刘威, 等. 二维液相色谱测定氨碘必利血药浓度的临床应用分析[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(5): 450-453.
 - [10] 周利娟, 汪闻, 唐原君, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中伊马替尼的浓度[A]. 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会. 苏州大学附属第一医院、北京卫新医药技术发展中心. 第九届全国治疗药物监测学术年会论文摘要集[C]. 苏州: 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会, 苏州大学附属第一医院、北京卫新医药技术发展中心, 2019. 2.
 - [11] 罗兴献, 黄琳, 李泰锋, 等. 反相高效液相色谱法同时测定伊马替尼及伏立康唑血药浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(1): 36-40.
 - [12] 王磊, 孙文利, 杨梓艺, 等. HPLC-MS/MS 法在伊马替尼、达沙替尼与尼洛替尼治疗 CML 患者血药浓度监测中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(14): 1992-1996.
 - [13] 张卫, 董吉, 缪丽燕. 超高效液相色谱-质谱法测定人血浆中伊马替尼的浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(14): 1329-1331.
 - [14] 杨龙伟, 张军. 胃肠道间质瘤患者伊马替尼血药浓度的监测及意义[J]. *医学信息*, 2019, 32(9): 51-53.
 - [15] 曹晓静, 陈瑞杰, 朱光辉. UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中伊马替尼及其代谢产物的含量及药代动力学研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(17): 2113-2116.
 - [16] Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, *et al*. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(19): 3141-3147.
 - [17] 赵曼. 伊马替尼及其代谢物血药浓度监测及在胃肠间质瘤患者中的临床应用分析[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
 - [18] 赵曼, 李国飞, 肇丽梅. 伊马替尼血药浓度影响因素研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(6): 647-651.
 - [19] Guilhot F, Hughes TP, Cortes J, *et al*. Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity trial[J]. *Haematologica*, 2012, 97(5): 731-738.
 - [20] Makhtar SM, Husin A, Baba AA, *et al*. Genetic variations in influx transporter gene SLC22A1 are associated with clinical responses to imatinib mesylate among Malaysian chronic myeloid leukaemia patients[J]. *J Genet*, 2018, 97(4): 835-842.
 - [21] Muzio ED, Polticelli F, Trezza V, *et al*. Imatinib binding to human serum albumin modulates heme association and reactivity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 560(20): 100-112.
 - [22] Hompland I. Clinical implications of repeated drug monitoring of imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumour[J]. *Clin Sarcoma Res*, 2016, 6: 21.
 - [23] Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44(9): 879-894.
 - [24] 邱海波, 庄玮, 王雪丁, 等. 胃肠间质瘤患者遗传因素与伊马替尼药动学个体差异的相关性研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2017, 20(9): 1031-1034.
 - [25] 曾晶, 徐萍, 姜志平. 伊马替尼药代动力学相关的基因多态性研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(2): 185-188.
 - [26] Singh O, Chan JY, Lin K, *et al*. SLC22A1-ABCB1 haplotype profiles predict imatinib pharmacokinetics in Asian patients with chronic myeloid leukemia[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51771.
 - [27] Nambu T, Hamada A, Nakashima R, *et al*. Association of SLC01B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(1): 114-119.
 - [28] 黄玲玲, 姚媛, 沈成银, 等. 伊马替尼疗效相关血药浓度和基因多态性研究进展[J]. *肿瘤药理学*, 2019, 9(4): 544-549, 571.
 - [29] Bins S, Eechoute K, Kloth JSL, *et al*. Prospective analysis in gist patients on the role of alpha-1 acid glycoprotein in imatinib exposure[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2016, 56(3): 1-6.