

二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及去甲伊马替尼药物浓度及临床应用

孔滢¹, 刘红¹, 彭洪薇¹, 江学辉², 邹德琴¹, 肖雄¹, 王峰³, 魏筱华^{1,4*} (1.南昌大学第一附属医院药学部, 南昌 330006; 2.南昌大学药学院, 南昌 330006; 3.湖南德米特仪器有限公司, 长沙 410000; 4.江西省临床医学科学研究院临床药理研究所, 南昌 330006)

摘要: 目的 基于全自动二维液相色谱技术, 建立一种能同时测定人血浆中伊马替尼及活性代谢物 *N*-去甲伊马替尼简单而灵敏的方法, 并应用于临床检测。方法 标本经简单去蛋白前处理后直接进样分析, 待测物在一维色谱柱 Aston SX1(3.5 mm×25 mm, 5 μm)上进行初步萃取分离, 通过中间柱 Aston SCB(4.6 mm×10 mm, 3.5 μm)转移至二维色谱柱 Aston SCB(4.6 mm×125 mm, 5 μm)进行二次分离分析, 一维流动相为 CAA-1D 移动相, 流速 0.8 mL·min⁻¹; 二维流动相为伊马替尼-2D 移动相, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 264/235 nm。结果 伊马替尼与血液中其他杂质分离良好, 伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼浓度分别在 13.44~1 400 ng·mL⁻¹ 及 13.17~1 372 ng·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系($r^2=0.999\ 9$, $r^2=0.999\ 9$), 伊马替尼 3 个浓度水平(33.6, 896, 1 120 ng·mL⁻¹)及 *N*-去甲伊马替尼 3 个浓度水平(32.93, 878.08, 1 097.60 ng·mL⁻¹)回收率分别为>96%及 98%, 浓度日内、日间 RSD 均<5.0%。结论 该方法准确度高, 重现性好, 自动化程度高, 相比传统 HPLC 更具优越性, 适用于临床伊马替尼血药浓度检测及其药动学研究。

关键词: 二维液相色谱; 伊马替尼; *N*-去甲伊马替尼; 治疗药物监测

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)17-2229-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.17.009

引用本文: 孔滢, 刘红, 彭洪薇, 等. 二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及去甲伊马替尼药物浓度及临床应用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2229-2235.

Simultaneous Determination of Imatinib and *N*-desmethyl Imatinib in Human Plasma by Two-Dimensional Liquid Chromatography and Its Clinical Application

KONG Ying¹, LIU Hong¹, PENG Hongwei¹, JIANG Xuehui², ZOU Deqin¹, XIAO Xiong¹, WANG Feng³, WEI Xiaohua^{1,4*} (1.Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2.School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3.Hunan Demeter Instrument Co., Ltd., Changsha 410000, China; 4.Institute of Clinical Pharmacology, Jiangxi Academy of Clinical Medicine, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simple and sensitive method based on two-dimensional liquid chromatography for the determination of imatinib and *N*-desmethyl imatinib in human plasma. **METHODS** Samples were directly injected and analyzed after simple deproteinization pretreatment. Samples were preliminarily extracted and separated with on the one-dimensional chromatographic column Aston SX1(3.5 mm×25 mm, 5 μm), and transferred from the one-dimension chromatographic column to the two-dimension chromatographic column as Aston SCB(4.6 mm×125 mm, 5 μm) through the intermediate column Aston SCB(4.6 mm×10 mm, 3.5 μm) for secondary separation analysis. The one-dimensional mobile phase was CAA-1D extractant with the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and the two-dimensional mobile phase was imatinib-2D flowing phase with the flow rate of 1.2 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C. The concentration of imatinib and *N*-desmethyl imatinib were tested under the the wavelength of 264/235 nm. **RESULTS** It was found that the plasma concentration of imatinib and *N*-desmethyl imatinib showed a good linear relationship with their peak areas over the concentration range of 13.44~1 400 ng·mL⁻¹ and 13.17~1 372 ng·mL⁻¹, respectively($r^2=0.999\ 9$, $r^2=0.999\ 9$). The mean recoveries obtained from three concentrations of imatinib(33.60, 896, 1 120 ng·mL⁻¹) and *N*-desmethyl imatinib(32.93, 878.08, 1 097.6 ng·mL⁻¹) were higher than 96% and 98%, respectively. The intra-day and inter-day RSD for imatinib and *N*-desmethyl imatinib were both <5.0%. **CONCLUSION** The method showed good accuracy, good reproducibility and high degree of automation. This method is more superior than traditional HPLC and can be applied to determine the clinical plasma concentration of imatinib and its pharmacokinetic studies.

KEYWORDS: two-dimensional liquid chromatography; imatinib; *N*-desmethyl imatinib; therapeutic drug monitoring

基金项目: 江西省科学技术厅重点研发项目(20201BBG71008)

作者简介: 孔滢, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: 651602736@qq.com

*通信作者: 魏筱华, 女, 主任药师 E-mail: wxh-hello@163.com

伊马替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂,其机制主要是通过占据包括 BCR-Abl, c-KIT 和血小板衍生的生长因子受体(PDGFR α 和 PDGFR β)在内的几种酪氨酸激酶分子的三磷酸腺苷结合位点来阻止下游蛋白底物的磷酸化,影响肿瘤细胞生长周期进而抑制肿瘤生长增殖^[1-2],目前作为靶向药物用于胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)及慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)的临床一线治疗。多项研究表明伊马替尼可显著改善 GIST 患者^[3-4]及 CML 患者中晚期患者预后^[5]。研究表明,伊马替尼血浆药物谷浓度($C_{\min}$)与疾病治疗的效果关系密切相关,GIST 患者伊马替尼 $C_{\min}>1\ 100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可具有更好的临床获益,相反 $C_{\min}<1\ 100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 临床疗效降低,疾病进展加快^[6];另有研究表明 CML 患者 $C_{\min}>1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可具有更好的临床治疗效果^[7];国内一项真实世界临床数据也表明,服用伊马替尼后其血浆药物稳态谷浓度达到 $1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的患者其完全及主要分子学反应率显著高于未达 $1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的患者^[5]。受基因多态性、环境、病理生理等多重因素的影响,不同患者服药后血药谷浓度可相差 7~40 倍,且临床合并使用的多种药物可影响其体内代谢过程^[8-10],进而造成伊马替尼耐药问题。鉴于此,中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2017 年版)中指出,推荐伊马替尼一线治疗患者、药物不良反应较重患者及未遵从医嘱用药患者进行伊马替尼血浆药物浓度检测^[11],对于指导患者个体化用药,改善临床预后具有重要意义。另有研究表明,伊马替尼经 CYP3A4、CYP3A5 代谢的代谢产物 *N*-去甲伊马替尼同样具有生物活性,且代谢比率 >0.274 时,疗效显著减弱^[12],因此,在监测伊马替尼血药浓度的同时,还应关注其活性代谢产物 *N*-去甲伊马替尼的血药浓度。

对于伊马替尼血药浓度监测研究多集中在国外^[13],中国伊马替尼治疗药物浓度监测开展较晚,目前中国报道的伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼血药浓度检测方法主要采用 HPLC 及 LC-MS/MS。但 HPLC 尚存在一定的局限性,样品前处理需要乙酸乙酯-正己烷进行液液萃取,操作时间长,存在有机试剂挥发对操作人员的潜在危害,且 HPLC 难以分离血液中的多种杂质,样本进样量受限,难以达到定量限的要求,操作繁琐耗时,不利于临床多样本的检测^[14];LC-MS/MS 检测精准、灵敏

度高,此方法在国外开展的伊马替尼血药浓度检测中应用较多^[15],但是由于检测成本较高,难以满足临床大量样本的检测需求,因而在我国其临床应用受限。因此,建立快速、准确、能同时测定伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼血药浓度的检测方法,对于临床指导伊马替尼个体化用药、改善临床预后具有重要意义。本研究基于全自动二维液相色谱技术,旨在对于同时检测伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼血药浓度的方法进行优质化探索,本方法进样量大,线性范围广,样本前处理操作简单,可满足临床大样本检测需求。

1 材料

1.1 仪器

2D-LC-UV 系统由全自动二维液相色谱耦合仪 FLC 2801(湖南德米特仪器有限公司)及岛津 LC-20A 液相色谱部件构成;微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);XW-80A 涡旋混悬器(上海琪特分析仪器有限公司);HR-200 电子分析天平(日本 AND)。

1.2 药品与试剂

伊马替尼对照品(批号:1-JSH-1-1;纯度:98%)、去甲伊马替尼对照品(批号:1-JSH-2-1;纯度:98%)均购自 Toronto Research Chemicals;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购自 ACS;磷酸(分析纯)、磷酸氢二铵(分析纯)、氨水(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;纯净水为纯水仪所制(不低于 GB17323 执行标准);CAA-1D 移动相[批号:20200924-1,甲醇:乙腈:25 mmol $\cdot$ L⁻¹磷酸铵盐水溶液=1:3:3,氨水调 pH 至 7.0]、伊马替尼-2D 移动相[批号:20200716-1,1.0 mmol $\cdot$ L⁻¹磷酸氢二铵水溶液(磷酸调 pH 至 7.4):乙腈=65:35]、ORG-1 去蛋白剂(批号:20201118-1)均购自湖南德米特仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 第一维色谱系统中,色谱柱 Aston SX1(3.5 mm $\times$ 25 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-乙腈-25 mmol $\cdot$ L⁻¹磷酸铵盐水溶液(1:3:3),氨水调 pH 至 7.0,第一维泵流速 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹;中间柱:Aston SCB(4.6 mm $\times$ 10 mm, 3.5 μ m),流动相为纯水;二维色谱柱 Aston SCB(4.6 mm $\times$ 125 mm, 5 μ m),2D 移动相为 1.0 mmol $\cdot$ L⁻¹磷酸氢二铵水溶液(磷酸调 pH 至 7.4)-乙腈(65:35),第二维泵流速

为 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。3 根色谱柱处于同一柱温箱中，柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，紫外检测波长： $264/235\text{ nm}$ ，进样量 $500\text{ }\mu\text{L}$ 。本实验时间程序设置见表 1。

表 1 FLC2801 系统运行时间程序

Tab. 1 Time program for online column extraction of FLC 2801

工序流程	工序 1	工序 2	工序 3
时间	0~2.00 min	2.00~3.30 min	3.33~12.00 min
系统工作 状态	LC1 色谱柱工 作，进行样品 初级分离	LC1 与中间柱连 通，样品中目 标组分的捕获	LC2 与中间柱连 通，样品中目标 组分的分离检测

2.1.2 伊马替尼对照品溶液及质控样品的制备 精密称量伊马替尼对照品 7.000 mg ，用 50% 甲醇溶解并定容至 25 mL ，配制成浓度为 $280.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的伊马替尼储备液。精密量取 5 mL 于 100 mL 量瓶中，用 50% 甲醇定容至刻度，即得浓度为 $14.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的伊马替尼对照品溶液。

精密量取上述伊马替尼对照品溶液 8 mL 于 100 mL 量瓶中，用空白血浆定容至刻度，得到浓度为 $1.12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度质控样品；精密量取上述高浓度伊马替尼质控样品 40 mL ，用空白血浆定容至 50 mL ，得到浓度为 $0.896\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的中浓度质控样品；精密量取上述高浓度伊马替尼质控样品 3 mL ，用空白血浆定容至 100 mL ，得到浓度为 $0.033\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低浓度质控样品。

2.1.3 *N*-去甲伊马替尼对照品溶液及质控样品的制备 精密称量 *N*-去甲伊马替尼对照品 6.860 mg ，用 50% 甲醇溶解并定容至 25 mL ，配制成浓度为 $274.40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *N*-去甲伊马替尼储备液。精密量取 5 mL 上述 *N*-去甲伊马替尼储备液于 100 mL 量瓶中，用 50% 甲醇定容至刻度，配制成浓度为 $13.72\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的去甲伊马替尼对照品溶液。

精密量取上述 *N*-去甲伊马替尼对照品溶液 8 mL ，用空白血浆定容至 100 mL ，得到浓度为 $1.097\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度质控样品；精密量取上述 *N*-去甲伊马替尼高浓度质控样品 40 mL 用空白血浆定容至 50 mL ，得到浓度为 $0.878\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的中浓度质控样品；精密量取上述 *N*-去甲伊马替尼高浓度质控样品 3 mL 用空白血浆定容至 100 mL ，得到终浓度 $0.032\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低浓度质控样品。

2.1.4 样品前处理 蛋白沉淀法：收集患者 $2\sim 3\text{ mL}$ 血液样品(EDTA 抗凝管采集)， $2\text{ }000\times g$ 离心 5 min 分离血浆，准确量取 1.0 mL ORG-1 去蛋白剂至

1.5 mL EP 管中，再准确加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 血浆样本，涡旋振荡 1 min 后， $14\text{ }000\times g$ 高速离心 15 min ，取上清液转移至进样瓶中待测。

2.2 方法学验证

2.2.1 色谱行为和专属性考察 分别取空白血浆、伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼中浓度质控品，以及患者口服甲磺酸伊马替尼片($400\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$)后的血浆样本，分别按“2.1.4”项下处理，按“2.1.1”项下条件进行测定，色谱图见图 1。由此可见，伊马替尼保留时间为 10.38 min ，*N*-去甲伊马替尼的保留时间为 7.40 min 。在对照品及患者血液样本中，伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼峰型及分离度均良好，且血浆中内源性物质及其他杂质均不干扰伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼的分离和测定。

2.2.2 标准曲线测定 精密量取适量伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼对照品溶液，用空白血浆依次稀释成系列浓度溶液，其中伊马替尼终浓度依次为 13.44 ， 44.80 ， 112.00 ， 280.00 ， 700.00 ， $1\text{ }400.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，*N*-去甲伊马替尼终浓度依次为 13.17 ， 43.90 ， 109.76 ， 274.40 ， 686.00 ， $1\text{ }372.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 构成标准曲线 6 个浓度梯度。按

“2.1.4”条件处理并测定，各浓度色谱图见图 2。以 6 个不同浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，分别以伊马替尼及去甲伊马替尼的峰面积对浓度进行线性回归，得到伊马替尼线性回归方程为 $Y=4\text{ }156.24X-17\text{ }550.50(r^2=0.999\text{ }9)$ ，线性范围 $13.44\sim 1\text{ }400.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；*N*-去甲伊马替尼线性回归方程为 $Y=2\text{ }974.73X-23\text{ }814.30(r^2=0.999\text{ }9)$ ，线性范围 $13.17\sim 1\text{ }372.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 定量限测定 取配制好的伊马替尼 $6.72\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及 *N*-去甲伊马替尼 $6.58\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品(以 $S/N=10$ 确定定量限样品浓度)，按“2.1.4”项下方法进行处理($n=6$)并考察其准确度和精密度，见表 2。结果表明，在该定量限浓度下，伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼浓度变异系数分别为 2.2% 及 1.9% ，平均回收率分别为 94.60% 及 99.54% ，符合生物样品测定相关要求。

2.2.4 回收率和精密度考察 以空白血浆为基质，按“2.1.2”及“2.1.3”项下方法分别制备伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼高、中、低 3 个浓度水平的质控样品($n=5$)，分别按“2.1.4”项下方法处理后进样分析，记录峰面积为 AI ；另以伊马替尼二维流动相

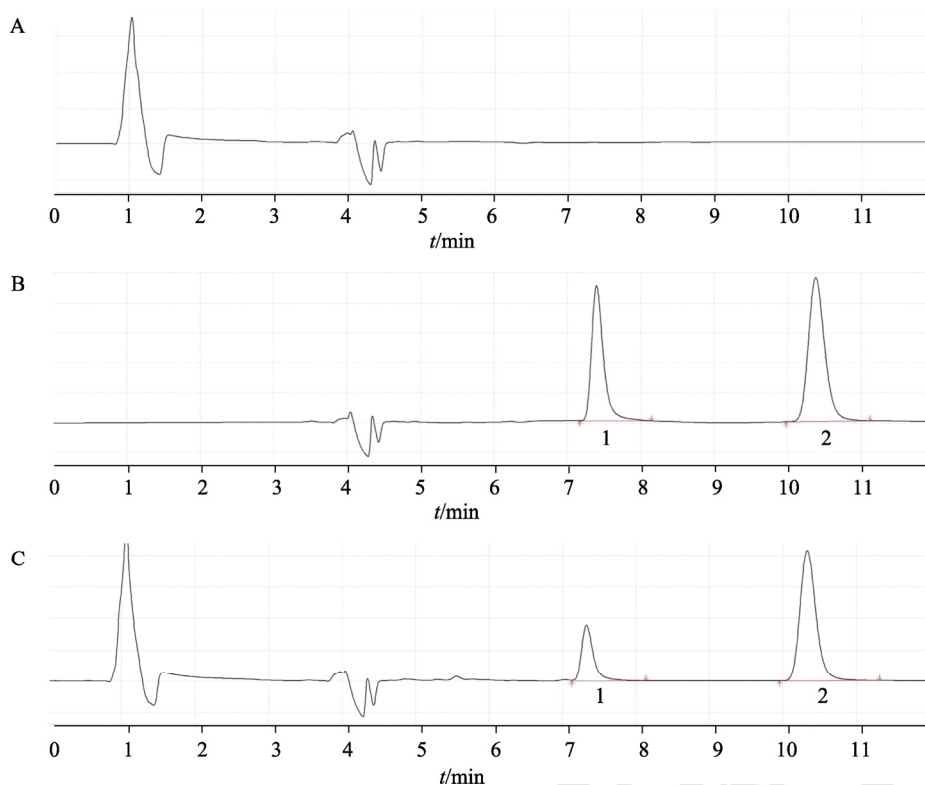


图1 伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼 2D-LC-UV 色谱图

A-空白人血浆; B-伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼对照品; C-患者服用伊马替尼后血浆样品; 1-*N*-去甲伊马替尼; 2-伊马替尼。

Fig. 1 2D-LC-UV chromatograms of imatinib and *N*-desmethyl imatinib

A-blank human plasma; B-reference solution of imatinib and *N*-desmethyl imatinib; C-plasma from patients after administration of imatinib; 1-*N*-desmethyl imatinib; 2-imatinib.

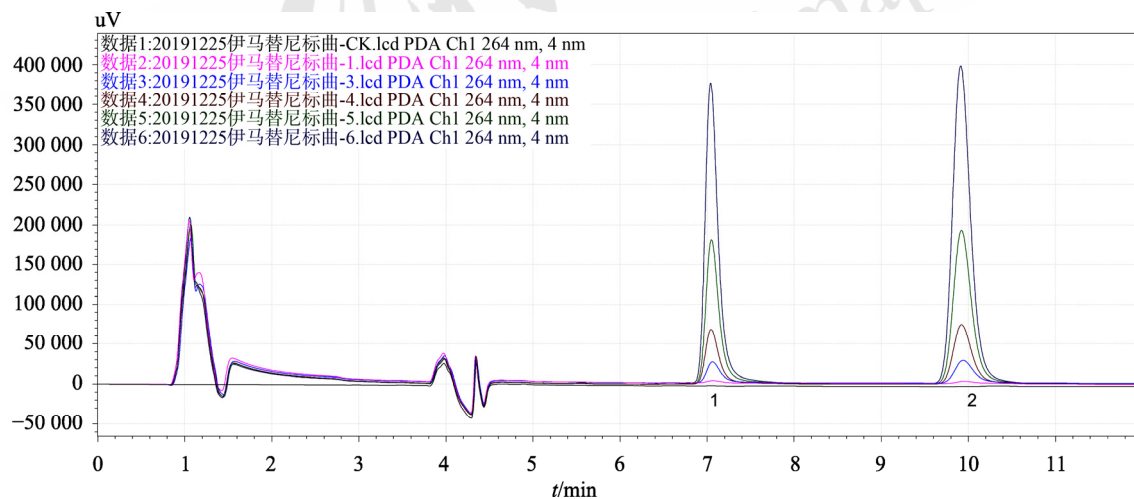


图2 伊马替尼及 *N*-去甲伊马替尼标准曲线不同浓度色谱图

数据 1-伊马替尼浓度 $13.44 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $13.17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 数据 2-伊马替尼浓度 $44.80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $43.90 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 数据 3-伊马替尼浓度 $112.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $109.76 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 数据 4-伊马替尼浓度 $280.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $274.40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 数据 5-伊马替尼浓度 $700.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $686.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 数据 6-伊马替尼浓度 $1400.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, *N*-去甲伊马替尼浓度 $1372.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1-*N*-去甲伊马替尼; 2-伊马替尼。

Fig. 2 Chromatograms of various concentrations in the standard curve of imatinib and *N*-desmethyl imatinib

Data 1-Concentrations of imatinib and *N*-desmethyl Imatinib were $13.44 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $13.17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; data 2-concentrations of imatinib and *N*-desmethyl imatinib were $44.80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $43.90 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; data 3-concentrations of imatinib and *N*-desmethyl imatinib were $112.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $109.76 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; data 4-concentrations of imatinib and *N*-desmethyl imatinib were $280.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $274.40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; data 5-concentrations of imatinib and *N*-desmethyl imatinib were $700.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $686.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; data 6-concentrations of imatinib and *N*-desmethyl Imatinib were $1400.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $1372.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; 1-*N*-desmethyl imatinib; 2-imatinib.

表2 伊马替尼及N-去甲伊马替尼定量限(n=6)

Tab. 2 Limit of quantitation of imatinib and N-desmethy imatinib(n=6)

药物	浓度/ ng·mL ⁻¹	测定值/ ng·mL ⁻¹	RSD/%	回收率/%
伊马替尼	6.72	6.38±0.14	2.2	94.60
N-去甲伊马替尼	6.58	6.51±0.12	1.9	99.54

为基质,按“2.1.2”及“2.1.3”项下方法分别制备伊马替尼及N-去甲伊马替尼高、中、低3个浓度水平样品并直接进样分析(n=5),记录峰面积为A₂,以A₁/A₂计算回收率。

取配制好的伊马替尼高、中、低3个水平浓度的质控样品,N-去甲伊马替尼低、中、高3个水平浓度的质控样品(n=5),按“2.1.4”项下方法进行处理,测出结果代入线性回归方程计算浓度,比较该浓度与理论浓度值,得出方法的回收率和变异系数,检验准确度和日内精密度。连续3d配制并分别测定质控样品,考察方法的日间精密度,结果见表3。由表3可知,建立的伊马替尼及N-去甲伊马替尼分析方法的回收率分别>96%及93%,浓度日内、日间变异系数均<5.0%。说明该分析方法准确性高、重现性好,符合生物等效性研究的方法要求。

2.2.5 样品稳定性试验 取“2.1.2”项下高、中、低3个浓度的质控样品(n=3),按“2.1.4”项下方法进行处理,按“2.1.1”项下色谱条件,分别考察样本在4℃放置24h,-20℃放置30d的样品稳定性,结果表明4℃放置24h的条件下伊马替尼及N-去甲伊马替尼的样本回收率分别>93%及>88%,-20℃放置30d的条件下伊马替尼及去甲伊马替尼样本回收率分别>98%及>93%,样品浓度RSD均<5%。表明样品在4℃放置24h以内或-20℃放置30d以内其稳定性良好,均符合稳定性要求。

表3 伊马替尼及N-去甲伊马替尼提取回收率及日内、日间精密度(n=5)

Tab. 3 Determination of extract recovery, intra-day and inter-day precision of imatinib and N-desmethy imatinib(n=5)

药物	浓度/ng·mL ⁻¹	提取回收率/%	日内(n=5)			日间(n=5)		
			测定值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%	测定值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%
伊马替尼	33.60	96.70±3.51	32.56±0.41	1.3	96.90	32.41±0.51	2.1	96.46
	896.00	97.38±4.07	891.86±2.52	0.3	99.54	895.24±6.18	1.1	99.92
	1 120.00	98.01±4.56	1 086.36±43.80	4.0	97.00	1 104.95±32.85	3.2	98.66
N-去甲伊马替尼	32.93	99.42±5.57	31.46±1.03	3.3	95.54	32.12±0.80	2.5	97.54
	878.08	99.62±4.29	874.07±4.06	0.5	99.54	874.74±4.41	0.5	99.62
	1 097.60	98.80±6.17	1 033.13±4.36	0.4	94.13	1 027.74±31.49	3.1	93.64

2.3 临床应用

南昌大学第一附属医院2021年2月—5月,基于二维液相色谱技术,应用该方法检测患者伊马替尼血药浓度标本共65例,其中男35例,女30例,14例来源于CML患者,51例来源于GIST患者。患者常规服用甲磺酸伊马替尼片(400 mg qd)达稳态后,于服药前2h内空腹采血,采血管使用EDTA抗凝管(淡紫色帽盖),2 200×g离心5 min收集血浆,应用本方法进行伊马替尼及其代谢物N-去甲伊马替尼血浆药物谷浓度检测。经统计分析,其中2例患者检测结果低于检测限,经随访,为患者未遵从医嘱按时服用药物所致,其余患者均应用本方法检测得到伊马替尼及去甲伊马替尼血药浓度结果。本研究临床检测结果也表明,不同个体之间伊马替尼血药浓度及其代谢比率差异较大,不同患者按照400 mg·d⁻¹日剂量服用药物后,伊马替尼谷浓度差异可高达38.87倍。所有常规服用伊马替尼患者的血药浓度波动范围为68.63~4 158.76 ng·mL⁻¹,平均谷浓度为1 499.34 ng·mL⁻¹,去甲伊马替尼血药浓度变化范围为138.08~949.84 ng·mL⁻¹,平均谷浓度为394.19 ng·mL⁻¹。其中男性患者伊马替尼及去甲伊马替尼平均C_{min}分别为1 447.75 ng·mL⁻¹,373.40 ng·mL⁻¹,女性患者伊马替尼及去甲伊马替尼平均C_{min}分别为1 566.80 ng·mL⁻¹,421.37 ng·mL⁻¹,女性伊马替尼及N-去甲伊马替尼C_{min}略高于男性,但差异无统计学意义。患者具体血药浓度监测结果见表4(随机列举10例)。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

有研究报道采用HPLC同时检测伊马替尼及去甲伊马替尼,但直接蛋白沉淀法前处理后,不能完全达到定量限要求,增加进样量后则分离度下降,为满足分离度需求,则需要乙酸乙酯-正己

表4 患者服药后伊马替尼及N-去甲伊马替尼血浆药物谷浓度(n=10)

Tab. 4 Concentration of imatinib and N-desmethy imatinib in plasma from patients after administration(n=10)

患者	性别	疾病	年龄/ 岁	服药剂量/ mg·d ⁻¹	伊马替尼 血药浓度/ ng·mL ⁻¹	去甲伊马替尼 血药浓度/ ng·mL ⁻¹
1	男	GIST	74	400	573.85	168.63
2	女	CML	58	400	2 400.00	473.02
3	男	GIST	63	400	1 105.84	391.73
4	男	CML	24	400	1 680.00	505.15
5	男	GIST	57	400	765.63	351.84
6	男	GIST	53	400	1 149.47	201.76
7	女	GIST	56	400	2 226.12	210.77
8	女	CML	51	400	1 053.93	330.97
9	女	GIST	43	400	2 227.41	626.88
10	男	GIST	45	400	107.00	162.47

烷液液萃取, 前处理繁杂; 因人体血液中存在较多复杂成分可干扰样品检测, 此前报道的检测方法多采用内标法定量, 需要准确称量添加内标物质, 操作繁琐耗时, 不利于临床多样本的检测^[14]。本方法采用“柱-柱转移”的二维色谱系统, 通过色谱工作站设置时间程序自动化完成样品的二维分离与检测, SX1-SCB 色谱柱是基于离子-反相二维液相原理, 依据抗肿瘤药物伊马替尼的分子结构含碱性基团和疏水基团这一特征, 首先在 Aston SX1 一维色谱柱上, 将水溶性杂质进行截留分离, 而疏水的伊马替尼及 N-去甲伊马替尼则被中间柱捕获后洗脱至二维色谱柱, 血液中的干扰物质可在进入二维色谱柱分析前被拦截, 二维 Aston SCB 色谱柱采用反相色谱柱, 可根据目标物质极性不同, 进一步分离伊马替尼、N-去甲伊马替尼以及患者血液标本中可能存在的其他疏水性药物。通过优化色谱系统, 伊马替尼及代谢产物 N-去甲伊马替尼可达到更好的分离效果, 且不受血浆中其他杂质的干扰。

3.2 流动相及前处理方法的选择

本研究在实验过程中通过探索一维及二维流动相中甲醇、乙腈及磷酸铵盐水溶液的比例及 pH, 并考察其对伊马替尼及 N-去甲伊马替尼保留时间及分离度的影响。因伊马替尼分子结构中含有碱性基团, 流动相的 pH 可影响目标物质的分离以及峰型, 最终确定一维流动相比例为甲醇: 乙腈: 25 mmol·L⁻¹ 磷酸铵盐水溶液=1: 3: 3, 氨水调 pH 至 7.0, 二维流动相的比例为 1.0 mmol·L⁻¹ 磷酸氢

二铵水溶液(磷酸调 pH 至 7.4): 乙腈=65: 35。在该条件下可同时较短的保留时间内检出伊马替尼及 N-去甲伊马替尼, 不受血液中内源性物质干扰并具有良好的分离度, 该流动相成分中缓冲盐含量低, 对色谱柱损伤小, 峰型良好且基线平稳不易出现漂移, 成本低廉, 配制操作简便。本研究采用直接蛋白沉淀法进行样本前处理, 前处理液成分为乙腈, 只需简单地震荡离心即可, 可节省样本前处理的时间且克服萃取过程中有机试剂挥发对操作人员的潜在危害。

3.3 线性范围及样本稳定性探索

由于伊马替尼血药浓度在国内尚未定义明确的治疗参考范围, 多数研究认为血浆药物稳态谷浓度达到 1 000.00 ng·mL⁻¹ 的患者具有更高的分子学反应率及更好的临床疗效^[16-17], 基于此, 本方法初次建立时探索性将伊马替尼及 N-去甲伊马替尼的线性范围分别拟定在 13.44~1 400.00 ng·mL⁻¹ 及 13.17~1 372.00 ng·mL⁻¹。方法学验证表明, 本方法在该线性范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r^2=0.999\ 9$, $r^2=0.999\ 9$), 其检测限及回收率均相对于 HPLC 进一步优化。根据本研究临床检测数据显示, 不同患者间血药浓度差异较大, 部分患者伊马替尼血药浓度可超过标准曲线最高值 1 400.00 ng·mL⁻¹, 个别患者可>4 000.00 ng·mL⁻¹, 此类标本需要进行稀释后检测, 鉴于此, 本研究拟进一步扩大伊马替尼及 N-去甲伊马替尼的线性范围, 拟将伊马替尼标准曲线最高浓度增加至 5 000.00 ng·mL⁻¹。针对日常检验工作中出现临床送检样本不能及时检测的情况, 常将血浆样本 4℃ 短期保存或 -20℃ 较长时间保存, 因此本研究样品稳定性实验中拟将伊马替尼及去甲伊马替尼样本分别放置于 4℃、24 h, -20℃、30 d 分别检测其浓度并考察样本稳定性, 结果表明在该条件下, 伊马替尼及去甲伊马替尼稳定性良好, 为伊马替尼血药浓度检测工作中标本的储存提供参考依据。

3.4 临床应用探讨

本方法能同时检测伊马替尼及其活性代谢产物, 可为进一步研究伊马替尼体内代谢通路及药物代谢动力学提供方法学基础。患者检测结果体现极大的个体差异, 提示临床医师可根据血药浓度检测结果并结合患者病情进行伊马替尼给药剂量调整, 患者在服用伊马替尼治疗过程中极有必要在血药浓度监测的指导下进行个体化用药。但

本研究中因临床样本有限,未能进一步探讨伊马替尼血药浓度个体差异与基因多态性、临床预后的关系,有待基于此方法学进一步研究。

综上所述,本研究基于二维液相色谱技术对伊马替尼检测方法进一步优化探索。该方法满足生物等效性要求,操作简便、重现性好,检测速度快,具有较高的准确性及稳定性,能够满足临床大样本的检测需求,为指导伊马替尼临床个体化用药及其药动学研究提供方法学参考。

REFERENCES

- [1] HAN J M, YEE J, CHO Y S, et al. Factors influencing imatinib-induced hepatotoxicity[J]. *Cancer Res Treat*, 2020, 52(1): 181-188.
- [2] SALEM W, LI K L, KRAPP C, et al. Imatinib treatments have long-term impact on placentation and embryo survival[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2535.
- [3] YANG L W, ZHANG J. Monitoring and significance of imatinib plasma concentration in patients with gastrointestinal stromal tumor[J]. *Med Inf(医学信息)*, 2019, 32(9): 51-53.
- [4] REICHARDT P. The story of imatinib in GIST - a journey through the development of a targeted therapy[J]. *Oncol Res Treat*, 2018, 41(7/8): 472-477.
- [5] YOU J H, CHEN J, ZHOU L, et al. Analysis of correlation between plasma trough level and response of generic imatinib in the treatment of Chinese patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Chin J Hematol(中华血液学杂志)*, 2019, 40(11): 939-942.
- [6] YIN Y, XIANG J, TANG S M, et al. A lower dosage of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumors with toxicity of the treatment[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(49): e5488. Doi: 10.1097/MD.0000000000005488.
- [7] 张晓旭, 郭志辉, 缴万里, 等. 酪氨酸激酶抑制剂相关治疗药物监测的研究进展[J]. *中国药房*, 2021, 32(1): 121-128.
- [8] CHEN J F. Advances in drug-drug interaction related to pharmacokinetics of imatinib[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(12): 1596-1599.
- [9] GARCÍA-FERRER M, WOJNICZ A, MEJÍA G, et al. Utility of therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib in chronic myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Ther*, 2019, 41(12): 2558-2570.e7.
- [10] LIN G T, XU T, LUO J, et al. Effects of Fufang Kushen injection on pharmacokinetics of imatinib in rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2016, 33(12): 1547-1552.
- [11] SHEN L, CAO H, QIN S K, et al. Chinese consensus guidelines for diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumor(2017)[J]. *J Multidiscip Cancer Manag: Electron Version(肿瘤综合治疗电子杂志)*, 2018, 4(1): 31-43.
- [12] ZHAO M. Monitoring the concentration of imatinib and its metabolites and its application in patients with gastrointestinal stromal tumor[D]. Shenyang: China Medical University, 2020.
- [13] PEARCE C M, RESMINI M. Towards point of care systems for the therapeutic drug monitoring of imatinib[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(24): 5925-5933.
- [14] LUO X X, HUANG L, LI T F, et al. Simultaneous determination of concentrations of imatinib and *N*-desmethyl imatinib in human plasma by HPLC[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2018, 27(10): 1159-1164.
- [15] ONMAZ D E, ABUSOGLU S, UNLU A, et al. Determination of serum imatinib and its' metabolite in patients chronic myeloid leukemia[J]. *Clin Chim Acta*, 2019(497): 120-124.
- [16] MIURA M, TAKAHASHI N. Management using the plasma concentration of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myelogenous leukemia: an update[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2019, 60(9): 1140-1147.
- [17] ZHANG J, JIANG Z P, XU P, et al. Study on monitoring of imatinib serum level guides management of chronic myelogenous leukemia patients[J]. *China Biotechnol(中国生物工程杂志)*, 2019, 39(9): 25-32.

收稿日期: 2021-06-29

(本文责编: 陈怡心)