

LC-MS/MS 法测定乳腺癌患者血浆中拉帕替尼浓度

Determination of lapatinib concentration in plasma of breast cancer patients by LC-MS/MS

黄越, 项迎春, 韩奇,
李力

(浙江医院 药剂科 浙江 杭州 310013)

HUANG Yue, XIANG Ying-chun,
HAN QI, LI Li(Department of Pharmacy, Zhejiang
Hospital, Hangzhou 310013, Zhejiang
Province, China)

摘要:目的 建立一种快速、灵敏的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测乳腺癌患者血浆中拉帕替尼的浓度。方法 以厄洛替尼为内标,血浆样品经乙腈直接沉淀蛋白后,经CAPCELL PAK-C₁₈(50 mm×100 mm, 3.5 μm)色谱柱分离,流动相为乙腈-水(均含0.1%甲酸水)(88:12 v/v),柱温30℃,分析时间3 min。用电喷雾离子化源,正离子方式,多反应监测(MRM)模式。方法验证内容包括专属性、标准曲线与定量下限、精密度与准确度、基质效应、稳定性。结果 拉帕替尼在0.02~5.0 μg·mL⁻¹线性关系良好($r=0.9943$);标准曲线方程为 $Y=2.38X-4.85\times 10^{-3}$,最低定量下限和低、中、高浓度的准确度在94.0%~106.0%;批内和批间RSD均小于15%;拉帕替尼和内标的提取回收率85.2%~94.6%,低、中、高质量浓度的基质效应分别为96.0%,103.1%和105.0%。稳定性考察项目均符合要求。结论 建立的LC-MS/MS方法特异性强,灵敏度高,可以满足临床药物监测及药代动力学研究的需要。

关键词: 拉帕替尼;液质联用法;血药浓度

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.06.023

中图分类号: R97 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2022)06-0585-04

Abstract: Objective To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of lapatinib in breast cancer patients. **Methods** Erlotinib was used as the internal standard. The analyte and internal standard were extracted from plasma by protein precipitation with acetonitrile and chromatographed on CAPCELL PAK-C₁₈ (50 mm×100 mm, 3.5 μm), mobile phase was consisted of acetonitrile-water (both of containing 0.1% formic acid), The column temperature was 30℃, the whole analytical time was 3 min. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive multiple reaction monitoring (MRM) mode. The selectivity standard curve, precision and accuracy, extraction recoveries, matrix effect and stability were investigated. **Results** The standard curves were demonstrated to be liner in the range of 0.02-5.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9943$), the RSD of inter-day and intra-day for four different concentration levels were less than 15%, The mean extract recoveries were between 85.2% and 94.6%. The matrix effects of LQC, MQC and HQC were 96.0%, 103.1% and 105.0% respectively, all stability tests met the acceptance criteria. **Conclusion** The method is specific, sensitive and suitable for clinical determination of lapatinib in breast patients plasma

收稿日期: 2021-11-15

定稿日期: 2022-01-20

基金项目: 国家科技重大专项项目-老年病新药临床技术平台基金资助项目(2013ZX09303005); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ15H310003)

作者简介: 黄越(1988-),女,硕士,药师,主要从事医院药学工作

通信作者: 李力,副主任药师

Tel: (0571) 81595229

E-mail: zjyylili@163.com

efficiently, suitable for the pharmacokinetic study of and the monitoring of plasma concentration.

Key words: lapatinib; LC-MS/MS; plasma concentration

乳腺癌是严重威胁女性健康的重大恶性疾病, 2020年的统计数据表明, 乳腺癌已经取代肺癌成为全球发病人数最多的瘤种^[1-2]。拉帕替尼(lapatinib)是一种口服的表皮生长因子受体(EGFR)及抑制人表皮生长因子受体-1(HER-1)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)双靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂, 2007年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于HER-2阳性既往接受过曲妥珠单抗治疗的晚期或转移性乳腺癌^[3-4]。有关拉帕替尼的血药浓度测定方法国外已有报道^[5-7]。本研究拟建立一种快速、简便的拉帕替尼检测方法, 并初步应用于乳腺癌患者血药浓度测定。

材料与方法

1 材料

药品 拉帕替尼, 纯度: > 99.0%, 批号: L126696, 阿拉丁试剂提供; 盐酸厄洛替尼, 纯度: 99.40%, 批号: 1611701, 由扬子江药业提供。

仪器 API4000 + 型三重四极杆质谱仪, 美国应用生物系统公司产品; 1290 液相系统, 安捷伦科技有限公司产品。

2 测定方法

色谱条件 色谱柱: CAPCELL PAK - C₁₈ (50 mm × 100 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 水(B) (含0.1%的甲酸) = 88:12, 流速: 0.30 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

质谱条件 电喷雾电离源(ESI); 正离子方式检测; 辅助气 1(GS1): 413.68 kPa; 气帘气(CUR): 206.84 kPa; 碰撞气(CAD): 34.47 kPa; 辅助气 2(GS2): 344.74 kPa; 离子源电压: 5 500 V; 温度: 550 °C; 扫描方式为多反应监测(MRM), 去簇电压(DP)分别为 90 V(拉帕替尼)和 65 V(内标); 碰撞能量(CE)分别为 40 eV 和 50 eV; 用于监测的离子对分别为 m/z 581.1 → m/z 365.0(拉帕替尼)和 m/z 394.1 → m/z 277.8(内标厄洛替尼)。

3 工作溶液配制与血浆样品处理

拉帕替尼系列对照溶液和质控溶液的配制 精密称取拉帕替尼对照品各 2 份, 用甲醇溶解并定容, 获得质量浓度为 100 μg · mL⁻¹的储备液 2 份, 一份用甲醇依次稀释拉帕替尼储备液, 得到拉帕替尼质量浓

度分别为 0.20, 0.50, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 μg · mL⁻¹的标准系列溶液。另一份用甲醇依次稀释后获得 0.20, 0.40, 4.0, 40 μg · mL⁻¹(最低定量限、低、中和高质量浓度)质控溶液。

内标溶液 精确称取盐酸厄洛替尼对照品适量(相当于厄洛替尼 10.0 mg), 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解定容至刻度, 配制成质量浓度为 100 μg · mL⁻¹的储备液, 用甲醇稀释得到 10.0 μg · mL⁻¹的工作溶液, 在 4 °C 条件下保存。

血浆样品处理 取含待测物血浆 100 μL 至 1.5 mL EP 管中, 加入 10.0 μg · mL⁻¹内标溶液 5 μL, 加乙腈(含 0.1% 甲酸) 0.2 mL, 涡旋混合 2 min, 以 1.3×10^4 r · min⁻¹离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样分析。

4 方法学考察

专属性 分别取 6 个不同来源的空白血浆、低浓度血浆样本、患者服药后的实际血浆样品, 按“血浆样品处理”项方法处理后, 进样分析记录色谱图, 并与空白样品色谱图进行对比。

标准曲线和定量下限 吸取拉帕替尼系列对照溶液 10 μL 于 1.5 mL EP 管中, 常温氮吹仪挥干后, 加入空白血浆 100 μL, 涡旋混合后配制成含有拉帕替尼质量浓度分别为 0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μg · mL⁻¹模拟血浆样品, 自加入内标溶液开始, 按“血浆样品处理”项下的方法操作后进样, 以待测物浓度(μg · L⁻¹)为横坐标 X , 待测物与内标物峰面积比值(A_s/A_i)为纵坐标 Y , 用加权($W = 1/x^2$)进行线性回归分析。

精密度和准确度 制备质量浓度分别为 0.02, 0.04, 0.40 和 4.0 μg · mL⁻¹(最低定量限和低、中、高)4 个质量浓度的质控(QC)血浆样本。共配制 3 批, 每一质量浓度水平 6 个样本分析, 在同一批次和不同批次按“血浆样品处理”项所述处理方法处理及分析。计算血浆中拉帕替尼批内和批间的相对标准差(RSD), 并以实测浓度与理论浓度之比求算法准确度。

提取回收率 配制含拉帕替尼的低、中、高(0.04, 0.40 和 4.0 μg · mL⁻¹)3 个质量浓度的质控血浆样本, 按“血浆样品处理”项下操作, 得峰面积 A ; 用人空白血浆处理后的上清液, 配制成对应拉帕替尼质控浓度的样品, 涡旋混合后离心, 进样得峰面积 B ,

每个质量浓度平行 6 个样本测定。拉帕替尼提取回收率 = $A/B \times 100\%$,同法计算内标提取回收率。

基质效应 取 6 份不同来源的空白血浆,经蛋白沉淀后,取上清液,加入相应质控浓度的拉帕替尼和内标溶液,所得样品和内标峰面积记分别为 A_1 和 B_1 ; 以水代替空白血浆提取液其余操作同上,峰面积分别记为 A_2 和 B_2 ,经内标校正后,拉帕替尼的基质效应(内标归一化基质因子) = $(A_1/A_2) / (B_1/B_2) \times 100\%$ 。

稳定性 分别考察拉帕替尼和内标储备液室温放置 12 h、经冰箱 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光放置 30 d 稳定性。配

制质量浓度分别为 0.04 和 $4.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控血浆样本,每个质量浓度平行配制 3 个样本,分别考察样品室温放置 8 h、处理后自动进样器 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 12 h,反复冻融 3 次,于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 环境中放置 30 d 后的稳定性。

结 果

1 方法学评价

专属性 内标和拉帕替尼的保留时间分别约为 1.17 和 1.77 min,峰形良好,血浆中的内源性物质不干扰测定。结果见图 1。

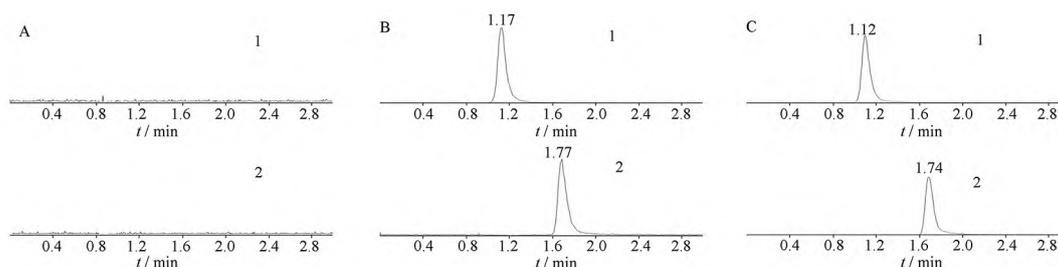


图 1 拉帕替尼血浆样品的典型色谱图

Figure 1 Representative chromatograms of lapatinib in human plasma

A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with Lapatinib ($0.40\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IS ($10.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C: Plasma sample after oral administration of 1250 mg of lapatinib once daily; 1: Erlotinib; 2: Lapatinib

标准曲线与定量下限 拉帕替尼直线回归方程为 $Y = 2.38X - 4.85 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9943$) 结果表明拉帕替尼血浆浓度在 $0.02 \sim 5.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好,准确度为 94.0%,RSD 为 6.4%。定量下限为 $0.02\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

精密度和准确度 拉帕替尼 4 个质量浓度的质控样品批内、批间 RSD 在 3.3% ~ 7.2%,准确度均在 94.0% ~ 106.0%。结果见表 1。

表 1 方法精密度和准确度测定结果

Table 1 Precision and accuracy for the determination of lapatinib in human plasma

Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Intra-day ($n = 6$)		Inter-day ($n = 3$)	
	Accuracy (%)	Precision (RSD%)	Accuracy (%)	Precision (RSD%)
0.02	94.0	6.4	95.3	7.2
0.04	98.2	5.4	99.1	6.6
0.40	102.4	4.6	103.2	5.8
4.0	106.0	3.3	104.5	5.4

提取回收率 拉帕替尼 3 个质控浓度和内标的提取回收率在 85.2% ~ 94.6%,RSD 在

6.2% ~ 9.0%。

基质效应 低、中和高质量浓度拉帕替尼经内标校正后的基质效应分别为 96.0%,103.1% 和 105.0%,RSD 在 6.8% ~ 9.3%。因此,本实验建立的 LC-MS/MS 方法不受基质效应的影响。

稳定性 拉帕替尼和内标储备液经室温放置 6 h 和经 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光放置 30 d 后,峰面积 RSD 均 $< 5\%$; 在考察的条件下,拉帕替尼质控样品的准确度在 92.1% ~ 105.7%,RSD 在 2.1% ~ 8.8%,结果表明拉帕替尼在上述条件下均保持稳定。

2 方法学应用

收集 6 例,年龄为 (57.4 ± 7.7) 岁,在我院收治的晚期乳腺癌患者,经临床诊断口服拉帕替尼 $1250\ \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。分别于第 8 天空腹取静脉血 2 mL,分离血浆后用本方法测定血浆中拉帕替尼浓度,测得血药浓度在 $0.42 \sim 1.06\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

讨 论

关于人血浆样本中拉帕替尼的分析测定鲜有国内文献报道,本文建立的 LC-MS/MS 分析方法与文

献报道的方法相比^[7-8],样品处理简单快捷,血浆用量少,灵敏度更高,分析时间更短,可以更好地满足临床样本快速检测分析需求。

对比 ZORBAX SBC₁₈、CAPCELL PAK C₁₈、Waters Symmetry C₁₈不同类型的色谱柱,结果表明待测物和内标在 CAPCELL PAK - C₁₈(50 mm × 100 mm, 3.5 μm) 色谱柱上峰形较好,保留时间比较合适。

考察流动相系统时,对比甲醇-水和乙腈-水作为流动相,拉帕替尼质谱信号响应值相当,甲醇为有机相时低浓度样品峰形较差,最后选择乙腈,流动相加入 0.1% 的甲酸后,拉帕替尼和内标物质离子化完全,响应值有所提高。

内标选择过程中,分别考察了苯海拉明、普瑞巴林和厄洛替尼,结果发现厄洛替尼质谱和色谱行为与拉帕替尼较为相似,回收率与基质效应与待测物接近,因此,选用厄洛替尼作为内标,另外与文献报道的同位素内标相比更易获得^[9],更具有普遍适用性。

测得的 6 例患者浓度范围在 0.42 ~ 1.06 μg · mL⁻¹,差别较大,拉帕替尼主要经 CYP3A4 代谢,且食物对其吸收具有一定程度的影响^[10-12],浓度最低的患者回顾其治疗用药发现,患者因为疼痛治疗需要,同时服用 CYP3A4 诱导剂卡马西平,可能是其血药浓度偏低的重要因素^[13]。拉帕替尼治疗浓度范围尚未确定,但有研究认为将其稳态浓度在 0.55 μg · mL⁻¹以上治疗效果较好^[14]。拉帕替尼引起的药物不良反应(如皮疹、腹泻)的毒性血药浓度范围目前尚不明确,有研究显示拉帕替尼引起的皮疹可能与其暴露量有关,当其血药浓度范围在 0.539 ~ 1.899 μg · mL⁻¹时发生皮疹可能性较高^[15]。其中浓度较高的 2 例患者在服药期间发生了较为严重的腹泻伴有不同程度的皮疹,对症处理后得以好转。拉帕替尼在体内的血药浓度与药物不良反应是否具有一定的量效关系,值得进一步研究。本方法的建立为可以用于大批量的生物样品分析和后续的相关研究。

参考文献:

- [1] 刘楠. 美国三大肿瘤学会联合发布遗传性乳腺癌管理指南[J]. 中华乳腺病杂志(电子版) 2020, 4(5): 325-326.
- [2] 张雅聪, 吕章艳, 宋方方, 等. 全球及我国乳腺癌发病和死亡变化趋势[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志 2021, 7(2): 14-20.
- [3] KONECNY G E, PEGRAM M D, VENKATESAN N, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2 - Overexpressing and trastuzumab - treated breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1630-1639.
- [4] D'AMATO V, RAIMONDO L, FORMISANO L, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2 - driven breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(10): 877-883.
- [5] ZHU J, HE Y, WANG Y, et al. Quantification of lapatinib in rat plasma by liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Lat Am J Pharm*, 2014, 33(1): 158-162.
- [6] HE Y, ZHOU L, SONG G, et al. Development and validation of a sensitive LC - MS/MS method for simultaneous determination of eight tyrosine kinase inhibitors and its application in mice pharmacokinetic studies [J]. *J Pharmaceut Biomed* 2018, 148(30): 65-72.
- [7] ESCUDERO - ORTIZ V, PÉREZ - RUIXO J J, VALENZUELA B. Development and validation of a high - performance liquid chromatography ultraviolet method for lapatinib quantification in human plasma [J]. *Ther Drug Monit*, 2013, 35(6): 796-802.
- [8] VROBEL I, JANEČKOVÁ H, FABER E, et al. Ultrafast online SPE - MS/MS method for quantification of 3 tyrosine kinase inhibitors in human plasma [J]. *Ther Drug Mon*, 2016, 38(4): 516-524.
- [9] WU J, WIEGAND R, LORUSSO P, et al. A stable isotope - labeled internal standard is essential for correcting for the interindividual variability in the recovery of lapatinib from cancer patient plasma in quantitative LC - MS/MS analysis [J/OL]. *J Chromatogr B*, 2013, 941: 100-108. 2013-12-15 [2021-01-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24189203/>.
- [10] CASTELLINO S, OMARA M, KOCH K, et al. Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: Implications for hepatotoxicity [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(1): 139-150.
- [11] TEO Y L, SAETAEW M, CHANTHAWONG S, et al. Effect of CYP3A4 inducer dexamethasone on hepatotoxicity of lapatinib: clinical and *in vitro* evidence [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(2): 703-711.
- [12] TENG W C, OH J W, NEW L S, et al. Mechanism - based inactivation of cytochrome P450 3A4 by lapatinib [J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 78(4): 693-703.
- [13] SMITH D A, KOCH K M, ARYA N, et al. Effects of ketoconazole and carbamazepine on lapatinib pharmacokinetics in healthy subjects [J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2009, 67(4): 421-426.
- [14] FUMOLEAU P, KOCH K M, BRAIN E, et al. A phase I pharmacokinetics study of lapatinib and tamoxifen in metastatic breast cancer EORTC 10053 lapatinib study [J]. *Breast*, 2014, 23(5): 663-669.
- [15] COKER S A, HURWITZ H I, SHARMA S, et al. The effects of lapatinib on cardiac repolarization: Results from a placebo controlled, single sequence, crossover study in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(2): 383-392.

(本文编辑 王超群)