

伊布替尼血药浓度检测方法的建立及临床应用^Δ

韩功伟^{1,2*}, 张 腾¹, 赵莹莉³, 刘沁华⁴, 夏 泉^{1,2#}(1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022; 3. 合肥市第二人民医院药学部, 合肥 230012; 4. 安徽医科大学第一附属医院血液科, 合肥 230022)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)22-2756-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.12



摘要 目的 建立检测伊布替尼血药浓度的方法并应用于临床。方法 以泽布替尼为内标, 血浆样本以固相萃取柱处理后, 采用高效液相色谱(HPLC)法检测伊布替尼的浓度。以Agilent 5 TC-C₁₈(2)为色谱柱, 乙腈-0.5%磷酸二氢钾溶液(43:57, V/V)为流动相, 流速为1 mL/min, 检测波长为260 nm, 柱温为40 °C, 进样量为20 μL, 运行时间为25 min。采用上述方法测定9例非霍奇金淋巴瘤患者第30天用药后2 h时血浆中伊布替尼的浓度。结果 伊布替尼检测质量浓度的线性范围为10~500 ng/mL($R^2=0.998 9$), 定量下限为10 ng/mL; 批内、批间精密度试验的RSD均不高于12.77%; 提取回收率分别为74.80%、97.70%, RSD均小于2.90%; 稳定性试验的RSD均小于7.10%。9例患者的血药浓度为15.341~279.628 ng/mL。结论 所建立的HPLC法简单、快捷, 可用于伊布替尼血药浓度的测定。

关键词 伊布替尼; 血药浓度; 非霍奇金淋巴瘤; 高效液相色谱法

Establishment and clinical application of ibrutinib blood concentration assay

HAN Gongwei^{1,2}, ZHANG Teng¹, ZHAO Yingli³, LIU Qinhu⁴, XIA Quan^{1,2}(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 3. Dept. of Pharmacy, the Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230012, China; 4. Dept. of Hematology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a method to detect the blood concentration of ibrutinib and apply it to the clinic. **METHODS** Using zanubrutinib as internal standard, the concentration of ibrutinib was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) after plasma samples were processed by solid-phase extraction. The separation was performed on an Agilent 5 TC-C₁₈(2) column with acetonitrile-0.5% potassium dihydrogen phosphate solution (43:57, V/V) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min, a detection wavelength of 260 nm, a column temperature of 40 °C, a sample size of 20 μL, and a run time of 25 min. The concentration of ibrutinib was measured in the plasma of 9 patients with non-Hodgkin's lymphoma 2 h after drug administration on the 30th day by the above method. **RESULTS** The linear range of the assayed mass concentration of ibrutinib was 10-500 ng/mL ($R^2=0.998 9$), the lower limit of quantification was 10 ng/mL, and the RSDs of the intra-batch and inter-batch precision tests were not higher than 12.77%. The recoveries of the extraction were 74.80% and 97.70%, with both RSDs<2.90%, and the RSDs of the stability tests were not higher than 7.10%. The peak plasma concentrations of 9 patients were 15.341-279.628 ng/mL. **CONCLUSIONS** The established HPLC method is simple and rapid, and can be used for the determination of ibrutinib concentration in plasma samples.

KEYWORDS ibrutinib; blood concentration; non-Hodgkin's lymphoma; high performance liquid chromatography

伊布替尼是首个不可逆的布鲁顿氏受体酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)抑制剂, 可通过抑制B细胞受体信号来减少B细胞的增殖、迁移和凋亡, 从而发挥阻断B细胞白血病和淋巴瘤所需生长信号的作用。

^Δ基金项目 国家自然科学基金项目(No.82174011); 安徽省高等学校省级质量工程项目(No.2022jyxm767); “白求恩·求索·药学科研能力建设”项目(No.2022-横-05)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 临床药学。E-mail: 928873520@qq.com

通信作者 主任药师, 硕士生导师, 博士。研究方向: 治疗药物监测的临床应用。电话: 0551-62922154。E-mail: xiaquan2010@163.com

临床研究证实, 该药可明显延长慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者的生存时间^[1-2]。2017年, 伊布替尼获我国国家食品药品监督管理总局批准用于治疗CLL/小淋巴细胞性淋巴瘤(small lymphocytic lymphoma, SLL)、套细胞淋巴瘤(mantle-cell lymphoma, MCL)和华氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia, WM)等非霍奇金淋巴瘤^[3]。随着伊布替尼在临床的广泛应用, 该药引起的出血、房颤、腹泻、上呼吸道感染、疲劳等常见的轻微(I~II级)不良反应逐渐被发现, 且房颤、出血还可能会导致Ⅲ级及以上严重不良反应的发生, 其安全性越来越受到临床关注。

伊布替尼主要由细胞色素 P450 代谢,在相同的服药剂量下,不同人群可能存在较大的浓度差异,且这种差异无法避免^[4-5]。有研究认为,较高的伊布替尼药-时曲线下面积(area under curve, AUC)与药物不良反应的发生有关^[6]。因此,该药的峰浓度可用于预测患者是否存在较高的药物毒性风险。虽然有研究报道了使用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术检测伊布替尼的血药浓度^[7],但该方法的设备价格高,操作复杂,很难在医疗机构普及。为此,本研究建立了检测人血浆中伊布替尼浓度的高效液相色谱(HPLC)法,并应用于临床,旨在为伊布替尼的个体化给药及药物毒性风险预测提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 1260 Infinity II 型 HPLC 仪[安捷伦科技(中国)有限公司],KDC-1044 型低速离心机、HC-3018 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),XW-80A 型涡旋机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),MG-2200 型氮气吹干仪(东京 EYELA 公司)。

1.2 主要药品与试剂

伊布替尼对照品(批号 S81126,纯度 99%)购自上海源叶生物科技有限公司;泽布替尼对照品(内标,批号 420076-202001,纯度 99.5%)购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱级,甲酸、磷酸二氢钾均为分析纯,水为注射用无菌用水。

1.3 血浆样本

空白血浆由未使用过伊布替尼或泽布替尼的健康志愿者提供。提供者均签署了知情同意书。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液(43:57, V/V)为流动相;流速为 1 mL/min;检测波长为 260 nm;柱温为 40 °C;进样量为 20 μL;运行时间为 25 min。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品储备液与内标储备液

精密称取伊布替尼、内标对照品各 10.00 mg,分别用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,制得质量浓度均为 1 mg/mL 的对照品储备液和内标储备液。

2.2.2 系列标准曲线溶液、质控溶液与内标工作液

取“2.2.1”项下对照品储备液 40 μL,加入甲醇 960 μL,制得质量浓度为 40 μg/mL 的伊布替尼工作溶液,再用甲醇稀释,得质量浓度分别为 0.8、2.0、4.0、8.0、16、32、40 μg/mL 的系列标准曲线溶液(分别以 0.8、2.0、16、32 μg/mL 作为定量下限、低、中、高质量浓度的质控溶液)。取“2.2.1”项下内标储备液 20 μL,加入甲醇 980 μL,得质量浓度为 20 μg/mL 内标溶液;取该溶液 400 μL,加入甲醇 600 μL,得质量浓度为 8 μg/mL 的内标工作液。

2.3 样本前处理

取血浆样本 780 μL,分别加入“2.2.2”项下质控溶液 10 μL 和内标工作液 10 μL,再加入水 700 μL,混匀,得载样前样本;取该样本,经固相萃取柱(先加入甲醇 1 mL,再加入水 1 mL 活化),依次用水 1 mL、甲醇-水溶液(60:40, V/V)1 mL 淋洗,再用甲醇-甲酸溶液(98:2, V/V)0.5 mL 洗脱 2 次后,收集洗脱液,在 40 °C 下以氮气流吹干,残渣用甲醇-甲酸溶液(98:2, V/V)100 μL 复溶,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样检测。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验

取 5 份不同来源的空白血浆,不加入质控溶液和内标工作液,其余按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图(图 1A)。取空白血浆,加入“2.2.2”项下定量下限质量浓度质控溶液(0.8 μg/mL)及内标工作液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图(图 1B)。取某患者用药(每日服用伊布替尼胶囊 1 次,每次 420 mg,服药 30 d)2 h 后血浆样本,加入内标工作液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图(图 1C)。结果显示,伊布替尼与内标的保留时间分别约为 22.7、11.6 min,空白血浆对目标成分和内标检测无干扰,表明本方法的专属性良好。

2.4.2 线性关系与定量下限考察

取“2.2.2”项下系列标准曲线溶液和内标工作液,按“2.3”项下方法处理,得质量浓度分别为 10、25、50、100、200、400、500 ng/mL 的标准曲线溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样检测。以伊布替尼质量浓度为横坐标(x)、伊布替尼峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(y),采用加权最小二乘法进行线性回归,得伊布替尼的回归方程为 $y=1.0414x+0.1379$ ($R^2=0.9989$),表明伊布替尼检测质量浓度在 10~500 ng/mL 范围内与峰面积比值的线性关系良好。其定量下限为 10 ng/mL。

2.4.3 准确度与精密度试验

取“2.2.2”项下质控溶液和内标工作液,按“2.3”项下方法处理,得质量浓度分别为 10、25、200、400 ng/mL 的溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,每样本平行测定 10 份,考察批内精密度;每样本平行测定 5 份,连续测定 3 d,考察批间精密度。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,以相对误差(relative error, RE)考察准确度。结果显示,批内、批间精密度试验的 RSD 均不高于 12.77%,RE 为 -2.14%~6.51%,表明本方法的准确度、精密度良好。结果见表 1。

2.4.4 提取回收率试验

取“2.2.2”项下低、高质量浓度的质控溶液(质量浓度分别为 2.0、32 μg/mL)和内标工作溶液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录伊布替尼峰面积与内标峰面积的比值(A_1)。取空白血浆,按“2.3”项下方法处理后,加入相应质量浓度的质控溶液

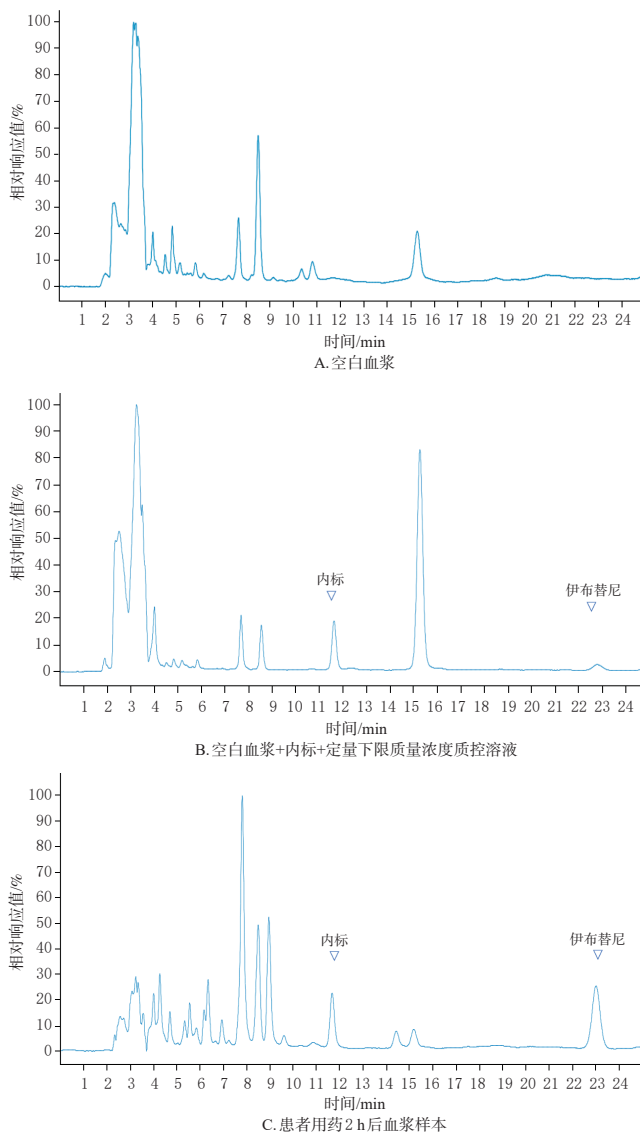


图1 伊布替尼定量分析的HPLC图

表1 准确度与精密度试验结果

理论质量浓度/ (ng/mL)	批内(n=10)			批间(n=15)		
	实测质量浓度/(ng/mL)	精密度RSD/%	RE/%	实测质量浓度/(ng/mL)	精密度RSD/%	RE/%
10	10.65	8.63	6.51	10.28	12.77	2.79
25	25.48	9.43	1.92	25.37	8.52	1.50
200	195.71	3.86	-2.14	210.45	6.12	5.22
400	392.84	2.81	-1.79	419.96	3.48	4.13

和内标工作液(使最终质量浓度与前者一致),再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录伊布替尼峰面积与内标峰面积的比值(A_2)。每样本平行测定5次,按下式计算提取回收率:提取回收率= $A_1/A_2 \times 100\%$ 。结果显示,提取回收率分别为74.80%、97.70%,RSD均小于2.90% ($n=5$)。

2.4.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下低、高质量浓度的质控溶液(质量浓度分别为2.0、32 $\mu\text{g/mL}$)和内标工作溶液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,分别考察处理前样本在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12 h,-20 $^{\circ}\text{C}$ 下分别保存30、60 d,处理后样本在自动进样器中放置12 h时的稳定

性,每样本平行测定5份。结果显示,低质量浓度溶液稳定性试验的RSD分别为2.81%、2.63%、2.48%、7.06% ($n=5$),高质量浓度溶液稳定性试验的RSD分别为0.79%、5.06%、1.70%、3.87% ($n=5$),表明不同条件下各样本稳定性良好。

2.5 临床应用

2.5.1 纳入与排除标准

本研究的纳入标准为:(1)年龄18~80岁;(2)经病理学检查明确诊断为CLL/SLL或MCL或WM;(3)具有完整的疗效评价资料和不良反应信息;(4)签署了知情同意书。

本研究的排除标准为:(1)中重度肝肾功能不全者;(2)妊娠期或哺乳期妇女;(3)依从性差者。

2.5.2 资料来源

选择2022年8月1日至2023年5月1日在安徽医科大学第一附属医院接受伊布替尼治疗的9例非霍奇金淋巴瘤患者(7例CLL,1例MCL,1例WM)。本研究方案经医院医学伦理委员会批准,伦理批件号:PJ2022-11-17。

2.5.3 用药方法

所有患者均连用伊布替尼胶囊(国药准字HJ20181066,美国Catalent CTS LLC,规格140 mg)超过30 d,用药频率为每天1次,用药剂量根据病情分为每天280 mg或420 mg,其中1例患者为280 mg,8例患者为420 mg。

2.5.4 检测方法与检测结果

从患者签署知情同意书日起连续用药至少30 d,采集患者第30天用药后2 h的静脉血^[8],按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积并代入随行标准曲线计算伊布替尼的血药浓度。结果显示,1例服用280 mg/d患者的血药浓度为176.583 ng/mL,8例服用420 mg/d患者的血药浓度分别为15.341、15.746、21.275、26.764、37.325、117.170、169.451、279.628 ng/mL。结果见图2。

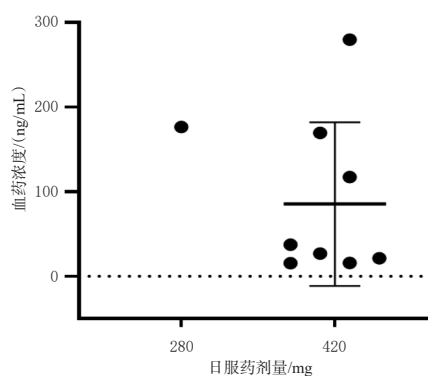


图2 9例患者第30天用药后2 h的伊布替尼血药浓度分布

3 讨论

Ezzeldin等^[9]使用LC-MS/MS技术检测了人血浆中伊布替尼的浓度,使用液-液萃取法进行样本前处理,线性范围为5~1 000 ng/mL。本研究在文献报道的基础上

进行了调整,以不同比例的甲醇-水溶液作为固相萃取的淋洗液和洗脱液,能有效去除杂质,提高伊布替尼回收率,且试剂简单易得,方法简便快捷,故选择甲醇-水溶液作为样本前处理试剂。在选择流动相时,本研究使用乙腈-0.5%磷酸二氢钾溶液为流动相,当二者比例为40:60~50:50(*V/V*)时,所得色谱峰峰形良好;随后将乙腈以1%的比例梯度增加,当二者比例为43:57(*V/V*)时,所得色谱峰峰形最优,故选择乙腈-0.5%磷酸二氢钾溶液(43:57,*V/V*)为流动相。

有文献指出,非复发型CLL患者服用伊布替尼420 mg/d后,第1天血药浓度为140.93 ng/mL,第8天为82.80 ng/mL,且患者可耐受该药的不良反应^[10]。本研究中,有1例患者因服用伊布替尼420 mg/d后出现心悸、房颤等不良反应,医师在评估临床疗效及不良反应后给予减量(280 mg/d)处理;经剂量调整后,患者服用280 mg/d的伊布替尼仍有效,其血药浓度为176.583 ng/mL;8例服用伊布替尼420 mg/d的患者中,血药浓度最低为15.341 ng/mL,而本方法的定量下限为10 ng/mL,表明本方法可以满足临床治疗药物监测的需求。本研究所得线性范围为10~500 ng/mL,患者可在25 min内完成血浆浓度的检测,对设备要求不高,适宜常规医疗机构开展血药浓度检测。此外,因泽布替尼与伊布替尼有相近的理化性质且与伊布替尼同属BTK抑制剂,故选择泽布替尼为内标;同时,本研究建立的方法也可用于后续拓展检测泽布替尼的血药浓度。

非霍奇金淋巴瘤是一种惰性肿瘤,绝大部分的CLL、WM初诊患者和部分MCL患者无明显症状。有研究发现,虽然伊布替尼可延长患者的生存时间^[11],但也会因药物的相互作用[如同时使用肝药酶抑制剂(酮康唑)或者禁食而导致伊布替尼血药浓度发生变化,甚至可能加重伊布替尼引起的出血、房颤等不良反应^[12]。伊布替尼主要通过细胞色素P450代谢,由于患者代谢酶差异而可能导致个体间药物浓度不同^[13]。本研究中,8例服用相同剂量伊布替尼患者的血药浓度为15.341~279.628 ng/mL,这提示该药的个体差异较大。有文献指出,伊布替尼的血药峰浓度大于70 ng/mL,对CLL或MCL有治疗作用^[14]。因此,通过检测伊布替尼的血药浓度及临床生化指标,可对其用药剂量进行及时调整,从而实现个体化给药。

综上所述,本研究所建立的HPLC法简单、快捷,可用于伊布替尼血药浓度的测定。

参考文献

[1] ADVANI R H, BUGGY J J, SHARMAN J P, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(1): 88-94.

[2] BYRD J C, FURMAN R R, COUTRE S E, et al. Three-year follow-up of treatment-naive and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib [J]. *Blood*, 2015, 125(16): 2497-2506.

[3] ROOD J J M, JAMALPOOR A, VAN HOPPE S, et al. Extrahepatic metabolism of ibrutinib[J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(1): 1-14.

[4] XU R N, WEN J, TANG P F, et al. Functional characterization of 22 CYP3A4 protein variants to metabolize ibrutinib *in vitro*[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(4): 383-387.

[5] KOLLER D, VAITSEKHOVICH V, MBA C, et al. Effective quantification of 11 tyrosine kinase inhibitors and caffeine in human plasma by validated LC-MS/MS method with potent phospholipids clean-up procedure. Application to therapeutic drug monitoring[J]. *Talanta*, 2020, 208: 120450.

[6] GALLAIS F, YSEBAERT L, DESPAS F, et al. Population pharmacokinetics of ibrutinib and its dihydrodiol metabolite in patients with lymphoid malignancies[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2020, 59(9): 1171-1183.

[7] 位宁, 郭进艳, 孙文利, 等. HPLC-MS/MS法测定血液病患者血浆中伊布替尼血药浓度的方法学研究及临床应用[J]. *中国合理用药探索*, 2021, 18(10): 89-95.

WEI N, GUO J Y, SUN W L, et al. Methodological study and clinical application on the determination of the plasma concentration of ibrutinib in plasma of patients with hematological diseases by HPLC-MS/MS[J]. *Chin J Ration Drug Use*, 2021, 18(10): 89-95.

[8] BYRD J C, FURMAN R R, COUTRE S E, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(1): 32-42.

[9] EZZELDIN E, IQBAL M, HERQASH R N, et al. Simultaneous quantitative determination of seven novel tyrosine kinase inhibitors in plasma by a validated UPLC-MS/MS method and its application to human microsomal metabolic stability study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1136: 121851.

[10] TOBINAI K, OGURA M, ISHIZAWA K, et al. Safety and tolerability of ibrutinib monotherapy in Japanese patients with relapsed/refractory B cell malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2016, 103(1): 86-94.

[11] GERTZ M A. Waldenström macroglobulinemia: 2023 update on diagnosis, risk stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98(2): 348-358.

[12] JONG J D, SKEE D, MURPHY J, et al. Effect of CYP3A perpetrators on ibrutinib exposure in healthy participants [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, 3(4): e00156.

[13] HAN M M, QIAN J C, YE Z Z, et al. Functional assessment of the effects of CYP3A4 variants on acalabrutinib metabolism *in vitro*[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109559.

[14] YASU T, MOMO, YASUI H, et al. Simple determination of plasma ibrutinib concentration using high-performance liquid chromatography[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(3): e4435.

(收稿日期:2023-05-12 修回日期:2023-10-20)

(编辑:陈宏)