

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2024.03.004

· 论著 ·

超高效液相色谱串联质谱测定儿童血液样本中高三尖杉酯碱含量

袁树伟, 杜小焕, 张先明, 花盛浩, 胡绍燕, 朱增燕 (苏州大学附属儿童医院, 江苏苏州 215123)

[摘要] 目的: 建立并验证超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定儿童血液样本中高三尖杉酯碱含量的方法。**方法:** 以 Waters Xevo TQD 为检测设备, Waters BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 为色谱柱, 采用甲醇为有机相, 含 0.1% 甲酸的超纯水为无机相, 进行梯度洗脱, 质谱检测采用正离子, 多重反应监控 (MRM) 模式, 待测物高三尖杉酯碱 (HHT) 离子通道 m/z 546.3 → 298.2, 内标物三尖杉酯碱 (HT) 离子通道 m/z 532.2 → 298.3, 锥孔电压 50 V, 碰撞能量 28 V。**结果:** 本方法样本前处理简单, 分析速度快, 结果具有较高的选择性和灵敏度, 线性区间 0.5~120.0 ng, 线性方程 $Y=0.0470113X+0.0070358$ ($r=0.9991$), 定量下限 0.5 ng, 日内精密度 RSD < 8.16%, 日间精密度 RSD < 6.38%, 准确度 94.00%~103.95%。**结论:** 本方法选择性好、灵敏度高, 可应用于儿童体内 HHT 的药动学研究和血药浓度监测等相关工作。

[关键词] 超高效液相色谱串联质谱; 高三尖杉酯碱; 药代动力学

[中图分类号] R917

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2024)03-0016-04

Determination of Harringtonine in Blood Samples of Children by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Yuan Shuwei, Du Xiaohuan, Zhang Xianming, Hua Shenghao, Hu Shaoyan, Zhu Zengyan (*Children's Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China*)

[Abstract] Objective: To establish and verify ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for content determination of homoharringtonine in blood sample of children. **Methods:** Waters Xevo TQD was used as detection equipment, with Waters BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) as separation column. Methanol as organic phase and ultra-pure water containing 0.1% formic acid as inorganic phase were used for gradient elution. Mass detection type was positive mode, with multiple reaction monitoring (MRM). The detection ion pair of harringtonine (HHT) was 546.3 → 298.2, the detection ion pair of internal standard harringtonine (HT) was 532.2 → 298.3, the cone energy was 50 V, and the collision energy was 28 V. **Results:** This method was characterized by simple sample pretreatment, fast analysis speed, and high selectivity and sensitivity, with a linear interval of 0.5 to 120.0 ng, a linear equation of $Y=0.0470113X+0.0070358$ ($r=0.9991$), a lower limit of quantification of 0.5 ng, an intra-day precision of RSD < 8.16%, an inter-day precision of RSD < 6.38%, and an accuracy of 94.00% to 103.95%. **Conclusion:** This method is selective and sensitive, and can be applied to the pharmacokinetic study of HHT in children and the monitoring of blood drug concentration and other related work.

[Keywords] ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; homoharringtonine; pharmacokinetics

高三尖杉酯碱 (homoharringtonine, HHT) 是我国科
研工作者于 20 世纪 70 年代从三尖杉属植物中提取分
离得到的具有治疗白血病作用的有效成分, 被广泛应
用于各型非淋巴细胞白血病的化疗方案中, 包括急性
髓系白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼细胞白血
病、真性红细胞增多症、慢性髓系白血病等^[1]。以 HHT
为基础的联合化疗方案, 如 HA 方案 (HHT、阿糖胞
苷)、HAA 方案 (HHT、阿糖胞苷、阿克拉霉素)、HAD
方案 (HHT、阿糖胞苷、柔红霉素) 等在急性髓系白血
病的治疗中发挥着重要作用^[2]。随着靶向药物络氨酸激
酶抑制剂 (伊马替尼、尼洛替尼等) 在慢性髓系白血
病中的广泛应用, HHT 在慢性髓系白血病方面的治疗应
用逐渐减少, 但近些年随着络氨酸激酶抑制剂耐药或
不耐受患者的广泛出现, 人们又将目光聚焦于 HHT, 其

皮下制剂于 2012 年 10 月在美国正式获批用于治疗对
络氨酸激酶抑制剂耐药或不耐受的慢性髓系白血病患
者^[3]。由于 HHT 具有广泛的细胞毒性, 有报道在成人
患者中存在剂量依赖性骨髓抑制, 低血压等不良反
应^[4], 而 HHT 的给药剂量说明书要求在 1~4 mg/(m²·d),
体内浓度水平较低, 这就要求其检测方法具有较高的
灵敏度, 而超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS)
具有高专属性及灵敏度好的优点, 广泛用于体内治疗
药物监测工作^[5], 目前国内应用此方法测定儿童患者
体内 HHT 含量的研究未见报道, 儿童患者给予 HHT
治疗后其毒性反应与浓度相关性的研究相对匮乏, 开
展此项研究具有重要的现实意义, 本研究旨在建立并
验证 HHT 血清含量测定方法, 为后续的研究工作打下
坚实基础。

基金项目: 2023 年度苏州市科技发展计划指导性项目, 编号 SKJD2023192。

作者简介: 袁树伟 (1984.03-), 男, 硕士, 主管药师, 主要从事儿童血药浓度监测研究, E-mail: 335664296@qq.com。

通信作者: 朱增燕 (1976.07-), 女, 博士, 主任药师, 主要从事抗肿瘤药物药理作用研究, E-mail: zhuzengyan7676@suda.edu.cn。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱串联质谱联用仪:液相系统(ACQUITY UPLC I-Class, Waters),质谱检测器(Xevo TQD, Waters);超纯水仪(Direct-Q5, 默克密理博纯水机);离心机(G20, 北京白洋);电子分析天平(ME155DU/02, 梅特勒-托利多);HHT 标准品(96.9%, 批号 111533-201904, 中国食品药品检定研究院);三尖杉酯碱(HT)标准品(98.0%, 批号 B25503, 上海源叶);注射用阿糖胞苷(批号 GY7827, 辉瑞制药);注射用盐酸柔红霉素(批号 22083411, 瀚辉制药);甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克);甲酸(分析纯, 上海阿拉丁)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相: A 为含 0.1% 甲酸的水溶液; B 相为甲醇, 采用梯度洗脱。洗脱梯度: 0-60 s, 5% → 10% B; 60-150 s, 10% → 20% B; 150-199 s, 20% → 25% B; 199-259 s, 25% → 30% B; 259-319 s, 30% → 40% B; 319-380 s, 40% B; 380-420 s, 40% → 90% B; 420-450 s, 90% → 5% B。流速 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL。

1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 多重反应监控(MRM)扫描; 毛细管电压 3.8 kV; 离子源温度 150 °C; 脱溶剂温度 500 °C; 脱溶剂气流速 1 000 L/h; 锥孔气流速 20 L/h。HHT 离子通道为 m/z 546.3 → 298.2, 锥孔电压 50 V, 碰撞能量 28 V; 内标 HT 离子通道为 m/z 532.2 → 298.3, 锥孔电压 50 V, 碰撞能量 28 V。

1.4 工作溶液的制备

1.4.1 标准品、质控品储备液及工作液的配制 精密称取 2 份 HHT 标准品 10.00 mg, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用 20% 甲醇溶解, 制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液, 分别作为标准品储备液和质控品储备液, 置 -80 °C 冰箱保存。取其中一份 HHT 储备液, 用 20% 甲醇定量稀释, 制成质量浓度分别为 17.5、70、350、1 750、3 500、4 200 ng/mL 的系列标准品工作溶液; 取另一份 HHT 储备液, 将其稀释为质量浓度为 17.5、52.5、1 400、3 150 ng/mL 的质控(QCs)工作溶液。将两种工作液置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.4.2 内标储备液及工作溶液的配制 精密称定 HT 标准品 10.00 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 用 20% 甲醇溶解, 制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液, 作为内标 HT 的储备液, 置 -80 °C 冰箱保存。取 HT 储备液, 用 20% 甲醇定量稀释成浓度为 700 ng/mL 的内标工作溶液, 置 -20 °C 冰箱中保存。

1.4.3 标准曲线和质控样品的配制及实际样本的制备及前处理 标准曲线及质控品的制备: 取促凝管采集, 4 °C 条件下 3 500 r/min 离心 5 min 后所得的健康体检儿童残存上层血清混合而成的空白血清 80 μL 于 1.5 mL

离心管中, 分别加入不同质量浓度的 HHT 标准品工作液以及 4 个不同浓度的质控工作液各 10 μL, 然后加入内标 HT 工作溶液 10 μL, 涡旋混匀, 即得浓度为 1.75、7、35、175、350、420 ng/mL 的系列标准品工作溶液及浓度为 1.75、5.25、140、315 ng/mL 的质控(QCs)工作溶液。取上述所得溶液加入乙腈-甲醇(2:3)混合溶液 250 μL, 形成总体积为 350 μL 的混合溶液, 对应形成浓度分别为 0.5、2、10、50、100、120 ng/mL 的标准系列溶液以及浓度分别为 0.5、1.5、40、90 ng/mL 质控溶液。空白血清对照样本制备只需用 20 μL 20% 甲醇替代内标工作液和标准品工作液即得; 只含内标血清样本的制备只需用 10 μL 20% 甲醇替代标准品工作液, 同时加入 10 μL 内标溶液即得; 实际待测样本的制备需取 4 °C 条件下 3 500 r/min 离心 5 min 后的实际用药患者上层血清 80 μL, 加 10 μL 20% 甲醇, 再加入内标 HT 工作溶液 10 μL 即得, 将所得样本涡旋振荡 2 min, 16 000 r/min 离心 8 min, 取上清液 150 μL 于 96 孔板中, 上机进行含量测定, 实际生物样本的浓度 $C_{实} = C_{测} \times 3.85$ (3.85 为稀释倍数)。

1.5 方法学考察

方法学验证参照欧洲药品管理局国际人用药品注册技术要求协调会(ICH)2022 版指导原则^[6]及国内现行指导原则^[7]。具体方法验证包括选择性、专属性、线性范围、携带效应、精密度及准确度、稳定性、基质效应等相关内容。

1.5.1 专属性及选择性实验 分别取 6 个批次的空白混合血清(健康体检儿童残存血清)按照“1.4.3”项下的操作方法进行处理, 考察目标待测物, 内标物附近的干扰情况, 考察残存血清作为空白基质的可行性, 随后以空白残存血清为基质, 依次考察空白血清加内标, 空白血清加内标及待测物情况下, 含药血清中加入阿糖胞苷和柔红霉素后, 待测物 HHT 的含量测定有无受干扰的情况。

1.5.2 标准曲线及线性范围 按照“1.4.3”项下的操作方法, 制备不含 HHT 及 HT 的空白血浆样品 1 份, 不含 HHT 只含内标 HT 的空白血浆样品 1 份, 浓度为 0.5、2、10、50、100、120 ng/mL 的标准曲线血浆样品 6 份, 进样测定。以 HHT 浓度(ng/mL)为横坐标(X), HHT 与 HT 峰面积的比值为纵坐标(Y), 采用加权最小二乘法进行回归运算计算直线回归方程, 并确定待测物的线性区间及定量下限。

1.5.3 准确度和精密度 取空白血清各 80 μL, 分别加入 HHT 质控工作液 1.75、5.25、140、315 ng/mL 4 个浓度及 HT 内标液各 10 μL, 每一浓度 5 份样本, 按照“1.4.3”项下方法处理, 同时配置标准曲线及空白基质, 空白含内标基质进行测定, 连续测定 3 天, 根据当日的标准曲线, 计算准确度和日内、日间精密度。

1.5.4 提取回收率和基质效应实验 按照“1.4.3”项下的操作方法配制和处理 3 个不同浓度的质控血浆样品, 每个浓度 6 份, 然后进行测定, 定为 A₁ 组; 取 6 个不

同来源的空白血浆,加入乙腈-甲醇(2:3)混合溶液进行蛋白沉淀后取上清液,再分别加入等量 HHT 三个不同浓度质控溶液和 HT 内标溶液,定为 A₂ 组;以 A₁ 组中 HHT 和 HT 峰面积之比与 A₂ 组中 HHT 和 HT 峰面积之比的比值比计算提取回收率。以等体积纯化水代替空白血浆,分别加入等量 HHT 三个不同浓度质控溶液和 HT 内标溶液,按照“1.4.3”项下方法处理后测定,定为 A₃ 组;以 A₃ 组 HHT 和 HT 峰面积之比与 A₂ 组中 HHT 和 HT 峰面积之比的比值比计算基质效应。

1.5.5 稀释完整性考察 制备浓度为 400 ng/mL 的高浓度质控样本,用空白血清稀释 4 倍,按“1.4.3”项下方法处理后测定,计算准确度和精密度,考察稀释完整性,用于评价样本浓度超线性范围后如何测定。

1.5.6 高脂血和溶血基质效应 收集健康体检液存高脂和溶血样本各 6 份,按“1.4.3”项下方法,中浓度质控样本各 5 份,考察临床特殊样本对测定结果的影响。

1.5.7 稳定性考察 采用低、高 2 个质控浓度样本,每一浓度 3 份样本,按照“1.4.3”项下方法处理和测定,考察样本在室温放置 6、24 h,样本处理后进样器中放置 24 h,反复冻融 5 次,-80 °C 放置 5 d、10 d 情况下,样本的稳定性情况。

2 结果

2.1 选择性和专属性验证

在优化的 UPLC-MS/MS 条件下,HHT 和 HT 的保留时间分别为 4.88、5.87 min,峰形良好,血清中内源性物质在 HHT 和 HT 吸收峰处干扰较少,不影响相关物质的含量测定,结果见图 1,而中浓度含药质控血清中加入 100 ng/mL 盐酸柔红霉素和阿糖胞苷后,HHT 测得值的相对误差为 4.3%,而其相对标准偏差(RSD)为 2.10%,满足定量标准±15%的要求,说明同时使用这两种药物并不会干扰结果的测定。

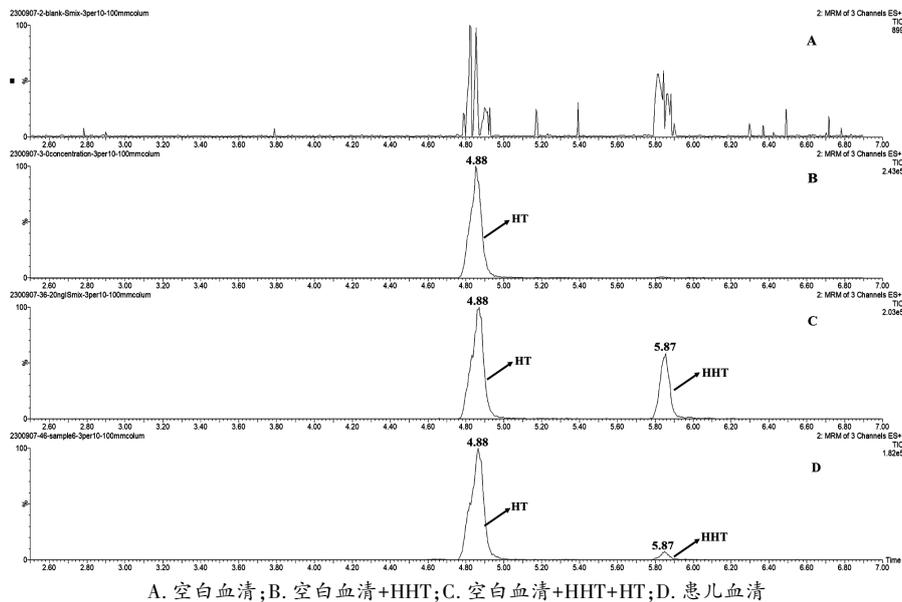


图 1 HHT 血清样本的 UPLC-MS/MS 色谱图

2.2 标准曲线和定量下限确立

HHT 的直线回归方程 $Y=0.0470113X+0.0070358$ ($r=0.9991$),线性范围 0.5~120 ng/mL,定量下限 0.5 ng/mL, $S/N>10$,重复测定 5 份样本,其准确度偏差-2%,RSD 为 8.16%,均符合目标要求(在定量下限±20%)。

2.3 精密度和准确度

在定量下限(LLOQ)、低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)4个水平上,日内精密度 $RSD<8.16%$,日间精密度 $RSD<6.38%$,准确度 94.00%~103.95%,相对误差(RE)均在目标值±15%的范围内,满足在定量下限±20%要求,见表 1。

2.4 提取回收率和基质效应

质控样本的提取回收率为 88.67%~92.49% ($RSD=5.35%$),基质效应因子 87.67%~93.54% ($RSD=5.21%$),结果表明该方法的提取回收率较好,样本测定基本不受生物基质的影响。

表 1 精密度和准确度实验结果

项目	HHT 浓度水平	理论浓度/(ng/mL)	实测浓度/(ng/mL)	RSD/%	RE/%	n
日内	LLOQ	0.50	0.49±0.04	8.16	2.00	5
	LQC	1.50	1.49±0.06	4.03	0.67	5
	MQC	40.00	40.71±0.45	1.11	1.78	5
	HQC	90.00	87.33±3.75	4.29	2.97	5
日间	LLOQ	0.50	0.47±0.03	6.38	6.00	15
	LQC	1.50	1.50±0.05	3.33	0.00	15
	MQC	40.00	41.58±1.34	3.22	3.95	15
	HQC	90.00	89.56±3.13	3.49	0.49	15

2.5 样本稳定性

样本在室温放置 24 h 的情况下分解较为严重,相对误差(RE)高达 40%,已经完全达不到生物样本测定的需求,故样本最好在放置 6 h 内完成测定工作。见表 2。

表 2 血清样本中 HHT 在不同条件下的稳定性数据

条件	理论浓度/ (ng/mL)	实测浓度/ (ng/mL)	RSD/%	RE/%	n
室温放置 6 h	1.50	1.54	4.31	2.67	3
	90.00	81.38	3.40	-9.58	3
采样器中放置 24 h	1.50	1.52	5.97	1.33	5
	90.00	92.68	0.71	2.98	5
室温放置 24 h	1.50	1.09	31.50	-27.33	3
	90.00	53.33	5.47	-40.74	3
冻融 5 次	1.50	1.59	7.09	6.00	3
	90.00	82.59	2.75	-8.23	3
-80 °C 放置 5 d	1.50	1.45	8.25	-3.33	3
	90.00	81.54	2.51	-10.5	3
-80 °C 放置 10 d	1.50	1.42	0.81	-5.33	3
	90.00	92.54	7.65%	2.82	3

2.6 携带效应

内标 HT 的携带效应为 0,待分析物 HHT 的携带效应 10.88%,满足待分析物如果存在携带效应,其主峰面积应低于 LLOQ 浓度主峰面积 20%的要求,故认为携带效应不影响待分析物的测定。

2.7 稀释完整性

质控浓度 400 ng/mL 经空白血清稀释 4 倍后进行测定,测得值相对误差为 4.05%,RSD 为 1.97%,满足精密度、准确度±15%的要求,表明高浓度样本经空白血清稀释后并不影响实验结果的测定。

2.8 高脂和溶血样本考察结果

溶血样本的相对误差为 4.35%,RSD 为 4.37%,高脂样本的相对误差为 11.55%,RSD 为 5.81%,结果表明溶血对测定结果的影响相对较小,脂质含量高的样本对测定结果有一定影响,但依然能够满足生物样本的测定要求。

2.9 实际临床样本测定结果

通过收集用于生化测定的实际用药患者残存血清 6 份,测定其中 HHT 的含量,测定结果依次为 0.68、0.33、1.60、0.79、1.14、1.09 ng/mL,通过校正对应实际样本浓度为 2.62、1.27、6.16、3.04、4.39、4.20 ng/mL,其中 1 份样本测定结果低于 LLOQ,通过对病例信息进行调阅,发现该份样本距离给药结束接近 40 h,而其余 5 份样本距离给药结束时间为 24 h 左右,通过对实际样本的验证,证明该方法适用于 HHT 的含量测定,可以满足后续的相关研究。

3 讨论

由于儿童群体的特殊性,采用健康体检儿童残存混合血清进行方法学开发具有较大的优点,既能够避免额外采血对儿童导致的创伤,又可以避免基质不等价影响测定结果的准确性,使儿童群体获益。高脂和溶血样本是临床常见的样本类型,通过对这两种特殊生物基质的考察,可以确定其对待测物的干扰情况,本研究发现溶血不会影响结果的测定,而高脂样本对结果的测定有一定影响,导致测定值偏大,因此对于肥胖患者,应作相应的校正以保证结果的可靠性。白血病的治疗往往存在

联合用药的相关情况,而联合化疗方案中会同时采用阿糖胞苷和盐酸柔红霉素,通过将阿糖胞苷、柔红霉素加入待测血清中,考察其对测定结果的影响,结果发现这两种药物对结果的测定尚不构成影响,进一步证明本方法稳定可靠。

目前国外关于 UPLC-MS/MS 测定 HHT 的方法学采用的是同位素内标^[8],而国内 HHT 的同位素内标无法获取,本研究采用的内标物是与 HHT 具有相似结构的 HT,不仅获取容易,而且价格低廉,为普通实验室的开展相关研究工作提供了可能,但由于内标与待测物具有相似的结构特征,需要优化色谱条件进行有效的分离工作,本方法通过对色谱条件进行优化,使得色谱峰分离度及对称性均能够满足测定的要求。既往关于 HHT 测定方法通常都需要对待测组分进行萃取、氮气吹干等复杂的操作过程^[9],而本研究样品前处理过程简单,无需复杂的前处理步骤,样本回收率高,更能适应临床检测需求,通过对实际用药患者用于其他检测项目的残存血样进行测定的结果,可以证明该方法稳定可靠,可以用于后续的儿童体内药动学及剂量效应关系研究。

本研究开发的方法样本前处理过程简单,样本需求量少,灵敏度高,有利于常规临床监测工作的顺利开展,这为儿童患者后续的临床药代动力学和药效学相关关系研究以及剂量依赖性毒性的相关研究,提供了技术性支撑。

参考文献:

[1] 李会波, 赛音其木格, 白院生. 高三尖杉酯碱在血液病治疗中的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(1): 63-65.
 [2] 刘黔伟, 魏辉. 高三尖杉酯碱在血液病中的应用及研究进展[J]. 癌症进展, 2015, 13(4): 382-385.
 [3] CORTES J, LIPTON J H, REA D, et al. Phase 2 study of subcutaneous omacetaxine mepesuccinate after TKI failure in patients with chronic-phase CML with T315I mutation [J]. Blood, 2012, 120(13): 2573-2580.
 [4] FEUN L G, SAVARAJ N, LANDY H, et al. Phase II study of homoharringtonine in patients with recurrent primary malignant central nervous system tumors [J]. Journal of neuro-oncology, 1990, 9(2): 159-163.
 [5] 欧美贤, 张美微, 于凡, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定伏立康唑血药浓度及其临床应用[J]. 儿科药理学杂志, 2021, 27(7): 38-42.
 [6] European Medicines Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, 2022 [EB/OL]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf
 [7] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[S]. 2020 版. 2020; 466-472.
 [8] NIJENHUIS C M, LUCAS L, ROSING H, et al. Validation of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assays quantifying omacetaxine mepesuccinate and its 4'-des-methyl and cephalotaxine metabolites in human plasma and urine [J]. Journal of chromatography B, 2015, 1002(8): 152-159.
 [9] 杨铭, 杨纯正, 马建国, 等. 高效液相色谱法检测血清中的高三尖杉酯碱[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 147-149.

(编辑:刘雄志)

(收稿日期:2023-11-21 修回日期:2023-12-06)