

用 LC-MS/MS 法测定非小细胞肺癌患者血浆中
伏美替尼浓度Determination of furmonertinib in non-small cell lung cancer patients plasma by
LC-MS/MS程敏毓^{1,2}, 李力², 沈琦²,
羊红玉³(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江
医院药学部, 浙江 杭州 310013; 3. 浙江大学
医学院附属第一医院临床药学部, 浙江 杭州
310003)CHENG Min-yu^{1,2}, LI Li²,
SHEN Qi², YANG Hong-yu³(1. School of Pharmacy, Zhejiang
University, Hangzhou 310012, Zhejiang
Province, China; 2. Department of
Pharmacy, Zhejiang Hospital, Hangzhou
310013, Zhejiang Province, China; 3.
Department of Clinical Pharmacy, the
First Affiliated Hospital, Zhejiang
University School of Medicine, Hangzhou
310003, Zhejiang Province, China)基金项目: 浙江省中医药科技计划基金资助项
目(2023ZL213)作者简介: 程敏毓(1974-), 女, 副主任药师, 主
要从事医院药学方面的工作

通信作者: 羊红玉, 副主任药师

Tel: (0571)87236531

E-mail: hongyuyang@zju.edu.cn

摘要:目的 建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中伏美替尼浓度,并将此方法应用于非小细胞肺癌患者服药后的血药浓度测定。**方法** 伏美替尼-d3为内标,血浆样品用乙腈沉淀蛋白,色谱柱为Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(2.1 mm×100.0 mm, 3.5 μm),流动相A为10 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱,进样时间为3 min。用电喷雾离子源,正离子模式,多反应监测(MRM)扫描方式进行检测。考察该方法的专属性、线性范围、精密度与准确度、提取回收率、基质效应和稳定性。**结果** 伏美替尼在0.50~100.00 μg·L⁻¹标准曲线为 $y = 3.95 \times 10^{-2}x - 4.16 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9954$),准确度在95.8%~107.3%;批内($n=6$)和批间($n=3$)精密度良好,变异系数(CV)均小于15%;伏美替尼和内标的提取回收率在83.1%~88.2%,基质效应在94.6%~105.8%。**结论** 建立的LC-MS/MS方法测定伏美替尼浓度符合生物样本分析要求,可用于临床伏美替尼的浓度测定。

关键词: 伏美替尼;液相色谱-串联质谱;血药浓度**DOI:**10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.021**中图分类号:** R979.1**文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2025)06-0862-04

Abstract: Objective To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of furmonertinib in human plasma and apply this method to analyze the blood concentration of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients after taking medicine. **Methods** Furmonertinib-d3 was employed as the internal standard. The analyte and internal standard were extracted from plasma by protein precipitation with acetonitrile and chromatographed on Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ (2.1 mm×100.0 mm, 3.5 μm); mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (both of containing 0.1% formic acid); the whole analytical time was 3 min. The quantitative analysis were ionized with an electrospray ionization (ESI) source and operated in positive ion, multiple reaction monitoring (MRM) mode, the specificity, linear range, precision and accuracy, extraction recovery rate, matrix effect, dilution validation, and stability were all investigated. **Results** The standard curves were demonstrated to be linear in the range of 0.50-100.00 μg·L⁻¹ with $y = 3.95 \times 10^{-2}x - 4.16 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9954$). The accuracy was 95.8%-107.3%. The coefficient of variation (CV) of inter-day ($n=6$) and intra-day ($n=3$) for four different

concentration levels were less than 15%. The average recoveries and matrix effects were between 83.1% – 88.2% and 94.6% – 105.8%. **Conclusion** The established LC – MS/MS method for determining the concentration of vormetinib meets the requirements of biological sample analysis and can be used for the concentration determination of vormetinib in clinical practice.

Key words: furmonertinib; liquid chromatography – tandem mass spectrometry; plasma concentration

伏美替尼是第3代表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,目前用于治疗既往经EGFR – 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)治疗后出现疾病进展,且存在EGFR^{T790M}突变阳性的局部晚期或转移性非小细胞肺癌(nonsmall – cell lung cancer, NSCLC)^[1]。有关伏美替尼的血药浓度测定方法国外已有报道^[2–3],国内有关伏美替尼人血浆中的测定方法和血药浓度数据报道较少。因此,本试验在文献[2–3]的基础上,建立了一种快速、灵敏的测定人血浆中伏美替尼的浓度液相色谱 – 串联质谱(liquid chromatography – tandem mass spectrometry, LC – MS/MS)法,并将该方法应用于肿瘤患者服药后血药浓度的测定,为后续系统的伏美替尼临床药代动力学研究提供方法支持。

材料与方法

1 材料

药品与试剂 伏美替尼,纯度:99.6%,批号:B12220501;伏美替尼 – d3,纯度:98.4%,批号:CN210401,均为上海艾力斯医药科技股份有限公司提供。肝素钠抗凝空白血浆或全血,由健康志愿者提供。

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

2 测定条件与血浆样品处理

色谱条件 色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB – C₁₈(2.1 mm × 100.0 mm, 3.5 μm);流动相组成:乙腈(A) – 10 mmol · L⁻¹醋酸铵(B);0 ~ 0.5 min 25% A;0.5 ~ 1.0 min 92% A,1.0 ~ 2.0 min 95% A;2.0 ~ 3.0 min 25% A。流速:0.25 mL · min⁻¹;柱温:30 °C;进样量20 μL。

质谱条件 电喷雾电离源(electron spray ionization, ESI);正离子方式检测;辅助气1:344.5 kPa;气帘气:137.9 kPa;碰撞气:34.5 kPa;辅助气2:344.5 kPa;离子源电压:5 500 V;温度:450 °C;扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM),去簇

电压分别为90 V(伏美替尼)和100 V(内标);碰撞能量均为40 V;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 569.1 → 441.0(伏美替尼)和 m/z 572.2 → 441.1(内标伏美替尼 – d3)。

血浆样品处理 取含药血浆100 μL至1.5 mL EP管中,加入0.197 μg · mL⁻¹内标溶液5 μL,加入乙腈0.2 mL,涡旋混合2 min,以 1.3×10^4 r · min⁻¹离心10 min,取上清液每次进样20 μL。

3 溶液配制

对照溶液和质控溶液 称取伏美替尼对照品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,分别用于配制标准系列样品和质控样品。用甲醇依次稀释伏美替尼储备液,得到伏美替尼质量浓度分别为0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0和100.0 μg · L⁻¹的标准系列溶液。另一份用甲醇依次稀释后获得质量浓度分别为0.50、1.50、15.00和75.00 μg · L⁻¹(定量下限、低、中和高质量浓度)的质控溶液。

内标溶液 适量甲醇多次润洗内标伏美替尼 – d3 1 mg于50 mL棕色容量瓶中,加入甲醇稀释定容,得伏美替尼 – d3内标标准储备液19.66 mg · L⁻¹,用甲醇稀释伏美替尼 – d3储备液得到197 μg · L⁻¹的工作溶液,在4 °C条件下保存。

4 方法学考察

专属性 分别取6个不同来源的空白血浆,空白血浆中加入一定浓度的对照品溶液和内标溶液、患者服药后的血浆样品加内标处理后样品,按“血浆样品处理”项方法处理后,进行LC – MS/MS分析。

标准曲线与定量下限 吸取伏美替尼系列对照溶液10 μL于1.5 mL EP管中,配制成含有伏美替尼质量浓度为0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0和100.0 μg · L⁻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,每一浓度平行2样本。以待测物浓度 x (μg · L⁻¹)为横坐标,待测物与内标物峰面积比值(A_s/A_i)^y为纵坐标,用加权($W = 1/x^2$)最小二乘法计算标准曲线。

精密度与回收率 分别取伏美替尼质控(quality control, QC)溶液10 μL,按“标准曲线与定量下限”项

下方法操作,制备成质量浓度分别为 0.50、1.50、15.00 和 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (定量下限、低、中和高)4 个质量浓度的 QC 血浆样本。共配制 3 批,每一质量浓度水平分析样本 6 个。计算血浆中伏美替尼批内和批间的相对标准差(relative standard deviation, RSD),并以实测值与加入量之比求算方法准确度。按照上述方法,分别配制含伏美替尼的低、中、高(1.50、15.00 和 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个质量浓度的 QC 血浆样本,按“血浆样品处理”项下操作,每个质量浓度平行测定 6 个样本,得峰面积 A;将人空白血浆处理后操作至取上清液,加入适量伏美替尼对照品溶液配制对应 QC 质量浓度的样品,涡旋混合后离心,进样得峰面积 B,每个质量浓度平行 6 样本测定。伏美替尼提取回收率 = $A/B \times 100\%$,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 QC 浓度的伏美替尼和内标溶液,峰面积记为 C;以水代替空白血浆其余操作同上,峰面积记为 D,以 $C/D \times 100\%$ 分别计算分析物和内标的基质效应因子。再以分析物的基质效应因子除以内标的基质效应因子计算内标归一化基质效应因子。

稳定性 配制质量浓度为 1.50 和 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个浓度的 QC 血浆样本,每个浓度平行配制 3 个样本,分别考察样品室温放置 5 h、处理后自动进样器 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h,反复冻融 3 次,于 -80°C 环境中放置 30 d 后的稳定性。

5 方法学应用

本研究经浙江医院伦理委员会批准[伦理批号:(2017)临审第(57K)号]。受试者均免除签署知情同意书。在我院住院确诊的服用伏美替尼治疗的晚期 NSCLC 患者,服药 7 d 后,分别于第 8 天空腹采集静脉血。

结 果

1 方法学评价

专属性 如图 1 所示,血浆中的内源性物质不干

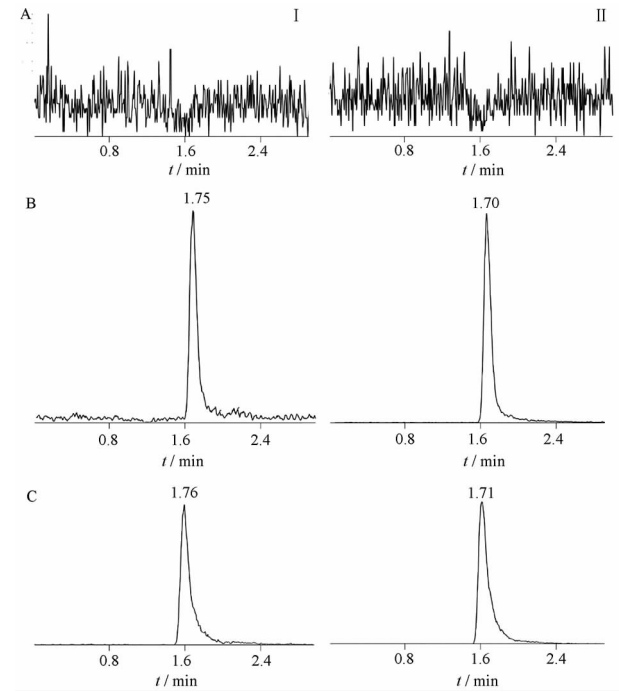


图 1 伏美替尼血浆样品的典型色谱图
Figure 1 Representative chromatograms of furmonertinib in human plasma
A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with furmonertinib ($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and internal standard ($1.97 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ furmonertinib b - d3); C: Plasma sample after oral administration of 80 mg of furmonertinib once daily; I: Furmonertinib; II: Furmonertinib b - d3.

扰待测物伏美替尼和内标的测定。伏美替尼和内标的保留时间分别为 1.75 和 1.70 min。

标准曲线和定量下限 伏美替尼直线回归方程为 $y = 3.95 \times 10^{-2}x - 4.16 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9954$),结果表明伏美替尼在血浆浓度 0.50 ~ 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,连续测定 6 份定量下限(lower limit of quantification, LLOQ)样本,准确度为 95.8%,变异系数(coefficient of variation, CV)为 7.36%。定量下限为 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

精密度与提取回收率 如表 1 所示:伏美替尼 4 个质量浓度的质控样品批内、批间 CV 在 5.37% ~ 8.89%,

表 1 用液相色谱与串联质谱法测定伏美替尼的精密度、准确度和提取回收率
Table 1 Determination of precision, accuracy and extraction recovery of vormetinib by liquid chromatography – tandem mass spectrometry

C ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Intra - day (n = 6)		Inter - day (n = 3)		Extraction recovery ($\bar{x} \pm s, \%$)
	Measured ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	CV (%)	Measured ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	CV (%)	
0.50	0.48 $\pm$ 0.036	7.59	0.49 $\pm$ 0.04	8.89	—
1.50	1.53 $\pm$ 0.12	7.64	1.57 $\pm$ 0.11	7.14	83.89 $\pm$ 3.56
15.00	15.56 $\pm$ 0.84	5.37	15.78 $\pm$ 0.98	6.18	87.22 $\pm$ 4.31
75.00	80.52 $\pm$ 5.09	6.32	79.97 $\pm$ 5.12	6.40	90.67 $\pm$ 8.24

CV: Coefficient of variation.

准确度均在 95.8% ~ 107.3%。

基质效应 伏美替尼低、中和和高经内标校正的基质效应分别为 94.6%、97.7% 和 105.8%，CV 在 5.96% ~ 9.08%。因此，本实验建立的测定方法不受基质效应的影响。

稳定性 在考察的条件下，伏美替尼 QC 样品的准确度在 93.4% ~ 104.5%，CV 在 6.4% ~ 10.6%，表明伏美替尼在上述条件下稳定性良好。

2 血药浓度测定

将建立的 LC-MS/MS 方法用于伏美替尼的稳态谷浓度测定。4 例(男性 3 例,女性 1 例)受试者,年龄为 65 ~ 73 岁,在我院住院确诊且服用伏美替尼治疗的晚期 NSCLC。3 例患者口服伏美替尼片 80 mg,1 例患者口服伏美替尼 160 mg,按照样品采集的方法要求,分离血浆后用本方法测定血浆中伏美替尼浓度,测得血药浓度在 4.6 ~ 23.9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

讨 论

本研究在建立 LC-MS/MS 分析方法过程中,对色谱、质谱条件以及生物样品前处理方法进行了优化。根据伏美替尼结构特征,选择用 ESI 正离子作为电离模式,伏美替尼在乙腈中的信号要比在甲醇中高,故选用乙腈作为有机相。流动相的酸度对待测物的分离和保留时间有显著影响,本研究发现流动相中加入 0.1% 甲酸后分析组分的色谱行为较好,同时甲酸有利于伏美替尼的离子化,可以得到较高的检测灵敏度,加入 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵有利于保留时间稳定。本方法用同位素作为内标,在生物样品的分析过程中,由于同位素内标与待测物具有相同的化学结构,二者在样品中的行为相似,这有助于减少基质效应和其他干扰,从而提高分析的精确度和准确度。本研究在提取方法的选择过程中,尝试了蛋白沉淀与液液萃取,分别用乙腈和甲醇作为蛋白沉淀剂,液液萃取分别尝试了甲基叔丁基醚和乙酸乙酯,发现与乙腈沉淀比较,液液萃取回收率较低,本研究用乙腈对血

浆样品进行蛋白沉淀,操作简单方便,并且基质效应影响低、回收率高。本研究将分析时间缩短至 3.0 min,显著提高了分析效率,可满足临床高通量分析的需要。对本研究方法的选择性、线性、准确度、精密度、灵敏度、稳定性、基质效应等项目进行了系统的方法学验证,可满足药物临床药代动力学研究的技术要求。本测定方法样品处理简单快捷,血浆用量少,分析时间短。测得的 4 例患者血药浓度范围在 4.6 ~ 23.9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,差别较大。伏美替尼是细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 3A4 底物和 CYP3A4 诱导药,联合用药期间应注意药物相互作用,这可能是稳态浓度差异大的原因^[4]。伏美替尼累积发生率较高的药物不良反应包括谷丙转氨酶升高、腹泻、谷草转氨酶升高和皮疹^[5],其中 3 例患者在服药期间发生了不同程度的谷丙转氨酶升高、腹泻和皮疹,这是否与伏美替尼在体内的血药浓度相关,值得进一步研究。本方法可以用于伏美替尼血药浓度的分析和后续的相关研究。

参考文献:

- [1] 崔久嵬,段建春,任胜祥,等. 三代 EGFR-TKI 在 EGFR 突变 NSCLC 治疗中应用的专家共识(2022 年版)[J]. 中国肺癌杂志,2022,25(9):627—641.
- [2] LIU X, LI W, ZHANG Y F, *et al.* Simultaneous determination of alflutinin and its active metabolite in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019;176112735. 2019-11-30 [2024-05-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31394305/>.
- [3] ZOU H X, ZHANG Y F, ZHONG D F, *et al.* Effect of autoinduction and food on the pharmacokinetics of furmonertinib and its active metabolite characterized by a population pharmacokinetic model[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 43(7):1865—1874.
- [4] ZHU Y, ZHANG Y, JIANG J, *et al.* Effects of rifampicin on the pharmacokinetics of alflutinin, a selective third-generation EGFR kinase inhibitor, and its metabolite AST5902 in healthy volunteers [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(4):1—8.
- [5] 夏盼盼,范若南,鹿楠楠,等. 伏美替尼治疗非小细胞肺癌的研究进展[J]. 中国药业,2024,33(1):128—132.

(收稿日期 2024-10-24)