

中图分类号: R969.1; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)14-0046-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.14.011



超高效液相色谱串联质谱法测定奥拉帕利血药浓度及临床样本监测*

向 露, 唐甜甜, 李丽仙, 张晓菊, 刘 梅, 黄一琴[△]

(重庆大学附属肿瘤医院, 重庆 400030)

摘要:目的 建立测定人血浆中奥拉帕利(OLA)血药浓度的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 以奥拉帕利-d8(OLA-d8)为内标,以乙腈对血浆样本进行前处理,采用UPLC-MS/MS法检测OLA血药浓度。色谱条件,色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为0.1%甲酸溶液-0.1%甲酸甲醇(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为40℃,进样量为1 μL。质谱条件,电喷雾离子源,正离子模式,多反应监测扫描方式进行信号采集,正离子电压为3 100 V,离子传输管温度为350℃,鞘气压力为5 Arb,辅助气压力为23 Arb。收集医院妇科肿瘤中心7例服用OLA的卵巢癌患者的血浆样本进行血药浓度检测。结果 OLA质量浓度在100~10 000 ng/mL范围内与OLA和OLA-d8峰面积比值线性关系良好($R^2 = 0.9988$),OLA批内和批间精密度的RSD均小于15%,准确度为98.59%~111.08%,提取回收率、基质效应及稳定性等结果均符合生物样品分析的相关要求。7例患者OLA血药浓度在250.61~1 932.77 ng/mL之间,均在所建方法的线性范围内。结论 该方法灵敏度高,特异性好,且样本处理简单,可用于真实世界患者OLA的血药浓度监测。

关键词:奥拉帕利;超高效液相色谱串联质谱法;血药浓度监测;临床样本

Determination of Olaparib Blood Concentration and Clinical Sample Monitoring by UPLC-MS/MS

XIANG Lu, TANG Tiantian, LI Lixian, ZHANG Xiaojie, LIU Mei, HUANG Yiqin

(Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing, China 400030)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for determining the concentration of olaparib (OLA) in human plasma. **Methods** Olaparib-d8 (OLA-d8) was used as the internal standard, and the plasma samples were pretreated with acetonitrile. The plasma concentration of OLA was detected by UPLC-MS/MS method. Chromatographic conditions: the chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution-0.1% formic acid methanol (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40℃, the injection volume was 1 μL. Mass spectrometry conditions: electrospray ion source, positive ion mode, and multiple reaction monitoring scanning mode were adopted for signal acquisition, the positive ion voltage was set at 3 100 V, the ion transport tube temperature was set at 350℃, the sheath gas pressure was set at 5 Arb, the auxiliary gas pressure was set at 23 Arb. The plasma samples of seven patients with ovarian cancer treated with OLA in the Gynecological Tumor Center of the hospital were collected for blood concentration detection. **Results** There was a good linear relationship between the mass concentration of OLA and the peak area ratio of OLA and OLA-d8 in the range of 100-10 000 ng/mL ($R^2 = 0.9988$). The intra-batch and inter-batch precision RSD of OLA was lower than 15%, and the accuracy was 98.59%-111.08%. The results of extraction recovery, matrix effect and stability all met the relevant requirements of biological sample analysis. The plasma concentration of OLA in seven patients ranged from 250.61 to 1 932.77 ng/mL, which were within the linear range of the established method. **Conclusion** The established method is sensitive, specific, and simple for sample preparation, which is suitable for therapeutic drug monitoring of OLA in real-world clinical samples.

Key words: olaparib; UPLC-MS/MS; blood concentration monitoring; clinical sample

奥拉帕利(OLA)是首款应用于临床的聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)抑制剂,2018年在我国上市,目前成为国内外卵巢癌诊疗指南中晚期卵巢癌基因(Brca)突变患者一线维持和铂敏感复发维持治疗的标

准选择^[1]。随着OLA在临床的广泛应用,用药安全性问题也备受关注。临床研究和真实世界研究中,均观察到OLA存在消化道毒性、贫血和疲乏等不良反应,这也是导致剂量减少和停药的主要原因^[2-3]。由于未考虑患者

* 基金项目:重庆市沙坪坝区科卫联合医学科研项目[2023SQKWLH013];重庆市科卫联合医学科研项目[2024MSXM037];吴阶平医学基金会科研项目[320.6750.2024-18-44]。

第一作者:向露,女,硕士,主管药师,研究方向为肿瘤临床药学、医院药学,(电子信箱)xianglu51@163.com。

[△]通信作者:黄一琴,女,硕士,主治医师,研究方向为妇科恶性肿瘤的诊治,术后化疗及靶向药物治疗,(电子信箱)88210997@qq.com。

间代谢酶的遗传多态性、疾病、药物相互作用等诸多个体因素可能的影响,在相同的给药剂量下,患者间药物代谢动力学参数如谷浓度($C_{\min}$)存在高度的变异性,且研究表明,OLA 患者 $C_{\min}$ 越高,不良反应发生率也越高^[4-5]。因此,监测该药的 $C_{\min}$ 有助于预测患者是否存在药物毒性风险,这是实施个体化治疗及提高治疗质量的有效方式。然而,目前人血浆中 OLA 浓度检测方法相关的文献报道仍较少,国外报道的主要有液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法^[6-9],国内仅有 1 篇测定大鼠血浆中 OLA 血药浓度的方法^[10]。鉴于此,本研究中拟建立简单、快速的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,用于测定人血浆中 OLA 浓度,为进一步研究 OLA 血浆药物暴露与其疗效和毒性之间的关系提供技术支撑。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Scientific™ TSQ endura™ 液相色谱串联质谱检测系统,包括 TSQ endura 型三重四极杆质谱仪、UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪和 TraceFinder 4.1 软件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SQP 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.01 mg);KB3 型涡旋混合仪(南京迪乐嘉生物科技有限公司);SB-5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);L3-5K 型医用离心机(湖南可成仪器设备有限公司);H1-16KR 型医用离心机(湖南可成仪器设备有限公司)。

1.2 试剂

奥拉帕利对照品(批号为 136925,含量 99.34%),奥拉帕利-d8 对照品(批号为 255623,含量 ≥ 98%),均购于美国 MCE 生物科技公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸、二甲基亚砜(DMSO)为分析纯,水为屈臣氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-0.1% 甲酸甲醇(B),梯度洗脱(0~2 min 时 20%B → 50%B, 2~2.7 min 时 50%B, 2.7~4 min 时 50%B → 90%B, 4~5 min 时 90%B, 5~6 min 时 90%B → 20%B, 6~7 min 时 20%B);流速为 0.3 mL/min;柱温为 40 °C;进样量为 1 μL。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子模式,多反应监测(MRM)扫描方式进行信号采集。离子源电压为 3 100 V,离子源温度为 350 °C,鞘气压力 5 Arb,辅助气压力 23 Arb。OLA 和 OLA-d8 质谱参数见表 1。

表 1 OLA 和 OLA-d8 串联质谱参数

Table 1. Tandem mass spectrometry parameters of OLA and

OLA-d8			
化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(v)
OLA	435.30	281.254	29.87
OLA-d8	443.25	281.254	30.73

2.2 溶液及样本处理

贮备液:称取 OLA 对照品 10.00 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用 0.1% DMSO-甲醇定容,制成质量浓度为 1 mg/mL 的 OLA 贮备液;称取 OLA-d8 对照品 1.00 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的内标贮备液。均于避光条件下配制,并避光保存于 -20 °C 医用冰箱。

工作液:取 OLA 贮备液适量,以 50% 甲醇逐级稀释,得质量浓度分别为 100, 200, 500, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 ng/mL 的系列工作液。取 OLA-d8 贮备液适量,以乙腈稀释,得质量浓度为 250 ng/mL 的内标工作液。

质控液:取 OLA 贮备液适量,以 50% 甲醇制备标准液,以及制备质量浓度分别为 300, 1 500, 7 500 ng/mL 的低、中、高质控液。

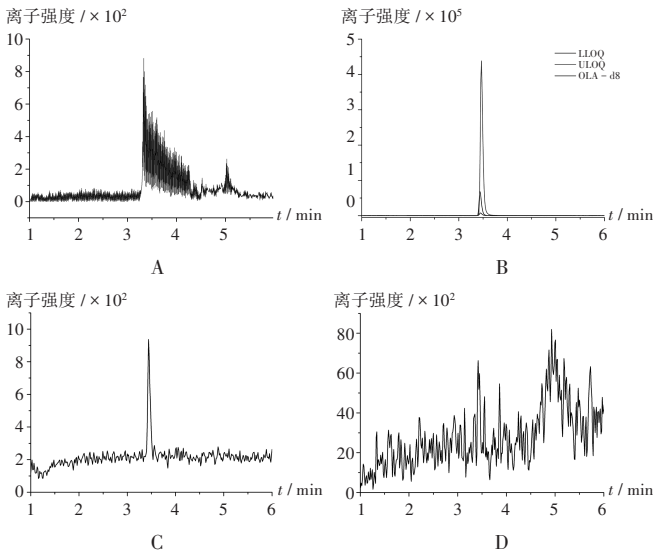
样本处理:取血浆 100 μL,置 1.5 mL 离心管中。加入 300 μL 乙腈(含内标),涡旋 5 min;4 °C 下、14 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得。

2.3 方法学考察^[11]

系统适用性试验:取 6 份不同来源的人空白血浆,按 2.2 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果显示,OLA 与 OLA-d8 的保留时间分别为 3.45 min 和 3.42 min,内源性物质对 OLA 及 OLA-d8 均无干扰。色谱见图 1 A-B。

线性关系与定量下限(LLOQ)考察:取 2.2 项下系列工作液各适量,加入血浆,按 2.2 项下方法处理,再按 2.1 项下试验条件进样测定,记录峰面积。以血浆中 OLA 质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、OLA 与 OLA-d8 的峰面积比值(Y)为纵坐标,采用加权($\omega = 1/x^2$)最小二乘法进行回归,得回归方程为 $Y = 7.362 \times 10^{-4} X - 4.867 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0.9988$)。结果显示,OLA 质量浓度在 100~10 000 ng/mL 范围内和 OLA 与 OLA-d8 峰面积比值线性关系良好^[7]。以信噪比为 10:1 时 OLA 质量浓度为 LLOQ,结果 LLOQ 为 100 ng/mL。

残留效应:取定量上限(ULOQ,即线性范围最大值)溶液适量,进样测定,随后进样 50% 甲醇考察残留效应,重复 3 次。结果表明,OLA 在 ULOQ 后空白样品中的响应值均低于 LLOQ 的 20% (分别为 10.49%, 11.78%, 10.06%),OLA-d8 在进样后的空白样品中的响应值为均小于样本响应值的 5% (0.12%, 0.02%,



A. 空白血浆样本 B. 定量下限、定量上限溶液及 OLA - d8 色谱图 C. OLA 的残留效应 D. OLA - d8 的残留效应
图 1 人血浆中分析物的典型色谱图

A. Blank plasma sample B. Chromatograms of LLOQ, ULOQ and OLA - d8 C. Residue effect of OLA D. Residue effect of OLA - d8
Fig. 1. Typical chromatogram of analytes in human plasma (0.07%), 连续样品测定不受影响, 方法残留效应可。色谱见图 1 C - D, 残留效应考察结果见表 2。

准确度与精密度试验: 选取 LLOQ 及 2.2 项下低、中、高质控液各适量, 加入血浆分别平行配制 5 份, 按 2.2 项下方法处理样本后, 按 2.1 项下试验条件进样测定。每天 3 次, 连续 3 d, 根据当日标准曲线计算血浆样品质量浓度, 然后计算方法的批内与批间准确度和精密度。结果表明, OLA 在 4 个质量浓度下批内批间精密度的 RSD 均小于 15%, 准确度为 98.59% ~ 111.08%, 方法精密度与准确度良好。详见表 2。

表 2 准确度和精密度试验结果(%, $n = 5$)

质量浓度 (ng / mL)	批内		批间	
	准确度	精密度 RSD	准确度	精密度 RSD
100	105.68	1.66	110.08	6.43
300	98.59	1.40	100.19	3.53
1 500	105.03	2.41	100.38	8.89
7 500	111.07	1.59	108.15	7.06

稳定性试验: 取 2.2 项下血浆样本, 在 -20°C 下放置 24 h、48 h、96 h, 在 4°C 进样器中放置 24 h, OLA (LLOQ 及低、中、高质控液), 在 -20°C 条件下储存 1 d、3 d、15 d、20 d、30 d 时按 2.2 项下方法处理样本, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果在考察条件下, 分析物每一质量浓度的均值与标示浓度的 RSD 均在 $\pm 15\%$ 范围内, 表明各样本在试验条件下基本稳定。详见表 3。

表 3 各样本在试验条件下的稳定性试验结果(%)

Tab. 3 Results of stability test of each samples under experimental conditions (%)								
OLA 质量浓度 (ng / mL)	质控溶液 (-20°C)				血浆样本 (-20°C)			处理后样本 (进样器 4°C , 24 h)
	1 d	3 d	15 d	30 d	24 h	48 h	96 h	
100	1.66	2.58	2.30	6.93				
300	1.40	2.30	0.26	2.90	3.89	3.54	3.21	3.22
1 500	2.41	2.39	3.00	1.18				
7 500	1.59	5.12	4.72	6.15	1.61	1.28	4.05	4.18

提取回收试验: 取 90 μL 空白血浆, 分别加入 300, 7 500 ng / mL 质控溶液 10 μL , 每个质量浓度平行 3 份, 按 2.2 项下方法处理样本, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积(A)。另取 100 μL 空白血浆, 按 2.2 项下方法处理样本, 取 90 μL , 分别加入 300, 7 500 ng / mL 质控液 10 μL , 内标工作液 300 μL , 每个质量浓度平行 3 份, 混匀, 离心, 取上清液 300 μL , 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积(B)。计算 OLA 的提取回收率(= $A / B \times 100\%$)。结果显示, 低、高质控液 OLA 提取回收率分别为 110.34% 和 118.34%, RSD 分别为 4.38% 和 8.13%, 表明样品前处理方法可行。

基质效应考察: 取 6 个不同的空白血浆 90 μL , 均分为 2 组, 分别加入质量浓度为 300, 7 500 ng / mL 质控液 10 μL , 按 2.2 项方法处理样本, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 以乙腈替代空白血浆, 按上述方法操作并进样分析。通过计算基质存在下的峰面积, 与无基质的峰面积比值, 计算分析物和内标的基质因子, 进一步通过分析物的基质因子除以内标的基质因子, 计算经内标归一化的基质因子。结果表明, 低、高质控液 OLA 内标归一化基质因子分别为 1.25%, 1.10%, RSD 分别为 5.84% 和 4.69%, 均小于 15%, 表明样品测定不受基质影响, 满足分析要求。

2.4 临床样本检测

选取 7 例卵巢癌患者, 年龄 41 ~ 72 岁, 且均连续服用 OLA > 7 d, 均于上午服药前 30 min 采血。检测血浆中 OLA 的稳态 $C_{\min}$ 。结果显示, 患者 OLA $C_{\min}$ 为 250.61 ~ 1 932.77 ng / mL, 均在所建方法的线性范围内。详见表 4。

3 讨论

血药浓度测定是治疗药物监测(TDM)中最常用的手段, 临床通过测定药物浓度来调整给药剂量, 使患者处于最佳暴露范围内, 可达到降低毒副反应发生率、提高疗效及监测患者用药依从性等目的^[12]。文献报道显示, 在临床研究和真实世界研究中均观察到 OLA 引起的贫血等不良反应的发生与其 $C_{\min}$ 存在明显的暴露 - 毒性关系^[2-4, 13], 因此, 开展 OLA 的 TDM 具有现实意义。

表 4 临床样本测定结果 ($n = 7$)

Tab. 4 Determination results of clinical samples ($n = 7$)

编号	年龄(岁)	服药方法	$C_{\min}$ (ng/mL)
1	72	早 150 mg, 晚 300 mg	250. 61
2	41	早 150 mg, 晚 300 mg	1 932. 77
3	49	每次 300 mg, 每日 2 次	1 059. 04
4	53	早 300 mg, 晚 150 mg	536. 88
5	60	每次 300 mg, 每日 2 次	838. 66
6	67	每次 300 mg, 每日 2 次	1 244. 84
7	57	每次 300 mg, 每日 2 次	1 360. 50

一项真实世界回顾性研究显示,当OLA的 $C_{\min}$ 高于2 500 ng/mL时,患者发生不良事件的发生率显著升高,并由此提出了2 500 ng/mL $C_{\min}$ 阈值可能有助于指导卵巢癌患者的剂量调整^[4]。MOHMAED ALI等^[5]的回顾性研究结果显示,尽管发生不良反应患者的 $C_{\min}$ 更高,但无法确定2 500 ng/mL的 $C_{\min}$ 值为OLA的毒性阈值。分析研究结果的差异可能与纳入的患者人群、样本量较少等因素有关。针对西方人群OLA的TDM相关研究正在进行,而针对中国人群的有关研究鲜有报道。

为此,本研究中建立了用于测定人血浆中OLA质量浓度的UPLC-MS/MS法,该方法前处理操作简单,分析时间短且分析效率高,在国内率先应用于OLA的血药浓度监测。在测定的7例卵巢癌患者中,4例患者用法用量为标准给药剂量(300 mg、每日2次),质量浓度在838.66~1 360.50 ng/mL之间,这与既往文献中报道的 $C_{\min}$ 范围相符^[14];另3例患者,均因胃肠道反应及贫血等不良反应减量。在减量的给药方案下,血药浓度范围为250.61~1 932.77 ng/mL,提示患者个体差异较大。临床药师对患者开展TDM,发现病例4因出现口腔溃疡,未遵医嘱自行减量,血药浓度仅536.88 ng/mL,相对偏低,提示血药浓度结果在一定程度上可用于监测患者的用药依从性。未来将进一步收集卵巢癌患者血浆样本,特别是正在发生不良反应的人群,通过收集更多的临床数据,探索OLA在中国人群中的毒性阈值,为提升临床治疗质量、减少药品不良反应的发生提供更多数据支持,进一步实现OLA的临床个体化治疗。

综上所述,本研究中所建UPLC-MS/MS法灵敏度、准确度与精密度较高,可作为可靠的检测方法用于TDM。

参考文献

[1] 孔北华,刘继红,黄 鹤,等. 卵巢癌 PARP 抑制剂临床应用指南(2022 版)[J]. 现代妇产科进展,2022,31(8):561-572.
[2] RICCI AD, RIZZO A, NOVELLI M, et al. Specific Toxicity of Maintenance Olaparib Versus Placebo in Advanced

Malignancies: A Systematic Review and Meta - analysis [J]. Anticancer Res, 2020, 40(2):597-608.
[3] ZHENG H, GAO Y, GUO H, et al. Real - world Experience of Olaparib Treatment in Patients with Ovarian Cancer: A Chinese Multicenter Study[J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(9):1735-1742.
[4] VELEV M, PUSZKIEL A, BLANCHET B, et al. Association between Olaparib Exposure and Early Toxicity in BRCA - Mutated Ovarian Cancer Patients: Results from a Retrospective Multicenter Study[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(8):804.
[5] MOHMAED ALI MI, BRUIN M, DEZENTJÉ VO, et al. Exposure - Response Analyses of Olaparib in Real - Life Patients with Ovarian Cancer [J]. Pharm Res, 2023, 40(5):1239-1247.
[6] CANIL G, ORLENI M, POSOCCO B, et al. LC - MS / MS Method for the Quantification of PARP Inhibitors Olaparib, Rucaparib and Niraparib in Human Plasma and Dried Blood Spot: Development, Validation and Clinical Validation for Therapeutic Drug Monitoring[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(5):1524.
[7] ORLENI M, CANIL G, POSOCCO B, et al. Bioanalytical Methods for Poly (ADP - Ribose) Polymerase Inhibitor Quantification: A Review for Therapeutic Drug Monitoring [J]. Ther Drug Monit, 2023, 45(3):306-317.
[8] PRESSIAT C, HUYNH HH, PLÉ A, et al. Development and Validation of a Simultaneous Quantification Method of Ruxolitinib, Vismodegib, Olaparib, and Pazopanib in Human Plasma Using Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry[J]. Ther Drug Monit, 2018, 40(3):337-343.
[9] BRUIN MAC, DE VRIES N, LUCAS L, et al. Development and validation of an integrated LC - MS / MS assay for therapeutic drug monitoring of five PARP - inhibitors [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1138:121925.
[10] 熊 婧, 杨 玲, 戴霞林, 等. UPLC - MS / MS 测定大鼠血浆中奥拉帕利的浓度及其药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(7):563-566.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:466-471.
[12] 张相林, 缪丽燕, 陈文倩. 治疗药物监测工作规范专家共识(2019 版)[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(8):897-898.
[13] BRUIN MAC, SONKE GS, BEIJNEN JH, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of PARP Inhibitors in Oncology [J]. Clin Pharmacokinet, 2022, 61(12):1649-1675.
[14] MATEO J, MORENO V, GUPTA A, et al. An Adaptive Study to Determine the Optimal Dose of the Tablet Formulation of the PARP Inhibitor Olaparib [J]. Target Oncol, 2016, 11(3):401-415.

(收稿日期:2025-02-08;修回日期:2025-06-13)