中图分类号：R917　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)12－0058－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.12.013

脊髓性肌萎缩症患者利司扑兰治疗药物监测方法研究*

吴　献[1,2]，黄晓会[2]，林志燕[2]，刘　艳[2]，蒋文高[1]，刘昕竹[2]，张　健[1,2△]

（1. 重庆医科大学药学院，重庆　400016；　2. 上海交通大学医学院附属新华医院，上海　200092）

摘要：目的　建立脊髓性肌萎缩症患者利司扑兰治疗药物监测的方法。**方法**　采用超高效液相色谱串联质谱法，色谱柱为Phenomenex Kinetex XB C_{18}柱（50 mm×3 mm，2.6 μm），流动相为0.07%甲酸水溶液（pH 4.5）－0.07%甲酸乙腈溶液（pH 5.5），梯度洗脱，流速为0.3 mL/min，柱温为40 ℃，进样量为2 μL；采用电喷雾离子源（正离子模式），多反应监测模式，利司扑兰的离子对*m*/*z*分别为402.2→319.2、402.2→374.4，RG7800的离子对*m*/*z*为417.3→360.2。**结果**　利司扑兰质量浓度在1.95～125.00 ng/mL范围内与其峰面积与内标峰面积比值线性关系良好（R^2=0.999 1，*n*=8），定量限为1.95 ng/mL；基质效应试验结果的变异系数均小于12%；精密度、稳定性试验结果的*RSD*均小于20%，准确度分别为87%～108%、87%～113%。6例患者利司扑兰血药浓度为13.03～91.14 ng/mL。**结论**　该方法操作简便、高效快速，可用于脊髓性肌萎缩症患者利司扑兰的治疗药物监测。

关键词：脊髓性肌萎缩症；利司扑兰；超高效液相色谱串联质谱法；治疗药物监测；含量测定

Study on Therapeutic Drug Monitoring Method of Risdiplam in Patients with Spinal Muscular Atrophy

WU Xian[1,2], HUANG Xiaohui[2], LIN Zhiyan[2], LIU Yan[2], JIANG Wengao[1], LIU Xinzhu[2], ZHANG Jian[1,2]

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, China　400016;　2. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China　200092)

Abstract: Objective　To establish a therapeutic drug monitoring (TDM) method of risdiplam in patients with spinal muscular atrophy. **Methods**　Ultra－high－performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC－MS/MS) was adopted, the chromatographic column was the Phenomenex Kinetex XB C_{18} column (50 mm×3 mm, 2.6 μm), the mobile phase was 0.07% formic acid aqueous solution (pH 4.5)－0.07% formic acid acetonitrile solution (pH 5.5) with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 2 μL. The electro－spray ionization was adopted with positive ion mode and multiple reaction monitoring mode. The mass－to－charge ratios (*m*/*z*) were 402.2→319.2 (risdiplam), 402.2→374.4 (risdiplam) and 417.3→360.2 (RG7800). **Results**　The linear range of risdiplam was 1.95－125.00 ng/mL (R^2=0.999 1, *n*=8). The limit of quantitation was 1.95 ng/mL. The coefficient of variation of the matrix effect test was lower than 12%. The *RSD*s of precision and stability tests were lower than 20%, with accuracy ranging from 87% to 108% and 87% to 113%, respectively. The plasma concentration of risdiplam in six patients was in the range of 13.03 to 91.14 ng/mL. **Conclusion**　This method is easy, efficient and fast, which can be used for TDM of risdiplam in patients with spinal muscular atrophy.

Key words: spinal muscular atrophy; risdiplam; UPLC－MS/MS; therapeutic drug monitoring; content determination

脊髓性肌萎缩症（SMA）为源于遗传因素的神经退行性疾病，其主要特征是脊髓内α－运动神经元的逐渐退化，导致肌力逐渐减弱[1]。该病多由运动神经元存活蛋白不足导致，主要由*SMN1*基因的纯合缺失或突变造成[2]。若不及时干预，SMA可能会进展并导致脊柱侧凸、延髓病变、呼吸衰竭等严重并发症，甚至死亡[3]。该病是婴儿死亡的主要遗传原因，新生儿患病率约为万分之一[4－5]。RG7800为首个进入人体临床试验的有潜力治疗SMA的小分子SMN2剪切修饰剂[6－7]，利司扑兰由其优化而来。美国食品和药物管理局（FDA）批准利司扑兰作为首个适用于16日龄及以上SMA患者的口服药物，其能穿越血脑屏障，并分布于全身。利司扑兰在推荐剂量下有可能恢复延髓和呼吸功能[8]。动物（大鼠和猴子）实验中，利司扑兰高剂量暴露导致了毒性反应，包括细胞周期抑制、视网膜变性、胃肠道上皮细胞变性、胰腺角化病、增生及皮肤和睾丸生殖细胞的变性[9]。但较低剂量较长时间的全身暴露是否会引发脱靶效应尚不清楚。利司扑兰血药浓度与其副作用之间的相关性也尚未明晰，监测其治疗窗十分必要[10]。本研究中建立了用于人血清中利司扑兰治疗药物监测（TDM）

*基金项目：中国药学会医院药学专业委员会人才专项资助项目[CPA－Z05－ZC－2022－003]；教育部·上海市生物医药临床研究与转化协同创新中心重点科研项目[CCTS－2022205]。

第一作者：吴献，男，在读硕士研究生，研究方向为临床药学，（电子信箱）2021120870@stu.cqmu.edu.cn。

△通信作者：张健，男，博士，主任药师，研究方向为临床药学，（电子信箱）zhangjian@xinhuamed.com.cn。

的超高效液相色谱串联质谱(UPLC－MS/MS)法,为SMA患者利司扑兰的临床TDM提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1290型超高效液相色谱－Agilent 6460三重四极杆串联质谱联用仪,配有B05.00 Masshunter Chromatography Workstation(美国Agilent公司);Eppendorf 5424 R型离心机(德国Eppendorf公司);Allegra X－15R型台式冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);Vortex KB3型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试药

利司扑兰对照品(批号为GC30845,含量大于99.00%),RG7800对照品(批号为GC37521,含量为99.56%),均购自美国Glpbio公司;空白血清(6份,用我院健康志愿者血液制备,均未使用过利司扑兰);乙醇、乙腈、甲醇、甲酸均为质谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水和双蒸水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Kinetex XB C_{18}柱(50 mm×3 mm,2.6 μm);流动相:0.07%甲酸水溶液(pH 4.5,A)－0.07%甲酸乙腈溶液(pH 5.5,B),梯度洗脱(0~5 min时95%A→10%A,5~6 min时10%A→95%A,6~6.5 min时5%A);流速:0.3 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源正离子模式(ESI^+);多反应监测(MRM)模式;毛细管电压为4 kV,喷雾电压为350 V,气体温度为325 ℃,鞘气温度为350 ℃,雾化器压力为45 psi,雾化气、干燥气均为氮气,流速分别为12,9 L/min。其余参数见表1。

表1 质谱条件部分参数

Tab. 1 Partial parameters of mass spectrometry

待测成分	m/z	碎裂电压(V)	碰撞能量(V)	碰撞池加速电压(V)
利司扑兰	402.2→319.2	120	12	7
	402.2→374.4	120	24	7
RG7800	417.3→360.2	80	30	7

2.2 溶液与样品制备

对照品溶液:取利司扑兰对照品10 mg,精密称定,加12 mL二甲基亚砜(DMSO),60 ℃下超声(功率200 W、频率40 kHz,下同)至完全溶解,得利司扑兰质量浓度为0.83 mg/mL的对照品溶液。

内标溶液:取RG7800对照品50 mg,精密称定,在60 ℃下超声溶解于10 mL乙醇中,制成质量浓度为5 mg/mL的内标贮备液。取内标贮备液适量,用甲醇稀释成质量浓度为1 250.00 ng/mL的溶液,即得。

血清样品预处理:取空白血清样品180 μL,置1.5 mL离心管中,加入1 000 μL甲醇沉淀蛋白,以2 800 r/min涡旋(圆周直径4 mm)1 min,静置5 min,4 ℃下13 000 r/min离心10 min,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取上清液,即得。

质控样品:取空白血清样品适量,加入一定质量浓度的对照品溶液,再同"血清样品预处理"方法进行预处理,即得。

2.3 方法学考察

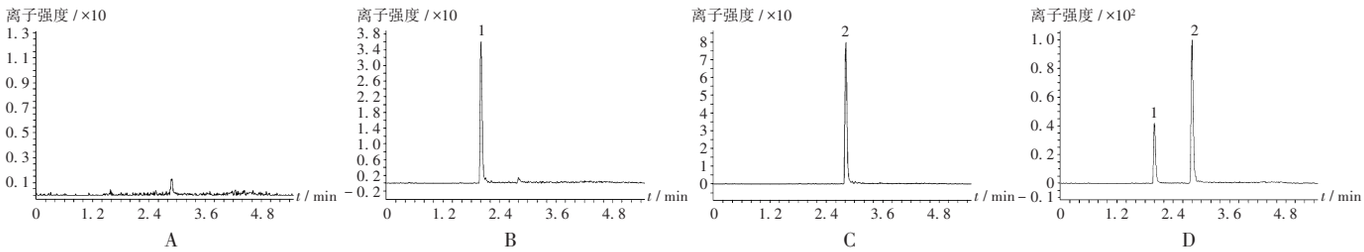
系统适用性与专属性试验:取2.2项下对照品溶液、内标溶液及经预处理的空白血清,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果空白血清+对照品溶液图谱中,在与对照品溶液图谱相应位置有吸收峰。利司扑兰和RG7800的出峰时间分别为2.02 min和2.81 min,且在其对应离子通道下,空白血清无干扰。详见图1。

线性关系考察:取对照品溶液适量,加入空白血清和20 μL内标溶液,再用甲醇制成质量浓度分别为1.95,3.91,7.81,15.63,31.25,50.00,62.50,125.00 ng/mL的系列溶液,按2.2项下方法进行预处理,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度(X,ng/mL)为横坐标、待测成分峰面积与内标峰面积比值(Y)为纵坐标,采用加权最小二乘法分析(权重因子为$1/X^2$),进行线性回归,得回归方程$Y=1.046\,846X-0.003\,720$($R^2=0.999\,1$,$n=8$)。结果表明,利司扑兰质量浓度在1.95~125.00 ng/mL范围内与其峰面积和内标峰面积比值线性关系良好。

定量限考察:取2.2项下对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下试验条件进样测定,以信噪比为10时的待测成分质量浓度为定量限,结果为1.95 ng/mL。

精密度试验:在1 d内取4个质量浓度[1.95,5.00,25.00,103.75 ng/mL]的质控样品各适量,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,评估日内精密度和准确度。同时,连续3 d按2.1项下试验条件进样测定,评估日间精密度和准确度。结果利司扑兰的日内、日间精密度试验的定量限样品质量浓度平均值与标示质量浓度的偏差在±20%范围内,RSD均小于20%;其余样品的质量浓度平均值与标示质量浓度的偏差均在±15%范围内,RSD均小于15%。详见表2。

回收试验:取6种空白血清各适量,按2.2项下方法准备低、中、高质量浓度的质控样品,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,以待测成分峰面积与内标峰面积的比值为A'。另取6种空白血清样品,按2.2项下方法进行预处理,加入一定质量浓度的对照品溶液,



1. 利司扑兰 2. RG7800

A. 空白血清 B. 利司扑兰 + 空白血清 C. RG7800 + 空白血清 D. 空白血清 + 利司扑兰 + RG7800

图1 总离子流图

1. Risdiplam 2. RG7800

A. Blank serum B. Risdiplam + blank serum C. RG7800 + blank serum D. Blank serum + risdiplam + RG7800

Fig. 1 Total ion chromatograms

表2 精密度试验结果(n = 6)

Tab. 2 Results of the precision tests (n = 6)

加入量	日内		日间	
(ng/mL)	准确度($\bar{X}\pm s$,%)	精密度*RSD*(%)	准确度($\bar{X}\pm s$,%)	精密度*RSD*(%)
1.95	88.50±3.17	3.58	104.57±12.12	11.61
5.00	99.49±9.25	9.29	106.07±7.60	7.17
25.00	101.31±11.47	11.33	107.66±8.54	7.93
103.75	98.08±9.71	9.90	93.61±6.68	7.14

制备出相同低、中、高质量浓度的溶液，并测定待测成分峰面积与内标峰面积的比值(B)。利司扑兰的提取回收率(%) = A' / B × 100%。结果利司扑兰的提取回收率为93.86%～110.28%，*RSD*为5.54%～10.21%(n = 9)。

基质效应：取6种空白血清样品各适量，分别制备质量浓度为5.00，103.75 ng/mL的质控样品，按2.1项下试验条件进样测定，记录峰面积(C)，并计算基质效应因子(基质效应因子 = $C'_{\text{待测成分+内标+空白血清}}$ / $C''_{\text{待测成分+内标}}$)，6个基质效应因子在经内标归一化后的变异系数(*CV*)应均不超过15%。结果显示，基质效应*CV*分别为11.70%和9.31%。

稳定性试验：取2个质量浓度(5.00，103.75 ng/mL)的质控样品各适量，连续3 d冷冻(－20 ℃)24，48，72 h并解冻(25 ℃)来评估其耐冻融稳定性；通过置4 ℃条件下24，48，72 h评估其在质谱系统中的稳定性；通过置25 ℃条件下24，48，72 h评估其室温稳定性。结果见表3，每个质量浓度的实测平均值与标示值的偏差均在±15%范围内，*RSD*均小于12%，说明利司扑兰在－20，4，25 ℃条件下可稳定保存72 h。血清样本在储存和运输过程中冻融循环不应超过3次。

稀释效应：取质量浓度为125.00 ng/mL的利司扑兰对照品溶液适量，加入空白血清稀释0，1，2，3，4，5倍，按2.2项下方法进行预处理，与当天制备的系列对照品溶液一起按2.1项下试验条件进样测定，记录峰面积，并计算准确度和精密度*RSD*。两者变化幅度均应不超过±15%。结果显示，精密度试验结果的*RSD*为3.40%，准确度为90.89%～101.44%，表明质控样品稀释5倍后不会降低实测值的准确性。

表3 不同贮存条件下稳定性试验结果(n = 3)

Tab. 3 Results of the stability test under different storage conditions (n = 3)

存储时间	理论质量浓度(ng/mL)	准确度($\bar{X}\pm s$,%)/精密度*RSD*(%)		
		－20 ℃	4 ℃	25 ℃
24 h	5.00	(112.31±1.04)/0.93	(104.45±12.21)/11.69	(110.59±3.57)/3.23
	103.75	(88.64±2.19)/2.47	(87.48±0.70)/0.80	(92.79±6.66)/7.18
48 h	5.00	(107.02±5.17)/1.47	(103.93±4.71)/1.11	(110.44±1.44)/1.20
	103.75	(90.44±3.27)/8.63	(91.38±2.97)/2.37	(93.77±7.39)/11.49
72 h	5.00	(112.87±1.66)/4.83	(111.24±1.24)/4.53	(112.62±1.26)/1.31
	103.75	(94.21±8.13)/3.62	(89.16±2.12)/3.25	(94.66±10.87)/7.88

2.4 临床应用

采集6例患者达到药物稳态浓度后(至少给药5剂后)的血液样本，4 750 r/min离心5 min，按2.2项下方法进行预处理，按2.1项下试验条件进样测定，结果见表4(其中用药频率均为每日1次)。可见，6例患者体内血药浓度差异较大，有必要对利司扑兰进行TDM，从而为患者的药物治疗剂量及个体化用药方案的制订提供参考[11－12]。本研究经医院医学伦理委员会批准(批准号：XHEC－D－2023－135)，患者均签署知情同意书。

表4 6例患者利司扑兰血药浓度检测结果

Tab. 4 Results of plasma concentration detection of risdiplam in six patients

编号	年龄(岁)	性别	体质量(kg)	用药剂量(mg)	血药浓度(ng/mL)
1	4	女	11.8	2.95	61.57
2	11	女	47.0	5	77.88
3	11	女	52.5	5	31.13
4	9	女	22.5	5	91.14
5	11	男	36.0	5	65.10
6	10	男	35.0	5	13.03

3 讨论

3.1 色谱条件优化

流动相中酸的存在会影响目标物质的电离[13]。故预试验中比较了色谱柱类型、流动相是否加酸、酸的体积分数等条件对色谱图的影响。色谱柱 Agilent SB C_{18}柱(50 mm × 2.1 mm, 2.8 μm)具有更好的响应值,但其峰形较宽且拖尾现象也更明显。与 Agilent SB C_{18}柱比较,Agilent Eclipse Plus C_{18}柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)和 Kinetex XB C_{18}柱在响应值方面稍有提高,而后者峰形更好,采集时间更短,能更好地满足试验要求。因此选择 Kinetex XB C_{18}柱进行后续研究。甲醇和乙腈是常用流动相,由于乙腈的黏度系数较低,相同流量和有机相下,系统压力较小,因此最终选择乙腈为流动相。后续考察了水相和乙腈中不同甲酸体积分数(0.05%, 0.07%, 0.10%),峰形较宽或拖尾现象明显。考虑到利司扑兰的弱酸性,在乙腈中添加甲酸,以改善待测成分的离子化和峰形[14-16],最终采用 0.07% 甲酸水溶液(pH 4.5)和 0.07% 甲酸乙腈溶液(pH 5.5),可得到较好的峰形和响应值。

3.2 样品制备方法优化

血液样本中存在多种非靶物质,如蛋白质、细胞、盐等。因此,样品预处理是必要的,以去除蛋白质等影响较大的杂质[17]。在样品前处理阶段,分别尝试了甲醇和乙腈作为沉淀剂的一步蛋白沉淀法,采用了 $L_{16}(4^5)$正交试验,综合考虑了试剂种类、用量、沉淀时间、冷冻时间、超声时间等因素,优化样品前处理条件。结果显示,甲醇能有效沉淀蛋白质,而沉淀时间对蛋白质沉淀效率有显著影响。因此,我们选择了甲醇作为蛋白质沉淀剂,用量为 1 000 μL,沉淀时间为 5 min,不进行冷冻和超声处理。该前处理程序操作简便,沉淀剂易获得且处理时间较短。

3.3 方法评价

本研究中建立了用于人血清中利司扑兰 TDM 的 UPLC-MS/MS 法。该方法操作简便,且高效、快速,已成功用于我院接受利司扑兰治疗 SMA 患者的 TDM。

参考文献

[1] LUNN MR, WANG CH. Spinal muscular atrophy [J]. Lancet (London, England), 2008, 371(9630): 2120-2133.
[2] LEFEBVRE S, BÜRGLEN L, REBOULLET S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene [J]. Cell, 1995, 80(1): 155-165.
[3] WURSTER C, PETRI S. Progress in spinal muscular atrophy research [J]. Curr Opin Neurol, 2022, 35(5): 693-698.
[4] SUGARMAN EA, NAGAN N, ZHU H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72,400 specimens [J]. Eur J Hum Genet, 2012, 20(1): 27-32.
[5] VERHAART IEC, ROBERTSON A, WILSON IJ, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy-a literature review [J]. Orphanet J Rare Dis, 2017, 12(1): 124.
[6] RATNI H, KARP GM, WEETALL M, et al. Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy [J]. J Med Chem, 2016, 59(13): 6086-6100.
[7] KLETZL H, MARQUET A, GÜNTHER A, et al. The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy [J]. Neuromuscular Disorders, 2019, 29(1): 21-29.
[8] MASSON R, MAZURKIEWICZ-BEŁDZIŃSKA M, ROSE K, et al. Safety and efficacy of risdiplam in patients with type 1 spinal muscular atrophy (FIREFISH part 2): secondary analyses from an open-label trial [J]. Lancet Neurology, 2022, 21(12): 1110-1119.
[9] RATNI H, EBELING M, BAIRD J, et al. Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA) [J]. J Med Chem, 2018, 61(15): 6501-6517.
[10] YEO CJJ, TIZZANO EF, DARRAS BT. Challenges and opportunities in spinal muscular atrophy therapeutics [J]. Lancet Neurology, 2024, 23(2): 205-218.
[11] 王 康, 赵 慧, 时 倩, 等. 脊髓性肌萎缩症的靶向治疗研究进展 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2024, 31(1): 46-51.
[12] 石再欢, 王芳婷, 郭芷君, 等. 基于 DTP 药房回访数据探讨利司扑兰相关药学服务价值 [J]. 中国药房, 2023, 34(19): 2414-2418.
[13] 亓秀华. 高效液相色谱法在药品成分分析中的应用及优化研究 [J]. 当代化工研究, 2024(3): 123-125.
[14] MARKATI T, FISHER G, RAMDAS S, et al. Risdiplam: an investigational survival motor neuron 2 (SMN2) splicing modifier for spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Expert Opinion On Investigational Drugs, 2022, 31(5): 451-461.
[15] DHILLON S. Risdiplam:First Approval [J]. Drugs, 2020, 80(17): 1853-1858.
[16] STURM S, GüNTHER A, JABER B, et al. A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, RO7034067), a SMN2 splicing modifier [J]. Br J Clin Pharmacol, 2019, 85(1): 181-193.
[17] 姚梦侃, 马秉亮, 马越鸣. 生物样品液质联用分析中的基质效应研究概况 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2436-2440.

(收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-04-20)