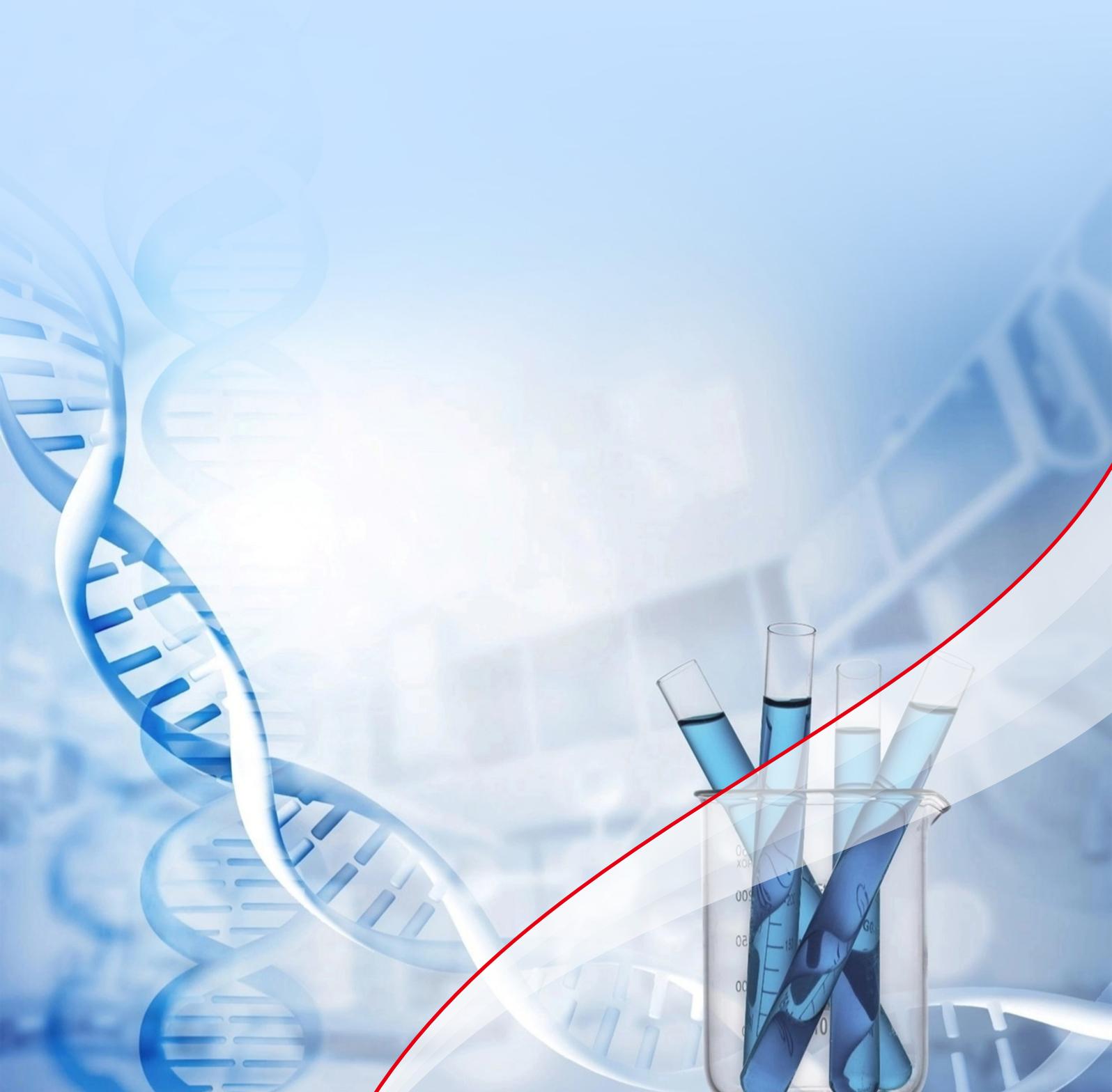


生物技术药物体内生物分析 解决方案



前言

在 21 世纪科技浪潮中，生物技术药物（以下简称“生物药”）研发作为医药科技领域的璀璨明珠，正以其独特的创新魅力和卓越的治疗效果，引领着医疗健康事业的革新与发展。生物药，作为生命科学与生物技术深度融合的产物，不仅在恶性肿瘤、自身免疫性疾病、罕见病等重大疾病的治疗中展现出非凡的疗效，还以其高度的靶向性、较低的副作用和较长的半衰期，赢得了医学界和广大患者的广泛赞誉。在全球医疗健康事业中，生物药研发已成为推动医药行业转型升级、提升国民健康水平的核心力量。

我国政府高度重视生物药研发，将其列为战略性新兴产业，并出台了《“健康中国 2030”规划纲要》和《“十四五”生物经济发展规划》等一系列鼓励生物药研发的政策法规，为生物药研发提供了良好的政策环境和市场机遇。这些举措不仅激发了国内科研机构和制药企业的创新活力，还吸引了众多跨国制药企业的关注和投资，使得中国生物药市场呈现出蓬勃发展的态势。

在生物药研发过程中，药物体内分析发挥着举足轻重的作用。它能够帮助科研人员精准评估药物的体内行为，包括药物的吸收、分布、代谢和排泄特性，从而指导药物剂量的确定、优化给药方案，以及预测药物的潜在毒性和药效。因此，体内分析技术的准确性和可靠性直接关系到生物药研发的成功与否，是推动新药从实验室走向临床的关键所在。

然而，生物药体内分析领域也面临着诸多挑战。生物药分子结构的复杂性和体内环境的多样性，给样本处理、分析方法的选择和优化带来了巨大难度。特别是随着生物药种类的不断增多，如何快速、准确地建立针对新型药物的分析方法，以及如何应对药物低浓度检测需求，成为当前亟待解决的问题。此外，生物药的免疫原性、代谢途径的复杂性以及生物样本的基质效应等问题，也对分析技术的灵敏度和特异性提出了更高的要求。面对这些挑战，科研人员和企业需要不断探索和创新，开发更加高效、精准的分析方法，以应对日益复杂的生物药研发需求。

针对上述挑战，岛津凭借其在分析仪器、技术和解决方案方面的深厚积累，编纂了《生物技术药物体内生物分析解决方案》。本文集汇编了岛津最新的研究成果、技术进展和应用案例，涵盖从样品前处理到高效液相色谱、质谱联用等先进分析技术的全面介绍，特别针对多肽、抗体、核酸药物等三大类热门前沿性药物，提供了全面、系统的体内分析方案。我们希望通过本文集的出版，能够为生物药研发人员提供一套实用的操作指南和问题解决策略，激发更多科研人员的创新热情，推动生物药研发领域的技术交流与进步，加速新药研发进程。

2025 年将迎来岛津创业 150 周年的里程碑。展望未来，岛津将继续秉持创新与卓越的精神，推动生物药研发技术的进步，满足社会的需求。岛津深信，通过我们的共同努力和持续创新，生物药研发的未来将更加光明。我们期待与广大读者携手共进，共同推动生物药研发事业的繁荣发展，为构建更美好的世界贡献力量！

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 生物技术药物体内生物分析简介	1
第 2 章 生物分析方法验证指导原则	6
第 3 章 应用文集	11
3.1 多肽类药物	11
LC-MS/MS 法痕量分析血浆中司美格鲁肽含量.....	12
LC-MS/MS 法定量分析血浆中替尔泊肽.....	18
LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度.....	23
LC-MS/MS 测定大鼠血浆中的艾塞那肽.....	27
LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物戈舍瑞林.....	31
LC-MS/MS 法测定人血浆中多肽类药物特立帕肽含量.....	38
LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林.....	44
LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物奥曲肽.....	50
LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中新型脑钠肽类似物.....	57
3.2 抗体类药物	63
突破传统方法，加快药物研发进程——抗体类药物分析：nSMOL 解决方案	64
基于 nSMOL 技术和 Skyline 软件的曲妥珠单抗 LC-MS/MS 定量分析方法开发	66
UHPLC-MS/MS 联用 Skyline 软件开展贝伐珠单抗定量方法开发.....	72
nSMOL 技术结合 UHPLC-MSMS 定量分析血浆中单抗类药物英利昔.....	78
nSMOL 技术应用于血浆中阿达木单抗药物的定量检测	83
nSMOL 技术用于血清中帕妥珠单抗的定量分析	91
3.3 核酸类药物	97
全新的分离体验——生物惰性超高效液相色谱仪	98
LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸药物福米韦生含量.....	102
LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸药物诺西那生的含量.....	107
附录 ICH M10 2020_M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (节选)	112

第 1 章 生物技术药物体内生物分析简介

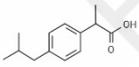
生物技术药物当前主要包括多肽类、治疗性蛋白类药物（如抗体类及抗体偶联药物 ADC 等）、核酸类药物（如核酸疫苗、基因治疗产品、反义寡核苷酸技术、小干扰 RNA 与信使 RNA 疗法等）以及细胞治疗产品等。随着生物科技领域的快速迭代，生物技术药物已被广泛应用于癌症、自身免疫紊乱及代谢障碍等多种疾病的治疗之中。生物治疗产品的临床与商业成就，已促使医药领域对其研发活动给予了前所未有的重视，这迫切要求具备高精度与高质量标准的生物分析技术来支撑这些药物的开发流程。

在评估生物技术药物的安全性与有效性时，如同对传统药物的考量，必须全面深入地了解其药代动力学（PK）、药效学（PD）、毒代动力学（TK）以及免疫原性等核心属性。美国食品药品监督管理局（FDA）、中国国家药品监督管理局（NMPA）等权威监管机构明确规定，任何药物在进入临床试验前，必须充分证明其疗效与安全性，且无论是在临床前研究阶段还是临床研究阶段，均需对药物的 PK 特性进行深入分析。因此，构建一套科学严谨、系统完善的 PD/PK/TK 生物分析方案，对于生物技术药物在临床前及临床阶段的分析评估而言，具有至关重要的意义和价值。

1 生物技术药物体内代谢特征

生物技术药物具有相对分子质量大、不易透过生物膜、给药剂量低、易在体内降解等特点，因其特殊的机构和生理性质，导致其在体内的吸收、分布、代谢、排泄等方面具有与小分子药物不同的药代动力学特征，充分了解这些特征对生物技术药物分析方法的开发具有指导意义。

表 1. 生物技术药物与传统小分子药物的药代动力学特征比较^[1]

特性	传统小分子药物	生物技术药物			
		多肽和蛋白	核酸	抗体	抗体药物偶联物
相对分子质量	200-700	1500-70000	6000-18000	150000	150000
结构示意图 ^[2]					
物理化学性质	溶解性差异大、带电状态差异大	水溶性好、带电状态差异大	水溶性好，多带负电荷	水溶性好，带电状态差异大	
给药途径	口服等	静脉注射或皮下给药			静脉注射
吸收	生物利用度差异大	生物利用度低，存在淋巴系统吸收			
分布	分布广泛	分布有限，多在血液	肝脏、肾脏存在高度分布，心脏、胰、中枢神经系统等几乎无分布	肾脏分布最多，其次是肝脏、脾脏，脑中分布最小	DAR<4，和 mAb 一致；DAR>4，肝分布增加，清除加快

代谢	CYP450 酶	蛋白酶	核酸酶	蛋白酶	蛋白酶和 CYP450 酶
排泄	存在不同程度的胆、肾排泄	以氨基酸或小肽方式重利用或经肾脏排泄	以核酸片段方式经肾脏排泄	以氨基酸或小肽方式重利用或经肾脏排泄	包含小分子和 mAb 2 种排泄途径
血浆蛋白结合率	由低到高差异大	未经修饰的核酸较低，经修饰的核酸较高			
半衰期	短 (小时)	-	未经修饰的核酸短 (秒或分)，经修饰的核酸长 (周或月)	长 (数天或数月)	抗体部分半衰期长，小分子化合物持续释放
线性动力学特征	部分药物高剂量时呈现非线性药代动力学特征	常呈非线性药代动力学特征			
DDI	广泛存在	无		存在	
靶向性	几乎无	靶向			
免疫原性	少见	常见			
生物样本分析对象	小分子药物本身或活性代谢产物	总蛋白和多肽	总核苷酸	总抗体	Linker、总抗体、载荷等

2 生物技术药物体内分析常见的样本前处理方法

生物技术药物样品处理是体内药物分析中极为重要的环节。通过这一步骤，可以有效去除生物样本中的蛋白质、脂肪等干扰物质，避免它们对药物及其代谢产物的测定产生负面影响。同时，前处理还能富集和浓缩目标药物及其代谢产物，使它们在分析仪器上的信号更加显著，从而降低检测限，提高方法的灵敏度。此外，前处理还能调整样本的形态，使其更适合后续的分析步骤，如色谱分离和质谱检测。生物技术药物形式多样，不同种类生物技术药物的生物样本需根据其特性采用不同的样品处理方法，因此正确的选择样品处理方法十分关键。

多肽类药物：常用的前处理方法主要有蛋白沉淀法、固相萃取和免疫捕获三种方式。其中，蛋白沉淀法，主要针对分子量<2000 Da 的小肽；SPE 方法是最常用前处理方式，可对样品做适当富集，且提取专属性大大优于蛋白沉淀。

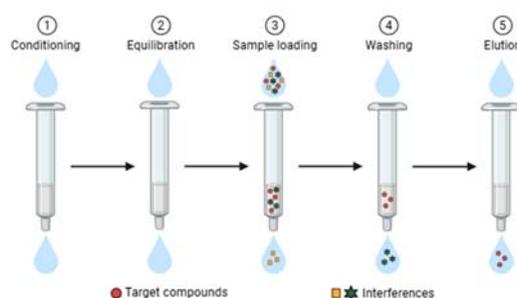


图 1. 多肽类药物固相萃取操作流程^[2]

抗体和 ADC 药物：抗体药物的分子量一般为 150 kDa，分子量较大，通常使用 ELISA 方法测定；但在临床前实验中，随着 LC-MS/MS 技术的引入，通过免疫捕获后酶解，从而获得特异性肽段也是常用的前处理手段。

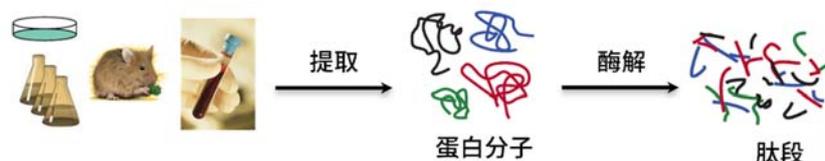


图 2. 抗体类药物酶解处理基本分析流程

核酸类药物：当前，Trizol 萃取法提取总 RNA、蛋白酶 K 降解法、固相萃取法、磁珠杂交提取及在线捕获法，都可应用于核苷酸类药物的生物样品前处理。其中 SPE 法因能富集更多的待测物而多被广泛使用。

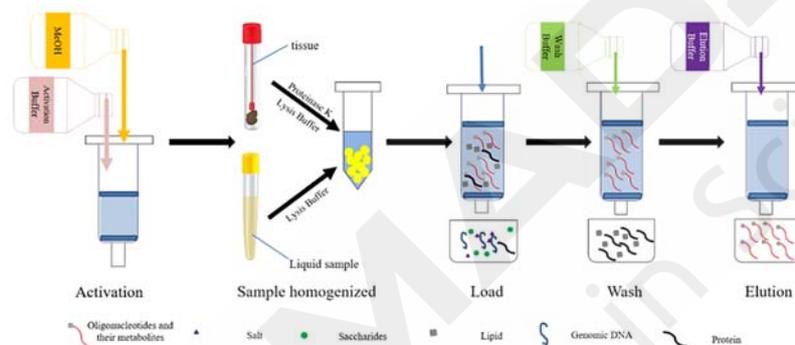


图 3. 核酸类药物固相萃取操作流程^[3]

3 生物技术药物体内分析技术

小分子药物多为外源性物质，分子量偏小，常用的生物体内分析方法涵盖液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）、气相色谱-质谱联用技术（GC-MS/MS）以及液相色谱-质谱联用技术（LC-MS/MS）等。相较于生物技术药物，小分子药物的体内分析在方法要求上相对简洁，通常只需通过预处理步骤后，利用色谱分离技术确保分析的专属性，再借助紫外（UV）或质谱（MS）等检测手段实现小分子药物的精准检测。而大分子药物的生物分析则更为复杂，其独特的药代动力学特性和生理性质显著提升了分析方法开发的难度。因此，针对所研究的生物技术药物，构建具备高度特异性和灵敏度的分析方法，是生物样本分析中的核心挑战与关键所在。

3.1 多肽与抗体类药物

多肽与抗体类药物的生物分析过程颇为繁琐，其独特的药代动力学特性及生理属性显著提升了生物检测的挑战性。鉴于此，开发具有高度特异性和灵敏度的分析技术，针对所研究的多肽与抗体类药物，成为了生物样本分析中的核心任务。此类药物常用的分析手段有放射性同位素示踪法、免疫分析法和液相色谱-质谱联用技术（LC-MS/MS）等，其中免疫分析法为该类药物分析的主流方法，其灵敏度可达 ng 级别。然而，随着高专属性、方法开发高效性、广泛的定量动态范围及同时对所测化合物进行定性定量等检测需求急迫度的提升，LC-

MS/MS 技术优势得到显现，在多肽与抗体类药物生物体内定量分析的应用越来越广泛。该技术基于特征性肽段和完整蛋白的分析方法对于结构复杂的抗体类药物检测的独特优势体现的也越来越突出。

表 2. 多肽与抗体类药物体内分析 LC-MS/MS 适用性总结

药物类型	多肽	抗体	抗体偶联药物
检测方法	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
适用种类	寡肽、线性/侧链修饰多肽、PDC	单抗/双抗类	ADC
检测对象	总肽	特征肽段	总抗体特征肽段、偶联抗体特征肽段、结合载荷、游离载荷和相关小分子

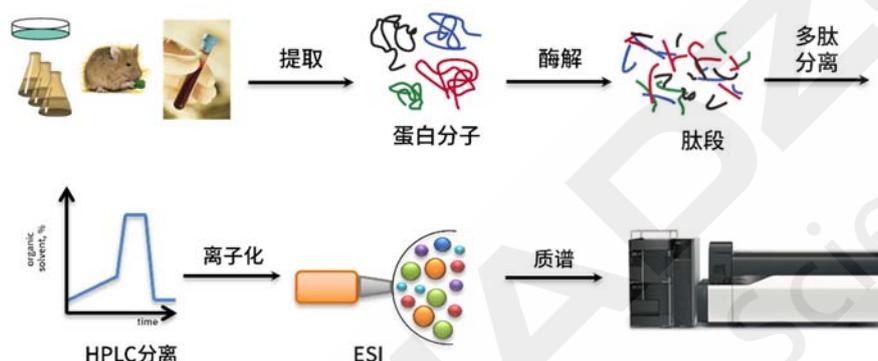


图 4. 抗体类药物 LC-MS/MS 技术分析基本流程

3.2 核酸类药物

核酸类药物与传统的药物变比，最显著的一个特性是易受到体内核酸酶的作用而迅速降解，具有极不稳定性，并且在体内残留量少，浓度低。常用的检测方法有 PCR 定量法、ELISA、LCMS、基于核酸杂交的酶联桥接分析（HELISA 技术）等。其中，LC-MS/MS 技术对寡核苷酸药物具有高灵敏度、高选择性、能够区分 5' 端和 3' 端的缩短代谢物的优势成为寡核苷酸 PK 与 TK 评估的主流检测方法。

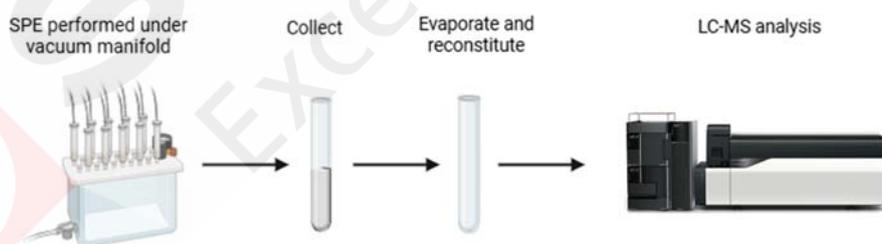


图 5. 核酸类药物 LC-MS/MS 技术分析基本流程^[2]

4 分析技术难点

生物技术药物体内分析面临诸多技术难点。首先，生物技术药物的复杂结构和异质性给分析带来了巨大挑战。例如，抗体类可能存在糖基化、脱酰胺等多种修饰，这些修饰可能影响药物的活性和稳定性。其次，生物技术药物生物样本中目标物的浓度通常较低，且存在大量干扰物质。不同药物的结构特性，在检测过程中还会带来非特异性吸附，从而影响峰形与定量能力。这些问题对分析方法的灵敏度和选择性提出了很高要求。此外，生物技术药物的

代谢产物复杂多样,有些代谢物可能仍具有生物活性,需要同时检测。生物技术药物的免疫原性也是一个重要问题,抗药抗体的产生可能干扰分析结果。最后,生物技术药物的体内分布和代谢可能因个体差异而不同,这增加了分析的复杂性。

为应对这些挑战,需要不断开发新的分析技术和方法。例如,质谱技术的应用可以提高分析的灵敏度和选择性;新型样品前处理方法的开发可以提高分析效率;特殊检测设备,从根本上解决吸附等检测难点;生物信息学工具的引入可以更好地解析复杂的分析数据。同时,还需要加强方法学验证,确保分析结果的准确性和可靠性。

生物技术药物的体内分析构成了一个既复杂又持续进化的领域,它广泛涵盖了从精细的样本前处理步骤到尖端高精度分析技术的各个层面。鉴于生物技术药物所展现的独特药代动力学特性及生理属性,科研人员正不懈探索并优化分析策略,旨在增强分析的精确性、灵敏度及效率。在此过程中,跨学科合作的强化以及生物学、化学、信息学等多学科知识的深度融合,为生物技术药物的体内分析开辟了一系列新颖且富有潜力的路径。展望未来,随着分析技术的不断精进与创新,生物技术药物的研发进程将步入一个更为高效的全新阶段。这不仅将极大促进生物医药领域的突破性进展,还将使我们能够更加全面且深入地洞察生物技术药物在体内的动态行为,从而为生物技术药物的创新发展注入不竭动力。

参考文献

- [1] 赵娣,陈西敬.生物大分子药物的药代动力学研究进展[J].药学进展,2018,42(08):592-598.
- [2] BioRender. (2025). [EB/OL]. <https://BioRender.com>.
- [3] 寡核苷酸药物热点聚焦: LC-MS 在其生物分析中的应用[EB/OL]. pharnexcloud. 2022-04-28[2024-07-20]. https://www.pharnexcloud.com/zixun/sd_4483.

第 2 章 生物分析方法验证指导原则

生物分析是指利用色谱法、色谱-质谱联用法或配体结合法 (LBA) 等技术对生物基质中的抗体、多肽等大分子物质或药物、代谢产物等小分子物质进行定量分析的科学研究。目前,生物分析广泛应用于药代动力学、药效动力学、毒代动力学、一致性评价以及生物利用度等多个方面。通过生物分析,研究人员可以准确地测定生物样品中药物及其代谢产物的浓度,进而评估药物的吸收、分布、代谢和排泄等特性,为药物的研发、安全性和有效性评估提供关键数据支持。然而,由于生物基质成分复杂,个体间差异显著,且生物分析涉及样品收集、存储、前处理、分析以及数据解读等多个复杂步骤,科研人员需要证明在特定生物基质中测定分析物含量的特定方法是可靠且可重复的,这也就出现了包含众多步骤和程序的生物分析方法验证实验。生物分析方法验证的参数主要包括:选择性、定量下限、准确度、精密度、基质效应以及分析物在生物基质中的稳定性等关键特征。只有经过严格验证的分析方法,才能为药物和生物制品的安全性和有效性提供关键数据支持。

1 国内外生物分析方法验证现行法规

为了确保分析方法的科学性和可靠性、保障药品质量和安全性、促进医药工业全球化发展、指导生物分析方法的应用和实践以及推动医药科技的创新和发展,各国纷纷建立并实施生物分析方法验证的相关法规与指导原则。

表. 生物分析行业方法验证现行主要的参照法规

发布机构	指导原则	最新版本情况	说明
欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA)	Guidance on bioanalytical method validation	2015 版	-
人用药品技术要求国际协调理事会 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)	Bioanalytical method validation and study sample analysis, M10	2022 年 5 月最新颁布	FDA : 同年发文表示采纳; EMA : 同年发布 Q&A, 并于 2023 年 1 月 21 日生效; NMPA: 2023 年 1 月 29 日发布 2023 年第 16 号公告, 自 2023 年 7 月 29 日起的研究均适用《M10: 生物分析方法验证及样品分析》国际人用药品协调会指导原则
中国国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA)	《中国药典》9012 《生物样品定量分析方法验证指导原则》(ChP/9012/2020)	2015 年发布 2020 年更新 2025 年删除	2025 版药典删除 9012 指导原则, 并指出与 ICH M10 指导原则相同
美国食品药品监督管理局 (U.S Food and Drug Administration, FDA)	Bioanalytical Method Validation for Biomarkers	2025 年 1 月 21 日最新发布	该份文件是 ICH M10 (2022) 的补充, 对生物标志物的生物分析方法提供指导, 同时宣布 2018 年 5 月发布的《Bioanalytical Method Validation》指导文件将被撤回

2 生物分析方法验证的基本要求

为避免与 CDE、ICH 的相关指导原则重叠，并达到保持一致的要求，2025 版《中国药典》删除 ChP/9012/2020 指导原则，并指出标准要求与 ICH M10 指导原则相同。在这里，我们将重点对 ICH M10（2022）指导原则中生物分析方法（色谱法）验证的考察项目进行阐述。

2.1 选择性

选择性是指在生物基质中存在潜在干扰物质时，分析方法能够区分并准确测定待测物的能力。评估选择性时，需确保空白样品（即不含待测物或内标的基质样品）在待测物或内标的保留时间处无干扰组分引起的显著响应。

根据 M10 指导原则，为了充分验证选择性，应使用至少来自 6 个不同个体/批次（且为非溶血和非高脂）的空白基质进行实验。在实验过程中，若遇到特殊情况，如溶血基质或高脂基质，则需额外至少考察一种来源的此类特殊基质。这是因为溶血和高脂状态可能影响生物基质的组成，从而干扰分析结果的准确性。

M10 指导原则要求应满足以下条件：在每个考察的基质中，干扰组分的响应不应高于待测物最低定量限（LLOQ）响应的 20%，同时也不应高于 LLOQ 样品中内标响应的 5%。这一标准确保了分析方法的敏感度和准确性，避免了干扰物质对测定结果的潜在影响。

2.2 特异性

特异性是生物分析方法的核心能力，它指的是该方法能够准确检测和区分待测物与其他各种物质，这些物质可能包括与待测物结构相近的相关物质（如同系物、代谢物、异构体、杂质等）。根据 M10 的指导原则，若生物基质中预期会存在这些相关物质，那么在方法验证阶段或分析给药前的研究样品时，就必须评估它们对分析方法的影响。

当采用液质联用（LC-MS）技术时，通常包括以下几个步骤：首先，比较待测物与潜在相关干扰物质的分子量，以确认它们之间的差异性；其次，通过色谱技术实现待测物与相关物质的有效分离；此外，在必要时，还需评估代谢物转化为待测物母体的可能性，并进行相应的部分验证。

对于特异性的接受标准，通常与选择性保持一致。这意味着，在考察的基质中，任何干扰物质的响应都不应高于待测物最低定量限（LLOQ）响应的 20%，同时也不应高于 LLOQ 样品中内标响应的 5%。这样的标准确保了分析方法的准确性和可靠性，从而能够准确测定待测物的浓度，而不受其他物质的干扰。

2.3 基质效应

基质效应是指在生物分析方法中，由于生物基质中存在的干扰物质及通常未被识别的成分，导致待测物的响应发生变化的现象。在方法验证的过程中，对不同来源和批次间的基质效应进行深入考察是至关重要的。

根据 M10 的指导原则，基质效应的评估应基于至少 3 个重复的低浓度和高浓度质控样品进行分析。为确保评估的准确性和全面性，每个重复样品都应使用至少来自 6 个不同来源或批次的基质进行制备。这样的设计有助于捕捉并量化基质中可能存在的变异性和干扰因素。

对于每个来源或批次的基质，其准确度应控制在标示浓度的±15%以内，这反映了分析方法在复杂基质环境中对待测物浓度的准确测量能力。同时，精密度（以变异系数百分比，%CV表示）不应超过15%，这确保了分析方法在不同基质条件下的一致性和稳定性。

2.4 校准曲线和范围

校准曲线是描绘待测物标示浓度与分析响应之间关系的工具。它通过将已知浓度的待测物加入空白基质中制备校正标样，这些标样涵盖预定的浓度范围，进而构成校准曲线。在方法验证流程中，校准曲线的定量范围由最低定量限（LLOQ）和最高定量限（ULOQ）界定。

M10 指南要求校准曲线包含空白样品、零浓度样品（仅含内标的空白样品）以及至少六个浓度级别的校正标样（涵盖 LLOQ 和 ULOQ）。这些校正标样与浓度之间的响应关系应采用简单的回归模型来描述。验证过程中所有符合要求的校准曲线均需提交报告，其中至少应包含三个独立分析批次的校准曲线，这些批次可在不同天内进行考察。在 LLOQ 和 ULOQ 水平，校正标样的回算浓度应在标示浓度的±20%以内；其他浓度水平应在标示值的±15%以内。至少 75%的校正标样（涵盖至少六个浓度级别）需满足上述标准。在重复测定的情况下，M10 指出每个浓度级别至少有 50%的校正标样应达到接受标准（LLOQ 为±20%，其他浓度为±15%）。若校准曲线中存在不符合接受标准的浓度点，则该校正标样应被弃用，并重新拟合去除该点后的校准曲线。

2.5 准确度与精密度

在评估准确度和精密度时，M10 指南规定了一套严谨的程序。它通过分析每个分析批内部（批内）以及不同分析批之间（批间）的质控样本来确定这两项指标。在方法验证阶段，需准备至少四个浓度水平的质控样品，这些样品应分布在校准曲线的范围内，具体包括：最低定量限（LLOQ）、LLOQ 三倍以内的低浓度质控（LQC）、校准曲线范围约 30%~50%的中浓度质控（MQC），以及至少为最高定量限（ULOQ）75%的高浓度质控（HQC）。

为了评估批内准确度和精密度，每个浓度水平的质控样品需在同一分析批中至少进行五次分析。而批间准确度和精密度的评估，则需通过对每个浓度水平的质控样品在至少两天内考察的三个分析批结果进行综合评价。M10 特别强调，分析批中的质控样品应与预期试验样品在相同条件下储存。

在接受标准方面，除 LLOQ 外，每个浓度水平的质控样品准确度应在标示值的±15%以内，而 LLOQ 的准确度可放宽至标示值的±20%。同样地，除 LLOQ 外，每个浓度水平质控样品的精密度（%CV）不应超过 15%，LLOQ 的精密度则不应超过 20%。

2.6 残留

残留效应是指前一个样品在分析仪器上遗留的残余物质导致后续样品测定浓度发生变化的现象。在方法开发阶段，M10 指南强调应对残留效应进行评估，并尽可能采取措施将其降至最低。在验证过程中，通过在高浓度样品（如最高定量限 ULOQ 样品）之后分析空白样品，可以考察残留效应的具体情况。

根据 M10 的规定，ULOQ 样品之后的空白样品中残留物的响应不应超过 LLOQ 样品中待测物的 20%，同时也不应超过内标响应的 5%。这一标准有助于确保分析方法的准确性和可靠性，避免残留物对后续样品测定结果产生干扰。

另外，指导原则明确指出，如果残留不可避免，应考虑特殊措施，在方法验证时检验并在试验样品分析时应用这些措施，以确保不影响准确度和精密度。这可能包括在高浓度样品后注射空白样品，然后分析下一个试验样品。

2.7 稀释可靠性

稀释可靠性评估是确保在必要时对样品进行稀释时，不会对其浓度的准确度和精密度造成不良影响的关键步骤。这一评估应使用与配制质控样品相同物种来源的空白基质进行。M10 指南明确规定，用于稀释的质控样品浓度应高于最高定量限（ULOQ），并采用空白基质进行稀释。为确保检测浓度在校准曲线范围内被准确且精密地测量，每个稀释因子至少应进行五次测定，并且这些测定应在同一批次内完成。

稀释质控的平均准确度应控制在标示值的 $\pm 15\%$ 之内，而精密度（%CV）则不应超过15%。在特定情况下，如果试验基质难以获取，可以在证明不影响精密度和准确度的前提下，使用替代基质进行稀释。

2.8 稳定性

稳定性的考察目的在于确保样品在制备、处理、分析以及储存过程中的每一步操作都不会对待测物的浓度产生不利影响。这一考察通常通过对质控样品的测试来进行验证，且质控样品的储存时间需与研究样品保持一致或更长，以确保所获得的数据能够充分反映样品的稳定性情况。由于文献报道的数据往往不足以全面证明稳定性结果，因此实际考察显得尤为重要。

M10 指南详细规定了稳定性考察的多个方面，包括冻融稳定性、前处理稳定性、长期稳定性、处理后稳定性，以及储备液和工作液中待测物和内标的稳定性。对于血浆基质样品，M10 还额外要求考察全血稳定性。稳定性考察通常采用低、高浓度的稳定性质控样品进行，每个浓度至少准备三份，并要求基质中待测物的稳定性在每一浓度的均值应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 范围内。若研究样品的浓度持续高于校准曲线的最高定量限（ULOQ），则应相应提高稳定性质控样品的浓度。

在考察长期稳定性时，对于化学药物，其保存温度的稳定性可以外推到更低温度；而对于生物药，则可通过括号法来评估稳定性，即在分别考察两个温度下的稳定性后，可证明该温度范围内的稳定性。

2.9 再进样重现性

M10 指出，方法的可重复性通过质控样品的重复测量来评估，并且通常包含在精密度和准确度的评估中。然而，如果发生例如仪器故障、中断或其他原因导致对样品进行再进样时，则应评估再进样可重复性，以确定已处理样品的可用性，并支持其在再进样前的储存。再进样可重复性通过重新进样一组储存后的校准品以及至少五份重复的低、中、高浓度质控样品进行评估。接受标准未明确指出，但要求验证结果应包含在验证报告中，或在进行研究时提供的生物分析报告中。

2.10 回收率

M10 中，回收率的验证项目暂未在色谱法方法验证项目列出，但在“VII.ADDITIONAL CONSIDERATIONS (7)”其他考虑项目下对回收率进行表述。M10 要求，对于采用样品提取

的方法，应评估回收率。回收率应以通过样品提取和方法处理步骤的已知分析物量的百分比来报告。回收率应通过比较添加分析物并处理后的生物样品中的分析物响应，与处理后再添加分析物的生物空白样品中的响应来确定。值得注意的是，M10 对于接受标准指出，分析物的回收率无需达到 100%，但分析物和内标物（如果使用）的回收程度应保持一致。建议通过比较多个浓度（通常为低、中、高三个浓度）的提取样品的分析结果来进行回收率实验。

在完成方法学验证后，该分析方法即可应用于实际样品的检测工作。在此过程中，M10 指导原则对试验样品分析中的分析批组成、接受标准、校正范围以及再分析等方面设定了相应的具体要求。此外，针对已验证分析方法所进行的小幅度调整，以及在不同项目或地点间转移验证方法时，原则要求提供了关于部分验证及交叉验证的规范性指导。

随着新药研发的不断发展和各个国家与地区生物分析方法相关法规指南也在不断迭代更新。这些指导原则的更新和完善，不仅反映了各国和地区在监管体系、技术水平上的最新进展，也体现了对药物研发质量和安全性的更高要求。各国和地区都在努力确保生物分析方法的准确性和可靠性，以满足新药研发过程中日益严格的数据需求。同时，不同法规间所存在的差异也为相关领域的从业人员提供了更多的选择和参考，促进了国际间的交流与合作。在追求药物研发的高效性和创新性的同时，各国和地区也在共同努力，确保生物分析方法验证的科学性、规范性和一致性，为新药的成功上市和人类健康事业的发展贡献力量。

参考文献

- [1] European Medicines Agency, Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2011.
- [2] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Bioanalytical method validation and study sample analysis M10[S]. 2022.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（四部）[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [4] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation for Biomarkers Guidance for Industry[S]. 2025.
- [5] 叶潇, 郑爽, 林超, 等. 生物分析方法验证及生物样品分析各指导原则间的比较[J]. 中国药物评价, 2023, 40(06): 470-479.

第 3 章 应用文集

3.1 多肽类药物

多肽，作为一类由氨基酸通过肽键连接而成的生物活性分子，其结构独特且功能多样，尤其在药物开发领域展现出巨大的潜力。它们不仅保持了与天然抗体相似的结构特征，还能够在复杂的生物体内环境中模拟或干扰细胞信号传导路径，从而发挥强大的药理作用。这类多肽药物，凭借其分子量适中、组织穿透力强、生物活性高等特性，在治疗疼痛管理、炎症性疾病、糖尿病等多种疾病上，展现出了显著的治疗效果，为临床提供了新的治疗策略。

然而，多肽药物在生物样品分析领域的应用却面临着诸多挑战。由于其治疗剂量通常较低，且生物体内存在大量结构相似的内源性多肽干扰物，加之多肽分子本身易于受到酶促降解的影响，这些因素共同构成了多肽药物体内分析在灵敏度与选择性上的巨大障碍。传统的分析方法，受限于检测灵敏度和特异性，往往难以满足多肽药物体内精确定量的需求。因此，科研人员不断寻求更为先进、精确的分析技术，以期突破这一瓶颈。

近年来，液相色谱-质谱联用技术（LC-MS/MS）凭借其高灵敏度、超高分辨率及卓越的选择性，在多肽类药物的生物分析领域迅速崛起，成为首选的分析平台。LC-MS/MS 技术不仅实现了对目标多肽的高精度定量分析，还通过多级质谱技术深入剖析其化学结构，为新药研发、药效评价及药代动力学研究提供了坚实的数据支撑。然而，LC-MS/MS 在多肽药物分析实践中亦面临一系列技术挑战，包括多肽在色谱柱及系统管路中的残留吸附、样品提取过程中的效率与稳定性、多肽分子的酶解保护以及离子化效率的优化等。这些挑战要求科研人员采取精密的策略和先进的技术手段，以确保分析的准确性和可靠性。

在此背景下，岛津作为液质联用技术领域的领航者，凭借其前沿的液质联用平台及独特的液相前端设计，针对司美格鲁肽、替尔泊肽等一系列热门多肽药物，从样品前处理到复杂基质中的方法学验证，开展了系统且深入的方法开发工作，采取了一系列的关键措施来克服多肽药物分析中的技术难题。优化样品预处理：采用高效的固相萃取技术，结合针对性的洗脱条件，显著提升了生物样本中目标多肽的回收率，有效减少了内源物的干扰。特色液相前端：依托生物惰性液相系统的低吸附特性，有效解决了多肽在分离过程中的吸附难题，确保了分析的准确性和重复性。高灵敏度离子源：结合多肽药物的化学特性，对离子源参数进行精细调优，如调整喷雾电压、加热温度等，显著提高了多肽分子的离子化效率，使得检测灵敏度达到了皮摩尔（pmol）级别。方法学验证：通过严格的线性范围、精密度、准确度、回收率及基质效应等验证实验，确保了所建立分析方法的可靠性和适用性。

本文将详尽介绍岛津液质联用技术在多种类型多肽药物体内分析中的实际应用案例，旨在为分析人员提供一份全面、详实且具有高度实用价值的参考手册。通过深入剖析岛津液质在多肽药物分析中的独特优势与实践经验，期望能够助力科研人员更好地理解并掌握这一先进技术，从而推动多肽药物研发与分析领域的持续进步与发展。

LC-MS/MS 法痕量分析血浆中司美格鲁肽含量

摘要: 本文建立并验证了使用岛津生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中司美格鲁肽的方法。实验系统优化样品前处理, 司美格鲁肽达到 90%以上的高回收率; 定量下限可达 0.1 ng/mL, 线性范围可从 0.1 ng/mL 拓宽至 500 ng/mL, 相关系数 0.999。另外, 选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质; 定量下限日内、日间精密度 2.60%与 4.66%, S/N 平均值为 22.7; 低中高三水水质控浓度日内精密度 2.15-3.04%, 日间精密度 3.96-5.83%, 准确度 90.00-109.07%。验证结果表明所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好、残留量低的特点, 满足司美格鲁肽生物样本分析要求, 可为药物研发体内研究提供快速准确的检测方法。

关键词: 三重四极杆质谱仪 痕量分析 生物治疗性多肽 血浆 司美格鲁肽

司美格鲁肽 (Semaglutide) 是一种由 31 个氨基酸组成的长效胰高糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物, 用于治疗 2 型糖尿病和肥胖症。由于其不仅拥有优异的降糖作用, 还具有显著的减重效果, 治疗性与安全性俱佳, 一经上市, 司美格鲁肽的药物渗透率及市场规模持续保持大幅增长。在降糖、减重适应症“内卷”的背景下, 发掘司美格鲁肽其他适应症及其它与之类似的 GLP-1 类似物研发热度日益高涨。

面对 GLP-1 药物的研发热潮, 体内研究必不可少, 建立 GLP-1 类似物在生物样本中灵敏、高效的分析方法更是不可或缺。当前, 以司美格鲁肽为代表的 GLP-1 多肽类药物, 生物样本分析方法主要有配体结合分析法 (LBA) 和液质联用法 (LCMSMS)。其中, 液质联用法由于具有短时效、低成本、高特异性、高灵敏等优点, 成为多肽药物体内分析重要技术手段之一。然而, 利用 LC-MS/MS 分析多肽药物时, 常会遇到回收率低、灵敏度差、非特异性吸附、峰形差、残留高等问题, 对于样品前处理的优化、液质方法的调整、仪器特性的选用均具有较高技术要求。面对多肽类大分子体内检测分析的需求与挑战, 本文使用岛津生物惰性液相与 LCMS-8050 联用系统, 开发灵敏、稳定的体内分析方法, 为实现司美格鲁肽高效、准确的定量分析提供技术支持。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用仪器由岛津生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-8050 联用。具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi × 2	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.120		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : UPLC Peptide CSH C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 130 Å, 1.7 μm)
流 动 相 : A 相-0.5%甲酸水溶液; B 相-0.4%甲酸乙腈
流 速 : 0.3 mL/min
柱 温 : 40°C
进 样 体 积 : 15 μL
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 项初始浓度为 30%, 具体见表 1

表 1. 梯度洗脱程序

时间(min)	流量 (mL/min)	泵 A 浓度	泵 B 浓度
0.25	0.3000	65.0	35.0
3.00	0.3000	20.0	80.0
3.10	0.3000	2.0	98.0
4.00	0.3000	2.0	98.0
4.10	0.3000	65.0	35.0
7.50	Stop		

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 温 度 : 300°C
接 口 电 压 : +2.0 kV D L 温 度 : 150°C
雾 化 气 : 氮气 2.5 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
干 燥 气 : 氮气 10.0 L/min 加 热 气 : 空气 15.0 L/min
扫 描 模 式 : MRM, 参数见表 2

表 2. MRM 参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
司美格鲁肽	1029.15	1238.55*	-30.0	-30.0	-30.0
	1029.15	1302.85	-50.0	-36.0	-50.0
利拉鲁肽 (IS)	938.50	1128.70	-32.0	-34.0	-44.0

注: *表示定量离子

1.3 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份司美格鲁肽适量, 溶解配制两份 1.0 mg/mL 储备液。储备液用稀释液 (20%甲醇) 分别稀释成浓度为 50 μg/mL 的母液。取其中一份母液 3 μL 加入 297 μL 空白血浆, 配制成 500 ng/mL 标准工作曲线最高点浓度, 后用空白血浆依次配制成浓度 0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、500 ng/mL 的标准工作曲线; 另一份母液按照上述方法, 使用空白血浆依次配制成 0.32、10、400 ng/mL 质控样品。

精密称取利拉鲁肽适量, 溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的储备液用稀释液 (20%甲醇) 稀释为 1 μg/mL 内标溶液, 待用。

1.4 血浆样品前处理方法

取血浆样品 150 μL, 依次加入 1 μg/mL 内标溶液 10 μL、甲醇 150 μL, 涡旋 2 min, 后用 13000 rpm/min 离心 10 min。离心后, 吸取上清液 250 μL, 按 1:2 的比例加入 5% 氨

水进行稀释混匀。

取全部混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，清洗除杂后，用洗脱液 30 μL 分别洗脱三次，并压干，收集全部洗脱溶液至抗体低吸附 96 孔板中，而后转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 15 μL 。

2. 结果与讨论

2.1 一级质谱图与产物离子扫描图

多肽由氨基酸通过肽键连接而成，而氨基酸本身具有不同的酸碱性。使用 ESI 对多肽物质进行检测时，会和其他大分子物质一样，呈多电荷状态。司美格鲁肽由 17 种 31 个氨基酸组成，使用 ESI 离子源对司美格鲁肽进行一级质谱扫描，得到不同价态的多电荷母离子（见图 1）。通过对比，实验选择灵敏度最高的 $[M+4H]^{4+}$ 作为母离子。对母离子进行产物离子扫描，得到主要碎片离子为 m/z 1238.55 与 m/z 1302.85。

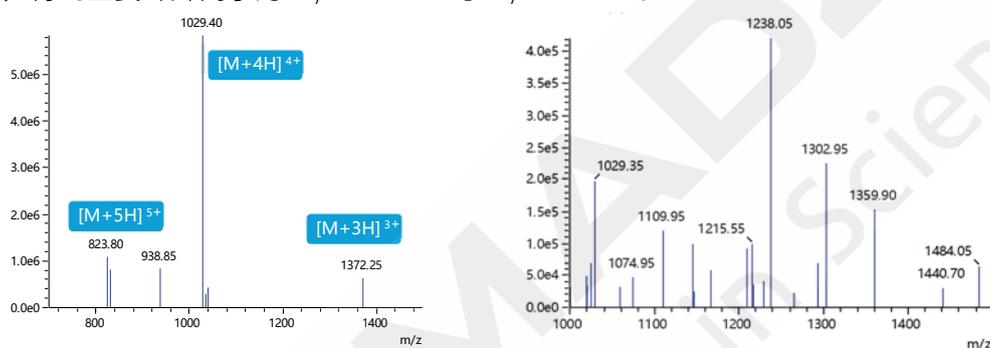
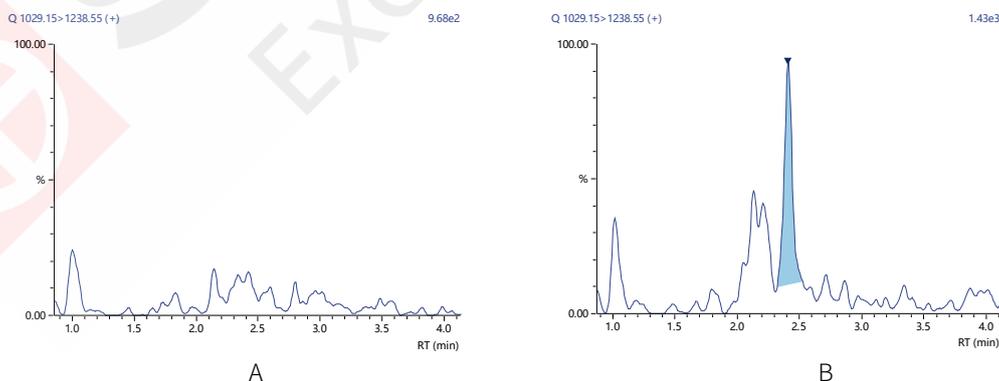


图 1. 司美格鲁肽质谱图（左：母离子；右：产物离子）

2.2 方法选择性

通过全方位的液相质谱参数对比调整，使用 LCMS-8050 最终建立血浆定量方法的定量下限 (LLOQ) 可达 0.1 ng/mL，空白血浆中目标物通道与内标通道均无明显干扰，检测方法具有优异的选择性与灵敏度。图 2 展示了，按照 1.4 项下前处理方法处理后，空白血浆与定量下限 (LLOQ) 0.1 ng/mL 的色谱图，司美格鲁肽的保留时间为 2.4 min，内标的保留时间为 2.7 min。



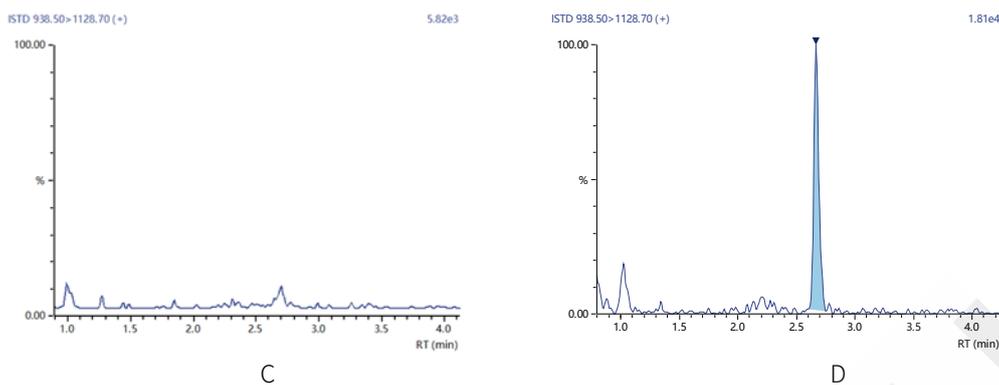


图 2. 司美格鲁肽与利拉鲁肽内标 MRM 色谱图
(A、C: 人空白血浆; B、D: 定量下限 0.1 ng/mL 血浆含内标样品)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备工作曲线，内标法进行定量分析。以血浆中司美格鲁肽浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以司美格鲁肽峰面积与阿拉瑞林峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析。所建方法线性范围为 0.1-500 ng/mL，相关系数 0.999，结果表明司美格鲁肽在 5000 倍浓度范围内线性关系良好，具体结果图 3。

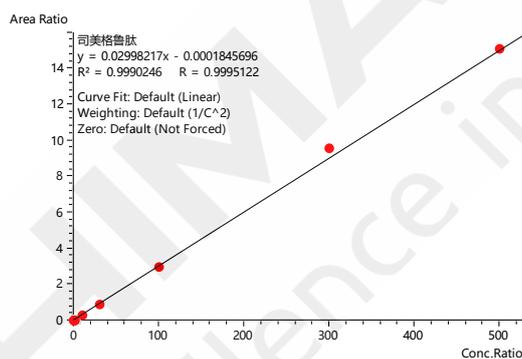


图 3. 血浆中司美格鲁肽校准曲线

2.4 方法灵敏度、精密度与准确度

为考察方法灵敏度、精密度与准确度，取已配制好的 0.32、10、400 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.1 ng/mL 样品，按照 1.4 方法制备，每个浓度的血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析，连续测定 3 天，每日随行校准曲线，用测得质控样品中司美格鲁肽峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 3。其中司美格鲁肽最低定量限 S/N 平均值为 22.07。结果表明，各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并符合生物样品检测要求。

表 3. 司美格鲁肽日内精密度与日间精密度 (3 天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
LLOQ	0.1	2.60	4.66	92.20-109.07
LQC	0.32	3.04	3.96	95.36-107.90
MQC	10	2.89	4.77	97.10-108.90
HQC	400	2.15	5.83	90.00-108.84

2.5 回收率

取低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 6 次），按照 1.4 方法制备，以血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.4 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比，即 $A1/A2 \times 100\%$ ，考察血浆样本处理方法的提取回收率。实验可见，通过样品前处理方法的细致优化，各浓度水平司美格鲁肽回收率均大于 78%、RSD 小于 8%，具体结果见表 4。

表 4. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.32	96.28	5.49
MQC	10	93.10	6.70
HQC	400	93.79	5.27

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 6 次），通过比较人空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应，并计算内标归一化基质效应。结果可见，使用优化后的样品前处理方法，各浓度水平基质效应因子均大于 90%，具体结果见表 5。

表 5. 基质效应考察结果(n=5)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	内标基质效应%	A/A _{is} 基质效应
LQC	0.32	90.16	92.53	97.45
MQC	10	96.37	106.87	90.18
HQC	400	103.60	105.79	97.94

2.7 系统残留考察(Carryover)

多肽类化合物由多个氨基酸通过肽链连接而成，存在大量的非极性残基以及电荷，非常容易在金属材质表面产生吸附、残留问题。实验采用生物惰性液相对司美格鲁肽进行检测分析，利用该液相非金属暴露的惰性特征，以减少残留问题。实验结果表明，完成浓度最高点血浆样品检测后分析空白样品，常规液相分析的空白样品中有检出微量司美格鲁肽，而惰性液相则没有明显检出目标化合物色谱峰，说明惰性液相可有效解决其残留问题。

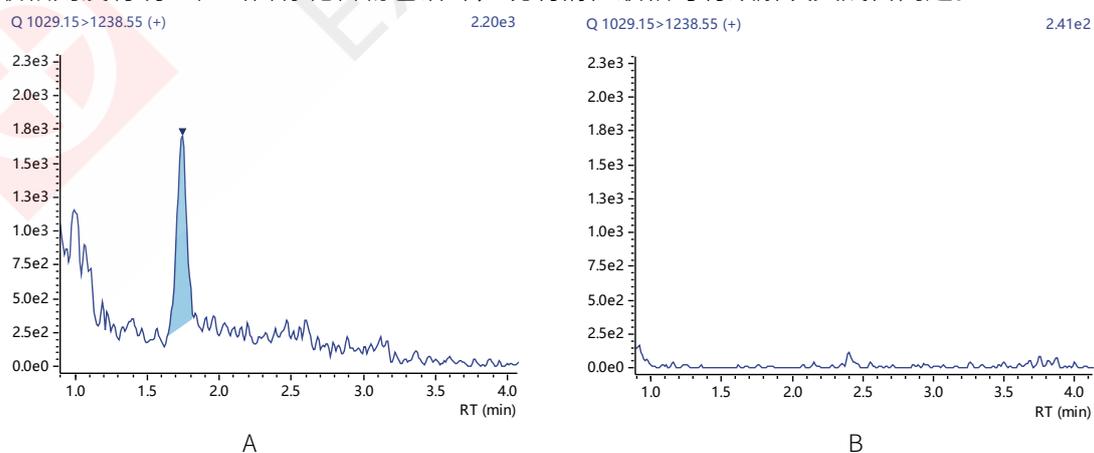


图4. 系统残留考察空白样品色谱图 (A: 普通液相结果; B: 惰性液相结果)

3. 结论

本文使用岛津特色产品生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 连用，开发血浆中司美格鲁肽定量分析方法。实验系统优化样品前处理，司美格鲁肽达到 90%以上的高回收率。通过全面优化液相、质谱参数，充分利用生物惰性液相的系统特点，克服多肽药物体内分析常见的峰形拖尾、非特异性结合严重、残留量高的分析难点，获得司美格鲁肽体内分析色谱峰峰形对称、残留量低、定量下限可达 0.1 ng/mL，并且线性范围可从 0.1 ng/mL 拓宽至 500 ng/mL，相关系数 0.999。通过方法学验证结果表明所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好、残留量低的特点，满足司美格鲁肽生物样本分析要求，可为药物研发体内研究提供快速准确的检测方法。



SHIMADZU
Excellence in Science

LC-MS/MS 法定量分析血浆中替尔泊肽

摘要: 替尔泊肽是礼来公司研发的全球首个 GLP-1 和 GIP 受体双重激动剂类药物，是当前医药市场热点药物。使用岛津三重四极杆液质联用仪，采用岛津 Shim-pack GISS-HP C18 Metal free 色谱柱建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法。以司美格鲁肽作为内标，使用基质匹配校准品及基质加标样品（质控品）进行了线性、准确度和精密度的考察。结果显示方法线性良好，在 0.5-200 ng/mL 范围内校准曲线相关系数 r 大于 0.997；定量下限及三浓度水平质控品的日内及日间精密度良好，RSD% 分别在 2.0%-8.7% 和 4.6%-9.5% 之间，准确度在 85%-107.1% 之间。使用该方法检测空白血浆无干扰成分，说明其选择性良好。校准曲线最高点进样后分析空白样品无残留，方法性能良好。对 SPE 的回收率和基质效应做了考察，结果表明三浓度水平质控品回收率在 80% 以上，基质效应在 83.9%-95.9% 之间。该方法拥有较高的灵敏度、重复性、特异性，且有效解决了多肽类药物的残留问题，可为替尔泊肽的 LC-MS/MS 定量检测提供参考。

关键词: LC-MS/MS 替尔泊肽 血浆 GLP-1 GIP

替尔泊肽 (Tirzepatide) 是礼来公司研发的全球首个 GLP-1 (胰高血糖素样肽-1) 和 GIP (葡萄糖依赖性促胰岛素多肽) 受体双重激动剂类药物。GLP-1 和 GIP 均为肠促胰岛素激素，前者一直是糖尿病领域的研发热点，度拉糖肽、司美格鲁肽都是其“明星产品”；后者具有抑制胃酸/胃抗体酶分泌、刺激胰岛素释放、抑制胃的蠕动和排空等功能，可补充 GLP-1 受体激动剂作用。2024 年 5 月，NMPA 批准其用于 2 型糖尿病的治疗；2024 年 7 月，减重适应症获得批准。

替尔泊肽是由 39 个氨基酸组成的多肽，作为当前医药市场热点药物，有必要开发其体内定量研究分析方法。液相色谱-串联质谱联用法 (LC-MS/MS) 具有灵敏度高、特异性强、通量大等优势，是该类药物分析的最佳选择。本文使用 LCMS-8050 建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法，该方法性能可靠、低残留，可为相关从业者提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050。具体配置为：

系统控制器	: CBM-40lite	在线脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40DXS	柱温箱	: CTO-40S
自动进样器	: SIL-40C XS	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: Labsolutions Ver.5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack GISS-HP C18 Metal free (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μ m);

岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-30924-03;

流动相：A-0.1%甲酸水溶液；B-0.1%甲酸甲醇溶液
进样体积：30 μ L 柱温：45 $^{\circ}$ C
流速：0.4 mL/min 清洗模式：清洗泵>清洗口
清洗泵溶液：甲醇/乙腈/异丙醇/水=1:1:1:1 清洗口溶液：甲醇/水=1:1 (v:v)
(含 0.1%甲酸)
洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 80%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	流量 (mL/min)	泵 A 浓度 (%)	泵 B 浓度 (%)
0.50	0.4	20	80
0.51	0.4	0	100
3.00	0.4	0	100
3.01	0.5	20	80
8.00	0.5	20	80
8.01	0.4	20	80
10.00		Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+ 雾化气流速：3.0 L/min
接口温度：300 $^{\circ}$ C 干燥气流速：15.0 L/min
D L 温度：150 $^{\circ}$ C 加热气流速：5.0 L/min
加热模块温度：450 $^{\circ}$ C 扫描模式：多反应监测(MRM)
M R M 参数：见表 2

表 2. MRM 参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
替尔泊肽	1204.15	396.20*	-34.0	-36.0	-29.0
	1204.15	299.10	-34.0	-55.0	-30.0
司美格鲁肽 (IS)	1029.25	1238.35	-38.0	-36.0	-44.0

注：*为定量离子

1.3 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份替尔泊肽适量，纯水溶解配制两份 1.0 mg/mL 储备液。储备液用稀释液（50%甲醇）分别稀释成浓度为 20 μ g/mL 的母液。取其中一份母液 10 μ L 加入 990 μ L 空白血浆，配制成 200 ng/mL 标准工作曲线最高点浓度，后用空白血浆依次配制成浓度 0.5、2、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准工作曲线；另一份母液按照上述方法，使用空白血浆依次配制成 1、60、120 ng/mL 的质控样品。

精密称取司美格鲁肽适量，溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的储备液用稀释液（50%甲醇）稀释为 10 μ g/mL 内标溶液，待用。

1.4 血浆样品前处理方法

取血浆样品 200 μ L，依次加入 10 μ g/mL 内标溶液 10 μ L、甲醇 200 μ L，涡旋 2 min，后用 13000 rpm/min 离心 10 min。离心后，吸取上清液 350 μ L，按 1:1 的比例加入 5% 氨

水进行稀释混匀。

取全部混合液加入已活化好的 MAX 固相萃取板，清洗除杂后，用洗脱液（60%乙腈，含 2% 甲酸）50 μ L 洗脱 2 次，并压干，收集全部洗脱溶液至收集板中，而后转入低吸附进样小瓶进样分析。

2. 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

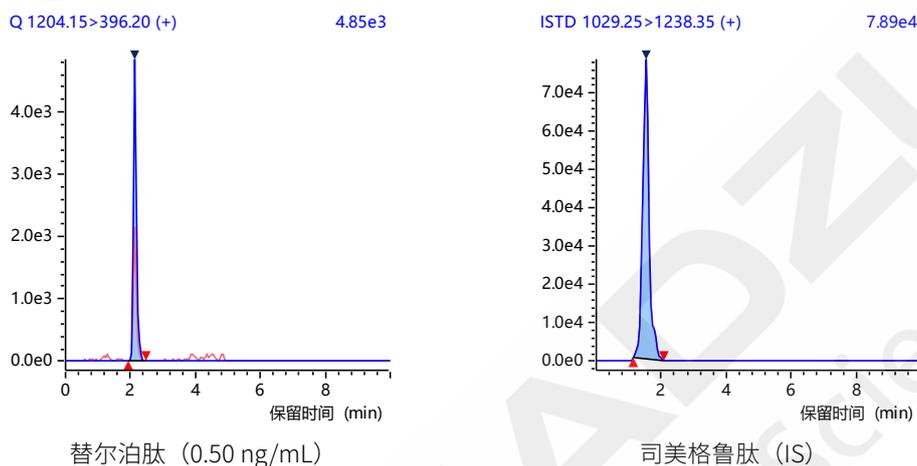


图 1. 校准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备校准曲线，内标法进行定量分析。以血浆中替尔泊肽浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以替尔泊肽峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析。校准曲线的线性范围为 0.5- 200 ng/mL，相关系数 $r > 0.997$ ，线性关系良好，校准曲线及结果分别见图 2 和表 3。

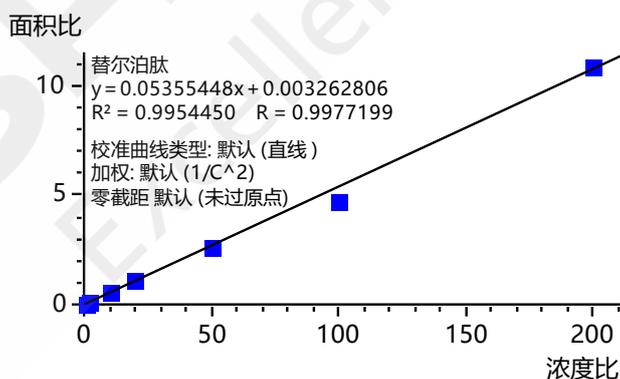


图 2. 替尔泊肽校准曲线

表 3. 校准曲线结果

化合物	线性范围(ng/mL)	相关系数 r	准确度(%)
替尔泊肽	0.50-200	0.9977	88.0%~108.6%

2.3 方法选择性

将空白血浆按照 1.4 项下前处理方法处理后，替尔泊肽与内标的色谱图如图 3 所示，各通道内均无明显干扰出现，方法的选择性良好。

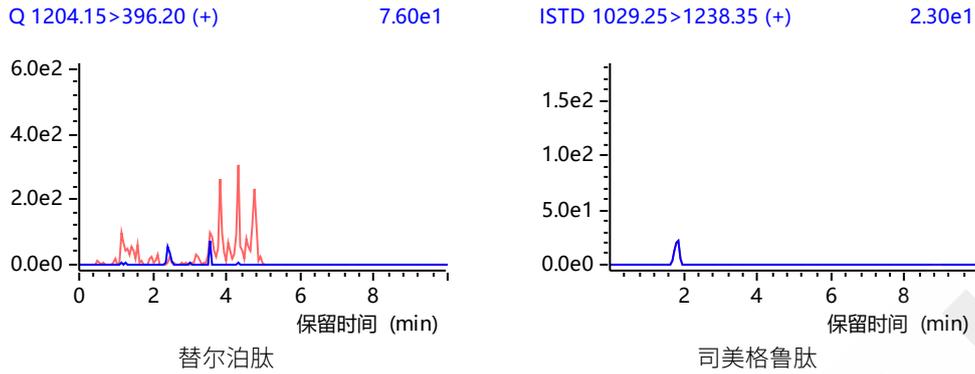


图 3. 空白血浆 MRM 色谱图

2.4 准确度及精密度

取三浓度水平质控样品 (1、60、120 ng/mL) 及定量下限样品 (0.5 ng/mL) 按上述前处理方法处理, 每个浓度样品重复制备 5 份, 在两天时间内连续考察三批次。用测得质控样品浓度值计算其日内和日间准确度、精密度, 结果 (见表 4) 表明, 各浓度水平精密度、准确度均在接受标准内, 符合生物样品检测要求。

表 4. 准确度及精密度考察结果

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
LLOQ	0.5	5.5-8.7	7.1	85.0-89.2
LQC	1	2.0-6.2	4.6	86.6-90.4
MQC	60	2.9-7.2	6.3	94.2-107.1
HQC	120	3.1-5.5	9.5	91.4-106.9

2.5 回收率和基质效应

取三浓度水平质控样品进行前处理, 进样检测后替尔泊肽色谱峰面积记为 A_1 ; 空白血浆按相同方法处理后加入相应量的标准品溶液进样检测所得替尔泊肽色谱峰面积记为 A_2 , 则 $A_1/A_2 \times 100\%$ 即为回收率。

取三浓度水平质控样品进行前处理, 进样检测后替尔泊肽色谱峰面积记为 B_1 ; 纯溶剂中加入相应量的标准品溶液进样检测所得替尔泊肽色谱峰面积记为 B_2 , 则 $B_1/B_2 \times 100\%$ 即为基质效应。

按上述方法进行回收率和基质效应考察, 结果见表 5。各浓度水平回收率均在 80% 以上, 基质效应在 83.9%-95.9% 之间。

表 5. 回收率和基质效应考察结果

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	基质效应 (%)
LQC	1	80.1	95.9
MQC	60	88.6	83.9
HQC	120	83.5	87.4

2.6 残留

替尔泊肽由多个氨基酸通过肽键连接而成, 存在大量的极性残基及电荷, 容易在色谱柱中产生残留。本实验使用岛津 Shim-pack GISS-HP C18 Metal free 色谱柱, 该色谱柱采用

PEEK 涂覆柱管内部不锈钢表面，从而减少样品与金属的接触，降低残留。实验结果表明，校准曲线浓度最高点检测后分析空白样品，没有明显检出目标化合物色谱峰（见图 4），无残留。

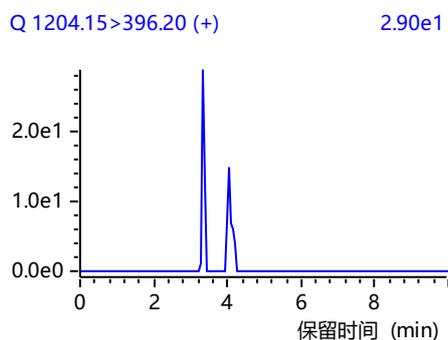


图 4. 残留考察用空白样品色谱图

3. 结论

使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法。该方法线性良好，精密度及准确度均符合生物样品检测要求。空白血浆未检出干扰成分，说明其选择性良好。使用 Metal free 系列色谱柱有效降低了残留。SPE 的回收率和基质效应均较为理想。该方法拥有较高的灵敏度、重复性、特异性，且有效解决了多肽类药物的残留问题，可为替尔泊肽的 LC-MS/MS 定量检测提供参考。

LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度

摘要：本文使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法，对方法的线性范围、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，质控品测定准确度结果与理论值接近，该方法前处理简便、分析速度快、灵敏度高，可用于血浆中利拉鲁肽含量测定。

关键词：三重四极杆液质联用仪 利拉鲁肽 血浆

利拉鲁肽(Liraglutide)是一种人体内源性物质胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的结构类似物，能够结合并激活 GLP-1 受体，以葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛素的分泌，抑制胰高血糖素释放，此外利拉鲁肽还可减缓胃排空，减少能量摄入而发挥减肥作用。虽然利拉鲁肽在临床使用较广，但该物质定量检测方法的发展却相对滞后。传统的免疫学方法自开发以来因其操作简单、快速，在普通实验室即可操作而应用广泛。然而当待测物分子量相对较小时，免疫学方法的特异性就会因交叉反应等原因变差。免疫学方法一次实验只能检测一种化合物，如果联合用药，一个样本则需要多次实验。目前，国内外越来越多的实验室采用 LC-MS/MS 方法替代免疫学方法开展血药浓度检测。

本文使用串联质谱 LCMS-8050，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器	： SCL-40	输 液 泵	： LC-40B X3
自动进样器	： SIL-40C X3	柱 温 箱	： CTO-40C
质 谱 仪	： LCMS-8050	色 谱 工 作 站	： LabSolutions Ver. 5.120

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱	： Shim-pack GISS-HP C18 Metal free column (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm); 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30922-02		
流 动 相	： A 相-0.1%甲酸水溶液, B 相-乙腈		
流 速	： 0.3 mL/min		
柱 温	： 50°C		
清 洗 模 式	： 清洗泵>清洗口		
清洗泵溶液	： 乙腈/异丙醇/DMSO/水/甲酸=30: 35: 10: 24.5: 0.5		
进 样 体 积	： 20 μL	清 洗 口 溶 液	： 甲醇/水=1:1
洗 脱 方 式	： 梯度洗脱, B 相起始浓度为 30%, 时间程序如表 1 所示。		

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	30
2.00	泵	B.Conc	45
5.00	泵	B.Conc	60
5.10	泵	B.Conc	95
6.00	泵	B.Conc	95
6.10	泵	B.Conc	30
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式	: ESI+	雾化气流速	: 3.0 L/min
接口电压	: 4.5 kV	干燥气流速	: 5.0 L/min
接口温度	: 250°C	加热气流速	: 15.0 L/min
D L 温度	: 200°C	碰撞气	: 氩气
加热模块温度	: 500°C	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
M R M 参数	: 见表2		

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
利拉鲁肽	938.5	1128.6*	-34	-31	-40
		1064.0	-34	-29	-38
格列苯脲 (内标)	494.1	369.1	-34	-34	-36

注: *为定量离子

1.3 校准品及样品制备

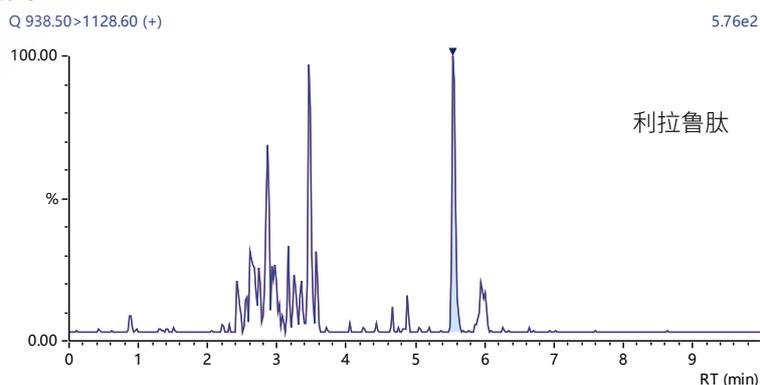
标准样品: 精密称取利拉鲁肽适量, 用 50%乙腈溶解配制成 1 mg/mL 储备液。用空白血浆溶液稀释成浓度为 200、100、50、20、10、5、2、1 ng/mL 的系列标准样品溶液;

内标溶液: 精密称取格列苯脲适量, 用甲醇溶解配制为 1 mg/mL 储备液。用甲醇溶液稀释为 200 ng/mL 内标溶液。

样品制备: 取 200 μ L 标准样品或血浆样本, 加入 20 μ L 内标溶液及 400 μ L 乙腈 (含 1% 甲酸), 涡旋混匀 3 min, 12000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液上机测定。

2. 结果讨论

2.1 MRM 色谱图



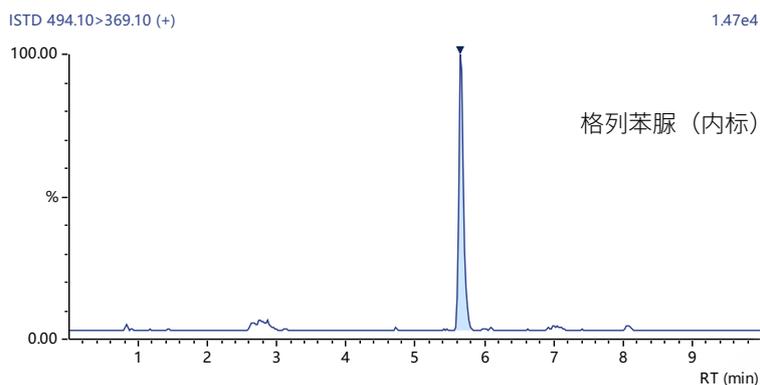


图 1. 校准曲线最低点色谱图

2.2 校准曲线

对校准曲线溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线结果见图 2 及表 3，利拉鲁肽在校准曲线浓度范围内线性良好，相关系数为 0.9993，准确度在 94.7%~104.7%之间。

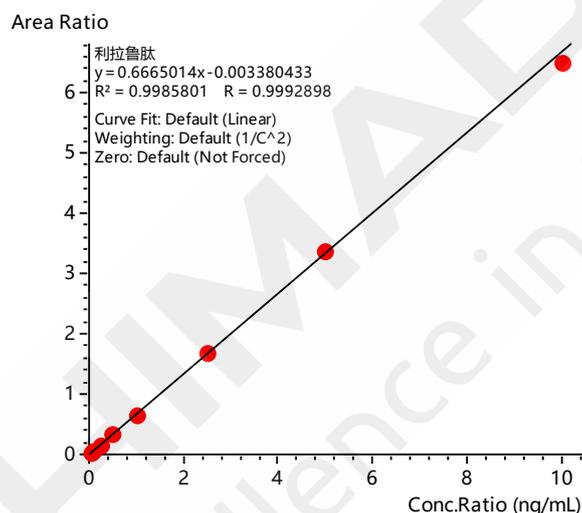


图 2. 校准曲线图谱

表 3. 校准曲线信息

名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度(%)
利拉鲁肽	$Y = (0.666501)X + (-0.00338043)$	1.00~200.00	0.9993	94.7%~104.7%

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行前处理，每个浓度重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行分析，准确度及精密度测定结果如表 4 所示，结果显示测定结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8%之间，RSD 在 2.91%~9.60%之间。

表 4. 质控准确度考察结果(n=6, 浓度单位 ng/mL)

化合物	项目	LLOQ	LQC	MQC	HQC
利拉鲁肽	理论浓度	1.00	2.50	15.00	150.00
	测定浓度	0.97	2.39	14.97	143.41
	回收率%	96.9	95.5	99.8	95.6
	RSD%	9.60	7.59	9.02	2.91

3. 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法。该方法采用内标法定量，在 1.00~200.00 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数为 0.9993；定量下限以及低、中、高浓度质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8%之间，RSD 在 2.91%~9.60%之间。该方法操作简单且灵敏可靠，可供相关行业人员参考使用。



LC-MS/MS 测定大鼠血浆中的艾塞那肽

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中艾塞那肽的方法。该多肽化合物的线性良好, 判定系数大于 0.993; 重复性实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别为 0.03% 和 4.21~4.67% 之间, 仪器精密度良好; 其仪器检出限为 0.01 ng/mL, 定量限为 0.03 ng/mL; 样品加标相对回收率在 30.4~34.8% 之间。该方法在血浆基质中灵敏度高分析速度快可以快速、灵敏地测定大鼠血浆中的艾塞那肽。

关键词: 艾塞那肽 血浆 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

糖尿病, 尤其是 II 型糖尿病是威胁人类健康的重大疾病, 传统的治疗药物磺酰脲类和双胍类不仅副作用较大, 而且对某些患者治疗效果有限; 人体分泌的胰高血糖素样肽 (GLP-1) 在血糖浓度较高的情况下能促进胰岛素分泌, 而在血糖正常时则无此作用, 而且其很容易被体内的二肽酶降解, 体内半衰期不足 2 分钟, 因此其作为临床药物使用受到了限制。后来人们发现一种从墨西哥巨蜥的毒液中分离得到的含 39 个氨基酸的多肽艾塞那肽与胰高血糖素样肽具有同源性, 而且有同样的促胰岛素分泌的功能, 稳定性好, 在 II 型糖尿病治疗方面具有良好的临床应用前景。

由于该类多肽药物的市场前景及由此带来的巨额利润, 目前国内多家制药企业对此进行了多类剂型的仿制药的研发。为了满足用户对此类药物快速、高灵敏度的要求本文建立了一种快速灵敏的大鼠血浆中艾塞那肽的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵), DGU-20A5R (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30AC (柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Inertsil Sustain GISS C18 Column (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.9 μm)

流 动 相 : A 相: (0.3%甲酸+1 mM 乙酸铵) 水;

B 相: (0.3%甲酸+1 mM 乙酸铵) 乙腈

流 速 : 0.4 mL/min

柱 温 : 40°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 项初始浓度为 10%, 具体见表 1

表 1. 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.51	Pumps	Pump B Conc.	10
8.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源	: ESI (+)	接口温度	: 300°C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	D L 温度	: 150°C
加热气	: 空气 10.0 L/min	加热块温度	: 400°C
干燥气	: 氮气 10.0 L/min	扫描模式	: MRM, 参数见表 2

表 2. 化合物信息及 MRM 参数

化合物	英文名	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
艾塞那肽	Exenatide	141758-74-9	1047.60	396.10*	-40.0	-40.0	-19.0
				299.20	-40.0	-54.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：用甲醇配制 5 mg/mL 的混合标准贮备液，用乙腈+水溶液+0.2%BSA(V/V/M, 80:20:0.2)逐步稀释成 4、20、40、200、400 和 800 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：取空白 SD 大鼠血浆 100 μ L 加入 10 μ L 标准溶液，再加入 290 μ L 纯乙腈，振荡后高速离心取上清。

2. 结果讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

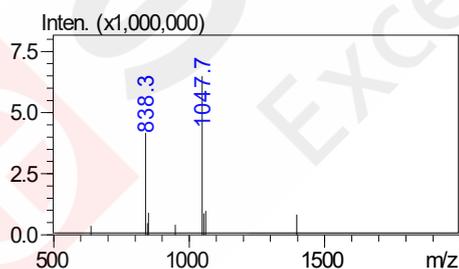


图 1. 艾塞那肽全扫描质谱图

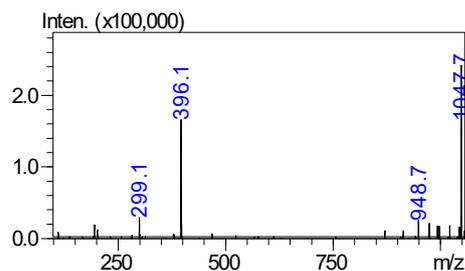


图 2. 艾塞那肽产物离子扫描质谱图

2.2 基质加标样品的 MRM 色谱图

基质加标样品的 MRM 色谱如图 3 所示。

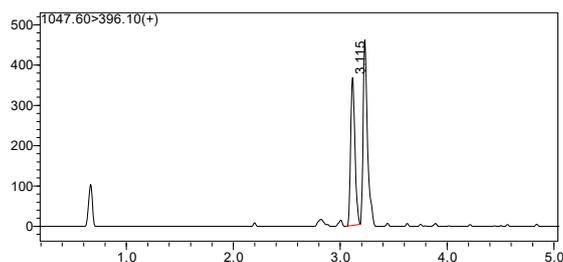


图 3. 基质加标样品的 MRM 色谱图 (0.1 ng/mL)

2.3 线性关系

配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10 和 20 ng/mL 的基质加标工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，标线如下图所示。在 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和判定系数见表 3。

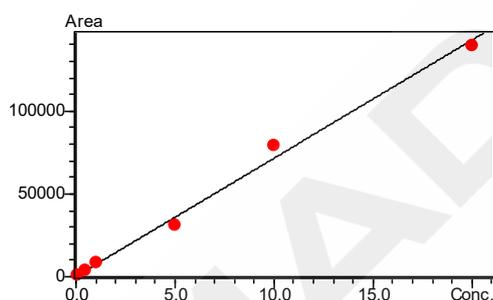


图 4. 标准工作曲线

表 3. 艾塞那肽校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ng/mL	准确度 (%)	判定系数 r^2
1	艾塞那肽	$Y = (7123.10)X + (359.992)$	0.1~20	86.2~110.4%	0.9931

2.4 检出限和定量限

对浓度为 0.5 ng/mL 的基质溶液进样分析，艾塞那肽的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表 4. 艾塞那肽的检出限和定量限

编号	名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	艾塞那肽	0.01	0.03

2.5 重复性实验

对二个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。2 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.03 和 4.21~4.67%之间，仪器重复性良好。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

编号	化合物	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)	
		R.T	Area	R.T	Area
1	艾塞那肽	0.03	4.67	0.03	4.21

2.6 回收率和专属性实验

大鼠血浆按照 1.3 方法进行处理获得浓度为 0.5、5 ng/mL 的样品各三份；另取适量大鼠血浆加入纯乙腈(V/V, 1:3)振荡后高速离心，取上清加标准品配制成 0.5、5 ng/mL 的样品

各三份。以前加标样品测得的峰面积为 A，后加标样品测得的峰面积为 A₁ 测定相对回收率，回收率=A/A₁。具体结果如表 6，回收率在 30.4~34.8%之间。比较基质加标色谱图和空白基质色谱图可知该分析方法专属性良好。空白基质的色谱图如图 4 所示，样品的色谱图如图 5 所示。

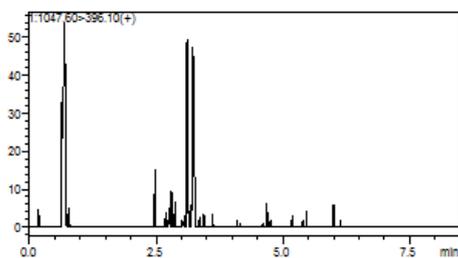


图 5. 空白基质色谱图

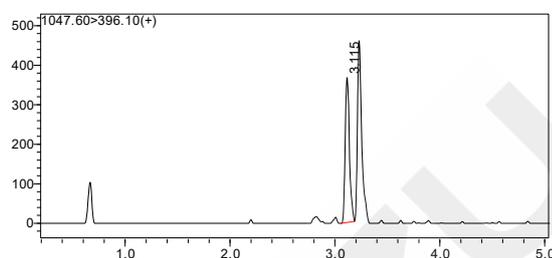


图 6. 加标回收色谱图 (0.1 ng/mL)

表 6. 加标样的回收率结果(n=3)

浓度水平	浓度 (ng/mL)	平均回收率%
1	0.5	30.4
2	5.0	34.8

2.7 样品残留考察

根据药品非临床药代动力学研究指导规则要求，在 20 ng/mL 的样品分析完成后对空白样品进行分析，结果如表 7 所示。残留面积和定量下限 0.1 ng/mL 的面积比为 7.2%，小于药品非临床药代动力学研究指导规则的 20%的要求。该方法符合标准要求。

表 7. 残留考察结果

样品类型	峰面积	面积比%
空白	68	7.2
定量下限	952	

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定大鼠血浆中的艾塞那肽。该多肽化合物的线性良好，判定系数大于 0.993；其仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.03 ng/mL；样品加标相对回收率在 30.4~34.8%之间，样品残留结果符合药品非临床药代动力学研究指导规则要求。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，满足艾塞那肽体内药物分析要求，可作为血浆中艾塞那肽的有效检测方法。

LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物戈舍瑞林

摘要: 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。人血浆样品采用固相萃取法进行前处理制备, 取上清液进样分析, 可在 8.5 min 内快速、准确地检测血浆中戈舍瑞林含量。本实验对方法选择性、线性范围、定量下限、精密度、回收率、基质效应、残留等项目均进行考察。结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求, 具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 适合人血浆中戈舍瑞林含量的快速准确检测, 可用于人体内戈舍瑞林浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词: 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 人血浆 多肽类药物 戈舍瑞林

以往抗体多肽研究主要依赖光谱法、生物检定和免疫分析等方法, 但这些分析方法分别具有专属性差、灵敏度低或成本较高等多方面局限性。LC-MS/MS 对多数药物结构的通用性、检测的专属性和灵敏度等各方面的优势, 已迅速成为药物代谢与药物动力学研究中采用的主要分析方法, 而利用 LC-MS/MS 从事抗体多肽类药物药代动力学研究已成为未来发展的趋势。

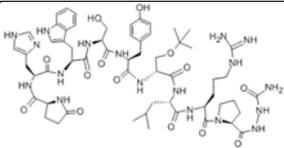
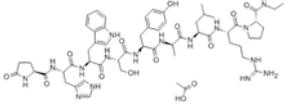
戈舍瑞林是一种注射用的促黄体生成素释放激素类似物, 属于用来治疗乳癌和前列腺癌的多肽类药物。资料显示, 样本医院数据统计得出醋酸戈舍瑞林用药金额从 2005 年的 2771 万元增长到 2015 年的 3.96 亿元, 而近几年使用量以 23.6% 的增长率不断提升。

针对以上应用需求, 为保障临床用药安全合理, 准确测定人体用药血药浓度, 实验采用 LCMS-8060 建立灵敏、高效的人血浆中戈舍瑞林含量的检测方法, 实现血浆基质中多肽药物的准确测定, 对临床精准用药提供技术支撑, 供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
戈舍瑞林	Goserelin	145781-92-6	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₈ O ₁₄	
阿拉瑞林 (IS)	Alarelin	79561-22-1	C ₅₆ H ₇₈ N ₁₆ O ₁₂	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A_{5R} 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-

20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2.0 μm)
 流 动 相 : A 相-0.1%乙酸水溶液; B 相-甲醇
 流 速 : 0.4 mL/min 进 样 体 积 : 5 μL
 柱 温 : 40°C
 洗 针 方 式 : Rinse pump→Rinse port
 外 置 洗 针 液 : 甲醇: 异丙醇: 丙酮: 水: (含 0.5%甲酸) 为 1:1:1:1
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	60
3.50	泵	B.Conc	60
5.00	泵	B.Conc	80
5.20	泵	B.Conc	80
5.50	泵	B.Conc	98
5.80	泵	B.Conc	98
5.90	泵	B.Conc	20
8.50	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 电 压 : 3.0 kV
 雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 350°C
 干 燥 气 : 氮气 9.0 L/min D L 温 度 : 200°C
 加 热 气 : 空气 9.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
 扫 描 模 式 : MRM, 参 数 见 表 3

表 3. MRM 优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
戈舍瑞林	635.60	607.55*	-32.0	-19.0	-28.0
	635.60	249.00	-32.0	-33.0	-24.0
阿拉瑞林	584.60	249.10	-28.0	-26.0	-24.0

注: *表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份戈舍瑞林适量, 用纯甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 戈舍瑞林储备液。取其中一份储备液用稀释液 (0.2%甲酸水溶液/甲醇溶液 = 40/60, v/v) 逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 的标准工作曲线; 另一份储备液用稀释液分别稀释成浓度为 30、250、4000 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 10 μL 加入 990 μL 人空白血浆 (含抑肽酶) 中, 依次配制成校准曲线 0.1、0.2、0.5、

1、2、5、10、20、50 ng/mL；分别取三个不同浓度质控溶液 10 μ L 加入 990 μ L 人空白血浆中，依次配制成 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品。

精密称取阿拉瑞林适量，用纯甲醇溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的阿拉瑞林储备液用稀释液（0.2%甲酸水溶液/甲醇溶液 = 40/60, v/v）稀释为 3 ng/mL 内标溶液，待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取含有抑肽酶的人血浆样品 100 μ L，依次加入 3 ng/mL 内标溶液 100 μ L、稀释液 100 μ L，涡旋混合 2 min。加入甲醇 500 μ L，涡旋 2 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min。吸取上清液与等体积纯水进行混匀，并取混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，分别用 1.0 mL 纯水与 60% 甲醇水溶液进行清洗除杂，再用 1.0 mL 甲醇（含 0.01% 甲酸）进行洗脱，并压干，收集全部洗脱溶液至抗体低吸附 96 孔板中，50 $^{\circ}$ C 水浴，进行氮气吹干。吹干后，向孔板内加入 100 μ L 稀释剂进行复溶，涡旋 3 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min，取上清液转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 5 μ L。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

戈舍瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[M+2H]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 635.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 607.55、 m/z 249.00；阿拉瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[M+2H]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 584.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 249.10，其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

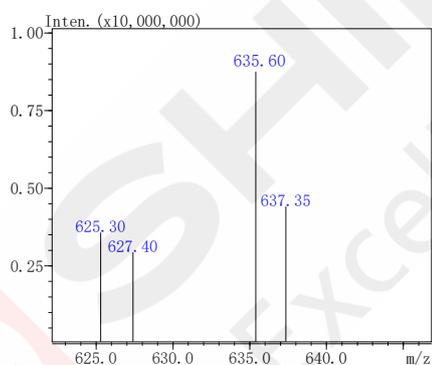


图 1. 戈舍瑞林一级质谱图

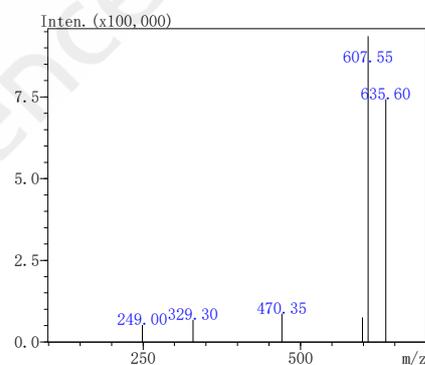


图 2. 戈舍瑞林产物离子扫描图 (CE 值-19 V)

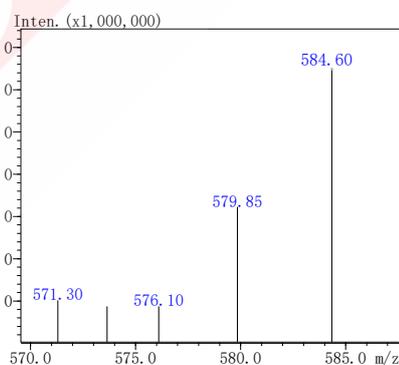


图 3. 阿拉瑞林一级质谱图

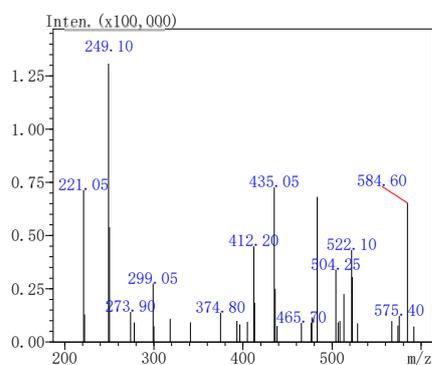


图 4. 阿拉瑞林产物离子扫描图 (CE 值-24 V)

2.2 方法选择性

取含抑肽酶的人空白血浆,按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定,得人空白血浆、0.1 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图,见图 5。结果表明,戈舍瑞林与内标物的保留时间 t_R 分别为 3.40 min、2.92 min。人空白血浆中的内源物质干扰,对样品检测无明显影响,方法具有较强选择性。

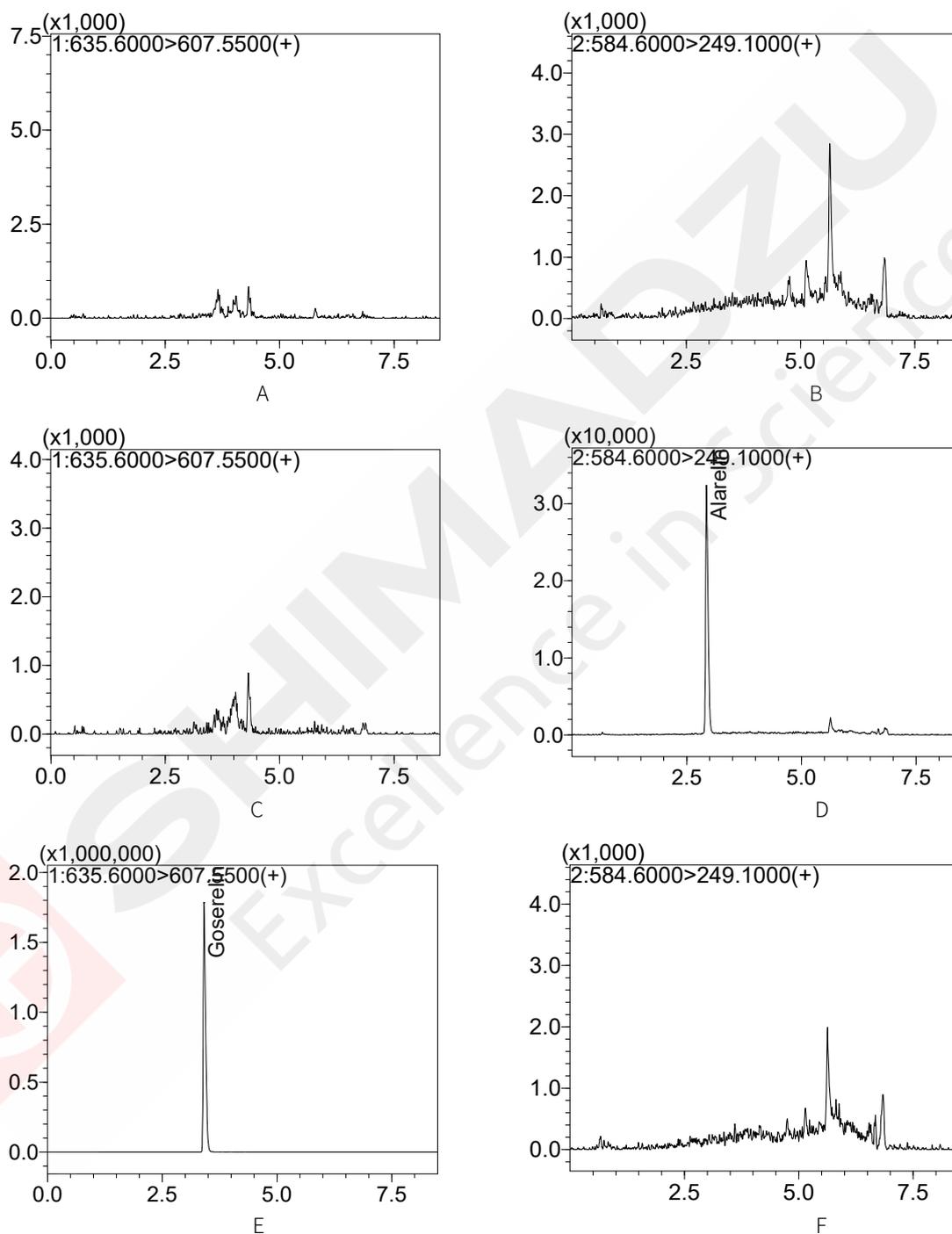


图 5. 戈舍瑞林与阿拉瑞林 MRM 色谱图 (A、B: 人空白血浆; C、D: 空白血浆含 3 ng/mL 内标血浆; E、F: 50 ng/mL 戈舍瑞林血浆样品不含内标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL 人血浆标准工作曲线,按照 1.5 项中人血浆样品前处理方法处理人血浆样品,建立校准曲线,并用同位素内标法进行分析测定。以人血浆中戈舍瑞林浓度与内标浓度(以 1 计)的比值 X 为横坐标,以戈舍瑞林峰面积与阿拉瑞林峰面积的比值 Y 为纵坐标,权重系数为 $1/C^2$,进行线性回归分析,所得校准曲线见图 6,人血浆中戈舍瑞林线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明戈舍瑞林在 0.1-50 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

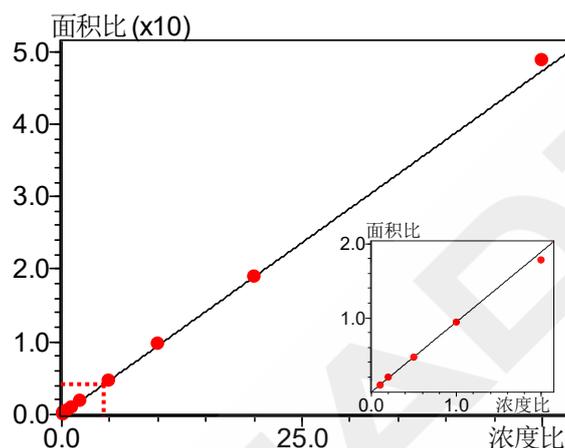


图 6. 戈舍瑞林校准曲线

表 4. 戈舍瑞林校准曲线参数 (线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
戈舍瑞林	$Y = (0.946223)X + (0.00105868)$	0.1-50	94.1~103.1	0.9995

表 5. 校准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度(%)
1	0.1	0.099	99.1
2	0.2	0.206	103.1
3	0.5	0.491	98.2
4	1	0.998	99.8
5	2	1.881	94.1
6	5	4.974	99.5
7	10	10.263	102.6
8	20	20.120	100.6
9	50	51.499	103.0

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.1ng/mL 样品,按照 1.5 方法制备,每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析,连续测定 3 天,每日随校准曲线,用测得质控样品中戈舍瑞林峰面积的 RSD%值计算其日间和日内差异,结果见

表 6。其中戈舍瑞林最低定量限 S/N 平均值为 26.85。结果表明，各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并已满足生物样品检测要求。

表 6. 戈舍瑞林日内精密度与日间精密度 (3 天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
LLOQ	0.1	4.03	6.67	87.70-109.10
LQC	0.3	3.05	3.82	93.60-107.50
MQC	2.5	1.44	3.21	96.50-107.80
HQC	40	2.08	3.54	101.90-113.70

2.5 回收率

取浓度为 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.5 方法制备, 以人血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比, 即 $A1/A2 \times 100\%$, 考察人血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 7, 各浓度水平戈舍瑞林回收率均大于 74%、RSD 小于 4%。

表 7. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.3	74.05	3.32
MQC	2.5	82.08	2.53
HQC	40	88.32	1.29

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 通过比较人空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液, 两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应, 并计算内标归一化基质效应。结果见表 8, 各浓度水平基质效应因子均大于 97%。

表 8. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	内标基质效应%	A/A _{IS} 基质效应
LQC	0.3	97.59	97.49	100.10
MQC	2.5	101.38	101.41	99.97
HQC	40	99.74	97.93	101.85

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境 (如室温、光照) 下的稳定性, 将低、中、高三浓度水平质控样品 (n=6) 在室温桌面放置 12 h 以上, 按照 1.5 方法制备并进行测定, 将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示, 三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.2\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内) 法规要求。人血浆中戈舍瑞林在室温下放置 12 h 以上具有良好稳定性。

考察生物样品在处理、制备等过程中反复冻融的稳定性, 将高、中、低质控样品 (n=6) 反复冻融三个周期, 每一周期大于 12 h, 经制备后同法测定, 与理论值进行比较。结果显

示, 测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.4\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测(偏差 $\pm 15\%$ 以内)法规要求, 说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在三次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

考察生物样品经制备后, 在待测环境中的稳定性, 将低、中、高三浓度水平质控样品($n=6$)在待测环境下放置 96 h, 将测定值与理论值进行比较。结果显示, 测定值与理论值的差异均在 $\pm 13.7\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测(偏差 $\pm 15\%$ 以内)法规要求。说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在待测环境中放置后, 其含量可保持稳定。

2.8 系统残留考察(Carryover)

考察系统残留的影响, 完成浓度最高点分析后, 其后分析空白样品中戈舍瑞林的峰面积, 空白样品中戈舍瑞林及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰, 见图 7。

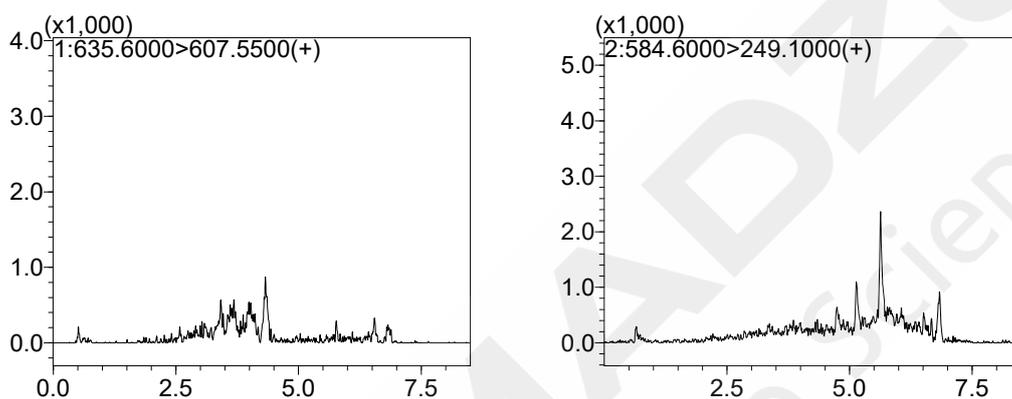


图 7. 系统残留考察空白样品色谱图 (左: 戈舍瑞林; 右: 阿拉瑞林)

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。该方法在 8.5 min 内完成人血浆中戈舍瑞林的检测, 采用同位素内标法定量, 方法定量下限 0.1 ng/mL, 线性范围 0.1-50 ng/mL, 相关系数在 0.9995。选择性考察结果表明人空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度 4.03% 与 6.67%, S/N 平均值为 26.85; 低中高三水平质控浓度日内精密度 1.44-3.05%, 日间精密度 3.21-3.82%, 准确度 87.7-113.7%; 各浓度水平质控样品中戈舍瑞林回收率均大于 74%, RSD 小于 4%, 基质效应大于 74%; 稳定性实验结果显示样品在室温下放置 12 小时稳定, 3 次冻融循环戈舍瑞林浓度无显著变化, 人血浆样品提取液待测环境下放置 96 h 稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 满足戈舍瑞林体内药物分析要求, 为戈舍瑞林仿制药生物等效性评价提供快速准确的检测方法。

LC-MS/MS 法测定人血浆中多肽类药物特立帕肽含量

摘要：本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中特立帕肽的方法。人血浆样品采用固相萃取法进行前处理制备，取上清液进样分析，可在 7 min 内快速、准确地检测血浆中特立帕肽含量。本实验对方法选择性、线性范围、定量下限、精密度、回收率、基质效应、残留等项目均进行考察。结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求，具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合人血浆中特立帕肽含量的快速准确检测，可用于人体内特立帕肽浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词：超高效液相色谱 三重四极杆质谱 人血浆 多肽类药物 特立帕肽

多肽类药物是医药行业具有广泛市场前景的研发发展方向之一。随着生物技术和遗传工程领域的迅速发展，人们可以在短期内合成多种多肽类药物。该类药物以其确切的疗效和较好的安全性，临床治疗地位不断提升，市场用量增长极快。目前药物的使用已经延伸至多种疾病的治疗领域，包括抗感染、抗肿瘤、生理调节、疼痛、心衰、骨质疏松、糖尿病、疫苗等。

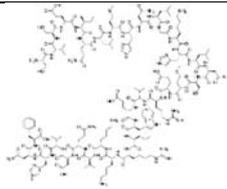
特立帕肽是一种合成的多肽激素，为人甲状旁腺素 PTH 的 1-34 氨基酸片段，具有刺激骨形成和骨吸收的生物活性，可减少绝经后妇女骨折的发生率，根据给药方式的不同，还能提高或降低骨密度。临床上常用于治疗原发性骨质疏松及性腺功能减退性骨质疏松、绝经后骨质疏松。特立帕肽原研药厂为美国礼来公司，伴随其专利的到期，以及更多国内医药企业对多肽类药物的产品优势及市场前景有了更深入的了解，国内特多立帕肽等多肽类仿制药的研发生产水平进入了全新上升的阶段。作为主要的多肽类药物，特立帕肽具有高效且低副作用的治疗功效，未来市场用药量将会进一步提升，患者对多肽类药物的接受程度也将日益提高。

迎合当前市场需求，加快特立帕肽等多肽类仿制药的研发速度，本实验采用岛津 LCMS-8060 建立灵敏、高效的人血浆中特立帕肽含量的检测方法，实现血浆基质中多肽药物的准确测定，以期对药物研制工作与临床精准用药提供技术支撑，供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
特立帕肽	Teriparatide	52232-67-4	C ₁₈₁ H ₂₉₁ N ₅₅ O ₅₁ S ₂	
人甲状旁腺激素(1-38) (IS)	Human Parathyroid 1-38	78232-94-7	C ₁₉₇ H ₃₁₉ N ₅₉ O ₅₅ S ₂	-

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。

具体配置为：

系统控制器	: CBM-20A	在线脱气机	: DGU-20A5
输液泵	: LC-30AD×2	质谱仪	: LCMS-8060
自动进样器	: SIL-30AC	色谱工作站	: LabSolutions Version 5.97
柱温箱	: CTO-20AC		

1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: UPLC Peptide CSH C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 130 Å, 1.7 μm)
流动相	: A相-0.1%甲酸水溶液; B相-0.1%甲酸乙腈
流速	: 0.3 mL/min
柱温	: 40°C
进样体积	: 20 μL
洗针方式	: Rinse pump→Rinse port
外置洗针液	: 甲醇: 异丙醇: 丙酮: 水: (含 0.1%甲酸) 为 1:1:1:1
洗脱方式	: 梯度洗脱, B相初始浓度为 15%, 洗脱程序见表 2。

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	98
4.50	泵	B.Conc	98
4.60	泵	B.Conc	15
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源	: ESI (+)	接口电压	: 1.0 kV
雾化气	: 氮气 2.0 L/min	接口温度	: 400°C
干燥气	: 氮气 10.0 L/min	D L 温度	: 200°C
加热气	: 空气 10.0 L/min	加热块温度	: 400°C
扫描模式	: MRM, 参数见表 3		

表 3. MRM 优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
特立帕肽	687.60	787.65*	-20.0	-21.0	-28.0
	824.60	984.10	-24.0	-29.0	-22.0
人甲状旁腺激素(1-38)	638.15	712.60	-22.0	-11.0	-20.0

注: *表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份特立帕肽适量, 用纯水溶解配制两份 1.0 mg/mL 特立帕肽储备液, 分装, -80°C冻存, 待用。取其中一份储备液用稀释液 (20%甲醇水溶液, 含 0.1%甲酸) 逐

级稀释成浓度为 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作曲线；另一份储备液用稀释液分别稀释成浓度为 0.02、0.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 10 μL 加入 990 μL 人空白血浆中，依次配制成校准曲线 0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 ng/mL ；分别取三个不同浓度质控溶液 10 μL 加入 990 μL 人空白血浆中，依次配制成 0.2、5、250 ng/mL 质控样品。

精密称取人甲状旁腺激素(1-38)适量，用纯水溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液，分装， -80°C 冻存，待用。将配制好的人甲状旁腺激素(1-38)储备液用稀释液 (50%甲醇水溶液，含 0.1%甲酸) 稀释为 100 ng/mL 内标溶液，待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取人血浆样品 200 μL ，依次加入 100 ng/mL 内标溶液 2 μL 、乙腈 200 μL (含 4%氢氧化铵溶液)，涡旋 2 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min。吸取上清液与 1 mL 纯水进行混匀，并取混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，用 200 μL 5% 甲醇水溶液进行清洗除杂，再用 25 μL 乙腈/水/甲酸 (60:39:1, $\text{v}/\text{v}/\text{v}$) 平行两次，进行洗脱，压干。收集全部洗脱溶液至抗体低吸附 96 孔板中，向孔板内每孔加入 50 μL 纯水进行稀释，涡旋混匀，进样分析，进样体积 20 μL 。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

特立帕肽在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 准分子离子峰 m/z 687.60、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 准分子离子峰 m/z 824.60，对准分子离子峰 m/z 687.60 进行产物离子扫描，分别生成主要碎片离子为 m/z 787.65；人甲状旁腺激素(1-38)在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 准分子离子峰 m/z 638.15，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 712.60，其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

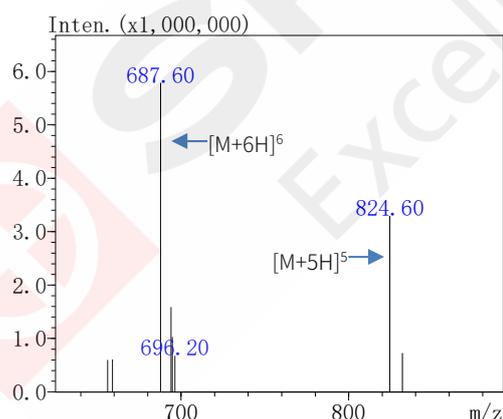


图 1. 特立帕肽一级质谱图

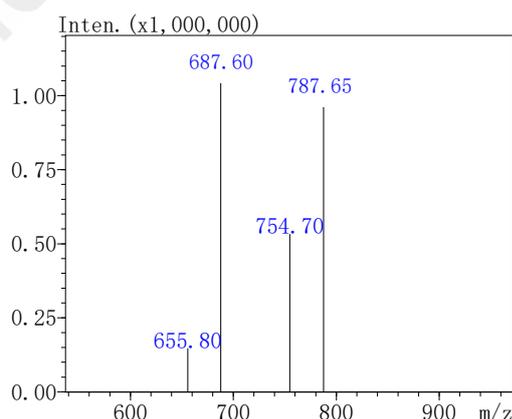


图 2. 特立帕肽 m/z 687.60 产物离子扫描图 (CE 值-20 V)

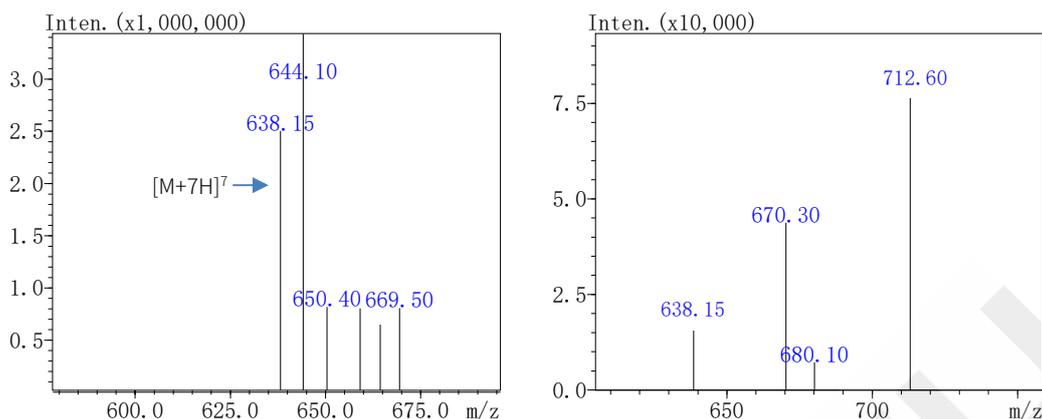


图 3. 人甲状旁腺激素(1-38)一级质谱图 图 4. 人甲状旁腺激素(1-38)产物离子扫描图 (CE 值-20 V)

2.2 方法选择性

取人空白血浆, 按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定, 得人空白血浆、0.1 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图, 见图 5。结果表明, 特立帕肽与内标物的保留时间 t_R 分别为 1.80 min、1.86 min。人空白血浆中的内源物质干扰, 对样品检测无明显影响, 方法具有较强选择性。

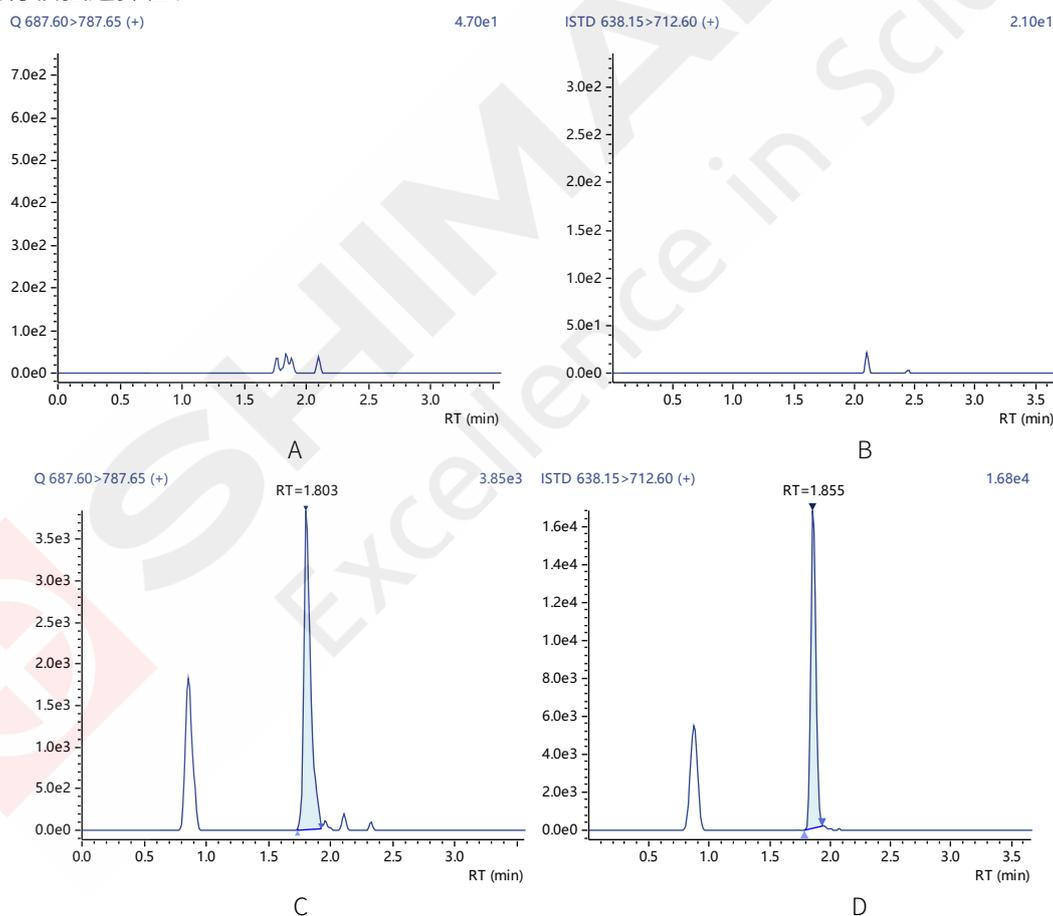


图 5. 特立帕肽与人甲状旁腺激素(1-38) MRM 色谱图 (A、B: 人空白血浆; C、D: 0.1 ng/mL 特立帕肽血浆样品含内标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 ng/mL 人

血浆标准工作曲线,按照 1.5 项中人血浆样品前处理方法处理人血浆样品,建立校准曲线,并用内标法进行分析测定。以人血浆中特立帕肽浓度与内标浓度(以 1 计)的比值 X 为横坐标,以特立帕肽峰面积与人甲状旁腺激素(1-38)峰面积的比值 Y 为纵坐标,权重系数为 $1/C^2$,进行线性回归分析,所得校准曲线见图 6,人血浆中特立帕肽线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明特立帕肽在 0.1-300 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

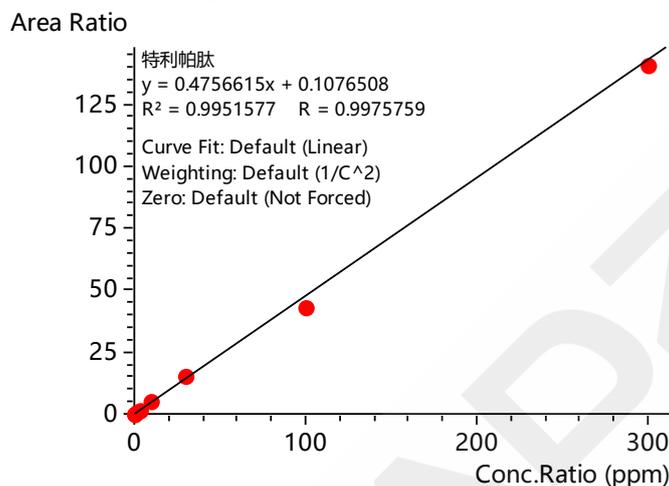


图 6. 特立帕肽校准曲线

表 4. 特立帕肽校准曲线参数 (线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
特立帕肽	$Y = (0.4756615)X + (0.1076508)$	0.1-300	89.5-107.8	0.9975

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.2、5、250 ng/mL 低中高三质控样品以及定量下限 0.1ng/mL 样品,按照 1.5 方法制备,每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析,连续测定 3 天,每日随行校准曲线,用测得质控样品中特立帕肽峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异,结果见表 5。其中特立帕肽最低定量限 S/N 平均值为 30.63。结果表明,各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内,并已满足生物样品检测要求。

表 5. 特立帕肽日内精密度与日间精密度 (3 天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
LLOQ	0.1	6.66	7.15	89.0-113.5
LQC	0.2	4.39	4.91	93.7-109.5
MQC	5	2.90	4.98	91.5-111.6
HQC	250	2.77	6.73	89.5-109.7

2.5 回收率

取浓度为 0.2、5、250 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次),按照 1.5 方法制备,以人血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比,即 $A1/A2 \times 100\%$,考察人血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 6,各浓度水平特立帕肽回收率均大于 76%、RSD 小于 8.6%。

表 6. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.2	76.21	8.57
MQC	5	80.39	4.51
HQC	250	82.69	6.49

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 5 次），通过比较人空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应，并计算内标归一化基质效应。结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 81%。

表 7. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	内标基质效应%	A/AIS 基质效应
LQC	0.2	87.17	88.45	98.55
MQC	5	76.05	93.16	81.63
HQC	250	91.97	96.22	95.58

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境（如室温、光照）下的稳定性，将低、中、高三浓度水平质控样品（n=6）在室温桌面放置约 4 h，按照 1.5 方法制备并进行测定，将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示，三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 ±13.7% 以内，满足生物样品稳定性检测（偏差 ±15% 以内）法规要求。人血浆中特立帕肽在室温下短期放置（4 h）稳定性良好。

2.8 系统残留考察(Carryover)

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中特立帕肽的峰面积，空白样品中特立帕肽及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中特立帕肽的方法。该方法在 7 min 内完成人血浆中特立帕肽的检测，采用同位素内标法定量，方法定量下限 0.1 ng/mL，线性范围 0.1-300 ng/mL，相关系数在 0.9975。选择性考察结果表明人空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度 6.66% 与 7.15%，S/N 平均值为 30.63；低中高三水平质控浓度日内精密度 2.77-4.39%，日间精密度 4.91-6.73%，准确度 89.0-113.5%；各浓度水平质控样品中特立帕肽回收率均大于 76%，RSD 小于 8.6%，基质效应大于 81%；稳定性实验结果显示样品在室温下放置 4 小时稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，满足特立帕肽体内药物分析要求，为特立帕肽仿制药生物等效性评价提供快速准确的检测方法。

LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林的方法。方法采用类似物奥曲肽作为内标物, 方法定量限 10 pg/mL, 线性范围为 10~2000 ng/mL, 相关系数 0.9997。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质, 并且亮丙瑞林和内标物奥曲肽之间无相互干扰。方法的日内精密度 2.14~4.38%, 日间精密度 2.68~5.11%, 各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4%, 能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 75%, 基质效应因子均大于 70%, 内标归一化基质效应因子在 100%左右; 系统残留考察结果表明在实验条件下亮丙瑞林无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 适合血浆中替比夫定含量的快速检测, 可用于人体内多肽类药物亮丙瑞林浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词: 超快速液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 多肽类药物 亮丙瑞林

亮丙瑞林是下丘脑产生的促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a), 是由 9 个氨基酸构成的肽类, 能与垂体内的特异性受体结合, 降低垂体反应性, 从而抑制性腺系统。亮丙瑞林促进黄体生成素(LH)释放的活性约为 GnRH 的 20 倍, 对垂体-性腺功能的抑制作用也较 GnRH 强, 对性激素依赖性疾病如前列腺癌、子宫内膜异位症等起到治疗作用。亮丙瑞林的给药剂量低, 在体内的半衰期长, 血药浓度通常为 pg/mL 级。

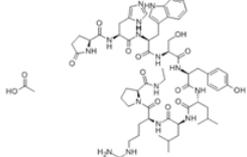
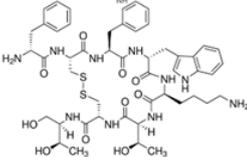
目前关于生物基质中亮丙瑞林的血药浓度测定方法的文献报道较少, 缺少能够快速、高灵敏度地检测该药物血药浓度的方法。本工作利用岛津的超高效液相色谱, 实现血浆基质中磷脂分子、内源性物质和多肽类目标药物的快速分离, 避免血浆中复杂的内源性物质对目标化合物的准确定量带来的干扰。串联三重四极杆 LCMS-8050 能够实现目标多肽物质的高灵敏度分析, 并且离子源同轴加热技术能够促进雾化, 提高离子化效率, 降低基质干扰和噪音水平, 实现血浆基质中多肽药物的准确、稳定检测。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1。

表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
亮丙瑞林	Leuprolide	74381-53-6	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₆ O ₁₂	
奥曲肽 (IS)	Octreotide	83150-76-9	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Inertsil Sustain Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L, 1.9 μm)
流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-乙腈
流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 40°C
自动进样器温度 : 10°C
进 样 体 积 : 20 μL
洗 针 方 式 : Rinse pump→Rinse port
外 置 洗 针 液 : 乙腈/异丙醇/丙酮/水/甲酸=25/25/25/24.5/0.5 (v/v/v/v/v)
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 电 压 : 1.0 kV
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 400°C
干 燥 气 : 氮气 5.0 L/min D L 温 度 : 200°C
加 热 气 : 空气 15.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
扫 描 模 式 : MRM, 参数见表 3

表 3. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
亮丙瑞林	605.40	249.05*	-22.0	-29.0	-26.0
		221.00	-22.0	-38.0	-23.0
奥曲肽 (内标)	510.30	120.00	-36.0	-31.0	-21.0

注: *表示定量离子

1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 亮丙瑞林储备液。一份储备液用 50% 甲醇逐级稀释成浓度为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的工作曲线;另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 3 ng/mL、30 ng/mL、

150 ng/mL 的质控溶液。取 10 μ L 标准工作曲线加入 990 μ L 空白血浆中，依次配制成校准曲线；取 10 μ L 质控溶液加入 990 μ L 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 奥曲肽储备液，用 50% 甲醇稀释成 100 μ g/mL，配制成内标工作液。

1.5 样品前处理方法

250 μ L 血浆样品加入 50 μ L 的内标溶液，用 4% 磷酸稀释至 500 μ L 后上样至预先活化好的 96 孔板式 SPE 小柱上，先用 500 μ L 5% 氨水溶液淋洗，再用 500 μ L 20% 乙腈淋洗，最后用 500 μ L 1% TFA 80% 乙腈溶液洗脱。氮吹干后，用 50% 甲醇溶液复溶。

1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进行样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的校准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (30 pg/mL、300 pg/mL、1500 pg/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度/理论浓度 \times 100% 计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

亮丙瑞林回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

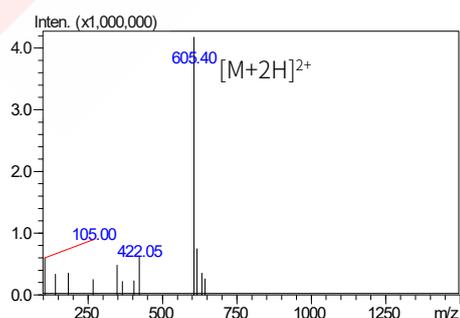


图 1. 亮丙瑞林的一级质谱图

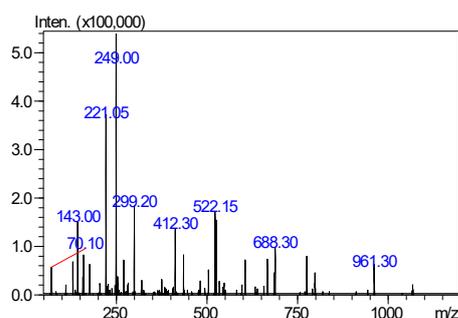


图 2. 亮丙瑞林的产物离子扫描图(CE 值-25 V)

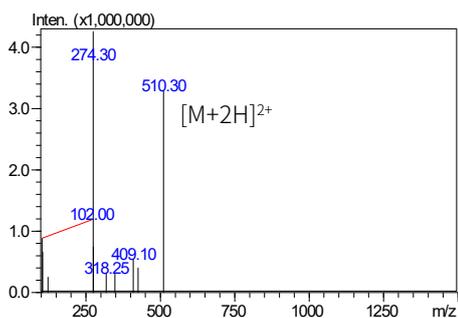


图 3. 奥曲肽的一级质谱图

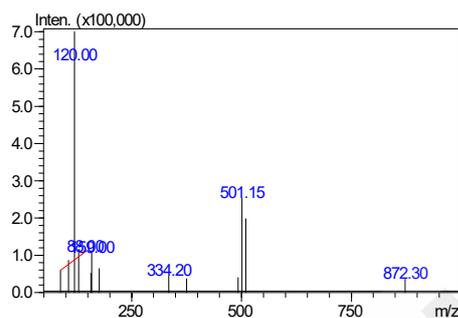


图 4. 奥曲肽的产物离子扫描图(CE 值-20 V)

2.2 方法选择性

考察空白血浆基质和 10 pg/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，亮丙瑞林及其内标奥曲肽的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

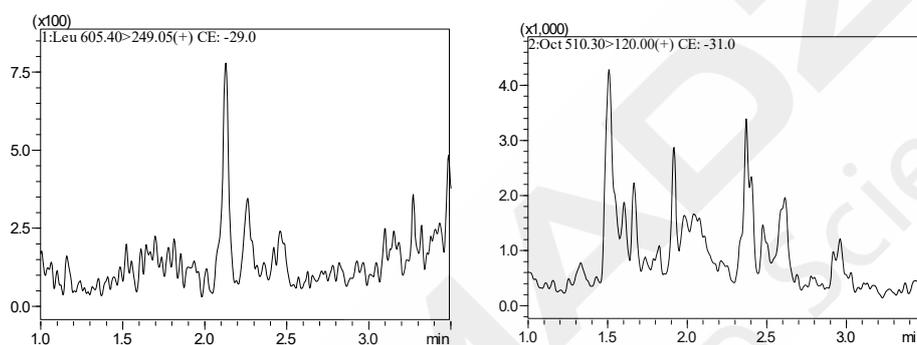


图 5. 空白血浆样品的 MRM 色谱图

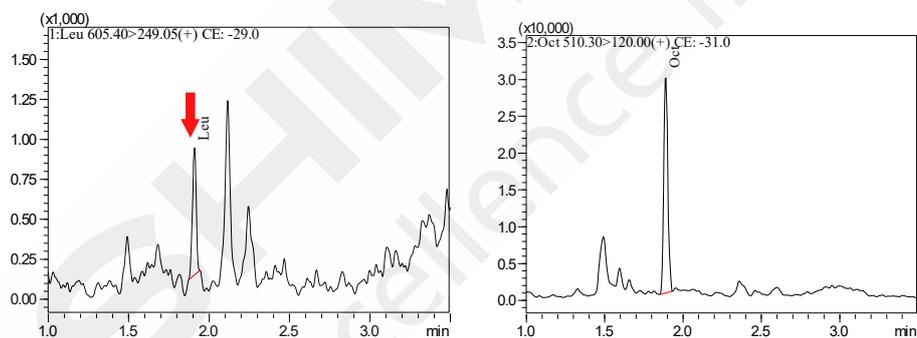


图 6. 10 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察内标物奥曲肽对替比夫定测定结果的影响，处理过程加入内标的空白样品 (QC0 样品) 如图 7 所示，与图 6 10 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，内标物奥曲肽不会对亮丙瑞林的准确测定造成干扰。

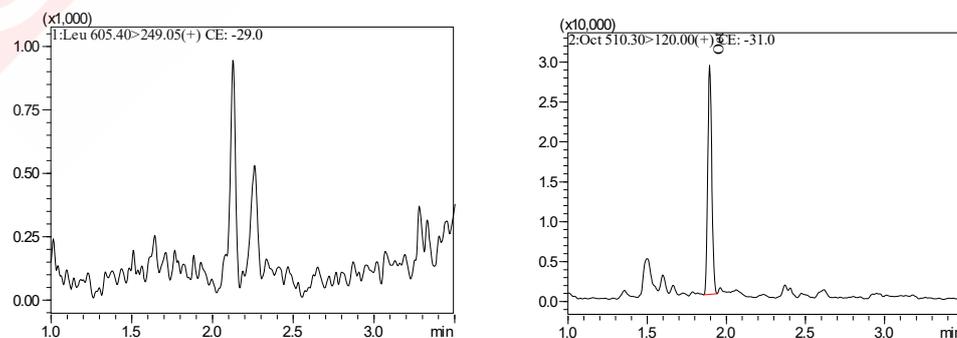


图 7. QC0 的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 10 pg/mL、20 pg/mL、50 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、500 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，内标法定量。所得校准曲线如图 8 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表亮丙瑞林面积与奥曲肽峰面积的比值，x 值代表血浆中亮丙瑞林浓度。方法检出限确定为 10 pg/mL，在此浓度水平，精密度和准确度均在接受标准内，6 次重复分析 RSD 为 7.60%，准确度为 86.7~108.4%，S/N 平均值为 14.6。

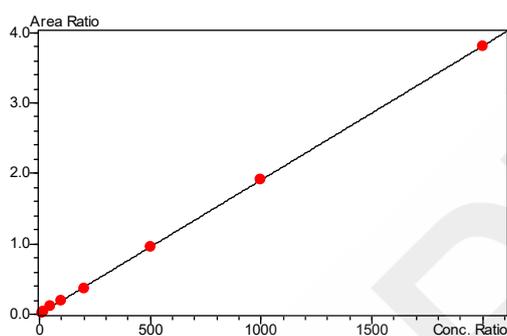


图 8. 亮丙瑞林校准曲线

表 4. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

化合物	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
亮丙瑞林	$Y = (1.85 \times 10^{-3})X + (3.86 \times 10^{-3})$	10~2000	91.3~110.3%	0.9997

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度的结果如表 5 所示。方法的日内精密度 2.14~4.38%，日间精密度 2.68~5.11%，各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4%。

表 5. 方法日间精密度和日内精密度的结果(3 天, 每天重复 6 次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度%
30	4.38	5.11	87.7~114.4
300	2.14	3.58	86.0~95.9
1500	2.58	2.68	86.0~101.3

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平亮丙瑞林的回收率分别为 $79.8 \pm 1.7\%$ 、 $76.8 \pm 9.6\%$ 和 $75.2 \pm 10.9\%$ 。实验结果表明亮丙瑞林的各质控浓度回收率一致，CV% 的变化也满足准确定量的要求。

表 6. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率%
LQC	30	79.8
MQC	300	76.8
HQC	1500	75.2

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子

均大于 70%，内标归一化基质效应因子均在 100%左右。

表 7. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	30	70.8%	108.1%
MQC	300	71.5%	100.4%
HQC	1500	77.0%	99.5%
内标基质效应因子		71.2%	

2.7 Carryover 考察

考察系统残留的影响,完成浓度最高点分析后,其后分析空白样品中亮丙瑞林的峰面积,空白样品中亮丙瑞林及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰,色谱图见图 9。

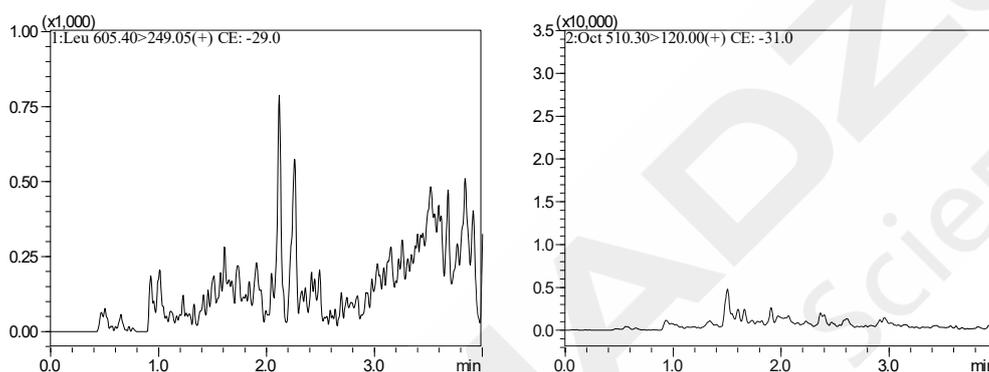


图 9. 高浓度样品后分析后空白样品的 MRM 色谱图

3. 结论

本文建立了一种使用岛津 LCMS-8050 测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林的方法。该方法在 5.5 min 内完成血浆中亮丙瑞林的检测,采用奥曲肽作为内标定量,方法定量限 10 pg/mL,线性范围为 10~2000 pg/mL,相关系数在 0.9997。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质,并且亮丙瑞林和内标物奥曲肽之间无相互干扰。方法的日内精密度 2.14~4.38%,日间精密度 2.68~5.11%,各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4%,能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求;各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 75%,基质效应因子均大于 70%,内标归一化基质效应因子在 100%左右;高浓度样品分析后考察空白样品中的残留,结果表明在 10~2000 pg/mL 线性范围内无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点,适合血浆中多肽类药物亮丙瑞林含量的快速准确检测。

LC-MS/MS 法测定血浆中多肽类药物奥曲肽

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物奥曲肽的方法。方法采用类似物亮丙瑞林作为内标物, 方法定量限 5 pg/mL, 线性范围为 5~2000 pg/mL, 相关系数 0.9993。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质, 并且奥曲肽和内标物亮丙瑞林之间无相互干扰。方法的日内精密度 3.30~6.01%, 日间精密度 2.43~6.44%, 各浓度水平质控样品的准确度 86.2~109.7%, 能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 70%, 基质效应因子均大于 80%, 内标归一化基质效应因子大于 90%; 系统残留考察结果表明在实验条件下奥曲肽无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 适合血浆中奥曲肽含量的快速检测, 可用于人体内多肽类药物奥曲肽浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词: 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 多肽类药物 奥曲肽

奥曲肽是一种人工合成的八肽环状化合物, 具有与天然内源性生长抑制素类似的作用。奥曲肽具有多种生理活性, 如抑制生长激素、促甲状腺素、胃肠和胰内分泌激素的病理性分泌过多等。奥曲肽的给药剂量较低, 在体内具有较长的半衰期, 药物在体内的浓度低。

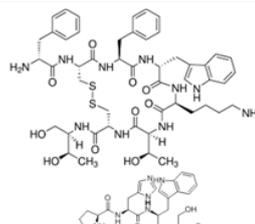
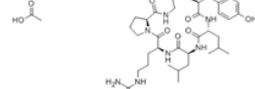
目前关于生物基质中奥曲肽的血药浓度测定方法的文献报道较少, 缺少能够快速、高灵敏度地检测该药物血药浓度的方法。本工作利用岛津的超高效液相色谱, 实现血浆基质中磷脂分子、内源性物质和多肽类目标药物的快速分离, 避免血浆中复杂的内源性物质对目标化合物的准确定量带来的干扰。串联三重四极杆 LCMS-8050 能够实现目标多肽物质的高灵敏度分析, 并且离子源同轴加热技术能够促进雾化, 提高离子化效率, 降低基质干扰和噪音水平, 实现血浆基质中多肽药物的准确、稳定检测。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1。

表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
奥曲肽	Octreotide	83150-76-9	$C_{49}H_{66}N_{10}O_{10}S_2$	
亮丙瑞林 (内标)	Leuprolide	74381-53-6	$C_{59}H_{84}N_{16}O_{12}$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Inertsil Sustain Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L, 1.9 μm)
流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-乙腈
流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 40°C
自动进样器温度 : 10°C
进 样 体 积 : 20 μL
洗 针 方 式 : Rinse pump→Rinse port
外 置 洗 针 液 : 乙腈/异丙醇/丙酮/水/甲酸=25/25/25/24.5/0.5 (v/v/v/v/v)
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 电 压 : 1.0 kV
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 400°C
干 燥 气 : 氮气 5.0 L/min D L 温 度 : 200°C
加 热 气 : 空气 15.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
扫 描 模 式 : MRM, 参数见表 3

表 3. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
奥曲肽	510.30	120.00*	-36.0	-31.0	-21.0
		501.15	-36.0	-15.0	-36.0
亮丙瑞林 (内标)	605.4	249.05	-22.0	-29.0	-26.0

注: *表示定量离子

1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 奥曲肽储备液。一份储备液用 50%甲醇逐级稀释成浓度为 0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL 的工作曲线; 另一份储备液用 50%甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 ng/mL、3.0 ng/mL、30 ng/mL 的质控溶液。取 20 μL 标准工作曲线加入 980 μL 空白血浆

中,依次配制成校准曲线;取 20 μL 质控溶液加入 980 μL 空白血浆中,依配制成低浓度(LQC)、中浓度(MQC)、高浓度(HQC)质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 亮丙瑞林备液,用 50%甲醇稀释成 1.0 ng/mL,配制成内标工作液。

1.5 样品前处理方法

200 μL 血浆样品加入 50 μL 的内标溶液,用 4% 磷酸稀释至 450 μL 后上样至预先活化好的 96 孔板式 $\mu\text{Elution WCX SPE}$ 小柱上,先用 400 μL 5%氨水溶液淋洗,再用 400 μL 20%乙腈淋洗,最后用 50 μL 1% TFA 75%乙腈溶液洗脱,加入 150 μL 水稀释后,20 μL 上机分析。

1.6 方法验证

考察方法的选择性,对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限(LLOQ)的考察,分别处理 6 份 LLOQ 样品,分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%,测量误差不超过理论值的 80~120%,同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察,通过分析空白血浆配制的校准曲线,在三个不同的分析批中对线性关系进行考察,采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线,权重采用 $1/x$ 。

方法精密度和准确度的考察,在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (15 pg/mL、150 pg/mL、1500 pg/mL),日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差,日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差;方法准确度通过公式计算:测量浓度/理论浓度 $\times 100\%$ 计算。准确度在 85~115%范围内,精密度不超过 15%。

奥曲肽回收率考察,三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次),比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品,两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察,三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次),通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液,两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

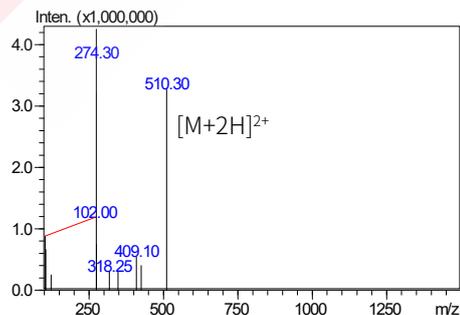


图 1. 奥曲肽的一级质谱图

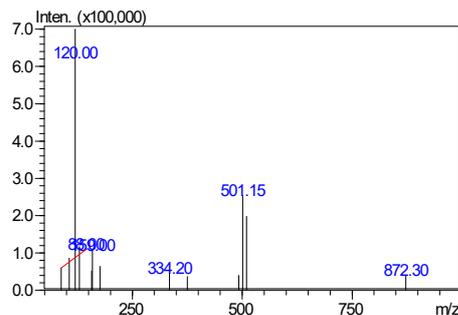


图 2. 奥曲肽的产物离子扫描图(CE 值-20 V)

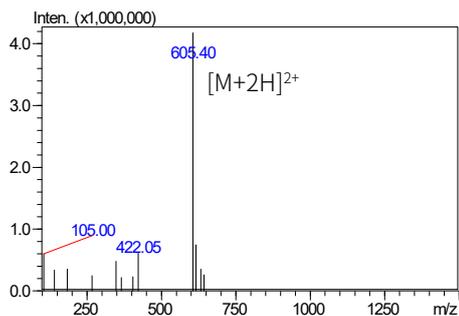


图 3. 亮丙瑞林的一级质谱图

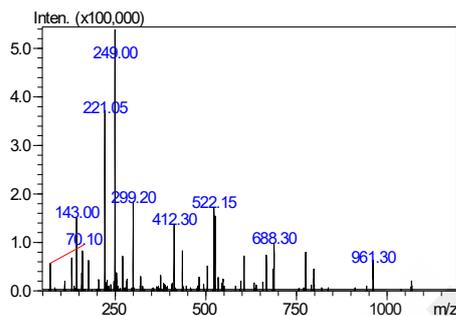


图 4. 亮丙瑞林的产物离子扫描图(CE 值-25 V)

2.2 方法选择性

考察空白血浆基质和 5 pg/mL 血浆基质加标样品, 结果如图 5、6 所示, 奥曲肽及其内标亮丙瑞林检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

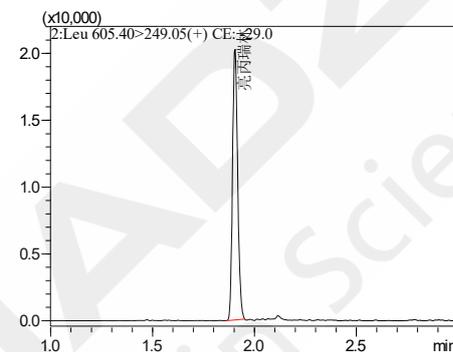
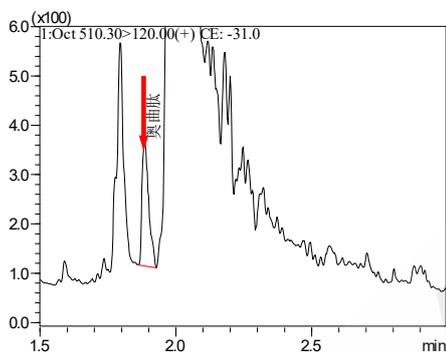


图 5. 5 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

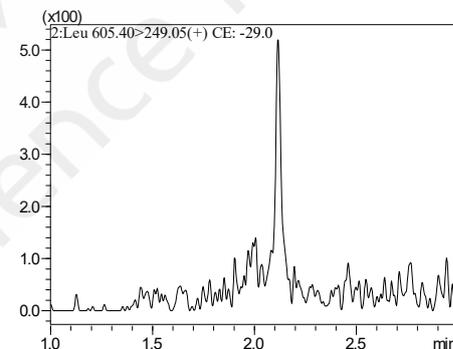
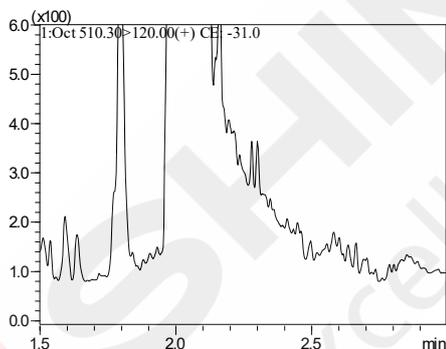


图 6. 空白血浆样品的 MRM 色谱图

由于空白血浆中奥曲肽检测通道中存在较多干扰峰, 通过梯度优化获得合适的色谱分离, 图 7 为 400 pg/mL 血浆基质中检测到奥曲肽色谱图, 图中奥曲肽和干扰峰依然得到很好的分离。

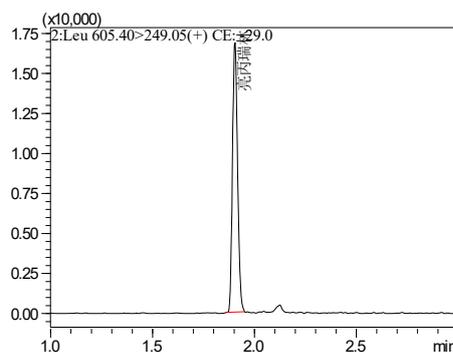
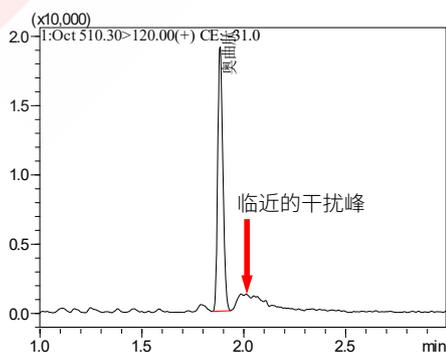


图 7. 400 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察内标物亮丙瑞林对奥曲肽测定结果的影响, 处理过程加入内标的空白样品(QC0 样品) 如图 8 所示, 与图 5 5 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较, 内标物亮丙瑞林不会对奥曲肽的准确测定造成干扰。

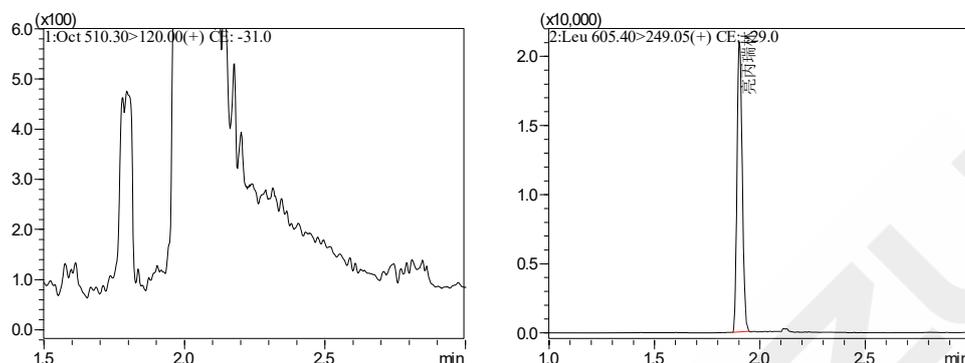


图 8. QC0 的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 5 pg/mL、10 pg/mL、20 pg/mL、40 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、400 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL 的血浆加标样品, 按 1.5 中的前处理条件处理样品, 按照 1.3 中的仪器条件进行测定, 内标法定量。所得校准曲线如图 9 所示, 线性方程及相关系数见表 4, 其中 y 值代表奥曲肽峰面积与亮丙瑞林峰面积的比值, x 值代表血浆中亮丙瑞林浓度。方法定量限确定为 5 pg/mL, 在此浓度水平, 精密度和准确度均在接受标准内, 6 次重复分析 RSD 为 6.22%, 准确度为 96.9~111.1%, S/N 平均值为 10.6。

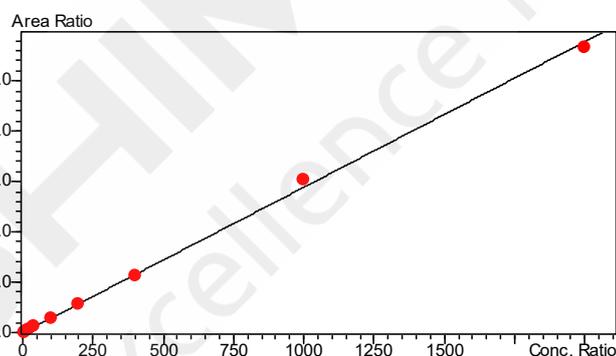


图 9. 奥曲肽校准曲线

表 4. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

化合物	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
奥曲肽	$Y = (2.89 \times 10^{-3})X + (-6.34 \times 10^{-3})$	5~2000	89.6~112.3%	0.9993

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度的结果如表 5 所示。方法的日内精密度 3.30~6.01%, 日间精密度 2.43~6.44%, 各浓度水平质控样品的准确度 86.2~109.7%。

表 5. 方法日内精密度和日间精密度的结果(3 天, 每天重复 6 次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度%
15	6.01	6.44	87.8~109.7
150	4.67	4.25	86.2~99.6
1500	3.30	2.43	87.7~95.4

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平奥曲肽的回收率分别为 $70.6 \pm 7.8\%$ ， $71.5 \pm 1.8\%$ 和 $70.1 \pm 1.9\%$ 。实验结果表明奥曲肽的各质控浓度回收率一致，CV% 的变化也满足准确定量的要求。

表 6. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率%
LQC	15	70.6
MQC	150	71.5
HQC	1500	70.1

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子均大于 90%。

表 7. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	15	82.1%	90.5%
MQC	150	87.6%	96.6%
HQC	1500	89.7%	98.9%
内标基质效应因子		90.7%	

2.7 Carryover 考察

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中奥曲肽的峰面积，空白样品中奥曲肽及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰，色谱图见图 10。

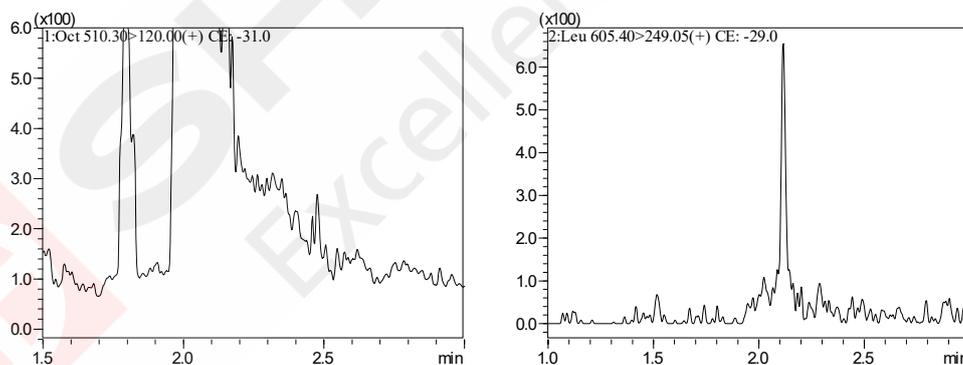


图 10. 高浓度样品后分析空白样品的 MRM 色谱图

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物奥曲肽的方法。该方法在 5.5 min 内完成血浆中奥曲肽的检测，采用亮丙瑞林作为内标定量，方法定量限 5 pg/mL，线性范围为 5~2000 pg/mL，相关系数在 0.9993。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且奥曲肽和内标物亮丙瑞林之间无相互干扰。方法的日内精密度 3.30~6.01%，日间精密度 2.43~6.44%，各浓度水平质控样品的准确度 86.2~109.7%，能够满足血浆中药物浓度准确定

量的要求；各浓度水平奥曲肽回收率大于 70%，基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子大于 90%；高浓度样品分析后考察空白样品中的残留，结果表明在 5~2000 pg/mL 线性范围内无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中多肽类药物奥曲肽含量的快速准确检测。



LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中新型脑钠肽类似物

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定大鼠血浆中多肽类药物 BNP 类似物的方法。血浆样品经抗体沉淀处理, 再经岛津 GL 离心固相萃取小柱 Mono Spin C18 进行离心固相萃取, 可在 6.0 min 内快速、准确地测定其中的 BNP 类似物。该方法采用奥曲肽作为内标定量, 方法最低定量限 5 ng/mL, 线性范围为 5~2000 ng/mL, 相关系数大于 0.997。低、中、高浓度质控样品, 每个浓度的样品平行处理 6 份, 其精密度与准确度分别在 1.98%~6.95% 与 87.1~112.7% 之间。方法回收率在 93.3%~111.1% 之间, 基质效应因子在 89.1%~98.9% 之间, 内标归一化基质效应因子在 93.4%~103.7% 之间。空白大鼠血浆不干扰最低定量限的准确测定, 目标物 BNP 类似物和内标奥曲肽之间无相互干扰。高浓度样品 (2000 ng/mL) 分析完成后进行空白样品分析, BNP 类似物和内标奥曲肽的通道中均没有明显的目标化合物干扰。该方法灵敏、稳定, 可以用于新型多肽药物 BNP 类似物的定量测定。

关键词: 多肽药物 血浆 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, 简称 BNP)是由心脏分泌的利尿钠肽家族的一员, 由 32 个氨基酸残基组成的多肽。因其首先在猪脑中发现, 故得名。可以促进排钠、排尿, 具有较强的舒张血管作用, 可用于治疗心力衰竭。目前已上市的基因重组人 BNP, 国内制剂商品名为新活素, 国外同类药名为奈西立肽(Nesiritide)。本文分析的目标物是一种新型 BNP 类似物, 与 BNP 具有较高的氨基酸同源性, 且半衰期更长, 具有较大的开发潜力和较高的开发价值。本文建立了一种测定大鼠血浆中新型多肽类药物 (BNP 类似物) 的 LC-MS/MS 方法, 快速、灵敏、准确, 可用于大鼠血浆中新型 BNP 类似物的定量检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions 色谱工作站。

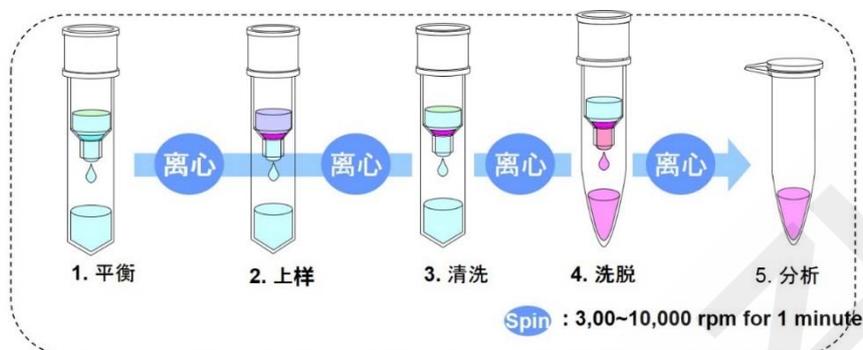
1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色 谱 柱 : InertSustain Bio C18 (2.0 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm)
- 流 动 相 : A 相-0.2%甲酸水溶液; B 相-0.2%甲酸甲醇
- 流 速 : 0.5 mL/min
- 柱 温 : 60°C
- 溶剂共进样 : 样品体积: 10 μL, 稀释剂 (0.2%甲酸水) 体积: 50 μL

加 850 μL 1.4.1 中的样品溶液, 1000 g 离心 2 min, 2000 g 离心 2 min, 加 300 μL 0.5% 甲酸水溶液, 2000 g 离心 1 min, 3000 g 离心 1 min, 加 250 μL 60% 甲醇水, 10000 g 离心 1 min, 低吸附 EP 管收集洗脱液, 14000 rpm 离心 5 min, 进 LC-MS/MS 分析。

整个前处理过程应使用低吸附 EP 管及低吸附枪头。



2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图

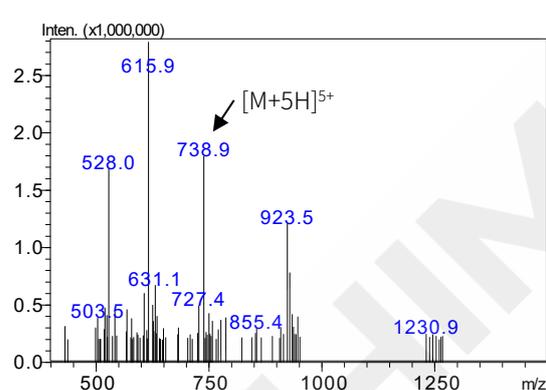


图 1. BNP 类似物一级质谱图

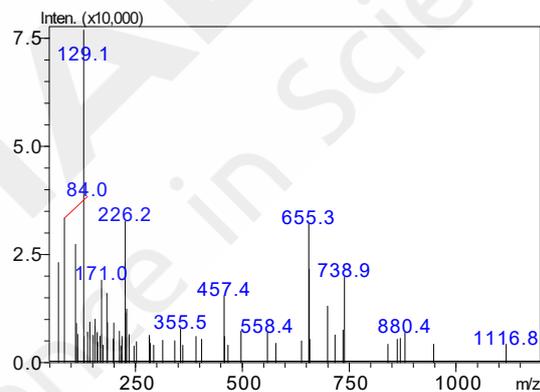


图 2. BNP 类似物二级质谱图

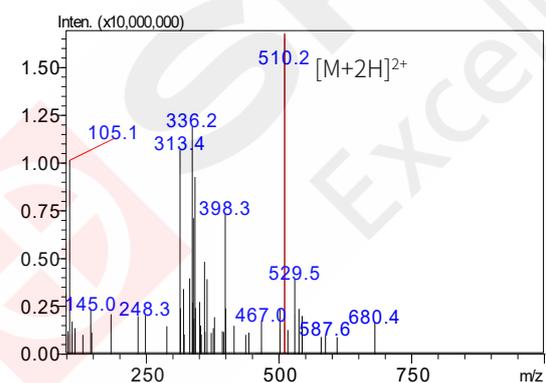


图 3. 奥曲肽一级质谱图

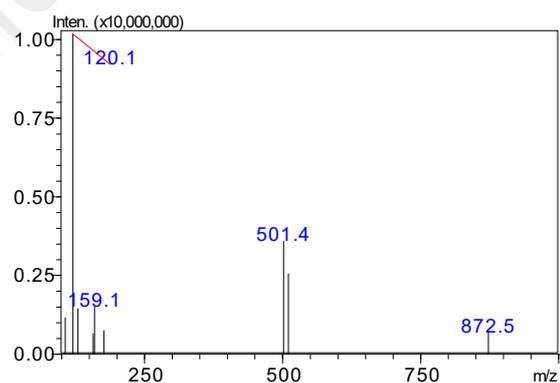


图 4. 奥曲肽二级质谱图

2.2 选择性

取空白大鼠血浆 45 μL , 不加标准工作液和内标, 按照 1.4 进行样品处理, 得到空白基质样品。取空白大鼠血浆 45 μL , 不加标准工作液, 按照 1.4 进行样品处理, 得到 QC₀ 样品。取空白大鼠血浆 45 μL , 按照 1.4 进行样品处理, 得到血浆加标样品。结果如图 5~图 10 所示。结果显示, 空白大鼠血浆中目标化合物 BNP 类似物和内标奥曲肽的通道均不干扰定量限样品的检测, 内标物奥曲肽不会对 BNP 类似物的准确测定造成干扰。

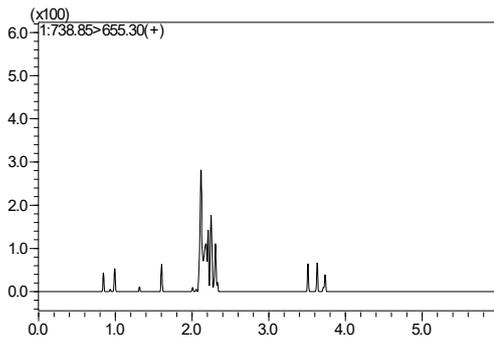


图 5. 空白血浆 MRM 谱图-BNP 类似物

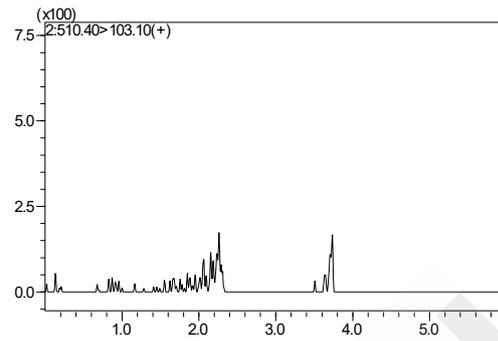


图 6. 空白血浆 MRM 谱图-奥曲肽

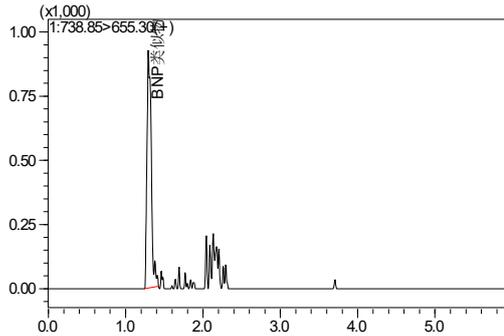


图 7. 血浆加标样品 MRM 谱图-BNP 类似物 (5 ng/mL)

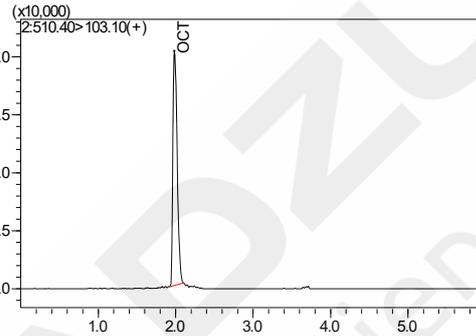


图 8. 血浆加标样品 MRM 谱图-奥曲肽

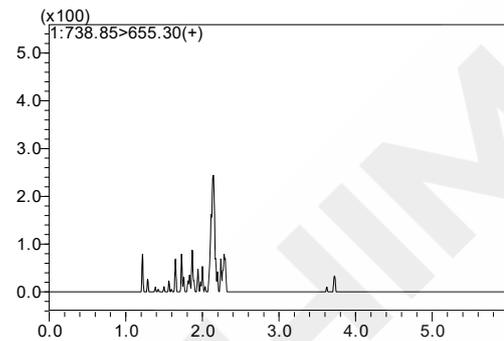


图 9. QC0 样品 MRM 谱图-BNP 类似物

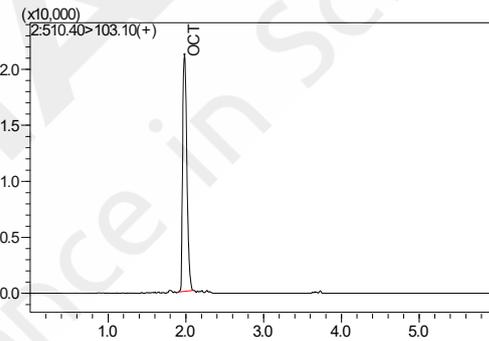


图 10. QC0 样品 MRM 谱图-奥曲肽

2.3 线性范围和最低定量限

取大鼠血浆 45 μ L, 加入标准系列工作液和内标, 按照 1.4 中的前处理条件处理样品, 得到血浆浓度为 5、10、20、50、100、250、500、1000、2000 ng/mL 的校准曲线样品, 按照 1.2 中的分析条件进行测定, 内标法定量。所得校准曲线如图 11 所示, 线性方程及相关系数见表 3, 其中 y 值代表 BNP 类似物峰面积与奥曲肽峰面积的比值, x 值代表血浆中 BNP 类似物的浓度。方法检出限确定为 5 ng/mL, 在此浓度水平, 精密度和准确度均在接受标准内, 6 次重复分析 RSD 为 6.51%, 准确度为 80.5~96.2%, S/N 平均值为 12.0。

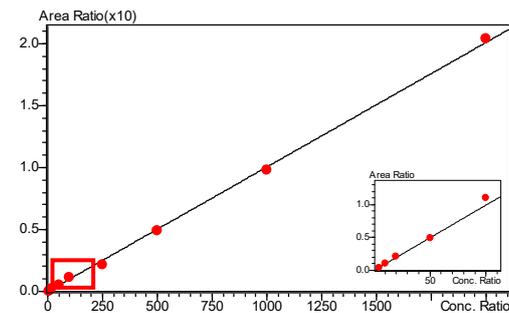


图 11. BNP 类似物校准曲线 (5~2000 ng/mL)

表 3. BNP 类似物校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C²)

名称	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
BNP 类似物	$Y=(1.00 \times 10^{-2})X + (2.98 \times 10^{-3})$	5~2000	86.4~111.6 %	0.9969

2.4 精密度与准确度

取大鼠血浆 45 μ L, 加入质控工作液和内标, 按照 1.4 中的前处理条件处理样品, 得到血浆浓度为 12 ng/mL、120 ng/mL、1200 ng/mL 的质控样品, 每个浓度平行处理 6 个样品, 按照 1.2 中的分析条件进行测定, 考察质控样品的日内精密度与准确度, 结果如表 4 所示。方法的日内精密度的为 1.98~6.95%, 各浓度水平质控样品的准确度为 87.1~112.7%。

表 4. 方法精密度与准确度(n=6)

理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 CV%	准确度%
10	6.95	87.1~99.2
120	5.51	96.8~111.7
1200	1.98	105.4~112.7

2.5 回收率

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的回收率, 结果如表 5 所示。各浓度水平 BNP 类似物的回收率在 93.3%~111.1%之间。

表 5. 回收率(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	实际浓度均值 (ng/mL)	平均回收率
LQC	12	11.2	93.3%
MQC	120	130.2	108.5%
HQC	1200	1333.4	111.1%

2.6 基质效应

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的基质效应, 结果如表 6 所示。结果表明, 各浓度水平 BNP 类似物的基质效应在 89.1%~98.9%之间, 内标基质效应因子为 95.4%, 内标归一化基质效应因子在 93.4%~103.7%之间。

表 6. 基质效应(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	12	94.5%	99.0%
MQC	120	89.1%	93.4%
HQC	1200	98.9%	103.7%
内标基质效应因子		95.4%	

2.7 残留

在高浓度样品 (2000 ng/mL) 后进样分析空白样品, 考察 BNP 类似物和内标奥曲肽的残留情况。结果如图 12、图 13 所示。

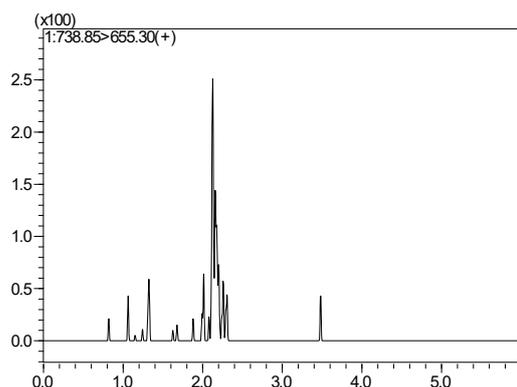


图 12. BNP 类似物残留考察

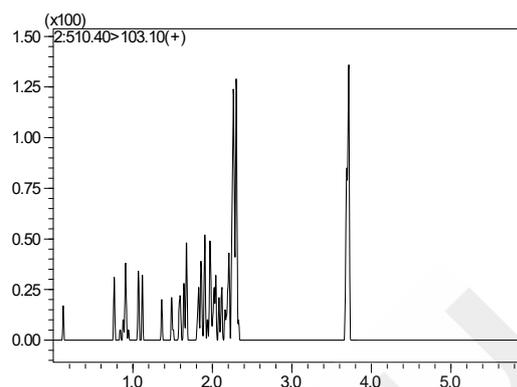


图 13. 奥曲肽残留考察

结果表明，在高浓度样品进样分析后分析空白样品，BNP 类似物和内标奥曲肽的通道中均无明显目标化合物干扰。

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定大鼠血浆中多肽类药物 BNP 类似物的方法。血浆样品经抗体沉淀处理，再经岛津 GL 离心固相萃取小柱 Mono Spin C18 进行离心固相萃取，可在 6.0 min 内快速、准确地测定其中的 BNP 类似物。该方法采用奥曲肽作为内标定量，方法最低定量限 5 ng/mL，BNP 类似物线性范围为 5~2000 ng/mL，相关系数大于 0.997，线性良好。低、中、高浓度质控样品，每个浓度的样品平行处理 6 份，其精密度与准确度分别在 1.98~6.95% 与 87.1~112.7% 之间，方法精密度和准确度良好。不同浓度质控样品回收率在 93.3%~111.1% 之间，基质效应因子在 89.1%~98.9% 之间，内标归一化基质效应因子在 93.4%~103.7% 之间。空白大鼠血浆不干扰最低定量限的准确测定，目标物 BNP 类似物和内标奥曲肽之间无相互干扰，方法选择性良好。高浓度样品（2000 ng/mL）分析完成后进行空白样品分析，BNP 类似物和内标奥曲肽的通道中均没有明显的目标化合物干扰。该方法灵敏、稳定，可以用于血浆中新型多肽药物 BNP 类似物的定量测定。

3.2 抗体类药物

抗体药物，作为生物制药领域的一项重大创新，是借助淋巴细胞杂交瘤技术或尖端基因工程技术精心研制而成的治疗性生物制剂。在抗肿瘤治疗中，抗体药物发挥着举足轻重的作用。它们通过精确调控肿瘤发生与发展的核心信号通路，或激活机体自身的抗肿瘤免疫机制，实现了对肿瘤细胞的精准打击，从而彰显了非凡的治疗潜力。

当前，抗体药物的应用领域远不止于肿瘤领域，它们在自身免疫性疾病、心血管疾病、感染性疾病等多个治疗领域同样展现出了广阔的应用前景。据最新市场统计数据 displays，2024 年全球抗体药物市场总值已飙升至 2328 亿美元的历史新高。其中，诸如 Keytruda 等重磅抗体药物的销售额尤为瞩目，以 250.11 亿美元的骄人业绩稳居榜首，而 Humira、Dupixent、Stelara 和 Opdivo 等抗体药物亦纷纷跨越百亿美元大关，展现出强劲的市场竞争力。未来预测显示，至 2025 年，抗体药物在全球畅销药物榜单中仍将占据显著位置，其中 Keytruda 预计将以 309.9 亿美元的销售额蝉联冠军，进一步凸显了抗体药物在全球医药市场的领先地位。在中国市场，抗体药物同样呈现出蓬勃发展的态势。随着生物技术的持续革新及政策环境的不断优化，中国抗体药物市场规模预计将持续保持高速增长，为生物医药产业的蓬勃发展注入强劲动力。

然而，抗体药物的临床应用之路并非坦途。根据美国 FDA 的严格监管要求，对于人体使用的抗体药物，必须开展全面而深入的药代动力学研究，涵盖药物血浆浓度的动态监测、体内分布特征以及清除速率等关键参数。其中，生物基质中抗体药物的定量分析却是一项极具挑战性的技术难题。传统的 ELISA 试剂盒检测方法虽应用广泛，但其固有的开发周期长、准确性不足、假阳性风险高以及线性范围受限等缺陷，严重阻碍了其在抗体药物定量分析中的广泛应用及准确性提升。

为克服 ELISA 方法的局限性，液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS/MS) 凭借其卓越的灵敏度、高分辨率以及宽广的线性范围等优势，逐渐成为抗体药物定量分析领域的新型分析手段。LC-MS/MS 技术不仅能够精确测定生物样品中抗体药物的浓度，还能提供药物代谢产物的详细信息，为药物研发及临床决策提供科学依据。然而，LC-MS/MS 方法的前处理步骤相对复杂，易于引入误差，导致选择性和重现性面临挑战，从而在一定程度上限制了其普及应用。

为解决上述问题，岛津采用创新研发的纳米表面分子导向限制性酶解 (nSMOL) 技术，通过选择性酶解抗体药物的 Fab 区域，精确获取靶标抗体的特异性肽段，进而利用 LC-MS/MS 方法对特异性肽段进行高效检测，实现了对抗体药物的精确定量分析。nSMOL 技术不仅确保了靶标抗体特异性肽段的有效提取，还显著降低了样品的复杂性，有效提升了液质系统定量分析的选择性和重现性。

本章将探讨 nSMOL 技术结合岛津高灵敏度液质分析系统在多种抗体药物体内分析中的应用实例，旨在为科研人员提供宝贵的参考信息及实用指南，并推动 nSMOL 技术在抗体药物定量分析领域的广泛应用及深入发展，为生物医药产业的持续创新贡献力量。

突破传统方法，加快药物研发进程

抗体类药物分析：nSMOL 解决方案

抗体类药物的生物分析通常采用 ELISA/LBA 等传统生物学方法。该类经典方法虽然灵敏度较高，但定量线性范围窄、实验步骤繁琐，对于抗体药物偶联物(ADC)，双特异性抗体(Bi-Specific)等创新药物，难度大且过程复杂。岛津与日本国立癌症研究中心合作，开发出通过纳米表面定向酶解抗体类药物 Fab 区域的选择性酶解技术---nSMOL:nano-Surface and Molecular-Orientation Limited proteolysis。该技术成功实现了抗体类药物 Fab 区域的选择性酶解，能够有效获取抗体 CDR 区域的特征肽段，用于构建 MRM 特征离子对参数，从而有效降低了待测样品复杂性，克服了传统溶液全酶解技术中存在的酶解产物复杂、酶解效率低、酶解重现性差，内源性干扰严重等问题，结合 LC-MS/MS 超快速三重四极杆质谱系统 MRM 扫描模式，快速定量分析抗体类药物。

nSMOL 技术的组成见图一。第一部份为含有固定化胰抗体酶的纳米颗粒，第二部份为含孔洞的树脂，树脂孔洞中结合有 Protein A。

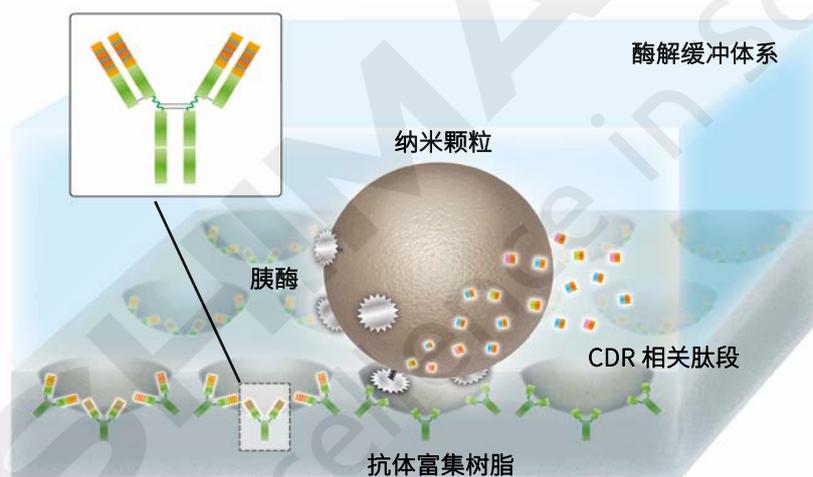


图 1. nSMOL 技术组成

nSMOL 实验流程见图二。其实验过程简述如下:样品与结合有 Protein G 的树脂混合，样品中的抗体被亲和富集。富集后的树脂与含固定化胰酶的纳米颗粒混合。由于纳米颗粒的直径于树脂孔径，所以纳米颗粒不能进入树脂孔洞。而其表面固化的胰抗体酶可以与树脂所富集抗体的 Fab 区域进行充分接触。因此，fab 区域，特别是 Fab 区域中的 CDR 相关特征肽段被选择性酶解下来，洗脱后进入 LC-MS/MS 超快速三重四极杆质谱仪进行 MRM 分析，快速确定目标抗体含量。

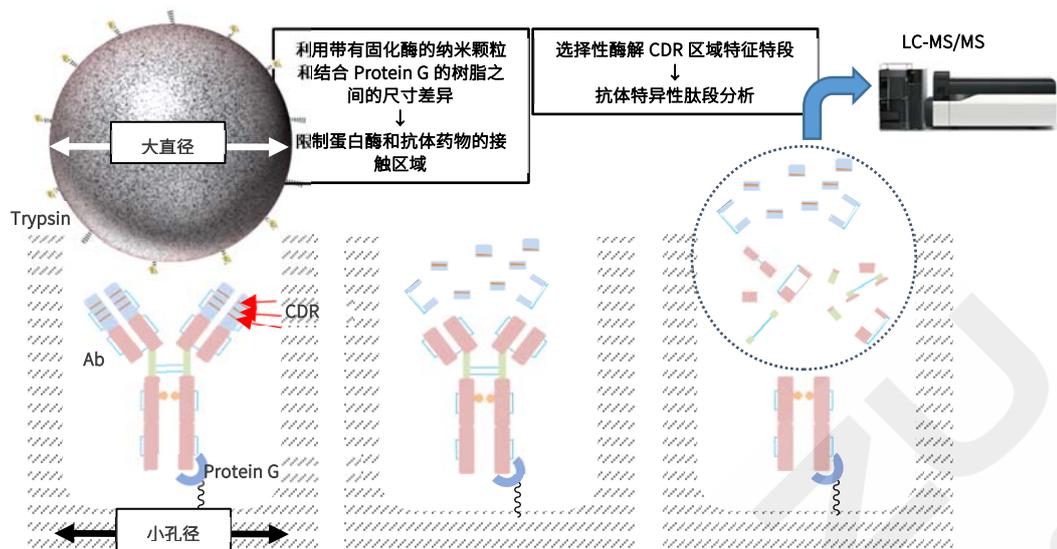


图 2. nSMOL 实验流程

nSMOL 技术在抗体药物研发的临床前阶段、毒理评价阶段、临床研究阶段以及治疗药物监测领域都有着较为广阔的应用前景，尤其对于生物类似药的研究，能够解决在 ELSA 试剂盒无法有效识别生物类似药，定量无有效试剂盒的时候，实现快速、高通量的定量分析。与传统抗体药物定量方法 EUSALBA 相比，nSMOL 技术结合超快速 LC-MS/MS 方法在复杂生物基质中抗体药物定量应用上具有通用性好、方法开发周期短、准确度高及线性范围宽等特点，是抗体类药物生物分析不可或缺的高效工具。

基于 nSMOL 技术和 Skyline 软件的曲妥珠单抗 LC-MS/MS 定量分析方法开发

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立曲妥珠单抗定量分析方法。通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出, LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法, 进行肽段筛选、碰撞能量优化, 最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法, 本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 IYPTNGYTR (542.80>404.70), 线性范围为 0.122 µg/mL~125 µg/mL。

关键词: 三重四极杆质谱 Skyline 曲妥珠单抗 定量分析

曲妥珠单抗是一种抗 Her2 的重组 DNA 衍生的人源化抗体类, 它通过将自己附着在 Her2 上来阻止人体表皮生长因子在 Her2 上的附着, 从而阻断癌细胞的生长, 曲妥珠单抗还可以刺激身体自身的免疫细胞去摧毁癌细胞。随着曲妥珠单抗在临床的广泛应用, 对该药物在人体血浆中定量检测的精密度和准确度要求也日益提高。

随着液相色谱和质谱技术以及生物样品分离技术的发展, LC-MS/MS 定量技术在抗体定量研究中的应用日益广泛。相对于传统的免疫分析方法 (例如 ELISA), LC-MS/MS 定量技术提高了抗体分析的精密度和准确度。基于质谱法的抗体定量在抗体药物临床前及临床研究中受到越来越多的关注, 为了使抗体定量技术与药物研究和临床检验更加紧密结合, 岛津将其超快速液相色谱-质谱联用平台和强大的定量抗体组学软件 Skyline 集成一体。根据抗体序列和用户自定义, Skyline 软件可以用来设计、改善以及优化选择反应监测 (SRM)/多反应监测 (MRM)、全扫描质谱和串联质谱定量法。Skyline 软件不仅将结果和方法优化结合起来, 也为抗体定量研究工作提供了标准化的工作流程。同时岛津研发工程师们为简化复杂生物基质中抗体药物的定量分析工作, 对抗体药物前处理过程进行了独特的设计, 发明了 nSMOL 前处理试剂包, 该方法能够有效富集血浆/血清中的抗体药物, 实现 Fab 区域的选择性酶解, 提高酶解效率, 极大降低了酶解产物的复杂性, 对于复杂生物基质中抗体药物的准确定量提供了非常有利的工具。

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统, 通过 Skyline 设计完成 MRM 通道的优化, 实现抗体药物定量及定性肽段的初步筛选, 进一步通过血浆样品的分析, 挑选特异性的定量和定性肽段, 完成 LCMS 方法结合 nSMOL 前处理技术定量分析血浆中曲妥珠单抗的方法开发工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC

柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站, Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

方法开发色谱柱 : Waters BEH Peptide C18 (2.0 mm I.D.× 150 mm L., 1.7 μm)
 定量分析色谱柱 : Inertsil Sustain Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 μm)
 流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-0.1%甲酸乙腈
 流 速 : 0.4 mL/min
 柱 温 : 40°C
 进 样 量 : 10 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%;
 (肽段筛选) 洗脱程序: 0.0-3.0 min, 5%; 3.0-35.0 min, 5%~40%; 35.0-37.5 min, 40%~95%; 37.5~45.0 min, 95%; 45.5-50.0 min, 5%;
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%;
 (定量分析) 洗脱程序: 0.00-1.50 min, 1%; 1.50-5.00 min, 1%~30%; 5.02-5.83 min, 95%; 5.85~7.00 min, 1%; 0-5.01 min, 0.4 mL/min; 5.03-6.20, 1 mL/min; 6.20-7.00 min, 0.4 mL/min。

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 电 压 : 1.0 kV
 雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 300°C
 干 燥 气 : 氮气 5.0 L/min D L 温 度 : 250°C
 加 热 气 : 空气 15.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
 扫 描 模 式 : MRM, 参数见表 2

1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建:

10 μg/mL 曲妥珠单抗标准品, 按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行曲妥珠单抗酶解, 获得的酶解混合物直接上机分析。

血浆中曲妥珠单抗的定量分析:

配制曲妥珠单抗血浆基质校准曲线: 浓度分别为 0.122、0.244、0.488、0.975、1.95、3.90、7.80、15.6、31.3、62.5、125 μg/mL, 按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理, 获得的酶解混合物直接上机分析。

表 1. MRM 参数 (曲妥珠单抗定量分析方法)

肽段选择	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	肽段作用
	415.70→660.30*	-16.0	-15.0	-34.0	
GLEWWAR	415.70→531.30	-16.0	-16.0	-40.0	定性肽段
	415.70→345.20	-16.0	-20.0	-24.0	
FTISADTSK	485.15→721.30*	-19.0	-18.0	-38.0	定性肽段
	485.15→608.30	-19.0	-20.0	-32.0	

	485.15→521.20	-19.0	-21.0	-26.0	
	542.80→404.70*	-20.0	-18.0	-30.0	
IYPTNGYTR	542.80→808.40	-20.0	-18.0	-28.0	定量肽段
	542.80→610.30	-20.0	-25.0	-22.0	
	512.10→292.30*	-38.0	-20.0	-20.0	
	512.10→389.30	-38.0	-16.0	-28.0	
P14R (IS)	512.10→757.50	-38.0	-19.0	-38.0	内标
	512.10→660.40	-38.0	-17.0	-24.0	
	512.10→563.30	-38.0	-17.0	-40.0	

注：*表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 曲妥珠单抗特征肽段的筛选

利用 Skyline 软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程如图 1 所示。将 Skyline 软件预测的曲妥珠单抗的离子对列表直接导入到 LabSolutions 中建立完整的 LC-MS/MS 方法（图 2），利用该方法分析检测曲妥珠单抗酶解产物（见图 3），然后将分析结果导入 Skyline 软件，排查色谱峰，删除未检出肽段，结果如图 4 所示。

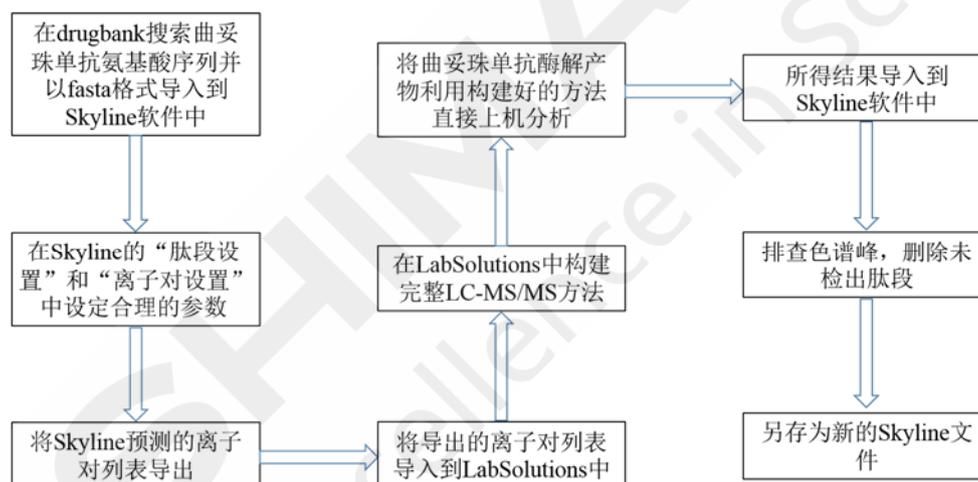


图 1. Skyline 软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程

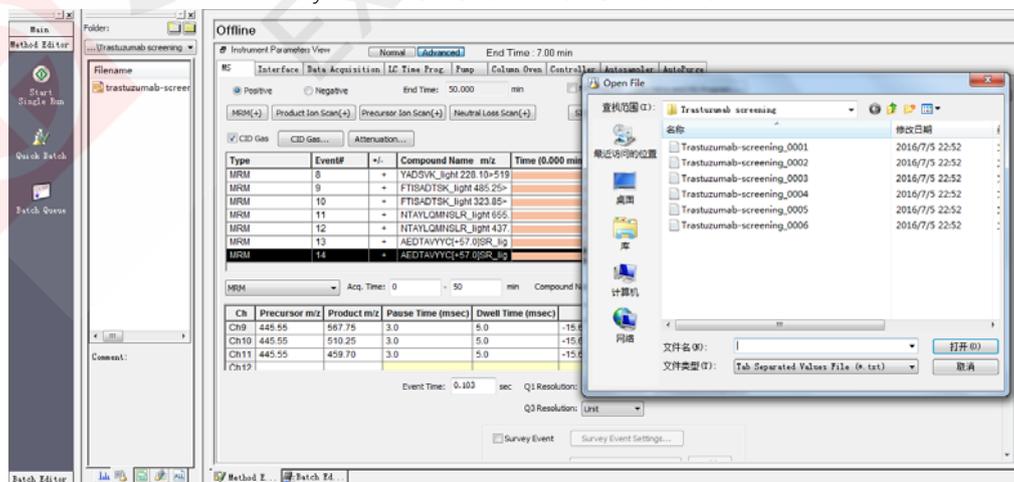


图 2. 将 Skyline 预测的离子对列表信息导入 LabSolutions 构建完整的 LC-MS/MS 方法

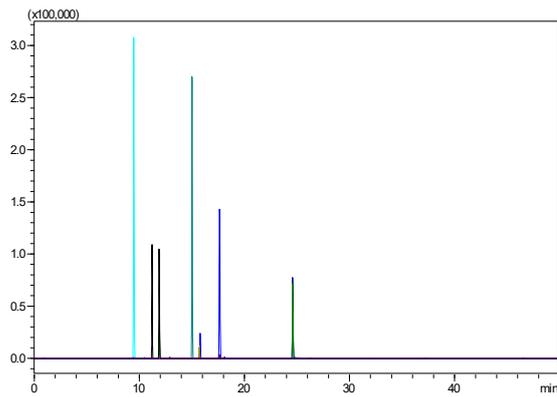


图 3. 肽段筛选获得的 MRM 色谱图

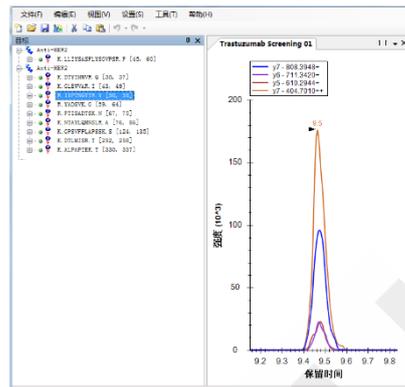


图 4. 筛选结果导入 Skyline 文件后的检出肽段确认

2.2 碰撞能量优化

将 Skyline 软件中的导出参数设置为“预定模式”、“碰撞能量优化”，导出 MRM 离子对列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对已筛选的 10 个肽段的 MRM 通道进行碰撞能量优化，LCMS-8060 能够实现 Dwell time 最小 0.8 ms，Pause time 最小 1.0 ms 的设置，极大地提高了 MRM 通道的单次分析通量，曲妥珠单抗的 10 个肽段 MRM 通道碰撞能量同步进行优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认，碰撞能量优化过程重复 1 次，不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好（见图 5），最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 离子对列表（见表 2）。表 2 中所涉及到曲妥珠单抗相关肽段中与 Fab 区域相关的特征肽段包括 LLIYSASFLYSGVPSR、DTYIHWVR、IYPTNGYTR、GLEWVAR、YADSVK、FTISADTSK、NTAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK；与 Fc 区域相关的特征肽段包括 DTLMISR、ALPAPIEK。根据抗体药物的结构特点，绝大多数抗体药物的保守区域氨基酸序列差异较小，可变区域的氨基酸序列具有较大差异。在 LCMS 定量分析目标抗体方法开发的过程中，主要工作即是挑选出目标抗体的特异性肽段，该实验利用 nSMOL 技术处理样品，该技术利用纳米颗粒表面固定化胰酶技术实现抗体药物的 Fab 区域的选择性酶解，所筛选出的 10 个肽段中有 8 个位于 Fab 区域，从而极大地降低了酶解产物的复杂性，大大缩小了目标肽段的筛选范围，充分体现了 nSMOL 技术的高选择性。因此利用 nSMOL 前处理可以简化 LCMS 方法开发阶段的筛选过程，提高方法开发的速度。

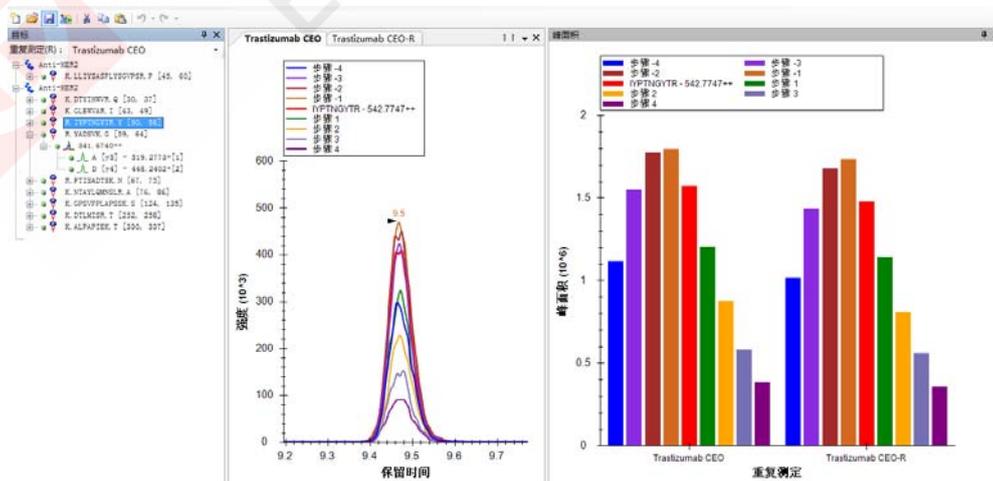


图 5. Skyline 软件进行碰撞能量优化结果查看

表 2. MRM 参数 (Skyline 筛选最佳碰撞能量肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
LLIYSASFLYSGVPSR	886.98	1270.64 [y12+]	-33.0	VL/CDR2
	[M+2H] ²⁺	359.20 [y3+]	-27.0	
	591.66	765.39 [y7+]	-19.1	
	[M+3H] ³⁺	602.32 [y6+]	-21.1	
DTYIHWVR		359.20 [y3+]	-15.1	VH/CDR1
		597.32 [y4+]	-18.6	
	363.85	460.27 [y3+]	-14.6	
	[M+3H] ³⁺	487.76 [y7++]	-14.6	
GLEWVAR		437.24 [y6++]	-10.6	VH/CDR2
	415.73	660.35 [y5+]	-16.1	
	[M+2H] ²⁺	531.30 [y4+]	-16.1	
		808.39 [y7+]	-19.2	
IYPTNGYTR	542.77	711.34 [y6+]	-27.2	VH/CDR2
	[M+2H] ²⁺	610.29 [y5+]	-25.2	
		404.70 [y7++]	-17.2	
		519.28 [y5+]	-15.2	
YADSVK	341.67	448.24 [y4+]	-13.2	VH/Fab
	[M+3H] ²⁺			
FTISADTSK	485.25	721.37 [y7+]	-14.9	VH/Fab
	[M+2H] ²⁺	608.29 [y6+]	-18.9	
		521.26 [y5+]	-18.9	
NTAYLQMNSLR	655.83	1024.52 [y8+]	-23.7	VH/Fab
	[M+2H] ²⁺	861.46 [y7+]	-25.7	
		748.38 [y6+]	-23.7	
GPSVFPLAPSSK	593.83	846.47 [y8+]	-19.2	CH1/Fab
	[M+2H] ²⁺	699.40 [y7+]	-21.2	
		418.23 [y4+]	-29.2	
DTLMISR	418.22	619.36 [y5+]	-16.2	CH2/Fc
	[M+2H] ²⁺	506.27 [y4+]	-16.2	
ALPAPIEK	419.75	654.38 [y6+]	-14.3	CH2/Fc
	[M+2H] ²⁺	486.29 [y4+]	-20.3	
		327.69 [y6++]	-14.3	

2.3 血浆中曲妥珠单抗定量分析结果

利用 Skyline 软件导出含最佳碰撞能量的 MRM 列表, 构建 LC-MS/MS 方法, 根据抗体定量特异性原则选择 CDR 区域的 GLEWVAR、FTISADTSK、IYPTNGYTR 作为特征肽段进行定量分析, 定量分析的典型色谱图如图 6 所示, 在 0.122~125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 IYPTNGYTR 具有良好的线性关系, 校准曲线见图 7。实验结果证明通过 Skyline 筛选出的特征肽段在生物基质中满足特异性要求, 其中 IYPTNGYTR 灵敏度较高, 作为定量肽段; GLEWVAR 和 FTISADTSK 具有较好的选择性, 可作为定性肽段进行分析。

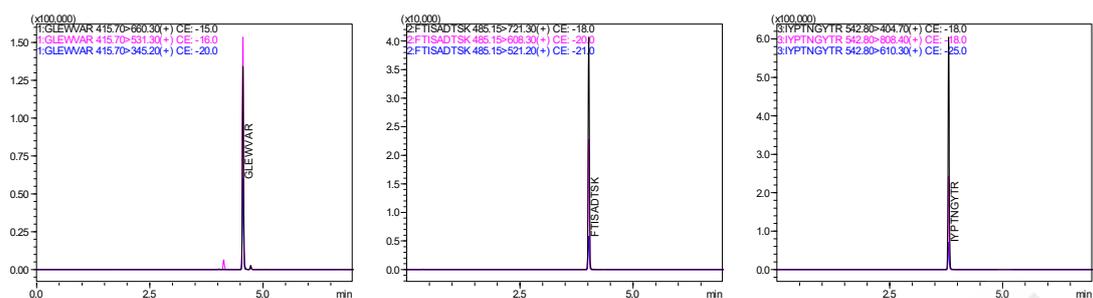


图 6. 血浆中曲妥珠单抗 nSMOL 前处理后 LC-MS/MS 分析获得的典型色谱图

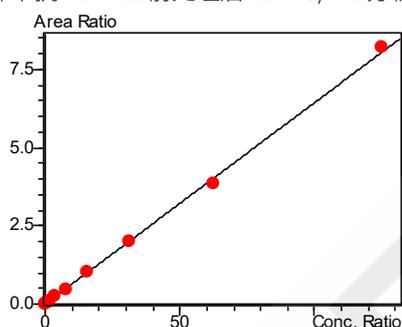


图 7. 曲妥珠单抗定量检测的校准曲线 (IYPTNGYTR (542.80>404.70))

表 3. 校准曲线的线性方程和相关系数

药物名称	肽段信息	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r	准确度 (%)
曲妥珠单抗	IYPTNGYTR (定量)	$Y=(0.0644864)X+(-0.00317900)$	0.122~125	0.9995	91.5~114.0

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立血浆中曲妥珠单抗定量分析的工作流程。结合 nSMOL 前处理技术，实现抗体药物 Fab 区域选择性酶解，从而显著降低了方法开发的复杂程度。在本实验筛选阶段，共有 10 个肽段具有明显的色谱峰，其中 8 条肽段与曲妥珠单抗的 Fab 区域相关，而曲妥珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域，充分体现了 nSMOL 技术的高选择性，从而极大地降低了酶解产物的复杂性，提高方法开发的速度。实验通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出，LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法，进行肽段筛选、碰撞能量优化，最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法，本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发，定量特征肽段为 IYPTNGYTR (542.80>404.70)，线性范围为 0.122 $\mu\text{g/mL}$ ~125 $\mu\text{g/mL}$ 。

UHPLC-MS/MS 联用 Skyline 软件开展贝伐珠单抗定量方法开发

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立贝伐珠单抗定量分析方法。通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出, LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法, 进行肽段筛选、碰撞能量优化, 最终确认贝伐珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法, 本文完成血浆中贝伐珠单抗药物的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 FTFSLDTSK (523.30>797.40), 线性范围为 0.146~300 µg/mL。

关键词: 三重四极杆质谱 Skyline 贝伐珠单抗 定量分析

基于质谱法的抗体定量在抗体药物临床前及临床研究中受到越来越多的关注。为了使抗体定量技术在药物研究和临床检验更加紧密结合, 岛津将其超快速液相色谱-质谱联用平台和强大的 Skyline 定量抗体组学软件集成一体。根据抗体序列和用户自定义, Skyline 软件可以用来设计、改善以及优化多反应监测(MRM), 全扫描质谱和串联质谱定量法。Skyline 软件不仅将结果和方法优化结合起来, 也为抗体定量量的研究工作提供了标准化的工作流程。同时岛津研发工程师们为简化复杂生物基质中抗体药物的定量分析工作, 对抗体药物前处理过程进行了独特的设计, 提出了 nSMOL 前处理试剂包, 该方法能够有效富集血浆/血清中的抗体药物, 实现 Fab 区域的选择性酶解, 提高酶解效率, 极大降低了酶解产物的复杂性, 对于复杂生物基质中抗体药物的准确定量提供了非常有利的工具。

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统, 通过 Skyline 设计, 完成 MRM 通道的优化, 完成抗体药物定量及定性肽段的初步筛选, 进一步通过血浆样品的分析, 筛选特异性的定量和定性肽段, 完成 LCMS 方法结合 nSMOL 前处理技术定量分析血浆中贝伐珠单抗的方法开发工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站, Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

- 方法开发色谱柱 : Waters BEH Peptide C18 (2.0 mm I.D.× 150 mm L., 1.7 µm)
- 定量分析色谱柱 : Inertsil Sustain Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 µm)
- 流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-0.1%甲酸乙腈

流速 : 0.4 mL/min
 柱温 : 40°C
 进样量 : 10 µL
 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%;
 (肽段筛选) 洗脱程序: 0.0-3.0 min, 5%; 3.0-35.0 min, 5%~40%; 35.0-37.5 min, 40%~95%; 37.5~45.0 min, 95%; 45.5-50.0 min, 5%;
 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%;
 (定量分析) 洗脱程序: 0.00-1.50 min, 1%; 1.50-5.00 min, 1%~30%; 5.02-5.83 min, 95%; 5.85~7.00 min, 1%; 0-5.01 min, 0.4 mL/min; 5.03-6.20, 1 mL/min; 6.20-7.00 min, 0.4 mL/min。

质谱条件

离子源 : ESI (+) 接口电压 : 1.0 kV
 雾化气 : 氮气 3.0 L/min 接口温度 : 300°C
 干燥气 : 氮气 5.0 L/min D L 温度 : 250°C
 加热气 : 空气 15.0 L/min 加热块温度 : 400°C
 扫描模式 : MRM, 参数见表 1

1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建

10 µg/mL 贝伐珠单抗标准品, 按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行贝伐珠单抗酶解, 获得的酶解混合物直接上机分析。

血浆中贝伐珠单抗的定量分析

配制贝伐单抗血浆基质校准曲线: 浓度分别为 0.146、0.293、0.586、1.17、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75、150、300 µg/mL, 按照 nSMOL 试剂盒进行样品前处理, 获得的酶解混合物直接上机分析。

表 1. MRM 参数 (贝伐珠单抗定量分析方法)

选择的肽段	区域	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
FTFSLDTSK	重链 CDR2	523.30([M+2H] ²⁺)→797.40(y7 ⁺)	-38.0	-18.0	-34.0
		523.30([M+2H] ²⁺)→898.50(y8 ⁺)	-38.0	-20.0	-30.0
		523.30([M+2H] ²⁺)→650.30(y6 ⁺)	-38.0	-19.0	-34.0
VLIYFTSSLHSGVPSR	轻链 CDR2	588.30([M+3H] ³⁺)→775.90(y14 ⁺) [*]	-22.0	-17.0	-28.0
		588.30([M+3H] ³⁺)→939.50(y9 ⁺)	-22.0	-27.0	-28.0
		588.30([M+3H] ³⁺)→602.30(y6 ⁺)	-22.0	-28.0	-22.0
STAYLQMNLSLR	重链 CH1	642.30([M+2H] ²⁺)→861.50(y7 ⁺)	-24.0	-25.0	-20.0
		642.30([M+2H] ²⁺)→748.40(y6 ⁺) [*]	-24.0	-22.0	-28.0
		642.30([M+2H] ²⁺)→620.30(y5 ⁺)	-24.0	-24.0	-32.0
P14R (IS)	-	512.10([M+3H] ³⁺)→292.30(b3 ⁺) [*]	-38.0	-20.0	-20.0
		512.10([M+3H] ³⁺)→389.30(b4 ⁺)	-38.0	-16.0	-28.0
		512.10([M+3H] ³⁺)→660.40(b6 ⁺)	-38.0	-17.0	-24.0

注: *表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 贝伐珠单抗特征肽段的筛选

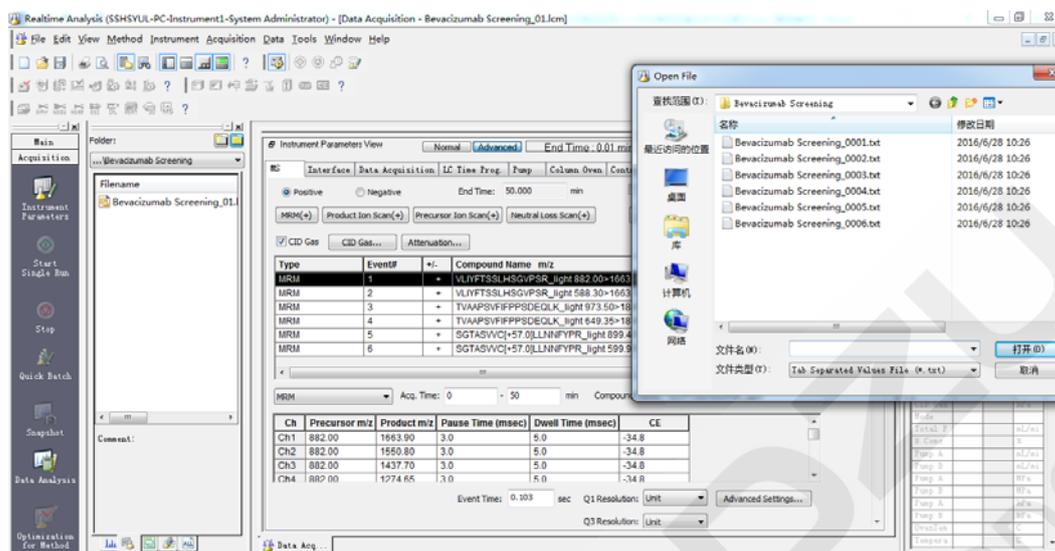


图 1. 利用 Skyline 导出的离子对列表信息构建 LC-MS/MS 肽段筛选方法

将数据库搜索获得的贝伐珠单抗 fasta 文件导入 Skyline 软件，构建合理的肽段设置和离子对设置的条件，根据设定导出贝伐珠单抗肽段的 MRM 方法，在 LabSolutions 软件中构建贝伐珠单抗肽段筛选的 LC-MS/MS 方法，过程见图 1，并且贝伐珠单抗酶解产物进行上机分析，分析结果见图 2，所得结果导入 Skyline 软件，如图 3 所示。逐一查看检测出的色谱峰，对未检出的肽段信息进行删除。所筛选出的肽段及 MRM 列表内容保存为新的 Skyline 文件。

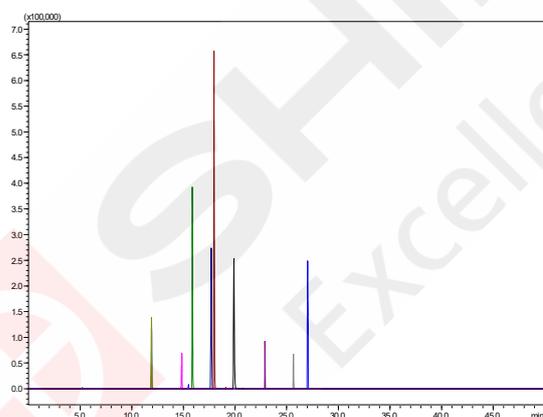


图 2. 肽段筛选获得的 MRM 色谱图

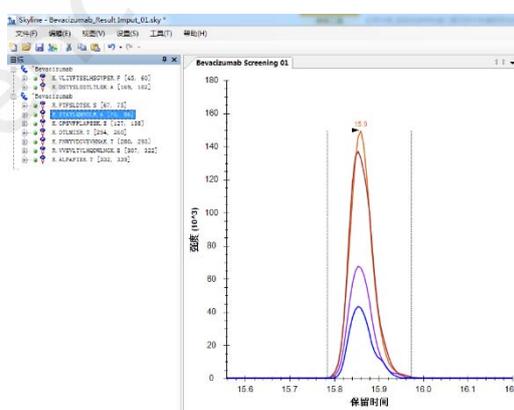


图 3. 筛选结果导入 Skyline 文件后的检出肽段确认

2.2 碰撞能量优化

Skyline 软件采用“预定模式”、“碰撞能量优化”导出 MRM 列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对 10 个肽段 MRM 通道进行碰撞能量优化。LCMS-8060 能够实现 Dwell time 最小 0.8 ms，Pause time 最小 1.0 ms 的设置，极大地提高了 MRM 通道的单次分析通量，因此可以实现贝伐珠单抗的 10 个肽段 MRM 通道碰撞能量同步进行优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认后见图 4，碰撞能量优化过程重复 1 次，图中可见不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好，最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 列表见表 2。表 2 中所涉

及到贝伐珠单抗相关肽段与 Fab 区域相关的特征肽段包括 STAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK、FTFSLDTSK、VLIYFTSSLHSGVPSR; 与 Fc 区域相关的特征肽段包括 ALPAPIEK、DTLMISR、DSTYLSSTLTLSK、FNWYVDGVEVHNAK、WSVLTVLHQDWLNGK。本方法因为选择 nSMOL 作为前处理方法, 该方法利用纳米颗粒表面固定化胰酶技术实现抗体药物 Fab 区域的选择性酶解, 从而大大缩小了目标肽段的筛选范围。根据抗体药物的结构特点, 绝大多数抗体药物的保守区域氨基酸序列差异较小, 可变区域的氨基酸序列具有较大差异。在 LCMS 定量分析目标抗体方法开发的过程中, 主要工作即是挑选出目标抗体的特异性肽段。所以 nSMOL 前处理方法极大地降低了酶解产物的复杂性, 在本实验中筛选阶段, 共有 9 个肽段具有明显的色谱峰, 其中 4 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关, 而贝伐珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域。因此利用 nSMOL 前处理可以简化 LCMS 方法开发阶段的筛选过程, 提高方法开发的速度。

表 2. MRM 参数 (Skyline 筛选肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
STAYLQMNSLR	642.30 [M+2H] ²⁺	1095.55 [y9]	-25.2	CH ₂ /Fab
		620.30 [y5]	-24.2	
		861.45 [y7]	-23.2	
		748.40 [y6]	-23.2	
GPSVFPLAPSSK	593.85 [M+2H] ²⁺	846.45 [y8]	-19.2	CH ₂ /Fab
		699.40 [y7]	-21.2	
		418.25 [y4]	-29.2	
FTFSLDTSK	523.25 [M+2H] ²⁺	898.45 [y8]	-20.4	VH/Fab
		797.40 [y7]	-18.4	
		650.35 [y6]	-18.4	
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.30 [M+3H] ³⁺	563.30 [y5]	-20.4	VL/CDR ₂
		939.50 [y9]	-26.9	
		602.35 [y8]	-27.9	
WSVLTVLHQDWLNGK	603.35 [M+3H] ³⁺	775.90 [y7]	-16.9	CH ₂ /Fc
		719.35 [y6]	-16.9	
		805.45 [y14]	-17.5	
ALPAPIEK	419.75 [M+2H] ²⁺	712.40 [y12]	-19.5	CH ₂ /Fc
		654.38 [y6]	-14.3	
DTLMISR	418.20 [M+2H] ²⁺	486.29 [y4]	-20.3	CH ₂ /Fc
		327.69 [y6]	-12.3	
DSTYLSSTLTLSK	501.60 [M+3H] ³⁺	619.35 [y5]	-16.2	CH ₂ /Fc
		506.30 [y4]	-16.2	
		694.35 [y13]	-13.7	
FNWYVDGVEVHNAK	839.40 [M+2H] ²⁺	600.35 [y11]	-25.7	CH ₂ /Fc
		518.80 [y10]	-19.7	
FNWYVDGVEVHNAK	839.40 [M+2H] ²⁺	1416.70 [y12]	-37.1	CH ₂ /Fc
		1230.60 [y11]	-35.1	
		853.45 [y8]	-37.1	

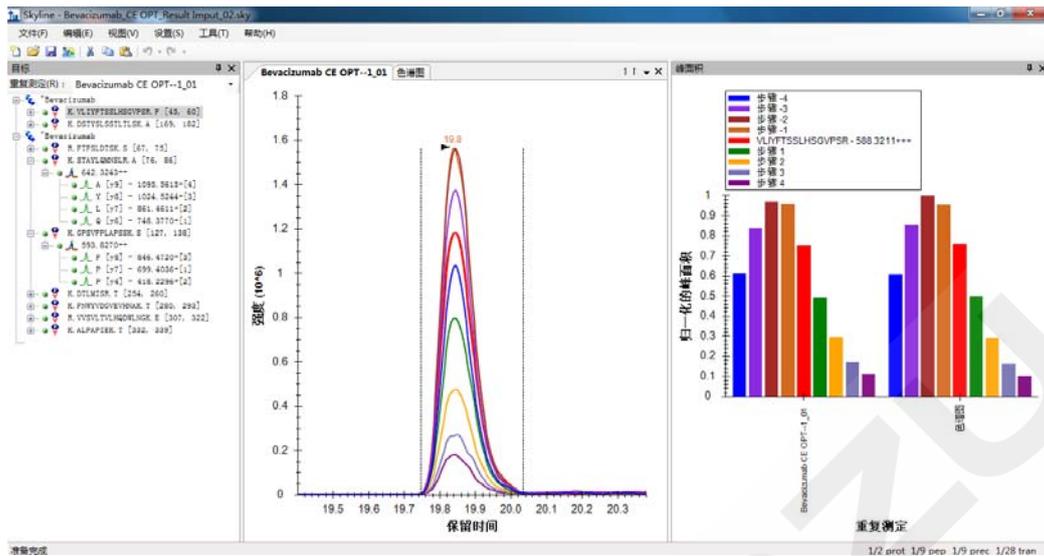


图 4. Skyline 软件进行碰撞能量优化结果查看

2.3 血浆中贝伐珠单抗定量分析结果

利用 Skyline 软件导出的含最佳碰撞能量的 MRM 列表，构建 LC-MS/MS 方法，根据抗体定量特异性原则进一步优化挑选出的肽段，最终选择 STAYLQMNSLR、FTFSLDTSK、VLIYFTSSLHSGVPSR 作为特征肽段进行定量分析。血浆中贝伐珠单抗通过 nSMOL 试剂盒的选择性酶解，获得以上特征肽段，典型色谱图如图 5 所示。在 0.146~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 STAYLQMNSLR 具有良好的线性关系，校准曲线见图 6a；0.146~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 FTFSLDTSK 具有良好的线性关系，校准曲线见图 6b，并且该肽段的灵敏度显著高于 STAYLQMNSLR；由于肽段 VLIYFTSSLHSGVPSR 存在空白血浆基质中的干扰，所以在 0.586~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 VLIYFTSSLHSGVPSR 具有良好的线性关系，校准曲线见图 6c，校准曲线详细信息见表 3。以上实验结果证明通过 Skyline 筛选出的特征肽段在生物基质中满足特异性要求，其中 FTFSLDTSK 灵敏度较高且选择性好，故可作为定量肽段；STAYLQMNSLR 和 VLIYFTSSLHSGVPSR 可作为定性肽段。

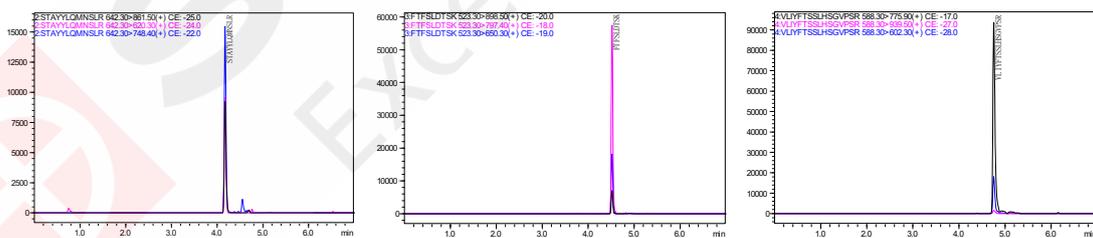


图 5. 血浆中贝伐珠单抗 nSMOL 前处理后 LCMS 分析获得的典型色谱图

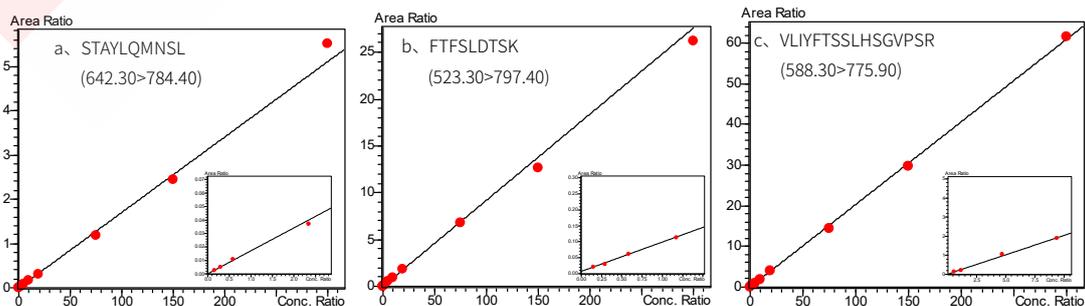


图 6. 血浆中贝伐珠单抗检测校准曲线信息

表 3. 校准曲线的线性方程和相关系数

抗体药物名称	肽段信息	校准曲线	线性范围 (µg/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
	STAYLQMNSLR (定性)	$Y = (0.0279439)X + (-0.000943832)$	0.146~300	0.9962	87.0~117.0
贝伐珠单抗	FTFSLDTSK (定量)	$Y = (0.0918856)X + (0.00746157)$	0.146~300	0.9961	86.3~112.6
	VLIYFTSSLHSGVPSR (定性)	$Y = (0.205532)X + (0.00952713)$	0.586~300	0.9970	89.0~110.5

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用并结合 Skyline 软件建立血浆中贝伐珠单抗定量分析的工作流程。结合 nSMOL 前处理技术, 实现抗体药物 Fab 区域选择性酶解, 从而显著降低了方法开发的复杂程度。在本实验中筛选阶段, 共有 9 个肽段具有明显的色谱峰, 其中 4 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关, 而贝伐珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域。实验通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出, LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法, 进行肽段筛选、碰撞能量优化, 最终确认贝伐珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法, 本文完成血浆中贝伐珠单抗药物的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 FTFSLDTSK (523.30>797.40), 线性范围为 0.146 µg/mL~300 µg/mL。

nSMOL 技术结合 UHPLC-MSMS 定量分析血浆中单抗类药物英利昔

摘要: 本文建立了一种使用 nSMOL 技术结合岛津 LCMS-8060 测定复杂生物基质中单抗类药物英利昔的定量方法。以英利昔的特征肽段 SINSATHYAESVK 作为定量肽段；STAYLQMNSLR 和 VLIYFTSSLHSGVPSR 作为定性肽段。方法特异性考察结果表明所选择的三个特征肽段均具有良好的选择性。在 0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 SINSATHYAESVK 具有良好的线性关系，相关系数 0.9960，方法定量限为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，6 次重复分析 RSD 为 6.40%。另外，三个浓度水平质控样品的精密度和准确度结果均满足方法验证的要求。利用 nSMOL 前处理试剂盒能够实现单抗药物 Fab 区域的选择性酶解，极大降低了酶解产物的复杂性，本方法无需经过固相萃取净化过程，即可采用 LC-MS/MS 方法在 7 分钟内完成样品分析，具有分析速度快、通用性好的优势。

关键词: nSMOL 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 单抗类药物 英利昔

英利昔单抗是一种人-鼠嵌合型抗体类，可以抑制肿瘤坏死因子 TNF- α 和可溶性受体及膜型受体的结合，使 TNF- α 失去活性，临床可用于治疗 TNF- α 参与的多种疾病，目前被广泛应用于风湿、类风湿性关节炎和强直性脊柱炎等自身免疫性疾病。英利昔单抗是强生旗下抗风湿类的重磅药物，商品名为“Remicade”，属于已上市单抗药物中销售额排名前 5 位的品种。近年来英利昔单抗相关生物类似药的研究如火如荼，不仅需要关注抗体药物药学性质，单抗药代/药动相关研究也具有重要意义，其中复杂生物基质中抗体药物的定量分析发挥重要作用。

在体内抗体药物定量研究中，配体结合实验（LBA）是最为传统和广泛使用的方法。但是 LBA 方法需要针对抗体药物开发特异性抗原，方法开发周期非常漫长，方法可移植性差，不同抗体或结构类似的抗体均需要重新进行方法开发。

基于质谱法的抗体定量因其方法开发过程简便周期短且方法通用性好，在抗体药物临床前及临床研究中受到越来越多的关注。在 LC-MS/MS 法分析生物样品中单抗药物浓度的方法开发过程中，首先需要挑选出抗体药物的特征性肽段，通过特征肽段的浓度分析来表征整体抗体药物的含量。受生物基质复杂性的影响，样品需要经过胰酶酶解、净化等过程再进行上机分析。为简化复杂生物基质中抗体药物的定量分析工作，岛津的研发团队利用抗体药物的特殊结构对前处理过程进行了独特的设计，提出了 nSMOL 前处理试剂盒，该方法能够有效富集血浆/血清中的抗体药物，实现 Fab 区域的选择性酶解，提高酶解效率，同时极大降低了酶解产物的复杂性，对于复杂生物基质中抗体药物的准确定量提供了非常便利的工具。

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统，采用 nSMOL 作为前处理方法完成英利昔单抗富集和选择性酶解，以特征肽段作为定量和定性的依据，完成血浆中英利昔单抗定量分析方法验证。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表 1. 化合物信息

名称	英文名	CAS No.	分子式	平均分子量
英利昔单抗	Infliximab	170277-31-3	C ₆₄₂₈ H ₉₉₁₂ N ₁₆₉₄ O ₁₉₈₇ S ₄₆	144190.3 Da

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Inertsil Sustain Swift C18 Column
(2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 μm)
流 动 相 : A 相-0.1% 甲酸水溶液; B 相-0.1% 甲酸乙腈
流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 40°C
进 样 体 积 : 20 μL
自动进样器温度 : 5°C
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 项初始浓度为 1%, 具体见表 2
: Rinse Pump>Rinse Port
洗 针 方 式 Rinse Pump 洗针液为乙腈/异丙醇/甲醇/水=25: 25: 25: 25 (v/v/v/v) ;
Rinse Port 洗针液为 50% 甲醇

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	1
5.00	Pumps	Pump B Conc.	30
5.10	Pumps	Pump B Conc.	95
5.80	Pumps	Pump B Conc.	95
5.90	Pumps	Pump B Conc.	1
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 温 度 : 300°C
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min D L 温 度 : 200°C
干 燥 气 : 氮气 5.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
加 热 气 : 空气 15.0 L/min 扫 描 模 式 : MRM, 参 数 见 表 3

表 3. MRM 参数

肽段选择	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	肽段作用
SINSATHYAESVK	469.55 [M+3H] ³⁺	603.80 ⁺⁺ [y11]	-19.0	-15.0	-22.0	定量肽段
		546.75 ⁺⁺ [y10]	-19.0	-17.0	-20.0	
		503.25 ⁺⁺ [y9]	-19.0	-18.0	-26.0	
		467.75 ⁺⁺ [y8]	-19.0	-28.0	-26.0	
YASEMSGIPSR	642.80 [M+2H] ²⁺	359.20 ⁺ [y3]	-20.0	-21.0	-25.0	定性肽段
		616.35 ⁺ [y6]	-20.0	-25.0	-24.0	
		834.40 ⁺ [y8]	-20.0	-25.0	-32.0	
ASQFVGSSIHWWYQQR	598.65 [M+3H] ³⁺	529.30 ⁺ [y5]	-20.0	-25.0	-23.0	定性肽段
		631.30 ⁺⁺ [y10]	-20.0	-18.0	-24.0	
		459.20 ⁺⁺ [y6]	-20.0	-23.0	-20.0	
		680.85 ⁺⁺ [y11]	-20.0	-19.0	-26.0	
		780.40 ⁺ [y5]	-20.0	-27.0	-30.0	

注：*表示定量离子

1.4 样品前处理

配制英利昔单抗血浆基质校准曲线：浓度分别为 0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、20.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，质控样品：浓度分别为 0.06、4.00、40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，按照 nSMOL 试剂盒步骤进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 特征肽段确证及分析条件优化

基于之前的应用研究，利用 Skyline 软件构建 LC-MS/MS 方法，根据抗体定量特异性原则进一步优化挑选出质谱响应较高的肽段，最终选择 SINSATHYAESVK、YASEMSGIPSR、ASQFVGSSIHWWYQQR 作为特征肽段进行定量和定性分析，利用 LCMS-8060 的 MRM 自动优化功能对特征肽段对应的 MRM 通道进行进一步优化，获得最佳的 Q1 Bias、CE 和 Q3 Bias 值，结果见表 3。血浆中英利昔单抗通过 nSMOL 试剂盒的特异性酶解，获得以上特征肽段，典型色谱图如图 1 所示。通过优化分离条件和质谱条件，提高目标肽段的灵敏度，最终结果表明在 0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 SINSATHYAESVK 具有良好的线性关系，校准曲线见图 2a；0.10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 YASEMSGIPSR、ASQFVGSSIHWWYQQR 具有良好的线性关系，校准曲线见图 2b 和图 2c。以上实验结果证明通过 Skyline 筛选出英利昔相关特征肽段在生物基质中进一步验证满足特异性要求，其中 SINSATHYAESVK 灵敏度较高且选择性好，作为定量肽段；STAYLQMNSLR 和 VLIYFTSSLHSGVPSR 可作为定性肽段。

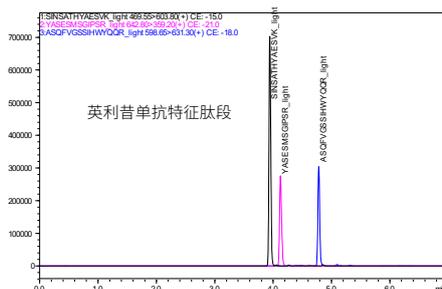


图 1. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血浆基质加标样品的英利昔单抗典型色谱图

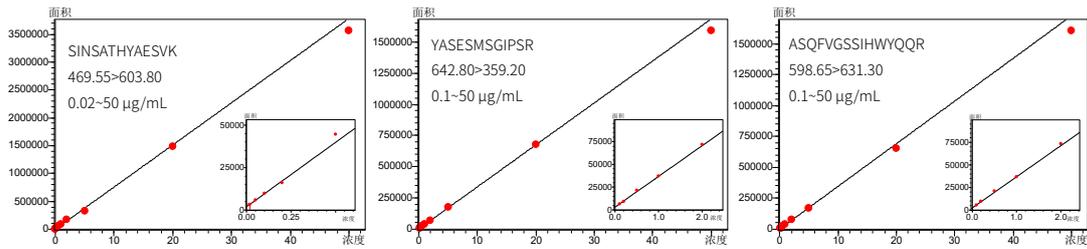


图 2. 英利昔单抗特征肽段相关校准曲线

2.2 方法选择性

考察空白血浆基质和 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 英利昔血浆基质加标样品, 结果如图 3、4 所示, 空白血浆中定量肽段 SINSATHYAESVK 的 MRM 通道 469.55>603.80 的干扰峰面积为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 英利昔血浆基质加标样品峰面积的 13.5%, 满足定量要求。

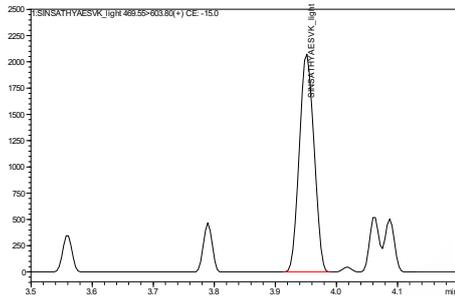


图 3. 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 英利昔血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

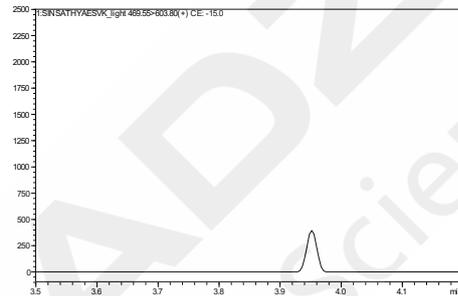


图 4. 空白血浆样品的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.3 所述制备浓度分别为 0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、20.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准样品, 和浓度分别为 0.06、4.00、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 的质控样品。按照 nSMOL 试剂盒的前处理条件处理样品, 采用 1.4 中的仪器条件进行测定, 外标法定量。线性方程及相关系数见表 4, 其中 y 值代表特征肽段定量 MRM 通道色谱峰面积, x 值代表血浆中英利昔浓度。方法定量限为 0.02 $\mu\text{g/mL}$, 在此浓度水平, 精密度和准确度均在接受标准内, 6 次重复测试 RSD 为 6.40%, 准确度为 80.9~114.6%, S/N 平均值为 156.7。

表 4. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 $1/C^2$)

特征肽段	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	相关系数 r
SINSATHYAESVK	$Y = (75575.8)X + (1976.67)$	0.02~50	86.2~114.1	0.9960
YASEMSGIPSR	$Y = (33624.7)X + (3243.93)$	0.10~50	90.1~109.0	0.9981
ASQFVGSSIHWYQQR	$Y = (34461.2)X + (2364.31)$	0.10~50	91.7~110.0	0.9982

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的精密度, 结果如表 5 所示。各浓度水平质控样品的精密度范围为 3.62~6.96%, 准确度范围为 86.1~114.0%。

表 5. 方法精密度和准确度结果 (n=6)

理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均测定浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	精密度 CV%	准确度范围%
0.06	0.062	6.96	86.7~114.0
4	3.75	4.52	86.1~97.5
40	42.6	3.62	100.8~107.9

2.5 Carryover 考察

考察系统残留的影响,完成浓度最高点分析后,其后分析空白溶剂中特征肽段的峰面积,色谱图见图 5,空白样品中特征肽段 SINSATHYAESVK、YASESMGIPSR 的通道中均没有明显的目标肽段色谱峰,ASQFVGSSIHWHYQQR 存在一定残留,残留色谱峰面积为最低浓度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血浆中英利昔单抗面积的 16.9%,因此分析方法所选 3 个目标肽段的残留量均满足样品分析要求。

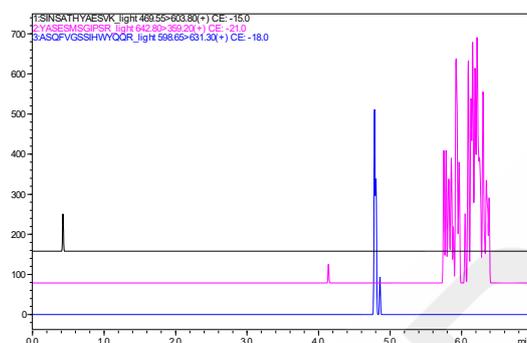


图 5. 高浓度样品后分析空白溶剂的 MRM 色谱图

3. 结论

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统,采用 nSMOL 作为前处理方法完成单抗药物英利昔富集和选择性酶解,以特征肽段 SINSATHYAESVK 作为定量肽段;STAYLQMNSLR 和 VLIYFTSSLHSGVPSR 作为定性肽段。方法特异性考察结果表明空白血浆中定量肽段 SINSATHYAESVK 的 MRM 通道 469.55>603.80 存在干扰峰面积为定量限色谱峰面积的 13.5%,满足定量要求。在 0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 SINSATHYAESVK 具有良好的线性关系,相关系数 0.9960,各浓度准确度范围 86.2~114.1%。方法定量限为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$,6 次重复分析 RSD 为 6.40%,准确度范围为 80.9~114.6%。三个浓度水平质控样品的精密度范围为 3.62~6.96%,准确度范围为 86.1~114.0%。高浓度样品分析后考察空白样品中的残留,结果表明在 0.02~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内目标肽段残留量满足要求。本方法利用 nSMOL 前处理试剂盒的优势,采用 LC-MS/MS 技术实现复杂生物基质中单抗药物的准确定量分析,具有良好的通用性,可以用于英利昔单抗及其生物类似药的药代/药动学研究。

nSMOL 技术应用于血浆中阿达木单抗药物的定量检测

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 结合 Skyline 软件, 建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法。结果表明, 浓度为 0.1~20 $\mu\text{g/mL}$ (0.675 nmol/L~135 nmol/L) 范围内的校准曲线相关系数良好 ($R=0.9982$), 标线各点的准确度范围在 94.2~110.0%之间。各浓度样品 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的批内精密度和批间精密密度分别为 1.2~5.9%和 5.7~8.3%, 准确度范围为 88.5~114.2%。此方法快速、特异性好和灵敏度高, 可作为阿达木单抗临床治疗药物监测的检测方法。

关键词: nSMOL 阿达木单抗 治疗药物监测 (TDM) Skyline

类风湿关节炎 (RA) 是由自身免疫引发的关节炎。以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现, 属于自身免疫炎性疾病。随着 RA 发病机制的逐步揭示, 针对发病机制各环节进行治疗的生物制剂, 如肿瘤坏死因子 (TNF) 抑制剂等陆续进入临床应用, 为 RA 患者的治疗带来了希望。

阿达木单抗 (Adalimumab), 商品名修乐美 (Humira), 由英国 Cambridge Antibody Technology 与美国雅培公司联合研制的一种 TNF 特异性重组抗体类。2003 年 1 月首次在美国上市, 随后相继在德国、英国和爱尔兰获准上市, 用于治疗中到重度 RA。2010 年 2 月 26 日获得中国食品药品监督管理局 (CFDA) 批准上市。近年来, 阿达木单抗高居全球药物销售榜首, 成为最热门药物之一。

随着精准医疗概念的提出, 治疗药物监测 (TDM) 越来越受到医疗工作者的关注。TDM 能为临床医生提供更准确的信息, 从而实现对患者给药方案个体化, 提高药物疗效, 避免或减少药物毒副反应, 达到最佳治疗效果。临床研究表明, 单抗药物的血药浓度与患者治疗效果、存活率之间存在显著关联, 这将单抗药物的 TDM 提升到一个新的高度。因此, 开发血浆中阿达木单抗检测方法, 用于日常监控阿达木单抗治疗的患者, 有着重要临床意义。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 并结合 Skyline 软件, 建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法, 并遵循 EMA 《Guideline on bioanalytical method validation》完成方法全验证。结果表明, 该方法快速、特异性好、灵敏度高, 适用于阿达木单抗药物的日常监控。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 (输液泵), DGU-20A5R (在线脱气机), SIL-30ACMP (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站, Skyline Ver.3.7.0.10940 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm)
流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-0.1%甲酸乙腈溶液
流 速 : 0.40 mL/min
柱 温 : 40°C
进 样 量 : 15 μL
自动进样器温度 : 4°C
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	5
6.50	Pumps	Pump B Conc.	65
6.60	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.10	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Controller	Stop	

质谱条件:

离 子 源 : ESI (+) 接 口 温 度 : 300°C
接 口 电 压 : 1.0 kV D L 温 度 : 150°C
雾化气流速 : 3.0 L/min 加热块温度 : 400°C
加热气流速 : 5.0 L/min 扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)
干燥气流速 : 15.0 L/min M R M 参 数 : 见表 2
驻 留 时 间 : 34 ms

表 2. MRM 参数

肽段选择	肽段作用	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
			500.35*	-26.0	-22.0	-22.0
APYTFGQGTK	定量肽段	535.60	305.35	-26.0	-31.0	-19.0
			490.55	-26.0	-25.0	-20.0
			292.30*	-38.0	-20.0	-20.0
P14R	内标	512.10	389.30	-38.0	-16.0	-28.0
			660.40	-38.0	-17.0	-24.0

*表示定量离子对

1.3 样品制备

标准溶液配制: 将阿达木单抗注射液 (5 mg/mL) 用 Tris·HCl 缓冲液 (pH 7.0) 稀释成浓度为 2.0 μg/mL、4.0 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 和 400 μg/mL 的标准工作液, P14R 通过 Tris·HCl 缓冲液 (pH 7.0) 配制浓度为 10 fmol/μL 的内标工作液备用。190 μL 新鲜血浆中分别加入 10 μL 阿达木单抗标准工作液, 配制得到校准曲线溶液, 浓度依次为 0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、

5.0 µg/mL、10 µg/mL 和 20 µg/mL。

样品前处理方法：取 20 µL 血浆，按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

2. 结果讨论

2.1 阿达木单抗特征肽段的筛选及碰撞能量优化

利用 Skyline 软件预测阿达木单抗特征肽段，将预测的离子对列表直接导入到 LabSolutions 中建立完整的 LC-MS/MS 方法，利用该方法分析检测阿达木单抗酶解产物，然后将分析结果导入 Skyline 软件，删除未检出肽段，结果如图 1 所示。

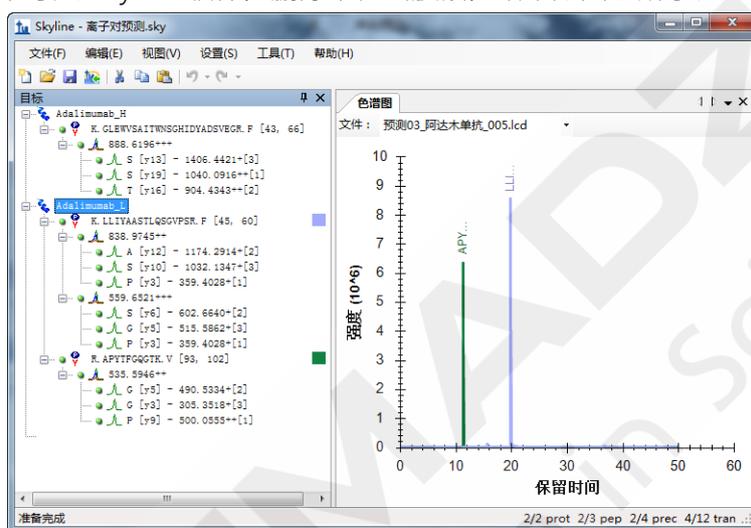


图 1. 筛选结果导入 Skyline 文件后的检出肽段确认

将 Skyline 软件中的导出参数设置为“预定模式”、“碰撞能量优化”，导出 MRM 离子对列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对已筛选的 4 个肽段的 MRM 通道进行碰撞能量优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认，碰撞能量优化过程重复 1 次，不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好（图 2），最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 离子对列表（表 3）。

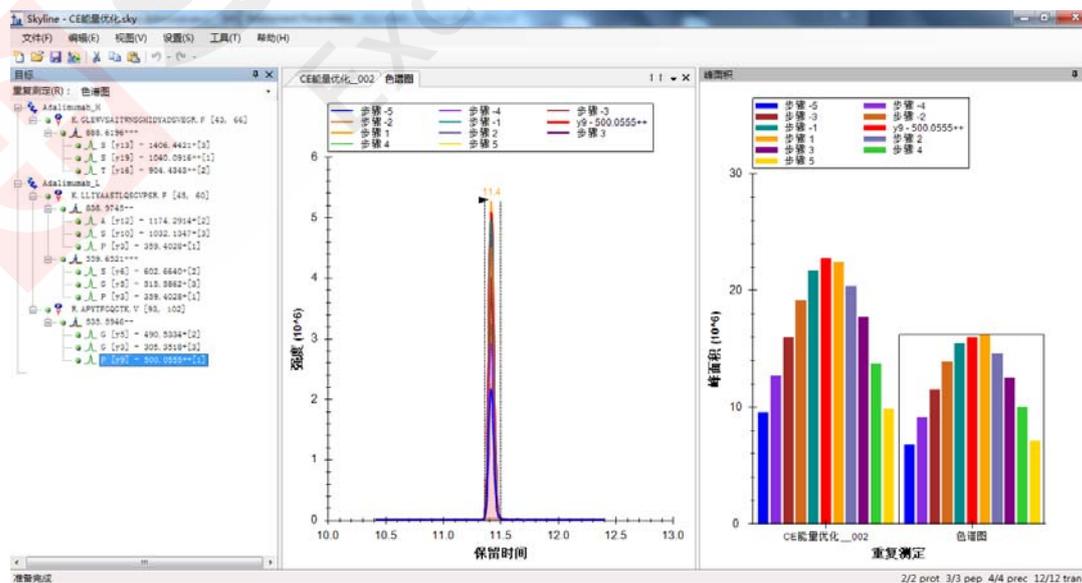


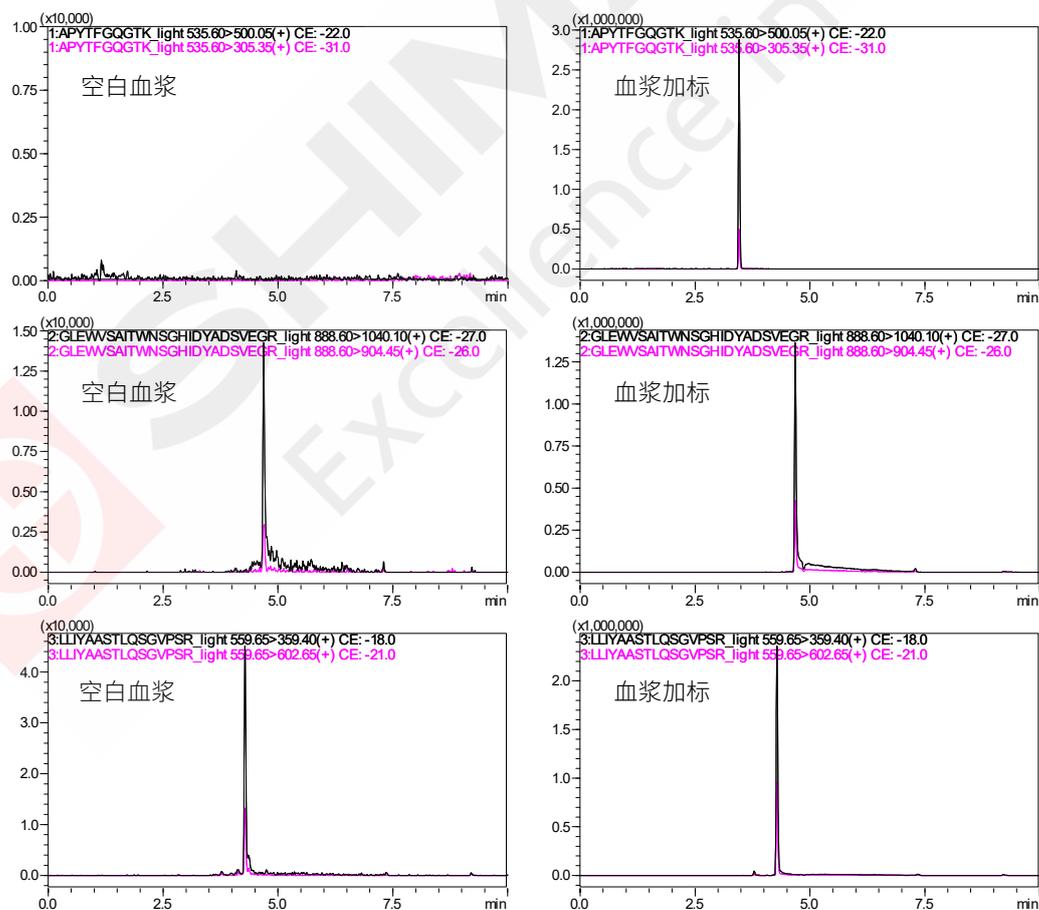
图 2. Skyline 软件进行碰撞能量优化结果查看

表 3. MRM 参数 (Skyline 筛选最佳碰撞能量肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)
APYTFGQGTK	535.60 [M+2H] ²⁺	500.06 [y9] ²⁺	-22.0
		305.35 [y3] ⁺	-31.0
		490.55 [y5] ⁺	-25.0
LLIYAASTLQSGVPSR	559.65 [M+3H] ³⁺	359.40 [y3] ⁺	-18.0
		602.65 [y6] ⁺	-21.0
		515.60 [y5] ⁺	-20.0
		838.95 [M+2H] ²⁺	359.40 [y3] ⁺
GLEWWSAITWNSGHIDYADSVGR	888.60 [M+3H] ³⁺	1174.30 [y12] ⁺	-35.0
		1032.15 [y10] ⁺	-34.0
		1040.10 [y19] ²⁺	-27.0
		904.45 [y16] ²⁺	-26.0
		1460.45 [y13] ⁺	-37.0

2.2 空白血浆及血浆基质加标中阿达木单抗各 MRM 通道色谱图

分别对比空白血浆与血浆基质加标中各个 MRM 通道色谱图,发现在空白血浆中目标肽段 LLIYAASTLQSGVPSR 和 GLEWWSAITWNSGHIDYADSVGR 通道均有显著干扰 (如图 3 所示),因此最终选取 APYTFGQGTK 作为阿达木单抗的定量特征肽段。



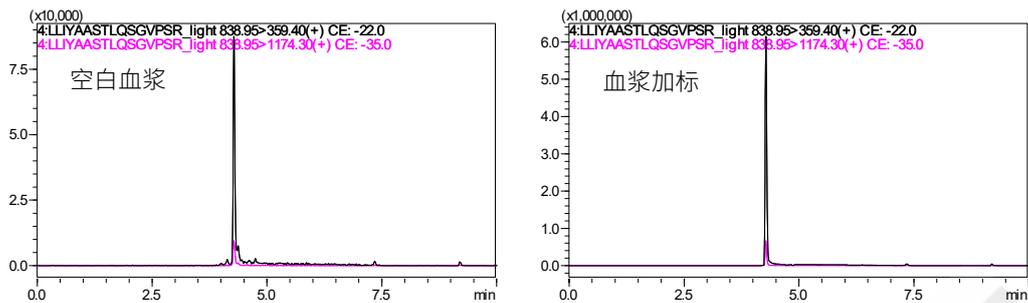


图 3. 空白血浆与血浆基质加标 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中各个 MRM 通道色谱图

2.3 线性范围

浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的校准曲线溶液，按照 1.3 中的样品前处理方法进行处理后按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线 (图 4)。在 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.675 nmol/L~135 nmol/L) 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

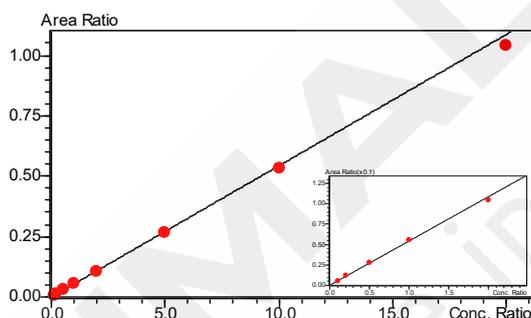


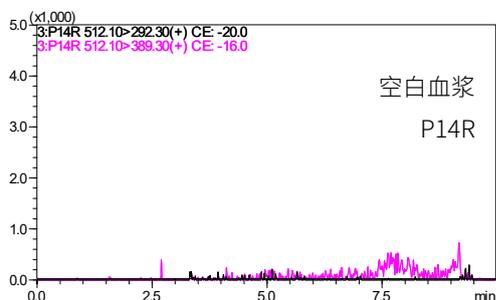
图 4. 校准曲线

表 4. 校准曲线参数

名称	特征肽段	校准曲线	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	准确度(%)	相关系数 r
阿达木单抗	APYTFGQGTK	$Y = (0.0543291)X + (2.64118e-005)$	0.1-20	94.2-110.0	0.9982

2.4 特异性验证

分别考察空白血浆基质、血浆基质加内标和 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血浆基质加标样品，结果表明，血浆基质对阿达木单抗及其内标的检测均无干扰，同时内标 P14R 亦不干扰阿达木单抗的检测 (见图 5)。



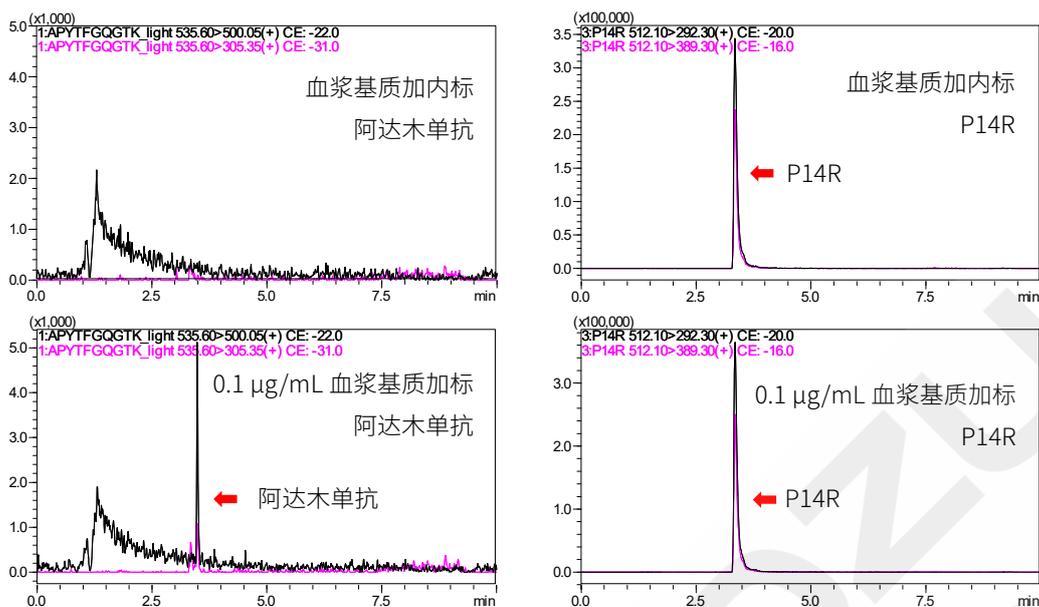


图 5. 特异性验证结果

2.5 精密度和准确度

用血浆基质配制定量下限、低、中、高四个浓度的样品，即 LLOQ (0.1 µg/mL)、LOQ (0.2 µg/mL)、MOQ (2.0 µg/mL) 和 HOQ (16 µg/mL)。连续三天对各样品分别测定 6 次，考察批内、批间的精密度和准确度，结果如表 5 所示。阿达木单抗的批内和批间精密度和准确度分别小于 8.3% 和 9.5%，LLOQ 批内和批间准确度在 ±20% 之内，其它浓度的质控样品批内和批间准确度分别为 88.5-110.0%、88.5-114.2%，结果均满足方法学验证标准。

表 5. 批内批间精密度和准确度结果

样品	理论浓度 (µg/mL)	批内 (n=6)			批间 (n=18)		
		平均实测值(µg/mL)	CV (%)	准确度(%)	平均实测值(µg/mL)	CV (%)	准确度(%)
LLOQ	0.1	0.106	8.3	91.6-116.9	0.101	9.5	82.8-116.9
LOQ	0.2	0.202	5.9	91.6-110.0	0.204	5.7	91.6-112.5
MOQ	2.0	1.88	1.8	92.5-97.1	2.03	7.2	92.5-114.2
HOQ	16	14.4	1.2	88.5-91.2	15.7	8.3	88.5-110.3

2.6 残留考察

在高浓度样品 (20 µg/mL) 后进样分析空白溶剂，考察阿达木单抗及其内标 P14R 的残留情况，结果如图 6 所示。结果表明，高浓度样品进样分析后，目标物和内标均无明显残留现象。

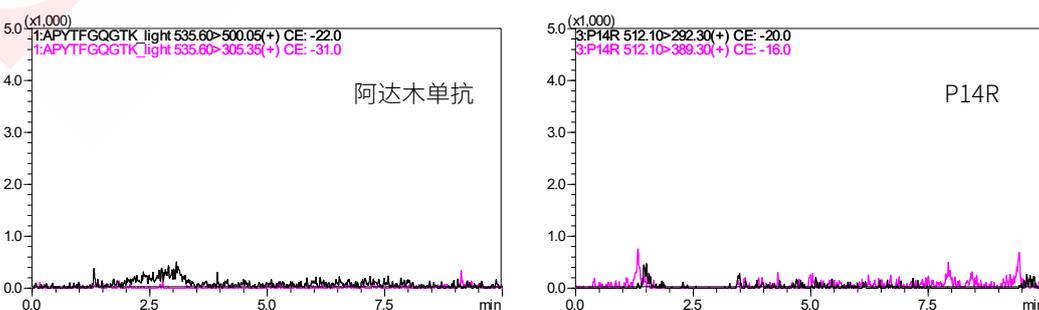


图 6. 残留考察

2.7 基质效应

分别考察 LOQ、MOQ 和 HOQ 样品的基质效应，并通过分析物的基质因子除以内标的基质因子 (MF)，计算得到经内标归一化的基质因子 (IS-normalised MF)，结果如表 6 所示。结果表明，低浓度和高浓度样品及其内标基质因子的 CV (%) 小于 15%，且内标归一化基质因子的 CV (%) 小于 15%。

表 6. 基质效应考察

项目	LOQ		MOQ		HOQ	
	MF	IS-normalised MF	MF	IS-normalised MF	MF	IS-normalised MF
1	0.934	1.25	0.877	1.20	0.874	1.16
2	0.916	1.21	0.905	1.17	0.830	1.12
3	0.838	1.15	0.932	1.25	0.819	1.13
4	0.939	1.31	0.872	1.22	0.874	1.17
5	0.881	1.20	0.875	1.21	0.829	1.13
6	0.863	1.24	0.877	1.21	0.808	1.06
均值	0.895	1.23	0.890	1.21	0.839	1.13
CV (%)	4.2	3.9	2.5	1.8	3.1	3.2

2.8 稀释可靠性

配制浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 血浆样品，分别用血浆基质稀释 10 倍、20 倍后，所得样品经前处理后，进样分析。样品测定结果乘以稀释因子，计算得到浓度数值与原始值比较。结果如表 7 所示，不同稀释倍数下的样品，其精密度和准确度均在 $\pm 15\%$ 之内，表明样品经 10 倍或 20 倍稀释后，测定结果仍然可靠。

表 7. 稀释可靠性验证

项目	10 倍稀释 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	20 倍稀释 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	92.3	93.4
2	97.3	99.5
3	98.6	99.5
4	100.7	97.3
5	102.1	98.4
6	99.6	97.5
均值	98.5	97.6
准确度 (%)	92.3-102.1	93.4-99.5
CV (%)	3.2	2.1

2.9 稳定性考察

分别考察室温、4 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，不同浓度样品储存 72 h 的稳定性，结果如表 8 所示。从结果上看，准确度范围在 86.5~110.7 之间，符合验证要求。

表 8. 样品稳定性考察

项目	室温			4°C			-20°C		
	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ	LOQ	MOQ	HOQ
1	0.207	1.90	14.5	0.183	1.78	15.2	0.221	1.86	15.6
2	0.201	1.94	14.3	0.214	1.84	14.4	0.212	1.92	15.2
3	0.183	1.90	14.2	0.208	1.84	14.5	0.214	1.92	14.9
4	0.208	1.85	14.6	0.185	1.79	14.7	0.174	1.73	15.3
准确度	91.6-	92.5-	88.5-	91.7-	86.9-	90.0-	86.9-	86.5-	93.4-
(%)	101.4	97.1	90.9	106.8	92.0	94.8	110.7	96.0	97.4

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，结合 Skyline 软件，建立了血浆中阿达木单抗药物的分析方法，并遵循 EMA 《Guideline on bioanalytical method validation (2012)》完成方法全验证。实验结果显示，浓度为 0.1~20 µg/mL (0.675 nmol/L~135 nmol/L) 范围内的校准曲线相关系数良好 (R=0.9982)，标线各点的准确度范围在 94.2~110.0%之间。各浓度样品 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的批内精密度和批间精密度分别为 1.2~5.9%和 5.7~8.3%，准确度范围为 88.5~114.2%；定量下限 (LLOQ) 样品批内精密度和批间精密度分别为 8.3%和 9.5%，准确度范围为 82.8~116.9%。此方法快速、选择性强和灵敏度高，所得结果均满足方法验证标准，可作为阿达木单抗 TDM 的检测方法。

nSMOL 技术用于血清中帕妥珠单抗的定量分析

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用, 建立了血清中帕妥珠单抗药物的定量分析方法。血清样品经 nSMOL 试剂盒处理后, 通过 Skyline 软件辅助完成 MRM 离子通道的预测和方法优化, 用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 12 min 内完成定量分析。实验结果表明: 空白血清基质干扰与帕妥珠单抗特征定量肽段分离良好, 且内标物不干扰分析物的检测; 帕妥珠单抗定量肽段在 0.05~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的校准曲线相关系数良好 ($R=0.9988$), 校准曲线各点的准确度范围在 86.3~110.2% 之间; 低中高三个浓度的质控样品 (LQC、MQC 和 HQC) 准确度范围为 86.8~96.8%, 质控样本精密度相对标准偏差在 2.95~5.75% 之间; 高浓度样品分析后帕妥珠单抗定量肽段无明显残留。

关键词: LCMS-8060 nSMOL 帕妥珠单抗 Skyline 定量分析

乳腺癌是威胁妇女健康的恶性肿瘤之一, 尽管乳腺癌的综合治疗水平在不断提高, 其病死率仍然位居女性肿瘤的第 2 位。人表皮生长因子受体-2 (HER-2) 阳性乳腺癌约占全部乳腺癌的 25%, 该类乳腺癌侵袭性高、预后性差。抗 HER-2 药物的出现显著改善了该类乳腺癌的预后, 如曲妥珠单抗、拉帕替尼和 T-DM1 等, 但对于 HER-2 阳性晚期患者, 进一步提高阳性乳腺癌患者的生存率依然是临床面临的问题。

帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 是第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的一种人源性单克隆 IgG1 抗体。2012 年 6 月被 FDA 批准联合曲妥珠单抗和多西他赛用于未接受过抗 HER2 治疗或化疗的转移性乳腺癌。帕妥珠单抗作为乳腺癌的靶向治疗药物, 不仅疗效显著, 且能有效延长患者的生存期。2018 年 1 月, 帕妥珠单抗在中国的上市申请获得 CDE 的承办受理, 并且已经获得 CFDA 优先审批的资格。

nSMOL 技术是岛津开发的一种全新的前处理技术, 能对抗体类药物 Fab 区域进行选择性的酶解, 得到相应的特征肽段。相比传统的抗体酶解方法, nSMOL 技术大大降低了酶解后样品的复杂性, 缩短了前处理时间, 为实现单抗药物的高效便捷分析提供了一个强有力的前处理手段。本文基于岛津 LCMS-8060 三重四级杆液质联用系统, 样品经 nSMOL 试剂盒处理后, 结合 Skyline 的预测和设计, 建立了该药物的 LC-MS/MS 的定量分析方法, 为该药物的生物样本分析提供了一种稳定, 灵敏的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 (输液泵), DGU-20A_{5R} (在线脱气机), SIL-30ACMP (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站, Skyline Ver.3.7.0.11317 软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : InertSustain BIO C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm)
 流动相 : A相-0.01%甲酸水溶液; B相-0.01%甲酸乙腈溶液
 流速 : 0.30 mL/min
 柱温 : 50°C
 进样量 : 1 μL
 自动进样器温度 : 4°C
 洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
7.50	Pumps	Pump B Conc.	40
7.60	Pumps	Pump B Conc.	90
9.50	Pumps	Pump B Conc.	90
9.51	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源 : ESI (+) 接口温度 : 300°C
 接口电压 : 2.5 kV D L 温度 : 250°C
 雾化气流速 : 3.0 L/min 加热块温度 : 400°C
 干燥气流速 : 5.0 L/min 扫描模式 : 多反应监测(MRM)
 加热气流速 : 15.0 L/min MRM 参数 : 见表 2
 驻留时间 : 30 ms

表 2. MRM 参数

肽段名称	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	肽段作用
YTGVPSPR	390.30([M+2H] ²⁺)→616.35[y6 ⁺]	-30.0	-18.0	-20.0	定性肽段
	390.30([M+2H] ²⁺)→515.10[y5 ⁺]	-30.0	-16.0	-34.0	
	390.30([M+2H] ²⁺)→359.40[y3 ⁺]	-30.0	-17.0	-14.0	
FTLSVDR	419.25([M+2H] ²⁺)→690.30[y6 ⁺]	-15.0	-17.0	-26.0	定量肽段
	419.25([M+2H] ²⁺)→589.25[y5 ⁺]*	-15.0	-16.0	-24.0	
	419.25([M+2H] ²⁺)→476.25[y4 ⁺]	-15.0	-17.0	-14.0	
LLIYSASYR	543.30([M+2H] ²⁺)→859.25[y7 ⁺]	-20.0	-19.0	-38.0	定性肽段
	543.30([M+2H] ²⁺)→746.25[y6 ⁺]	-20.0	-19.0	-30.0	
	543.30([M+2H] ²⁺)→583.30[y5 ⁺]	-20.0	-20.0	-22.0	
GLEWVADVNPNSGGSIYNQ	726.10([M+3H] ³⁺)→894.25[y8 ⁺]	-24.0	-26.0	-22.0	定性肽段
	726.10([M+3H] ³⁺)→796.40[y15 ²⁺]	-24.0	-18.0	-24.0	
	726.10([M+3H] ³⁺)→596.90[y11 ²⁺]	-24.0	-20.0	-24.0	
	726.10([M+3H] ³⁺)→870.25[b8 ⁺]	-28.0	-16.0	-28.0	
P14R	512.10([M+3H] ³⁺)→292.30[b3 ⁺]	-38.0	-20.0	-20.0	内标
	512.10([M+3H] ³⁺)→389.30[b4 ⁺]	-38.0	-16.0	-28.0	
	512.10([M+3H] ³⁺)→660.40[b6 ⁺]	-38.0	-17.0	-24.0	

*表示定量离子对

1.3 样品制备

基质标准溶液：将帕妥珠单抗标准品（5 mg/mL）用人血清基质稀释成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液。取上述溶液适量，用空白血清基质逐级稀释成浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，P14R 通过 Enhanced Solution C 配制成浓度为 10 fmol/ μL 的内标工作液备用。

基质质控样本：取 500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液适量，用空白血清基质稀释为 0.15、1、400 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，按照 nSMOL 试剂盒进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

样品前处理方法：取 10 μL 血浆，按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理，获得的酶解混合物直接上机分析。

2. 结果讨论

2.1 帕妥珠单抗特征肽段的筛选

将帕妥珠单抗的 FASTA 文件导入 Skyline 软件，通过对肽段和离子对条件的设置导出帕妥珠单抗预测肽段的离子对列表，随后在 LabSolutions 软件中构建肽段筛选的 LC-MS/MS 方法，酶解产物进行上机分析后得到初步筛选结果，根据初筛结果进一步对肽段和方法进行优化后最终得到四个特异性较好的肽段，肽段分析结果见图 1。

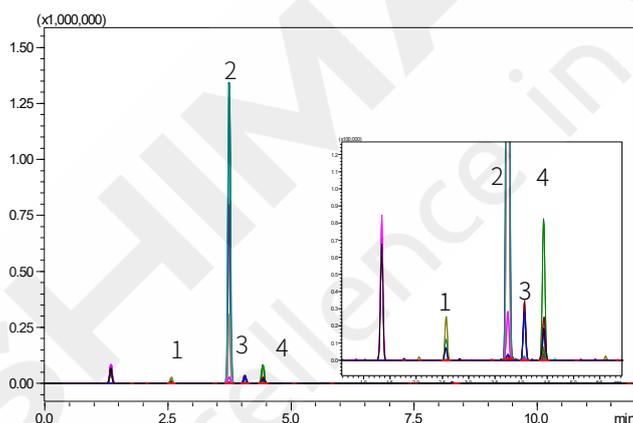


图 1. 特征肽段质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

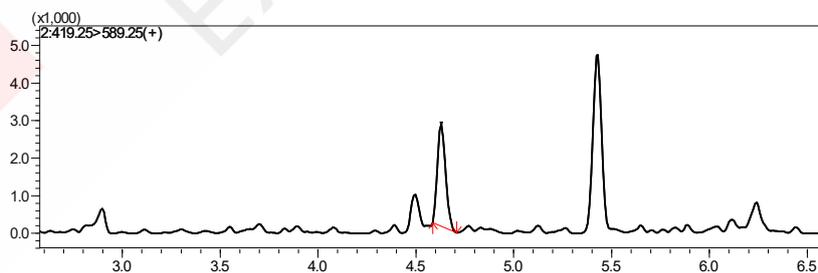


图 2. 定量肽段血清基质样品 MRM 色谱图(0.05 $\mu\text{g/mL}$)

2.3 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备空白血清样品和空白血清加内标样品，按照 1.2 中条件进行分析，结果表明，血清基质在内标物通道无明显色谱峰，且血清基质及内标物均对帕妥珠单抗的检测无干扰，色谱图如下所示：

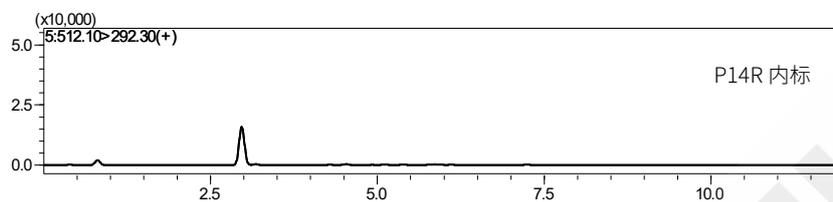
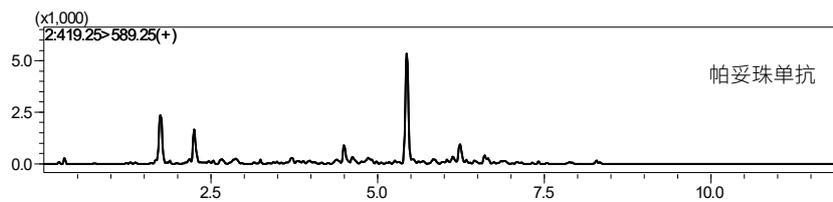


图 3. 空白血清基质色谱图

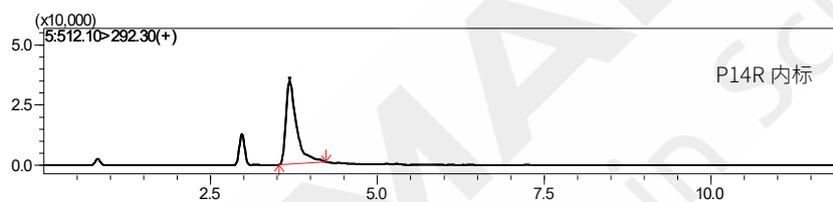
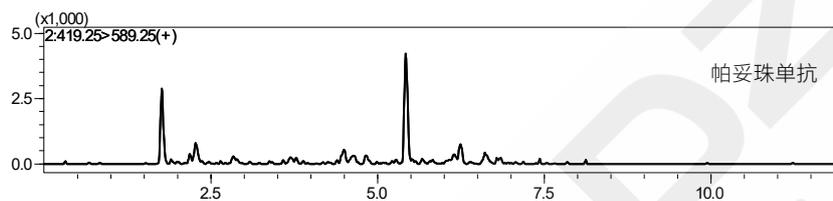


图 4. 空白血清基质加内标色谱图

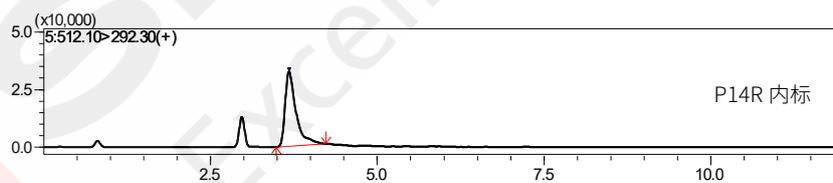
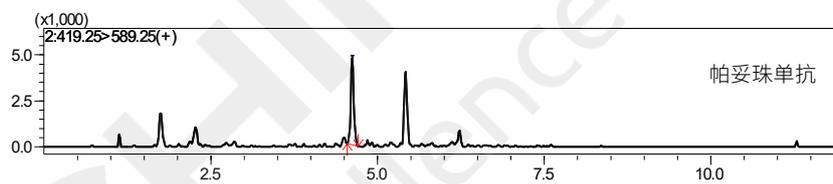


图 5. 帕妥珠单抗 (0.1 µg/mL) 血清基质加内标色谱图

2.4 线性范围

浓度为 0.05 µg/mL、0.1 µg/mL、0.2 µg/mL、1 µg/mL、2 µg/mL、10 µg/mL、50 µg/mL 的校准曲线溶液，照 1.3 中的样品前处理方法进行处理后按 1.2 中的分析条件进行测定，以内标法制作校准曲线 (图 6)。定量肽段在 0.05~50 µg/mL 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

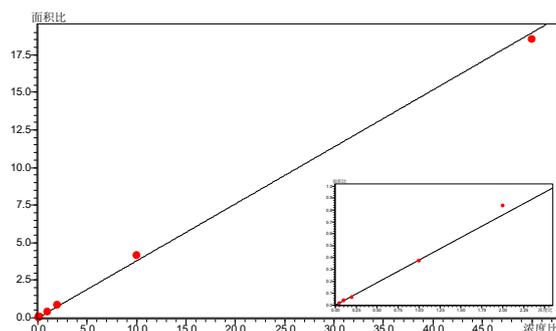


图 6. 校准曲线

表 3. 校准曲线参数

名称	特征肽段	校准曲线	线性范围 (μg/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
帕妥珠单抗	FTLSVDR	$Y = (0.379263)X + (5.93914e-004)$	0.05-50	86.3-110.2	0.9988

2.5 精密度和准确度

用血清基质制备低、中、高三个浓度的质控样品，LQC (0.15 μg/mL)、MQC (3.0 μg/mL) 和 HQC (40 μg/mL)，平行测定 6 次，考察精密度和准确度。结果如表 4 所示，低中高三种不同浓度的质控品平行 6 次测定，定量肽段测定结果的 RSD 分别为 5.75%、2.95% 和 3.06%，结果均值的准确度分别为 86.8%~96.8%，说明该方法的精密度和准确度良好。

表 4. 精密度和准确度结果 (n=6)

样品名称	理论浓度 (μg/mL)	RSD (%)	实测浓度 (μg/mL)	准确度 (%)
LQC	0.15	5.75	0.130	86.8
MQC	3.0	2.95	2.66	88.5
HQC	40	3.06	38.7	96.8

2.6 残留考察

在高浓度样品 (50 μg/mL) 后进样分析空白基质样品，考察帕妥珠单抗的残留情况，结果如图 7 所示。结果表明，高浓度样品进样分析后，目标物无明显残留。

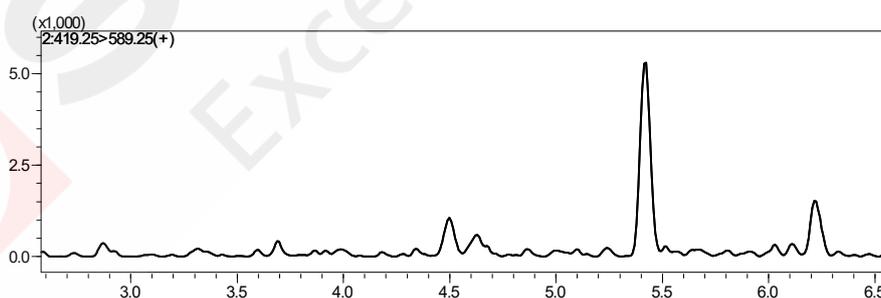


图 7. 残留考察

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，结合 nSMOL 技术及 Skyline 软件，建立了血清中帕妥珠单抗的分析方法。实验结果显示：在本分析系统下，空白血清基质干扰与帕妥珠特征定量肽段分离良好，且内标物不干扰分析物的检测；帕妥珠定量肽段在浓度为 0.05~50 μg/mL 范围内的校准曲线相关系数良好 (R=0.9988)，

标线各点的准确度范围在 86.3~110.2%之间；低中高三个浓度的质控样品准确度范围为 86.8~96.8%，精密度 RSD 在 2.95~5.75%之间；高浓度样品分析后帕妥珠定量肽段无明显残留。此方法具有选择性强、灵敏度高、稳定性好和线性范围宽的特点，可为该药物的临床血清样本定量分析提供较好的借鉴和参考。



3.3 核酸类药物

在 21 世纪的生物医药领域，随着基因治疗和精准医疗的快速发展，核酸类药物作为一类新型的治疗手段，正逐步成为药物研发的重点方向。核酸类药物，又称核苷酸类药物，主要包括寡聚核糖核酸（RNA）与寡聚脱氧核糖核酸（DNA）的各种具有不同功能的片段，它们能够直接作用于靶基点或靶基因，从而在基因治疗领域发挥显著疗效。这类药物种类繁多，涵盖了抗病毒类、抗肿瘤类、干扰素诱导剂类、免疫增强类及功能剂类等，为多种疾病的治疗提供了全新的解决方案。

然而，核酸类药物的体内分析却面临着诸多具体挑战。与传统的小分子药物和大分子抗体药物不同，核酸类药物的分析需要根据核酸药物的特性开发和建立针对性的定量生物分析技术。在众多检测技术中，液质联用技术（LC-MS/MS）因其高灵敏度、高分辨率及强大的定量分析能力，成为了核酸类药物体内分析的重要手段。然而，LC-MS/MS 在检测核酸类药物时，也面临着一些特有的挑战和难点。例如，核酸类药物在质谱检测过程中容易发生碎裂，导致信号不稳定；同时，生物基质中的复杂成分可能对核酸类药物的检测产生干扰，影响分析的准确性。此外，由于核酸类药物在生物样本中的浓度通常较低，对检测方法的灵敏度提出了极高要求；同时，残留效应、基质效应以及质谱仪器的专属性问题也是 LC-MS/MS 在核酸类药物体内分析中需要克服的难点。

岛津作为质谱技术的领先者，液质联用系统以其卓越的性能和稳定性，在核酸类药物体内分析中展现出了独特的优势。为了应对液质定量分析方法在核酸药物体内生物分析中面临的挑战，岛津不断探索和创新，提出了一系列应对策略。例如，通过优化色谱分离条件，如选择合适的色谱柱、调整流动相组成和 pH 值等，提高核酸类药物在质谱中的稳定性；采用标准加入法等，对基质效应进行校正和评价；同时，不断改进质谱仪器的性能，如提高离子源的效率、优化质谱检测参数等，提高其专属性，降低假阳性结果的出现概率。此外，通过引入生物惰性液相技术，完美解决核酸类药物金属吸附所带来的严重残留、峰形拖尾、低浓度无检出、回收率低、校准曲线线性差等问题，进一步提高了系统的耐用性和分析准确性，为核酸类药物的体内分析提供了更加可靠的技术支持。

本章将重点介绍岛津质谱结合生物惰性液相对核酸类药物体内分析实验设计、方法验证及结果分析的应用案例，旨在为分析人员提供有益的参考和借鉴，推动核酸类药物体内分析技术的不断发展。

全新的分离体验

生物惰性超高效液相色谱仪

在生物分子的 UHPLC 分析中，如何克服分析物在仪器路润湿表面上潜在的吸附问题，是一个严峻的挑战。使用小粒径色谱柱可以实现最佳的色谱分离，但要求仪器有更高的耐压性，并且由于流动相通常具有高盐浓度和极端 pH 值等特点，仪器流路也要具有很好惰性和耐腐蚀的性能。

Nexera XS inert 生物惰性系统将 UHPLC 系统的高压耐受性与完全惰性的样品流路完美结合，确保没有润湿金属表面的吸附作用，且具有超高耐腐蚀性，从而为生物分子的分离提供了理想的解决方案。

1 支持全范围的生物惰性 UHPLC 系统

该系统采用不锈钢套管增强的聚醚醚酮（PEEK）管，确保了系统耐压高达 105 MPa，这意味着分析色谱柱可选用小颗粒的长分离柱，实现超高分离效率。Nexera XS inert 生物惰性系统将 UHPLC 系统的高压耐受性与完全惰性的样品流路完美结合，确保没有润湿金属表面的吸附作用，且具有高耐腐蚀性，支持各种生物技术药物的检测分析。

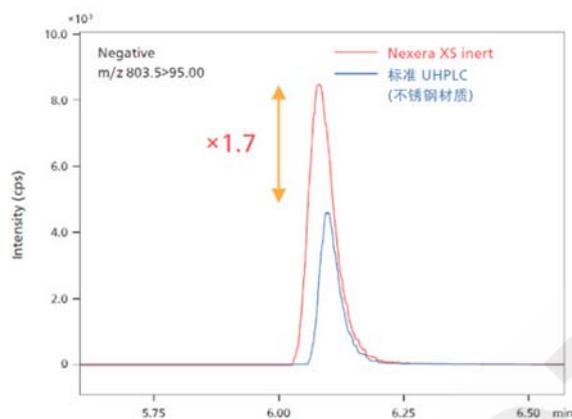


2 不打折扣的回收率和灵敏度

对于生物分子的定量分析，特别是对于灵敏度要求较高的分析，由于吸附导致较低的化合物回收率，直接降低灵敏度水平，Nexera XS inert 生物惰性系统可通过消除抗体、核酸或其他组分对金属吸附作用，防止目标组分的峰拖尾和较低回收率。即使对于极少量的低浓

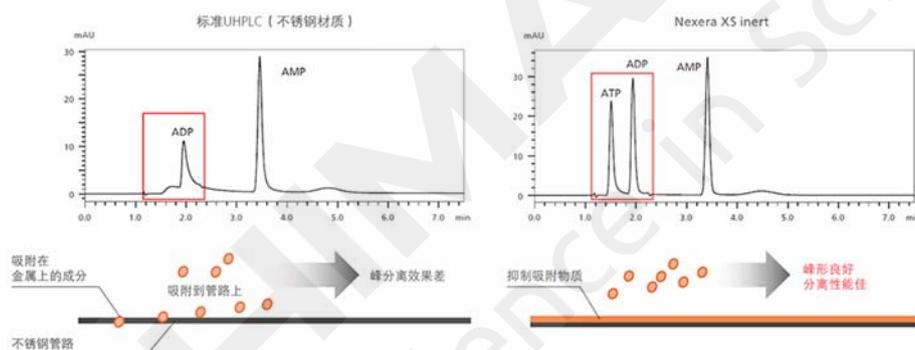
度样品，也可以获得可靠、准确的定量结果。

下图为标准 UHPLC 系统和 Nexera XS inert 生物惰性系统分析寡核苷酸的示例。由于 Nexera XS inert 惰性管路，可准确检测到极易吸附到金属材料上的寡核苷酸。



3 不打折扣的分离度

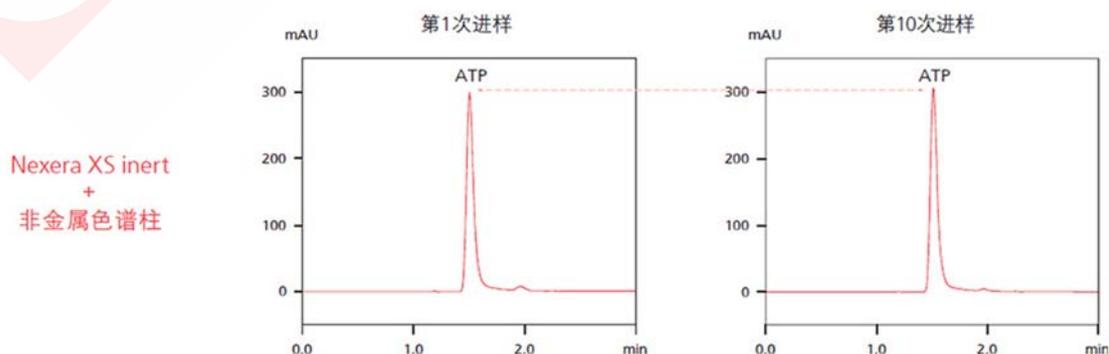
Nexera XS inert 生物惰性系统使用岛津新开发技术，消除样品与内部金属表面的接触。从而抑制了样品流动通道内目标分子的吸附，确保了良好的峰形，并提供了出色的分离。

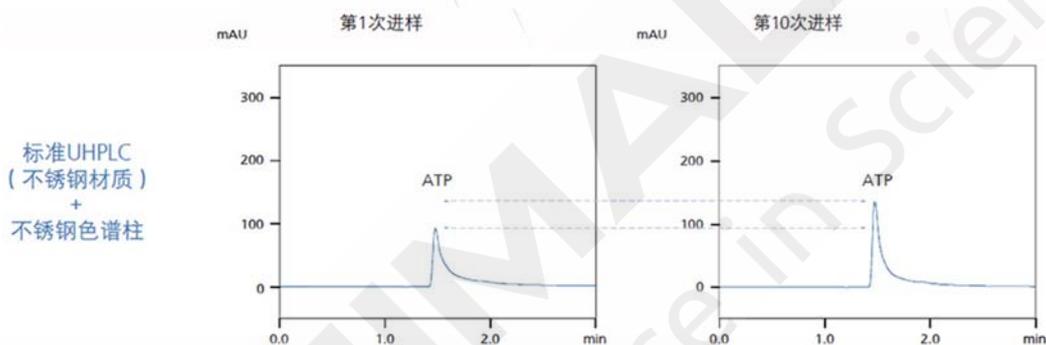
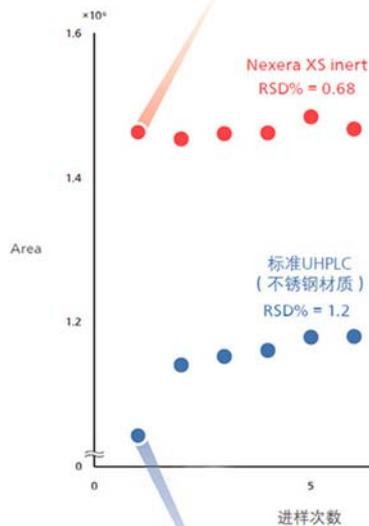


4 不打折扣的重现性和可靠性

4.1 始终如一的分析重现性

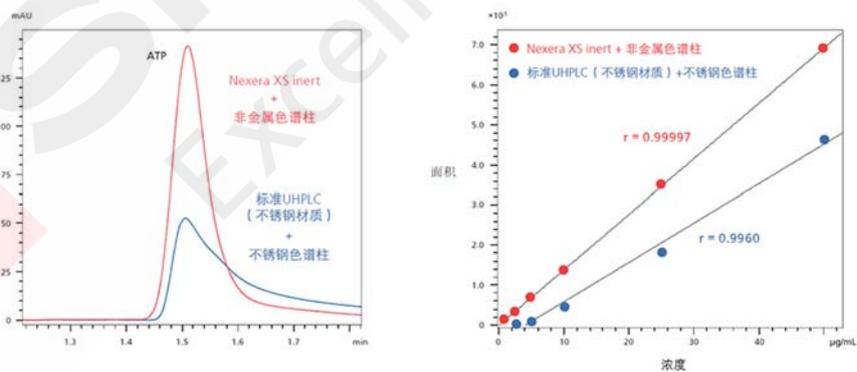
为防止由于吸附可能引起的各种问题，在开始数据采集之前，有时会通过反复进样含有目标化合物的样品来使整个系统钝化。这样不仅浪费了珍贵的样品材料和钝化所消耗的时间，而且在长期连续分析中钝化状态的变化会导致最终难以获得可靠的数据。Nexera XS inert 系统无需进行初步钝化，即可在连续分析过程中提供始终如一的可靠数据。





4.2 提高定量分析性能

目标化合物在低浓度区域内的吸附尤为明显, 会导致校准曲线线性、检测下限和定量下限变差。Nexera XS inert 可在低浓度区域实现了更大的动态范围和定量精度。



QC样品定量分析结果(不锈钢材质 标准UHPLC)

QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Low	2	2.2	2.83	110.7
Medium	20	21.1	0.797	105.4
High	45	45.5	0.507	101.1

QC样品定量分析结果(Nexera XS inert)

QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Low	2	2.1	0.690	103.9
Medium	20	20.2	0.546	101.1
High	45	45.2	0.358	100.4

此外，生物大分子吸附问题不仅可以发生在仪器内，也会发生在预处理过程中使用的容器、移液管、分析柱和其他设备中。为提升生物分离效率，除在仪器设备检测方面提供完善的解决方案外，岛津同时在色谱柱（如 Metal-Free 系列）、低吸附样品瓶（如 TORAST-H Bio）等方面提供用于测定生物分子理想的实验耗材，从而全方位支持生物技术药物的检测分析。



LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸药物福米韦生含量

摘要：本文采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪与三重四极杆质谱联用建立了血浆中反义寡核苷酸福米韦生的定量分析方法。通过优化质谱参数，1 ng/mL 基质标准溶液信噪比为 17。在 1~200 ng/mL 浓度范围内基质标曲线性良好，线性相关系数为 0.9998，准确度为 92.7%~104.8%。精密度实验中，2 ng/mL 标准溶液重复分析 6 次，保留时间 RSD 为 0.15%，与内标的峰面积比 RSD 为 3.18%，重复性佳。实际样品加标实验中，20、100、400 ng/mL 加标回收率分别为 83.2%、90.6%、92.4%，回收率高。实验结果表明，该方法灵敏度高、重复性佳、回收率高，可用于反义寡核苷酸药代动力学（DMPK）分析。

关键词：反义寡核苷酸 LC-MS/MS 福米韦生 DMPK

寡核苷酸药物是长度较短、碱基少于 30 nt 的一类核酸药物，其通过作用于致病靶基因或者靶 mRNA，从根源上调控致病基因的表达，达到疾病治疗的目的。寡核苷酸药物主要有反义寡核苷酸 (ASO)、小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA (miRNA)、RNA 适配体 (RNA aptamer) 等。

在寡核苷酸药物研发或临床阶段，生物基质样品中寡核苷酸的定量分析对药代动力学分析是至关重要的，分析结果可对这类药物的结构改造及递送系统的优化起到指导作用，达到改善药物的稳定性和提高递送效率的目的。

目前，可用于生物样品中寡核苷酸药物分析的方法主要有荧光法、qPCR 法、ELISA、质谱法等，其中质谱法具有较好的选择性和抗基质干扰能力，且可实现多组分同时分析，应用较广。本文采用 LC-MS/MS 建立了血浆样品中寡核苷酸的定量分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪 LC-40D XSi 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060NX 联用系统。

液相具体配置为：

系统控制器	： CBM-40A	自动进样器	： SIL-40C XSi
脱气机	： DGU-405	柱温箱	： CTO-40C
输液泵	： LC-40D XSi×2	色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	： Shim-pack Scepter Claris C18-300 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N: 227-31209-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)
流动相	： A 相-10mM DIPEA+25mM HFIP 水溶液, B 相-A 相: 乙腈=1: 1 (v/v)
流速	： 0.3 mL/min
柱温	： 55°C

样品预处理

- 移取500 μL 血浆至1.5 mL离心管中，加入500 μL 裂解液，涡旋混合均匀。

净化

- 活化：依次使用甲醇、pH=5.5的乙酸铵水溶液活化96孔固相萃取板。
- 淋洗：使用pH=5.5的乙酸铵溶液淋洗固相萃取板。
- 洗脱：使用500 μL pH=9.5碳酸氢铵溶液洗脱固相萃取板2次，收集洗脱液。

定容

- 氮吹：对洗脱液进行氮吹，使其中有机溶剂挥发。
- 定容：在样品溶液中加入内标，并使用超纯水定容至1 mL。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

通过全方位的质谱参数优化，血浆中福米韦生定量方法的定量下限 (LLOQ) 1 ng/mL，信噪比为 17.7，具体福米韦生和内标的色谱图如图 1 所示。

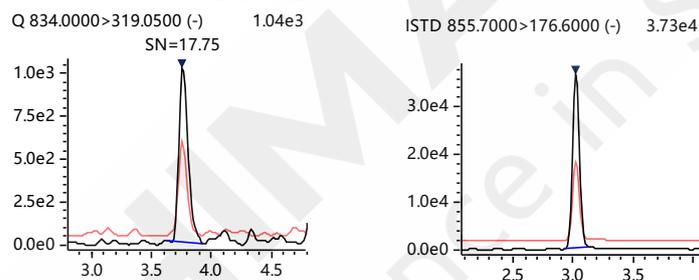


图 1. 福米韦生 (1 ng/mL, 左) 及内标 (50 ng/mL, 右) MRM 图

2.2 系统残留考察

福米韦生是一种反义寡核苷酸，其结构中含多个磷酸基团，与不锈钢金属材料接触可能发生非特异性吸附而导致残留。所以，本文进行了系统残留考察，分析完校准曲线最高点 200 ng/mL 标准溶液后，分析空白溶液，如采用常规液相系统，空白溶液中检出微量福米韦生福米韦生，如采用惰性液相系统，则无残留，具体如图 2 所示。

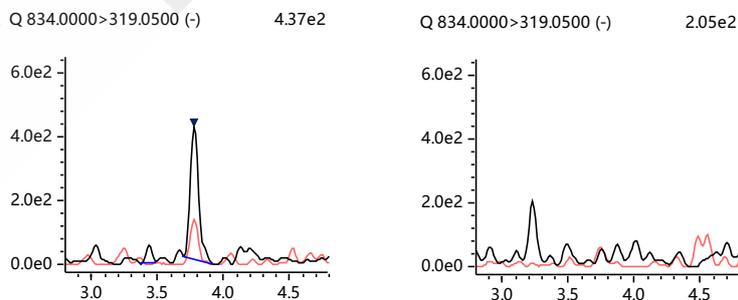


图 2. 常规液相 (左) 和惰性液相 (右) 分析空白溶液 MRM 图

2.3 校准曲线

按 1.2 中的分析条件分析系列基质标准溶液，浓度为 1、2、5、10、20、50、100、200 ng/mL。以目标物与内标的浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用内标法建立校准曲线，

如图 3 所示。在 1~200 ng/mL 线性浓度范围内，线性相关系数为 0.9998，线性良好，标准溶液回读准确度为 92.7%~104.8%，准确度高。

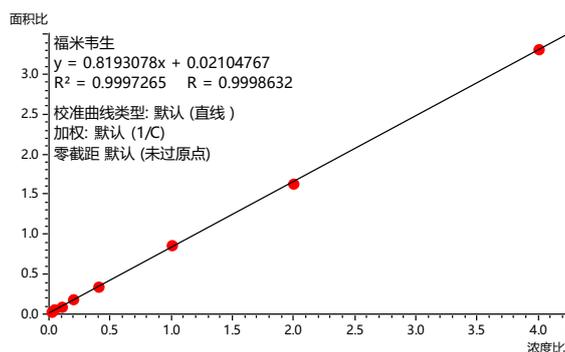


图 3. 校准曲线

2.4 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 2 ng/mL 的基质标准溶液重复分析 6 次，重复性谱图如图 4 所示。福米韦生保留时间 RSD 为 0.15%，峰面积比 RSD 为 3.88%，重复性结果良好。

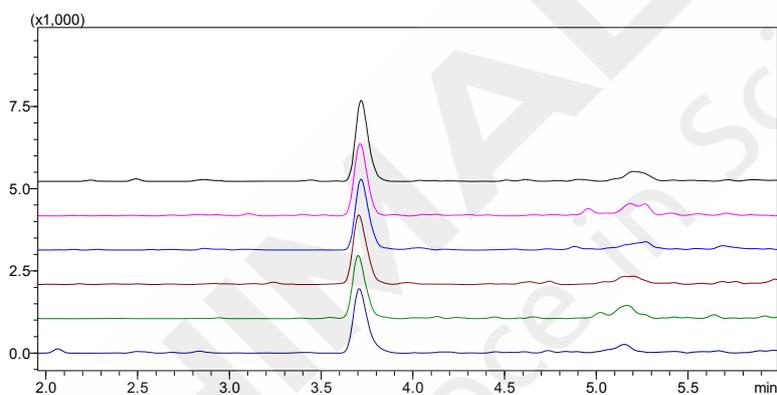


图 4. 2 ng/mL 基质标准溶液重复分析 MRM 图 (n=6)

2.5 样品测定及加标实验结果

按照 1.4 中样品处理方法对血浆样品进行处理，上机分析，样品中未检出福米韦生。对此样品进行加标实验，加标量为 20、100、400 ng/mL，加标后色谱图如图 5 所示。重复实验 3 次，加标结果如表 3 所示，此方法回收率及重复性佳。

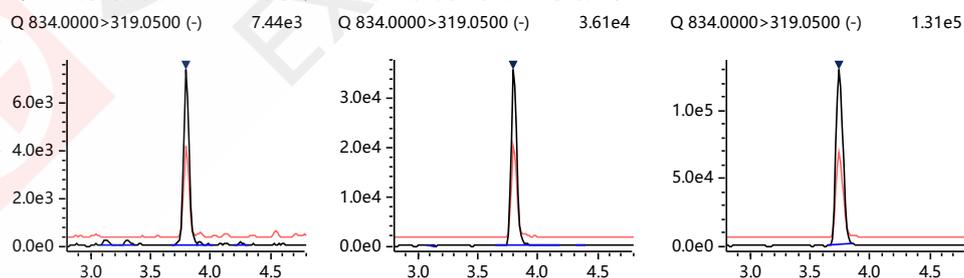


图 5. 样品加标后 MRM 图 (从左至右加标浓度分别为: 20、100、400 ng/mL)

表 3. 血浆样品中福米韦生定量及加标结果

化合物名	样品浓度 (ng/mL)	加标量 (20 ng/mL)		加标量 (100 ng/mL)		加标量 (400 ng/mL)	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
福米韦生	N.D.	83.2	7.72	90.6	5.33	92.4	6.46

备注: N.D.表示未检出

3. 结论

本文采用岛津超高效生物惰性液相系统与三重四极杆质谱仪联用建立了血浆中寡核苷酸药物的分析方法。此方法灵敏度高且无残留，线性范围广，实际样品加标检测回收率高，可用于生物基质样本中寡核苷酸药物的定量分析。



LC-MS/MS 测定血浆中反义寡核苷酸药物诺西那生的含量

摘要：本文采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪与三重四极杆质谱联用建立了血浆中反义寡核苷酸诺西那生的定量分析方法。方法学验证结果表明：灵敏度良好，2 ng/mL 基质标准溶液信噪比为 12.82；在 2~500 ng/mL 浓度范围内基质标曲线性良好，线性相关系数为 0.9989，准确度为 92.45%~106.72%；精密度实验中，10 ng/mL 标准溶液重复分析 6 次，保留时间 RSD 为 0.165%，峰面积比 RSD 为 2.81%，重复性良好；实际样品加标回收实验中，10、50、400 ng/mL 加标回收率分别为 91%、110.7%、106.36%，加标回收率良好。该方法灵敏度高、线性、重复性和加标回收率良好，可用于生物样本中诺西那生定量分析。

关键词：诺西那生 LC-MS/MS 反义寡核苷酸

反义寡核苷酸 (Antisense oligonucleotides, ASOs) 是一种治疗性核酸分子，通常由 15 到 20 个核苷酸单元组成。其原理主要通过人工合成的短链核酸序列，设计成与特定信使 RNA (mRNA) 序列互补，通过精确匹配目标 mRNA 上的序列，能够特异性地识别并结合到这些 mRNA 上，从而影响 mRNA 的功能和后续的抗体合成过程，达到抑制目标基因的表达，从而进行相关疾病的治疗。

诺西那生 (Nusinersen) 是一种反义寡核苷酸 (ASO) 药物，专门设计用于治疗脊髓性肌萎缩症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA)。诺西那生需要通过鞘内注射给药，即直接注入脊髓周围的脑脊液中，以确保药物能够直接作用于目标神经元。它是首个且是目前治疗 SMA 的重要药物之一。

质谱法由于其专属性强、灵敏度高、检测范围宽，在寡核苷酸生物样本检测中具有非常大的应用潜力。本文采用 LC-MS/MS 建立了血浆样品中寡核苷酸的定量分析方法，为相关分析人员提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效生物惰性液相色谱仪 LC-40D XSi 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045RX 联用系统。

液相具体配置为：

系统控制器	: CBM-40A	自动进样器	: SIL-40C XSi
脱气机	: DGU-405	柱温箱	: CTO-40C
输液泵	: LC-40D XSi×2	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shim-pack Scepter Claris C4-300 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N: 227-31208-01, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A相-10mM DIPEA+25mM HFIP 水溶液，B相-A相：乙腈=1：1 (v/v)

流速：0.3 mL/min

柱温：55°C

进样体积：10 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1. 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
5.00	Pumps	Pump B Conc.	50
6.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8.10	Pumps	Pump B Conc.	10
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI (-)

C I D 气：230 kPa

喷针位置：+4 mm

接口温度：300°C

接口电压：-3 kV

D L 温度：250°C

聚焦电压：-1 kV

加热块温度：500°C

雾化气：氮气 4 L/min

扫描模式：MRM

加热气：空气 20 L/min

M R M 参数：见表 2

干燥气：氮气 3 L/min

表 2. MRM 参数

No.	中文名	英文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q1 Pre Bias (V)
1	诺西那生	Nusinersen	1258984-36-9	890.00>393.00*	24.0	44.0	25.0
				1017.00>393.00	50.0	54.0	25.0
2	内标	/	/	855.60>176.80	24.0	55.0	28.0

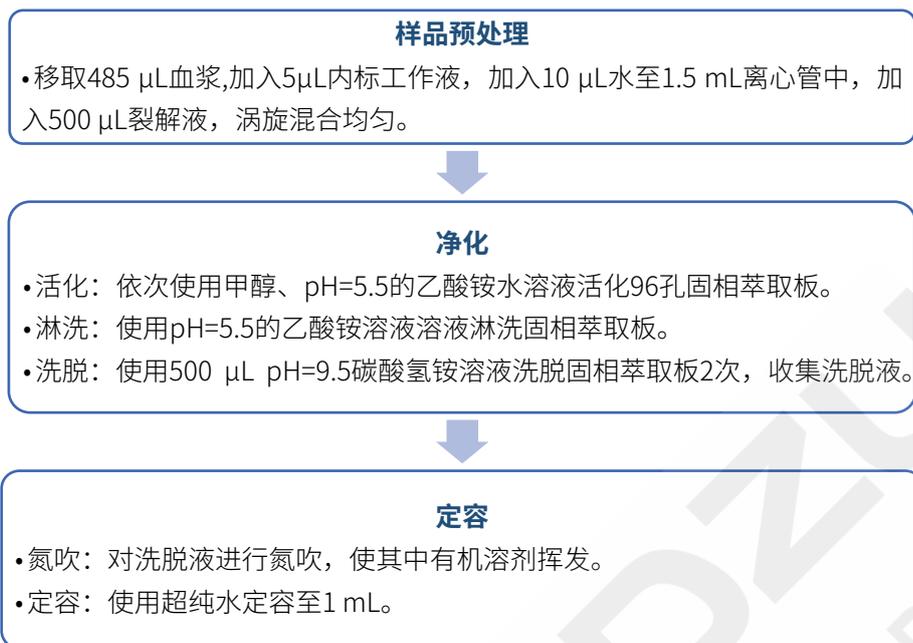
注：1. *表示定量离子；2. 内标为 DNA，分子量为 6854.53 Da

1.3 标准品配制

标准储备液：准确称取标准品 1 mg，用超纯水溶解并定容至 1 mL，配制浓度为 1000 μ g/mL 标准储备液。

标准溶液：取适量标准储备液，用超纯水逐级稀释成 0.2、0.5、2、10、20、50 μ g/mL 工作液，取 10 μ L 工作液加入 485 μ L 空白血浆，再加入 5 μ L 内标溶液 (10 μ g/mL)，混匀后，并按 1.4 样品前处理方式进行基质校准曲线点的制备。

1.4 样品前处理



2. 结果与讨论

2.1 RX 离子源参数优化

为考察最优的 RX 离子源参数, 优化了喷针位置及聚焦电压对响应的影响, 通过下图 1 发现, 喷针位置在+4 mm 和+5mm 处响应最优, 通过喷针位置水平的调整, 在满足灵敏度前提下, 提升质谱对基质的耐污染水平; 离子聚焦水平取决于聚焦电压、喷针位置及化合物性质, 诺西那生在-1 kV 的聚焦电压下, 有最优的响应。

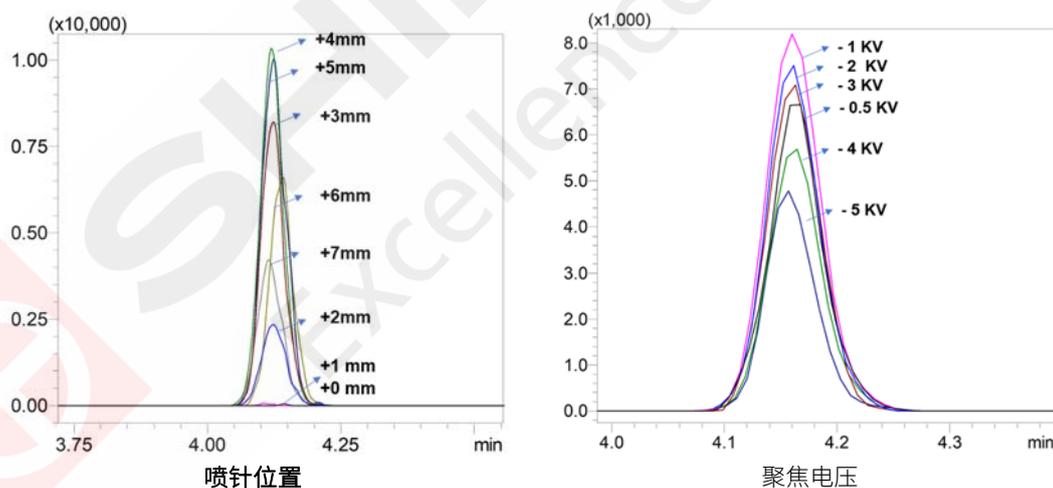


图 1. RX 离子源喷针位置及聚焦电压优化

2.2 色谱柱选择及优化

寡核苷酸药物由于其具有多个磷酸基团, 与不锈钢金属材料接触可能发生非特异性吸附而导致残留及峰形异常, 本文考察了惰性液相结合惰性填料和涂层的色谱柱, 和常规 C18 填料的色谱柱进行分析, 如下图所示, 常规色谱柱易发生非特异性吸附导致峰形异常、拖尾, 而惰性填料的色谱柱, 峰形对称正常, 尖锐。

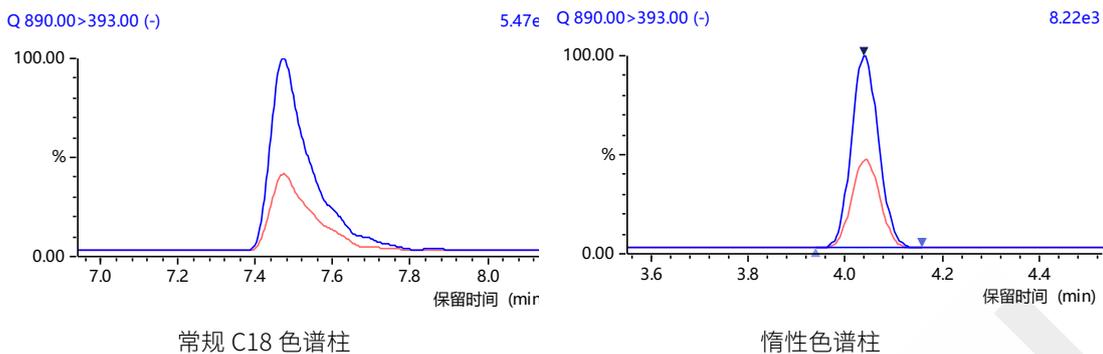


图 2. 惰性和非惰性色谱柱差异比较

2.3 标准溶液色谱图

血浆基质中诺西那生定量下限 (LLOQ) 为 2 ng/mL, 信噪比为 12.82, 诺西那生和内标的色谱图如图 3 所示。

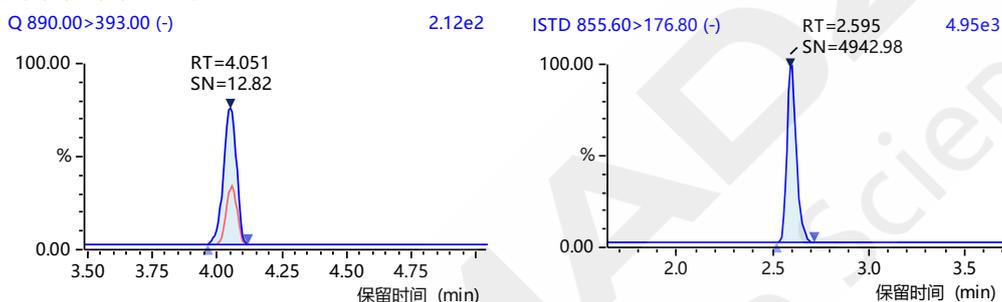


图 3. 诺西那生 (2 ng/mL, 左) 及内标 (50 ng/mL, 右) MRM 图

2.4 系统残留考察

本文采用惰性液相结合惰性填料色谱柱进行了诺西那生分析, 进行系统残留考察, 分析完校准曲线最高点 500 ng/mL 标准溶液后, 分析空白溶液, 空白处无色谱峰检出, 系统无残留, 具体如图 4 所示。

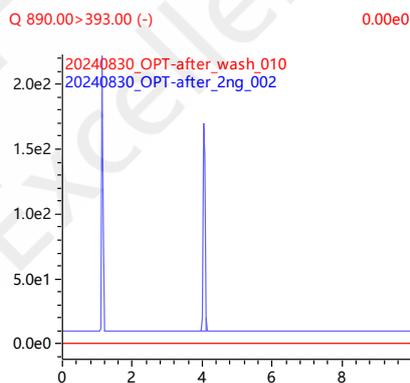


图 4. 分析空白溶液 MRM 图

2.5 校准曲线

按 1.2 中的分析条件分析基质标准溶液, 浓度为 2、5、20、100、200、500 ng/mL。以目标物与内标的浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 采用内标法建立校准曲线, 如图 5 所示。在 2~500 ng/mL 线性浓度范围内, 线性相关系数为 0.9989, 线性良好, 标准溶液回读准确度为 92.45%~106.72%, 准确度高。

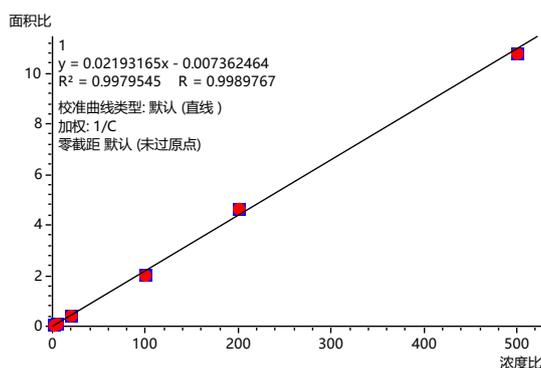


图 5. 校准曲线

2.6 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 10 ng/mL 的基质标准溶液重复分析 6 次，重复性谱图如图 6 所示。诺西那生保留时间 RSD 为 0.165%，峰面积比 RSD 为 2.81%，重复性结果良好。

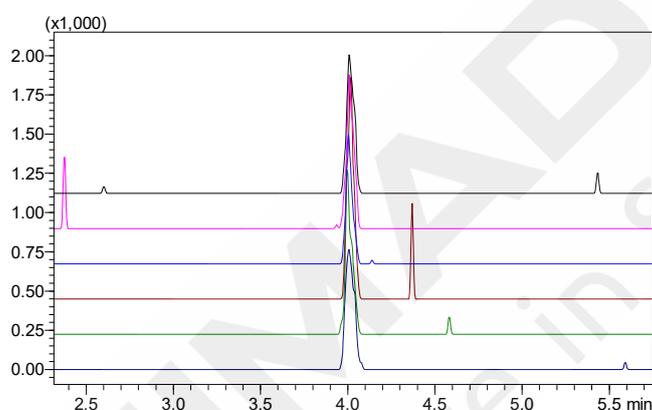


图 6. 10 ng/mL 基质标准溶液重复分析 MRM 图 (n=6)

2.7 样品测定及加标实验结果

按照 1.4 中样品处理方法对血浆样品进行处理，上机分析，样品中未检出诺西那生。对此样品进行加标实验，加标量为 10、50、400 ng/mL。重复实验 3 次，加标结果如表 3 所示，此方法回收率及重复性良好。

表 3. 血浆样品中诺西那生定量及加标结果

No.	化合物名	样品浓度 (ng/mL)	加标量 (10 ng/mL)		加标量 (50 ng/mL)		加标量 (400 ng/mL)	
			回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
1	诺西那生	N.D.	91.0	8.16	110.7	4.92	106.36	3.37

备注：N.D.表示未检出

3. 结论

本文采用岛津超高效生物惰性液相系统与三重四极杆质谱仪联用建立了血浆中寡核苷酸药物诺西那生的分析方法。该方法灵敏度高、耐用性好，无残留，加标回收率稳定可靠，可用于实际生物样本基质中寡核苷酸药物诺西那生的定量分析。

**附录 ICH M10 2020_M10 Bioanalytical
Method Validation and Study Sample
Analysis (节选)**



**M10 BIOANALYTICAL
METHOD VALIDATION
AND STUDY SAMPLE
ANALYSIS**
Guidance for Industry

**U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)**

**November 2022
ICH**

M10 BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS

Guidance for Industry

*Additional copies are available from:
Office of Communications, Division of Drug Information
Center for Drug Evaluation and Research
Food and Drug Administration
10001 New Hampshire Ave., Hillandale Bldg., 4th Floor
Silver Spring, MD 20993-0002
Phone: 855-543-3784 or 301-796-3400; Fax: 301-431-6353
Email: druginfo@fda.hhs.gov*

*<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>
and/or*

*Office of Communication, Outreach and Development
Center for Biologics Evaluation and Research
Food and Drug Administration
10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Room 3128
Silver Spring, MD 20993-0002
Phone: 800-835-4709 or 240-402-8010
Email: ocod@fda.hhs.gov*

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics/biologics-guidances>

**U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)**

**November 2022
ICH**

Contains Nonbinding Recommendations

FOREWORD

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) has the mission of achieving greater regulatory harmonization worldwide to ensure that safe, effective, and high-quality medicines are developed, registered, and maintained in the most resource-efficient manner. By harmonizing the regulatory expectations in regions around the world, ICH guidelines have substantially reduced duplicative clinical studies, prevented unnecessary animal studies, standardized safety reporting and marketing application submissions, and contributed to many other improvements in the quality of global drug development and manufacturing and the products available to patients.

ICH is a consensus-driven process that involves technical experts from regulatory authorities and industry parties in detailed technical and science-based harmonization work that results in the development of ICH guidelines. The commitment to consistent adoption of these consensus-based guidelines by regulators around the globe is critical to realizing the benefits of safe, effective, and high-quality medicines for patients as well as for industry. As a Founding Regulatory Member of ICH, the Food and Drug Administration (FDA) plays a major role in the development of each of the ICH guidelines, which FDA then adopts and issues as guidance to industry.

Contains Nonbinding Recommendations

TABLE OF CONTENTS

I.	INTRODUCTION (1)	1
A.	Objective (1.1)	1
B.	Background (1.2)	1
C.	Scope (1.3)	2
II.	GENERAL PRINCIPLES (2)	3
A.	Method Development (2.1)	3
B.	Method Validation (2.2)	3
1.	<i>Full Validation (2.2.1)</i>	3
2.	<i>Partial Validation (2.2.2)</i>	4
3.	<i>Cross Validation (2.2.3)</i>	4
III.	CHROMATOGRAPHY (3)	4
A.	Reference Standards (3.1)	4
B.	Validation (3.2)	5
1.	<i>Selectivity (3.2.1)</i>	5
2.	<i>Specificity (3.2.2)</i>	6
3.	<i>Matrix Effect (3.2.3)</i>	7
4.	<i>Calibration Curve and Range (3.2.4)</i>	7
5.	<i>Accuracy and Precision (3.2.5)</i>	8
6.	<i>Carryover (3.2.6)</i>	9
7.	<i>Dilution Integrity (3.2.7)</i>	9
8.	<i>Stability (3.2.8)</i>	10
9.	<i>Reinjection Reproducibility (3.2.9)</i>	12
C.	Study Sample Analysis (3.3)	13
1.	<i>Analytical Run (3.3.1)</i>	13
2.	<i>Acceptance Criteria for an Analytical Run (3.3.2)</i>	14
3.	<i>Calibration Range (3.3.3)</i>	15
4.	<i>Reanalysis of Study Samples (3.3.4)</i>	15
5.	<i>Reinjection of Study Samples (3.3.5)</i>	16
6.	<i>Integration of Chromatograms (3.3.6)</i>	17
IV.	LIGAND BINDING ASSAYS (4)	17
A.	Key Reagents (4.1)	17
1.	<i>Reference Standard (4.1.1)</i>	17
2.	<i>Critical Reagents (4.1.2)</i>	17
B.	Validation (4.2)	18
1.	<i>Specificity (4.2.1)</i>	18
2.	<i>Selectivity (4.2.2)</i>	19
3.	<i>Calibration Curve and Range (4.2.3)</i>	19
4.	<i>Accuracy and Precision (4.2.4)</i>	20
5.	<i>Carryover (4.2.5)</i>	21
6.	<i>Dilution Linearity and Hook Effect (4.2.6)</i>	21
7.	<i>Stability (4.2.7)</i>	22

Contains Nonbinding Recommendations

C.	Study Sample Analysis (4.3)	23
1.	<i>Analytical Run (4.3.1)</i>	23
2.	<i>Acceptance Criteria for an Analytical Run (4.3.2)</i>	23
3.	<i>Calibration Range (4.3.3)</i>	24
4.	<i>Reanalysis of Study Samples (4.3.4)</i>	25
V.	INCURRED SAMPLE REANALYSIS (5)	26
VI.	PARTIAL AND CROSS VALIDATION (6)	27
A.	Partial Validation (6.1)	27
B.	Cross Validation (6.2)	28
VII.	ADDITIONAL CONSIDERATIONS (7)	29
A.	Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1)	29
1.	<i>Quality Control Samples for Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1.1)</i> ..	31
2.	<i>Selectivity, Recovery, and Matrix Effects for Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1.2)</i>	31
3.	<i>Parallelism for Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1.3)</i>	32
4.	<i>Accuracy and Precision for Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1.4)</i>	32
5.	<i>Stability for Methods for Analytes That Are Also Endogenous Molecules (7.1.5)</i>	33
B.	Parallelism (7.2)	33
C.	Recovery (7.3)	33
D.	Minimum Required Dilution (7.4)	34
E.	Commercial and Diagnostic Kits (7.5)	34
F.	New or Alternative Technologies (7.6)	35
1.	<i>Dried Matrix Methods (7.6.1)</i>	35
VIII.	DOCUMENTATION (8)	36
A.	Summary Information (8.1)	36
B.	Documentation for Validation and Bioanalytical Reports (8.2)	37
	GLOSSARY	45

M10 BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS Guidance for Industry¹

This guidance represents the current thinking of the Food and Drug Administration (FDA or Agency) on this topic. It does not establish any rights for any person and is not binding on FDA or the public. You can use an alternative approach if it satisfies the requirements of the applicable statutes and regulations. To discuss an alternative approach, contact the FDA office responsible for this guidance as listed on the title page.

I. INTRODUCTION (1)²

A. Objective (1.1)

This guidance is intended to provide recommendations for the validation of bioanalytical methods for chemical and biological drug quantification and their application in the analysis of study samples. Adherence to the principles presented in this guidance will ensure the quality and consistency of the bioanalytical data in support of the development and market approval of both chemical and biological drugs.

The objective of the validation of a bioanalytical method is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. You may use an alternative approach from the recommendations in this guidance if it satisfies the requirements of applicable statutes and regulations. Alternative approaches should be supported by appropriate scientific justification. Applicants are encouraged to consult the regulatory authority(ies) regarding significant changes in method validation approaches when an alternate approach is proposed or taken. This guidance replaces the ICH draft guidance for industry *M10 Bioanalytical Method Validation*, issued on June 27, 2019.³

B. Background (1.2)

Concentration measurements of chemical and biological drug(s) and their metabolite(s) in biological matrices are an important aspect of drug development. The results of studies employing such methods contribute to regulatory decisions regarding the safety and efficacy of

¹ This guidance was developed within an Expert Working Group of the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH process. This document was endorsed by the Regulatory Members of the ICH Assembly at *Step 4* of the ICH process on May 24, 2022.

² The numbers in parentheses reflect the organizational breakdown of the document endorsed by the Regulatory Members of the ICH Assembly at *Step 4* of the ICH process, May 24, 2022.

³ We update guidances periodically. For the most recent version of a guidance, check the FDA guidance web page at <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>.

Contains Nonbinding Recommendations

drug products. It is therefore critical that the bioanalytical methods used are well characterized, appropriately validated, and documented in order to ensure reliable data to support regulatory decisions.

This guidance intends to facilitate development of drugs in accordance with the principles of the 3Rs (Reduce, Refine, Replace) for animal studies, where valid.

C. Scope (1.3)

This guidance describes the validation of bioanalytical methods and study sample analysis that are expected to support regulatory decisions. The guidance is applicable to the bioanalytical methods used to measure concentrations of chemical and biological drug(s) and their metabolite(s) in biological samples (e.g., blood, plasma, serum, other body fluids or tissues) obtained in nonclinical toxicokinetic (TK) studies conducted according to the principles of Good Laboratory Practice (GLP), nonclinical pharmacokinetic (PK) studies conducted as surrogates for clinical studies, and all phases of clinical trials, including comparative bioavailability/bioequivalence (BA/BE) studies, in regulatory submissions. Full method validation is recommended for the primary matrix intended to support regulatory submissions. Additional matrices should be validated as necessary.

For studies that are not submitted for regulatory approval or not considered for regulatory decisions regarding safety, efficacy, or labeling (e.g., exploratory investigations), applicants may decide on the level of qualification that supports their own internal decision-making.

The information in this guidance applies to the quantitative analysis by ligand binding assays (LBAs) and chromatographic methods such as liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC), which are typically used in combination with mass spectrometry (MS) detection.

For studies that are subject to GLP or Good Clinical Practice (GCP) requirements, the bioanalysis of study samples must conform to those requirements. The bioanalysis of biomarkers and bioanalytical methods used for the assessment of immunogenicity are not within the scope of this guidance.

In general, FDA's guidance documents do not establish legally enforceable responsibilities. Instead, guidances describe the Agency's current thinking on a topic and should be viewed only as recommendations, unless specific regulatory or statutory requirements are cited. The use of the word should in Agency guidances means that something is suggested or recommended, but not required.

Contains Nonbinding Recommendations

II. GENERAL PRINCIPLES (2)

A. Method Development (2.1)

The purpose of bioanalytical method development is to define the design, operating conditions, limitations, and suitability of the method for its intended purpose and to ensure that the method is ready for validation.

Before or during the development of a bioanalytical method, the applicant is encouraged to, if feasible, understand the analyte of interest (e.g., the physicochemical properties of the drug, in vitro and in vivo metabolism, preferential distribution between red blood cells and plasma, and protein binding) and consider aspects of any prior analytical methods that may be applicable.

Method development involves identifying the procedures and conditions involved with quantifying the analyte. Method development can include the characterization of the following bioanalytical elements: reference standards, critical reagents, calibration curve, quality control samples (QCs), selectivity and specificity, sensitivity, accuracy, precision, recovery, stability of the analyte, and minimum required dilution (MRD).

Bioanalytical method development does not require extensive record keeping or notation. Once the method has been developed, bioanalytical method validation proves that the method is suited to the analysis of the study samples.

If a problem is encountered with the method during the analysis of nonclinical or clinical study samples that requires that the analysis be stopped, any changes to the method and the rationale should be documented.

B. Method Validation (2.2)

1. Full Validation (2.2.1)

Bioanalytical method validation is important to ensure the acceptability of assay performance and the reliability of analytical results. A bioanalytical method is defined as a set of procedures used for measuring analyte concentrations in biological samples. A full validation of a bioanalytical method should be performed when establishing a bioanalytical method for the quantification of an analyte in clinical and in applicable nonclinical studies. Full validation should also be performed when implementing an analytical method that is reported in the literature and when a commercial kit is repurposed for bioanalytical use in drug development. Usually, one analyte has to be determined, but on occasion it may be appropriate to measure more than one analyte. This may involve two different drugs, a parent drug with its metabolites or the enantiomers or isomers of a drug. In these cases, the principles of validation and analysis apply to all analytes of interest. For chromatographic methods, a full validation should include the following elements, unless otherwise justified: selectivity, specificity, matrix effect, calibration curve (response function), range (lower limit of quantification (LLOQ) to upper limit

Contains Nonbinding Recommendations

of quantification (ULOQ)), accuracy, precision, carryover, dilution integrity, stability, and reinjection reproducibility.

For LBAs, the following elements should be evaluated, unless otherwise justified: specificity, selectivity, calibration curve (response function), range (LLOQ to ULOQ), accuracy, precision, carryover, dilution linearity, and stability. If necessary, parallelism can be conducted when appropriate study samples are available.

The assessments that are performed during validation should be relevant to the sample analysis workflow. The matrix used for bioanalytical method validation should be the same as the matrix of the study samples, including anticoagulants and additives. In cases in which it may be difficult to obtain an identical matrix to that of the study samples (e.g., rare matrices such as tissue, cerebrospinal fluid, bile or in cases where free drug is measured), surrogate matrices may be acceptable for analytical method validation.

The choice of surrogate matrix should be scientifically justified. Matrix differences within species (e.g., age, ethnicity, sex) are generally not considered different when validating a method.

A specific, detailed, written description of the bioanalytical method and validation procedure should be established *a priori*. This description may be in the form of a protocol, study plan, report, notebook, or Standard Operating Procedure (SOP).

2. *Partial Validation (2.2.2)*

Modifications to a fully validated analytical method may be evaluated by partial validation. Partial validation can range from as little as one accuracy and precision determination to a nearly full validation (refer to section VI.A (6.1)). The items in a partial validation should be determined according to the extent and nature of the changes made to the method.

3. *Cross Validation (2.2.3)*

Cross validation is required to demonstrate how the reported data are related when multiple bioanalytical methods and/or multiple bioanalytical laboratories are involved (refer to section VI.B (6.2)).

III. CHROMATOGRAPHY (3)

A. Reference Standards (3.1)

During method validation and the analysis of study samples, a blank biological matrix is spiked with the analyte(s) of interest using solutions of reference standard(s) to prepare calibration standards and QCs. Calibration standards and QCs should be prepared from separate stock solutions. However, calibration standards and QCs may be prepared from the same stock

Contains Nonbinding Recommendations

solution provided the accurate preparation and stability of the stock solution should have been verified.

A suitable internal standard (IS) should be added to all calibration standards, QCs, and study samples during sample processing. The absence of an IS should be justified.

It is important that the reference standard is well characterized and the quality (e.g., purity, identity) of the reference standard and the suitability of the IS is ensured, as the quality will affect the outcome of the analysis and, therefore, the study data. The reference standard used during validation and study sample analysis should be obtained from an authentic and traceable source. The reference standard should be identical to the analyte. If this is not possible, an established form (e.g., salt or hydrate) of known quality should be used.

Suitable reference standards include compendial standards, commercially available standards or sufficiently characterized standards prepared in-house or by an external organization. A certificate of analysis (CoA) or an equivalent alternative is recommended to ensure quality and to provide information on the purity, storage conditions, retest/expiration date and batch number of the reference standard.

A CoA is not required for the IS as long as the suitability for use is demonstrated, e.g., a lack of analytical interference is shown for the substance itself or any impurities thereof.

When MS detection is used, the use of the stable isotope-labeled analyte as the IS is recommended whenever possible. However, it is important that the labeled standard is of high isotope purity and that no isotope exchange reaction occurs. The presence of unlabeled analyte should be checked and if unlabeled analyte is detected, the potential influence should be evaluated during method validation.

Stock and working solutions should only be prepared from reference standards that are within the stability period as documented in the CoA (either expiration date or the retest date).

B. Validation (3.2)

1. Selectivity (3.2.1)

Selectivity is the ability of an analytical method to differentiate and measure the analyte in the presence of potential interfering substances in the blank biological matrix.

Selectivity should be evaluated using blank samples (matrix samples processed without addition of an analyte or IS) obtained from at least six individual sources/lots (non-hemolyzed and non-lipemic). Use of fewer sources may be acceptable in the case of rare matrices. Selectivity for the IS should also be evaluated.

The evaluation of selectivity should demonstrate that no significant response attributable to interfering components is observed at the retention time(s) of the analyte or the IS in the blank samples. Responses attributable to interfering components should not be more than 20% of the

Contains Nonbinding Recommendations

analyte response at the LLOQ and not more than 5% of the IS response in the LLOQ sample for each matrix.

For the investigation of selectivity in lipemic matrices at least one source of matrix should be used. To be scientifically meaningful, the matrix used for these tests should be representative as much as possible of the expected study samples. A naturally lipemic matrix with abnormally high levels of triglycerides should be obtained from donors. Although it is recommended to use lipemic matrix from donors, if this is difficult to obtain, matrix can be spiked with triglycerides even though it may not be representative of study samples. However, if the drug impacts lipid metabolism or if the intended patient population is hyperlipidemic, the use of spiked samples is discouraged. This evaluation is not necessary for nonclinical studies unless the drug impacts lipid metabolism or is administered in a particular animal strain that is hyperlipidemic.

For the investigation of selectivity in hemolyzed matrices at least one source of matrix should be used. Hemolyzed matrices should be obtained by spiking matrix with hemolyzed whole blood (at least 2% V/V) to generate a visibly detectable hemolyzed sample.

2. *Specificity (3.2.2)*

Specificity is the ability of a bioanalytical method to detect and differentiate the analyte from other substances, including its related substances (e.g., substances that are structurally similar to the analyte, metabolites, isomers, impurities, degradation products formed during sample preparation, or concomitant medications that are expected to be used in the treatment of patients with the intended indication).

If the presence of related substances is anticipated in the biological matrix of interest, the impact of such substances should be evaluated during method validation, or alternatively, in the pre-dose study samples. In the case of LC-MS based methods, to assess the impact of such substances, the evaluation may include comparing the molecular weight of a potential interfering related substance with the analyte and chromatographic separation of the related substance from the analyte.

Responses detected and attributable to interfering components should not be more than 20% of the analyte response at the LLOQ and not more than 5% of the IS response in the LLOQ sample.

The possibility of back-conversion of a metabolite into the parent analyte during the successive steps of the analysis (including extraction procedures or in the MS source) should also be evaluated when relevant (e.g., potentially unstable metabolites such as ester analytes to ester/acidic metabolites, unstable N-oxides or glucuronide metabolites, lactone-ring structures). It is acknowledged that this evaluation will not be possible in the early stages of drug development of a new chemical entity when the metabolism is not yet evaluated. However, this issue should be investigated, and partial validation performed, if needed. The extent of back-

Contains Nonbinding Recommendations

conversion, if any, should be established and the impact on the study results should be discussed in the Bioanalytical Report.

3. *Matrix Effect (3.2.3)*

A matrix effect is defined as an alteration of the analyte response due to interfering and often unidentified component(s) in the sample matrix. During method validation the matrix effect between different independent sources/lots should be evaluated.

The matrix effect should be evaluated by analyzing at least three replicates of low and high QCs, each prepared using matrix from at least six different sources/lots. For each individual matrix sources/lots evaluated, the accuracy should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration and the precision (percent coefficient of variation (%CV)) should not be greater than 15%. Use of fewer sources/lots may be acceptable in the case of rare matrices.

The matrix effect should also be evaluated in relevant patient populations or special populations (e.g., hepatically impaired or renally impaired) when available. An additional evaluation of the matrix effect is recommended using hemolyzed or lipemic matrix samples during method validation on a case-by-case basis, especially when these conditions are expected to occur within the study.

4. *Calibration Curve and Range (3.2.4)*

The calibration curve demonstrates the relationship between the nominal analyte concentration and the response of the analytical platform to the analyte. Calibration standards, prepared by spiking matrix with a known quantity of analyte(s), span the calibration range and comprise the calibration curve. Calibration standards should be prepared in the same biological matrix as the study samples. The calibration range is defined by the LLOQ, which is the lowest calibration standard, and the ULOQ, which is the highest calibration standard. There should be one calibration curve for each analyte studied during method validation and for each analytical run.

A calibration curve should be generated with a blank sample, a zero sample (blank sample spiked with IS), and at least six concentration levels of calibration standards, including the LLOQ and the ULOQ.

A simple regression model that adequately describes the concentration-response relationship should be used. The selection of the regression model should be directed by written procedures. The regression model, weighting scheme, and transformation should be determined during the method validation. Blank and zero samples should not be included in the determination of the regression equation for the calibration curve. Each calibration standard may be analyzed in replicate, in which case data from all acceptable replicates should be used in the regression analysis.

The calibration curve parameters should be reported (e.g., slope and intercept in the case of a linear model). The back-calculated concentrations of the calibration standards should be presented together with the calculated mean accuracy and precision values. All acceptable curves

Contains Nonbinding Recommendations

obtained during validation, based on a minimum of three independent runs over several days, should be reported. The accuracy of the back-calculated concentrations of each calibration standard should be within $\pm 20\%$ of the nominal concentration at the LLOQ and within $\pm 15\%$ at all the other levels. At least 75% of the calibration standards with a minimum of six calibration standard levels should meet the above criteria.

In the case that replicates are used, the criteria (within $\pm 15\%$ or $\pm 20\%$ for LLOQ) should also be fulfilled for at least 50% of the calibration standards tested per concentration level. In the case that a calibration standard does not comply with these criteria, this calibration standard sample should be rejected, and the calibration curve without this calibration standard should be reevaluated, including regression analysis. For accuracy and precision runs, if all replicates of the LLOQ or the ULOQ calibration standard in a run are rejected, then the run should be rejected, the possible source of the failure should be determined and the method revised, if necessary. If the next validation run also fails, then the method should be revised before restarting validation.

The calibration curve should be prepared using freshly spiked calibration standards in at least one assessment. Subsequently, frozen calibration standards can be used within their defined period of stability.

5. *Accuracy and Precision (3.2.5)*

a. *Preparation of quality control samples (3.2.5.1)*

The QCs are intended to mimic study samples and should be prepared by spiking matrix with a known quantity of analyte, storing them under the conditions anticipated for study samples and analyzing them to assess the validity of the analytical method.

Calibration standards and the QCs should be prepared from separate stock solutions in order to avoid biased estimations which are not related to the analytical performance of the method. If calibration standards and the QCs may be prepared from the same stock solution, the accuracy and stability of the stock solution should be verified. A single source of blank matrix may be used, which should be free of interference or matrix effects, as described in section III.B.3 (3.2.3).

During method validation the QCs for accuracy and precision runs should be prepared at a minimum of 4 concentration levels within the calibration curve range: the LLOQ, within 3 times of the LLOQ (low QC), around 30% to 50% of the calibration curve range (medium QC) and at least 75% of the ULOQ (high QC).

For non-accuracy and precision validation runs, low, medium, and high QCs may be analyzed in duplicate. These QCs, along with the calibration standards, will provide the basis for the acceptance or rejection of the run.

b. *Evaluation of accuracy and precision (3.2.5.2)*

Contains Nonbinding Recommendations

Accuracy and precision should be determined by analyzing the QCs within each run (within-run) and in different runs (between-run). Accuracy and precision should be evaluated using the same runs and data.

Within-run accuracy and precision should be evaluated by analyzing at least five replicates at each QC concentration level in each analytical run. Between-run accuracy and precision should be evaluated by analyzing each QC concentration level in at least three analytical runs over at least two days. To enable the evaluation of any trends over time within one run, it is recommended to demonstrate accuracy and precision of the QCs over at least one of the runs in a size equivalent to a prospective analytical run of study samples. Reported method validation data and the determination of accuracy and precision should include all results obtained, including individual QCs outside of the acceptance criteria, except those cases where errors are obvious and documented. Within-run accuracy and precision data should be reported for each run. If the within-run accuracy or precision criteria are not met in all runs, an overall estimate of within-run accuracy and precision for each QC level should be calculated. Between-run (intermediate) precision and accuracy should be calculated by combining the data from all runs.

The calibration curves for these assessments should be prepared using freshly spiked calibration standards in at least one run. If freshly spiked calibration standards are not used in the other runs, stability of the frozen calibration standards should be demonstrated.

The accuracy at each concentration level should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration, except at the LLOQ, where it should be within $\pm 20\%$. The precision (%CV) of the concentrations determined at each level should not exceed 15%, except at the LLOQ, where it should not exceed 20%. For non-accuracy and precision validation runs, at least 2/3 of the total QCs and at least 50% at each concentration level should be within $\pm 15\%$ of the nominal values.

6. *Carryover (3.2.6)*

Carryover is an alteration of a measured concentration due to residual analyte from a preceding sample that remains in the analytical instrument.

Carryover should be assessed and minimized during method development. During validation carryover should be assessed by analyzing blank samples after the calibration standard at the ULOQ. Carryover in the blank samples following the highest calibration standard should not be greater than 20% of the analyte response at the LLOQ and 5% of the response for the IS. If it appears that carryover is unavoidable, study samples should not be randomized. Specific measures should be considered, validated, and applied during the analysis of the study samples, so that carryover does not affect accuracy and precision. This could include the injection of blank sample(s) after samples with an expected high concentration, before the next study sample.

7. *Dilution Integrity (3.2.7)*

Dilution integrity is the assessment of the sample dilution procedure, when required, to confirm that it does not impact the accuracy and precision of the measured concentration of the analyte.

Contains Nonbinding Recommendations

The same matrix from the same species used for preparation of the QCs should be used for dilution.

Dilution QCs should be prepared with analyte concentrations in matrix that are greater than the ULOQ and then diluted with blank matrix. At least five replicates per dilution factor should be tested in one run to determine if concentrations are accurately and precisely measured within the calibration range. The dilution factor(s) and concentrations applied during study sample analysis should be within the range of the dilution factors and concentrations evaluated during validation. The mean accuracy of the dilution QCs should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration and the precision (%CV) should not exceed 15%.

In the cases of rare matrices, use of a surrogate matrix for dilution may be acceptable. It should be demonstrated that this does not affect precision and accuracy.

8. *Stability (3.2.8)*

Stability evaluations should be carried out to ensure that every step taken during sample preparation, processing, and analysis as well as the storage conditions used do not affect the concentration of the analyte.

The storage and analytical conditions applied to the stability tests, such as the sample storage times and temperatures, sample matrix, anticoagulant and container materials, should reflect those used for the study samples. Reference to data published in the literature is not considered sufficient. Validation of storage periods should be performed on QCs that have been stored for a time that is equal to or longer than the study sample storage periods.

Stability of the analyte in the matrix is evaluated using low and high concentration QCs. Aliquots of the low and high QCs are analyzed at time zero and after the applied storage conditions that are to be evaluated. One bulk QC should be prepared at each concentration level. For each concentration tested, the bulk sample should be divided into a minimum of three aliquots that will be stored, stressed, and analyzed.

The QCs should be analyzed against a calibration curve, obtained from freshly spiked calibration standards in a run with its corresponding freshly spiked QCs or QCs for which stability has been proven. The mean concentration at each QC level should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration. If the concentrations of the study samples are consistently higher than the ULOQ of the calibration range, the concentration of the high QC should be adjusted to reflect these higher concentrations. It is recognized that this may not be possible in nonclinical studies due to solubility limitations.

For fixed dose combination products and specifically labeled drug regimens, the freeze-thaw, bench top, and long-term stability tests of an analyte in matrix should be conducted with the matrix spiked with all of the dosed compounds.

Contains Nonbinding Recommendations

The following stability tests should be evaluated:

(1) Stability of the Analyte in Matrix

Freeze-Thaw Stability in Matrix

To assess the impact of repeatedly removing samples from frozen storage, the stability of the analyte should be assessed after multiple cycles of freezing and thawing. Low and high QCs should be thawed and analyzed according to the same procedures as the study samples. QCs should be kept frozen for at least 12 hours between the thawing cycles. QCs for freeze-thaw stability should be assessed using freshly prepared calibration standards and QCs, or QCs for which stability has been proven. The number of freeze-thaw cycles validated should equal or exceed that of the freeze-thaw cycles undergone by the study samples, but a minimum of three cycles should be conducted.

Bench Top (Short-Term) Stability in Matrix

Bench top matrix stability experiments should be designed and conducted to cover the laboratory handling conditions for the study samples.

Low and high QCs should be thawed in the same manner as the study samples and kept on the bench top at the same temperature and for at least the same duration as the study samples.

The total time on the bench top should be concurrent; additive exposure to bench top conditions should not be used (i.e., time from each freeze-thaw evaluation should not be added up).

Long-Term Stability in Matrix

The long-term stability of the analyte in matrix stored in the freezer should be established. Low and high QCs should be stored in the freezer under the same storage conditions and at least for the same duration as the study samples.

For chemical drugs, the stability at one temperature (e.g., -20°C) can be extrapolated to lower temperatures (e.g., $-70^{\circ}/-80^{\circ}\text{C}$).

For biological drugs, a bracketing approach can be applied, e.g., in the case that the stability has been demonstrated at $-70^{\circ}/-80^{\circ}\text{C}$ and at -20°C , then it is not necessary to investigate the stability at temperatures in between those two points at which study samples will be stored.

(2) Stability of the Analyte in Processed Samples

The stability of processed samples, including the time until completion of analysis (in the autosampler/instrument), should be determined. For example:

Contains Nonbinding Recommendations

- Stability of the processed sample under the storage conditions to be used during the analysis of study samples (dry extract or in the injection phase)
- On-instrument/autosampler stability of the processed sample at injector or autosampler temperature

The total time that a processed sample is stored should be concurrent (i.e., autosampler and other storage times should not be added together).

(3) Stability of the Analyte and IS in Stock and Working Solutions

The stability of the stock and working solutions of the analyte and IS should be determined under the storage conditions used during the analysis of study samples by using the lowest and the highest concentrations of these solutions. They should be assessed using the response of the detector. Stability of the stock and working solutions should be tested with an appropriate dilution, taking into consideration the linearity and measuring range of the detector. If the stability varies with concentration, then the stability of all concentrations of the stock and working solutions should be assessed. If no isotopic exchange occurs for the stable isotopically labeled IS under the same storage conditions as the analyte for which the stability is demonstrated, then no additional stability determinations for the IS are necessary. If the reference standard expires, or it is past the retest date, the stability of the stock solutions made previously with this lot of reference standard are defined by the expiration or retest date established for the stock solution. Stock and working solutions should not be made from reference standards solely for extending the expiration date for the use of the reference standard.

In addition, the following test should be performed, if applicable:

(4) Stability of the Analyte in Whole Blood

Sufficient attention should be paid to the stability of the analyte in the sampled matrix (blood) directly after collection from subjects and prior to preparation for storage to ensure that the concentrations obtained by the analytical method reflect the concentrations of the analyte in the subject's blood at the time of sample collection.

If the matrix used is plasma, the stability of the analyte in blood should be evaluated during method development (e.g., using an exploratory method in blood) or during method validation. The results should be provided in the Validation Report.

9. *Reinjection Reproducibility (3.2.9)*

Reproducibility of the method is assessed by replicate measurements of the QCs and is usually included in the assessment of precision and accuracy. However, if samples could be reinjected (e.g., in the case of instrument interruptions or other reasons such as equipment failure), reinjection reproducibility should be evaluated to establish the viability of the processed samples and to support their storage prior to reinjection.

Contains Nonbinding Recommendations

Reinjection reproducibility is assessed by reinjecting a run that is comprised of calibration standards and a minimum of five replicates of the low, middle, and high QCs after storage. The precision and accuracy of the reinjected QCs establish the viability of the processed samples.

The results should be included in the Validation Report or provided in the Bioanalytical Report of the study where it was conducted.

C. Study Sample Analysis (3.3)

The analysis of study samples can be carried out after validation has been completed, however, it is understood that some parameters may be completed at a later stage (e.g., long-term stability). By the time the data are submitted to a regulatory authority, the bioanalytical method validation should have been completed. The study samples, QCs, and calibration standards should be processed in accordance with the validated analytical method. If system suitability is assessed, a predefined specific study plan, protocol, or SOP should be used. System suitability, including apparatus conditioning and instrument performance, should be determined using samples that are independent of the calibration standards and QCs for the run. Subject samples should not be used for system suitability. The IS responses of the study samples should be monitored to determine whether there is systemic IS variability. Refer to Table 1 for recommendations regarding documentation.

1. Analytical Run (3.3.1)

An analytical run should consist of a blank sample (processed matrix sample without analyte and without IS), a zero sample (processed matrix with IS), calibration standards at a minimum of six concentration levels, at least three levels of QCs (low, medium, and high) in duplicate (or at least 5% of the number of study samples, whichever is higher) and the study samples to be analyzed. The QCs should be interspersed in the run in such a way that the accuracy and precision of the whole run is ensured. Study samples should always be bracketed by QCs.

The calibration standards and QCs should be spiked independently using separately prepared stock solutions unless the accuracy and stability of the stock solutions have been verified. All samples (calibration standards, QCs, and study samples) should be processed and extracted as one single batch of samples in the order in which they are intended to be analyzed. Analyzing samples that were processed as several separate batches in a single analytical run is discouraged. If such an approach cannot be avoided, for instance due to bench top stability limitations, each batch of samples should include low, medium, and high QCs.

For comparative BA/BE studies, it is advisable to analyze all samples of one subject together in one analytical run to reduce variability.

The impact of any carryover that occurs during study sample analysis should be assessed and reported (refer to section III.B.6 (3.2.6)). If carryover is detected, its impact on the measured concentrations should be mitigated (e.g., non-randomization of study samples, injection of blank

Contains Nonbinding Recommendations

samples after samples with an expected high concentration) or the validity of the reported concentrations should be justified in the Bioanalytical Report.

2. Acceptance Criteria for an Analytical Run (3.3.2)

Criteria for the acceptance or rejection of an analytical run should be defined in the protocol, in the study plan, or in an SOP. In the case that a run contains multiple batches, acceptance criteria should be applied to the whole run and to the individual batches. It is possible for the run to meet acceptance criteria, even if a batch within that run is rejected for failing to meet the batch acceptance criteria. Calibration standards in a failed batch should not be used to support the acceptance of other batches within the analytical run.

The back-calculated concentrations of the calibration standards should be within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the LLOQ for which it should be within $\pm 20\%$. At least 75% of the calibration standard concentrations, which should include a minimum of six concentration levels, should fulfill these criteria. If more than six calibration standard levels are used and one of the calibration standards does not meet the criteria, this calibration standard should be rejected and the calibration curve without this calibration standard should be reevaluated, and a new regression analysis performed.

If the rejected calibration standard is the LLOQ, the new lower limit for this analytical run should be the next lowest acceptable calibration standard of the calibration curve. This new lower limit calibration standard should retain its original acceptance criteria (i.e., $\pm 15\%$). If the highest calibration standard is rejected, the ULOQ for this analytical run should be the next acceptable highest calibration standard of the calibration curve. The revised calibration range should cover at least three QC concentration levels (low, medium, and high). Study samples outside of the revised range should be reanalyzed. If replicate calibration standards are used and only one of the LLOQ or ULOQ standards fails, the calibration range is unchanged.

At least 2/3 of the total QCs and at least 50% at each concentration level should be within $\pm 15\%$ of the nominal values. If these criteria are not fulfilled the analytical run should be rejected. A new analytical batch should be prepared for all study samples within the failed analytical run for subsequent analysis. In the cases where the failure is due to an assignable technical cause, samples may be reinjected.

Analytical runs containing samples that are diluted and reanalyzed should include dilution QCs to verify the accuracy and precision of the dilution method during study sample analysis. The concentration of the dilution QCs should exceed that of the study samples being diluted (or of the ULOQ) and they should be diluted using the same dilution factor. If multiple dilution factors are used in one analytical run, then dilution QCs need only be diluted by the highest and lowest dilution factors. The within-run acceptance criteria of the dilution QC(s) will only affect the acceptance of the diluted study samples and not the outcome of the analytical run.

When several analytes are assayed simultaneously, there should be one calibration curve for each analyte studied. If an analytical run is acceptable for one analyte but has to be rejected for another analyte, the data for the accepted analyte should be used. The determination of the

Contains Nonbinding Recommendations

rejected analyte requires reextraction and analysis only for the analyte that is reanalyzed. Only data for this reanalyzed analyte needs to be reported.

The back-calculated concentrations of the calibration standards and QCs of passed and accepted runs should be reported. The overall (between-run) accuracy and precision of the QCs of all accepted runs should be calculated at each concentration level and reported in the analytical report (refer to section VIII. (8) Documentation and Table 1). If the overall mean accuracy and/or precision fails the 15% criterion, an investigation to determine the cause of the deviation should be conducted. In the case of comparative BA/BE studies, it may result in the rejection of the data.

3. Calibration Range (3.3.3)

If a narrow range of analyte concentrations of the study samples is known or anticipated before the start of study sample analysis, it is recommended to either narrow the calibration curve range, adapt the concentrations of the QCs, or add new QCs at different concentration levels as appropriate, to adequately reflect the concentrations of the study samples.

At the intended therapeutic dose(s), if an unanticipated clustering of study samples at one end of the calibration curve is encountered after the start of sample analysis, the analysis should be stopped and either the standard calibration range narrowed (i.e., partial validation), existing QC concentrations revised, or QCs at additional concentrations added to the original curve within the observed range before continuing with study sample analysis. It is not necessary to reanalyze samples analyzed before optimizing the calibration curve range or QC concentrations.

The same applies if a large number of the analyte concentrations of the study samples are above the ULOQ. The calibration curve range should be changed, if possible, and QC(s) added, or their concentrations modified. If it is not possible to change the calibration curve range or the number of samples with a concentration above the ULOQ is not large, samples should be diluted according to the validated dilution method.

At least two QC levels should fall within the range of concentrations measured in study samples. If the calibration curve range is changed, the bioanalytical method should be revalidated (partial validation) to verify the response function and to ensure accuracy and precision.

4. Reanalysis of Study Samples (3.3.4)

Possible reasons for reanalysis of study samples, the number of replicates, and the decision criteria to select the value to be reported should be predefined in the protocol, study plan, or SOP before the actual start of the analysis of the study samples. For study samples in which multiple analytes are being analyzed, a valid result for one analyte should not be rejected if the other analyte fails the acceptance criteria.

The number of samples (and percentage of total number of samples) that have been reanalyzed should be reported and discussed in the Bioanalytical Report. For comparative BA/BE studies, a separate table should report values from rejected runs.

Contains Nonbinding Recommendations

Some examples of reasons for study sample reanalysis are:

- Rejection of an analytical run because the run failed the acceptance criteria with regard to accuracy of the calibration standards and/or the precision and accuracy of the QCs
- IS response significantly different from the response for the calibration standards and QCs (as predefined in an SOP)
- The concentration obtained is above the ULOQ
- The concentration observed is below the revised LLOQ in runs where the lowest calibration standard has been rejected from a calibration curve, resulting in a higher LLOQ compared with other runs
- Improper sample injection or malfunction of equipment
- The diluted study sample is below the LLOQ
- Identification of quantifiable analyte levels in pre-dose samples, control, or placebo samples
- Poor chromatography (as predefined in an SOP)

For comparative BA/BE studies, reanalysis of study samples for a PK reason (e.g., a sample concentration does not fit with the expected profile) should not be done, as it may bias the study result.

Any reanalyzed samples should be identified in the Bioanalytical Report and the initial value, the reason for reanalysis, the values obtained in the reanalyzes, the final accepted value and a justification for the acceptance should be provided. Further, a summary table of the total number of samples that have been reanalyzed for each reason should be provided. In cases where the first analysis yields a nonreportable result, a single reanalysis is considered sufficient (e.g., concentration above the ULOQ or equipment malfunction). In cases where the value needs to be confirmed (e.g., pre-dose sample with measurable concentrations) replicate determinations are required if sample volume allows.

The safety of trial subjects should take precedence over any other aspect of the trial. Consequently, there may be other circumstances when it is necessary to reanalyze specific study samples for the purpose of a safety investigation.

5. Reinjection of Study Samples (3.3.5)

Reinjection of processed samples can be made in the case of equipment failure if reinjection reproducibility has been demonstrated during validation or provided in the Bioanalytical Report where it was conducted. Reinjection of a full analytical run or of individual calibration standards

Contains Nonbinding Recommendations

or QCs simply because the calibration standards or QCs failed, without any identified analytical cause, should not be done.

6. *Integration of Chromatograms (3.3.6)*

Chromatogram integration and reintegration should be described in a study plan, protocol, or SOP. Any deviation from the procedures described *a priori* should be discussed in the Bioanalytical Report. The list of chromatograms that required reintegration, including any manual integrations, and the reasons for reintegration should be included in the Bioanalytical Report. Original and reintegrated chromatograms and initial and repeat integration results should be kept for future reference and submitted in the Bioanalytical Report for comparative BA/BE studies.

IV. LIGAND BINDING ASSAYS (4)

A. Key Reagents (4.1)

1. *Reference Standard (4.1.1)*

The reference standard should be well characterized and documented (e.g., CoA and origin). A biological drug has a highly complex structure and its reactivity with binding reagents for bioanalysis may be influenced by a change in the manufacturing process of the drug substance. It is recommended that the manufacturing batch of the reference standard used for the preparation of calibration standards and QCs is derived from the same batch of drug substance as that used for dosing in the nonclinical and clinical studies whenever possible. If the reference standard batch used for bioanalysis is changed, bioanalytical evaluation should be carried out with QCs from the original material and the new material prior to use to ensure that the performance characteristics of the method are within the acceptance criteria.

2. *Critical Reagents (4.1.2)*

Critical reagents, including binding reagents (e.g., binding proteins, aptamers, antibodies, or conjugated antibodies) and those containing enzymatic moieties, have direct impact on the results of the assay and, therefore, their quality should be assured. Critical reagents bind the analyte and, upon interaction, lead to an instrument signal corresponding to the analyte concentration. The critical reagents should be identified and defined in the assay method.

Reliable procurement of critical reagents, whether manufactured in-house or purchased commercially, should be considered early in method development. The data sheet for the critical reagent should include at a minimum identity, source, batch/lot number, purity (if applicable), concentration (if applicable), and stability/retest date/storage conditions (refer to Table 1). Additional characteristics may be warranted.

A critical reagent lifecycle management procedure is necessary to ensure consistency between the original and new batches of critical reagents. Reagent performance should be evaluated using

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容, 以本版本为准, 资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。