

LC-MS/MS 法测定抗肿瘤药物中骨化三醇含量

LCMSMS-757

摘要： 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定某抗肿瘤药物中的骨化三醇含量。该方法在 5 min 内完成测试。方法学结果表明，骨化三醇在 0.1~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，仪器检出限为 0.01 ng/mL。0.25 ng/mL 标准溶液重复进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 0.669 % 和 2.63%。0.5 ng/mL 和 5 ng/mL 2 个水平浓度的加标回收率测试，平均回收率为 87.3-105.1%，相对标准偏差为 1.77-4.73%。该方法满足检测要求，能快速、有效的分析抗肿瘤药物中骨化三醇的含量。

关键词： 骨化三醇 三重四极杆质谱 维生素 D₃ 类似物

技术特点：

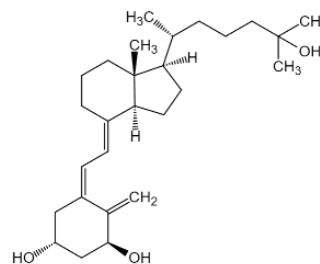
- ❖ 5 min 内完成骨化三醇物质快速检测。
- ❖ 骨化三醇基质灵敏度可达到 0.1 ng/mL。

骨化三醇 (Calcitriol) 为维生素 D₃ 经肝脏和肾脏代谢产生一种最强活性代谢产物。研究表明骨化三醇抗恶性肿瘤增生具有重要作用，主要作用机制包括：降低周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 活性、阻止生长因子产生促有丝分裂信号、调节蛋白激酶信号转导途径、抑制肿瘤细胞中端粒酶活性。

临床上有许多恶性肿瘤患者 (如骨髓瘤、乳腺癌、肾癌等) 治疗过程中常伴随骨化三醇联合使用，现有新的剂型会在药物表层涂敷一定量的骨化三醇药物，进而达到联合用药的目的，但骨化三醇浓度过高使用会引发高钙血症，血钙异常升高会造成心律失常、消化系统及泌尿系统的损伤、严重危及生命。对于提升血钙含量的物质骨化三醇及其类似物、在其复合制剂

中需严格监控其含量稳定性。

本文建立了 LC-MS/MS 法测定某抗肿瘤药物在介质溶出过程中骨化三醇的含量，为相关研究提供方法参考。



骨化三醇

实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A 5R
输液泵：	LC-30AD×2	柱温箱：	CTO-20AC
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8045
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.109		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (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:227-30048-02)

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B-0.1% 甲酸甲醇溶液
 进样体积：10 μ L 柱温：40°C
 流速：0.3 mL/min 洗针液：甲醇 / 水 = 1:1 (v:v)
 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

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.50	柱温箱	CTO.RVR	1*
2.00	泵	B Conc	95
3.00	泵	B Conc	95
5.00	柱温箱	CTO.RVR	0
3.50	泵	B Conc	30
5.00	控制器	STOP	

* 表示柱温箱柱后切换阀位置，1 代表进入质谱

质谱条件

离子化模式：ESI+ 雾化气流速：3.0 L/min
 接口电压：4 kV 干燥气流速：10.0 L/min
 喷针位置：+2 mm 加热气流速：10.0 L/min
 接口温度：300°C 碰撞气：氩气
 D L 温度：250°C 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 加热模块温度：500°C MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

中文名称	缩写	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
骨化三醇	Calc.	32222-06-3	399.25	135.15* 381.25	-15.0 -15.0	-21 -15	-30 -17

* 代表定量离子对。

■ 样品前处理

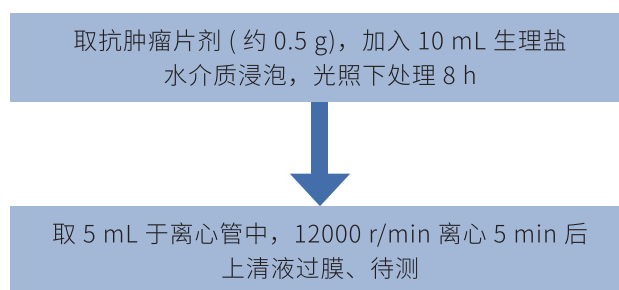


图 1 样品前处理步骤

■ 结果与讨论

3.1 标准样品谱图

骨化三醇出峰时间为 2.3 min，目标峰保留时间处，空白基质未见明显干扰。

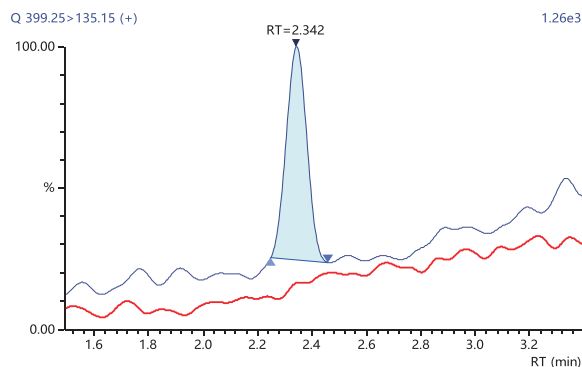


图 2 基质空白和 0.25 ng/mL 骨化三醇标准溶液 MRM 重叠色谱图

3.2 校准曲线和检出限

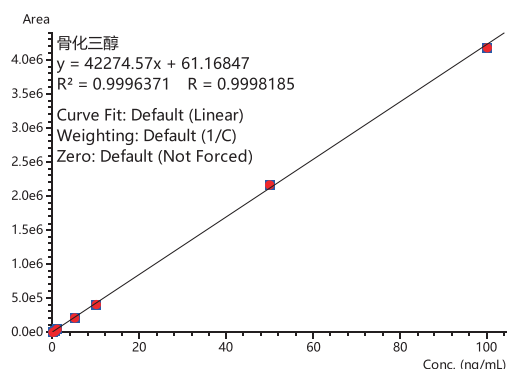


图 3 骨化三醇校准曲线 (0.1-100 ng/mL)

分别配制 0.1、1、5、10、50、100 ng/mL 的骨化三醇标准溶液，取 10 μ L 进样，以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，权重设置为 1/C，骨化三醇在 0.1~100 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。LabSolutions 软件采用 ASTM 的计算方式，以信噪比 S/N=3.3 和 10.0，分别计算检出限和定量限，检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.03 ng/mL。

3.3 重复性实验

取 0.25 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3 骨化三醇重复性结果 (n=6)

No.	保留时间 Min	保留时间 RSD (%)	峰面积	峰面积 RSD (%)
1	2.353	0.669	11287	2.63
2	2.344		11342	
3	2.344		11888	
4	2.309		11018	
5	2.345		11602	
6	2.344		11576	

3.4 加标回收率

将空白基质样品进行 0.5、5 ng/mL 浓度加标后，按照上述前处理方法处理后上机，平行 3 份样品考察回收率和 RSD，具体结果如下：骨化三醇的平均加标回收率为 87.3%-105.1%，RSD 为 1.77%-4.73%。

表 4 骨化三醇加标回收和精密度结果 (n=3)

化合物	添加浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
骨化三醇	0.50	0.433	87.3	4.73
		0.458		
		0.417		
	5.00	5.336	105.1	1.77
		5.153		
		5.274		

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪测定骨化三醇含量的方法。该方法在 5 min 内完成测试。方法学考察中，线性、灵敏度、重复性和加标回收率均满足检测需求，为相关骨化三醇含量检测研究提供参考。

岛津应用云

