

ICS 01.040.11

CCS C10/29

T/HBIQA

河北省检验检疫学会团体标准

T/HBIQA 0006—2024

人体血液中9种酪氨酸激酶类药物含量的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of nine tyrosine kinase drugs in human blood by HPLC-MS/MS

2024-08-15 发布

2024-10-15 实施

河北省检验检疫学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河北省检验检疫学会提出并归口。

本文件起草单位：河北省药品医疗器械检验研究院、河北科技大学。

本文件主要起草人：李挥、李怡霖、梁艳、宋莉、姜文。

人体血液中 9 种酪氨酸激酶类药物含量的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了人体血液中 9 种酪氨酸激酶类药物含量的高效液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于人体血液中替万替尼，LY2157299，索拉非尼，伦伐替尼，瑞戈非尼，卡博替尼，安罗替尼，阿帕替尼和吉非替尼含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品用甲醇提取，提取液加入无水硫酸镁盐析后，用 N-丙基乙二胺（PSA）吸附净化，液相色谱-质谱/质谱法测定，内标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 甲醇：色谱纯。

5.1.2 乙酸乙酯：色谱纯。

5.1.3 丙酮：色谱纯。

5.1.4 甲酸：色谱纯。

- 5.1.5 乙酸：色谱纯。
- 5.1.6 乙腈：色谱纯。
- 5.1.7 无水硫酸镁。
- 5.1.8 N-丙基乙二胺（PSA）。
- 5.1.9 标准品：替万替尼（CAS 号：1000873-98-2）、LY2157299（CAS 号：700874-72-2）、索拉非尼（CAS 号：284461-73-0）、伦伐替尼（CAS 号：417716-92-8）、瑞戈非尼（CAS 号：755037-03-7）、卡博替尼（CAS 号：1140909-48-3）、安罗替尼（CAS 号：1058156-90-3）、阿帕替尼（CAS 号：41567-78-6）、吉非替尼（CAS 号：184475-35-2）和普萘洛尔（CAS 号：525-66-6）纯度均 $\geq 98\%$ 。
- 5.1.10 混合标准储备溶液的配制：分别称取替万替尼，LY2157299，索拉非尼，伦伐替尼，瑞戈非尼，卡博替尼，安罗替尼，阿帕替尼和吉非替尼 1 mg（精确到 0.01 mg），置 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，分别配制成替万替尼，LY2157299，索拉非尼，伦伐替尼，瑞戈非尼，卡博替尼，安罗替尼，阿帕替尼和吉非替尼的储备溶液，于 -20°C 保存至分析。
- 5.1.11 标准中间溶液的配制：取 500 μL 标准储备溶液（5.1.10）至 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释，混匀，得到 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间溶液于 -20°C 保存备用。
- 5.1.12 内标储备液的配制：称取 1 mg（精确到 0.01 mg）普萘洛尔，置 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，得到 0.1 mg/mL 的内标储备液，于 -20°C 保存至分析。
- 5.1.13 0.1%（体积分数）甲酸水溶液：准确移取甲酸 1.0 mL 置于 1 L 量瓶中，用水定容，混匀。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 氮吹浓缩仪。
- 6.3 涡旋震荡仪。
- 6.4 电子分析天平（精度 0.01 mg）。
- 6.5 高速冷冻离心机（最高转速 22000 rpm）。

7 试样制备

全部血液样本充分混匀后，在 4°C 、3000 r/min 条件下离心 10 min，取管内上清液分装， -80°C 储存待测。

8 试验步骤

8.1 试样预处理

取200 μL 血液试样（7）加入5 mL离心管中，加入1.5 mL乙腈进行提取，并涡旋混匀30 s。然后，分别加入350 mg MgSO_4 和40 mg PSA进行盐析和净化。涡旋30 s后，12000 r/min离心10 min，取上清液1 mL，经0.22 μm 微孔膜过滤后移入离心管，室温下氮气吹干，加入200 μL 含有内标的甲醇溶液作为复溶溶剂，待测定。

8.2 标准曲线

取相应的空白样品，按照7步骤进行处理，用得到的空白样品提取液，将混合标准储备溶液逐级稀释，得到伦伐替尼，索拉非尼，卡博替尼，阿帕替尼，吉非替尼，瑞戈拉非尼，安罗替尼：0.1、0.2、0.5、1、2、5、8和10 ng/mL；替万替尼和LY2157299：1、2、3、10、20、50、80和100 ng/mL的系列混合标准工作溶液（内标普萘洛尔的浓度为100 ng/mL），浓度由低到高进行检测，以分析物与内标定量离子的峰面积比值对质量浓度作图，做出内标标准曲线回归方程。

8.3 仪器参考条件

8.3.1 液相色谱参考条件

- a. 色谱柱：Hypersil GOLD VANQUISH C18（100 \times 2.1 mm，1.9 μm ），或相当者。
- b. 流动相：A相为乙腈；B相为0.1%甲酸水溶液。
- c. 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 。
- d. 进样体积：5 μL 。
- e. 流速：0.3 mL/min。梯度洗脱程序见表1：

表1 梯度程序洗脱表

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	15	85
0.5	15	85
2	95	5
6	95	5
7	15	85
8	15	85
9	70	30

8.3.2 质谱参考条件

- a. 电离方式：电喷雾电离，正离子扫描模式。

- b. 电喷雾电压：3500 V。
- c. 鞘气流速：45 Arb。
- d. 辅助气流速：10 Arb。
- e. 离子传输温度：325°C。
- f. 雾化温度：350°C。
- e. 碰撞气：氩气。

其他质谱条件见附录 A。

8.4 测定

8.4.1 测定步骤

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中，得到 9 种酪氨酸酶类药物的质谱响应值，根据标准曲线得到待测液中 9 种酪氨酸酶类药物的浓度。样品溶液中各组分的响应值应在标准曲线的线性范围内，超过线性范围则应稀释后再进样测定（内标物根据测定结果，添加与稀释倍数相同倍数的内标量，开展前处理实验，稀释后再进样分析）。

8.4.2 定性判定

在相同条件测定样品溶液和标准溶液，如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准溶液中的某种组分峰的保留时间一致（变化范围在±2.5%），并且所选择的两对子离子的质荷比一致，样品溶液中定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液中定性离子的相对丰度进行比较时，相对偏差不超过表 2 规定的范围，则可判断样品中存在该组分。

9 种酪氨酸激酶标准物质的色谱图参见附录 B。

表 2 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.4.3 数据计算

血液样本中各药物浓度含量为：

$$X_i = \frac{\rho_i \times V_{\text{定容}} \times K}{V_{\text{试样}}}$$

式中：

X_i ——试样中待测组分含量，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

ρ_i ——由标准曲线得出的测试液中某种组分的质量浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

$V_{\text{定容}}$ ——定容体积，单位为毫升(mL)；

K ——稀释倍数；

$V_{\text{试样}}$ ——试样体积，单位为毫升(mL)。

8.5 空白试验

取空白血样，按 8.1-8.4 测定步骤进行。

8.6 定量限和重复性

8.6.1 定量限

本方法索拉非尼的定量限为 0.02 ng/mL，卡博替尼的定量限为 0.04 ng/mL，吉非替尼的定量限为 0.01 ng/mL，瑞戈非尼的定量限为 0.01 ng/mL，安罗替尼的定量限为 0.04 ng/mL，替万替尼的定量限为 0.4 ng/mL，LY2157299 的定量限为 0.2 ng/mL，伦伐替尼的定量限为 0.04 ng/mL，阿帕替尼的定量限为 0.02 ng/mL。

8.6.2 重复性

在重复性实验条件下获得两次独立实验结果的绝对差值不得超过算数平均值的 15%。

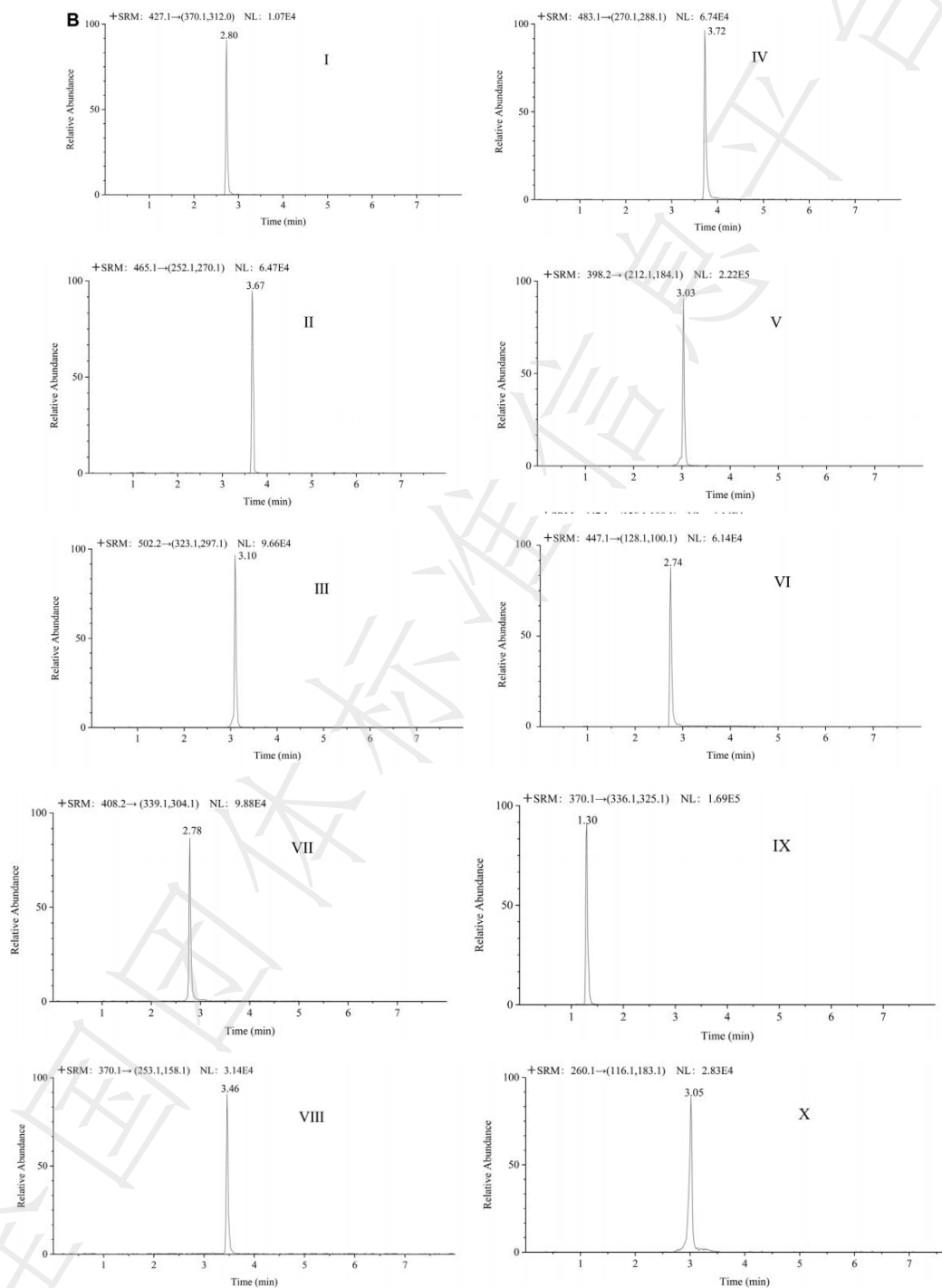
附录 A
(资料性行附录)
质谱参数

表A.1 目标物的质谱参数及参考保留时间

化合物	母离子 (m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压(V)	碰撞电压 (eV)	参考保留时 间(min)
伦伐替尼	427.1	370.1 ^a /312.0	102	27/43	2.80
索拉非尼	465.1	252.1 ^a /270.1	113	33/24	3.67
卡博替尼	502.2	323.1 ^a /297.1	139	37/35	3.10
瑞戈非尼	483.1	270.1 ^a /288.1	123	33/24	3.72
阿帕替尼	398.2	212.1 ^a /184.1	81	26/37	3.03
吉非替尼	447.1	128.1 ^a /100.1	75	24/47	2.74
安罗替尼	408.2	339.1 ^a /304.1	60	18/40	2.78
替万替尼	370.1	253.1 ^a /158.1	65	21/22	3.46
LY2157299	370.1	336.1 ^a /325.1	74	30/29	1.30
普萘洛尔 (内标)	260.1	116.1 ^a /183.1	53	18/18	3.05

^a代表定量离子

附录 B
(资料性附录)
多反应监测色谱图



图B. 1 9种酪氨酸激酶类抑制剂和普萘洛尔（内标）的多反应监测色谱图

乐伐替尼 (I)、索拉非尼 (II)、卡博扎替尼 (III)、瑞戈非尼 (IV)、阿帕替尼 (V)、吉非替尼 (VI)、安洛替尼 (VII)、替凡替尼 (VIII)、LY2157299 (IX) 和普萘洛尔 (X)