

## 用 HPLC – MS/MS 法测定人血浆中鲑降钙素的浓度

## Determination of salmon calcitonin concentration in human plasma by HPLC – MS/MS method

陈学义<sup>1,2</sup>, 举晓霞<sup>2</sup>, 王 颖<sup>2</sup>,  
石先凤<sup>2</sup>, 沈 虹<sup>2</sup>, 蔡兰兰<sup>2</sup>,  
魏秀岩<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院,  
辽宁 沈阳 110000; 2. 北京阳光德美医药科技有  
限公司, 北京 100071)

CHEN Xue – yi<sup>1,2</sup>, JU Xiao – xia<sup>2</sup>,  
WANG Ying<sup>2</sup>, SHI Xian – feng<sup>2</sup>,  
SHEN Hong<sup>2</sup>, CAI Lan – lan<sup>2</sup>,  
WEI Xiu – yan<sup>1</sup>

( 1. College of Life Sciences and  
Biopharmaceuticals, Shenyang Pharmace-  
utical University, Shenyang 110000,  
Liaoning Province, China; 2. Beijing  
Scinovo Pharmaceutical Technology Co. ,  
Ltd. , Beijing 100071, China)

作者简介: 陈学义 (1992 – ), 男, 本科, 初级药  
师, 主要从事临床药代动力学生物样  
品分析方面的研究和工作

通信作者: 魏秀岩, 副教授, 硕士生导师

MP: 13194225280

E – mail: wei\_xiuyan@163.com

**摘要:**目的 建立测定鲑降钙素血药浓度的高效液相色谱串联质谱 (HPLC – MS/MS) 方法。方法 用有机试剂沉淀血浆样品, 离心分离取上清, 再进行浓缩、复溶、进样, 用 phenomenex Jupiter<sup>®</sup> C4 – 300A 色谱柱 (2.1 mm × 50.0 mm, 5.0 μm) 进行色谱分离, 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) – 0.1% 甲酸乙腈 (B); 梯度洗脱, 流速为 0.50 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 50 °C, 进样量为 20 μL。以定制的同位素化合物为内标, 用电喷雾电离源, 用正电离模式, 以多反应监测的方式进行扫描。考察该方法的专属性、标准曲线、定量下限、精密度、准确度、回收率、基质效应和稳定性。结果 方法的专属性结果良好, 待测物与内标之间相互无干扰, 鲑降钙素的标准曲线线性范围为 2.00、4.00、10.00、50.00、100.00、200.00、360.00、400.00 pg · mL<sup>-1</sup>, 标准曲线为  $y = 2.98 \times 10^{-2}x + 5.30 \times 10^{-3}$  ( $R^2 = 0.9974$ ), 定量下限为 2.00 pg · mL<sup>-1</sup>。日内、日间相对标准偏差 (RSD) 均小于 15%, 提取回收率为 60.13% ~ 75.39% (RSD < 15%), 基质效应为 97.45% ~ 109.72% (RSD < 10%)。基质样品在实验台室温放置 24 h、在 -20 °C 和 -70 °C 下反复冻融进行 5 次、在 -20 °C 和 -70 °C 冻存 49 d 以及处理后样品在自动进样器中放置 333 h 的稳定性经验证, 准确度在 97.03% ~ 108.64%, 均稳定。结论 本研究建立的 HPLC – MS/MS 方法简单、快速、灵敏度高、专属性好, 可用于药代动力学研究中血浆样本的检测。

**关键词:** 鲑降钙素; 高效液相色谱串联质谱法; 血药浓度

**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.11.013

**中图分类号:** R97 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-6821(2026)11-1581-05

**Abstract: Objective** To establish a high – performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) method for simultaneous determination of calcitonin salmon in human plasma.

**Method** Precipitate plasma samples using organic reagents, then centrifuge and collect the supernatant, proceed with concentration, reconstitution, and sample injection, and a phenomenex Jupiter<sup>®</sup> C4 – 300A column (2.1 mm × 50.0 mm, 5.0 μm) was used for chromatographic separation. The mobile phase was 0.1% formic acid water (phase A) – 0.1% formic acid acetonitrile (phase B); gradient elution with a flow rate of 0.50 mL · min<sup>-1</sup>, column temperature 50 °C, injection volume 20 μL. A custom – labeled isotopic compound was used as the internal standard, scanning was carried out by means of multi reaction monitoring (MRM) in the positive ionization mode with an electric spray ionization source (ESI). Examine the specificity, standard curve, lower limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy, recovery rate, matrix effect, and stability of the method. **Result** The

method showed a good specificity results of the method, and there is no interference between the analyte and the internal standard. The linear range of the standard curves for the tested substances was 2.00、4.00、10.00、50.00、100.00、200.00、360.00、400.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , The standard curve was  $y = 2.98 \times 10^{-2}x + 5.30 \times 10^{-3}$  ( $R^2 = 0.9974$ ) and the lower limit of quantification (LLOQ) is 2.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The intra-day and inter day relative standard deviation (RSD) were both less than 15%, extraction recovery rates ranging from 60.13% to 75.39% ( $\text{RSD} < 15\%$ ), and matrix effects ranging from 97.45% to 109.72% ( $\text{RSD} < 10\%$ ). The stability of the matrix samples was verified by placing them at room temperature for 24 hours, repeatedly freezing and thawing at  $-20^\circ\text{C}$  and  $-70^\circ\text{C}$  for 5 times, freezing at  $-20^\circ\text{C}$  and  $-70^\circ\text{C}$  for 49 days, and placing the processed samples in an automatic sampler for 333 hours, with accuracy ranging from 97.03% to 108.64%, all stable. **Conclusion** The established HPLC-MS/MS method is simple, rapid, highly sensitive, and specific, and can be used for the detection of plasma samples in pharmacokinetic studies.

**Key words:** calcitonin salmon; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; plasma concentration

人源降钙素 (calcitonin, CT) 是由 32 个氨基酸组成的多肽类激素, 与靶细胞膜上的降钙素受体 (calcitonin receptor, CTR) 特异性结合, 发挥降低破骨细胞活性、减少破骨细胞数量、抑制破骨细胞吸收的作用。鲑鱼降钙素的生物活性比人源降钙素高 50 倍左右, 更有效的稳定血钙, 抑制小肠对于  $\text{Ca}^{2+}$  的吸收, 降低体内血  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 使血中游离  $\text{Ca}^{2+}$  向骨组织中转化; 并有效的抑制肾小管对钙和磷的重吸收, 增加尿  $\text{Ca}^{2+}$  流失, 并具有缓解骨痛的作用<sup>[1-2]</sup>。目前报道中, 检测人血浆中鲑鱼降钙素含量的方法有酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法<sup>[3]</sup> 和高效液相色谱串联质谱 (high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 法<sup>[4]</sup>, 相较于 HPLC-MS/MS 法, ELISA 法定量下限虽能够达到 2.50  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 但是特异性较差, 而 HPLC-MS/MS 法的灵敏度目前报道定量下限仅有 10.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 不能够满足药代研究需求。本研究建立高效液相色谱串联质谱法检测人血浆中的鲑降钙素的浓度, 定量下限为 2.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 并通过方法学验证确认各考察指标均符合相关指导原则的要求<sup>[5-6]</sup>, 以期为鲑降钙素的进一步临床研究提供支持。

## 材料与方法

### 1 材料

**试剂** 鲑降钙素, 规格: 每支 10 mg, 纯度: 89.2%, 批号: 140665-202305, 中国食品药品检定研究院生产; 鲑降钙素同位素内标, 规格: 每支 1.0 mg, 纯度: 95.72%, 批号: P240418-LR1158733, 岛吉尔生化(上海)有限公司生产; 甲醇、乙腈、异丙醇、乙酸、甲

酸, 均由美国 Fisher Scientific 公司提供。

**仪器** TRIPLE QUAD 7500 三重四极杆质谱仪, 美国 SCIEX 公司产品; LC-40D X3 液相色谱仪, 日本岛津公司产品; 3-18KS 型低温高速离心机, 美国 Sigma 公司产品; NV96-G-8 氮吹仪, 美国 Agela 公司产品。

### 2 测定方法、标准溶液配制与血浆样品处理

**色谱条件** 色谱柱: phenomenex Jupiter<sup>®</sup> C4-300A (2.0 mm  $\times$  50.0 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液, 柱温:  $50^\circ\text{C}$ , 进样器温度:  $4^\circ\text{C}$ , 进样量: 20.0  $\mu\text{L}$ , 流速: 0.50  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 梯度洗脱, 梯度程序为 0~0.5 min: 20% B, 0.5~2.0 min: 20%~33% B, 2.0~2.7 min: 33% B, 2.7~3.3 min: 33%~70% B, 3.3~4.0 min: 70% B, 4.1~5.0 min: 20% B。

**质谱条件** 应用 TRIQUAD 7500 三重四极杆串联质谱仪, 电喷雾电源用正电离模式, 以多反应监测的方式进行扫描。气帘气气压: 40 kPa, 碰撞气气压: 11 kPa, 离子源喷射电压: 3500 V, 离子源温度:  $500^\circ\text{C}$ , 雾化气气压: 75 kPa, 辅助气气压: 75 kPa。鲑降钙素和同位素内标的碰撞电压均为 33 V, 离子对分别为  $m/z$  858.92  $\rightarrow$  1106.999、 $m/z$  860.70  $\rightarrow$  1109.200。

**对照品和内标储备液的配制** 分别精密称取对照品及内标置于量瓶中, 甲醇: 水: 乙酸: 血浆 (30.0: 60.0: 10.0: 0.1,  $v:v:v:v$ ) 溶解并定容, 制成 1.00  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度的储备液。

**对照品标准曲线工作液、质控样品工作液和内标工作液的配制** 分别取储备液适量, 用甲醇: 水: 乙酸: 血浆 (30.0: 60.0: 10.0: 0.1,  $v:v:v:v$ ) 稀释系列质量浓度溶液, 标准曲线工作液中鲑降钙素的质量浓度为

40.0、80.0、200.0、1 000.0、2 000.0、4 000.0、7 200.0、8 000.0  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。质控样品工作液中鲑降钙素的质量浓度为120、2 400、6 400  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同位素内标用甲醇:水:乙酸:血浆(30.0:60.0:10.0:0.1,  $v:v:v:v$ )稀释至2 000  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的内标工作液。

**标准曲线样品和质控样品的配制** 取系列标准曲线工作液20  $\mu\text{L}$ 于管中,加入空白血浆380  $\mu\text{L}$ ,涡旋30 s,得到鲑降钙素的质量浓度分别2.00、4.00、10.00、50.00、100.00、200.00、360.00、400.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准曲线样品。取系列质控样品工作液20  $\mu\text{L}$ 于管中,加入空白血浆380  $\mu\text{L}$ ,涡旋30 s,得到鲑降钙素的质量浓度分别6.00、120.00、600.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控样品。

**血浆样品处理** 精密吸取血浆样品200  $\mu\text{L}$ ,置于96孔处理板中;分别加入内标工作液50  $\mu\text{L}$ 和沉淀溶液(0.1%甲酸乙腈溶液)800  $\mu\text{L}$ ,以800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 涡旋混合10 min;在低温(2~8  $^{\circ}\text{C}$ )下、以4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心10 min;吸取上清液800  $\mu\text{L}$ ,置于氮吹仪50  $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,再加入10%乙腈水溶液(含0.1%甲酸)150  $\mu\text{L}$ 复溶,以1 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 涡旋3 min,混合均匀;进样20.0  $\mu\text{L}$ 进行HPLC-MS/MS分析。

### 3 方法学考察

**专属性** 取6份不同来源的空白人血浆分别配制双空白(double blank, DB)样品,并配制只含有内标的零浓度(blank, BK)样品及仅含有各对照品的标准血浆样品,按“血浆样品处理”项下方法处理,分析得到相应色谱图。

**标准曲线与定量下限** 按“标准曲线样品和质控样品的配制”项处理,配置成系列标准血浆样品,鲑降钙素的质量浓度分别为2.00、4.00、10.00、50.00、100.00、200.00、360.00、400.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按照“血浆样品处理”项下方法处理,并测定峰面积。以待测物与内标的峰面积比( $y$ )对待测物浓度( $x$ )作图,以 $1/x^2$ 作为加权因子,使用加权最小二乘法进行线性的回归。并以 $S/N \geq 10$ ,准确度和精密度满足要求的标准曲线的最低浓度为定量下限。

**精密度与回收率** 按“标准曲线样品和质控样品的配制”项处理,配制成低、中、高3个质量浓度的质控样品,鲑降钙素的质量浓度分别为6.00、120.00、600.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按照“血浆样品处理”项下方法处理,在同1 d内处理并测定,考察日内精密度与准确度,连续3 d处理并测定,考察日间精密度与准确度。取空白人血浆,按“标准曲线样品和质控样品的配制”项处理,配制成低、中、高3个质量浓度的质控样品,

再按照“血浆样品处理”项样品处理方法进行处理,制备正常预处理的低、中、高质量浓度的模拟血浆样品,上述样品进样分析得待测物的峰面积为“ $A$ ”。另按“血浆样品处理”项方法处理空白人血浆200  $\mu\text{L}$ ,以处理后的溶液作为稀释液,加入质控工作液,配制成低、中、高3个质量浓度的含基质的质控样品,上述样品进样分析得待测物的峰面积为“ $B$ ”。提取回收率 =  $A/B \times 100\%$ 。

**基质效应** 按“血浆样品处理”项方法处理6个不同来源的空白人血浆200  $\mu\text{L}$ ,以处理后的溶液作为稀释液,加入质控工作液,配制成低、中、高3个质量浓度的含基质的质控样品,上述样品进样分析得待测物的峰面积为“ $B$ ”。用纯水代替空白人血浆,按“血浆样品处理”项方法进行处理,用处理后的溶液稀释质控工作液,配制成低、中、高3个浓度的不含基质的质控样品,上述样品进样分析得待测物的峰面积为“ $C$ ”。基质效应 =  $B/C \times 100\%$ 。

**稳定性** 按“含药血浆的制备”项处理,制备低、高2个质量浓度的质控血浆样品,分别考察实验台室温放置24 h、在-20  $^{\circ}\text{C}$ 和-70  $^{\circ}\text{C}$ 下反复冻融进行5次、在-20  $^{\circ}\text{C}$ 和-70  $^{\circ}\text{C}$ 冻存49 d的长期稳定性以及处理后样品在自动进样器中放置333 h的稳定性。按照“血浆样品处理”项操作方法对样品处理进行处理,并进行分析。

**残留效应** 按“标准曲线样品和质控样品的配制”项处理,依序进样定量下限、标准曲线最高点及空白基质样本,以空白基质在待测物和IS保留时间处的峰面积与定量下限处的比值,考察本方法的残留效应。

## 结 果

### 1 方法学评价

**专属性** 在本实验条件下,鲑降钙素和同位素内标的保留时间分别为2.19和2.19 min,标准血浆样品色谱图峰形良好,血浆中内源性物质不干扰检测,待测物之间无相互干扰,色谱图见图1。

**标准曲线与定量下限** 鲑降钙素的标准曲线方程为  $y = 2.98 \times 10^{-2}x + 5.30 \times 10^{-3}$  (线性范围2.00~400.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9974$ )。待测药物在各自的浓度范围内线性关系良好,相关系数( $R^2$ )均大于0.99。定量下限均为2.00  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**精密度与回收率** 对各化合物,低、中、高3个质量浓度的批内和批间RSD均小于15%,准确度均在

85% ~ 115%, 准确度和精密度均符合对方法学验证的要求。鲑降钙素在低、中、高质控浓度下的提取回收率在 60.13% ~ 75.39%, 且提取回收率的总变异系数均小于 15%, 提取回收率一致性良好, 见表 1。

**基质效应** 低、高质量浓度质控样品中, 鲑降钙素的经内标归一化的基质效应因子范围为 97.45% ~ 109.72%, 结果符合相关要求, 均在 85% ~ 115% 之间。

**稳定性** 低、高浓度质控样品在实验台室温放置

24 h、在 -20 和 -70 °C 下反复冻融进行 5 次、在 -20 和 -70 °C 冻存 49 d 以及处理后样品在自动进样器中放置 333 h 的稳定性经验证, 均稳定, 鲑降钙素的准确度在 97.03% ~ 108.64%。

**残留效应** 最高浓度校正标样后连续分析的 1 个空白基质样品在分析物保留时间处无明显干扰峰, 内标保留时间处也无明显干扰峰, 结果符合相关要求, 说明高质量浓度样品对低质量浓度样品的测定无残留影响。

表 1 人血浆中 GLT 浓度在批内和批间精密度、准确度与提取回收率

Table 1 Precision and accuracy of intra-batch and inter-batch and recovery of GLT concentration in human plasma

| Item | Concentration<br>(pg · mL <sup>-1</sup> ) | Intra-day (n = 6)                          |         |        | Inter-day (n = 36)                         |         |        | Absolute<br>recovery<br>(%) |
|------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|--------|--------------------------------------------|---------|--------|-----------------------------|
|      |                                           | Concentration                              | RSD (%) | RE (%) | Concentration                              | RSD (%) | RE (%) |                             |
|      |                                           | (pg · mL <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ ) |         |        | (pg · mL <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s$ ) |         |        |                             |
| GLT  | 2.00                                      | 1.80 ± 0.07                                | 3.67    | -9.92  | 2.02 ± 0.25                                | 12.23   | 1.16   | -                           |
|      | 6.00                                      | 6.20 ± 0.20                                | 3.30    | 3.33   | 6.27 ± 0.43                                | 6.86    | 4.50   | 75.39                       |
|      | 120.00                                    | 114 ± 4.67                                 | 4.10    | -5.14  | 123 ± 8.97                                 | 7.26    | 2.87   | 63.00                       |
|      | 320.00                                    | 307 ± 8.57                                 | 2.79    | -3.96  | 323 ± 15.32                                | 4.74    | 1.07   | 60.13                       |

SD; Standard deviation; RSD; Relative standard deviation; RE; Relative error.

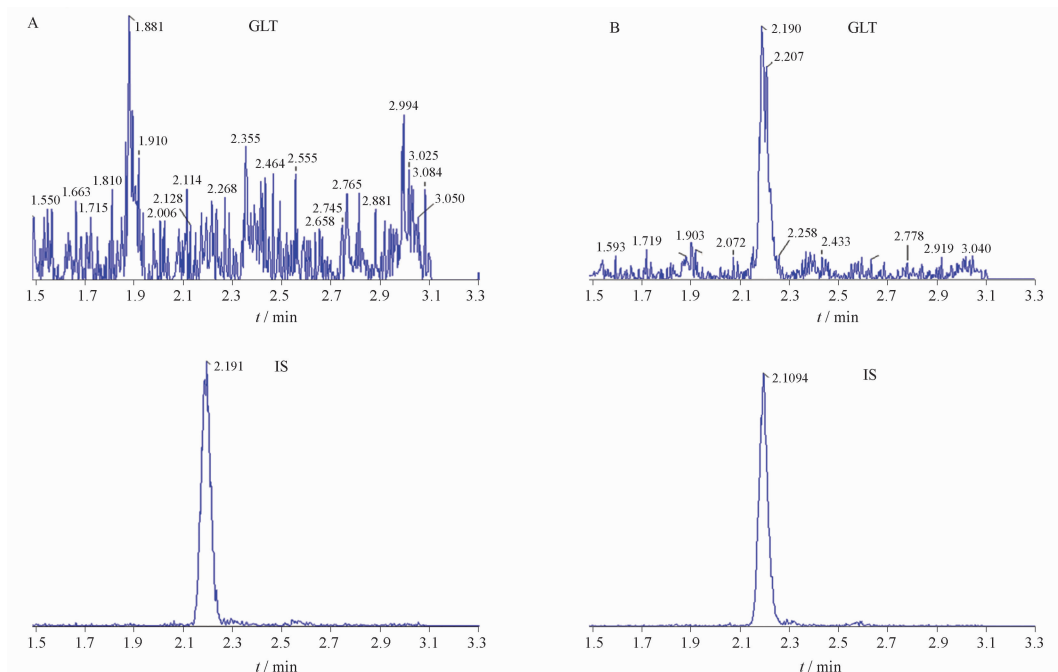


图 1 鲑降钙素 (GLT) 及其内标 (IS) 的典型质谱图

Figure 1 Typical chromatograms of calcitonin (GLT) and internal standard (IS)

A: Blank plasma; B: Sample plasma.

## 讨论

鲑降钙素一般给药剂量是 1 mL/50 IU, 检测定量

下限需要达到 pg 级别, 而多肽药物一直具有非特异性吸附与残留、仪器响应低、稳定性差、内源性干扰多等特点, 导致多肽药物在生物样品分析中面临很多的挑战。

KARSDAL 等<sup>[3]</sup>用 LC-MS/MS 法对人血清中鲑降钙素进行定量分析,但是定量下限为  $10.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,而实际药代动力学样本中浓度极低。为了获取更为完整的更为准确的药代参数评估其安全性,SONG 等<sup>[4]</sup>用 ELISA 法对人血浆中鲑降钙素进行定量分析,定量下限达到  $2.50 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本研究既采用高灵敏度的美国 SCIEX 公司的 TRIPLE QUAD 7500 三重四极杆质谱仪,并结合提取方法采用沉淀蛋白后浓缩法进行提纯样品,最终达到定量下限为  $2.00 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,且方法专属性、重现性良好。

多肽药物普遍存在多电荷分布,但是质谱采用多重反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)模式中碰撞诱导解离(collision-induced dissociation,CID)会产生大量的不同碎片离子,反而会稀释质谱响应,且由于鲑降钙素分子量大,同位素峰分布也会降低质谱信号。为了提高灵敏度和特异性,本研究筛选不同电荷数的母离子和碎片离子,特异性差、背景高的低质量区间的碎片离子不采用,而优先考察特异性强的较大碎片离子,最终鲑降钙素选择带离子对  $m/z$  858.92 $\rightarrow$ 106.999 达到最佳的特异性和灵敏度。

多肽是一种两性化合物,主要是由氨基酸组成的,而氨基酸上的氨基带有正电荷,羧基又带有负电荷,静电作用很强,加上多肽的分子结构相对较大,易疏水,所以易吸附到固体表面,包括液相管路、色谱柱、玻璃瓶和 EP 管上。经过实践,在对照品的储备液和工作液配置过程中需使用的特定溶剂甲醇:水:乙酸:血浆(30.0:60.0:10.0:0.1,  $v:v:v:v$ )可以有效的降低特异性吸附的影响,原因主要是额外添加酸调节 pH 值改变化合物的离子状态,同时添加少量空白血浆可以提高血浆蛋白结合竞争力从而抑制非特异性吸附。

血浆中鲑降钙素的提取方法,文献报道一般用固相萃取以纯化样品减少内源性干扰,提高灵敏度至  $25.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[7]</sup>。但是本研究考虑方法后续的高通量使用,优化了蛋白沉淀法提取鲑降钙素后进行氮吹浓缩,如此不仅操作简单、快速、提高通量,而且有效

降低成本。内源性干扰用 phenomenex Jupiter<sup>®</sup> C4-300A(2.0 mm $\times$ 50.0 mm,5.0  $\mu\text{m}$ )色谱柱,结合梯度洗脱,能够有效的将相关干扰峰进行基线分离,不影响方法的准确度。本方法的提取回收率达到 60.13%~75.39%,且低、中、高不同浓度的提取回收率变异系数不到 15%,一致性良好,完全满足方法的重现性,定量下限可达  $2.00 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

最终成功的建立 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中鲑降钙素的浓度,适用于鲑降钙素药物的药代动力学及生物等效性研究。

## 参考文献:

- [1] 张萌萌,毛未贤,宋玉庭,等. 降钙素合成分泌及生理作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(7):1059—1062.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2022,15(6):573—611.
- [3] KARSDAL M A, BYRJALSEN I, HENRIKSEN K, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of synthetic and recombinant oral salmon calcitonin. [J]. *Clin Pharmacol*, 2009, 49(2):229—234.
- [4] SONG K H, AN H M, KIM H J, et al. Simple liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the routine determination of salmon calcitonin in serum. [J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 775(2):247—255.
- [5] INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). M10: Bioanalytical method validation and study sample analysis [EB/OL]. 2022-05-24 [2025-03-05]. <https://database.ich.org/sites/default/files/M10-Guideline-Step4-2022-0524.pdf>.
- [6] EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on bioanalytical method validation [EB/OL]. 2009-11-19 [2025-03-05]. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf).
- [7] TANNA N, LAME M E. Development of a SPE LC-MS/MS method for the bioanalytical quantification of salmon calcitonin from human serum[J/OL]. 2018-07-01 [2025-02-15]. <https://www.semanticscholar.org/paper/Development-of-a-SPE-LC-MS-MS-Method-for-the-of-Tanna-Lame/3c5d381b584e84803a75cf4e83ce161d6871cc5>.

( 本文编辑:马凌云 收稿日期 2026-03-26)