

用 LC-MS/MS 法测定人血浆中乌帕替尼的浓度

Determination of upatinib concentration in human plasma by LC-MS/MS method

高瑶瑶¹, 田晓彤², 王茉莉²,
闫凯², 王柳², 李姿²,
高燕霞²

(1. 河北大学 化学与材料科学学院, 河北 保定 071002; 2. 河北省药品医疗器械检验研究院 国家药品监督管理局仿制药质量控制与评价重点实验室, 河北 石家庄 050000)

GAO Yao-yao¹, TIAN Xiao-tong²,
WANG Mo-li², YAN Kai²,
WANG Liu², LI Zi², GAO Yan-xia²

(1. College of Chemistry and Materials Science, Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Generic Drug, Hebei Institute of Pharmaceutical and Medical Device Inspection, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

基金项目: 中央引导地方科技发展资金资助项目(226Z2402G)

作者简介: 高瑶瑶(1999-), 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析方面的研究

通信作者: 高燕霞, 主任药师, 硕士生导师
Tel: (0311) 69086005
E-mail: 657968434@qq.com

摘要:目的 建立一种液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法定量测定人血浆中乌帕替尼血药浓度的方法。方法 以乌帕替尼-15N-d2 为内标, 用乙腈沉淀蛋白预处理。以 Waters BEH C₁₈ (2.4 mm × 50.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行分离; 以乙腈(含 0.1% 甲酸)和 0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C。用电喷雾离子源, 正离子多反应监测模式扫描, 用于定量分析的离子对分别为 m/z 388.90 → 255.90 (乌帕替尼), m/z 384.10 → 256.20 (乌帕替尼-15N-d2, 内标)。考察该方法的专属性、标准曲线、定量下限、精密度、回收率、稀释可靠性、基质效应和稳定性。结果 血浆中的内源性成分、内标与乌帕替尼之间均无相互干扰。质量浓度 0.75 ~ 60.00 ng · mL⁻¹ 乌帕替尼与峰面积的线性关系良好 ($r = 0.9986$), 标准曲线方程为 $y = 8.24 \times 10^{-2}x + 0.61 \times 10^{-2}$, 定量下限为 0.75 ng · mL⁻¹, 质控样品批内、批间精密度变异系数均 ≤ 5.3%; 5 倍稀释后的样品浓度准确度为 1.1%, 变异系数为 4.6%。低、高质量浓度血浆质控样品的基质效应因子分别为 1.1 和 1.0。全血样品和血浆样品的稳定性符合生物样品分析的要求。结论 所用方法简便快速、准确度高、灵敏度高, 适用于测定人血浆中乌帕替尼的浓度, 可用于其在健康人体中的药代动力学及生物等效性研究。

关键词: 乌帕替尼; 液相色谱-质谱联用; 血药浓度

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.03.019

中图分类号: R971.1 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-6821(2025)03-0393-04

Abstract: Objective To establish liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) quantitative method for determining the blood concentration of Upatinib in human plasma. **Methods** Upatinib 15N-d2 was used as the internal standard, and acetonitrile was used for protein precipitation pretreatment. Separate using a Waters BEH C₁₈ (2.4 mm × 50.0 mm, 1.7 μm) chromatographic column; acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and 0.1% formic acid aqueous solution were used as mobile phases, with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹ and column temperature of 40 °C. The ion pair used for quantitative analysis was m/z 388.90 → 255.90 (Upatinib) and m/z 384.10 → 256.20 (Upatinib-15N-d2, internal standard) respectively by using an electrospray ion source and positive ion multi reaction monitoring mode scanning. The specificity, standard curve, quantitative cutoff, precision, recovery rate, dilution reliability, matrix effect and stability of the method were examined. **Results** There is no mutual interference between endogenous components, internal standards and Upatinib in plasma. The linear relationship between the mass concentration of 0.75 ~ 60.00 ng · mL⁻¹ Upatinib and peak area is good

($r=0.998\ 6$), the standard curve equation was $y=8.24\times10^{-2}x+0.61\times10^{-2}$, with a lower limit of quantification of $0.75\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The intra-day and inter-day batch precision coefficients of variation of the quality control samples are both $\leq 5.3\%$. The accuracy of the sample concentration after 5-fold dilution is 1.1% , and the coefficient of variation is 4.6% . The matrix effect factors of low and high-quality plasma quality control samples are 1.1 and 1.0 , respectively. The stability of whole blood samples and plasma samples meets the requirements of biological sample analysis. **Conclusion** The method used is simple, rapid, highly accurate, and sensitive, and is suitable for determining the concentration of Upatinib in human plasma. It can be used for pharmacokinetic and bioequivalence studies of Upatinib in healthy individuals.

Key words: Upatinib; liquid chromatography-mass spectrometry; human plasma

乌帕替尼是一种具有选择性 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) 抑制作用的药物^[1-2], 已于 2022 年 3 月获得国家药品监督管理局批准。该药适用于治疗中度至重度活动性类风湿关节炎反应不佳或倾向于接受一种或多种肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 抑制治疗的成年患者, 并对活动性银屑病关节炎 (psoriatic arthritis, PsA) 成年患者中, 对一种或多种改善病情抗风湿药物 (disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 反应不佳或不耐受时具有重要作用。乌帕替尼主要通过阻断 JAK-信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路中 Janus 激酶^[3-4] 的活性, 禁止其起作用, JAK-STAT 信号通路是一种细胞内通路^[5-6], 在促炎细胞因子的释放中起着关键的作用, 促炎细胞因子刺激类风湿关节炎、银屑病关节炎和特应性皮炎的炎症^[7-8]。本研究基于液相质谱联用技术联合同位素内标^[9], 建立快速、准确、高效的测定人血浆中乌帕替尼浓度的方法, 以期为临床医学的合理用药和安全性提供参考。

材料与方法

1 材料

药品与试剂 乌帕替尼对照品, 含量: 100% , 批号: 1003205, 乌帕替尼-15N-d2 对照品, 含量: 99.10% , 批号: 1002069, 均购自广州佳途科技股份有限公司。空白基质, 由山东省聊城市第二人民医院提供, 并经山东省聊城市第二人民医院药物临床试验伦理委员会批准, 伦理批号: KB2024-伦理意见-25-01。

仪器 LC-40A 系列超高效液相色谱仪, 日本岛津公司产品; QTrap 6500 + 三重四极杆串联质谱仪、Analyst 采集工作站 1.63, 均为美国应用生物系统公司产品; SIGMA 3-18KS 低温离心机, 美国 SIGMA 公司产品; XPR36/A 百万分之一电子分析天平, 瑞士

Mettler Toledo 公司产品。

2 测定条件、血浆样品处理和溶液配制

色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ ($2.4\text{ mm}\times 50.0\text{ mm}, 1.7\text{ }\mu\text{m}$), 流动相: 乙腈 (含 0.10% 甲酸) - 0.10% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序: $0\sim 1.00\text{ min}$, $80\% \text{ B}$, $1.00\sim 2.00\text{ min}$, $10\% \text{ B}$, $2.10\sim 3.50\text{ min}$, $80\% \text{ B}$, 分析时间: 3.50 min , 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量: $2\text{ }\mu\text{L}$, 流速: $0.30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

质谱条件 在正离子模式下, 进行多离子反应监测, 电喷雾电离源。电喷雾电压: $+5\ 500\text{ V}$, 雾化器压力: 344.75 kPa , 辅助气压力: 344.75 kPa , 气帘气压力: 241.33 kPa , 离子源温度: $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 选择离子对分别为 $m/z\ 388.90\rightarrow 255.90$ (乌帕替尼), $m/z\ 384.10\rightarrow 256.20$ (乌帕替尼-15N-d2)。乌帕替尼与乌帕替尼-15N-d2 的离子去簇电压分别为 160 、 20 V , 碰撞能均为 38 V , 入口电压均为 10 V , 碰撞室出口电压均为 24 V 。由 Analyst 软件进行数据采集和积分, 数据传输至 Watson LIMS 管理系统进行线性回归、浓度计算等分析处理。

储备液的配制 称取乌帕替尼标准品和乌帕替尼-15N-d2 标准品, 分别用甲醇溶解, 配制成浓度为 $0.20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乌帕替尼储备液与内标储备液。

工作液的配制 量取乌帕替尼储备液用甲醇-水 ($50:50$) 梯度稀释后得到系列标准工作液 (质量浓度分别为 15 、 40 、 90 、 200 、 400 、 800 、 $1\ 200$ 、 $10\ 000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和质控工作液 (质量浓度分别为 15 、 45 、 250 、 900 、 $10\ 000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。吸取内标储备液用 50% 甲醇稀释制得 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。

标准曲线血浆样品和质控血浆样品的配制 吸取空白血浆与乌帕替尼标准工作液与质控工作液按 $19:1$ 混匀, 配制成含乌帕替尼质量浓度为 0.75 、 2.00 、 4.50 、 10.00 、 20.00 、 40.00 和 $60.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线血浆样品, 以及血浆中含乌帕替尼质量浓度为 0.75 、 2.25 、 12.50 、 $45.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控血浆样品。

血浆样品处理 在 96 孔板中加入血浆样品 55 μL 和 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标工作液 25 μL 混匀 (以 1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min), 加入乙腈 220 μL , 振摇提取 (以 1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min) 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行离心 (以 4 700 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min); 取上清液 100 μL 至另一干净的 96 孔板中, 加入 10% 乙腈水溶液 50 μL , 混匀 (以 1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min), 封膜 (170 $^{\circ}\text{C}$, 2 s)。

3 方法学考察

专属性 取 6 个不同来源的空白血浆, 按“血浆样品处理” (用 50% 甲醇水替代内标溶液) 制得双空白样品; 将 6 个不同来源的空白血浆与质量浓度为 15.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乌帕替尼工作液按 19:1 混匀后, 按“血浆样品处理”制得只含乌帕替尼的定量下限样品; 取 6 个不同来源的空白血浆, 按“血浆样品处理”制得只含乌帕替尼-15N-d2 的零浓度样品。

标准曲线与定量下限 取标准曲线样品按“血浆样品处理”项下方法操作, 建立标准曲线。标准曲线样品含乌帕替尼质量浓度分别为 0.75、2.00、4.50、10.00、20.00、40.00、60.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以待测物的浓度为横坐标, 待测物质与内标峰面积之比为纵坐标, 采用加权最小二乘法 ($W = 1/X^2$) 进行回归, 得到线性回归方程, 并确定定量下限。

精密度与回收率 取质控样品按“血浆样品处理”项下方法预处理, 每个浓度水平的质控样品 6 个平行样本。连续 3 d, 分别考察 3 个具有独立标准曲线的分析批, 以标准曲线计算质控样品浓度。考察方法准确性与精密度。取空白血浆按专属性考察中双空白样品方法制备后, 取上清液 100 μL 至 EP 管中, 分别加入含乌帕替尼质量浓度为 1.65、9.167 和 33.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液 25 μL , 和含内标 6.667 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液 25 μL 。每个浓度 6 个重复。记录样品峰面积 A 。精密吸取低、中、高浓度乌帕替尼血浆质控样品 55 μL , 按“血浆样品处理”中的方法, 每个浓度 6 个重复, 记录样品峰面积 B 。提取回收率 = $B/A \times 100\%$ 。

基质效应 取 6 个不同来源的空白血浆按照双空白样品处理后, 取上清液 100 μL 至 EP 管中, 分别加入含乌帕替尼质量浓度为 1.65 和 33.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液 25 μL 和含内标 6.667 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液 25 μL , 混匀进样, 记录样品峰面积 A 。另取超纯水配制与上述浓度相同的样品。每种样品每个浓度 6 个重复。记录峰面积 C 。基质效应因子 = $A/C \times 100\%$ 。

稀释可靠性 制备含乌帕替尼质量浓度 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的稀释质控样品, 用空白血浆稀释 5 倍,

平行制样 6 份, 计算样品浓度准确度。

稳定性 考察了乌帕替尼储备液和工作液室温保存 28 h, 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d 的稳定性; 取低、高浓度的乌帕替尼血浆质控样本, 分别于室温下放置 24 h, 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 25 d, 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 8 d, 或反复冻融 5 次, 或经过样品处理后在自动进样器中放置 33 h 的稳定性。另外, 分别考察了全血样本 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 或冰浴保存 2 h 的稳定性。每个浓度 6 个重复。

结 果

1 方法学评价

专属性 乌帕替尼保留时间为 1.29 min, 乌帕替尼-15N-d2 保留时间为 1.27 min, 结果表明生物样品中其他内源性成分对待测物的检测没有影响。且内标与待测物之间不存在相互干扰, 见图 1。

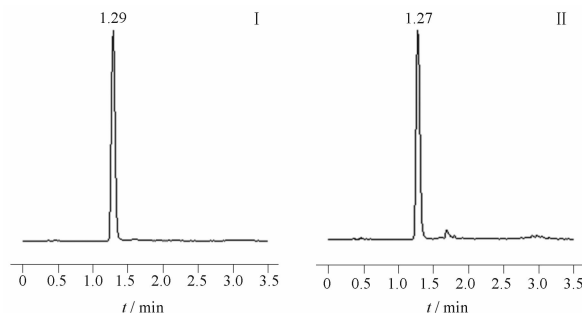


图 1 乌帕替尼 (I) 和内标乌帕替尼-15N-d2 (II) 在血浆基质中的典型色谱图

Figure 1 Typical chromatogram of Upatinib (I) and Internal standard Upatinib-15N-d2 (II) in its plasma standards

标准曲线与定量下限 典型标准曲线方程为 $y = 8.24 \times 10^{-2}x + 0.61 \times 10^{-2}$, 相关系数 $r = 0.9986$, 乌帕替尼在血浆基质中浓度在 0.75 ~ 60.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。定量下限为 0.75 ng 。

精密度与回收率 乌帕替尼的批内、批间精密度变异系数均 $\leq 5.3\%$, 在低、中、高质量浓度血浆质控样品中, 与提取回收率均满足生物样品定量分析的基本要求, 见表 1。

基质效应 在低、高质量浓度血浆质控样品中乌帕替尼的基质效应因子分别为 1.1 和 1.0, 表明血浆基质对乌帕替尼检测结果无明显影响。

稀释可靠性 5 倍稀释后的样品浓度准确度为 1.1%, 变异系数为 4.6%。符合验证要求。

稳定性 不同保存条件下的低、高质量浓度样本准确度均在 $\pm 10\%$, 且样本变异系数均小于 10%, 表明样本在以上稳定性考察条件下稳定性良好。

表1 用液相色谱-质谱联用法检测乌帕替尼在人血浆中的精密度与回收率

Table 1 Determination of precision and recovery of Upatinib in human plasma by liquid chromatography - mass spectrometry

Concentration (ng · mL ⁻¹)	Intra - day (n = 6)			Inter - day (n = 18)			Recovery (%)
	Measured (ng · mL ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	RSD (%)	RE (%)	Measured (ng · mL ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	RSD (%)	RE (%)	
2.25	2.13 ± 0.11	5.25	-5.19	2.23 ± 0.07	3.23	-0.71	76.01 ± 3.67
12.50	12.58 ± 0.42	3.33	0.66	12.86 ± 0.42	3.30	2.88	77.72 ± 1.84
45.00	46.03 ± 0.85	1.85	2.28	46.92 ± 1.69	3.61	4.26	81.26 ± 3.90

RSD: Relative standard deviation; RE: Relative error.

讨 论

LI等^[6]建立了UPLC-MS/MS法测定乌帕替尼与甲氨蝶呤在大鼠体内的血药浓度,使用托法替布为内标;WANG等^[4]建立了比格犬血浆中乌帕替尼的测定方法,内标为菲达替尼,样本使用乙酸乙酯的液液萃取法,前处理过程繁琐;MARTENS等^[8]建立了LC-MS/MS法测定乌帕替尼在人血浆内浓度的方法,使用培西达替尼作为内标,分析时间为12 min,检测效率较低。

本文运用灵敏度指标较高的QTrap 6500+液质联用仪测定人体内乌帕替尼的血药浓度,血浆样品取样量低至55 μL,减小了临床受试者的采血量。采用乙腈蛋白沉淀法处理样本,同时实现了方法的高灵敏度、低检测成本及操作简便^[10]。同时采用乌帕替尼-15N-d2同位素内标,消除样品前处理过程差异的同时,抵消了质谱离子化时的基质效应,减小系统误差,保证检测结果准确可靠。本方法乌帕替尼与内标均在1.3 min内出峰,单个样品检测仅需3.5 min,方法便捷灵敏,可满足大批量生物样品检测的需求。

实验初期出现乌帕替尼残留较大的情况,为了降低进样针上的残留,考察了不同比例的甲醇或乙腈水溶液或异丙醇作为洗针液的清洗效果,最终选择甲醇-乙腈-水-异丙醇(1:1:1:1)作为洗针液,并采用内外清洗结合的洗针方式时,待测物的残留可控制在5%内,内标的残留可控制在1%内,残留符合相关法规要求^[11-14]。本文建立的方法操作简便、准确度高。

参考文献:

[1] DUGGAN S, KEAM S J. Upadacitinib: First approval[J]. *Drugs*, 2019, 79(16): 1819—1828.

[2] 杨涵, 王雅洁, 魏田, 等. 乌帕替尼缓释片治疗中国自身免疫介导炎症性疾病——特应性皮炎及类风湿关节炎及银屑病关节炎的药物经济学评价[J]. *中国药物经济学*, 2024, 19(3): 11—18, 24.

[3] 庄昊俊, 郭美亮, 刘婉雯, 等. Janus 激酶抑制剂在特应性皮炎治疗中的临床应用研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2021, 41(7): 963—966.

[4] WANG M J, ZHAO Y H, FAN C, *et al.* Development of an UPLC -

MS/MS Method for the quantitative analysis of upadacitinib in beagle dog plasma and pharmacokinetics study[J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4167—4175. 2021 - 10 - 02 [2024 - 05 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34629864/>.

[5] MCINNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328—2337.

[6] LI J W, CHEN C J, WANG J, *et al.* Simultaneous measurement of upadacitinib and methotrexate by UPLC - MS/MS and its pharmacokinetic application in rats[J/OL]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1188: 123071. 2022 - 01 - 01 [2024 - 05 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34875493/>.

[7] ALUNNO A, PADJEN I, FANOURIAKIS A, *et al.* Pathogenic and therapeutic relevance of JAK/STAT signaling in systemic lupus erythematosus: Integration of distinct inflammatory pathways and the prospect of their inhibition with an oral agent[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 898.

[8] MARTENS LOBENHOFFER J, TOMARAS S, FEIST E, *et al.* Quantification of the janus kinase 1 inhibitor upadacitinib in human plasma by LC - MS/MS[J/OL]. *J Chromatogr*, 2022, 1188: 123076. 2022 - 01 - 01 [2024 - 05 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34871917/>.

[9] GUTTMAN - YASSKY E, THAÇ, I D, PANGAN A L, *et al.* Upadacitinib in adults with moderate to severe atopic dermatitis: 16 - week results from a randomized, placebo - controlled trial[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(3): 877—884.

[10] 赵梦然, 杨乐, 张彦景, 等. 用UPLC-MS/MS法测定人血浆中盐酸贝尼地平的浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(24): 3648—3652.

[11] 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验生物样本分析实验室管理指南(试行). 国食药监注(2011年第482号)[EB/OL]. 2011 - 12 - 02 [2024 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20111202112701644.html>.

[12] 国家药品监督管理局. 药物临床试验质量管理规范公告(2020年第57号)[EB/OL]. 2020 - 04 - 26 [2024 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggfg/20200426162401243.html>.

[13] *Ch. P* (2020) Vol IV, 中国药典2020版[S]. 四部. 2020: 466—472.

[14] 国家食品药品监管总局. 食品药品监管总局关于适用国际人用药品注册技术协调会二级指导原则的公告(2018年第10号)[EB/OL]. 2018 - 01 - 25 [2024 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanli/ypqxgg/ggzhcfcg/20180125175101846.html>.

(收稿日期 2024 - 07 - 20)