



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104931637 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201510356323.9

(56)对比文件

(22)申请日 2015.06.25

WO 2007044153 A1,2007.04.19,

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 肖锡峰

申请公布号 CN 104931637 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(73)专利权人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 顾景凯 周晓彤 程龙妹 尹磊 杨艳

(74)专利代理机构 北京国林贸知识产权代理有限公司 11001

代理人 李连生 李桂玲

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

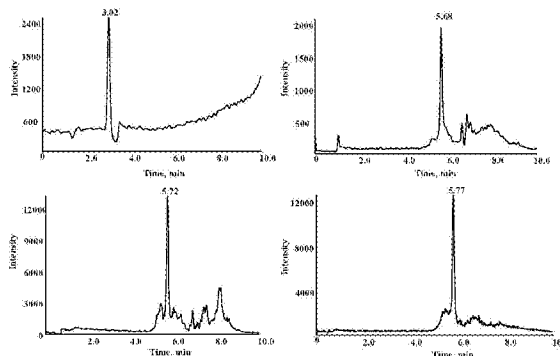
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种生物样本中PEG含量的测定方法

(57)摘要

本发明为一种生物样本中PEG含量的测定方法,采用液相色谱-飞行时间质谱进行测定,首先制备标准曲线,然后将待测样本测定结果通过标准曲线计算出待测样本中PEG浓度;本发明中质谱条件基于三重串联质谱技术,质谱部分的设定为:第一个质量分析器Q1中不选择母离子,带电粒子全部通过后进入第二个质量分析器Q2;在第二个质量分析器Q2中设置碰撞能量,将带电粒子打碎成碎片离子;在第三个质量分析器飞行时间质量分析器选取稳定的特征碎片离子,来定量PEG。本发明针对生物样本中PEG分子量的不唯一性,建立一种操作简便易行,结果准确可靠,灵敏度高,重现性好的PEG定量测定方法。



1. 一种生物样本中PEG含量的测定方法,其特征在于:采用液相色谱-飞行时间质谱进行测定,测定步骤包括:

A. 建立 PEG测定的标准曲线;

B. 使用液相色谱-飞行时间质谱测定待测样品,通过步骤A所得标准曲线计算出待测样本中PEG浓度;

步骤A和步骤B的色谱条件和质谱条件相同,其中质谱条件基于三重串联质谱技术,步骤A和步骤B质谱部分的设定为:第一个质量分析器Q1中不选择母离子,带电粒子全部通过后进入第二个质量分析器Q2;在第二个质量分析器Q2中设置碰撞能量,将带电粒子打碎成碎片离子;在第三个质量分析器飞行时间质量分析器选取稳定的特征碎片离子,来定量PEG;

所述特征碎片离子 m/z 为133.083~133.086;

测定PEG 400~1000,所述质谱操作部分解簇电压为80 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为25 eV;测定PEG 1000~2000,所述质谱操作部分解簇电压为100 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为25 eV;测定PEG 2000~20000,所述质谱操作部分解簇电压为100 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为30 eV。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其特征在于:测定方法中使用的内标物质为辛伐他汀。

3. 根据权利要求1或2所述的测定方法,其特征在于:步骤A和步骤B中所述质谱条件为:正离子方式检测;离子喷射电压:5500 V;温度:500°C;气帘气体(CUR)氮气压力15 psi;气体1氮气压力(GS1)60 psi、气体2氮气压力(GS2)50 psi;PEG扫描方式为TOF-MS模式,扫描的 m/z 范围为88.0~178.0。

4. 根据权利要求1或2所述的测定方法,其特征在于:步骤A和步骤B中所述色谱条件为:流动相为甲酸体积百分数占0.1%的水和甲酸体积百分数占0.1%的乙腈,梯度洗脱,柱温40°C;流速:400 mL/min。

5. 根据权利要求1或2所述的测定方法,其特征在于:所述步骤A具体操作程序为:

1) 制备内标溶液和不同浓度的PEG标准溶液;

2) 于抗吸附管中加入内标溶液、PEG标准溶液及预冷的乙腈后涡流混匀,离心后上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

3) 取不同浓度的PEG标准溶液重复程序2)操作,记录色谱图,PEG浓度为横坐标,PEG色谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,用加权 $W=1/x^2$ 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程,即为标准曲线。

6. 根据权利要求5所述的测定方法,其特征在于:所述步骤B具体操作程序为:

1) 于抗吸附管中加入内标溶液、待测样本溶液及预冷的乙腈涡流混匀,离心后取上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

2) 将程序1)中获取的待测样本PEG峰面积与内标峰面积比值代入标准工作曲线,求得PEG浓度。

一种生物样本中PEG含量的测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物分析技术领域,具体涉及一种生物样本中PEG含量的测定方法。一种基于高效液相色谱-飞行时间质谱(LC-Q-Q-TOF)联用技术测定样本中不同聚合度PEG含量的方法。

背景技术

[0002] 聚乙二醇(PEG)是一种pH中性,无毒,且具有独特理化性质和良好生物相容性的亲水高分子聚合物,也是经FDA批准的极少数可以体内注射的合成聚合物之一。当PEG偶联到蛋白质、多肽、小分子有机药物或纳米颗粒外壳上时,可以降低药物制剂的免疫清除以及肾脏的快速消除,延长药物的体内循环时间,减小药物的毒性。作为新型的药用辅料,PEG的质量控制以及在体内的吸收、分布与排泄过程对于PEG化药物的设计与评价具有十分重要的意义。

[0003] 目前对于PEG的分析常采用放射性标记法、比色法、Western Blot和高效液相色谱法(HPLC),但这些方法均存在明显的不足。例如,放射性标记法用于标记PEG时成本太高,且目前尚未建立成熟的方法学检验标记效率,也没有对比试验说明标记后的PEG在体内的动力学行为是否发生了变化;比色法和Western Blot法都不能得到精确的定量结果,且后者是通过测定与PEG结合的抗体量来间接对PEG进行定量。鉴于抗体的选择性差,可能和样本中存在的内源性干扰物质结合,故不适合血浆或组织等复杂生物样本中PEG的定量分析;HPLC法采用折射率检测器,分析时间长,且定量下限仅为50 mg/mL,不足以分析生物体内痕量的PEG水平。

[0004] 近年来,迅速发展的液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)凭借其在定量分析方面的出色表现,为药物的药代动力学研究提供了良好的解决方案。LC-MS/MS定量的流程是:色谱分离、离子化、质荷比(m/z)扫描、选择特定 m/z 进行定量。在众多扫描方式中,三重四级杆质量分析器的多重反应监测模式(MRM)选择性好,灵敏度高,已经成为LC-MS/MS分析中最常用的定量方式。这种模式的定量思路是:离子化、第一个四级杆(Q1):选择一个特定的离子作为母离子,并只允许这一种离子通过、第二个四级杆(Q2):母离子被碰撞能量打成碎片、第三个四级杆(Q3):从产生的碎片中选择一个响应高且稳定的碎片作为子离子、测定选择的母子离子对的含量。所以这种模式必须在知道待测化合物母离子和子离子的准确 m/z 的前提下才能进行。

[0005] 而PEG是由一系列以乙二醇为基本单元组成的高分子混合物,其分子量不是唯一的值,而是以某个聚合度的分子量平均值为中心呈正态分布,如:PEG 4000其实是以分子量4000的PEG分子为中心呈正态分布的多种分子量PEG分子的混合物;PEG600、PEG 6000、PEG 10000也是如此,均为多种分子量PEG分子的混合物;因此这给以待测化合物目标分子量为基础的LC-MS/MS定量分析带来了极大的挑战。

[0006] 对于PEG的质谱定量分析,通常采用电喷雾离子源(ESI),在ESI条件下,PEG的离子化效率高,其长链易于带电,但是其所带电荷量不同,这使得本身聚合度就不相同的PEG具

有更多不同的 m/z ,所以PEG碎片的 m/z 更加不确定,难以用传统的MRM扫描模式对PEG进行LC-MS/MS定量分析。为此,人们也在尝试着一些方法来解决这一难题。如有学者尝试利用离子源内能量将不同聚合度PEG初步打碎成较大片段,并通过Q1选择其中一个响应较高的片段作为母离子,再继续按照MRM模式用产生的碎片进行定量分析。该方法虽然能部分实现PEG的LC-MS/MS定量分析,但是离子源内产生的能量较低,比串联质谱碰撞室(Q2)内的碰撞能量至少低2个数量级,所以只能部分裂解PEG,且裂解位置不固定,裂解效率不稳定,可以产生若干种不同 m/z 的碎片,无论选择哪个碎片作为母离子进行定量,都不得不忽略大部分其他 m/z 的碎片,其定量结果灵敏度、准确性较低,线性差。另有学者对聚合度较低的PEG 400进行定量分析,针对其中丰度较高的9种不同分子量的PEG,对每个PEG都利用MRM模式测定含量之后,再将它们的含量相加得到PEG 400的总体含量。但是在定量前必须先测定每种聚合度的PEG占总量的比例才可完成定量,而且对每种成分都要单独制作标准曲线,操作步骤相应增加,造成定量准确性降低。以上两种方法均采用MRM模式,仍需要利用Q1选择母离子,没有从根本上解决问题,还存在一些不足。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是,针对生物样本中PEG分子量的不唯一性,建立一种操作简便易行,结果准确可靠,灵敏度高,重现性好的PEG定量测定方法。本发明的目的是通过以下技术方案实现的。

[0008] 一种生物样本中PEG含量的测定方法,采用液相色谱-飞行时间质谱(LC-Q-Q-TOF)进行测定,测定步骤包括:

[0009] A. 建立PEG测定的标准曲线;

[0010] B. 使用液相色谱-飞行时间质谱测定待测样品,通过步骤A所得标准曲线计算出待测样本中PEG浓度;

[0011] 步骤A和步骤B的色谱条件和质谱条件相同,其中质谱条件基于三重串联质谱技术,步骤A和步骤B质谱部分的设定为:第一个质量分析器Q1中不选择母离子,带电粒子全部通过后进入第二个质量分析器Q2;在第二个质量分析器Q2中设置碰撞能量,将带电粒子打碎成碎片离子;在第三个质量分析器飞行时间质量分析器选取稳定的特征碎片离子,来定量PEG。

[0012] 进一步的,所述特征碎片离子 m/z 为133.083~133.086。

[0013] 进一步的,测定PEG 400~1000,所述质谱操作部分解簇电压为80 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为25 eV。

[0014] 进一步的,测定PEG 1000~2000,所述质谱操作部分解簇电压为100 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为25 eV。

[0015] 进一步的,测定PEG 2000~20000,所述质谱操作部分解簇电压为100 V,第二个质量分析器Q2中PEG的碰撞电压为30 eV。

[0016] 进一步的,测定方法中使用的内标物质为辛伐他汀。

[0017] 进一步的,步骤A和步骤B中所述质谱条件为:正离子方式检测;离子喷射电压:5500 V;温度:500°C;气帘气体(CUR)氮气压力15 psi;气体1氮气压力(GS1)60 psi、气体2氮气压力(GS2)50 psi;PEG扫描方式为TOF-MS模式,扫描的 m/z 范围为88.0~178.0。

[0018] 进一步的,步骤A和步骤B中所述色谱条件为:流动相为甲酸体积百分数占0.1%的水和甲酸体积百分数占0.1%的乙腈,梯度洗脱,柱温40°C;流速:400 mL/min。

[0019] 进一步的,所述步骤A具体操作程序为:

[0020] 1) 制备内标溶液和不同浓度的PEG标准溶液。

[0021] 2) 于抗吸附管中加入内标溶液、PEG标准溶液及预冷的乙腈涡流混匀,离心后取上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

[0022] 3) 取不同浓度的PEG标准溶液重复程序2) 操作,记录色谱图,PEG浓度为横坐标,PEG色谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,用加权 $W=1/x^2$ 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程,即为标准曲线。

[0023] 进一步的,所述步骤B具体操作程序:

[0024] 1) 于抗吸附管中加入内标溶液、待测样本溶液及预冷的乙腈涡流混匀,离心后取上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

[0025] 2) 将程序1) 中获取的待测样本PEG峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线,求得PEG浓度。

[0026] 本发明测定方法的原理是:通过改变液相色谱流动相比例,将不同分子量范围的PEG从色谱柱上洗脱后进入质谱检测。采用TOF-MS模式,无需在Q1中选择母离子,所有PEG都直接进入碰撞室(Q2)内,通过碰撞诱导解离(CID)的方式,利用Q2内的较大能量高效地将PEG全部打碎,然后利用飞行时间质量分析器(TOF)选择不同聚合度PEG共同产生的的响应最高且稳定的特征质谱裂解碎片(理论上精确 m/z 为133.08592,3个乙二醇重复单元)进行定量,进而建立一种操作简便、结果准确可靠,灵敏度高,重现性好的用于分析不同分子量PEG的LC-Q-Q-TOF定量方法。

[0027] 本发明的有益效果为:

[0028] 1、本发明可解决母离子未知情况下的不同分子量PEG的定量难题。传统的质量分析器由于软、硬件设计上的问题,难以得到背景干扰低且灵敏度高的全质荷比裂解数据。本发明中使用的串联四级杆飞行时间质量分析器(Q-Q-TOF)通过碰撞室内碰撞诱导解离(CID)的方式,利用较大能量将进入碰撞室内的质荷比不确定、不唯一的PEG全部打碎,进而对不同分子量的PEG均产生的丰度高且稳定的特征质谱裂解碎片(理论上精确 m/z 为133.08592,3个乙二醇重复单元)进行定量。

[0029] 2、本发明利用高效液相色谱将PEG与杂质在色谱柱上初步分离,并可起到富集作用,然后将色谱洗脱液进行Q-Q-TOF分析。Q-Q-TOF是一种新型的高分辨率质量分析设备,其质量分辨率高达2.0 ppm,突破了单位质量分辨率分析器的限制,提高了对待测碎片的专属辨识能力,可将样本测定过程中的基质干扰降至最低水平,提高不同分子量PEG定量的灵敏度与准确性。

[0030] 3、本发明除提取质量范围为133.083~133.086离子的色谱图进行定量以外,还提取质量范围为89.058~89.062以及177.110~177.114两个范围的离子色谱图作为监测离子。这三种离子均为PEG在碰撞室中裂解产生的丰度高且稳定的PEG特征碎片,其中用于定量分析的碎片响应信号最强且稳定性最好。当这三种离子的色谱峰型和保留时间均相同时,可以确定所得到的色谱峰来自待分析物,使定量的专属性、准确性更强。

[0031] 4、本发明所述的PEG定量方法操作简便易行、分析时间短、线性关系良好、准确度

高、重现性好而且灵敏、可靠,不仅可以对复杂生物样本中不同聚合度的PEG进行定量,也可应用于PEG键合药物中PEG的含量测定,应用范围广。

附图说明

[0032] 图1是空白血浆样本色谱图。

[0033] 图2是内标色谱图。

[0034] 图3是PEG 600、PEG 4000、PEG 6000、PEG 10000标准工作曲线最低定量下限色谱图。

[0035] 图4是实施例1得到的PEG 4000血浆样本色谱图。

[0036] 图5是实施例1得到的大鼠尾静脉注射PEG 4000后血浆药-时曲线。

具体实施方式

[0037] 实施例1

[0038] 一种生物样本中PEG含量的测定方法,采用液相色谱-飞行时间质谱(LC-Q-Q-TOF)进行测定,测定步骤包括:

[0039] A. 建立PEG测定的标准曲线;

[0040] B. 使用液相色谱-飞行时间质谱测定待测样品,通过步骤A所得标准曲线计算出待测样本中PEG浓度;

[0041] 步骤A和步骤B的色谱条件和质谱条件相同,其中质谱条件基于三重串联质谱技术,步骤A和步骤B质谱部分的设定为:第一个质量分析器Q1中电压不选择母离子,带电粒子全部通过后进入第二个质量分析器Q2;在第二个质量分析器Q2中设置碰撞能量,将带电粒子打碎成碎片离子;在第三个质量分析器飞行时间质量分析器选取稳定的特征碎片离子,来定量PEG。

[0042] 所述特征碎片离子m/z为133.083~133.086(精确m/z为133.08592,3个乙二醇重复单元)。

[0043] 测定方法中使用的内标物质为辛伐他汀。

[0044] 步骤A和步骤B中所述质谱条件为:正离子方式检测;离子喷射电压:5500 V;温度:500°C;气帘气体(CUR)氮气压力15 psi;气体1氮气压力(GS1)60 psi、气体2氮气压力(GS2)50 psi;PEG扫描方式为TOF-MS模式,扫描的m/z范围为88.0~178.0。根据待测为中PEG聚合度不同,解簇电压(DP)和碰撞电压(CE)的设定值如下。

表1 PEG 和辛伐他汀的 DP、CE 设定值

待测物	DP (V)	CE (eV)
PEG 400~1000	80	25
PEG 1000~2000	100	25
PEG 2000~20000	100	30
辛伐他汀	100	20

[0045]

[0046] 步骤A和步骤B中所述色谱条件为:流动相为甲酸体积百分数占0.1%的水和甲酸体

积百分数占0.1%的乙腈,梯度洗脱,柱温40°C;流速:400 mL/min。

[0047] 所述步骤A具体操作程序为:

[0048] 1) 制备内标溶液和梯度稀释的不同浓度的PEG标准溶液。

[0049] 2) 于抗吸附管中加入20 μ L内标溶液、100 μ L PEG标准溶液及300 μ L在-20°C中预冷的乙腈后涡流混匀,15000 rpm离心5 min取30 μ L上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

[0050] 3) 取不同浓度的PEG标准溶液重复程序2)操作,记录色谱图,PEG浓度为横坐标,PEG色谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,用加权 $W=1/x^2$ 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程,即为标准曲线。

[0051] 所述步骤B具体操作程序:

[0052] 1) 于抗吸附管中加入20 μ L内标溶液、100 μ L待测样本溶液及300 μ L在-20°C中预冷的乙腈后涡流混匀,15000 rpm离心5 min取30 μ L上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

[0053] 2) 将程序1)中获取的待测样本PEG峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线,求得PEG浓度。

[0054] 实施例 2

[0055] 在实施例1的基础上,具体选择测定血浆中 PEG 4000 进行定量。

[0056] 测定之前的准备工作为:

[0057] 大鼠血浆样本的采集

[0058] ①选取体重为200 g \pm 10 g雄性大鼠1只,自由饮食;

[0059] ②称取PEG 4000并用生理盐水稀释至1.0 mg/mL;

[0060] ③给药过程如下:尾静脉注射给药,给药剂量为1.0 mg/mL的PEG 4000生理盐水溶液0.6 mL/只。大鼠分别于给药前(0 h)和给药后0.083 h、0.25 h、0.5 h、0.75 h、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h,经大鼠眼眶取血0.5 mL,将全血置于预冷的肝素化EP管中,4°C离心(13300 rpm,5 min),分离并将全部血浆移置另一EP管中,置于-20°C冰箱中保存待测。

[0061] 大鼠血浆样本中PEG 4000含量的测定

[0062] 采用液相色谱-飞行时间质谱(LC-Q-Q-TOF)进行测定,测定步骤包括:

[0063] A. PEG测定标准曲线的制备,

[0064] 具体操作程序为:

[0065] 1) 制备内标溶液和梯度稀释的不同浓度的PEG标准溶液。

[0066] ①用去离子水将PEG 4000标准品溶解,并稀释至1.0 mg/mL,得到PEG 4000储备液;

[0067] ②利用与待测样本相同的基质溶液将PEG 4000储备液分别稀释至50,100,300,1000,3000,10000 ng/mL;

[0068] ③用甲醇将辛伐他汀标准品溶解,并稀释至1.0 mg/mL,得到辛伐他汀储备液,利用甲醇:水=50:50(v/v)的溶液将辛伐他汀储备液稀释至100 ng/mL,用作内标溶液;

[0069] 2) 于2 mL抗吸附管中加入20 μ L内标溶液、100 μ L PEG标准溶液及300 μ L在-20°C中预冷的乙腈后涡流混匀,15000 rpm离心5 min取30 μ L上清液进样到高效液相色谱-飞行

时间质谱中分析;

[0070] 3) 取不同浓度的PEG标准溶液重复程序2) 操作, 记录色谱图, PEG浓度为横坐标, PEG色谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标, 用加权 $W=1/x^2$ 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程, 即为标准曲线。

[0071] B. 使用液相色谱-飞行时间质谱测定待测样品, 通过步骤A所得标准曲线计算出待测样本中PEG浓度,

[0072] 步骤B具体操作程序:

[0073] 1) 于2 mL抗吸附管中加入20 μ L内标溶液、100 μ L待测样本溶液及300 μ L在-20 $^{\circ}$ C中预冷的乙腈后涡流混匀, 15000 rpm离心5 min取30 μ L上清液进样到高效液相色谱-飞行时间质谱中分析;

[0074] 2) 将程序1) 中获取的待测样本PEG峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线, 求得PEG浓度。

[0075] 步骤A和步骤B的色谱条件和质谱条件相同, 其中质谱条件基于三重串联质谱技术, 步骤A和步骤B质谱部分的设定为: 第一个质量分析器Q1中不选择母离子, 带电粒子全部通过后进入第二个质量分析器Q2; 在第二个质量分析器Q2中设置碰撞能量, 将带电粒子打碎成碎片离子; 在第三个质量分析器飞行时间质量分析器选取稳定的特征碎片离子, 来定量PEG。

[0076] 色谱条件: Agilent 1100高效液相色谱系统, 包括二元输液泵, 脱气机, 自动进样器, 美国Agilent公司; 岛津UFLC SIL-20A XR柱温箱, 日本岛津公司; 色谱柱: XBridgeTM BEH300 C18柱, 2.1 \times 50 mm I.D., 3.5 μ m粒径, 300A孔径(Waters); 流动相: 甲酸体积百分数占0.1%的水和甲酸体积百分数占0.1%的乙腈, 梯度洗脱, 具体程序见表2; 柱温40 $^{\circ}$ C; 流速400 mL/min;

表 2 PEG 4000 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (μ L/min)	%A	%B
0	400	80	20
2	400	80	20
4	400	10	90
5.9	400	10	90
6	400	80	20
10	400	80	20

[0077] 其中A是甲酸体积百分数占0.1%的水, B是甲酸体积百分数占0.1%的乙腈。

[0078] 质谱条件: Triple TOF 5600型质谱仪, 配有电喷雾离子化源以及Analyst TF 1.6.1数据处理软件(美国AB SCIEX公司); 正离子方式检测; 离子喷射电压: 5500 V; 温度: 500 $^{\circ}$ C; 气帘气体(CUR) 氮气压力15 psi; 气体1氮气压力(GS1) 60 psi、气体2氮气压力(GS2)

50 psi;PEG扫描方式为TOF-MS模式,扫描的m/z范围为88.0~178.0,解簇电压(DP)100 V,碰撞电压(CE)30 eV;辛伐他汀扫描方式为Product ion模式,母离子的m/z为419.2,子离子扫描范围为198.5~199.5;

[0080] 数据处理:

[0081] 利用Analyst TF 1.6.1软件记录色谱图,并使用Multiquant 2.0.2软件提取m/z范围为133.083~133.086(理论上精确m/z为133.08592,3个乙二醇重复单元)离子的色谱图进行定量,同时提取质量范围为89.058~89.062(理论上精确m/z为89.05971,2个乙二醇重复单元)以及177.110~177.114(理论上精确m/z为177.11214,4个乙二醇重复单元)两个范围的离子色谱图作为监测离子.以A步骤中获取的PEG浓度为横坐标,PEG色谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,用加权 $W=1/x^2$ 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程,即为标准工作曲线.将B步骤中获取的待测样本PEG峰面积与内标峰面积比值代入标准工作曲线,求得PEG浓度.空白血浆样本色谱图如图1所示,内标色谱图如图2所示,含PEG 4000的样本色谱图如图4所示,大鼠尾静脉注射PEG 4000后的血药浓度见表3;

表 3 PEG 4000 标准工作曲线

浓度 (ng/ml)	峰面积	峰面积	峰面积	峰面积	峰面积	峰面积
50	3.874E+04	3.028E+04	2.469E+05	8.378E+05	2.274E+06	7.098E+06
回归方程	$y=785.38212x+1317.17985$					
相关系数 (r)	0.99721					

[0082]

表4 大鼠尾静脉注射 PEG 4000 后的血药浓度

	时间 (h)	浓度 (ng/mL)
1	0.083	7110
2	0.25	4305
3	0.5	3525
4	0.75	1788
5	1	1659
6	2	985.8
7	3	463.2
8	4	198.5
9	6	114.7
10	8	63.80
11	10	55.98
12	12	47.40
13	24	36.69

[0083]

[0084] 质量控制样本制备

[0085] ①利用去离子水将PEG 4000标准品溶解至1.0 mg/mL,得到PEG 4000储备液;

[0086] ②利用大鼠血浆将PEG储备液分别稀释至100,1000,8000 ng/mL;

[0087] ③每浓度取至少三个样本,按照标准曲线制备方法处理样本,并根据标准曲线,得出PEG浓度,计算质量控制样本准确度,具体见表5,考察方法的准确性。

表5 PEG 4000 质量控制样本准确度

理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE% RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE% RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE% RE%
100	100.2	0.17	1000	1007	0.87	8000	7871	-1.11
100	101.7	1.68	1000	1038	3.81	8000	8137	1.71
	91.69	-8.31		1122	12.2		7318	-8.53

[0088]

[0089] 本发明所述的不同聚合度PEG定量方法操作简便易行、分析时间短、线性关系良好、准确度高、重现性好而且灵敏、可靠,不仅可以对复杂生物样本中不同聚合度的PEG进行

定量,也可应用于PEG键合药物中PEG的含量测定,应用范围广。

[0090] 实施例 3

[0091] 血浆样本中PEG 10000含量的测定,除下述参数与实施例2不同外,其他操作和参数与实施例2相同。

[0092] 测定之前的准备工作中给大鼠注射的为PEG 10000生理盐水溶液,制作标准溶液时选取的标准品为PEG 10000。测定参数中:质谱条件中解簇电压为100 V,碰撞电压为30 eV;色谱洗脱程序见表6。标准曲线和准确度见表7、8。

表 6 PEG 10000 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (μL/min)	%A	%B
0	400	80	20
2	400	80	20
4	400	10	90
5.9	400	10	90
6	400	80	20
10	400	80	20

[0093]

表 7 PEG 10000 标准工作曲线

浓度 (ng/mL)	峰面积
50	1.068E+05
100	2.287E+05
300	6.793E+05
1000	2.258E+06
3000	7.977E+06
10000	2.788E+07

回归方程: $y = 2875.38477x + 138465.14543$

相关系数 (r): 0.99779

[0094]

表 8 PEG 10000 质量控制样品准确度

理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%
	113.59	13.59		932.9	-6.72		7734	-3.33
100	92.26	-7.74	1000	1025	2.50	8000	8339	4.24
	103.55	3.55		918.0	-8.20		7524	-5.98

[0095]

[0096] 实施例 3

[0097] 血浆样本中PEG 600含量的测定,除下述参数与实施例2不同外,其他操作和参数与实施例2相同。

[0098] 测定之前的准备工作中给大鼠注射的为PEG 600生理盐水溶液,制作标准溶液时选取的标准品为PEG 600。测定参数中:质谱条件中解簇电压为80 V,碰撞电压为25 eV;色谱洗脱程序见表9。标准曲线和准确度见表10、11。

表 9 PEG 600 梯度洗脱程序

[0099]

时间 (min)	流速 (μL/min)	%A	%B
0	400	90	10
1	400	90	10
1.5	400	10	90
5.9	400	10	90
6	400	90	10
10	400	90	10

表 10 PEG 600 标准工作曲线

[0100]

浓度点	sd 01	sd 02	sd 03	sd 04	sd 05	sd 06
浓度值 (ng/mL)	50	100	300	1000	3000	10000
响应值	1.43E+04	4.56E+04	1.14E+05	4.16E+05	1.29E+06	3.13E+06
回归方程	$y=1284.13480x+12314.75885$					
相关系数 (r)	0.99856					

表 11 PEG 600 质量控制样品准确度

[0101]

理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%	理论值 (ng/mL)	实测值 (ng/mL)	RE%
	110.9	10.9		1117	11.7		8256	1.28
100	90.89	-9.11	1000	1011	1.10	8000	7963	-0.46
	92.18	-7.82		1027	2.70		8425	5.31

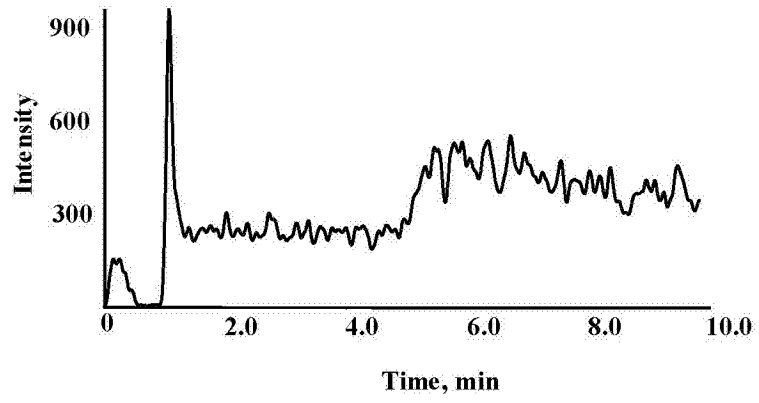


图1

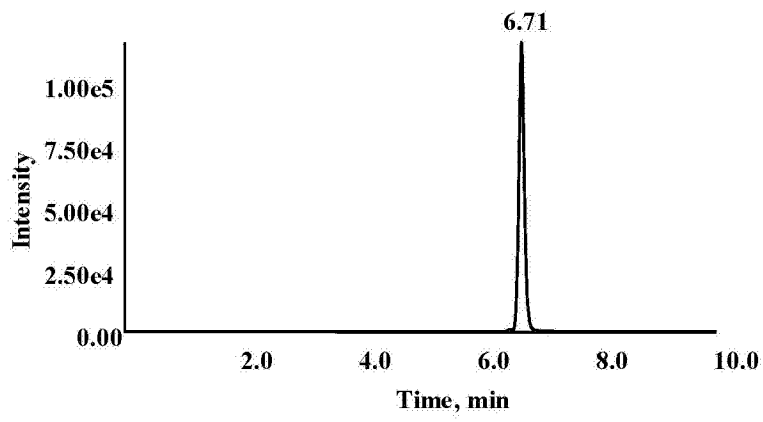


图2

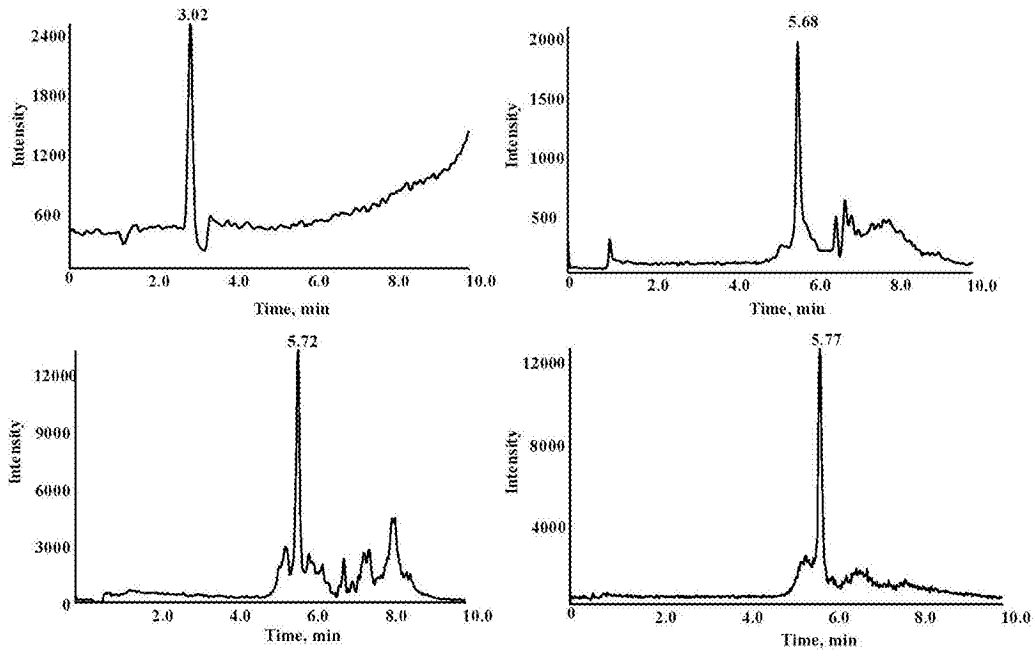


图3

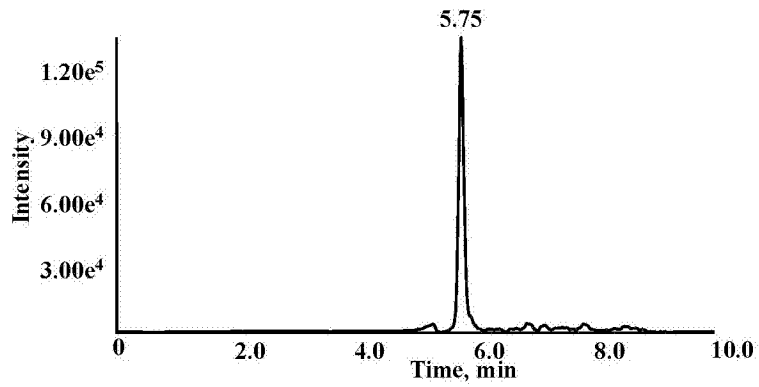


图4

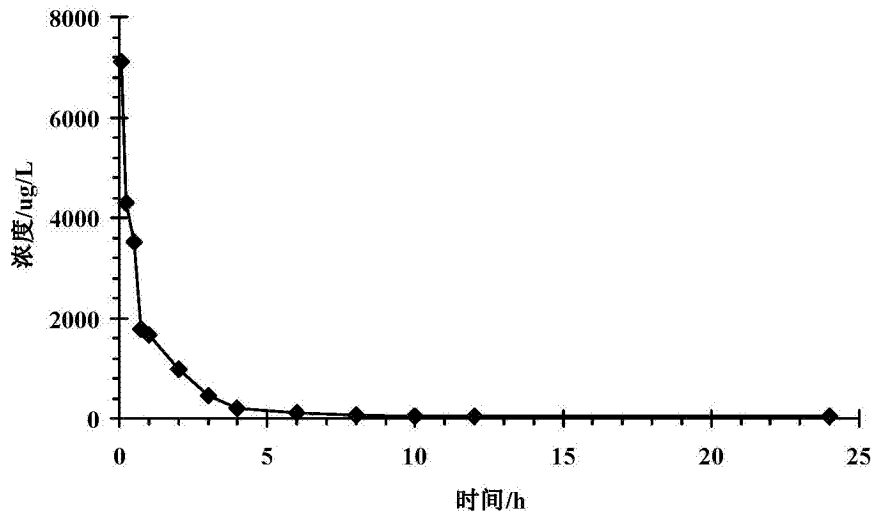


图5