

一种采用 LC-MS/MS 检测 ADC 中 DTPA 含量的方法

技术领域

[01] 本发明属于生物医药领域，涉及一种准确度高，耐用性强，可重复性好的 LC-MS/MS 检测 DTPA 的方法。

5 背景技术

[02] 二乙基三胺五乙酸 (DTPA) 是由具有五个羧甲基的二亚乙基三胺骨架组成的氨基多羧酸。

[03] DTPA 于二十世纪五十年代后期广泛用于放射性核素的促排，目前主要用的是其钙盐，DTPA 及其相关钙盐的毒副作用主要包括高剂量的致死反应、肝肾损伤、肠黏膜损伤以及造血抑制 (赵兴成等，DTPA 的毒性与促排应用，国外医学(放射医学分册)，1980 年 04 期)。

[04] DTPA 目前广泛用于 ADC 产品的生产中，在单抗还原工序中添加，主要目的是保护还原后的蛋白。DTPA 也可以作为抗体药物偶联物的连接子 (Virginia del Solar et al, Metal-based antibody drug conjugates. Potential and challenges in their application as targeted therapies in cancer, Journal of Inorganic Biochemistry 199, 2019)，用于制备铂金属抗体药物偶联物 (Metal-based antibody drug conjugates)，工艺实践表明；在无 DTPA 添加时无法正常偶联 ADC 或者偶联后产品质量下降。目前 ADC 生产的工艺中通常没有特定针对 DTPA 的去除工艺，只在产品透析过程中去除，因此其在 ADC 产品中具有残留的可能性，对后续成药安全性有一定的负面影响，不容忽视。目前现有技术中还未发现有专门针对 ADC 相关产品中的 DTPA 检测的研究。

[05] 目前文献报道的 DTPA 检测方法主要集中在食品领域和纺织领域。主要采用气相色谱法和高效液相色谱法，也有采用离子色谱法。但是气相色谱法检测时，由于 DTPA 及其络合物中含有极性的羧基基团而难以挥发，需对其进行酯化反应生成可挥发性化合物，操作复杂。而采用 HPLC 法时其检测限偏高，不适用于残留量的检测。综合以上原因，目前 LC-MS/MS 法也越来越受到关注。例如：专利申请 (CN107315056A) 公开了利用 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆生物样品中的 DTPA-Ca 的方法，其取得了优异的色谱分离效果，具有优异的目标物质回收率。专利申请 (CN107167541A) 公开了利用 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆生物样品中的 DTPA-Zn 的方法，同样取得了良好的分离效果。然而这些方法均不适合

用于抗体药物偶联物产品中的 DTPA, 原因在于: 抗体药物偶联物作为蛋白生物大分子混合物, 体系复杂, 对 DTPA 的检测干扰严重。

[06] LC-MS/MS 实际上是将 LC 技术与两次 MS 技术结合的一项综合性检测技术。LC-MS/MS 是液相色谱 (LC) 与质谱 (MS) 的组合使用, 其工作原理为: 样品进样后首先在流动相的携带下进入色谱柱, 经过色谱柱分离后, 进入质谱进行检测。质谱根据被测物的质荷比 (m/z) 进行检测, 被测物在离子源转换成气相离子进入质谱, 在三重四级杆中一级质谱扫描特定范围离子或允许特定离子进入碰撞室, 在碰撞室内分子离子碰撞裂解, 形成子离子进入二级质谱, 二级质谱扫描特定范围离子或允许特定离子进入检测器。LC-MS/MS 联用的优点非常显著, 因为气相色谱只能分离易挥发且不分解的物质, 而液相色谱则大大拓宽了分离范围, 由此可见, LC 与高选择性、高灵敏度的 MS/MS 结合, 可对复杂样品进行实时分析, 即使在 LC 难分离的情况下, 只要通过 MS1 及 MS2 对目标化合物进行中性碎片扫描, 则可发现并突出混和物中的目标化合物, 显著提高信噪比。

[07] 在应用 LC-MSMS 法检测 DTPA 的方法中, 大多采用 Fe^{3+} 衍生的手段, 但是其衍生条件均为酸性条件, 且流动相需加入离子对试剂才能实现良好分离, 方法重现性较差, 且不稳定。因此, 为了更好快速高效的检测 DTPA, 我们开发了基于弱碱性衍生条件的 LC-MS/MS 检测 DTPA 的方法, 有效解决了现有技术中 DTPA 检测遇到的难题。本申请将 LC-MSMS 法检测用于抗体药物偶联物产品中的 DTPA 检测中, 准确度高, 耐用性强, 可重复性好, 在 ADC 生产的质量控制中具有重要的应用价值。

发明内容

[08] 本专利采用 LC-MS/MS 法检测抗体药物偶联物产品中的 DTPA, 样品采用 $FeCl_3$ 衍生, 弱碱性衍生条件, 衍生时间短, 且衍生后样品 8h 内稳定, 同时采用弱碱性流动相, 无需加入离子对试剂即可在 C18 色谱柱中产生较好的色谱峰。该方法高效、稳定、耐用性强。

[09] 本发明第一方面涉及一种采用液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS, 或 LC-MS/MS) 检测 ADC 样品中 DTPA 含量的方法, 其特征在于, 检测的 ADC 样品采用 Fe^{3+} 衍生, 且为弱碱性衍生条件, 采用 C18 色谱柱, 同时采用弱碱性流动相, 无需加入离子对试剂。

[10] 进一步的, 本发明的弱碱性是指 $7 \leq pH \leq 8$ 。

- [11] 进一步的, 所述 Fe^{3+} 衍生为采用 FeCl_3 衍生。
- [12] 进一步的, 所述流动相 A 为包括乙酸铵和氢氧化铵的水溶液; 优选包括 0.2% 80-100 mM 乙酸铵 (W/V) 和 0.01% 氢氧化铵 (W/V) 的水溶液; 最优选包括 0.2% 100 mM 乙酸铵 (W/V) 和 0.01% 氢氧化铵 (W/V) 的水溶液。
- [13] 进一步的, 所述流动相 B 为包括乙酸铵和氢氧化铵的乙腈溶液; 优选包括 0.2% 80-100 mM 乙酸铵 (W/V) 和 0.01% 氢氧化铵 (W/V) 的乙腈溶液; 最优选包括 0.2% 100 mM 乙酸铵 (W/V) 和 0.01% 氢氧化铵 (W/V) 的乙腈溶液。
- [14] 进一步的, 加入的 FeCl_3 溶液的浓度约为 40—60 $\mu\text{g/ml}$, 进一步优选为 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 。
- [15] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 其中所述方法采用 DTPA 制作标准品溶液。
- [16] 进一步的, 所述标准品溶液优选为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 溶液。
- [17] 进一步的, 述 DTPA 溶液的配置及标准曲线系列溶液配制包括如下步骤:
- [18] 1) DTPA 工作液配制: 称取 5~10 mg 的 DTPA 标准品到 EP 管中, 用 1ml 的 0.1% 氢氧化铵溶解为母液, 后将母液逐级稀释至 DTPA 浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 。
- [19] 2) 标准曲线系列溶液配制: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 标准品溶液, 用流动相 A 稀释成浓度为 500 ng/ml、400 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml、50 ng/ml 系列浓度的 DTPA 标准品溶液。
- [20] 所述方法进一步包括质控溶液, 所述质控溶液采用流动相 A 稀释 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 溶液制备而成, 质控溶液的浓度为 400 ng/ml (HQC)、200 ng/ml (MQC)、100 ng/ml (LQC) 的 DTPA 质控溶液。
- [21] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 所述液相色谱仪包括但不限于: 美国安捷伦公司 Agilent 1200 型液相色谱仪、Teledyne Isco 高压制备液相色谱仪、安捷伦 HPLC 1260 高效液相色谱仪;
- [22] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 所述串联质谱仪包括

但不限于：美国 AB Sciex 公司 API 4000 型串联质谱仪、岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪、GBC 电感耦合等离子体直角加速式飞行时间质谱仪 Optimass；

[23] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法，液相色谱采用 C18 柱，包括但不限于：YMC-C18、Agilent Extard-C18、资生堂 PAK CR-18；

[24] 在本发明任一方面的任一实施方案中，任一技术特征可以适用于其它实施方案中的该技术特征，只要它们不会出现矛盾。本发明所引述的所有文献，它们的全部内容通过引用并入本文，并且如果这些文献所表达的含
义与本发明不一致时，以本发明的表述为准。

附图说明

[25] 图 1：线性拟合 DTPA 的标准曲线

[26] 图 2：LC-MS/MS 法测定 DTPA 含量检测结果

具体实施方式

实施例 1 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定 DTPA 含量

1)工作液的配制；

[27] DTPA 工作液配制：称取 5~10 mg 的 DTPA 标准品到 EP 管中，用 1ml 的 0.1%氢氧化铵溶解为母液，后将母液逐级稀释至 DTPA 浓度为 1.0 μg/ml。

[28] 三氯化铁工作液配制：称取 10~20 mg 的三氯化铁到 EP 管中，用适量水溶解为母液，后将母液逐级稀释至三氯化铁浓度为 50.0 μg/ml。

[29] 标准曲线系列溶液配制：1.0 μg/ml 的 DTPA（设为 A1）标准品溶液，按照表 2 用流动相 A 稀释成浓度为 600 ng/ml、400 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml、50 ng/ml 系列浓度的 DTPA 标准品溶液。分别取上述不同浓度的 DTPA 标准品溶液各 200 μl，各自加入 5 μl 三氯化铁溶液（浓度 50.0 μg/ml），旋涡混合，室温避光反应 9 h 后，直接上机检测。

表 1

样品名称	工作液 名称	工作液 体积(μl)	稀释液体积(μl)	总体积 (μl)	DTPA 终浓度 (ng/ml)
------	-----------	---------------	-----------	-------------	---------------------

STD5	A1	600	400	1000	600
STD4	A1	400	600	1000	400
STD3	STD4	500	500	1000	200
STD2	STD3	500	500	1000	100
STD1	STD2	500	500	1000	50

[31] 质控溶液配制：1.0 µg/ml 的 DTPA（设为 A1'，需重新从母液稀释）标准品溶液，按照表 2 用流动相 A 稀释成浓度为 400 ng/ml(HQC)、200 ng/ml (MQC)、100 ng/ml (LQC)的 DTPA 质控溶液。分别取上述不同浓度的 DTPA 质控溶液各 200 µl，各自加入 5 µl 三氯化铁溶液（浓度 50.0 µg/ml），旋涡混合，室温避光反应 4 h 后，直接上机检测。

[32] 表 2

样品名称	工作液名称	工作液体积(µl)	稀释液体积(µl)	总体积(µl)	DTPA 终浓度 (ng/ml)
HQC	A1'	400	600	1000	400
MQC	HQC	500	500	1000	200
LQC	MQC	500	500	1000	100

2)液相色谱-串联质谱测定：

[33] 待测样品处理：以流动相 A（0.2% 100 mM 乙酸铵 0.01%氢氧化铵水溶液）作为稀释液，将 ADC 样品浓度稀释至适当浓度（样品 DTPA 含量在线性区间内，若超出范围则需加大/减小稀释倍数再次检测）。取 200 µl 稀释后样品，加入 5 µl 三氯化铁溶液（浓度 50.0 µg/ml），旋涡混合，室温避光反应 4 h 后，直接上机检测。

[34] 流动相 A 的配制：称取乙酸铵 0.771 g，加入 80 ml 水搅拌溶解后，加水定容至 100 ml，经 GHP 滤膜过滤即得 100 mM 乙酸铵，精密量取 100 mM 乙酸铵 1000 µl，10%氢氧化铵 500 µl，加入水至刻度 500 ml，经 GHP 滤膜过滤即得。

[35] 流动相 B 的配制：精密量取 100 mM 乙酸铵 1000 µl，10%氢氧化铵 500 µl，再加入乙腈 500 ml，GHP 滤膜过滤即得。

[36] 进行检测时，流动相 A 和流动相 B 按照如表 3 所示的浓度梯度进行洗脱。

[37] 表 3

洗脱梯度	洗脱时间 (min)	模块	事件	参数
	0.0	Pumps	Pump B ConC	10
	2.0	Pumps	Pump B ConC	10
	2.5	Pumps	Pump B ConC	50
	5.0	Pumps	Pump B ConC	80
	5.5	Pumps	Pump B ConC	10
	8.0	Controller	Stop	/

3)数据处理与分析

5 [38] 评价标准：标准曲线： $r \geq 0.9800$ ，定量上限及定量下限浓度点回收率在 80.0%-120.0%。

[39] 质控的回收率在 80.0%-120.0%之间，每一浓度的质控样品至少 50% 符合该范围，且同一分析批次至少 4 个质控浓度点符合要求。

具体结果如下：

10 [40] 表 4：标准曲线（具体拟合曲线参见图 1）

样品名称	样品类型	实际浓度(ng/ml)	峰面积	保留时间	计算浓度(ng/ml)	准确性
STD1	Standard	50	2.16E+04	2.57	45.481	90.96
STD2	Standard	100	1.32E+06	2.56	118.126	118.13
STD3	Standard	200	2.94E+06	2.57	209.537	104.77
STD4	Standard	400	6.36E+06	2.58	401.707	100.43
STD5	Standard	500	7.69E+06	2.58	476.081	95.22
STD6	Standard	600	8.88E+06	2.58	543.008	90.5
LQC	QC	100	1.200e6	2.58	111.701	111.70
MQC	QC	200	2.865e6	2.58	205.222	102.61
HQC	QC	400	5.924e6	2.59	377.034	94.26

[41] 线性拟合后获得标准曲线如下:

[42] $Y=16058x-416744$ $R^2=0.9936$ 根据图 1 的结果显示, $R^2>0.99$,拟合性较好。

实施例 2 检测方法结果与评价

5 1) 耐用性 (稳定性)

[43] 衍生温度的耐用性:取浓度为 600 ng/ml 的 DTPA 标准品溶液 200 μ l , 加入 5 μ l 三氯化铁溶液 (浓度 50.0 μ g/ml), 旋涡混合, 避光反应 4 小时, 衍生温度分别为室温, 37°C 和 50°C, 考察衍生温度对结果的影响, 具体结果见表 5。

10 [44] 表 5

样品理论浓度 (ng/ml)	37°C 衍生样品浓度 (ng/ml)	室温衍生样品浓度 (ng/ml)	50°C 衍生样品浓度 (ng/ml)	RSD(%)
50	59.827	46.434	71.934	21.5
100	104.847	117.73	107.631	6.2
200	213.285	192.906	190.428	6.3
400	375.96	386.096	449.338	9.9
500	444.249	465.884	411.396	6.3
600	579.645	619.491	657.508	6.3

[45] 衍生时间的耐用性:取浓度为 600 ng/ml 的 DTPA 标准品溶液 200 μ l , 加入 5 μ l 三氯化铁溶液 (浓度 50.0 μ g/ml), 旋涡混合, 室温避光反应, 分别衍生 4 小时, 6 小时, 8 小时考察衍生时间对结果的影响, 具体结果见表 6。

15 [46] 表 6

样品理论浓度 (ng/ml)	4h 衍生样品浓度 (ng/ml)	6h 衍生样品浓度 (ng/ml)	8h 衍生样品浓度 (ng/ml)	RSD(%)
50	46.434	51.557	45.159	7.1
100	117.73	101.666	93.884	11.6
200	192.906	139.134	132.229	21.5

400	386.096	329.076	290.415	14.4
500	465.884	458.652	489.751	3.5
600	619.491	666.944	700.338	6.15

[47] 考察被测溶液（精密度试验用样品）的稳定性即，DTPA 与三氯化铁衍生反应后在样品盘放置 0 时，4 小时，8 小时标准品 DTPA 的含量变化，具体结果见表 7。

[48] 表 7

样品理论浓度 (ng/ml)	0h 样品浓度 (ng/ml)	4h 样品浓度 (ng/ml)	8h 样品浓度 (ng/ml)	RSD(%)
50	52.775	56.24	58.383	5.1
200	195.657	170.057	180.946	7.1
400	342.436	338.507	337.147	0.8
600	734.414	640.083	642.08	8.0

5 [49] 评价标准：浓度(相对标准偏差 RSD%) $\leq$ 25.0%。根据表 5-7 的实验结果可知，RSD%均小于 25.0%，因此本方法的耐用性强。

2) 重复性

[50] 待仪器稳定后，取标准品 3 溶液（DTPA 浓度为 200 ng/ml），按照实验方法衍生进样分析，测定 6 份的结果进行评价，结果见表 8。采集色谱图，计算主峰含量 RSD。

[51] 表 8

进样次数	峰面积 (EU)	浓度 (ng/ml)
第 1 次	1.37E+05	213.430
第 2 次	1.15E+05	177.924
第 3 次	1.40E+05	218.562
第 4 次	1.42E+05	220.844
第 5 次	1.45E+05	225.477
第 6 次	1.45E+05	226.486

RSD	8.3%	8.5%
-----	------	------

- [52] 定量分析领域中，重复性是指在相同操作条件下，由同一个分析人员在较短的间隔时间内测定所得结果的精密度，重复性的可接受标准：主峰浓度 $RSD \leq 15.0\%$ ，本试验 $RSD < 15.0\%$ ，本方法的 RSD 大大小于最高比例，可重复性好。
- 5 [53] 以上通过本发明较佳实施例对本发明的精神作了详细阐述。本领域技术人员理解，凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何修改、等同变化与修饰，均落在本发明的保护范围内。

权 利 要 求 书

1.一种采用液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS) 检测 ADC 中 DTPA 含量的方法, 其特征在于, 检测的 ADC 样品采用 Fe^{3+} 衍生, 且为弱碱性衍生条件, 采用 C18 色谱柱, 同时采用弱碱性流动相, 无需加入离子对试剂。

5 2.根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述 Fe^{3+} 衍生为采用 FeCl_3 衍生。

3.根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述弱碱性流动相包括流动相 A, 流动相 A 为包括乙酸铵和氢氧化铵的水溶液; 优选包括 0.2% 80-100 mM 乙酸铵和 0.01% 氢氧化铵的水溶液; 最优选包括 0.2% 100 mM 乙酸铵和 0.01% 氢氧化铵的水溶液。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 所述弱碱性流动相包括流动相 B, 流动相 B 为包括乙酸铵和氢氧化铵的乙腈溶液; 优选包括 0.2% 80-100 mM 乙酸铵和 0.01% 氢氧化铵的乙腈溶液; 最优选包括 0.2% 100 mM 乙酸铵和 0.01% 氢氧化铵的乙腈溶液。

15 5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 加入的 FeCl_3 溶液的浓度约为 40—60 $\mu\text{g/ml}$, 进一步优选为 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述方法采用 DTPA 制作标准品溶液。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述标准品溶液优选为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 溶液。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述 DTPA 溶液的配置及标准曲线系列溶液配制包括如下步骤:

1) DTPA 工作液配制: 称取 5~10 mg 的 DTPA 标准品到 EP 管中, 用 1ml 的 0.1% 氢氧化铵溶解为母液, 后将母液逐级稀释至 DTPA 浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$;

2) 标准曲线系列溶液配制: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 标准品溶液, 用流动相 A 稀释成浓度为 500 ng/ml、400 ng/ml、200 ng/ml、100 ng/ml、50 ng/ml 系列浓度的 DTPA 标准品溶液。

9. 根据权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括质控溶液, 所述质控溶液采用流动相 A 稀释 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTPA 溶液制备而成, 质控溶液的浓度为 400 ng/ml(HQC)、200 ng/ml (MQC)、100 ng/ml

(LQC)的 DTPA 质控溶液。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，所述液相色谱仪包括但不限于：美国安捷伦公司 Agilent 1200 型液相色谱仪、Teledyne Isco 高压制备液相色谱仪、安捷伦 HPLC 1260 高效液相色谱仪。

5 11. 根据权利要求 1 所述的方法，所述串联质谱包括但不限于：美国 AB Sciex 公司 API 4000 型串联质谱仪、岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪、GBC 电感耦合等离子体直角加速式飞行时间质谱仪 Optimass。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，所述 C18 色谱柱，包括但不限于：YMC-C18、Agilent Extard-C18、资生堂 PAK CR-18。

10