超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林

LCMSMS-181

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林的方法。方法采用类似物奥曲肽作为内标物，方法定量限 10 pg/mL，线性范围为 10~2000 ng/mL，相关系数 0.9997。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且亮丙瑞林和内标物奥曲肽之间无相互干扰。方法的日内精密度 2.14~4.38 %，日间精密度 2.68~5.11 %，各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4 %，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 75 %，基质效应因子均大于 70 %，内标归一化基质效应因子在 100 % 左右；系统残留考察结果表明在实验条件下亮丙瑞林无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中替比夫定含量的快速检测，可用于人体内多肽类药物亮丙瑞林浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词：超快速液相色谱三重四极杆质谱血浆多肽类药物亮丙瑞林

亮丙瑞林是下丘脑产生的促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a)，是由 9 个氨基酸构成的肽类，能与垂体内的特异性受体结合，降低垂体反应性，从而抑制性腺系统。亮丙瑞林促进黄体生成素 (LH) 释放的活性约为 GnRH 的 20 倍，对垂体 – 性腺功能的抑制作用也较 GnRH 强，对性激素依赖性疾病如前列腺癌、子宫内膜异位症等起到治疗作用。亮丙瑞林的给药剂量低，在体内的半衰期长，血药浓度通常为 pg/mL 级。

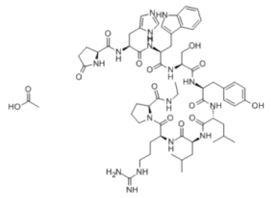
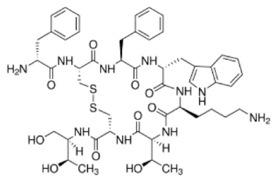
目前关于生物基质中亮丙瑞林的血药浓度测定方法的文献报道较少，缺少能够快速、高灵敏度地检测该药物血药浓度的方法。本工作利用岛津的超高效液相色谱，实现血浆基质中磷脂分子、内源性物质和多肽类目标药物的快速分离，避免血浆中复杂的内源性物质对目标化合物的准确定量带来的干扰。串联三重四极杆 LCMS-8050 能够实现目标多肽物质的高灵敏度分析，并且离子源同轴加热技术能够促进雾化，提高离子化效率，降低基质干扰和噪音水平，实现血浆基质中多肽药物的准确、稳定检测。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
亮丙瑞林	Leuprolide	74381-53-6	$C_{59}H_{84}N_{16}O_{12}$	
奥曲肽 (IS)	Octreotide	83150-76-9	$C_{49}H_{66}N_{10}O_{10}S_2$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A$_5$ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS–8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutionsVer. 5.65 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil Sustain Swift C18 Column（2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 µm）

流动相：A 相 -0.1 % 甲酸水溶液

B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

进样量：20 µL

自动进样器温度：10℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20 %，洗脱程序见表 2。

洗针方式：Rinse Pump>Rinse Port，Rinse Pump 洗针液为乙腈 / 异丙醇 / 丙酮 / 水 / 甲酸 =25/25/25/24.5/0.5（v/v/v/v/v）；Rinse Port 洗针液为 50 % 甲醇

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050

离子源：ESI，正离子模式分析

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：15.0 L/min

接口温度：400℃

DL 温度：200℃

加热模块温度：400℃

干燥气流速：5.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：75 ms

MRM 参数：见表 3

表 3 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias（V）	CE(V)	Q3 Pre Bias（V）
亮丙瑞林	605.40	249.05	-22.0	-29.0	-26.0
		221.00	-22.0	-38.0	-23.0
奥曲肽（内标）	510.30	120.00	-36.0	-31.0	-21.0

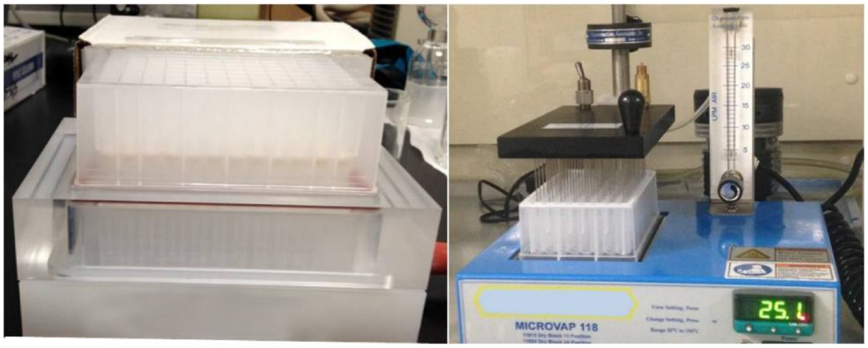
1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 亮丙瑞林储备液。一份储备液用 50 % 甲醇逐级稀释成浓度为 0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 的工作曲线；另一份储备液用 50 % 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 ng/mL、3.0 ng/mL、15 ng/mL 的质控溶液。取 10 µL 标准工作曲线加入 990 µL 空白血浆中，依次配制成标准曲线；取 10 µL 质控溶液加入 990µL 空白血浆中，依配制成低浓度（LQC）、中浓度（MQC）、高浓度（HQC）质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 奥曲肽储备液，用 50 % 甲醇稀释成 100 µg/mL，配制成内标工作液。

1.5 样品前处理方法

250 µL 血浆样品加入 50 µL 的内标溶液，用 4 % 磷酸稀释至 500 µL 后上样至预先活化好的 96 孔板式 SPE 小柱上，先用 500 µL5 % 氨水溶液淋洗，再用 500 µL 50 % 乙腈淋洗，最后用 500 µL1 % TFA80 % 乙腈溶液洗脱。氮吹干后，用 50 % 甲醇溶液复溶。



1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限（LLOQ）的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20 %，测量误差不超过理论值的 80~120 %，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（30 pg/mL、300 pg/mL、1500 pg/mL），日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度 / 理论浓度 ×100 % 计算。准确度在 85~115 % 范围内，精密度不超过 15 %。

亮丙瑞林回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

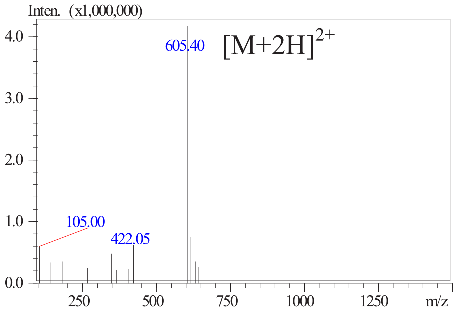


图 1 亮丙瑞林的一级质谱图

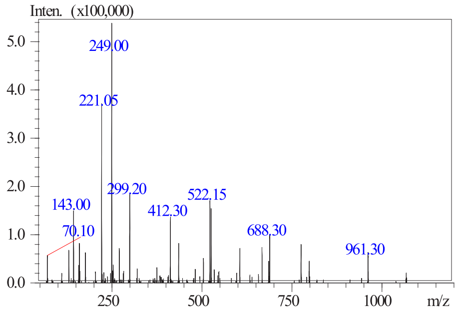


图 2 亮丙瑞林的产物离子扫描图(CE 值-25 V)

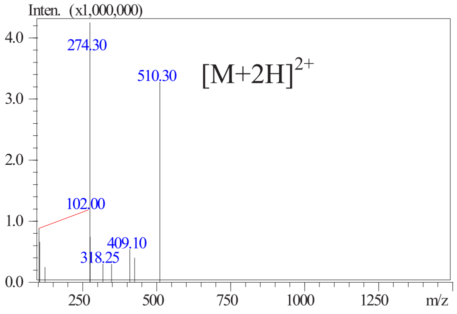


图 3 奥曲肽的一级质谱图

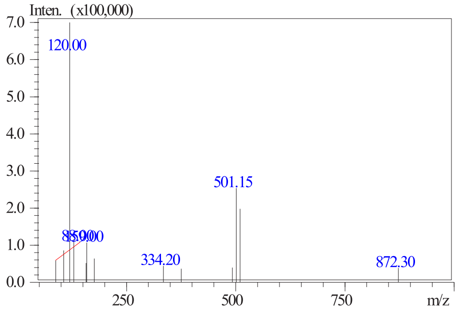


图 4 奥曲肽的产物离子扫描图(CE 值-20 V)

2.2 方法选择性

考察空白血浆基质和 10 pg/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，亮丙瑞林及其内标奥曲肽的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

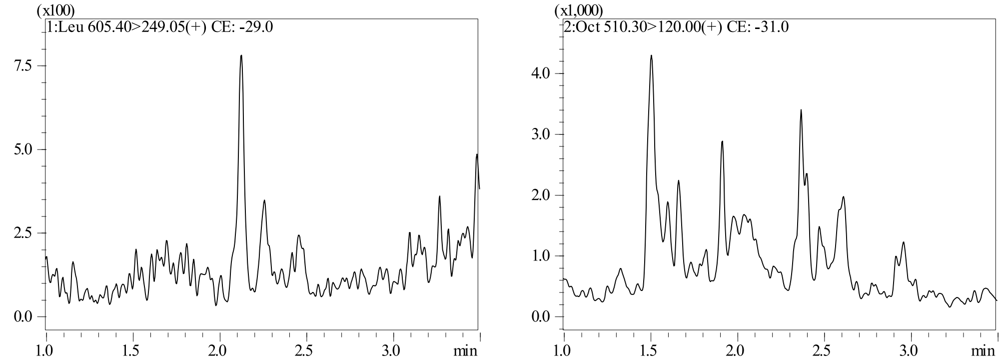


图 5 空白血浆样品的 MRM 色谱图

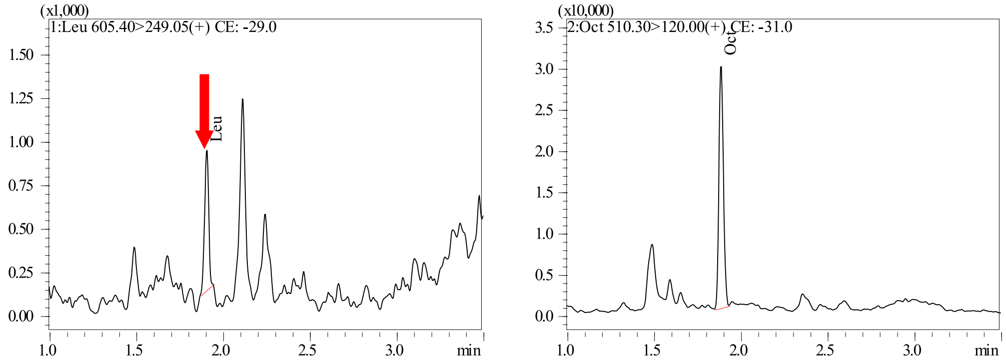


图 6 10 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察内标物奥曲肽对替比夫定测定结果的影响，处理过程加入内标的空白样品（QC0 样品）如图 7 所示，与图 6 10 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，内标物奥曲肽不会对亮丙瑞林的准确测定造成干扰。

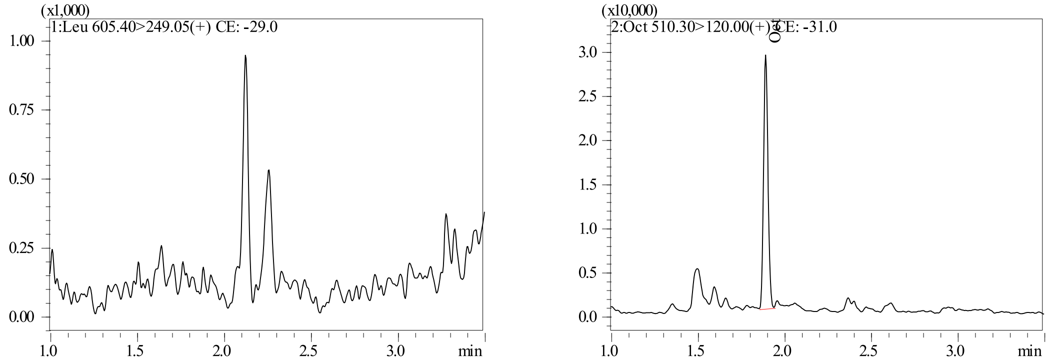


图 7 QC0 的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 10 pg/mL、20 pg/mL、50 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、500 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，内标法定量。所得校准曲线如图 8 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表亮丙瑞林面积与奥曲肽峰面积的比值，x 值代表血浆中亮丙瑞林浓度。方法检出限确定为 10 pg/mL，在此浓度水平，精密度和准确度均在接受标准内，6 次重复分析 RSD 为 7.60 %，准确度为 86.7~108.4 %，S/N 平均值为 14.6。

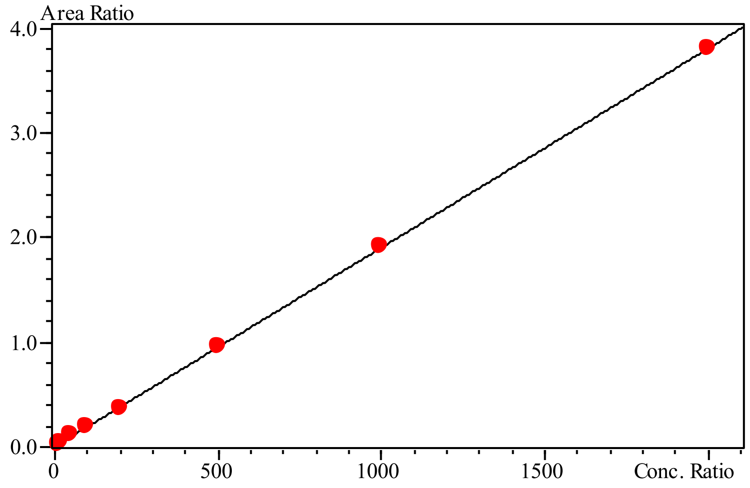


图 8 亮丙瑞林标准曲线

表 4 校准曲线参数（线性回归，权重为 1/C）

化合物	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
亮丙瑞林	$Y = (1.85\times10^{-3})X + (3.86\times10^{-3})$	10~2000	91.3~110.3 %	0.9997

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度，结果如表 5 所示。方法的日内精密度 2.14~4.38 %，日间精密度 2.68~5.11 %，各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4 %。

表 5 方法日间精密度和日内精密度结果(3 天，每天重复 6 次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度 %
30	4.38	5.11	87.7~114.4
300	2.14	3.58	86.0~95.9
1500	2.58	2.68	86.0~101.3

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平亮丙瑞林的回收率分别为 79.8±1.7 %, 76.8±9.6 % and 75.2±10.9 %。实验结果表明亮丙瑞林的各质控浓度回收率一致，CV % 的变化也满足准确定量的要求。

表 6 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率 %
LQC	30	79.8
MQC	300	76.8
HQC	1500	75.2

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 70 %，内标归一化基质效应因子均在 100 % 左右。

表 7 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	30	70.8%	108.1%
MQC	300	71.5%	100.4%
HQC	1500	77.0%	99.5%
内标基质效应因子		71.2%	

2.7 Carryover 考察

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中亮丙瑞林的峰面积，空白样品中亮丙瑞林及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰，色谱图见图 9。

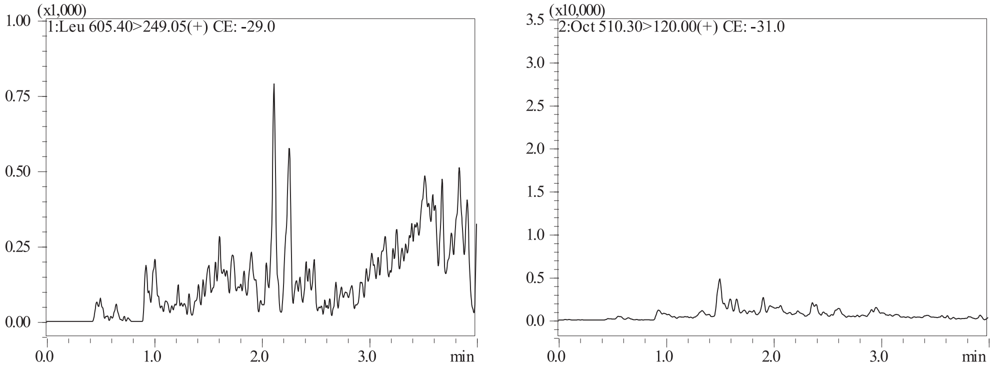


图 9 高浓度样品后分析后空白样品的 MRM 色谱图

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物亮丙瑞林的方法。该方法在 5.5 min 内完成血浆中亮丙瑞林的检测，采用奥曲肽作为内标定量，方法定量限 10 pg/mL，线性范围为 10~2000 pg/mL，相关系数在 0.9997。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且亮丙瑞林和内标物奥曲肽之间无相互干扰。方法的日内精密度 2.14~4.38 %，日间精密度 2.68~5.11 %，各浓度水平质控样品的准确度 86.0~114.4 %，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 75 %，基质效应因子均大于 70 %，内标归一化基质效应因子在 100 % 左右；高浓度样品分析后考察空白样品中的残留，结果表明在 10~2000 pg/mL 线性范围内无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中多肽类药物亮丙瑞林含量的快速准确检测。