

LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽

LCMSMS-192

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 联用测定血浆中艾塞那肽的方法。该多肽化合物的线性良好，判定相关系数大于 0.993；重复性实验结果表明：其保留时间和峰面积相对标准偏差分别为 0.03% 和 4.21~4.67% 之间，仪器精密度良好；其仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.03 ng/mL；样品加标相对回收率在 30.4 ~ 34.8% 之间。该方法在血浆基质中灵敏度高分析速度快可以快速、灵敏地测定大鼠血浆中的艾塞那肽。

关键词：艾塞那肽 血浆 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

糖尿病，尤其是 II 型糖尿病是威胁人类健康的重大疾病，传统的治疗药物磺酰脲类和双胍类不仅副作用较大，而且对某些患者治疗效果有限；人体分泌的胰高血糖素样肽 (GLP-1) 在血糖浓度较高的情况下能促进胰岛素分泌，而在血糖正常时则无此作用，而且其很容易被体内的二肽酶降解，体内半衰期不足 2 分钟，因此其作为临床药物使用受到了限制。后来人们发现一种从墨西哥巨蜥的毒液中分离得到的含 39 个氨基酸的多肽艾

塞那肽与胰高血糖素样肽具有同源性，而且有同样的胰岛素分泌的功能，稳定性好，在 II 型糖尿病治疗方面具有良好的临床应用前景。

由于该类多肽药物的市场前景及由此带来的巨额利润，目前国内多家制药企业对此进行了多类剂型的仿制药的研发。为了满足用户对此类药物快速、高灵敏度的要求本文建立了一种快速灵敏的大鼠血浆中艾塞那肽的检测方法。

实验部分

1.1 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-20A5R(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, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

1.2 分析条件

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

流动相: A 相: (0.3% 甲酸 +1mM 乙酸铵) 水,

B 相: (0.3% 甲酸 +1mM 乙酸铵)

乙腈流速: 0.40 mL/min

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始比例 10%B

表1 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.51	Pumps	Pump B Conc.	10
8.50	Controller	Stop	

质谱条件
分析仪器：LCMS-8050
离子源：ESI+
雾化气流速：3.0 L/min
加热气流速：10.0 L/min

接口温度：300℃
DL 温度：150℃
加热模块温度：400℃
干燥气流速：10.0 L/min
扫描模式：多反应监测 (MRM)，MRM 参数见表 2

表2 化合物信息及MRM参数

序号	化合物	英文名	CAS	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE	Q3Pre Bias(V)
1	艾塞那肽	Exenatide	141758-74-9	1047.60	396.10*	-40.0	-40.0	-19.0
					299.20	-40.0	-54.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：用甲醇配制 5 mg/mL 的混合标准贮备液，用乙腈 + 水溶液 +0.2%BSA(V/V/M, 80:20:0.2) 逐步稀释成 4、20、40、200、400 和 800 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：取空白SD大鼠血浆 100 μL 加入 10 μL 标准溶液，再加入 290 μL 纯乙腈，振荡后高速离心取上清。

结果讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

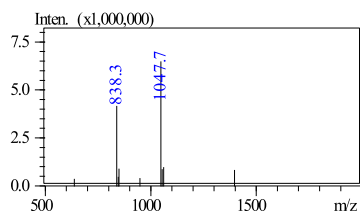


图1 艾塞那肽全扫描质谱图

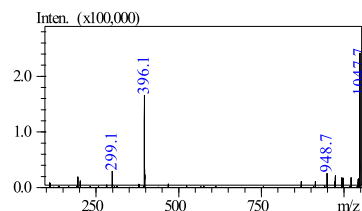


图2 艾塞那肽产物离子扫描质谱图

2.2 基质加标样品的 MRM 色谱图

基质加标样品的 MRM 色谱如图 3 所示。

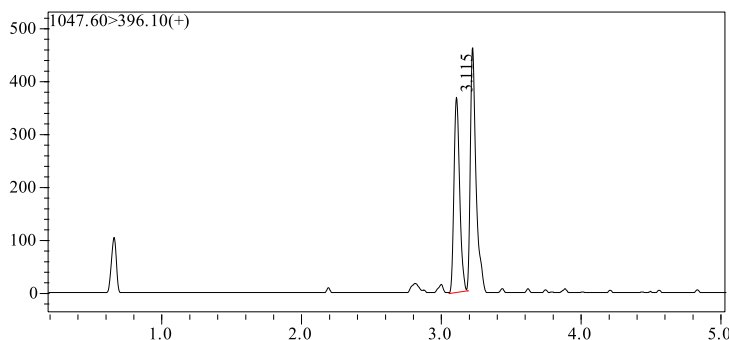


图3 基质加标样品的MRM色谱图(0.1 ng/mL)

2.3 线性关系

配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10 和 20 ng/mL 的基质加标工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，标线如下图所示。在 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和判定系数见表 3。

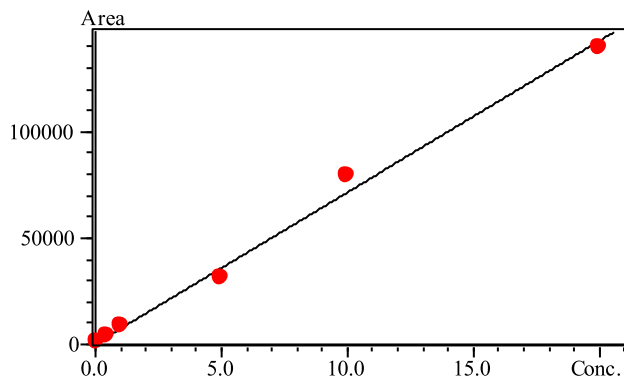


图4 标准工作曲线

表3 艾塞那肽校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ng/mL	准确度 (%)	判定系数 r^2
1	艾塞那肽	$Y = (7123.10)X + (359.992)$	0.1~20	86.2~110.4%	0.9931

2.4 检出限和定量限

对浓度为 0.5 ng/mL 的基质溶液进样分析，艾塞那肽的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表4 艾塞那肽的检出限和定量限

编号	名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	艾塞那肽	0.01	0.03

2.5 重复性实验

对二个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。2 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.03 和 4.21~4.67% 之间，仪器重复性良好。

表5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

编号	化合物	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)	
		R.T	Area	R.T	Area
1	艾塞那肽	0.03	4.67	0.03	4.21

2.6 回收率和专属性实验

大鼠血浆按照 1.3 方法进行处理获得浓度为 0.5、5 ng/mL 的样品各三份；另取适量大鼠血浆加入纯乙腈 (V/V, 1:3) 振荡后高速离心，取上清加标准品配制 0.5、5 ng/mL 的样品各三份。以前加标样品测得的峰面积为 A，后加标样品测得的峰面积为 A1 测定相对回收率，回收率 = A/A1。具体结果如表 6，回收率在 30.4 ~ 34.8% 之间。比较基质加标色谱图和空白基质色谱图可知该分析方法专属性良好。空白基质的色谱图如图 4 所示，样品的色谱图如图 5 所示。

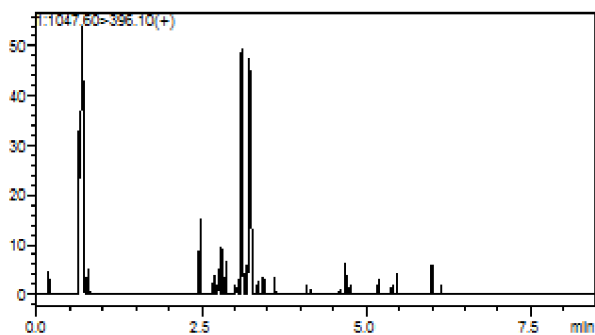


图5 空白基质色谱图

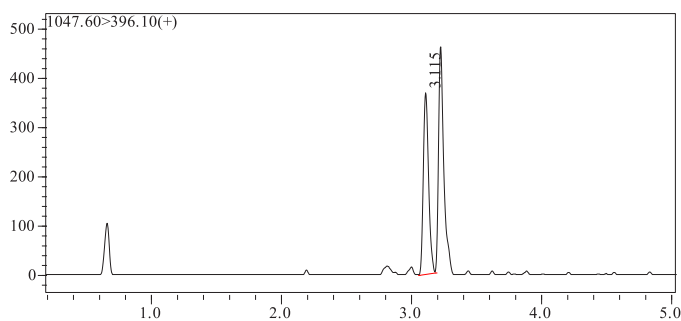


图6 加标回收色谱图(0.1 ng/mL)

表6 加标样的回收率结果(n=3)

浓度水平	浓度 (ng/mL)	平均回收率 %
1	0.5	30.4
2	5.0	34.8

2.7 样品残留考察

根据药品非临床药代动力学研究指导规则要求，在 20 ng/mL 的样品分析完成后对空白样品进行分析，结果如表 7 所示。残留面积和定量下限 0.1 ng/mL 的面积比为 7.2%，小于药品非临床药代动力学研究指导规则的 20% 的要求。该方法符合标准要求。

表7 残留考察结果

样品类型	峰面积	面积比 %
空白	68	7.2
定量下限	952	

■ 结论

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 联用测定大鼠血浆中的艾塞那肽。该多肽化合物的线性良好，判定系数大于 0.993；其仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.03 ng/mL；样品加标相对回收率在 30.4 ~ 34.8% 之间，样品残留结果符合药品非临床药代动力学研究指导规则要求。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，满足艾塞那肽体内药物分析要求，可作为血浆中艾塞那肽的有效检测方法。