

# LCMS-8060 测定人血浆中新型降糖药及其代谢物

## LCMSMS-266

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用技术 LCMS-8060 测定人血浆中的新型降糖药 CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 的方法。人血浆样品经二氯甲烷萃取后，可在 5.5 min 内快速、准确地完成分析。本文考察了方法的线性、精密度与准确度、回收率和残留，结果表明：CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 线性范围分别为 0.1~180 ng/mL，0.1~90 ng/mL，相关系数大于 0.999，准确度范围 90.6%~109%，线性良好；不同浓度质控样品每批次连续进样 6 次，其精密度与准确度分别在 2.11~7.54% 与 96.9~113% 之间；血浆加标样品 0.3 ng/mL 平行分析五次，CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 回收率分别为 97.7% 和 97.0%。

**关键词：**降糖药 血浆 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

CX1001 是一种新型降糖药物，可以高效抑制二肽基肽酶-4(DPP-4) 的活性，减缓肠促胰岛素的灭活，增加肠促胰岛素的浓度，葡萄糖依赖性地刺激胰岛素的释放，降低血浆胰高血糖素水平。研究证明该新型降糖药对降低血糖有着非常良好的治疗作用，持续时间长，安

全剂量范围较宽，具有较大的开发潜力和较高的开发价值。本文建立了一种测定人血浆中 CX1001 及其代谢产物 CX1001-M1 的 HPLC-MS/MS 方法，快速、灵敏、准确，可用于人血浆中 CX1001 及其代谢产物 CX1001-M1 的定量检测。

### 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-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 液相色谱条件

色谱柱：BEH C18(2.0 mm I.D.×50 mm L., 1.7 μm)

流动相：A 相 -0.05 % 甲酸 -2 mM 乙酸铵水溶液；

B 相 - 甲醇

流速：0.40 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40℃

清洗液：Rinse Pump 甲醇 / 乙腈 / 异丙醇 / 水 =

1:1:1:1(含甲酸 0.5%)，Rinse Port 甲醇 / 水 =1:1

洗针模式：进样前后洗针，External only(进样针外壁清洗)，Rinse Pump>Rinse Port

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 30% 时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module     | Command      | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 0.60      | Pumps      | Pump B Conc. | 30    |
| 2.00      | Pumps      | Pump B Conc. | 100   |
| 4.00      | Pumps      | Pump B Conc. | 100   |
| 4.10      | Pumps      | Pump B Conc. | 30    |
| 5.50      | Controller | Stop         |       |

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 20 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

| 名称        | 前体离子<br>[M+H] <sup>+</sup> | 产物离子<br>(m/z) | Q1 Pre Bias (V) | 碰撞能量<br>CE(V) | Q3 Pre Bias (V) |
|-----------|----------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| CX1001    | 482.20                     | 412.15*       | 20.0            | -18.0         | -29.0           |
|           |                            | 166.10        | 20.0            | -18.0         | -52.0           |
| CX1001-M1 | 483.20                     | 345.00*       | 20.0            | -18.0         | -34.0           |
|           |                            | 166.00        | 20.0            | -18.0         | -50.0           |
| CX002-9   | 464.20                     | 411.10        | 20.0            | -18.0         | -24.0           |

\*代表定量离子对

1.3 对照品溶液及内标溶液的配制

用 60% 甲醇水将标准储备液逐级稀释成浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、60 ng/mL、200 ng/mL、600 ng/mL、1800 ng/mL、3600 ng/mL 的工作曲线; 用 60% 甲醇水溶液将标准储备液逐级稀释成浓度为 6 ng/mL、24 ng/mL、240 ng/mL、2400 ng/mL 的质控溶液。取 50 μL 标准工作曲线加入 950 μL 空白血浆中, 依次配制成标准曲线样品; 取 50 μL 质控溶液加入 950 μL 空白血浆中, 依次配制成质控样品。用 60% 甲醇水将内标储备液稀释为 100 ng/mL 的内标工作液。

1.4 样品处理方法

取 100 μL 血浆, 加入 50 μL 内标, 加入 100 μL 0.5 M 氢氧化钠水溶液, 加入 3 mL 二氯甲烷, 漩涡混合 10 min, 3300 rpm 离心 8 min, 抽弃上层蛋白, 转移至尖底试管, 45°C 水浴氮吹挥干, 200 μL 30% 甲醇水复溶, 5 μL 进样。

■ 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图

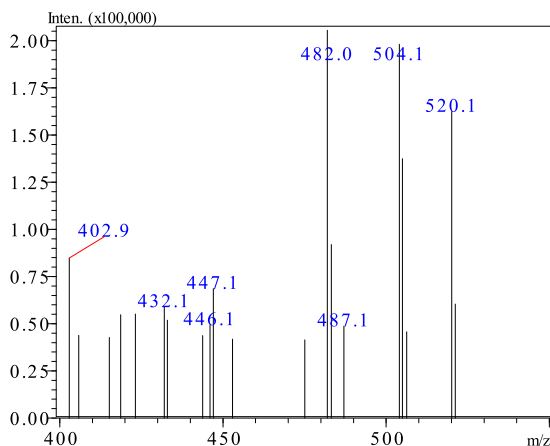


图1 CX1001一级质谱图

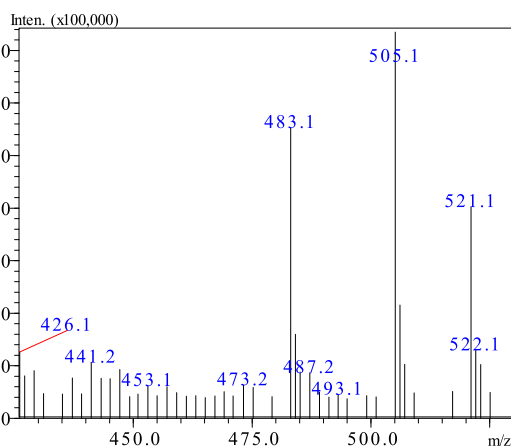


图2 CX1001-M1一级质谱图

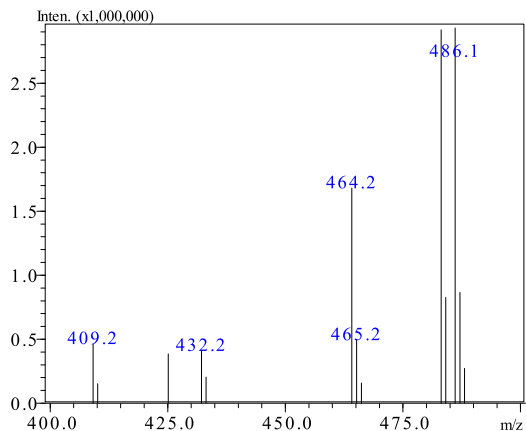


图3 C002-9一级质谱图

## 2.2 选择性

取空白人血浆 100  $\mu$ L, 按照 1.4 进行样品处理, 结果如图 4~16 所示。结果显示, 空白人血浆中目标化合物 CX1001 及其代谢产物 CX1001-M1 和内标 C002-9 的通道均不干扰定量限样品的检测。

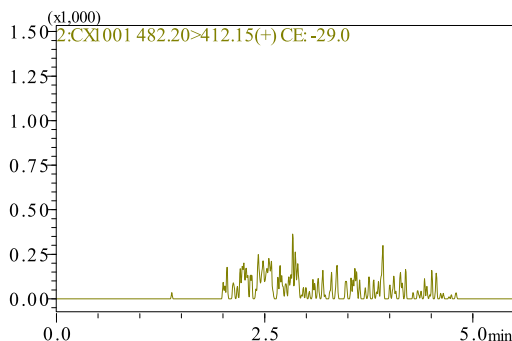


图4 空白血浆MRM谱图-CX1001

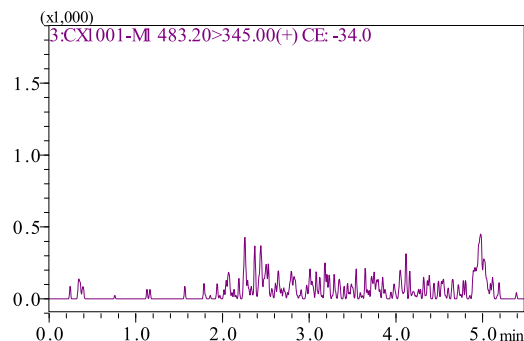


图5 空白血浆MRM谱图- CX1001-M1

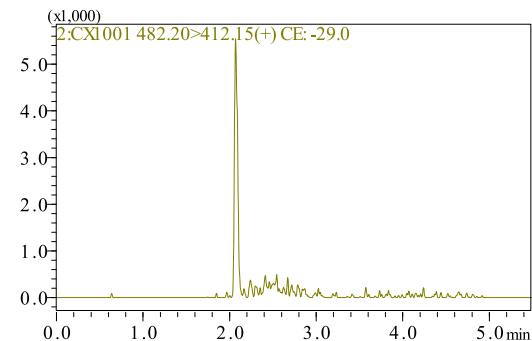


图6 血浆加标样品MRM谱图- CX1001 (0.5 ng/mL)

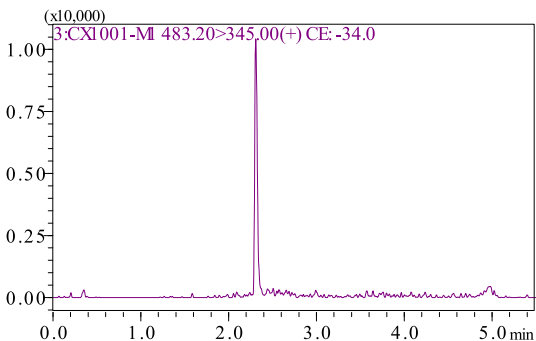


图7 血浆加标样品MRM谱图- CX1001-M1 (0.5 ng/mL)

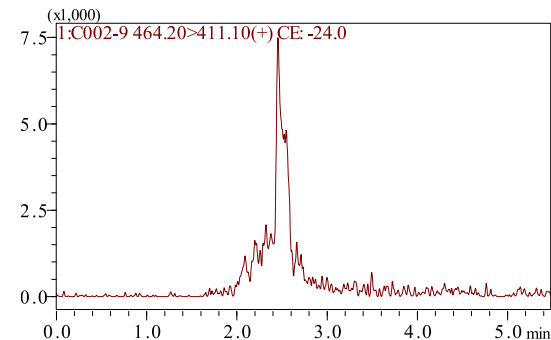


图8 空白血浆MRM谱图-C002-9

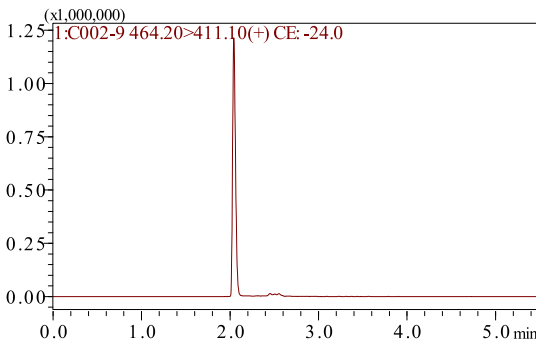


图9 血浆样品MRM谱图-C002-9

### 2.3 线性范围

所得校准曲线样品浓度分别为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、3 ng/mL、10 ng/mL、30 ng/mL、90 ng/mL、180 ng/mL。内标法绘制校准曲线。校准曲线如图 10、11 所示，线性方程及相关系数见表 3，其中 Y 值代表待测物质与内标物质峰面积的比值，X 值代表血浆中待测物质浓度。

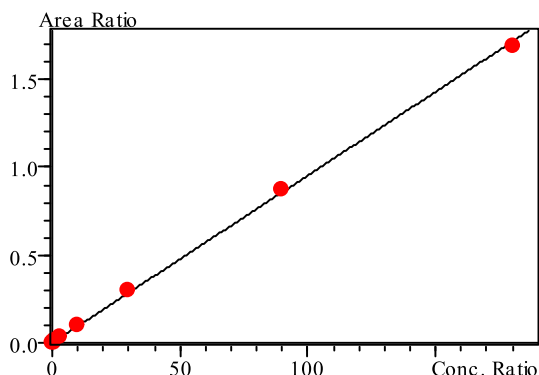


图10 CX1001校准曲线 (0.1~180 ng/mL)

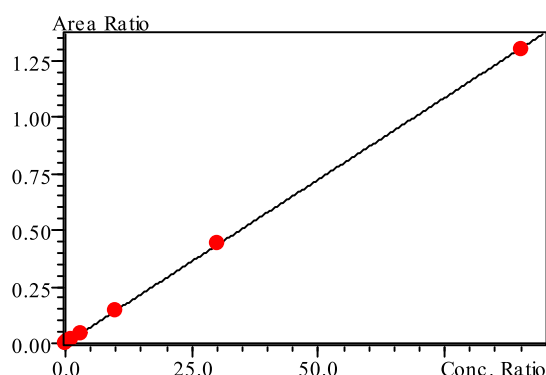


图11 CX1001-M1校准曲线 (0.1~90 ng/mL)

表3 CX1001及其代谢物CX1001-M1校准曲线参数 (线性回归, 权重为1/C)

| 名称        | 校准曲线                    | 线性范围(ng/mL) | 准确度(%)     | 相关系数 r |
|-----------|-------------------------|-------------|------------|--------|
| CX1001    | $Y=0.01448X+0.0004781$  | 0.1~180     | 90.6~107 % | 0.9997 |
| CX1001-M1 | $Y=0.009536X+0.0001808$ | 0.1~90      | 91.4~109 % | 0.9999 |

### 2.4 检出限和定量限

对浓度为 0.1 ng/mL 的混合标准溶液进样分析，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 检出限和定量限

| 名称        | 信噪比   | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
|-----------|-------|------------|------------|
| CX1001    | 22.48 | 0.012      | 0.041      |
| CX1001-M1 | 65.43 | 0.008      | 0.017      |

### 2.5 精密度与准确度

考察质控样品的日内精密度与准确度，结果如表 5 所示。

表5 方法精密度与准确度(n=6)

| 待测物质/样品浓度<br>(ng/mL) | 精密度<br>RSD% | 准确度<br>Accuracy% | 待测物质/样品浓度<br>(ng/mL) | 精密度<br>RSD% | 准确度<br>Accuracy% |      |
|----------------------|-------------|------------------|----------------------|-------------|------------------|------|
| CX1001               | 0.3         | 5.00             | 102                  | 0.3         | 7.54             |      |
|                      | 1.2         | 5.34             | 103                  | CX1001      | 1.2              | 3.89 |
|                      | 12          | 2.48             | 96.9                 | -M1         | 12               | 2.33 |
|                      | 120         | 2.11             | 98.8                 | -           | -                | -    |

结果表明，CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 在质控样品各浓度下的精密度分别在 2.11~5.34%，2.33~7.54% 之间；准确度分别在 96.9~103%，100~113% 之间。

## 2.6 回收率

血浆加标浓度 0.3 ng/mL 的样品按照 1.4 进行样品前处理，平行五次，CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 回收率分别为 97.7% 和 97.0%，具体结果见表 6。

表6 回收率(n=5)

| 名称        | 实测平均值 (ng/mL) | 回收率 (%) |
|-----------|---------------|---------|
| CX1001    | 0.293         | 97.7    |
| CX1001-M1 | 0.291         | 97.0    |

## 2.7 残留

在高浓度样品 (180 ng/mL) 后进样分析空白样品，考察 CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 和内标 C002-9 的残留情况。结果如图 12~14。

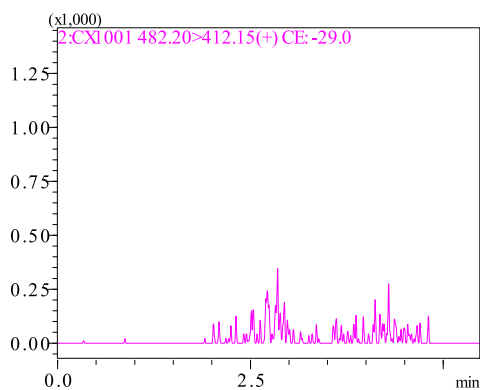


图12 CX1001残留考察

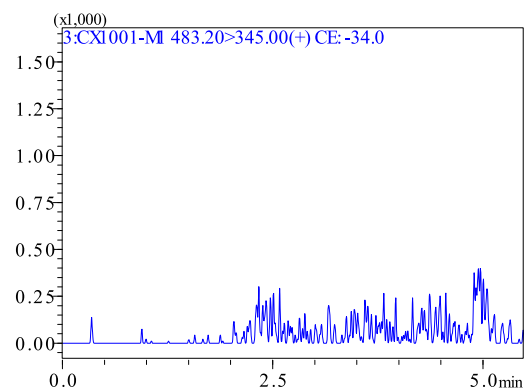


图13 CX1001-M1残留考察

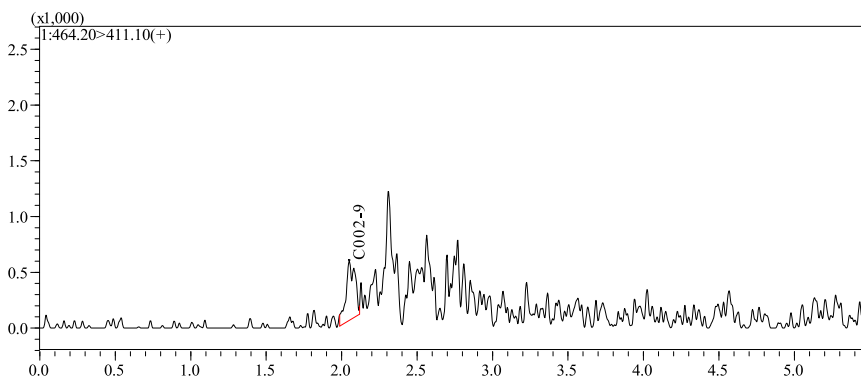


图14 C002-9残留考察

(残留峰面积: 2494, 加标样品峰面积: 2653489, 比值: 0.09%)

结果表明，在高浓度样品进样分析后分析空白样品，CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 和内标 C002-9 残留不会影响定量结果的准确性。

## ■ 结论

人血浆样品经二氯甲烷萃取处理，可在 5.5 min 内快速、准确地测定其中的 CX1001 及其代谢物 CX1001-M1。线性范围分别为 0.1~180 ng/mL，0.1~90 ng/mL，相关系数大于 0.999，准确度范围 90.6%~109%，线性良好；不同浓度质控样品每批次连续进样 6 次，其精密度与准确度分别在 2.11~7.54% 与 96.9~113% 之间；血浆加标样品 0.3 ng/mL 平行分析五次，CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 回收率分别为 97.7% 和 97.0%。该方法灵敏、稳定，可以用于新型降糖药 CX1001 及其代谢物 CX1001-M1 血浆浓度的定量测定。