

LCMS-8060 测定比格犬血浆中人胰岛素

LCMSMS-340

摘要：本文建立了一种简便、灵敏度高、选择性好的胰岛素定量分析方法，并在比格犬血浆中进行了验证。以甘精胰岛素作为内标，样品经过固相萃取后，使用 LCMS-8060 进行分析。结果显示在 1~1000 $\mu\text{IU/mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系 ($R>0.99$)，定量下限为 1 $\mu\text{IU/mL}$ (相当于 38.46 pg/mL)。人类胰岛素的日内和日间精密度 (用相对标准偏差表示, RSD) 分别 $\leq 12.1\%$ 和 13% ，准确度在 $-7.23 \sim 11.9\%$ 范围之内。该方法已成功应用于比格犬皮下注射人胰岛素的药动学研究。

关键词：比格犬血浆 胰岛素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

随着生活节奏和饮食习惯的改变，全球糖尿病发病率迅速增加，已成为严重影响人类健康的主要疾病之一。根据国际糖尿病联合会 (IDF) 的数据，2015 世界上有 4 亿 1500 万多人患有糖尿病，预计到 2040 年将增加到 6 亿 4200 万人。胰岛素及其类似物的发现和应用使许多患有糖尿病的患者改善了他们的生活条件。许多研究表明，胰岛素不仅用于糖尿病的治疗，而且还涉及有害的胰岛素给药引起的故意杀人，它可以作为运动员的兴奋剂物质。然而，胰岛素及其类似物仍然是最有效的糖尿病治疗。因此，迫切需要灵敏、高通量、准确的分析方法。

目前，胰岛素定量的方法主要有两种：一是配体结

合实验 (LBA) 如放射免疫法 (RIA) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA)，另外一种为液相色谱 - 质谱 (LC-MS) 法。在胰岛素的药代动力学研究中 LBA 被研究者认为可以提供足够的精度和灵敏度，但是与 LC-MS 法相比其缺点也是非常明确的。在过去的几年中，虽然有部分临床胰岛素的定量研究是基于 LC-MS/MS 质谱的，但是在胰岛素药物的临床前定量分析中仍然是以 LBA 方法为主。众所周知，LBA 方法的交叉反应严重影响数据的准确性，从而大大限制了 LBA 方法的应用和药物研发进展。因此，有必要建立一种用于临床前研究的胰岛素的 LC-MS/MS 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-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times 2$ (输液泵)，DGU-20A_{SR} (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutionsDB Ver. 6.72 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：InertSustain Bio C18 Column (2.1 mm I.D. \times 100 mm L., 1.9 μm)

流动相：A 相 - (1% 甲酸) 乙腈，
B 相 - (1% 甲酸) 水

流速：0.40 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始比例 70%B

表1 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	70
3.50	Pumps	Pump B Conc.	65
3.60	Pumps	Pump B Conc.	2
5.50	Pumps	Pump B Conc.	2
5.51	Pumps	Pump B Conc.	70
7.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI +

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：15.0 L/min

接口温度：400°C

DL 温度：150°C

加热模块温度：400°C

干燥气流速：5.0 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

名称	英文名	CAS No	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
人胰岛素 (5+)	Human Insulin	11061-68-0	1162.20	143.20	-44.0	-58.0	-29.0
甘精胰岛素 (IS)	Glargine Insulin	160337-95-1	1011.20	143.20	-38.0	-43.0	-29.0

1.3 样品制备

标准工作液配制：重组人胰岛素和甘精胰岛素（内标）的储备液浓度均为 100 IU/mL（如果重组人胰岛素和甘精胰岛素的浓度由 IU/mL 为转换成 mg/mL 的话，100 IU 相当于 3.846 mg 的人胰岛素或 3.638 mg 甘精胰岛素）。配制甲醇：水：甲酸 = 49:49:2(v/v/v) 的混合液作为标准工作液的稀释液，使用该稀释液稀释储备液至下列浓度工作液：10，20，50，200，1000，5000 和 10000 μ IU/mL。相同的配制方式得到浓度为 25，500，8000 μ IU/mL 的质控溶液。内标稀释至 5 mIU/mL 备用。取 110 μ L 标准工作液和质控溶液加入到 990 μ L 空白比格犬血浆中，稀释得到浓度为 1，2，5，20，100，500 和 1000 μ IU/mL 的标准曲线溶液和浓度为 2.5，50，和 800 μ IU/mL 的质控溶液。

样品前处理步骤：固相萃取法，WondaSep® MCX 萃取柱 (60 mg/3 mL，GL Sciences Corp., Japan)，洗脱液为 100 mM 醋酸铵 / 甲醇 / 氢氧化铵 v/v/v 为 30/70/0.5 的混合液。接收的洗脱液用氮气吹干后使用标准工作液的稀释液复溶，复溶液 12000 g 转速离心 10 分钟，取上清进样。进样体积 10 μ L。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

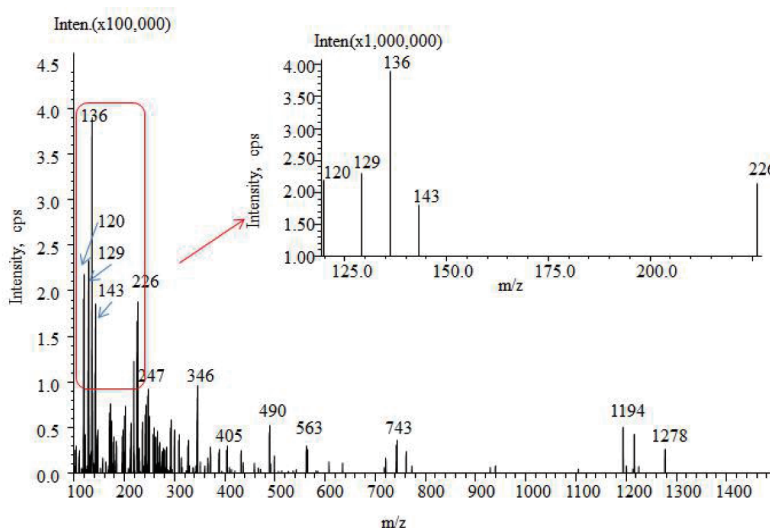


图1 人胰岛素二级扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图:

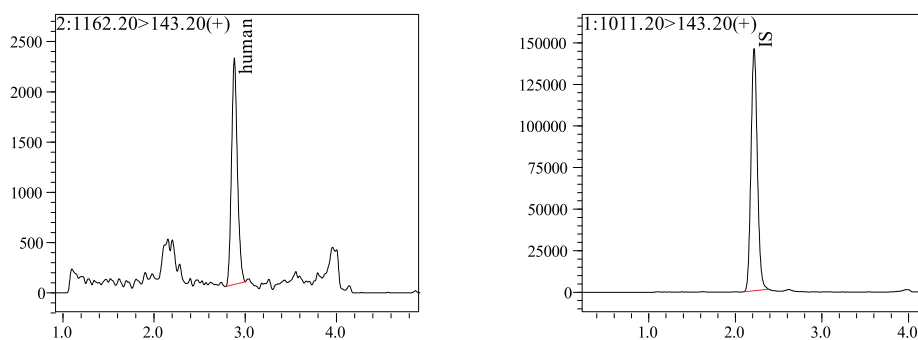


图2 人胰岛素和内标溶剂标准品MRM色谱图

2.3 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备空白血浆样品和加标血浆样品，按照 1.2 中条件进行分析后得到的色谱图如下所示，由下图可知该方法专属性良好。

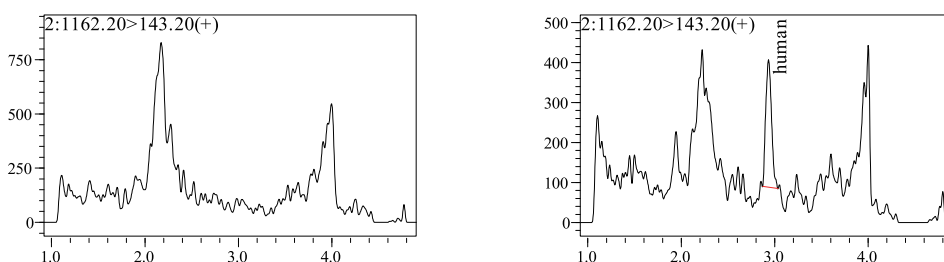


图3 空白血浆基质和人胰岛素血浆基质标准品色谱图(1 μ IU/mL)

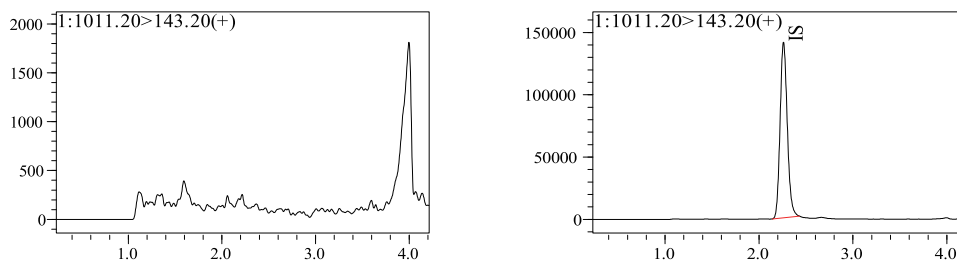


图4 内标空白血浆基质和内标血浆基质标准品色谱图

2.4 线性关系

按照 1.3 进行标准曲线配制，内标法制作校准曲线，标准曲线如下图所示。在 1~1000 μ IU/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

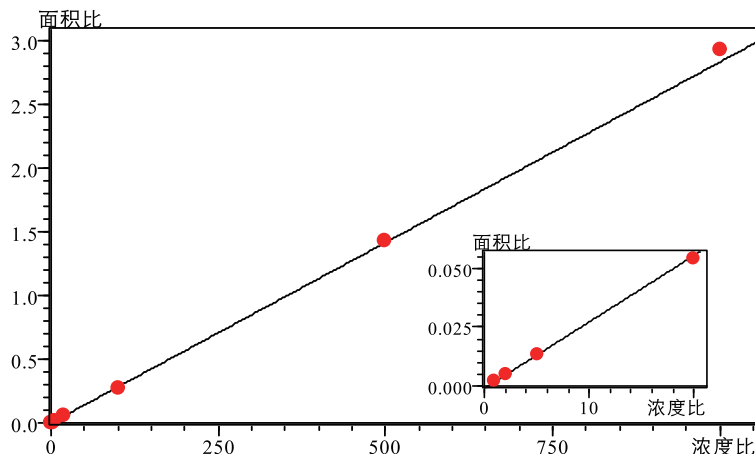


图5 标准工作曲线

表3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 $\mu\text{IU/mL}$	准确度 (%)	相关系数 r
1	人胰岛素	$Y = (0.00284620)X + (-0.000993281)$	1~1000	95.1~102.1%	0.9993

2.5 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 1000 $\mu\text{IU/mL}$ 的样品分析完成后对空白样品进行分析，结果下图所示。空白样品无残留，符合药品非临床药代动力学研究指导规则的要求。

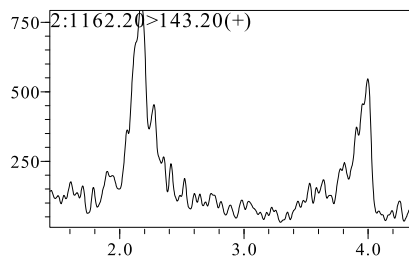


图6 空白样品色谱图

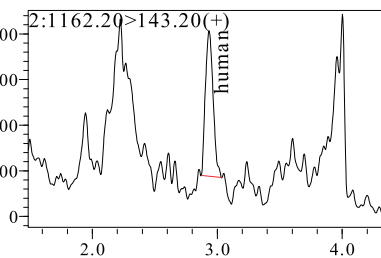


图7 定量下限色谱图(1 $\mu\text{IU/mL}$)

2.6 准确度和精密度考察结果

使用浓度为 1, 2.5, 50, 和 800 $\mu\text{IU/mL}$ 的基质加标溶液连续三天进行日内日间准确度和精密度的考察，结果如下表所示：

表4 日内日间准确度和精密度结果

Spiked concentration ($\mu\text{IU/mL}$)	Accuracy (RE %)				Precision (RSD %)			
	Intra-day			Inter-day	Intra-day			Inter-day
	Day 1	Day 2	Day 3		Day 1	Day 2	Day 3	
1	106	108	97.6	104	9.08	10.3	6.32	13.0
2.5	103	112	96.8	106	6.98	12.1	10.8	11.9
50	101	98.4	94.8	98.2	2.24	3.13	4.19	8.36
800	97.2	97.4	92.8	95.8	2.08	1.31	1.27	6.66

2.7 药 - 时曲线结果

比格犬血浆样品经 LCMS-8060 分析后得出的定量结果使用 WinNonLin 软件进行计算, 相关参数经处理后绘制的药 - 时曲线如下图所示:

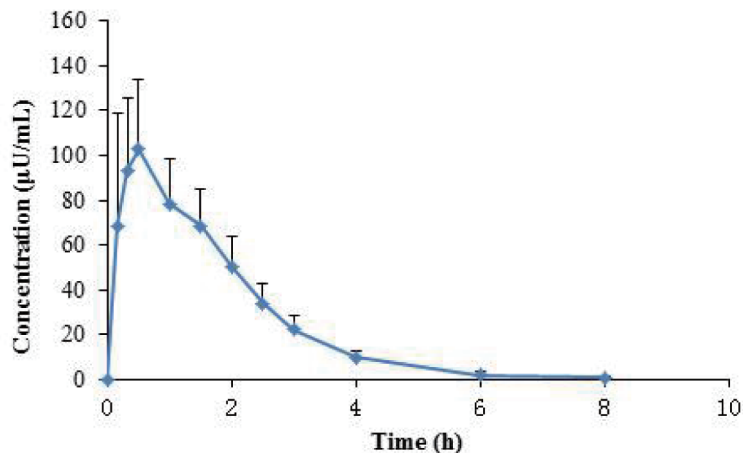


图8 人胰岛素在比格犬体内代谢药-时曲线

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-8060 联用测定比格犬血浆中人胰岛素。人胰岛素在比格犬血浆中 1~1000 µIU/mL 内线性良好, 相关系数大于 0.9993; 该方法专属性良好, 日内日间准确度和精密度良好, 样品在该方法下分析无残留现象出现, 符合药品非临床药代动力学研究指导规则的要求。

此方法选择性强和灵敏度高, 可以为临床前比格犬血浆中人胰岛素的检测提供很好的借鉴和参考。