

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用法 测定人血浆中多肽类药物戈舍瑞林含量

LCMSMS-422

摘要： 本文建立并验证了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 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。人血浆样品采用固相萃取法进行前处理制备，取上清液进样分析，可在 8.5 min 内快速、准确地检测血浆中戈舍瑞林含量。本实验对方法选择性、线性范围、定量下限、精密度、回收率、基质效应、残留等项目均进行考察。结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求，具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合人血浆中戈舍瑞林含量的快速准确检测，可用于人体内戈舍瑞林浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 人血浆 多肽类药物 戈舍瑞林

以往蛋白多肽研究主要依赖光谱法、生物检定和免疫分析等方法，但这些分析方法分别具有专属性差、灵敏度低或成本较高等多方面局限性。LC-MS/MS 对多数药物结构的通用性、检测的专属性和灵敏度等各方面的优势，已迅速成为药物代谢与药物动力学研究中采用的主要分析方法，而利用 LC-MS/MS 从事蛋白质多肽类药物药代动力学研究已成为未来发展的趋势。

戈舍瑞林是一种注射用的促黄体生成素释放激素类似物，属于用来治疗乳腺癌和前列腺癌的多肽类药物。

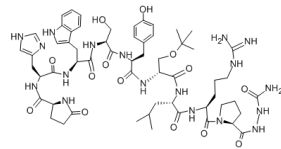
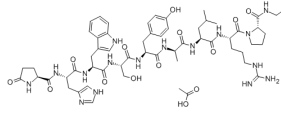
资料显示，样本医院数据统计得出醋酸戈舍瑞林用药金额从 2005 年的 2771 万元增长到 2015 年的 3.96 亿元，而近几年使用量以 23.6% 的增长率不断提升。

针对以上应用需求，为保障临床用药安全合理，准确测定人体用药血药浓度，实验采用 LCMS-8060 建立灵敏、高效的人血浆中戈舍瑞林含量的检测方法，实现血浆基质中多肽药物的准确测定，对临床精准用药提供技术支撑，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1. 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
戈舍瑞林	Goserelin	145781-92-6	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₈ O ₁₄	
阿拉瑞林 (IS)	Alarelin	79561-22-1	C ₅₆ H ₇₈ N ₁₆ O ₁₂	

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-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{5R} 在线脱气机，SIL-30ACMP 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，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2.0 μm)
 流动相: A相 -0.1% 乙酸水溶液; B相 - 甲醇
 流速: 0.4 mL/min
 柱温: 40°C
 进样量: 5 μL
 洗针方式: Rinse pump → Rinse port
 外置洗针液: 甲醇: 异丙醇: 丙酮: 水: (含 0.5% 甲酸) 为 1:1:1:1
 洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

干燥气: 氮气 9.0 L/min
 碰撞气: 氩气
 接口温度: 350°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: 47 ms
 延迟时间: 3 ms
 MRM 参数: 见表 3

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060
 离子化模式: ESI(+)
 离子源接口电压: 3.0 kV
 雾化气: 氮气 3.0 L/min
 加热气: 空气 9.0 L/min

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	60
3.50	泵	B.Conc	60
5.00	泵	B.Conc	80
5.20	泵	B.Conc	80
5.50	泵	B.Conc	98
5.80	泵	B.Conc	98
5.90	泵	B.Conc	20
8.50	Controller	Stop	

表 3. MRM 优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
戈舍瑞林	635.60	607.55*	-32.0	-19.0	-28.0
	635.60	249.00	-32.0	-33.0	-24.0
阿拉瑞林	584.60	249.10	-28.0	-26.0	-24.0

注: * 表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份戈舍瑞林适量, 用纯甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 戈舍瑞林储备液。取其中一份储备液用稀释液 (0.2% 甲酸水溶液 / 甲醇溶液 = 40/60, v/v) 逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 的标准工作曲线; 另一份储备液用稀释液分别稀释成浓度为 30、250、4000 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 10 μL 加入 990 μL 人空白血浆 (含抑肽酶) 中, 依次配制标准曲线 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL; 分别取三个不同浓度质控溶液 10 μL 加入 990 μL 人空白血浆中, 依次配制成 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品。

精密称取阿拉瑞林适量, 用纯甲醇溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的阿拉瑞林储备液用稀释液 (0.2% 甲酸水溶液 / 甲醇溶液 = 40/60, v/v) 稀释为 3 ng/mL 内标溶液, 待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取含有抑肽酶的人血浆样品 100 μL ，依次加入 3 ng/mL 内标溶液 100 μL 、稀释液 100 μL ，涡旋混合 2 min。加入甲醇 500 μL ，涡旋 2 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min。吸取上清液与等体积纯水进行混匀，并取混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，分别用 1.0 mL 纯水与 60% 甲醇水溶液进行清洗除杂，再用 1.0 mL 甲醇（含 0.01% 甲酸）进行洗脱，并压干，收集全部洗脱溶液至蛋白低吸附 96 孔板中，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴，进行氮气吹干。吹干后，向孔板内加入 100 μL 稀释剂进行复溶，涡旋 3min 后，13000 rpm/min 离心 10 min，取上清液转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 5 μL 。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

戈舍瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 635.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 607.55、 m/z 249.00；阿拉瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 584.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 249.10，其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

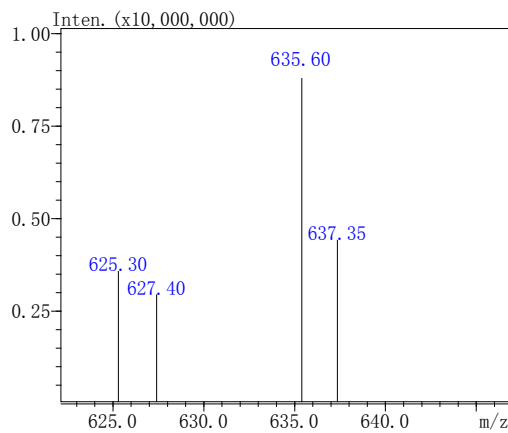


图 1. 戈舍瑞林一级质谱图

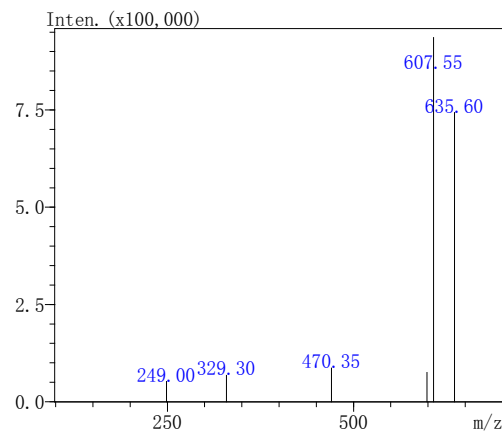


图 2. 戈舍瑞林产物离子扫描图 (CE 值 -19 V)

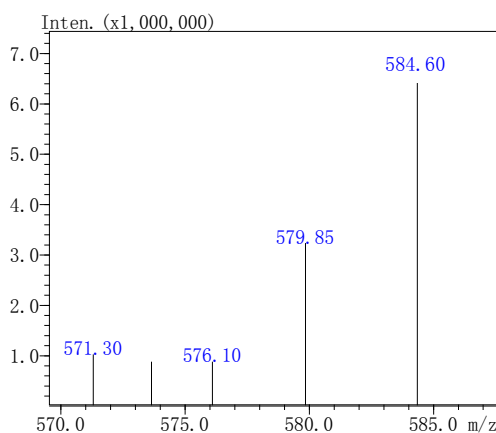


图 3. 阿拉瑞林一级质谱图

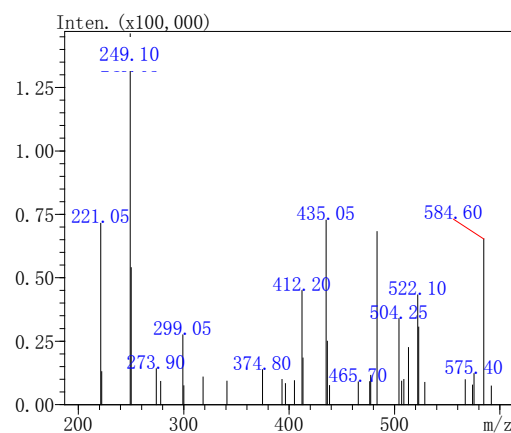


图 4. 阿拉瑞林产物离子扫描图 (CE 值 -24 V)

2.2 方法选择性

取含抑肽酶的人空白血浆，按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定，得人空白血浆、0.1 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图，见图 5。结果表明，戈舍瑞林与内标物的保留时间 t_R 分别为 3.40 min、2.92 min。人空白血浆中的内源物质干扰，对样品检测无明显影响，方法具有较强选择性。

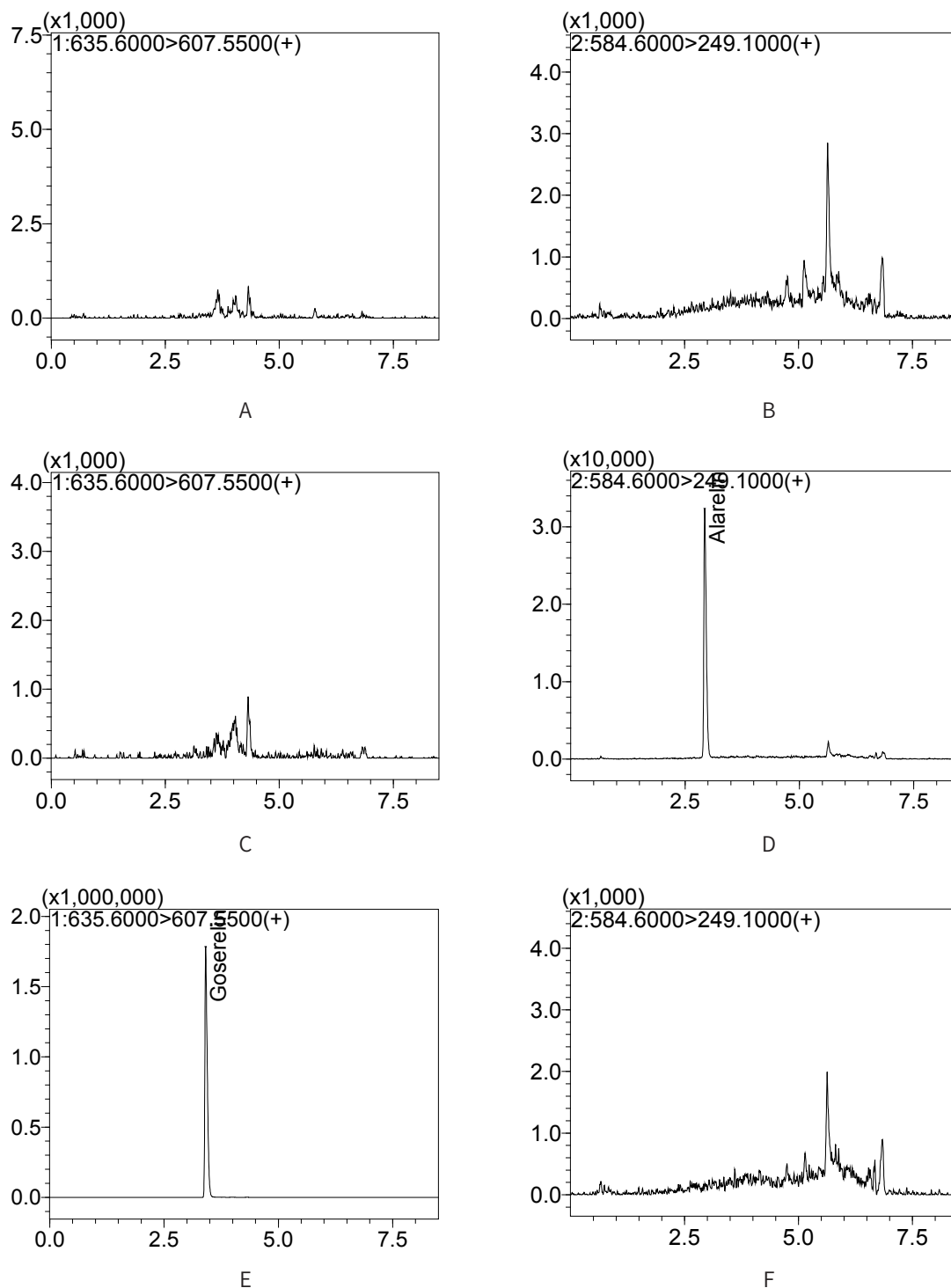


图 5. 戈舍瑞林与阿拉瑞林 MRM 色谱图 (A、B: 人空白血浆; C、D: 空白血浆含 3 ng/mL 内标血浆; E、F: 50 ng/mL 戈舍瑞林血浆样品不含内标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL 人血浆标准工作曲线，按照 1.5 项中人血浆样品前处理方法处理人血浆样品，建立标准曲线，并用同位素内标法进行分析测定。以人血浆中戈舍瑞林浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以戈舍瑞林峰面积与阿拉瑞林峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析，所得标准曲线见图 6，人血浆中戈舍瑞林线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明戈舍瑞林在 0.1-50 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

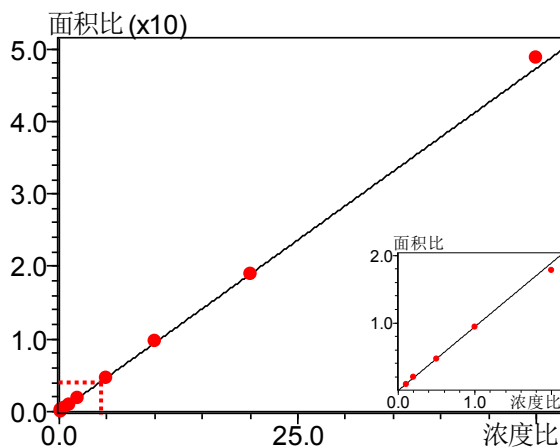


图 6. 戈舍瑞林标准曲线

表 4. 戈舍瑞林标准曲线参数（线性回归，权重系数为 $Y=1/C^2$ ）

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
戈舍瑞林	$Y = (0.946223)X + (0.00105868)$	0.1-50	94.1~103.1	0.9995

表 5. 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度 (%)
1	0.1	0.099	99.1
2	0.2	0.206	103.1
3	0.5	0.491	98.2
4	1	0.998	99.8
5	2	1.881	94.1
6	5	4.974	99.5
7	10	10.263	102.6
8	20	20.120	100.6
9	50	51.499	103.0

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.1ng/mL 样品，按照 1.5 方法制备，每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析，连续测定 3 天，每日随行标准曲线，用测得质控样品中戈舍瑞林峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 6。其中戈舍瑞林最低定量限 S/N 平均值为 26.85。结果表明，各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并已满足生物样品检测要求。

表 6. 戈舍瑞林日内精密度与日间精密度 (3 天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度 %
LLOQ	0.1	4.03	6.67	87.70-109.10
LQC	0.3	3.05	3.82	93.60-107.50
MQC	2.5	1.44	3.21	96.50-107.80
HQC	40	2.08	3.54	101.90-113.70

2.5 回收率

取浓度为 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.5 方法制备, 以人血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比, 即 $A1/A2 \times 100\%$, 考察人血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 7, 各浓度水平戈舍瑞林回收率均大于 74%、RSD 小于 4%。

表 7. 方法回收率结果 (n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	RSD%
LQC	0.3	74.05	3.32
MQC	2.5	82.08	2.53
HQC	40	88.32	1.29

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 通过比较人空白血浆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即为基质效应, 并计算内标归一化基质效应。结果见表 8, 各浓度水平基质效应因子均大于 97%。

表 8. 基质效应考察结果 (n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应 %	内标基质效应 %	A/AIS 基质效应
LQC	0.3	97.59	97.49	100.10
MQC	2.5	101.38	101.41	99.97
HQC	40	99.74	97.93	101.85

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境 (如室温、光照) 下的稳定性, 将低、中、高三浓度水平质控样品 (n=6) 在室温桌面放置 12 h 以上, 按照 1.5 方法制备并进行测定, 将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示, 三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.2\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内) 法规要求。人血浆中戈舍瑞林在室温下放置 12 h 以上具有良好稳定性。

考察生物样品在处理、制备等过程中反复冻融的稳定性, 将高、中、低质控样品 (n=6) 反复冻融三个周期, 每一周期大于 12 h, 经制备后同法测定, 与理论值进行比较。结果显示, 测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.4\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内) 法规要求, 说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在三次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

考察生物样品经制备后, 在待测环境中的稳定性, 将低、中、高三浓度水平质控样品 (n=6) 在待测环境下放置 96 h, 将测定值与理论值进行比较。结果显示, 测定值与理论值的差异均在 $\pm 13.7\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内) 法规要求。说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在待测环境中放置后, 其含量可保持稳定。

2.8 系统残留考察 (Carryover)

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戈舍瑞林的峰面积，空白样品中戈舍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，见图 7。

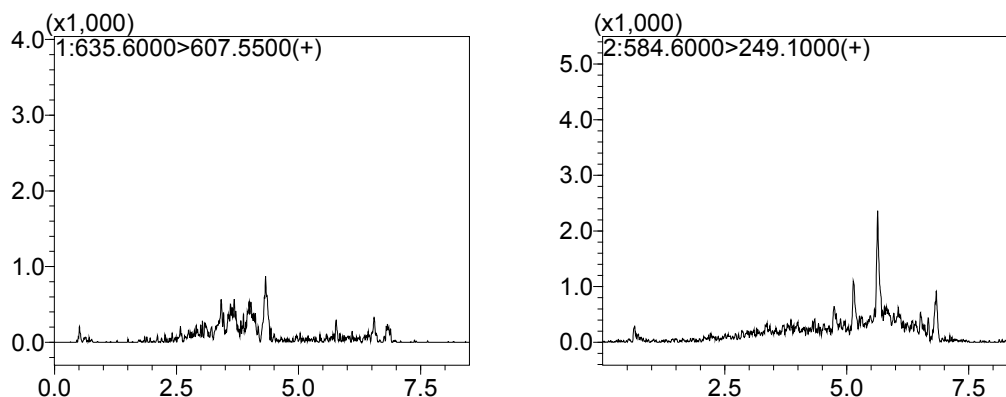


图 7. 系统残留考察空白样品色谱图 (左: 戈舍瑞林; 右: 阿拉瑞林)

■ 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-8060 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。该方法在 8.5 min 内完成人血浆中戈舍瑞林的检测，采用同位素内标法定量，方法定量下限 0.1 ng/mL，线性范围 0.1-50 ng/mL，相关系数在 0.9995。选择性考察结果表明人空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度 4.03% 与 6.67%，S/N 平均值为 26.85；低中高三水水质控浓度日内精密度 1.44-3.05%，日间精密度 3.21-3.82%，准确度 87.7-113.7%；各浓度水平质控样品中戈舍瑞林回收率均大于 74%，RSD 小于 4%，基质效应大于 74%；稳定性实验结果显示样品在室温下放置 12 小时稳定，3 次冻融循环戈舍瑞林浓度无显著变化，人血浆样品提取液待测环境下放置 96 h 稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，满足戈舍瑞林体内药物分析要求，为戈舍瑞林仿制药生物等效性评价提供快速准确的检测方法。

岛津应用云

