

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特立帕肽含量

LCMSMS-491

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 联用测定人血浆中特立帕肽的方法。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 7 min 内快速、准确地检测血浆中特立帕肽含量。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，适合人血浆中特立帕肽含量的快速准确检测，可用于人体内特立帕肽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 特立帕肽

多肽类药物是医药行业具有广泛市场前景的研发发展方向之一。随着生物技术和遗传工程领域的迅速发展，人们可以在短期内合成多种多肽类药物。该类药物以其确切的疗效和较好的安全性，临床治疗地位不断提升，市场用量增长极快。目前药物的使用已经延伸至多种疾病的治疗领域，包括抗感染、抗肿瘤、生理调节、疼痛、心衰、骨质疏松、糖尿病、疫苗等。

特立帕肽是一种合成的多肽激素，为人甲状旁腺素 PTH 的 1-34 氨基酸片段，具有刺激骨形成和骨吸收的生物活性，可减少绝经后妇女骨折的发生率，根据给药方式的不同，还能提高或降低骨密度。临床上常用于治疗原发性骨质疏松及性腺功能减退性骨质疏松、绝经后骨质疏松。特立帕肽原研药厂为美国

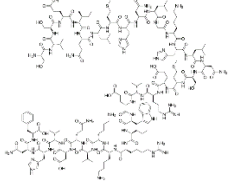
礼来公司，伴随其专利的到期，以及更多国内医药企业对多肽类药物的产品优势及市场前景有了更深入的了解，国内特多立帕肽等多肽类仿制药的研发生产水平进入了全新上升的阶段。作为主要的多肽类药物，特立帕肽具有高效且低副作用的治疗功效，未来市场用药量将会进一步提升，患者对多肽类药物的接受程度也将日益提高。

迎合当前市场需求，加快特立帕肽等多肽类仿制药的研发速度，本实验采用岛津 LCMS-8060 建立灵敏、高效的人血浆中特立帕肽含量的检测方法，实现血浆基质中多肽药物的准确测定，以期对药物研制工作与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
特立帕肽	Teriparatide	52232-67-4	$C_{181}H_{291}N_{55}O_{51}S_2$	
人甲状旁腺激素(1-38) (IS)	Human Parathyroid 1-38	78232-94-7	$C_{197}H_{319}N_{59}O_{55}S_2$	-

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-8060 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A	在线脱气机：DGU-20A ₅
输液泵：LC-30AD×2	质谱仪：LCMS-8060
自动进样器：SIL-30AC	色谱工作站：LabSolutions Version 5.97
柱温箱：CTO-20AC	

1.3 分析条件

液相条件	质谱条件
色谱柱：UPLC Peptide CSH C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 130 Å, 1.7 μm)	分析仪器：LCMS-8060
流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液； B 相 0.1% 甲酸乙腈	离子化模式：ESI(+)
流速：0.3 mL/min	离子源接口电压：1.0 kV
柱温：40°C	雾化气：氮气 2.0 L/min
进样量：20 μL	加热气：空气 10.0 L/min
洗针方式：Rinse pump → Rinse port	干燥气：氮气 10.0 L/min
外置洗针液：乙腈：异丙醇：丙酮：水： (含 0.1% 甲酸) 为 1:1:1:1	碰撞气：氩气
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%， 洗脱程序见表 2。	接口温度：400°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

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	98
4.50	泵	B.Conc	98
4.60	泵	B.Conc	15
7.00	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)
特立帕肽	687.60	787.65*	-20.0	-21.0	-28.0
	824.60	984.10	-24.0	-29.0	-22.0
人甲状旁腺激素 (1-38)	638.15	712.60	-22.0	-11.0	-20.0

注：* 表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份特立帕肽适量,用纯水溶解配制两份 1.0 mg/mL 特立帕肽储备液,分装,-80°C冻存,待用。取其中一份储备液用稀释液(20% 甲醇水溶液,含 0.1% 甲酸)逐级稀释成浓度为 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{g/mL}$ 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 0.02、0.5、25 $\mu\text{g/mL}$ 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 人空白血浆中,依次配制成标准曲线 0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 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 0.2、5、250 ng/mL 质控样品。

精密称取人甲状旁腺激素(1-38)适量,用纯水溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液,分装,-80°C冻存,待用。将配制好的人甲状旁腺激素(1-38)储备液用稀释液(50% 甲醇水溶液,含 0.1% 甲酸)稀释为 100 ng/mL 内标溶液,待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取人血浆样品 200 μL ,依次加入 100 ng/mL 内标溶液 2 μL 、乙腈 200 μL (含 4% 氢氧化铵溶液),涡旋 2 min 后,13000 rpm/min 离心 10 min。吸取上清液与 1 mL 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,用 200 μL 5% 甲醇水溶液进行清洗除杂,再用 25 μL 乙腈/水/甲酸(60:39:1,v/v/v)平行两次,进行洗脱,压干。收集全部洗脱溶液至蛋白低吸附 96 孔板中,向孔板内每孔加入 50 μL 纯水进行稀释,涡旋混匀,进样分析,进样体积 20 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

特立帕肽在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 准分子离子峰 m/z 687.60、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 准分子离子峰 m/z 824.60,对准分子离子峰 m/z 687.60 进行产物离子扫描,分别生成主要碎片离子为 m/z 787.65;人甲状旁腺激素(1-38)在一级质谱扫描下主要生成 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 准分子离子峰 m/z 638.15,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 712.60,其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

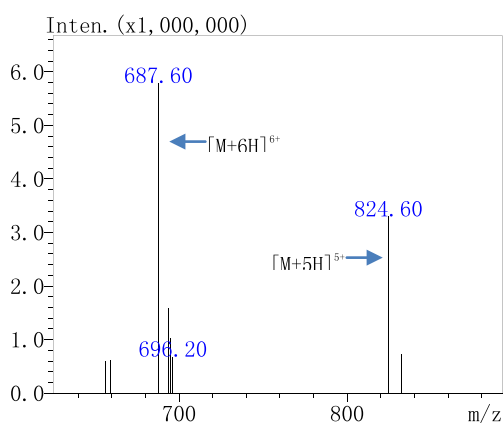


图 1 特立帕肽一级质谱图

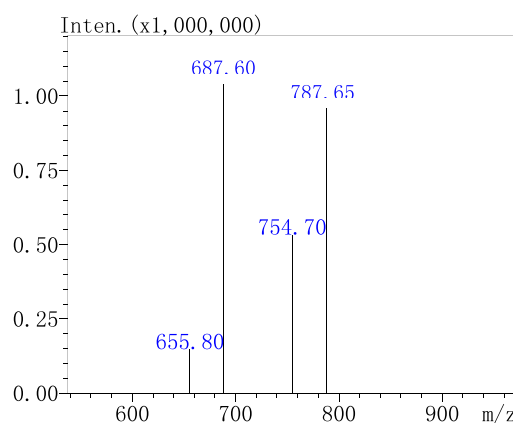


图 2 特立帕肽 m/z 687.60 产物离子扫描图 (CE 值 -20 V)

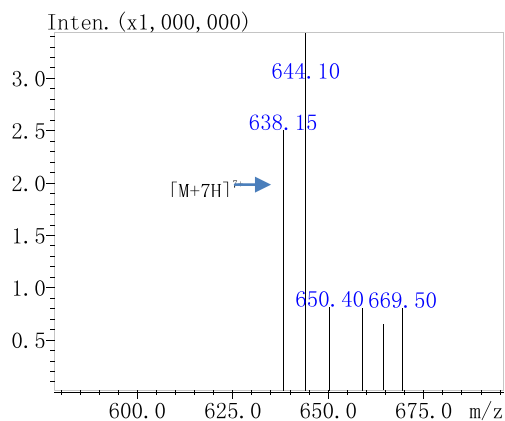


图3 人甲状旁腺激素(1-38)一级质谱图

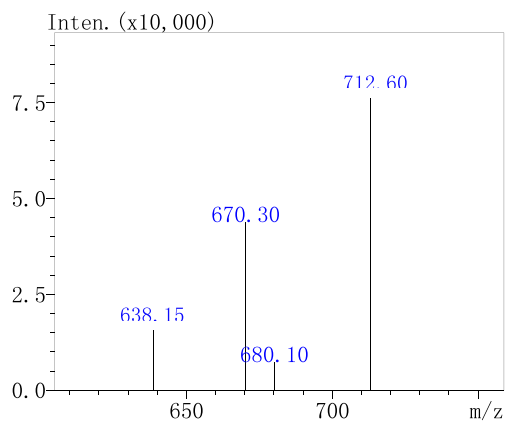


图4 人甲状旁腺激素(1-38)产物离子扫描图(CE值-20V)

2.2 方法选择性

取人空白血浆,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,特立帕肽与内标物的保留时间tR分别为1.80 min、1.86 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。

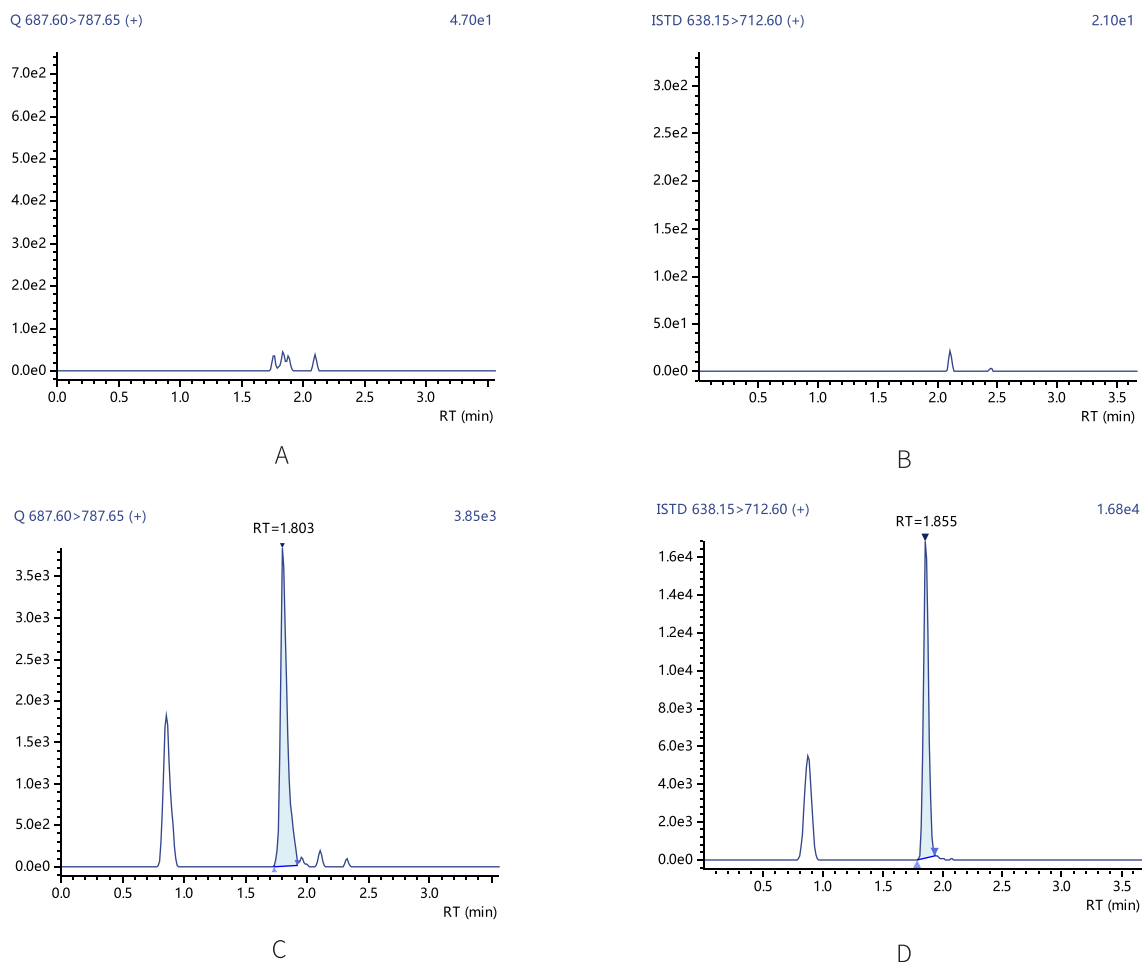


图5 特立帕肽与人甲状旁腺激素(1-38)MRM色谱图(A、B:人空白血浆;C、D:0.1 ng/mL特立帕肽血浆样品含内标)

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、0.3、1、3、10、30、100、300 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，并用内标法进行分析测定。以人血浆中特立帕肽浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以特立帕肽峰面积与人甲状旁腺激素 (1-38) 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，人血浆中特立帕肽线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明特立帕肽在 0.1-300 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

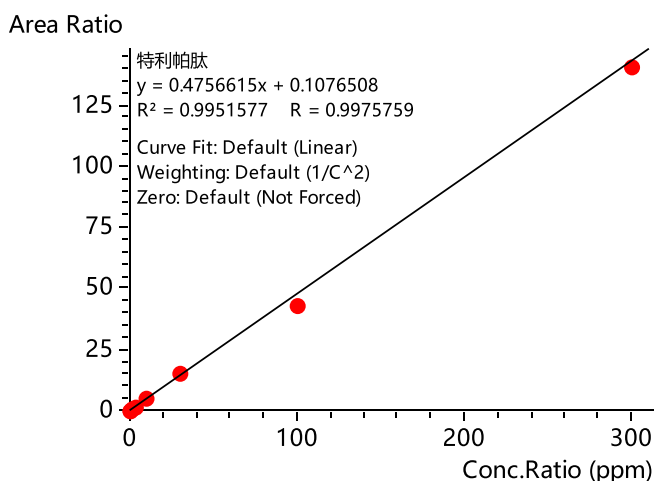


图 6 特立帕肽标准曲线

表 4 特立帕肽标准曲线参数（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
特立帕肽	$Y = (0.4756615)X + (0.1076508)$	0.1-300	89.5-107.8	0.9975

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.2、5、250 ng/mL 低中高三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，用测得质控样品中特立帕肽峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 5。其中特立帕肽最低定量限 S/N 平均值为 30.63。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 5 特立帕肽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	6.66	7.15	89.0-113.5
LQC	0.2	4.39	4.91	93.7-109.5
MQC	5	2.90	4.98	91.5-111.6
HQC	250	2.77	6.73	89.5-109.7

2.5 回收率

取浓度为 0.2、5、250 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 6，各浓度水平特立帕肽回收率均大于 76%、RSD 小于 8.6%。

表 6 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	0.2	76.21	8.57
MQC	5	80.39	4.51
HQC	250	82.69	6.49

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 5 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 7，各浓度水平基质效应因子均大于 81%。

表 7 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	0.2	87.17	88.45	98.55
MQC	5	76.05	93.16	81.63
HQC	250	91.97	96.22	95.58

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）在室温桌面放置约 4 h，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 $\pm 13.7\%$ 以内，满足生物样品稳定性检测（偏差 $\pm 15\%$ 以内）法规要求。人血浆中特立帕肽在室温下短期放置（4 h）稳定性良好。

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特立帕肽的峰面积，空白样品中特立帕肽及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

■ 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 联用测定人血浆中特立帕肽的方法。该方法在 7 min 内完成人血浆中特立帕肽的检测，采用同位素内标法定量，方法定量下限 0.1 ng/mL，线性范围 0.1-300 ng/mL，相关系数在 0.9975。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 6.66% 与 7.15%，S/N 平均值为 30.63；低中高三水平质控浓度日内精密度 2.77-4.39%，日间精密度 4.91-6.73%，准确度 89.0-113.5%；各浓度水平质控样品中特立帕肽回收率均大于 76%，RSD 小于 8.6%，基质效应大于 81%；稳定性实验结果显示样品在室温下放置 4 小时稳定。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，满足特立帕肽体内药物分析要求，为特立帕肽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

