

LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度

LCMSMS-783

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法，对方法的线性范围、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好，质控品测定准确度结果与理论值接近，该方法前处理简便、分析速度快、灵敏度高，可用于血浆中利拉鲁肽含量测定。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 利拉鲁肽 血浆

技术特点：

- ❖ 前处理简便快速，仅需简单蛋白沉淀即可上机分析。
- ❖ 血浆中内源性干扰物与目标物在 Shim-pack GISS-HP 色谱柱上分离良好。

利拉鲁肽 (Liraglutide) 是一种人体内源性物质胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 的结构类似物，能够结合并激活 GLP-1 受体，以葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛素的分泌，抑制胰高血糖素释放，此外利拉鲁肽还可减缓胃排空，减少能量摄入而发挥减肥作用。虽然利拉鲁肽在临床使用较广，但该物质定量检测方法的发展却相对滞后。传统的免疫学方法自开发以来因其操作简单、快速，在普通实验室即可操作而应用广泛。然而当待测物

分子量相对较小时，免疫学方法的特异性就会因交叉反应等原因变差。免疫学方法一次实验只能检测一种化合物，如果联合用药，一个样本则需要多次实验。目前，国内外越来越多的实验室采用 LC-MS/MS 方法替代免疫学方法开展血药浓度检测。

本文使用串联质谱 LCMS-8050，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	输液泵：	LC-40B X3
自动进样器：	SIL-40C X3	柱温箱：	CTO-40C
质谱仪：	LCMS-8050	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.120

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： Shim-pack GISS-HP C18 Metal free column (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm); 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30922-02

流动相： A 相 -0.1% 甲酸水溶液, B 相 - 乙腈

流速： 0.3 mL/min

清洗模式： 清洗泵 > 清洗口

柱温： 50°C

清洗泵溶液： 乙腈 / 异丙醇 / DMSO / 水 / 甲酸 = 30: 35: 10: 24.5: 0.5

进样体积： 20 μL

洗脱方式： 梯度洗脱, B 相起始浓度为 30%, 清洗口溶液： 甲醇 / 水 = 1:1
时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	30
2.00	泵	B.Conc	45
5.00	泵	B.Conc	60
5.10	泵	B.Conc	95
6.00	泵	B.Conc	95
6.10	泵	B.Conc	30
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+	雾化气流速：3.0 L/min
接口电压：4.5 kV	干燥气流速：5.0 L/min
接口温度：250°C	加热气流速：15.0 L/min
D L 温度：200°C	碰撞气：氦气
加热模块温度：500°C	扫描模式：多反应监测 (MRM)
MRM 参数：见表 2	

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
利拉鲁肽	938.5	1128.6*	-34	-31	-40
		1064.0	-34	-29	-38
格列苯脲 (内标)	494.1	369.1	-34	-34	-36

注：* 为定量离子

1.3 校准品及样品制备

标准样品：精密称取利拉鲁肽适量，用 50% 乙腈溶解配制成 1 mg/mL 储备液。用空白血浆溶液稀释成浓度为 200、100、50、20、10、5、2、1 ng/mL 的系列标准样品溶液；

内标溶液：精密称取格列苯脲适量，用甲醇溶解配制成 1 mg/mL 储备液。用甲醇溶液稀释为 200 ng/mL 内标溶液。

样品制备：取 200 μ L 标准样品或血浆样本，加入 20 μ L 内标溶液及 400 μ L 乙腈（含 1% 甲酸），涡旋混匀 3 min，12000 rpm 离心 10 min，吸取上清液上机测定。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

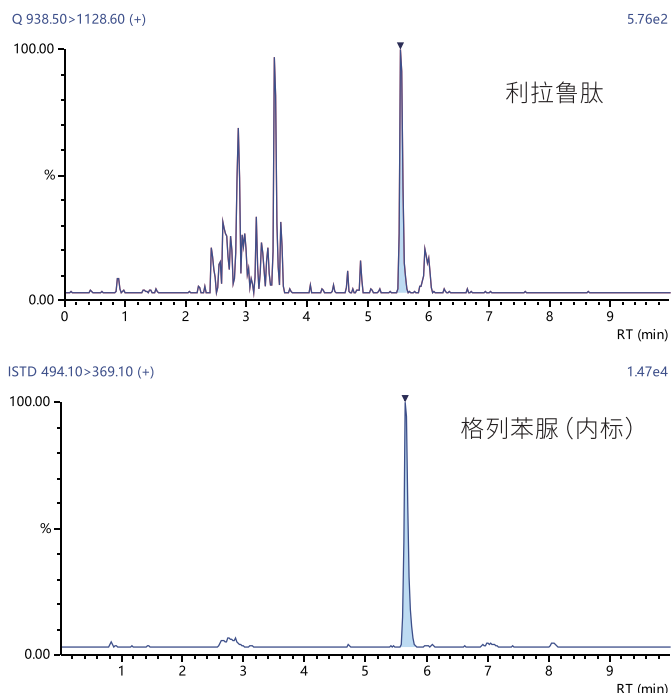


图 1 校准曲线最低点色谱图

2.2 校准曲线

对标准曲线溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线结果见图 2 及表 3，利拉鲁肽在校准曲线浓度范围内线性良好，相关系数为 0.9993，准确度在 94.7%~104.7% 之间。

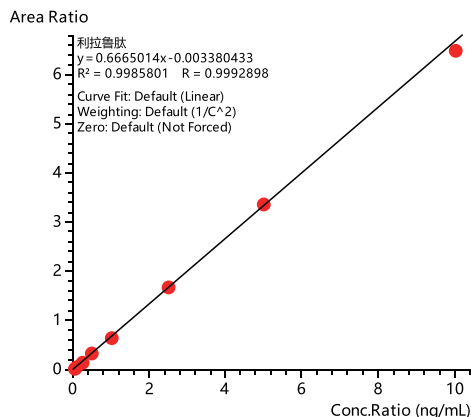


图 2 校准曲线图谱

表 3 校准曲线信息

名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
利拉鲁肽	$Y = (0.666501)X + (-0.00338043)$	1.00~200.00	0.9993	94.7%~104.7%

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行前处理，每个浓度重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行分析，准确度及精密度测定结果如表 4 所示，结果显示测定结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8% 之间，RSD 在 2.91%~9.60% 之间。

表 4 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

化合物	项目	LLOQ	LQC	MQC	HQC
利拉鲁肽	理论浓度	1.00	2.50	15.00	150.00
	测定浓度	0.97	2.39	14.97	143.41
	回收率 %	96.9	95.5	99.8	95.6
	RSD%	9.60	7.59	9.02	2.91

■ 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法。该方法采用内标法定量，在 1.00~200.00 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数为 0.9993；定量下限以及低、中、高浓度质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8% 之间，RSD 在 2.91%~9.60% 之间。该方法操作简单且灵敏可靠，可供相关行业人员参考使用。

岛津应用云

