

LC-MS/MS 法定量分析血浆中替尔泊肽

LCMSMS-976

摘要：替尔泊肽是礼来公司研发的全球首个 GLP-1 和 GIP 受体双重激动剂类药物，是当前医药市场热点药物。使用岛津三重四极杆液质联用仪，采用岛津 Shim-pack GISS-HP C18 Metal free 色谱柱建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法。以司美格鲁肽作为内标，使用基质匹配校准品及基质加标样品（质控品）进行了线性、准确度和精密度的考察。结果显示方法线性良好，在 0.5-200 ng/mL 范围内校准曲线相关系数 r 大于 0.997；定量下限及三浓度水平质控品的日内及日间精密度良好，RSD% 分别在 2.0%-8.7% 和 4.6%-9.5% 之间，准确度在 85%-107.1% 之间。使用该方法检测空白血浆无干扰成分，说明其选择性良好。校准曲线最高点进样后分析空白样品无残留，方法性能良好。对 SPE 的回收率和基质效应做了考察，结果表明三浓度水平质控品回收率在 80% 以上，基质效应在 83.9%-95.9% 之间。该方法拥有较高的灵敏度、重复性、特异性，且有效解决了多肽类药物的残留问题，可为替尔泊肽的 LC-MS/MS 定量检测提供参考。

关键词：LC-MS/MS 替尔泊肽 血浆 GLP-1 GIP

技术特点：

- ❖ 方法灵敏度出色，定量下限水平低至 0.5 ng/mL。
- ❖ 使用岛津 Shim-pack GISS-HP C18 Metal free 色谱柱，有效降低多肽类药物残留，提升方法性能。

替尔泊肽（Tirzepatide）是礼来公司研发的全球首个 GLP-1（胰高血糖素样肽 -1）和 GIP（葡萄糖依赖性促胰岛素多肽）受体双重激动剂类药物。GLP-1 和 GIP 均为肠促胰岛素激素，前者一直是糖尿病领域的研发热点，度拉糖肽、司美格鲁肽都是其“明星产品”；后者具有抑制胃酸 / 胃蛋白酶分泌、刺激胰岛素释放、抑制胃的蠕动和排空等功能，可补充 GLP-1 受体激动剂作用。2024 年 5 月，NMPA 批准其用于 2 型糖尿病的治疗；2024 年 7 月，减重

适应症获得批准。

替尔泊肽是由 39 个氨基酸组成的多肽，作为当前医药市场热点药物，有必要开发其体内定量研究方法。液相色谱 - 串联质谱联用法（LC-MS/MS）具有灵敏度高、特异性强、通量大等优势，是该类药物分析的最佳选择。

本文使用 LCMS-8050 建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法，该方法性能可靠、低残留，可为相关从业者提供参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40lite	在线脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40DXS	柱温箱：	CTO-40S
自动进样器：	SIL-40C XS	质谱仪：	LCMS-8050
色谱工作站：	Labsolutions Ver.5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色 谱 柱：Shim-pack GISS-HP C18 Metal free (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μ m);
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-30924-03;
- 流 动 相：A-0.1% 甲酸水溶液；B-0.1% 甲酸甲醇溶液

取全部混合液加入已活化好的 MAX 固相萃取板，清洗除杂后，用洗脱液（60% 乙腈，含 2% 甲酸）50 μ L 洗脱 2 次，并压干，收集全部洗脱溶液至收集板中，而后转入低吸附进样小瓶进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

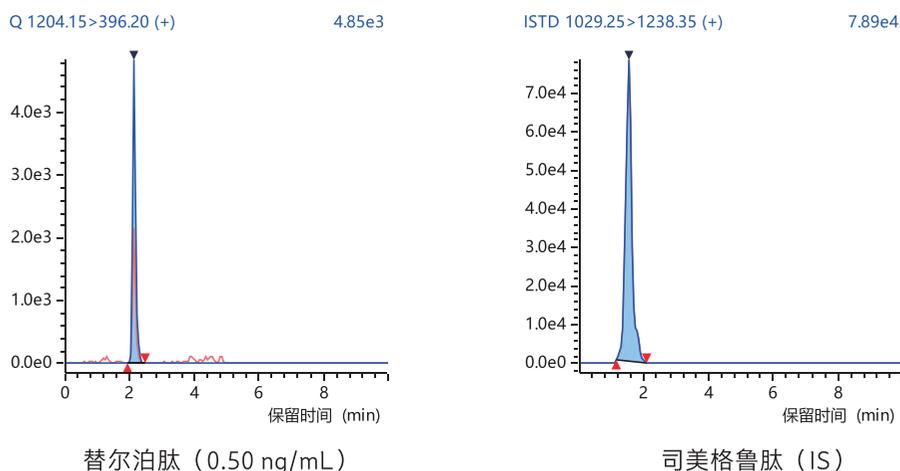


图 1 校准曲线最低点 MRM 色谱图

2.2 校准曲线

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备校准曲线，内标法进行定量分析。以血浆中替尔泊肽浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以替尔泊肽峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析。校准曲线的线性范围为 0.5- 200 ng/mL，相关系数 $r > 0.997$ ，线性关系良好，校准曲线及结果分别见图 2 和表 3。

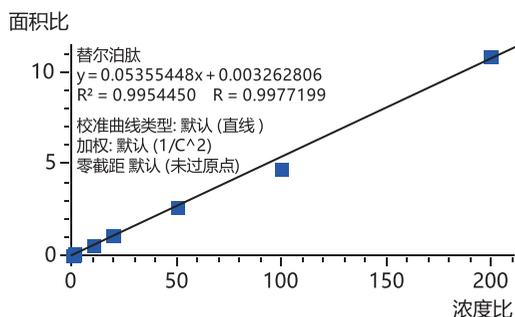


图 2 替尔泊肽校准曲线

表 3 校准曲线结果

化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
替尔泊肽	0.50-200	0.9977	88.0%~108.6%

2.3 方法选择性

将空白血浆按照 1.4 项下前处理方法处理后，替尔泊肽与内标的色谱图如图 3 所示，各通道内均无明显干扰出现，方法的选择性良好。

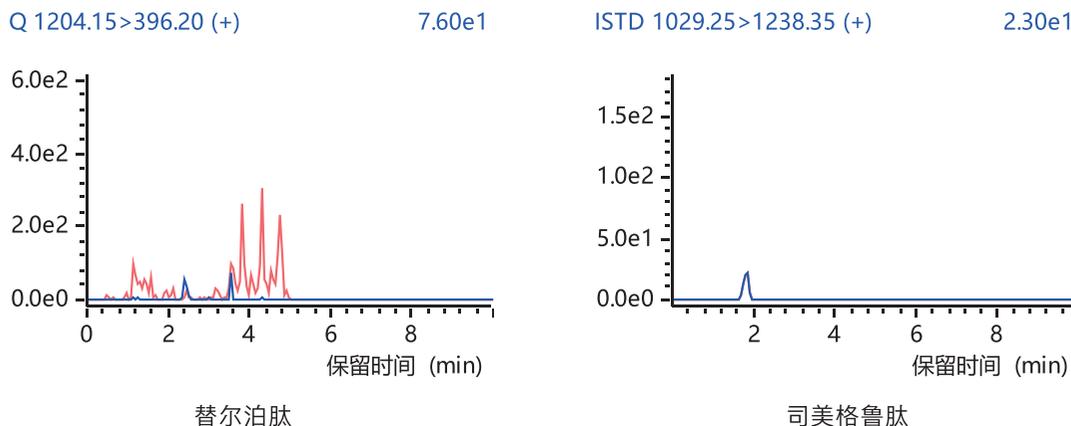


图 3 空白血浆 MRM 色谱图（左：替尔泊肽，右：内标）

2.4 准确度及精密度

取三浓度水平质控样品（1、60、120 ng/mL）及定量下限样品（0.5 ng/mL）按上述前处理方法处理，每个浓度样品重复制备 5 份，在两天时间内连续考察三批次。用测得质控样品浓度值计算其日内和日间准确度、精密度，结果（见表 4）表明，各浓度水平精密度、准确度均在接受标准内，符合生物样品检测要求。

表 4 准确度及精密度考察结果

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	0.5	5.5-8.7	7.1	85.0-89.2
LQC	1	2.0-6.2	4.6	86.6-90.4
MQC	60	2.9-7.2	6.3	94.2-107.1
HQC	120	3.1-5.5	9.5	91.4-106.9

2.5 回收率和基质效应

取三浓度水平质控样品进行前处理，进样检测后替尔泊肽色谱峰面积记为 A1；空白血浆按相同方法处理后加入相应量的标准品溶液进样检测所得替尔泊肽色谱峰面积记为 A2，则 $A1/A2 \times 100\%$ 即为回收率。

取三浓度水平质控样品进行前处理，进样检测后替尔泊肽色谱峰面积记为 B1；纯溶剂中加入相应量的标准品溶液进样检测所得替尔泊肽色谱峰面积记为 B2，则 $B1/B2 \times 100\%$ 即为基质效应。

按上述方法进行回收率和基质效应考察，结果见表 5。各浓度水平回收率均在 80% 以上，基质效应在 83.9%-95.9% 之间。

表 5 回收率和基质效应考察结果

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	基质效应 (%)
LQC	1	80.1	95.9
MQC	60	88.6	83.9
HQC	120	83.5	87.4

2.6 残留

替尔泊肽由多个氨基酸通过肽键连接而成，存在大量的极性残基及电荷，容易在色谱柱中产生残留。本实验使用岛津 Shim-pack GISS-HP C18 Metal free 色谱柱，该色谱柱采用 PEEK 涂覆柱管内部不锈钢表面，从而减少样品与金属的接触，降低残留。实验结果表明，校准曲线浓度最高点检测后分析空白样品，没有明显检出目标化合物色谱峰（见图 4），无残留。

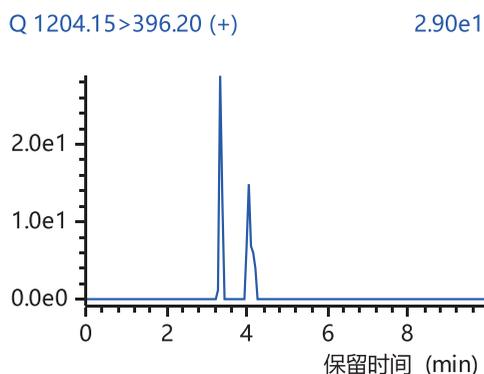


图 4 残留考察用空白样品色谱图

■ 结论

使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了血浆中替尔泊肽的定量分析方法。该方法线性良好，精密度及准确度均符合生物样品检测要求。空白血浆未检出干扰成分，说明其选择性良好。使用 Metal free 系列色谱柱有效降低了残留。SPE 的回收率和基质效应均较为理想。该方法拥有较高的灵敏度、重复性、特异性，且有效解决了多肽类药物的残留问题，可为替尔泊肽的 LC-MS/MS 定量检测提供参考。

岛津应用云

