

LC-MS/MS 法痕量分析血浆中司美格鲁肽含量

LCMSMS-923

摘要： 本文建立并验证了使用岛津生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中司美格鲁肽的方法。实验系统优化样品前处理，司美格鲁肽达到 90% 以上的高回收率；定量下限可达 0.1 ng/mL，线性范围可从 0.1 ng/mL 拓宽至 500 ng/mL，相关系数 0.999。另外，选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质；定量下限日内、日间精密度 2.60% 与 4.66%，S/N 平均值为 22.7；低中高三水相质控浓度日内精密度 2.15-3.04%，日间精密度 3.96-5.83%，准确度 90.00-109.07%。验证结果表明所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好、残留量低的特点，满足司美格鲁肽生物样本分析要求，可为药物研发体内研究提供快速准确的检测方法。

关键词： 三重四极杆质谱仪 痕量分析 生物治疗性多肽 血浆 司美格鲁肽

技术特点：

- ❖ 使用 LCMS-8050 分析血浆中司美格鲁肽检测下限可达 0.1 ng/mL；
- ❖ 使用优化后的 SPE 样品前处理方法，司美格鲁肽回收率达 90% 以上；
- ❖ 与普通液相相比，前端惰性液相的使用，大大降低了司美格鲁肽残留问题。

司美格鲁肽 (Semaglutide) 是一种由 31 个氨基酸组成的长效胰高糖素样肽 -1 (GLP-1) 类似物，用于治疗 2 型糖尿病和肥胖症。由于其不仅拥有优异的降糖作用，还具有显著的减重效果，治疗性与安全性俱佳，一经上市，司美格鲁肽的药物渗透率及市场规模持续保持大幅增长。在降糖、减重适应症“内卷”的背景下，发掘司美格鲁肽其他适应症及其它与之类似的 GLP-1 类似物研发热度日益高涨。

面对 GLP-1 药物的研发热潮，体内研究必不可少，建立 GLP-1 类似物在生物样本中灵敏、高效的分析方法更是不可或缺。当前，以司美格鲁肽为代表的 GLP-1 多肽类药物，生物样本分析方法主要有

配体结合分析法 (LBA) 和液质联用法 (LCMSMS)。其中，液质联用法由于具有短时效、低成本、高特异性、高灵敏等优点，成为多肽药物体内分析重要技术手段之一。然而，利用 LC-MS/MS 分析多肽药物时，常会遇到回收率低、灵敏度差、非特异性吸附、峰形差、残留高等问题，对于样品前处理的优化、液质方法的调整、仪器特性的选用均具有较高技术要求。面对多肽类大分子体内检测分析的需求与挑战，本文使用岛津生物惰性液相与 LCMS-8050 联用系统，开发灵敏、稳定的体内分析方法，为实现司美格鲁肽高效、准确的定量分析提供技术支持。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用仪器由岛津生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与 LCMS-8050 联用。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XSi × 2	自动进样器：	SIL-40C XSi
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

取全部混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，清洗除杂后，用洗脱液 30 μL 分别洗脱三次，并压干，收集全部洗脱溶液至蛋白低吸附 96 孔板中，而后转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 15 μL 。

■ 结果与讨论

2.1 一级质谱图与产物离子扫描图

多肽由氨基酸通过肽键连接而成，而氨基酸本身具有不同的酸碱性。使用 ESI 对多肽物质进行检测时，会和其他大分子物质一样，呈多电荷状态。司美格鲁肽由 17 种 31 个氨基酸组成，使用 ESI 离子源对司美格鲁肽进行一级质谱扫描，得到不同价态的多电荷母离子（见图 1）。通过对比，实验选择灵敏度最高的 $[M+4H]^{4+}$ 作为母离子。对母离子进行产物离子扫描，得到主要碎片离子为 m/z 1238.55 与 m/z 1302.85。

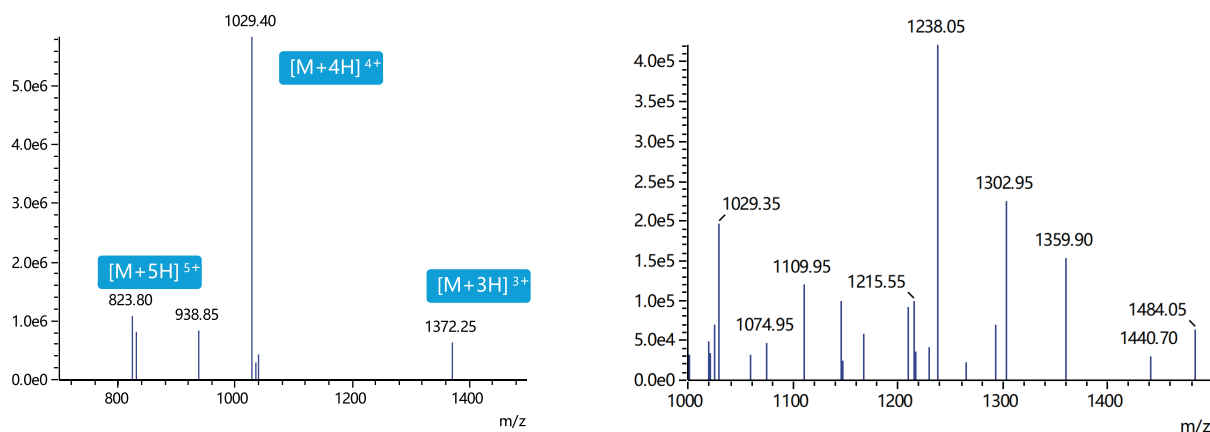
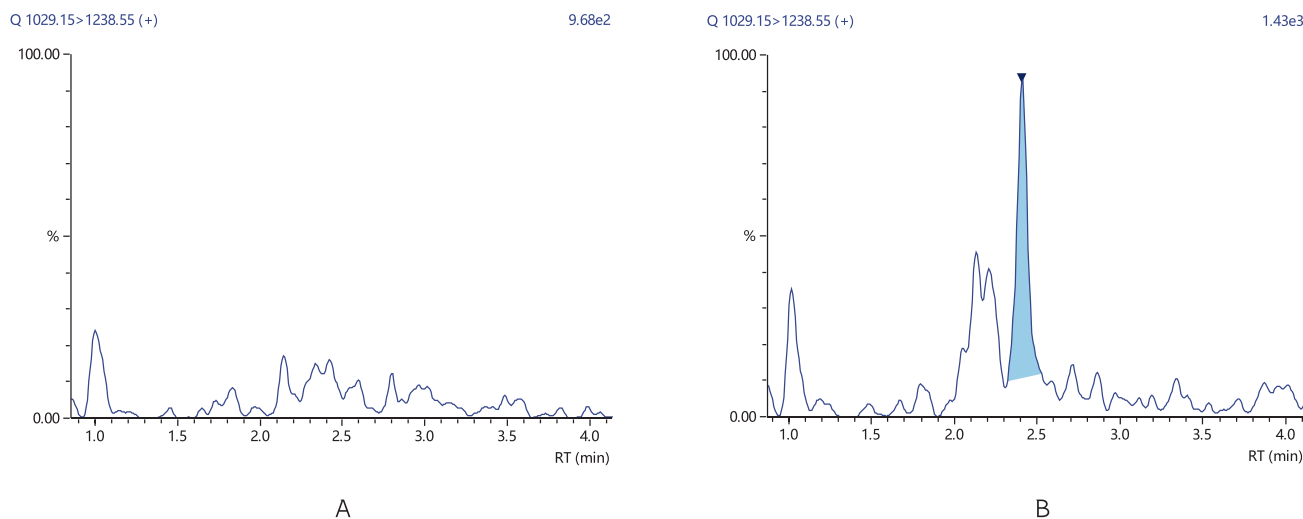


图 1 司美格鲁肽质谱图（左：母离子；右：产物离子）

2.2 方法选择性

通过全方位的液相质谱参数对比调整，使用 LCMS-8050 最终建立血浆定量方法的定量下限（LLOQ）可达 0.1 ng/mL，空白血浆中目标物通道与内标通道均无明显干扰，检测方法具有优异的选择性与灵敏度。图 2 展示了，按照 1.4 项下前处理方法处理后，空白血浆与定量下限（LLOQ）0.1 ng/mL 的色谱图，司美格鲁肽的保留时间为 2.4 min，内标的保留时间为 2.7 min。



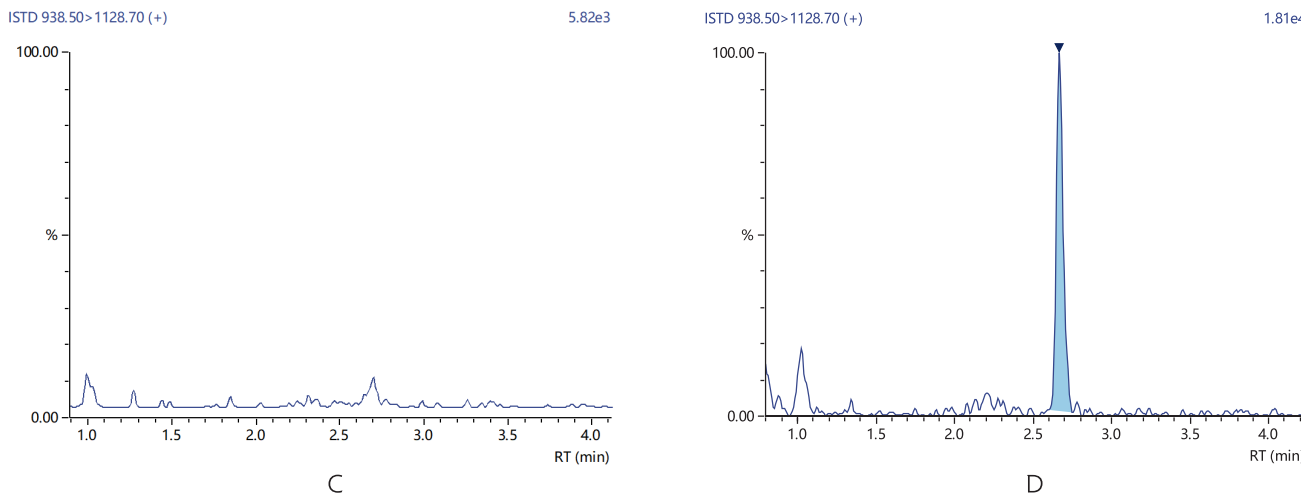


图2 司美格鲁肽与利拉鲁肽内标 MRM 色谱图
(A、C: 人空白血浆; B、D: 定量下限 0.1 ng/mL 血浆含内标样品)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备工作曲线，内标法进行定量分析。以血浆中司美格鲁肽浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以司美格鲁肽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。所建方法线性范围为 0.1- 500 ng/mL，相关系数 0.999，结果表明司美格鲁肽在 5000 倍浓度范围内线性关系良好，具体结果图 3。

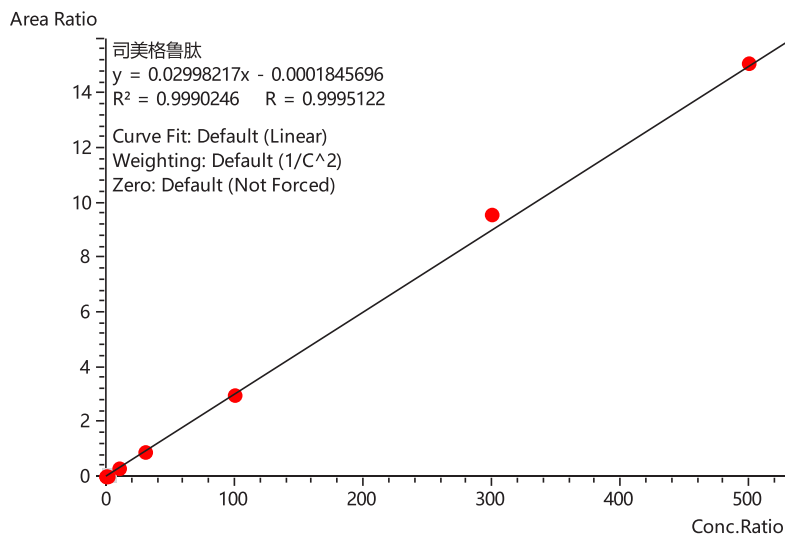


图3 血浆中司美格鲁肽标准曲线

2.4 方法灵敏度、精密度与准确度

为考察方法灵敏度、精密度与准确度，取已配制好的 0.32、10、400 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.1 ng/mL 样品，按照 1.4 方法制备，每个浓度的血浆样品在 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，用测得质控样品中司美格鲁肽峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 3。其中司美格鲁肽最低定量限 S/N 平均值为 22.07。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，并符合生物样品检测要求。

表 3 司美格鲁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	2.60	4.66	92.20-109.07
LQC	0.32	3.04	3.96	95.36-107.90
MQC	10	2.89	4.77	97.10-108.90
HQC	400	2.15	5.83	90.00-108.84

2.5 回收率

取低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.4 方法制备, 以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 1.4 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 $A1/A2 \times 100\%$, 考察血浆样本处理方法的提取回收率。实验可见, 通过样品前处理方法的细致优化, 各浓度水平司美格鲁肽回收率均大于 78%、RSD 小于 8%, 具体结果见表 4。

表 4 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	0.32	96.28	5.49
MQC	10	93.10	6.70
HQC	400	93.79	5.27

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。结果可见, 使用优化后的样品前处理方法, 各浓度水平基质效应因子均大于 90%, 具体结果见表 5。

表 5 基质效应考察结果 (n=5)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应 %	内标基质效应 %	A/A _{IS} 基质效应
LQC	0.32	90.16	92.53	97.45
MQC	10	96.37	106.87	90.18
HQC	400	103.60	105.79	97.94

2.7 系统残留考察 (Carryover)

多肽类化合物由多个氨基酸通过肽链连接而成, 存在大量的非极性残基以及电荷, 非常容易在金属材质表面产生吸附、残留问题。实验采用生物惰性液相对司美格鲁肽进行检测分析, 利用该液相非金属暴露的惰性特征, 以减少残留问题。实验结果表明, 完成浓度最高点血浆样品检测后分析空白样品, 常规液相分析的空白样品中有检出微量司美格鲁肽, 而惰性液相则没有明显检出目标化合物色谱峰, 说明惰性液相可有效解决其残留问题。

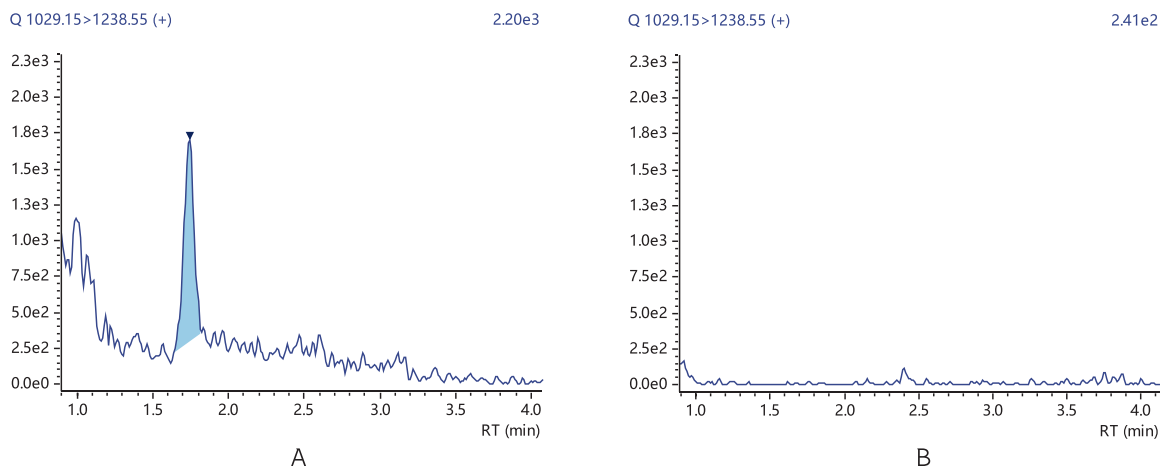


图 4 系统残留考察空白样品色谱图 (A: 普通液相结果; B: 惰性液相结果)

■ 结论

本文使用岛津特色产品生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 连用，开发血浆中司美格鲁肽定量分析方法。实验系统优化样品前处理，司美格鲁肽达到 90% 以上的高回收率。通过全面优化液相、质谱参数，充分利用生物惰性液相的系统特点，克服多肽药物体内分析常见的峰形拖尾、非特异性结合严重、残留量高的分析难点，获得司美格鲁肽体内分析色谱峰峰形对称、残留量低、定量下限可达 0.1 ng/mL，并且线性范围可从 0.1 ng/mL 拓宽至 500 ng/mL，相关系数 0.999。通过方法学验证结果表明所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好、残留量低的特点，满足司美格鲁肽生物样本分析要求，可为药物研发体内研究提供快速准确的检测方法。

岛津应用云

