

## 利用SPE-LC/MS生物分析定量分析血浆中的生物治疗性肽 - 索马鲁肽

---

Mary Trudeau, Angela Scumaci

Waters Corporation

---

### 摘要

以下研究展示了一种高灵敏度、高选择性、稳定的LC-MS生物分析方法对血浆中的肽类治疗药物索马鲁肽进行的定量分析。使用 $\mu$ Elution 96孔板选择性固相萃取(SPE)样品前处理, 结合QuanRecovery™与MaxPeak™高性能表面96孔板进行样品分析, 来减少肽类的非特异性结合, 并利用LC-MS/MS分析和定量技术, 使用UPLC™ CSH™ C<sub>18</sub>肽分析专用柱、ACQUITY™ UPLC I-Class Plus系统及TQ-XS质谱仪, 实现了血浆生物基质中索马鲁肽的快速、灵敏且具有高可重现性的准确定量。

### 优势

- 高选择性、快速的SPE萃取 (<30分钟)
- 用于SPE的96孔 $\mu$ Elution板可在浓缩样品的同时保持其溶解性, 尽可能地减少吸附导致的肽损失。
- 使用ACQUITY™ CSH C<sub>18</sub>肽分析专用柱进行快速UPLC分析 (4分钟)
- 使用带有MaxPeak HPS样品收集板的QuanRecovery板, 减少了索马鲁肽的非特异性结合, 确保了肽的高回收率和分析过程的重复性
- 可准确、灵敏地定量提取血浆中的索马鲁肽, LLOQ为0.120 ng/mL

---

## 简介

索马鲁肽(Ozempic®、Rybelsus®、Wegovy®)是一种由32个氨基酸组成的类胰高血糖素肽1 (GLP-1)类似物，可用于治疗2型糖尿病和肥胖症<sup>1</sup>。在持续研究和开发这类肽及与之密切相关的GLP-1激动剂肽类的过程中，人们迫切需要一种稳定、灵敏且具有选择性的样品前处理以及液相色谱-质谱(LC-MS)分析方法。然而，LC-MS/MS通常难以对大分子肽（如索马鲁肽(MWT 4114)）进行灵敏、稳定的定量分析，因为肽进入气相的转移不充分、信号在不同电荷态下的稀释，以及碎裂不佳，导致质谱的灵敏度降低。此外，索马鲁肽还极易发生非特异性结合，而且溶解性较差，这些都增大了开发LC方法和样品前处理方法的难度。

本文所述的研究采用高选择性 $\mu$ Elution反相固相萃取(SPE)、理想的MS设置和MRM通道，以及利用装填有带微弱正表面电荷的C<sub>18</sub>颗粒的高效UPLC分离色谱柱来提供出色的色谱峰形，并采用低结合性样品收集板来减少疏水性肽损失，最终实现了血浆中索马鲁肽的高灵敏度、高稳定性、低浓度ng/mL水平定量分析。

---

## 实验

### 样品前处理

将索马鲁肽(Cayman Chemical)加入市售大鼠血浆中。标准曲线样品浓度范围为0.120~1000 ng/mL。制备的索马鲁肽质控(QC)样品的浓度为0.48、15.6和500 ng/mL。在1.5 mL低结合性聚丙烯试管中，制备标准曲线样品和QC血浆样品，重复三次。

#### 步骤1：蛋白沉淀(PPT)

取200  $\mu$ L制得的索马鲁肽大鼠血浆样品，加入200  $\mu$ L甲醇进行沉淀，并在10,000 rcf下离心5分钟。

将上清液转移到装有400  $\mu$ L水的1 mL QuanRecovery 96孔板中，充分混合。

#### 步骤2：使用Oasis HLB 96孔 $\mu$ Elution板进行SPE

采用3步（上样、清洗和洗脱）SPE方案。将(600  $\mu$ L)稀释的PPT上清液样品全部上样至萃取板，然后取200  $\mu$ L 5%甲醇进行清洗。纯化后的样品用含5%甲酸的75/25乙腈/水溶液进行2次25  $\mu$ L的洗脱，然后收集在QuanRecovery 96孔收集板中。随后分析SPE萃取后的样品。

### LC/MS条件

---

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class Plus, 固定定量环
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	含0.1%甲酸的乙腈溶液
弱洗针液:	90:10水:乙腈, 含0.1% 甲酸
强洗针液:	乙腈:异丙醇:水:甲醇(25:25:25:25 v/v/v/v)
检测:	Xevo TQ-XS
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH C <sub>18</sub> 100 Å肽分析专用柱, 1.7 μm 2.1 mm × 50 mm (P/N: 186005296)
柱温:	65 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 μL
流速:	0.3 mL/min

## LC梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.300	65.0	35.0	6
0.25	0.300	65.0	35.0	6
3.0	0.300	25.0	75.0	6
3.1	0.300	10.0	90.0	6
3.2	0.300	10.0	90.0	6
3.4	0.300	65.0	35.0	6

## MS设置

电离模式：	ESI+
采集范围：	MRM
毛细管电压：	2.00 kV
锥孔电压：	32 V
脱溶剂气温度：	500 °C
脱溶剂气流速：	1100 L/h
锥孔气流速：	150 L/h
碰撞气体流速：	0.15 mL/min
喷雾器气流：	7 bar

## 数据管理

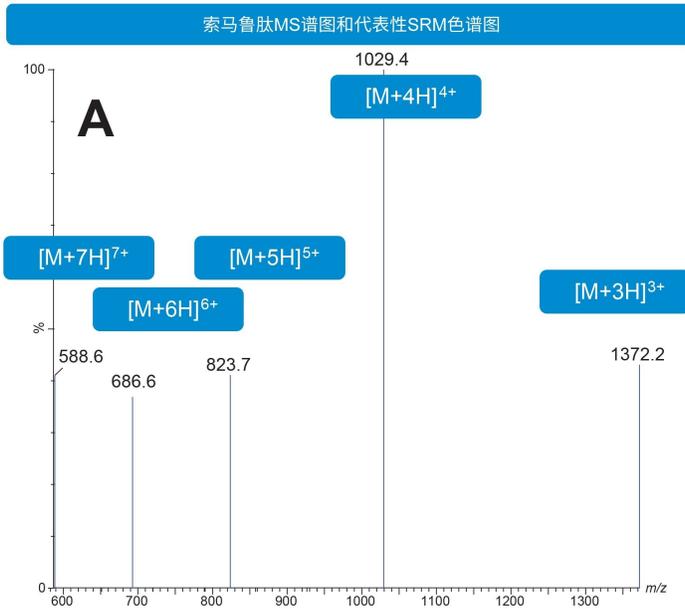
仪器控制软件：	MassLynx™ (v4.2)
定量软件：	TargetLynx™

---

## 结果与讨论

使用ACQUITY UPLC I-Class与在ESI+模式下运行的Xevo TQ-XS质谱仪系统联用，对索马鲁肽进行了LC-MS/MS定量分析。在MS方法开发过程中，通过对索马鲁肽溶液进行直接MS注样分析，测得从[M+3H]<sup>3+</sup>到[M+7H]<sup>7+</sup>的多电荷母离子（图1A）。注样后，通过LC色谱分离和选择离子监测(SIM)的质谱检测确认了这些电荷态。在这些条件下

，确定灵敏度最高的母离子为 $[M+4H]^{4+}$ ，其 $m/z$ 为1029，以及 $[M+3H]^{3+}$ 母离子的质量数，其 $m/z$ 为1371.2（图1 B）。在优化MRM碎片离子鉴定的过程中，我们发现 $[M+3H]^{3+}$ 母离子难以碎裂，需要非常高的碰撞能量，并且虽然它在SIM模式下具有高质谱仪灵敏度，但评估碎片离子MRM分析的灵敏度比 $[M+4H]^{4+}$ 母离子及其产生的碎片离子低两个数量级以上（图2）。因此，检测和定量采用的最终MS/MS多重反应监测(MRM)通道为1029.27>1302.6，用于初步定量，而1029.27>1238.1和1371.2>1238.1的MRM则用于确认。



## 索马鲁肽MS谱图和代表性SIM色谱图

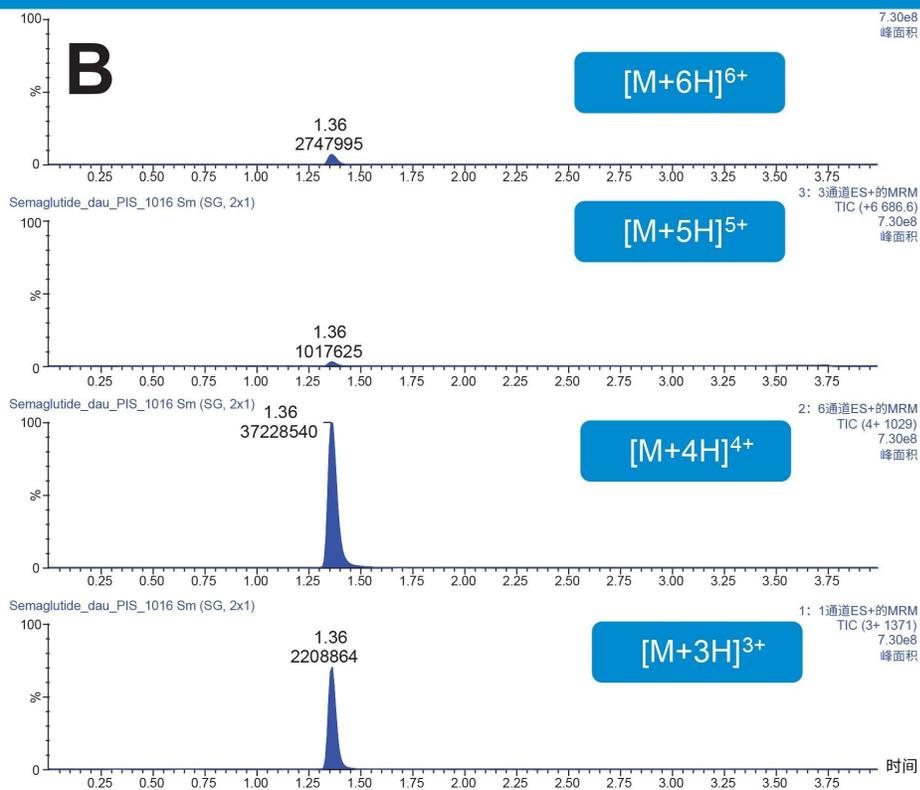


图1. MS谱图(A)突出显示了索马鲁肽  $[M+3H]^{3+}$  到  $[M+7H]^{7+}$  的多电荷母离子，代表性的单反应监测(SRM)色谱图(B)突出显示了索马鲁肽  $[M+3H]^{3+}$  到  $[M+6H]^{6+}$  的多电荷母离子MS响应。

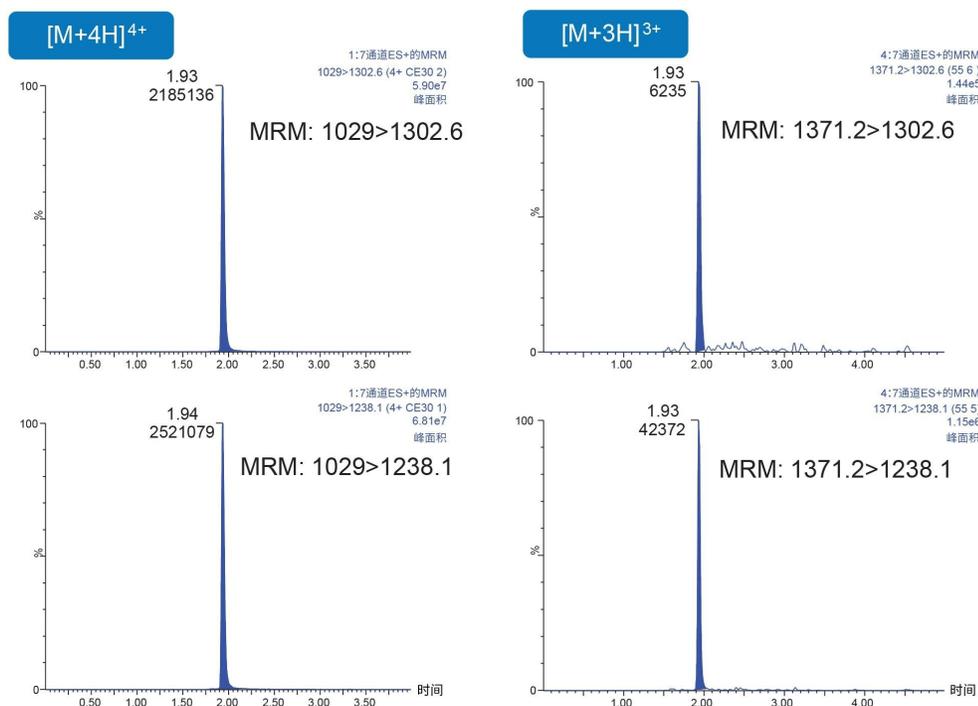


图2.索马鲁肽的代表性MS MRM色谱图，展示了 $[M+3H]^{3+}$ 和 $[M+4H]^{4+}$ 多电荷母离子，突出显示了使用 $[M+4H]^{4+}$ 多电荷母离子以及1302.6和1238.1  $m/z$ 碎片离子时的最佳灵敏度。

索马鲁肽是一种大分子疏水性肽，分子量为4113.5 g/mol，HPLC指数为89.7（疏水性的相对度量）。大分子疏水性肽的色谱分析通常面临峰形不佳、峰拖尾和肽残留等挑战，根本原因往往与溶解度低、色谱孔隙进出的扩散不佳以及柱温不理想有关。为了解决这些问题，研究中柱温保持在65 °C，并采用较低的流速(0.3~0.5 mL/min)。较低流速和较高的柱温可缩短索马鲁肽的保留时间，有利于索马鲁肽在色谱孔隙中的进出扩散，同时，高温可减少峰拖尾，尽可能减少色谱柱残留。色谱分析的一大改进在于对色谱柱吸附剂的评估。此评估重点考察了ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (300 Å) 1.7 μm肽分析专用柱和ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> (130 Å) 1.7 μm肽分析专用柱，两者均以出色的肽分离性能而著称。CSH色谱柱采用填充表面带有少量正表面电荷的C<sub>18</sub>颗粒，可提供更出色的色谱分离性能，索马鲁肽的MS响应更高，峰拖尾减少。其性能展示请参见图3。基于上述原因，本研究使用CSH C<sub>18</sub>色谱柱对索马鲁肽进行定量分析。

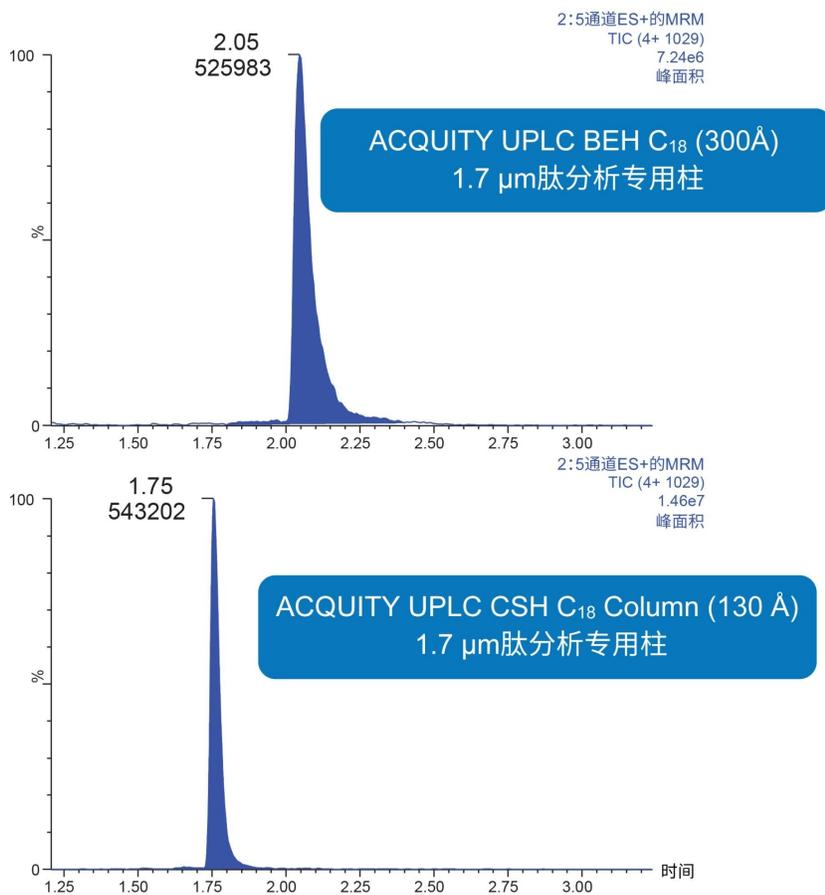


图3.索马鲁肽LC色谱柱评估，比较ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (300 Å) 1.7 μm肽分析专用柱和ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> (130 Å) 1.7 μm肽分析专用柱 (0.4 mL/min, 65 °C)，展示了CSH C<sub>18</sub>肽分析专用柱可提高MS响应，减少峰拖尾。

在样品前处理和SPE纯化过程中，由于索马鲁肽对消耗品的非特异性结合(NSB)程度很高，并且在整个过程中难以维持肽的溶解度，我们遇到了额外的挑战。本研究在样品前处理和萃取方案开发过程中，评估了样品前处理和LC-MS分析过程所用的消耗品，重点考察了专为减少肽疏水作用引起的NSB而设计的聚丙烯消耗品。本次评估比较了标准聚丙烯样品板和QuanRecovery 96孔样品板。QuanRecovery样品板采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术，设计精良，能够大幅减少肽与表面的相互作用，从而减轻疏水性NSB损失。图4展示了这一比较结果，使用10%甲醇溶液制备索马鲁肽溶液(1和10 ng/mL)，与标准聚丙烯样品板相比，使用QuanRecovery样品板可改善MS响应。出于同样的原因，在索马鲁肽储备液制备过程中，还使用了低结合性聚丙烯试管，以进一步减少NSB

损失。此外，研究中还发现，与100%水溶液或100%甲醇溶液相比，在20%~30%甲醇溶液中制备的索马鲁肽储备液能够观察最佳的质谱仪信号。

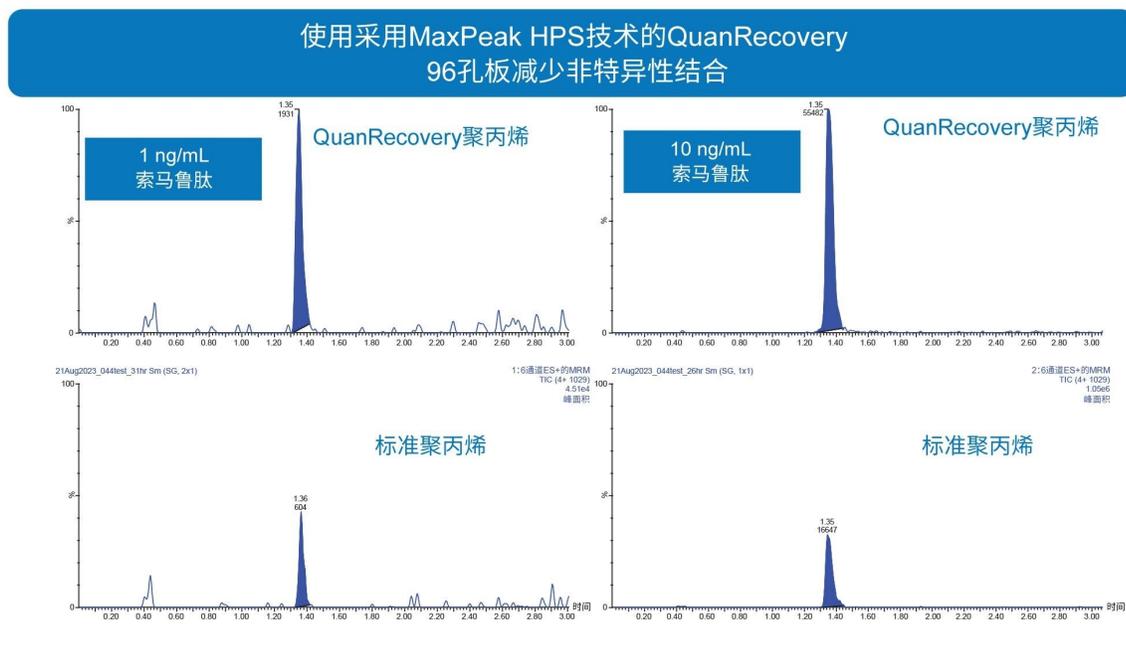


图4.使用配备MaxPeak HPS的96孔QuanRecovery™样品收集板减少收集容器中的疏水性NSB，结果表明，与标准聚丙烯样品板相比，MS峰响应有所改善。

研究证明，SPE纯化前的样品预处理对于提高血浆中索马鲁肽提取物的回收率和特异性至关重要。传统的酸性和/或碱性水溶液样品预处理方法无法充分破坏索马鲁肽与血浆蛋白的结合，导致血浆中的回收率不足20%。采用蛋白沉淀法(1:1)和含5%甲酸的甲醇溶液进行预处理后，索马鲁肽的回收率可以达到80%~100%，而肽本身没有沉淀。采用更高比例的有机溶剂进行蛋白沉淀时，由于索马鲁肽发生沉淀，导致肽损失。此外，PPT预处理进一步消除了白蛋白等大分子蛋白质的内源性干扰，增加了SPE萃取的选择性。PPT样品预处理后，用水按1:2的比例稀释索马鲁肽PPT上清液，然后上样至Oasis HLB SPE板。这样做是为了尽可能减少由于PPT样品的有机相组成高而造成的索马鲁肽穿透(breakthrough)。这样确保了在上样步骤期间，索马鲁肽保留在SPE吸附剂上，且不发生穿透。理想的洗脱溶液使用含5%甲酸的75%乙腈，以确保最佳洗脱的同时保持索马鲁肽足够的溶解度。最终方案请参见实验部分，如图5所示。从血浆中提取的索马鲁肽标准曲线的定量性能见表1，QC性能见表2和图6。

## Oasis® HLB 96孔 $\mu$ Elution板 (2 mg/孔)

### 样品预处理

1:1 200  $\mu$ L血浆：200  $\mu$ L甲醇PPT，  
用水按1:2的比例稀释，然后进行SPE上样

### 上样

完全稀释的血浆PPT上清液

### 清洗

1  $\times$  200  $\mu$ L 5%甲醇

### 洗脱

2  $\times$  25  $\mu$ L含5%甲酸的75/25乙腈/水溶液，  
用50  $\mu$ L水稀释（可选）

图5.索马鲁肽样品萃取方案，使用1:1血浆:甲醇进行预处理，然后使用Oasis HLB 96孔 $\mu$ Elution板 (2 mg/孔) 进行反相SPE，采用200  $\mu$ L起始血浆体积和50  $\mu$ L SPE洗脱，获得2倍浓缩的样品。

索马鲁肽大鼠血浆标准曲线统计数据			
标准曲线动态范围 (ng/mL)	加权	线性拟合结果 (R <sup>2</sup> )	准确度范围 (%)
0.12-1,000	1/X2	0.995	-11.6-14.8

表1.从血浆中提取的索马鲁肽标准曲线统计数据。

索马鲁肽大鼠血浆QC统计数据				
QC水平	预期浓度 (ng/mL)	平均实测浓度 (ng/mL) (N = 3)	平均准确度% (N = 3)	% RSD
LQC	0.48	0.50	103.80	3.80
MQC	15.6	16.09	103.10	4.28
HQC	500	497.14	99.43	6.04

表2.从血浆中提取的索马鲁肽QC统计数据。

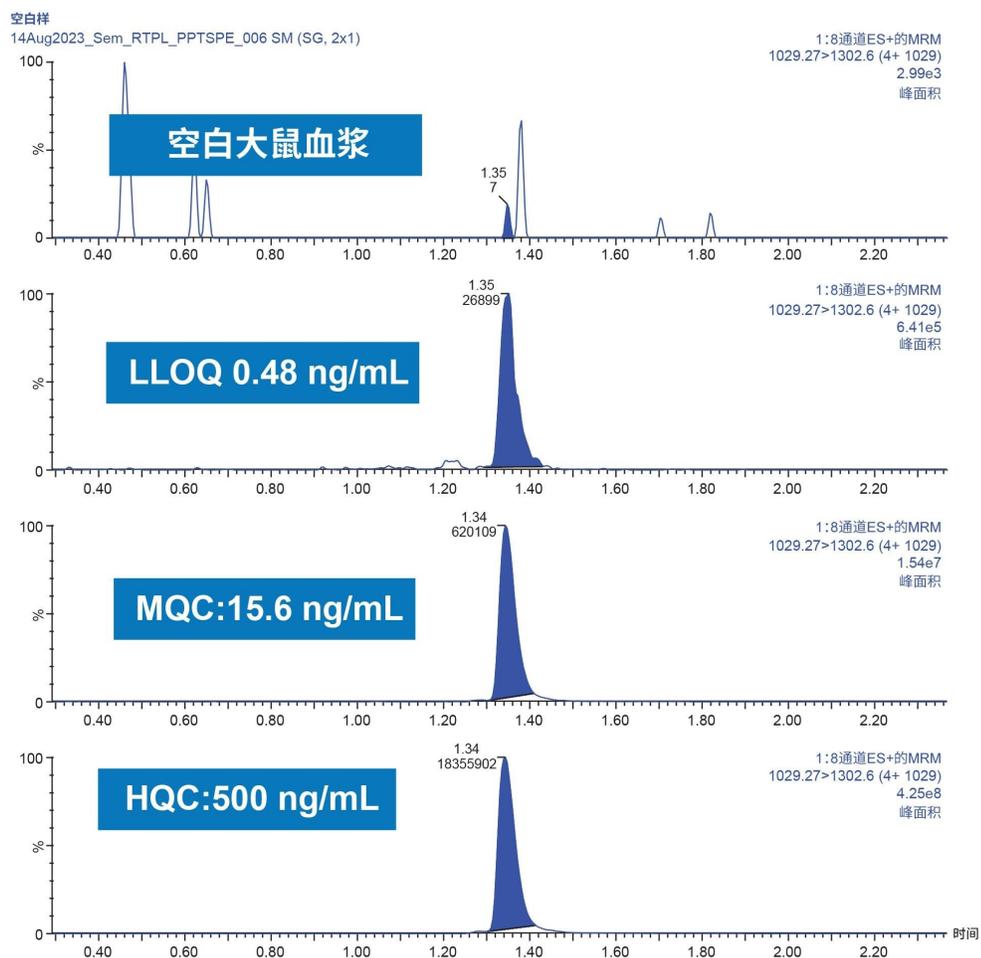


图6.从血浆中提取的索马鲁肽QC样品的代表性色谱图，浓度分别为0.48、15.6和500 ng/mL。

## 结论

研究通过选择性的反相 $\mu$ Elution SPE纯化，利用QuanRecovery MaxPeak HPS 96孔板减少NSB，选择合适的MS碎片离子，并使用CSH C<sub>18</sub> UPLC肽分析专用柱进行色谱分离，实现了血浆中索马鲁肽灵敏、准确、稳定的定量分析。

---

## 参考资料

1. Semaglutide: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online <<https://go.drugbank.com/drugs/DB13928>> , accessed on 19 September 2023.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720008097ZH, 2023年11月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)  
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号