

使用Xevo™ TQ-XS质谱仪定量分析人血浆中的索马鲁肽：一种高灵敏度且可靠的分析方法

Tirumal Datar, Sushil Gawande, Dr. Padmakar Wagh, Amy Bartlett

Waters Corporation

摘要

在本研究中，我们使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪与ACQUITY™ Premier UPLC™的联用系统开发并验证了一种高灵敏度且稳定的分析方法，用于准确定量人血浆中的索马鲁肽。该LC-MS/MS方法展示了质谱检测的优化参数以及使用ACQUITY Premier BEH™ C18肽分析专用柱进行的色谱分离。加入二氟乙酸(DFA)作为离子对试剂可改善带电分析物的峰形和灵敏度，使峰形更清晰，且电离效率更高。该方法经过验证，确认其具有优异的选择性、灵敏度和重现性，并在临床相关浓度范围(0.1 ng/mL~20 ng/mL)内评估了线性。使用质控(QC)样品进行了精密度和准确度(P&A)评估，获得令人满意的结果：准确度(%)处于可接受范围内，变异系数(CV)值低于8% RSD。开发的这一方法在推进糖尿病治疗的研究和临床应用方面展现出重要潜力，不仅提供了准确定量索马鲁肽的有效工具，还促进了生物分析科学中肽分析技术的发展。

优势

- 精密、准确地测定：该方法能够对索马鲁肽实现精密、准确的测量，定量下限(LLOQ)低至0.1 ng/mL
 - 高特异性、高选择性的样品前处理：采用SPE（固相萃取）技术，可在样品前处理过程中实现高特异性和高选择性，从复杂样品基质中浓缩分析物用于后续分析，从而获得可靠的结果
 - 色谱分离：采用Premier BEH肽分析专用柱进行色谱分离，旨在减少化合物与金属相互作用引起的非特异性结
-

合，从而提高灵敏度并改善峰形

- 使用ACQUITY Premier UPLC：该系统采用MaxPeak™表面，可减少表面相互作用和吸附，从而提高分析物回收率、重现性和灵敏度，并尽可能降低残留效应
- 使用QuanRecovery™聚丙烯样品瓶：这些样品瓶旨在尽可能减少分析物吸附、提高回收率并确保样品分析的重现性。通过减少分析物的非特异性结合，进一步提高了样品提取和分析过程中的回收率

简介

索马鲁肽是一种胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)类似物，在2型糖尿病(T2D)和肥胖症的治疗中，已成为一种有前景的疗法。它是一种新开发的GLP-1受体激动剂，结构与利拉鲁肽相似，但经过修改拥有更长的半衰期¹。2020年，该药物在美国T2D常用处方药中排名第129位，处方量超过400万张。全球近9%的成年人患有T2D，其病例约占所有糖尿病的90%²⁻³。有效的血糖控制对于治疗T2D和减少相关并发症至关重要。索马鲁肽与人肠促胰岛素GLP-1类似，可促进胰岛素分泌和血糖代谢，从而改善血糖控制。因此，它可以作为成人2型糖尿病患者饮食和运动的辅助治疗手段⁴。其每周一次的给药方案和有效的血糖控制作用在临床实践中引起了广泛关注⁵⁻⁶。为确保索马鲁肽的临床给药安全有效，对人血浆中的索马鲁肽进行准确可靠的定量分析至关重要。在本研究中，我们使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪开发并验证了一种高灵敏度且稳定的分析方法，用于精确定量人血浆中的索马鲁肽。针对复杂的血浆样品，由于需要更高的灵敏度、可靠的重现性和尽可能减少基质干扰，因此对分析方法进行了优化。

该方法的验证过程严格遵循国际法规指南，可确保方法的精密度、准确度和选择性。制备涵盖临床相关浓度范围的校准标准品，并加入质控样品，以评估方法稳定性。

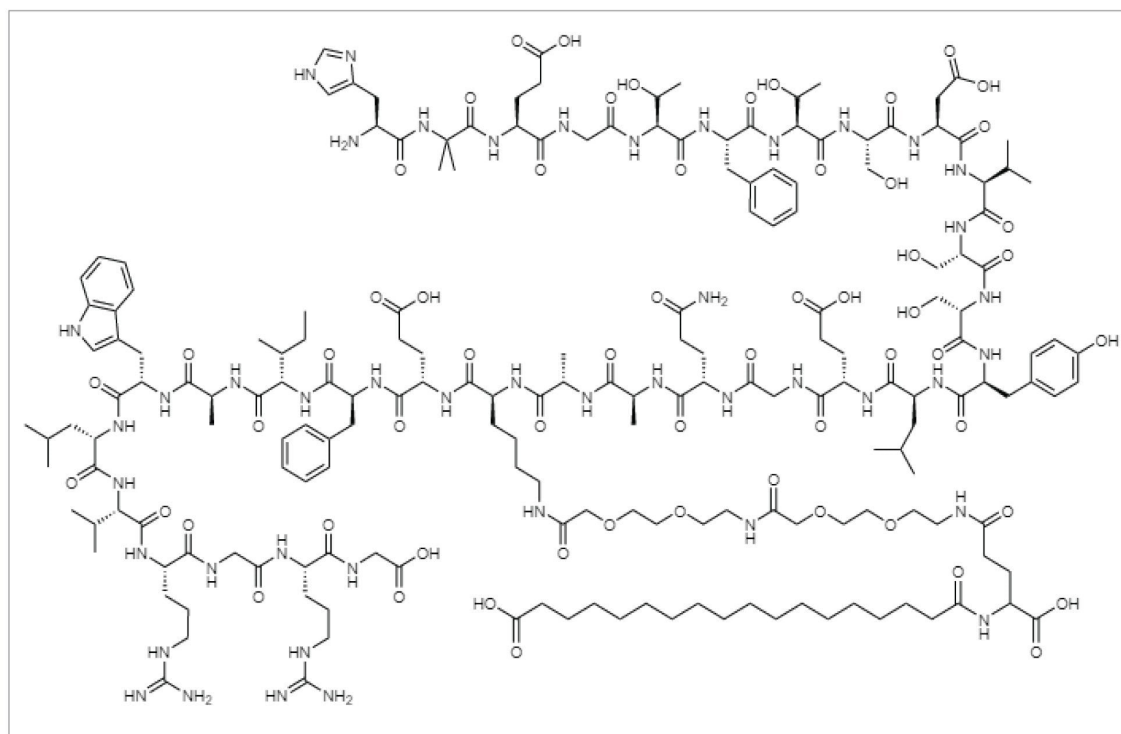


图1.索马鲁肽的化学结构

实验

在本研究中，使用水和乙腈的1:1混合溶液（含2%甲酸）稀释标准样和加标溶液。向待测的人血浆样品中加入已知含量的索马鲁肽标准品，绘制标准曲线，浓度范围为0.1~20 ng/mL。此外，通过加标四种不同浓度的索马鲁肽制备质控(QC)样品：0.1 ng/mL（下限QC）、0.5 ng/mL（低浓度QC）、5 ng/mL（中等浓度QC）和20 ng/mL（高浓度QC）。值得注意的是，本实验不使用内标。

样品前处理

开始进行样品前处理：取500 μ L人血浆，用等量的乙腈处理。充分涡旋1 min后，在10 $^{\circ}$ C下以15000 rpm离心样品5 min。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	配备FTN SM的ACQUITY I-Class Premier UPLC
样品瓶:	QuanRecovery, MaxPeak 12 x 32 mm 300 μ L PP螺旋盖样品瓶 (P/N: 186009186)
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C18肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm (P/N: 186009494)
柱温:	70 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	15 μ L
流动相A:	0.4%甲酸的水溶液
流动相B:	含0.1% DFA的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.2	60	40	初始
6.0	0.2	10	90	6
6.5	0.8	10	90	6
7.0	0.8	5	95	6
8.0	0.8	5	95	6
8.5	0.2	60	40	6
12	0.2	60	40	6

表1.用于索马鲁肽分析的LC梯度

质谱条件

质谱系统:	Xevo TQ-XS
电离模式:	电喷雾正离子模式
毛细管电压:	3.0 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	1100 L/h
锥孔气流速:	300 L/h

锥孔电压:

50 V

表2.索马鲁肽的优化后MS参数

MRM方法 (定量离子通道用粗体表示)

化合物	保留时间 (min)	MRM	CE (eV)	驻留时间 (s)
索马鲁肽	2.7	1029.1>1237.7	30	0.03
		1029.1>1303.35	30	0.03

表3.索马鲁肽的优化后MRM通道

利用Auto-Dwell功能自动设置驻留时间,使每个峰至少包含20个数据点。

数据管理

质谱软件:

Masslynx™ v4.2

信息学软件:

Targetlynx™ XS

结果与讨论

本研究开发出一套完整的样品前处理和UPLC LC-MS/MS方法,用于准确定量血浆中的索马鲁肽。该方法包括使用Oasis 1 cc (30 mg)小柱的混合模式SPE萃取步骤。

使用Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪(ESI+)进行定量分析。调谐过程非常重要,旨在确保仪器能够高效检测和定量目标离子,使样品中索马鲁肽的鉴定和定量分析获得精密、准确的结果。与许多其他肽和蛋白质一样,索马鲁肽

因其结构和组成的原因，在电喷雾质谱中表现出多电荷态。这种现象在生物大分子（例如肽和蛋白质）中很常见，是质谱分析中的电离过程（尤其是电喷雾电离(ESI)）所导致的。由于索马鲁肽含有多个碱性氨基酸残基（例如赖氨酸和精氨酸），因此在电离过程中可以吸引多个质子。每次质子化均产生一个带正电离子。因此，在索马鲁肽的质谱图中，可能观察到多个不同的多电荷离子，如图2所示。值得注意的是，我们选择了强度最高的离子 m/z 1029（代表4+离子）用于定量分析。

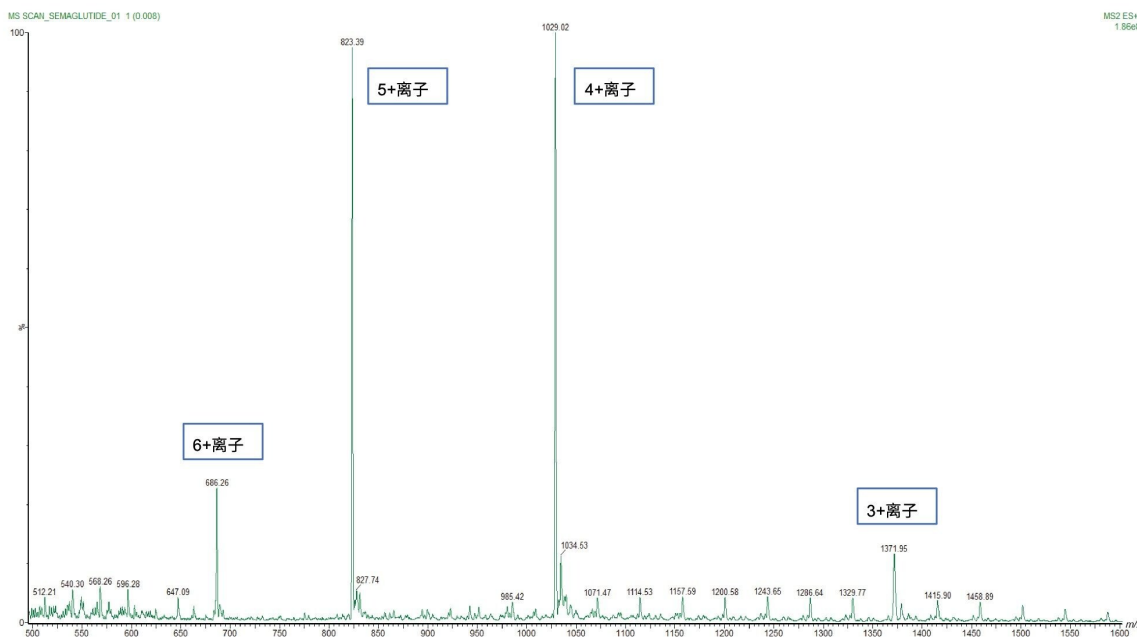


图2.索马鲁肽的多电荷离子

优化后的MS参数和MRM通道分别参见上文实验部分的表2和表3。

使用ACQUITY Premier BEH C₁₈肽分析专用柱(300 Å, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm)和ACQUITY I-Class Premier UPLC系统进行色谱分离。ACQUITY Premier色谱柱和色谱系统采用的硬件技术旨在减少化合物与金属相互作用引起的非特异性结合，从而提高灵敏度并改善色谱峰形。这款色谱柱专为肽分离设计，可通过与肽之间发生疏水相互作用，从而提供良好的保留性能和选择性。在索马鲁肽与基质的分离中，该色谱柱提供了出色的分离度、灵敏度和重现性。

除此之外，通过在流动相中添加二氟乙酸(DFA)作为离子对试剂，也可以改善带电分析物的峰形。与DFA形成的离子对提高了电离效率，从而改善了质谱仪的灵敏度。DFA还通过促进质子化并防止与固定相发生不必要的次级相互作用，从而减少峰拖尾。（参考资料7）

所开发的方法表现出优异的选择性、灵敏度和重现性。图3展示了基质空白和定量下限(LLOQ) 0.1 ng/mL加标样品的典型色谱图，对于后者，分析物在2.71 min处出现明显的对称峰，不存在基质干扰。此外，在不进行平滑处理的情况下，LLOQ (0.1 ng/mL)样品的信噪比(S/N)超过了30。

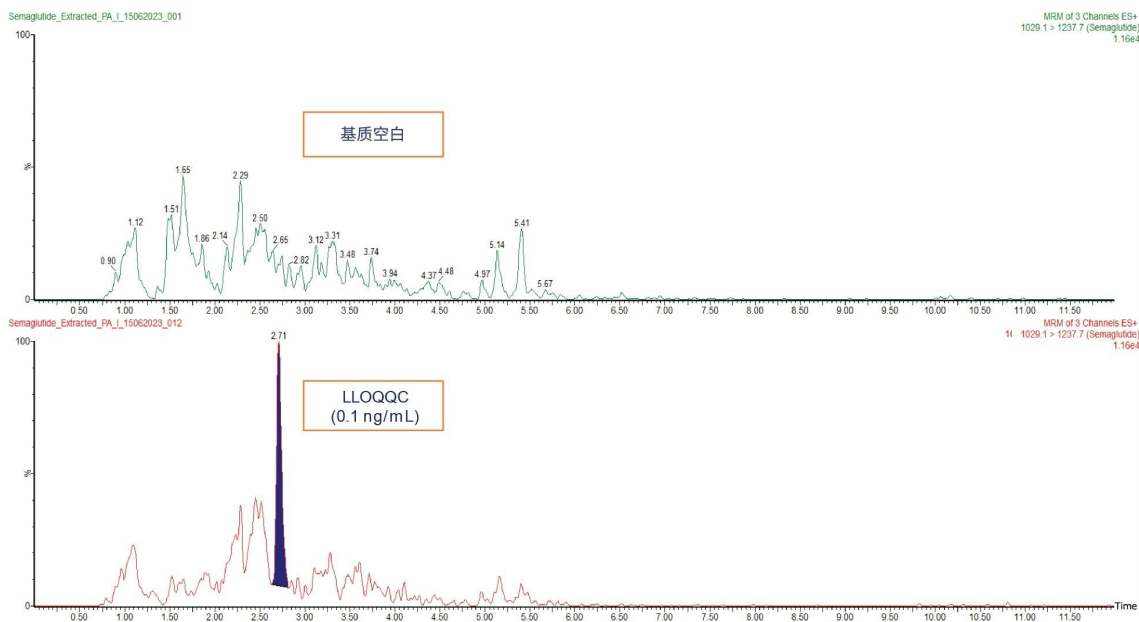


图3.基质空白和定量下限加标样品的典型色谱图

本研究评估了0.1 ng/mL~20 ng/mL浓度范围内的线性，相关系数高达0.999，非常出色。该范围内的代表性标准曲线如图4所示。

化合物名称: 索马鲁肽(1)
相关系数: $r = 0.999277$, $r^2 = 0.99854$
标准曲线: $852.119 \times C - 4.74233$
曲线类型: 外标法, 按峰面积计算
曲线类型: 线性, 原点: 1.0E+2, 稀释: 无

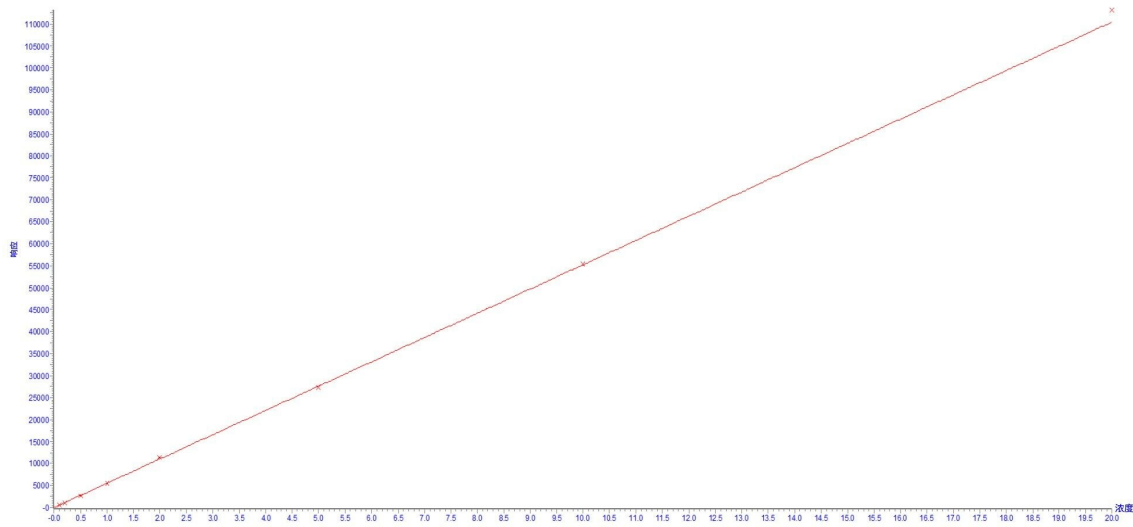


图4.索马鲁肽的标准曲线

在精密度和准确度(P&A)评估中, 制备了加标四种不同浓度的QC样品: 0.1 ng (LLOQC)、0.5 ng (LQC)、5 ng (MQC)和20 ng (HQC)。由不同的分析人员在不同场景下分析了三个单独的P&A批次。结果汇总见表4。

所有QC水平的预加标血浆样品的准确度%均处于相应QC水平的可接受范围内。在所有三个批次中, 各QC水平的变异系数均低于8% RSD。此外, 在所有三个批次中, 四个QC水平的平均准确度%范围为92%~106%, 符合生物分析验证指南中概述的可接受标准。

		计算浓度(ng/mL)			
批次1	样品重复测定	LLQC (0.1 ng/mL)	LQC (0.5 ng/mL)	MQC (5 ng/mL)	HQC (20 ng/mL)
	1	0.085	0.536	4.988	19.958
	2	0.094	0.527	4.947	22.062
	3	0.086	0.530	4.928	22.576
	4	0.102	0.494	5.205	18.394
	5	0.101	0.512	5.183	19.775
	6	0.096	0.485	5.148	20.623
	平均浓度 (ng/mL)	0.094	0.514	5.066	20.565
	标准偏差	0.007	0.021	0.126	1.549
	% CV	7.48	4.03	2.48	7.53
	平均准确度 (%)	94.10	102.78	101.33	102.82

		计算浓度(ng/mL)			
批次2	样品重复测定	LLQC (0.1 ng/mL)	LQC (0.5 ng/mL)	MQC (5 ng/mL)	HQC (20 ng/mL)
	1	0.100	0.469	5.094	20.608
	2	0.109	0.459	5.040	20.700
	3	0.099	0.464	4.970	21.257
	4	0.108	0.482	5.068	19.880
	5	0.094	0.490	4.977	19.393
	6	0.103	0.465	5.096	20.008
	平均浓度 (ng/mL)	0.102	0.471	5.041	20.308
	标准偏差	0.006	0.012	0.056	0.672
	% CV	5.53	2.58	1.11	3.31
	平均准确度 (%)	101.80	94.28	100.82	101.54

		计算浓度(ng/mL)			
批次3	样品重复测定	LLQC (0.1 ng/mL)	LQC (0.5 ng/mL)	MQC (5 ng/mL)	HQC (20 ng/mL)
	1	0.098	0.433	5.455	17.747
	2	0.092	0.472	5.348	19.330
	3	0.107	0.449	5.447	17.381
	4	0.099	0.473	5.063	18.393
	5	0.084	0.469	5.251	18.252
	6	0.092	0.467	5.099	18.191
	平均浓度 (ng/mL)	0.095	0.460	5.277	18.216
	标准偏差	0.008	0.016	0.170	0.662
	% CV	8.08	3.50	3.21	3.63
	平均准确度 (%)	95.30	92.08	105.54	91.08

表4.三个独立P&A批次的质控样品分析结果总结

结论

总之，本研究开发出一套全面且稳定的样品前处理和UPLC LC-MS/MS方法，用于准确定量血浆中的索马鲁肽。Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪(ESI+)为索马鲁肽提供了灵敏、可靠的定量分析，要获得精密且准确的结果，其调谐过程至关重要。

ACQUITY Premier UPLC色谱系统和色谱柱采用了MaxPeak表面，可有效减少表面相互作用和分析物吸附。这些优势有助于提高分析物回收率、改善重现性、灵敏度并减少残留效应。

色谱分离使用ACQUITY Premier BEH C₁₈肽分析专用柱进行，提供了优异的保留性能、选择性和灵敏度，确保复杂多肽混合物也能实现高效分离。加入二氟乙酸(DFA)作为离子对试剂进一步改善了反相LC中带电分析物的峰形和灵敏度，从而获得更清晰的峰形，且质谱仪中的电离效率更高。

验证结果表明，该方法具有优异性能，在0.1 ng/mL~20 ng/mL的浓度范围内表现出优异的线性、精密度和准确度。不同QC水平的准确度%和变异系数均符合可接受标准，证明该方法能够对人血浆中的索马鲁肽进行可靠且可重现的定量分析。

开发的这一方法在推进糖尿病治疗的研究和临床应用方面展现出重要潜力。该方法具有出色的稳定性和灵敏度，不仅提供了准确定量索马鲁肽的有效工具，支持安全有效的治疗用途，还促进了生物分析科学中肽分析技术的发展。

参考资料

1. 14 December 2017 EMA/CHMP/715701/2017 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
2. "The Top 300 of 2020". *ClinCalc*. 2020年3月18日自原始网站存档. 检索日期: 2022年10月7日.
3. "Semaglutide – Drug Usage Statistics". *ClinCalc*. 2022年10月8日自原始网站存档. 检索日期: 2022年10月7日.
4. "Ozempic- semaglutide injection, solution". *DailyMed*. 2021年6月5日自原始网站存档. 检索日期: 2021年6月5日.

5. Goldenberg RM, Steen O. "Semaglutide: Review and Place in Therapy for Adults With Type 2 Diabetes". *Canadian Journal of Diabetes*. (March 2019) 43 (2): 136–145. doi:10.1016/j.jcjd.2018.05.008. PMID 30195966.
 6. Kapitza C, Nosek L, Jensen L, Hartvig H, Jensen CB, Flint A. "Semaglutide, a once-weekly human GLP-1 analog, does not reduce the bioavailability of the combined oral contraceptive, ethinylestradiol/levonorgestrel". *Journal of Clinical Pharmacology*. (May 2015) 55 (5): 497–504. doi:10.1002/jcph.443. PMC 4418331. PMID 25475122.
 7. Melvin Blaze, Thomas H. Walter. 将二氟乙酸用作小分子LC-MS分析的流动相改性剂. 沃特世应用纪要 [720006776ZH](#) 2020.
-

特色产品

[ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

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

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[MassLynx定量应用程序 <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720008160ZH, 2023年12月



© 2025 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](#)