

SCIEX LC-MS/MS系统定量检测大鼠血浆中司美格鲁肽和替尔泊肽

Quantitative Analysis of Semaglutide and Tirzepatide in Rat Plasma by SCIEX LC-MS/MS System

史晓媛, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiaoyuan Shi, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX 应用支持中心, 中国

Keywords: LC-MS/MS, Semaglutide, Tirzepatide, Quantitative Analysis

引言

司美格鲁肽 (Semaglutide) 是2021年6月被FDA批准用于减肥适应症, 它是胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂, 替尔泊肽 (Tirzepatide) 是2023年11月8日获FDA批准用于慢性体重管理, 它是葡萄糖依赖性促胰岛素多肽/胰高血糖素样肽-1 (GIP/GLP-1) 双受体激动剂。它们的作用机制类似, 都能够刺激胰岛素分泌, 抑制胰高血糖素释放, 调节血糖; 还可以减缓胃排空, 诱导饱腹感, 发挥减重作用。这些GLP-1类似物的口服生物利用度非常低, 需要高灵敏和高选择性的分析方法在生物基质中进行定量检测。本文采用高效液相色谱串联质谱建立了司美格鲁肽和替尔泊肽在大鼠血浆中的定量方法。司美格鲁肽和替尔泊肽在大鼠血浆中的定量限为0.2 ng/mL。在获得优异灵敏度的同时, 出色的分析重现性、准确性和定量线性使得整个分析流程更加可靠。

前处理方法

200 μ L大鼠血浆加入400 μ L甲醇对血浆中的蛋白进行沉淀, 涡旋混匀2 min。离心机在15000 rpm/min转速下离心10 min。上清液取500 μ L, 再加入400 μ L水稀释, 涡旋混匀, 待净化。净化液加载至活化过的Peptide-3-MW 96微孔板, 用水淋洗微孔板, 最后用洗脱液 (5%甲酸 乙醇:水=4:1) 洗脱2次, 涡旋混合, 上机检测。

实验设备

ExionLC™ AD系统和SCIEX MS/MS系统



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX MS/MS系统

液相方法

色谱柱: Phenomenex AeriS Peptide XB-C18 (2.1 \times 100 mm, 2.6 μ m)

流动相: A: 水 (含0.1%甲酸); B: 乙腈 (含0.1%甲酸)

流速: 0.3 mL/min;

梯度洗脱

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	70	30
0.5	70	30
3.0	35	65
3.5	35	65
4.0	2	98
5.5	2	98
5.6	70	30
7.0	70	30

质谱方法

数据采集方法：MRM (多反应监测)

离子源：ESI源正模式

气帘气CUR: 35 psi IS电压: 5500 V

源温度 TEM: 450 °C 雾化气Gas1: 60 psi

辅助气Gas2: 60 psi 碰撞气 CAD: High

多反应监测离子通道如表2

数据处理

采用SCIEX OS软件, 版本3.3. 使用MQ4算法进行积分, 权重为 $1/x^2$ 。

实验结果

1. 灵敏度和线性

本实验配制大鼠血浆标准工作溶液至0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL和100 ng/mL, 经过蛋白沉淀和96孔板后上机分析。血浆基质定量下限 (LOQ) 可达0.2 ng/mL, 空白干净无干扰, 方法特异性好、灵敏度高(图2)。Semaglutide和Tirzepatide化合物线性范围和回归方程 (图3), Semaglutide和Tirzepatide在0.2~100ng/mL的浓度范围内线性良好。每个标点连续进样3针, RSD%均小于10% (表3), 偏差小。

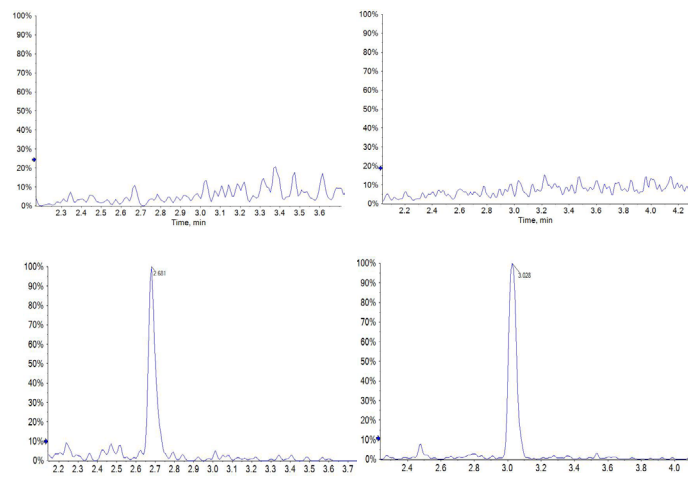


图2. 典型色谱图 (上图为Semaglutide和Tirzepatide空白血浆基质提取离子色谱图, 下图为0.2ng/mL基质加标样品提取离子色谱图)

表2. Semaglutide和Tirzepatide的MRM离子对信息

Compound ID	Q1 mass	Q3 mass	DP	CE
Semaglutide 1	1029.3	1238.5	40	41
Semaglutide 2	1029.3	1110.3	40	39
Tirzepatide 1	1204.2	396.3	67	36
Tirzepatide 2	1204.2	910.0	67	33

2. 重现性

为考察方法的重现性和准确性, 分别将处理好的LOQ浓度点0.2 ng/mL样本进行重复性考察。6针样品(图5)连续采集, 精密度 (RSD) 分别为1.81%和3.00%, 准确度在91.01%~110.51%之间。

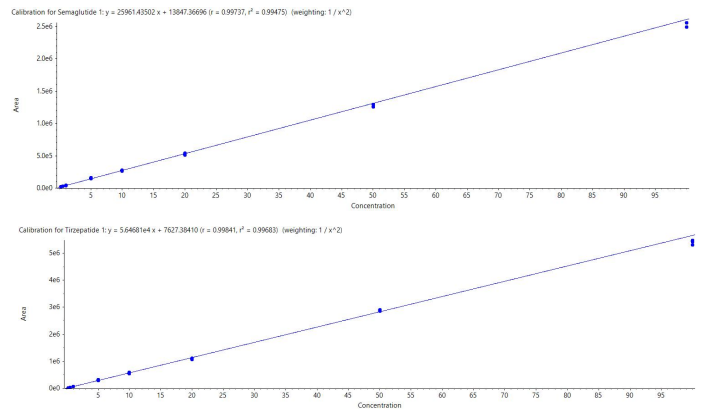


图3. Semaglutide和Tirzepatide标准曲线和线性回归方程, 线性相关系数 $r > 0.995$

Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Concentration	Area	Retention Time	Signal / Noise	Calculated Concentration	Accuracy			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.930e4	2.68	10.8	0.205	102.45			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.930e4	2.70	16.1	0.205	102.39			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.972e4	2.69	24.6	0.221	110.51			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.871e4	2.70	15.0	0.182	91.02			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.952e4	2.69	11.9	0.213	106.73			
0.2ng/ml	Quality Control	Semaglutide 1	Quantifiers	0.20	1.911e4	2.70	12.6	0.198	98.77			
Row	Component Name	Act...	Num. Va...	Mean	Stand...	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Semaglutide 1	0.20	6 of 6	1.928e4	3.485e2	1.81	1.930e4	1.930e4	1.972e4	1.871e4	1.952e4	1.911e4
Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Component Group Name	Actual Concentration	Area	Retention Time	Signal / Noise	Calculated Concentration	Accuracy		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.785e4	3.04	31.0	0.181	90.49		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.946e4	3.04	22.1	0.209	104.75		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.881e4	3.04	16.7	0.198	98.98		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.897e4	3.04	20.1	0.201	100.45		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.887e4	3.03	38.7	0.199	99.55		
0.2ng/ml	Quality C...	Tirzepatide 1	Quantifiers	Tirzepatide	0.20	1.831e4	3.04	24.1	0.189	94.55		
Row	Component Name	Act...	Num. Va...	Mean	Stand...	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Tirzepatide 1	0.20	6 of 6	1.871e4	5.504e2	3.00	1.785e4	1.946e4	1.881e4	1.897e4	1.887e4	1.831e4

图4. LOQ标点连续进样6针峰面积、保留时间、准确度和RSD列表

3. 回收率

取9份大鼠空白血浆，平行制备三份加标溶液，浓度分别在LQC, MQC和HQC作为质控样品，净化液上机检测。测定结果请见表3。加标样品的准确度均在95.89-111.74%，平行样品的RSD% < 5%，准确度和重现性均满足测试要求，测试结果良好。

表3. 不同浓度标点重复进样3针RSD%

浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	平均值	RSD%	实测浓度 (ng/mL)	平均值	RSD%
0.2	0.213	0.201	6.46	0.202	0.196	6.51
	0.187			0.205		
	0.204			0.181		
0.5	0.508	0.477	5.72	0.525	0.518	1.44
	0.456			0.510		
	0.468			0.519		
1	1.110	1.047	9.78	1.102	1.021	7.02
	0.929			0.966		
	1.104			0.995		
5	5.483	5.454	4.48	5.224	5.208	4.99
	5.682			5.460		
	5.196			4.941		
10	10.089	9.807	2.62	9.455	9.847	5.11
	9.584			10.414		
	9.747			9.673		
20	19.294	19.649	2.67	18.744	19.311	2.66
	19.402			19.745		
	20.252			19.444		
50	49.250	48.823	1.57	51.018	50.842	0.87
	47.937			51.168		
	49.283			50.340		
100	97.985	96.218	1.59	96.759	95.426	1.61
	95.322			93.739		
	95.347			95.779		

表4. 3种不同添加浓度样本回收率表

化合物	质控点	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度平均值 (ng/mL)	相对标准偏差 RSD(%)	准确度 (%)
Semaglutide	LQC	2	2.235	2.92	111.74
	MQC	25	23.973	1.31	95.89
	HQC	75	75.550	2.60	100.73
Tirzepatide	LQC	2	2.069	1.80	103.45
	MQC	25	24.342	1.63	97.37
	HQC	75	76.927	0.49	102.57

符合法规要求的SCIEX OS软件

SCIEX OS软件是一个封闭系统，记录和签名以电子方式存储，符合21 CFR Part 11中列出的法规要求。SCIEX OS软件可以通过指定的处理工作站，从封闭网络内的任何可见存储位置打开原始数据文件。图5展示了SCIEX OS软件的特点，用于监控审计跟踪、执行采集、处理数据和配置用户访问。审计跟踪功能使用户能够监控高风险事件并评估数据完整性。中央管理员控制台(CAC)功能允许用户将采集和处理集中在一个平台上，以提高实验室的效率。使用配置模块，用户可以分配角色和访问管理员、方法开发人员、分析师和审核员。

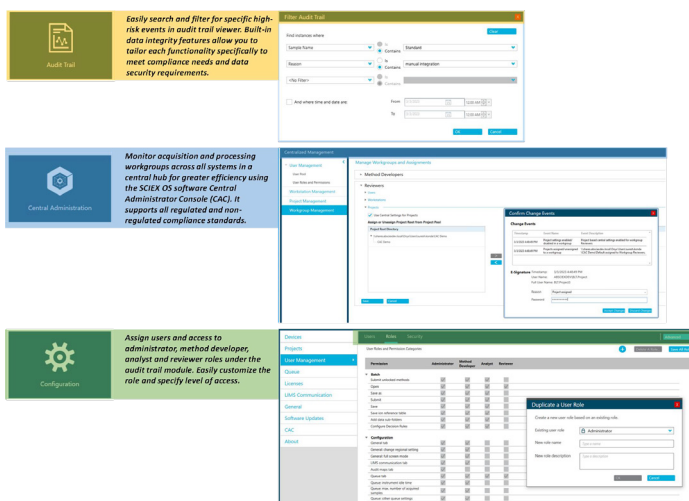


图5. SCIEX OS软件可用于监控审计跟踪、执行采集、处理数据和配置用户访问

总结

本文使用SCIEX LC-MS/MS系统建立了LC-MS/MS方法测定大鼠血浆中Semaglutide和Tirzepatide的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.2 ng/mL-100 ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.995；低、中、高浓度的QC加标准准确度以及重现性良好，满足方法学要求。

参考文献

1. Imma Forzano; Fahimeh Varzideh; Roberta Avvisato; Stanislovas S. Jankauskas; Pasquale Mone and Gaetano Santulli. Tirzepatide: A Systematic Update, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 14631.
2. Tae Suk Lee; Eun Ji Park; Minkyu Choi, etc. Novel LC-MS/MS analysis of the GLP-1 analog semaglutide with its application to pharmacokinetics and brain distribution studies in rats. Journal of Chromatography B 1221 (2023) 123688.
3. Low-ng/mL quantitation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog in rat plasma. SCIEX technical note.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15952-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)