

应用SCIEX Triple Quad™ 7500系统建立赖脯胰岛素的定量分析方法

To Develop Quantitative Analysis Method of Intact Insulin Lispro By SCIEX Triple Quad™ 7500 System

刘响, 罗继, 郭立海

Liu Xiang, Luo Ji, Guo Lihai

SCIEX应用技术中心, 中国

SCIEX, China

关键词: SCIEX Triple Quad™ 7500 system, Insulin lispro, Quantitative analysis

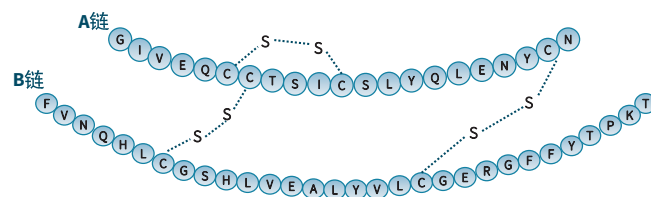
前言

胰岛素是由胰岛β细胞分泌的一种具有降血糖作用的多肽类物质。胰岛素是最早应用的多肽治疗药物之一, 多种长效和速效胰岛素类似物被开发出来, 作为控制糖尿病的处方用药。其中, 赖脯胰岛素是一种短效胰岛素类似物, 它比人胰岛素更容易吸收并且起效更快(图1)。传统的胰岛素等生物制剂的检测主要依靠免疫分析法, 例如ELISA或RIA。而LC-MS/MS方法相较于免疫分析法具有一定优势, 包括方法开发周期短、准确度高、特异性强^[1]。

本方法采用沉淀蛋白结合固相萃取的前处理方法, 通过SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中完整的赖脯胰岛素进行直接定量, 检测限(LOD)为25 pg/mL, 定量限(LLOQ)为50pg/mL, 特点如下:

- 1、使用SCIEX Triple Quad™ 7500系统, 能够实现快速分析、操作简单, 同时获得检测灵敏度高的LC-MS/MS方法。
- 2、采用沉淀蛋白结合固相萃取的前处理方法, 能够有效的实现对样品的净化, 与免疫亲和法相比, 方法开发周期短、开发成本低, 特异性强。
- 3、方法检测灵敏度高(LOD: 25 pg/mL; LLOQ: 50 pg/mL), 较宽的线性范围(50~50000 pg/mL)以及良好的定量重现性(RSD < 10%)。

人胰岛素



赖脯胰岛素

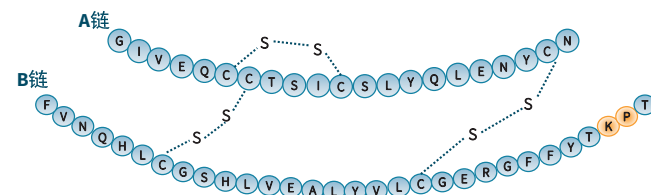


图1. 人胰岛素和赖脯胰岛素的氨基酸序列

实验方法

1. 样品制备

第1步: 蛋白沉淀(PPT)

200 μL 大鼠血浆中加入赖脯胰岛素(Insulin lispro)标准品浓度为50 ~ 50000 pg/mL, 并分别加入10 μL 内标溶液(胰岛素前体 IS-proinsulin, 2000 pg/mL), 涡旋混匀。加入200 μL含有1% 乙酸的甲醇/乙腈(1:1)混合液对样品进行沉淀, 13000 rpm离心10min。取上清 400 μL, 加入 900 μL 5% NH₃H₂O 水溶液, 使其

充分混合。

第2步：固相萃取（Phenomenex Strata™ -X-A microelution 96-well plate, 2mg/well）

活化：200 µL 甲醇

平衡：200 µL 水

上样：2 × 700 µL

淋洗1：200 µL 5% NH₃H₂O 水溶液

淋洗2：200 µL 5% 甲醇水溶液（含 1% 乙酸）

洗脱：2 × 30 µL 60:30:10 甲醇/水/乙酸

稀释：40 µL 水

2. 液相条件

液相：Exion LC 30AD™系统

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18（100 × 3 mm, 2.6 µm）

流动相：A：水（含0.2% 乙酸）

B：乙腈（含0.2% 乙酸）

流速：0.4 mL/min

柱温：50 °C

进样体积：20 µL

梯度洗脱，洗脱程序如表1：

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
2	50	50
4	10	90
5	10	90
5.1	90	10
8	90	10

3. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 7500系统

数据采集方法：MRM（多反应监测）

离子源：ESI源

离子源参数：

IS电压：2500 V

气帘气 CUR: 37 psi

碰撞气 CAD: 10

雾化气 GS1: 40 psi

辅助气 GS2: 50 psi

源温度 TEM: 450°C

多反应监测离子通道如表2：

表2. 赖脯胰岛素及内标物MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1 (m/z)	子离子 Q3 (m/z)	碰撞能量 CE (V)	碰撞池出口电压 CXP (V)
Insulin lispro	968.9	217.1	50	11
IS-proinsulin	994	219.1	45	14

实验结果

赖脯胰岛素与人胰岛素具有相同的分子量和几乎相同的氨基酸序列，而只有B链中C末端的两个氨基酸（K和P）交换位置（图1）。这使得赖脯胰岛素与人胰岛素的区分特别困难。区分赖脯胰岛素和人胰岛素的唯一标志性片段离子是B链的y₂离子。其他所有y离子的m/z值与人胰岛素相同。因此，将y₂离子作为定量离子，以使采集方法也适用于人体基质。

本实验采用沉淀蛋白结合固相萃取的前处理方法，通过SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中完整的赖脯胰岛素进行直接定量，检测限（LOD）为25 pg/mL，定量限（LLOQ）为50 pg/mL（图2）。赖脯胰岛素的回归方程和线性范围见图3，赖脯胰岛素在50~50000 pg/mL的浓度范围内线性良好。

为了考察方法的重现性及准确性，分别在大鼠血浆中制备以下低、中、高浓度的质量控制（QC）样品：100、500、20000 pg/mL，进行精密度和准确度方法验证。从表3可以看出，赖脯胰岛素低、中、高浓度的精密度（RSD）均在10%以内，准确度均在88-100%之内。

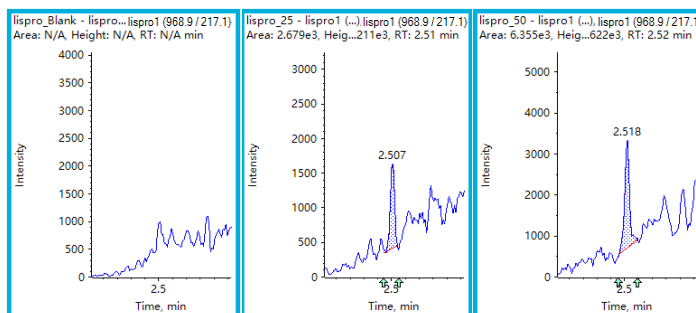


图2. 赖脯胰岛素的MRM离子对（968.9/217.1）在空白基质、25pg/mL和50 pg/mL大鼠血浆基质的提取离子流色谱图

Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
50.00	3 of 3	5.054e1	4.329e0	8.57	101.09
200.00	3 of 3	1.913e2	1.206e1	6.31	95.64
1000.00	3 of 3	9.900e2	1.187e2	11.99	99.00
5000.00	3 of 3	5.233e3	2.689e2	5.14	104.66
10000.00	3 of 3	1.014e4	3.881e2	3.83	101.43
50000.00	3 of 3	4.909e4	1.352e3	2.75	98.18

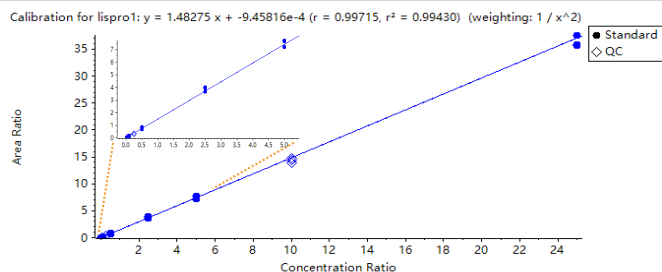


图3. 赖脯胰岛素MRM离子对 (968.9/217.1) 的线性方程和线性图谱, 线性范围50~50000 pg/mL, 线性相关系数 $r^2=0.99430$

表3. 赖脯胰岛素的质控样品 (QC) 的准确度和精密度

QC浓度 (pg/mL)	平均计算浓度 (pg/mL)	平均精密度 %	平均准确度 %
100	91.05	8.15	91.05
500	443.35	3.78	88.67
20000	19396	2.68	96.98

结论

本方法采用沉淀蛋白结合固相萃取的前处理方法, 通过 SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中完整的赖脯胰岛素进行直接定量。该LC-MS/MS检测方法灵敏度高, 检测限 (LOD) 达到 25 pg/mL, 定量限 (LLOQ) 为50 pg/mL; 方法的特异性好, 无干扰; 在50~50000 pg/mL的浓度范围内线性良好, 且具有较好的重现性和准确度 (RSD < 10%); 同时具有操作简单、快速分析的优点, 具有较高的分析通量, 为血浆基质中赖脯胰岛素的定量提供参考。

参考文献

1. Olga M Selivanova, Mariya Yu Suvorina, Alexey K Surin, Nikita V Dovidchenko, Oxana V Galzitskaya. Insulin and Lispro Insulin: What is Common and Different in their Behavior? Curr Protein Pept Sci. 2017;18(1):57-64.

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. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12382-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: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)