

血浆中多肽药物的测定

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

多肽是由多个氨基酸通过肽键连接而形成的一类化合物, 通常由10~100个氨基酸分子组成, 其连接方式与蛋白质相同, 相对分子质量低于10000。多肽普遍存在于生物体内, 迄今在生物体内发现的多肽已达数万种, 其广泛参与和调节机体内各系统、器官、组织和细胞的功能活动, 在生命活动中发挥重要作用。

关键词

多肽; Peptide-3-MW; Luna Omega Polar C18;
LC-MS/MS

化合物信息

表1. 化合物信息

名称	CAS号	分子量
血管紧张素I	70937-97-2	1296.48
奥曲肽	79517-01-4	1079.3
血管紧张素II	4474-91-3	1046.18
去氨加压素	62288-83-9	1129.28
加压素	11000-17-2	1056.22
神经加压素	145781-92-6	1269.41
戈舍瑞林	145781-92-6	1269.41
门冬胰岛素	116094-23-6	5824.60

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™5500), 配有电喷雾离子源(ESI);
孔正压装置(Agela Cleanert M96);
氮吹浓缩仪(Agela Cleanert V96)。

3.1.2试剂材料

96孔板: Peptide-3-MW
屈臣氏蒸馏水, 甲醇、甲酸、乙酸铵、乙腈、氨水均为色谱级。

3.1.3样品基质

EDTA抗凝大牛血浆

3.2样品前处理方法

预处理: 200 µL血浆加入200 µL甲醇涡旋, 加入200µL水涡旋, 8000g/5min 离心取上清, 待净化;

活化: 96孔板依次使用 200 µL甲醇、200 µL水活化;

上样: 加载预处理后的血浆至活化后微孔板;

淋洗: 依次使用500 µL水、200 µL水淋洗微孔板;

洗脱: 用100 µL洗脱液 (乙醇: 100mM乙酸铵水溶液=3:1) 洗脱2次, 涡旋混合;

氮干复溶: 37 °C氮气干燥20 min后, 加入150 µL水涡旋混合, 待检测。

3.3仪器检测条件

3.3.1色谱条件

色谱柱: Luna Omega Polar C18 (2.1×50 mm, 1.6 µm, 100 Å) ; P/N: 00B-4748-AN

流动相A相: 0.1%甲酸5 mM乙酸铵水溶液;

流动相B相: 0.1%甲酸乙腈溶液;

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样量: 10 µL;

梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
----------	-------------	-------



0	0.3	20
0.5	0.3	20
3.0	0.3	50
3.2	0.3	98
4.1	0.3	98
4.3	0.3	20
6.0	0.3	20

3.3.2 质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源（ESI+）
扫描方式：多反应监测正负离子模式（MRM）
喷雾针电压：5500 V
离子源温度：500 °C
加热器（GS1）：60 psi
辅助加热气（GS2）：60 psi
气帘气（CUR）：40 psi
碰撞气（CAD）：10 psi

为获得较好的稳定和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（DP）和碰撞电压（CE），目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均需经过系统优化。本案例参数仅供参考不具备法律效力。

表3. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
血管紧张素I	433.1	619.4	80	30
	433.1	647.6	80	24
奥曲肽	510.3	501.4	100	22
	510.3	872.5	100	25
血管紧张素II	524.0	619.4	120	38
	524.0	534.3	120	38
去氨加压素	535.4	328.3	100	30
	535.4	680.3	100	30
加压素	543.0	534.2	100	20
	543.0	328.3	100	30
神经加压素	558.6	643.5	100	33
	558.6	725.5	100	33
戈舍瑞林	635.6	607.4	100	24
	635.6	435.3	100	34
门冬胰岛素	1162.3	652.1	100	45
	968.8	354.3	100	50

3.4 结果与讨论

由表4可知，大部分肽类在该模式下的外标法回收率均在80%~120%之内，相对标准偏差RSD小于10%可以满足分析需求。

表4. 加标回收实验结果

化合物	外标法相对回收率 %	RSD % (n=5)
血管紧张素I	75.6	7.6
奥曲肽	83.5	6.3
血管紧张素II	93.0	8.6
去氨加压素	92.1	3.7
加压素	84.6	6.4
神经加压素	83.0	5.1
戈舍瑞林	96.3	3.7
门冬胰岛素	96.4	3.3

3.5 实验谱图

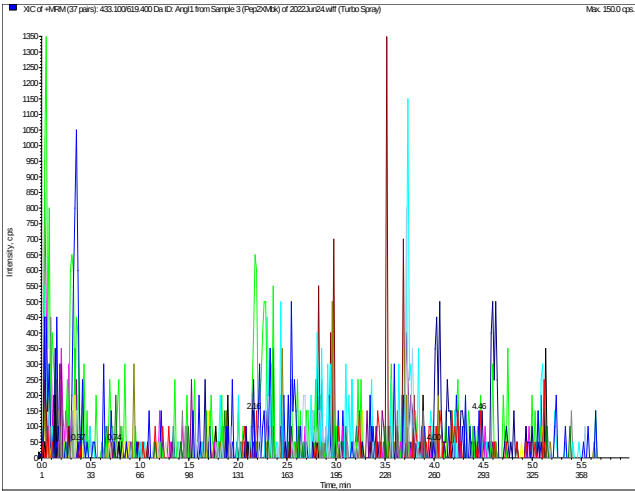


图1. 空白血浆总XIC色谱图

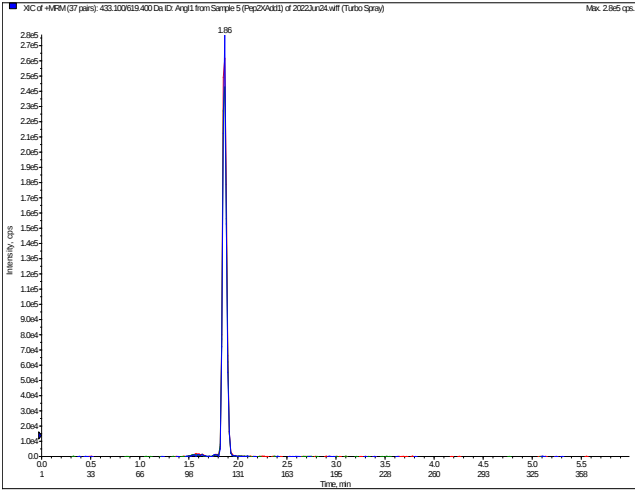


图2. 血管紧张素I 50ng/ml加标回收色谱图

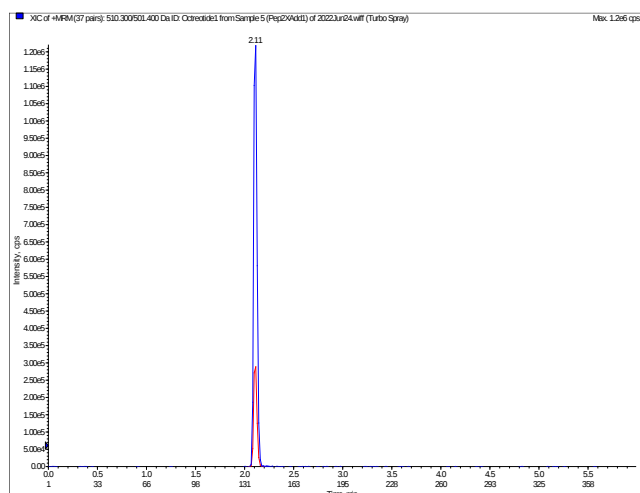


图3. 奥曲肽 50ng/ml加标回收色谱图

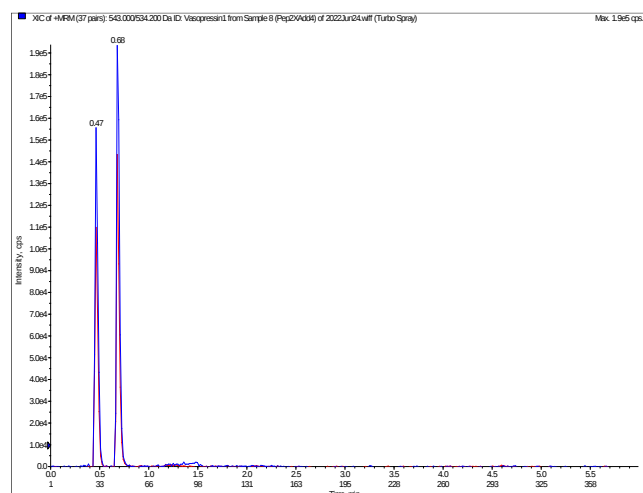


图6. 加压素 50ng/ml加标回收色谱图-0.47为干扰

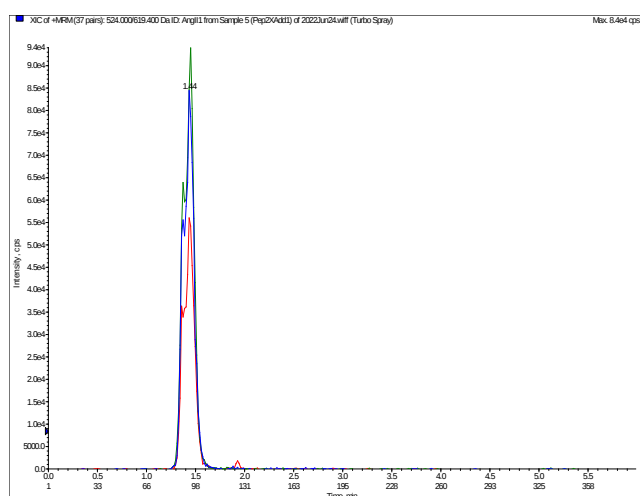


图4. 血管紧张素II 50ng/ml加标回收色谱图

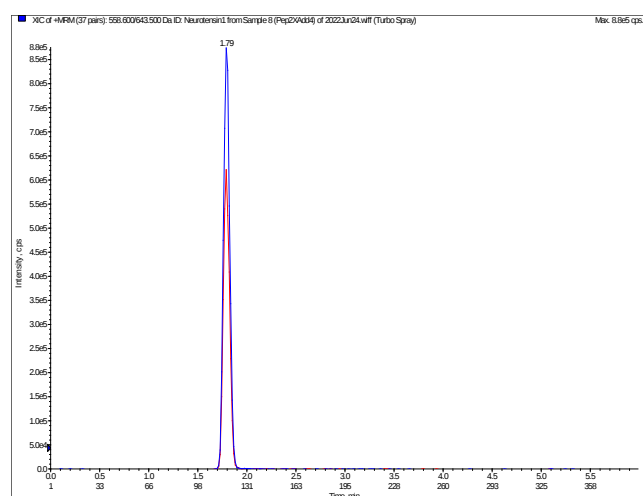


图7. 神经加压素 50ng/ml加标回收色谱图

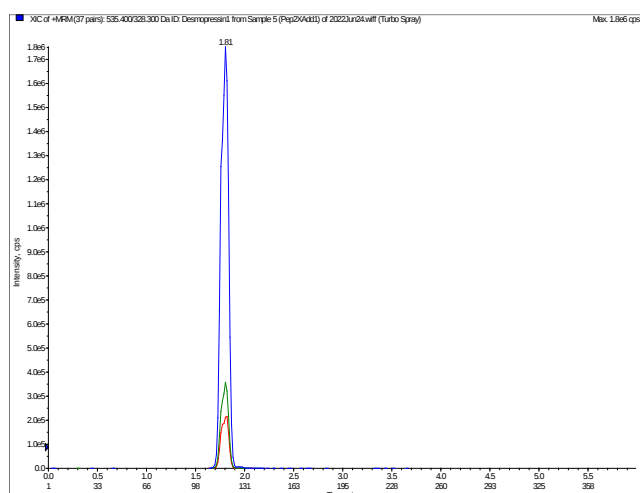


图5. 去氨加压素50ng/ml加标回收色谱图

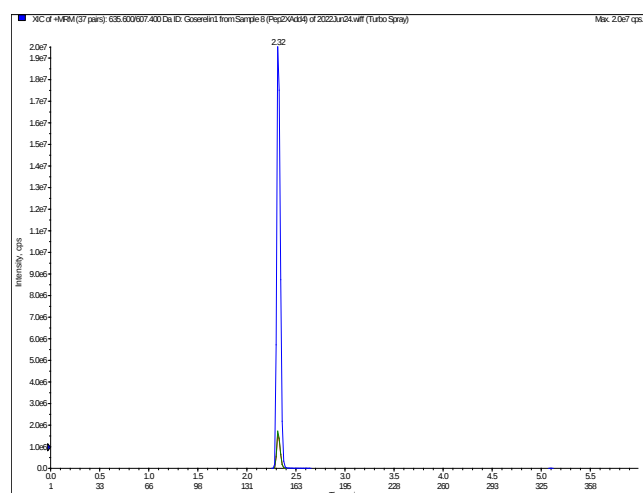


图8. 戈舍瑞林 50ng/ml加标回收色谱图



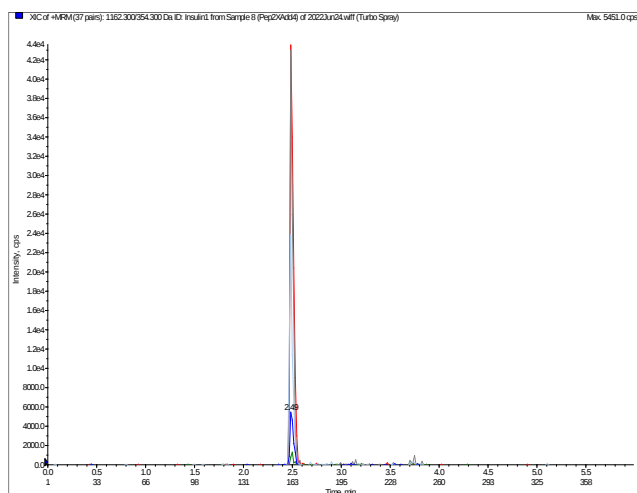


图9. 门冬胰岛素 50ng/ml加标回收色谱图

结论

本实验建立了血浆中小肽类药物的检测方法。



Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

