

# 糖尿病相关内源肽与胰岛素类药物的测定

王姣

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

糖尿病是全球最常见的代谢紊乱疾病, 目前我国患者位于全球第一<sup>[1]</sup>。糖尿病的发病原理<sup>[2]</sup>, 主要与胰岛功能, 特别是胰岛素抵抗 (IR) 和胰岛β细胞分泌功能减退有关。人体胰岛通过分泌胰岛素原, 经酶的分解而形成胰岛素和C肽, 测定血清**胰岛素**和血清**C肽**是评价胰岛功能的重要指标。与胰岛素的作用相反, **胰高血糖素**是一种反调节激素, 起着升高血糖的作用, 在糖尿病患者中, 胰高血糖素分泌可能不受控制, 一些治疗糖尿病的方法中可通过抑制胰高血糖素的分泌或作用, 以及胰高血糖素特异性靶向治疗<sup>[3]</sup>。**胰高血糖素样肽 (GLP-1)**由肠道细胞产生的一种激素, 它具有促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素的双重作用。因此, 对以上4种内源标志物的测定对糖尿病的病理诊断研究以及治疗具有重要意义。另外, 本文也同时建立了对血浆中4种胰岛素类似药物 (**赖脯胰岛素、门冬胰岛素、赖谷胰岛素、甘精胰岛素**) 的测定方法, 为精准合理用药提供科学依据。

## 关键词

糖尿病; 胰岛素; 多肽; Peptide-1-MW;  
Luna Omega Polar C18; LC-MS/MS

## 化合物信息

表1. 化合物信息

名称	英文名	分子量	结构式
重组人胰岛素	Human Insulin	5807.57	C <sub>257</sub> H <sub>383</sub> N <sub>65</sub> O <sub>77</sub> S <sub>6</sub>
C肽	C-Peptide	3030.26	C <sub>129</sub> H <sub>211</sub> N <sub>35</sub> O <sub>48</sub>
胰高血糖素	Glucagon(1-29)	3482.75	C <sub>153</sub> H <sub>225</sub> N <sub>43</sub> O <sub>49</sub> S
胰高血糖素样肽	GLP-1(1-37)	4169.48	C <sub>186</sub> H <sub>275</sub> N <sub>51</sub> O <sub>59</sub>
赖脯胰岛素	Lispro insulin	5808	C <sub>257</sub> H <sub>383</sub> N <sub>65</sub> O <sub>77</sub> S <sub>6</sub>
赖谷胰岛素	Glulisine insulin	5823	C <sub>258</sub> H <sub>384</sub> N <sub>64</sub> O <sub>78</sub> S <sub>6</sub>
门冬胰岛素	Aspart insulin	5826	C <sub>256</sub> H <sub>381</sub> N <sub>65</sub> O <sub>79</sub> S <sub>6</sub>
甘精胰岛素	Glargine insulin	6063	C <sub>267</sub> H <sub>404</sub> N <sub>72</sub> O <sub>78</sub> S <sub>6</sub>

## 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);  
96孔正压装置(Agela Cleanert M96);

#### 3.1.2 试剂材料

**96孔板: Peptide-1-MW (5mg/1mL/Well, 2ea/pk)**

屈臣氏蒸馏水, 乙腈、甲醇、甲酸、乙醇、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, 再加入200 μL 2%氨水水溶液, 涡旋, 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 μL0.5%FA水淋洗微孔板;

**洗脱:** 用50 μL洗脱液 (5%甲酸 乙醇: 水=4:1) 洗脱2次, 涡旋混合;

**稀释:** 再加入100 μL 5%FA水稀释涡旋混合, 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%甲酸水溶液;  
**流动相B相:** 0.1%甲酸乙腈溶液;  
**流速:** 0.4 mL/min;  
**柱温:** 50 °C;  
**进样量:** 20 µL;  
 梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
0	0.4	10
0.5	0.4	10
3.5	0.4	45
3.8	0.4	95
4.5	0.4	95
4.6	0.4	10
6.0	0.4	10

### 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):** 35 psi  
**辅助加热气 (GS2):** 70 psi  
**气帘气 (CUR):** 35 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
Human Insulin	1162.5	226*	120	56
	1162.5	345.4	120	60
C-Peptide	1007.7	1047.4*	120	30
	1007.7	533.5	120	33
Glucagon(1-29)	1007.7	927.6	120	36
	697.8	694.2*	120	22
	871.6	1040.3	120	40
GLP-1(1-37)	871.6	1002.4	120	43
	695.7	880.5	90	29
Lispro insulin	695.7	771*	90	26
	968.9	217.1*	120	50
Glargine insulin	1162.5	217.1	120	56
	1011.5	1008.5	120	40
Aspart insulin	867.2	965.4	120	32
	867.2	992.6*	120	30
	972	1110.9	120	36

	972	1133.8*	120	33
Glulisine insulin	1165.4	346.2*	120	36
	1165.4	227.3	120	42

### 3.4 结果与讨论

图1为4种内源标志物和4种胰岛素类药物标准曲线, 且由表4得出其检出限、线性范围和线性相关系数 $r^2$ , 在目前的条件下, 几种化合物检出限均可做到1ng/mL至以下, 在相应浓度范围内线性良好,  $r^2$ 均>0.995。

同时为考察方法的准确度和稳定性, 对血浆样本进行加标回收试验, 添加浓度1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL低中高三个梯度, 绝对回收基本均能满足70%以上, 且精密RSD满足10%以内 (表5)。

表4. 检出限和线性范围

化合物	LQD	相关系数 $r^2$	曲线范围
Human Insulin	1ng/mL	0.99887	1~500ng/mL
C-Peptide	1ng/mL	0.99501	1~200ng/mL
Glucagon(1-29)	0.1ng/mL	0.99988	0.1~500ng/mL
GLP-1(1-37)	1ng/mL	0.99914	1~500ng/mL
Lispro insulin	1ng/mL	0.99963	1~500ng/mL
Glargine insulin	1ng/mL	0.99996	1~500ng/mL
Aspart insulin	1ng/mL	0.99821	1~500ng/mL
Glulisine insulin	0.5ng/mL	0.99581	0.5~200ng/mL

表5. 加标回收实验结果

化合物	添加浓度ng/L	平均回收率%	RSD%
Human Insulin	1	89.7	1.1
	10	84.7	2.2
	100	78.1	5.0
C-Peptide	1	82.9	3.9
	10	88.6	5
	100	74.1	1.9
Glucagon(1-29)	1	76.7	5.1
	10	80.7	5.0
	100	84.5	5.6
GLP-1(1-37)	1	71.9	4.4
	10	71.0	3.8
	100	69.7	5.1
Lispro insulin	1	77.6	2.5
	10	77.3	1.6
	100	71.9	1.2
Glargine insulin	1	83.8	5.9
	10	78.6	2.2
	100	78.1	3.3
Aspart insulin	1	76.8	0.9
	10	76.0	5.7



	100	75.3	5.5
	1	73.3	6.2
Glulisine insulin	10	78.5	3.9
	100	76.0	8.3

### 3.5 实验谱图

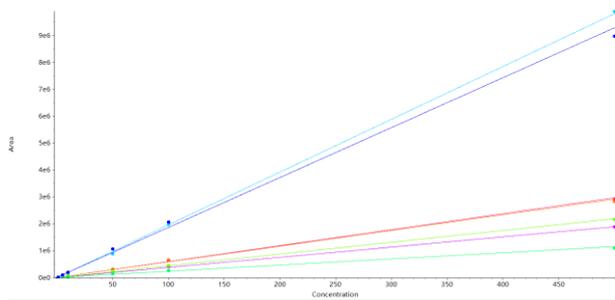


图1. 标准曲线

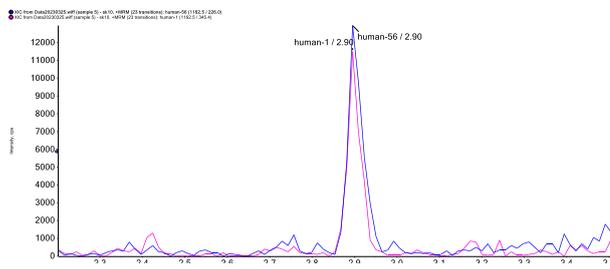


图2. Human Insulin 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

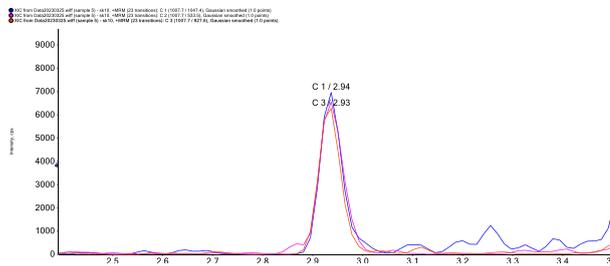


图3. C-Peptide 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

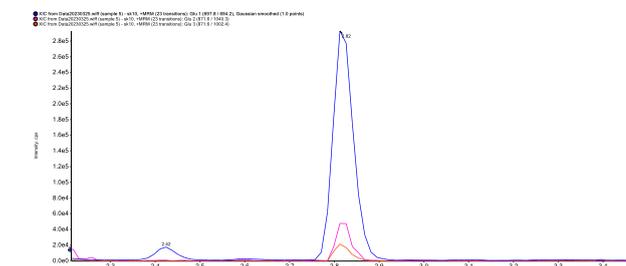


图4. Glucagon 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

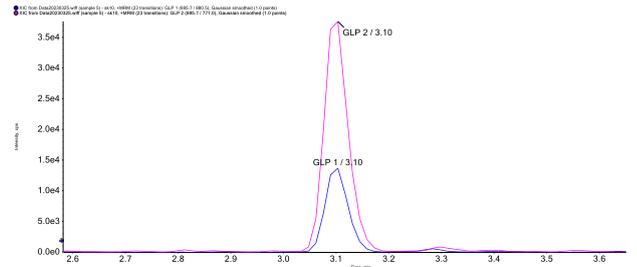


图5. GLP-1 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

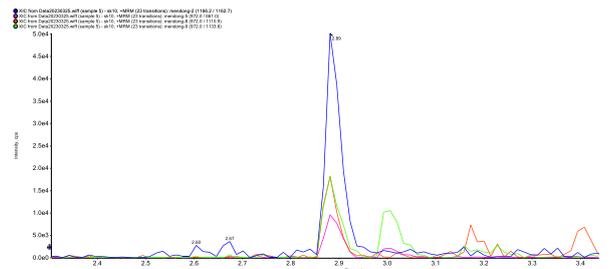


图6. Aspart insulin 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

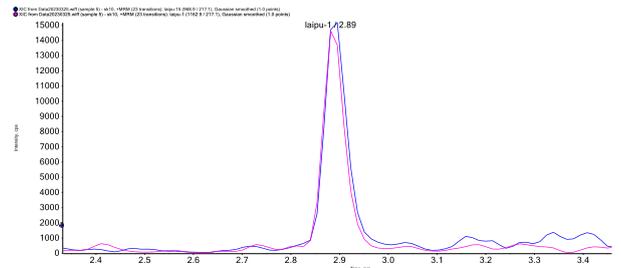


图7. Lispro insulin 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

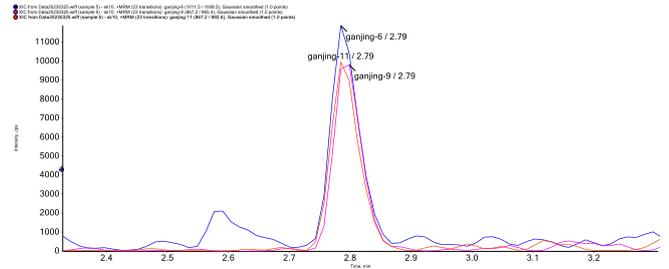


图8. Gargine insulin 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图

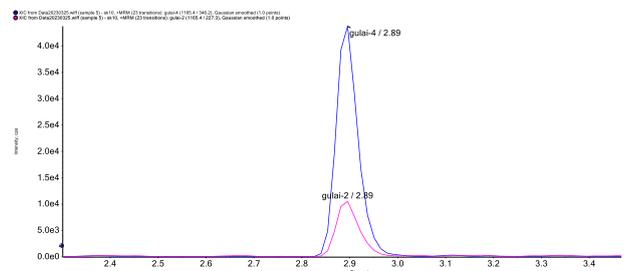


图9. Glulisine insulin 10 ng/mL血浆加标XIC提取色谱图



## 结论

本方法使用Agela自研的专门针对肽类测定的Peptide-1-MW96孔板，实现了同时对糖尿病相关8种内源标志物及血药浓度进行测定，各化合物在相应浓度范围内线性良好 $r^2 > 0.995$ ，绝对回收准确度可满足70%以上，精密度（10%以内）满足方法学要求。



## 参考文献

- 【1】刘武伟, 韩敏露等. 基于UPLC-MS技术筛选db/db小鼠血清和组织中的小分子2型糖尿病标志物. 现代生物医学进展[J]. 2021, 15: 2801-2807.
- 【2】李秀钧. 胰岛自身的胰岛素抵抗——2型糖尿病发病机理的新认识[J]. 国外医学内分泌学分册, 2004, 24(4): 264-265.
- 【3】张艳超. 糖尿病前期胰岛素和胰高血糖素检测的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(3): 516-519.



## 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!

phenomenex®