

基于TSQ平台的多肽药物特立帕肽的定量分析

邵宇皓, 黄敏 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

TSQ, 多肽药物, 特立帕肽, 定量分析

前言

多肽药物是介于大分子蛋白/抗体类药物和小分子药物之间的一类重要的药物分子, 因其生物活性高、靶向专一性高、选择性强、毒副作用低等优点而被广泛应用于疾病治疗领域^[1]。因为其的分子量大, 血浆浓度低, 前处理过程复杂等原因, 基于质谱技术的多肽药物定量一直是一个难点^[2,3]。

PTH 是甲状旁腺主细胞分泌的由 84 个氨基酸组成的多肽类激素, 其对于维持钙磷代谢的稳定起着至关重要的作用^[4]。特立帕肽 (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF, 4117.7Da) 是一种人工重组合成人PTH 1-34多肽, 是第一个被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的抗骨质疏松性骨折的骨合成药物^[5]。

TSQ Fortis, Quantis, Altis是赛默飞世尔科技在2017和2018年推出的全新一代三重四极杆质谱仪, 采用了增强型主动离子管控 (Active Ion Management, AIM⁺), 精密设计从Thermo Scientific OptaMax™ 离子源到增强型电子倍增器的离子管控、结合分段式双曲面四极杆以及增强型RF电子元件, 以进一步提升离子管控精度、可靠性、速度和重现性, 最终获得极限量性。本文在这三种仪器上建立了特立帕肽的定量分析方法, 结果表明新一代TSQ系列仪器对大分子多肽类药物良好的定量分析能力。

实验条件

样品配置:

称取特立帕肽粉末, 加水稀释成5mg/mL的标准品储备液。用含5%乙腈, 0.1 μg/μL BSA, 1% 甲酸的稀释剂, 逐级稀释特立帕肽标准品, 配置成标准曲线。

色谱条件:

液相系统为: Thermo Vanquish Flex, 色谱柱为Thermo Accu-core™ 150 C18 (50×2.1mm, 2.6μm, 货号16126-052130); 柱温: 45°C; 流动相及梯度系统程序见表1

Time(min)	A% (含0.1%FA的水)	B% (含0.1%乙腈)	流速 (mL/min)
0	85	15	0.3
0.5	85	15	0.3
3.3	2	98	0.3
4.8	2	98	0.3
5	85	15	0.3
7	5	15	0.3

表1 流动相参数

质谱条件: Thermo TSQ Fortis, Quantis, Altis的质谱参数见表2. 扫描模式: SRM。特立帕肽的监测离子对、RF-lens 电压以及碰撞能等参数见表3。

血浆样品前处理:

取150 μL的人空白血浆, 加入15μL的特立帕肽工作液, 震荡混匀。按体积比1:6加入含75%乙腈, 0.1%FA的沉淀剂后, 充分震荡。6500g离心5min, 取上清后, 40°C挥干。挥干样品用150 μL含10% ACN, 90%水, 1% FA的复溶剂复溶, 充分震荡, 14000g离心5min, 取上清, 上样5μL进行分析。

	Spray Voltage(kV)	Sheath Gas(Arb)	Aux Gas(Arb)	Ion transfer Temperature(°C)	Vaporizer Temperature(°C)	CID Gas (mTorr)
Foris	1.6	48	20	300	270	2.5
Quantis	3.5	50	24	325	300	2.5
Altis	3.5	35	16	300	350	2.5

表2 仪器质谱参数

	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy(V)	RF Lens(V)
Foris	687.2	787.1	18	126
Quantis	687.2	787.2	18.8	216
Altis	687.2	787.1	20	55

表3 离子对参数

数据分析:

所有数据分析均使用Thermo Scientific™ TraceFinder™ 软件完成。TraceFinder平台包含了仪器控制，方法开发，数据定性定量批处理等功能。可以快速完成TSQ系列仪器的数据定量分析。

实验结果

1、特立帕肽标准品在Fortis, Quantis, Altis上的线性与准确度。

用稀释剂（含0.1 µg/µL BSA, 1% FA, 5% ACN）的稀释剂逐级稀释特立帕肽标准品，配置成一系列浓度标准品，上样10µL进行分析。结果表明，Fortis对特立帕肽的定量下限为78pg/mL（图1），上柱约187 amol，标准曲线线性良好，R2=0.998，标准曲线各点回算的浓度在理论值的10%以内（表4）。

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	78.125	76.604	-1.95
2	156.25	142.565	-8.76
3	312.5	321.515	6.08
4	625	663.316	6.13
5	1250	1288.834	3.11
6	2500	2350.117	-6.00
7	5000	5068.924	1.38

表4 Fortis标曲回算精密度

特立帕肽标准品在Quantis上的标准曲线见图2。Quantis对特立帕肽标准品的定量下限为11.7 pg/mL，上样10µL，所以上柱量约为28 amol。标准曲线各点回算与标示值的差异在15%以内（表5），满足分析要求。

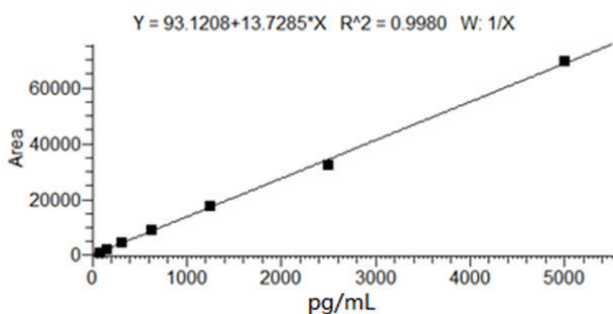


图1 特立帕肽在Fortis上的线性

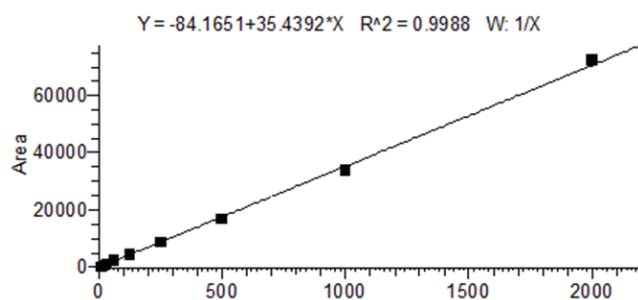


图2 特立帕肽在Quantis上的线性

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	11.719	12.466	6.4
2	23.438	22.030	-6.0
3	31.250	28.946	-7.4
4	62.500	70.875	13.4
5	125.000	122.075	-2.3
6	250.000	249.346	-0.3
7	500.000	487.364	-2.5
8	1000.000	963.828	-3.6
9	2000.000	2046.977	2.3

表5 Quantis标曲回算精密度

特立帕肽标准品在Altis上的标准曲线见图3。Quantis对特立帕肽标准品的定量下限为9.8 pg/mL，上样5μL，所以上柱量约为12 amol。LOQ与标示值得差异在20%以内，其他各点回算与标示值的差异在15%以内（表6），满足分析要求。

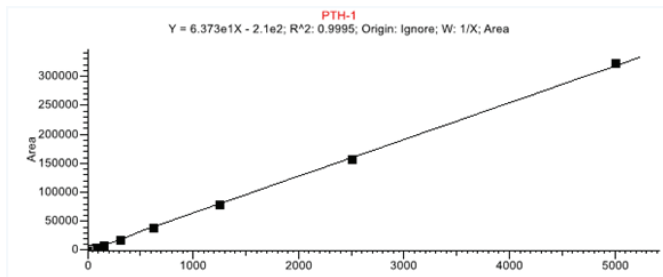


图3 特立帕肽在Altis上的标曲

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	9.766	11.68	19.6
2	19.531	18.541	-5.07
3	39.063	41.328	5.8
4	78.125	74.356	-4.82
5	156.25	146.013	-6.55
6	312.5	292.357	-6.45
7	625	604.106	-3.34
8	1250	1255.344	0.43
9	2500	2473.84	-1.05
10	5000	5072.669	1.45

表 6 Altis上标曲回算精密度

Fortis, Quantis, Altis上特立帕肽标准品LOQ的峰型见图4，各个LOQ下峰面积的重现性良好，三款仪器在低浓度点仍表现出良好的稳定性。同时Altis和Quantis上检测背景更低，信噪比更高，基质干扰更少，显示出更加的灵敏度。

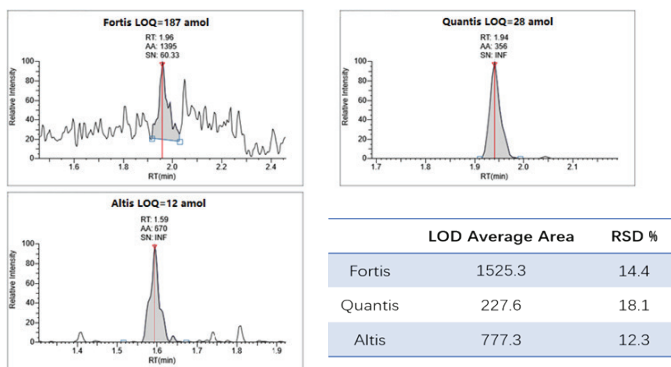


图 4 Fortis, Quantis, Altis上特立帕肽LOQ的峰面积和RSD %

2、特立帕肽血浆样品在Altis上的线性与准确度。

同时在Altis上考察了特例帕肽血浆样品的定量下限。取150 μL的空白人血浆，加入一系列浓度梯度的特立帕肽标准品，配置成血浆标曲，用1:6体积的75% 乙腈沉淀后，离心去上清，挥干，复溶后进样。

结果显示，Altis对于基质复杂的气浆样品仍表现出良好的线性（图5），精密度，稳定性。特立帕肽最低定量下限为24.pg/mL，线性范围24 pg/mL-3.1 ng/mL，上柱量约30 amol，标曲各点diff值<10%（表7）。

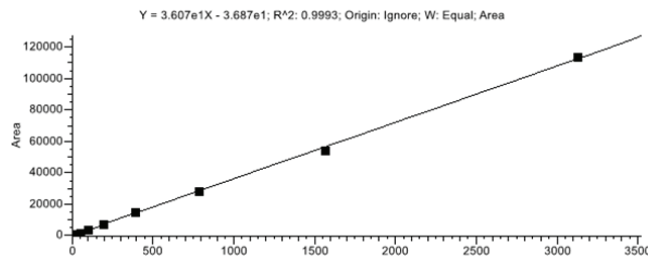


图5 特立帕肽的血浆标曲

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	24.414	25.689	5.22
2	48.828	51.209	4.88
3	97.656	104.478	6.99
4	195.313	195.85	0.27
5	390.625	413.669	5.9
6	781.25	783.248	0.26
7	1562.5	1497.734	-4.15
8	3125	3153.709	0.92

表7 血浆标曲回算精密度

结论

本文分别在Fortis, Quantis, Altis三重四级杆上建立了大分子多肽类药物特例帕肽的定量分析方法。结果表明，得益于增强型主动离子管控技术（AIM⁺），Fortis, Quantis, Altis对特立帕肽表现出良好的定量能力，定量下限可以分别达到上柱124 amol, 28 amol, 12 amol。同时，对于基质更为复杂的气浆样品，可以达到定量下限上柱30 amol，灵敏度满足临床上对特立帕肽的检测要求。

参考文献

- [1] Lau J L, Dunn M K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2018, 26(10): 2700-2707.
- [2] Kang L, Weng N, Jian W. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides[J]. Biomedical Chromatography, 2019: e4633.
- [3] Kay R G, Hands J T, Hawthorne G, et al. Validation of an ultrasensitive LC-MS/MS method for PTH 1-34 in porcine plasma to support a solid dose PK study[J]. Bioanalysis, 2015, 7(12): 1435-1445.
- [4] Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review[J]. Clinical therapeutics, 2004, 26(6): 841-854.
- [5] Berg C, Neumeyer K, Kirkpatrick P. Teriparatide[J]. 2003.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC