

# 大鼠血浆中完整赖脯胰岛素超灵敏的定量方法

## 配置SCIEX OS软件的SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP® Ready

Lei Xiong<sup>1</sup>, Ian Moore<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, USA; <sup>2</sup> SCIEX, Canada

胰岛素类似物是通过在天然胰岛素结构基础上进行改造，形成等效或增效血糖控制的胰岛素替代物。它们中的膳食胰岛素类似物，如赖脯胰岛素、阿斯巴甜胰岛素、格列嗪胰岛素，与人胰岛素相比更容易吸收、起效更迅速（图1），因此研究此类胰岛素类似物的药代动力学和药效学属性至关重要。然而，开发灵敏的液质联用方法，并在基质中定量分析仍然颇具挑战，原因是：1）分子量相对较大导致离子化和碰撞诱导解离碎片化效率较低；2）基质中含量较低；3）天然的胰岛素会造成内源性干扰。

在本项研究中，我们基于SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP Ready开发了在大鼠血浆中完整赖脯人胰岛素灵敏的定量检测方案。配置OptiFlow™ Pro离子源的SCIEX 7500系统采用D Jet™离子导向技术，使得对于完整胰岛素类似物的检测灵敏度显著提高。此系统增强了去溶剂化作用和离子聚焦能力，也是实现仪器灵敏度乃至多反应监测模式（Multiple Reaction Monitoring, MRM）定量灵敏度提高的关键因素。不需经过样本富集，在大鼠血浆中赖脯人胰岛素的定量限为0.1 ng/mL，分析重现性、准确度、定量线性良好。



### 完整赖脯人胰岛素定量检测流程的主要特点

- 通过关键硬件设备的引入：配置OptiFlow Pro离子源的SCIEX 7500系统采用D Jet离子导向和E Lens™技术，提高离子的产生、捕获、传输的效率以实现SCIEX Triple Quad 7500 LC-MS/MS系统 - QTRAP Ready的检测灵敏度的提高。<sup>1</sup>
- 简单的样品前处理策略，不需要样品富集步骤。
- 在大鼠血浆中赖脯人胰岛素定量限为0.1 ng/mL，重现性好
- 在标准曲线定量范围内良好的分析重现性、精确度、准确性、定量线性
- SCIEX OS软件 - 集合数据采集、处理、管理于一体，合规功能于一体、可定制、简单易用

### 实验方法

**样品前处理：**在大鼠血浆中加入赖脯人胰岛素和牛胰岛素（内标）。通过连续稀释配制标准曲线。样品经过蛋白沉淀，取上清液过混合型固相萃取小柱处理。洗脱液用纯水稀释后直接进行液质联用分析。



图1. 赖脯人胰岛素和人胰岛素的氨基酸序列。序列的差异用绿色进行标注。

**液质联用分析条件：**样品通过ExionLC™串联SCIEX Triple Quad™ 7500系统 - QTRAP® Ready，进行三次平行分析。详尽方法列于表1和2。

**数据处理：**数据通过SCIEX OS 软件2.0中的定量功能（点击“Analytics”）进行处理。

表1. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	Phenomenex bioZen Peptide XB-C18 50 × 2.1 mm; 2.6 μm
流动相A	含0.1%甲酸的水
流动相B	含0.1%甲酸的乙腈
流速	500 μL/min
柱温	40 °C
进样体积	10 μL

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	95	5
0.1	95	5
5	60	40
5.1	10	90
6.0	10	90
6.1	95	5
7.0	95	5

表2. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	40 psi	源温度	450 °C
雾化气	70 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	12	离子喷雾电压	2000 V

名称	Q1	Q3	碰撞能量	碰撞池出口电压
赖脯人胰岛素	1162	217.1	46	18
牛胰岛素	956.4	1114.8	31	18

## 赖脯人胰岛素定量结果

SCIEX Triple Quad™ 7500系统 - QTRAP® Ready通过创新的硬件设计实现仪器检测灵敏度的提高。首先是OptiFlow Pro离子源和E Lens技术。<sup>1</sup>E Lens技术在ESI喷嘴处形成更强的电场，提升了离子从带电液滴中释放的效率，并使更多的离子偏转进入孔口以提升检测灵敏度。

其次是D Jet离子导向技术的引入，可以提高在高真空环境中离子的捕获和传输效率。锥形渐缩设计的十二极杆有效地将离子聚焦进入下一级的QJet™离子导向。

通过这些技术的整合使得SCIEX 7500系统与之前的产品相比，灵敏度有显著的提升。胰岛素标准曲线的分析在SCIEX 7500系统（图2）。

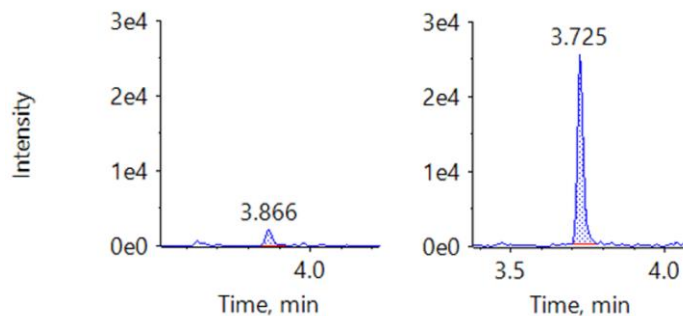


图2. SCIEX 7500系统灵敏度的提升。SCIEX 7500系统（右）检测赖脯人胰岛素在1 ng/mL水平的MRM 提取离子流图。

赖脯人胰岛素与人胰岛素有几乎一致的氨基酸序列，仅仅是B链C端两个氨基酸调换了位置（图1）。这使得赖脯人胰岛素和人胰岛素的区分变得相当困难。区分赖脯胰岛素和人胰岛素的特征性碎片离子仅有B链的y<sub>2</sub>离子。所有其他的y离子与人胰岛素产生的质荷比均相同。因此，y<sub>2</sub>离子被用做在人源基质分析时的定量离子。如图3、图4和图5所示，在大鼠血浆中完整赖脯人胰岛素的定量下限为0.1 ng/mL，在整个线性定量范围（0.1-100 ng/mL）内重现性差异小（CV<13%），准确度高（87-111%）。100 ng/mL为此样品配制的最高浓度，但由于100 ng/mL并未出现信号饱和，故定量上限可能不止于此。

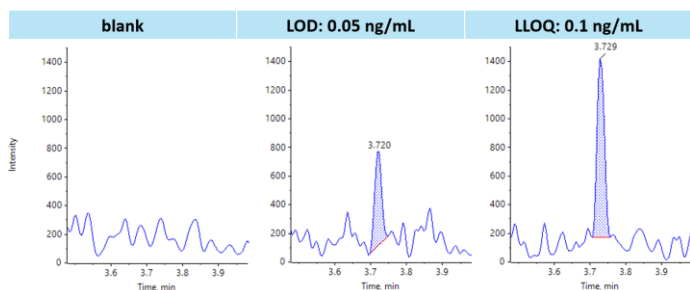


图3. 大鼠血浆中典型的赖脯人胰岛素 MRM提取离子流图。从左到右：基质空白、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL

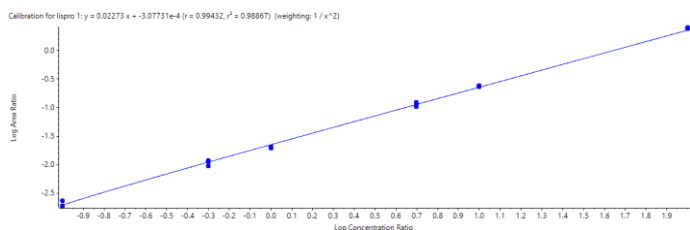


图4. 大鼠血浆中赖脯人胰岛素0.1 - 100 ng/mL的标准曲线 (log-log)

Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
0.10	3 of 3	1.018e-1	1.254e-2	12.32	101.76
0.50	3 of 3	4.875e-1	6.202e-2	12.72	97.50
1.00	3 of 3	8.711e-1	4.447e-2	5.11	87.11
5.00	3 of 3	4.940e0	4.156e-1	8.41	98.80
10.00	3 of 3	1.045e1	3.062e-1	2.93	104.51
100.00	3 of 3	1.103e2	4.482e0	4.06	110.32

图5. 大鼠血浆中赖脯人胰岛素定量信息总结

## 结论

- 建立了基于SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MSMS系统 - QTRAP® Ready检测大鼠血浆中赖脯人胰岛素MRM定量方法，该方法灵敏度高。
- 赖脯人胰岛素在大鼠血浆中的定量下限为0.1 ng/mL，该方法分析重现性、准确度、定量线性良好。
- SCIEX 7500系统有超高的灵敏度，得益于其配有E Lens技术加持的OptiFlow Pro离子源和D Jet离子导向技术。

## 参考文献

- Enabling new levels of quantification. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11886-A.
- Improved LC-MRM quantification sensitivity for cyclic peptides from the natriuretic peptide family. SCIEX technical note RUO-MKT-02-11883-A.

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11884-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](http://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)