

破解 GLP-1 多肽吸附难

Frontier 生物惰性液相-质谱联用多肽药物分析方案

前言：多肽是由多个氨基酸通过肽键连接形成的化合物。一般指 2-100 个氨基酸缩合而成，分子量大致 200-10000 Da。以司美格鲁肽和替尔泊肽为代表的长链多肽，作为新一代治疗糖尿病的药物，不仅可以有效刺激体内胰岛素的释放，控制血糖水平，还可以抑制肠胃蠕动，控制食欲。它们在降糖，减重等方面表现出了良好的临床优势。这类 GLP-1 类药物其口服利用度非常低，需要高灵敏度高选择性的分析方法，通常采用高效液相色谱串联质谱法进行定性定量检测。而由于其分子量大、多条肽键、含大量疏水氨基酸并同时带电荷，极易吸附残留。LC-MS 上表现为进空白溶剂仍出峰、交叉污染和峰保留时间逐步漂移等现象。针对多肽类药物在色谱端残留大的问题，科诺美现推出 Frontier 生物惰性超高效液相色谱系统（Frontier Bio Inert LC），该系统与质谱仪联用，可以大大减少乃至消除非特异性吸附，有效提高检测精准度；无需钝化处理系统，提高仪器使用效率，为多肽类药物测定提供优质解决方案。

一、仪器

Frontier Bio Inert LC 联用 SCIEX 5500+ MS/MS



二、色谱条件

液相方法:

色谱柱: ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 2.1*100 mm 1.7 μ m

流动相: A: 水 (含 0.1%甲酸); B: 乙腈 (含 0.1%甲酸)

梯度洗脱: 0.01-0.5min, 30%B; 0.5-3.0min, 30%B-65%B; 3.0-3.5min, 65%B;

3.5-4.0min, 65%B-98%B; 4.0-5.5min, 98%B。

流速: 0.3mL/min

柱温: 65°C

进样量: 5 μ L

质谱方法:

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI 正模式

气帘气 CUR: 35psi

IS 电压: 5500V

源温度 TEM: 450°C

雾化气 GS1: 60psi

辅助气 GS2: 60psi

碰撞气 CAD: high

表 1 Semaglutide 和 Tirzepatide 的 MRM 离子对信息

Compound ID	Q1 mass	Q3 mass	DP	CE
Semaglutide-1	1029.3	1238.5	40	41
Semaglutide-2	1029.3	1110.3	40	39
Tirzepatide-1	1204.2	396.3	67	36
Tirzepatide-2	1204.2	910.0	67	33

三、溶液配制



混合标准储备液：分别称取适量司美格鲁肽和替尔泊肽标准物质用 50%乙腈水配制成 1mg/mL 的混合标准溶液。

混合标准工作液：将上述标准储备液用 50%乙腈水稀释成浓度为 1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL 的混合标准工作液，现配现用。

四、实验结果

Carryover 测试结果对比

按照空白-500ng/mL-空白 1-空白 2 的进样顺序编辑序列，运行结束后根据目标峰的峰面积计算 500ng/mL 浓度之后的第一针和第二针空白的残留水平，结果如表 2 所示。生物惰性仪器 500ng/mL 后空白 1 残留%比普通 Frontier 残留减少约 57%。

表 2 普通 Frontier 和生物惰性 Frontier Bio Inert 仪器残留对比表（以峰面积计算）

仪器	普通 Frontier LC + SCIEX 5500+ MS/MS		生物惰性 Frontier Bio Inert LC + SCIEX 5500+ MS/MS	
	第 1 组	第 2 组	第 1 组	第 2 组
化合物	Semaglutide	Semaglutide	Semaglutide	Semaglutide
500ng/mL 后空白 1 残留%	0.55%	0.63%	0.26%	0.24%
500ng/mL 后空白 2 残留%	0.16%	0.18%	0.08%	0.07%

Bio inert 系统新增多种自动进样器清洗方式，更适配易残留的多肽检测，通过增加针清洗和阀清洗等方式残留可降至 0.1%以内。

表 3 生物惰性 Frontier Bio Inert 不同进样器清洗程序仪器残留对比表（以峰面积计算）



清洗程序	默认方法				方法优化后（增加针清洗与阀清洗）			
序号	第 1 组		第 2 组		第 1 组		第 2 组	
化合物	Semaglutide	Tirzepatide	Semaglutide	Tirzepatide	Semaglutide	Tirzepatide	Semaglutide	Tirzepatide
500ng/mL 后 空白 1 残留%	0.26%	0.19%	0.24%	0.20%	0.04%	0.08%	0.03%	0.04%
500ng/mL 后 空白 2 残留%	0.08%	0.05%	0.07%	0.05%	N/A	N/A	N/A	N/A

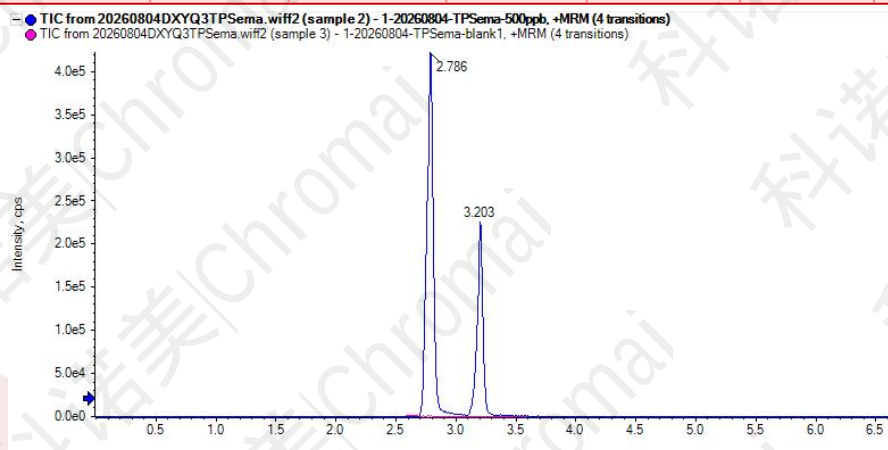


图 1 线性最高点浓度 500ng/mL 司美格鲁肽和替尔泊肽总离子流图 (TIC)

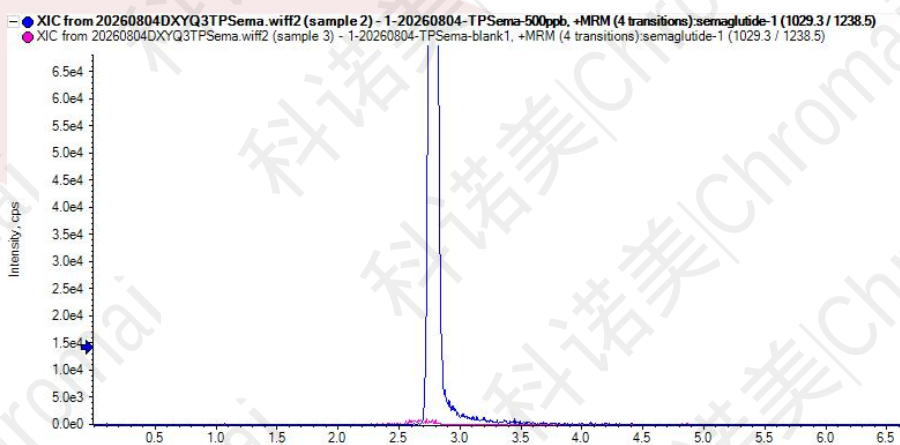


图 2 司美格鲁肽 500ng/mL 以及空白 1 残留叠加图



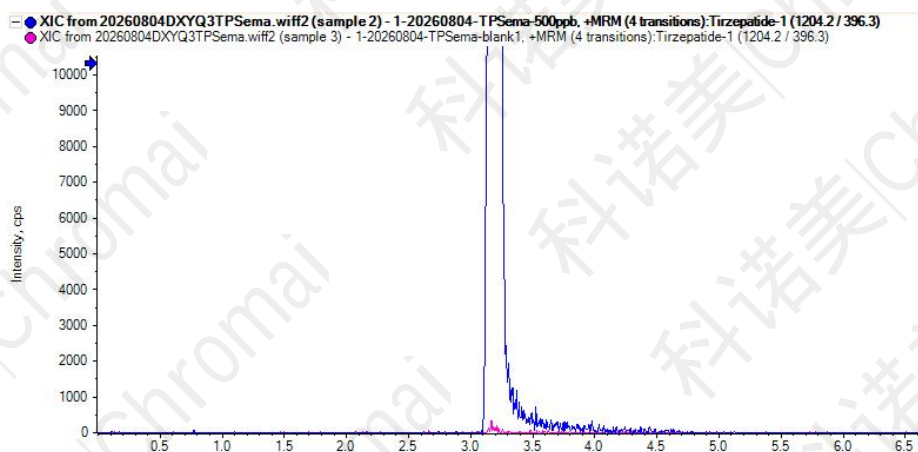


图 3 替尔泊肽 500ng/mL 以及空白 1 残留叠加图

2. 线性

将司美格鲁肽和替尔泊肽混合标准工作液 1.0ng/mL, 5.0ng/mL, 10.0ng/mL, 50.0ng/mL, 100.0ng/mL, 200ng/mL, 500ng/mL 分别进样分析。司美格鲁肽和替尔泊肽线性结果如图 4 所示, 在 1.0ng/mL~500ng/mL 范围内线性良好, r^2 均大于 0.999。

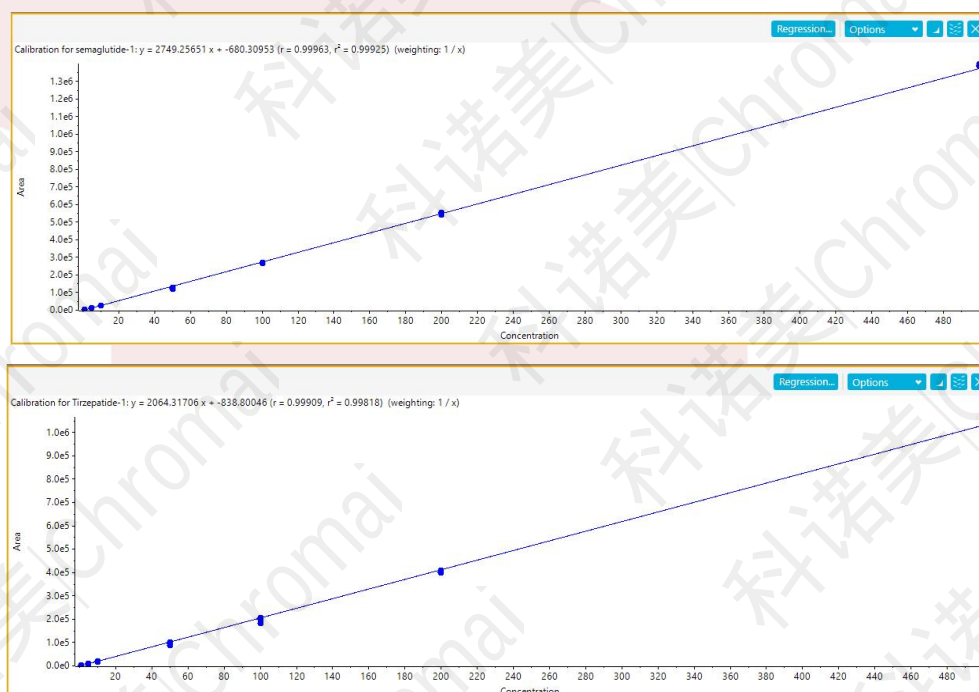


图 4 Semaglutide 和 Tirzepatide 的标准曲线结果



3.重现性

将 100ng/mL 的样品连续进样 6 次进行重复性考察。保留时间重复性在 0.07%-0.09%

之间，峰面积重复性在 1.24%-1.80%之间，结果如图 5 和图 6 所示。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Component Group	Actual Concentration	Expected RT	Area	Height	Retention Time	U...	Calculated Concentration	Accuracy
99	20260803-TPSema-100ppb-1	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.648e5	4.332e4	2.71	☒	9.840e1	98.40
103	20260803-TPSema-100ppb-2	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.650e5	4.324e4	2.70	☒	9.902e1	99.02
107	20260803-TPSema-100ppb-3	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.642e5	4.108e4	2.71	☒	9.803e1	98.03
111	20260803-TPSema-100ppb-4	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.632e5	4.335e4	2.70	☒	9.745e1	97.45
115	20260803-TPSema-100ppb-5	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.650e5	4.392e4	2.70	☒	9.851e1	98.51
119	20260803-TPSema-100ppb-6	Quality Control	semaglutide-1	Qualifiers	Group 1	100.00	2.70	1.691e5	4.497e4	2.71	☒	1.010e2	100.97

Row	Component ...	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	semaglutide-1	20260803-TPSema-10...	6 of 6	2.71	0.00	0.07	2.71	2.70	2.71	2.70	2.70	2.71

Row	Component ...	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	semaglutide-1	20260803-TPSema-10...	6 of 6	1.653e5	2.043e3	1.24	1.648e5	1.658e5	1.642e5	1.632e5	1.650e5	1.691e5

图 5 司美格鲁肽 100ng/mL 连续 6 针重复性结果表

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Component Group	Actual Concentration	Expected RT	Area	Height	Retention Time	U...	Calculated Concentration	Accuracy
97	20260803-TPSema-100ppb-1	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.209e5	3.270e4	3.13	☒	9.385e1	93.85
101	20260803-TPSema-100ppb-2	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.198e5	2.985e4	3.13	☒	9.299e1	92.99
105	20260803-TPSema-100ppb-3	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.230e5	3.402e4	3.13	☒	9.552e1	95.52
109	20260803-TPSema-100ppb-4	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.258e5	3.408e4	3.13	☒	9.765e1	97.65
113	20260803-TPSema-100ppb-5	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.238e5	3.407e4	3.13	☒	9.608e1	96.08
117	20260803-TPSema-100ppb-6	Quality Control	Tirzepatide-1	Quantifiers	Group 1	100.00	3.12	1.212e5	3.445e4	3.13	☒	9.411e1	94.11

Row	Component ...	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Tirzepatide-1	20260803-TPSema-10...	6 of 6	3.13	0.00	0.09	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13

Row	Component ...	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Tirzepatide-1	20260803-TPSema-10...	6 of 6	1.224e5	2.205e3	1.80	1.209e5	1.198e5	1.230e5	1.258e5	1.238e5	1.212e5

图 6 替尔泊肽 100ng/mL 连续 6 针重复性结果表

结论:本方案采用科诺美 Frontier 生物惰性超高效液相色谱系统 (Frontier Bio Inert LC),

该系统与质谱仪联用, 采用新的自动进样器清洗方式, 可以有效减少乃至消除非特异性吸

附, 线性最高点 500ng/mL 后空白残留在 0.1%以内, 在浓度范围 1ng/mL-500ng/mL

内线性良好, 线性相关系数大于 0.999, 重复性好, 满足多肽类药物的测定要求。

