

HPLC-Q TOF MS 法同时测定 4 种 GLP-1 类多肽及 4 种小分子减肥类添加物

凌明, 舒展*, 金琴, 王琤帅

(金华市食品药品检验检测研究院, 金华 321000)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q TOF MS)同时测定 4 种减肥类小分子及 4 种胰高血糖素样肽-1(GLP-1)多肽类非法添加物的分析方法。**方法:** 样品以 50% 乙腈为提取溶剂进行超声提取, 离心后取上清液, 采用 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×3.0 mm, 2.7 μm)进行分离, 以乙腈(0.1% 甲酸)和水(0.1% 甲酸)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C。采用正离子全扫描及目标离子二级碎片扫描方式, 碎裂电压 150 V。其中一级质谱扫描范围为 *m/z* 100~3 200, 二级质谱扫描范围为 *m/z* 50~3 200, 扫描速度均为每秒 1 张质谱图。根据对照品的色谱保留时间、一级质谱和二级质谱信息建立数据谱库, 通过数据库比对进行结构的确认。**结果:** 多肽类物质定性筛查的检测限为 0.5 μg·mL⁻¹, 其他小分子物质为 0.05 μg·mL⁻¹。在全扫描模式下, 8 个化合物线性相关系数均 > 0.995, 回收率范围为 79.4%~115.8%, RSD 范围为 0.21%~9.7%。采用本方法对 20 批减肥类样品进行检测, 其中 1 批样品中检出西布曲明, 4 批样品中检出司美格鲁肽。**结论:** 本方法扩大了国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批件 2012005 的筛查范围, 能同时兼顾小分子物质和大分子多肽类物质(相对分子质量 < 5 000)检测的需要, 具有高效、准确的特点。

关键词: 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法; 减肥类非法添加药物; 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂(GLP-1 RA); 多肽类物质; 裂解规律

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)02-0280-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0327

Simultaneous analysis of 4 GLP-1 peptide additives and 4 small molecule illegal anti-obesity drugs by HPLC-Q TOF MS

LING Ming, SHU Zhan*, JIN Qin, WANG Cheng-Shuai

(Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China)

Abstract Objective: To establish a high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q TOF MS) method for the simultaneous analysis of illegal 4 anti-obesity small molecule drugs and 4 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) peptide additives. **Methods:** The samples were extracted by ultrasound using 50% acetonitrile as the extraction solvent. After centrifugation, the supernatant was taken and

* 通信作者 Tel:(0579)82301374; E-mail: 185161587@163.com

第一作者 Tel:(0579)82301374; E-mail: 78398627@qq.com

separated using an Agilent EC-C₁₈ chromatographic column (150 mm × 3.0 mm, 2.7 μm). Acetonitrile (0.1% formic acid) and water (0.1% formic acid) were used as mobile phases, with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹ and column temperature of 40 °C. Adopting positive ion full scanning and target ion secondary fragment scanning methods, with a fragmentation voltage of 150 V. The scanning range of the primary mass spectrometry was *m/z* 100–3 200, and the scanning range of the secondary mass spectrometry was *m/z* 50–3 200, with a scanning speed of 1 mass spectrum per second. Establish a data spectral library based on the chromatographic retention time, primary mass spectrometry, and secondary mass spectrometry information of the reference standard, and confirmed the structure through database comparison. **Results:** The screening detection limit for peptides was 0.5 μg · mL⁻¹, while small molecular drugs was 0.05 μg · mL⁻¹. The recoveries were in the range of 79.4% to 115.8%, with the relative standard deviations of 0.21% to 9.7%. Using this method, 20 batches of anti-obesity drugs were tested, in which semaglutide was identified in 4 samples and sibutramine was identified in 1 batch. **Conclusion:** Compared with the complementary method No. 2012005 by the China Food and Drug Administration, the method established in this study can simultaneously analyze small and large molecules (the relative molecular mass < 5 000), featuring high efficiency and accuracy.

Keywords: HPLC-Q TOF MS; illegally added anti-obesity drugs; glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP-1 RA); peptides; fragmentation pattern

近年来,以司美格鲁肽为代表的胰高血糖素样肽-1受体激动剂(GLP-1 RA)显示出了显著的减肥疗效^[1]。部分不法分子将其非法添加至冻干粉针中,以“绿色天然”为口号,声称能够实现“减肥”的效果,从而牟取暴利。GLP-1类药物在我国获批的适应症主要为2型糖尿病或者是肥胖、超重并至少伴有一种体重相关的合并症。消费者在不知情的情况下超适应症使用,可能会发生严重的肠胃道反应,甚至会有癌症的风险^[2]。更为严重的是,非法添加药物的生产过程不可控,这大大增加了潜在的风险^[3]。

目前,对于减肥类非法添加物筛查的主要标准是《国家食品药品监督管理局补充检验方法和检验项目批件2012005》规定的酚酞、西布曲明等小分子物质的检查方法,当前的研究也主要集中在扩大小分子物质的筛查谱^[4-5],缺少GLP-1 RA的检验标准。对此类物质的筛查方法研究也较少,仅在临床医学及药代动力学领域有相应的检测方法研究^[6-7]。

从结构上来看,GLP-1 RA主要通过改变天然氨基酸序列和引入脂肪酸侧链改造而来^[8-9],二者分别以艾塞那肽和司美格鲁肽为代表。此类物质相对分子质量介于小分子化学药物和蛋白质药物之间,包含了30~40个氨基酸,相对分子质量在3 000~5 000,属于多肽类物质^[10]。多肽类物质的分析方

法主要包括HPLC法^[11]、核磁共振法^[12]、液质联用法^[13-14]等。其中,液相色谱联用高分辨质谱具有高精度和高选择性^[13],故而在多肽类物质的分析中引起了越来越多的重视,其分析策略主要包括“自下而上”和“自上而下”2种。“自下而上”法利用蛋白酶将多肽水解为8~15个氨基酸的小肽,通过分析小肽进行结构的确认^[15];而高分辨质谱的发展使得利用串联质谱对多肽乃至蛋白质类物质的全序列分析变得可能,因此产生了“自上而下”的分析策略,先进行完整的质量数分析,再通过碎片离子对序列结构进行确认^[16],这种方法与小分子化合物的分析策略比较相似,因而可将筛查范围从小分子物质扩充到大分子多肽物质上。

本文利用“自上而下”的分析策略,利用HPLC-Q TOF MS建立了多肽及小分子减肥类非法添加物的数据库及其靶向分析方法,同时通过裂解规律的研究,提供了此类物质结构确认的解析流程及非靶向筛查的可能,扩充了减肥类非法添加物的筛查范围(相对分子质量<5 000),弥补了现有标准缺少GLP-1类物质的不足,给非法添加药物的监管提供了技术支撑。

1 仪器与试剂

高效液相色谱串联飞行时间质谱,配有Agilent

1260 液相色谱系统和 6530Q TOF 质谱系统 (Agilent 公司); 超声清洗器 (昆山市超声仪器厂); XS105DU 型十万分之一电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

对照品艾塞那肽 (批号 17-Feb-LL11-4-01, 含量 99.8%)、艾塞那肽类似物 (Exendin-3, 批号 08-May-LL11-13-02, 含量 98.3%)、利拉鲁肽 (批号 12-Apr-LL11-12-03, 含量 99.8%), Lovan Research Chemicals Inc. 公司; 司美格鲁肽 (STD PHARM, 批号 222795S-LX-01, 含量 99.1%)、酚酞 (批号 100091-201802, 含量 99.8%)、西布曲明 (批号 100624-201802, 含量 99.9%)、*N*-去甲基西布曲明 (批号 520002-201902, 含量 97.7%)、*N,N*-双去甲基西布曲明 (批号 520001-201902, 含量 94.4%), 中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲酸为色谱纯, Merck 公司; 实验用水为经 Milli-Q 净化系统过滤的超纯水。

20 批宣称具有减肥功能的样品均为市级风险监控样品。

2 溶液的配制

2.1 混合对照品溶液

分别精密称取对照品酚酞约 20 mg, 西布曲明、*N*-去甲基西布曲明、*N,N*-双去甲基西布曲明各约 10 mg (精确到 0.01 mg), 置同一 10 mL 瓶中, 用 50% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 I。分别精密称取艾塞那肽、Exendin-3、司美格鲁肽各约 10 mg, 利拉鲁肽约 20 mg (精确到 0.01 mg), 精密量取对照品溶液 I 1.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 用 50% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液

若供试品为固体制剂 (薄膜衣片片或糖衣片除去包衣, 胶囊取内容物), 研细后, 精密称取一次使用量; 若供试品为液体制剂, 精密量取一次使用量。如前所述, 取供试品一次使用量, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙腈约 5 mL, 超声 (650 W, 40 kHz) 提取 15 min, 静置至室温, 用 50% 乙腈定容至刻度, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。必要时以 50% 乙腈稀释浓度过高的供试品溶液, 使其浓度在线性范围内。

3 色谱、质谱条件

采用 Agilent EC-C₁₈ (150 mm × 3.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~10 min, 10%B → 25%B; 10~25 min, 25%B → 90%B; 25~30 min, 90%B;

30~35 min, 90%B → 10%B; 35~40 min, 10%B), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 进样量 1 μL, 柱温 40 °C。

采用 ESI(+) 离子源, 雾化气 (N₂) 241 kPa, 干燥气 (N₂) 流速 12 L · min⁻¹, 温度 200 °C, 毛细管电压 3.5 kV, 碎裂电压 150 V。采用全扫描模式进行筛查, 阳性结果采用 Target MS/MS 模式获得二级质谱图进行结构的确证。其中一级质谱扫描范围为 *m/z* 100~3 200, 二级质谱扫描范围为 *m/z* 50~3 200。一级、二级质谱扫描速度均为每秒 1 张质谱图。

4 结果与讨论

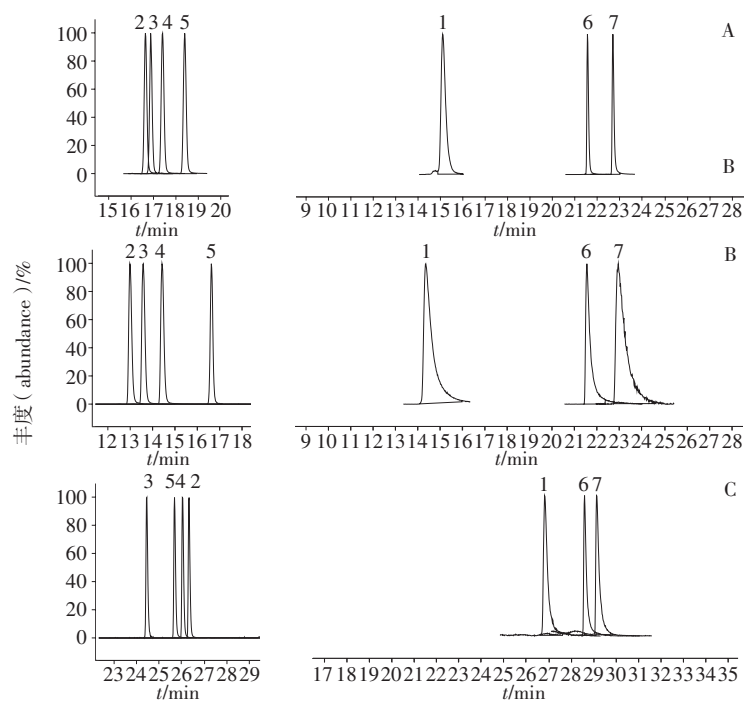
4.1 色谱-质谱条件的优化

4.1.1 色谱条件的选择 流动相和色谱柱的选择对大分子多肽类物质的峰形和分离的影响远大于小分子物质 (图 1、2, 由于艾塞那肽和 Exendin-3 为共流出峰, 故未标出 Exendin-3 的图谱)。考察了 0.1% 甲酸 (pH 2.6)、0.1% 乙酸 (pH 3.5) 体系及甲醇、乙腈体系对峰形的影响 (图 1)。更低的 pH 缓冲范围有利于抑制色谱柱填料中硅醇基的离子化^[17], 从而减少色谱峰的拖尾; 乙腈作为有机相可以改善拖尾现象。因此选择 0.1% 甲酸-0.1% 甲酸乙腈作为流动相。大孔径的色谱柱 (120 Å) 有利于大分子的多肽类物质进入硅胶颗粒内部孔隙, 改善峰形 (图 2)。采用表面多孔的色谱柱可以提高多肽类物质进出色谱柱填料孔粒的速度, 提高柱效, 从而获得更好的分离和峰形^[18] (图 2)。以利拉鲁肽为例, 采用表面多孔的 Agilent EC-C₁₈, 较全多孔的 Shim-pack C₁₈, 拖尾因子由 1.6 减少为 1.3。

4.1.2 质谱条件的选择 碎裂电压对不同相对分子质量物质的离子化过程影响比较大。多肽类物质相对分子质量比较大, 响应随着碎裂电压的增大而增加, 在 200~220 V 时能够得到最大的响应。但是在高碎裂电压的情况下, 小分子物质容易发生源内裂解, 响应减小。在非法添加物的筛查过程中, 往往缺少筛查物质的结构先验信息, 将碎裂电压设置为 150 V, 可以同时满足小分子物质和多肽类物质筛查的需求。

4.2 数据库的建立

取混合对照品溶液, 用 50% 乙腈稀释 50 倍, 在“3”项试验条件下进行数据采集。利用 PCDL 软件记录 8 个减肥类物质的保留时间、分子式、一级质谱及二级碎片离子的精确质量数和离子丰度, 构建定性分析数据库 (表 1)。



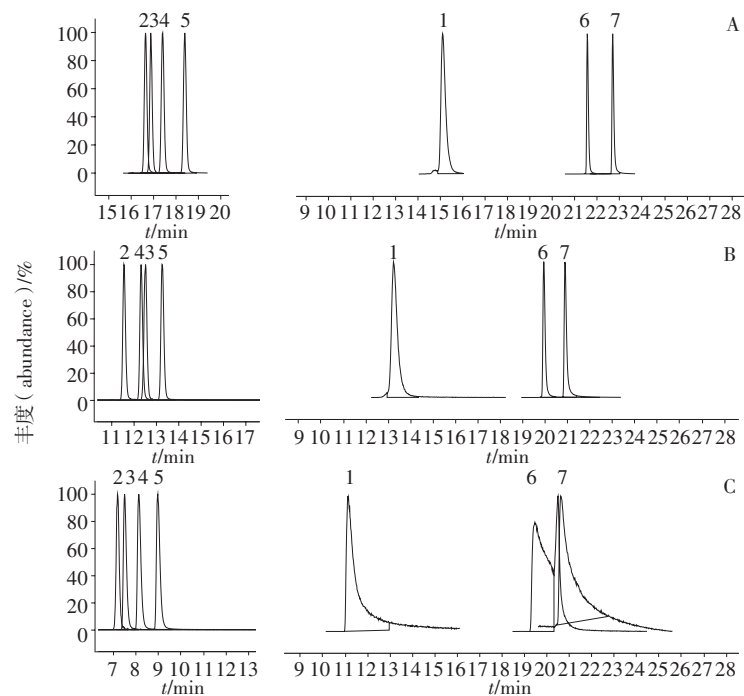
1. 艾塞那肽 (exenatide) 2. *N,N*- 双去甲基西布曲明 (*N,N*-didesmethylsibutramine) 3. 酚酞 (phenolphthalein) 4. *N*- 去甲基西布曲明 (*N*-monodesmethylsibutramine) 5. 西布曲明 (sibutramine) 6. 司美格鲁肽 (semaglutide) 7. 利拉鲁肽 (liraglutide)

A. 0.1% 甲酸-0.1% 甲酸乙腈 (0.1% formic acid-0.1% formic acid acetonitrile) B. 0.1% 乙酸-0.1% 乙酸乙腈 (0.1% acetic acid-0.1% acetic acid acetonitrile)

C. 0.1% 甲酸-0.1% 甲酸甲醇 (0.1% formic acid-0.1% formic methanol)

图 1 流动相对峰形和分离的影响

Fig. 1 The influence of mobile on peak shape and separation



1~7. 同图 1 (same as Fig. 1)

A. Agilent EC-C₁₈ (150 mm × 3.0 mm 2.7 μm, 120 Å) B. Shim-pack C₁₈ (100 mm × 3.0 mm 3 μm, 120 Å) C. ZORBAX SB-C₁₈ (50 mm × 2.1 mm 1.8 μm, 90 Å)

图 2 色谱柱对峰形和分离的影响

Fig. 2 The influence of chromatographic column on peak shape and separation

表 1 数据库及相关质谱参数

Tab. 1 Library and mass spectrum parameters

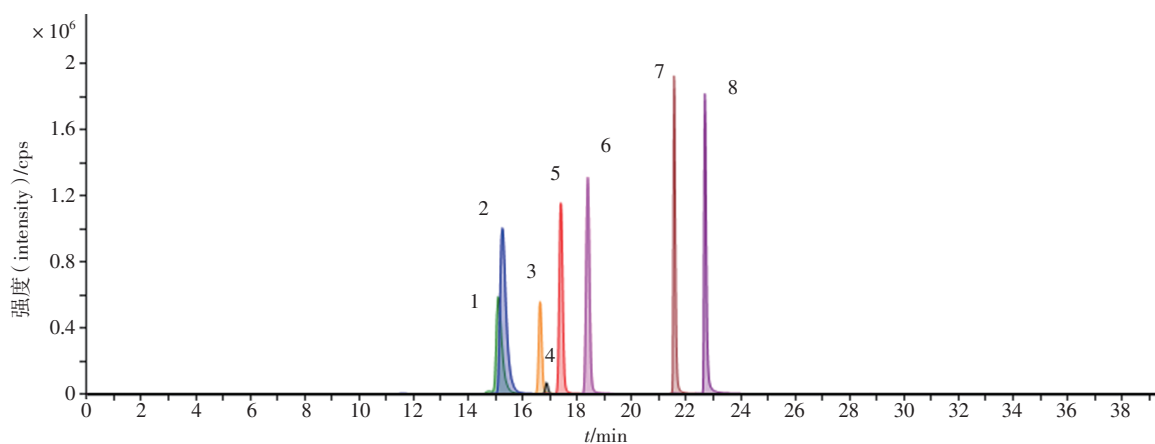
化合物 (compound)	t_R / min	分子式 (formular)	精确相对分子质量 (exact relative molecular mass)	离子化方式 (ionization mode)	CE/ eV	主要碎片离子 (fragment ion) m/z	可能的结构 (possible structure)
西布曲明 (sibutramine)	18.2	C ₁₇ H ₂₆ NCl	279.175 4	[M+H] ⁺	30	125.015 2、139.030 7、 103.054 4	C ₈ H ₈ Cl ⁺ , C ₇ H ₆ Cl ⁺ , C ₈ H ₇ ⁺
N-去甲基西布曲明 (N-monodesmethylsibutramine)	17.2	C ₁₆ H ₂₄ NCl	265.159 7	[M+H] ⁺	30	125.015 1、139.030 4、 103.053 0	C ₈ H ₈ Cl ⁺ , C ₇ H ₆ Cl ⁺ , C ₈ H ₇ ⁺
N,N-双去甲基西布曲明 (N,N-didesmethylsibutramine)	16.5	C ₁₅ H ₂₂ NCl	251.144 1	[M+H] ⁺	30	125.015 0、139.030 5、 103.054 4	C ₈ H ₈ Cl ⁺ , C ₇ H ₆ Cl ⁺ , C ₈ H ₇ ⁺
酚酞 (phenolphthalein)	16.9	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318.089 2	[M+H] ⁺	30	225.054 0、105.033 4	C ₁₄ H ₉ O ₃ ⁺ , C ₇ H ₅ O ⁺
司美格鲁肽 (semaglutide)	21.5	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	4 111.115 4	[M+4H] ⁴⁺	30	136.075 5、530.240 7、 689.800 0、1 302.225 8、 1 237.705 3、960.406 2、 72.081 7、1 358.766 7、 1 059.473 0、573.757 8	Immonium ion Y, b10 ²⁺ , b13 ²⁺ -H ₂ O, y17 ²⁺ , y16 ²⁺ , b9 ⁺ , Immonium ion V, y18 ²⁺ , b10 ⁺ , b11 ²⁺
利拉鲁肽 (liraglutide)	22.7	C ₁₇₂ H ₂₆₅ N ₄₃ O ₅₁	3 748.946 5	[M+4H] ⁴⁺	30	136.075 2、72.081 7、 1 128.148 7、946.390 2、 1 063.6277 5、523.234 2、 1 184.691 0、86.097 1、 1 353.255 2、372.669 1	Immonium ion Y, Immonium ion V, y17 ²⁺ , b9 ⁺ , y16 ²⁺ , b10 ²⁺ , y18 ²⁺ , Immonium ion L, y21 ²⁺ , b7 ²⁺
艾塞那肽 (exenatide)	15.0	C ₁₈₄ H ₂₈₂ N ₅₀ O ₆₀ S	4 184.027 3	[M+5H] ⁵⁺	20	396.224 2、948.207 9、 299.171 4、943.704 4、 70.066 3、834.208 7、 202.117 4、378.211 5、 797.594 6、972.471 0	y ⁴⁺ , b35 ⁴⁺ , y ³⁺ , b35 ⁴⁺ - H ₂ O, Immonium ion P, [M+4H] ⁴⁺ -H ₂ O, y2 ⁺ , y4 ⁺ -H ₂ O, b37 ⁴⁺ , b36 ³⁺
艾塞那肽类似物 (exendin-3)	15.2	C ₁₈₄ H ₂₈₂ N ₅₀ O ₆₁ S	4 200.022 2	[M+5H] ⁵⁺	20	396.224 1、952.208 5、 299.171 1、70.065 7、 837.060 3、947.706 3、 917.769 6、378.214 0、 800.789 6、781.380 1	y ⁴⁺ , b35 ⁴⁺ , y ³⁺ , Immonium ion P, b22 ³⁺ , b35 ⁴⁺ -H ₂ O, b24 ⁴⁺ , y ⁴⁺ - H ₂ O, b37 ⁴⁺ , b36 ⁴⁺

小分子物质电离后只带 1 个电荷,以 [M+H]⁺ 为主,而 4 种多肽经 ESI 源离子化后以三电荷 [M+3H]³⁺、四电荷 [M+4H]⁴⁺ 离子和五电荷 [M+5H]⁵⁺ 为主。其中,艾塞那肽和 Exendin-3 的五电荷 [M+5H]⁵⁺ 离子,司美格鲁肽和利拉鲁肽的四电荷 [M+4H]⁴⁺ 离子丰度相较其他离子要强,因此选择作为筛查的母离子,并对其进行裂解,得到二级质谱。

利用 Masshunter 软件的 Find By Formular 算法,对样品和数据库中的保留时间 (< 0.35 min)、母离子精确质量数 (< 10 × 10⁻⁶) 进行筛查。利用二级质谱图比对,进行靶向筛查的结构确认。典型的色谱图见图 3,其中艾塞那肽和 Exendin-3 的保留时间比较接近,但是可以通过一级、二级质谱图进行区分(表 1)。

4.3 定性筛查的检测限

定性筛查的检测限一般被定义为能够在 95% 的样品中检出的最低浓度^[19-20]。为了避免假阳性的产生,Celine 等^[21]认为多肽类的结构确认至少需要 2 个子离子相匹配,而小分子物质则至少需要 1 个子离子的匹配。但是在欧盟 PA/PH/OMCL(15)04 2R^[22]中指出,比较复杂的多肽需要更多的子离子进行定性。Merkley 等^[23]认为采用人工检查和图谱匹配度的方式更为合理。综上,本方法判断定性筛查的检测限指标:由 MassHunter 软件的 Find By Formular 算法计算供试品溶液质谱图,当保留时间、母离子在数据库筛查均满足要求后,比对二级质谱图,要求至少 2 个子离子的精确质量数误差小于 20 × 10⁻⁶,在此基础上结合 Masshunter 软件的质谱图匹配在 80 分以上。



1. 艾塞那肽 (exenatide) 2. Exendin-3 3. *N,N*-双去甲基西布曲明 (*N,N*-didesmethylsibutramine) 4. 酚酞 (phenolphthalein) 5. *N*-去甲基西布曲明 (*N*-monodesmethylsibutramine) 6. 西布曲明 (sibutramine) 7. 司美格鲁肽 (semaglutide) 8. 利拉鲁肽 (liraglutide)

图 3 8 个对照品溶液的提取离子流图

Fig. 3 Extracted chromatograms of 8 illegally added compounds

以宣称具有减肥功能的胶囊剂、片剂和冻干粉为 3 种典型的基质 (其辅料分别为脱脂乳粉、异麦芽酮糖、甜菊糖苷、硬脂酸镁; 乳糖、二氧化硅、硬脂酸镁; 甘露醇), 添加用 50% 稀释 250 倍的混合对照品溶液 1.0 mL, 按“2.2”项下方法处理后进样分析。结果 4 种多肽类物质质量浓度在 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 其他小分子物质质量浓度在 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右 (表 3), 在不同的基质中均能够满足筛查的要求。保留时间小于 0.35 min, 一级质谱的质量数偏差小于 20×10^{-6} , 避免了假阴性的可能。在 Target MS/MS 模式下得到的二级碎片离子匹配度分数均在 80 以上, 图谱的匹配度较好, 避免了假阳性的可能。

相对于小分子物质, 多肽类物质的筛查检测限较高。原因在于多肽类物质具有较大的分子量, 在相同浓度的情况下, 可供离子化的分子数量较少。同时多肽类物质容易带多电荷, 只选择 1 种电荷离子进行检测, 进一步降低了响应强度。

根据艾塞那肽、司美格鲁肽、利拉鲁肽的最小使用量 (5 、 250 、 $600 \mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$) 计算, Exendin-3 以艾塞那肽的最小使用量 $5 \mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$ 估算, $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的筛查检测限能够进行 10~1 000 倍的稀释。由于非法添加物的工艺不稳定, 添加的量具有随意性。因此, 在实际测定的过程中, 样品首先稀释 10 倍后进行筛查。

4.4 裂解规律的研究

对多肽类大分子物质而言, 在 CID 的条件下, 裂

解主要发生在酰胺键上, 其碎片离子主要表现为 b/y 离子。当电荷保留在 N -末端片段时, 产生 b_n 离子, 而当电荷保留在 C -末端部分时, 则碎片离子为 y_n , n 代表氨基酸链中残基的位置 (图 4)^[24]。根据裂解规律, 通过 b/y 系列离子可以对多肽的氨基酸序列进行匹配, 从而确定多肽的序列。

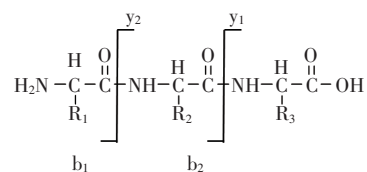
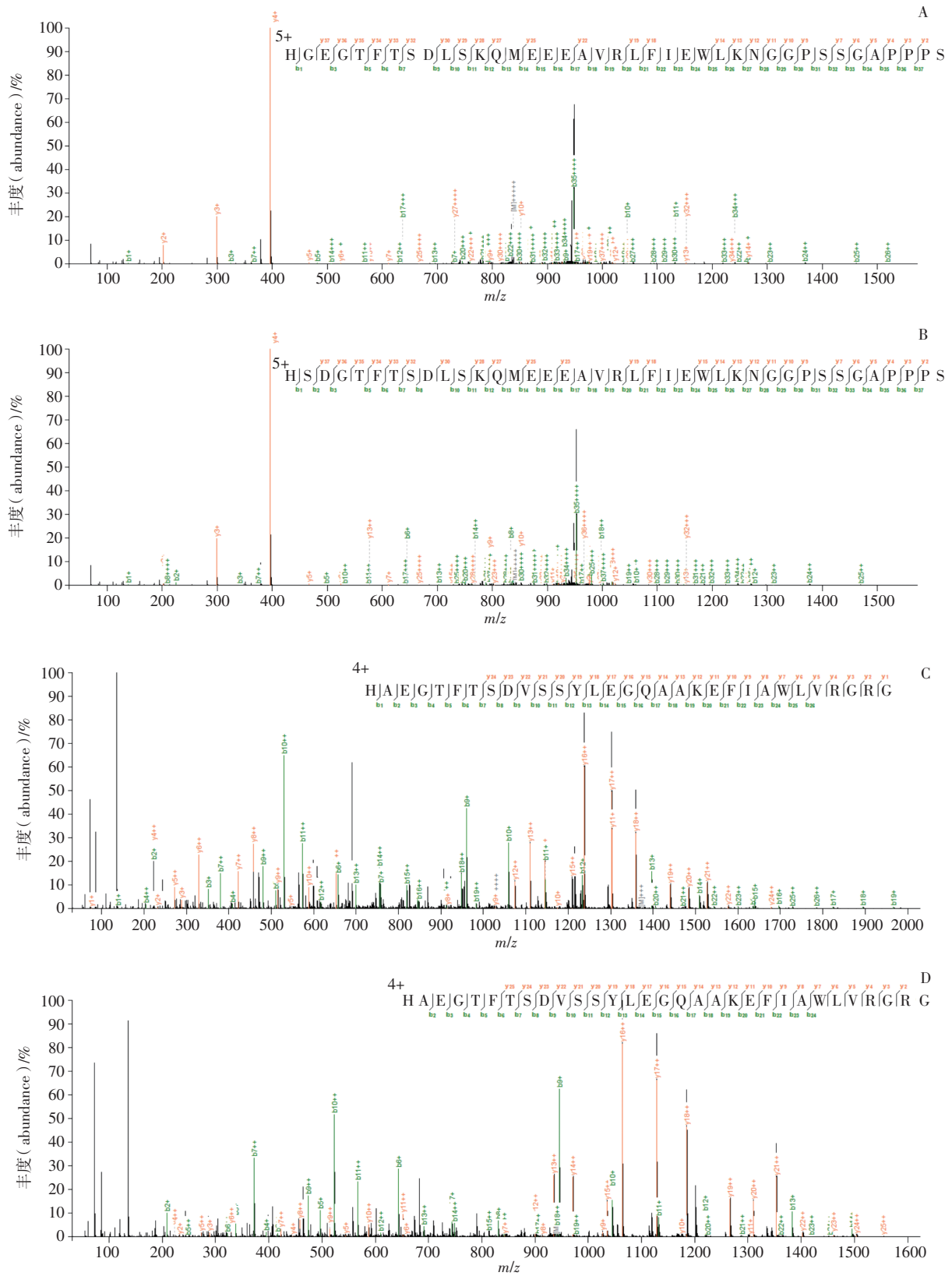


图 4 多肽在 CID 条件下的裂解规律及 b/y 离子

Fig. 4 A schematic representation of the fragmentation and nomenclature for the assignment of b/y ions in MS/MS spectra of peptides

通过 Bioconfirm 软件及 Pfind 软件^[25-26]对碎片离子进行匹配。设置 MS/MS 质量提取窗口为 20, 相对离子丰度阈值为 0.1%, 结果见图 5。艾塞那肽和 Exendin-3 的 b/y 离子数量分别为 60、61 个, 能够覆盖 80% 左右的理论 b/y 离子, 可以匹配 95% 以上的氨基酸序列。司美格鲁肽和利拉鲁肽中 b/y 离子分别为 50、47 个, 覆盖了 80% 左右的理论 b/y 离子, 可以匹配 93% 的氨基酸序列。通过对 b/y 离子的分析, 还可以确定酰化试剂的结构修饰位点在 20 位 K 上。因此, 与小分子物质相同, 在实际样品的分析过程中, 可以采用二级质谱图的比对, 实现多肽类物质的靶向筛查的结构确认。



A. 艾塞那肽 (exenatide) B. Exendin-3 C. 司美格鲁肽 (semaglutide) D. 利拉鲁肽 (liraglutide)

图5 4种多肽类药物二级质谱图

Fig. 5 Product ion spectra of 4 peptides

4.5 数据库的筛查

在一批名为轻盈组合的无批号冻干粉样品中,通过 MassHunter 软件的 Find by Formular 算法,在数据库中匹配到疑似司美格鲁肽成分,与谱库中的对照品

比较,二者保留时间的偏差为 0.03 min,母离子质量偏差为 0.000 27%。随后在 Target MS/MS 模式下对比二者的二级质谱图,谱库匹配分数 83,确定为司美格鲁肽(图 6)。

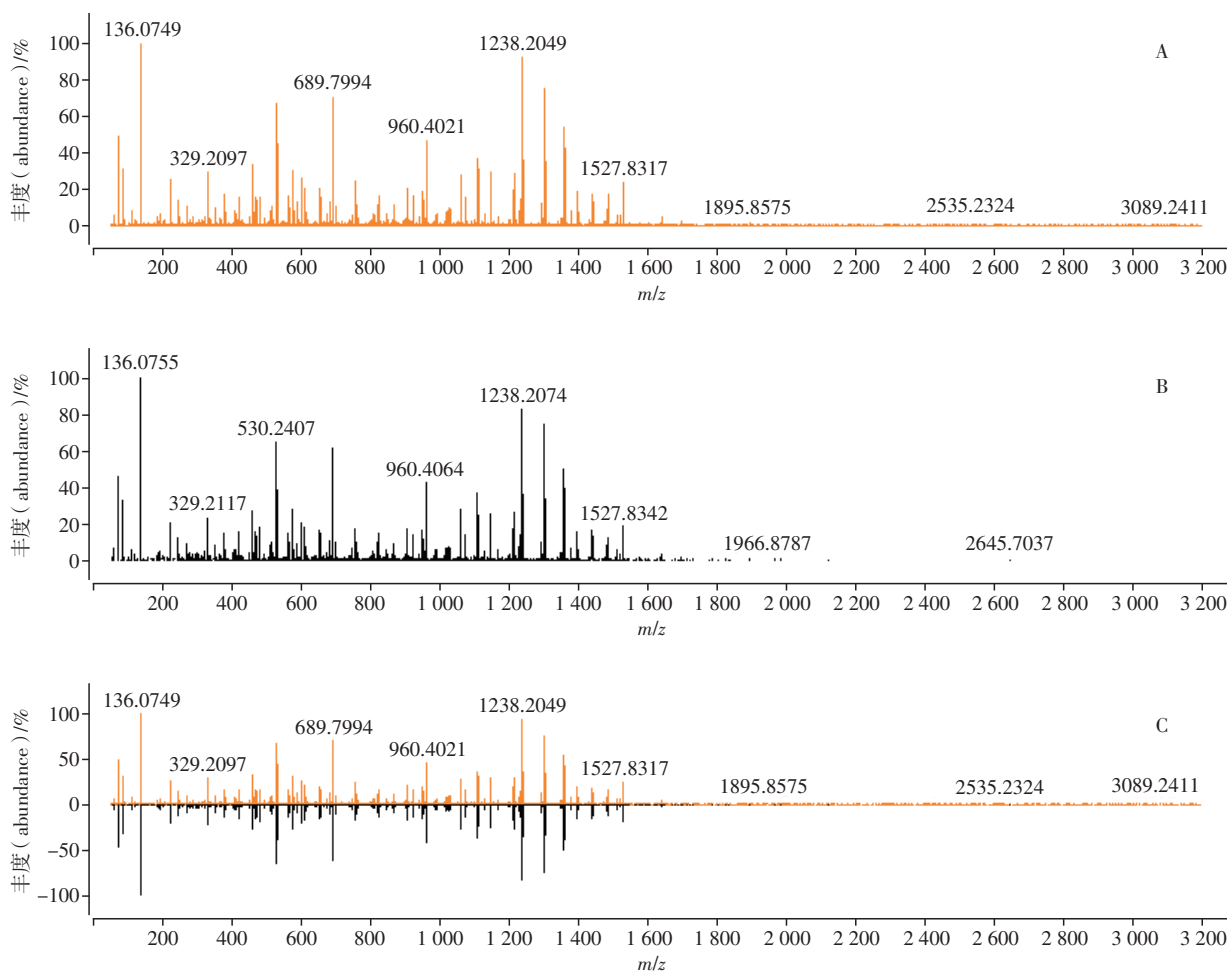


图 6 对照品 (A) 与样品 (B) 的二级碎片离子图及其区别 (C)

Fig. 6 The fragment ion spectra of reference substance (A) and sample (B) and their differences (C)

4.6 方法学验证

4.6.1 专属性试验 取“2.3”项下胶囊剂、片剂和冻干粉 3 种典型的基质,考察辅料及其他成分对 4 种小分子物质和 4 种多肽类物质定性检查的干扰情况。按“2.2”项方法制备供试溶液,进样分析,结果均未检出上述 8 个减肥类物质。

4.6.2 线性关系考察 取混合对照品溶液,用 50% 乙腈分别稀释 10、25、50、100、500 倍,作为系列混合对照品溶液。在“3”项色谱质谱条件下采用

全扫描模式进行分析,以质量浓度 X 为横坐标,相应的母离子色谱峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归分析,结果见表 2。8 种减肥类物质线性关系良好。

4.6.3 回收率试验 取空白片剂、胶囊和冻干粉各 1 g,分别置 50 mL 量瓶中,精密加入混合对照品溶液 1 mL,按“2.2”项下方法处理,分别平行制备 6 份供试溶液,在“3”项色谱质谱条件下全扫描模式进样测定,计算回收率及重复性,结果见表 3。

表 2 方法的线性、相关系数和筛查检出限

Tab. 2 The results of linear, correlation coefficients and SDL

化合物 (compound)	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程 (linear equation)	r	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
司美格鲁肽 (sibutramine)	2.64~132.20	$Y = 3.089 \times 10^5 X + 4.314 \times 10^4$	0.999 3	0.53
利拉鲁肽 (liraglutide)	3.64~181.90	$Y = 3.719 \times 10^5 X + 1.599 \times 10^6$	0.997 9	0.73
艾塞那肽 (exenatide)	2.52~126.10	$Y = 2.708 \times 10^5 X + 5.973 \times 10^5$	0.998 7	0.50
Exendin-3	2.72~136.00	$Y = 2.836 \times 10^5 X + 3.480 \times 10^5$	0.998 7	0.54
西布曲明 (sibutramine)	0.18~8.82	$Y = 4.390 \times 10^6 X + 4.275 \times 10^5$	0.998 9	0.04
<i>N</i> -去甲基西布曲明 (<i>N</i> -monodesmethylsibutramine)	0.17~8.57	$Y = 3.968 \times 10^6 X + 5.334 \times 10^5$	0.999 4	0.03
<i>N,N</i> -双去甲基西布曲明 (<i>N,N</i> -didesmethylsibutramine)	0.17~8.46	$Y = 2.223 \times 10^6 X + 3.548 \times 10^4$	0.999 9	0.03
酚酞 (phenolphthalein)	0.41~20.44	$Y = 4.390 \times 10^6 X + 4.275 \times 10^5$	0.999 9	0.08

4.7 实际样品检测

对 20 批宣称具有减肥功能的样品进行筛查,其中 1 批片剂样品中检出西布曲明成分,4 批冻干粉样品中检出司美格鲁肽成分。结果表明,减肥类产品中除了小分子非法添加物外,也存在大分子多

肽类非法添加物。由于生物利用度的关系,目前这些产品以冻干粉为主。但是,随着口服类 GLP-1 药物剂型的上市,这类非法添加物质可能会以片剂、胶囊等剂型出现,更具有隐蔽性,应当引起足够的重视。

表 3 方法的准确度和精密度

Tab. 3 The results of recovery and precision

化合物 (compound)	胶囊 (capsule)		片剂 (tablet)		冻干粉 (lyophilization)	
	回收率 (recovery)/%	RSD/%	回收率 (recovery)/%	RSD/%	回收率 (recovery)/%	RSD/%
司美格鲁肽 (sibutramine)	79.4	2.3	96.8	1.6	97.4	1.9
利拉鲁肽 (liraglutide)	99.9	4.9	81.9	3.2	101.3	9.7
艾塞那肽 (exenatide)	89.1	2.1	94.5	0.54	88.6	1.5
Exendin-3	91.0	2.1	92.6	0.88	93.4	1.4
西布曲明 (sibutramine)	106.2	0.77	114.0	0.83	87.5	0.92
<i>N</i> -去甲基西布曲明 (<i>N</i> -monodesmethylsibutramine)	115.8	0.21	101.0	0.91	99.9	0.44
<i>N,N</i> -双去甲基西布曲明 (<i>N,N</i> -didesmethylsibutramine)	107.6	0.93	108.8	0.37	100.5	0.37
酚酞 (phenolphthalein)	103.1	0.73	98.0	0.79	106.8	1.6

5 结论

减肥类产品一直以来都是非法添加物的“重灾区”,目前对于这类产品的监管筛查以小分子物质为主,实验结果表明,市场上大分子类的非法添加物质也并不罕见。本研究采用了“自上而下”的分析策略,能同时兼顾小分子物质和大分子多肽类物质(相对分子质量 < 5000)筛查的需要,给日常的监管提供了便利,也为多肽类非法添加物的筛查提供了解决的思路。

参考文献

- [1] 周围,马鹏,许天姝,等.美国 FDA 上市减肥药不良反应研究进展与安全性思考[J].中国新药杂志,2023,32(20):2113
ZHOU W, MA P, XU TS, *et al.* Progress in research on side effects of FDA listed weight-loss drugs and considerations on their safety[J]. Chin J New Drugs, 2023, 32(20): 2113
- [2] 李振兴,白秋江.司美格鲁肽临床和安全性的研究进展[J].药物评价研究,2024,47(3):657
LI ZX, BAI QJ. Advancements in clinical research and safety evaluation of semaglutide[J]. Drug Eval Res, 2024, 47(3): 657

- [3] KLEIN SR, HOBAL IA. Semaglutide, delayed gastric emptying, and intraoperative pulmonary aspiration: a case report [J]. *Can J Anaesth*, 2023, 70(8): 1394
- [4] 张立军, 张新玥, 张转平, 等. TLC-NIRS 联用技术快速检测保健品中添加减肥类化学药物研究 [J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(11): 1961
ZHANG LJ, ZHANG XY, ZHANG ZP, *et al.* Determination of anti-obesity drugs illegally added in health care products by TLC-NIRS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(11): 1961
- [5] 徐红斌, 张申平, 杜茹芸, 等. 超高效液相色谱-Orbitrap 高分辨质谱用于减肥和壮阳类保健食品中 32 种非法添加药物的快速筛查和确证 [J]. *色谱*, 2022, 40(6): 531
XUE HB, ZHANG SP, DU RY, *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap high-resolution mass spectrometry for rapid screening and identification of 32 illegally added drugs in slimming and anti-impotence health foods [J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 40(6): 531
- [6] LEE TS, PARK EJ, CHOI M, *et al.* Novel LC-MS/MS analysis of the GLP-1 analog semaglutide with its application to pharmacokinetics and brain distribution studies in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2023, 1221, 123688
- [7] OH HS, CHOI M, LEE TS, *et al.* Pharmacokinetics and brain distribution of the therapeutic peptide liraglutide by a novel LC-MS/MS analysis [J]. *J Anal Sci Technol*, 2023, 14(1): 19
- [8] ABUHAMDAH R, RABIEE A, MENEILLY GS, *et al.* The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(6): 1843
- [9] SAGHAHAZRATI S, AYATOLLAHI SA, KOBARFARD F, *et al.* The synergistic effect of glucagon-like peptide-1 and chamomile oil on differentiation of mesenchymal stem cells into insulin-producing cells [J]. *Cell J (Yakhteh)*, 2020, 21(4): 371
- [10] 任丽萍, 范慧红. 合成肽类药物的质量控制 [J]. *中国药事*, 2023, 37(8): 925
REN LP, FAN HH. The review of quality control of chemically synthetic peptides drug [J]. *Chin Pharm Aff*, 2023, 37(8): 925
- [11] D'ADDIO SM, BOTHE JR, NERI C, *et al.* New and evolving techniques for the characterization of peptide therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(10): 2989
- [12] AHIRE JJ, KASHIKAR MS, LAKSHMI SG, *et al.* Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(3): 112
- [13] LIAN Z, WANG N, TIAN Y, *et al.* Characterization of synthetic peptide therapeutics using liquid chromatography-mass spectrometry: challenges, solutions, pitfalls, and future perspectives [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32(8): 1852
- [14] LI M, JOSEPHS RD, DAIREAUX A, *et al.* Identification and accurate quantification of structurally related peptide impurities in synthetic human C-peptide by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(20): 5059
- [15] WANG HB, ZENG F, WANG YY, *et al.* Evaluation of the site-unspecified peptide identification method for proteolytic peptide mapping [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(61): 37182
- [16] DARIE CC. Applications of tandem mass spectrometry (MS/MS) in protein analysis for biomedical research [J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2411
- [17] 杨灿. 基于 LC-MS/MS 法的蛋白多肽类药物利拉鲁肽定量分析方法的建立及应用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023
YANG C. Development and Application of Quantitative Method for Protein Polypeptide Drug Liraglutide based on LC-MS/MS [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013
- [18] VOLLMER AC, WAGMANN L, WEBER AA. Simultaneous analysis of antihyperglycemic small molecule drugs and peptide drugs by means of dual liquid chromatography high-resolution mass spectrometry [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2023, 61(7): 1300
- [19] EURLs. European Guideline SANTE/11312/2021 version 2: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed [EB/OL]. (2023-11-22) [2024-09-18]. https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf
- [20] EURLs. Guidance Document on Screening Method Validation [EB/OL]. (2021-11-25) [2024-09-18]. https://eurl-residues.eu/wp-content/uploads/2023/10/Guidance_screening_20230921_v1_0.pdf
- [21] CELINE V, STEVEN J, BART D, *et al.* Analysis of illegal peptide biopharmaceuticals frequently encountered by controlling agencies [J]. *Talanta*, 2015, 142: 1
- [22] OMCL Network/EDQM of the Council of Europe. PA/PH/OMCL(15) 04 2R: Interpretation of Screening Results for Unknown Peptides and Proteins by Mass Spectrometry Based Methods [EB/OL]. (2016-04-25) [2024-09-18]. https://www.edqm.eu/en/d/129107?p_i_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3DINTERPRETATION%2BOF%2BSCREENING%2BRESULTS%2BFOR%2BUNKNOWN%2BPEPTIDES%2BAND%2BPROTEINS%2BBY%2BMASS%2BSPECTROMETRY%2BBASED%2BMETHODS
- [23] MERKLEY ED, WUNSCHER DS, WAHL KL, *et al.* Applications and challenges of forensic proteomics [J]. *Forensic Sci Int*, 2019, 97(4): 350
- [24] BAKHTIAR R, GUAN Z. Electron capture dissociation mass spectrometry in characterization of peptides and proteins [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(14): 1047
- [25] CHI H, LIU C, YANG H, *et al.* Comprehensive identification of peptides in tandem mass spectra using an efficient open search engine [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(11): 1059
- [26] SHAO G, CAO Y, CHEN Z, *et al.* How to use open-pFind in deep proteomics data analysis?—A protocol for rigorous identification and quantitation of peptides and proteins from mass spectrometry data [J]. *Biophys Rep*, 2021, 7(3): 2

(本文于 2024 年 5 月 15 日收到)