

## 液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中赖脯胰岛素及其药动力学研究

孙筱初<sup>1,2</sup>, 林菲菲<sup>2</sup>, 万咪咪<sup>2</sup>, 佟悦<sup>2</sup>, 常路<sup>2</sup>, 袁梦<sup>2</sup>,  
冯莹莹<sup>2</sup>, 滕国生<sup>1\*</sup>, 刘佳<sup>2\*</sup>

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**摘要:** 赖脯胰岛素皮下注射吸收较快, 与人胰岛素相比, 其降血糖作用起效更快, 血药浓度峰值更高, 可更好地控制餐后高血糖。本文建立了液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定大鼠血浆中的赖脯胰岛素, 并评价其药动力学特征。采用牛胰岛素作为内标, 血浆样品经过固相萃取后, 使用 ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 进行色谱分离。采用电喷雾离子源 (ESI源), 在正离子模式下以多反应监测模式检测, 赖脯胰岛素和牛胰岛素 (内标) 定量的离子对分别为  $m/z$  1 162.5→217.2 和  $m/z$  1 157.5→136.0。方法学验证结果表明, 大鼠血浆中赖脯胰岛素的线性范围为 0.1~100 ng·mL<sup>-1</sup>, 日内、日间准确度和精密度均符合生物样品分析相关要求, 回收率在 63.1%~68.1% 之间。与文献报道方法相比, 色谱分离得到改善, 回收率显著提高。本方法成功应用于大鼠的单剂量皮下注射赖脯胰岛素的药代动力学研究。本研究中实验动物的使用已获得中国科学院上海药物研究所实验动物管理与使用委员会的批准。

**关键词:** 赖脯胰岛素; LC-MS/MS; 药代动力学; 固相萃取

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2383-06

## Determination of insulin lispro in rat plasma by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetics study

SUN Xiao-chu<sup>1,2</sup>, LIN Fei-fei<sup>2</sup>, WAN Mi-mi<sup>2</sup>, TONG Yue<sup>2</sup>, CHANG Lu<sup>2</sup>, YUAN Meng<sup>2</sup>,  
FENG Ying-ying<sup>2</sup>, TENG Guo-sheng<sup>1\*</sup>, LIU Jia<sup>2\*</sup>

(1. School of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;  
2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Compared with human insulin, insulin lispro shows a faster hypoglycemic effect and a higher peak plasma concentration, which can better control postprandial hyperglycemia. In this study, we used a solid phase extraction pretreatment method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to quantify insulin lispro in rat plasma. Bovine insulin was used as an internal standard. Plasma samples were separated on an ACQUITY UPLC Peptide CSH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) after solid phase extraction. Positive electrospray ionization was performed using multiple reaction monitoring (MRM) with transitions of  $m/z$  1 162.5→217.2 for insulin lispro and  $m/z$  1 157.5→136.0 for insulin bovine (internal standard). The method validation results showed that the linear range was 0.1 ng·mL<sup>-1</sup>–100 ng·mL<sup>-1</sup>; intra- and inter-day accuracy and precision met the acceptance criteria for biological sample analysis. The recovery of insulin lispro ranged from 63.1% to 68.1%. The method was applied in a pharmacokinetic study of insulin lispro following a single-dose subcutaneous administration to rats. Animal experiments were approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Insti-

收稿日期: 2021-04-30; 修回日期: 2021-07-26.

\*通讯作者 Tel: 18946545897, E-mail: gshteng@163.com;

Tel: 86-21-58559563, E-mail: jia.liu@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0670

tute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences.

**Key words:** insulin lispro; LC-MS/MS; pharmacokinetics; solid phase extraction

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病<sup>[1]</sup>。根据最新统计,全球糖尿病患者接近4.63亿,中国是世界上糖尿病患病率上升最快的地区之一<sup>[2]</sup>。最新的流行病学研究表明,全球约11%的人口患有糖尿病并且仍有50.1%的成人未得到确诊<sup>[3]</sup>。胰岛素是胰岛 $\beta$ 细胞分泌的一种蛋白质激素,并受到内源性或外源性物质(例如葡萄糖、乳糖、核糖、精氨酸、胰高血糖素等)的调控,它也是体内唯一的降血糖激素<sup>[4]</sup>。皮下注射胰岛素是降低血糖的最有效方法,对人体健康具有重要意义<sup>[5]</sup>。胰岛素类似物主要分为短效胰岛素和长效胰岛素。前者以赖脯胰岛素和门冬胰岛素为代表,后者以甘精胰岛素为代表。它们都是通过在人胰岛素结构上改变一些氨基酸的结构或添加脂肪酸链而制成的<sup>[6]</sup>。赖脯胰岛素(insulin lispro)作为市面上第一个速效胰岛素类似物,对糖尿病患者具有重大意义,它的结构仅通过在人胰岛素B链的28和29位上的赖氨酸和脯氨酸交换而获得(图1),这种交换使得分子在血液中形成六聚体的速度减缓,从而快速发挥降糖作用<sup>[7]</sup>,它也替代了传统的使用人胰岛素治疗糖尿病的方法<sup>[8]</sup>。

在药代动力学研究的样品分析测定中,液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)已成为不可替代的检测手段<sup>[9]</sup>,与其他方法相比,它具有更好的专属性和更高的灵敏度。在先前的胰岛素分析中,有文献报道了放射免疫分析(RIA)和LC-MS/MS进行了直接比较,与RIA相比,LC-MS/MS分析显示出更高的灵敏度<sup>[10]</sup>。其他方法(例如免疫测定)则会产生交叉反应,在胰岛素类似物或甘精胰岛素代谢物的交叉反应中,其变化范围为0~264%,无法实现应用<sup>[11]</sup>。过去几年中有文献报道了混合模式固相萃取(SPE)和多维液相色谱联用的方法用于定量人血浆中完整的人胰岛素和5种胰岛素类似物<sup>[12]</sup>。与其他技术相比,使用SPE和液相色谱-质谱联用技术进行胰岛素定量具有显著的优势<sup>[13]</sup>。最新

文献报道了使用阳离子交换吸附SPE进行样品处理来测定多种胰岛素类似物,但赖脯胰岛素的回收率仅为42%<sup>[14]</sup>。综上,胰岛素类似物经过SPE后低回收率问题仍然没有得到很好的解决。

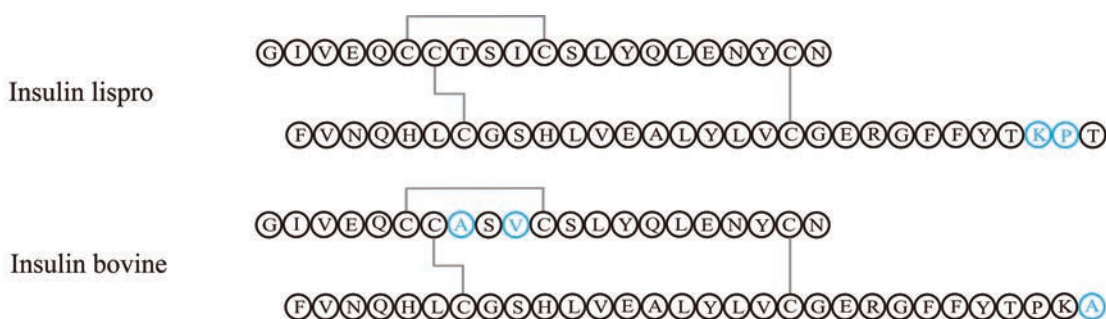
先前的研究已经表明胰岛素类似物对于降低血糖维持体内稳态具有重要作用<sup>[15]</sup>,因此检测其在血浆中浓度水平具有重要意义。因此本文参考了现有的文献<sup>[16]</sup>,建立并验证了一种灵敏和准确的LC-MS/MS方法测定大鼠血浆中的赖脯胰岛素,本方法显著提高了待测物的回收率,可以作为赖脯胰岛素药动力学研究的一种快速简便的检测方法。

## 材料与方法

**对照品和试剂** 赖脯胰岛素(批号:T8220,纯度 $\geq$ 99.0%,上海陶素生化科技有限公司);牛胰岛素(批号:ZZS-20-H270-A2,纯度98.0%,上海甄准生物有限公司);乙酸溶液和氢氧化铵溶液(色谱级, $\geq$ 99.99%,美国Sigma公司);乙腈、甲醇和异丙醇(色谱级,德国Merck公司);甲酸(液相色谱-质谱级,98%,北京百灵威科技有限公司);盐酸(分析级,36.0%~38.0%,国药控股化学试剂有限公司);去离子水由法国MilliQ<sup>®</sup> Advantage A10超纯水仪制得。

**仪器** Waters Acquity UPLC超高效液相色谱系统、Waters Xevo TQ-S三重四级杆串联质谱,配备电喷雾电离源(ESI源)、Waters正压96孔固相萃取装置、Waters Oasis MAX 96-well  $\mu$ Elution固相萃取板,美国Waters公司;罗氏活力型血糖仪,德国罗氏公司。

**动物** 从北京维通利华实验动物技术有限公司(中国北京)购买Sprague Dawley大鼠18只(雄性,体重200 g  $\pm$  20 g),使用许可SYXK(沪)2017-0014。标准环境(18  $^{\circ}$ C~26  $^{\circ}$ C,避光)饲养一周熟悉环境,自由饮水进食。本研究中动物实验方案已获得中国科学院



**Figure 1** Sequences of insulin lispro and bovine insulin (internal standard). Amino acids different from human insulin are marked in blue

上海药物研究所实验动物伦理委员会的批准(IACUC批准号: 2020-02-YY-10)。

**色谱条件** 色谱柱: Waters公司的ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 色谱柱(130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), 柱温为60 °C。流动相: 含0.1%甲酸的水溶液(A)-含0.1%甲酸的乙腈溶液(B)。流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>。线性梯度洗脱程序如下: 0~0.5 min, 20% B; 0.5~4.0 min, 20%~25% B; 4~4.5 min, 25%~90% B; 4.5~5.0 min, 20% B。自动进样器温度设置为10 °C, 进样量为30 μL。

**质谱条件** 离子源为ESI源, 正离子模式检测; 毛细管电压为3.0 kV, 脱溶剂气流速1 000 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流速50 L·h<sup>-1</sup>, 雾化气压力7.0 bar, 碰撞气体(氩气)流速0.15 mL·min<sup>-1</sup>, 去溶剂温度为500 °C; 扫描方式为选择反应监测(SRM); 待测物和内标的离子反应分别为: 赖脯胰岛素(*m/z* 1 162.5→217.2)、牛胰岛素(*m/z* 1 157.5→136.0); 扫描时间为200 ms。

**对照品溶液和质控样品配制** 精确称量两份赖脯胰岛素和一份牛胰岛素对照品, 分别用10 mmol·L<sup>-1</sup>的稀盐酸(pH ≈ 3)配制成2 mg·mL<sup>-1</sup>的储备液, 分别用于配制赖脯胰岛素制标准系列溶液、质控溶液和内标工作溶液。

用甲醇-水-乙酸(60:30:10, v/v/v)并添加0.1%的空白大鼠血浆配制, 获得2.00、4.00、6.00、20.0、60.0、200、600和2 000 ng·mL<sup>-1</sup>的胰岛素标准工作溶液和2.0、5.0、1 000和1 500 ng·mL<sup>-1</sup>的质控(QC)溶液以及质量浓度为100 ng·mL<sup>-1</sup>的内标工作液。取10 μL标准工作溶液和质控溶液加入空白大鼠血浆190 μL, 以获得血浆浓度分别为0.10、0.20、0.30、1.0、3.0、10.0、30.0和100 ng·mL<sup>-1</sup>标准系列样品以及0.10、0.25、50和75 ng·mL<sup>-1</sup>的质控样品。

**血浆样品预处理** 取血浆样品200 μL, 加入100 ng·mL<sup>-1</sup>内标溶液10 μL, 混合均匀, 加入5%氨水200 μL等体积混匀后待上样。取200 μL甲醇和水分别加入Oasis MAX 96-well μElution板中使填料平衡和活化, 然后将400 μL混匀血浆样品上样, 控制压力在2 psi(1 psi ≈ 6.9 kPa)左右防止液滴流速过快; 分别用200 μL 5%氨水和甲醇-水-乙酸(5:94:1, v/v)洗涤; 最后将样品用甲醇-水-乙酸(60:30:10, v/v/v)25 μL洗脱两次, 加入水50 μL稀释, 混合离心后待进样。

**方法学考察** 对建立的方法进行方法学验证, 参照2020版中国药典指导原则<sup>[17]</sup>, 对方法的选择性、定量下限和线性、基质效应、准确度精密度、回收率和稳定性进行了验证。

**选择性** 使用6只用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝空白大鼠血浆作为基质, 分别对其进行了分析和干扰评估。当干扰

组分的响应小于分析物定量下限(LLOQ)响应的20%且小于内标响应的5%时作为接受标准。

**定量下限和线性** 标准曲线应包括8个非零浓度点且样品按照“血浆样品预处理”项下操作, 以待测物浓度作为横坐标, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标, 使用加权( $W = 1/x^2$ )最小二乘法进行线性回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线, 其相关系数应大于0.99, 标准曲线的最低点作为定量下限。

**基质效应** 分别取6个不同来源的空白大鼠血浆, 按“血浆样品预处理”项下操作, 分别考察低浓度质控样品(LQC)、高浓度质控样品(HQC)两个浓度水平的基质效应, 每一浓度水平六样本分析。通过比较经过萃取空白基质后加标的样品和同浓度下的标准溶液的峰面积比值×100%分析基质效应。

**回收率** 根据优化的方法选择了低、中、高三个质控样品(LQC、MQC和HQC)浓度水平测试了回收率, 每种浓度6样本分析。按“血浆样品预处理”项下处理后测定药物峰面积A<sub>1</sub>; 取空白血浆(不含分析物)经过预处理后再向提取后的基质中加入对照品, 测定药物峰面积A<sub>2</sub>; 通过A<sub>2</sub>与A<sub>1</sub>的比值×100%计算回收率。

**准确度与精密度** 根据“血浆样品预处理”分别制备定量下限、低、中和高四个浓度的质控样品, 每一浓度6样本, 分3天分别考察了日内、日间准确度和精密度。

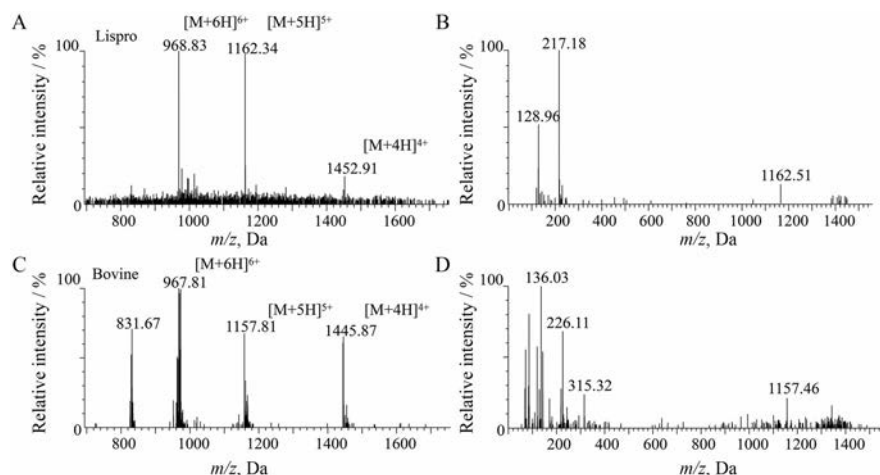
**稳定性** 考察了赖脯胰岛素的低浓度质控样品LQC和高浓度质控样品HQC两个浓度标准血浆样品在各条件下的稳定性。包括: 室温(24 h), 4 °C(24 h), 70 °C(冻融循环3次)和-70 °C放置60天长期稳定性。

**药动学研究** 将18只动物随机分为3组, 每组6只( $n = 6$ ), 皮下注射剂量为90 μg·kg<sup>-1</sup>的赖脯胰岛素<sup>[18,19]</sup>。分别于给药后5、15、30、45、60、90、120、180和240 min, 从眼眶静脉处收集约400 μL全血(采用交叉取血法, 每组采集三个时间点), 用EDTA-K<sub>2</sub>作抗凝剂, 取3 μL滴入血糖监测试纸记录血糖值。将收集的样品在4 °C下以15 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 血浆样品保存在70 °C待测。采用Phoenix WinNonlin 6.3(美国Pharsight公司)软件以非房室模型对测得的药动学数据进行处理和统计分析。

## 结果

### 1 质谱分析

多肽一般在正离子模式下带多电荷, 通常选择在正模式下进行分析。牛胰岛素不同于人胰岛素的结构在图1中用蓝色标出, 作为胰岛素类似物的类似肽, 是内标的合适选择。如图2A和图2C所示是赖脯胰岛素和牛胰岛素的全扫描质谱图, 由于赖脯胰岛素和牛胰



**Figure 2** Full scan mass spectra of insulin lispro (A) and insulin bovine (C), and MS<sup>2</sup> spectra of insulin lispro (B), and insulin bovine (D)

胰岛素的分子量较大,因此选择了赖脯胰岛素的五电荷前体[M+5H]<sup>5+</sup> ( $m/z$  1162.5)和牛胰岛素五电荷前体[M+5H]<sup>5+</sup> ( $m/z$  1157.5)作为母离子。赖脯胰岛素的选定离子对为 $m/z$  1162.5→217.2(图2B),牛胰岛素的选定产物离子对为 $m/z$  1157.5→136.0(图2D)。虽然牛胰岛素的六电荷前体[M+6H]<sup>6+</sup>离子响应较高,但进一步研究发现其作为母离子产生的峰形较差,产生的基线噪音也高,所以选择[M+5H]<sup>5+</sup>作为母离子,并进一步优化了碰撞能量等质谱参数,以获得更高的分子离子信号强度。

## 2 方法学验证

**2.1 选择性** 图3显示了赖脯胰岛素和牛胰岛素(内标)的典型色谱图,从左到右分别是空白血浆色谱图、LLOQ色谱图和给药后30 min的色谱图。赖脯胰岛素的出峰时间为2.80 min,内标为2.92 min。结果显示内源性物质对胰岛素的干扰为7.44%,并不会干扰胰岛素的测定,内标与待测物也互无干扰。

**2.2 定量下限和线性范围** 赖脯胰岛素线性范围在0.1~

100 ng·mL<sup>-1</sup>之间。标准曲线的线性的回归方程为 $y = 0.5271x + 0.04667$ ,  $r^2 = 0.996$ 。定量下限为0.1 ng·mL<sup>-1</sup>,符合接受标准。

**2.3 基质效应** 考察了低和高两个浓度质控样品的基质效应,基质效应在98.4%~113.1%之间,表明电离增强或抑制产生的基质效应并不会影响分析。

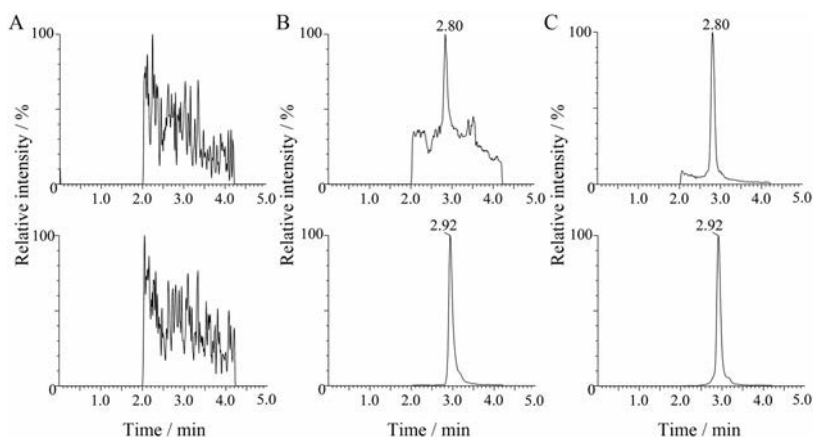
**2.4 准确度和精密度** 赖脯胰岛素的日内和日间精密度分别为5.0%~9.8%和5.1%~9.5%,准确度在93.7%~101.1%之间,符合生物样品分析相关要求。

**2.5 回收率** 赖脯胰岛素在低、中和高浓度下质控样品的回收率分别为63.1%、65.7%和68.1%,达到了较高水平。

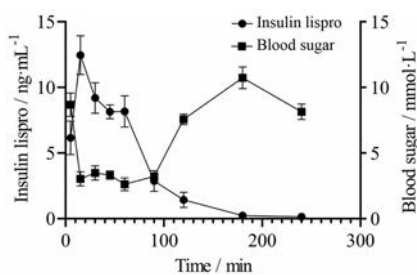
**2.6 稳定性** 结果表明,赖脯胰岛素在不同储存条件下准确度偏差在-7.9%~10.4%之间,表明样品在上述条件下稳定。

## 3 药动学研究

大鼠的单剂量皮下注射90 μg·kg<sup>-1</sup>的药时曲线和血糖值曲线见图4,其药代动力学参数见表1。结果表



**Figure 3** Representative chromatograms of insulin lispro (2.80 min), insulin bovine (2.92 min). A: Blank rat plasma sample; B: Blank plasma sample spiked with insulin lispro (LLOQ) and internal standard; C: Rat plasma samples obtained 30 min after subcutaneous administration



**Figure 4** Mean plasma concentration-time profile of insulin lispro and blood sugar levels after subcutaneous administration of a  $90 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of insulin lispro

**Table 1** Pharmacokinetic parameters of insulin lispro after subcutaneous administration to Sprague Dawley rats ( $n = 6$ )

Parameter	Insulin lispro
$t_{\max}$ /min	15.00
$C_{\max}$ /ng·mL <sup>-1</sup>	12.46
$t_{1/2}$ /min	36.49
MRT <sub>0-t</sub> /min	52.07
MRT <sub>0-∞</sub> /min	54.42
AUC <sub>0-t</sub> /min·ng·mL <sup>-1</sup>	776.47
AUC <sub>0-∞</sub> /min·ng·mL <sup>-1</sup>	782.85

明,建立的LC-MS/MS方法适用于赖脯胰岛素药代动力学研究。

## 讨论

胰岛素作为6000 Da分子质量左右的小分子蛋白,电喷雾离子源是最适合的选择。在色谱分离上尝试过提高流动相中甲酸的比例:0.1%~1%,高比例的甲酸虽然能够提高化合物质子化能力并增强响应,但是信噪比也成比例的增加,且甲酸量过大会减少仪器寿命<sup>[20]</sup>,考虑到仪器状态,所以最终使用了0.1%的甲酸;肽的色谱分离通常使用CSH(带电杂化颗粒)类的色谱柱,对ACQUITY PREMIER Peptide CSH C<sub>18</sub> Column和ACQUITY UPLC Peptide CSH C<sub>18</sub> Column两根C<sub>18</sub>反向柱进行了考察,前者对肽类的残留问题有较好解决,但后者峰形更好、重复性更高,因此选择后者。柱温由45℃提高至60℃后色谱峰的拖尾情况得到改善。

胰岛素的回收率低一直无法得到很好的解决,主要有几个原因:胰岛素本质上是肽,而肽会产生非特异性吸附,这一点在低浓度下的胰岛素溶液上尤其显著,因此要尽量避免在聚丙烯塑料管或玻璃小瓶中制备低浓度的胰岛素溶液<sup>[21]</sup>。在尝试使用低蛋白吸附离心管后,发现此类Lobind-Eppendorf管对胰岛素类似物等多肽的解吸附并没有明显作用,需要在稀释剂中添加空白大鼠血浆才能解决<sup>[22]</sup>,在稀释剂中添加了0.1%的大鼠空白血浆来饱和容器的吸附位点,结果显示胰岛

素的吸附问题得到了较好的解决;预处理的过程也是导致回收率低的一大原因,用不同比例的有机溶剂沉淀蛋白是实验室常用方法,相比较固相萃取技术,虽然步骤简单但是信噪比会更高,加入沉淀剂后赖脯胰岛素可能和血浆中的一些蛋白发生共沉淀现象,导致样品也无法富集,回收率降低<sup>[23]</sup>。在对比MCX阳离子交换吸附剂后选用了适用于酸性化合物混合模式阴离子交换吸附剂的固相萃取板,其 $pK_a$ 值>18,适用于在高pH下带负电的胰岛素。Oasis MAX 96-well  $\mu$ Elution板的填料是一种新型的混合模式聚合物吸附剂,可实现更高的选择性和灵敏度,以萃取含阴离子交换基团的酸性化合物<sup>[24]</sup>。通过优化各项预处理步骤并显著提高了胰岛素经过固相萃取后的回收率,以获得更低的定量下限。在活化平衡后将血浆样品等体积混入5%氨水碱化后上样,再用5%的氨水和50%甲醇水来清洗,不同的洗脱方案对回收率有较大影响,经优化后选择用中性的甲醇水溶液来替代,最后避免了氮气吹干的操作方法,使得回收率提升至63.1%~68.1%。

药动力学结果显示皮下注射后赖脯胰岛素的浓度在15 min内迅速达峰,随后开始快速下降,在2 h内几乎已经完成代谢,符合速效胰岛素的代谢情况<sup>[25]</sup>。血糖值也在15 min内迅速降低,并在15~90 min内维持在较低水平后拉升,值得注意的是180 min处的血糖值略高于正常大鼠的血糖范围(4.77~8.27 mmol·L<sup>-1</sup>),推测是一段时期的过低血糖导致大鼠体内胰高血糖素的分泌增加,促使多种升糖途径的共同作用,包括肝糖原转化、脂肪的 $\beta$ 氧化分解和糖异生等,异常一小时后重回正常范围,表明实验大鼠给药后仍拥有调节体内血糖稳态的能力。

本文建立了测定大鼠血浆中赖脯胰岛素浓度的LC-MS/MS方法,并成功运用于大鼠的皮下注射单剂量药代动力学研究。经过优化前处理的方式提高了赖脯胰岛素经过固相萃取后的低回收率。0.1 ng·mL<sup>-1</sup>的定量下限充分满足了药代动力学实验要求。方法学考察结果表明,该方法灵敏度高、重现性好,能够作为实验室检测的一种快速简便的方法。

**作者贡献:** 孙筱初设计实验、实验操作、数据分析,文章的撰写和返修,刘佳提供了实验平台、文章的选题设计和思路指导,林菲菲、万咪咪和滕国生为论文修改提出宝贵意见,常路、佟悦和冯莹莹负责动物实验血浆样品采集,袁梦负责测量血糖。

**利益冲突:** 本文中所有作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology

- of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 88-98.
- [2] Ma RCW. Epidemiology of diabetes and diabetic complications in China [J]. *Diabetologia*, 2018, 61: 1249-1260.
- [3] Freeland B, Farber MS. A review of insulin for the treatment of diabetes mellitus [J]. *Home Healthc Now*, 2016, 34: 416-423.
- [4] Mayer JP, Zhang F, Dimarchi RD. Insulin structure and function [J]. *Biopolymers*, 2007, 88: 687-713.
- [5] Cichocka E, Wietchy A, Nabrdalik K, et al. Insulin therapy-new directions of research [J]. *Endokrynol Pol*, 2016, 67: 314-324.
- [6] Ehren M, Klein HH. Insulin therapy-new insulin analogues [J]. *Internist*, 2019, 60: 887-894.
- [7] Holleman F, Hoekstra JB. Insulin lispro [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337: 176-183.
- [8] Pailleux F, Beaudry F. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26: 881-891.
- [9] Kumar A, Saint G, Nair A, et al. UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis [J]. *Acta Pol Pharm*, 2012, 69: 371-380.
- [10] Xu Y, Prohn M, Cai XY, et al. Direct comparison of radioimmunoassay and LC-MS/MS for PK assessment of insulin glargine in clinical development [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6: 3311-3323.
- [11] Heurtault B, Reix N, Meyer N, et al. Extensive study of human insulin immunoassays: promises and pitfalls for insulin analogue detection and quantification [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52: 355-362.
- [12] Chambers EE, Fountain KJ, Smith N, et al. Multidimensional LC-MS/MS enables simultaneous quantification of intact human insulin and five recombinant analogs in human plasma [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 694-702.
- [13] Darby SM, Miller ML, Allen RO, et al. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples [J]. *J Anal Toxicol*, 2001, 25: 8-14.
- [14] Thomas A, Yang R, Petring S, et al. Simplified quantification of insulin, its synthetic analogs and C-peptide in human plasma by means of LC-HRMS [J]. *Drug Test Anal*, 2020, 12: 382-390.
- [15] Pettus J, Santos T, Tamborlane WV, et al. The past, present, and future of basal insulins [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32: 478-496.
- [16] Thomas A, Schänzer W, Thevis M. Determination of human insulin and its analogues in human blood using liquid chromatography coupled to ion mobility mass spectrometry (LC-IM-MS) [J]. *Drug Test Anal*, 2014, 6: 1125-1132.
- [17] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 ed. Vol 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 466-472.
- [18] Valladolid-Acebes I, Avall K, Recio-Lopez P, et al. Lowering apolipoprotein CIII protects against high-fat diet-induced metabolic derangements [J]. *Sci Adv*, 2021, 7: 2931-2944.
- [19] Plum A, Agerso H, Andersen L. Pharmacokinetics of the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, in rats, dogs, and pigs, and pharmacodynamics of insulin aspart in pigs [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28: 155-160.
- [20] Dong S, Zeng Y, Wei G, et al. Determination of human insulin in dog plasma by a selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 20: 1077-1078.
- [21] Blackburn M. Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2013, 5: 2933-2946.
- [22] Verbeke F, Bracke N, Debunne N, et al. LC-MS compatible anti-adsorption diluent for peptide analysis [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 1712-1719.
- [23] Shen Y, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Insulin: a review of analytical methods [J]. *Analyst*, 2019, 144: 4139-4148.
- [24] Esposito S, Vanni D, Menta S, et al. Comparison of different protein precipitation and solid-phase extraction protocols for the study of the catabolism of peptide drugs by LC-HRMS [J]. *J Pept Sci*, 2020, 26: 9-17.
- [25] Vincent M, Nobécourt E. Treatment of diabetic ketoacidosis with subcutaneous insulin lispro: a review of the current evidence from clinical studies [J]. *Diabetes Metab*, 2013, 39: 299-305.