

LCMS-8060 测定大鼠血浆中的重组人胸腺素 β_4

LCMSMS-275

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用检测大鼠血浆中的重组人胸腺素 β_4 的检测方法。样品经处理后，用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 8 min 内完成定量分析。重组人胸腺素 β_4 在大鼠血浆中 0.1~100 ng/mL 内线性良好，判定系数大于 0.9972；该方法保留时间和峰面积重复性良好，残留面积和定量下限的面积比为 5.4%，符合药品非临床药代动力学研究指导规则的要求。

关键词： 大鼠 血浆重组人胸腺素 β_4 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

人胸腺素 β_4 (Thymosin β_4 ，简称 T β_4) 是真核细胞中一种重要的肌动蛋白螯合分子，广泛分布于人体内大部分组织和细胞中，是一个由 43 个氨基酸组成的酸性小肽，在物种中高度保守，广泛分布于除红细胞外的大部分细胞中。它参与人体许多重要的生命活动，能够促进伤口愈合，促进毛发生长、抗炎、促进组织修复，抗内毒素性休克、促血管生成，维持细胞骨架的动态平衡。

现阶段使用的 T β_4 均来源于化学合成，目前 T β_4 对于多种创伤性疾病以及心肌梗死后心脏保护作用的研究均已进入临床试验阶段。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了一种重组人胸腺素 β_4 的定量分析方法，该方法特异性好、灵敏度高，适用临床前人胸腺素 β_4 检测的需要。供相关从业人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2(输液泵), DGU-20A5R(在线脱气机), SIL-30ACMP(自动进样器), CTO-20AC(柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件	流速：0.30 mL/min
色谱柱：ACQUITY UPLC [®] Peptide CSH [™] C18 (2.1 mm I.D. \times 100 mm L., 1.7 μ m)	柱温：40 $^{\circ}$ C
流动相：A 相 -(0.1% 甲酸) 水， B 相 -(0.1% 甲酸) 乙腈	进样体积：10 μ L
	洗脱方式：梯度洗脱，初始比例 5%B

表1 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	15
7.10	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.01	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI+

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：15.0 L/min

接口温度：350℃

DL 温度：150℃

加热模块温度：300℃

干燥气流速：5.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)，MRM 参数见表 2

表2 化合物信息及MRM参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
重组人胸腺素β4	712.25 (7+)	813.20*	-26.0	-82.0	-17.0
		129.15	-26.0	-50.0	-22.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准工作液配制：配制甲醇：水：甲酸=3:6:1(v/v/v)的混合液作为标准工作液的稀释液，逐步稀释得到浓度为0.1、0.3、1、3、10、30和100 ng/mL的标准工作液。

基质加标样品前处理步骤：90 μL 空白血浆与10 μL 工作液混匀，加入300 μL 冰甲醇，振匀后12000 rpm 离心10 min 取上清进样分析。

■ 结果讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

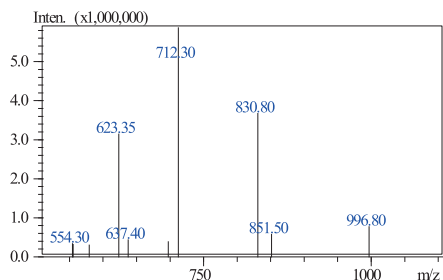


图1 Tβ4一级扫描质谱图

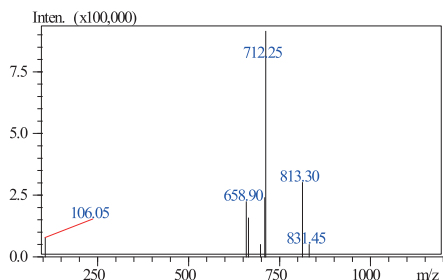


图2 Tβ4二级扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

标准样品的 MRM 色谱图：

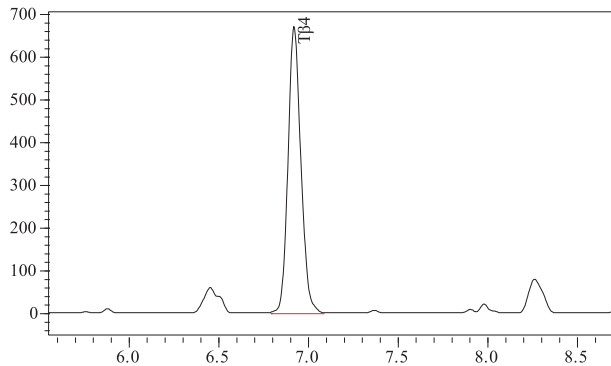


图3 Tβ4溶剂标准品MRM色谱图(0.1 ng/mL)

2.3 实验方法

按照 1.3 中的样品前处理方法制备空白血浆样品和加标血浆样品，按照 1.2 中条件进行分析后得到的色谱图如下所示：

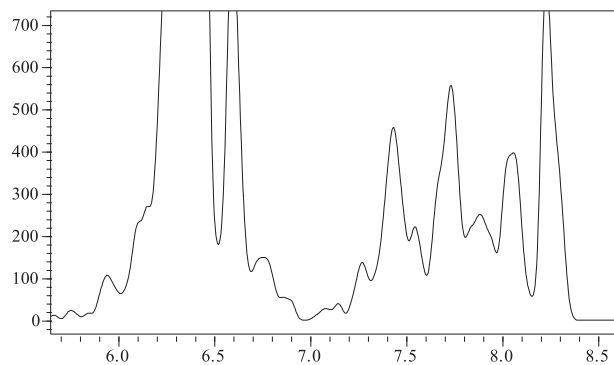


图4 空白血浆基质色谱图

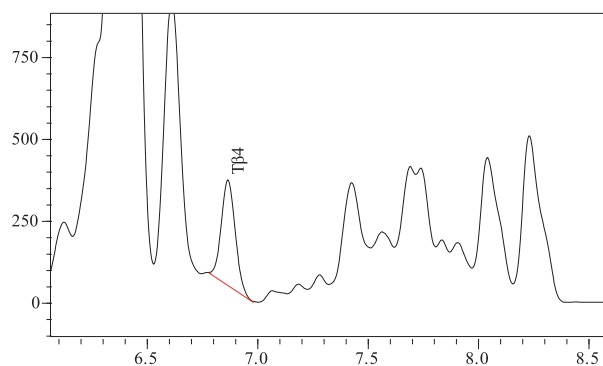


图5 TB4血浆基质标准品色谱图(0.1 ng/mL)

2.4 线性关系

配制三条标准曲线，分别在批表的前、中、后三个位置进样分析，外标法制作校准曲线，3次分析拟合的标准曲线标线如下图所示。在 0.1~100 ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

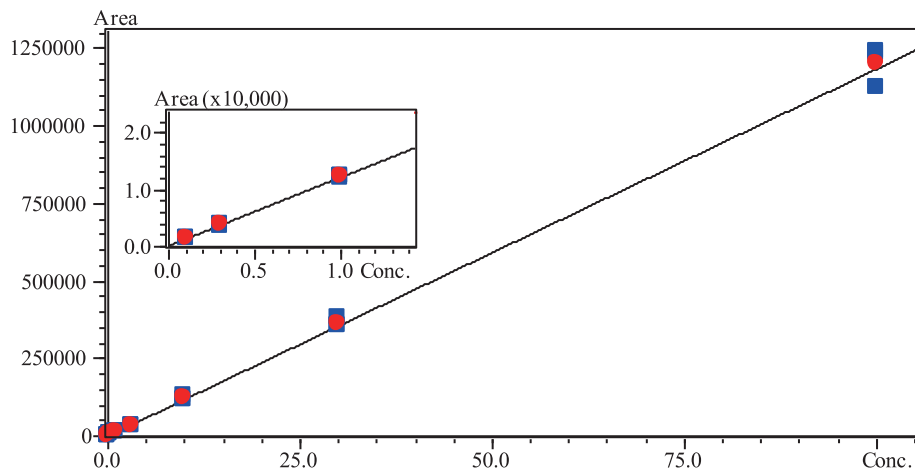


图6 标准工作曲线(n=3)

表3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ng/mL	准确度 (%)	相关系数 r
1	批 1	$Y = (11898.8)X + (134.635)$	0.1~100	94.3~113.5%	0.9972
2	批 2	$Y = (12096.7)X + (182.828)$	0.1~100	90.0~104.7%	0.9983
3	批 3	$Y = (12211.7)X + (178.435)$	0.1~100	91.3~111.5%	0.9977
4	拟合	$Y = (12049.9)X + (167.531)$	0.1~100	90.4~113.0%	0.9996

2.5 重复性考察

对浓度为 2.5 ng/mL 的 7 份基质加标样品按照 1.3 的方法进行前处理后进样分析，重复性结果如下表 4 所示。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=7)

样品名称	RSD% (0.1 ng/mL)		RSD% (2.5 ng/mL)		RSD% (60 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Tβ4	0.56	8.82	0.61	5.87	0.87	4.25

2.6 样品残留考察

根据药品非临床药代动力学研究指导规则要求，在 100 ng/mL 的样品分析完成后对空白样品进行分析，结果如表 5 所示。空白样品残留峰面积为 72，定量下限峰面积为 1336，残留面积和定量下限 0.1 ng/mL 的面积比为 5.4%，小于药品非临床药代动力学研究指导规则的 20% 的要求。该方法符合标准要求。

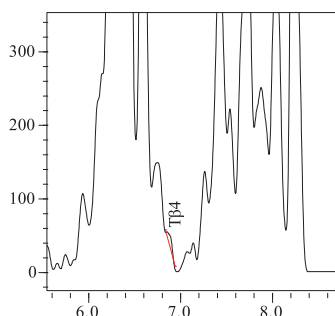


图7 空白样品色谱图

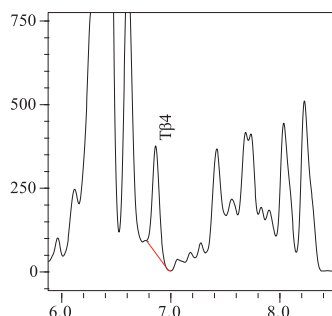


图8定量下限色谱图 (0.1 ng/mL)

2.7 实际样品检测结果

按 1.2 中的分析条件和 1.3 中的前处理方法对四份大鼠血浆样品进行处理后上机进行分析，色谱图和定量结果如下所示：

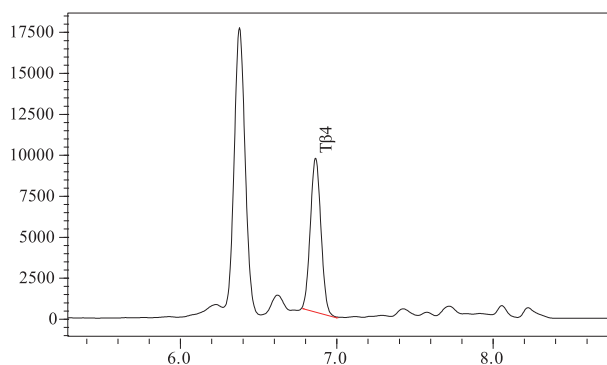


图9 实际样品MRM色谱图

表5 大鼠血浆中T β 4测试结果

No.	实测值 (ng/mL)
1	3.191
2	2.431
3	4.245
4	3.650

■ 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定大鼠血浆中重组人胸腺素 β 4。重组人胸腺素 β 4 在大鼠血浆中 0.1~100 ng/mL 内线性良好, 相关系数大于 0.9972; 该方法保留时间和峰面积重复性良好, 残留面积和定量下限的面积比为 5.4%, 符合药品非临床药代动力学研究指导规则的要求。

此方法选择性强和灵敏度高, 可以为临床前大鼠血浆中重组人胸腺素 β 4 的检测提供很好的借鉴和参考。