

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定小鼠尿液中多肽类药物 TCP-1 含量 及排泄研究

LCMSMS-190

摘要：建立一种测定小鼠尿液中的多肽类药物 TCP-1 的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并用于考察尾静脉给予小鼠多肽类药物 TCP-1 排泄情况研究。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离多肽类药物 TCP-1，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用内标法进行分段定量 1 ng/mL~1000 ng/mL 浓度范围，相关系数为 0.9970；0.5 μg/mL~160 μg/mL 浓度范围，相关系数 0.9997。对两段标准曲线范围内高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密度考察，RSD% 在 10.25 以下，符合 CFDA 报批要求。

关键词：多肽类药物 TCP-1 尿液排泄研究 超高效液相色谱串联质谱法

结直肠癌属高危癌症，且面临早期诊断和治疗难题；缺乏有效的早期诊断手段，使得结直肠癌的死亡率居高不下。近几十年来，多肽类药物无论是在治疗还是在诊断上，其作用已引起科学界的高度重视。我们前期通过体内噬菌体展示技术发现了一种可以与结直肠癌组织血管系统特异性结合的小分子多肽 TCP-1 (CTPSPFSHC)，与正常组织的血管不结合，500nmol/ 只剂量携带荧光分子 FITC 的 TCP-1 可发现小至 2 mm 的微小结直肠肿瘤。

认识药物的代谢特征对于保证用药的安全和有效是至关重要的。多肽类药物在结构和作用机理上不同于传统药物，有其自己独特的处置行为及代谢机理。研究多肽药物的代谢特征具有较大的挑战，对于药物代谢领域的发展具有较大意义和价值，我们将开展 TCP-1 在 ICR 小鼠体内的药代动力学研究，阐明其独特的处置行为。

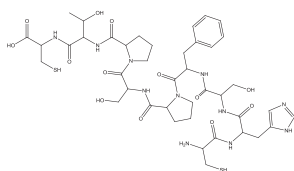


图1 多肽类药物TCP-1结构式

实验部分

1.1 药物

CTPSPFSHC (TCP-1) 及内标 TPSPFSH (TH-7) 由上海吉尔生化提供。

1.2 动物

icr 雄性小鼠 (SPF 级)，20 g，购买于北京大学医学部，合格证号 SCXK(京)2011-0012；实验前小鼠 12 h 禁食，但自由饮水。

1.3 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-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站；AG-135 电子天平 (瑞士 Mettler 公司)；XW-80A 型微型漩涡混合仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司)；TH2-100 型恒温培养摇床 (上海一恒科技有限公司)；氮气吹扫仪 MD200-2 (杭州奥盛仪器有限公司)；Heraeus Pico 21 离心机 (Thermo Scientific, 德国)。

1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司 (Fairlawn, NJ, USA); 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

方法和结果

2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

由于 TCP-1 在小鼠体内的浓度变化范围较大, 需建立两套方法学。超纯水配 2 mg/mL TCP-1 储备液, 依次用超纯水稀释等到 TCP-1 工作液 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$, 用于 TCP-1 处于低浓度范围时检测; 10, 50, 100, 400, 800, 1600 $\mu\text{g/mL}$ 用于 TCP-1 处于高浓度范围时检测。0.02, 1, 8, 10, 150, 1500 $\mu\text{g/mL}$ 溶液用于质控样品制备。内标溶液浓度配制为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 标准曲线与质控样品的配制

空白尿液与以上工作液混合, 使得最终样本中 TCP-1 浓度为 0.5, 1, 5, 10, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$, 质控样本中 TCP-1 浓度分别为 1, 15, 150 $\mu\text{g/mL}$ (用于高浓度 TCP-1 含量); 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/mL, 质控样本中 TCP-1 浓度分别为 2, 100, 800 ng/mL (用于低浓度 TCP-1 含量)。内标为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 生物样品处理方法

取 10 μL 尿液, 加 5 μL IS (10 $\mu\text{g/mL}$), 加 50 μL 乙腈沉淀蛋白后, 旋转 30 s 混匀, 14800 rpm 离心 5 min 取上清液, 氮气吹干。取上清 2 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 色谱条件

色谱柱采用岛津 Shim-pack XR-ODSII 75 mm \times 2 mm, 2.2 μm	流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;
色谱条件为流动相: 水 (0.1% 甲酸) - 甲醇 (0.1% 甲酸);	进样量: 2 μL 。
梯度: 0 min, 85:15; 1.50 min, 85:15; 3 min, 40:60; 4.00 min, 40:60; 4.01 min, 85:15; 5.00 min, 85:15;	

2.5 质谱条件

离子化模式: ESI(+)	加热模块温度: 450 $^{\circ}\text{C}$
离子喷雾电压: 4.5 kV	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
雾化气: 氮气 3.0 L/min	驻留时间: 100 ms
干燥气: 氮气 15 L/min	延迟时间: 3 ms
碰撞气: 氩气	MRM 参数: 见表 1
DL 温度: 300 $^{\circ}\text{C}$	

表1 MRM优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
TCP-1 [M+2H] ²⁺	488.70	70.10	-18.0	-49.0	-29.0
		109.95*	-18.0	-53.0	-19.0
I.S.	386.70	70.00*	-27.0	-45.0	-28.0

*为定量离子对

2.6 方法学考察

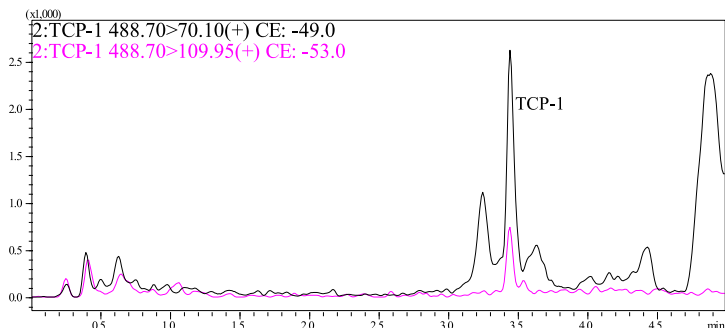


图2 小鼠尿液1 ng/mL色谱图

2.6.1 线性关系考察

分别取空白生物样品，加入适量的系列浓度标准溶液，配制成系列浓度的模拟生物样品。按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如表 2 所示。

表2 线性结果

基质	回归方程	r	范围
尿液	$y = 0.0001x + 0.0065$	$r = 0.9970$	1 ng/mL ~1000 ng/mL
	$y = 0.1389x + 0.0553$	$r = 0.9997$	0.5 μg/mL~160 μg/mL

2.6.2 准确度及精密度

按尿液样品“标准曲线制备”项下方法配制多肽类药物 TCP-1 的低、中、高浓度的 QC 样品 1, 100, 800, 1000, 15000, 150000 ng/mL。每个浓度进行 6 样本分析，连续测定三批，根据标准曲线，计算 QC 样品的测定浓度，与配制浓度做比，求得准确度及精密度，结果如表 3。

表3 精密度及准确度结果

基质	加入量 (ng/mL)	批内精密度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)	RSD (%)	批间精密度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)	RSD (%)	准确度 (%)
尿液	2	2.08±0.23	6.44	1.69±0.07	6.05	109.69
	100	103.73±5.80	10.25	97.22±9.98	5.24	87.83
	800	807.11±20.90	6.23	797.43±49.39	2.34	87.71
	1 μg/mL	0.95±0.07	2.12	1.05±0.05	3.32	95.42
	15 μg/mL	14.68±0.72	3.44	14.77±0.20	2.33	99.60
	150 μg/mL	150.03±5.33	5.12	148.98±5.74	5.08	86.23

2.6.3 回收率

取 100 μL 小鼠尿液，按“标准曲线制备”项下方法配制多肽类药物 TCP-1 浓度为 2, 100, 800, 1000, 15000, 150000 ng/mL 的样品，每个浓度进行 6 样本分析。同时另取小鼠鼠空白尿液样品，除不加系列标准溶液和内标外，按“标准曲线制备”项下操作，用离心后的上清液制备浓度为 2, 100, 800, 1000, 15000, 150000 ng/mL 的样品，每个浓度 6 样本分析。以前者处理后样品测得峰面积与后者未经处理的样品测得的峰面积相比，考察样品提取回收率，结果如下表。结果表明，多肽类药物 TCP-1 在小鼠尿液回收率良好。

表4 提取回收率结果

TCP-1 (ng/mL)	2	100	800	1 µg/mL	15 µg/mL	150 µg/mL
提取回收率(% 平均±SD	95.86±5.81	103.19±0.59	96.96±1.83	98.14±3.91	99.23±0.82	102.22±2.40

2.6.4 基质效应

小鼠尿液空白样品,除不加系列标准溶液和内标外,按“标准曲线制备”项下操作,用离心后的上清液制备浓度为2, 100, 800, 1000, 15000, 150000 ng/mL 的样品, 每个浓度 6 样本分析。另以水代替尿液配制浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品, 每个浓度 5 样本分析。以前者样品测得的浓度与后者以水代替尿液配制样品测得的峰面积相比, 考察样品的基质效应, 结果如下表。多肽类药物 TCP-1 在小鼠尿液中不受基质干扰。

表4 小鼠尿液中多肽类药物TCP-1的基质效应结果(RE%,n=6)

TCP-1 (ng/mL)	2	100	800	1 µg/mL	15 µg/mL	150 µg/mL
基质效应 (%)	102.89±1.59	99.07±4.28	96.94±5.12	98.14±3.22	102.96±0.82	95.32±4.20

2.7 尿液测定结果

取小鼠 18 只, 雌雄各半。平均分为三组, 高、中、低剂量组 (50 mg/kg, 25 mg/kg, 12.5 mg/kg) 灌胃给药, 每组 6 只。尿液采集时间点为: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h。按照“生物样品处理”下方法处理。数据经 GraphPad Prism® 6 分析, 计算药物排泄参数, 如下表所示。

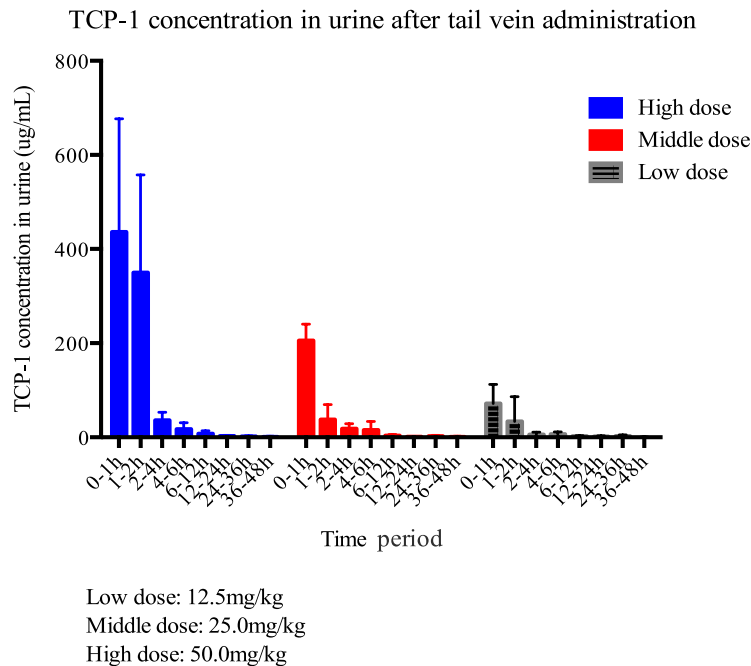


图2 小鼠尾静脉注射给药后排泄图

对高中低三个给药量组分别合并所有采集时间段, 计算药物含量, 并根据给药量对给药量回收进行计算。

表5 给药后药物回收率

剂量组	高剂量	中剂量	低剂量
TCP-1 尿液回收率 (%)	59.04±13.78	56.92±10.89	52.58±14.80

■ 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小鼠尿液中多肽类药物 TCP-1 的快速方法，经方法学研究表明线性、精密度、灵敏度均满足样品测定要求。小鼠尾静脉注射多肽类药物 TCP-1，在血浆中稳定并快速消除，主要以母药形式快速自尿液排出，推测药物经肾脏排泄。