

HPLC-MS/MS 法测定血浆中十肽化合物 LXT-101 及 Beagle 犬药代动力学研究

孔爱英, 张振清, 乔建忠, 张帆, 周文霞, 刘克良, 阮金秀*

(军事医学科学院 毒物药物研究所 药代动力学重点实验室, 北京 100850)

摘要: 建立 HPLC-MS/MS 法测定血浆中十肽化合物(LXT-101)的浓度,并应用于 Beagle 犬的药代动力学研究。血浆样品采用乙腈直接沉淀蛋白的方法,内标(IS)选用¹²⁷I-LXT-101,采用 ESI-MS/MS 二极质谱,选择反应监测(SRM)方式进行检测。LXT-101 的线性范围为 0.5 ~ 500.0 ng · mL⁻¹ ($r^2 > 0.9930$),绝对回收率为 85.2% ~ 90.7%,日内、日间精密度(RSD%)均小于 10.9%,准确度(RE)在 ±1.8% 之内。血浆中的最低检测限(LOQ)为 0.5 ng · mL⁻¹。该法操作简便、快速、灵敏度高。可检测出低剂量肌注(im)给药后犬体内的血药浓度,适于临床前药代动力学研究。

关键词: 十肽; HPLC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号: R917; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)09-0946-05

Determination of decapeptide LXT-101 in plasma by HPLC-MS/MS and its pharmacokinetics in Beagle dogs

KONG Ai-ying, ZHANG Zhen-qing, QIAO Jian-zhong, ZHANG Fan, ZHOU Wen-xia, LIU Ke-liang, RUAN Jin-xiu*

(Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: This paper developed a sensitive and specific liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of decapeptide LXT-101 in Beagle dog plasma. Plasma samples spiked with internal standard (IS) were treated with acetonitrile to precipitate the protein. Selected reaction monitoring (SRM) using the precursor → product ion combinations of m/z 472.1 → 587.9 and m/z 502.8 → 633.8 were used to quantify LXT-101 and IS, respectively. The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.5 - 500.0 ng · mL⁻¹. The limit of quantification (LOQ) was 0.5 ng · mL⁻¹. The inter-day and intra-day precision (RSD) across three validation run over the entire concentration range was below 10.9%, and the accuracy (RE) was within ±1.8%. The main pharmacokinetic parameters of LXT-101 after muscle injection of 20 μg · kg⁻¹ were as follows, AUC_{0-∞}: (176.8 ± 116.7) μg · h · L⁻¹, MRT_{0-∞}: (2.52 ± 0.53) h, T_{1/2}: (1.4 ± 0.3) h; CL: (0.16 ± 0.09) L · h⁻¹ · kg⁻¹, and V_d: (0.30 ± 0.16) L · kg⁻¹, respectively. The method is proved to be specific, sensitive and suitable for the investigation of LXT-101 pharmacokinetics in Beagle dog.

Key words: decapeptide; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics

收稿日期: 2008-04-02.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2002AA2Z3121).

*通讯作者 Tel: 86-10-66874610, Fax: 86-10-88270688, E-mail: RuanJX1936@yahoo.com.cn

前列腺癌是男性泌尿生殖系统肿瘤中最重要的,是人类特有的疾病。近二十年来,治疗前列腺癌的内分泌药物中,促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)类似物逐渐发展起来。GnRH 是下丘脑脉冲式分泌的十肽激素,通过垂体门脉与垂体前叶促性腺细胞表面的特异性高亲和力 GnRH-R 结合,基于对垂体 GnRH-R 的作用将其分为激动剂与拮抗剂^[1],激动剂比 GnRH 的作用强且半衰期长,给药初期可以刺激促性腺激素的释放,持续给药使 GnRH 受体脱敏下调,抑制促性腺激素的释放,从而抑制性腺功能。拮抗剂直接抑制 GnRH 受体功能发挥上述作用,GnRH 激动剂如亮丙瑞林(leuprorelin)已在临床上广泛应用^[2],与激动剂相比,GnRH 拮抗剂具有疗效确切、起效迅速且不良反应小的特点,成为近年来内分泌治疗药物的研发热点^[3]。因此开发高效、低毒副作用的前列腺癌治疗药物十分重要。LXT-101 是新型 GnRH 拮抗剂,为 10 个氨基酸小肽化合物。体内、外实验结果证明,它通过降低血清睾酮分泌及直接抑制前列腺癌细胞增殖两种途径抑制雄激素依赖性前列腺癌的生长,有望开发成为新型前列腺治疗药物^[4]。

生物样品中的肽类化合物常用的检测方法有放射免疫法(RIA)^[5,6]和同位素标记法^[7],近年来,由于 HPLC-MS/MS 的高灵敏度、专属性强的特点,在检测中肽类化合物的报道逐渐增加^[8~11]。

本文首次建立了 LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中新型十肽化合物 LXT-101 药物浓度,参照《化药非临床药代动力学指导原则》完成生物样品的方法学验证并应用于药代动力学研究,其体内药代数据为临床研究提供参考依据。

材料与方 法

仪器与试剂 美国 Thermo Finnigan TSQ Quantum 三重四极杆串联质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI)及 Xcalibur1.4 控制软件,Lcquan2.0 数据处理系统,Surveyor 液相泵及自动进样器。

LXT-101 原料药(相对分子质量 1 413,含量 98.3%,军事医学科学院合成室,批号 040804),¹²⁷I-LXT-101(含量 99.17%,内标化合物,军事医学科学院合成室,批号 050307)。乙腈、甲醇为色谱纯(Sigma 公司,美国),去离子水(Millipore,美国),其他试剂均为分析纯,临床用玻璃肝素钠管。

实验动物 雄性 Beagle 犬,体重 10~12 kg,军事医学科学院动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2002-001。

Beagle 犬药代动力学实验 取雄性 Beagle 犬 5 只,适应性喂养 1 周。肌内注射,剂量 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (用 5% 甘露醇溶液配制),分别于给药前和给药后 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8 和 10 h,由前肢静脉取血 2 mL,置于肝素玻璃管中,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取血浆于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,备测。

色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μm , 美国);分析柱前接在线过滤器;流动相:乙腈-水-甲酸(35:65:0.1, v/v/v);流速:0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温箱:30 $^{\circ}\text{C}$;进样仓温度:10 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

质谱参数 电喷雾离子化电离源(ESI),源电压:4.9 kV;离子传输毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$;鞘气和辅助气皆为 N_2 ,流速分别为 29,4(ARB);碰撞气氩气(Ar_2),流速 1.5(ARB),二级碰撞能量分别为 34 eV(LXT-101)和 16 eV(内标);正离子方式检测;扫描方式为选择反应监测(SRM),用于定量分析的离子对分别为 m/z 472.2 \rightarrow m/z 587.9(LXT-101)和 m/z 502.8 \rightarrow m/z 633.9(¹²⁷I-LXT-101,内标)。扫描时间为 3 min。

储备溶液配制 精密称取 LXT-101,用流动相配制成 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,内标化合物用流动相配制成 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,置于 Eppendorf 管中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

标准曲线和质量控制(QC)样品 用空白犬血浆稀释储备液为系列浓度 0.5, 1.0, 10.0, 50.0, 250.0 和 500.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,QC 样品分别配制高、中、低(250, 10.0 和 1.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度($n=6$),在方法学验证中,用以计算精密度、准确度、回收率及其基质效应,线性浓度样品及其 QC 样品按“血浆样品处理”项操作。

血浆样品处理 精密取血浆 0.3 mL,置 Eppendorf 管中,加入内标溶液(600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50 μL ,混匀。加入乙腈溶液 0.6 mL 沉淀,涡旋振荡 1 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min,上清液转移至干净的 Ep 管中,于离心浓缩仪 37 $^{\circ}\text{C}$ 挥干,残渣用流动相 200 μL 复溶,涡旋混合,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 20 μL 进样。

数据处理 根据所测 LXT-101 血浆浓度-时间数据,利用 DAS 2.1 软件,计算其主要药代动力学参数。

结果

1 质谱分析

LXT-101(图1)为10个氨基酸的小肽化合物,在ESI条件下,流动注射模式全扫描可得到多电荷峰,即 $[M+3H]^{3+}$ (m/z 472.1)、 $[M+2H]^{2+}$ (m/z 707.7)(图2)。LXT-101的三电荷 m/z 数由理论计算可得 $(1\ 413+3)/3=472.0$,二电荷 m/z 数由理论计算可得 $(1\ 413+2)/2=707.5$,理论值与实测值完全吻合;内标化合物同理计算可得。由于 $[M+3H]^{3+}$ 响应信号强于 $[M+2H]^{2+}$ 而且稳定,选择 $[M+3H]^{3+}$ 为母离子。在优化好的CID条件下,轰击母离子得到子离子有 m/z 170、 m/z 153和 m/z 587.9,选择子离子 m/z 587.9,空白血浆中内源性物质无干扰,所以用于定量分析的离子反应为 m/z 472.1 \rightarrow m/z 587.8。LXT-101和内标色谱图一级和二级质谱图如图2所示。

2 方法专属性

按“血浆样品处理”项操作,得到色谱图,如图3所示。在上述色谱条件下,LXT-101和IS的保留时间分别为1.45 min和1.55 min。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物的测定。

3 标准曲线

应用Lcquan 2.0数据处理系统,以LXT-101与内标峰面积比值对LXT-101浓度进行线性回归,所得回归方程为 $Y = -0.002\ 670 + 0.013\ 96X$, $r^2 = 0.995\ 7$ (权重系数 $1/x^2$, $n=6$)。LXT-101质量浓度在 $0.5 \sim 500.0\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时线性良好,可满足Beagle犬低剂量($20\ \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)给药后血浆样品中药物浓度的测定。

4 基质效应和绝对回收率

将QC样品测得的峰面积与空白基质加入对照品溶液峰面积之比,计算方法的绝对回收率;上述空

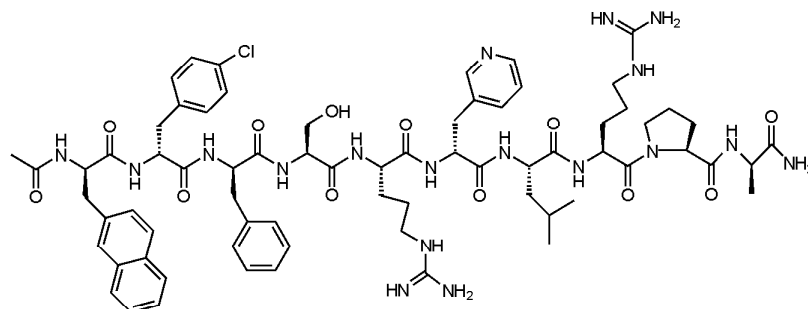


Figure 1 Structure of LXT-101

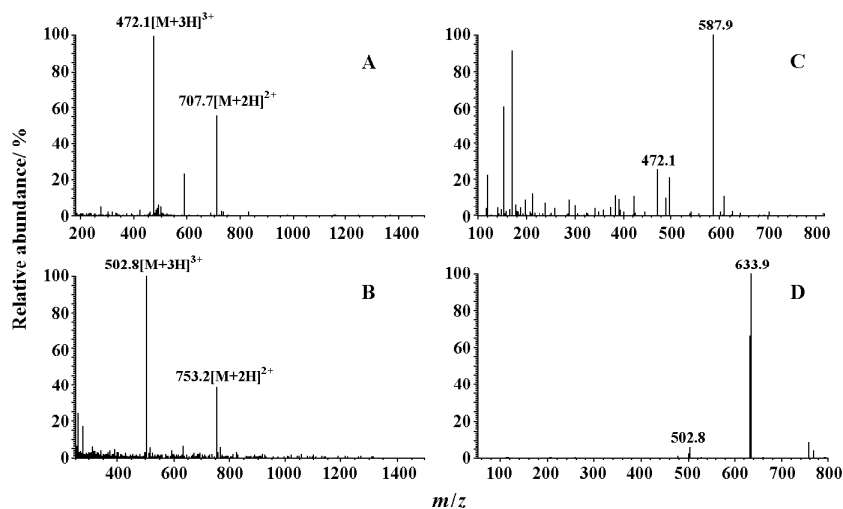


Figure 2 A: Q1 full-scan mass spectrum of LXT-101; B: Q1 full-scan mass spectrum of internal standard (^{127}I -LXT-101, IS); C: Product ions scan of the $[M+3H]^{3+}$ ion of LXT-101 at m/z 472.1 at a collision energy of 34 eV; D: Product ions scan of the $[M+3H]^{3+}$ ion of IS at m/z 502.8 at a collision energy of 16 eV

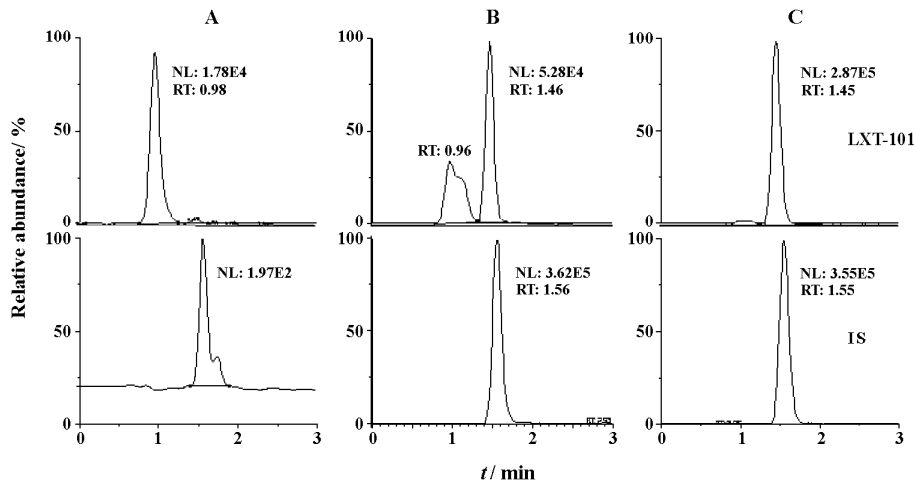


Figure 3 SRM chromatograms of m/z 472.2→587.9 (LXT-101) and m/z 502.8→633.9 (IS). A: A blank plasma; B: A blank plasma sample spiked with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of LXT-101 and IS; C: A plasma sample obtained 1 h after im administration of LXT-101 ($20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

白基质加入对照品溶液峰面积与对应浓度的 LXT-101 对照溶液测得的峰面积之比, 计算方法的基质效应, 结果见表 1。LXT-101 在 3 个浓度的 QC 样品的绝对回收率分别为 90.7%、90.4% 和 85.2%。相同的方法测定内标的提取回收率为 99.1%, 基质效应为 41.5%。

Table 1 Matrix effect and recovery of LXT-101 in plasma ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Concentration / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	LXT-101/%		IS/%	
	Absolute recovery	Matrix effect	Absolute recovery	Matrix effect
1.0	90.7 ± 9.5	36.8 ± 2.4		
10.0	90.4 ± 7.8	27.4 ± 2.1	99.1 ± 8.8	41.5 ± 2.4
250.0	85.2 ± 3.6	26.5 ± 1.7		

5 方法精密度和准确度

质控样品低、中、高 3 个浓度, 每一个浓度分别配制 6 份, 按“血浆样品处理”项操作, 上述 3 个浓度的血样, 于一日内测定, 连续 3 日测定, 每批次做随行标准曲线, 计算日内、日间精密度和准确度, 结果日内精密度分别为 5.3%、4.6% 和 10.9%; 日间精密度分别为 5.0%、3.3% 和 6.5%。准确度 (RE) 在 $\pm 1.8\%$ 内。

6 样品稳定性试验

3 个浓度的 QC 样品 ($n=3$), 分别进行反复冻融 2 次, $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ 冻存 1 d 和 10 d, 及其经过处理后,

复溶样品在进样仓放置 8 h 的稳定性试验。结果证明低、中、高 3 个浓度的血浆样品的准确度的标准偏差小于 $\pm 6.3\%$, 稳定性良好。

7 方法稳定性试验

在测定未知样品过程中, 随行测定低、中、高 3 个浓度的 QC 样品, 使其均匀分布在未知样品测试顺序中, 以考察方法的稳定性。结果 3 个浓度 QC 样品的相对标准偏差小于 11.0%, 符合体内药物分析的要求。

8 药时曲线和药代动力学参数

采用 HPLC-MS/MS 法测定 Beagle 犬单剂量 ($20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 肌注后血药浓度, LXT-101 平均血药浓度-时间曲线见图 4。用 DAS 2.1 软件进行处理, 结

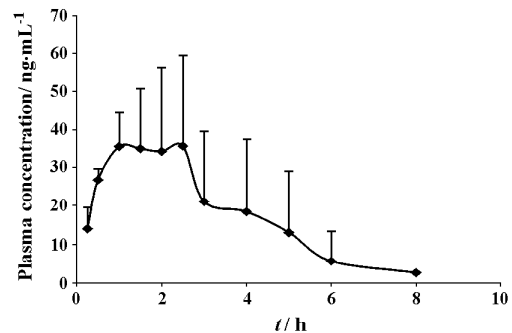


Figure 4 Representative curve of LXT-101 average concentrations versus time profiles in Beagle dog plasma at dose of $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

果表明 LXT-101 在 Beagle 犬体内代谢过程符合两室模型,其主要药代动力学统计参数见表 2。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of LXT-101 in Beagle dog after im administration of $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Value
$\text{AUC}_{0-8\text{h}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	176.8 ± 116.7
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	184.6 ± 125.0
$\text{MRT}_{0-8\text{h}}/\text{h}$	2.52 ± 0.53
$T_{1/2}/\text{h}$	1.4 ± 0.3
T_{max}/h	1.8 ± 0.7
$\text{CL}/\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.16 ± 0.09
$C_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	50.1 ± 25.3
$V_d/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.30 ± 0.16

讨论

内标法定量肽类化合物,多选用稳定同位素^[8]或是同类化合物^[9]为内标,本研究采用¹²⁷I-LXT-101 为内标,它是将 LXT-101 中一个氨基酸的 Cl 用 I 替代,两者理化性质接近,所以提取回收率和基质效应接近,且没有同位素的污染,是一个较为理想的内标化合物。

肽类化合物生物样品的前处理,通常采用固相萃取(SPE)^[10]、蛋白沉淀法^[11]。本研究中分别尝试了 SPE、直接沉淀蛋白和液-液萃取法,都可以测到目标化合物,从结果看,乙腈直接沉淀蛋白前处理更加简便。优化不同比例的乙腈沉淀量,当血浆-乙腈为 1:2 时信号最强,乙腈增加,信号会降低,这可能是因为随着乙腈量增多,蛋白沉淀过程中,部分药物会被吸附。上述前处理方法能满足灵敏度的要求。

本文方法前处理操作简单、取样量少,灵敏度高、专属性强,且血浆中内源物对测定无干扰,经方法学考察确证其回收率和日内、日间精密密度均符合生物样品测定的要求,满足低剂量 Beagle 犬给药后体内药代动力学的研究。

肽类化合物在体内各种酶的作用下可快速降解,导致生物利用度低,半衰期短。从 LXT-101 药代动力学参数分析: $T_{1/2}$ 为 $(1.4 \pm 0.3) \text{h}$,与体内内源性 GnRH 相比较长。现正在进行药代-药效的相关性研究。药代动力学的研究结果将为该药进一步药

效研究提供体内依据。

References

- [1] Zhang YP. Improvement in the research of GnRH system of extra-hypothalamic-pituitary axis [J]. Acta Acad Med CPAPF (武警医学院学报), 2004, 13:424-428.
- [2] Chillik C, Acosta A. The role of LHRH agonists and antagonists [J]. Reprod Biomed Online, 2001, 2:120-128.
- [3] Wong SL, Lau DT, Baughman SA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel depot formulation of abarelix, a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist, in healthy men ages 50 to 75 [J]. J Clin Pharmacol, 2004, 44:495-50.
- [4] Chi XL, Zhou WX, Cheng JP, et al. *In vivo* characterization of a novel GnRH (gonadotropin-releasing hormone) antagonist, LXT-101, in normal male rats [J]. Regul Pept, 2006, 136:122-129.
- [5] Erb K, Klipping C, Duijkers I, et al. Pharmacodynamic effects and plasma pharmacokinetics of single doses of cetrorelix acetate in healthy premenopausal women [J]. Fertil Steril, 2001, 75:316-323.
- [6] Lizio R, Klenner T, Borchard G, et al. Systemic delivery of the GnRH antagonist cetrorelix by intratracheal instillation in anesthetized rats [J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 9:253-258.
- [7] Schwahn M, Schupke H, Gasparic A, et al. Disposition and metabolism of cetrorelix, a potent luteinizing hormone-releasing hormone antagonist, in rats and dogs [J]. Drug Metab Dispos, 2000, 28:10-20.
- [8] Chang D, Kolis SJ, Linderholm KH, et al. Bioanalytical method development and validation for a large peptide HIV fusion inhibitor (Enfuvirtide, T-20) and its metabolite in human plasma using LC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38:487-496.
- [9] Stokvis E, Rosing H, Lo'pez-La'zaro L, et al. Quantitative analysis of the novel decapeptide anticancer drug Kahalalide F in human plasma by high-performance liquid chromatography under basic conditions coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2002, 37:992-1000.
- [10] Niwaa M, Enomoto K, Yamashita K. Measurement of the novel decapeptide cetrorelix in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 1999, 729:245-253.
- [11] Wilbert SM, Engrissei G, Yau EK, et al. Quantitative analysis of a synthetic peptide, NR58-3.14.3, in serum by LC-MS with inclusion of a diastereomeric internal standard [J]. Anal Biochem, 2000, 278:14-21.