康维讯生物 KANWHISH

官方微信公众号

康维讯生物官网 www.kanwhish.com

基于LC-MS/MS方法的光敏剂DVDMS在小鼠体内的组织分布研究

范琳资[1]，栾洁[1]，刘源振[1,*]，邹灵龙[1,*]

[1]康维讯生物科技有限公司，苏州，215104

*E-mail: yuanzhen.liu@kanwhish.com, linglong.zou@kanwhish.com

背景：DVDMS（华卟啉钠）是一种新型光敏剂，其结构特征为以醚键结合的卟啉二聚体钠盐。与早期的光敏剂如Photofrin相比，DVDMS的有效剂量仅为Photofrin的1/10，治疗后避光时间预计缩短为3～7天，这使得DVDMS在临床应用中具有更好的安全性和便利性。随着研究的深入，科学家们发现了DVDMS的声敏性，这使得DVDMS介导的声动力治疗（SDT）成为可能，进一步拓展了其在肿瘤治疗领域的研究和应用范围。DVDMS在膀胱癌治疗中的应用可能会为患者提供一种新的治疗选择。通过光动力疗法或声动力疗法，DVDMS能够精确地定位并破坏肿瘤细胞，同时减少对周围正常组织的损害。此外，DVDMS的声敏性为其在深部肿瘤治疗中提供了可能性。随着对DVDMS体内分布特征的研究深入，期望能够揭示其在膀胱癌组织中的靶向富集能力，以及是否能够有效减少在非靶组织中的积累，从而降低副作用，提高治疗指数。鉴于膀胱癌的高发率和治疗挑战，DVDMS作为一种具有潜力的新型治疗药物，其组织分布特征的研究对于推动膀胱癌治疗领域的进步具有重要意义，有望为膀胱癌患者带来新的治疗希望。

目的

通过在MB49-Luc膀胱癌细胞原位同种移植C57BL/6小鼠体内经尿道膀胱灌注给予供试品DVDMS，利用液质联用技术（LC-MS/MS）检测DVDMS在荷瘤小鼠体内的18种组织中药物浓度，揭示DVDMS注射液在小鼠体内的组织分布特征。

实验方法

检测条件

液相系统： Shimadzu Nexera LC-40

质谱系统： AB SCIEX QTRAP 6500+

色谱柱： Agilent PLRP-S 300 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm

流动相： 流动相A：含有1mg/mL抗坏血酸的水溶液；流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液。以0.8 mL/min的流速进行洗脱。

洗脱梯度： 0-0.50 min：90%B；1-1.6 min：100%B；1.61-2 min：90%B；

柱温： 40 ℃

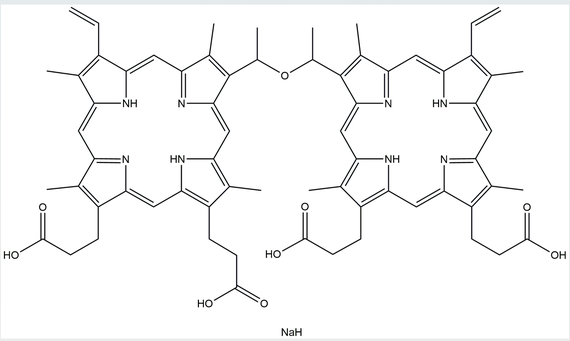
进样量： 1 µL

出峰时间： 1.20 min (IS)、1.39 min (DVDMS)

表1 目标待测物DVDMS和内标物的质谱条件

化合物	Q1 Mass(m/z)	Q3 Mass(m/z)	Dwell Time(ms)	DP	CE
DVDMS	1143.3	563.3	200	180	88
Testosterone-[^{13}C3]	292.3	100.1	200	180	30

图1 目标待测物DVDMS化学结构



样品前处理

a. 在室温黄光灯条件下解冻组织样品，精密称量，按照1mg：20 µL的比例加入组织匀浆液（含有3 mg/mL抗坏血酸的甲醇-水溶液（10:90，*v/v*）），充分匀浆，离心取上清。血浆样本，常温下解冻，以1：1的比例加入组织匀浆液混匀。

b. 分别取50.0 µL上述样本溶液，加入10.0 µL内标工作溶液（100 ng/mL），再加入140 µL乙腈 (含0.1%甲酸)，涡旋振荡10 min；离心取上清液50 µL于深96孔板中，加入50 µL DD水（含有3 mg/mL抗坏血酸），涡旋振荡3 min后准备进样。

实验结果

方法学验证

对开发的测定小鼠血浆及17种组织（包括肿瘤、眼球、皮肤、心脏、肺、肝、脾、肾、脑、食管、胃壁、小肠、脂肪、膀胱、子宫和卵巢）中DVDMS含量的方法进行了验证，验证内容涵盖特异性、标准曲线与测定范围、残留、准确度、精密度、稀释效应可靠性、基质效应及提取回收率等，旨在确保满足实验样本的测定需求。验证结果表明该方法符合《中国药典》附录9012《生物样本定量分析方法验证指导原则》及 ICH M10 《生物分析方法验证及样品分析》的相关要求。

图2 目标待测物DVDMS质谱裂解图

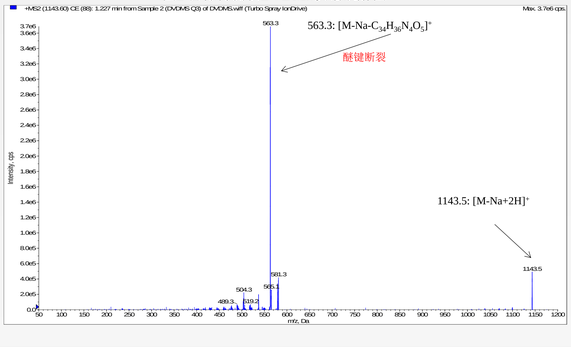


图3 DVDMS色谱图

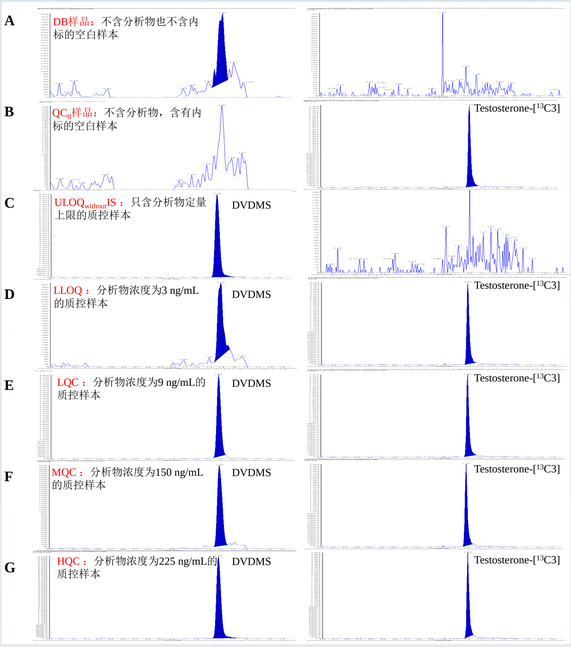
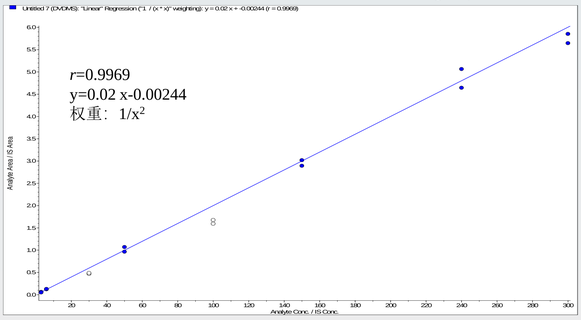
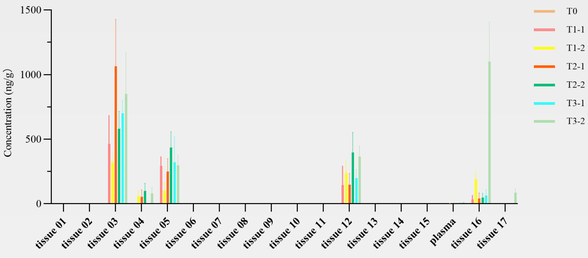


图4 骨骼肌基质中DVDMS标准曲线（3-300 ng/mL）



检测结果

图5 试验样本分析结果



讨论及结论

DVDMS是一种光敏剂，其生物分析方法开发面临稳定性差、样品残留、基质效应等挑战：

- 实验全程在黄光灯下及冰上操作，最大限度减少整个过程中温度和光源对于DVDMS的稳定性的影响。
- 在组织样品的匀浆过程中，在匀浆液中加入抗坏血酸后整体匀浆，延长组织样本的有效保存时间。
- DVDMS工作液存在不稳定的问题，最初使用甲醇（含有3 mg/mL抗坏血酸）、50%甲醇（含有3 mg/mL抗坏血酸），发现DVDMS在酸性条件下析出。抗坏血酸浓度降低，则工作液稳定性变差。最终使用甲醇-DMSO溶液（30:70，*v/v*，含有3 mg/mL抗坏血酸）溶解标准品，包裹锡箔纸，存放于-20°C。
- DVDMS样品在检测过程中存在不稳定的问题，使用含有1mg/mL抗坏血酸的水溶液（流动相A）/0.1%甲酸的乙腈溶液（流动相B）作为洗脱溶液。
- 为了保证DVDMS的稳定性，采用的高酸度体系对常规的C18柱产生腐蚀，使用无键合相的聚合物型色谱柱（Agilent PLRP-S 300 Å色谱柱）进行分析。

本研究建立并验证了UPLC-MS/MS法定量检测小鼠组织中DVDMS的浓度，该方法在3.0-300 ng/mL范围内具有良好的线性关系，精密度和准确度、选择性、残留、基质效应等均符合生物样品分析相关指导原则的要求，并成功应用于DVDMS的药代动力学研究。

© 2024 CBF China