文章编号: 1674 - 7054(2019) 01 - 0083 - 06

反相高效液相色谱法对小鼠血清中基因重组人促肾上腺皮质激素前体及其代谢物的测定

武新丽[1,2],韦双双[1,2],裴业春[1,2,3],赵景锋[1,2],王大勇[1,2]

(1. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室,海口 570228;
2. 海南大学 热带农林学院生物学院 生物技术与分子药理实验室,海口 570228;
3. 海南大学 热带农林学院 动物科技学院,海口 570228)

摘 要: 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC) 法测定分析静脉注射基因重组人促肾上腺皮质激素(ACTH) 前体蛋白(ProACTH141) 后小鼠血清中 ProACTH141 及其代谢产物 ACTH(1 - 39) 的含量变化。结果表明,ProACTH141 的半衰期($T_{1/2}$) 为 21.9 min; 其代谢物 ACTH(1 - 39) 在血清中的达峰时间(T_{max}) 为 20 min。ProACTH141 和代谢产生的 ACTH(1 - 39) 的药时曲线下面积(AUC) 分别为 538.2 和 88.2 (mg · L^{-1}) · min^{-1}。该方法操作简便,灵敏度高,结果准确,可用于基因重组人促肾上腺皮质激素前体蛋白的药物代谢动力学分析。

关键词: 基因重组; 人促肾上腺皮质激素; ACTH; 前体; HPLC

中图分类号: R 917 **文献标志码:** A DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.2019.01.014

促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotropic hormone,ACTH) 又称为促皮质素(Corticotropin) ,是由 39 个氨基酸构成的多肽激素,主要由垂体前叶分泌,也发现于下丘脑、肾上腺髓质等组织[3-4]。ACTH 能够调控糖皮质激素(GC) 的合成与分泌,影响糖、脂肪和蛋白质的合成与代谢,调节心脑血管功能,提高机体抵抗力,促进神经损伤恢复与再生,还具有抗炎、免疫抑制、抗毒素、抗休克等作用。ACTH 是治疗两岁以下婴儿惊厥症的唯一特效药,该病发病率为 0.5% ~1%,6% ~33% 的婴儿惊厥症患儿在 3 岁前死亡,70% ~90% 患儿智力发育缓慢,30% 发展为自闭症。除此之外,ACTH 也用于红斑狼疮、多发性硬化病急性恶化、肾病综合征、全身性皮肌炎和结节病的治疗,以及银屑病关节炎、风湿性关节炎、强直性脊柱炎以及严重眼部过敏和炎症等的辅助治疗[5]。ACTH 的半衰期很短,约为 10 min,需要反复大量用药[6]。目前,国内临床应用的 ACTH 由家猪的脑垂体中提取,容易传播动物病毒和支原体。人工合成的 ACTH(1 - 24) 的体内半衰期更短,并且工业化生产成本高,未见药用。ACTH(1 - 39) 的前体蛋白是鸦片样肽促黑激素促皮质激素原(Propiomelanocortin,POMC) ,天然存在酶切底物序列(POMCst) ,在体内逐步被丝氨酸内切酶——激素原转化酶 1(Prohormone convertase 1,PC1) ,PC2 和 PC3 水解,释放出 ACTH(1 - 39)[7-9]。此外,POMC 经蛋白酶酶切还可以产生其他多种代谢产物,包括 γ - 促脂素、γ3 - 促黑素和 γ1 - 促黑素等[10-11]。在前期实验中,本试验室构建了多种基因重组人促肾上腺皮质激素前体蛋白,其中一种由 141 个氨基酸构成的 ACTH 前体蛋白(ProACTH141) 在血液中比 ACTH 更加稳定,并且具有良好的药理作用。在 ProACTH141 的结构中 ACTH 的 N 末端增添了一段多肽链,可以防止具有药理活性的 N 末端被氨肽酶快速降解,从而降低微生物表达过程中的降解速度; 延长药物的体内半衰期,减少给药次数和剂量。基因工程制药法还可以避免传播动物病毒的潜在风险。研究目的是探讨采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)

收稿日期: 2018 - 11 - 22 **修回日期:** 2018 - 12 - 24
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31460226) ; 海南省自然科学基金(317039)
作者简介: 武新丽(1989 -) ,女,海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生. E-mail: 2465508435@qq.com
通信作者: 王大勇(1972 -) ,男,教授,博士,博士生导师. 研究方向: 生物技术与分子药理学. E-mail: wangdy@hainu.edu.cn

法同时测定在一定的时间内小鼠血清中重组人促肾上腺皮质(ACTH)激素前体蛋白(ProACTH141)及其代谢产物 ACTH(1-39)的实验方法,用于分析 ACTH 前体蛋白质的药物代谢动力学特性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津)、ME204E/02 电子天平(梅特勒-托利多仪器公司)、PS-40 超声波清洗仪(深圳超艺达科技有限公司)。ACTH(1-24)(批号:human-20180810,纯度≥95.0%,生工生物工程有限公司),ACTH(1-39)(批号:P14976-20171124,纯度≥95.0%,生工生物工程有限公司),乙腈和三氟乙酸(色谱纯,北京迈瑞达科技有限公司)。SPF 级昆明种雄性小鼠(5 周龄)(海南省实验动物中心)。

1.2 载体构建 针对 BL21-DE3 基因工程菌密码子偏好性,优化 HisTag-EKst-ProACTH141 cDNA 核苷酸序列,并在 5′端添加 NdeI 酶切位点,在 3′端添加 SalI 酶切位点,人工合成 cDNA。合成的 cDNA 经 NdeI 和 SalI 双酶切。回收 cDNA 酶切片段连接至同样双酶切的 pET21a 载体,以构建 pET21a-HisTag-EKst-Pro-ACTH141 原核表达质粒。

1.3 HisTag-EKst-ProACTH14 蛋白原核表达 将构建好的原核表达质粒 pET21a-HisTag-EKst-Pro-ACTH141 转化入 BL21-DE3 工程菌感受态细胞,复苏 2 h 后接种到含有阳性筛选抗生素的 LB 半固体培养基,37 °C 培养 16 h 后挑取单克隆菌落至 50 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养,37 °C,180 r·min^{-1}振荡过夜。按 1∶50 接种到 250 mL 的含有氨苄青霉素的 LB 液体培养,OD_{600} = 0.6~0.8。移取 1 mL 菌液作为非诱导对照,剩余菌液加入 IPTG(终浓度 0.1 mmol·L^{-1}),37 °C 诱导表达 5 h 后采样,SDS-PAGE 电泳并考马斯亮蓝染色检测表达量。

1.4 HisTag-EKst-ProACTH141 蛋白的纯化 诱导表达后的菌液经 6 000 r·min^{-1}离心 15 min 收集菌体,每克湿重加入 8 mL 非变性裂解液(50 mmol·L^{-1} Tris-HCl,300 mmol·L^{-1} NaCl,10 mmol·L^{-1}咪唑,pH 8.0)缓慢洗涤菌体。6 000 r·min^{-1},4 °C 离心 10 min 收集沉淀,反复洗涤 3 次。将菌液置于冰上,用超声破碎仪破碎菌体,破碎功率为 400 W,破碎 3 s,暂停 5 s,反复破碎至菌液澄清。6 000 r·min^{-1},4 °C 离心 20 min,收集合并上清液,用镍柱纯化 HisTag-EKst-ProACTH141 蛋白质。

1.5 肠激酶酶切及 ProACTH141 蛋白的纯化 测定纯化后的 HisTag-EKst-ProACTH141 蛋白浓度,1 U 肠激酶(EK)催化水解 50 μg 融合蛋白,1 μL≈3.3 U。带 His 标签的肠激酶溶解于酶切缓冲液(25 mmol·L^{-1} Tris-HCl,pH 7.6,50 mmol·L^{-1} NaCl,2 mmol·L^{-1} $CaCl_2$),25 °C 温育 16 h,切割约 95% 样品中的 HisTag-EKst-ProACTH141 多肽链,得到游离的 ProACTH141 以及 HisTag-EKst 片段。用平衡缓冲液(50 mmol·L^{-1} NaH_2PO_4,300 mmol·L^{-1} NaCl,10 mmol·L^{-1}咪唑,pH 8.0)平衡 Ni 柱,将 EK 酶切后的样品液缓慢加至 Ni 柱中,流出液即为纯化的 ProACTH141 目的蛋白质。

1.6 小鼠处理 5 周龄昆明种雄性小白鼠随机分为 2 组,分别为对照组和 ProACTH1411 实验组,每组 12 只。实验组尾静脉注射 ProACTH141,剂量为 56 pmol·g^{-1},对照组注射等体积生理盐水。注射 1,5,10,15,20,30,45,60,80 和 100 min 后摘眼球采血,4 °C,4 000 r·min^{-1}离心 10 min,收集血清[12]。

1.7 标准品溶液的制备 分别称取适量纯度超过 95% 的 ACTH(1-24),ACTH(1-39)和 ProACTH141 冻干粉,溶解于 0.1% TFA 溶液,通过预实验确定每种多肽或蛋白质标准品的保留时间。以浓度为 0.3 mg·mL^{-1} ACTH(1-24)作为定量标准品。

1.8 样品预处理 取 2 μL ACTH(1-24)储备液加入 298 μL 血清中,加入 600 μL 乙腈充分振荡 10 min,5 000 r·min^{-1}离心 10 min 弃去上清。缓慢吹入氮气挥去乙腈,加入 298 μL 0.1% TFA,振荡使其充分溶解,再次离心后取上清,以 0.45 μm 针头式滤器过滤[13-14]。

1.9 色谱条件 色谱柱:Inertsil® C18 柱(4.6×150 mm,Ø 5 μm),流速:1.0 mL·min^{-1},进样体积:20 μL,柱温:室温,检测波长:280 nm,流动相:0.1% 的 TFA(A)-含 0.1% TFA 的乙腈(B)梯度洗脱液[15],梯度程序见表 1。

表 1　HPLC 梯度洗脱程序

Tab. 1　Gradient elution program for HPLC

时间 t / min	0.1% 的 TFA (A) /%	含 0.1% TFA 的乙腈(B) /%
0.01	95	5
0.01 ~ 25	95 ~ 35	5 ~ 65
25 ~ 32.01	35 ~ 5	65 ~ 95

3　结果与分析

3.1　载体构建　重组质粒 Nde Ⅰ **和** Sal Ⅰ **双酶切,琼脂糖凝胶电泳,条带大小和预测大小(**477 bp**) 相符(图** 1A**)**。

3.2　ACTH141 蛋白诱导表达及镍柱亲和层析纯化　诱导物 IPTG **终浓度为** 0.1mmol·L^{-1}**,大肠杆菌在** 37 °C **诱导表达** 5 h **后,**SDS-PAGE **电泳结果表明上清液中存在较大量** HisTag-EKst-ProACTH141 **蛋白(表观相对分子质量约** 25×10^3**),并且纯化效果良好(图** 1B**)**。

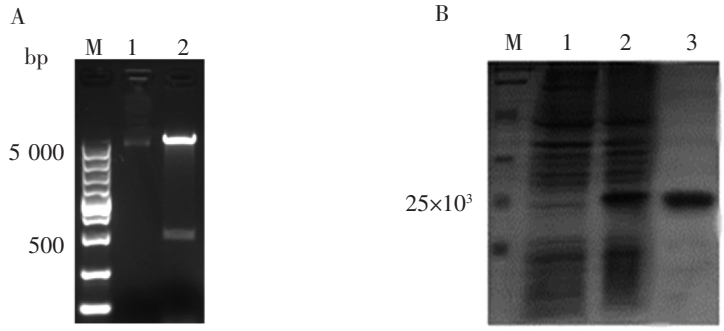

图 1　重组质粒 pET21a-HisTag-EKst-ProACTH141 **双酶切鉴定及蛋白的原核表达及纯化结果**

A. **重组质粒用** NdeI **和** SalI **内切酶双酶切鉴定结果。**M: DNA **分子量标记; 泳道** 1: pET21a-HisTag-EKst-ProACTH141 **重组质粒; 泳道** 2: pET21a-HisTag-EKst-ProACTH141 **双酶切。**B. IPTG **诱导表达** HisTag-EKst-ProACTH141 **蛋白电泳图谱。**M: **蛋白质分子量标记; 泳道** 1: **未诱导表达对照组; 泳道** 2: IPTG **诱导表达后的菌体裂解上清液; 泳道** 3: **镍柱亲和纯化的** HisTag-EKst-ProACTH141 **蛋白**

Fig. 1　1Double digest of recombinant pET21a-HisTag-EKst-ProACTH141 plasmid and prokaryotic expression and purification of the protein

A: Double digest of the recombinant plasmid with NdeI and SalI. M: DNA marker. Lane 1: pET21a-HisTag-EKst-Pro-ACTH141 recombinant plasmid. Lane 2: pET21a-HisTag-EKst-ProACTH141 plasmid double digested. B: Electrophoresis of HisTag-EKst-ProACTH141 protein expressed with IPTG induction. M: Protein marker. Lane 1: Lysate of bacteria not treated with IPTG. Lane 2: Lysate of bacteria treated with IPTG. Lane 3: HisTag-EKst-ProACTH141 protein purified by a nickel column from the lysate of bacteria treated with IPTG.

3.3　肠激酶酶切及 ProACTH141 **蛋白的纯化**　HisTag-EKst-ProACTH141 **蛋白经带有组蛋白标签的** EK **酶切得到** proACTH141。HisTag-EKst-ProACTH141 **及** ProACTH141 **经** SDS-PAGE(15% Tris-Glycine **聚丙烯酰胺凝胶) 分离,转印到硝酸纤维素膜后用抗体检测,一抗为鼠抗人** ACTH(Abcam) **抗体,二抗为** Alexa488 **标记的羊抗鼠抗体(**Abcam**),用** Typhoon FLA 9500(GE Healthcare) **检测荧光条带,见图** 2 **泳道** 1,2 **所示。**

3.4　ProACTH141,ACTH(1 -39) 及 ACTH(1 -24) 的 RP-HPLC **色谱图**　ProACTH141,ACTH(1-39) **及** ACTH(1 -24) **冻干粉溶解于** 0.1% TFA **中,用配备了** C18 **反相色谱柱的岛津高效液相色谱仪检测** 3 **种蛋白质或多肽的系统保留时间。经测定,**ACTH(1 -24) **的保留时间为(**13.23 ±0.02) min**,**ACTH(1 -39) **的保留时间为(**15.24 ±0.05) min**,**ProACTH141 **的保留时间为(**26.12 ±0.05 min**) (图** 3**)**。

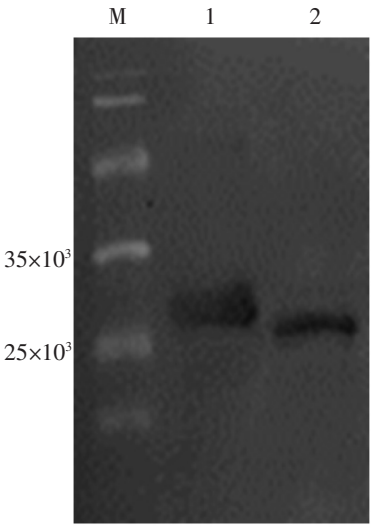

图 2 HisTag-EKst-ProACTH141 及 ProACTH141 蛋白的Western blotting 鉴定结果

M:蛋白相对分子质量标记。泳道 1:HisTag-EKst-ProACTH141 蛋白;泳道 2:经肠激酶酶切并纯化后的 ProACTH141 蛋白

Fig.2 Western blotting of HisTag-EKst-ProACTH141 and ProACTH141 proteins

M: protein marker. Lane 1: HisTag -EKst - ProACTH141 protein. Lane 2: ProACTH141 protein purified after digestion with enterokinase

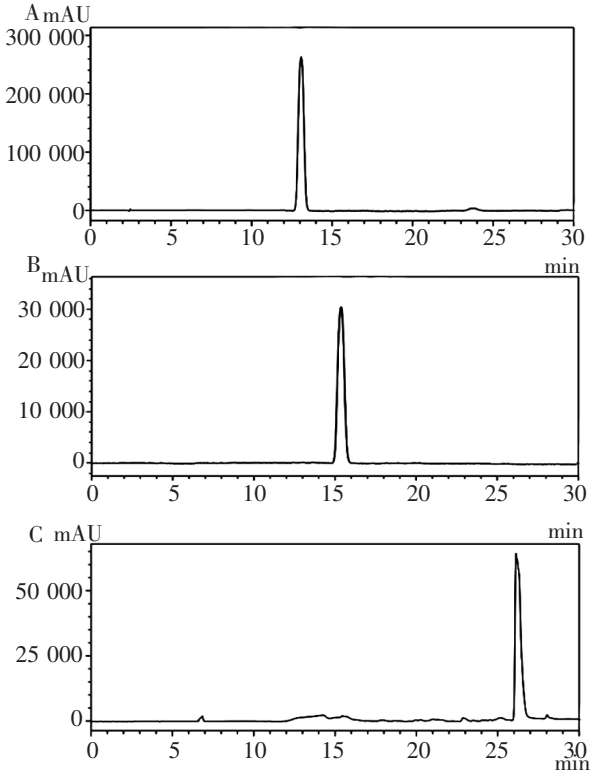

图 3 ACTH(1-24)、ACTH(1-39)及 ProACTH141 的 RP-HPLC 色谱图

A:ProACTH141 的高效液相色谱图;B:ACTH(1–39)的高效液相色谱图;C:ACTH(1–24)的高效液相色谱图

Fig.3 The reversed-phase high performance liquid chromatography of ACTH (1-24)ProACTH141, ACTH (1-39) and ProACTH141

A: Chromatogram of ACTH (1-24); B: Chromatogram of ACTH (1-39); C:Chromatogram of ProACTH141

3.5 不同时间血清中 ProACTH141 及 ACTH(1–39)的含量 尾静脉注射 ProACTH141 蛋白,注射后 1,5,10,15,20,30,45,60,80 和 100 min 快速摘眼球采血。通过 HPLC 反相色谱法测定 ProACTH141 蛋白及其代谢物 ACTH(1–39)在小鼠血清中的含量,ProACTH141 蛋白含量 1 min 时的浓度为 19.01 mg·L^{-1},然后逐渐降低,在 100 min 时恢复到血清基线水平,其半衰期($T_{1/2}$)为 21.9 min。ACTH(1–39)的血清达峰时间(T_{max})约为 20 min,其后逐渐降低。从 1~100 min,ProACTH141 和 ACTH(1-39)的药时曲线下面积(*AUC*)分别为 538.2 和 88.2 (mg·L^{-1})·min^{-1}。

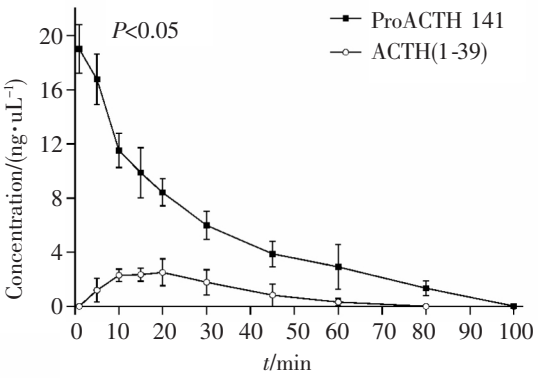

图 4 ProACTH141 和 ACTH(1–39)在小鼠血清中的含量变化

曲线分别代表血清中 ProACTH141 和 ACTH (1-39)的浓度,*P<0.05*,*n=12*, 采用双因素方差分析法检测两组间差异显著性

Fig. 4 Concentrations of ProACTH141 and ACTH (1-39) proteins in mouse blood serum

Different curves represent concentrations of ProACTH141 and ACTH (1-39) in the blood serum, *P*<0.05, *n*=12. A two-way ANOVA test was used for statistical analysis

3 讨 论

ACTH 是治疗小儿痉挛症的唯一特效药,目前国内仅有一家生化药厂从动物脑垂体中提取生产,成本较高,供不应求[16]。美国同类药品 Acthar 单剂(5 mL)价格超过 4 万美元(CVS Pharmacy/Walgreens,2018.11)。人体内天然存在识别 POMC 酶切底物序列(POMCst)

的蛋白酶,包括 PC1,PC2 和 PC3。其酶切过程分为 3 个部分。(1) PC1 和 PC3 可酶切得到 β-促脂素和 ACTH 前体 2 段多肽链。(2) PC1,PC2 和 PC3 共同发挥作用,PC1,PC3 识别 ACTH 前体中的酶切位点,PC2 识别 β-促脂素中的酶切位点。(3) PC2 发挥酶切作用释放出具有生物活性的短肽[18]。POMC 在 3 种蛋白酶作用下,逐渐水解释放出游离的 ACTH(1-39)。针对这一酶切特性,笔者设计表达了多种 ACTH 前体药物,一方面考察不同长度的 ACTH 前体是否具有与 ACTH 相同的药理作用,另一方面考察它们的药物代谢动力学特性,包括 $T_{1/2}$,T_{max}和 AUC。前期预实验中发现包含 141 个氨基酸的 ACTH 前体蛋白 Pro-ACTH141 不但具备良好的药效,并且在血液中的半衰期较长,发挥药效的时间长于 ACTH(1-39)。本研究采用 RP-HPLC 法测定 ProACTH141 蛋白其 $T_{1/2}$,其结果与预实验的一致,并长于 ACTH(1-39)。

针对待分离的蛋白质,笔者对分析条件作了优化。首先,选择从血液中提取 ProACTH141 及 ACTH(1-39)的溶剂。采用液液萃取法,比较了甲醇、乙腈等多种溶剂对注射到血液中的 ProACTH141 及 ACTH(1-39)的提取效果。其中,乙腈对两者的提取回收率均较高,且色谱峰形对称,故以乙腈作为提取溶剂。其次,选择检测波长。取标准品混合液注入 RP-HPLC,应用 PDA 检测器,在 210 nm 及 280 nm 波长扫描[19],结果显示 3 个成分在 210 nm 和 280 nm 均有较好的紫外吸收,其中 280 nm 紫外吸收高于 210 nm,且基线和峰形较好,干扰少,色谱图较理想,因此选择 280 nm 作为检测波长。第三,流动相的选择。由于血清成分复杂,用组分恒定的流动相难以将 ProACTH141 与 ACTH(1-39)很好地分离而且保留时间较长,因此,本试验采用两种流动相(A 与 B)混合梯度洗脱。通过比较多种流动相系统,确立以 0.1%(V/V) TFA 缓冲液(A)与含 0.1%(V/V) TFA 缓冲液的乙腈溶液(B)混合梯度洗脱,色谱分离度较高,基线平稳。

参考文献:

[1] ANDREJ SLOMINSKY, ANDREZJ SZCZESNIEWSKI, JACOBO WORTSMAN. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Detection of Corticotropin-Releasing Hormone and Proopiomelanocortin-Derived Peptides in Human Skin [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000, 10(2): 3582-3588.

[2] GARDI J, KHALIL W K, VECSEMYKS M. Molecular forms of alpha-melanocyte-stimulating hormone in pheochromocytoma tissue [J]. Endocrine research, 2000, 26(1): 71-79.

[3] ITO N, SUGAWARA K, BODO E. Corticotropin-releasing hormone stimulates the in situ generation of mast cells from precursors in the human hair follicle mesenchyme [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2010, 130: 995-1004.

[4] SLOMINSKY A, WORTSMAN J. Neuroendocrinology of the Skin [J]. Endocrine, 2000, 21(5): 457-487.

[5] SWARON L. WARDLAW. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660(1): 213-219.

[6] MORRIS H, SCANTLEBURY, CHUN KYOUNG-CHUI, et al. Adrenocorticotropic Hormone Protects Learning and Memory Function in Epileptic Kcna1-null mice [J]. Neuroscience Letters, 2017, 645(3): 14-18.

[7] MICHAEL R, PRANZATELLI, TYLER J, et al. Effect of low-dose cyclophosphamide, ACTH, and IVIG combination immunotherapy on neuroinflammation in pediatric-onset OMS: A retrospective pilot study [J]. Official Journal of the European Paediatric Neurology Society, 2018, 22(4): 589-594.

[8] GONG SHUAI, MIAO YI-LONG, JIAO GUANG-ZHONG, et al. Dynamics and correlation of serum Cortisol and Corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice [J]. PLoS ONE, 2015, 2: 2-14.

[9] HUANG YONGLIN, PEI YECHUN, GUANHUAI, et al. Stability and pharmacological effects of gene-recombinant wild type and mutant human Adrenocorticotropic hormone [J]. Springer Science + Business Media New York, 2017, 34: 793-799.

[10] MORTON I K, JUDITH M H. Concise dictionary of pharmacological agents: properties and synonyms [J]. Springer Science & Business Media, 2018, 16: 35-41.

[11] YALOW R S, GLICK S M, ROTH J, et al. Radioimmunoassay of human plasma ACTH [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1964, 24 (11): 1219-1225.

[12] GIRPEN W H, WIEGANT V M, GREVEN H M, et al. The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies [J]. Life Sciences, 1975, 17(4): 645-652.

[13] ITO M, AIBA H, HASHIMOTO K. et al. Low-dose ACTH therapy for West syndrome [J]. Neurology, 2002, 58: 110-114.

[14] 张为民,张利红,马广智,等. 斜带石斑鱼阿片黑素促皮质素原全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 水生生物学报, 2007, 27(6): 625-630.

[15] 丁 冰,杨文玲,许华容,等. HPLC 法测定乙胺吡嗪利福异烟片中有关物质的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2018,35(9):750-755.

[16] 卢金淼. ACTH 对婴儿痉挛症的重要性[N]. 医药经济报,2015-12-23(8).

[17] 白海波,杜继曾. 促肾上腺皮质激素释放激素及去甲肾上腺素对高原鼠兔体液免疫的抑制作用[J]. 兽类学报,1997,17(2):131-135.

[18] CARUSO C,CARNIGLIA L,DURAND D,et al. Melanocortins: Anti-inflammatory and neuroprotective peptides[J]. Neurodegeneration,2012,10:93-120.

[19] KERTESZ V,CALLIGARIS D. Feldman D R,et al. Profiling of adrenocorticotropic hormone and arginine vasopressin in human pituitary gland and tumor thin tissue sections using droplet-based liquid-microjunction surface-sampling-HPLC-ESI-MS-MS[J]. Anal Bioanal Chem,2015,407:5989-5998.

Determination of Recombinant Human Adrenocorticotropic Hormone Precursor Protein and Its Metabolite in Mouse Serum by RP-HPLC

WU Xinli[1,2], WEI Shuangshuang[1,2], PEI Yechun[1,2,3], ZHAO Jingfeng[1,2], WANG Dayong[1,2]

(1. Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
2. Laboratory of Biotechnology and Molecular Pharmacology, College of Biology, Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
3. College of Animal Sciences, Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The concentrations of recombinant human adrenocorticotropic (ACTH) hormone precursor protein (Pro-ACTH141) and its metabolite ACTH (1-39) in mouse blood serum were determined by using a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). In the Rp-HPLC method Inertsil® C18 column (4.6×150 mm, Ø5 μm) was adopted, and ACTH (1-24) was used as an internal standard. Linear gradient elution was performed by proportional mixing of 0.1% TFA buffer (mobile phase A) and acetonitrile containing 0.1% TFA (mobile phase B). HPLC condition: flow rate, 1 mL·min^{-1}; detection wavelength, 280 nm; column temperature, room temperature. Pharmacokinetic analysis showed that the half-life ($T_{1/2}$) of ProACTH141 was 21.9 min and that the peak retention time (T_{max}) of its metabolite ACTH (1-39) in the serum was 20 min. The area under the curves of ProACTH141 and ACTH (1-39) was 538.2 (mg·L^{-1})·min^{-1}. and 88.2 (mg·L^{-1})·min^{-1}, respectively. The RP-HPLC method is easy to operate, and high in sensitivity and accuracy and can hence be used for pharmacokinetic analysis of the recombinant human adrenocorticotropic hormone precursor protein.

Keywords: Gene recombination; human adrenocorticotropic hormone; ACTH; precursor; HPLC

(责任编辑:钟云芳)