

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定细胞裂解物中丙酮酸等五种内源性 化合物含量

LCMSMS-151

摘要：建立一种测定细胞裂解物中的丙酮酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、乙酰辅酶 A、谷氨酰胺五种内源性化合物含量的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS），并采取对细胞进行诱导方法，检测该五种化合物在细胞裂解物含量。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速检测丙酮酸等五种化合物，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用外标法在 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内绘制校准曲线，线性良好，相关系数为 0.9958。对高、中、低三浓度样品进行批次内、批次间精密度考察，RSD % 在 12.68 以下。

关键词：丙酮酸；细胞裂解液；乙酰辅酶 A；超高效液相色谱串联质谱法

细胞液中存在很多种内源性化合物，内源性化合物直接参与生物体的促进、调节、协同、抑制、循环等作用，因此该类化合物在细胞液中含量的变化可能直接影响生物体的运转，造成病变或产生治疗作用。丙酮酸，直接参与生物体的糖代谢、胶质、氨基酸、蛋白质等的生物合成、代谢、醇的发酵等； α -酮戊二酸是微生物三羧酸循环中重要的代谢中间产物，连接细胞内 C-N 代谢的关键节点；柠檬酸是生理中将脂肪、蛋白质和糖转化为二氧化碳的过程中的重要化合物，这些反应是几乎所有代谢的核心反应，为生物提供能量；乙酰辅酶 A 是能源物

质代谢的重要中间代谢产物，是合成脂肪酸、酮体等能源物质的前体物质，也是合成胆固醇及其衍生物等生理活性物质的前体物质；谷氨酰胺在克雷布斯循环中作为一种非碳水化合物的能量来源，被转化为谷氨酸并生成三磷酸腺苷（ATP）。

在 LCMSMS 发展之前，通常采用 HPLC 的方法进行检测，但一些极性化合物通常会较严重地影响这类极性较大的化合物的测定。现使用 LCMSMS 进行检测以减少基质里极性化合物对目标化合物检测的影响。

实验部分

1.1 药物

丙酮酸对照品（批号 1130639-39387，纯度为 98 %）购自阿拉丁； α -酮戊二酸对照品（批号 YY12243，纯度 ≥ 99 %）和乙酰辅酶 A 对照品（批号 100008-200505，纯度 ≥ 93 %）购自上海源叶生物科技有限公司；柠檬酸对照品；谷氨酰胺对照品（批号 100968-201001，纯度为 100 %）购自中国药品生物制品检定所。

1.2 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 \times 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）；Heraeus Pico 21 离心机（Thermo Scientific，德国）。

1.3 试剂

脲购自美国 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；乙酸铵为分析纯，购自北京化学试剂公司。

方法和结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称取约 1.0 mg 丙酮酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、乙酰辅酶 A、谷氨酰胺对照品，置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解定容，制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液，等比稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

2.2 生物样品处理方法

本取细胞裂解液 200 μL ，加入 300 μL 甲醇沉淀蛋白，14800 rpm 离心 15 min，40 $^{\circ}\text{C}$ N_2 流吹干，200 μL 流动相复溶，过 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.3 色谱条件

色谱柱采用岛津 Shim-pack XR-ODSII 75 mm \times 2mm，2.2 μm 。色谱条件为流动相 20 mM 乙酸铵

水溶液(A)–乙腈(B)=98:2；流速：0.5 mL/min；柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：5 μL ；

2.4 质谱条件

离子化模式：ESI(-)
 离子喷雾电压：3.0 kV
 雾化气：氮气 3.0 L/min
 干燥气：氮气 15 L/min
 碰撞气：氩气
 DL 温度：300 $^{\circ}\text{C}$
 加热模块温度：450 $^{\circ}\text{C}$
 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：30 ms
 延迟时间：2 ms
 MRM 参数：见表 1；

表 1 MRM 优化参数

化合物名称	CAS 登录号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
丙酮酸 Pyruvic acid	127-17-3	87.10	43.05*	13	13	16
α -酮戊二酸 2-Ketoglutaric acid	328-50-7	145.20	101.05*	16	11	20
			56.85	16	11	21
柠檬酸 Citric acid	5949-29-1	190.80	111.05	22	12	21
			87.05	22	18	16
乙酰辅酶 A Acetyl coenzyme A	102029-73-2	662.10	539.95	30	15	26
			272.80	30	35	28
谷氨酰胺 Glutamine	585-21-7	144.90	126.95	16	14	25
			84.15	16	14	15

*为定量离子对

2.5 方法学考察

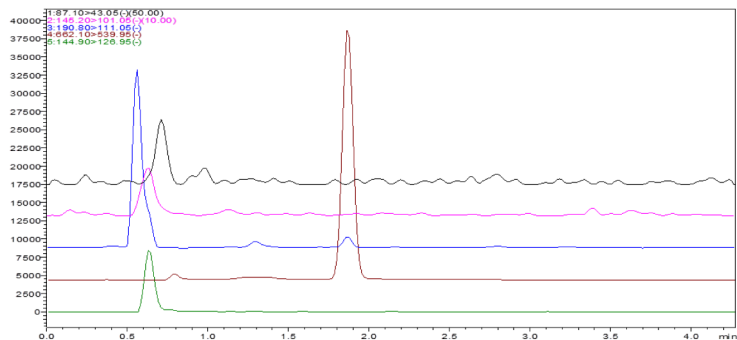


图 2 细胞裂解液 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 色谱图

2.5.1 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“2.2 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分的峰面积，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

No.	Regression equation	r
丙酮酸	$y=749.15x$	0.9991
α -戊酮二酸	$y=6 \times 10^3 x$	0.9953
柠檬酸	$y=8 \times 10^4 x$	0.9993
乙酰辅酶 A	$y=5 \times 10^3 x - 1.01$	0.9986
谷氨酰胺	$y=569.44x$	0.9979

2.5.2 准确度及精密度

按“标准曲线制备”项下方法配制各化合物 5 $\mu\text{g/mL}$ 。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

名称	批内精密度 RSD (%)	批间精密度 RSD (%)	准确度 (%)
丙酮酸	2.18	5.67	102.21
α -戊酮二酸	1.52	8.13	101.05
柠檬酸	1.76	10.22	99.67
乙酰辅酶 A	2.11	7.46	98.23
谷氨酰胺	1.58	11.15	101.39

2.6 细胞裂解液测定结果

对采用两种不同方法进行药物及酶诱导细胞的裂解液 SCR 和 SHP 按照 2.2 项下“生物样品前处理方法”进行处理，上样分析，比较两种结果是否存在显著性差异，以此对酶诱导进行判断以及药效进行评价。对两种细胞裂解液进行各化合物浓度测定如下图所示。

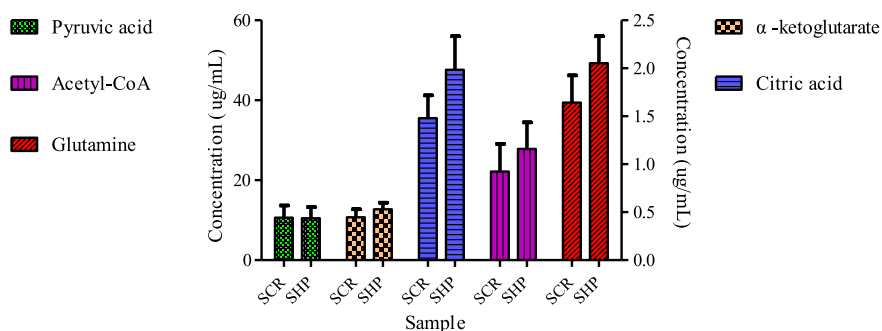


图 2 SCR 和 SHP 样品中丙酮酸等物质的含量比较图
(丙酮酸、谷氨酰胺、乙酰辅酶 A 采取左侧纵坐标， α -酮戊二酸、柠檬酸采取右侧纵坐标)

■ 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 联用测定细胞裂解液中丙酮酸、 α -戊酮二酸、柠檬酸、乙酰辅酶 A 以及谷氨酰胺五种化合物的快速方法，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。