

# LCMS-8040 测定中药注射剂对细胞培养上清液中组胺含量

## LCMSMS-296

**摘要：**本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定中药注射剂对细胞培养上清液中组胺含量的方法。中药注射剂反应后的细胞上清液经简单处理后，用 LC-20A 进行分离，三重四极杆 LCMS-8040 进行定量分析。组胺 (HA) 在 1~250 ng/mL 内线性良好，相关系数大于 0.999，方法检出限及定量限分别为 0.016 ng/mL 及 0.047 ng/mL，使用 1、10、100 ng/mL 的标样连续进样 3 针，其峰面积的 RSD 为 2.98~6.39%，结果表明该方法灵敏度高、重复性好，可用于中药注射剂对细胞培养上清液中组胺含量的测定，为中药注射剂的过敏反应提供参考。

**关键词：**组胺 高效液相色谱串联质谱 (LCMS-8040) 中药注射剂 细胞上清液

由于中药注射剂 (TCMI) 具有疗效确切、作用迅速等优点，在临床上广泛使用。但近年来，其在临床上出现类过敏反应，严重威胁病人的生命安全。类过敏是非经典途径的免疫反应，其主要机制是细胞受到外界物质刺激发生反应后分泌组胺、蛋白酶和花生四烯酸等过敏性介质。组胺则是过敏反应中最主要的活性过敏介质之一，可导致机体产生潮红、头痛、水肿、低血压以及休克等症状。研究表明，通过中药注射剂对细胞培养液反应，检测组胺等过敏介质的含量，对判断中药注射剂发生类过敏的风险具有一定的应用价值。

由于生物样品中组胺的含量低，量化组胺需要敏感的分析方法。目前，组胺的检测方法主要有 ELISA 检测法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、气相色谱和离子色谱法等。其中，ELISA 检测法步骤简便，但存在

对试剂的选择性高、对结构类似的化合物有一定程度的交叉反应等局限性；高效液相色谱法为常用方法，但检出限高，且样品需要经过衍生化，处理步骤繁琐，分析时间长，增加了样品污染风险；毛细管电泳法需要通过苯甲酰氯等有毒有机溶剂对样品的处理，对身体存在一定的危害性；气相色谱法和离子色谱法的检出限分别在  $\mu\text{g}$  和  $\text{mg}$  级，不能满足生物中低含量组胺的测定要求。LC-MS/MS 法具有灵敏度高、检出限低等特点，对于组胺含量极低的细胞上清液检测具有很好的效果。

本文利用岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8040 测定中药注射剂对细胞上清培养液作用后的组胺含量，该方法稳定、快速、灵敏，可为中药注射剂的过敏反应提供借鉴。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-20AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>3</sub> 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60SP2 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相条件

色谱柱: Agela UHP HILIC(2.1 mm I.D.×150 mm L.,  
3 μm)

流动相: A相 -20mM 乙酸铵 +0.1% 甲酸水溶液  
B相 - 乙腈

### 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

离子喷雾电压: +4.5 kV

雾化气流速: 氮气 3.0 L/min

干燥气流速: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗脱方式: 等度洗脱, A:B=10:90(V/V)

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 1

表1 MRM优化参数

化合物名称	保留时间 (min)	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
组胺 (HA)	7.620	112.00	95.05	-20	-15	-20
			68.05	-12	-24	-25
D4-HA	7.628	115.90	99.10	-20	-19	-20
			72.00	-12	-25	-28

## 1.3 样品的处理

取培养一段时间后的细胞培养液, 注射入中药注射试剂刺激细胞后取细胞上清液, 并在 0~4°C 以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液于至进样小瓶中, 从中取 100 μL 至另一离心管中加入 20 μL 内标溶液, 加入 200 μL 乙腈, 充分振荡室温 15000 rpm, 15 min 再次离心。取 100 μL 上清加入 900 μL 超纯水充分振荡后直接上样分析。

## 结果与讨论

### 2.1 标样的 MRM 色谱图

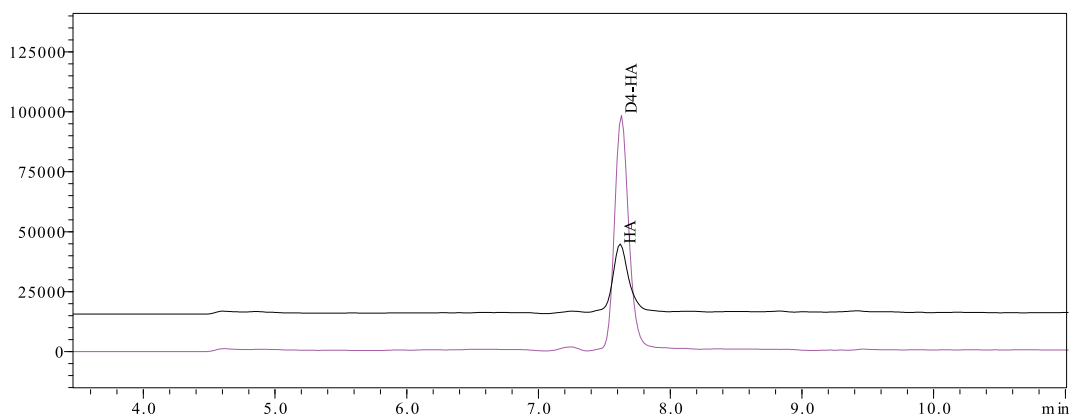


图1 标样的MRM色谱图 (10 ng/mL浓度)

## 2.2 线性关系

配制浓度为 1、2、5、10、50、100 和 250 ng/mL 的标准工作液，并加入一定浓度的氘代内标物，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，标线如下图 2 所示。在 1~250 ng/mL 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 2。

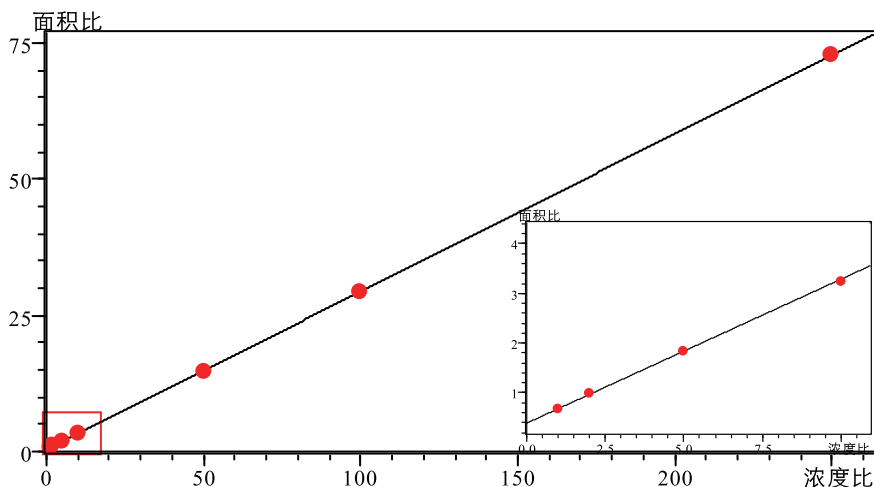


图2 组胺校准曲线

表2 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 ng/mL	准确度 (%)	相关系数 $r^2$
HA	$Y = (0.289845) X + (0.388663)$	1~250	99.6~103.0%	0.99995

## 2.3 线性关系

配制目标物浓度分别为 1、10、100 ng/mL 的混合标样，平行测定各 3 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积重复性结果如表 3 所示，仪器重复性良好。

表3 保留时间和峰面积重复性结果(n=3)

名称	RSD (% , 1 ng/mL)		RSD (% , 10 ng/mL)		RSD (% , 100 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
HA	0.027	6.39	0.034	4.44	0.027	2.98

## 2.4 灵敏度实验

对目标物浓度为 1 ng/mL 标准溶液进样分析，由信噪比计算各目标组分仪器检出限 (LOD, S/N=3) 和仪器定量限 (LOQ, S/N=10)，结果为 LOD 为 0.016 ng/mL，LOQ 为 0.047 ng/mL，检测限及定量限完全满足生物样品中组胺含量的测定要求。

## 2.5 回收率及精密度实验

称取组胺标准品，以阴性细胞上清液溶解，使其质量浓度为 1、10、100 ng/mL，按 1.3 进行处理后，对样品进行 3 个加标水平的回收率实验，每个加标水平平行测定 3 次，其回收率与相对标准偏差见表 4。结果表明，3 个加标水平的平均回收率为 90.4%~93.8%，相对标准偏差为 4.75%~5.78%。结果表明方法的回收率和精密度均较好。

表4 回收率和精密度结果

加标浓度(ng/mL)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	90.4	5.78
10	91.9	5.34
100	93.8	4.75

## ■ 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8040 测定中药注射剂对细胞培养上清液组胺含量的分析方法，方法稳定、特异性和灵敏度均较高，重复性好。因此，本方法可用于测定中药注射剂对细胞培养上清液中组胺含量的测定，对判断中药注射剂发生过敏的风险具有一定的应用价值。