

LC-MS/MS 法检测培养基 C¹³ 标记柠檬酸含量

LCMSMS-612

摘要：本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测培养基内 C¹³ 标记的柠檬酸含量。该方法采用外标法定量，在 1~500 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.999。LOQ 基质标液 1 ng/mL 连续 6 次进样保留时间 RSD% 小于 0.5%，峰面积的 RSD 为 5.07%，仪器精密度良好。三个浓度样品加标回收率在 97.90~106.80% 之间，测试结果的 RSD 在 1.14~3.26% 之间，该方法稳定可靠，可为研究药物给药后，C¹³ 标记柠檬酸转移摄入量检测提供参考。

关键词：柠檬酸 能量代谢 三重四极杆液质联用仪

三羧酸循环，又称柠檬酸循环或 TCA 循环。在细胞线粒体内，一系列酶促反应供能的系统。糖、蛋白、脂肪在分解代谢过程中都会产生乙酰 CoA，与草酰乙酸结合进入三羧酸循环，进而生成 ATP，氧化供能。在三羧酸循环中，乙酰辅酶 A 与草酰乙酸缩合生成含有 3 羧基的柠檬酸，柠檬酸再经过 4 次脱氢反应和磷酸化反应，最终生成 CO₂，释放能量。在整个过程中，草酰乙酸和乙酰-CoA 合成柠檬酸是三羧酸循环的重要调节点。通过定量检测三羧酸循环中各种中间有机酸含量，可用于靶向研究某些药物在治疗中是否参与到能量代谢，特别是抗癌药物的研究。通过影响或者控

制三羧酸循环功能的调节点，靶向给药进而抑制癌细胞的生长，达到抑制或者治疗作用。其中能量代谢中参与的有机酸小分子的定量研究具有重要的评估和参考价值。

由于柠檬酸等小分子有机酸属于内源性物质，内源性物质检测中会有基质干扰。为了消除内源性物质对分析带来的干扰，目前常采用同位素标记物进行培养，考察同位素标记的有机酸在培养前后的差异，表征摄入的情况。本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪检测 C¹³ 标记的柠檬酸培养基培养前后变化，表征在胞内摄入量，可为于相关分析人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：CBM-40

输液泵：LC-40D XR×2

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

质谱仪：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver.5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACE Excel 3 C18-AR (50 mm × 4.6 mm × 3.0 μm)；

流动相：A-0.02% 氨水；B- 乙腈

流速：0.25 mL/min

柱温：40°C

进样体积：10 μL

洗针方式：外壁洗针

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	2
1.80	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.60	Pumps	Pump B Conc.	2
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI⁻

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 500°C

DL 温度: 150°C

MRM 参数: 见表 2

接口温度: 350°C

干燥气流速: 8 L/min

加热气流速: 12 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	采集模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
1	柠檬酸 C ¹³	负	197.0	116.00*	13	13	20
				90.00	21	18	15

* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液制备

以 20% 乙腈水配制标准贮备液 (1000 µg/mL)，并配置标准工作液 0.1、0.2、0.5、1、2、5 µg/mL 工作液、取 10 µL 工作液加入 990 µL 的无 C¹³ 标记柠檬酸的培养基 (基质空白)，加乙腈蛋白沉淀后，制备成 1、2、5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 共 9 个标准系列基质标液，待测。

1.4 样品前处理

将用添加药物和 C¹³ 标记的柠檬酸培养液，培养一定时间的 H22 癌细胞，取培养后的培养基，经乙腈提取、沉淀蛋白后，12000 rpm 离心 10 min，取上清上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性

基质空白和基质标液 MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处，未见明显干扰。

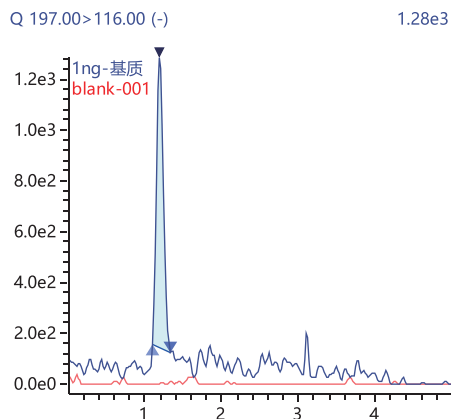


图 1 基质空白和 1.0 ng/mL 基质对照溶液 MRM 重叠色谱图

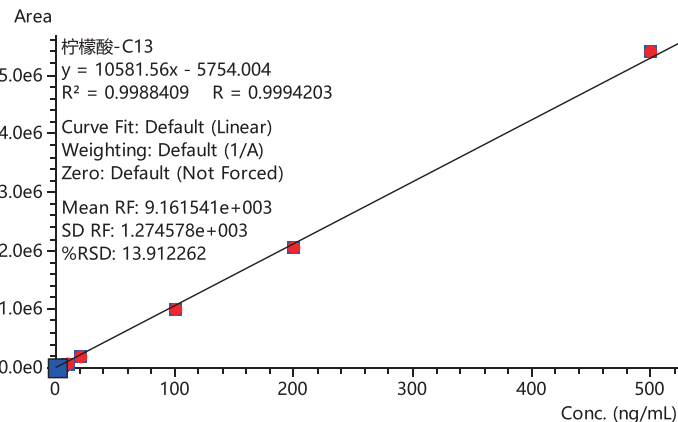


图 2 标准曲线

2.2 线性关系

按照 1.3 配制 9 个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图 2，定量限为 1 ng/mL，信噪比为 14.02，准确度范围为 86%-104%。

2.3 精密度实验

对三个浓度的基质标液 1 ng/mL、连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。保留时间 RSD% 小于 0.5%，峰面积的 RSD 为 5.07%，仪器精密度良好。

Data#	数据文件名	级别号	保留时间	面积	浓度 (ng/mL)	精确度%	统计
1	1ng-基质-LQ002.lcd	1	1.234	4,421	0.962	96.2	☑
2	1ng-基质-LQ003.lcd	1	1.236	4,618	0.980	98.0	☑
3	1ng-基质-LQ004.lcd	1	1.231	4,458	0.965	96.5	☑
4	1ng-基质-LQ005.lcd	1	1.241	4,366	0.956	95.6	☑
5	1ng-基质-LQ007.lcd	1	1.223	4,992	1.016	101.6	☑
6	1ng-基质-LQ008.lcd	1	1.235	4,459	0.965	96.5	☑
	平均		1.233	4,552	0.974	97.4	
	%RSD		0.499208	5.076110	2.263389	2.242091	
	最大		1.241	4,992	1.016	101.6	
	最小		1.223	4,366	0.956	95.6	
	标准偏差		0.006156	231.074227	0.022045	2.183745	

图 3 精密度结果 (n=6)

2.4 加标回收实验

使用本方法检测了未添加 C¹³ 标记柠檬酸培养基溶液，在该培养基基质中添加标准溶液，配制为三个不同浓度的加标样品，每个浓度平行制备三份，按照 1.4 处理后上机分析，样品检测结果和加标回收结果见表 5。三个浓度加标回收率在 97.90~106.80% 之间，测试结果的 RSD 在 1.14~3.26% 之间，方法可靠。

表 5 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	基质空白 ng/mL	1.0 ng/mL		80 ng/mL		400 ng/mL	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
柠檬酸 C ¹³	N.D.	97.90	3.26	106.80	1.61%	102.50	1.14

注：N.D. 表示未检出。

2.5 残留考察

高浓度标准样品 (500 ng/mL) 分析完成后，进样分析溶剂空白，分析结果与定量下限 (1 ng/mL) 比对，残留考察结果表明，柠檬酸 C¹³ 定量检测通道中无残留，结果见图 4。

2.6 样品检测

用该方法检测某抗癌药后，培养 12 h 后细胞培养基 C¹³ 标记的柠檬酸含量，经计算含量为 34.85 ng/mL，三针的 RSD% 为 1.62%。三针样品色谱图见图 5。

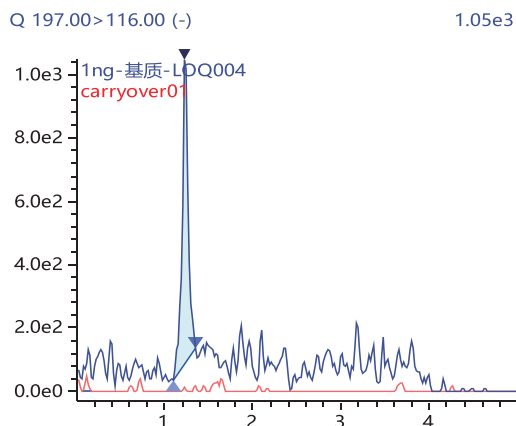


图 4 残留考察溶剂空白和定量下限 MRM 重叠图

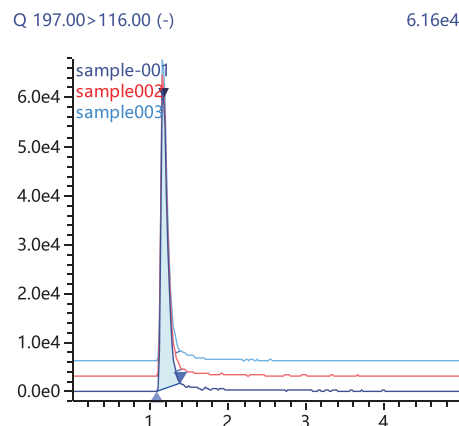


图 5 样品检测的 MRM 色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 测定培养基中 C^{13} 标记的柠檬酸含量的方法。该方法可快速准确的检测给药后培养基中 C^{13} 标记的柠檬酸含量变化，进而表征胞内转移的柠檬酸含量，可用于研究药物给药后，是否参与影响到细胞的能量代谢，为相关研究提供方法参考。

岛津应用云

