

LC-MS/MS 检测脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留

LCMSMS-657

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脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量的方法。样品经乙腈沉淀蛋白，高速离心、稀释后上机分析。采用外标法定量，在 0.1~100 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.12~0.21 % 和 0.74~4.44 % 之间。该方法灵敏可靠，定量限为 0.1 ng/mL；三个浓度样品加标回收率在 88.0~110.5 % 之间；可为脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量测定和评估提供参考。

关键词: 三重四极杆液质联用仪 脂肪细胞培养 肾上腺素 利多卡因

脂肪间充质干细胞是一种源自脂肪的干细胞，具有体外增生和多向分化的能力，可定向分化为脂肪、肌肉、骨骼、神经等多种细胞，在组织与器官的修复和再生方面具有广阔的应用前景。脂肪间充质干细胞可通过体外培养进行扩增，再通过诱导分化、制剂等工艺成为干细胞产品。

吸脂手术获取的脂肪组织是脂肪间充质干细胞的重要来源。在吸脂前，需要往吸脂部位注射膨胀液，其组成为含肾上腺素和利多卡因的生理盐水，利多卡

因的作用是局部麻醉，肾上腺素与利多卡因联用起到止血的作用。在脂肪间充质干细胞培养时，带入的肾上腺素和利多卡因可能会抑制细胞生长，故需要检测培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量，并评估其对细胞生长可能的影响。

本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪检测脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量的分析方法。样品前处理简单、分析速度快、灵敏度高、稳定可靠，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：CBM-20A 脱气机：DGU-20A₅
 输液泵：LC-30AD×2 自动进样器：SIL-30AC
 柱温箱：CTO-20AC 质谱仪：LCMS-8050
 色谱工作站：LabSolutions Ver.5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：BEH HILIC 100 mm x 2.1 mm I.D., 2.5 μm；
 流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B- 乙腈 流速：0.3 mL/min
 进样体积：1 μL 柱温：40°C
 洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 85 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	50
5.00	Pumps	Pump B Conc.	40
6.00	Pumps	Pump B Conc.	40
6.01	Pumps	Pump B Conc.	85
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 400 °C

接口温度: 300 °C

DL 温度: 250 °C

加热气流速: 10 L/min

干燥气流速: 10 L/min

碰撞气: 氩气 270 kPa

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	肾上腺素	Epinephrine	51-43-4	184.10	166.10*	-12.0	-13.0	-11.0
					107.05	-13.0	-22.0	-21.0
2	利多卡因	Lidocaine	137-58-6	235.10	86.05*	-11.0	-5.0**	-16.0
					58.00	-15.0	-20.0**	-19.0

* 代表定量离子对。

** 利多卡因碰撞能量非灵敏度最佳时的数值, 已根据本实验样品情况进行了调整。

1.3 标准溶液制备

以 0.1 % 甲酸水将混合标准储备液逐级稀释为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 共 10 个标准系列工作溶液, 待测。

1.4 样品前处理

取 100 μ L 样品, 加入 200 μ L 乙腈, 涡旋混匀, 14000 rpm 离心 5 min, 取上清液 10 μ L, 加入 0.1 % 甲酸水 990 μ L, 涡旋混匀, 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性

溶剂空白与标准溶液 MRM 谱图比较, 目标峰保留时间处, 未见明显干扰。

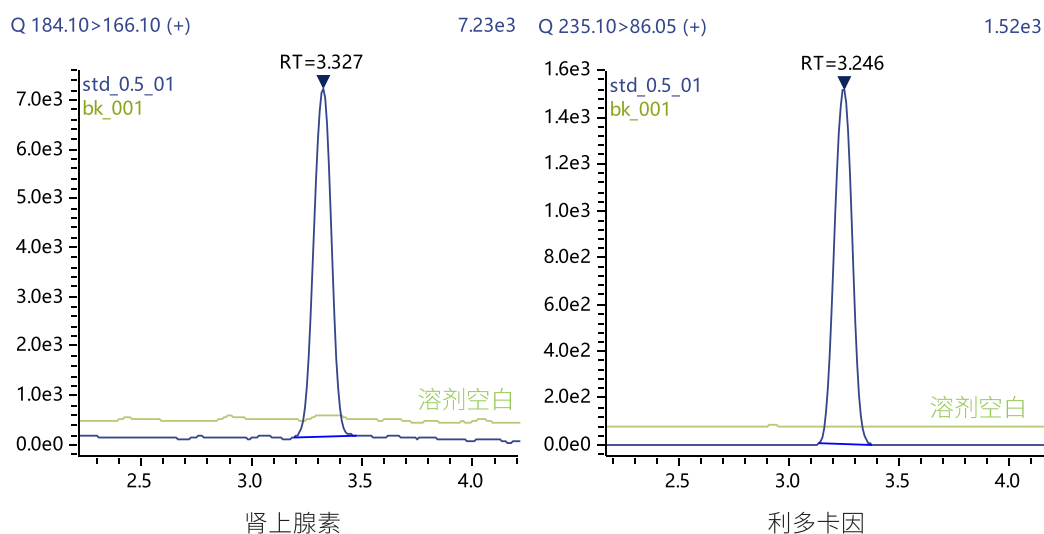


图 1 溶剂空白和标准溶液 (0.5 ng/mL) MRM 色谱图

2.2 线性关系

按照 1.3 配制 10 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，外标法绘制校准曲线。各化合物校准曲线见图 2，线性方程、相关系数和定量限见表 3。

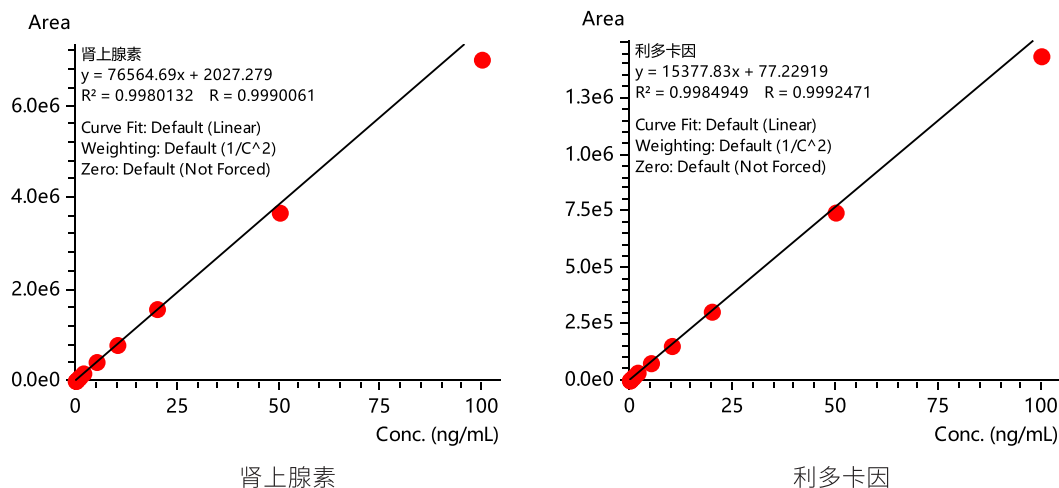


图 2 校准曲线

表 3 线性关系和定量限 (权重: 1/C²)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 (ng/mL)	定量限 S/N
肾上腺素	$Y=76564.69X+2027.279$	0.1~100	90.9~107.6	0.9990	0.1	28.6
利多卡因	$Y=15377.83X+77.229$	0.1~100	93.1~109.5	0.9992	0.1	223.5

2.3 精密度实验

对三个浓度的标准溶液连续 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。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.12~0.21 % 和 0.74~4.44 % 之间，仪器精密度良好。

表 4 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
肾上腺素	0.15	2.28	0.20	1.32	0.12	0.74
利多卡因	0.15	4.44	0.21	1.02	0.12	0.86

2.4 加标回收实验

在空白培养液中添加标准溶液，配制为三个不同浓度的加标样品，按照 1.4 处理后上机分析，加标回收结果见表 5。三个浓度加标回收率在 88.0~110.5 % 之间，方法可靠。

表 4 精密度结果 (n=6)

化合物名称	加标回收率 (%)		
	0.3 µg/mL	1.5 µg/mL	6.0 µg/mL
肾上腺素	88.6	93.9	88.0
利多卡因	106.1	110.5	103.3

2.5 残留考察

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后，进样分析溶剂空白，分析结果与定量下限 (0.1 ng/mL) 比对，残留考察结果表明，肾上腺素和利多卡因各检测通道中均无明显干扰。

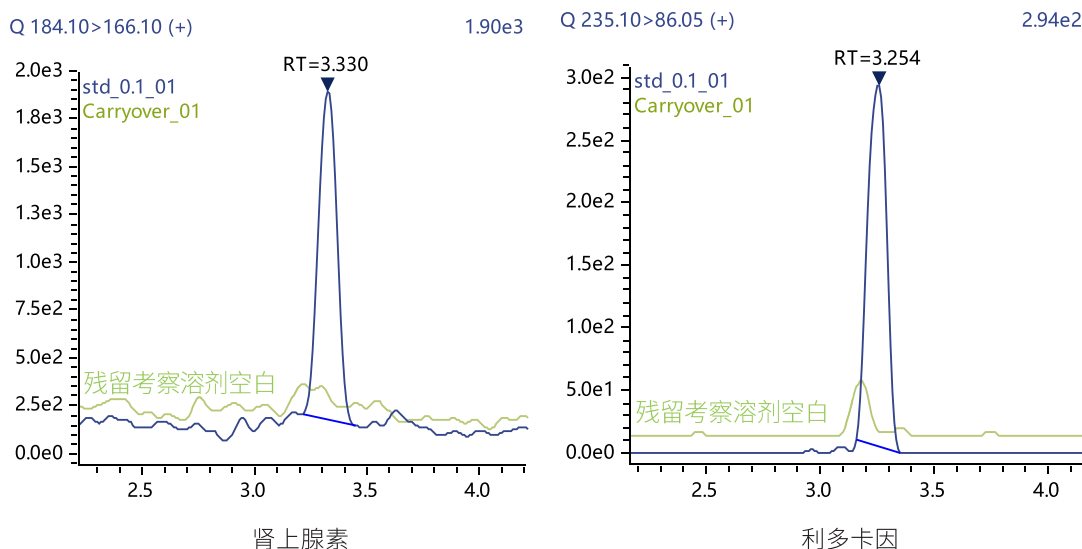


图3 残留考察溶剂空白和定量下限 (0.1 ng/mL) MRM 重叠图

2.6 脂肪细胞培养上清液样品分析

使用本方法分析了脂肪细胞培养上清液实际样品，色谱图见图4。样品中未检出肾上腺素，检出利多卡因，浓度为 18.171 $\mu\text{g/mL}$ 。

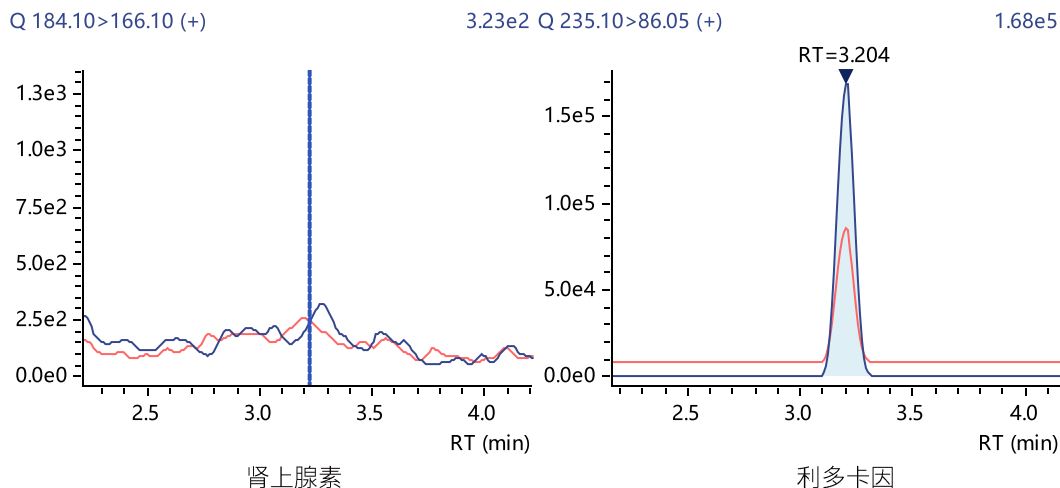


图4 脂肪细胞培养上清液样品分析 MRM 谱图

结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量的方法。方法线性范围宽、前处理简单、灵敏度高、稳定可靠，适用于脂肪细胞培养上清液中肾上腺素和利多卡因残留量的检测和监控。

岛津应用云

