

高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定肝细胞和 Hank's 缓冲液中 d-Penicillamine 2,5-enkephalin 的浓度

LCMSMS-132

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 MS-8030 联用测定肝细胞和 Hank's 缓冲液中 d-Penicillamine 2,5-enkephalin (以下简称 DPDPE) 的浓度, 以此研究 DPDPE 作为底物用于“三明治”培养大鼠原代肝细胞的转运体功能。在 Hank's 缓冲液中线性范围为 0.5~50 ng/well ($r^2=0.9995$), 定量限 0.5 ng/well; 在细胞基质中线性范围为 0.1~5 ng/well ($r^2=0.9997$), 定量限 0.1 ng/well。方法日内和日间精密度 (RSD) 均小于 15%。肝细胞和 Hank's 缓冲液中 DPDPE 的提取回收率均大于 65%。使用所开发的分析方法对肝细胞和 Hank's 缓冲液中 DPDPE 浓度进行分析, 结果表明 α -萘异硫氰酸酯可以抑制在“三明治”培养大鼠肝细胞胆管侧的外排及基底侧的摄取, 对基底侧外排无显著影响。

关键词: 高效液相色谱三重四极杆质谱肝细胞 Hank's 缓冲液 DPDPE

DPDPE(d-Penicillamine 2,5-enkephalin) 是一个环状的阿片类肽, 是转运体蛋白 Mrp2 和 Oa1Pla4 底物。它不易被肝脏代谢, 并且能够迅速由肝胆排出, 常用作探针底物研究肝细胞膜上 Mrp2 和 Oa1pla4 的功能。

目前常用的测定 DPDPE 的方法是通过液体闪烁计数器测定同位素标记 ^3H -DPDPE, 但是这极大地限制了该底物在科研和临床上的适用。由于细胞内蓄积和由细

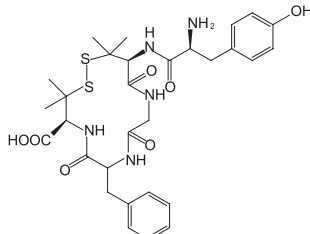
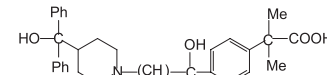
胞排出到缓冲液中的 DPDPE 含量通常较低, 而且目前尚未有适用于相关研究的系统的色谱分析方法报道。本文中使用了 LC-MS/MS 方法准确测定 DPDPE 在不同基质中的浓度, 例如肝细胞和 Hank's 缓冲液。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表1 化合物信息

化合物名称	缩写	CAS No.	分子式	结构式
d-Penicillamine 2,5-enkephalin	DPDPE	88373-73-3	$\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$	
非索非那定	/	83799-24-0	$\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{NO}_4$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-20AD \times 2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.54 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: ACE C18 (2.10 mm I.D. \times 100 mm L., 3 μm)

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水溶液

B 相 - 乙腈

流速: 0.2 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 15 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	50
4.50	Pumps	Pump B Conc.	50
5.00	Pumps	Pump B Conc.	10
7.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子模式分析

加热块温度：400℃

脱溶剂管温度：250℃

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：15.0 L/min

雾帘气：3.0 L/min

离子源电压：4.5 kV

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 3

表3 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	驻留时间 (ms)	Q1 Bias (V)	CE(V)	Q3 Bias(V)
DPDPE	646.2	127.15	100	-26.0	-40.0	-27.0
非索非那 定 (内标)	502.1	466.1	100	-28.0	-25.0	-22.0

1.4 标准样品和质控样品的配制

用 50% 甲醇溶液将 DPDPE 储备液逐级稀释成浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL 的标准工作曲线。取 20 μL 标准工作曲线加入细胞培养板中，依次配制成标准曲线；取 20 μL 10 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL 质控溶液加入细胞培养板中，依配制成低、中、高质控样。

用 50% 甲醇溶液将 DPDPE 储备液逐级稀释成浓度为 25 ng/mL、50 ng/mL、125 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1250 ng/mL 的标准工作曲线。取 20 μL 标准工作曲线加入细胞培养板中，依次配制成标准曲线；取 20 μL 50 ng/mL、500 ng/mL、2500 ng/mL 质控溶液加入细胞培养板中，依配制成低、中、高质控样。

用 70% 甲醇配制成 1.0 ng/mL 非索非那定作为内标物。

1.5 样品前处理方法

细胞样品：向每个 24 孔细胞培养板的孔中加入 0.4 mL 70% 甲醇（含 1 ng/mL 非索非那定），超声 20s，将破碎的细胞样品转移到 EP 管中 18000 r/min × 10 min 4℃离心，取上清于真空旋转蒸发仪挥干。

Hank's 缓冲液样品：向 60 μL 样品中加入 20 μL 含非索非那定 30 ng/mL 的 0.6% 甲酸水，混匀后加入 400 μL 水饱和正丁醇振荡 20 min，4000 r/min × 10 min 4℃离心，取上清挥干。

样品均用 100 μL 50% 甲醇复溶，再经过 18000 r/min × 10 min 4℃离心后取 10 μL 进样。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图

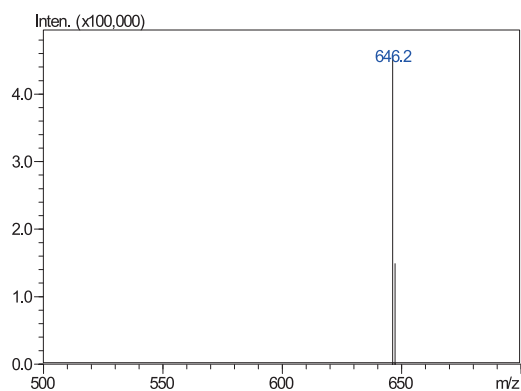


图1 DPDPE的一级质谱图

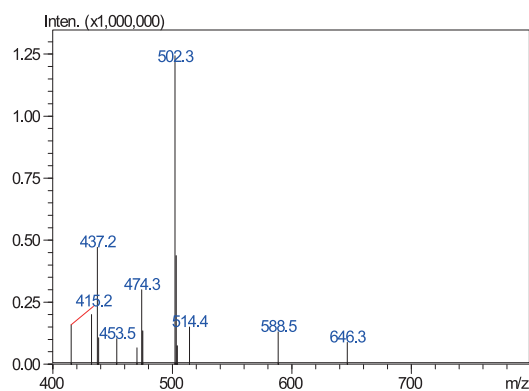


图2 非索非那定的一级质谱图

2.2 方法专属性

考察肝细胞基质和 Hank' s 缓冲液中是否存在对 DPDPE 的测定造成干扰的内源性物质，结果如图 5、6 所示。在肝细胞基质中，DPDPE 的定量限为 0.1 ng/well，内源性物质和内标物均不干扰 DPDPE 的干扰；在 Hank' s 缓冲液中，DPDPE 的定量限为 0.5 ng/well，内源性物质和内标均不干扰 DPDPE 的干扰。此结果表明，本方法具有很好的专属性。

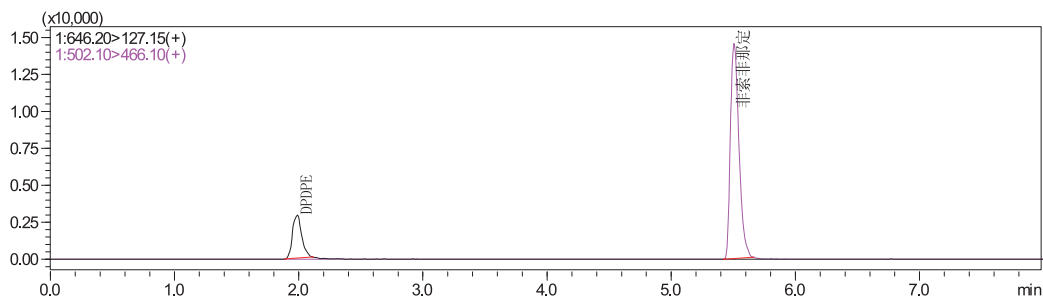
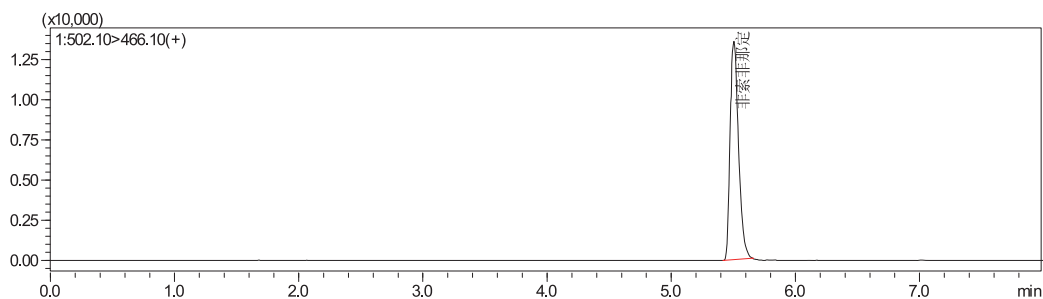
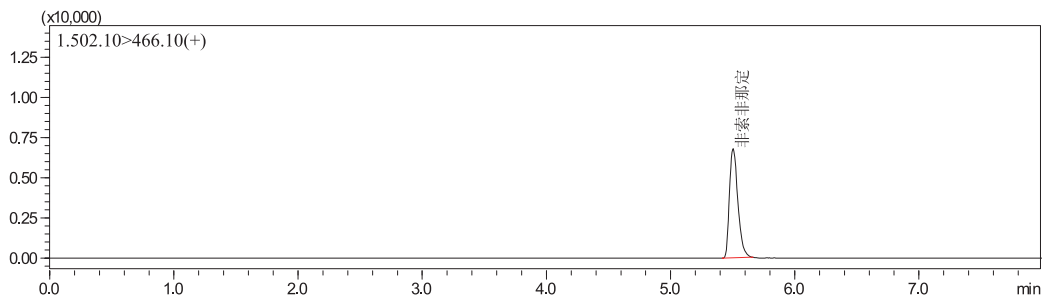


图5 A 空白细胞加入内标标准品；B 空白细胞加入DPDPE (2 ng/well) 和内标标准品。1 DPDPE；2 非索非那定



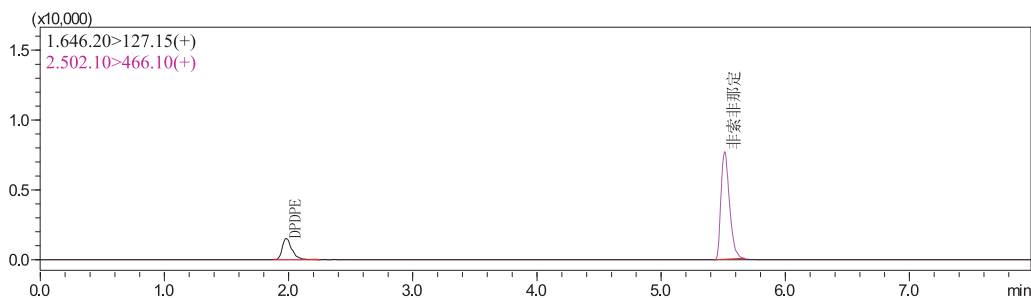


图6 A 空白Hank's加入内标标准品; B 空白Hank's加入DPDPE (2 ng/well) 和内标标准品。1 DPDPE; 2 非索非那定

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 50 ng/well、100 ng/well、200 pg/well、500 pg/well、1000 pg/well、2000 pg/well、5000 pg/well、10000 ng/well 的肝细胞基质加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，内标法进行定量。所得校准曲线如图 7 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表 DPDPE 峰面积与非索非那定的比值，x 值代表肝细胞中 DPDPE 浓度，方法的定量下限为 0.1 ng/well。所得校准曲线如图 8 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表 DPDPE 峰面积与非索非那定的比值，x 值代表 Hank's 缓冲液中 DPDPE 浓度，方法的定量下限为 0.5 ng/well。

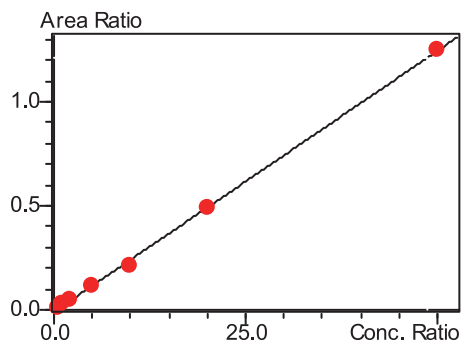


图7 肝细胞中DPDPE标准曲线

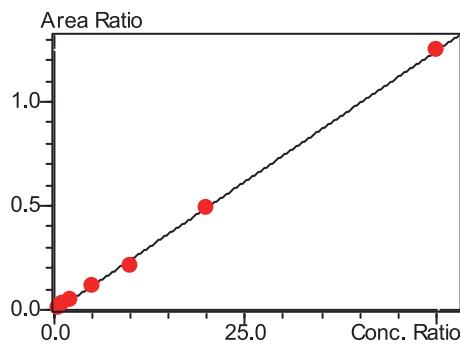


图8 Hank's缓冲液DPDPE标准曲线

表4 校准曲线参数 (线性回归)

基质	化合物	校准曲线	线性范围 (ng/well)	相关系数 r^2
肝细胞溶液	DPDPE	$Y = 0.0021X + 0.0056$	0.1~5	0.9997
Hank's 缓冲液	DPDPE	$Y = 0.0035X + 0.0065$	0.5~50	0.9995

2.4 方法精密度和准确度考察

分别考察肝细胞样品和 Hank's 缓冲液样品中三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度，结果如表 5 和表 6 所示。方法的日内精密度和日间精密度 (RSD%) 均在 15% 以内，准确度在 85~115%，符合生物分析的要求。

表5 肝细胞样品中DPDPE的精密度和准确度结果(n=6)

配制浓度 (ng/well)		0.2			2			5		
	Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3	
	0.20	0.20	0.25	1.89	1.97	2.23	5.04	5.57	4.67	
	0.22	0.22	0.22	1.93	1.90	2.13	5.03	5.16	5.36	
测定浓度 (ng/well)	0.24	0.21	0.21	1.84	2.02	2.12	5.19	4.55	5.30	
	0.24	0.20	0.25	1.83	1.96	2.28	4.63	4.69	4.48	
	0.23	0.21	0.23	2.09	2.04	2.41	4.59	5.19	4.45	
	0.22	0.19	0.20	2.05	1.98	2.42	4.91	5.65	4.47	
	平均值	0.23	0.20	0.23	1.94	1.98	2.26	4.90	5.13	4.79
日内	RSD (%)	7	5	8	6	2	6	5	9	9
	准确度 (%)	112.8	102.4	114	97	98.9	113.2	98.0	102.7	95.7
日间	平均值	0.22			2.06			4.94		
	RSD (%)	8			9			8		

表6 Hank's缓冲液样品中DPDPE的精密度和准确度结果(n=6)

配制浓度 (ng/well)		1			10			50		
	Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3	
	0.82	0.96	1.11	10.0	11.9	10.8	50.0	49.1	53.5	
	0.99	1.14	0.95	11.9	10.6	11.0	52.2	46.8	43.5	
测定浓度 (ng/well)	1.01	1.12	1.04	11.0	9.8	11.8	52.4	48.4	53.3	
	1.17	1.19	1.13	12.0	9.4	10.3	50.5	53.7	44.0	
	1.08	1.17	1.02	11.2	9.9	11.2	53.5	45.7	51.8	
	1.15	1.08	1.09	11.1	10.2	9.9	51.1	52.8	52.3	
	平均值	1.04	1.11	1.06	11.2	10.3	10.8	51.6	49.4	49.7
日内	RSD (%)	12	5	6	6	9	6	3	6	9
	准确度 (%)	103.8	111.0	105.6	111.9	103.2	108.2	103.2	98.8	99.4
日间	平均值	1.10			10.78			50.25		
	RSD (%)	14			7			7		

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的肝细胞提取回收率和 Hank's 缓冲液回收率, 结果如表 6 所示。

表6 方法回收率结果(n=6)

浓度(ng/well)	肝细胞样品回收率(%)	浓度(ng/well)	Hank's 缓冲液回收率(%)
0.2	78.9	1	65.1
2	73.1	10	71.1
5	75.1	50	85.9

2.6 DPDPE 作为探针底物研究 SCRH 转运体的功能

α -萘异硫氰酸酯可以剂量依赖地减低 DPDPE 的胆管外排指数和在细胞及胆管中的蓄积, 如图 7; 组间差异具有统计学意义, 但对 DPDPE 基底侧的外排没有显著影响, 如图 8。

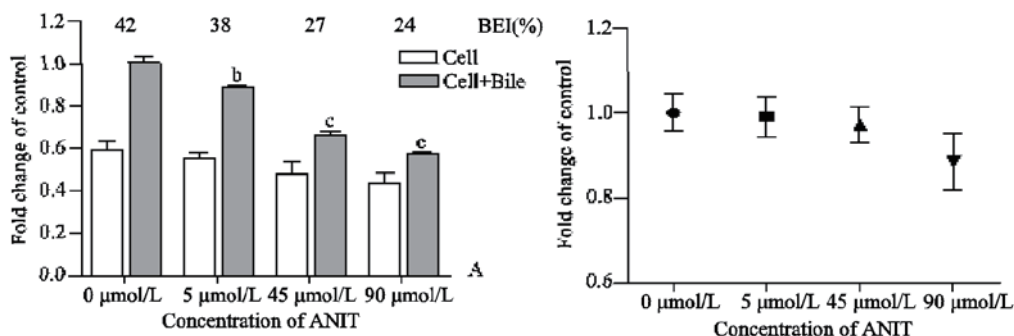


图8 α -萘异硫氰酸酯对SCRH摄取及外排功能的影响 (x+s, n=3)

A. 细胞摄取实验, α -萘异硫氰酸酯对细胞内 DPDPE 含量 (白色柱状图) 及细胞内和胆管内 DPDPE 含量 (黑色柱状图) 的影响与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较 $^bP<0.05$, $^cP<0.01$; B. 细胞外排实验, α -萘异硫氰酸酯对 DPDPE 从基底侧外排空的影响

结论

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-8030 联用测定肝细胞和 Hank's 缓冲液中的浓度, 以此研究 DPDPE 作为底物用于“三明治”培养大鼠原代肝细胞的转运体功能。所建立的样品处理和测定方法能够满足体外转运体实验需要的灵敏度和线性范围, 在 Hank's 缓冲液中线性范围为 0.5~50 ng/well ($r^2=0.9995$), 定量限 0.5 ng/well; 在细胞基质中线性范围为 0.1~5 ng/well ($r^2=0.9997$), 定量限 0.1 ng/well。日内和日间精密度 (RSD) 均小于 15%; 提取回收率达于 65%。使用所开发的分析方法对肝细胞和 Hank's 缓冲液中 DPDPE 浓度进行分析, 结果表明 α -萘异硫氰酸酯可以抑制 DPDPE 在“三明治”培养大鼠肝细胞胆管侧的外排及基底侧的摄取, 对基底侧外排无显著影响。