

HPLC-MS/MS 法测定 NB4 细胞培养液中的全反式维甲酸

卢 珊¹, 李晓红², 秦 峰³, 宋兆博⁴, 豆妮娜¹

1. 中国石油天然气集团公司中心医院药学部, 河北 廊坊 065000

2. 中国医科大学附属第一医院药学部, 中国医科大学药学院, 辽宁 沈阳 110001

3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

4. 中国石油天然气管道通信电力工程总公司, 河北 廊坊 065000

摘要:目的 建立 HPLC-MS/MS 法测定 NB4 细胞培养液中全反式维甲酸的浓度。方法 采用 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以布洛芬为内标, 流动相为乙腈-水 (含 0.1% 乙酸), 体积流量为 0.2 mL/min, 梯度洗脱方式分离全反式维甲酸, 同时采用 ESI 源负离子检测方式, 定量分析时的离子反应分别为 m/z 299.2→ m/z 255.2 (全反式维甲酸) 和 m/z 205.4→ m/z 161.3 (内标布洛芬)。结果 全反式维甲酸在 2.55~255 ng/mL 线性关系良好, 定量限为 2.55 ng/mL, 日内精密度 RSD≤10.3%, 日间精密度 RSD≤12.9%。结论 建立的 HPLC-MS/MS 法可用于测定 NB4 细胞含维甲酸的培养液中全反式维甲酸的浓度, 以及在加入维甲酸代谢阻断剂时全反式维甲酸浓度的变化。

关键词: 全反式维甲酸; 高效液相色谱-质谱联用法; 测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2017) 12-1731-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.12.011

Determination of all-trans retinoic acid in NB4 cell medium by HPLC-MS/MS

LU Shan¹, LI Xiao-hong², QIN Feng³, SONG Zhao-bo⁴, DOU Ni-na¹

1. Department of Pharmacy, Central Hospital of China National Petroleum Corporation, Langfang 065000, China

2. Department of Pharmacy, The First Hospital of China Medical University; College of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110001, China

3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

4. China petroleum pipeline communication Power Engineering Corporation, Langfang 065000, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-MS/MS method for determination of all-trans retinoic acid (ATRA) in NB4 cell medium. **Methods** Following liquid-liquid extraction with anhydrous ether, the analyte (ATRA) and internal standard (ibuprofen) were separated from medium using a gradient elution with acetonitrile and aqueous phase, containing 0.1% acetic acid, on an ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column at the flow rate of 0.2 mL/min. The detection was carried out by means of electrospray ionization mass spectrometry in negative ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 299.2→ m/z 255.2 and m/z 205.4→ m/z 161.3 was used to quantify ATRA and internal standard, respectively. **Results** The calibration curves were linear in the range of 2.55—255 ng/mL. The limit of quantification was 2.55 ng/mL. The intra- and inter-day precisions (RSD) were less than 10.3% and 12.9%. **Conclusion** It can be used to determinate all-trans retinoic acid (ATRA) in NB4 cell medium, and the variety of ATRA with metabolic inhibitor of ATRA.

Key words: all-trans retinoic acid (ATRA); HPLC-MS/MS; determination

全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 是维生素 A 的天然氧化代谢产物, 能够诱导恶性克隆分化成熟, 促进细胞凋亡, 抑制多种肿瘤细胞的增殖, 对急性早幼粒细胞白血病 (APL) M3 型完

全缓解率高达 90% 左右, 是治疗 APL 的临床首选药物^[1-2]。然而, 单用 ATRA 维持治疗的多数患者病情缓解后易复发, 因其对抗体产生耐药性, 对于耐药机制的解释, 主流认为细胞色素 P450 (CYPs) 介

收稿日期: 2017-07-27

作者简介: 卢 珊 (1984—), 女, 黑龙江省大庆人, 主管药师, 硕士, 从事药物分析学研究。Tel: 0316-2077846 E-mail: luziyan840815@163.com

导 ATRA 代谢增强,所以对 CYPs 抑制剂,即 ATRA 代谢阻断剂的研究具有重要意义^[3]。本文建立的方法即可测定 ATRA 在 NB4 细胞(人急性早幼粒白血病细胞)培养液中的浓度及加入 ATRA 代谢阻断剂后对 ATRA 浓度的影响,从而为 ATRA 代谢阻断剂的研究提供一定的理论依据。

ATRA 结构中含有长链的共轭双键,具有较强的紫外吸收,因此紫外检测的方法是首选^[4-5],除此之外,还有文献报道使用 GC-MS^[6]和 LC-MS^[7-8]的方法测定其浓度。GC-MS 法由于操作复杂,一般需要衍生化,已很少使用;HPLC-UV 和 LC-MS 法各有其优点,但 ATRA 的保留时间均大于 7 min。由于 ATRA 对光和温度较敏感,因此缩短分析时间能够更好保证其稳定性。本文采用 HPLC-MS/MS 法快速地测定 ATRA 在 NB4 细胞培养液中的浓度,缩短了分析时间,更能避免其催化降解对测定产生的影响。

1 仪器与材料

ACQUITY Ultra Performance LC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters Quattro micro API 三重四极杆串联质谱仪,配备电喷雾离子源(ESI 源)以及 Masslynx 4.1 数据采集软件(美国 Waters 公司);80-2 型离心机(上海手术器械厂);XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司);AL-104 电子分析天平(德国梅特勒公司);L-128B 型试管氮吹浓缩仪(北京来亨科贸有限公司)。

ATRA 对照品(Sigma 公司,纯度大于 98%);布洛芬(内标)对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 99.8%)。乙腈为色谱纯,购自 Fisher 公司。空白培养液和 NB4 细胞培养液(NB4 细胞于含有 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素及 10%经加热灭活的胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养)由沈阳药科大学药理实验室提供。

2 方法

2.1 色谱、质谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司);流动相为乙腈(A)-水(含 0.1%乙酸)(B);体积流量 0.2 mL/min;洗脱方式为梯度洗脱(程序见表 1);柱温为室温;进样量 20 μL;离子源为 ESI 源;检测方式为负离子检测;扫描方式为多反应监测(MRM)方式,定量分析时的离子反应分别为 m/z 299.2→ m/z

255.2(ATRA)和 m/z 205.4→ m/z 161.3(布洛芬),扫描时间为 0.10 s;毛细管电压为 2.8 kV;锥孔电压为 40 V;去溶剂气为 N₂;去溶剂气温度为 350 ℃;源温度为 95 ℃;去溶剂气体积流量 600 L/h;碰撞诱导解离(CID)电压均为 18 eV。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相	
	A/%	B/%
0	20	80
2.3	0	100
2.4	20	80
3.3	20	80

A-0.1%乙酸水溶液; B-乙腈

A- 0.1 % acetic acid aqueous solution; B- acetonitrile

2.2 溶液配制

对照品溶液:称取 ATRA 对照品 10.2 mg 于 100 mL 量瓶中,用乙醇溶解配制成浓度为 102 μg/mL 的 ATRA 储备液。精密量取 ATRA 储备液适量,用乙醇稀释成质量浓度分别为 10.2、20.4、51、102、204、510、1 020 ng/mL 的 ATRA 系列标准对照溶液。

内标溶液:称取布洛芬对照品 10.0 mg 于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解配制成浓度为 100 μg/mL 的布洛芬储备液,于冰箱中保存。临用前取适量用甲醇稀释为 200 ng/mL,作为内标溶液。

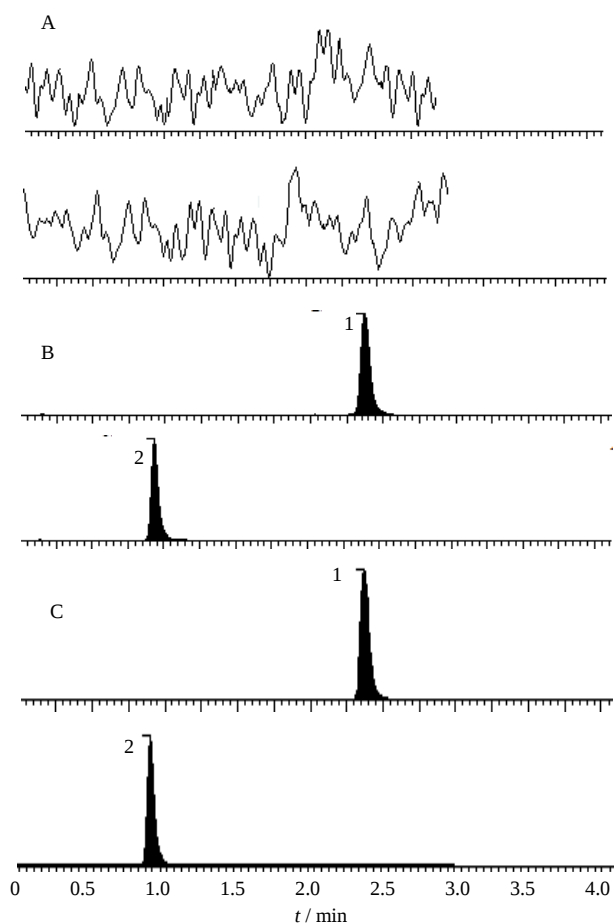
2.3 样本处理

将 100 μL 的内标甲醇溶液(布洛芬, 200 ng/mL)加置 10 mL 玻璃试管中,加 100 μL 乙醇和 400 μL 的空白培养液,涡旋 30 s;加 3 mL 的提取试剂(无水乙醚),涡旋 1 min, 3 500 r/min 离心 5 min;定量移取 2.4 mL 置另一尖底试管中,冰浴下氮气吹干;残渣用 100 μL 初始流动相溶解,涡旋 30 s,取上清液进样 20 μL,进行 HPLC-MS/MS 分析。

3 结果

3.1 专属性试验

取空白培养液 400 μL,除不加内标改加相应体积的甲醇外,按“样本处理”项下依法操作,进样 20 μL,得色谱图,如图 1A;将一定浓度的 ATRA 标准溶液和内标溶液加入空白培养液中,依同法操作,得色谱图,如图 1B,ATRA 和布洛芬的保留时间分别为 2.37 min 和 0.93 min;取 NB4 细胞含 ATRA 的培养液,依同法操作,得色谱图,如图 1C。



A-空白培养液; B-空白培养液加入 ATRA 和内标; C-NB4 细胞含 ATRA 的培养液

A- blank culture medium; B- blank culture medium added with ATRA and internal standard; C- NB4 cell containing ATRA culture medium

图1 测定培养液中 ATRA (1) 及内标 (布洛芬, 2) 典型 MRM 色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of ATRA (1) and I.S. (ibuprofen, 2) by multiple reaction monitoring (MRM) scan mode

3.2 标准曲线和定量限

取 10 mL 具塞玻璃试管, 加入 ATRA 系列标准溶液 100 μ L (溶剂为乙醇), 加入空白培养液 400 μ L 和 100 μ L 内标溶液, 配制相当于 ATRA 浓度为 2.55、5.1、12.75、25.5、51、127.5、255 ng/mL 的培养液样品, 按“样本处理”项下依法操作, 制备标准曲线。以培养液中 ATRA 的浓度为横坐标, 以 ATRA 与内标的峰面积比为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归计算, 求得直线的回归方程。

ATRA 的线性范围为 2.55~255 ng/mL, 标准曲线方程为 $Y=1.39 \times 10^{-1} X+3.40 \times 10^{-2}$ ($r=0.997$), 定量限浓度为 2.55 ng/mL, 检测限浓度为 0.85

ng/mL ($S/N=3$)。

3.3 精密度和准确度试验

按“标准曲线的制备”项下操作, 制备低、中、高 3 个浓度 (ATRA 分别为 4.08、20.4、204 ng/mL) 的质量控制样品 (QC), 每个浓度分别制备 6 个样本, 重复 3 个分析批, 并与标准曲线同批测定, 以当日的标准曲线计算 QC 样品的测得浓度, 与配制的浓度对照, 求得本法的精密度和准确度。结果 (表 2) 表明, ATRA 的日内精密度 RSD 小于 10.3%, 日间精密度 RSD 小于 12.9%。

表 2 方法的精密度和准确度 ($n=18$)

Table 2 Accuracy and precision of the method ($n=18$)

质量浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)		RSD/%		RE/%
加入量	测得量	日内	日间	
4.08	3.94 ± 0.42	10.3	12.9	-3.4
20.4	20.4 ± 1.98	10.1	5.5	0.20
204	191 ± 14.7	8.2	1.5	-6.4

3.4 提取回收率试验

取空白培养液 400 μ L, 按“标准曲线的制备”项下操作, 制备 ATRA 低、中、高 3 个浓度 (分别为 4.08、20.4、204 ng/mL) 的 QC 样品, 每一浓度进行 5 个样本分析。同时另取空白培养液 400 μ L, 除不加 1 系列标准溶液和内标外, 按“标准曲线的制备”项下的方法操作, 向获得的残渣中加入内标溶液和相应浓度的 ATRA 系列标准溶液各 100 μ L, 涡旋混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣 100 μ L 初始流动相溶解, 取 20 mL 进样分析, 获得相应的峰面积, 以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。该方法中 ATRA 在 4.08、20.4、204 ng/mL 下的培养液样品平均提取回收率分别为 45.9%、66.0%、71.0%; RSD 分别为 3.1%、1.9%、3.8%。内标的提取回收率为 31.7%, RSD 为 2.8%。

3.5 稳定性试验

按“标准曲线的制备”项下操作, 制备 3 个浓度的 QC 样品, 按“样本处理”项下规定分析, 考察室温稳定性 (室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h)、样品预处理后稳定性 (4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h) 及冻融稳定性 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 24 h, 反复冻融 3 次), 求得相对偏差。结果 (表 3) 表明, ATRA 在上述条件下是稳定的。

3.6 应用

以上所建立的方法用于测定含 ATRA 的 NB4 细胞培养液中 ATRA 的浓度, 以及在加入 ATRA 代

表3 ATRA在不同条件下的稳定性

Table 3 Stability of ATRA under different conditions

保存条件	加入量/ (ng·mL ⁻¹)	测得量/ (ng·mL ⁻¹)	RE/%
室温 2 h	4.08	4.11	0.7
	20.4	19.6	-3.9
	204	199	-2.5
预处理后 12 h	4.08	3.95	-3.2
	20.4	18.9	-7.4
	204	211	3.4
冻融 3 次	4.08	4.19	2.7
	20.4	21.5	5.4
	204	187	-8.3

谢阻断剂利阿唑时 ATRA 浓度的变化。结果显示, 在空白培养液中加入 0.2 μmol/L 的 ATRA 测得浓度为 (49.49±3.64) ng/mL, 在 NB4 细胞培养液中 ATRA 的浓度为 (27.05±1.34) ng/mL, 而在含 ATRA 的 NB4 细胞培养液中加入 5 μmol/L 代谢阻断剂利阿唑后, ATRA 的浓度为 (39.78±2.51) ng/mL (在加入 12 h 后测定)。由此可见, 利阿唑对 ATRA 的代谢产生阻断作用。

4 讨论

在实验时, 当使用 ATRA 的乙醇溶液进样时, 为单一色谱峰, 而使用 ATRA 的培养液样品进样后, 发现在 ATRA 的前方出现它的顺式异构体, 两者可达到完全分离。为了使测定更加准确, 要抑制 ATRA 向其顺式异构体的转化, 尝试了 APCI 正离子检测模式, 可是其响应只有 ESI 负离子模式的 1/10。于是又分别在水相中加入醋酸铵和乙酸, 当加入 5 mmol/L 的醋酸铵时, 顺反式维甲酸不能达到完全分离, 且内标的峰形非常差, 而当加入乙酸时, 基本可抑制 ATRA 向其顺式异构体的转化, 经过进一步优化, 最终决定添加 0.1% 的乙酸作为水相。

液-液萃取法、沉淀蛋白法和固相萃取法这 3 种前处理方法最为常用, 因为液-液萃取法可除去大部分干扰物质, 使被分析物组分富集, 经济适用, 并且大部分文献都使用此方法, 所以最终确定使用液-液萃取法。在萃取溶剂的选择上, 考察了乙醚和醋酸乙酯, 发现乙醚提取的更干净, 回收率更高, 所

以选择了乙醚作为萃取溶剂。

由于 ATRA 对光和热很敏感, 整个试验过程中需严格的避光和控温。样品处理过程中, 所有操作均在冰浴上进行, 用到的各种试剂如提取试剂、溶样流动相等在 4 °C 下储存备用, 离心在低温冷冻离心机上进行。因此样品的分析时间越短越不利于 ATRA 向顺式异构体的转化, 而提高测定的准确性。本文所建立的 HPLC-MS/MS 方法简便、快速, 适合于 NB4 细胞培养液中 ATRA 的测定, 并可用于 ATRA 代谢阻断剂的研究。

参考文献

- [1] 高 丰, 宋金丹. 维甲酸诱导的人大肠癌细胞凋亡 [J]. 细胞生物学杂志, 2000, 22(1): 35-39.
- [2] 卢立志, 王文英. 全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病现状及相关若干问题 [J]. 现代诊断与治疗, 2005, 16(2): 127-128.
- [3] 任金红, 马 超, 张 健, 等. 维甲酸代谢阻断剂的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(19): 1444-1448.
- [4] Lanvers C, Hempel G, Blaschke G, et al. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis- and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 865(2): 233-240.
- [5] 王晓平, 任 斌. 高效液相色谱法测定人血浆中全反式维甲酸血药浓度 [J]. 广东药学院学报, 2006, 22(1): 76-77.
- [6] Napoli J L, Pramanik B C, Williams J B, et al. Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans retinoic acid in human plasma [J]. J Lipid Res, 1985, 26(3): 387-392.
- [7] Wang Y, Chang W Y, Prins G S, et al. Simultaneous determination of all-trans, 9-cis, 13-cis retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2001, 36(8): 882-888.
- [8] Peng J B, Luo C H, Wang Y C, et al. Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for determination of all-trans retinoic acid in human plasma and its application to a bioequivalence study [J]. Molecules, 2014, 19(1): 1189-1200.