文章编号:1000-5404(2009)06-0555-02

技术方法

高效液相色谱串联质谱联用法测定培养基中丝裂霉素C残留量

周 葯[1],谭志荣[2],卢光琇[1] (中南大学:[1]生殖与干细胞工程研究所,人类干细胞国家工程研究中心,长沙 410078,[2]临床药理研究所,长沙 410078)

摘 要:目的 建立液相色谱-电喷雾串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定培养基中丝裂霉素C残留量的方法。**方法** 培养基样品经乙腈直接沉淀蛋白后,采用Thermo Hypurity C_{18}柱(2.1 mm×150 mm,5 μm)分离,流速为0.2 ml/min,以乙腈:0.1%甲酸=40:60为流动相等度洗脱。通过电喷雾离子源进入质谱,以二级质谱多反应监测(MRM)方式进行检测。**结果** 丝裂霉素的线性范围分别为0.098~50 ng/ml,最低检测浓度为0.098 ng/ml,平均相对回收率在91.30%~105.46%范围内,日内和日间精密度<15%。**结论** 本法简单、快速、灵敏、重现性好,可用于丝裂霉素C的培基中残余量的测定和监控。

使用丝裂霉素C(MMC)灭活的鼠胚胎成纤维细胞(mEF)或者人胚胎成纤维细胞(hEF)作为饲养层细胞(feeder cell)来支持人胚胎干细胞(hESCs),是实验室维持人胚胎干细胞不分化的常规培养体系[1]。作为一种DNA损伤试剂,丝裂霉素C可以导致真核细胞染色体核型的改变或者DNA碱基的突变[2,3]。丝裂霉素C在人胚胎干细胞的培养体系中是否有残留,残留量多少,以及残留的丝裂霉素C对人胚胎干细胞的体外培养有何影响等问题有待进一步研究解决。本研究建立了液相色谱-电喷雾串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定培养基中丝裂霉素C的残留浓度。通过这种检测手段有助于监控丝裂霉素C的残留量,进一步研究残留的丝裂霉素C对人胚胎干细胞的影响并将丝裂霉素C的残留控制在一个较安全的水平。

1 材料与方法

1.1 仪器

Finnigan LCQ Deca XP型质谱,带有ESI源;Finnnigan Surveyor型高效液相色谱仪带自动进样器和柱温箱,工作站软件Xcalibure 1.3。AB-265S型精密天平(瑞士梅特勒公司),WH-2微型旋涡混合器(上海沪西分析仪器厂)。

基金项目:湖南省科技计划项目(2008FJ3133)
Supported by the Science and Technology Program of Hunan Province (2008FJ3133)

作者简介:周 葯,女,湖南省长沙市人,博士研究生,主要从事人胚胎干细胞生物学方面的研究。电话:(0731)2355100转8428,E-mail:zhoudidi_2000@163.com

通信作者:卢光琇,E-mail:lugxdirector@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-12-26;修回日期:2009-01-12

1.2 实验材料

甲酸、甲醇和乙腈均为色谱纯(广州迪马公司);丝裂霉素C(Sigma,USA);高糖DMEM培养基(Invitrogen, USA);胎牛血清(Invitrogen, USA)。

1.3 方法

1.3.1 色谱、质谱条件 色谱柱为Thermo Hypurity C18柱(2.1 mm×150 mm,5 μm);流动相为乙腈:0.1%甲酸=40:60;流速为0.20 ml/min;柱温为40 ℃,自动进样瓶温15 ℃。

采用ESI^+;毛细管电压:5.0 kV;源温度:300 ℃;翘气气体流速:100 L/h;辅助气体流速:10 L/h;采用MRM进行离子方式监测用于监测的离子丝裂霉素质荷比(m/z)。

1.3.2 对照品储备液 精密称取25.0 mg丝裂霉素对照品,置于10 ml容量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到2.50 mg/ml丝裂霉素储备液。置于4 ℃冰箱保存备用。

1.3.3 培养基样品处理 取培养基样品0.2 ml置于1.5 ml Eppendorf离心管管中,加入乙腈400 μl,振荡2 min,离心(13 000 r/min)10 min,转移上清液400 μl至2 ml自动进样瓶中,再加400 μl 0.1%甲酸水溶液混匀,进样量10 μl。

1.3.4 专属性实验 取空白培养基0.2 ml,按1.3.3项操作,得色谱图;将一定浓度的丝裂霉素C溶液加入空白培养基中,按1.3.3项操作,得另一色谱图,将2图进行比较。待测物丝裂霉素C的保留时间为1.0 min。

1.3.5 标准曲线和线性范围 用空白培养基将丝裂霉素对照品储备液稀释成不同浓度(50.0、25.0、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.195 ng/ml和0.098 ng/ml)的对照品培养基,按1.3.3项操作,以丝裂霉素对照品与内标浓度比值(y)和对照品与内标面积比值(x)作回归分析。

1.3.6 精密度和准确度 配制浓度为0.195、3.125 ng/ml和25 ng/ml的丝裂霉素对照品培养基各5份,按1.3.3项平行操作得日内精密度(RSD);配制浓度为0.195、3.125 ng/ml和25 ng/ml的丝裂霉素对照品培养基各15份,每次取3个浓度

各5管,按1.3.3项平行操作检测,3 d测完,得日间精密度(RSD)。

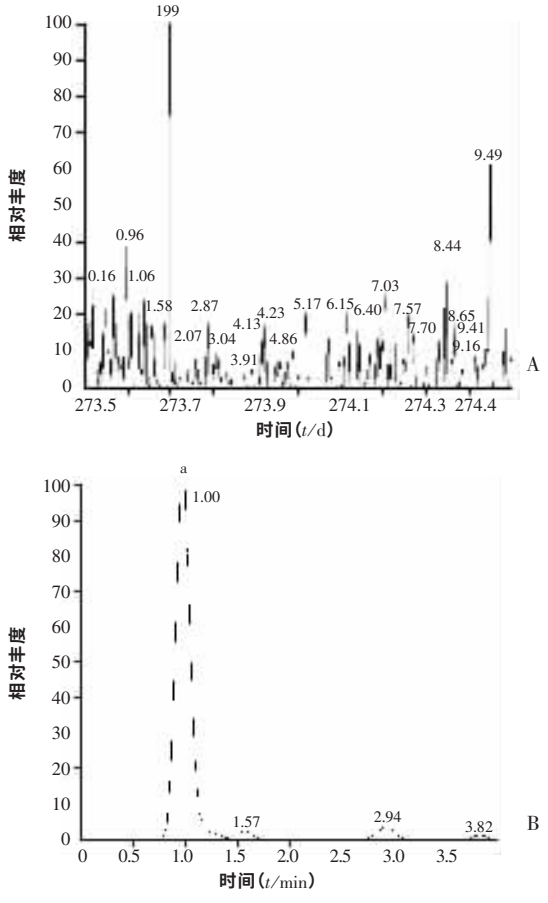
1.3.7 萃取回收率 分别取丝裂霉素(0.195、3.125 ng/ml和25 ng/ml)的低、中、高3个浓度的质量控制(QC)样品,按1.3.3项操作,以处理后的色谱峰面积与未经处理直接进样获得的色谱峰面积之比,考察样品的萃取回收率。每一浓度进行5份样本分析。

1.3.8 稳定性考察 待测物经3次冷冻-融溶试验检测稳定性。待测物的培养基溶液室温放置24 h及-40 ℃冷冻保存2个月检测稳定性。处理后的样品溶液室温放置24 h检测稳定性。

2 结果

2.1 方法专属性

空白培养基色谱图见图1A,丝裂霉素C溶液加入空白培养基的色谱图见图1B。结果表明空白培养基中内源性物质及代谢产物不干扰丝裂霉素C。



A:空白培养基;B:空白培养基中加入丝裂霉素C(1 ng/ml) a:丝裂霉素C

图1 空白培养基及加入内对照品丝裂霉素C的质谱色谱图

2.2 质谱特征离子监测结果

丝裂霉素C的特征离子为m/z:357→274。

2.3 标准曲线和线性范围

以丝裂霉素对照品与内标浓度比值(y)和对照品与内标面积比值(x)作回归分析,得线性回归方程为:$y = 3\ 600.15 + 16\ 837.1x$,$r = 0.990\ 5$,权重为$1/x$。

2.4 精密度和准确度

日内精密度(RSD)分别为14.31 %、8.69%和5.02%,均小于15%;平均相对回收率分别为99.25%、105.12%、98.56%。日间精密度(RSD)分别为14.25%、6.25%和5.28%,均小于15%。

2.5 萃取回收率

丝裂霉素C 3种浓度下绝对回收率分别为78.5%、76.3%、79.52%。

2.6 稳定性考察

结果表明,待测物经3次冷冻-融溶试验稳定,RSD<15.0%。待测物的培养基溶液室温放置24 h及-40 ℃冷冻保存2个月稳定,RSD<10.0%。处理后的样品溶液室温放置24 h稳定,RSD<15.0%。

3 讨论

HPLC法测定血浆中丝裂霉素C灵敏度低,样品处理复杂,进行样品检测存在一定限制[4-6]。本研究建立了一种液相色谱-电喷雾串联质谱测定培养基中丝裂霉素C浓度的方法,结果表明:采用该法测定培养基中丝裂霉素C残留量,灵敏度高,检测限低,并且样品处理简单、快速。该方法有助于实验者监控残留的丝裂霉素C,为后续研究残留丝裂霉素C是否对人胚胎干细胞的体外培养产生影响提供研究基础。

关键词:液相色谱质谱联用;丝裂霉素C;人胚胎干细胞

中图法分类号:R927.2 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, *et al*. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 399-404.

[2] 黄念君. 染色体畸变试验中CHL细胞系/剂量法则的应用[J]. 遗传, 1984, 6(6): 26-28.

[3] 郑胡镛, 王 欣, Warren A J, 等. 哺乳动物细胞对丝裂霉素诱导的DNA链间交联的修复[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(4): 285-290.

[4] 陈伟力, 沈 熊, 李雪宁, 等. 高效液相色谱法测定丝裂霉素C的血浆浓度及应用[J]. 中国临床药学杂志, 1999, 8(1): 47-48.

[5] 张彦舫, 冯敢生, 郑传胜, 等. 丝裂霉素C白芨胶犬肾动脉栓塞后丝裂霉素C的药代动力学研究[J]. 华中医学杂志, 2006, 30(4): 301-303.

[6] 李秋明, 董红涛. 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、肝素和地塞米松对体外不同生长状态晶状体上皮细胞生长的抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(3): 491-493.

(编辑 王小寒)