

基于SCIEX LC MS/MS系统衍生法对人体血浆及粪便样本9种短链脂肪酸检测

Determination of 9 short-chain fatty acids in human plasma and fecal samples by SCIEX LC-MS/MS with derivatization

崔敬文, 赵祥龙, 郭立海

Cui Jingwen, Zhao Xianglong, Guo Lihai

Keywords: Short-chain fatty acids, LC-MS/MS, fecal samples, plasma, O-benzylhydroxylamine

引言

短链脂肪酸 (SCFAs) 是一类具有 2 到 6 个碳的线性或支链有机羧酸, SCFAs 是肠道微生物重要代谢产物, 也是体内重要的能量来源和新型信号分子, 参与调节人体代谢, 其短半衰期并能快速代谢的挥发性化合物。常见种类有乙酸 (AA)、丙酸 (PA)、丁酸 (BA)、戊酸 (VA)、己酸 (CA)、异丁酸 (IBA)、2-甲基丁酸 (2-MBA)、异戊酸 (IVA)、异己酸 (ICA)、3-甲基戊酸 (3-MVA) 类风湿性关节炎是一种自身免疫性疾病, 目前有研究表明, 肠道菌群与免疫系统有着非常密切联系。首先, 肠道粘膜免疫系统是固有免疫重要组成部分, 发挥着促进营养物质的吸收、防御感染、抑制微生物穿透组织屏障重要作用, 其次肠道菌群可对免疫系统产生重要影响, 表现为影响肠壁粘液层的特性、可诱导肠壁淋巴样结构发育、调节免疫细胞的分化以及影响炎性介质的产生。因此, 通过肠道菌群代谢产物 SCFAs 研究可以为类风湿性关节炎发生发展及治疗方案提供重要依据。

实验部分

1. 试剂准备

(1) 储备液制备: 用超纯水溶解 SCFA 标准品至 1 mg/mL, 用乙腈溶解 SCFA 同位素内标至 1 mg/mL, 所有储备溶液均在 -20°C 冷冻保存, 在用于方法鉴定和样品分析之前, 将这些溶液平衡至室温。

(2) 校准品制备: 校准品浓度范围为 25- 25000 ng/mL, 经 2 次活性炭吸附前处理后的血浆作为稀释溶剂, 将储备液稀释至相应的浓度。

(3) 衍生化试剂制备: 制备吡啶 HCl 缓冲液, 合并 0.54 mL HCl (12.1 M), 0.86 mL 吡啶和 8.6 mL 水 (pH 调至 5.0), 用吡啶 HCl 缓冲液分别溶解 O-BHA 和 EDC, 浓度为 1 mol/L。

2. 样本前处理

粪便样本: 称取粪便 (湿重) 20 mg, 加入 60% 乙腈 200 μ L, 涡旋混匀 3 min, 成均质混悬液, 14000 rpm (字体格式需要统一)、4 °C 离心 10 min, 取上清, 即得粪便样品溶液; 分别移取 25 μ L 的血浆样品、粪便样品溶液, 质控 (如有) 及校准品于 EP 管中, 再加入 10 μ L 浓度 1 μ g/mL 的 IS 工作液。将配好的 1 mol/L 浓度的 N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 取 10 μ L 加入每个试管中, 再加入 10 μ L 1 M 衍生试剂 3-叔丁基-4-羟基苯甲醚 (O-BHA)。将样品以 1000 rpm 的速度混匀 10 分钟。向每个样本中加入 50 μ L 超纯水。用 400 μ L 乙酸乙酯通过液液萃取选择性提取 SCFA。然后将有机洗脱液 (200 μ L) 在 37 °C 下干燥 20 分钟, 并用 100 μ L 20% 甲醇水复溶。

3. 检测

色谱条件

色谱柱: Kinetex Evo C18 色谱柱 (100 \times 2.1 mm 2.6 μ m; Phenomenex); 柱温: 35°C; 流动相: 0.1% (v/v) 甲酸溶液 (A) 和甲醇 (B); 流速: 0.6 ml/min; 进样量: 2 μ L, 梯度洗脱, 液相梯度见表 1。

表1. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
1.0	80	20
5.5	50	50
5.7	40	60
6.0	20	80
6.5	20	80
6.6	95	5
7.5	95	5

质谱条件:

在 ESI (Electrospray Ionization, ESI) 正模式下, (Electrospray Ionization, ESI) 采用多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 数据采集方式。离子源参数: 喷雾 (Ionspray, IS) 正模式电压为 +4500V, 喷雾气 (GS1) 和辅助加热气 (GS2) 分别为 60psi、60 psi, 脱溶剂气温度为 500°C; 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 为 30 psi, 碰撞气 (Collision Gas, CAD) 为 8。为了获取较好的稳定性和灵敏度, 针对各化合物监测离子对去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞电压 (Collision Energy, CE), 目标物离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化, 化合物参数信息见表 2。

表2 目标化合物和内标物质化合物参数

物质名称	Q1	Q3	Dwell time	ID	DP	CE
丙酸	180.3	91.3	30	PA	55	16
异丁酸	194.1	91.0	30	IBA	60	15
丁酸	194.1	91.0	30	BA	64	21
2-甲基丁酸	208.1	91.0	30	2-MBA	60	15
异戊酸	208.1	91.0	30	IVA	60	15
戊酸	208.1	91.0	30	VA	61	33
3-甲基戊酸	222.0	91.0	30	3-MVA	60	15
异己酸	222.0	91.0	30	ICA	60	15
己酸	222.0	91.0	30	CA	60	15
D3-PA	185.3	91.0	30	D5-PA	60	15
D2-BA	201.2	91.0	30	D7-BA	60	15
D3-IBA	217.2	91.0	30	D9-VA	60	15
D2-IVA, D2-VA	224.0	91.0	30	D2-CA	60	15
D2-CA	197.1	91.0	30	D3-IBA	60	15
D4-AA	170.1	91.0	30	D4-AA	60	15

结果与讨论

以活性炭吸附处理后的血浆为模拟基质, 考察了衍生前处理后目标分析物的出峰情况, 结果表明化合物峰型良好, 见图 1。

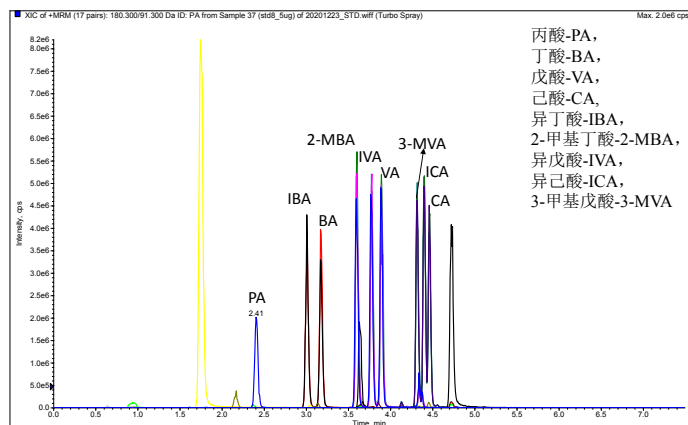


图1. 10种不同短链脂肪酸标准品经前处理后的典型出峰色谱图

实验中考察了衍生试剂的不同用量 (10 μ L, 25 μ L 和 50 μ L) 以及衍生时间 (10 min, 30 min 和 60 min) 对结果的影响, 发现过量的衍生试剂和较长的衍生时间不会提高信号的响应。因此最终选定了 10 μ L 衍生试剂和 10 分钟的衍生化时长。同时对实际血浆样本和粪便样本中的出峰情况也做了考察, 典型出峰图见图 2 和图 3。

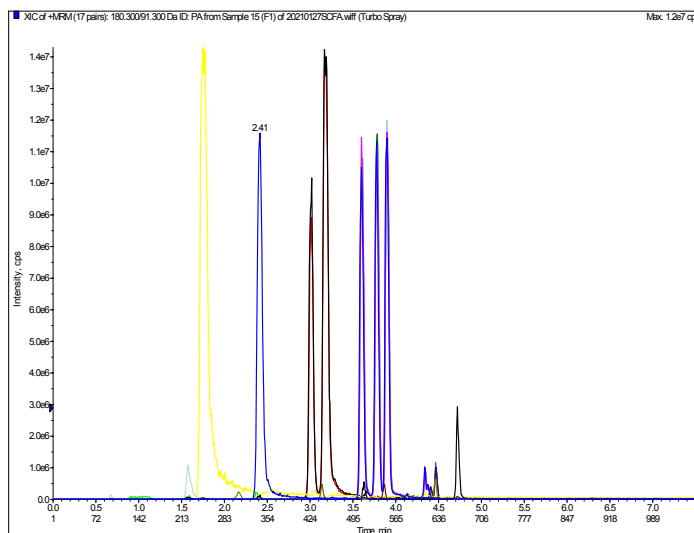


图2. 实际粪便样本中10种不同短链脂肪酸的色谱图

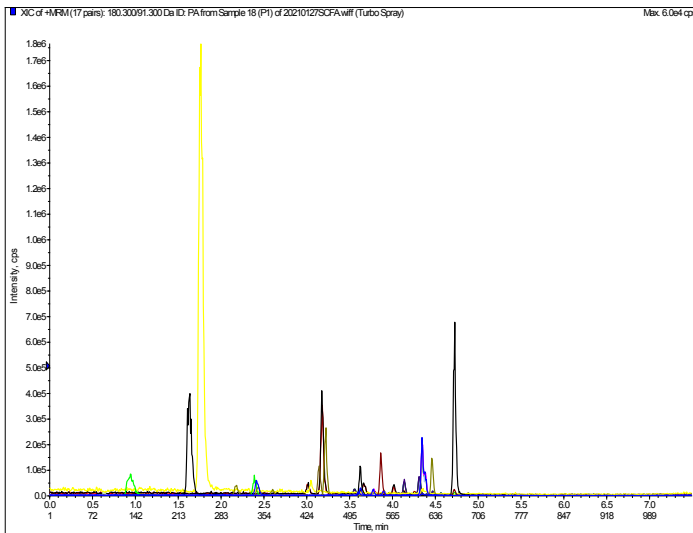


图3. 实际血浆样本中10种不同短链脂肪酸的色谱图

表3. 各指标校准曲线以及相关系数r

μ	线性方程	相关系数
丙酸 (PA)	$Y=5581.57x+9.95e5$	0.99700
丁酸 (BA)	$Y=6212.01x+4.44e6$	0.99166
戊酸 (VA)	$Y=7661.48x+2.82e6$	0.99721
己酸 (CA)	$Y=6675.54x+1.10e6$	0.99393
异丁酸 (IBA)	$Y=1.08x^2+388.84x+5.08e6$	0.99236
2-甲基丁酸 (2-MBA)	$Y=8234.55x+2.48e5$	0.99361
异戊酸 (IVA)	$Y=7638.70x+2.59e5$	0.99442
异己酸 (ICA)	$Y=6559.23x+8.45e5$	0.99076
3-甲基戊酸 (3-MVA)	$Y=6612.01x+1.01e6$	0.99535

以水为模拟基质，配制混合标曲溶液，按上述前处理步骤进行处理，制作标准工作曲线见表格3（此校准过程未添加同位素内标，仅作参考）。

标曲的线性在考察的浓度范围内（25-25000 ng/mL）线性良好，符合临床中 ≥ 0.99 的需求。

总结

本方案基于 SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统通过衍生法前处理对粪便和血浆中9种短链脂肪酸-丙酸 (PA)，丁酸 (BA)，戊酸 (VA)，己酸 (CA)，异丁酸 (IBA)，2-甲基丁酸 (2-MBA)，异戊酸 (IVA)，异己酸 (ICA)，3-甲基戊酸 (3-MVA) 进行定性和定量分析，该方法具有特异性高、准确度高等优点，可以满足临床对于血浆及粪便中短链脂肪酸监测的需要。

1. 本方案基于 SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统通过衍生法前处理对粪便和血浆中9种短链脂肪酸-丙酸 (PA)，丁酸 (BA)，戊酸 (VA)，己酸 (CA)，异丁酸 (IBA)，2-甲基丁酸 (2-MBA)，异戊酸 (IVA)，异己酸 (ICA)，3-甲基戊酸 (3-MVA) 进行定性和定量分析。
2. 7.5 min梯度，简便快速，灵敏度高，定量准确。线性范围25-25000 ng/mL，且线性的 r 值 > 0.999，线性相关性良好。
3. SCIEX Turbo V™ 离子源设计和主动排废功能带来高离子化效率和卓越的抗污染能力，确保在日常工作大批量样本检测过程中，仍可以保证稳定的高灵敏度和重现性。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. IVD-MKT-02-14949-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: SCIEX-China