

LC-MS/MS快速测定细胞中易挥发成分活性醛

LC-MS/MS Method for Rapid Determination of Volatile Aldehydes in Cells

汪洋

Wang Yang

SCIEX China

Key Words: API 4000™ LC-MS/MS; Tumor; Reactive aldehyde species; Derivatization

前言

氧化应激与多种病理状态相关，包括炎症、动脉粥样硬化、神经退行性疾病和癌症。细胞氧化应激通常被用于描述氧化还原状态的失衡，这种代谢紊乱不仅涉及反应性自由基，还包括过氧化氢、活性醛等非自由基。其中，脂质过氧化分解产物中的醛类，如丙二醛、乙醛和己醛等，被称为“氧化应激第二信使”，与自由基相比，活性醛半衰期较长，能够从其生成部位扩散开来，引起更广泛的影响。

目前针对醛类检测研究较多的领域，主要集中于环境食品行业。而针对肿瘤细胞中活性醛的研究一般依赖于灵敏度低的检测试剂盒，高通量检测多种醛类的方法研究却相当匮乏。虽然醛类检测使用气相质谱联用技术更具优势，但是需要固相微萃取或者顶空进样装置，对技术平台要求高。因此，我们基于LC-MS/MS技术平台，开发了适用于肿瘤细胞中十一种活性醛靶向检测方法。主要方法是采用2,4-二硝基苯肼（Dinitrophenylhydrazine, DNPH）作为衍生化试剂，与活性醛生成稳定的腙类化合物进行LC-MS/MS检测，从而摆脱易挥发性物质对气相质谱联用技术检测的依赖。

试验方案：

1. 样品前处理：

处理细胞样品时，加入180 μ L 50% 乙腈水溶液裂解细胞，再加入20 μ L NaOH溶液，涡旋5 min后，加入20 μ L HClO₄溶液，最后加入200 μ L DNPH溶液在室温下反应4 h，离心（20000 g, 4 $^{\circ}$ C，

15 min）后取上层清液真空挥干，200 μ L ACN复溶，离心进样检测。

2. 液相条件：

液相：Shimadzu LC 20AD^{XR}系统

色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C18（2.1mm \times 50mm, 5 μ m）

流速：0.3 ml/min

流动相：ESI-: A相为H₂O, 含2 mM 醋酸铵；B相为ACN, 含2 mM 醋酸铵；ESI+: A相为H₂O, 含0.1% 甲酸（Formate, FA）；B相为ACN, 含0.1% FA

柱温：40 $^{\circ}$ C

进样量：5 μ L

梯度洗脱：

| Time (min) | % A (水相) | % B (有机相) |
|------------|----------|-----------|
| 0 | 70 | 30 |
| 1 | 70 | 30 |
| 10 | 0 | 100 |
| 12 | 0 | 100 |
| 12.2 | 70 | 30 |
| 15 | 70 | 30 |

3. 质谱条件：

质谱扫描模式：MRM

离子源：电喷雾离子源

电离模式：负离子模式检测（ESI-）子模式检测（ESI+）

质谱参数：

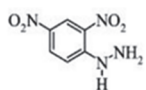
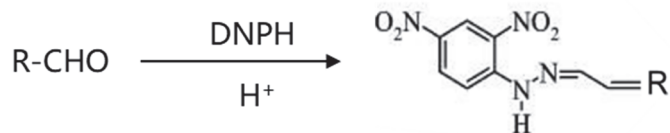
| 质谱参数 | 数值 |
|------|----------------|
| ISV | 5500 / -4500 V |
| CUR | 30 psi |
| TEM | 450 °C |
| GS1 | 50 psi |
| GS2 | 50 psi |

表1. 活性醛衍生物MRM离子对、CE和DP参数。

| Analyte | MW | Precursor ion | Product ion | CE | DP |
|-----------------|-------|---------------|-------------|-----|-----|
| Formaldehyde | 30.0 | 208.9 | 150.9/162.8 | -12 | -40 |
| Acetaldehyde | 44.1 | 223.1 | 150.9/162.9 | -13 | -40 |
| Pentanal | 86.1 | 264.9 | 152.0/163.0 | -28 | -60 |
| Hexaldehyde | 100.2 | 279.0 | 151.9/162.8 | -30 | -50 |
| Heptanal | 114.2 | 293.0 | 162.8/177.9 | -20 | -90 |
| Nonanal | 142.1 | 321.1 | 151.9/162.9 | -30 | -90 |
| Glyoxal | 58.0 | 417.1 | 181.8/233.9 | -28 | -75 |
| 4-HNE | 156.2 | 335.1 | 166.9/181.7 | -28 | -70 |
| Retinal | 284.4 | 465.3 | 268.2/373.2 | 34 | 55 |
| Methylglyoxal | 72.1 | 433.1 | 250.3 | 20 | 60 |
| Malondialdehyde | 72.1 | 235.0 | 259.0/189.0 | 29 | 50 |

4. 活性醛的DNPH衍生化

活性醛化学性质活泼，稳定性差，物理性质易挥发，因此在样品处理过程中易出现损失，造成结果偏差。我们采用衍生化的方法，将活性醛与DNPH反应生成稳定的腙类化合物进行LC-MS/MS检测。衍生化反应如下：



DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

实验结果:

1. C18色谱柱分离获得的典型色谱图

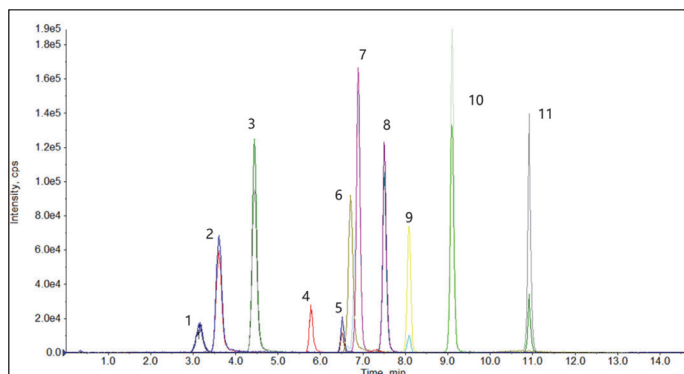


图1. 11种醛类衍生物的色谱峰。

以上色谱峰为各个醛类物质的衍生物色谱峰，对应的醛类物质如下：

1. Malondialdehyde; 2. Formaldehyde; 3. Acetaldehyde; 4. Methylglyoxal; 5. 4-HNE; 6. Glyoxal; 7. Pentanal; 8. Hexaldehyde; 9. Heptanal; 10. Nonanal; 11. Retinal

2. 线性范围:

11种活性醛在各自线性范围内线性良好 ($r > 0.99$)，线性范围宽，保证不同浓度水平样品的准确定量 (如表2)。

表2. 测定11种活性醛的标准曲线。

| Number | Analyte | Calibration range (ng/ml) | Regression equation | Linearity (r) |
|--------|-----------------|---------------------------|-----------------------|---------------|
| 1 | Malondialdehyde | 50-1000 | $y=0.00195x-0.0109$ | 0.9978 |
| 2 | Formaldehyde | 10-500 | $y=0.00308x+0.265$ | 0.9953 |
| 3 | Acetaldehyde | 10-500 | $y=0.00754x+0.113$ | 0.999 |
| 4 | Methylglyoxal | 10-500 | $y=0.000519x-0.00196$ | 0.9975 |
| 5 | 4-HNE | 5-100 | $y=0.000908x+0.0133$ | 0.998 |
| 6 | Glyoxal | 10-500 | $y=0.00716x+0.104$ | 0.9946 |
| 7 | Pentanal | 1-50 | $y=0.0089x+0.0284$ | 0.9981 |
| 8 | Hexaldehyde | 1-50 | $y=0.00611x+0.0292$ | 0.9988 |
| 9 | Heptanal | 2-100 | $y=0.000524x+0.00158$ | 0.9985 |
| 10 | Nonanal | 5-100 | $y=0.00662x+0.274$ | 0.9904 |
| 11 | Retinal | 20-500 | $y=0.00644x-0.0318$ | 0.9934 |

3. 回收率

制备得到低/高浓度的质控样品，经过与样品相同的前处理过程后，经LC-MS/MS检测，回收率为70.26-90.34%（见图2），重现性（n=3）RSD为1.30-7.37%（见图3）。

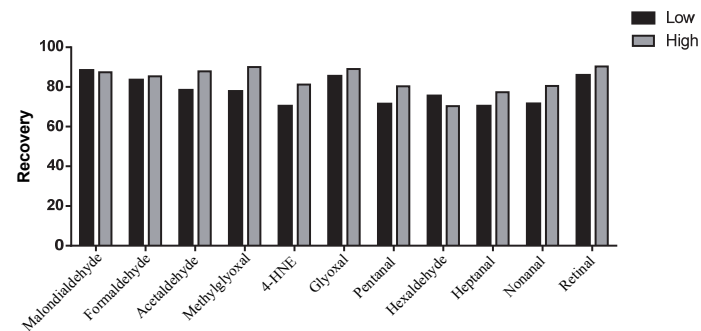


图2. 11种活性醛质控样品的回收率。

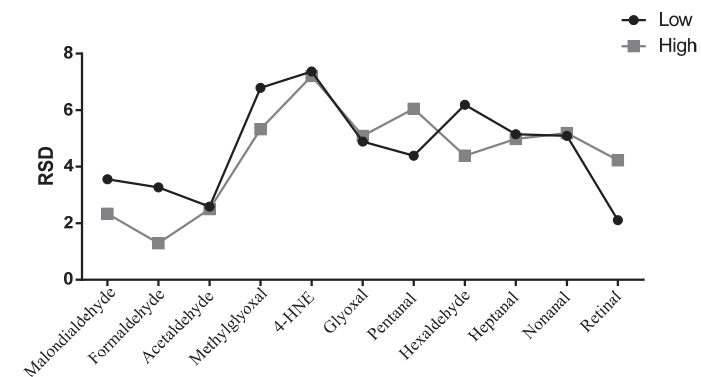


图3. 11种活性醛质控样品的分析重现性。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10543-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：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

上海公司及中国区应用支持中心
地址：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

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：www.sciex.com.cn 微博：@SCIEX