

LC-MS/MS法靶向测定血浆中41种类二十烷酸代谢物

Targeted Analysis of Eicosanoid in Plasma by LC-MS/MS

郭姝媛, 龙志敏, 郭立海

Guo Shuyuan, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX中国应用支持中心

Key Words: eicosanoid, LC-MS, oxidation; fatty acid

类二十烷酸 (Eicosanoid) 是一类由20个碳原子的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 经过氧化而形成的具有生物活性的氧化脂类物质¹。花生四烯酸 (arachidonic Acid, AA) 作为eicosanoid的主要底物, 可以通过氧化酶和自由基氧化的途径产生多种具有生物活性的代谢物, 这些代谢物调节众多生理过程, 如炎症、血管再生, 也参与多种疾病的发生, 如心血管疾病、神经退行性疾病、癌症等²。

机体中, AA大多与细胞膜表面的磷脂相结合, 经过磷脂酶A2 (phospholipase A2, PLA2) 水解而形成w-6型PUFA。AA的酶氧化途径主要包括三种: 环氧化酶 (cyclooxygenase, COX); 脂氧化酶 (lipoxygenase, LOX); 细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450) 途径。COX途径主要将AA代谢成前列腺素类 (prostanoids), 包括前列腺素 (prostaglandins, PGs)、环前列腺素 (prostacyclins) 和血栓素 (thromboxane, TXs)。LOX途径的氧化产物更加丰富, 包括白三烯类 (leukotrienes, LTs)、脂氧素类 (lipoxins, LXs)、羟基二十烷四烯酸 (hydroxy-eicosatetraenoic acids, HETEs)等。CYP途径可分为羟化酶途径和环氧化酶途径, 可产生HETE或环氧二十烷三烯酸 (epoxy-eicosatrienoic acids, EET)。由于这些类二十烷酸代谢物具有众多的生物学效应, 因此准确的检测其在体内的含量具有重要的意义¹。

因此, 建立一个能够准确检测到多种类二十烷酸代谢物的液相色谱质谱 (liquid chromatography and mass spectrometry, LC-MS) 联用方法, 是进行其含量分析的关键。本文利用超高效液相色谱法 (ultra high performance liquid chromatography, UPLC) 结合三重四极杆质谱 (triple quadrupole mass spectrometry, MS)³, 通过分段式多反应监测 (scheduled multiple reaction monitoring, sMRM) 扫描模式, 实现一次进样, 同时检测41种类二十烷酸代谢物, 并保证数据采集方法的可靠性和稳定性。

1 实验方法:

1.1 仪器设备

SCIEX ExionLC™液相系统 + Triple Quad™ 5500质谱系统



1.2 液相方法

色谱柱: C18, ACQUITY UPLC BEH SHIELD 1.7 μm, 2.1×100mm (Waters)

流动相: A相: ACN/H₂O/AA=60/40/0.02 (v/v)

B相: ACN/IPA=50/50 (v/v)

流速: 0.5 ml/min

柱温: 40°C;

流动相梯度:

| Time(min) | A (%) | B (%) |
|-----------|-------|-------|
| 3 | 99 | 1 |
| 6.5 | 98 | 2 |
| 9.5 | 80 | 20 |
| 13 | 45 | 55 |
| 13.5 | 1 | 99 |
| 14 | 1 | 90 |
| 14.2 | 90 | 99 |
| 16 | 10 | 10 |

1.3 质谱方法

离子源：ESI源，负离子模式

离子源参数：

喷雾电压IS: -4500

气帘气 CUR: 30 psi

雾化气 GS1: 55 psi

辅助加热气GS2: 55psi

碰撞气 CAD: Medium

源温度 TEM: 525°C

进入电压EP: -10

碰撞池退出电压 CXP: -15

化合物离子对信息及参数信息见表 1.1。

表1.1 化合物离子对信息及化合物参数。

| Name | Q1 | Q3 | DP | CE |
|----------------|-----|-----|-----|-----|
| 12-HETE | 319 | 135 | -50 | -19 |
| 9-Nitrooleate | 326 | 168 | -40 | -20 |
| d11-14,15-EET | 330 | 219 | -40 | -29 |
| PGA2 | 333 | 271 | -20 | -20 |
| PGA1 | 335 | 273 | -30 | -27 |
| RvE1 | 349 | 195 | -40 | -20 |
| PGE2 | 351 | 271 | -50 | -23 |
| PGF2a | 353 | 193 | -50 | -35 |
| PGE1 | 353 | 235 | -40 | -29 |
| d4-PGE1 | 357 | 239 | -40 | -22 |
| TXB2 | 369 | 169 | -50 | -22 |
| RvD2 | 375 | 141 | -40 | -21 |
| d5-Resolvin D2 | 380 | 175 | -40 | -19 |
| 9-HODE | 295 | 171 | -60 | -23 |
| 13-HODE | 295 | 195 | -60 | -23 |
| AA | 303 | 259 | -55 | -20 |
| EPA | 301 | 257 | -40 | -16 |
| DHA | 327 | 283 | -40 | -19 |
| PGD2 | 351 | 271 | -50 | -23 |
| PGJ2 | 333 | 189 | -40 | -22 |
| PGI2 | 369 | 163 | -40 | -22 |
| 5-HETE | 319 | 115 | -40 | -20 |
| 15-HETE | 319 | 175 | -40 | -19 |
| 8-HETE | 319 | 155 | -40 | -19 |
| LTB4 | 335 | 195 | -45 | -23 |
| PGD1 | 353 | 235 | -40 | -29 |
| PGEM | 327 | 291 | -30 | -23 |
| Protectin D1 | 359 | 153 | -20 | -20 |
| 8,15-diHETE | 335 | 235 | -40 | -26 |
| 9-HETE | 319 | 123 | -40 | -20 |
| 12-HEPE | 317 | 179 | -30 | -19 |
| 8-HEPE | 317 | 155 | -50 | -29 |
| 5-HEPE | 317 | 115 | -30 | -22 |
| PGF1a | 355 | 293 | -60 | -33 |
| 15-HEPE | 317 | 219 | -40 | -18 |
| Adrenic acid | 331 | 287 | -70 | -20 |
| 10-Nitrooleate | 326 | 169 | -40 | -19 |
| 9,10-EpOME | 295 | 171 | -60 | -21 |
| 15-oxoETE | 317 | 113 | -20 | -25 |
| 12,13-diHOME | 313 | 183 | -50 | -29 |
| 16(17)-EpDPE | 343 | 193 | -40 | -19 |

1.4 样品的前处理

单标配制：所有单标用甲醇溶解，详细信息见表1.2。

混标QC (standard QC) 配制：9个标准品，3种同位素内标，利用ACN/H₂O/AA=60/40/0.02配制成终浓度为7 ng/ml的混标用于方法稳定性验证。

血浆样品处理：血清100 μl，加入4.5 ml甲醇沉淀蛋白，离心取上清液，上清液经过冷冻浓缩干燥后，加入4 ml 10% 甲醇复溶，加HCl调 pH=3，过SPE柱。SPE柱过柱方法：分别加水 4 ml，正己烷 2 ml进行洗涤，弃去洗涤液，加入甲酸甲酯 4 ml 洗脱，收集洗脱液，浓缩挥干。LC-MS上样处理：所有样品干燥后，用ACN/H₂O/AA=60/40/0.02 回溶³。

样品 pool QC (pool QC) 制备：每个样品中吸收20 μl混合后，经过上述前处理方式，最终用ACN/H₂O/AA=60/40/0.02回溶，用于除标准品外的其余代谢物稳定性验证。

表1.2 单标及其浓度。

| Name | Con. (μg/ml) |
|-------------------|--------------|
| 9-Nitrooleate | 5 |
| (±)12-HETE | 2.5 |
| TXB2 | 1.25 |
| RvD2 | 1 |
| PGE1 | 1.25 |
| PGE2 | 1.25 |
| PGF2 α | 1.25 |
| PGA2 | 1.25 |
| PGA1 | 1.25 |
| RvD2-d5 | 1 |
| (±)14(15)-EET-d11 | 2.5 |
| PGE1-d4 | 5 |

2 实验结果

2.1 混标稳定性

利用混标对方法进行稳定性验证，图1展示了混标中所有物质的提取离子流图。当日连续进样5针后，考察混标中的所有物质的重现性。从图2中可以看出所有物质稳定性良好，表2.1中展示了所有物质的日内相对标准偏差 (relative standard derivation, RSD%)。结果表明，5针样品中，所有物质的RSD<10%。混标QC间隔进样6针，考察其中所有物质的重现性。从图3中可以看出所有物质日间重现性良好，表2.1中展示了所有物质的日间RSD%。结果表明，6针间断混标中，所有物质的RSD<15%。以上数据表明，该方法可以用于样品中类二十烷酸类物质的检测。

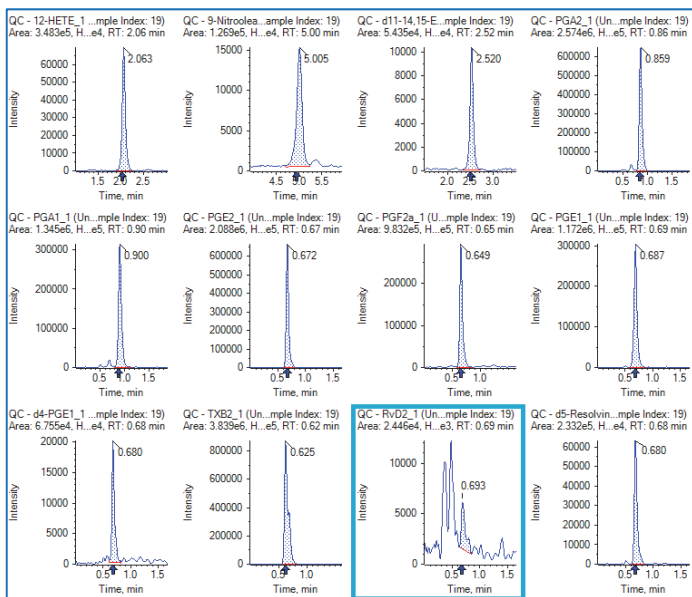


图1. 混标中各标品的提取离子流 (XIC) 图; 从左至右, 从上至下, 依次为: 12-HETE; 9-Nitrooleate; d11-14,15-EET; PGA2; PGA1; PGE2; PGF2a; PGE1; d4-PGE1; TXB2; RvD2; d5-Resolvin D2.

表2.1 混标QC 日内与日间RSD (%)。

| Name | Intra-Mean | Intra-RSD (%) | Inter-Mean | Inter-RSD (%) |
|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| 12-HETE | 3.328e5 | 6.20 | 1.78e5 | 7.29 |
| 9-Nitrooleate | 1.358e5 | 5.10 | 6.52e4 | 3.84 |
| d11-14,15-EET | 5.306e4 | 3.40 | 2.66e4 | 2.73 |
| PGA2 | 2.731e6 | 6.15 | 1.22e5 | 4.3 |
| PGA1 | 1.281e6 | 4.36 | 6.32e5 | 4 |
| PGE2 | 1.795e6 | 9.52 | 8.97e5 | 7.75 |
| PGF2a | 9.502e5 | 2.47 | 5.06e5 | 5.24 |
| PGE1 | 1.169e6 | 1.52 | 5.99e5 | 8.78 |
| d4-PGE1 | 7.474e4 | 7.75 | 3.9e4 | 11.95 |
| TXB2 | 3.657e6 | 5.11 | 2.08e6 | 6.47 |
| RvD2 | 2.421e4 | 3.12 | 1.39e4 | 14.32 |
| d5-RvD2 | 2.049e5 | 9.44 | 1.12e5 | 14.23 |

表2.2 血浆pool QC 41种代谢物的响应Intra-RSD (%)

| Name | Intra-Mean | Intra-RSD (%) | Name | Intra-Mean | Intra-RSD (%) |
|---------------|------------|---------------|----------------|------------|---------------|
| 12-HETE | 3.035e7 | 1.59 | 5-HETE | 1.673e6 | 5.91 |
| 9-Nitrooleate | 6.459e5 | 1.67 | 15-HETE | 2.725e6 | 3.80 |
| d11-14,15-EET | 1.926e5 | 8.00 | 8-HETE | 2.394e6 | 1.12 |
| PGA2 | 2.542e6 | 7.52 | LTB4 | 1.916e6 | 6.01 |
| PGA1 | 1.914e6 | 9.22 | PGD1 | 1.754e6 | 3.66 |
| RvE1 | 2.019e5 | 8.95 | PGEM | 4.714e5 | 1.55 |
| PGE2 | 6.160e6 | 5.35 | Protectin D1 | 8.342e5 | 5.05 |
| PGF2a | 1.293e6 | 10.17 | 8,15-diHETE | 2.321e6 | 4.20 |
| PGE1 | 1.724e6 | 6.51 | 9-HETE | 6.835e5 | 6.42 |
| d4-PGE1 | 2.191e5 | 13.17 | 12-HEPE | 1.562e7 | 5.49 |
| TXB2 | 3.406e7 | 2.7 | 8-HEPE | 5.719e4 | 8.24 |
| RvD2 | 6.808e4 | 6.26 | 5-HEPE | 3.522e6 | 6.50 |
| d5-RvD2 | 5.305e5 | 7.88 | PGF1a | 3.673e5 | 4.18 |
| 9-HODE | 6.148e6 | 1.62 | 15-HEPE | 1.373e6 | 3.90 |
| 13-HODE | 2.239e7 | 3.87 | Adrenic acid | 6.741e6 | 0.51 |
| AA | 1.739e8 | 2.08 | 10-Nitrooleate | 2.465e4 | 8.63 |
| EPA | 7.796e7 | 2.61 | 9,10-EpOME | 5.383e6 | 4.57 |
| DHA | 2.065e8 | 1.49 | 15-oxoETE | 5.518e5 | 3.36 |
| PGD2 | 6.038e6 | 8.33 | 12,13-diHOME | 6.964e6 | 7.99 |
| PGJ2 | 1.248e6 | 2.67 | 16(17)-EpDPE | 8.385e5 | 6.67 |
| PGI2 | 4.283e5 | 5.29 | | | |

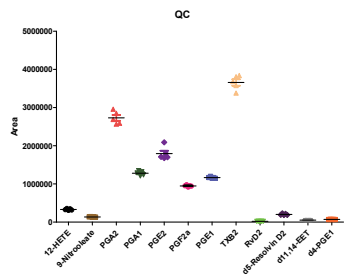


图2. 混标QC日内重现性。

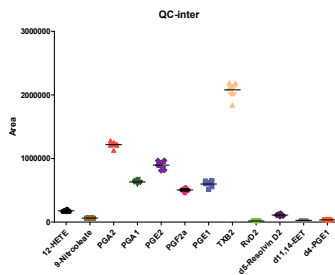


图3. 混标QC日间重现性。

2.2 血浆样品pool QC稳定性

利用血浆pool QC 样品 (此样品种依然加入三种同位素内标), 进一步优化检测方法, 以期可以特异性测到更多的类二十烷酸代谢物, 并通过日内的RSD来评价方法的稳定性。图4中展示了41种类二十烷酸代谢物的XIC图, 包括上述12种标准品。从图5中可以看出, 血浆pool QC中所有41种类二十烷酸代谢物5针进样重现性较好, 表2.2中展示了这些代谢物响应的RSD。可以看出, 所有物质的响应RSD<15%。表2.3中展示了这些代谢物保留时间 (Retention time, RT) 的RSD, 可以看出所有代谢物保留时间的RSD<2%。这些数据进一步说明该方法的可靠性与稳定性。

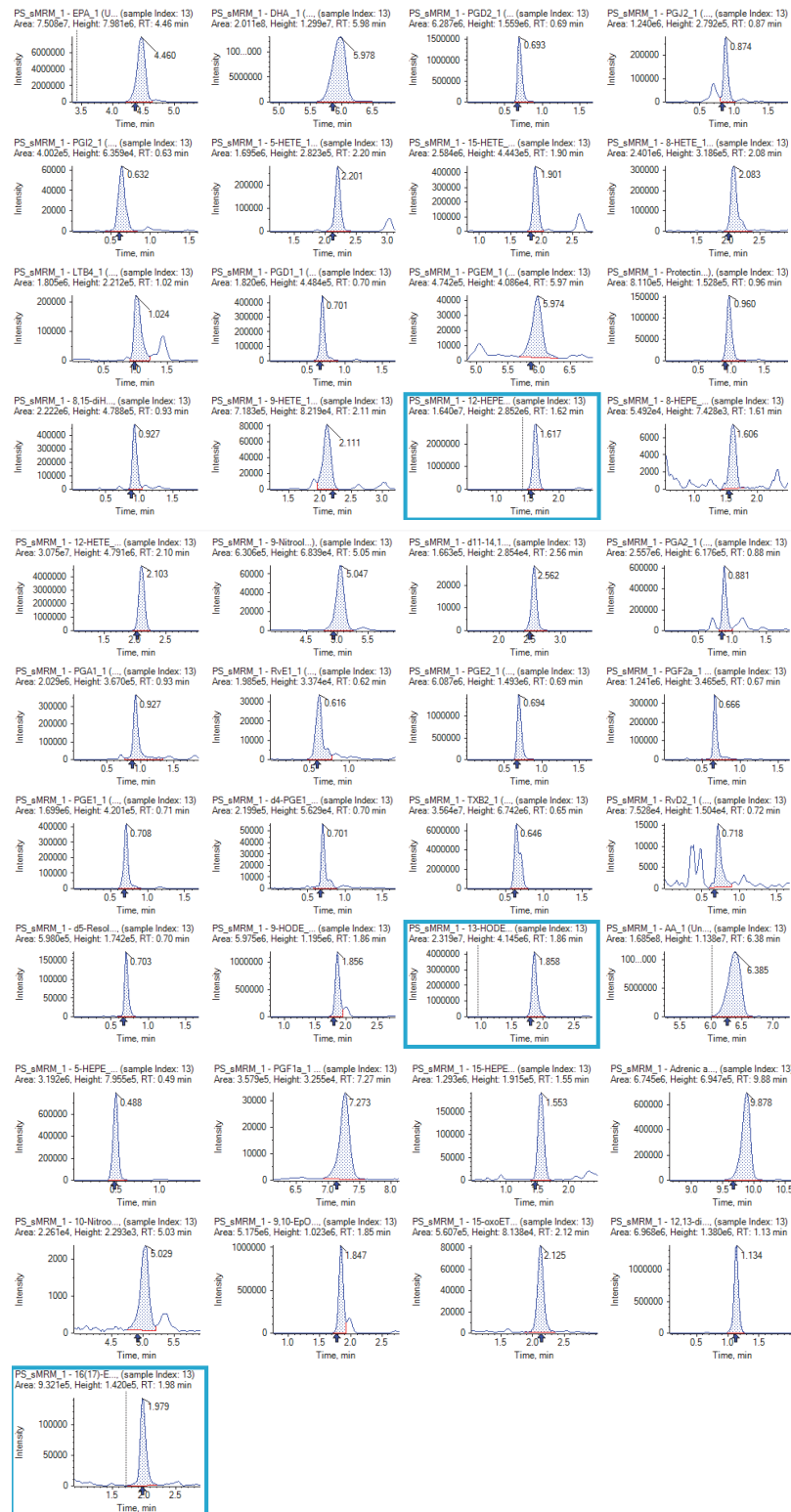


图4. 样品pool QC中各代谢物的提取离子流 (XIC) 图: 从左至右, 从上至下, 依次为: 12-HETE; 9-Nitrooleate; d11-14,15-EET; PGA2; PGA1; RvE1; PGE2; PGF2a; PGE1; d4-PGE1; TXB2; RvD2; d5-Resolvin D2; 9-HODE; 13-HODE; AA; EPA; DHA; PGD2; PGJ2; PGI2; 5-HETE; 15-HETE; 8-HETE; LTB4; PGD1; PGEM1; Protecin D1; 8,15-diHETE; 9-HETE; 12-HEPE; 8-HEPE; 5-HEPE; PGF1a; 15-HEPE; Adrenic acid; 10-Nitrooleate; 9,10-EpOME; 15-oxoETE; 12,13-diHOME; 16(17)-EpDPE;

表2.3 血浆pool QC 41种代谢物的保留时间Intra-RSD (%)。

| Name | RT-Mean (min) | RT-RSD (%) | Name | RT-Mean (min) | RT-RSD (%) |
|---------------|---------------|------------|----------------|---------------|------------|
| 12-HETE | 2.06 | 1.22 | 5-HETE | 2.16 | 1.16 |
| 9-Nitrooleate | 4.98 | 0.8 | 15-HETE | 1.86 | 1.36 |
| d11-14,15-EET | 2.51 | 1.15 | 8-HETE | 2.04 | 1.25 |
| PGA2 | 0.86 | 1.51 | LTB4 | 1 | 1.56 |
| PGA1 | 0.9 | 1.56 | PGD1 | 0.69 | 0.86 |
| RvE1 | 0.64 | 1.14 | PGEM | 5.91 | 0.63 |
| PGE2 | 0.68 | 0.88 | Protectin D1 | 0.93 | 1.71 |
| PGF2a | 0.66 | 0.53 | 8,15-diHETE | 0.9 | 1.54 |
| PGE1 | 0.69 | 1.16 | 9-HETE | 2.07 | 1.26 |
| d4-PGE1 | 0.69 | 0.72 | 12-HEPE | 1.58 | 1.45 |
| TXB2 | 0.64 | 0.89 | 8-HEPE | 1.57 | 1.37 |
| RvD2 | 0.69 | 1.9 | 5-HEPE | 0.49 | 0.51 |
| d5-RvD2 | 0.68 | 1.55 | PGF1a | 7.21 | 0.51 |
| 9-HODE | 1.82 | 1.12 | 15-HEPE | 1.5 | 1.79 |
| 13-HODE | 1.82 | 1.17 | Adrenic acid | 9.84 | 0.25 |
| AA | 6.32 | 0.59 | 10-Nitrooleate | 4.95 | 0.78 |
| EPA | 4.4 | 0.81 | 9,10-EpOME | 1.81 | 1.23 |
| DHA | 5.91 | 0.64 | 15-oxoETE | 2.07 | 1.5 |
| PGD2 | 0.68 | 0.91 | 12,13-diHOME | 1.11 | 1.33 |
| PGJ2 | 0.85 | 1.45 | 16(17)-EpDPE | 1.93 | 1.4 |
| PGI2 | 0.62 | 1.07 | | | |

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 5500建立了LC-MS/MS方法检测血浆中41种类二十烷酸代谢物。结果表明，该方法重现性和稳定性好，可用于分析生物样品中的类二十烷酸代谢物。

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/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可可使用。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10602-ZH-A



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：sciex.com.cn 官方微信：ABSciex-China

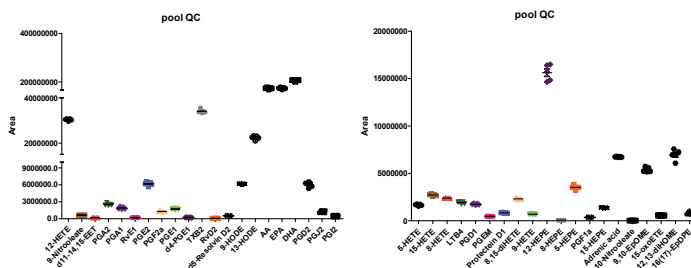


图5. 血浆pool QC中41种代谢物的日内重现性。

参考文献

- 1 Borin, T. F., Angara, K., Rashid, M. H., Achyut, B. R. & Arbab, A. S. Arachidonic Acid Metabolite as a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* 18, doi:10.3390/ijms18122661 (2017).
- 2 Esser-von Bieren, J. Immune-regulation and -functions of eicosanoid lipid mediators. *Biol Chem* 398, 1177-1191, doi:10.1515/hsz-2017-0146 (2017).
- 3 Wang, Y., Armando, A. M., Quehenberger, O., Yan, C. & Dennis, E. A. Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples. *J Chromatogr A* 1359, 60-69, doi:10.1016/j.chroma.2014.07.006 (2014).