

LC/MS/MS 法测定血清中的司可异罗叶松甘油二酯、 司可异罗叶松酯素、肠内二醇和肠内脂

杜业刚¹, 张伟², 张明³, 丁昌明¹, 林少彬^{1,*}

(1. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100021; 2. 中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021;
3. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要: 本实验用 β -葡萄糖醛酸苷酶酶解血清样品, 采用电喷雾离子源, 负离子 MRM 扫描, 建立了血清中司可异罗叶松甘油二酯(SDG)、司可异罗叶松酯素(Seco)、肠内二醇(EL)、肠内脂(ED)的 LC/MS/MS 分析方法。本方法线性相关系数 $r > 0.9991$, 最低检出浓度(LOQ, $S/N=10$) 分别为 SDG 50 ng/mL, Seco 5.0 ng/mL, EL 5.0 ng/mL, ED 5.0 ng/mL。空白血清加标回收率 79.0%~105.6%, 变异系数(CV, $n=6$) < 19.4%。该法灵敏可靠, 样品处理简单, 适用于血清中 SDG、Seco、EL、ED 的检测。

关键词: LC/MS/MS; 血清; 木脂素

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)03-168-05

Determination of Secoisolariciresonol Diglucoside, Secoisolariciresinol, Enterolactone and Enterodiol in Serum by LC/MS/MS

DU Ye-gang¹, ZHANG Wei², ZHANG Ming³, DING Chang-ming¹, LIN Shao-bin^{1,*}

(1. Institute for Environmental Health and Related Product Safety,

Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China;

2. Cancer Institute & Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100021, China;

3. Institute for Nutrition And Food Safety, Chinese Center for
Disease Control And Prevention, Beijing 100021, China)

Abstract: A method for determination of Secoisolariciresonol diglucoside(SDG), secoisolariciresinol(Seco), enterolactone(EL) and enterodiol(ED) in serum by LC/MS/MS was established. In this method, β -Glucuronidase was used to hydrolyze the serum samples, the electrospray ionization source and negative ion MRM scan were employed. The linearity correlation coefficients (r) was more than 0.9991. The limit of quantification (LOQ, $S/N=10$) was 50 ng/mL for SDG, 5.0 ng/mL for Seco, 5.0 ng/mL for EL and 5.0 ng/mL for ED. The spiked recovery in blank serum sample ranged from 79.0% to 105.6% with coefficient of variation (CV, $n=6$) less than 19.4%. The method is sensitive and reliable, and the samples handling is simple, which is suitable for determination of SDG, Seco, EL, ED in

serum sample.

Key words: LC/MS/MS; serum; lignan

在人的食物中发现的植物雌激素分为异黄酮类和木脂素类(lignans),其中木脂素类包括有:肠内脂(enterolactone)、肠内二醇(enterodiol)、司可异罗叶松甘油二酯(secoisolariciresonol diglucoside)。肠内脂和肠内二醇由植物中的司可异罗叶松酯素(secoisolariciresinol)和罗汉松酯素(matairesinol)衍生而来^[1-3]。植物雌激素的化学结构相似人体内源性雌激素,它们在生理上起着雌激素和抗雌激素的作用,对生理和病理均有一定的影响。由于木脂素对一些癌症(乳腺癌、前列腺癌、子宫癌和结肠癌)可能具有预防和治疗作用^[4-5],近来越来越引起人们的关注。本文建立了测定血清中木脂素的LC/MS/MS分析方法,为今后对木脂素的进一步研究提供了可靠的检测手段。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

API4000 串联质谱仪:美国 Applied Biosystems 公司产品;Agilent 1100 系列高效液相色谱仪:美国安捷伦(Agilent)公司产品;Scientific Industries 涡流振荡器;N-EVAP 氮吹仪;Mettler AE 163 分析天平(精度 0.000 1 g);Barnstead 纯水机;高速离心机。SDG、Seco 标准品由中国医学科学院肿瘤研究所提供;EL、ED、 β -葡萄糖醛酸苷酶标准品由 Sigma 公司提供,甲醇、乙酸乙酯均为色谱纯,无水乙酸钠和盐酸为分析纯。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ (150×3.9 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相:甲醇:5 mmol/L 乙酸铵(70:30);流速:300 μ L/min;柱温:室温;进样量:5 μ L。

1.2.2 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源;负离子 MRM 扫描;碰撞活化参数(CAD):5;气帘气(CUR):172.375 kPa(25 psi);雾化气(GS1):241.325 kPa(35 psi);辅助气(GS2):241.325 kPa(35 psi);离子源电压(IS):-4 500 V;离子源温度(TEM):450 $^{\circ}$ C。

1.3 标准溶液的配制

称取一定量的 SDG、Seco、EL、ED 标准品于 5 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,定容到刻度,得浓度分别为 SDG 2.61 mg/mL、Seco 1.90 mg/mL、EL 2.00 mg/mL、ED 2.00 mg/mL 的标准储备液。准确量取上述标准储备液适量,用甲醇稀释配制成浓度为 SDG 100 μ g/mL、Seco 50 μ g/mL、EL 10 μ g/mL、ED 10 μ g/mL 的混合标准使用液。

准确称取 0.41 g 无水乙酸钠,加入去离子水,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 5.0,定容至 1 L,得到 5 mmol/L 乙酸钠缓冲液。

准确称取 0.305 6 g β -葡萄糖醛酸苷酶,用乙酸钠缓冲液定容至 10 mL,得到 12.0 units/ μ L 的 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液。

1.4 样品前处理^[6]

准确移取 100 μ L 血清于 2 mL 试管中,加入 100 μ L(1 200 units) β -葡萄糖醛酸苷酶溶液,在 37 $^{\circ}$ C 水浴下,水解 24 h,加入 400 μ L 乙酸乙酯,振荡 3 min,离心 2 min(10 000 r/min),取出上层的乙酸乙酯层,用氮气吹干,加入 100 μ L 流动相溶解后进样分析。

1.5 计算

$$\rho_x = \rho_1 V_1 / V_x$$

式中: ρ_x —血清中木脂素的浓度,ng/mL;
 ρ_1 —测试液中木脂素的浓度,ng/mL; V_1 —测试液的体积,mL; V_x —血清的体积,mL。

2 结果与讨论

2.1 质谱和色谱行为

首先经 Q₁ 全扫描选择母离子,然后进行二级质谱扫描,得到四种化合物的二级质谱图如图 1。根据质谱图分析结果,选定进行 MRM 扫描的离子通道:SDG m/z 685.5 $\rightarrow$ (523.6;361.4);Seco m/z 361.0 $\rightarrow$ (346.3;165.2);EL m/z 297.0 $\rightarrow$ (253.2;189.2);ED m/z 301.0 $\rightarrow$ (271.3;253.2)。

在选定的仪器条件下,混合标准溶液液相色谱图如图 2,从图中可以看出 SDG、Seco、EL 和 ED 的保留时间分别为:3.28 min,3.86 min,4.61 min 和 4.32 min,色谱行为良好。

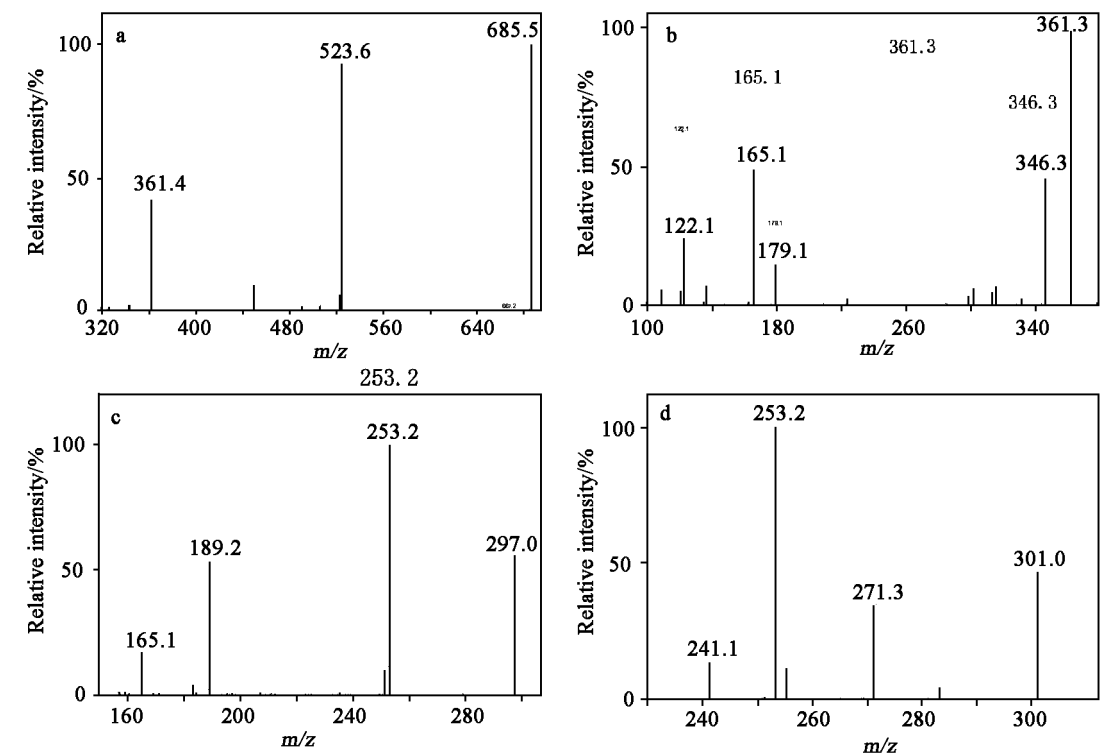


图 1 SDG、Seco、EL、ED 的二级质谱图

Fig. 1 MS/MS spectra of SDG, Seco, EL and ED
(a—SDG, b—Seco, c—EL, d—ED)

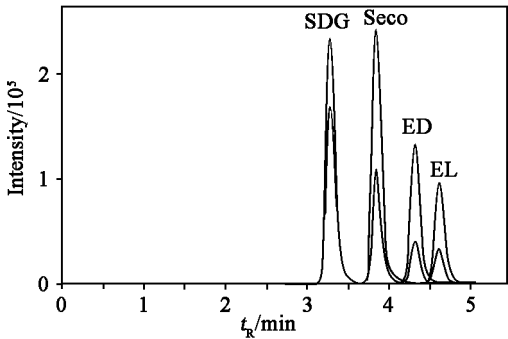


图 2 SDG、Seco、EL、ED 的液相色谱图

Fig. 2 LC chromatogram of SDG, Seco, EL and ED

2.2 线性范围

在空白血清中添加不同量的混合标准溶液,按照前面所述样品前处理方法及仪器条件进行测定,以样品的浓度(x , ng/mL)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标(外标法),进行线性回归方程计算,考查线性范围。

测定结果得出,SDG 在 0~1 000 ng/mL、Seco 在 0~500 ng/mL、EL 在 0~200 ng/mL、ED 在 0~200 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好,线性相关系数 $>0.999\ 1$,回归方程及线性相关系数见表 1。

表 1 SDG、Seco、EL、ED 的线性回归方程
Table 1 The calibration curves of SDG, Seco, EL and ED

定量离子 Target ion m/z		$y=ax+b$		r
		a	b	
SDG	685.5/523.6	14.9	218	0.999 7
Seco	361.0/165.2	624	13 400	1.000 0
EL	297.0/253.2	1730	-4 410	0.999 1
ED	301.0/253.2	821	-1 900	0.999 1

2.3 最低检测浓度(LOQ)

采用信噪比 $S/N=10$ 来计算最低检测浓度,得到本方法的最低检出浓度分别为 SDG 50.0 ng/mL、Seco 5.0 ng/mL、EL 1.0 ng/mL、ED 1.0 ng/mL。

2.4 回收率和精密度

在 100 μ L 空白血清样品中加入浓度分别为 SDG 100.0 ng/mL、Seco 50.0 ng/mL、EL 10.0 ng/mL、ED 10.0 ng/mL 的混合标准溶液,按照所述前处理方法处理后进样分析,计算回收率和精密度,结果见表 2。

表 2 SDG、Seco、EL、ED 的回收率和精密度($n=6$)

Table 2 Results of spiked recovery and precision				
	加标量/ng Spiked level	测定值/ng Level	平均回收率/% Recovery	CV/%
SDG	10.0	9.60	96.0	5.18
Seco	5.00	5.28	105.6	6.41
EL	1.00	0.83	83.0	19.4
ED	1.00	0.79	79.0	13.7

从表中结果可以看出本方法具有较好的回收率,范围在 79.0%~105.6%之间,变异系数(CV)<19.4%,精密度也比较好。

2.5 方法特点

本方法仅采用少量的溶剂来萃取酶解后的血清样品,使用溶剂少,减少了溶剂危害,快速准确、灵敏可靠。采用空白血清添加来评价此方法,结果表明空白血清无干扰。图 3 是空白血清和样品的色谱图。

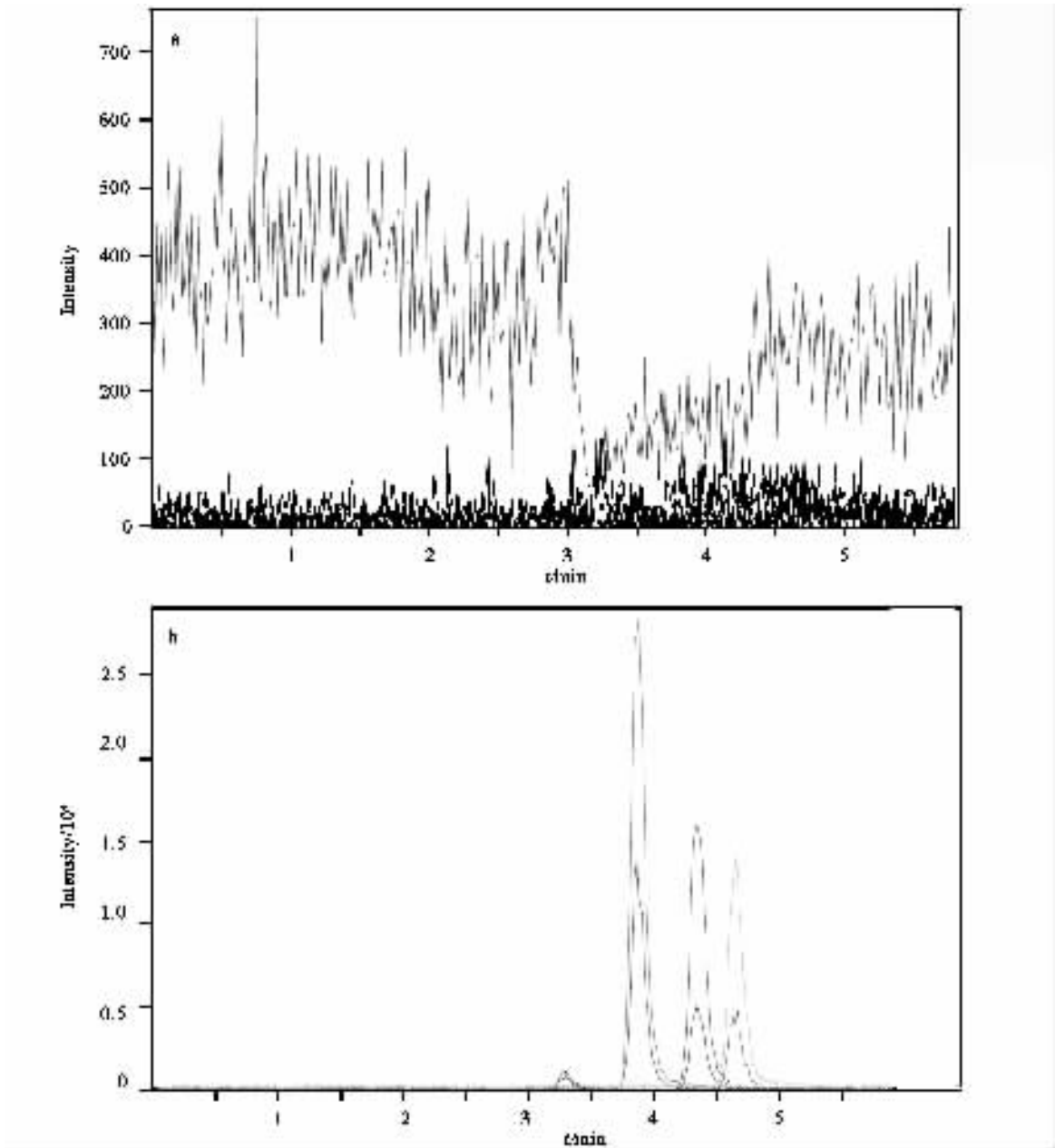


图 3 空白血清(a)和样品(b)测定色谱图
Fig. 3 Chromatogram of (a) blank and (b) unknown serum sample

3 方法应用

依照本文所述方法对中国医学科学院肿瘤研究所提供的一批服药病人的血清样品进行测试。定量计算结果,得出血清样品中木脂素及其代谢产物的含量见表 3。

表 3 血清样品中 SDG、Seco、EL、ED 的浓度 (ng/mL)
Table 3 Content of SDG, Seco, EL
and ED in serum samples (ng/mL)

编号 No.	SDG	Seco	EL	ED
1	<50	8.6	12.6	164
2	<50	36.8	16.6	190
3	<50	78.1	10.4	76.4
4	<50	115	17.0	29.8
5	62.1	85.6	170	474

参考文献:

[1] Axelson M, Setchell K D R. The Excretion of Lignans in Rats-evidence for an Intestinal Bacteri-

al Source for This New Group of Compounds[J]. FEBS Letters, 1981, 123: 337-343.
[2] Setchell K D R., Axelson M. Origin of Lignans inMammals and Identification of a Precursor from Plants[J]. Nature, 1982, 298: 659-660.
[3] Thompson L U, Hill H H, Shultz T D. Quantification of Mammalian Lignans in Biological Fluids Using Gas Chromatography[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 617: 173-179.
[4] Rose D P. Dietary Fiber, Phytoestrogens, and Breast Cancer[J]. Nutrition, 1992,8: 47-51.
[5] Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a Possible Role in Cancer Protection[J]. Environmental Health Perspectives, 1995,103: 103-112.
[6] Jacobs E, Kulling S E, Metzler M. Novel Metabolites of the Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol in Human Urine[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 68: 211-218.

=====

《岩矿测试》

中国科技核心期刊
CODEN: YACEEK

ISSN 0254-5357
CN 11-2131/TD

欢迎订阅 欢迎投稿 承接广告

《岩矿测试》杂志是中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的分析测试技术科技期刊。国际标准刊号:ISSN 0254-5357;国际刊名代码 CODEN: YACEEK;国内统一刊号 CN11-2131/TD。

《岩矿测试》的宗旨是突出服务于地球科学和地质找矿事业以及促进岩矿测试技术的发展;根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变,《岩矿测试》的内容有所拓宽,主要报道国内与分析科学、资源环境、地球科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果、动态、评述及相关实践经验。

《岩矿测试》1982 年创刊,为国内外公开发行人刊物。近年来刊物地位不断提高,是中国科技核心期刊,中国期刊方阵双效期刊。目前被国内外多家检索数据库、文摘收录。曾先后被评为国家、原地矿部、北京市、中国科协的优秀科技刊物。适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校分析化学、环境资源、地球科学等相关专业的师生阅读。

为顺应国家地质工作的根本转变,拓宽地质分析领域,扩大信息容量,缩短发稿周期,适应科技发展和读者的需求,自 2007 年起,《岩矿测试》由季刊变更为双月刊,大 16 开版本,80 页/期,逢双月出版;国内邮发代号 2-313;广告经营许可证:京西工商广字第 0227 号;定价 10.00 元/本,全年 60.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

《岩矿测试》编辑部地址:北京西城区百万庄大街 26 号 国家地质实验测试中心
邮政编码:100037 电话:010-68999562 传真:010-68999563
E-mail: ykcs_zazhi@163.com