

HPLC-MS 代谢组学研究中基质效应的尿液处理方法考察

陈艳华, 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜

(中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

Evaluation of Urine Preparation Method to Matrix Effect in HPLC-MS-Based Metabonomics

CHEN Yan-hua, ZHANG Rui-ping, ABLIZ Zeper

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The purpose of the present work was the evaluation of matrix effects due to the sample preparation approaches using RRLC-ESIMS technique. The result shows that urine dilution has the least relative matrix effect. Additionally, in an effort to reduce sample preparation time for high throughput studies and avoid analyte losses, urine dilution is more suitable to urinary metabonomic research.

Key words: matrix effect; metabonomics; HPLC-ESIMS; urine preparation

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-102-02

基质效应 (matrix effect, ME) 是样品中其他成分对目标分析物测定值的影响, 尤其在生物样品的 ESIMS 分析时, 基质效应是评价样品处理方法和检测准确度的重要指标。进行代谢组学研究时, 需要在不损失样品的情况下尽量提高检测灵敏度和准确性, 因此基质效应是其样品处理方法的重要依据之一。然而, 除盐和大分子物质外, 其余所有的小分子化合物均是代谢组学的研究对象, 所以难以评价其基质效应。本工作利用一组保留时间分布在不同区域的标准品, 考察了采用 RRLC-ESIMS 方法进行代谢组学研究时, 尿液经不同方法处理后的基质效应, 从而为代谢组学研究中尿液的处理方法提供了有利的依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器

Agilent 1200 Series RRLC system, QTRAPTM LC/MS/MS system (Applied Biosystem/MDS Sciex), 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Analyst 1.4.2 数据处理系统。

1.2 主要试剂与材料

乙腈、甲醇和甲酸 (色谱纯): 购自 Merck 公司产品; 8-溴鸟苷 (3): 购于 Sigma 公司; 拉米夫定 (1)、*N*-乙酰酪氨酸 (2)、柚皮苷 (4) 等: 购于中国药品生物制品检定所。采集 6 位志愿者的尿液样本, 保存于 -80 °C 冰箱内。试验用水均为纯净水。

1.3 样品处理

尿液样品经 4 °C 离心 20 min 后, 分别经过 3 种方法处理, (1) 直接稀释法: 用 4 倍的水稀释;

基金项目: 国家重大科学研究计划 (2006CB910600) 资助项目

作者简介: 陈艳华 (1980~), 女 (汉族), 湖北人, 博士研究生, 从事质谱学研究。E-mail: chenyanhua@imm.ac.cn

通信作者: 再帕尔·阿不力孜 (1961~), 男 (维吾尔族), 新疆人, 研究员, 博士生导师, 分析化学及药物分析专业。zeper@imm.ac.cn

(2) 固相萃取法: 尿液经等体积甲醇洗脱、氮吹、水复溶; (3) ACN 沉淀法: 尿液经等体积 ACN 和甲醇水溶液 (1:1) 沉淀, 合并上清, 氮吹, 水复溶。配制标准品储备液浓度分别为标准品①0.44 mmol·L⁻¹; ②3.20 mmol·L⁻¹; ③6.40 mmol·L⁻¹; ④2.20 mmol·L⁻¹。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 SB-C₁₈ 色谱柱(15 cm×2.1 mm×1.8 μm); 流速 0.2 m·min⁻¹; 柱温 40 °C; 梯度: 2~100% B, A=0.1% 甲酸水溶液, B=ACN; 分析时间 21 min。

1.4.2 质谱条件 ESI 源, 正离子检测, EMS 扫描模式, 喷雾针电压 5 500 V。

1.5 基质效应考察方法

6 个不同来源的尿液样本, 经 3 种方法处理后, 分别加入上述标准品溶液: (1) 2 μL; (2) 2 μL; (3) 5 μL; (4) 10 μL。200 μL 水作为空白对照, 依次进行正离子检测模式的 RRLC-ESI-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 绝对基质效应

在获得的 LC/MS 谱中, 记录各标准品的选择离子质量色谱峰的峰面积, 计算各尿液样本的绝对基质效应, 其计算公式为: $[1 - (\text{尿液样本中标准品的质量色谱峰面积}) / (\text{空白对照中标准品的质量色谱峰面积})]$ 。最终获得 3 种尿液处理方法的平均绝对基质效应, 结果示于图 1a。由图可见, 乙腈沉淀的预处理方法产生的绝对基质效应最大, SPE 法的最小。

2.2 相对基质效应

用相同方法处理的多个尿液样品进行 LC/MS 分析时, 各标准品的选择离子质量色谱峰面积的相对标准偏差 (RSD), 则代表其相对基质效应, 示于图 1b。该结果表明, 乙腈沉淀的预处理方法产生的相对基质效应最大, 直接稀释法最好。

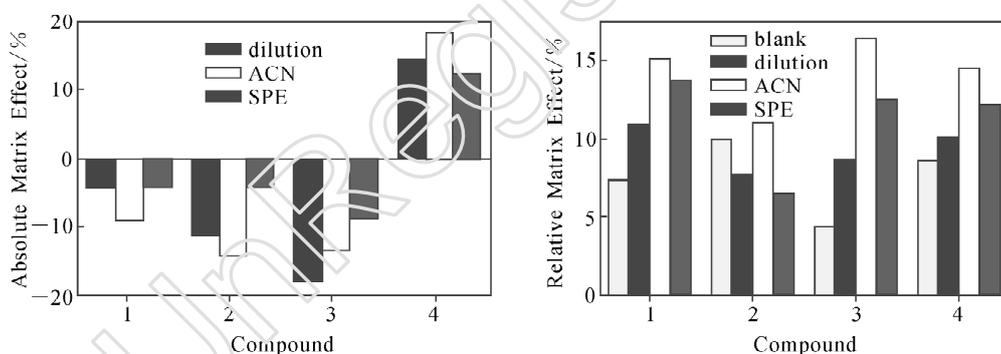


图 1 不同尿液处理方法的基质效应比较

(a) 绝对基质效应; (b) 相对基质效应

Fig. 1 Comparison on matrix effect of different urine pretreatment method

(a) absolute matrix effect; (b) relative matrix effect

2.3 尿液处理方法

绝对基质效应的大小影响检测的灵敏度, 而相对基质效应显示了方法的可靠性^[1]。在代谢组学分析中, 更为重要的是检测结果的可靠性。上述结果显示, 乙腈沉淀法明显较另 2 种样品处理方法差; 直接稀释法的相对基质较小, 处理方法简单不易造成样品损失, 同时由于代谢组学研究具有高通量的特点, 因此, 尿液直接稀释法更加适合运用 LC-ESIMS 方法的代谢组学研究。

参考文献:

- [1] BÖTTCHER C, ROEPENACK-LAHAYE E V, WILLSCHER E, et al. Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2007, 79: 1 507-1 513.