

LC-MS/MS 分析血浆中脂肪酸及代谢产物

钟 宇, 陈 滨, 李 健, 杨青锦, 文 娟, 蔡 春

(广东医科大学分析中心, 广东 湛江 524023)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)同时测定血浆中脂肪酸花生四烯酸(AA)及其代谢产物 13-羟基十八碳烯酸(13-HODE)和 9-羟基十八碳烯酸(9-HODE)的方法。采用 Strata-X 固相萃取柱净化, BEH C18 色谱柱分离, 以乙腈-水为流动相, 流速 0.2 mL/min, 等度洗脱; 电喷雾离子源负离子模式和多反应监测模式定量。结果表明, 3 种物质在 0.5~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.994 2~0.996 0; 低、中、高 3 个加标水平的平均回收率为 97.42%~101.46%; 日内相对标准偏差为 2.72%~6.11%, 日间相对标准偏差为 3.87%~6.39%; AA、13-HODE 和 9-HODE 定量限分别为 0.5、0.5、1.0 $\mu\text{g/L}$ 。该方法简单、灵敏、快速、可靠, 可用于血浆中脂肪酸及其代谢产物的检测分析。

关键词:血浆; 13-羟基十八碳烯酸(13-HODE); 9-羟基十八碳烯酸(9-HODE); 花生四烯酸(AA); 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2018)03-0310-06

doi: 10.7538/zpzb.2016.0192

Analysis of Fatty Acids and Metabolites in Plasma by LC-MS/MS

ZHONG Yu, CHEN Bin, LI Jian, YANG Qing-jin, WEN Juan, CAI Chun

(Analysis Center of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: A method of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for the determination of arachidonic acid (AA), 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) and 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) in plasma. The plasma sample was extracted using solid phase extraction, then separated on BEH C18 column with equal elution of acetonitrile and water as mobile phase, and the flow rate was 0.2 mL/min. It was detected by electrospray ionization tandem mass spectrometry in the multiple reaction monitoring negative mode. The results show that AA, 13-HODE and 9-HODE have good linear relationship in the concentration of 0.5-50 $\mu\text{g/L}$. The average recoveries are 97.42%-101.46% at 3 spiked levels. The precisions of intra-day and inter-day are less than 6.4%. The limits of quantification are 0.5, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/L}$ for AA, 13-HODE and 9-HODE, respectively. The method is simple, efficient and

收稿日期: 2016-12-01; 修回日期: 2017-04-13

基金项目: 国家自然科学基金(21375029); 湛江市科技攻关计划项目(2015B01025); 广东医科大学科研基金(M2016021, XQ1303)资助

作者简介: 钟宇(1981—), 女(汉族), 湖南湘潭人, 研究员, 从事生物医学分析。E-mail: zhongyu517618@163.com

通信作者: 蔡春(1960—), 男(汉族), 广东湛江人, 教授, 从事分析化学研究。E-mail: caichun@gdmc.edu.cn

网络出版时间: 2017-09-15; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20170915.1507.016.html>

accurate, which is suitable for determination of fatty acids and metabolites in plasma.

Key words: plasma; 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE); 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE); arachidonic acid (AA); liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是一种二十碳四烯酸,属于 ω -6多不饱和脂肪酸,AA及其代谢产物在调节新陈代谢、维持机体内环境稳态、调节细胞组织生理功能等方面具有重要作用。脂肪酸的代谢产物单羟基十八碳烯酸(hydroxyoctadecadienoic acids, HODEs)有13-羟基十八碳烯酸(13-hydroxyoctadecadienoic acid, 13-HODE)和9-羟基十八碳烯酸(9-hydroxyoctadecadienoic acid, 9-HODE)两种异构体。亚油酸(linoleic acid, LA)在非酶促作用下产生等摩尔的13-HODE与9-HODE混合物;在15-脂氧酶作用下,LA氧化产生13-HODE;而在5-脂氧酶作用下,LA氧化产生9-HODE^[1-2]。羟基十八碳烯酸在炎症、代谢综合征及肿瘤发生过程中具有多重病理生理学作用。Vangaveti等^[1]指出9-HODE和13-HODE是不同细胞系统炎症的主要调节因子,可作为感染免疫状态的潜在生物标志物^[3]。Leghmar等^[4]研究表明,在感染人巨细胞病毒(HCMV)的永生化人绒毛外滋养细胞(HIPEC)中释放13-HODE的量增加,在孕期13-HODE参与炎症调节和脉管系统的形成。通过吡格列酮刺激可以提高13-HODE的水平,有助于调节脂质代谢和通过调控糖尿病患者的PPAR通路降低患心血管疾病的风险^[5-7]。9-HODE和13-HODE在细胞有丝分裂和凋亡中作为程序性细胞死亡过程的调控因子,在维持正常细胞代谢中发挥重要作用,同时也有研究表明,9-HODE和13-HODE与肿瘤的发生发展相关^[8-9]。

目前,有关羟基十八碳烯酸的研究主要集中在病理生理学功能,以及其在体内代谢的产生途径方面,而关于羟基十八碳烯酸分析方法的报道较少。Dumlao等^[10]采用LC-MS/MS法检测细胞中类花生四烯酸;An等^[11]采用HPLC法检测细菌中13-HODE等成分;王秀娟等^[12]采用液质联用法对海带中的氧化脂类成分进行检测;Schober等^[13]利用GC/MS法检测了红细胞中脂肪酸含量。GC/MS法需要

样品衍生化,且不适合分析热不稳定代谢物;而LC/MS和LC-MS/MS的前处理方法相对简单,样品提取后不需衍生等前处理方法就可以直接上机分析。因此,本研究拟通过优化固相萃取处理技术,采用LC-MS/MS法同时测定血浆中AA、13-HODE和9-HODE,以期为血浆中脂肪酸的代谢研究提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200-6430A液相色谱-串联质谱仪:美国Agilent公司产品;3K15台式高速冷冻离心机:德国Sigma公司产品。

花生四烯酸标准品、13-羟基十八碳烯酸标准品、9-羟基十八碳烯酸标准品、氘代花生四烯酸(arachidonic acid-d8, AA-d8):美国Cayman Chemical公司产品;乙腈:德国Merck公司产品;实验用水:由美国Millipore公司的超纯水系统制备。

1.2 血浆样品中脂肪酸及代谢产物的提取和处理

取100 μ L血浆,加入1 mL甲醇和10 μ L 100 μ g/L内标,于4 $^{\circ}$ C下搅拌10 min,以13 000 r/min离心5 min,取上清液;用1 mL甲醇和1 mL 0.1%甲酸溶液活化固相萃取柱(Strata-X, 10 mg),向上清液中添加4 mL 0.1%甲酸溶液,上样;用1 mL 0.1%甲酸和1 mL 15%乙醇溶液按次序淋洗萃取柱,最后用200 μ L甲醇洗脱,收集洗脱液,进行LC/MS分析。

1.3 标准溶液的配制

分别准确量取一定量的AA、13-HODE、9-HODE标准品溶液,用流动相定容,配制成1 mg/L的AA、13-HODE、9-HODE标准储备液。准确量取一定量的AA-d8内标溶液,用甲醇定容,配制成1 mg/L的AA-d8内标储备液。储备液置于-20 $^{\circ}$ C保存,使用时用流动相逐级稀释成混合标准工作液。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm);流动相:A 为水,B 为乙腈;流速 0.2 mL/min,柱温 40 °C,进样量 10 μL;梯度洗脱程序:0~2 min(40%B),2~20 min(40%~95%B),20~20.5 min(40%B)。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式;多反应监测模式(MRM);干燥器温度350 °C,干燥气流速 10 L/min;毛细管电压4 000 V。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

在正、负离子模式下,分别进样 10 μL 1 g/L 的 AA、13-HODE、9-HODE 和 AA-d8 标准溶液,在 m/z 50~400 范围内全扫描,以选择合适的电离模式和准分子离子峰。AA、13-HODE、9-HODE 和 AA-d8 在负离子模式下的响应值较高,示于图 1。在选择离子监测模式下,优化 AA、13-HODE、9-HODE 和 AA-d8 的锥孔电

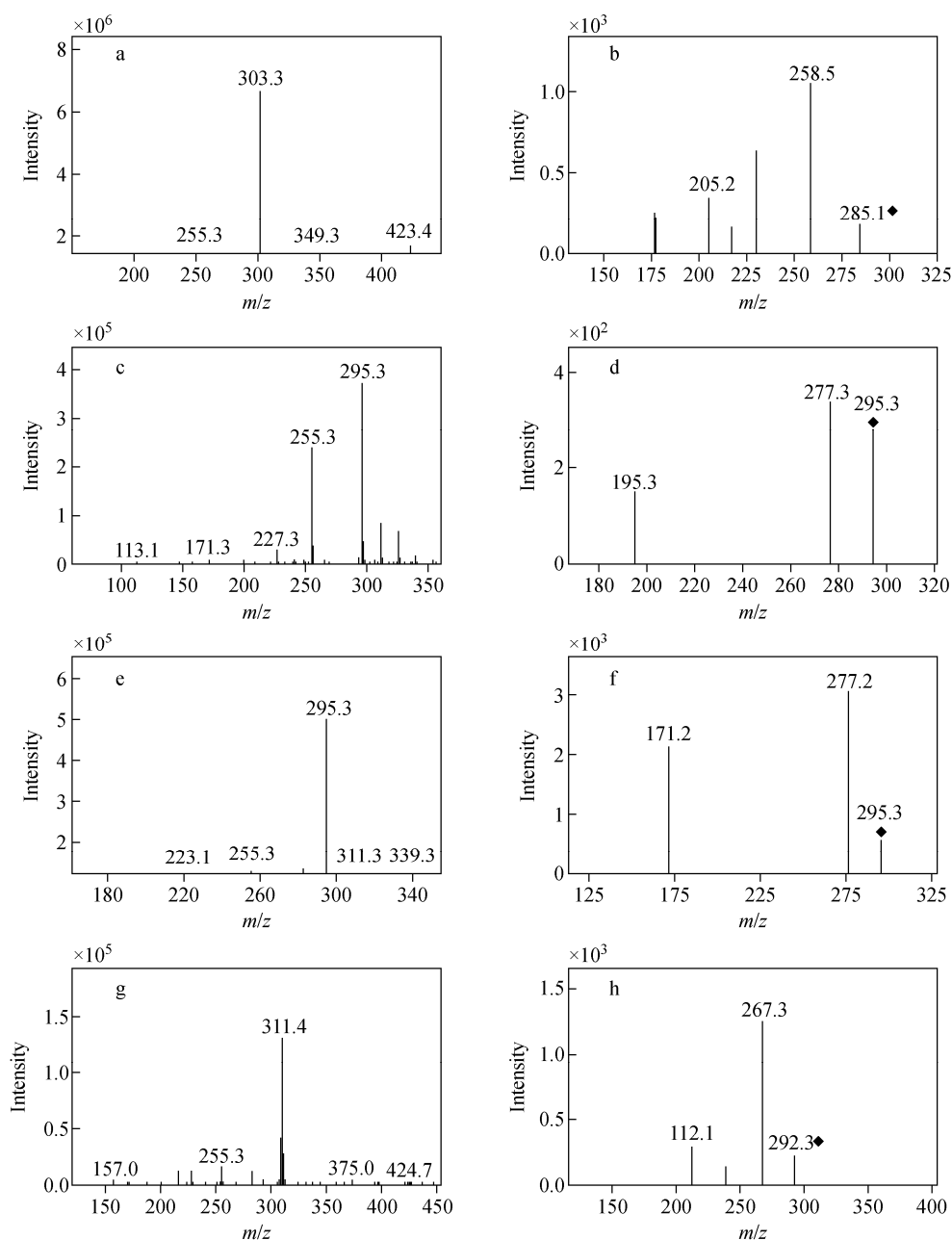


图 1 AA、13-HODE、9-HODE、AA-d8 的全扫描图(a, c, e, g)和子离子扫描图(b, d, f, h)

Fig. 1 Full-scan (a, c, e, g) and product ion (b, d, f, h) mass spectra of AA, 13-HODE, 9-HODE and AA-d8

压,使离子峰强度达到最高;在多反应监测模式下,优化AA、13-HODE、9-HODE和AA-d8的定性和定量离子的碰撞能量,分别选用 m/z 303.3 $>$ 259.5、 m/z 295.3 $>$ 195.3、 m/z 295.3 $>$ 171.2、 m/z 311.4 $>$ 267.3作为定量离子。

13-HODE和9-HODE互为同分异构体,其色谱分离特性相似,在液相色谱中难以分离。在优化质谱条件时,由于二者母离子相同,主要对其子离子进行条件优化,选用2个化合物中质荷比不同的子离子作为定量离子。为了监测13-HODE和9-HODE在分析过程中是否相互干扰,在进行13-HODE定量离子MRM分析时,同时监测了9-HODE定量离子 m/z 295.3 $>$ 171.2,结果显示13-HODE的MRM色谱图中没有 m/z 295.3 $>$ 171.2离子峰。同样,在进行9-HODE定量离子MRM分析时,同时监测了

13-HODE定量离子 m/z 295.3 $>$ 195.3,结果显示9-HODE子离子扫描图中也没有 m/z 295.3 $>$ 195.3离子峰,故两者不存在互相干扰。

2.2 色谱条件的优化

为了优化AA、13-HODE、9-HODE在色谱柱上的保留时间和分离条件,探讨了流动相中乙腈的比例和流速的影响。在固定流速下,将乙腈比例从30%升至40%,发现AA、13-HODE、9-HODE的响应值升高,峰形变好;将乙腈比例从30%降至20%,或将乙腈比例升至45%、60%时,分离度均有不同程度的降低。在优化梯度洗脱条件下,同时优化了流动相流速,最终选择1.4.1节中的梯度洗脱程序进行洗脱。在优化条件下,AA、13-HODE、9-HODE、AA-d8标准溶液的色谱图示于图2。

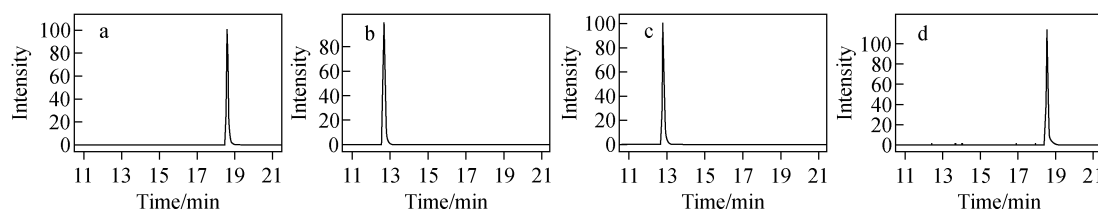


图2 化合物AA(a)、13-HODE(b)、9-HODE(c)、AA-d8(d)的分离色谱图

Fig. 2 Chromatograms of AA (a), 13-HODE (b), 9-HODE (c) and AA-d8 (d)

2.3 样品前处理条件的优化

本实验考察了两种方式淋洗固相萃取柱时的回收率。第一种方式为先分别用0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%甲酸溶液淋洗固相萃取柱,再用15%乙醇溶液淋洗,结果显示,用0.1%甲酸溶液和15%乙醇溶液淋洗时的回收率最高。第二种方式为先用0.1%甲酸溶液淋洗固相萃取柱,再分别用30%、20%、15%、10%、5%乙醇溶液淋洗,用0.1%甲酸溶液和15%乙醇溶液淋洗时的回收率最高。故选择0.1%甲酸-15%乙醇溶液作为淋洗液。

2.4 线性范围、检出限及定量限

本实验配制了0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的AA、13-HODE、9-HODE混合标准溶液,各浓度标准溶液的内标浓度均为50 $\mu\text{g/L}$ 。在优化的条件下,以定量离子的峰面积对质量浓度绘制标准曲线,在0.5~50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内,3种脂肪酸代谢物均呈现良好的线性关系,相

关系数均大于0.99。以信噪比大于3为样品的检出限(LOD),以信噪比大于10为样品的定量限(LOQ),其结果列于表1。

2.5 重复性和精密度

取10 mg/L 的AA、13-HODE、9-HODE混合标准溶液,在同一样品、同一天的3、6、9、12 h和第1、2、3天进行重复测试,连续进样6次。结果表明:AA、13-HODE、9-HODE日内标准偏差(RSD)分别为6.11%、3.89%和3.72%,日间标准偏差分别为6.39%、4.76%和3.87%,精密度RSD分别为2.77%、1.95%和1.48%。说明该方法的重现性和稳定性较好。

2.6 方法的回收率

向样品中分别加入200 μL 0.5、5、20 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液,按1.2节方法操作,每个浓度分别连续进样6次。在不同的加标浓度下,AA的回收率均在98.50%~100.07%之间,RSD在3.7%~5.6%之间;13-HODE的回收率均

在 97.43%~101.46% 之间, RSD 在 3.6%~5.1% 之间; 9-HODE 的回收率均在 97.42%~100.85% 之间, RSD 在 3.8%~4.8% 之间, 其结果列于表 2。

表 1 AA、13-HODE 和 9-HODE 的线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 1 Linear equations, correction coefficients (R^2), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of AA, 13-HODE and 9-HODE

目标物 Analytes	线性方程 Linear equations	相关系数 R^2	检出限 LODs/($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQs/($\mu\text{g/L}$)
AA	$y=0.0384x+0.0101$	0.9960	0.2	0.5
13-HODE	$y=0.1267x-0.1655$	0.9942	0.2	0.5
9-HODE	$y=0.0735x-0.0806$	0.9955	0.2	1.0

表 2 AA、13-HODE、9-HODE 的加标回收率和精密度 ($n=6$)

Table 2 Recoveries and precisions of AA, 13-HODE and 9-HODE ($n=6$)

目标物 Analytes	添加量 Addition amounts/ng	测得量 Measured amounts/ng	回收率 Recoveries/%	RSD/%
AA	0.5	0.4950 ± 0.1185	98.50	5.6
	5.0	5.2283 ± 0.5450	100.07	3.7
	20.0	19.7950 ± 1.5823	98.96	4.7
13-HODE	0.5	0.4933 ± 0.2263	98.56	5.1
	5.0	4.8717 ± 0.3183	97.43	3.6
	20.0	19.7928 ± 1.1277	101.46	4.6
9-HODE	0.5	0.5033 ± 0.1744	100.85	4.8
	5.0	4.9736 ± 0.3066	99.49	3.8
	20.0	19.4833 ± 1.0706	97.42	4.6

2.7 实际样品分析

取 6 份年龄为 50~60 周岁的结直肠癌病人血浆, 同时采集 6 份同一年龄段健康人的血浆样品, 按照 1.2 节方法处理, 用 LC-MS/MS 检测。样品中 AA、13-HODE、9-HODE 的色

谱分离图示于图 3。血浆中 AA、13-HODE、9-HODE 的含量示于图 4。结果表明, 正常组血浆中 AA、13-HODE、9-HODE 的含量均略高于结直肠癌组。

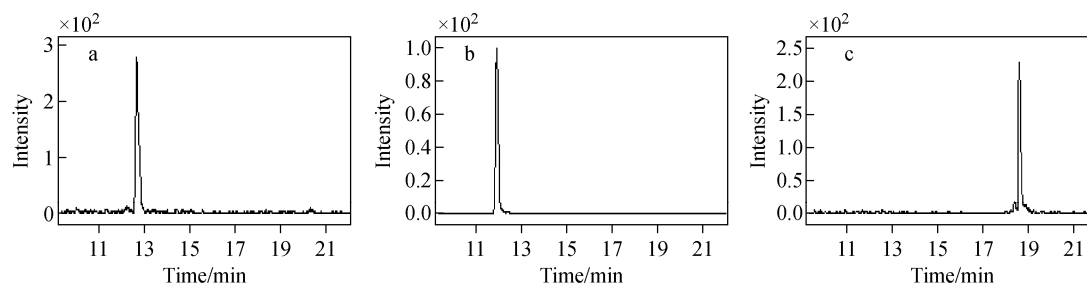


图 3 实际样品中 13-HODE(a)、9-HODE(b)、AA(c) 的分离色谱图

Fig. 3 Chromatograms of 13-HODE (a), 9-HODE (b) and AA (c) in the actual samples

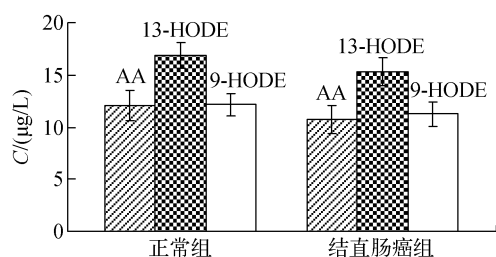


图4 血浆样品中AA、13-HODE和9-HODE的含量

Fig. 4 Contents of AA, 13-HODE and 9-HODE in plasma samples

3 结论

通过对血浆样品进行前处理,建立了LC-MS/MS法分析血浆中脂肪酸代谢产物AA、13-HODE、9-HODE,该方法具有良好的灵敏度、回收率和重现性,适用于血浆中脂肪酸及代谢产物的分析测定。

参考文献:

- [1] VANTANETI V N, SHASHIDHAR V M, RUSH C, et al. Hydroxyoctadecadienoic acids regulate apoptosis in human THP-1 cells in a PPAR γ -dependent manner[J]. *Lipids*, 2014, 49(12): 1 181-1 192.
- [2] SALIL S, GRÉGOIRE R, SOBAN U, et al. Role of oxidized lipids in pulmonary arterial hypertension[J]. *Pulm Circ*, 2016, 6(3): 261-273.
- [3] TAM V C, QUEHENBERGER O, ADEREM A, et al. Lipidomic profiling of influenza infection identifies mediators that induce and resolve inflammation[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 213-227.
- [4] LEGHMAR K, CENAC N, ROLLAND M, et al. Cytomegalovirus infection triggers the secretion of the PPAR γ agonists 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) and 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) in human cytotrophoblasts and placental cultures [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132627.
- [5] VINAIXA M, RODRIGUEZ M A, SAMINO S, et al. Metabolomics reveals reduction of metabolic oxidation in women with polycystic ovary syndrome after pioglitazone-flutamide-metformin polytherapy[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29052.
- [6] YE Y, LIN Y, MANICKAVASAGAM S, et al. Pioglitazone protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury in eNOS and iNOS knockout mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 95(6): H2436-H2446.
- [7] NISSEN S E, WOLSKI K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality [J]. *Arch Intern Med*, 2010, 170(14): 1 191-1 201.
- [8] CABRAL M, MARTÍN-VEGAS R, MORENO J J. Differential cell growth/apoptosis behavior of 13-hydroxyoctadecadienoic acid enantiomers in a colorectal cancer cell line [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014, 307(6): 664-671.
- [9] CHANG J, JIANG L, ZHANG M Z, et al. 12/15 Lipoxygenase regulation of colorectal tumorigenesis is determined by the relative tumor levels of its metabolite 12-HETE and 13-HODE in animal models [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 2 879-2 888.
- [10] DUMLAO D S, BUCZYNSKI M W, DENNIS E A, et al. High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and *N*-acyl ethanolamines [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 181(11): 724-736.
- [11] AN J U, KIM B J, OH D K, et al. Characterization of an omega-6 linoleate lipoxygenase from *Burkholderia thailandensis* and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(13): 5 487-5 497.
- [12] 王秀娟,陈娟娟,徐继林,等. 海带中氧化脂类成分的液质联用分析研究 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(10): 1 656-1 664.
WANG Xiujuan, CHEN Juanjuan, XU Jilin, et al. Quantitative analysis of oxylipins in *Laminaria japonica* by LC-MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(10): 1 656-1 664 (in Chinese).
- [13] SCHOBBER Y, WAHL H G, NOCKHER W A, et al. Determination of red blood cell fatty acid profiles: rapid and high-confident analysis by chemical ionization-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 13(1 040): 1-7.