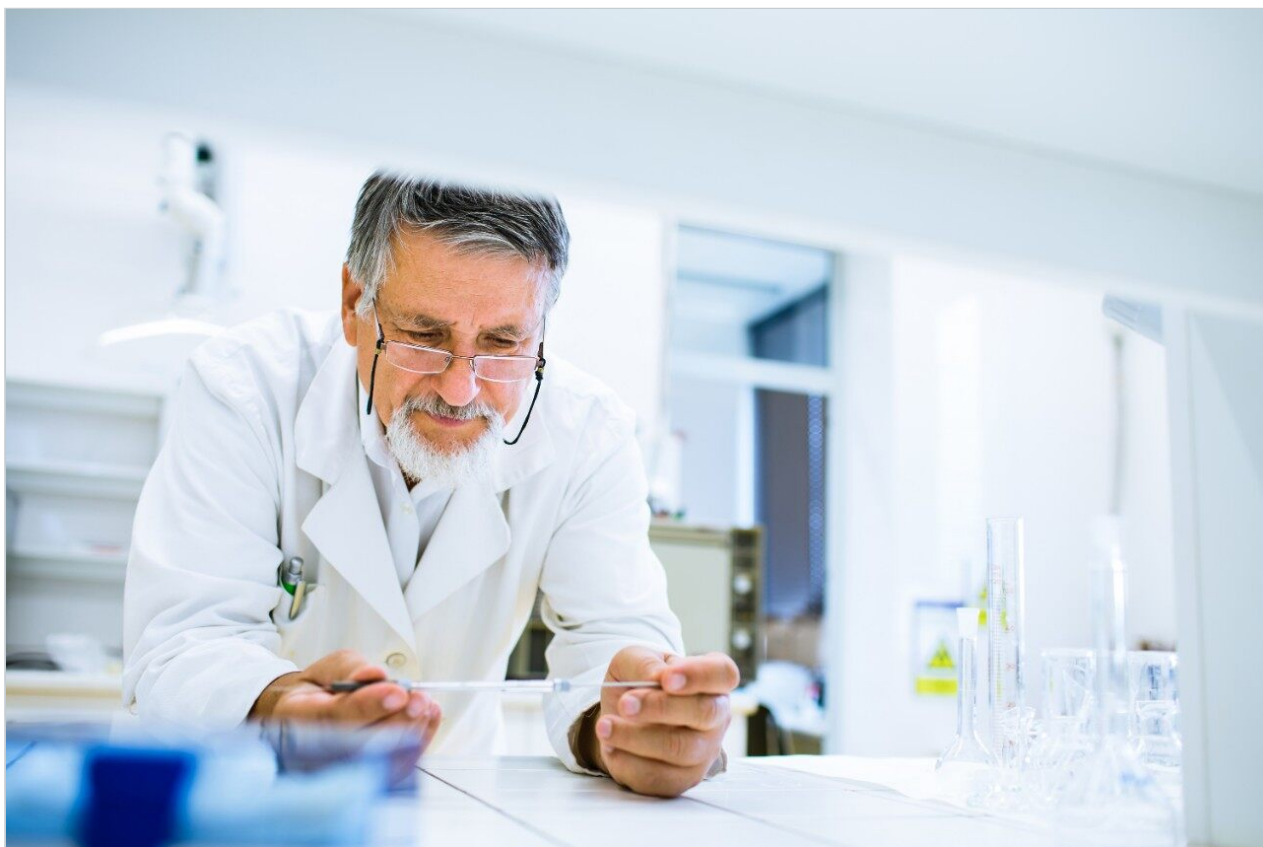


应用纪要

脂氧化物的靶向UPLC-MS/MS分析

Billy J. Molloy

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

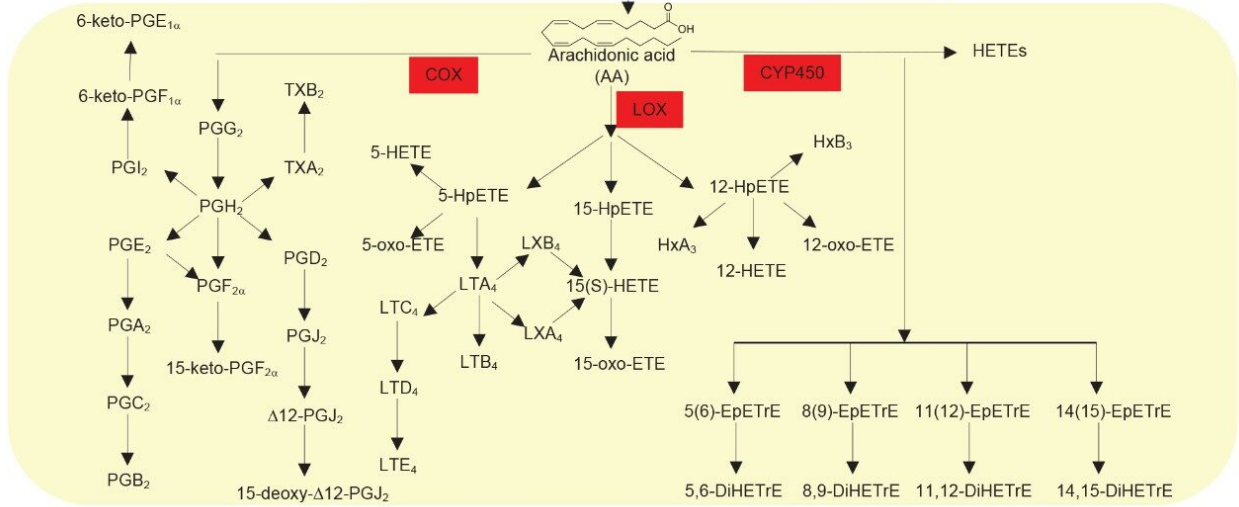
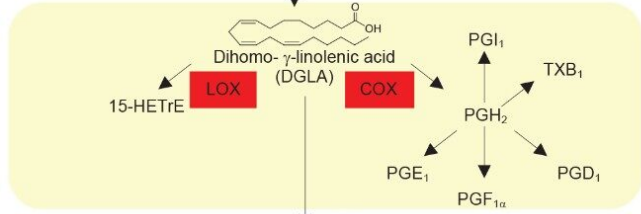
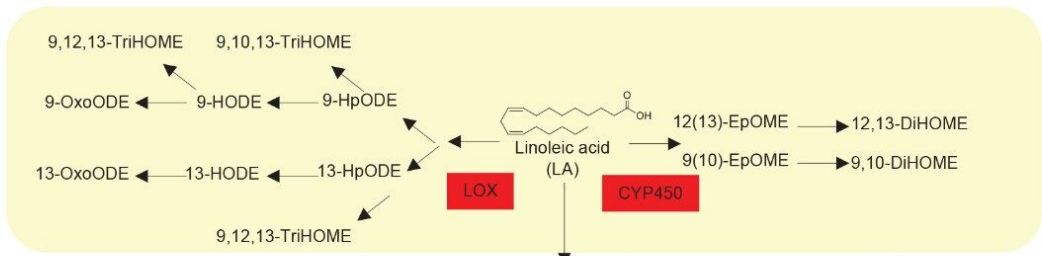
本文介绍一种对血浆/血清和细胞培养基中的生物活性脂氧化物（氧化脂肪酸）进行半定量分析的靶向UPLC-MS/MS方法。混合模式固相萃取(Oasis MAX μ Elution SPE)与UPLC-MS/MS结合使用，能够分析多种脂氧化物，适用于靶向工作流程。本文详细列出了92种脂氧化物的保留时间和MRM通道，以便在生物医学研究中对样品进行常规的靶向分析。

优势

- 具有高分析灵敏度和选择性的UPLC-MS/MS方法，运行一次即可分析92种脂氧化物
- 可分离主要异构体
- 无需衍生化的简易分析流程

简介

脂氧化物是重要的生物活性脂质，在许多关键的生物过程中发挥重要作用，尤其是炎症的诱发和消退过程。因此，对血浆/血清和细胞培养物样品中的各种脂氧化物进行半定量分析将有利于生物医学研究。脂氧化物由 ω -6多不饱和脂肪酸（亚油酸、肾上腺酸、花生四烯酸）和 ω -3多不饱和脂肪酸（ α -亚麻酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸）的酶促和非酶促氧化作用产生，如图1和图2所示。产生此类化合物涉及的主要代谢途径包括环氧合酶(COX)、脂氧合酶(LOX)和细胞色素P450 (CYP)途径。这些途径是多种疾病的重要药物靶点，因此半定量分析方法与药物发现密切相关。但是，由于脂氧化物的内源性浓度低并且在样品中的稳定性不佳，进行半定量分析非常棘手。另外，同一种脂肪酸前体可能在分子的不同位置发生反应，得到多种异构体。因此，要求使用的分析方法具有出色的专属性和灵敏度。之前使用辐射测量和酶免疫分析法分析脂氧化物，但这些方法通常缺乏选择性，只能靶向测量少量化合物。还使用过气相色谱(GC-MS)法，但该方法需要进行衍生化等复杂程序。本文介绍一种用于分析血浆/血清和细胞培养物样品中92种脂氧化物的靶向UPLC-MS/MS方法。



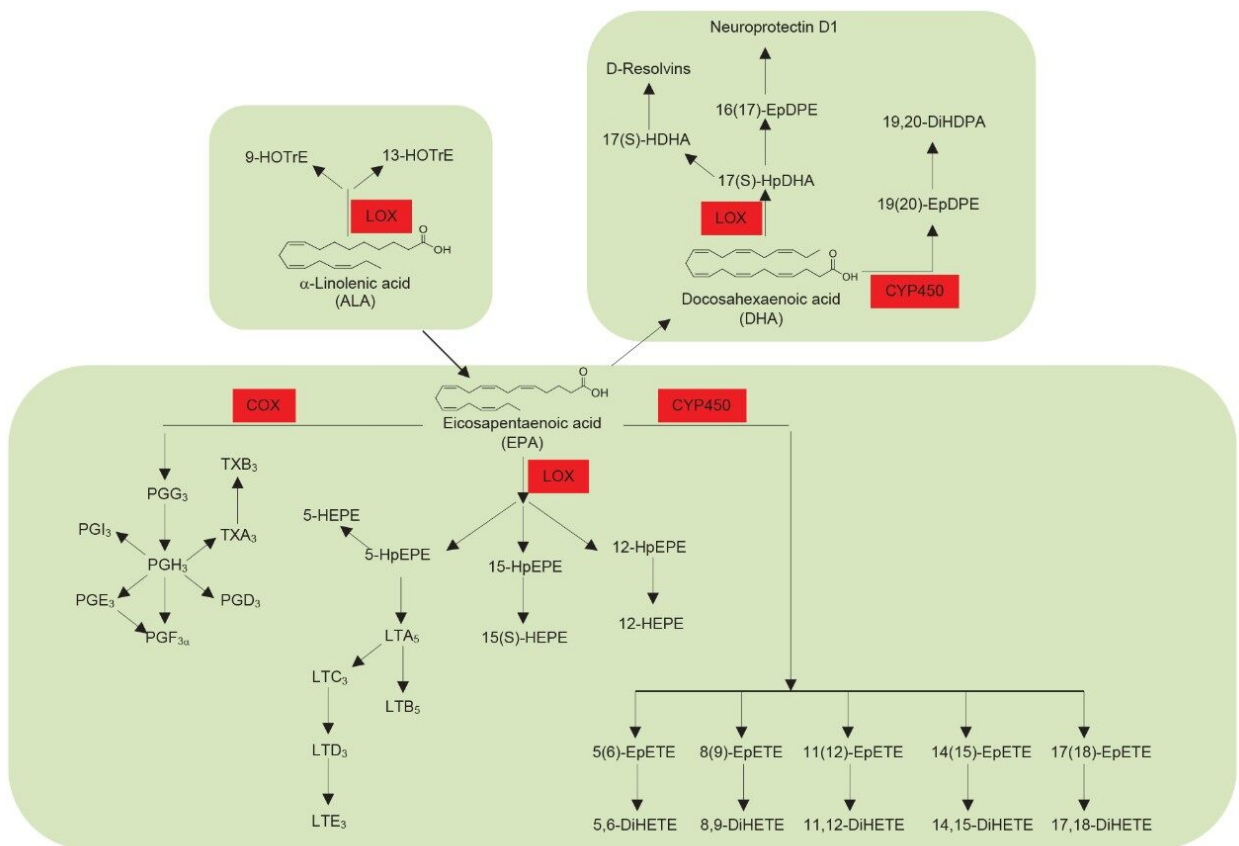


图1和图2.形成脂氧化物的代谢途径示意图

实验

样品前处理

样品预处理（在稀释前先对样品进行离心）

- 血浆/血清：样品稀释：150 μ L血浆样品 + 550 μ L水
- 细胞培养物：样品稀释：300 μ L细胞培养物样品 + 400 μ L [85:15（200 μ M碳酸氢铵:甲醇）]

使用Waters Oasis MAX μ Elution提取板进行固相萃取：血浆

- 用200 μ L甲醇进行活化
- 用200 μ L水进行活化

- 上样（总体积）
- 用600 μL水进行清洗
- 用600 μL甲醇进行清洗
- 向每个孔中加入30 μL 10%甘油的水溶液，制备收集板
- 用30 μL 50:50 ACN:IPA+5%甲酸尽可能缓慢地洗脱
- 用聚丙烯垫盖密封孔板
- 混合孔板
- 取3 μL注入UPLC-MS/MS系统

使用Waters Oasis MAX μElution提取板进行固相萃取：细胞培养物

- 用200 μL甲醇进行活化
- 用200 μL [85:15（200 μM碳酸氢铵:甲醇）]进行活化
- 上样（总体积）
- 用600 μL [85:15（200 μM碳酸氢铵:甲醇）]进行清洗
- 用600 μL甲醇进行清洗
- 向每个孔中加入30 μL 10%甘油的水溶液，制备收集板
- 用30 μL 50:50 ACN:IPA+5%甲酸尽可能缓慢地洗脱
- 用聚丙烯垫盖密封孔板
- 混合孔板
- 取3 μL注入UPLC-MS/MS系统

UPLC条件

使用ACQUITY UPLC I-Class系统装配ACQUITY Premier BEH C₁₈ (2.1×150 mm)分析柱（柱温维持在35 °C）进行UPLC分离。将3 μL等分试样注入色谱柱，在反相梯度条件下进行洗脱，流动相A为0.01%甲酸的水溶液，流动相B为0.01%甲酸的乙腈溶液。使用3阶段线性梯度分离从色谱柱流出的脂氧化物。在初始阶段，流动相B在4 min内由25%增加至28%；随后进入第二阶段，流动相B在8 min内由28%增加至32%。最后进入第三阶段，流动相B在14 min内由32%增加至95%，然后冲洗色谱柱2 min，接下来重新平衡色谱柱，使其恢复起始条件。

MS条件

使用Xevo TQ-XS质谱仪进行多重反应监测(MRM)分析来检测脂氧化物。所有实验均在负离子电喷雾电离(ESI-)模式下进行。离子源温度和毛细管电压保持不变,分别设置为150 °C和2.0 kV。锥孔气流速为50 L/h,脱溶剂气温度为650 °C。所用的MRM通道详见表1。

信息学软件

利用MassLynx中的Quanpedia功能将方法信息导入LC-MS系统。这款可拓展且可搜索的数据库不仅可以生成LC和MS方法,还能生成在TargetLynx中用于化合物定量分析的处理方法。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
检测条件:	Xevo TQ-XS
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C ₁₈ (2.1×150 mm)
柱温:	35 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	3 μL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	0.01%甲酸的水溶液
流动相B:	0.01%甲酸的乙腈溶液
梯度:	0~4 min, B由25%增加至28% 4~12 min, B由28%增加至32% 12~26 min, B由32%增加至95%

MS条件

MS系统: Xevo TQ-XS

电离模式: ESI-

毛细管电压: 2.0 kV

结果与讨论

本研究的重点是展示一种高灵敏度、高专属性的UPLC-MS/MS方法，用于分析血浆、血清和细胞培养物样品中的生物活性脂氧化物。生物样品中的脂氧化物含量非常低，因此妥善进行样品前处理对于成功完成分析非常重要。为尽可能去除不相关的基质组分，大幅改善低丰度分析物的检测灵敏度，我们在UPLC-MS/MS分析之前使用了阴离子交换混合模式固相萃取(Oasis MAX SPE)。此类SPE专门用于靶向提取基质中的酸，能够得到比标准SPE方法更洁净的样品。

脂氧化物是一类化合物，具有非常多结构相似的异构体。要分离这些物质，必须采用正确的色谱条件。通过比较各种流动相/固定相组合，对本研究所用的反相UPLC条件进行了大量优化，使其能够分离多种异构体。图3为混合人血浆样品的代表性色谱图，显示了样品中高丰度脂氧化物的洗脱顺序。表1完整列出了全部92种分析物的保留时间以及优化后的MRM条件。图4举例说明了UPLC梯度发挥的出色专属性。通过色谱图可以清楚看出，从溶剂标准品中分离2种结构异构体（即PGE2和PGD2）的能力不足，因为该基质中同一化合物的异构体形式更多。人血浆中PGE2和PGD2的UPLC色谱图展示了这些分析物存在的多种同分异构体（箭头指示分析物峰）。

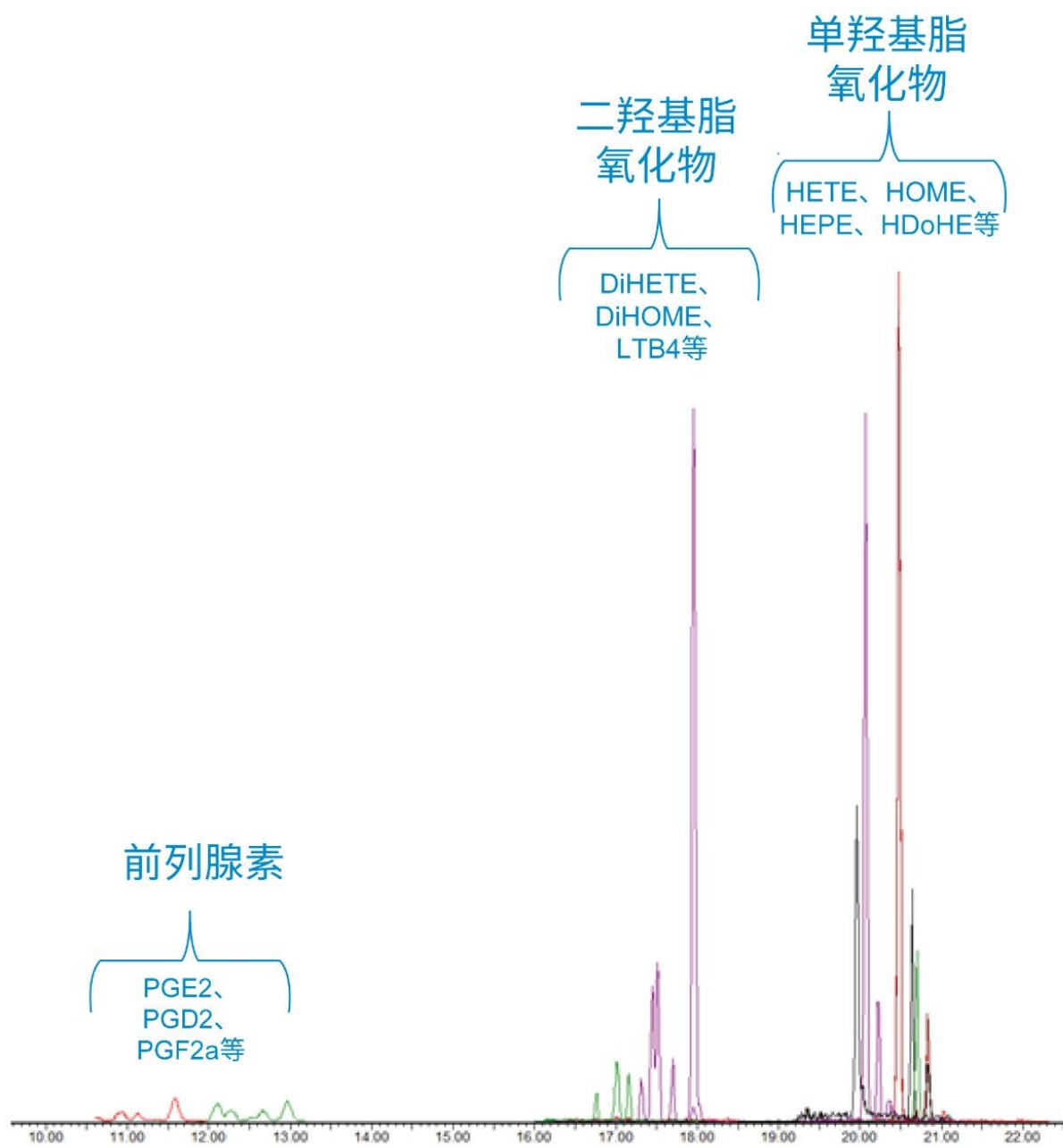


图3.UPLC-MS/MS色谱图，显示人血浆中一些高丰度脂氧化物的洗脱顺序。（分析物及保留时间的完整列表详见表1。）

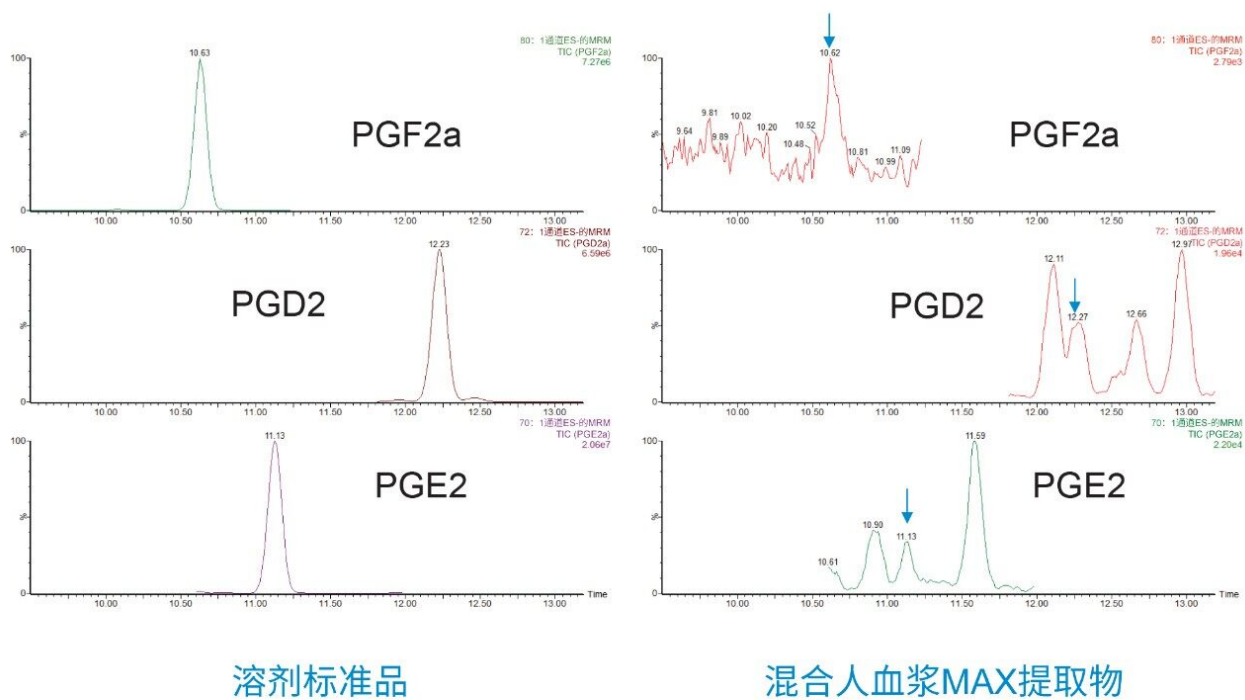


图4.人血浆和溶剂标准品中前列腺素的UPLC-MS/MS色谱图（箭头指示人血浆样品中真正的分析物峰。）

在负离子ESI模式下使用Xevo TQ-XS测定所有脂氧化物的保留时间和最佳MRM通道（表1）。为提高检测灵敏度，在定义的保留时间窗口内监测这些MRM通道，通过减少重叠通道尽量延长驻留时间。使用这种UPLC-MS/MS方法，可以快速分析血浆、血清和细胞培养物样品中的92种脂氧化物。

化合物	母离子质量数	子离子质量数	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)	RT (min)
6-酮基PGF1 α	369.1	207.0	60	19	4.70
8-iso 15(R) PGF2 α	353.1	193.0	40	20	7.62
8-iso PGF2 α	353.1	193.0	40	20	8.04
TXB2	369.1	169.0	25	16	8.20
11 β -PGF2 α	353.1	193.0	40	20	8.55
(+/-) 5-iPF2 α -VI	353.1	115.0	25	19	9.52
PGF2 α	353.1	193.0	40	20	10.40
8-iso PGE2	351.1	271.1	30	16	10.94
脂氧素A5	349.1	115.0	25	12	11.25
PGE2	351.1	271.1	30	16	11.30
11 β -PGE2	351.1	271.1	30	16	11.70
消退素D3	375.1	147.0	25	18	12.43
脂氧素B4	351.1	221.1	25	12	12.50
PGD2	351.1	271.1	30	16	12.56
15-酮基PGE2	349.1	287.1	40	12	12.60
消退素D2	375.1	141.0	25	15	13.34
13,14-二氢-15-酮基PGE2	351.1	113.0	20	28	14.20
消退素D1	375.1	141.0	25	13	14.68
脂氧素A4	351.1	115.0	25	13	14.68
15(R)-脂氧素A4	351.1	115.0	25	13	14.76
17(R)-消退素D1	375.1	141.0	25	13	14.83
6(S)-脂氧素A4	351.1	115.0	25	13	15.10
13,14-二氢-15-酮基PGD2	351.1	113.0	20	28	15.34
LTD4	495.1	177.0	25	18	15.85
LTE4	438.1	333.1	25	16	16.48
8(S),15(S)-DiHETE	335.1	208.0	25	16	17.00
17,18-DiHETE	335.1	247.1	25	14	17.13
5(S),15(S)-DiHETE	335.1	115.0	25	13	17.25
神经保护素D1	359.1	153.0	25	13	17.35
消退素D5	359.1	119.0	25	13	17.44
14,15-DiHETE	335.1	207.0	25	14	17.50
LTB4	335.1	195.0	35	14	17.60
15-脱氧- Δ 12,14-PGD2	333.1	271.1	10	14	17.60
12,13-DiHOME	313.1	183.0	35	15	17.70
9,10-DiHOME	313.1	201.0	35	15	18.00
14,15-DiHETrE	337.0	207.0	25	15	18.40
19,20-DiHDP A	361.1	273.1	25	14	18.47
12S-HHTrE	279.1	179.0	35	15	18.50
11,12-DiHETrE	337.1	167.0	25	16	18.80
9-HOTrE	293.1	171.0	30	12	19.10
8,9-DiHETrE	337.1	127.0	25	16	19.16
13-HOTrE	293.1	224.0	30	10	19.24
15-脱氧- Δ 12,14-PGJ2	315.1	271.1	10	12	19.50
5(S),6(R)-DiHETE	335.1	115.0	25	14	19.50
5,6-DiHETrE	337.1	145.0	25	16	19.65
5(S),6(S)-DiHETE	335.1	115.0	25	14	19.73
12(S)-HEPE	317.1	179.0	35	15	19.85
5(S)-HEPE	317.1	115.0	35	15	20.17
13-HODE	295.1	195.0	45	14	20.17
20-HDoHE	343.1	341.1	35	15	20.24
9-HODE	295.1	171.0	35	15	20.26
15-HETE	319.1	175.0	35	11	20.45
16-HDoHE	343.1	233.0	35	15	20.49
17-HDoHE	343.1	201.0	35	15	20.55
17(18)-EpETE	317.1	215.0	20	10	20.56
9-HpODE	293.1	185.0	30	16	20.60
13-HpODE	293.1	113.0	30	18	20.63
13-HDoHE	343.1	193.0	35	15	20.65
13-KODE	293.1	113.0	30	17	20.72
11-HETE	319.1	167.0	35	15	20.72
15-HpETE	317.1	113.0	30	16	20.75
14-HDoHE	343.1	205.0	35	15	20.75
10-HDoHE	343.1	153.0	35	15	20.81
15-KETE	317.1	113.0	30	17	20.83
14(15)-EpETE	317.1	207.0	20	10	20.90
9-KODE	293.1	185.0	30	17	20.90
11-HDoHE	343.1	149.0	35	15	20.93
12-HETE	319.1	179.0	30	12	20.97
11(12)-EpETE	317.1	167.0	20	10	21.00
8-HETE	319.1	155.0	35	14	21.00
7-HDoHE	343.1	141.0	35	15	21.06
15(S)-HETrE	321.1	221.1	35	15	21.08
8(9)-EpETE	317.1	155.0	20	10	21.10
12(S)-HpETE	317.1	153.0	30	14	21.13
8-HDoHE	343.1	189.0	35	15	21.15
9-HETE	319.1	167.0	35	15	21.15
12-KETE	317.1	153.0	30	17	21.24
5-HETE	319.1	115.0	35	10	21.33
4-HDoHE	343.1	101.0	35	15	21.56
19(20)-EpDPE	343.1	241.1	25	10	21.56
5-HpETE	317.1	203.0	30	16	21.64
12(13)-EpOME	295.1	195.0	25	13	21.66
14(15)-EET	319.1	219.0	50	8	21.72
9(10)-EpOME	295.1	171.0	25	14	21.84
16(17)-EpDPE	343.1	233.1	25	10	21.85
13(14)-EpDPE	343.1	193.1	25	10	21.92
10(11)-EpDPE	343.1	153.1	25	12	22.02
5-KETE	317.1	203.0	30	17	22.07
11(12)-EET	319.1	167.0	45	10	22.08
7(8)-EpDPE	343.1	109.0	25	12	22.18
8(9)-EET	319.1	155.0	42	8	22.25
AA	303.1	259.1	10	12	24.50

方法用于对人血浆/血清和细胞培养物样品中的92种脂氧化物进行研究分析。该方法经证实适用于分析生理相关水平的脂氧化物。将混合模式SPE、UPLC分离和串联四极杆质谱检测的专属性相结合，为生物医学研究中脂氧化物的靶向分析提供一套全面的分析平台。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

Quanpedia <<https://www.waters.com/10148049>>

720007030ZH, 2020年10月