Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用ACQUITY UPLC I-Class Xevo TQ-S液质联用系统建立血浆中花生四烯酸19种代谢物同时测定的定量分析方法

万咪咪　范自全
沃特世科技（上海）有限公司

应用优势

- UPLC®液相分离结合CORTECS® UPLC C_{18} 实心核颗粒色谱柱可显著改善多组同系物的分离和峰形，提高检测灵敏度
- Xevo® TQ-S具有超高灵敏度,可用于花生四烯酸体内19种代谢物同时测定
- 使用Oasis® µElution 96孔板可浓缩样品，减少挥发过程待测物的损失

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class系统
Xevo TQ-S系统
CORTECS C_{18}色谱柱
Oasis MAX 96孔µElution板

关键词

UPLC液相分离，Xevo TQ-S，
Oasis样品前处理，
花生四烯酸代谢物同分异构体

前言

花生四烯酸(Arachidonic acid,AA)，是ω-6系列人体重要的多不饱和脂肪酸。它是人体一种必需脂肪酸。AA在生物体内主要以磷脂的形式存在于机体各个组织的细胞膜上，正常生理状态下游离的AA浓度很低，但当细胞膜受到各种刺激时，AA便从细胞膜的磷脂池中释放出来，在酶的作用下，转变为具有生物活性的代谢物。这一过程主要有三类酶参与:环加氧酶(COX)，脂加氧酶(LOX)和CYP450单氧化酶。

AA体内代谢物具有很强的生物活性，是细胞调节的重要物质，同时AA代谢物之间的平衡失调与多种疾病相关。为了能够深入理解这些化合物对人类健康和生理与病理过程的影响，需要对其准确定量。然而这些代谢物体内存在浓度很低，稳定性差，其形成依赖于体内前体AA的释放，而且存在大量的同系物，分子量相同，结构也相似，给分析带来了很大的挑战。

本文采用ACQUITY UPLC I-Class Xevo TQ-S液质联用系统成功建立了高通量、灵敏的分析方法用于同时测定人血浆中19种AA体内代谢物，为其临床检测提供了有利的工具。

实验

液相方法

系统: ACQUITY UPLC I-Class

色谱柱: ACQUITY UPLC CORTECS C_{18}, 1.6 µm, 2.1 × 100 mm

柱温: 40 °C

流动相 水相: 0.1%甲酸水溶液
有机相: 乙腈

进样体积: 5 µL

质谱方法

质谱: Xevo TQ-S三重四极杆质谱仪

电离模式: ESI-

毛细管电压: 2.5 KV

样品前处理方法

采用Oasis MAX µElution洗脱条件对血浆样品进行前处理

结果与讨论

本实验研究的19种AA体内代谢物存在多组分子量相同，结构类似的同系物,其产生的碎片也一致，所以寻找稳定且无干扰的碎片的同时也需要优化色谱条件达到最佳分离，以避免相互之间的干扰。

本实验使用基于创新的StepWave™技术的超高灵敏度Xevo TQ-S质谱,同时使用IntelliStart™功能自动进行19种AA代谢物MRM方法开发，提高了质谱方法开发的效率。同时本实验采用ACQUITY UPLC I-Class系统和实心核颗粒技术CORTECS色谱柱，实现同系物之间的最佳分离。通过UPLC分离结合选择各个化合物稳定且无干扰碎片用于MRM定量来进行化合物的定量分析。表1为19种AA代谢物的MRM通道，UPLC结合CORTECS色谱柱得到的同系物分离谱图见图1。

No.	化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(v)	碰撞能量(v)
1	5,6-DHET	337.35	145.09	10	18
2	8,9-DHET	337.33	127.08	10	22
3	11,12-DHET	337.34	167.25	10	18
4	14,15-DHET	337.34	207.28	10	16
5	5,6-EET	319.35	125.11	10	14
6	8,9-EET	319.33	155.21	10	10
7	11,12-EET	319.35	208.11	14	12
8	14,15-EET	319.33	219.26	10	12
9	5-HETE	319.33	115.11	10	14
10	8-HETE	319.33	155.21	10	14
11	15-HETE	319.33	219.13	16	12
12	12-HETE	319.33	179.23	10	14
13	20-HETE	319.33	245.22	10	14
14	TXB2	369.35	195.17	32	14
15	6-KETO-PGF2	369.37	163.18	10	26
16	LTB4	335.33	195.24	10	14
17	LTC4	624.40	272.25	56	24
18	LTD4	495.36	177.13	10	18
19	LTE4	438.34	333.32	10	18

表1. 19种AA代谢物的MRM通道。

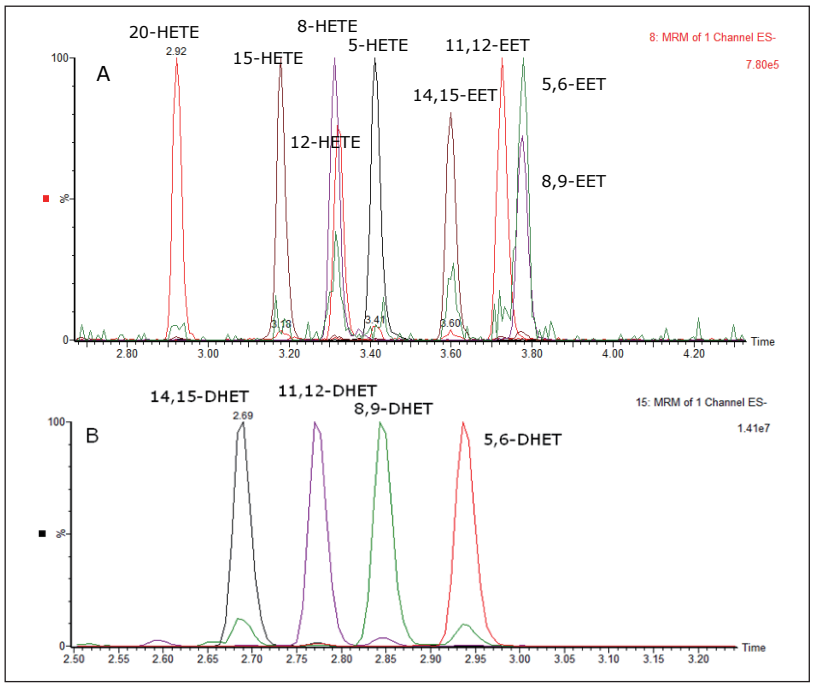

图1. HETEs, EETs, DHETs的UPLC/MS/MS色谱图。
A: 代谢物EETs和HETEs B: DHETs

由于AA代谢物体内浓度很低，同时血浆样品基质复杂，常规的沉淀蛋白法无法满足低浓度样品测定；液液萃取法(LLE)操作繁琐，在高通量上受限，同时对于像亲水性半胱氨酰LTs类，LLE也不适合。本实验建立了SPE前处理方法(见图2)，采用Oasis MAX SPE板建立了血浆样品中19个AA代谢物同时测定的处理方法。Oasis MAX可提供反相和离子交换保留模式，帮助获得更好的选择性和提升灵敏度。此外，96孔Oasis µElution板死体积非常小(仅为8 µL)，允许25 µL(洗脱2次)就可以将待测物洗脱下来。同时低量的洗脱液还可以直接进样，省去耗时的吹干步骤，也避免了挥干过程中待测物的损失，极大提高了样品通量。

本实验仅采用350 µL血浆建立的SPE UPLC/MS/MS方法有很好的线性及灵敏度，19个化合物中有10个化合物的最低定量限为20 pg/mL，7个化合物的最低定量限为50 pg/mL，线性相关系数R^2大于0.99。表2显示AA体内19种代谢物的线性范围和定量下限。

No.	化合物	最低定量限 (pg/mL)	线性范围 (pg/mL)	线性相关系数 (R^2)
1	5,6-DHET	20	20-2000	0.9977
2	8,9-DHET	20	20-2000	0.9955
3	11,12-DHET	20	20-2000	0.9921
4	14,15-DHET	20	20-2000	0.9871
5	5,6-EET	500	500-2000	0.9982
6	8,9-EET	20	20-2000	0.9926
7	11,12-EET	20	20-2000	0.9922
8	14,15-EET	50	50-2000	0.9871
9	5-HETE	100	100-2000	0.9892
10	8-HETE	50	50-2000	0.9916
11	15-HETE	50	50-2000	0.9905
12	12-HETE	50	50-2000	0.9916
13	20-HETE	20	20-2000	0.9959
14	TXB2	20	20-2000	0.9963
15	6-KETO-PGF2	20	20-2000	0.992
16	LTB4	20	20-2000	0.9961
17	LTC4	50	50-2000	0.998
18	LTD4	50	50-2000	0.9874
19	LTE4	50	50-2000	0.9906

表2. AA体内19种代谢物的线性范围和定量下限。

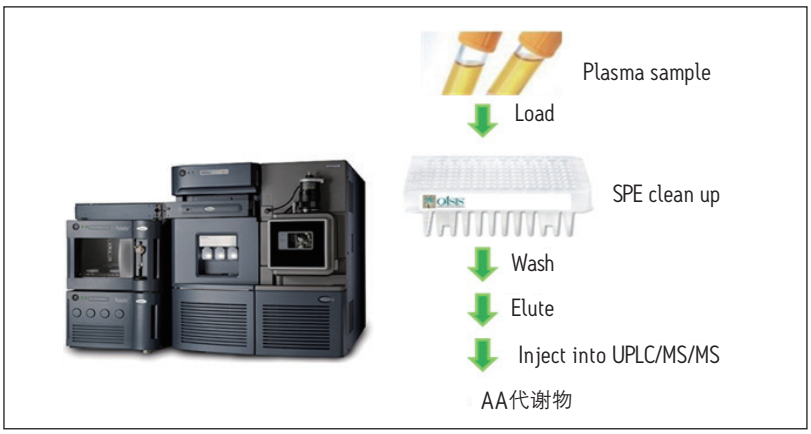

图2. Oasis MAX前处理分析操作流程。

结论

UPLC结合CORTECS C_{18}色谱柱、混合型离子交换SPE以及超高灵敏度的Xevo TQ-S， 建立了19种AA体内代谢物的定量分析方法，此方法灵敏度高，重现性好，适用于临床AA体内代谢物的同时检测。

快速的UPLC方法，运行总时间仅为8 min。同时与传统的C_{18}全多孔色谱柱相比，CORTECS UPLC C_{18} 实心核颗粒色谱柱可显著改善多组同系物之间的分离和峰形，提高检测灵敏度。

Oasis MAX SPE板死体积非常小(仅为8 µL)，仅需要25 µL(洗脱2次)就可以将待测物洗脱下来，另外在满足高通量的同时不需吹干复溶即可浓缩富集样品，大大降低了样品在吹干过程的损失。

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPLC, UPLC, CORTECS, Xevo和Oasis是沃特世公司的注册商标。
StepWave和IntelliStart是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2016年 沃特世公司 中国印刷 2016年1月

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com