

LC-MS/MS 测定 ob/ob 小鼠血浆中呋喃脂肪酸代谢物及其类似物的含量

LCMSMS-486

摘要： 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 代谢物及其类似物的方法。ob/ob 小鼠血浆样品采用乙腈蛋白沉淀前处理方式进行制备。采用同位素 3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸 -d5 (CMPF-d5) 内标法建立 CMPF 的绝对定量方法，对血浆样品标准曲线回归分析，使用扣除内源性含量后回归标线对实际血浆样品含量测定，对提供质控样品做精密密度考察；其他类似物的定量根据内标 CMPF-d5 的峰面积做相对定量分析。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，能够满足 ob/ob 小鼠体血浆中 CMPF 及类似物浓度定量的要求，为 ob/ob 小鼠体内 CMPF 前体研究及相关代谢通路研究提供技术帮助。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 ob/ob 小鼠血浆 CMPF 代谢物

脂质组学和代谢组学研究发现，作为呋喃脂肪酸的代谢物，3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸 (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, CMPF) 在妊娠期糖尿病患者、糖耐受受损患者和 T2D 患者体内显著上升，被认为是糖尿病发生发展过程中的新型生物标志物。这些升高的 CMPF 可对胰岛 β 细胞造成损伤，包括线粒体功能受损、葡萄糖诱导的 ATP 积累下降和诱导氧化应激，从而导致关键转录因子失调并最终减少胰岛素的生物合成。然而，

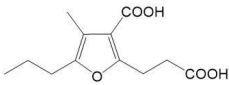
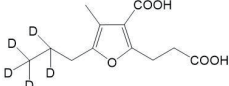
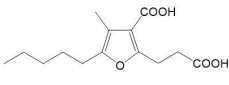
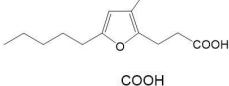
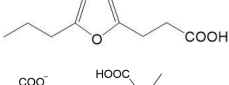
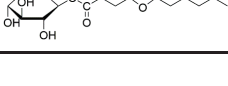
目前研究对代谢前体与中间涉及的代谢通路目前尚不清楚。因此，研究 CMPF 的代谢通路对人类健康的关系是基础科学和临床医学关注的重要课题。

本实验在前期已完成的呋喃脂肪酸定量方法开发基础上，以代谢产物 CMPF 及其类似物为研究对象，使用岛津 LCMS-8060 建立准确、高效的 CMPF 及其类似物的定量方法，以期对 CMPF 代谢通路研究做进一步的探讨。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

化合物名称	英文	英文名缩写	CAS No.	分子式	结构式
3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸	3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid	CMPF	86879-39-2	$C_{12}H_{16}O_5$	
3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸 -d5	3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic Acid-d5	CMPF-d5	-	$C_{12}H_{11}D_5O_5$	
3- 羧基 -4- 甲基 -5- 戊基 -2- 呋喃丙酸	3-carboxy-4-methyl-5-amyl-2-furanpropanoic acid	CMPentylF	-	$C_{14}H_{20}O_5$	
3- 羧基 -5- 戊基 -2- 呋喃丙酸	3-carboxy-5-amyl-2-furanpropanoic acid	CPentylF	-	$C_{13}H_{18}O_5$	
3- 羧基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸	3-carboxy-5-propyl-2-furanpropanoic acid	CPropylF	-	$C_{11}H_{14}O_5$	
葡萄糖苷 -3- 羧基 -4- 甲基 -5- 戊基 -2- 呋喃丙酸	Glu-3-carboxy-4-methyl-5-amyl-2-furanpropanoic acid	Glu-CMPentylF	-	$C_{20}H_{28}O_{11}$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A_{5R} 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: CSH C18 column (2.1 mm×100 mm L., 1.7 μm)

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水; B 相 -0.1% 甲酸乙腈;

流速: 0.4 mL/min

柱温: 30°C

进样量: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	10
2.00	泵	B.Conc	30
5.00	泵	B.Conc	80
6.00	泵	B.Conc	100
7.00	泵	B.Conc	100
7.10	泵	B.Conc	10
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子源接口电压: 4.0 kV

加热气: 空气 15.0 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

延迟时间: 3 ms

离子化模式: ESI(-)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

接口温度: 350°C

加热模块温度: 400°C

驻留时间: 13 ms

MRM 参数: 见表 3

表 3 MRM 优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
CMPF	239.05	195.05*	28	13	24
		151.10	12	17	11
		221.00	12	12	16
CMPF-d5	244.00	200.00*	28	13	24
		156.00	12	17	11
		226.00	12	12	16
CMPentylF	267.00	223.00*	28	13	24
		179.00	12	17	11
		249.00	12	12	16

CPentylF	253.00	209.00*	28	13	24
		165.00	12	17	11
		235.00	12	12	16
CPropylF	225.00	181.00*	28	13	24
		137.00	12	17	11
		207.00	12	12	16
Glu-CMPentylF	443.00	267.00*	28	13	24
		175.00	12	17	11
		195.00	12	12	16

注：* 表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

精密称取 CMPF 标准品适量，分别用纯乙腈溶解稀释配制成两份 CMPF 储备液 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，待用。精密称取内标 CMPF-d5 适量，用纯乙腈溶液溶解，并稀释配制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液，待用。

血浆基质标准曲线：取 6 个 2 mL 离心管并分别编号为 1-6，备用。取其中一份 CMPF 储备液，分别向 1-6 号离心管中依次加入 CMPF 储备液 0、4、20、100、500、2500 μL ，氮气吹干，吹干后向离心管中加入 1 mL 糖尿病模型小鼠 (ob/ob 小鼠) 混合血浆，涡旋混匀，配制成含 CMPF 浓度 0、4、20、100、500、2500 ng/mL 的血浆基质标准曲线。

血浆质控样品：取 3 个 2 mL 离心管，从另一份 CMPF 储备液中分别加入 CMPF 储备液 1、10、100 μL ，氮气吹干，吹干后向离心管中加入 1 mL ob/ob 小鼠混合血浆，涡旋混匀，配制成含 CMPF 浓度 1、10、100 ng/mL 混标，待用。

1.5 血浆样品前处理方法

取 ob/ob 小鼠血浆样品 25 μL ，依次加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标溶液 2 μL 、4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏乙腈 100 μL ，涡旋混合 2 分钟，14000 rpm/min 离心 10 min，弃去下层沉淀蛋白，吸取上清液进样分析，进样体积 10 μL 。

■ 结果与讨论

2.1 血浆样品典型色谱图

按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定，得含 CMPF 目标物 4 ng/mL 与 CMPF-d5 内标 ob/ob 小鼠血浆基质加标样品的 MRM 色谱图，见图 1。结果显示，CMPF 与内标物的保留时间 t_R 分别为 4.38 min、4.37 min。ob/ob 小鼠血浆中的内源物质干扰，对样品检测无明显影响，方法具有较强选择性。

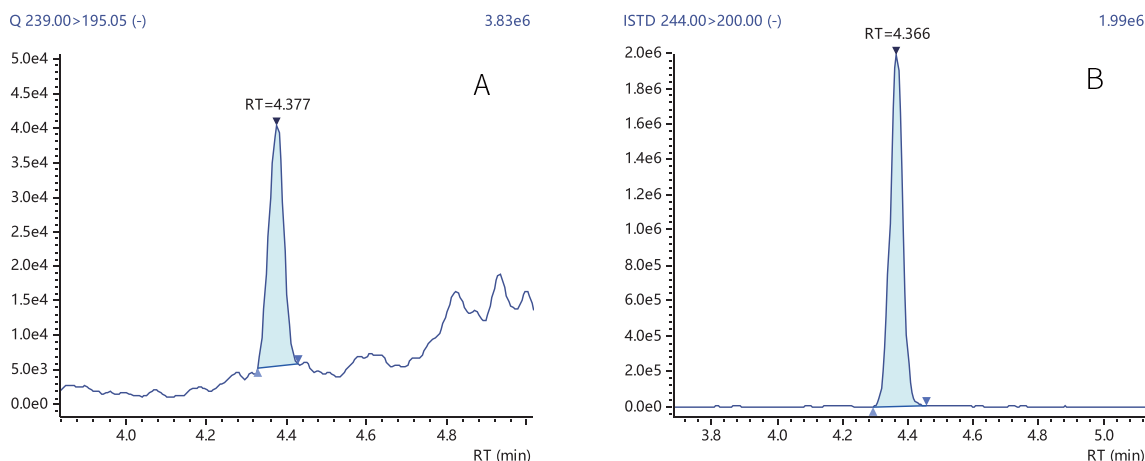


图 1 CMPF (A) 及其内标 CMPF-d5 (B) 血浆样品色谱图 (CMPF 4 ng/mL 含内标 11D3-d5 血浆样品)

2.2 线性范围

按照 1.4 项下血浆样品配制方法制备 0、4、20、100、500、2500 ng/mL ob/ob 小鼠血浆标准工作曲线, 按照 1.5 项中血浆样品前处理方法处理血浆样品, 建立标准曲线, 并用同位素内标法进行分析测定。

以 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 浓度与对应内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以 CMPF 浓度峰面积与对应内标峰面积的比值 Y 为纵坐标, 权重系数为 $1/C^2$, 进行线性回归分析, 所得实际血浆样品标准曲线见图 2, 线性回归方程及相关系数见表 4。

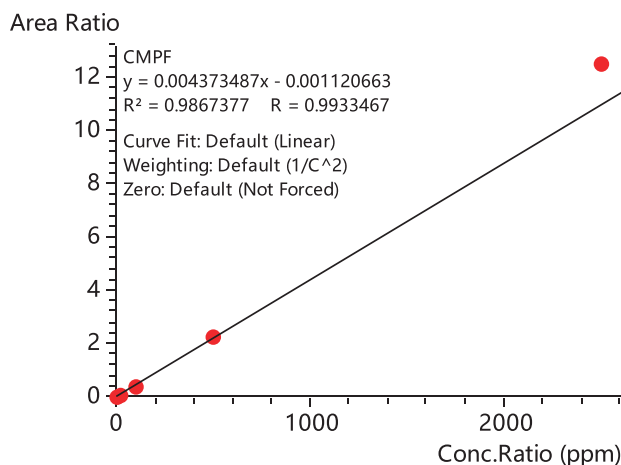


图 2 CMPF 标准曲线

表 4 CMPF 标准曲线参数 (线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
CMPF	$Y = (0.00437349)X + (-0.00112066)$	0-2500	89.0~114.7	0.9933

由于 CMPF 为内源性物质, 血浆样品浓度计算所需标准曲线, 应以血浆中 CMPF 与内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以 CMPF 面积减去空白基质中 CMPF 面积的差值与内标面积的比值 Y 为纵坐标, 无权重, 进行线性回归分析, 所得标准曲线见图 3, 血浆中 CMPF 线性回归方程及相关系数见表 5。结果表明 CMPF 在 4-2500 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。

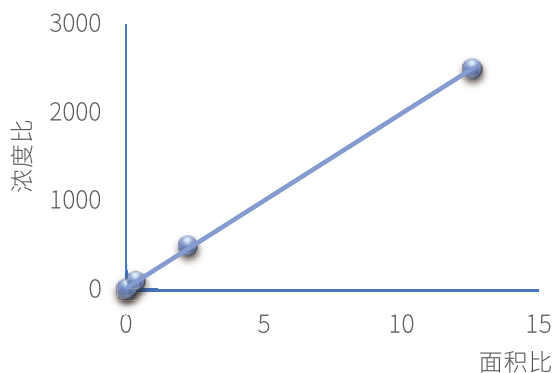


图 3 CMPF 血浆样品标准曲线 (扣除内源性含量)

表 5 CMPF 标准曲线参数 (线性回归, 无权重)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
CMPF	$y = 197.06x + 20.574$	4-2500	0.9996

2.3 方法精密度

取已配制好的 1、10、100 ng/mL 质控样品，按照 1.5 方法制备，每个浓度的血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析，连续测定 3 天，每日随行标准曲线，用测得质控样品中 CMPF 峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 6。其中 CMPF 最低定量限 S/N 平均值为 33。结果表明，各浓度水平精密密度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并已满足临床检测浓度要求。

表 6 呋喃脂肪酸日内精密密度与日间精密密度 (3 天, 每天 n=6)

目标物	样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密密度 RSD%	日间精密密度 RSD%
CMPF	LQC	1	3.54	4.49
	MQC	10	4.92	5.01
	HQC	100	2.57	4.32

2.4 实际样本检测结果

选取 ob/ob 小鼠作为模型小鼠，实验组选用呋喃脂肪酸 11D3 (低、中、高三剂量) 和 11D5 (低、中、高三剂量) 灌胃给 ob/ob 小鼠，对照组选用橄榄油灌胃，连续灌胃一周后，分别取 ob/ob 小鼠血浆进行 CMPF 及其类似物测定。

CMPF 定量分析时，使用扣除内源性含量后重新对标准曲线线性回归所得方程，内标法定量，CMPF 类似物 CMPentylF、CPentylF、CpropylF、Glu- CMPentylF 为参考物质，无标准曲线，定量根据 CMDF-d5 内标的峰面积做相对定量。所得实际样品含量结果见图 7，并根据所得结果进行统计分析，统计图见图。

表 7 实际血浆样品 CMPF 及类似物含量测定结果

样品名称	CMPF 及类似物含量 (ng/mL)				
	CMPF	CMPentylF	CpentylF	CpropylF	Glu- CMPentylF
对照组 -01	85.58	2.28	29.23	2.61	0.23
对照组 -02	84.93	2.03	26.41	1.84	0.19
对照组 -03	85.20	3.06	29.07	1.32	0.09
11D3- 低剂量 -01	85.03	1.61	31.59	2.81	0.08
11D3- 低剂量 -02	84.10	2.63	24.22	1.52	0.25
11D3- 低剂量 -03	85.14	3.03	36.33	2.49	0.30
11D3- 中剂量 -01	85.40	1.96	30.76	2.27	0.15
11D3- 中剂量 -02	85.77	2.51	29.34	1.93	0.11
11D3- 中剂量 -03	86.30	2.31	37.55	2.79	0.41
11D3- 高剂量 -01	88.48	2.12	20.59	1.54	0.51
11D3- 高剂量 -02	87.89	2.56	20.21	1.58	0.31
11D3- 高剂量 -03	89.03	3.10	32.40	2.51	0.17
11D5- 低剂量 -01	85.29	3.41	26.26	1.55	0.41
11D5- 低剂量 -02	84.36	3.74	26.79	1.55	0.29
11D5- 低剂量 -03	85.38	3.68	26.64	1.54	0.40
11D5- 中剂量 -01	84.42	4.58	23.83	1.24	0.86
11D5- 中剂量 -02	85.12	5.27	27.52	1.73	0.80
11D5- 中剂量 -03	84.26	5.31	25.63	1.32	1.45
11D5- 高剂量 -01	85.67	32.10	27.90	1.71	7.46
11D5- 高剂量 -02	85.11	25.55	25.15	1.63	11.95
11D5- 高剂量 -03	84.61	32.02	23.13	1.39	11.86

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 及其类似物的方法。该方法在 10 min 内完成 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 与类似物的检测。CMPF 采用同位素内标法定量，扣除内源性物质后，线性范围 4-2500 ng/mL，相关系数 0.9996。CMPF 类似物 CMPentylF、CPentylF、CpropylF、Glu-CMPentylF 为参考物质，定量根据 CMDF-d5 内标的峰面积做相对定量。选择性考察结果表明 ob/ob 小鼠空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。CMPF 低中高三水水平质控浓度日内精密度 2.57-4.92%，日间精密度 4.32-5.01%，能够满足 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 浓度准确定量的要求。所建方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，满足 CMPF 及类似物体内含量分析要求，适合 ob/ob 小鼠血浆中 CMPF 及其类似物含量的快速检测，为呋喃脂肪酸代谢通路研究提供有力检测手段。

岛津应用云

