

使用血浆微量采样样品建立快速类二十烷酸质谱分析法

01-00124-CN

山田 真希、长野 直子、久保 晴美、服部 考成

使用益处

- ◆ 可以在 10 分钟内监测人体血浆中包含类二十烷酸的脂肪酸代谢产物。
- ◆ Nexera™ 和超高速三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 可进行高通量分析。
- ◆ 可以使用微采样设备 MSW²™ 准确地进行样品的微量采集。

前言

类二十烷酸和 omega-3 脂肪酸代谢产物是阐明病理生理功能以及探索疾病生物标志物的重要目标物。在 2019 年 ASMS 的报道中，作者开发出了能够监测类二十烷酸类组分的 MRM（多反应监测）方法，并报告对患病模型小鼠血清中检测到的 100 多种组分的定量谱分析¹⁾。

在本报告中，也会介绍使用微量血浆快速构建类二十烷酸分析系统。为提高检测速度和灵敏度，将 MRMs 的数量缩小到检测目标物及内标物所需最小值，即可在 10 分钟内监测类二十烷酸及相关脂肪酸代谢产物等共 114 种组分。也会报告使用新开发的方法分析使用微采样设备 MSW² 微量采集的市售人血浆（5.6 μL）并检测类二十烷酸的示例。

分析条件

标准样品购自 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)。人血浆和人血清购自 Kohjin-bio 株式会社。使用微采样设备 MSW²（由本公司制造）采集一定量的血浆。固相萃取试剂盒使用 STRATA™-X 10mg (Phenomenex Torrance, CA)。

测定设备使用 LC-40 系列 Nexera UHPLC 系统和超高速三重四极杆质谱仪 LCMS-8060（图 2）。HPLC 以及质谱仪的分析条件如表 1 所示。

微采样设备 MSW²

MSW² 是一种独特的微采样设备，用于从全血中微量采集血浆。

在使用树脂制成的 Microsampling Wing™（图 1）中采集全血，直接进行离心分离，以在微流路中分离为血浆和血细胞。离心后，只需折下定容部分，即可准确采集一定量的血浆。此外，由于 Microsampling Wing 是树脂材质，耐溶剂性高，因此，可用于在管中进行脱蛋白等预处理。

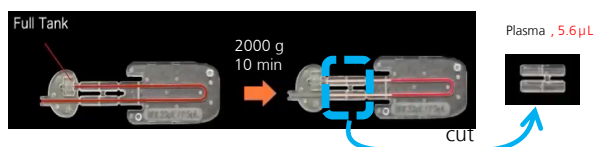

 图 1 微采样设备 MSW²™ 的 Microsampling Wing™

表 1 分析条件

[HPLC 的条件] (Nexera X3)	
色谱柱	: Shim-pack™ GIST C18-AQ HP ** (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
柱温箱	: 40° C
流动相 A	: 0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	: 乙腈
流速	: 0.4 mL/min
进样量	: 5 μL (与 15 μL 水共同进样)
[MS 的条件] (LCMS-8060)	
离子源	: ESI, 正 / 负
扫描模式	: MRM
雾化气流量	: 2.5 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250° C
加热模块温度	: 400° C
接口温度	: 270° C
CID 气体压力	: 230 kPa
延迟时间 / 暂停时间	: 10 msec / 1 msec

*1 P/N 227-30807-02



图 2 LCMS™-8060 的外观

预处理

图 3 所示为从人血浆中萃取脂肪酸的过程。向微采样设备 MSW² 采集的血浆 5.6 μL 中加入含有 0.1% 甲酸的甲醇 300 μL 和 18 种组分的内标物质溶液 10 μL，然后搅拌 5 分钟。离心后，用 0.1% 甲酸水稀释上清液，装入固相萃取试剂盒中进行萃取。将萃取液干燥后，用 30 μL 甲醇溶解，制备 LCMS 分析样品。



图 3 预处理流程

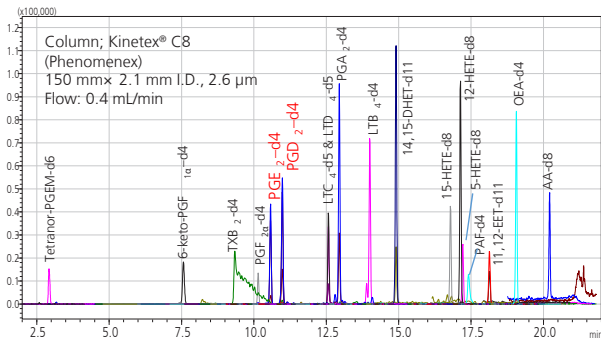
结果

<快速分析方法开发>

之前 (Ref.1) 报道了一种 MRM 方法, 可在 20 分钟内分析 196 个类二十烷酸类目标物和 18 个内标 (ISTD) 物质。使用该方法从疾病模型小鼠血清中共检测到 109 种组分, 并进行了定量分析。18 种内标组分的 MRM 色谱图 (20 分钟法) 如图 4 的上半部分 (I) 所示¹⁾。

为了加快分析速度, 将目标物组分数目缩小到 114 种, 也就是上述 109 种组分再加上 5 种。在 10 分钟的分析时间内共设定了 200 组 MRM 离子对, 包括 18 种内标组分。在新开发的方法中, 18 种内标组分的 MRM 色谱图如图 4 的下半部分 (II) 所示。在新开发的 10 分钟方法中, 前列腺素 E₂-d4 (PGE₂-d4) 和 PGD₂-d4 分别在 5.05 分钟和 5.24 分钟时洗脱, 分离度为 3.0。20 分钟法两种组分的分离度为 3.8, 在不影响分离的情况下缩短了分析时间。

I. 20 分钟方法



II. 新 10 分钟方法

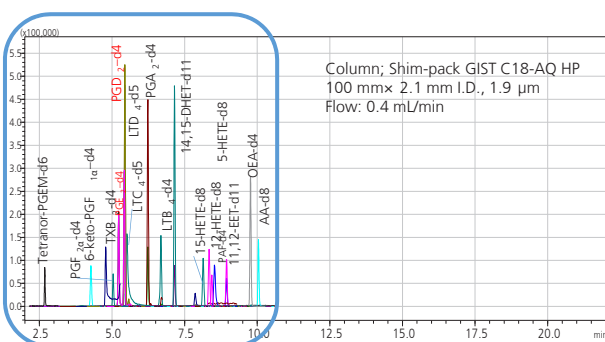


图 4 内标物质 (18 种组分) 的 MRM 色谱图
I. 20 分钟方法 (ASMS2019)
II. 新 10 分钟方法

<人血浆分析>

在 5.6 μL 的人血浆中检测到包括主要的花生四烯酸代谢产物在内的 50 种组分, 例如 5-、8-、11-、12- 及 15-HETEs。表 2 所示为以良好重现性检测到的 36 种组分的峰高比 (目标物 / 对应的内标物质) 和重现性 (CV%, n=3)。

表 2 人血浆 (5.6 μL) 中检测到的组分高度比

	脂肪酸种类	化合物名称	保留时间	高度比平均值 (3 次分析)	CV% (3 次分析)
1	AA	6-trans-LTB4	6.65	0.0378	9.4
2	AA	14,15-DHET	7.229	0.0109	18.2
3	AA	11,12-DHET	7.334	0.0065	19.1
4	AA	15-HETE	8.175	0.4461	7.7
5	AA	11-HETE	8.301	1.1596	1.9
6	AA	8-HETE	8.338	0.4028	14.1
7	AA	12-HETE	8.367	0.3975	14.2
8	AA	15-KETE	8.369	0.0593	12.0
9	AA	9-HETE	8.434	0.1796	13.7
10	AA	5-HETE	8.465	0.7621	3.5
11	AA	12-KETE	8.553	0.0544	9.3
12	AA	AA	10.073	11.6832	11.2
13	ALA	9-HOTrE	7.487	0.0041	4.8
14	DGLA	15-HETrE	8.495	0.2570	14.6
15	DGLA	8-HETrE	8.529	0.1466	14.9
16	DHA	10,17-DiHDHA	6.73	0.0173	13.9
17	DHA	20-HDHA	8.098	0.0423	6.9
18	DHA	16-HDHA	8.265	0.0830	13.1
19	DHA	10-HDHA	8.338	0.0500	10.4
20	DHA	14-HDHA	8.357	0.0510	17.6
21	DHA	7-HDHA	8.431	0.0201	8.1
22	DHA	11-HDHA	8.431	0.1002	19.9
23	DHA	8-HDHA	8.46	0.0850	16.0
24	DHA	DHA	9.993	5.2927	3.8
25	EA	AEA	9.076	0.0256	9.1
26	EA	OEA	9.793	0.2154	2.3
27	EDA	15-HEDE	8.924	0.0239	19.9
28	EPA	EPA	9.584	2.0875	11.0
29	LA	12,13-DiHOME	6.905	0.0844	6.1
30	LA	9,10-DiHOME	6.986	0.1568	5.9
31	LA	9-HODE	8.015	1.8331	6.9
32	LA	13-HODE	8.015	1.2752	7.9
33	LA	9-HpODE	8.206	0.2157	15.1
34	LA	13-KODE	8.209	0.2299	17.8
35	LA	9-KODE	8.299	0.0434	18.7
36	LPC	Lyso-PAF	7.861	575.2240	3.4

缩略语 AA: 花生四烯酸, DGLA: 二高γ亚麻酸, DHA: 二十二碳六烯酸, EA: 乙醇胺, EDA: 二十碳二烯酸, EPA: 二十碳五烯酸, LA: 亚油酸, LPC: 溶血磷脂酰胆碱

结论

开发出的高通量分析方法可在 10 分钟内监测包括类二十烷酸在内的脂肪酸代谢产物的 114 种组分。试验证明, 使用本方法可以从 5.6 μL 人血浆 (相当于 MSW2 微量采样的量) 中定量检测到包括类二十烷酸在内的 36 种组分以上的脂肪酸代谢产物、DHA 代谢产物以及亚麻酸代谢产物。

这些结果有望应用于使用再利用 (Re-using) 小鼠的病理生理学研究等。

<参考文献>

1) M. Yamada, T. Nakamura, A. Murata and T. Hattori, MP-546, 67th ASMS (2019)

岛津应用云



Nexera、LCMS、MSW²、Shim-pack 以及 Microsampling Wing 是株式会社岛津制作所在日本及其他国家的商标。Kinetex 以及 STRATA 是 Phenomenex, Inc. 的注册商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2021 年 3 月