

RP-LC/ESI-MS 和 HILIC/ESI-MS 相结合的大鼠尿液成分检测方法的建立

高晓燕*,白玉静

(北京中医药大学科研实验中心,北京 100029)

[摘要] 目的:建立反相液相色谱-电喷雾质谱(RP-LC/ESI-MS)和亲水作用液相色谱-电喷雾质谱(HILIC/ESI-MS)相结合的尿液尽量多化学成分检测数据采集方法。方法:RP-LC 最佳色谱条件为 Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 25℃,流动相 A 10 mmol·L⁻¹甲酸铵缓冲液(甲酸调 pH 4.0),B 0.1% 甲酸乙腈,A 与 B 梯度洗脱;HILIC 最佳色谱条件为 Alltima HP HILIC 色谱柱(2.1 mm×150 mm,3 μm),柱温 25℃,流动相 A 10 mmol·L⁻¹甲酸铵缓冲液(甲酸调 pH 4.0),B 0.1% 甲酸乙腈,A 与 B 梯度洗脱;质谱条件为 ESI 离子源,离子源温度 350℃,毛细管电压 3.5 kV,雾化压力 50.0 psi,干燥气流速 11.0 L·min⁻¹,质谱扫描范围 *m/z* 15~2 200,正、负离子检出模式。结果:RP-LC/ESI-MS 和 HILIC/ESI-MS 两种色谱系统同时应用对大鼠尿液中极性不同的内源性物质实现了较为全面的检测。结论:该方法可为代谢组学研究中数据采集的全面性提供参考。

[关键词] 反相液相色谱-电喷雾质谱;亲水作用液相色谱-电喷雾质谱;大鼠尿液;全成分检测

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)20-0119-03

Establishment of RP-LC/ESI-MS Combined with HILIC/ESI-MS Method for Research of Metabonomics of Rat Urine

GAO Xiao-yan*, BAI Yu-jing

(Center of Scientific Experiment Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-LC/ESI-MS combined with HILIC/ESI-MS method for the research of metabonomics. **Method:** For RP-LC/ESI-MS, the assay was conducted on a Prevail C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase A was 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate (adjusted to pH 4 with formic acid) in water, B was acetonitrile-formic acid (99.9:0.1). A gradient elution mode composed of A and B was used as the mobile phase. For HILIC/ESI-MS, the assay was conducted on a Alltima HP HILIC (2.1 mm×150 mm, 3 μm). The mobile phase A was 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate (adjusted to pH 4 with formic acid) in water, B was acetonitrile-formic acid (99.9:0.1). A gradient elution mode composed of A and B was also used as the mobile phase. Electrospray ionization (ESI) in the positive and negative ion mode was used as the ionization source. Nitrogen was used as the nebulizer gas and was maintained at a flow of 11.0 L·min⁻¹ with a nebulizer pressure of 50.0 psi. The fragmentor voltage was set at 275.8 V. Mass spectra were recorded covering *m/z* 15-2200. **Result:** Endogenous compounds with different polarity in rat urine could be detected by using RP-LC/ESI-MS and HILIC/ESI-MS. **Conclusion:** This method could offer a reference for metabonomics study.

[Key words] RP-LC/ESI-MS; HILIC/ESI-MS; rat urine; metabonomics

生物体液中的内源性小分子主要包括脂类、氨基酸、糖、有机酸等,其极性和化学结构彼此间的差

[收稿日期] 20120424(010)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173649/H2817);北京中医药大学自主选题项目(5221010061055)
[通讯作者] *高晓燕,博士,副研究员,从事中药质量控制及天然药物化学研究,Tel:010-64286401, E-mail:gaoxiaoyan0913@sina.com

异比较大,仅用一种分离分析方法尚不足以反映整个代谢物组的轮廓。液相-质谱(LC-MS)技术的优势是具有很高的灵敏度和专属性,可以实现对多个化合物的同时快速分析与鉴定,而且避免了气相-质谱(GC-MS)中繁杂的样品前处理,能鉴别和分析各类化合物及其在复杂生物样品基质中含量极低的代谢物类型,现已成为生物分析中的首选方法^[1]。本文将 HILIC/ESI-MS 法和 RP-LC/ESI-MS 法相结合对尿液进行分析,以期建立较为全面的代谢组学研究数据采集方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,Agilent LC/MSD Trap XCT Plus 型质谱仪、高压二元梯度泵、二极管阵列检测器、自动进样器、柱温箱、Chemstations 化学工作站等(美国 Agilent 公司),日立 20PR-52D 型高速冷冻离心机,电热真空干燥箱(上海申光仪器仪表有限公司),KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),Milli-Q 型纯化水制备系统(Millipore 公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司)。

2 尿液的采集与处理

健康雄性 BN 大鼠 6 只(6 周龄),体重 180 ~ 220 g,购于北京市维通利华实验动物科技有限公司。实验前在笼中适应环境 1 周后,分别转移至代谢笼中,收集 0 ~ 24 h 尿液。实验过程中动物给予标准饲料和饮用水。将收集的尿液置于 - 20 ℃ 冰箱保存。尿液样品处理时首先室温融解(25 ± 3) ℃,加入 3 倍量重蒸水稀释,然后 10 000 r · min⁻¹ 离心 10

min,上清液 LC-MSⁿ 分析。

3 LC-MS 条件

3.1 亲水作用液相色谱(HILIC) Alltima HP HILIC 色谱柱(2.1 mm × 150 mm,3 μm);流动相 A 10 mmol · L⁻¹ 甲酸铵缓冲液(甲酸调 pH 4.0),B 0.1% 甲酸乙腈,A 与 B 梯度洗脱(0 ~ 5 min,100% ~ 90% B,5 ~ 8 min,90% ~ 80% B,8 ~ 20 min,80% ~ 60% B,20 ~ 35 min,60% ~ 40% B);柱温 25 ℃,流速 0.2 mL · min⁻¹。

3.2 反相液相色谱(RP-LC) Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相 A 10 mmol · L⁻¹ 甲酸铵缓冲液(甲酸调 pH 4.0),B 0.1% 甲酸乙腈,A 与 B 梯度洗脱(0 ~ 5 min,20% ~ 40% B,5 ~ 10 min,40% ~ 60% B,10 ~ 20 min,60% ~ 80% B,20 ~ 25 min,80% ~ 100% B);柱温 25 ℃,流速 0.5 mL · min⁻¹。

3.3 质谱 ESI 离子源,离子源温度 350 ℃,毛细管电压 3.5 kV,雾化压力 275.8 kPa,雾化压力 50.0 psi,干燥气流速 11.0 L · min⁻¹,质谱扫描范围 *m/z* 15 ~ 600,正、负离子检出模式。

4 方法学考察

4.1 线性范围 根据对照品的保留时间及质谱裂解碎片,确定 5 种氨基酸。然后根据离子扫描图,分别对精氨酸、牛磺酸、色氨酸、γ-氨基丁酸、苯丙氨酸选取信号最强的 174.9/148.9,124.0/79.8,205.0/148.9,104.2/87.3,163.8/146.7 为离子对进行 MRM 质谱检测。线性关系如表 1。

表 1 5 种物质的线性方程

No.	成分	线性范围/mg · L ⁻¹	线性方程	<i>r</i>
1	牛磺酸(taurine)	10 ~ 100	<i>Y</i> = 0.831 1 <i>X</i> - 0.519 2	0.998 9
2	色氨酸(tryptophane)	5 ~ 100	<i>Y</i> = 0.982 5 <i>X</i> + 0.746 6	0.997 5
3	精氨酸(arginine)	1 ~ 50	<i>Y</i> = 1.165 8 <i>X</i> + 0.699 6	0.998 8
4	γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid)	1 ~ 100	<i>Y</i> = 4.862 3 <i>X</i> + 2.541 4	0.998 3
5	苯丙氨酸(phenylalanine)	10 ~ 100	<i>Y</i> = 1.543 0 <i>X</i> + 0.443 2	0.997 8

4.2 精密度试验 取同一对照品溶液,连续进样 6 次,计算其日内精密度 RSD < 10%;重复上述操作,连续测定 3 d,计算其日间精密度 RSD < 12%,结果表明方法精密度良好。

4.3 重复性试验 将同一份尿液制备 6 份样品,进行 LC/MS 分析。各个峰面积在 6 张图谱中的 RSD 均 < 13%,结果表明方法重复性良好。

4.4 样品冻融稳定性试验 取同一份尿液,制备 3

· 120 ·

份样品,LC/MS 测定;然后将尿液置于 - 20 ℃ 冰箱中,24 h 后取出,室温解冻后再置于 - 20 ℃ 冰箱中,24 h 后取出后室温解冻,解冻后再制备 3 份样品,LC/MS 分析,比较冻融前后样品的差异,结果显示,几乎所有共有峰在 2 批样品间的差异均 < 8%。结果表明样品在 24 h 内稳定。

4.5 加样回收率试验 配置高、中、低 3 个不同质量浓度的对照品溶液,加入到样品中,计算加样回收

率,结果加样回收率在 82.6% ~120.4%。

5 结果

图 1 为 HILIC 色谱柱在 ESI⁺,ESI⁺ 模式下的总离子流图,图 2 为 RP-C₁₈ 色谱柱在 ESI⁺,ESI⁺ 模式下的总离子流图。测得大鼠尿液中牛磺酸、色氨酸、精氨酸、γ-氨基丁酸和苯丙氨酸的含量分别为 (58.4 ±11.1), (8.7 ±3.2), (10.2 ±6.2), (5.0 ±1.0), (109.4 ±24.6) mg·L⁻¹ (n=8)。

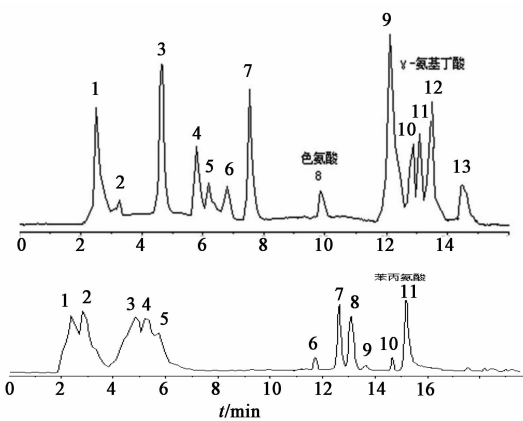


图 1 HILIC 柱在 ESI⁺,ESI⁺ 模式下的总离子流

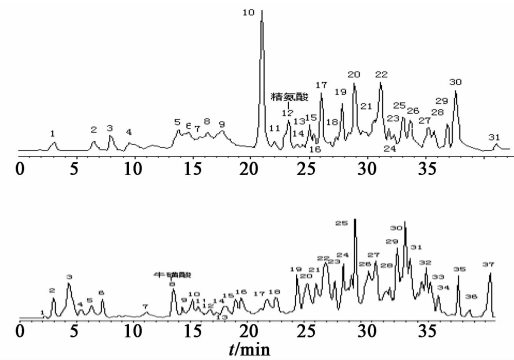


图 2 RP-C₁₈ 柱在 ESI⁺,ESI⁺ 模式下的总离子流

6 讨论

HILIC 是近年来色谱领域研究的热点之一^[2]。它可以为强极性和强亲水性的化合物提供合适的保留。通过优化多个色谱参数,有利于实现目标组分

和基体中干扰组分的分离,从而降低基体效应的影响;而含有高浓度水溶性有机相的流动相又有利于提高质谱的离子化效率,进而提高质谱分析的灵敏度^[3-8]。

氨基酸是生物体内源性物质中比较重要的一类成分,具有多种生物学功效,对它们的检测一般是通过柱前或柱后衍生的方法。这些方法步骤繁琐,操作复杂,费时较长。氨基酸所具有的离子化、不稳定性和极性大等特性决定了其适合用质谱检测。本文即是建立 HILIC/ESI-MS 法和 RP-C₁₈/ESI-MS 法相结合的尿液代谢组学分析方法,并应用此方法对尿液中 5 种氨基酸的含量进行测定,可为代谢组学的分析方法提供参考。

[参考文献]

[1] 刘欢,韩涛. 代谢组学及其在肝脏疾病研究中的应用进展[J]. 实用肝脏病杂志,2008,11(1):59.

[2] 王媛,顾惠新,路鑫,等. 以亲水作用色谱为核心的液相色谱联用技术及其应用研究[J]. 色谱,2008,26(6):649.

[3] 罗和古,丁杰,岳广欣,等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[J]. 中西医结合学报,2007,5(3):307.

[4] Jeffrey R Idle1, Frank J Gonzalez. Metabolomics [J]. Cell Metabolism,2007,12(6):348.

[5] Clayton T A, Lindon J C, Cloarec O, et al. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment[J]. Nature,2006,440(7087):1073.

[6] 黄成钢. 中药研究的必然趋势——中药复方系统研究[J]. 中国药理学杂志,2000,35(7):4331.

[7] 周宏伟,谭凤仪,钟音,等. 代谢组学及其在微生物领域的研究进展[J]. 分析化学,2007,35(2):309.

[8] Nicholson J K, Wilson I D. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids[J]. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc,1989,21(4):449.

[责任编辑 邹晓翠]