

基于液质联用仪的溶血磷脂酸分析

陈红娟¹

(1.南京大学 生命科学学院, 南京 210023)

摘要: 本文应用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)建立溶血磷脂酸及其同分异构体检测方法, 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18(2.1×50mm,1.7 μm), 流动相 A 相为 5mM 甲酸铵(加 0.025%氨水和 0.1%钝化添加剂):甲醇:乙腈=1:1:1, B 相为乙腈:异丙醇=1:1, 采用梯度洗脱方式, 流速为 0.4mL/min, 检测柱温为 45°C, 各溶血磷脂酸峰型良好, 同分异构体得到有效分离, 满足各溶血磷脂酸及其同分异构体同时检测的要求。

关键词 溶血磷脂酸; 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法; 同分异构体

中图分类号: R917

文献标识码: A

The analysis of lysophosphatidic acids by using UPLC-MS/MS

CHEN Hongjuan¹

(1.School of Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Objective To analyze the lysophosphatidic acids and its isomers by using UPLC-MS/MS.The chromatographic separation was performed on Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18(2.1×50mm,1.7μm) with gradient elution of 5mM ammonium formate(adding 0.025% aqueous ammonia and 0.1% infinitylab additive): methanol: acetonitrile(1:1:1)- acetonitrile: isopropanol (1:1) . The flow rate is 0.4mL/min, and the detection column temperature is 45 °C. The peak patterns of each lysophosphatidic acids are good, and the isomers are effectively separated, meeting the requirements for simultaneous detection of each lysophosphatidic acids and its isomers.

Keywords: lysophosphatidic acids; UPLC-MS/MS; isomers

溶血磷脂酸(lysophosphatidic acids, LPA)是迄今发现的一种最小、结构最简单的磷脂^[1], 它是甘油磷脂代谢的中间产物, 由甘油主链、单个脂肪酸链和磷酸基团组成。溶血磷脂存在同分异构体, 因为各种磷脂(图 1)失去 sn-1 位和 sn-2 位脂肪酸的磷脂都称为溶血磷脂,

但 sn-2 位的酰基容易转移到 sn-1 位^[2]。超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法具有高灵敏度、高通量的特点，适合微量 LPA 的检测^[3,4,5,6]，但 LPA 的 sn-1 型和 sn-2 型同分异构体较难分离。使用 Acquity BEH Shield RP18 UPLC 色谱柱，使用弱碱性条件并在流动相中添加 InfinityLab 钝化添加剂，在梯度洗脱条件下，采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法对 LPA 的 sn-1 型和 sn-2 型同分异构体进行分离测定。

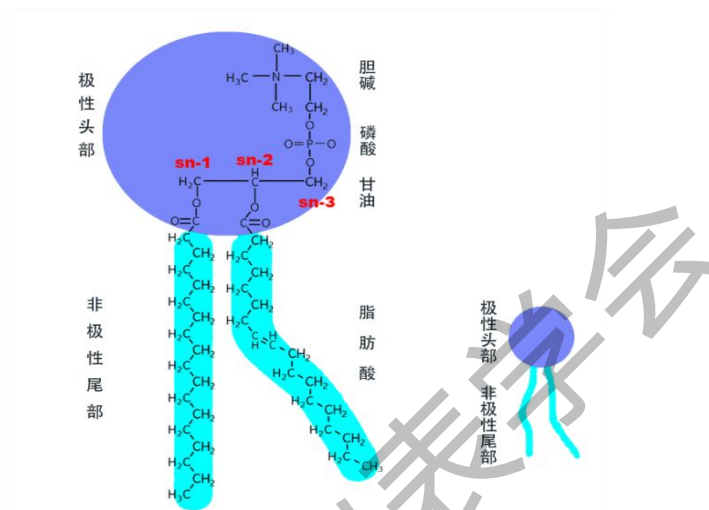


图1 磷脂结构图

1 试剂与材料

水：超纯水(密理博超纯水仪制)；

甲酸：质谱纯（美国赛默飞公司）；

甲酸铵：质谱纯（美国赛默飞公司）；

甲醇：色谱纯（德国默克飞公司）；

乙腈：色谱纯（德国默克飞公司）；

异丙醇：色谱纯（德国默克飞公司）；

氨水：浓度 25%（德国默克公司）；

InfinityLab 钝化添加剂：混合物，浓度 0.1%，防止磷酸根类等物质在液相系统中吸附（美国安捷伦公司）；

LPA16:0 对照品：sn-1 型，纯度为 99%，可能含有 10% sn-2 型异构体（禾大医药健康公司）；

LPA18:0 对照品：sn-1 型，纯度为 99%，可能含有 10% sn-2 型异构体（禾大医药健康公司）；

LPA18:1 对照品: sn-1 型, 纯度为 99%, 可能含有 10% sn-2 型异构体 (禾大医药健康公司)。

2 仪器与设备

三重四极杆液质联用仪: Waters iclass UPLC (美国 Waters 公司)、Sciex 6500Qtrap 三重四极杆复合线性离子阱质谱仪 (美国 Sciex 公司);

超声波清洗器 (国产昆山);

分析天平: 精确到 0.00001g (德国赛多利斯公司);

涡旋振荡器 (国产);

冷冻离心机: 最高转速 16000 转 (日本日立公司);

移液器: 20 μ L、200 μ L、1000 μ L (德国普兰德公司);

塑料离心管: 1.5mL (德国艾本德公司);

容量瓶: 50mL、100mL、透明带刻度 (国产)。

3 测定步骤

3.1 溶液配制

供试品溶液的配制: 精密称取小鼠脑组织 50mg, 置于 1.5mL 塑料离心管中, 捣碎, 加水 50 μ L, 加异丙醇: 乙腈=1: 1 的溶液 200 μ L, 涡旋 30s, 置于冷冻离心机, 12000 转离心 10 分钟, 取上清液 100 μ L, 作为供试品溶液;

对照品溶液的配制: 精密称取 LPA16:0、LPA18:0、LPA18:1 对照品各约 5mg, 置于 100mL 容量瓶中, 加甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1mL, 置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀; 再精密量取 1mL, 置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

3.2 质谱条件

- 1) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);
- 2) 扫描方式: 负离子;
- 3) 检测方式: 质谱多反应监测 (MRM) 模式;
- 4) 气帘气(CUR):40psi;
- 5) 碰撞气(CAD):中;
- 6) 喷雾电压(IS):-4500V;
- 7) 离子源温度(TEM):450°C;

- 8) 雾化气(GS1):55psi;
 9) 辅助加热气(GS2):55psi;
 10) 优化的质谱参数见表 1。

表 1 LPA 质谱多反应检测参数

| 化合物 | 母离子 | 子离子 | 锥孔电压 (DP) | 碰撞能 (CE) |
|---------|-------|-------|-----------|----------|
| LPA16:0 | 409.2 | 153.0 | -80 | -27 |
| LPA18:0 | 437.3 | 153.0 | -80 | -28 |
| LPA18:1 | 435.3 | 153.0 | -80 | -29 |

3.3 色谱条件

- 1) 色谱柱: Acquity BEH Shield RP18 UPLC 色谱柱(2.1×50mm,1.7μm);
 2) 流动相: A 相: 5mM 甲酸铵 (加 0.025%氨水和 0.1%钝化添加剂): 甲醇: 乙腈=1: 1: 1; B 相: 异丙醇: 乙腈=1: 1; 梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 2;
 3) 柱温: 45℃;
 4) 进样量: 1μL;
 5) 流速: 0.4mL/min;

表 2 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | B 相百分比 (%) |
|----------|------------|
| 0 | 0 |
| 2.5 | 0 |
| 5 | 95 |
| 6 | 95 |
| 6.5 | 0 |
| 9.5 | 0 |

4 结果

LPA16:0、LPA18:0、LPA18:1 三种溶血磷脂酸的 sn-1 和 sn-2 构型峰型良好, sn-1 和 sn-2 异构体得到有效分离 (见图 2, 3, 4), LPA16:0 sn-1 和 sn-2 分离度 1.54, LPA18:0 sn-

1 和 sn-2 分离度 1.51, LPA18:1 sn-1 和 sn-2 分离度 1.55, 满足三种溶血磷脂酸及其同分异构体同时检测的要求。方法可推广应用于其他溶血磷脂酸及其同分异构体的分离测定。

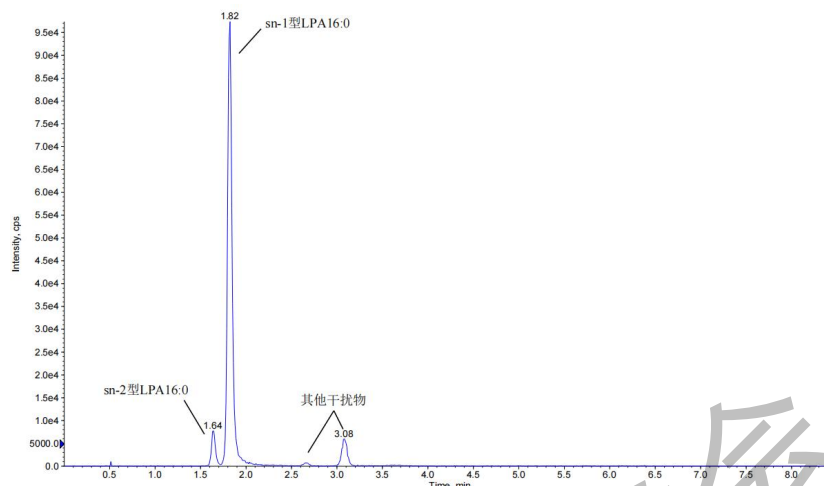


图2 LPA16:0LCMS图

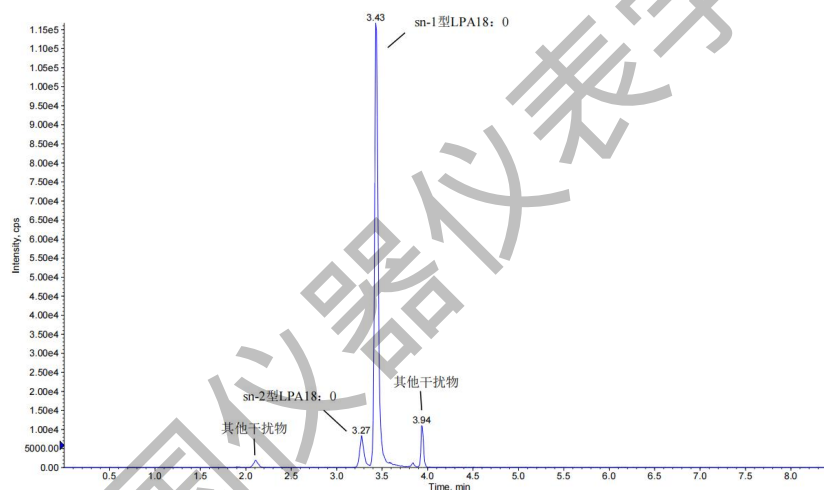


图3 LPA18:0LCMS图

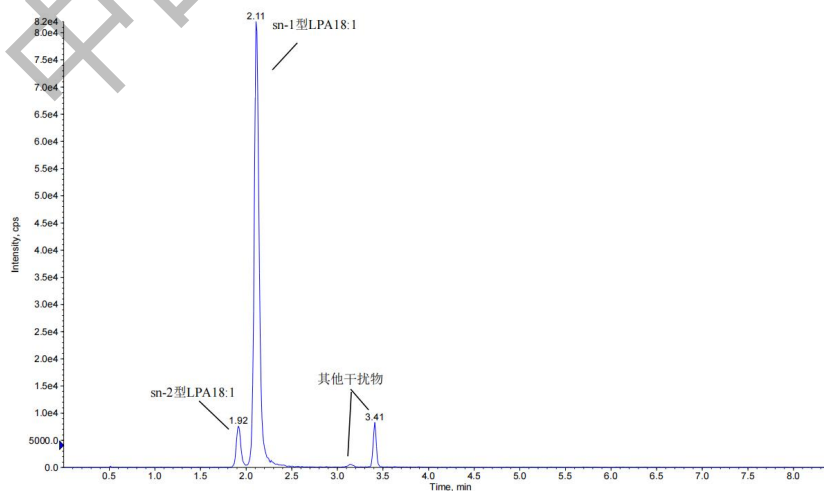


图4 LPA18:1LCMS图

参考文献

- [1] 何兰杰.溶血磷脂酸——一种具有多种生物学功能的磷脂信号分子[J].细胞生物学杂志, 2000, 22(3):6.
- [2] 贾洪强.溶血磷脂的理化性质、制备方法及其在畜牧业上的应用[J].福建畜牧兽医,2018,40(03):17-19.
- [3] Lynn B,Timo U,Carine T,et al.Inhibition of the enzyme autotaxin reduces cortical excitability and ameliorates the outcome in stroke.[J].Science translational medicine,2022,14(641).
- [4] 韩俊,彭惠萍,李辽闽.LC-MS 法测定人唾液中溶血磷脂酸的浓度[J].中国药房,2012,23(14):1283-1286.
- [5] Bathena S,Huang J,Nunn M, et al.Quantitative determination of lysophosphatidic acids (LPAs) in human saliva and gingival crevicular fluid (GCF) by LC-MS/MS[J].Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2011,56(2).
- [6] Shan L,Jaffe K,Li S,et al.Quantitative determination of lysophosphatidic acid by LC/ESI/MS/MS employing a reversed phase HPLC column[J].Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences,2008,864(1-2):22-28.