

稳定同位素标记衍生法基于 UPLC-MS 技术测定 11 种生物胺的分析方法研究

李春婷 (上海百趣生物医学科技有限公司, 上海 201800)

摘要: 运用稳定同位素标记衍生化方法, 利用苯甲酰氯和苯甲酰氯-D5 分别与 11 种生物胺的活泼氢发生衍生化反应, 获得苯甲酰氯标记的生物胺衍生物记为轻标, 苯甲酰氯-D5 标记的记为重标, 以重标作为目标生物胺的同位素内标。研究了 11 种生物胺与苯甲酰氯及苯甲酰氯-D5 的衍生化过程中, 活泼氢与衍生化试剂的反应情况, 建立了超高效液相色谱-质谱法分析腐胺, 亚精胺, 精胺, 多巴胺, 组胺, 去甲肾上腺素, 5-羟色胺, 色胺, 酪胺, 肾上腺素, 章鱼胺的定量分析方法。该方法线性关系良好, 相关系数 (R^2) 均大于 0.9957; 检出限 (LOD) 在 0.02-1.45nmol/L 之间, 定量限在 0.05-5.81nmol/L 之间。该方法简单、快速、准确, 高灵敏度, 对于高通量检测有一定的研究意义。

关键词: 生物胺; 衍生化反应; 苯甲酰氯; 稳定同位素标记; 超高效液相色谱质谱法

生物胺 (Biogenic amine) 是一类具有生物活性的含氨基的低分子量的碱性有机化合物的总称。生物胺广泛存在, 在生物体中起着重要的生理和代谢作用, 它也是对多种行为有潜在效应的神经递质。随着人们对于生物胺的活性和毒性的研究不断增多, 生物样品中生物胺的检测也越来越受到重视和关注。稳定同位素标记衍生化技术是以待分析物的目标基团为反应活性部位, 通过特定的化学反应使其与带有稳定同位素的衍生化试剂相连, 从而将同位素标记的具有质量差异的“标签”引入到目标物中。本研究用“轻”苯甲酰氯对 11 种生物胺化合物进行衍生, 使其带上“轻”衍生化基团。另取 11 种生物胺用“重”苯甲酰氯对其进行衍生, 使其带上“重”同位素标记作为对应多胺化合物的同位素内标。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

SCIEX ExionLC 超高效液相色谱仪, AB Sciex QTrap 6500 质谱仪和 skyline 数据处理软件。高速离心机: Heraeus Fresco 17 centrifuge, Thermo Scientific, USA; 分析天平: AUW 120D, Shimadzu, Japan, 精确至 $\pm 0.01\text{mg}$; 纯水: 屈臣氏; 乙腈 (色谱纯, CNW); 甲酸 (色谱纯, CNW); 甲酸铵 (色谱纯, CNW); 碳酸钠 (BioXtra, Sigma); 去甲肾上腺素 (98%, 阿拉丁)、肾上腺素 (99.7%, 国家标准品物质) 和盐酸多巴胺 (98%, 阿拉丁)。

1.2 色谱条件

色谱柱为: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 ($100 \times 2.1\text{mm}$, $1.8\mu\text{m}$), 流动相 A 为 0.1% 甲酸 & 1mM 甲酸铵水溶液, B 相为乙腈。设置的柱温箱温度为 40°C , 进样体积为 $2\mu\text{L}$, 自动进样器的温度为 4°C 。

1.3 质谱条件

采用 ESI 电喷雾电离源, 正离子多反应监测 (MRM) 模式检测, 高纯氮气; 气帘气为 35psi; 离子源电压为 +5000V, 温度为 400°C ; 雾化气 (GS1) 压力为 60psi; 辅助加热气 (GS2) 压力为 60psi; 碰撞气为 medium。

1.4 标准溶液配置

分别用分析天平称取一定质量的生物胺标准品于容

量瓶中, 用 50% 甲醇 / 水溶液定容, 分别配制成浓度为 1mmol/L 的标准工作液。分别移取等量的 1mmol/L 单标混合均匀, 得到轻标混合标准工作液记为 L-std; 分别移取等量的一定浓度的单标于 EP 管内混合均匀, 得到重标混合标准工作液记为 H-std。

1.5 衍生化过程

分别取 $100\mu\text{L}$ 的 L-std 和 H-std 于 EP 管中, 分别加入 $50\mu\text{L}$ 浓度为 100mM 的碳酸钠溶液, 再加入 $50\mu\text{L}$ 质量浓度为 2% 的苯甲酰氯乙腈溶液, 室温孵育 30min。得到衍生后的“轻”记为 Bz-std-Light; 得到衍生后的“重”标记为 Bz-std-Heavy, 作为内标。

1.6 样品的准备

生物液体类样本取 $40\mu\text{L}$ 于 EP 管, 加入 $160\mu\text{L}$ 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 涡旋混合均匀, 超声。 -40°C 冰箱静置 2h, 沉淀蛋白。离心分别取 $100\mu\text{L}$ 上清按照 2.5 步骤进行衍生化处理。衍生好后加入 Bz-std-Heavy 内标; 离心取上清上机测试。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

乙腈-水溶剂体系具有较好的洗脱能力, 且响应和色谱峰形皆优于甲醇-水溶剂体系。考虑到正离子模式甲酸有助于离子化效率, 于是在乙腈-水流动相中添加甲酸, 当添加体积比为 0.1% 的甲酸时, 峰的响应强度能够显著增加。

2.2 色谱分离

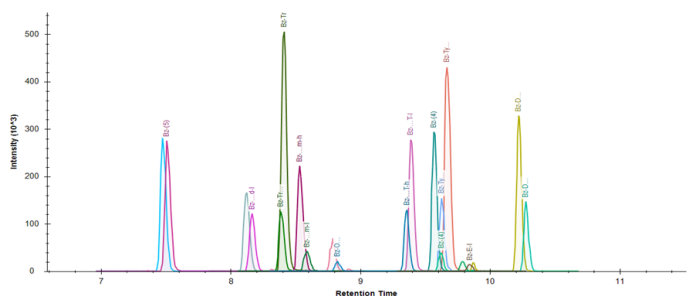


图 1 11 种生物胺

该方法很好地实现了各个目标化合物的色谱分离。图

1 显示了 11 种生物胺的 MRM 叠加色谱图。

由于“轻”“重”衍生物只相差 5m/z (苯甲酰氯-D5 与苯甲酰氯的质量差), 它们具有相同的结构, 相似的理化性质, 洗脱时间和质谱的离子化能力几乎相同, 所以衍生后的轻标保留时间与重标保留时间很接近, 重标的保留时间比轻标的保留时间略提前。这一规律应用在生物样品中, 可以在基质干扰较严重, 目标化合物保留时间出现多个峰的情况下作为判断目标化合物的参考依据。图 2 以组胺为例, 在分析生物样品数据时, 被标记的同位素重标作为内标可较好的识别目标峰, 并且重标的积分时间跨度也可作为轻标的参考。

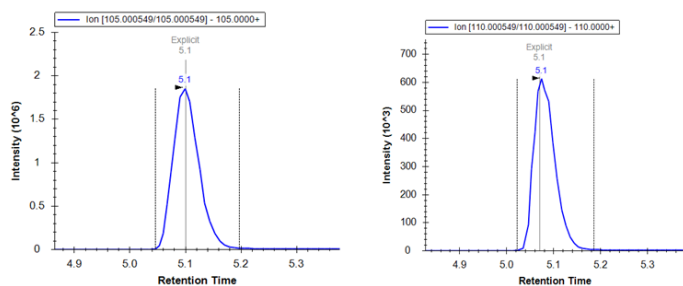


图 1

标准品中组胺轻标 (左图), 保留时间为 5.10min, 重标 (右图), 保留时间为 5.07min。

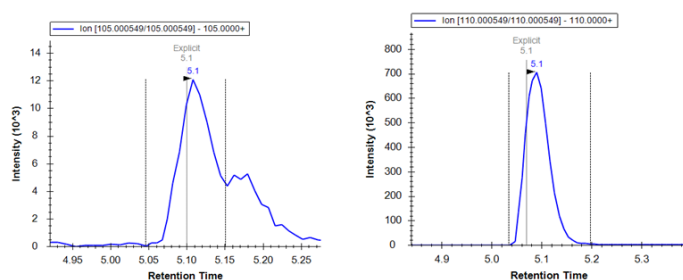


图 2

大鼠血清样本中组胺轻标 (左图) 在 5.12min 有峰, 但后面有明显的峰是杂质峰还是拖尾峰, 单纯依靠外标不好判断, 再看其重标 (右图) 保留时间为 5.09min, 无拖尾情况, 可判断样本 5.15min 后面的峰为杂质峰。

2.3 质谱参数的选择

分别将 11 种生物胺类物质按照 2.5 衍生后, 进行质谱条件的优化。结果表明, 酰胺物质可获得较高响应的 [M+H]⁺ 离子。组胺和色胺都含有一个伯胺, 与苯甲酰氯及苯甲酰氯-D5 衍生发生一取代反应, 在原有分子质量基础分别加 104.14m/z (109.4m/z) 再加 H, 即为母离子质荷比; 酪胺和 5 羟色胺各带一个酚羟基和一个伯胺, 腐胺和亚精胺各带有两个伯胺, 母离子质荷比为分子量 +104.11 (109.14) *2+1; 多巴胺、去甲基肾上腺素和肾上腺素各带有两个酚羟基和一个伯胺 (或仲胺), 母离子质荷比为分子量 +104.11 (109.14) *3+1; 精胺含有两个伯胺两个仲胺, 对应的母离子质荷比为分子量 +104.11 (109.14) *4+1; 章鱼胺衍生后的母离子表现出质子化失水, 含有一个伯胺和一个酚羟基母离子为分子量 +104.14 (109.14) *2-18+1。

衍生过后的物质容易断裂生成苯甲酰基碎片 105m/z (轻标) 和 110m/z (重标)。105m/z 的苯甲酰基片段是大多数分析物中响应最高的子离子, 但有一些物质选择独特的子离子进行检测, 以提高分析对这些化合物的选择性。

2.4 衍生化条件的选择

pH 约为 10 时, 衍生信号强度最优, 选择了 100mm 碳酸钠溶剂调节 pH, pH 低于 9 时, 衍生反应不完全; 但当 pH 过高时, 可能因强碱性溶液导致了衍生试剂和衍生物的分解, 响应下降。对衍生时间和温度的考察结果表明, 在室温避光环境下衍生 30min, 衍生化反应能够完全, 且响应很好。较高温的衍生温度对于精胺、腐胺的衍生效果较好, 但是对于多巴胺、肾上腺素、去肾上腺素本身不稳定的物质会导致目标化合物的降解。苯甲酰氯很容易水解, 选择用乙腈配制, 并且需要现配现用。

2.5 衍生效率的评估

分两步进行验证: ①苯甲酰氯和苯甲酰氯-D5 分别衍生 11 种生物胺, 苯甲酰氯-D5 衍生后 (重标) 的响应值与苯甲酰氯衍生后 (轻标) 的响应值的比值情况, 可以作为衍生效率的评判依据, 结果表明, 衍生效率几乎为百分之百; ②轻标再与苯甲酰氯-D5 进行衍生反应, 重标与苯甲酰氯进行衍生反应记为第二次衍生反应。若轻标未能衍生完全, 则与苯甲酰氯-D5 再进行衍生化反应, 结果应该是轻标响应降低, 有标记的重标被检出, 重标同理。结果表明, 第二次衍生后的结果与第一次衍生结果几乎相同。说明该方法的衍生效率很好。

2.6 线性范围、检出限、定量限及精密度

结果表明, 各生物胺具有良好的线性响应, 相关系数 (R^2) 均大于 0.9957。检出限和定量限分别在 0.02–1.45nmol/L 和 0.05–5.81nmol/L 范围内。对 14.80nmol/L 的标准品重复分析 ($n=5$), 所有目标化合物的平均回收率在 90.2%–111.7% 之间, 标准相对偏差均小于 4.9%。

2.7 加标回收实验

用空白血浆作为加标样品, 取 9 个平行样, 分别加入 3 种不同浓度的标准溶液, 按照 2.6 处理, 进行加标回收实验, 平均加标回收率在 90.2%–108.4%。

3 结论

本研究实现了 11 种生物胺利用稳定同位素标记衍生化方法基于 UPLC-MS/MS 技术的检测。该方法具有简单、准确性好, 高灵敏度的优点。利用稳定同位素标记衍生化方法可有效校正保留时间漂移产生的基质效应, 该方法衍生化条件容易获取, 并能获得较高的产量, 对于生物样品中含有特定基团的同类化合物的高通量检测也有一定的研究意义。

参考文献:

- [1] 林绍艳, 张芳, 徐颖洁. 植物中多胺含量超高效液相色谱法的建立 [J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(3): 358-365.
- [2] 何昀璐, 罗彦波, 陈欢, 侯宏卫, 胡清源. 稳定同位素标记衍生化结合液相色谱-串联质谱在生物样本中小分子代谢物分析的研究进展 [J]. 分析化学, 2017(7): 1066-1077.