论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0350-04

大鼠血清中喹啉酸含量的气质联用测定

熊 缨,余华荣,周岐新 (重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 建立用于测定大鼠血清中喹啉酸含量的气质联用(gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS)技术。**方法** 动物分为对照组和炎症模型组。经内眦静脉取血,对采集的血清样品进行纯化和衍生化,采用GC-MS联用技术测定喹啉酸含量,以全扫描方式定性,选择性离子监测(selected ion monitoring, SIM)方式定量检测。**结果** 测定方法的专一性良好,检出限为50 nmol/L,喹啉酸浓度在0.05~20 μmol/L范围内线性关系良好。**结论** 本方法检测结果准确、干扰少,检定快速,适合需要多次少量取血的动物实验应用。喹啉酸的六氟异丙醇衍生物较为稳定,但血清不宜长时间冻存,宜尽快测定。

关键词:喹啉酸;血清;气质联用

中图法分类号:R446.112;R977.4 **文献标识码**:A

Concentration of quinolinic acid in rat serum by GC-MS

XIONG Ying, YU Hua-rong, ZHOU Qi-xin (Department of Pharmacology, College of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish a sensitive and accurate gas chromatography-mass spectrometry method for determination of quinolinic acid in rat serum. **Methods** The objective compound was purified and derivatized to its dihexafluoroisopropyl ester before quantitative determination by scanning method and quantitative determination by SIM method. **Results** The endogenous substances in serum had no interference on the measurement of quinolinic acid in the sample. Assay linearity was obtained in the range of 0.05 – 20 μmol/L with limit of quantitation (LOQ) of 0.05 μmol/L. The intra-day relative standard deviation (RSD) was lower than 15%. The inter-day relative standard deviation was lower than 12%. **Conclusion** It is a sensitive, accurate and convenient method. The dihexafluoroisopropyl ester of quinolinic acid is quite stable, but the serum should not be preserved for a long time before derivation.

Key words: GC-MS; quinolinic acid; serum

喹啉酸(quinolinic acid, QUIN),又称2,3-吡啶二羧酸,是内源性L-色氨酸的代谢物和体内正常组分之一。喹啉酸是N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体的竞争性激动剂。但脑组织并不能对喹啉酸进行代谢,而需由对丙磺酸敏感的载体系统转运出脑,因此,疾病状态下,喹啉酸容易在脑室内累积,产生毒性作用,并与多种疾病的神经元损害病理机制密切相关。因此,对生物标本中的喹啉酸进行测定具有重要意义。国外报道的喹啉酸测定方法有气相色谱法、液相色谱法[1-5]、气质联用法[6-15]、高压电泳法、毛细管区带电泳法[16]和差示脉冲极谱法[17]等,其中灵敏度最高的是气质联用法。国内对喹啉酸的研究还处于初级阶段[2,15]。为了更好地了解喹啉酸在实验动物和人体内的存在和动态变化,本研究建立了经衍生化后以气质联用技术测定血清中喹啉酸含量的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

喹啉酸、六氟异丙醇、三氟醋酸酐均购自Aldrich公司,其他化学药品均为分析纯。所有试剂与药品均在室温下保存。

2 ml MT型ODS填料的SPE为大连依利特化学仪器公司生产。气质联用系统包括HP6890气相色谱仪,HP5973N质谱监测仪,HP质谱工作站。

1.2 血样采集和处理

雄性SD大鼠10只,体质量240~290 g,由重庆医科大学

作者简介:熊 缨(1974-),女,重庆市人,博士,讲师,主要从事药物代谢及神经药理学方面的研究。电话:13823194580,E-mail: brendaxiong@hotmail.com

通讯作者:周岐新,电话:(023)68485038,E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-03-17;修回日期:2006-11-15

实验动物中心提供。用点样定量毛细管从大鼠内眦静脉采血 1 ml,25 ℃室温放置 30 min,4 ℃下10 000 r/min 离心 10 min,分离血清,低温冷冻干燥,在 -20 ℃保存。

1.3　喹啉酸类成分的衍生化

在 18 ℃室温下,将冻干的血清样品解冻。C18 固相萃取小柱预先活化:用 2 ml 正庚烷洗涤 2 次,除去柱内的非极性杂质,然后用 2 ml 甲醇洗涤 2 次,除去极性杂质,再以纯水润洗,勿使萃取短柱干燥。血清样品加入到萃取短柱上,分别用 1 ml 纯水及 0.1 mol/L 甲酸清洗 2 次,再用 1 mol/L 盐酸 1.5 ml 分 3 次洗脱,收集洗脱液。洗脱液用弱氮气流小心吹干,加入六氟异丙醇和三氟醋酸酐各 100 μl,于 80 ℃下反应 1 h。用氮气充分挥去溶剂后,以 500 μl 5% $NaHCO_3$ 和 500 μl 纯水依次洗涤,残留物再次挥干,在 -20 ℃冻存。检测前 30 min 加入 200 μl 正庚烷溶解,在冰浴中保存,等待进样。

1.4　喹啉酸的气质联用测定

分析所用 Hewlet-Pakard 气质联用系统由气相色谱仪 HP5890 和质谱仪 5973N 所组成。气相分离柱为 HP-5 柱(长 25 m,内径 0.2 mm,膜厚 0.33 μm),载气采用氦气(纯度为 99.999%),流速 1 ml/min,压力 30 kPa。进样口温度为190 ℃,进样体积为 1 μl。每次注射进样后,微量注射器都用正庚烷反复抽洗。柱温采用程序升温:初始温度 50 ℃,维持 1 min,以每分钟 50 ℃的速率升温至 250 ℃,再维持 10 min。分流比 10∶1,溶剂延迟 3 min,离子源温度 240 ℃,传输线温度 250 ℃,全扫描质量范围:110 ~ 480 a. m. u.,离子化电压设定为 60 eV。质谱定性采用全扫描方式,定量采用 SIM 方式,用于定量分析的离子 m/z 为 316。

为了确定喹啉酸双六氟异丙酯的出峰时间,采用了比较喹啉酸标准品和样品色谱峰的保留时间、将喹啉酸标准品加入到样品中使色谱峰增高、比较与标准品喹啉酸峰相应保留时间的样品出峰中几个离子的丰度比对样品中的喹啉酸双六氟异丙酯进行定性。采用外标法进行定量分析。

在全扫描下可见,在本实验的运行条件下,喹啉酸双六氟异丙酯的保留时间为 11.36 min。其质谱特征峰(图 1)共有 4 个,质荷比分别为 122、272、316、467,与文献[10]报道值一致,经人工解析确认为喹啉酸双六氟异丙酯的碎片离子峰。

在 11.00 ~ 11.60 min 以 SIM 方式,选择 m/z 为 272、316、465 的碎片离子对喹啉酸进行定量监测。

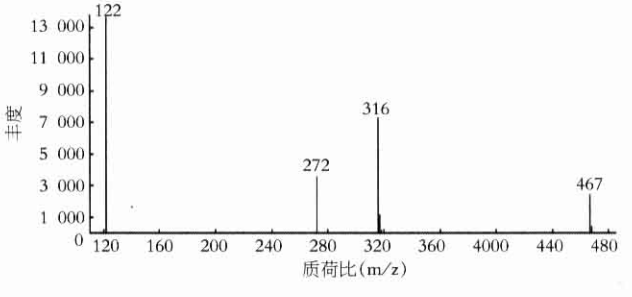


图 1　喹啉酸双六氟异丙酯的质谱图

1.5　标准曲线建立

首先制备喹啉酸储备液,浓度为 10 mmol/L,然后稀释为 0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20 μmol/L 的系列溶液,照 1.3 所述步骤进行衍生化。按选定的仪器条件进样,每种溶液进样 3 次,计算 SIM 监测所得离子丰度的平均值,以平均丰度对浓度作线性回归。

2　结果

2.1　方法的专属性 - 血清对色谱分离的影响实验

测定了空白溶液、对照大鼠血清、喹啉酸标准品溶液、添加喹啉酸标准品的对照大鼠血清共 4 种样品的总离子流图,分别如图 2 ~ 5 所示。与空白溶液相比,对照大鼠血清的总离子流图基线较高,内源性杂质也较多,先出的两个较大的峰是溶剂正庚烷带入的瓶塞增塑剂杂质成分;图 3 ~ 5 中保留时间为 11.36 min 的峰经碎片离子结构解析确定为喹啉酸双六氟异丙酯。添加标准品的对照大鼠血清,除图 3、4 的组分之外没有出现新的峰。显示血清内源性物质及其他杂质基本不干扰样品的分离测定。

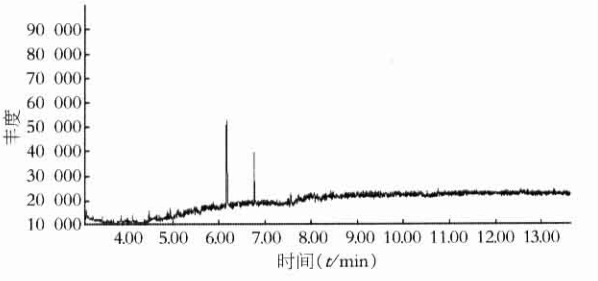


图 2　空白溶液的总离子流图

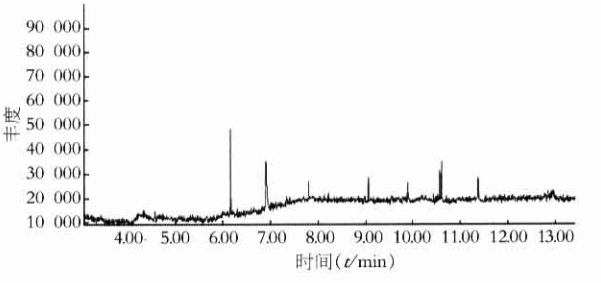


图 3　对照血清的总离子流图

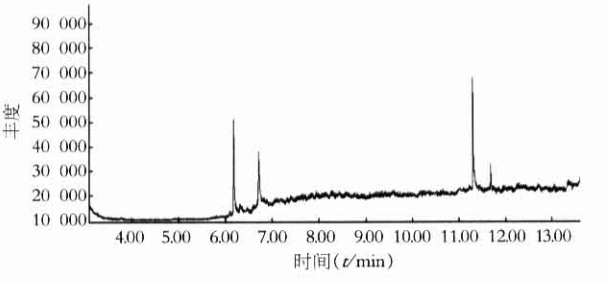


图 4　标准溶液的总离子流图

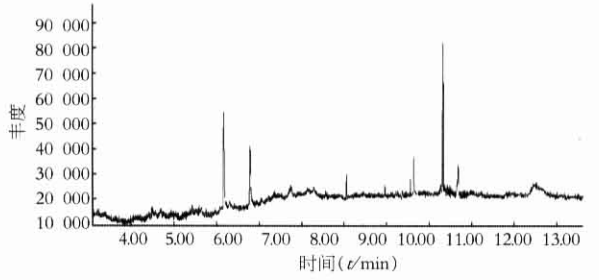


图5 对照血清+标准溶液的总离子流图

2.2 方法的精密度

采用0.05、0.5、1、5、10 μmol/L的标准溶液进行测定，每个浓度的溶液进样3次，计算相对标准偏差RSD，结果如表1。

表1 日内精密度测定结果

溶液浓度(μmol/L)	0.050	0.500	1.000	5.000	10.000
测得浓度(μmol/L)	0.057	0.709	0.803	4.639	10.172
标准偏差(μmol/L)	0.008	0.070	0.072	0.221	0.479
RSD(%)	14.04	9.87	8.97	4.76	4.71

2.3 方法的定量限

根据10倍的信噪比，最低定量浓度为30 nmol/L。但如果我们以15%的变异系数作为可以接受的状态，那么这时的检出浓度50 nmol/L就被认为是本方法的合理定量限。更低的浓度虽然在GC-MS上亦可检出，但数据的离散系数将要大于15%。

2.4 方法的线性范围

浓度分别为0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20 μmol/L的系列溶液，照1.3所述步骤进行衍生化，按选定的仪器条件进样，每种溶液进样3次，浓度及SIM监测所得m/z 316离子丰度峰面积的平均值见表2。

表2 工作曲线测定结果

浓度(μmol/L)	0.05	0.1	0.5	1	5	10	15	20
平均丰度($\times10^3$)	2.215	4.139	18.126	20.406	114.053	249.084	379.124	480.015

以喹啉酸浓度为横轴，喹啉酸双六氟异丙酯丰度为纵轴作图，得到的回归直线线性范围为0.05~20 μmol/L，线性方程为$Y=24.407\times10^3X+818.050$，相关系数$r=0.9992$。表明在0.05~20 μmol/L范围内丰度与浓度呈良好线性关系。

2.5 衍生化前喹啉酸在大鼠血清中的稳定性

加入浓度为0.5 μmol/L喹啉酸标准品的大鼠血清在-20 ℃冻存10、20、30、40、60 d后衍生化，所得到的时间曲线在实验进行的60 d内得到良好的半对数曲线，半衰期为29 d。

当加入浓度为5 μmol/L喹啉酸标准品时，在同上条件下衍生化，稳定性明显增加，半衰期为49 d。

提示血清应在采集血清后尽快完成衍生化，不可久置。

2.6 衍生化后喹啉酸酯的稳定性

取低、中、高3个浓度的喹啉酸标准溶液各3份(浓度分别为0.1、1、10 μmol/L)，衍生化后在-20 ℃冻存，分别于0、7、14 d测定，所得的RSD分别为11.65%、9.37%和7.83%。说明衍生后的样品在-20 ℃冷藏14 d是稳定的。

3 讨论

运用气相色谱-质谱联用仪对来自大鼠血清样品中的喹啉酸进行纯化、衍生化后分析的结果表明：GC-MS分析法快速、方便，以每次的后运行时间设为5 min计，每份样品总运行时间不超过20 min。同时需要的样品量少，又能避免色氨酸通路其他代谢物的干扰，非常适合于需要少量多次采样的动物实验应用。

3.1 样品预处理方法的选择

文献所载的预处理方法是：取血浆碱化、离心，上清液低温冷冻过夜沉淀酯性物质，再加入离子交换树脂、振荡5 min后离心，弃上清，用酸洗脱，收集洗脱液真空干燥并衍生化。该方法较为繁琐，需时长，可控性差。如果直接冻存血清，实验证明将影响喹啉酸浓度稳定性，且浓度越低，半衰期越短。故改为取血清，经SPE(固相萃取)小柱分离杂质后真空冷冻干燥，以减低影响程度。

3.2 色谱分离条件的选择

为了选择适合喹啉酸分离检测用的毛细管柱，我们尝试了通用柱OV-17和HP-5两种。实验表明，后者分离效果更好，而且HP-5色谱柱可以耐受相对较高的温度，加快出峰的时间，缩短检测的全过程。

色谱柱温度的选择上，我们首先试验了250 ℃恒温，不能满意地分离。采用初温50 ℃保持1 min，25 ℃/min升温至250 ℃保持15 min，6 min开始出峰，20 min出最后一峰。由于出峰温度较高，随后把初温提高到100 ℃保持1 min，以20 ℃/min升温至280 ℃保持10 min，4 min开始出峰，17 min出最后一峰，分离效果不太理想。最后改用30 m HP-5柱，升温程序为溶剂延时3 min，初温50 ℃保持1 min，50 ℃/min升温至250 ℃保持10 min，结果最为理想。

3.3 质谱条件的选择

在60 eV下，喹啉酸双六氟异丙酯的特征性离子共有4个，质荷比分别为122、272、316、467。这几个碎片分别为：单吡啶酸$^-$122，单吡啶酸单三氟异丙酯$^-$

272，吡啶二酸单三氟异丙酯 316，吡啶二酸双三氟异丙酯 467，吡啶二酸双三氟异丙酯分子峰的同位素碎片即 M+1 是 468。样品的色谱保留时间和质谱碎片离子必须与标准样品完全吻合，且其质谱图中的 4 个主要离子的面积比也必须与标准样品相符，才能确定为目标物。我们所得到的棒图所提供的碎片与文献相同，再根据其裂解机制的推断，其化学结构得到证实。

为提高灵敏度，减少干扰，提高方法的选择性和可靠性，采用 SIM，选择丰度高、高质量端的离子进行检测。由于整个过程中，血样中其他物质在 m/z 122 处也有出峰，为避免干扰，不选择作为定量离子。而 m/z 272、316、465 这 3 个碎片都可认定为喹啉酸双六氟异丙酯的特征性结构离子，故选择这 3 个碎片离子对喹啉酸进行 SIM，监测时间为 11.00 ~ 11.60 min。

3.4　气质联用法的优越性

气质联用法比液相色谱法和气相色谱法更精确。它可以对所测定的样品成分进行谱库检索或结构解析，准确地给出检出成分的分子量、分子式、结构式等结果。采用 EI 源轰击后，选择性监测喹啉酸特征碎片离子的方法，具有较高的灵敏度和专属性；GC-MS 联用可以依靠质谱的分辨能力区分不同物质的色谱峰，抗干扰能力强。同时本实验采用梯度升温的方法使血清中其他干扰物的出峰提前，从而缩短了样品的分析时间，可以满足本实验低浓度测定的需要。

（致谢：本方法的建立得到了深圳冠利达波顿香料公司杨文彬同志，深圳卷烟厂徐旸同志和深圳通港实业有限公司杨严明同志在技术上的大力帮助，特此致谢。）

参考文献：

[1] Chuang C Z, Ragan F A, Jr., Prasad C. Optimization of conditions for the simultaneous separation of ten tryptophan metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1990, 534: 13 - 21.

[2] 周　祺，王正敏. 喹啉酸的螺旋神经节神经兴奋毒性研究[J]. 上海医学，1999，22(5)：286 - 288.

[3] Pawlak D, Koda M, Pawlak S, *et al*. Contribution of quinolinic acid in the development of anemia in renal insufficiency[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(4): F693 - F700.

[4] Xia C, Dang Y, Brown O R. HPLC analysis of quinolinic acid, a NAD biosynthesis intermediate, after fluorescence derivatization in an aqueous matrix[J]. Microbios, 1998, 94(379): 167 - 181.

[5] Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, *et al*. Determination of quinolinic acid by liquid chromatography with fluorimetric detection[J]. Adv Exp Med Biol, 1996, 398: 697 - 701.

[6] Heyes M P, Morrison P F. Quantification of local de novo synthesis versus blood contributions to quinolinic acid concentrations in brain and systemic tissues[J]. J Neurochem, 1997, 68(1): 280 - 288.

[7] Nicholls T, Lacey B, Nitsos L, *et al*. Regional changes in kynurenic acid, quinolinic acid, and glial fibrillary acidic protein concentrations in the fetal sheep brain after experimentally induced placental insufficiency[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 184(2): 203 - 208.

[8] Rider L G, Schiffenbauer A S, Zito M, *et al*. Neopterin and quinolinic acid are surrogate measures of disease activity in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies[J]. Clin Chem, 2002, 48(10): 1681 - 1688.

[9] Sinz E H, Kochanek P M, Heyes M P, *et al*. Quinolinic acid is increased in CSF and associated with mortality after traumatic brain injury in humans[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(6): 610 - 615.

[10] Valle M, Price R W, Nilsson A, *et al*. CSF quinolinic acid levels are determined by local HIV infection: cross-sectional analysis and modelling of dynamics following antiretroviral therapy[J]. Brain, 2004, 127(Pt 5): 1047 - 1060.

[11] Smythe G A, Braga O, Brew B J, *et al*. Concurrent quantification of quinolinic, picolinic, and nicotinic acids using electron-capture negative-ion gas chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2002, 301(1): 21 - 26.

[12] Bell M J, Kochanek P M, Heyes M P, *et al*. Quinolinic acid in the cerebrospinal fluid of children after traumatic brain injury[J]. Crit Care Med, 1999, 27(3): 493 - 497.

[13] Dobbie M S, Surtees R A. Concentrations of quinolinic acid in cerebrospinal fluid measured by gas chromatography and electron-impact ionisation mass spectrometry. Age-related changes in a paediatric reference population[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 696(1): 53 - 58.

[14] Saito K, Fujigaki S, Heyes M P, *et al*. Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279(3): F565 - F572.

[15] 郭　庆，匡培根，谢　军. 癫痫患者脑脊液及血浆喹啉酸含量的变化[J]. 中华神经精神科杂志，1995，28(5)：303 - 305.

[16] Weber P L, Malis M, Palmer S D, *et al*. Capillary zone electrophoresis separation of tryptophan and its metabolites, including quinolinic acid[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 697(1 - 2): 263 - 268.

[17] Furlanetto S, Pinzauti S, La-Porta E, *et al*. Development and validation of a differential pulse polarographic method for quinolinic acid determination in human plasma and urine after solid-phase extraction: a chemometric approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17(6 - 7): 1015 - 1028.

（编辑　陈聪连）