

LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 L-色氨酸和 L-犬尿氨酸浓度的研究

徐开成,于瑞莲*,杨云菲,卞智慧,邵佳蔚

(南京中医药大学药学院,南京 210023)

摘要 本研究运用液相色谱-二级质谱连用技术,以3-硝基酪氨酸(3-NT)为内标,建立了可同时、快速测定大鼠血浆中L-色氨酸(L-Try)和L-犬尿氨酸(L-Kyn)的LC-MS/MS法,通过比较肝癌成模过程中L-Kyn和L-Try的变化来为肝癌的诊断提供理论依据。色谱条件:RRHD Eclipse Plus C₁₈色谱柱(3.0 mm×100 mm,1.8 μm),以水-乙腈(含0.1%甲酸)(90:10)为流动相洗脱,流速0.25 mL/min,进样量5 μL。质谱条件:采用MRM模式进行定量检测,化合物质荷比分别为205.12→146.10(L-Try),209.09→146.10(L-Kyn),227.09→181.10(3-NT)。结果显示:L-Try和L-Kyn的线性范围分别是9.670~9.670和9.973~9.973 ng/mL($r^2 \geq 0.9990$),L-Try和L-Kyn的定量限分别为9.670和9.973 ng/mL,日内、日间精密度均小于15%。整个分析物的回收率均大于81.17%,并没有表现出严重的基质效应,表明肝癌成模过程中大鼠血浆L-Kyn/L-Try比值呈现整体下降趋势。L-Kyn/L-Try比值的变化是肝肿瘤形成过程中一个非常明显的变化,可为药物代谢研究和肝癌机制研究发挥重要作用。该方法灵敏、快捷、准确,专一性强,可用于药物代谢的分析研究及药物对肝癌的作用机制研究。

关键词 LC-MS/MS; L-色氨酸; L-犬尿氨酸; 内源性物质; 药物代谢分析; 中医药作用机制; 拮抗性调节作用

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0714-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160614

引用本文 徐开成,于瑞莲,杨云菲,等. LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 L-色氨酸和 L-犬尿氨酸浓度的研究[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6): 714–718.

Cite this article as: XU Kaicheng, YU Ruilian, YANG Yunfei, et al. Simultaneous determination of L-tryptophan and L-kynurene in rat plasma by LC-MS/MS[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 714–718.

Simultaneous determination of L-tryptophan and L-kynurene in rat plasma by LC-MS/MS

XU Kaicheng, YU Ruilian*, YANG Yunfei, BIAN Zhihui, SHAO Jiawei

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract To establish a simple and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of the concentration for L-tryptophan(L-Try) and L-kynurene(L-Kyn) in rat plasma. The changes in the process of the liver tumors formation may provide a basis for the diagnosis of liver cancer. 3-Nitro-L-tyrosine(3-NT) were added as the internal standard for the determination of two active substances and the chromatographic analysis was performed on a RRHD Eclipse Plus C₁₈ column(3.0 mm×100 mm,1.8 μm). The mobile phase was composed of water and acetonitrile(containing 0.1% formic acid)(90:10) at a flow rate of 0.25 mL/min, and the injection volume is 5 μL. Detection and quantification were performed by mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode with m/z 205.12→146.10(L-Try), m/z 209.09→146.10(L-Kyn), m/z 227.09→181.10(3-NT), respectively. The results show that the linear ranges were 9.670~9.670 ng/mL for L-Try, and 9.973~9.973 ng/mL for L-Kyn ($r^2 \geq 0.9990$). The limit of quantitation were 9.670 ng/mL for L-Try, and 9.973 ng/mL for L-Kyn, respectively. The intra- and inter-day precisions were all less than 15%; the recoveries of the two analytes were

more than 81.17% and severe matrix effect was not observed. The ratio of L-Try/L-Kyn determined by LC-MS/MS in rat plasma showed an overall downward trend, which could be used effectively for the drug metabolism studies and researches on the action mechanism of medicine on liver cancer. A rapid, simple, sensitive and specific LC-MS/MS method has been successfully developed and could also be used effectively for the drug metabolism studies and researches on the action mechanism of medicine on liver cancer.

Key words LC-MS/MS; plasma; L-tryptophan; L-kynurenine; endogenous substances; drug metabolism analysis; mechanism of Chinese medicine; antagonistic adjustment

This work was supported by the Research Foundation of Jiangsu Provincial Science and Technology Department Innovation Projects (No. BY2015008-03)

色氨酸(L-Try)属芳香族氨基酸,是人体必需氨基酸之一,除合成蛋白质外,可在肝、肾、脑等组织代谢为多种生物活性分子。摄入体内的色氨酸主要经犬尿氨酸代谢通路代谢,其中犬尿氨酸(L-Kyn)是该代谢途径中最为重要的中间代谢产物之一。吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)是细胞内一种含亚铁血红素的单体蛋白,是肝脏外唯一可催化色氨酸分子(Try)中吡咯环氧化裂解、沿犬尿氨酸(Kyn)途径分解代谢的限速酶。研究认为IDO居于免疫调节中心,IDO的活力可以用L-Kyn/L-Try(KT)浓度比值表示,IDO的活力是可以用来监测体内细胞免疫活动状态的指标^[1]。IDO在正常状态下呈低水平表达,在炎症或癌症过程中表达显著增加,最近研究表明,在肝癌肿瘤微环境中产生免疫耐受的机制中,多种细胞成分通过高表达IDO,导致肿瘤局部色氨酸代谢异常,降解色氨酸使细胞微环境中色氨酸含量耗竭,并且促进调节性T细胞形成,导致T细胞的增殖停滞在G₁期,抑制T细胞增殖,在局部制造免疫逃逸的微环境,从而介导肝癌细胞逃避免疫系统的攻击,参与肝癌的免疫逃逸^[2]。它在恶性肝癌的发生、发展和转移过程中发挥了重要作用。

L-Try、L-Kyn均为影响IDO活性的内源性物质,在机体内含量较低,用常规的化学分析方法很难测定。近年来国内外研究中主要使用了高效液相色谱法实现了对这些物质的浓度的测定,但由于L-Kyn不能产生荧光,使用HPLC-FLD法时通常采用柱后衍生法,操作复杂,应用受限^[3];使用HPLC-UV法测定时由于检测L-Kyn时灵敏度较低,需要L-Try负荷试验时才能检测到L-Kyn,故无法测定

微量L-Kyn的浓度^[4]。本研究建立了同时测定大鼠血浆中L-Try和L-Kyn浓度的LC-MS/MS法,方法简便、快速,为后期研究药物对肝癌作用机制提供分析方法。

1 材 料

1.1 药品与试剂

L-色氨酸(L-Try,上海源聚生物科技有限公司);L-犬尿氨酸(L-Kyn)、3-硝基酪氨酸(3-NT)(上海源叶生物科技有限公司);乙腈、甲酸均为色谱纯(德国Merck公司);醋酸铵为分析纯,水为超纯水系统。

1.2 仪器及测试条件

Thermo TSQ三重四极杆液相-质谱联用仪,流动相为水-乙腈(含0.1%甲酸),梯度为0.0~1.0 min(95:5),1.0~2.5 min(70:30),2.5~6.0 min(30:70),6.0~7.0 min(30:70),7.0~8.5 min(95:5),8.5~10 min(95:5);流速为0.25 mL/min,柱温为36.5℃,色谱柱为RRHD Eclipse Plus C₁₈(3.0 mm×100 mm,1.8 μm),进样量为5 μL。三重四极质谱仪配备有电喷射离子化(ESI)源(美国热电公司)用于质谱检测,该检测是在正离子模式和多反应监测(MRM)模式下操作,雾化气(N₂)压力设为40 psi(1 psi=6.895 kPa);干燥气(N₂)的流速设为10 L/min,干燥气(N₂)的温度设为350℃。多个反应监测(MRM)模式监测反应质荷比(m/z):205.12→146.10(L-Try),209.09→146.10(L-Kyn),227.09→181.10(3-NT)。碎裂电压分别为47、66和61 V;碰撞能量分别为17、21和12 V。

L-Try、L-Kyn、3-NT的化学结构见图1。

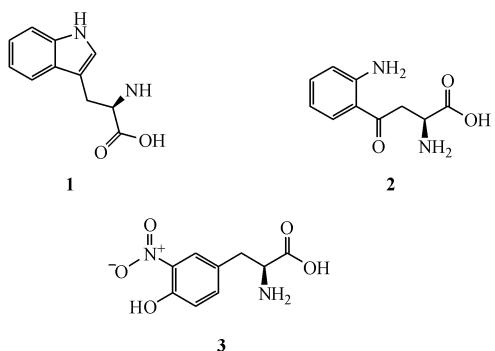


Figure 1 Chemical structures of L-Tryptophan (L-Try, 1), L-Kynurenine (L-Kyn, 2) and 3-Nitrol-L-tyrosine (3-NT, IS, 3)

2 方 法

2.1 标准品与内标溶液的制备

取 L-Try、L-Kyn、3-NT 的对照品适量, 精密称定后加超纯水配制成 1 mg/mL 的混合储备液, 使用时使用超纯水进行稀释, 配制 L-Try 质量浓度为 9.670, 19.34, 96.70, 193.4, 967.0, 1934, 9670 ng/mL, L-Kyn 质量浓度为 9.973 0, 19.946, 99.730, 199.46, 997.30, 1994.6, 9973.0 ng/mL 的标准溶液, 3-NT 质量浓度为 100.00 ng/mL 的内标溶液。含有 0.4 mmol/L 醋酸铵的流动相的配制: 在每 100 mL 水-乙腈(含 0.1% 甲酸)(90:10)中, 加入已配制好的 10 mmol/L 的醋酸铵母液 4 mL 混匀制得。所有溶液避光保存在 4 ℃ 下。

2.2 空白血样预处理

经肝素抗凝后血液样本于低温 4 ℃ 下 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照血浆体积加入 2 倍活性炭, 涡旋混合, 低温 4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 经由 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 保存备用^[5-6]。按“1.2”项下条件测定, 空白血浆中的内源物不干扰目标物的测定。

2.3 血样预处理

首先使用乙腈对血浆去蛋白, 在每 100 μL 的血浆加 3-NT 内标溶液 10 μL, 再加 4 倍乙腈涡旋混合, 10 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液, 45 ℃ 下真空干燥至干, 加入含 0.4 mmol/L 醋酸铵的流动相 100 μL 复溶, 涡旋混合后 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 4 ℃ 下保存备用。

2.4 色谱-质谱行为

按“1.2”项下条件测定, 血浆样品色谱图见图 2-A, L-Try、L-Kyn、3-NT 保留时间分别是 5.50、

4.86 和 4.72 min。L-Try、L-Kyn、3-NT 对照品加入到空白血浆的色谱图见图 2-B, 活性炭吸附后的空白血浆的色谱图见图 2-C, 可以看出空白血浆中的内源物不干扰目标物的测定。

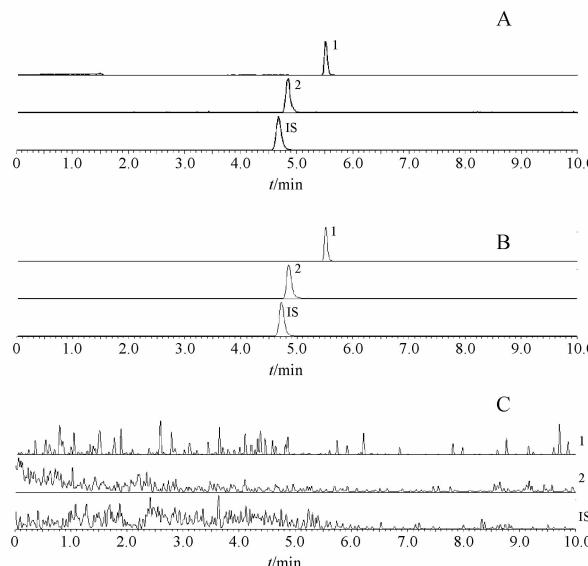


Figure 2 Representative MRM chromatograms of L-Try (1), L-Kyn (2) and 3-NT (IS). A: Plasma sample spiked with IS; B: Blank plasma spiked with the two analytes and IS; C: Blank plasma after absorption of activated carbon

2.5 方法学考察^[7]

2.5.1 线性关系及定量限 取空白血浆 100 μL 置 2 mL 离心管中, 精密加入标准曲线各点浓度的标准溶液 100 μL, 制成 L-Try 质量浓度为 9.670, 19.34, 96.70, 193.4, 967.0, 1934, 9670 ng/mL, L-Kyn 质量浓度为 9.973 0, 19.946, 99.730, 199.46, 997.30, 1994.6, 9973.0 ng/mL 的标准血浆样品, 经“2.3”项下方法处理后, 分别进样 10 μL, 按“1.2”项下条件测定离子流峰面积; 采用内标法定量分析, 用 Thermo Xcalibur 软件进行曲线拟合, 以样品与内标峰面积之比 (Y) 为纵坐标, 样品浓度 (X) 为横坐标进行线性拟合。结果表明, L-Try 和 L-Kyn 在此测定范围内线性良好。平均回归方程分别为 $Y = 0.0082X + 0.1805$, $R^2 = 0.9997$ 和 $Y = 0.0029X + 0.0332$, $R^2 = 0.9994$ 。定量限分别为 9.670 和 9.973 ng/mL。

2.5.2 精密度 取 2 mL 离心管加入空白血浆 100 μL, 分别加入低、中、高 3 种浓度的标准溶液 (L-Try 和 L-Kyn 质量浓度分别为 19.340/19.946, 193.40/199.46, 1934.0/1994.6 ng/mL) 100 μL。

按“2.3”项下方法处理,同一个样连续进样5次,考察仪器精密度。日内测定5次,考察日内精密度,连续测定3d,考察日间精密度。计算日内和日间RSD结果表明,L-Try和L-Kyn日内、日间精密度RSD均小于15%,重复性良好。

2.5.3 稳定性 取2mL离心管加入空白血浆100μL,分别加入低、中、高3种浓度的标准溶液100μL。按“2.3”项下方法处理,分析物的稳定

性用3种浓度在各种存储和工艺条件下进行了研究。数据表明,样品在自动取样器(4℃)72 h的稳定性,3次冻融循环(在-20±20℃)中冷冻和长期储存(30 d,在-80℃)是可以接受的。结果表明,所有被分析物的准确度为85.320%~100.14%之间,相对标准偏差为3.16%~9.62%之间。结果说明L-Try和L-Kyn在这种情况下稳定性良好。

Table 1 Stability of the L-Try and L-Kyn in rat plasma

Compd.	c/ (ng/mL)	Freeze-thaw cycles		-80 °C for a month		4 °C for 72 h	
		Accuracy/%	Precision (RSD, %)	Accuracy/%	Precision (RSD, %)	Accuracy/%	Precision (RSD, %)
L-Try	1.934×10	91.32	5.32	85.32	4.32	88.32	6.76
	1.934×10 ²	89.43	6.04	90.21	7.11	95.31	6.54
	1.934×10 ³	98.21	3.16	88.32	3.45	97.42	4.98
L-Kyn	1.9946×10	100.14	6.99	92.31	8.56	89.43	4.32
	1.994×10 ²	98.12	7.93	96.32	9.62	97.21	7.21
	1.994×10 ³	98.32	6.28	99.64	5.47	97.43	4.18

2.5.4 回收率 取2mL离心管加入空白血浆100μL,分别加入(L-Try和L-Kyn质量浓度分别为19.340/19.946、193.40/199.46、1.934.0/1.994.6 ng/mL)低、中、高3种浓度的标准溶液100μL。同“2.3”项下方法处理,平行5份,分别进样10μL,按“1.2”项下条件测定离子流峰面积,与空白血浆按“2.3”项下操作,分别以低、中、高对照品溶液重组,进样所得峰面积比较计算各物质的回收率,结果见表2。

2.5.5 基质效应 取5只大鼠的空白血浆各100μL,按“2.3”项下条件操作,不加内标溶液,然后分别加入高、中、低浓度的对照品100μL,平行5份,分别进样10μL,按“1.2”项下条件测定,记峰面积记为A,用流动相配制相同浓度标准品及内标溶液直接进样,记峰面积为B,基质效应为A/B×100%,结果见表2。低、中、高3个浓度各物质基质效应在85%~115%之间,均不影响定量分析。

Table 2 Recoveries and matrix effects of the two compounds in rat plasma

Compd.	c/ (ng/mL)	Recovery		Matrix effect	
		Accuracy/%	Precision (RSD, %)	Accuracy/%	Precision (RSD, %)
L-Try	1.934×10	93.19	13.62	89.69	8.33
	1.934×10 ²	94.00	10.06	89.34	3.02
	1.934×10 ³	81.17	8.34	92.21	4.91
L-Kyn	1.994.6×10	96.68	12.76	86.31	10.18
	1.994.6×10 ²	88.53	5.54	92.71	7.19
	1.994.6×10 ³	103.78	4.35	92.12	6.99

2.6 动物实验

SPF级健康Wistar雄性幼鼠5只,体重100~120 g。分别取1mL Walker-256细胞悬液注入幼鼠腹腔内。1周后可见腹腔积液形成,抽取癌性腹水,800 r/min离心5 min,弃上清液,取下层黏稠细胞悬液于1mL无菌注射器中备用。

取健康雄性SPF级Wistar大鼠15只,体重180~220 g。适应环境1周后用3%水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧位捆绑,常规消毒、剃毛后,沿剑突下沿正中线切口1 cm,暴露左侧叶肝脏,用

1 mL无菌注射器针尖与肝脏成30°斜行刺入肝脏1 cm,注射癌细胞悬液0.2 mL,拔针后按压注射点至无渗血,确切止血后以灭菌注射用水冲洗腹腔,逐层关腹。在第0,2,4,6,8,10,12,14天所有动物通过眼底静脉丛取血0.5 mL,用于测定肝癌造模过程中大鼠血浆L-Try/L-Kyn的比值变化规律。

2.7 肝肿瘤成模过程中大鼠血浆L-Try和L-Kyn的变化规律

15只Wistar大鼠在肝肿瘤成模过程中大鼠血浆L-Try的浓度见图3-A,L-Kyn的浓度见图3-B,

L-Kyn/L-Try 的比值见图 3-C。肝癌成模过程中大鼠血浆中 L-Kyn 和 L-Try 浓度上升或下降无明显

规律,但 L-Kyn/L-Try 比值整体成下降趋势,随着时间的推移下降的趋势逐渐变缓。

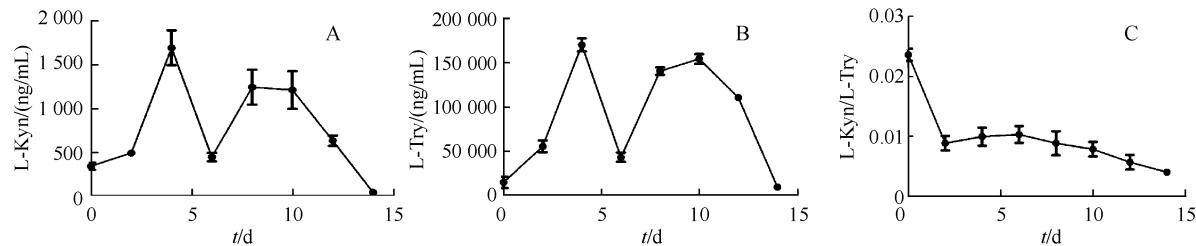


Figure 3 Concentration of L-Kyn (A), L-Try (B) and L-Kyn/L-Try ratio (C) during the generation process of liver tumor in rat plasma ($\bar{x} \pm s, n=15$)

3 讨 论

L-Try 和 L-Kyn 都是极性相差不大的小分子两性物质,在分离时,随流动相 pH 的不同而有不同程度的解离。当流动相在使用甲醇与乙腈为有机相时,均未得到良好的分离度。有研究指出在流动相中加入乙酸铵等挥发性物质时可改善分离度状况及解离状况^[8],但这样增加了条件摸索的复杂性以及加盐后对色谱柱的损伤,而本实验发现直接将醋酸铵缓冲盐加入到样品中,可直接改善分离度及峰形状况,在样品中加入 0.4 mmol/L 醋酸铵后,L-Try 和 L-Kyn 保留时间较适合且峰形良好。在选用流动相时对比不加甲酸的纯水做为流动相,峰形略有拖尾,在流动相中添加 0.1% 甲酸后能获得良好的峰形。

IDO 的高表达是导致肝癌免疫逃逸的一个重要机制,在肝癌的治疗中可能是一种良好的候选治疗靶点和预后指标^[9]。利用 LC-MS/MS 方法建立可同时检测 L-Try 和 L-Kyn 的高效快速检测法,观察血浆中内源性物质 L-Try 和 L-Kyn 在肝癌形成过程中的含量变化,来确定 IDO 酶活性 (K/T),以 IDO 为关键限速酶的犬尿酸代谢途径为研究对象,探讨药物在移植性肝癌形成过程中作用机制。研究结果证实,由图 3 可知肝癌成模过程中大鼠血浆中 L-Kyn 和 L-Try 浓度上升或下降无明显规律,但 L-Kyn/L-Try 比值下降,说明在此过程中 IDO 酶活性不断降低,L-Kyn/L-Try 比值的变化是肝癌形成过程中一个非常明显的变化,可为肝癌的诊断以及基础研究提供一个分析方法。

参 考 文 献

- [1] Yuzo S, Takafumi S, Kazuki F, et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer [J]. Lung Cancer, 2010, 67(3): 361–365.
- [2] Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells [J]. J Immunol, 2006, 176(11): 6752–6761.
- [3] Wang L, Hong DQ, Wang F, et al. Association of serum L-kynurenine with nutritional status and vascular stiffness in maintenance hemodialysis patients [J]. Chin J Nephrol (中华肾脏病杂志), 2011, 27(6): 411–415.
- [4] Yi YH, Zhao QH, Liao WP, et al. Determination of L-tryptophan and Its part of the metabolites by HPLC [J]. Acad J Guangzhou Med Coll (广州医学院学报), 1998, 26(5): 45.
- [5] Zhang X, Xie XQ, Liu TL, et al. Research progress on endogenous substance's determination methods and bioequivalence evaluation [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2011, 20(22): 2221–2228.
- [6] Zhu BJ. Quantitative study on endogenous carbohydrate and 5-hydroxytryptamine in rat plasma by HPLC-MS spectrometry (基于亲水液相色谱-串联质谱联用技术的大鼠血浆中内源性糖类和 5-羟色胺的定量方法学研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University (上海:上海交通大学), 2014.
- [7] Peng C, Wang M, Lyu MY, et al. Determination of bile acids, bilirubin and taurine in rat plasma by LC-MS/MS [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2013, 44(4): 343–347.
- [8] Jaroslav G, Alena M, Vojtech P, et al. Quantitative analysis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan and kynurenone in rat model for tauopathies by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117: 85–90.
- [9] Ke P, Hui W, Min-Shan C, et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(11): 1247–1253.