

柱前衍生化结合气质联用技术测定实验性高脂血症大鼠血浆中代谢标志物*

徐文杰

(广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院),广东省中医药研究开发重点实验室,广东 广州 510095)

[摘要] **目的:**建立柱前衍生化结合气质联用技术测定高脂血症大鼠血浆中内源性代谢物的分析方法,初步研究高脂血症大鼠血浆中内源性代谢标志物。**方法:**将SD大鼠随机分为正常对照组和模型组,采用高脂饲料喂养复制实验性高脂血症大鼠模型,眼眶取血,柱前衍生化,采用GC-MS建立分析测定方法并进行方法学考察,包括精密度、重现性、稳定性。对正常对照组与实验性高脂血症组两组大鼠的血浆样品进行检测,对潜在代谢标志物进行鉴定指认。**结果:**建立了基于GC-MS的实验性高脂血症血浆代谢组学分析方法,该方法精密度、重复性和稳定性试验的相对峰面积RSD值均小于10%。**结论:**该方法快速、准确、重复性好,可用于高脂血症大鼠血浆中代谢标志物的测定,该方法可为代谢组学在高脂血症的应用提供一定的参考。

[关键词] 气质联用技术;高脂血症;代谢组学;代谢标志物;大鼠

[中图分类号] R917 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 2097-3128(2024)01-0032-04

DOI: 10.19787/j.issn.2097-3128.2024.01.007

Determination of Metabolic Biomarkers in Plasma of Experimental Hyperlipidemia Rat Model by Pre-Column Derivatization Combined with GC-MS

XU Wen-jie

(Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital(Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research and Development, Guangdong Guangzhou, 510095)

Abstract Objective: By pre-column derivatization to establish a gas chromatography-mass spectrography method for determination of potential metabolic biomarkers, and was used to study the metabolic changes in the plasma of experimental hyperlipidemia rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into normal control group and experimental hyperlipidemia model group. The experimental hyperlipidemia rat model was reproduced by feeding with high-fat diet. Orbital blood was taken and pre column derivatization was performed. The analytical method was established by GC-MS and investigated for methodology, including precision, reproducibility and stability. The plasma samples of normal control group and experimental hyperlipidemia group were detected, and the potential metabolic markers were identified. **Results:** A metabonomic method based on GC-MS was established for the analysis of experimental hyperlipidemia plasma. The RSD of the relative peak areas in the precision, repeatability and stability tests of the method were less than 10%. **Conclusion:** The method is rapid, accurate, reproducible, and can be used for the determination of endogenous metabolites in plasma of rats with hyperlipidemia. The method can provide some reference for the application of metabonomics in hyperlipidemia.

Keywords GC-MS; hyperlipidemia model; metabonomics; metabolic biomarkers; rat

高脂血症是指脂质代谢异常或转运异常导致血浆中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)异于正常值而引起的代谢性疾病。高脂血症可导致冠心病、脑血管意外等多种重大疾病,已成为人类健康的一大威胁。因此,研究高脂血症发病机理并探索治疗靶点是防治该疾病的关键。代谢组学技术是通过考察机体受刺激或扰动前后其代谢标志物种类及含量动态变化而对生物体代谢途径进行研究的一种技术^[1]。近年来,代谢组学技术已被用于高脂血症的相关研究,为高脂血症的诊断和治疗提供了有效支持^[2-3]。本研究高脂乳剂喂养复制大鼠高脂血症模型,采用柱前衍生化方法联合气相色谱/质谱联用(GC-MS)技术对样品进行分析测定并开展方法学考察,对正常对照组与实验性高脂血症组两组大鼠

的血浆样品代谢标志物开展数据分析,自建对照品物质库,参考气质工作站的数据库对高脂血症的代谢标志物进行鉴定指认,建立大鼠高脂血症模型的血浆代谢组学研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器 HP6890GC/5973MS型气相色谱质谱联用仪(惠普公司,美国);JJ 3000型动物电子天平(G&C公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SANYO MDF-382型超低温冰箱(SANYO公司,日本);XW-80A型旋涡混合器(上海精科实业有限公司);3K30型低温高速离心机(Sigma公司,德国);HH-6数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司产品);十万分之一电子天平(Mettler TOLEDO公司,瑞士)。

1.2 试剂 缬氨酸、丝氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨

*基金项目:广东省自然科学基金自由申请项目(2017A030313628);广东省科技计划项目(2017A070701017)

作者简介:徐文杰(1983-),女,博士,副主任中药师,研究方向:中药新药开发研究。

酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸等均购自阿拉丁试剂公司。胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒均购自上海科欣生物技术研究所以;高密度脂蛋白胆固醇试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司;吡啶、无水硫酸钠、氯甲酸乙酯(ECF)、氢氧化钠、氯仿、无水乙醇、乙醇等均购自成都化夏化学试剂有限公司,均为分析纯。

1.3 动物 SPF级SD大鼠,雌雄各半,体重 $200\pm 20\text{g}$,动物许可证号为SCXK(粤)2013-0002,动物合格证号为44007200011927,购自广东省医学实验动物中心。动物实验环境:广东省中医研究所SPF级动物实验室,环境设施使用许可证号为SYXK(粤)2010-0059。所有大鼠均遵循实验动物伦理学要求饲养及实验操作。于室内保持12小时光照、12小时避光循环饲养,并控制室内相对湿度40%~50%,温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$,大鼠给予标准饲料和饮用水。

2 方法

2.1 大鼠高脂饲料配制 参照文献方法^[4]进行配制,大鼠高脂饲料组成:2%胆固醇,10%猪油,0.2%丙基硫氧嘧啶,87.8%基础饲料,由广东省医学实验动物中心加工配制。

2.2 实验性高脂血症大鼠模型的建立^[5-6] SPF级SD大鼠预先适应1周后开始实验。随机分为2组,分别为正常对照组和高脂血症模型组,每组10只,雌雄分笼饲养,每笼5只。正常对照组大鼠给予正常饲料,高脂血症模型组大鼠每天上午每笼给予高脂饲料200g,下午5时左右换成正常饲料100g,两组大鼠均自由饮水,连续造模4周。实验过程中观察大鼠行为学特征的变化。模型组大鼠于造模后的第4周末下午开始禁食不禁水12小时,第二天上午正常对照组与模型组大鼠均从眼眶后静脉丛采血1mL,2000rpm离心10min分离血清,分别按各试剂盒说明书测定各组大鼠血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C含量,

2.3 标本采集与预处理^[7-8] 模型组大鼠于造模后的第4周末下午开始禁食不禁水12小时,第二天上午正常对照组与模型组大鼠均从眼眶后静脉丛采血250 μL ,置于含有EDTA-2Na的试管中,于 4°C 低温

离心机中离心(3000 rpm,10min),取血浆置于含有EDTA-2Na的试管中,置于 -80°C 冰箱保存备用,用于代谢组学的分析,测定血浆样品中内源性小分子代谢物。

2.4 供试品溶液制备^[9] 血浆于 37°C 水浴快速解冻,精密吸取血浆100 μL 于EP管中,添加无水乙醇400 μL ,吡啶100 μL 和ECF50 μL ,静置1min,漩涡振荡1min,加入氯仿300 μL ,继续振荡30s,静置5min,置低温高速离心机中离心(3000rpm,5min),取出后加入100 μL $10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH,继续加入50 μL ECF,振荡30s,离心(3000rpm,10min),吸去上层水层,往氯仿层添加少量无水硫酸钠除去多余水分,氯仿层溶液用0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液,置 4°C 冰箱备用,待后续进行GC-MS分析。

2.5 GC-MS分析条件 色谱柱:DB-5MS Ultra Inert毛细管柱(30 m $\times$ 250 μm ,0.25 μm);无分流进样;流速为 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量为2 μL ;进样口温度设为 250°C ;采用升温程序模式: 70°C (2.0min), 70°C ~ 300°C 以 $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度进行线性升温, 300°C (2.0min);载气为氦气(纯度>99.999%)。质谱条件:电离方式EI;电子能量70eV;离子源温度 230°C ;电子倍增器电压1847V。扫描模式为全扫描,扫描范围为30-550 m/z。

2.6 代谢物的鉴定 自建对照品物质库及查询网站(http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php和<http://www.hmdb.ca/>),并运用气质工作站的数据库(WILEY 275.L及NIST05.L),对内源性生物标志物进行鉴定,选择匹配度较高的内源性生物标志物作为鉴定结果,部分物质通过标准品进一步鉴定。

2.7 统计方法 计量资料以均值加减标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均值比较采用两独立样本t/t'检验。由SPSS 19.0软件进行数据处理。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

3 结果

3.1 高脂血症大鼠模型生化指标的测定 由表1可知,与正常对照组相比,高脂血症模型组大鼠血清TC、TG、LDL-c含量均显著升高($P<0.01$),HDL-c含量显著降低($P<0.01$),说明造模成功。

表1 各组大鼠TC、TG、HDL-c、LDL-c的含量($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	TC/mmol/L	TG/mmol/L	HDL-c/mmol/L	LDL-c/mmol/L
正常对照组	1.7 ± 0.20	1.0 ± 0.11	1.4 ± 0.29	0.72 ± 0.11
模型对照组	$5.2\pm 0.65^{(1)}$	$2.9\pm 0.36^{(1)}$	$0.7\pm 0.10^{(1)}$	$2.13\pm 0.28^{(1)}$

注:与对照组相比,① $P<0.05$,① $P<0.01$

3.2 GC-MS法对样品进行分析测定

3.2.1 方法学考察

3.2.1.1 精密度试验 取同一份血浆样品溶液,按照

2.4项下方法操作制备供试品溶液,按照2.5项下测定方法连续测定6次,记录峰面积并作归一化处理,选取若干丰度较大的代谢物为考察对象,计算各峰

的相对峰面积(A),计算相对标准偏差(RSD)。结果显示,所考察的相对峰面积 RSD(n=6)均小于10%,该方法精密度尚可。见表2。

表2 精密度试验结果

标志物	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A 平均值	RSD(%)
缬氨酸	0.0812	0.0852	0.0738	0.0743	0.0749	0.0811	0.0784	6.02
丝氨酸	0.2013	0.1999	0.2183	0.2421	0.2138	0.2132	0.2148	7.11
亮氨酸	0.9786	0.9625	0.9775	1.0422	1.0315	0.9568	0.9915	3.66
蛋氨酸	0.1847	0.1925	0.1695	0.1817	0.1698	0.1827	0.1802	4.98
苯丙氨酸	4.1476	4.2475	4.3524	4.0872	4.4859	3.8986	4.2032	4.92
异亮氨酸	1.4671	1.2812	1.2904	1.3775	1.4086	1.2501	1.3458	6.31
酪氨酸	0.7969	0.7575	0.7735	0.7194	0.7336	0.7041	0.7475	4.67
色氨酸	0.9125	0.9267	1.1045	1.0053	0.9975	0.9564	0.9838	7.09

3.2.1.2 重复性试验 取同一份血浆样品溶液,按照2.4项下方法制备供试品溶液,平行操作6份,按照2.5项下测定方法进样,记录峰面积并作归一化处理,选取若干丰度较大的代谢物为考察对象,计算各峰的相对峰面积(A),计算相对标准偏差(RSD)。结果显示,所考察的相对峰面积 RSD(n=6)均小于10%,表明该制备方法可靠。见表3。

表3 重复性试验结果

标志物	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A 平均值	RSD(%)
缬氨酸	0.0721	0.0835	0.0783	0.0734	0.0849	0.0808	0.0788	6.65
丝氨酸	0.1993	0.2001	0.2318	0.2214	0.1938	0.2231	0.2116	7.43
亮氨酸	0.9821	0.9752	1.0057	1.0056	1.0123	0.9869	0.9946	1.52
蛋氨酸	0.1784	0.1852	0.1650	0.1817	0.1546	0.2022	0.1779	9.30
苯丙氨酸	4.0041	4.5243	4.4884	3.9894	4.8592	4.1928	4.3430	7.86
异亮氨酸	1.3264	1.2819	1.4902	1.5177	1.3478	1.6010	1.4275	8.86
酪氨酸	0.7798	0.7394	0.7662	0.7486	0.7703	0.7086	0.7522	3.45
色氨酸	0.9722	0.9828	1.0021	1.1213	0.9339	0.9775	0.9983	6.44

3.2.1.3 稳定性试验 按照2.4项下方法操作制备供试品溶液,取同一份供试品溶液分别在0、4、8、12、16、20、24小时按照2.5项下测定方法进样,记录峰面积并作归一化处理,选取若干丰度较大的代谢物为考察对象,计算其相对峰面积(A)及考察一致性,计算相对标准偏差(RSD)。结果显示所考察的相对峰面积RSD均小于10%,表明供试品溶液在24小时内稳定性良好。见表4。

表4 稳定性试验结果

标志物	归一化峰面积							A 平均值	RSD(%)
	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h		
缬氨酸	0.0767	0.0844	0.0761	0.0739	0.0799	0.0809	0.0786	0.0786	4.42
丝氨酸	0.2003	0.2016	0.2251	0.2318	0.2038	0.2182	0.2135	0.2135	5.74
亮氨酸	0.9804	0.9689	0.9916	1.0239	1.0219	0.9719	0.9931	0.9931	2.24
蛋氨酸	0.1816	0.1889	0.1673	0.1817	0.1622	0.1925	0.1790	0.1790	6.09
苯丙氨酸	4.0759	4.3859	4.4204	4.0383	4.6723	4.0457	4.2731	4.2731	5.57
异亮氨酸	1.3968	1.2816	1.3903	1.4476	1.3782	1.4256	1.3867	1.3867	3.78
酪氨酸	0.7884	0.7485	0.7699	0.7340	0.7515	0.7064	0.7498	0.7498	3.46
色氨酸	0.9424	0.9548	1.0533	1.0633	0.9657	0.9669	0.9911	0.9911	4.87

3.2.2 高脂血症模型大鼠血浆中代谢标志物的变化 取正常对照组与高脂血症模型组样品分别按照2.4项下方法制备供试品溶液,按照2.5项下测定方法进样,正常对照组大鼠血浆GC-MS总离子流图如图1,高脂血症大鼠血浆GC-MS总离子流图如图2所示。根据直观分析,正常对照组与模型组代谢物谱明显不同。对空白组、模型组的尿液代谢轮廓进行分析,对其特征抽提及模式识别,鉴定出8种氨基酸类内源性生物标志物,与正常对照组比较,模型组中丝氨酸、酪氨酸、色氨酸显著性升高($P<0.05$),缬氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸显著性降低($P<0.05$),亮

氨酸无显著性差异($P>0.05$)。见表5。

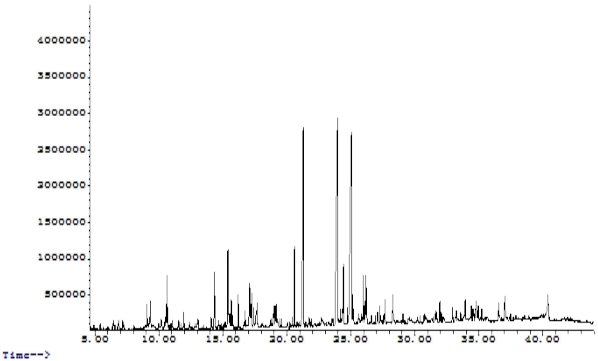


图1 正常对照组大鼠血浆代谢物GC-MS总离子流图

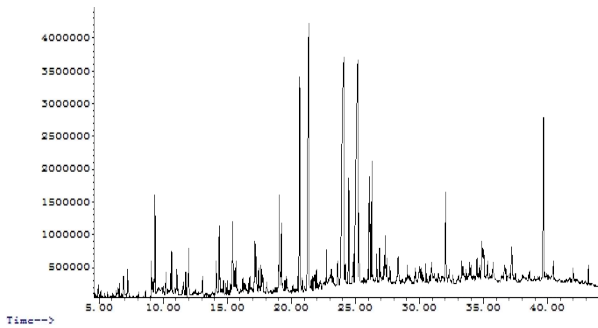


图2 实验性高脂血症大鼠血浆代谢物GC-MS总离子流图

表5 高脂血症模型大鼠血浆中代谢标志物的

变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

标志物	正常对照组	模型组
缬氨酸	0.354±0.047	0.072±0.008 ⁽¹⁾
丝氨酸	0.199±0.086	0.501±0.174 ⁽¹⁾
亮氨酸	0.821±0.033	1.075±0.197
蛋氨酸	0.178±0.072	0.052±0.002 ⁽¹⁾
苯丙氨酸	18.34±1.976	4.004±1.025 ⁽¹⁾
异亮氨酸	1.326±0.213	0.317±0.101 ⁽¹⁾
酪氨酸	0.075±0.014	0.739±0.076 ⁽¹⁾
色氨酸	0.124±0.023	0.983±0.097 ⁽¹⁾

注:与对照组相比,① $P<0.05$, (1) $P<0.01$

4 讨论

近年来,气相色谱/质谱联用技术(GC-MS)具有灵敏度好、费用低、色谱性能较好等优点,已被广泛应用于植物代谢组学、微生物和临床代谢组学研究^[10],加上其庞大化合物谱图库为鉴定工作带来了很大的便利,能提供定量和定性的信息,在代谢组学研究中显示出突出的优势。

代谢组学研究的对象主要是动物体液中的代谢物,如血液、尿液中的糖类,氨基酸,脂肪酸,甾体类物质,胺类^[11-12],而体液中干扰分析的主要成分是蛋白质^[7],其存在会对色谱柱和检测器造成损害而且会增大检测误差,所以往往不能直接进样分析,因而需进行适当的化学处理将其转化成相应的挥发性衍生物,使其适用于气相色谱进行分离分析。样品提取是GS/MS代谢组学研究的关键步骤,生物样本中代谢组种类和数量繁多,理化性质悬殊,浓度差异巨大,动物体液中的代谢物共同特征是极性高,挥发性低,兼顾不同性质的化合物,从体液中提取内源性小分子代谢物具有一定困难。因此提取方法要尽可能多地提取出生物样本中的内源性小分子代谢物,使样品中完整的代谢物组分信息得以保留和体现。为了尽可能多地检测到这些物质,同时保持样品前处理过程简单准确。

根据文献^[8]报道,甲醇(或乙腈)沉降法和离心沉降法是去除蛋白质的常用方法。预试验过程中比较了两种处理方法的除杂效果,某些特定物质在有机溶剂中的溶解度不高,因此经甲醇(或乙醇)处理

的样品在质谱上得到的信息有所减少,故不采用此方法进行蛋白质去除。本研究最终确定了先对血样进行离心沉降,然后进行柱前衍生化,经过一系列适当的化学处理的办法去除杂质。此方法将这些极性高,挥发性低的物质转化成相应的挥发性衍生物,使生物样品中结构极其近似的化合物更易被区分。该衍生化试剂与酚、胺的衍生反应可以直接在水相中进行,衍生产物是碳酸酯和氨基甲酸酯,衍生产物色谱性能优良^[13]。采用此方法的前处理步骤较为简单,该方法最大的优点是不需要将血液蒸干到无水状是,大大降低了前处理的时间和难度。

通过方法学研究,本研究建立柱前衍生化结合气质联用技术测定实验性高脂血症大鼠血浆中代谢标志物的方法,重复性好、精密度高,适用于快速的高通量检测。采用该方法对血样溶液进行测定,峰分离度、分辨率以及峰形都具有较好的结果。

本研究以代谢组学为研究方法,初步研究了高脂血症建模前后大鼠体内源性生物标志物的代谢变化。正常对照组与高脂血症模型组之间丝氨酸、酪氨酸、色氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸水平有显著差异,结果表明高脂血症模型大鼠存在氨基酸代谢的紊乱。在下一步工作中将对高脂血症代谢物的综合检测进行更全面、更深入的研究。

参考文献

- [1] 陈华,苗华,田婷,等.代谢组学技术在实验性高脂血症研究中的应用[J].药物分析杂志,2014,34(4):563-569.
- [2] 罗荣生,李坤平,朴胜华,等.高脂血症大鼠造模过程中血液代谢组学研究[J].中药新药与临床药理,2016,27(1):70-74.
- [3] 罗荣生,李坤平,朴胜华,等.高脂血症大鼠病程进展的尿液代谢组学研究[J].广东药学院学报,2016,32(2):223-227.
- [4] 陈奇.高脂血症的中药药效研究思路与方法.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005,1:638.
- [5] 王俊,孙雅利,房燕娜,等.实验性高脂血症大鼠模型的建立和评价[J].皖南医学院学报,2019,38(4):317-319.
- [6] 胡慧明,朱彦陈,朱巧巧,等.实验性高脂血症动物模型比较分析[J].中国中药杂志,2016,41(20):3709-3714.
- [7] 熊喜悦,盛小奇,王华,等.代谢组学气相色谱-质谱分析方法中样品衍生化技术的新进展[J].化学通报,2015,78(7):602-607.
- [8] 邹忠杰,梁生旺,袁经权,等.中药代谢组学研究中生物样品前处理方法[J].广东药学院学报,2010,26(4):434-437.
- [9] 谢国祥.基于几种色谱分析方法的生物样本的代谢组学研究[D].上海:上海交通大学,2006:46.
- [10] 辜雪琴,范国荣,陆峰,等.气相色谱-质谱代谢组学研究关键技术及典型应用[J].中国医药工业杂志,2015,46(1):68-73.
- [11] 赵丹,徐建良,肖明中.代谢组学在中医药研究中的应用[J].亚太传统医药,2021,17(8):206-209.
- [12] 赵利,钟建宾,郭捷,等.基于代谢组学技术的植物抗病相关代谢物研究进展[J].西北植物学报,2021,41(6):1071-1078.
- [13] 蔡品品,卢红梅.气相色谱-质谱分析血清代谢组前处理中的除蛋白及衍生方法[J].分析化学,2013,41(8):1183-1187.

(收稿日期:2022-06-21)