

## 高效液相色谱-质谱联用定量检测人血清 5 个溶血磷脂酰胆碱的浓度\*

张磊<sup>1,2</sup>, 武玉晶<sup>2</sup>, 范志娟<sup>2</sup>, 康华<sup>2</sup>, 王宇凡<sup>2</sup>, 刘树业<sup>2\*\*</sup>, 单忠强<sup>1\*\*</sup>

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 天津市第三中心医院检验科, 天津市人工细胞重点实验室, 卫生部人工细胞工程技术研究中心, 天津 300170)

**摘要 目的:** 利用代谢组学代谢靶标分析技术, 建立一种定量检测人血清中溶血磷脂酰胆碱(LPC)类物质的方法。**方法:** 以高效液相色谱与串联质谱联用(HPLC-MS/MS)分析平台, 利血平为内标物, 构建定量检测 LPC 14:0、LPC 15:0、LPC 16:0、LPC 17:0 和 LPC 18:0 系列物质的检测方法。绘制每种目标 LPC 对应的标准曲线, 分析其相关系数  $r$  值, 并进一步评估检测平台的灵敏度检测下限(LOD)和线性范围。通过加样回收试验验证检测平台的准确度(加样回收率)和精密度(RSD), 并进一步分析该平台在检测人血清标本的适用性。在此基础上, 利用该 HPLC-MS/MS 平台分析了 LPC 14:0~LPC 18:0 5 个 LPCs 在乙肝相关性肝细胞肝癌(HBV-HCC)患者血清中的浓度。**结果:** 本研究建立了基于 HPLC-MS/MS 的 LPC 检测平台, 该平台检测稳定性和准确性较高。LPC 14:0~LPC 18:0 5 个物质的检测下限分别是 0.027、0.120、0.320、0.059、0.072  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 标准曲线方程分别为  $Y=0.725X-0.00264$ 、 $Y=0.212X-0.0256$ 、 $Y=1.22X+1.84$ 、 $Y=0.861X-0.0155$  和  $Y=0.813X+0.558$ , 相关系数分别为 0.9976、0.9992、0.9927、0.9980 和 0.9943, 测量结果准确度和精密度均控制在 85%~115% 范围内。利用 HPLC-MS/MS 平台测定的 5 个 LPC 类物质, 对不同巴塞罗那期 HBV-HCC 患者具备一定的鉴别能力。**结论:** 本研究利用 HPLC-MS/MS 分析平台, 成功建立了一个稳定、灵敏而可靠的定量检测人血清中 LPC 14:0~LPC 18:0 5 个目标 LPC 类物质的检测方法, 适合临床推广。

**关键词:** 代谢组学; 液相色谱-质谱联用; 溶血磷脂酰胆碱(LPC); 内标法; 乙肝相关性肝细胞肝癌(HBV-HCC)

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2019)02-0272-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.02.12

## Quantitative detection of five types of lysophosphatidylcholine substances in human serum by HPLC-MS/MS\*

ZHANG Lei<sup>1,2</sup>, WU Yu-jing<sup>2</sup>, FAN Zhi-juan<sup>2</sup>, KANG Hua<sup>2</sup>,  
WANG Yu-fan<sup>2</sup>, LIU Shu-ye<sup>2\*\*</sup>, SHAN Zhong-qiang<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Inspection, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin Artificial Cell Key Laboratory, Ministry of Health Artificial Cell Engineering Technology Research Center, Tianjin 300170, China)

**Abstract Objective:** To establish a quantitative detection platform for the identification of lysophosphatidylcholine (LPC) substances in human serum by using targeted metabolomics techniques. **Methods:** The

\* 天津市自然科学基金(青年项目)《慢性噬肝性病毒相关原发肝癌个性化诊疗代谢标志物研究》(No. 16JCQNJC11600)

\*\* 通信作者 刘树业 Tel: 15522242777; E-mail: lshye@163.com

单忠强 Tel: 13612032260; E-mail: 18622431776@163.com

第一作者 Tel: 13752068733; E-mail: rikkichang12345@163.com



analytical platform was developed based on a high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), which using reserpine as the internal standard to quantitatively detect LPC substances, including LPC 14 : 0, LPC 15 : 0, LPC 16 : 0, LPC 17 : 0 and LPC 18 : 0. The standard curve of each LPC was plotted and the linear correlation coefficient was analyzed. The limits of detection (LODs) and the linearity were evaluated. The accuracy (spiked recovery rate) and precision (RSD) of the detection platform were verified by spiked recovery experiments. The applicability of HPLC–MS/MS platform in human serum was analyzed, as well. In addition, the concentrations of five types of LPCs (LPC 14 : 0–LPC 18 : 0) in patients with hepatitis B–related hepatocellular carcinoma (HBV–HCC) were validated by the current HPLC–MS/MS platform. **Results:** A LPC detection platform based on HPLC–MS/MS was established, which had high stability and accuracy. The LODs of the five substances LPC 14 : 0 to LPC 18 : 0 were 0.027, 0.120, 0.320, 0.059 and 0.072  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The standard curves were:  $Y=0.725X-0.00264$ ,  $Y=0.212X-0.0256$ ,  $Y=1.22X+1.84$ ,  $Y=0.861X-0.0155$  and  $Y=0.813X+0.558$ , respectively. The correlation coefficients were 0.9976, 0.9992, 0.9927, 0.9980 and 0.9943, respectively. In the meantime, the accuracy and precision of the measurement were controlled within the range of 85%–115%. The five types of LPCs determined by HPLC–MS/MS platform could be applied to differentiate HBV–HCC patients with different stages of Barcelona. **Conclusions:** In the study, a stable, sensitive and reliable quantitative detection platform was successfully established based on HPLC–MS/MS. The platform can quantitatively detect five types of target LPCs (LPC 14 : 0 to LPC 18 : 0) in human serum, which is suitable for promotion in the clinical study.

**Keywords:** metabolomics; liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS); lysophosphatidylcholine (LPC); internal standard method; hepatitis B–related hepatocellular carcinoma (HBV–HCC)

代谢组学技术包括色谱技术、质谱技术和磁共振技术等多种技术手段, 鉴于其具有检测速度快, 仪器自动化高, 高通量, 检测质量能够控制和重复性良好等优点, 代谢组学引起越来越多的科研工作者的重视, 已经在临床得到一定应用<sup>[1]</sup>。目前, 已有大量研究试图用代谢组学技术探讨在肝硬化及肝癌等重大肝脏疾病发生发展过程中代谢标志物的变化<sup>[2-3]</sup>, 并应用于临床标本进行验证<sup>[4]</sup>。溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC), 又称溶血卵磷脂, 是广泛存在于人体细胞内外的一种具有强溶血作用的磷脂类物质, 然而其在体内的作用机制目前尚不明确。代谢组学技术是检测 LPC 类物质最常用的手段, 但常常受到多种因素的影响, 各研究即便采用相同的对照疾病组, 结果也存在一定的差异。有研究表明, 患者体内 LPC 含量会显著增高<sup>[5]</sup>, 也有研究表明 LPC 类物质受肝脏功能的影响, 患者血液中浓度较少甚至消失<sup>[6]</sup>。另外, 有研究表明, 2 种或以上技术手段检测血液中的 LPC 类物质明显优于单一检测方法<sup>[7]</sup>。

本研究在前期实验基础上, 通过靶向代谢组学

的液相色谱–串联质谱 (LC–MS/MS) 联合, 建立定量检测与肝硬化及肝癌等肝脏重大疾病诊断相关的 5 个饱和 LPC 类物质 (包括 LPC 14 : 0、LPC 15 : 0、LPC 16 : 0、LPC 17 : 0 和 LPC 18 : 0) 方法, 以期代谢组学技术手段在临床上疾病的筛选或诊断提供重要的支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

人血清标本由天津市第三中心医院提供, 均为在清晨空腹下抽取, 离心取血清后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存, 分析前室温下解冻。甲酸和甲酸铵 (Mreda 公司生产, 纯度均是 HPLC 级), 甲醇 (Honeywell 公司生产, 纯度为 LC–MS 级), 2, 6–二叔丁基对甲酚 (BHT, 威企业有限公司, 优级纯), Durashell  $\text{C}_{18}$  (L) 色谱柱 (孔径  $150\text{ }\text{\AA}$ , 粒径约  $5\text{ }\mu\text{m}$ , 大小为  $3.0\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ )、Cleanert PPT 96 孔蛋白沉淀板 (货号 96CD2025Q)、Cleanert M96 生物样品前处理仪、Cleanert<sup>®</sup> V96 样品氮吹浓缩仪和 96 孔收集板均购自天津博纳艾杰尔科技有限公司。质谱仪为 Applied biosystems 公司下属

的 AB/SCIEX 生产部门制造的 API 4000+, 质谱仪中使用 TurboV 离子源、三重四极杆 (Triple quadruple) 作为串联质谱的质量分析装置。实验中使用的其他试剂: LPC 14 : 0、LPC 15 : 0、LPC 16 : 0、LPC 17 : 0 和 LPC 18 : 0 的标准品均购自美国 Avanti 公司, 纯度为 100%。内标物质利血平由 Sigma 公司生产提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 HPLC-MS/MS 方法学建立

人血清样本中含有大量的蛋白质, 影响 LPC 类物质的定量检测, 所以需要对样本进行预处理除去干扰蛋白质。主要步骤如下: 1) 为保护人血中溶血磷脂酰胆碱, 试验中使用的甲醇均含有 0.1% 的 BHT。0.1% 的 BHT 甲醇溶液配制方法: 70 mL 甲醇溶液加入 BHT 70 mg, 充分涡旋使 BHT 完全溶解。2) 样本去除蛋白前的预处理过程: 标准曲线及质控样本的配制方法是取 100  $\mu\text{L}$  生理盐水与 25  $\mu\text{L}$  标准工作液 (或质控品) 混合, 充分涡旋均匀即可; 对于临床样本而言则每 1 份临床样本取 100  $\mu\text{L}$  血清样品至 EP 管内, 再加入甲醇 25  $\mu\text{L}$ , 充分涡旋均匀即可备用。3) 先向 Cleanert PPT 96 孔蛋白沉淀板中加入甲醇 (含 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  利血平) 150  $\mu\text{L}$ , 再加入上述预处理混合的待测样本 25  $\mu\text{L}$ , 使用 96 孔板振荡器于 600  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  涡旋 5 min, 混合均匀后静置 10 min, 最后使用 Cleanert M96 生物样品前处理仪将去蛋白后的溶液收集到洁净的收集板中备用。4) 将收集板里的溶液在 Cleanert<sup>®</sup> V96 样品氮吹浓缩仪中用氮气吹干, 温度设定为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。吹干后标本再于 1 mL 80% 甲醇水溶液中复溶, 涡旋器上混合均匀后即可上机进行测试。上机测试过程中, HPLC 流动相参数见表 1, 流速均设定为 800  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温固定在 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量设定为 5  $\mu\text{L}$ 。经 HPLC 分离后的样本进入质谱仪进行鉴定和定量分析, 质谱仪的参数设置见表 2。质谱检测条件如下: 碰撞气 CAD 41.37 kPa, 气帘气 CUR 137.9 kPa, 雾化气 GS1 137.9 kPa, 辅助加热气 GS2 344.75 kPa, 喷雾电压 5.5 kV。离子化温度 600  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2.2 HPLC-MS/MS 方法学验证

由于难以获得完全不含 5 个待测 LPC 类物质的基质, 本研究采用 0.9% 的生理盐水代替人血清进行方法学评估和性能验证。将 20  $\mu\text{L}$  生理盐水加入 5  $\mu\text{L}$  的标准工作液作为待检测样本进行去蛋白处理, 并按照上述参数设定 HPLC 和 MS 的条件后上机检测。

表 1 HPLC 的流动相条件

Tab. 1 Mobile phase conditions of HPLC

时间 (time) / min	流动相 (mobile phase) A: 0.1% 甲酸-25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵 (0.1% formic acid-25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium formate) /%	流动相 (mobile phase) B: 0.1% 甲酸-甲醇 (mobile phase B: 0.1% formic acid-methanol) /%
0	70	30
0.5	50	50
1	0	100
4	0	100
4.1	70	30
5	STOP	

表 2 质谱条件参数信息

Tab. 2 MS parameter information

目标物 (target)	$t_{\text{R}}$ / min	母离子 (parent ion) Q1 $m/z$	子离子 (daughter ion) Q3 $m/z$	DP/V	CE/V
利血平 (reserpine)	2	609.3	448.2	140	40
		609.3	195 <sup>*</sup>	120	45
LPC 14 : 0	2.46	468.4	285.3	110	40
		468.4	450.4 <sup>*</sup>	120	27
LPC 15 : 0	2.54	482.3	299.5	120	36
		482.3	464.2 <sup>*</sup>	120	28
LPC 16 : 0	2.63	496.4	478.2 <sup>*</sup>	124	16
LPC 17 : 0	2.72	510.4	327.2	120	30
		510.4	492.4 <sup>*</sup>	120	20
LPC 18 : 0	2.83	524.5	341.5	115	28
		524.5	506.2 <sup>*</sup>	127	18

注 (note): 定量离子对 (quantification ion pair)

HPLC-MS/MS 实验平台线性范围和灵敏度的评估, 称取 LPC 14 : 0、LPC 15 : 0、LPC 16 : 0、LPC 17 : 0 和 LPC 18 : 0 的标准品分别为 1.875、3.750、56.250、5.625 和 37.500 mg, 溶解于 5 mL 甲醇溶液中, 取 5  $\mu\text{L}$  移至 20  $\mu\text{L}$  甲醇溶液中, 即制成表 3 中 S7 浓度的样本。用 S7 样本倍比稀释成 S1-S6 梯度浓度的样本, 用于标准曲线确定和线性关系验证。将 S1 浓度水平样本稀释至更低浓度梯度上机检测, 测定信噪比 (S/N), 直至 S/N 为 10 : 1。再平行处理 5 个样本, 满足精密度 (RSD) 小于 20%, 则此时的样本浓度即为仪器的检测下限 (LOD)。

为验证本 HPLC-MS/MS 实验平台精密度和准确度, 以生理盐水为基质, 配制出 S3 和 S5 2 个浓度水平的标准样本, S3 为低加样浓度, S5 为高加样浓度。对 S3 和 S5 2 个浓度水平的标准样本, 分别进行 8 个样本的平行试验。根据实测值和配制溶液的加样浓度, 计算平均值  $\bar{x}$  及标准差 SD、加样回收率和精密度 (RSD)。

表 3 标准曲线样品配制浓度

Tab. 3 Concentrations of samples for standard curve					
浓度水平 (concentration level)	LPC 14 : 0	LPC 15 : 0	LPC 16 : 0	LPC 17 : 0	LPC 18 : 0
S1	0.125	0.25	3.75	0.375	2.50
S2	0.25	0.50	7.50	0.75	5.00
S3	0.50	1.00	15.00	1.50	10.00
S4	1.25	2.50	37.50	3.75	25.00
S5	2.50	5.00	75.00	7.50	50.00
S6	3.75	7.50	112.50	11.25	75.00
S7	7.50	15.00	225.00	22.50	150.00

为验证本 HPLC-MS/MS 实验平台对人血清样本的适用性,以人血清代替生理盐水配制成 S3 和 S5 2 个浓度梯度的加标准品的“加样血清”,进行加标回收率的检测。按照上述同样的步骤和设置,测定加标血清中 LPC 14 : 0~LPC 18 : 0 5 个 LPC 类物质的含量,记为加样血清浓度。在此基础上,验证了 HPLC-MS/MS 实验平台在乙肝相关性肝细胞肝癌 (HBV-HCC) 患者血清的适用性。

### 1.3 统计学方法

HPLC-MS/MS 平台标准曲线是由工作站软件

Analyst® 自动处理给出,其主要原理是根据检测的 S1~S7 系列浓度和相应的峰面积,绘制标准浓度 / 内标物浓度 - 标准浓度面积 / 内标物面积的曲线,并计算曲线方程和相关系数  $r$ 。以生理盐水为基质的加样回收率计算公式<sup>[8]</sup>: 加样回收率 = (加样实测浓度 / 加样浓度) × 100%; 精密度 RSD = 标准差 SD / 平均值  $\bar{x}$ 。以人血清为基质的加样回收率计算公式: 回收率 = (加样血清浓度 - 人血清平均浓度) / 加样浓度 × 100%。利用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,分析不同巴塞罗那分期亚组 HBV-HCC 患者血清中 5 个 LPC 类物质水平。  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 均被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPLC-MS/MS 平台灵敏度和线性结果

用检测下限 (LOD) 值表示本 HPLC-MS/MS 技术平台的灵敏度,直接记录检测结果  $S/N=10:1$  时的样品浓度,即为 LOD 值。经检验, LPC 14 : 0、LPC 15 : 0、LPC 16 : 0、LPC 17 : 0 和 LPC 18 : 0 的 LOD 值分别为 0.027、0.12、0.32、0.059 和 0.072  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。相邻 2 个峰的分离良好, S2 浓度水平溶液的检测结果如图 1 所示。

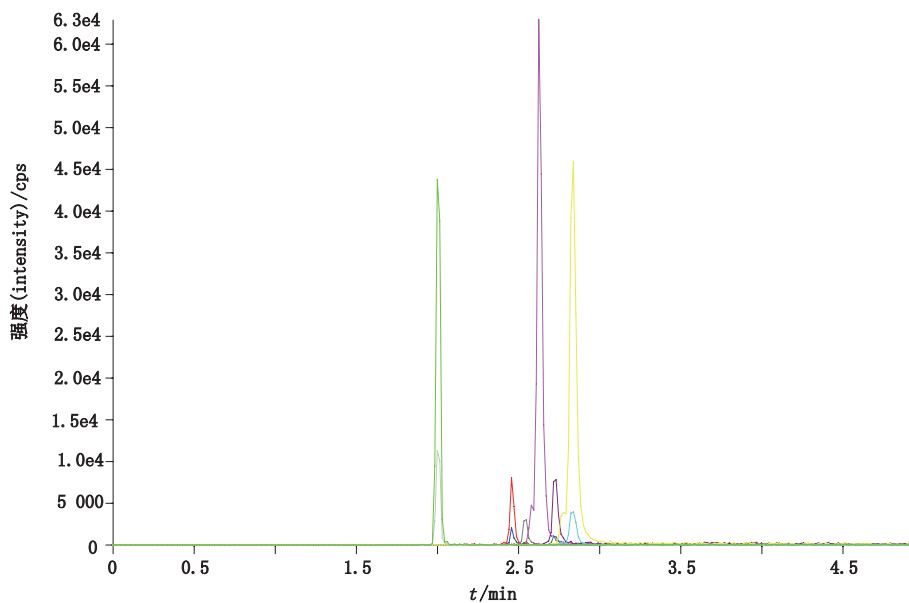


图 1 S2 浓度标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution at S2 concentration

根据表 3 配制上机的不同浓度梯度溶液,分析图谱中峰面积绘制标准曲线。线性范围的评估过程中, S1~S7 共计 7 个系列浓度均在线性范围内,但是更高浓度的 LPC 16 : 0 和 LPC 18 : 0 检测显示其线

性程度变差(数据未显示),故而认为 LPC 14 : 0~LPC 18 : 0 5 个物质在该平台检测的线性范围即 S1~S7 浓度范围。在该范围内的检测结果可信,超出范围的检测结果不可信。LPC 14 : 0~LPC 18 : 0 5 个物质的回



归方程如下:

$$Y=0.725X-0.00264 \quad r=0.9976$$

$$Y=0.212X-0.0256 \quad r=0.9992$$

$$Y=1.22X+1.84 \quad r=0.9927$$

$$Y=0.861X-0.0155 \quad r=0.9980$$

$$Y=0.813X+0.558 \quad r=0.9943$$

## 2.2 HPLC-MS/MS 平台准确度、精密度的评估

以生理盐水为基质,进行加样回收试验,验证

HPLC-MS/MS 平台精密度和准确度(表4)。结果 S3 低加样浓度、S5 高加样浓度水平上 LPC 14:0~LPC 18:0 加样回收率均在 85%~115% 范围内。LPC 14:0~LPC 18:0 在 S3 水平的精密度 RSD 分别为 6.3%、6.4%、8.5%、7.1% 和 7.0%; LPC 14:0~LPC 18:0 在 S5 浓度的 RSD 结果分别为 11.3%、12.1%、12.3%、12.0% 和 11.3%。5 个 LPC 类物质的 RSD 检测结果均小于 15%。

表 4 加样回收试验评估 HPLC-MS/MS 平台准确度、精密度

Tab. 4 Precision and accuracy assessment of HPLC-MS/MS platform by spiked recovery experiments

浓度水平 (concentration level)	目标物 (target)	加样值 (spiked concentration) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	实测值-1 (actual concentration-1) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率-1 (recovery-1)/%	实测值-2 (actual concentration-2) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率-2 (recovery-2)/%	RSD/%
S3	C14:0	1.25	1.29	103.2	1.43	114.4	6.3
	C15:0	2.50	2.28	91.2	2.85	114.0	6.4
	C16:0	37.50	38.10	101.6	43.00	114.7	8.5
	C17:0	3.75	3.31	88.3	4.09	109.1	7.1
	C18:0	25.00	24.30	97.2	28.10	112.4	7.0
S5	C14:0	3.75	3.44	91.7	3.35	89.3	11.3
	C15:0	7.50	6.77	90.3	6.53	87.1	12.1
	C16:0	113.00	102.00	90.3	103.00	91.2	12.3
	C17:0	11.30	9.83	87.0	9.94	88.0	12.0
	C18:0	75.00	69.90	93.2	69.00	92.0	11.3

## 2.3 HPLC-MS/MS 平台对血清样本的适用性

以人血清为基质,进行加样回收试验,明确 HPLC-MS/MS 平台在人血清中应用的适用性(表5)。2 份人血清样本 LPC 14:0~LPC 18:0 质量浓度分别为 0.83、2.46、107.00、2.92、47.30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  以及 0.68、2.21、92.00、2.45、39.40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。加样血清样本 LPC

14:0~LPC 18:0 的浓度明显高于灵敏度和线性范围的 LOD 值,且都处于线性验证试验范围内,结果可信。S3 低加样浓度、S5 高加样浓度血清加样回收率均落在 85%~115% 范围内,与以生理盐水为基质的加样回收率差异不显著。HPLC-MS/MS 平台对血清样本也有良好的适用性,人血清对该 HPLC-MS/MS 平台影响不大。

表 5 HPLC-MS/MS 平台对血清样本的适用性分析

Tab. 5 Applicability evaluation of HPLC-MS/MS platform for human serum samples

浓度水平 (concentration level)	目标物 (target)	加标值 (spiked concentration) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	实测值-1 (actual concentration-1) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率-1 (recovery-1)/%	实测值-2 (actual concentration-2) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率-2 (recovery-2)/%
S3	C14:0	1.25	1.97	97.4	2.17	113.4
	C15:0	2.50	4.50	86.6	4.99	106.2
	C16:0	37.50	140.00	108.0	136.00	97.3
	C17:0	3.75	6.24	94.8	6.67	106.3
	C18:0	25.00	72.00	114.6	70.00	106.6
S5	C14:0	3.75	4.80	107.9	4.72	105.3
	C15:0	7.50	9.46	95.0	9.69	98.1
	C16:0	113.00	196.00	85.4	216.00	103.1
	C17:0	11.30	13.80	98.4	14.80	107.2
	C18:0	75.00	113.00	92.9	122.00	104.9

2.4 HPLC-MS/MS 平台分析 5 个 LPC 类物质在 HBV-HCC 患者血清中的浓度

此外,本研究利用 HPLC-MS/MS 平台分析了 82 例 HBV-HCC 患者血清中 5 个 LPC 类物质水平(表 6)。根据巴塞罗那分期,所有患者被分为 4 组:单个肿瘤(A1 期、A2 期和 A3 期)患者为 BCLC-I 组( $n=27$ );多个肿瘤,肿瘤直径  $<3$  cm 者(A4 期)患者为 BCLC-II 组( $n=16$ );将多个肿瘤,肿瘤体积较大,肝

脏尚可代偿者(B 期)患者为 BCLC-III 组( $n=18$ );肝功能失代偿,处于进展期或晚期 C 期和 D 期患者为 BCLC-IV 组( $n=21$ )。结果表明,LPC 14:0~LPC 18:0 5 个代谢标志物在各巴塞罗那亚组患者血清中浓度差异显著,具有统计学意义( $P<0.05$ )。可见,利用 HPLC-MS/MS 平台测定的 5 个 LPC 类物质,对不同巴塞罗那期 HBV-HCC 患者具备一定的鉴别能力。

表 6 LPC 14:0~LPC 18:0 在不同 CTP 分级 HVB-HCC 患者之间的比较

Tab. 6 Comparisons of LPC 14:0~LPC 18:0 among patients with HVB-HCC at different CTP classes

目标物(target)	BCLC-I	BCLC-II	BCLC-III	BCLC-IV
LPC 14:0	0.58 (0.37-0.78)	0.45 (0.29-0.81)*	0.41 (0.24-0.57)*&	0.27 (0.19-0.36)**&#
LPC 15:0	1.68 (1.32-2.25)	1.78 (0.94-3.22)*	4.77 (1.33-10.95)**&&	2.20 (1.19-8.91)*&#
LPC 16:0	90.20 (68.30-128.00)	85.50 (60.50-122.00)*	77.15 (56.43-107.50)*&	71.80 (41.20-104.50)**&#
LPC 17:0	2.12 (1.80-2.92)	1.59 (0.90-2.44)*	1.41 (1.08-1.91)**&	1.39 (0.63-2.03)**&
LPC 18:0	30.30 (23.70-52.00)	26.90 (16.6-45.73)*	31.95 (20.03-45.18)*&	25.40 (14.25-34.60)**&#

注(note):ts BCLC-I 组(BCLC-I group),\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;ts BCLC-II 组(BCLC-II group),& $P<0.05$ ,&& $P<0.01$ ;ts BCLC-III 组(BCLC-III group),# $P<0.05$ 。

### 3 讨论

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,目前已发展为一门内可整合色谱、质谱、磁共振等多项技术,外可整合基因组学、转录组学和蛋白质组学等的重要学科<sup>[9]</sup>。磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、毛细管电泳-质谱联用(capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, CE-MS)及以 HPLC-MS/MS 可谓是目前代谢组学分析技术的四大支柱<sup>[10]</sup>。GC-MS 长期以来用于生物体液中代谢物的鉴定,但应用范围常受到待测物挥发性和生成挥发性衍生物的限制<sup>[11]</sup>;CE-MS 技术适用于生物样本中极性带电荷的代谢物质<sup>[12]</sup>;NMR 虽具有重复性好及实验室间的差异较小等优点,但其灵敏度较低<sup>[13]</sup>;HPLC-MS/MS 适用的待检代谢物范围较广,同时具有较高的特异性和敏感性,是目前定量检测微量非挥发性分析物的金标准<sup>[14]</sup>。本研究中检测的 LPC 14:0~LPC 18:0 系列物质对热不稳定,且不易挥发,适用于 HPLC-MS/MS 技术定量分析检测,利于 LPC 类物质定量准确检测。

鉴于人血清样本的复杂成分,本研究对样本进行了前期分离和预处理,以防样本中高丰度的蛋白质在质谱仪的电离作用下裂解生成与待测物裂解物相似的产物,或与待测物之间发生反应而影

响最终定量检测的结果。研究中使用加入了 0.1% BHT 的甲醇溶液对样本前处理,BHT 可以防止对 LPC 类物质中不饱和键脂肪链的氧化,而甲醇对水的亲和力大,能破坏人血清蛋白颗粒表面的水化膜,致使蛋白质沉淀而除去待测样本中的蛋白质。前处理后的待测样本注入到高效液相色谱柱中,流动相中 0.1% 甲酸  $25 \text{ m mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵-水溶液和 0.1% 甲酸-甲醇溶液的配比随时间而改变,待测样本中各种物质在不同配比流动相中的溶解度不同而先后被洗脱下来,这就完成色谱过程对样本的初步分离作用,而不破坏待测样本的化学结构。

经色谱柱初步分离后的样本随流动相进入质谱的离子源,样本在离子源内电离成为带电离子。研究中使用的 API 4000+ 质谱仪、Turbo V™ 离子源对 LPC 类物质的电离模式选择电喷雾(electrospray ionization, ESI)电离,离子化效率高,灵敏度高,电离更加稳定和高效<sup>[15]</sup>。待测的 5 个 LPC 类物质经电离后成为带电离子在接口内进行去溶剂、聚集、冷却后进入质量分析器。本研究采用三重四极杆(triple quadrupole mass spectrometry, TQMS)质量分析器的多反应检测模式(multi-reaction monitoring, MRM)进行扫描检测,3 个四极杆在空间上串联,限定母离子和子离子 2 个参数,选择性极高,提高了灵敏度,最终

将离子信号转变为电信号,经 API 4000+ 质谱仪的分析软件 Analyst<sup>®</sup> 软件分析成离子强度图,完成定量分析离子碎片强度和质谱图的绘制。

具体每一种 LPC 类物质在循环中的具体量并不十分明确,而且各 LPC 亚型众多,各亚型之间还可以相互转换,这给具体 LPC 类物质的绝对定量带来了巨大的困难。有研究报道,正常人血浆中 LPC 类物质占磷脂类物质的含量低于 3.2%,而生理状态下人血浆磷脂类物质的总浓度约在  $1\sim 3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内<sup>[16-17]</sup>。也有研究表明,生理状态下人血浆中 LPC 类物质的浓度范围约在  $12\sim 166\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[18]</sup>。本研究通过前处理以及色谱参数和质谱条件的选择优化,最终建立了 HPLC-MS/MS 检测平台,并对该技术平台的性能进行验证。首先是标准曲线的绘制和线性相关性的验证:本研究以生理盐水为基质,配制不同浓度梯度的 LPC 14:0~LPC 18:0 标准品溶液,通过质谱仪自带软件分析待测物浓度和峰下面积的关系,并绘制标准曲线和线性相关系数  $r$ ,结果显示 5 个目标 LPC 类物质实测浓度和配制浓度之间的  $r$  值分别为 0.997 6、0.999 2、0.992 7、0.998 0 和 0.994 3,均在 0.99 以上;此外,对 LPC 14:0~LPC 18:0 每一种 LPC 类物质配制的 S1~S7 共计 7 个浓度水平均在直线范围内,说明本研究建立的 HPLC-MS/MS 平台可以满足人血清中 5 个目标 LPC 类物质的定量检测在浓度范围方面的需求。检测下限 (LOD) 结果表明, LPC 14:0~LPC 18:0 的 LOD 分别为 0.027、0.12、0.32、0.059 和  $0.072\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。高 (S5)、低 (S3) 2 个浓度水平加样回收率试验结果显示,5 个 LPC 类待测物质在以生理盐水为基质的高、低 2 个浓度水平均具有满意的回收率,在 85%~115% 范围内。低浓度的 8 个样本的平行试验显示, LPC 14:0~LPC 18:0 5 个物质的平均回收率分别是 96.3%、99.9%、103.6%、96.6% 和 100.0%,均处于 95%~105% 范围内;而高浓度 5 个物质的平均加样回收率分别是 96.8%、99.1%、97.5%、93.8% 和 97.7%,在 95%~105% 范围内,证明该平台能够以高准确度定量分析以生理盐水为基质的溶液中的目标待测物。以血清为基质再次进行加样回收率试验显示,加样回收率也可控制在 85%~115% 范围内,说明该平台性能稳定,受人血清影响较小,适用于对人血清中目标待测物的定量检测分析。精密度结果表明, HPLC-MS/MS 符合临床检验工作中对仪器精密度

的要求,低浓度和高浓度水平上 5 个 LPC 类目标物质 RSD 均小于 15%。

本研究通过代谢组学技术建立了一定程度上满足临床检测人血清中 LPC 14:0~LPC 18:0 5 个 LPC 类物质的 HPLC-MS/MS 平台,适合临床推广。

## 5 结论

本研究利用 HPLC-MS/MS 平台,以血脂平作为内标物,绘制目标待测物 LPC 14:0~LPC 18:0 的标准曲线并分析其  $r$  值,评估检测平台的定量下限、线性范围,评价其准确性和精密度。通过加样回收试验排除基质效应的影响,最终成功建立了一个稳定、灵敏而可靠的定量检测人血清中 LPC 14:0~LPC 18:0 5 个目标 LPC 类物质的检测平台,适合临床推广。

## 参考文献

- [1] FITIAN AI, CABRERA R. Disease monitoring of hepatocellular carcinoma through metabolomics [J]. *World J Hepatol*, 2017, 9(1): 1
- [2] LIU Y, HONG Z, TAN G, *et al.* NMR and LC/MS-based global metabolomics to identify serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(3): 658
- [3] RESSOM HW, XIAO JF, TULI L, *et al.* Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 743(18): 90
- [4] ZENG J, HUANG X, ZHOU L, *et al.* Metabolomics identifies biomarker pattern for early diagnosis of hepatocellular carcinoma: from diethylnitrosamine treated rats to patients [J]. *Sci Rep*, 2015, 10(5): 16101
- [5] MATSUMOTO T, KOBAYASHI T, KAMATA K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(30): 3209
- [6] KRAUTBAUER S, EISINGER K, WIEST R, *et al.* Systemic saturated lysophosphatidylcholine is associated with hepatic function in patients with liver cirrhosis [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2016, 6(124): 27
- [7] SONOMURA K, KUDOH S, SATO TA, *et al.* Plasma lipid analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(12): 2033
- [8] 张虹. 加标回收率的测定和结果判断 [J]. *石油与天然气化工*, 2000, 29(1): 50  
ZHANG H. Study on the determination and recovery of spike recovery [J]. *Petrol Nat Gas Chem Ind*, 2000, 29(1): 50
- [9] 朱超, 梁琼麟, 王义明, 等. 代谢组学的整合化发展及其新进展 [J]. *分析化学*, 2010, 38(7): 1060  
ZHU C, LIANG QL, WANG YM, *et al.* Integrative development of



- metabolomics and its new progress [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(7): 1060
- [10] PENG B, LI H, PENG XX. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(9): 628
- [11] GAO P, XU G. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(3): 669
- [12] RAMAUTAR R, SOMSEN GW, de JONG GJ. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2012-2014 [J]. *Electrophoresis*, 2015, 36(1): 212
- [13] WOLFENDER JL, MARTI G, THOMAS A, *et al.* Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1382(1): 136
- [14] GODFREY AR, JONES L, DAVIES M, *et al.* Miltefosine: a novel internal standard approach to lysophospholipid quantitation using LC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(11): 2791
- [15] 王中华, 陈艳华, 徐婧, 等. 血清脂质组学研究中多重离子化液相色谱-质谱方法的比较 [J]. *分析化学*, 2017, 45(5): 674
- WANG ZH, CHEN YH, XU J, *et al.* Comparison of multiple ionization liquid chromatography-mass spectrometry in serum lipid group study [J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(5): 674
- [16] XIA YQ, JEMAL M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(14): 2125
- [17] QUEHENBERGER O, ARMANDO AM, BROWN AH, *et al.* Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(11): 3299
- [18] 亢爱春, 霍勇, 齐丽彤. 溶血磷脂酰胆碱在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 12(14): 1083
- KANG AC, HUO Y, QI LT. The role of lysophosphatidylcholine in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2006, 12(14): 1083
- (本文于 2018 年 3 月 7 日修改回)