

席 丽,闫永锋,秦新喜,等. 绵羊血浆催产素水平定量检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):157-160.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.045

绵羊血浆催产素水平定量检测方法的建立

席 丽¹, 闫永锋¹, 秦新喜², 韩进诚¹, 瞿红侠¹, 张进良¹

(1. 商丘师范学院, 河南商丘 476000; 2. 普莱柯生物工程股份有限公司, 河南洛阳 471000)

摘要:建立采用高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定绵羊血浆中催产素(oxytocin, OT)的方法。经乙腈沉降法提取血浆样品,在多元反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下进行检测,标准加入法定量。通过该方法获得标准曲线线性方程为 $y = 1.448x + 544.400$, 相关系数为 0.998, 线性范围在 50 ~ 10 000 pg/mL, 方法检出限为 10 pg/mL, 定量限为 50 pg/mL。应用 HPLC-MS/MS 法测定醋酸去甲雄三烯醇酮-17 β 雌二醇(trenbolone acetate and estradiol-17 β , TBA-E₂)联合处理阉公羊血浆中 OT 浓度变化,其中对照组催产素浓度为 55 ~ 80 pg/mL, TBA-E₂ 处理组为 75 ~ 160 pg/mL, 表明 TBA-E₂ 可提高阉公羊血浆中的 OT 浓度。该方法简便、快速、准确,可用于血浆样品中 OT 的检测。

关键词:高效液相色谱-串联质谱;多元反应监测;乙腈沉降法;催产素;血浆

中图分类号: S858.267.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0157-04

OT 是一种环状的九肽类神经垂体激素,由下丘脑视上核和室旁核的神经内分泌细胞合成和分泌,经下丘脑-垂体轴投射到垂体后叶,再释放入血。大脑是产生 OT 的主要部位,但子宫、生殖腺、心肌、胸腺等组织也能合成 OT^[1]。OT 作为激素和神经递质具有重要的生物学作用,临床上主要用于催生引产,产后止血,缩短第三产程和刺激泌乳。此外还具有广泛的生理作用,尤其是对中枢神经系统的作用,例如,通过对垂体的分泌功能起作用,从而调节促肾上腺皮质激素释放激素的释放,促进催乳素、促性腺激素的分泌,调节生长激素的分泌^[2]。研究显示,OT 与动物的“社会行为”,包括配偶选择、交配、亲本育幼等行为相关^[3-5]。据报道,OT 能增加人与人之间的信任感、影响社会关系的建立并调节情感行为^[6-7]。

目前,用于定量分析生物样品中 OT 的方法有放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)^[8]、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[9]、液相色谱-紫外法^[10]、库伦电化学高效液相色谱法^[11-13]、毛细管区带电泳-紫外法^[14]等。RIA、ELISA 法灵敏度高,但需要制备待测物的特异性抗体,而且容易受到来源于生物样品中特异性(如结构类似物-赖氨加压素)和非特异性(如 pH 值、离子浓度、基质其他成分等)的干扰^[15]。即使应用特异性非常高的抗体,RIA 获得的数据所反映的是分析物免疫活性水平,而非分析物本身的水平。HPLC-MS/MS 具有高灵敏度、选择性、特异性等优点,被越来越广泛地应用于生物样品中蛋白质和多肽的分析研究中^[16-17]。本研究建立了 HPLC-MS/MS 测定绵羊血浆中 OT 的方法,采用乙腈方法提取和净化 OT,利用高效液相色谱-串联质谱在多元反应离子监测模式下进行检测,本方法有效去除了干扰,提高了灵敏度,定性 with 定量分析准

确,能够满足血浆中催产素水平的快速检测和确证的要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 型高效液相色谱系统(Dionex 公司);Grac-smart™ RP C18 色谱柱(150mm × 2 mm, 5 μ m, Grace Davison 公司);电喷雾电离源-API 4000 型三重四极杆串联质谱仪(Applied Biosystems 公司);VM1 型漩涡混合器(Ratek 公司);PS-20 型超声清洗仪(Unisonic 公司);5424R 型台式高速离心机、微量移液器(Eppendorf 公司);Heto 型真空离心干燥仪(Medos 公司);Sep-Pak C8、C18 和 Oasis HLB 固相萃取柱(Waters 公司);YM-3 Microcon 型离心超滤装置(Millipore 公司)。

催产素标准品(Auspep 公司);绵羊血浆冻干粉(Sigma 公司);乙腈(色谱纯, Labscan 公司);甲酸、甲醇(分析纯, Univar 公司);超纯水经美国 Millipore 公司超纯水系统处理。

1.2 标准溶液的配制

催产素标准工作液的制备:称取催产素标准品 0.5 mg, 用超纯水稀释并定容到 1 mL, 配制成 0.5 mg/mL 的储备液, 置于 -20 °C 冰箱保存。移取适量标准储备液, 配制 10、25、50、100、250、500、1 000、2 500、5 000 pg/mL 的催产素标准工作液系列。

质量控制样品的制备:配制 50、500 pg/mL 溶液作为血浆催产素提取方法比较的质量控制样品。

1.3 血浆样品的处理

将 5 mg 绵羊血浆冻干粉溶于 5 mL 超纯水中, 置于 -20 °C 冰箱保存备用。

血浆质量控制样品分别采用固相萃取法、乙腈沉降法、3 ku 超滤法提取催产素,用于比较各提取方法的回收率及优化提取该多肽的方法。

1.3.1 乙腈沉降法 吸取 300 μ L 乙腈到 100 μ L 分别含有 50、500 pg/mL 催产素的血浆样品中, 涡旋振荡 5 min 后于

收稿日期:2016-01-04

基金项目:商丘师范学院博士科研启动经费。

作者简介:席 丽(1982—),女,天津人,博士,讲师,从事家畜生殖与内分泌学研究。E-mail: xili_0808@163.com。

4 ℃ 放置 30 min,4 ℃、13 200 g 离心 20 min,上清液转入新的 Eppendorf 管中,并在 4 ℃ 真空离心干燥,100 μL 1% 甲酸溶液重新溶解,取 20 μL 进样分析。

1.3.2 离心超滤法 将 100 μL 血浆样品加入到 3 ku MWCO 规格的 Microcon 离心超滤管中,14 000 g 离心 100 min,回收超滤液于 4 ℃ 真空离心干燥,100 μL 1% 甲酸溶液重新溶解,取 20 μL 进样分析。

1.3.3 固相萃取法 取 100 μL 血浆样品置于冰上,分别加入 5 μL 100 mmol/L PMSF 和 3 μL Complete™ 蛋白酶抑制剂混合液,用 pH 值 3.0 的 0.1 mol/L 乙酸铵溶液 900 μL 稀释成 1 mL 上样血浆样品。HLB、C₈ 和 C₁₈ 固相萃取小柱分别经 1 mL 甲醇预处理,1 mL 75% 乙腈/0.1% 甲酸溶液活化和 2% 乙腈/0.1% 甲酸溶液平衡后,将 100 μL 上述血浆样品加入柱内,经 6 mL 2% 乙腈/0.1% 甲酸溶液淋洗后,用 50% 乙腈/0.1% 甲酸溶液将分析物洗脱下来,洗脱液经 4 ℃ 真空离心干燥,100 μL 1% 甲酸溶液重新溶解,取 20 μL 进样分析。

1.4 色谱和质谱条件

1.4.1 高效液相色谱条件 色谱柱:Gracesmart™ RP C₁₈ 色谱柱;柱温 45 ℃;流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,流动相 B 为乙腈-0.1% 甲酸溶液(体积比 9 : 1)。梯度洗脱程序:0 ~ 12 min,0 ~ 40% B;12 ~ 15 min,40% ~ 80% B;15 ~ 20 min,80% B;20 ~ 20.1 min,80% ~ 0 B;20.1 ~ 30 min,0% B。流速 0.25 mL/min;进样量 20 μL。

1.4.2 质谱条件 采用 MRM 方式,测定催产素质子化的准分子离子经碰撞诱导解离产生产物离子的反应。离子化方式:电喷雾正离子扫描(ESI+);毛细管电压 5.3 kV;离子源温度 450 ℃;气帘气 20 psi;雾化气 35 psi;辅助气 25 psi;去簇

电压 20 V;射入电压 10 V;碰撞室射出电压 15 V。其他质谱参数详见表 1。

表 1 催产素的质谱检测条件

母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	延迟时间 (s)	碰撞能 (V)
504.2	285.2	0.2	28
504.2	723.2	0.2	22
504.2	820.3	0.2	25
1 007.3	285.2	0.2	50
1 007.3	723.2	0.2	50
1 007.3	820.3	0.2	50

1.5 数据处理

在上述优化后的 LC-MS/MS 条件下测定样品,记录质量色谱图中 OT 的峰面积,以标准曲线法进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

在电喷雾离子源的正离子检测模式下,催产素在一级增强型全扫描质谱中获得 *m/z* 为 1 007.3 和 504.2,分别对应 [M+H]¹⁺ 和 [M+2H]²⁺ 准分子离子峰(图 1)。采用产物离子扫描方式,对 [M+2H]²⁺ 峰进行二级质谱分析(图 2),获得的主要碎片峰 *m/z* 分别为 285.2、723.2、820.3,对应 y₃⁺、b₆⁺、b₇⁺,为-S-S-键之外的 X-pro 不稳定肽键经碰撞裂解后的碎片离子,具有较高的信号强度和重现性。因此将上述 2 个母离子和产生的主要子离子组合,作为后续催产素多反应监测的母-子离子对。

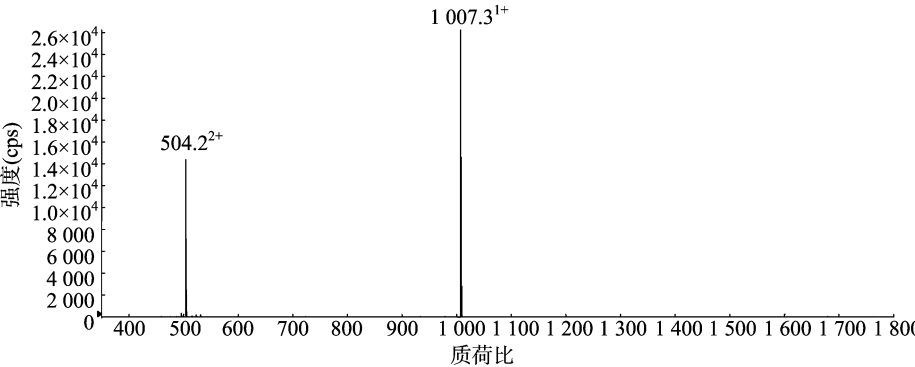


图1 TOF-MS增强型全扫描质谱显示催产素不同带电状态

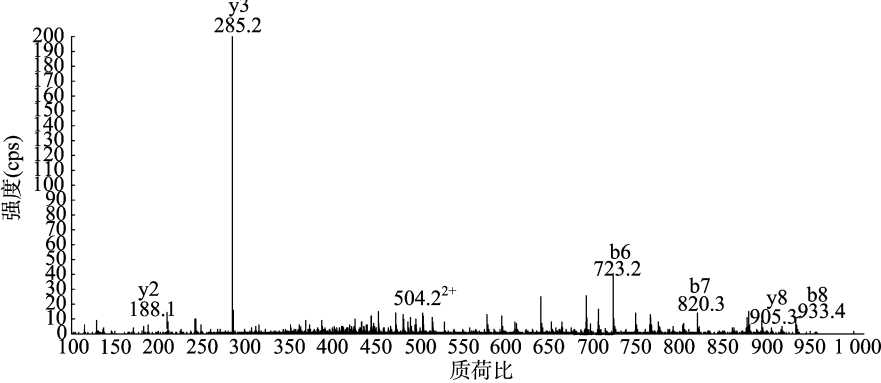


图2 催产素 [M+2H]²⁺峰离子扫描质谱图

2.2 色谱条件的优化

试验中对流动相及洗脱梯度进行优化。HPLC 级乙腈吸光度低,产生的噪声小;与水混合后引起的柱压低;洗脱能力

高,因此选用乙腈作为有机相。在流动相中加入少量的甲酸(0.1%),可改善色谱峰形和提高离子化效率。1 μmol/L OT 经 30 min 梯度洗脱后保留时间为 9.33 min(图 3)。

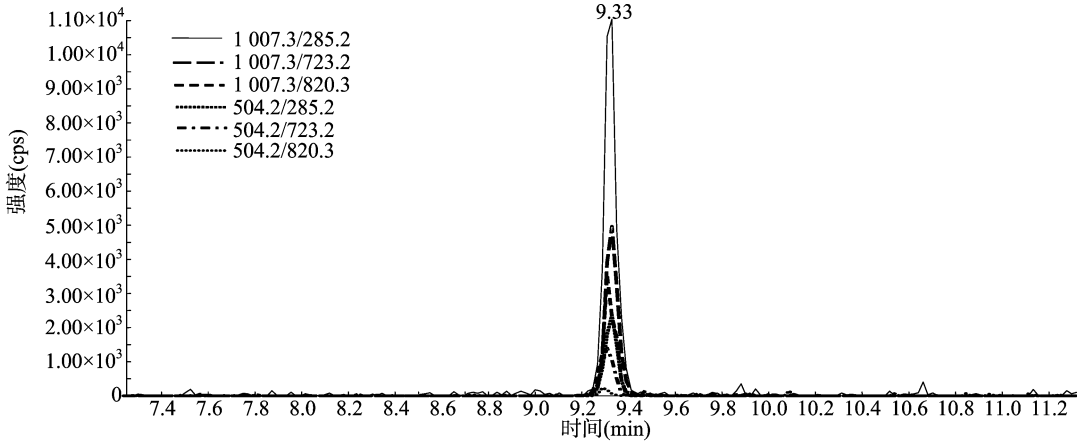


图3 OT MRM 色谱图

2.3 血浆样品提取方法的优化

应用“1.3”中提到的多种方法对 QC 样品进行提取,选择最佳提取方法。对于固相萃取方法,回收率为血浆 QC 样品经 50% 乙腈洗脱产物干燥、重溶后 OT 面积之和与未经提取的 1% 甲酸溶液 QC 样品 OT 面积比值的百分率。对于乙腈蛋白质沉降法,回收率为上清液经干燥、重溶后 OT 面积与未经提取的 1% 甲酸溶液 QC 样品 OT 面积比值的百分率。对于 3 ku 超滤法,回收率为超滤液经干燥、重溶后 OT 面积与未经提取的 1% 甲酸溶液 QC 样品 OT 面积比值的百分率。结果显示,乙腈蛋白质沉淀法对血浆 OT 的回收率优于固相萃取法,且重复性较好(变异系数 <4.0%)(图 4)。

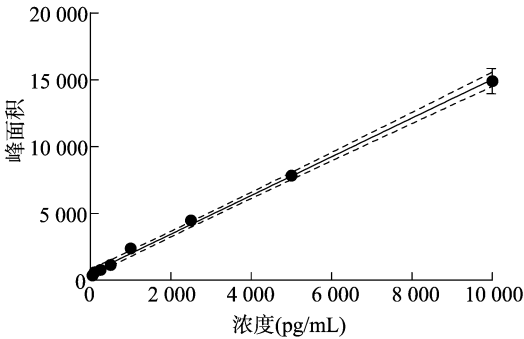


图5 OT 校准曲线

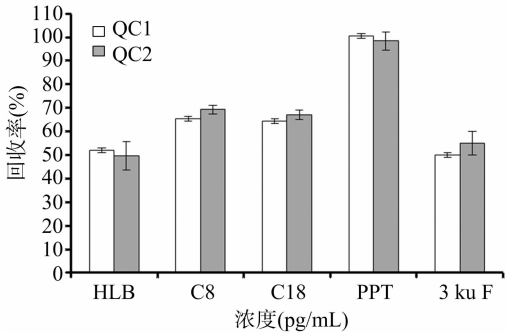


图4 OT 提取方法的比较

2.4 校准曲线的构建

标准系列溶液按上述优化过的高效液相色谱-串联质谱条件进行分析,进样 20 μL,记录色谱图。以待测物浓度为横坐标,待测物峰面积值为纵坐标,用 Graphpad Prism 4.0 绘图软件求得的线性回归方程即为标准曲线。方法检出限(limit of detection, LOD)以待测物确证离子的信噪比等于 3(S/N = 3)时待测物浓度表示,定量限(limit of quantitation, LOQ)以待测物确证离子的信噪比等于 10(S/N = 10)时待测物浓度表示。分析方法的校准曲线见图 5。根据校准曲线,线性回归方程为 $y = 1.448x + 544.400$, $r^2 = 0.998$ 。OT 线性范围为 50 ~ 10 000 pg/mL, LOD 为 10 pg/mL, LOQ 为 50 pg/mL, CV < 15%。

2.5 方法的特异性

测定生物样品中某种物质,需要排除其他干扰而显示出方法的特异性。上述建立的 MRM 检测方法中,在 OT 保留时间 9.33 min 处未见干扰离子对的色谱出峰,证明该方法对 OT 的检测具有特异性。

2.6 方法的精密度

制备 100、1 000、5 000 pg/mL 3 个添加水平的加标样品,按照已建立的检测方法进行处理和测定,每个水平重复 3 次,计算日内和日间精密度,结果见表 2。3 个浓度质控样品的日内 RSD < 9%, 日间 RSD < 14%。

表 2 血浆 OT HPLC-MS/MS 定量分析方法的精密度

添加浓度 (pg/mL)	日内(n=3)		日间(n=3)	
	测得浓度 (pg/mL)	精密度 (%)	测得浓度 (pg/mL)	精密度 (%)
100	100.2 ± 8.6	8.6	100.3 ± 13.2	13.2
1 000	998.4 ± 58.9	5.9	996.7 ± 78.7	7.9
5 000	4 997.3 ± 134.9	2.7	4 995.4 ± 184.8	3.7

2.7 绵羊血中 OT 浓度测定

18 只 7 月龄阉公羊,体质量为 37.1 kg,分为 TBA-E₂ 处理组 and 对照组。TBA-E₂ 处理为耳部埋植 60 mg 醋酸去甲雄三烯醇酮(trenbolone acetate, TBA)和 6 mg 雌激素(estradiol, E₂)。试验期 85 d,试验结束后采血,置于肝素抗凝剂管中,4 ℃、3 000 g 离心 20 min,取上清于 -80 ℃贮存备用。利用

上述定量检测方法测定血浆中 OT 浓度。对照组 OT 浓度为 55 ~ 80 pg/mL, TBA - E₂ 处理组为 75 ~ 160 pg/mL, 表明 TBA - E₂ 可提高阉公羊血浆中的 OT 浓度。

3 结论与讨论

本研究串联质谱扫描中 OT(Cys - Tyr - Ile - Gln - Asn - Cys - Pro - Leu - Gly - NH₂) 母离子 [M + H]⁺ 经碰撞诱导裂解后主要产生了 y3⁺(Pro - Leu - Gly - NH₂) 和 b6⁺(Cys - Tyr - Ile - Gln - Asn - Cys) 子离子, 可见 C1 和 C7 位的二硫键所形成的碳环非常稳固, 经气体碰撞后仍然保持较好的完整性。因此本研究在筛选多反应监测母子离子对时, 主要选取了信号强度大且稳定的 y3⁺、b6⁺、b7⁺ 作为子离子, 可在一定程度上保证所建立方法的灵敏度和重现性。

在 LC - MS 分析过程中, 通常会遇见基质抑制效应, 造成被测化合物的灵敏度低, 测定结果重复性、定量准确度差, 有时还会影响质谱碎片的相对丰度, 从而影响定性判断。目前从生物样品中提取蛋白质和多肽以获得更纯净样品的方法已经在 LC - MS 定量分析中得到广泛应用并不断发展。蛋白质沉淀法快速、简便, 但其在沉淀大分子蛋白的同时易引起待测物质的共沉淀从而导致响应值降低; 固相萃取方法能够有效降低抑制干扰, 但是其对某一特定多肽的提取效率因多肽的结构和性质以及分离柱和洗脱方法的选择而不同; 超滤法仅采用压力作为膜分离的动力, 具有流程短、操作简便的优点, 但小分子物质容易与大分子物质黏附在一起, 从而被阻断在膜上方, 导致滤液中待测物浓度降低。因此, 对于某一特定多肽, 需要比较和优化蛋白质和多肽的方法后才能获得最大回收率和重复性。本研究通过比较乙腈蛋白质沉淀法、固相萃取法(C₈ 柱、C₁₈ 柱、HLB 柱) 和 3 ku 超滤法的回收率和重复性, 发现乙腈蛋白质沉淀法在提取血浆中 OT 时具有较高的回收率(98.4%) 和较好的重复性(CV < 4.0%)。

为了消除试样基质或干扰组分的影响, 提高测定准确度, 往往应用标准加入法来测定复杂生物基质中目标物含量。本研究采用标准加入法构建血浆 OT 定量校准曲线, 通过方法学验证表明, 该方法具备较高的特异性和精确度, 并在测定临床血浆样品时得到应用。本研究建立了一种应用 HPLC - MS/MS 检测血浆中 OT 含量的方法, 并在临床样品分析中得到验证。该方法通过对 OT 血浆样品的前处理, 结合 OT 在 HPLC 的保留时间及多反应监测系统对 OT 及其碎片离子质量的分析这一多重筛选, 可以最大程度降低信号干扰, 提高定量检测方法的灵敏度。本研究建立的标准曲线线性方程为 $y = 1.448x + 544.400$, 相关系数为 0.998, 线性范围在 50 ~ 10 000 pg/mL, 方法检出限为 10 pg/mL, 定量限为 50 pg/mL, 该方法具有较好的特异性、精确性、可重复性, 可应用于临床中动物施用 OT 后血浆中 OT 浓度的实时监测。

参考文献:

- [1] McCarthy M M, Altemus M. Central nervous system actions of oxytocin and modulation of behavior in humans [J]. *Molecular Medicine Today*, 1997, 3(6): 269 - 275.
- [2] Nachum Z, Garmi G, Kadan Y, et al. Comparison between amniotomy, oxytocin or both for augmentation of labor in prolonged latent phase; a randomized controlled trial [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, 8(1): 136 - 143.
- [3] Gross M M, Froemke C, Hecker H. The timing of amniotomy, oxytocin and neuraxial analgesia and its association with labour duration and mode of birth [J]. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2014, 289(1): 41 - 48.
- [4] Gohil J T, Tripathi B. A study to compare the efficacy of misoprostol, oxytocin, methyl - ergometrine and ergometrine - oxytocin in reducing blood loss in active management of 3rd stage of labor [J]. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 2011, 61(4): 408 - 412.
- [5] Iqbal Z, Rahman Z U, Muhammad F, et al. Effect of oxytocin on serum biochemistry, liver enzymes, and metabolic hormones in lactating Nili Ravi buffaloes [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2015, 47(1): 21 - 27.
- [6] Lv Y L, Feng M, Che T T, et al. CCK mediated the inhibitory effect of oxytocin on the contraction of longitudinal muscle strips of duodenum in male rats [J]. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2010, 460(6): 1063 - 1071.
- [7] Borg J, Ohlsson B. Oxytocin prolongs the gastric emptying time in patients with diabetes mellitus and gastroparesis, but does not affect satiety or volume intake in patients with functional dyspepsia [J]. *BMC Research Notes*, 2012, 5(1): 148 - 155.
- [8] Coiro V, Saccani - Jotti G, Rubino P A, et al. Oxytocin inhibits the stimulatory effect of ghrelin on circulating neuropeptide Y levels in humans [J]. *Journal of Neural Transmission*, 2008, 115(9): 1265 - 1267.
- [9] Blevins J E, Ho J M. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight [J]. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2013, 14(4): 311 - 329.
- [10] Akther S, Korshnova N, Zhong J, et al. CD38 in the nucleus accumbens and oxytocin are related to paternal behavior in mice [J]. *Molecular Brain*, 2013, 6(1): 41 - 50.
- [11] Zhou Z B, Yang X Y, Yuan B L, et al. Sevoflurane - induced down - regulation of hippocampal oxytocin and arginine vasopressin impairs juvenile social behavioral abilities [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2015, 56(1): 70 - 77.
- [12] 张珍瑞, 叶鑫先, 郭凡溪, 等. 饲料中辅酶 Q10 反相高效液相色谱检测方法的建立 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2016, 37(1): 47 - 50.
- [13] 肖文华, 方玉桂, 常婷婷, 等. 鸡可食性组织中癸氧喹啉残留的 HPLC 检测方法 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2014, 35(4): 41 - 45.
- [14] Reimert I, Bolhuis J E, Kemp B, et al. Emotions on the loose: emotional contagion and the role of oxytocin in pigs [J]. *Animal Cognition*, 2015, 18(2): 517 - 532.
- [15] Larsimont V, Bogaards M, Mulleneers P, et al. Analysis of leucine enkephalin by high - performance liquid chromatography using enzymatic derivatization by tyrosinase and electrochemical or fluorescence detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 19(6): 855 - 864.
- [16] Karbiwnyk C M, Faul K C, Turnipseed S B, et al. Determination of oxytocin in a dilute IV solution by LC - MSn [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(3): 672 - 677.
- [17] Baliyan P K, Singh R P, Arora S. Liquid chromatography - mass spectrometry determination of oxytocin in cow milk [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2009, 21(1): 397 - 402.