

*Małgorzata Jelińska<sup>1</sup>, Iwona Gielecińska<sup>2</sup>, Hanna Mojska<sup>2</sup>, Andrzej Tokarz<sup>1</sup>*

## WALIDACJA OZNACZANIA WYBRANYCH EIKOZANOIDÓW METODĄ LC-MS/MS

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Bromatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. ndzw. dr hab. *A. Tokarz*

<sup>2</sup>Zakład Żywności i Suplementów Diety, Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie

Kierownik: dr n. roln. *K. Stoś*, prof. nadzw. *IŻŻ*

*Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC-MS/MS) do oznaczania wybranych eikozanoidów, metabolitów kwasów linolowego, arachidonowego oraz dokozaheksaenowego w surowicy krwi.*

Hasła kluczowe: eikozanoidy, kwasy hydroksyeikozatetraenowe, kwasy hydroksyoctadekadienowe, walidacja, LC-MS/MS

Keywords: eicosanoids, hydroxyeicosatetraenoic acid, hydroxyoctadecadienoic acid, validation, LC-MS/MS

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) od dawna zaliczane są do czynników oddziałujących w istotny sposób na funkcjonowanie organizmu człowieka. Poświęcone im badania dotyczą m.in. wpływu na wzrost i rozwój, pracę układu krążenia, ryzyko rozwinięcia się miażdżycy, łuszczycy, alergii, czy choroby nowotworowej (1, 2, 3). W doświadczeniach tych bierze się pod uwagę nie tylko udział poszczególnych WNKT w diecie, ale także proporcje między różnymi kwasami, czy też grupami kwasów oraz właściwości ich metabolitów - eikozanoidów. Do najlepiej przebadanych należą pochodne kwasu arachidonowego powstające na szlaku cyklooksygenazy (4). W ostatnim czasie, wraz z rozwojem technik analitycznych, rośnie zainteresowanie metabolitami WNKT powstającymi na szlaku lipoksygenaz (LOX). Należą do nich kwasy 15-, 12-, i 5-hydroksyeikozatetraenowe (15-, 12- i 5-HETE), których prekursorem jest kwas arachidonowy, 13- i 9-hydroksyoctadekadienowe (13- i 9-HODE), będące metabolitami kwasu linolowego, oraz niedawno odkryte resolwiny, wywodzące się z kwasów eikozapentaenowego (EPA) czy dokozaheksaenowego (DHA). Są one określane jako lipidowe mediatory procesów zachodzących w organizmie, takich jak modulowanie odpowiedzi immunologicznej, wydzielanie hormonów, angiogeneza, a także wzrost, proliferacja i adhezja komórek, odgrywające istotną rolę w tworzeniu się zmian nowotworowych (5, 6, 7). Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) do oznaczania wybranych eikozanoidów, metabolitów kwasów linolowego, arachidonowego oraz DHA w surowicy krwi.

## MATERIAŁY I METODY

## Odczynniki i wzorce

Wzorce: kwasy 15-, 12- i 5-hydroksyeikozatetraenowe (15-, 12- i 5-HETE), 13- i 9-hydroksyoktadekadienowe (13- i 9-HODE), kwasy 15-, 12- i 5-hydroksyeikozapentaenowe (15-, 12- i 5-HEPE), leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), resolwina D1 (RvD1) oraz kwas 17S-hydroksydokozahexaenowy (17S-HDHA) o stężeniu 100 µg/ml w etanolu, prostaglandyna E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>; c = 1 mg/ml w octanie metylu) oraz prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; ≥99%) firmy Cayman Chemical Company, USA; metanol (HPLC, ≥99,9%) z firmy POCh S.A., etanol bezwodny (HPLC, ≥99,5%), metanol (LC-MS, ≥99,8%) oraz acetonitryl (LC-MS, ≥99,9%) z firmy Mallinckrodt Baker BV, Holandia; kwas octowy lodowaty (LC-MS) z firmy Sigma-Aldrich, Niemcy.

## Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotowano mieszaninę wzorców wszystkich eikozanoidów w etanolu (5 µg/ml), a następnie rozcieńczono etanolem i wodą dejonizowaną, tak, aby końcowe stężenia wynosiły 1000, 750, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 4 i 2 pg/µl. Jedynie w przypadku RvD1 i LTB<sub>4</sub> zakres krzywej kalibracyjnej był krótszy i wynosił odpowiednio: 2 ÷ 200 pg/µl(RvD1) oraz 2 ÷ 50 pg/µl(LTB<sub>4</sub>).

## Przygotowanie próbki

Surowicę przygotowywano przez wirowanie krwi 10 min przy 3000 obr./min. Eikozanoidy izolowano z surowicy metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) wykorzystując kolumnienki C18 Bakerbond (500 mg; 3 ml; J.T. Baker) (8). Do surowicy (0,4 ml) dodawano metanol (0,5 ml), rozcieńczano wodą tak, aby jego zawartość wynosiła ok. 10% i wprowadzano na kolumnienki. Kolumnienki przemycano następnie wodą i 10% metanolem (po 2 ml). Eikozanoidy eluowano metanolem (3 razy po 0,5 ml). Rozpuszczalnik odparowywano do sucha w atmosferze azotu w temperaturze 30°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,2 ml mieszaniny etanolu i wody (1:2; v/v), a następnie filtrowano (filtry wirówkowe Ultrafree-MC, Durapore PVDF, 0.22 µm, Millipore).

## Analiza chromatograficzna

Oznaczanie zawartości eikozanoidów wykonano stosując zmodyfikowaną metodę Masoodi M. i wsp. (9).

Rozdział chromatograficzny eikozanoidów w surowicy krwi przeprowadzono na chromatografie cieczowym UltraMate 3000 firmy Dionex na kolumnie Luna 5u C18(2) (150 x 2,0 mm, wielkość cząstki 5 µm, Phenomenex) wraz z prekolumną o tym samym wypełnieniu. Warunki analizy LC: przepływ przez kolumnę 500 µl/min, a od 12 min – 1000 µl/min; temperatura kolumny 30°C, dozowana objętość 100 µl, czas analizy 14 min. Analizę przeprowadzono w systemie gradientowym mieszaniny dwóch faz ruchomych: faza A – woda z dodatkiem 0,2% kwasu octowego; faza B – acetonitryl : metanol (75:25, v/v) z dodatkiem 0,2% kwasu octowego. Eikozanoidy rozdzielono za pomocą następującego gradientu: 0,0 ÷ 1,0 min, 40% fazy B; 1,0 ÷ 10,0 min, narost do 90% fazy B; 10,0 ÷ 12,0 min, 90% fazy B; 12,0 ÷ 12,1 min, spadek do 40% fazy B; 12,1 ÷ 14,0, 40% fazy B.

Do oznaczania eikozanoidów wykorzystano spektrometr mas 3200QTrap firmy Applied Biosystems. Analizę przeprowadzono techniką MRM (monitorowania wybranych reakcji) w polaryzacji ujemnej. Warunki analizy spektrometrycznej: gaz osłonowy azot (CUR = 20), temperatura źródła jonów – 600°C, napięcie kapilary elektrospreju (IS) – 5000 V, czas przemieszczania (dwell-time) – 50 ms. Monitorowane jony badanych związków oraz energię zderzeń (CE) przedstawiono w tabeli I.

Wyniki zawartości eikozanoidów odczytano z odpowiednich krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla poszczególnych związków. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie czasów ich retencji i widma masowego. Za wynik przyjęto średnią z dwóch równoległych oznaczeń.

Tabela 1. Monitorowanie wybranych reakcji (MRM) na LC/MS/MS dla badanych eikozanoidów  
Table 1. Multiple reaction monitoring (MRM) for the LC/MS/MS analysis of selected eicosanoids

Badany związek	MRM ( <i>m/z</i> )	Energia zderzeń (eV)
PGE <sub>3</sub>	349,1 → 269,2	-20
PGE <sub>2</sub>	351,1 → 271,2	-22
RvD1	375,2 → 141,0	-18
LTB <sub>4</sub>	335,1 → 195,0	-20
15-HEPE	317,1 → 219,0	-16
12-HEPE	317,1 → 179,0	-16
5-HEPE	317,1 → 114,9	-18
13-HODE	295,1 → 195,3	-24
9-HODE	295,2 → 171,0	-26
15-HETE	319,1 → 219,0	-16
17S-HDHA	343,1 → 325,2	-20
12-HETE	319,2 → 179,0	-18
5-HETE	319,1 → 114,9	-18

Do obliczenia parametrów walidacji metody wykorzystano statystyczny program komputerowy e-stat ([www.chem.uw.edu.pl/stat](http://www.chem.uw.edu.pl/stat)) oraz arkusz kalkulacyjny Microsoft Excel.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Rozwój technik analitycznych, takich jak LC-MS/MS umożliwia wykrywanie związków występujących w bardzo niskich stężeniach oraz jednoczesną analizę coraz większej liczby badanych substancji.

Na podstawie opublikowanych dotychczas metod oznaczania eikozanoidów (9, 10), zakresu działania sprzętu oraz przeprowadzonej kalibracji spektrometru

mas, opracowano metodę dedykowaną do oznaczania zawartości wszystkich 13 związków eikozanoidowych w surowicy krwi w trakcie jednej analizy. W celu sprawdzenia przydatności metody do oznaczania wszystkich 13 eikozanoidów oraz potwierdzenia wiarygodności uzyskiwanych wyników przeprowadzono walidację metody, wyznaczając granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), zakres metody, precyzję i odzysk metody.

Granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności i oznaczalności wyznaczono na podstawie stosunku sygnału do szumu (S/N) dla kolejnych stężeń badanych substancji. W przypadku ww. metody przyjęto, że LOD wynosi 1 pg/ $\mu$ l, natomiast LOQ – 2 pg/ $\mu$ l.

Zakres roboczy metody

Zakres roboczy metody wyznaczono na etapie tworzenia krzywej kalibracyjnej, biorąc pod uwagę spodziewaną zawartość poszczególnych eikozanoidów. W większości przypadków liniowość uzyskano w zakresie od 2 do 100 pg/ $\mu$ l. Inny zakres roboczy wyznaczono w przypadku: LTB<sub>4</sub> (4 ÷ 50 pg/ $\mu$ l), 13-HODE (10 ÷ 500 pg/ $\mu$ l) oraz 12-HETE (100 ÷ 1000 pg/ $\mu$ l).

Tab e l a 11. Wybrane elementy walidacji metody oznaczania eikozanoidów w surowicy krwi.

Tab l e 11. Selected parameters of validation LC/MS/MS method for eicosanoid analysis in blood plasma.

Elementy walidacji	Eikozanoidy				
	5-HETE	12-HETE	15-HETE	9-HODE	13-HODE
precyzja metody					
zawartość średnia – x [pg/ $\mu$ l]	50,9	357,1	21,7	58,9	121,9
rozrzut wyników [pg/ $\mu$ l]	45,4 ÷ 58,5	266,0 ÷ 409,5	15,5 ÷ 24,3	53,4 ÷ 63,7	95,6 ÷ 138,4
odchylenie standardowe – SD [pg/ $\mu$ l]	6,0	38,2	2,8	3,0	11,3
współczynnik zmienności – RSD [%]	11,9	10,7	12,9	5,1	9,3
granica wykrywalności – LOD [pg/ $\mu$ l]	1				
granica oznaczalności – LOQ [pg/ $\mu$ l]	2				
odzysk metody					
średni odzysk [%]	137,5 (136,3 ÷ 139,8)	90,4 (85,3 ÷ 93,8)	112,5 (106,6 ÷ 120,9)	76,8 (74,4 ÷ 80,1)	97,6 (96,5 ÷ 98,6)

Krzywe kalibracji wyznaczone dla wszystkich badanych związków mają przebieg liniowy w podanych powyżej zakresach stężeń (współczynnik korelacji krzywej  $r \geq 0,999$ , z wyjątkiem 15-HEPE, 13-HODE, 15-HETE, 17S-HDHA oraz 12-HETE, dla których był nieznacznie niższy, uzyskując jednakże wartości nie niższe niż 0,995).

### Precyzja

Do wyznaczenia precyzji metody wybrano 5 eikozanoidów o zróżnicowanej zawartości w surowicy krwi (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE oraz 9-HODE i 13-HODE). Precyzję wyznaczono poprzez analiz 12 równoległych próbek surowicy. Charakterystykę precyzji metody przeprowadzono za pomocą parametrów opisujących rozproszenie wartości zmiennych, czyli odchylenia standardowego (SD), a przy pomiarach względnych – współczynnika zmienności (RSD). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli II.

### Odzysk

Odzysk metody wyznaczono poprzez analizę próbek surowicy krwi wzbogaconych dodatkiem 5 wybranych eikozanoidów (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE oraz 9-HODE i 13-HODE). Poziom wzbogacenia wynosił od 25% (dla 13-HODE) do 110% (dla 9-HODE) spodziewanej zawartości związku w surowicy krwi. Uzyskane wyniki dla odzysku przedstawiono w tabeli II.

## WNIOSKI

Reasumując należy podkreślić, że ww. metoda oznaczania eikozanoidów charakteryzuje się dobrą precyzją i odzyskiem, umożliwiając jednocześnie dobry rozdział poszczególnych związków i oznaczanie ich na bardzo niskich poziomach w surowicy krwi w stosunkowo krótkim czasie (14 min) w trakcie jednej analizy.

M. Jelińska, I. Gielecińska,  
H. Mojska, A. Tokarz

## VALIDATION OF LC/MS/MS METHOD FOR EICOSANOID ANALYSIS IN BLOOD PLASMA

### Summary

The aim of the study was validation of the LC-MS method for eicosanoids (metabolites of arachidonic, linoleic and docosahexaenoic acids) analysis in blood plasma. Chromatographic separation was carried out on Luna C18(2), 150 x 2,0 mm, 5 µm column (Phenomenex) and UltraMate 3000, Dionex, with mass spectrometer – 3200 QTrap, Applied Biosystems were used in eicosanoid determination.

The method described enables good separation as well as fast (14 min) and simultaneous analysis of 13 eicosanoids – 5-, 12- i 15-hydroxyeicosatetraenoic acids (5-, 12- i 15-HETE), 5-, 12- i 15-hydroxyeicosapentaenoic acids (5-, 12- i 15-HEPE), 9- i 13-hydroxyoctadecadienoic acids (9- i 13-HODE), prostaglandins E<sub>2</sub> i E<sub>3</sub> (PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>3</sub>), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), resolvin D1 (RvD<sub>1</sub>) and 17S-hydroxydocosahexaenoic acid (17-HDHE) – on very low levels. The method is characterized by good precision and recoveries.

## PIŚMIENNICTWO

1. Marchioli R., Levantesi G., Macchia A., Maggioni A.P., Marfisi R.M., Silletta M.G., Tavazzi L., Tognoni G., Valagussa F., on behalf of GISSI-Prevenzione Investigators: Antiarrhythmic mechanisms of n-3 PUFA and the results of the GISSI-prevenzione trial. *J. Membrane Biol.*, 2005; 206:117–128. – 2. Kobayashi N.,

Barnard R.J., Henning S.M., Elashoff D., Reddy S.T., Cohen P., Leung P., Hong-Gonzalez J., Freedland S.J., Said J. i wsp. Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 4662-4670. – 3. Tapiero. H., Nguyen Ba G., Couvreur P, Tew K.D. : Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Pharmacotherapy*, 2002; 56: 215-222. – 4. Ding X.Z., Tong W.G., Adrian T.E.: 12-lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation. *Int. J. Cancer.*, 2001; 94: 630-636. – 5. Bogatcheva N.V., Serseevaz M.G., Dudek S.M., Vering A.D.: Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvascular Research*, 2005; 69: 107-127. – 6. Connolly J.M., Rose D.: Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Letters*, 1998; 132: 107-113. – 7. Bednar W., Holzmann K., Marian B.: Assessing 12(S)-lipoxygenase inhibitory activity using colorectal cancer cells overexpressing the enzyme. *Food Chem. Toxicol.*, 2007; 45: 508-514. – 8. Froberg P., Drukowski G., Wobst J.: Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 41: 1317-1324. – 9. Masoodi, M., Mir A.A., Petasis N.A., Serhan C.N., Nicolaou A.: Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008; 22: 75-83. – 10. Lu Y, Hong S., Yang R., Uddin J., Gotlinger K.H., Petasis N.A., Serhan C.N.: Identification of endogenous resolving E1 and other lipid mediators derived from eicosapentaenoic acid via electrospray low-energy tandem mass spectrometry: spectra and fragmentation mechanisms. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007; 21: 7-22.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1