

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.06.002

基于液相色谱 - 串联质谱技术(LC-MS/MS)检测癫痫小鼠毛发中内源性大麻素(2-AG、AEA)的含量*

马富鑫¹ 任盼¹ 阮哲² 陈建梅³ 王莉^{3Δ}

(1 空军军医大学第二附属医院烧伤整形科 陕西 西安 710038; 2 空军军医大学第二附属医院神经内科 陕西 西安 710038;

3 空军军医大学第二附属医院超声医学科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:基于液相色谱 - 串联质谱技术(LC-MS/MS)对癫痫小鼠毛发中内源性大麻素(2-AG、AEA)进行含量检测。**方法:**匹鲁卡品腹腔注射方法建立小鼠癫痫模型,采用 LC-MS/MS 检测毛发中 2-AG、AEA 的含量,对比分析不同癫痫发作分级小鼠 2-AG、AEA 含量差异。**结果:**标准品溶液中 AEA、2-AG 的保留时间分别为 14.3 min, 18.1 min, 毛发样品中 AEA、2-AG 的保留时间分别为 14.0 min, 17.7 min。毛发样品中 AEA 的检测限、定量限、回收率为 0.7 pg/mg, 2.1 pg/mg 和 97.9%, 毛发样品中 2-AG 的检测限、定量限、回收率为 3.2 pg/mg, 10.9 pg/mg 和 99.3%, 且二者的日内、日间变异系数均低于 15%。癫痫发作 1 级、2 级、3 级、4 级、5 级这五个分级癫痫小鼠的 AEA 含量和 2-AG 含量依次升高,不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量比较(P 均 <0.05)。**结论:**LC-MS/MS 测定癫痫小鼠毛发中 2-AG、AEA 的表达量,具有灵敏度更高,样品使用量更少等优点,可大规模样本研究。

关键词:液相色谱;串联质谱;毛发;癫痫分级;内源性大麻素

中图分类号:R-33;R742.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)06-1006-04

Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Determined the Content (2-AG, AEA) Endocannabinoids in Epileptic Mice*

MA Fu-xin¹, REN Pan¹, RUAN Zhe², CHEN Jian-mei³, WANG Li^{3Δ}

(1 Department of Burn and Plastic Surgery, Tangdu Hospital, the Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Neurology, Tangdu Hospital, the Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 Department of Ultrasound Medicine, Tangdu Hospital, the Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: The content of endocannabinoids (2-AG, AEA) was examined based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in epileptic mice. **Methods:** The mouse epilepsy model was established by pilocarpine peritoneal injection, methanol incubation and solid phase extraction column extraction, qualitatively tested under atmospheric chemical ionizing positive ion mode and multi-reaction monitoring, quantitatively tested 2-AG and AEA content by liquid chromatography and series mass spectrometry, compared the differences in 2-AG and AEA content of different seizure grades of epileptic mice. **Result:** The retention times of AEA and 2-AG in the standard solution were 14.3 min, 18.1 min, and those of AEA and 2-AG in the hair samples were 14.0 min, 17.7 min, respectively. Hair AEA, 2-AG detection limits were 0.7 pg/mg and 3.2 pg/mg, quantitative limits of 2.1 pg/mg and 10.9 pg/mg, respectively, the recovery rates were 97.9% and 99.3%, respectively, and the day and daytime coefficient of variation was less than 15%. AEA and 2-AG were increased in grade seizures, grade 1, grade 3, grade 4, and grade 2, and AEA and 2-AG were compared in hair samples of different seizure grades ($P<0.05$). **Conclusion:** The determination of endocannabinoids (2-AG, AEA) used by LC-MS/MS has the advantages of higher sensitivity and less sample use, and is conducive to large-scale sample research.

Key words: Liquid chromatography; Tandem mass spectrometry; Hair; Epilepsy stage; Endocannabinoids

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)06-1006-04

前言

癫痫是最常见神经内科综合征之一,较多见于 10 周岁以下儿童,该症儿童常伴认知功能损伤^[1]。癫痫患者的病理表现主要体现为胶质细胞异常增生、神经元损伤、中枢神经异常脱髓

鞘、免疫因子异常等^[2]。近年研究显示,内源性大麻素系统也在癫痫病理发作中有重要的作用,可调控中枢神经系统,对癫痫病情进展产生影响^[3]。目前,实验中内源性大麻素检测方法主要以液质联用(LC-MS)和气质联用(GC-MS)为主,而 LC-MS 检测样品量较大,灵敏度较低,GC-MS 灵敏度高,但不适合酸性

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81701718)

作者简介:马富鑫(1986-),男,主治医师,主要研究方向:分子生物治疗

Δ 通讯作者:王莉, E-mail: wlsx127@163.com

(收稿日期:2022-09-23 接受日期:2022-10-18)

大麻素的检测^[4]。本文旨在设计一种样品使用量相对较少、灵敏度相对较高的 LC-MS/MS 技术,利用该方法检测对癫痫小鼠毛发中内源性大麻素(2-AG、AEA)进行含量检测,对比不同癫痫发作等级小鼠 2-AG、AEA 的含量差异,分析其与癫痫发作程度之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性 C57BL/6J 小鼠共 40 只,年龄:6±1 周,体重:20.0±1.0 g,购自空军军医大学动物实验中心。饲养于(12-12)h 光暗环境,常温饲养,自由饮食。

1.1.2 试剂与仪器 KQ-250 型超声波清洗仪,购自昆山超声仪器设备公司;API3200 Q-TRAP 型质谱分析仪,购自美国应用生物科技;Agilent 1200 型液相色谱分析仪,购自美国安捷伦科技;盐酸匹鲁卡品(批号 066k1730,质量分数≥ 98%,购自美国 Sigma 公司);0.9%氯化钠溶液(批号 20190720,购自山东拓普生物工程有限公司);硫酸阿托品注射液(药品批号 1902251)和地西洋注射液(药品批号 1903101),均购自天津金耀药业。AEA、2-AG 标准品(购自美国西格玛奥德里奇公司,批号 20201014,产品质量分数高于 98%)、甲醇(色谱纯,购自北京迪科马科技)、甲酸、乙酸铵(色谱纯,购自美国赛默飞世尔科技)、去离子蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 癫痫模型的建立 取小鼠腹腔注射硫酸阿托品(1 mg·

kg⁻¹),15 min 后再腹腔注射 PILO(280 mg·kg⁻¹)以拮抗外周胆碱能反应,当小鼠出现明显癫痫症状 1 h 后,腹腔注射地西洋(10 mg·kg⁻¹)对癫痫症状予以控制。出现以下表现三项及以上者视为建模成功^[5]:① 面部抽搐;② 点头;③ 单侧前肢阵挛发作;④ 起身,双侧前肢阵挛发作;⑤ 双侧前肢阵挛发作伴倒地。

1.2.2 癫痫发作分级及胰岛素抵抗、鞘脂代谢观察 癫痫发作程度分级以 Racine 分级标准^[6]评定:1 级为仅表现出面部抽搐;2 级为除 1 级表现外,有不断点头症状;3 级为除 2 级表现外,有单侧前肢阵挛发作症状;4 级为除 3 级表现外,有双侧前肢阵挛发作症状;5 级为除 4 级表现外,有双侧前肢阵挛发作伴倒地症状。

1.2.3 2-AG、AEA 含量测定 以癫痫小鼠后枕部毛发为测量样本,首先将毛发样品采用甲醇清洗,然后置于 50℃ 烘箱 5 min,剪碎称重后置入离心管并加入 1 mL 甲醇,25℃ 水浴加热 20 min,再取出毛发样品进行离心(10000 ×g,5 min),再取上清液进行氮气吹干,再加入 50 μL 甲醇复溶,混合摇匀后加 1 mL 水稀释,加入固相萃取柱萃取,再加入 800 μL 甲醇洗脱 5 min,洗脱液利用氮气吹干后再采用流动相溶液定容至 50 μL。预处理后进行 LC-MS/MS 检测:色谱柱 迪马 PlatisilTM C18;色谱长度 150 mm;色谱内径 4.6 mm;色谱填料粒径 5 μm;流动相 90%甲醇+10%水溶液(乙酸铵浓度 2 mmol/L,PH=4.5);流速 500 μL/min;柱温 40℃;进样量 20 μL;离子化模式 APCI 正离子;多反应模式。具体离子化条件见表 1。

表 1 AEA 离子和 2-AG 离子的对和质谱条件表

Table 1 Table of the pair and mass spectrometry conditions of the AEA ions and 2-AG ions

Detection of ions	Mass / charge parention	Mass / charge subion	Collision period energy (V)	Entrance electricity press (V)	When staying Room (ms)	Export electricity press(V)
AEA	347.4	61.3	27.8	3.9	2.3	2.3
2-AG	378.6	287.6	22.4	6.5	4.7	4.7

1.3 统计学方法

以 spss20.0 软件包作数据统计分析。AEA 含量、2-AG 等计量资料采用均数±标准差表征,以 t 检验分析组间差异,以 LSD 法分析多组间差异。若 P<0.05,则比较差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 毛发样品使用量情况分析

选取正常小鼠毛发作为毛发空白样品,毛发空白样品+AEA、2-AG 标准品的 LC-MS/MS 检测色谱图如图 2 所示。由图 1 可看出,标准品溶液和待测样品毛发的 AEA、2-AG 峰都能得到很好的分离效果。标准品溶液中 AEA、2-AG 的保留时间分别为 14.3 min,18.1 min,毛发样品中 AEA、2-AG 的保留时间分别为 14.0 min,17.7 min,且出峰时间内无干扰峰。

2.2 线性范围和回收率分析

取 -60℃ 冰箱保存的 15 mg 毛发空白样品分别放入试管中,加入 50 μL AEA (2.0 ng/mL)和 2-AG (50.0 ng/mL)标准品溶液以及 1 mL 甲醇溶液,进行 LC-MS/MS 检测。每天检测 5

次平行样品,连续 3 天,以评估 LC-MS/MS 的相关测定参数。结果见表 2:毛发样品中 AEA 的检测限、定量限、回收率为 0.7 pg/mg、2.1 pg/mg 和 97.9%,毛发样品中 2-AG 的检测限、定量限、回收率为 3.2 pg/mg、10.9 pg/mg 和 99.3%,且二者的日内、日间变异系数均低于 15%。

2.3 不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量检测结果

根据 Racine 分级标准,40 只小鼠中,癫痫发作 1 级、2 级、3 级、4 级、5 级分别为 14 只、10 只、7 只、6 只、5 只。LC-MS/MS 测定方法检测不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量显示(表 3):癫痫发作 1 级、2 级、3 级、4 级、5 级这五个分级癫痫小鼠的 AEA 含量和 2-AG 含量依次升高,不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量比较,经检验分析差异具有统计学意义(P 均 <0.05)。

3 讨论

采用 LC-MS/MS 技术测定内源性大麻素表达情况时,其主要检测样品为毛发。然而,由于动物毛发的内源性大麻素含量

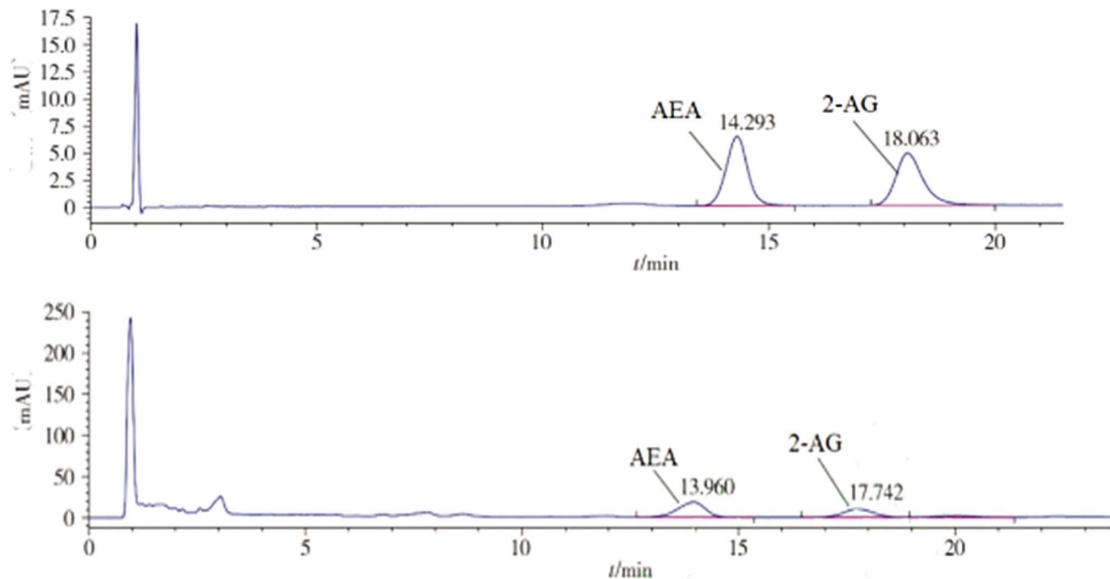


图 1 LC-MS/MS 检测色谱图

Fig. 1 The LC-MS/MS detection chromatogram

表 2 LC-MS/MS 测定参数表

Table 2 Table of LC-MS/MS

Detection of ions	Detectability (pg/mg)	Quantitative limit (pg/mg)	Percent recovery (%)	Intraday coefficient variation (%)	Daytime coefficient variation (%)	linearity range (pg/mg)
AEA	0.72	2.13	97.83±2.72	5.56	11.64	2.13-1664.48
2-AG	3.24	10.94	99.34±3.68	3.74	13.82	10.94-164.48

表 3 不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量检测结果分析表

Table 3 Analysis results of AEA content and 2-AG content in mouse hair samples with different seizure grades

Racine classify	n	AEA content(pg/mg)	2-AG content(pg/mg)
1 classify	14	50.74±9.42*	80.27±11.68*
2 classify	10	61.43±10.03*	91.23±12.71*
3 classify	7	86.67±11.11*	119.84±14.68*
4 classify	6	96.72±13.26*	141.42±15.08*
5 classify	5	106.67±15.11*	183.19±17.82

Note: The comparison of the data of seizures at grade 1,2,3,4, and 5 levels, as analyzed by the LSD method, was * $P < 0.05$.

很低,故对 LC-MS/MS 技术的测定参数要求相对较高。在学者 Matias 等^[7]的研究中显示,虽然能在人体毛发中检测出内源性大麻素,但 LC-MS/MS 检测具有处理过程复杂、耗时较长、样品用量多等缺点。本文所建立的方法具有以下优势:① 检测限低,灵敏度高,本文液相色谱-串联质谱法测定毛发 AEA, 2-AG 检测限分别为 0.7 pg/mg 和 3.2 pg/mg,而文献^[8]方法的检测限为 1.54 pg/mg 和 6.08 pg/mg;② 灵敏度高,本文液相色谱-串联质谱法测定毛发的回收率分别为 97.9%和 99.3%,日内、日间变异系数均小于 15%,相比文献^[9,10]方法由于具有更高的检测回收率和日内、日间变异系数,故有更高的灵敏度;③ 样品预处理过程简单,采用本文液相色谱-串联质谱法时,毛发预处理仅使用了 1 次液液萃取,而文献^[11,12]中方法则需要使用 3 次液液萃取。上述操作在方法上的优势主要体现在:① 检测采用了 APCI 离子化源,因 AEA 和 2-AG 属于弱极性物质,这不同

于既往研究中多采用的 ESI 离子化源^[13,14];② 采用甲醇作为有机相,是因文献^[15,16]指出 AEA 和 2-AG 的离子化效率在甲醇为流动相的环境下是既往多使用的乙腈的 10 倍;③ 在中性条件下提纯毛发中的内源性大麻素,是因文献^[17,18]的研究结果表明在碱性条件会增加 2-AG 转化为 1-AG 或 3-AG 及 o-AEA 转化为 AEA 的可能性。

内源性大麻素可对中枢神经系统及其周围组织产生系列调控作用,也可对一些生理功能和心理功能产生作用^[19]。当前, 2-AG 和 AEA 是临床研究最多的内源性大麻素物质,二者均具有类似于四氢大麻酚的三维结构,均与癫痫有着密切的关系,如可调控 CB1 受体对癫痫患者的记忆、认知、运动控制产生影响,同时也可起到癫痫患者的免疫调节作用^[20,22]。本研究运用液相色谱-串联质谱法检测 40 只不同癫痫发作分级癫痫小鼠毛发样品中 AEA 和 2-AG 含量,结果显示癫痫发作 1 级、2 级、3

级、4级、5级这五个分级癫痫小鼠的 AEA 含量和 2-AG 含量依次升高,不同癫痫发作分级小鼠毛发样品中 AEA 含量和 2-AG 含量比较(P 均 <0.05),提示内源性大麻素 2-AG、AEA 可能与癫痫病情进展之间存在关联。相关研究也证实,癫痫急性期大鼠大脑皮质及癫痫患者颞叶皮质内 2-AG、AEA 均升高,后者通过抗惊厥作用实现了一定程度的脑保护^[23-25],而慢性期中 2-AG 及 AEA 的作用受体 CB1R 的活化以抑制性神经突触为主,加上星形胶质细胞上该受体的表达上调,升高的内源性大麻素可能出现一定的促癫痫发生作用^[26,27]。在急性期向慢性期过渡中是否存在可能时间窗作用于内源性大麻素系统,从而抑制癫痫发作或癫痫发生,是未来该领域的研究方向,而灵敏且便捷的检测方法是必不可少的。

综上所述,本文建立了一种可检测毛发中 AEA、2-AG 含量的高效液相串联质谱分析方法,该方法灵敏度更高,样品使用量更少,有利于大规模样本研究,对内源性大麻素检测方法的建立具有借鉴作用。

参考文献(References)

- [1] 张贇,郑辑英,李光来,等. 癫痫发病机制研究的进展与脑损伤机制[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 6(3): 174-177
- [2] Shibata S, Matsushashi M, Kunieda T, et al. Magnetoencephalography with temporal spread imaging to visualize propagation of epileptic activity[J]. Clin Neurophysiol, 2017, 128(13): 734-743
- [3] 曹庆隽,杨风华,王华,等. 癫痫持续状态下幼年癫痫大鼠海马区星形胶质细胞: 大麻素 2 型受体调控 MAPK 通路的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(32): 5179-5185
- [4] 李俊,米要磊,王思嘉,等. 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 的工业大麻中 6 种大麻素类成分定量研究[J/OL]. 中草药, 2021, 13(10): 101-104
- [5] 刘刚. 龙胆苦苷对匹罗卡品诱发癫痫小鼠的抗癫痫作用及其对 NR2B/CaMK II /CREB 信号通路的影响[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2017
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 2020, 32(3): 281-294
- [7] Matias I, Gatta B, Tabarin A, et al. Endocannabinoids measurement in human saliva as potential bio-marker of obesity[J]. PLoS ONE, 2019, 7(7): 423-429
- [8] Mwanza C, Chen Z, Zhang Q, et al. Simultaneous HPLC-APCI-MS / MS quantification of endogenous cannabinoids and glucocorticoids in hair[J]. J Chromatogr Analyt Technol Biomed, 2019, 16(44): 1845-1849
- [9] Marczylo T H, Lam P M, Nallendran V, et al. A solid-phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple human biomatrices[J]. Anal Biochem, 2019, 384(1): 106-113
- [10] Lam PM, Marczylo TH, Konje JC, et al. Simultaneous measurement of three N-acyl ethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2020, 398(5): 2089-2097
- [11] Prestifilippo JP, Fernández-Solari J, Medina V, et al. Role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary secretion[J]. Alcohol Alcohol, 2019, 44(5): 443-448
- [12] Fezza F, Dillwith J W, Bisogno T, et al. Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick[J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1633(1): 61-67
- [13] Krumbholz A, Anielski P, Reisch N, et al. Diagnostic value of concentration profiles of glucocorticosteroids and endocannabinoids in hair[J]. Ther Drug Monit, 2018, 35(5): 600-607
- [14] 王为, 吴彦, 楚刘喜, 等. HIV 感染者毛发中糖皮质激素和内源性大麻素的高效液相-串联质谱检测[J]. 应用化学, 2020, 13(4): 51-54
- [15] 李超, 徐多麒, 王继芬, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测毛发中两种合成大麻素[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(28): 30-34
- [16] 任雁明, 解润芳, 王蕊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大麻植物中 8 种大麻素[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2021, 14(06): 101-106
- [17] 吴丽琳, 唐庆强, 陈迪, 等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法测定大麻仁油中 Δ^9 -四氢大麻酚含量 [J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(01): 35-39
- [18] Sergi M, Battista N, Montesano C, et al. Determination of the two major endocannabinoids in human plasma by μ -SPE followed by HPLC-MS / MS[J]. Bioanal Chem 2019, 405(23): 785-793
- [19] 吴琼. 内源性大麻素在中枢神经系统疾病中的作用 [J]. 国际儿科学杂志, 2019, (05): 352-355
- [20] 朱时钰, 陆永利, 杨红卫, 等. 大麻素受体 1 信号通路在癫痫中作用的研究进展[J]. 中华神经科杂志, 2019, (08): 674-677
- [21] 朱时钰. 内源性大麻素 2-AG 通过 CB1 受体对海人酸损伤尾核神经元离子通道电学活性的调制作用[D]. 三峡大学, 2020
- [22] 李德欣, 李玲, 邹明扬, 等. 内源性大麻素及其代谢酶与孤独症谱系障碍严重程度的相关性 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2020, (03): 245-246-247-248-249
- [23] Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, et al. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307: 129-37
- [24] Griebel G, Pichat P, Beeske S, et al. Selective blockade of the hydrolysis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol impairs learning and memory performance while producing antinociceptive activity in rodents[J]. Sci Rep, 2015, 5: 7642
- [25] Rocha L, Cinar R, Guevara-Guzman R, et al. Endocannabinoid System and Cannabinoid 1 Receptors in Patients With Pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy and Comorbid Mood Disorders[J]. Front Behav Neurosci, 2020, 14: 52
- [26] Chen K, Ratzliff A, Hilgenberg L, et al. Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures [J]. Neuron, 2003, 39(4): 599-611
- [27] Navarro M, Hernández E, Muñoz RM, et al. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat[J]. Neuroreport, 1997, 8(2): 491-496