

doi: 10.12452/j.fxcxb.26060802

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定正常大鼠和类风湿关节炎模型大鼠中13种单羟基脂质介质

金 波<sup>#</sup>, 陈依洋<sup>#</sup>, 梁雅晶, 胡雪鑫, 马 辰<sup>\*</sup>

(中国医学科学院 北京协和医学院, 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 该文建立了测定正常大鼠和类风湿关节炎模型大鼠心、肝、脾、肺和肾组织中13种单羟基脂质介质含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法, 包含7种羟基二十碳四烯酸(HETE)和6种羟基二十二碳六烯酸(HDHA)。前处理方法采用液液萃取法, 以含2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT)的乙酸乙酯作为提取溶剂。方法学验证结果表明, 13种待测物的方法检出限(LOD)为0.1~1.0 ng/mL, 定量下限(LOQ)为0.5~2.0 ng/mL。除4-HDHA外, 其他待测物的线性范围为LOQ~1 000 ng/mL, 且相关系数( $r$ )均大于0.99。13种待测物在3个加标水平下的回收率为82.5%~118%, 相对标准偏差(RSD)小于7.5%。日内精密度均小于5.0%, 日间精密度均小于6.0%。样品溶液在室温下3 h内稳定, 在4 °C下72 h内稳定。该方法灵敏、准确、重现性好。应用该方法检测了正常和类风湿关节炎大鼠各组织中13种单羟基脂质介质的含量。结果表明, 正常大鼠不同器官中单羟基脂质介质的分布存在明显差异, 类风湿关节炎大鼠心、肝、脾和肾组织中多数HETE和HDHA呈升高趋势, 提示类风湿关节炎可引发大鼠各器官的炎症代谢改变。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱; 单羟基脂质介质; 类风湿关节炎; 羟基二十碳四烯酸; 羟基二十二碳六烯酸

中图分类号: O657.7; R593.22 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2026)11-0001-08

## Determination of 13 Monohydroxy Lipid Mediators in Normal Rats and Rats with Rheumatoid Arthritis Using Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

JIN Bo<sup>#</sup>, CHEN Yi-yang<sup>#</sup>, LIANG Ya-jing, HU Xue-xin, MA Chen<sup>\*</sup>

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** An analytical method based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed to determine the concentrations of 13 monohydroxy lipid mediators—comprising seven hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and six hydroxydocosahexaenoic acids (HDHAs)—in the heart, liver, spleen, lung, and kidney tissues of normal rats and rats with rheumatoid arthritis. The sample preparation method employed liquid-liquid extraction, with ethyl acetate containing butylated hydroxytoluene as the extraction solvent. The validation results showed that the limits of detection for the 13 monohydroxy lipid mediators ranged from 0.1 to 1.0 ng/mL, and the limits of quantification (LOQ) ranged from 0.5 to 2.0 ng/mL. Except for 4-HDHA, the linear range for the other analytes ranged from LOQ to 1 000 ng/mL, and the correlation coefficients ( $r$ ) exceeded 0.99. Recoveries of the 13 analytes at three spiked levels ranged from 82.5% to 118%, with relative standard deviations that were lower than 7.5%. The intra- and inter-day precisions were lower than 5.0% and 6.0%, respectively. The sample solution was stable for 3 h at room temperature and for 72 h at 4 °C. The proposed method is sensitive, accurate, and reproducible. The method was used to determine the levels of HETE and HDHA in various tissues of normal rats and rats with rheumatoid arthritis. The results showed significant differences in the distribution of monohydroxy lipid mediators

收稿日期: 2026-06-08; 修回日期: 2026-07-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(82304436)

\* 通讯作者: 马 辰, 硕士, 研究员, 研究方向: 基于色谱、质谱的分析新方法开发及应用, E-mail: mach@imm.ac.cn

<sup>#</sup> 共同第一作者

in different organs of normal rats. Furthermore, most HETE and HDHA levels in the heart, liver, lung, and kidney tissues of rats with rheumatoid arthritis increased, indicating that rheumatoid arthritis can cause inflammatory metabolic changes in various rat organs.

**Key words:** ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; monohydroxy lipid mediator; rheumatoid arthritis; HETE; HDHA

脂质介质是由多不饱和脂肪酸(PUFA)经酶促或非酶促氧化代谢后生成的一类生物活性小分子,在炎症调控、血管功能和神经活动等生理过程中发挥重要作用<sup>[1-3]</sup>。花生四烯酸(AA)和二十二碳六烯酸(DHA)是体内重要的 PUFA,主要经脂氧合酶(LOX)或细胞色素 P450(CYP450)途径分别生成两类脂质介质:羟基二十碳四烯酸(HETE)和羟基二十二碳六烯酸(HDHA),它们在炎症中发挥重要作用。多项研究表明,HETE 具有促炎作用。5-、11-、12-和 15-HETE 在溃疡性结肠炎患者的结肠黏膜活检组织中显著升高,并与炎症严重程度相关<sup>[4]</sup>。过敏性哮喘和重症哮喘患者体内多种 HETE 大量生成,表明其参与急性炎症反应过程<sup>[5]</sup>。多种 HETE 如 5-, 12-和 20-HETE 作为促炎因子可调控糖尿病发生过程中的炎症反应<sup>[6]</sup>。20-HETE 在关节炎中作为促炎介质发挥效应<sup>[7]</sup>。而 HDHA 表现出抗炎活性。17(S)-HDHA 被证实可预防高同型半胱氨酸血症诱导的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体形成,并抑制白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的产生,提示了其在肾脏保护和抗炎方面的潜力<sup>[8]</sup>。4-HDHA 可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )通路、抑制细胞凋亡和炎症反应以缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎,有望成为溃疡性结肠炎的新型治疗候选药物<sup>[9]</sup>。

类风湿关节炎可引起心、肾、肺等损伤<sup>[10]</sup>,但其对各脏器的炎症影响研究较少。Wang 等<sup>[11-12]</sup>采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测了类风湿关节炎模型大鼠的关节、脏器组织和血浆中 AA 的 LOX 和环氧化酶代谢产物,这些代谢物可有效表征炎症程度,其中包括 4 种 HETE;结果显示,包含 HETE 在内的多种代谢物在模型鼠的关节、各脏器和血中显著升高。除关节炎模型外,与脂质介质在各脏器分布相关的分析方法和应用也值得借鉴。Chiu 等<sup>[13]</sup>采用气相色谱法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定了野生型和 fat-1 小鼠(n=3 PUFA 增加)中 AA、DHA、二十碳五烯酸(EPA)及其脂质介质 HETE、HDHA 和羟基二十碳五烯酸(HEPE)在各脏器组织中的含量;结果表明, fat-1 小鼠各脏器中, HETE 含量保持不变或轻度降低, HDHA 升高 1~3 倍, HEPE 生成量最为显著。目前,类风湿关节炎模型中脂质介质的检测偏向与 AA 有关的炎症代谢物,而生物体是一个复杂的调节系统,促炎与抗炎活动可能并行发生,与 DHA 有关的抗炎性代谢物的含量和分布变化可在一定程度上指征体内的抗炎和炎症消退活动。因此,本研究拟建立 UPLC-MS/MS 法同时测定正常大鼠和类风湿关节炎模型大鼠的各脏器组织(心、肝、脾、肺和肾)中 13 种 HETE 和 HDHA 含量,获得正常大鼠和类风湿关节炎模型大鼠中相关脂质介质的组织分布及含量变化,并分析类风湿关节炎对各脏器的炎症影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与设备

UFLC-20AD XR 超高效液相色谱(日本岛津制作所)与 SCIEX Qtrap 5500 质谱(美国 SCIEX 公司)联用仪; Sigma 3-30KS 高速冷冻离心机(德国 Sigma Laborzentrifugen 公司); RVC 2-18 CDplus 真空离心浓缩仪(德采实仪器设备(北京)有限公司)配备 JM50-PLUS 高效低温冷阱(北京吉艾姆科技有限公司); 涡旋振荡器(天津艾尔世科技有限公司); KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XPE205 天平、RAININ 微量移液器(梅特勒托利多国际有限公司); Eppendorf 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); Master Prep 多样本组织均质器(上海净信科技有限公司); 超低温保存箱(海尔集团)。

### 1.2 试剂、标准品与材料

14 种对照品: 5-HETE、8-HETE、11-HETE、12-HETE、15-HETE、17-HETE、18-HETE、4-HDHA、7-HDHA、10-HDHA、11-HDHA、3-HDHA、20-HDHA、12-HETE-D<sub>8</sub>溶液(均为 100  $\mu\text{g/mL}$ , 美国 Cayman Chemical 公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 甲醇、乙腈、异丙醇(HPLC 级, Fisher 科技公司); 乙酸乙酯(HPLC 级, 美国 Honeywell 国际公司); 甲酸(HPLC 级, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT, 美国 MCE 公司); 无菌磷酸盐缓冲液(PBS, 武汉博士

德生物工程有限公司);牛血清白蛋白(BSA, 上海碧云天生物技术有限公司);不完全费氏佐剂、Ⅱ型牛胶原蛋白(免疫级, 美国 Chondrex 公司)。

### 1.3 动物实验

Wista 雄性大鼠, 体重(200±30) g, 维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2021-0006, 饲养条件为 12 h 光/黑暗循环, 环境控制恒定温湿度, 所有动物实验步骤和操作均由中国医学科学院药物研究所实验动物管委会批准(伦理审批号 IMM-S-25-0662)。

造模剂: 将冷冻保存的Ⅱ型牛胶原蛋白和不完全费氏佐剂置于冰上解冻, 按 1:1(体积比)混合成完全均匀的白色乳剂。

将大鼠随机分为对照组和模型组( $n=7$ ), 对照组不做处理, 模型组皮下注射 0.2 mL 造模剂, 7 d 后再次注射 0.2 mL 造模剂, 期间定时查看大鼠关节肿胀现象, 至 22 d 对大鼠类风湿关节炎造模情况进行评价, 其类风湿指数均大于 4, 符合标准, 诱导造模成功。造模 28 d 后, 将各组大鼠处死, 收集心、肝、脾、肺、肾组织样本, 迅速置于-80 °C 冰箱冻存。

### 1.4 样品前处理

内标(IS)溶液配制: 取 12-HETE- $D_8$  溶液适量, 以甲醇稀释成 50 ng/mL 的 IS 溶液。

将各组织样本称重, 并按 1 g:10 mL 的比例加水匀浆。取组织匀浆液 0.5 mL(相当于 50 mg 组织), 加 IS 溶液 100  $\mu$ L、乙酸乙酯(含 20  $\mu$ g/mL BHT)溶液 1.2 mL, 以 2 500 r/min 涡旋振荡 3 min, 离心(4 °C, 15 000 r/min)10 min, 取上清液 1 mL, 至真空离心浓缩仪挥干后, 加甲醇 100  $\mu$ L, 涡旋 3 min, 超声 3 min, 再充分涡旋后离心(4 °C, 15 000 r/min)10 min, 取上清液, 待测。除涡旋振荡、超声和离心浓缩步骤外, 其他样品前处理步骤均在冰上进行。

### 1.5 标准溶液样本的制备

精密量取 HETE 和 HDHA 各对照品适量, 以 IS 溶液配制成 1 000 ng/mL 混合标准溶液, 并以 IS 溶液定量稀释至 0.1、0.25、0.5、0.8、1、2、5、10、50、100、200、400、500 ng/mL 标准工作溶液。

以含 10 mg/mL BSA 的 PBS 溶液作为替代基质。取替代基质 0.5 mL, 加各浓度标准工作溶液 100  $\mu$ L、乙酸乙酯(含 20  $\mu$ g/mL BHT)溶液 1.2 mL, 以 2 500 r/min 涡旋振荡 3 min, 离心(4 °C, 15 000 r/min)10 min, 取上清液 1 mL, 用真空离心浓缩仪挥干后, 加甲醇 100  $\mu$ L, 涡旋 3 min, 超声 3 min, 再充分涡旋后离心(4 °C, 15 000 r/min)10 min, 取上清液, 即为各浓度的标准溶液样本。除涡旋振荡、超声和离心浓缩步骤外, 其他样品前处理步骤均在冰上进行。

### 1.6 分析条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH  $C_{18}$  色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7  $\mu$ m), 乙腈/异丙醇(4:1, 含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸水溶液(85:15)为流动相, 流速 0.1 mL/min, 运行时间 25 min, 样品室温度 4 °C。

质谱条件: 电喷雾(ESI)离子源, 负离子模式, 多反应监测(MRM)扫描模式, 质谱参数: 气帘气(CUR)241 kPa(35 psi), 离子喷雾电压-4500 V, 离子源温度(TEM)475 °C, 雾化气(GS1)414 kPa(60 psi), 去溶剂气(GS2)414 kPa(60 psi), 解簇电压(DP)-60 V, 碰撞能量(CE)-25 V。MRM 离子对如表 1 所示。

表 1 13 种目标化合物和 IS 的 MRM 参数  
Table 1 MRM parameters of 13 target compounds and internal standard

| Compound       | Q1 mass/Da | Q3 mass/Da | Dwell time/ms |
|----------------|------------|------------|---------------|
| 5-HETE         | 319        | 115        | 10            |
| 8-HETE         | 319        | 155        | 10            |
| 11-HETE        | 319        | 167        | 10            |
| 12-HETE        | 319        | 179        | 10            |
| 15-HETE        | 319        | 175        | 10            |
| 17-HETE        | 319        | 247        | 10            |
| 18-HETE        | 319        | 261        | 10            |
| 12-HETE- $D_8$ | 327        | 184        | 10            |
| 4-HDHA         | 343        | 101        | 10            |
| 7-HDHA         | 343        | 141        | 10            |

(续表 1)

| Compound | Q1 mass/Da | Q3 mass/Da | Dwell time/ms |
|----------|------------|------------|---------------|
| 10-HDHA  | 343        | 153        | 10            |
| 11-HDHA  | 343        | 149        | 10            |
| 13-HDHA  | 343        | 193        | 10            |
| 20-HDHA  | 343        | 241        | 10            |

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器条件优化

对比了 Waters Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm) 和 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 发现后者对脂质介质的保留能力更强, 有利于分离, 故选择 BEH 柱。此外, 考察了有机相和水相不同比例(95:5、90:10、85:15 和 80:20) 的分离效果, 结果表明有机相与水相比比例为 95:5 和 90:10 时, 待测物的保留时间聚集, 共流出峰较多; 当调整比例为 85:15 和 80:20 时, 可使待测物峰与其他干扰峰分离, 且保留时间适中(5.9~8.6 min), 所以最终选择 85:15 作为有机相与水相的洗脱比例。13 种单羟基脂质介质标准样品的提取离子流图见图 1。

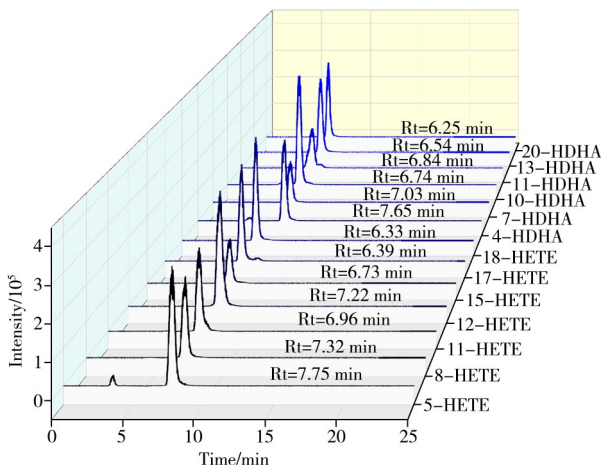


图 1 13 种单羟基脂质介质标准样品的提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion current chromatograms of 13 monohydroxy lipid mediators

目标脂质介质为脂肪酸衍生物, 均带有羧基, 在负离子模式下有较好的响应, 因此选择负离子扫描模式。质谱扫描首先对每个对照品进行全扫描和子离子扫描, 选择响应高且具有结构特征的子离子作为定量离子, 并优化合适的碰撞能量。结果表明, HETE 和 HDHA 在 25 V 和 30 V 均有较好的离子碎裂, 但 25 V 条件下定量离子对的响应比 30 V 更高, 所以最终选择 25 V 作为碰撞能量。其他优化后的参数见“1.6”。

### 2.2 样品前处理条件优化

因目标脂质介质在溶液中不稳定, 所以加入适量 BHT 作为抗氧化剂提高稳定性。此外, 本实验分别对比了以甲醇、乙腈作为沉淀溶剂的蛋白质沉淀法, 和以乙酸乙酯、正己烷作为提取剂的液液萃取法, 以优选出合适的提取方法。组织样本经乙腈蛋白沉淀后的上清液有漂浮物, 使得后续处理变复杂, 故不选乙腈。进一步, 以替代基质加标样本为研究对象, 分别加入甲醇、乙酸乙酯和正己烷(均含 BHT), 经涡旋、离心后取上清液或上层萃取液挥干、复溶后, 与相同浓度的混合标准溶液比较, 计算回收率( $n=3$ )。结果显示, 分别以正己烷、甲醇、乙酸乙酯为提取溶剂时, 13 种待测物的回收率依次为 24%~96%、48%~131%、80%~113%, 所以最终确定乙酸乙酯(含 BHT)作为提取溶剂。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 标准曲线、检出限和定量下限** 使用“1.5”的标准溶液样本进样分析, 以 3 倍信噪比对应的浓度作为检出限(LOD), 以 5 倍信噪比以上并符合准确度和精密度偏差均小于±20%的浓度作为定量下限(LOQ)。以各目标物的质量浓度( $c$ )为横坐标, 面积响应值为纵坐标, 权重为  $1/c^2$ , 拟合标准曲线, 结果如表 2 所示。目标化合物的 LOD 为 0.1~1.0 ng/mL, LOQ 为 0.5~2.0 ng/mL, 表明方法灵敏度良好。除 4-HDHA 的线性范围上限为 500 ng/mL 外, 其他代谢物的线性范围均为 LOQ~1 000 ng/mL, 且相关系数( $r$ )均大于 0.99, 说明方法的线性关系良好。

将各浓度点的面积响应值代入回归方程得到浓度值, 计算相对偏差 RE=(计算值-标示值)/标示值×100%。结果表明, 在 LOQ 浓度下各化合物的 RE 均小于 6%, 在其他浓度水平下均小于 16%, 说明标准曲线可以准确计算样品浓度。

**2.3.2 回收率和基质效应** 在替代基质中添加低(LOQ)、中(100 ng/mL)和高(500 ng/mL)3 个浓度水平的混合标准物质进行加标回收实验(每个水平  $n=5$ ), 计算回收率及其相对标准偏差(RSD)。表 3 结果

表明, LOQ 加标水平下的回收率为 82.5%~118%, RSD 为 0.90%~5.0%; 中浓度水平的回收率为 87.6%~103%, RSD 为 0.50%~2.4%; 高浓度水平的回收率为 85.6%~109%, RSD 为 0.50%~7.1%, 均符合人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)M10《生物分析方法验证及样品分析》要求<sup>[14]</sup>。

表2 目标化合物的线性参数、检出限和定量下限

Table 2 Linear parameters, limits of detection, and limits of quantification of target compounds

| No. | Compound | Regression equation | Linear range/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | <i>r</i> | LOD/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | LOQ/(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|-----|----------|---------------------|-------------------------------------|----------|----------------------------|----------------------------|
| 1   | 5-HETE   | $Y=0.031X-0.005$    | 1~1 000                             | 0.996    | 0.5                        | 1.0                        |
| 2   | 8-HETE   | $Y=0.020X$          | 1~1 000                             | 0.999    | 0.5                        | 1.0                        |
| 3   | 11-HETE  | $Y=0.114X+0.011$    | 0.5~1 000                           | 0.997    | 0.1                        | 0.5                        |
| 4   | 12-HETE  | $Y=0.036X+0.001$    | 1~1 000                             | 0.999    | 0.5                        | 1.0                        |
| 5   | 15-HETE  | $Y=0.013X+0.001$    | 1~1 000                             | 0.998    | 0.5                        | 1.0                        |
| 6   | 17-HETE  | $Y=0.025X+0.007$    | 2~1 000                             | 0.999    | 0.5                        | 2.0                        |
| 7   | 18-HETE  | $Y=0.027X+0.003$    | 1~1 000                             | 0.999    | 0.5                        | 1.0                        |
| 8   | 4-HDHA   | $Y=0.026X-0.002$    | 2~500                               | 0.995    | 0.5                        | 2.0                        |
| 9   | 7-HDHA   | $Y=0.012X+0.009$    | 2~1 000                             | 0.999    | 0.8                        | 2.0                        |
| 10  | 10-HDHA  | $Y=0.035X+0.001$    | 1~1 000                             | 0.999    | 0.5                        | 1.0                        |
| 11  | 11-HDHA  | $Y=0.015X+0.008$    | 2~1 000                             | 0.999    | 0.8                        | 2.0                        |
| 12  | 13-HDHA  | $Y=0.026X+0.001$    | 1~1 000                             | 0.998    | 0.5                        | 1.0                        |
| 13  | 20-HDHA  | $Y=0.010X+0.001$    | 2~1 000                             | 0.997    | 1.0                        | 2.0                        |

取替代基质平行 6 份, 按照“1.4”进行前处理后, 在复溶时其中 3 份加低(2 ng/mL)或高浓度(400 ng/mL)混合标准溶液, 其余 3 份作为空白基质用于扣除背景, 并与相应混合标准溶液比较, 计算基质效应( $n=3$ )及其 RSD(见表 3)。结果表明, 近 LOQ 水平(2 ng/mL)的基质效应为 88.2%~105%, RSD 小于 10%, 高浓度水平的基质效应为 91.3%~104%, RSD 小于 4%, 符合 ICH M10 要求。

表3 回收率和基质效应结果

Table 3 Results for recoveries and matrix effects

| Compound | Spiked LOQ |       | Spiked 100 ng/mL |       | Spiked 500 ng/mL |       | Spiked 2 ng/mL |       | Spiked 400 ng/mL |       |
|----------|------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|----------------|-------|------------------|-------|
|          | Recovery/% | RSD/% | Recovery/%       | RSD/% | Recovery/%       | RSD/% | ME/%           | RSD/% | ME/%             | RSD/% |
| 5-HETE   | 94.5       | 2.8   | 101              | 1.3   | 98.5             | 1.4   | 101            | 0.40  | 104              | 3.1   |
| 8-HETE   | 105        | 4.0   | 103              | 1.2   | 101              | 0.70  | 104            | 1.2   | 103              | 3.1   |
| 11-HETE  | 100        | 1.6   | 103              | 0.70  | 102              | 1.0   | 98.5           | 1.0   | 100              | 1.4   |
| 12-HETE  | 102        | 2.1   | 102              | 1.0   | 101              | 0.60  | 101            | 1.2   | 101              | 1.6   |
| 15-HETE  | 95.9       | 5.0   | 96.3             | 0.50  | 95.6             | 2.1   | 88.2           | 2.0   | 91.3             | 3.2   |
| 17-HETE  | 93.0       | 3.3   | 87.6             | 2.3   | 86.2             | 5.4   | 105            | 1.4   | 98.5             | 1.4   |
| 18-HETE  | 82.5       | 0.90  | 92.5             | 2.4   | 85.6             | 3.3   | 105            | 1.6   | 99.4             | 0.40  |
| 4-HDHA   | 98.9       | 2.9   | 99.6             | 1.0   | 97.5             | 1.2   | 103            | 4.3   | 104              | 3.5   |
| 7-HDHA   | 118        | 5.0   | 102              | 1.2   | 99.6             | 0.50  | 103            | 9.8   | 101              | 1.1   |
| 10-HDHA  | 94.5       | 2.1   | 97.4             | 0.80  | 97.3             | 1.7   | 94.8           | 4.8   | 92.4             | 2.4   |
| 11-HDHA  | 92.0       | 2.3   | 98.7             | 1.6   | 97.8             | 2.0   | 96.4           | 6.6   | 95.5             | 1.7   |
| 13-HDHA  | 95.7       | 2.9   | 92.7             | 0.90  | 93.1             | 2.7   | 96.2           | 3.7   | 95.2             | 2.3   |
| 20-HDHA  | 104        | 4.1   | 100              | 1.4   | 109              | 7.1   | 104            | 0.90  | 102              | 1.0   |

2.3.3 精密度和稳定性 分别以 LOQ 和 500 ng/mL 浓度的混合标准溶液连续进样分析( $n=6$ ), 计算日内精密度; 以相同浓度连续 3 d 进样分析( $n=6$ ), 计算日间精密度。结果表明, 在 LOQ 和高浓度水平下的日内精密度均小于 5.0%, 日间精密度均小于 6.0%, 说明方法精密度良好。

替代基质中加低(LOQ 或接近 LOQ)和高(400 或 500 ng/mL)浓度混合标准溶液, 按照“1.4”步骤处理样品得到待测溶液, 分别考察室温、4℃以及冻融循环的样品稳定性。由于样品前处理步骤及测试均在 0~4℃进行, 所以考察样品溶液在 4℃时的稳定性, 分别计算样品放置 24 h、48 h 和 72 h 与初始样品的峰面积比值, 发现低和高浓度基质加标样品放置 72 h 与初始的峰面积比为 0.90~1.05, 说明样品在 4℃时放置 72 h 内稳定。由于样品前处理中涡旋振荡、超声和离心浓缩步骤均为室温操作, 且总时长不超过 1.5 h, 所以考察样品在室温 3 h 内的稳定性。结果表明, 低和高浓度基质加标样品在室温 3 h 与初始的峰面积比为 0.95~1.14, 表明样品溶液在室温 3 h 内稳定。低和高浓度基质加标样品在 -80℃冻融 3 次, 发现低浓度样品冻融 2 次后与初始的峰面积比为 0.87~1.18, 高浓度样品冻融 2 次后与初始的峰面积比为 0.87~1.02, 说明样品冻融 2 次稳定。

## 2.4 样品测定

**2.4.1 HETE 和 HDHA 在正常和模型大鼠中的测定结果** 对照组和模型组大鼠脏器中 13 种 HETE 和 HDHA 的含量结果见表 4。除了 17-HETE 在心、脾、肺和肾中未检出, 18-HETE 在心脏中未检出, 7-HDHA 在肝脏中未检出外, 其他被测脂质介质均可测定。

表 4 对照组和模型组组织样本 HETE 和 HDHA 中的测定结果

Table 4 Determination results for HETE and HDHA in tissue samples of the control and model groups  $w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$

| Compound | Heart            |                               | Liver            |                  | Spleen           |                  | Lung             |                               | Kidney           |                               |
|----------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
|          | BK <sup>a</sup>  | RA <sup>a</sup>               | BK <sup>a</sup>  | RA <sup>a</sup>  | BK <sup>a</sup>  | RA <sup>a</sup>  | BK <sup>a</sup>  | RA <sup>a</sup>               | BK <sup>a</sup>  | RA <sup>a</sup>               |
| 5-HETE   | 0.039<br>(0.013) | 0.039<br>(0.010)              | 0.174<br>(0.159) | 0.158<br>(0.096) | 0.148<br>(0.101) | 0.142<br>(0.138) | 0.262<br>(0.133) | 0.275<br>(0.183)              | 0.288<br>(0.127) | 0.321<br>(0.250)              |
| 8-HETE   | 0.037<br>(0.009) | 0.044<br>(0.010)              | 0.081<br>(0.037) | 0.094<br>(0.032) | 0.288<br>(0.101) | 0.263<br>(0.151) | 0.385<br>(0.156) | 0.659<br>(0.448)              | 0.116<br>(0.049) | 0.126<br>(0.063)              |
| 11-HETE  | 0.152<br>(0.024) | 0.180<br>(0.029)              | 0.691<br>(0.174) | 0.851<br>(0.208) | 1.833<br>(0.261) | 1.917<br>(0.360) | 0.713<br>(0.065) | 0.787<br>(0.072)              | 0.585<br>(0.179) | 0.679<br>(0.217)              |
| 12-HETE  | 0.303<br>(0.044) | 0.359<br>(0.118)              | 0.138<br>(0.050) | 0.168<br>(0.052) | 2.590<br>(1.050) | 2.459<br>(0.918) | 3.897<br>(2.114) | 9.215<br>(7.197)              | 0.236<br>(0.092) | 0.275<br>(0.169)              |
| 15-HETE  | 0.228<br>(0.043) | 0.243<br>(0.039)              | 0.780<br>(0.423) | 0.929<br>(0.191) | 1.492<br>(0.209) | 1.598<br>(0.367) | 0.598<br>(0.078) | 0.612<br>(0.112)              | 1.046<br>(0.381) | 1.473<br>(0.804)              |
| 17-HETE  | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>               | 0.023<br>(0.011) | 0.022<br>(0.006) | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>               | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>               |
| 18-HETE  | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>               | 0.057<br>(0.029) | 0.070<br>(0.015) | 0.024<br>(0.009) | 0.031<br>(0.019) | 0.029<br>(0.016) | 0.026<br>(0.016)              | 0.012<br>(0.004) | 0.018 <sup>c</sup><br>(0.005) |
| 4-HDHA   | 0.016<br>(0.007) | 0.020<br>(0.003)              | 0.024<br>(0.018) | 0.024<br>(0.014) | 0.021<br>(0.018) | 0.023<br>(0.032) | 0.006<br>(0.001) | 0.011 <sup>c</sup><br>(0.005) | 0.089<br>(0.070) | 0.089<br>(0.063)              |
| 7-HDHA   | 0.008<br>(0.003) | 0.013 <sup>c</sup><br>(0.002) | ND <sup>b</sup>  | ND <sup>b</sup>  | 0.014<br>(0.005) | 0.012<br>(0.010) | 0.024<br>(0.010) | 0.041<br>(0.031)              | 0.017<br>(0.009) | 0.024<br>(0.010)              |
| 10-HDHA  | 0.035<br>(0.011) | 0.048 <sup>c</sup><br>(0.008) | 0.069<br>(0.018) | 0.065<br>(0.020) | 0.040<br>(0.017) | 0.031<br>(0.021) | 0.059<br>(0.027) | 0.114<br>(0.106)              | 0.038<br>(0.017) | 0.046<br>(0.018)              |
| 11-HDHA  | 0.091<br>(0.030) | 0.140 <sup>c</sup><br>(0.027) | 0.203<br>(0.063) | 0.224<br>(0.045) | 0.151<br>(0.034) | 0.123<br>(0.040) | 0.271<br>(0.114) | 0.388<br>(0.263)              | 0.097<br>(0.039) | 0.122<br>(0.047)              |
| 13-HDHA  | 0.088<br>(0.024) | 0.104<br>(0.017)              | 0.241<br>(0.061) | 0.275<br>(0.062) | 0.209<br>(0.045) | 0.190<br>(0.049) | 0.369<br>(0.168) | 0.458<br>(0.156)              | 0.103<br>(0.038) | 0.126<br>(0.040)              |
| 20-HDHA  | 0.081<br>(0.026) | 0.116 <sup>c</sup><br>(0.017) | 0.160<br>(0.102) | 0.212<br>(0.082) | 0.105<br>(0.043) | 0.086<br>(0.045) | 0.128<br>(0.063) | 0.148<br>(0.072)              | 0.170<br>(0.073) | 0.252<br>(0.137)              |

a: values are expressed as means(standard deviations), BK refers to the control group, RA refers to the rheumatoid arthritis model group; b: ND indicates not detected; c: statistical comparisons between the control and model groups were performed using the Mann-Whitney U-test, where  $*p<0.05$

**2.4.2 HETE 和 HDHA 在正常大鼠中的组织分布** 图 2 统计了正常大鼠(对照组)HETE 和 HDHA 的组织分布。结果表明, 8-HETE 和 12-HETE 在肺和脾中分布较多, 肺分布占 42%~55%, 脾分布占 32%~36%。11-HETE 在脾中分布最多(46%), 其次是肺(18%)、肝(17%)和肾(15%)。5-HETE 和 15-HETE 在肝、脾、肺和肾分布中较为均衡。上述 HETE 在心脏中普遍较低, 只占 4%~6%。17-HETE 和 18-HETE 在肝脏中较高, 且 17-HETE 只在肝脏中检出, 在其他脏器中含量较低未达检出限。HDHA 方面, 除 7-HDHA 在肝脏中含量低于检出限外, 其他 HDHA 在各组织中均有分布。其中, 4-HDHA 主要在肾中分布(占 58%), 10-HDHA、11-HDHA、13-HDHA 和 20-HDHA 在各脏器中分布较为均衡。这显示了不同器官中单羟基脂质介质的分布存在明显差异。

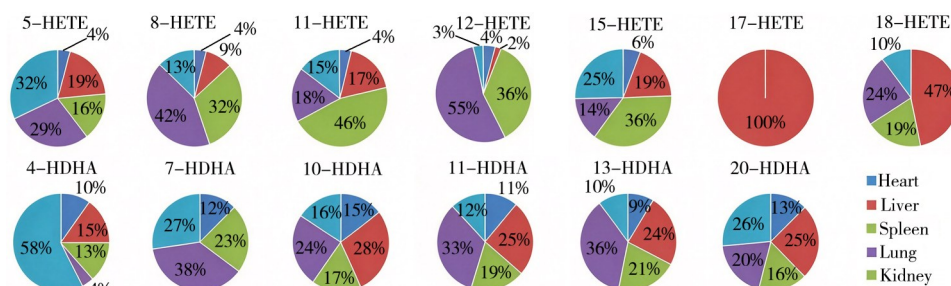


图 2 目标 HETE 和 HDHA 在不同器官中的分布比例

Fig. 2 Distribution ratios of targeted HETE and HDHA across different organs

**2.4.3 HETE 和 HDHA 在类风湿关节炎模型大鼠中的含量变化** 图3统计了单个 HETE 和 HDHA 模型组与对照组的倍率变化(FC)热图。除脾外, 绝大多数的 HETE 和 HDHA 含量在类风湿关节炎模型大鼠的心、肝、肺和肾组织中均呈升高趋势。进一步, 图4呈现了 HETE 和 HDHA 的柱状堆叠图及其倍率变化。与单独 HETE 和 HDHA 趋势一致, 除脾外, 总 HETE 和总 HDHA 在关节炎大鼠各器官中均有增加。其中, 总 HETE 的倍率变化在肺中最高, 达到 2.0, 主要贡献来自于 12-HETE 和 8-HETE, 它们在类风湿关节炎模型大鼠中 FC 值分别达 2.4 和 1.7 倍(图 3); 其次是肾(FC 1.3), 主要来自于 18-HETE 和 15-HETE 的增加, 在模型大鼠中 FC 值分别增至 1.5 和 1.4 倍; 再次是肝(FC 1.2)和心(FC 1.1), 在脾中未有明显变化(FC 1.0)。同时, 总 HDHA 在类风湿关节炎模型大鼠的心、肺和肾中均有明显增加, FC 分别达到 1.4、1.4 和 1.3, 这归因于被测 HDHA 在这 3 种组织中的含量明显提升; 其次是肝(FC 1.1), 在脾中略有下降(FC 0.9)。

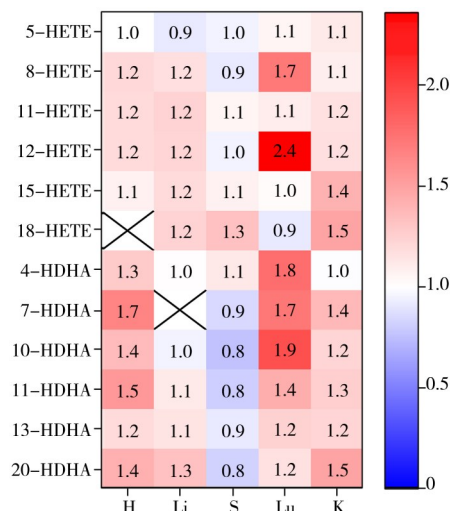


图3 HETE 和 HDHA 模型组与对照组的倍率变化热图

Fig. 3 Heatmap of fold changes for HETE and HDHA between the model and control groups  
H: heart, L: liver, S: spleen, Lu: lung, K: kidney

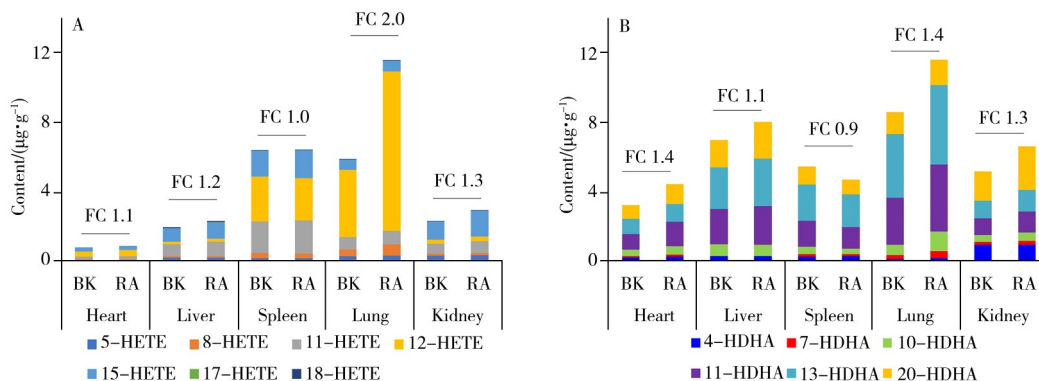


图4 HETE(A)和HDHA(B)的柱状堆叠图及其在不同器官中的倍率变化

Fig. 4 Bar charts of HETE (A) and HDHA (B) and their fold changes in different organs

一般而言, HETE 表现为促炎作用, 而 HDHA 为抗炎或促炎症消退物质。在生物体内,  $n-3$  PUFA (如 DHA) 会和  $n-6$  PUFA (如 AA) 竞争酶底物, 进而产生具有抗炎或促消退作用的 HDHA 等脂质介质; 补充体内  $n-3$  PUFA 可改变脂质代谢物谱, 将代谢从促炎的  $n-6$  产物转向抗炎的  $n-3$  产物<sup>[13]</sup>。另有研究表明, DHA 的摄入可以减少由 AA 引起的促炎物质 (如 HETE), 增加促消退物质 (如 HDHA)<sup>[15]</sup>。本研究的类风湿关节炎模型大鼠中, 无论是单独还是总体的 HETE 和 HDHA, 它们在心、肝、肺和肾组织中均呈升高趋势, 说明类风湿关节炎会引起大鼠各脏器的炎症代谢物谱变化, 同时也体现了体内促炎和抗炎的共同发生和平衡调控。

### 3 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱检测正常和类风湿关节炎模型大鼠各器官中 13 种单羟基脂质介质含量的分析方法。方法学验证结果表明, 该方法灵敏、准确, 重现性好。13 种脂质介质的检出限为 0.1~1.0 ng/mL, 定量下限为 0.5~2.0 ng/mL, 不同浓度水平的加标回收率为 82.5%~118%, 日内和日间精密度均不大于 6.0%。本方法适合于生物体内各组织中 HETE 和 HDHA 脂质介质的检测。本研究展示了正常大鼠中待测 HETE 和 HDHA 在心、肝、脾、肺、肾各组织间的差异性分布情况, 并发现在类风湿关节炎模型大鼠心、肝、肺和肾组织中多数 HETE 和 HDHA 均呈升高趋势, 说明类风湿关节炎可以引起大鼠各脏器的炎症代谢变化, 也提示了体内促炎和抗炎的共同发生和平衡调控。

## 参考文献:

- [1] Vomero M, Lamberti L, Corberi E, Currado D, Marino A, Berardicurti O, Fava M, Leuti A, Maccarrone M, Giacomelli R, Navarini L. *Autoimmun Rev.*, **2025**, 24(11): 103896.
- [2] Dyall S C, Balas L, Bazan N G, Brenna J T, Chiang N, da Costa Souza F, Dalli J, Durand T, Galano J M, Lein P J, Serhan C N, Taha A Y. *Prog. Lipid Res.*, **2022**, 86: 101165.
- [3] Harwood J L. *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24(10): 8838.
- [4] Masoodi M, Pearl D S, Eiden M, Shute J K, Brown J F, Calder P C, Trebble T M. *PLoS One*, **2013**, 8(10): e76532.
- [5] Kytikova O Y, Kovalenko I S, Novgorodtseva T P, Denisenko Y K. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **2024**, 519(1): 512–520.
- [6] Dong L, Wang H, Chen K, Li Y. *Biomed. Pharmacother.*, **2022**, 156: 113981.
- [7] Hoxha M, Zappacosta B. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2020**, 146: 106405.
- [8] Li G, Chen Z, Bhat O M, Zhang Q, Abais-Battad J M, Conley S M, Ritter J K, Li P L. *J. Lipid Res.*, **2017**, 58(6): 1080–1090.
- [9] Li R, Zheng M, Zhai Y, Li L, Li W, Li S, Zuo X, Li Y. *Int. Immunopharmacol.*, **2025**, 166: 115614.
- [10] Wu D, Luo Y, Li T, Zhao X, Lv T, Fang G, Ou P, Li H, Luo X, Huang A, Pang Y. *Front. Immunol.*, **2022**, 13: 1051082.
- [11] Wang N, Zhao X, Wang W, Peng Y, Bi K, Dai R. *Talanta*, **2017**, 162: 479–487.
- [12] Wang N, Zhao X, Huai J, Li Y, Cheng C, Bi K, Dai R. *J. Ethnopharmacol.*, **2018**, 217: 205–211.
- [13] Chiu C Y, Smyl C, Dogan I, Rothe M, Weylandt K H. *Biology(Basel)*, **2017**, 6(1): 9.
- [14] ICH. Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10. (2022-05-24) [2026-09-14]. [https://database.ich.org/sites/default/files/M10\\_Guideline\\_Step4\\_2022\\_0524.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf).
- [15] Dawczynski C, Dittrich M, Neumann T, Goetze K, Welzel A, Oelzner P, Völker S, Schaible A M, Troisi F, Thomas L, Pace S, Koeberle A, Werz O, Schlattmann P, Lorkowski S, Jahreis G. *Clin Nutr.*, **2018**, 37(2): 494–504.

(责任编辑: 丁 岩)