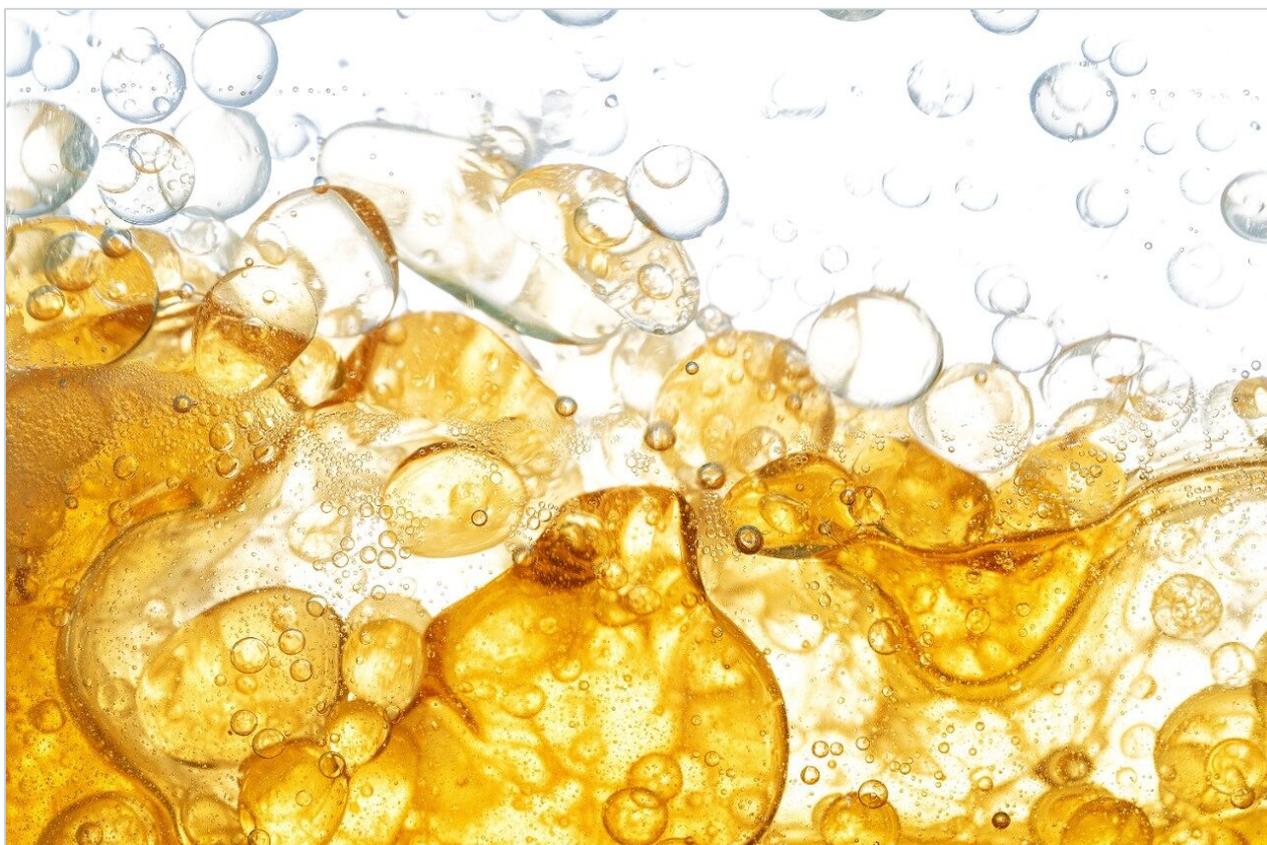


应用纪要

一种适用于大规模样品组且兼具稳定性与可重现性的反相脂质分析方法

Giorgis Isaac, Nyasha Munjoma, Lee A. Gethings, Lauren Mullin, Robert S. Plumb

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

对来自大规模样品组（例如动物安全评估研究和流行病学研究）的哺乳动物血浆进行脂质组学分析需要使用可靠且耐用的方法。快速且耐用的方法可为纵向研究提供支持，从而在不同实验室之间实现方法转移。为满足这一需求，沃特世开发了一种高通量反相LC-MS方法，利用超高效液相色谱(UPLC)与表面带电杂化颗粒(CSH) C₁₈技术进行分离，并使用SYNAPT XS质谱仪进行准确的质谱检测。该方法在分析100多次人血浆进样时表现出优异的专属性、稳健性和重现性。

优势

- 高度可重现且稳定耐用的脂质分析方法
- 高通量、全面的方法，适用于大规模样品组
- 可为复杂混合物提供出色的色谱分离度
- 脂质组学覆盖范围广，正离子和负离子模式分析均适用
- 适用于各种生物样品，例如体液、组织样品和细胞培养物

简介

脂质在能量储存、细胞信号传导以及疾病（如癌症、神经退行性疾病、感染和糖尿病）的病理生理学中起重要作用。LC-MS方法的进步为脂质研究提供了更高的灵敏度和专属性，从而减少了共流出化合物和同量异位干扰物的影响，并使低丰度脂质更易于检测。由于脂质组学分析在大规模药物发现和流行病学研究中的应用得到越来越多的关注，因此需要一种高通量、耐用且高度可重现的方法，以便用于纵向研究，并在不同实验室之间转移^{1,2}。要进行全面的脂质分析，需要分别在正负离子模式下筛选脂质。

脂质的传统质谱分析一般通过直接注样或反相(RP)和正相(NP)色谱进行。不过，上述每种方法都具有各自的缺点。直接注样会产生离子抑制效应，从而限制脂质检测效果并降低重现性。该方法也无法分离同量异位脂质，导致结果分析非常复杂，需要进行去卷积。正相色谱法可按类别分离脂质，但通常存在洗脱时间长和无法分离脂质异构体的问题。研究中广泛应用的传统反相色谱法同样存在洗脱时间长、峰容量低和分析间重现性差的问题。

本文介绍了一种高通量、耐用且可重现的LC-MS方法，该方法使用配备表面带电杂化颗粒(CSH) C₁₈色谱柱以及QToF检测器的Waters ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统对脂质进行RP-UPLC分离。将亚2 μm粒径与优化

液相色谱系统以大幅减少谱带展宽的新型填料相结合，可以显著改进RP方法。此方法可大幅提高上述颗粒的性能，经优化后适用于大规模样品分析。

实验

样品描述：

使用Differential Ion Mobility System Suitability Lipidomix (Avanti Polar Lipids, INC.)作为系统适应性标准品评估仪器性能。混合物中每种脂质各1 mg/mL (0.25 mg/mL PI)，0.5 mL/瓶，溶于氯仿:甲醇(1:1)。用50/50 IPA/ACN配制500 ng/mL工作溶液(125 ng/mL PI)。

血浆样品制备方案很简单，使用预冷的异丙醇(IPA)沉淀蛋白即可。将20 μ L人血浆NIST标准参比物质1950与80 μ L预冷的IPA混合。将样品涡旋混合1 min，在-20 $^{\circ}$ C下放置10 min。接着再将样品涡旋混合1 min，然后在4 $^{\circ}$ C下放置2 h，确保蛋白沉淀完全。将样品在4 $^{\circ}$ C下离心10 min（最大离心力10,300 g）。转移上清液，并用50/50 IPA/ACN以1:5的比例稀释，然后将上清液转移到沃特世全回收UPLC样品瓶（部件号：[186005669CV <https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/vials-containers--collection-plates/186005669cv-truview-lcms-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-total-r.html>](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/vials-containers--collection-plates/186005669cv-truview-lcms-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-total-r.html)）进行LC-MS分析。

方法条件

LC条件

LC系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	SYNAPT XS
样品瓶：	全回收UPLC样品瓶
色谱柱：	ACQUITY UPLC CSH C ₁₈ (2.1 x 100 mm, 1.7 μ m)
柱温：	55 $^{\circ}$ C

LC条件

样品温度:	10 °C
进样体积:	2 μL (正离子模式) 4 μL (负离子模式)
流速:	400 μL/min
流动相A:	含0.1%甲酸的600/390/10 乙腈/水/1 M甲酸铵水溶液
流动相B:	含0.1%甲酸的900/90/10 异丙醇/乙腈/1 M甲酸铵水溶液

梯度:

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10	0.4	1	99	6
11	0.4	1	99	1
12	0.4	50	50	1

MS条件

MS系统:	SYNAPT XS
电离模式:	ESI+和ESI-
采集范围:	100–1200
毛细管电压:	3.0 kV (正离子模式) 2.5 kV (负离子模式)
碰撞能量:	线性增加 (传输CE) 25–45 eV
锥孔电压:	30 V

数据管理

色谱软件:	MassLynx V4.2
MS软件:	MassLynx V4.2

结果与讨论

我们之前开发了一种20 min的CSH C₁₈方法，可对血浆和组织中的脂质进行深度分析^{3,4}。为了满足更快分析的要求，我们开发出12 min的替代方法，适用于需要高通量的大规模样品研究。得到的方法结果表明，Avanti Polar Lipid IMS混合物中各类脂质的脂质标准品清晰分离。平均色谱峰宽为6.5秒，在10 min的分离时间内得到的整体峰容量为90。图1所示数据展示了正离子和负离子模式下Avanti Polar Lipid IMS混合标准品的分离情况。

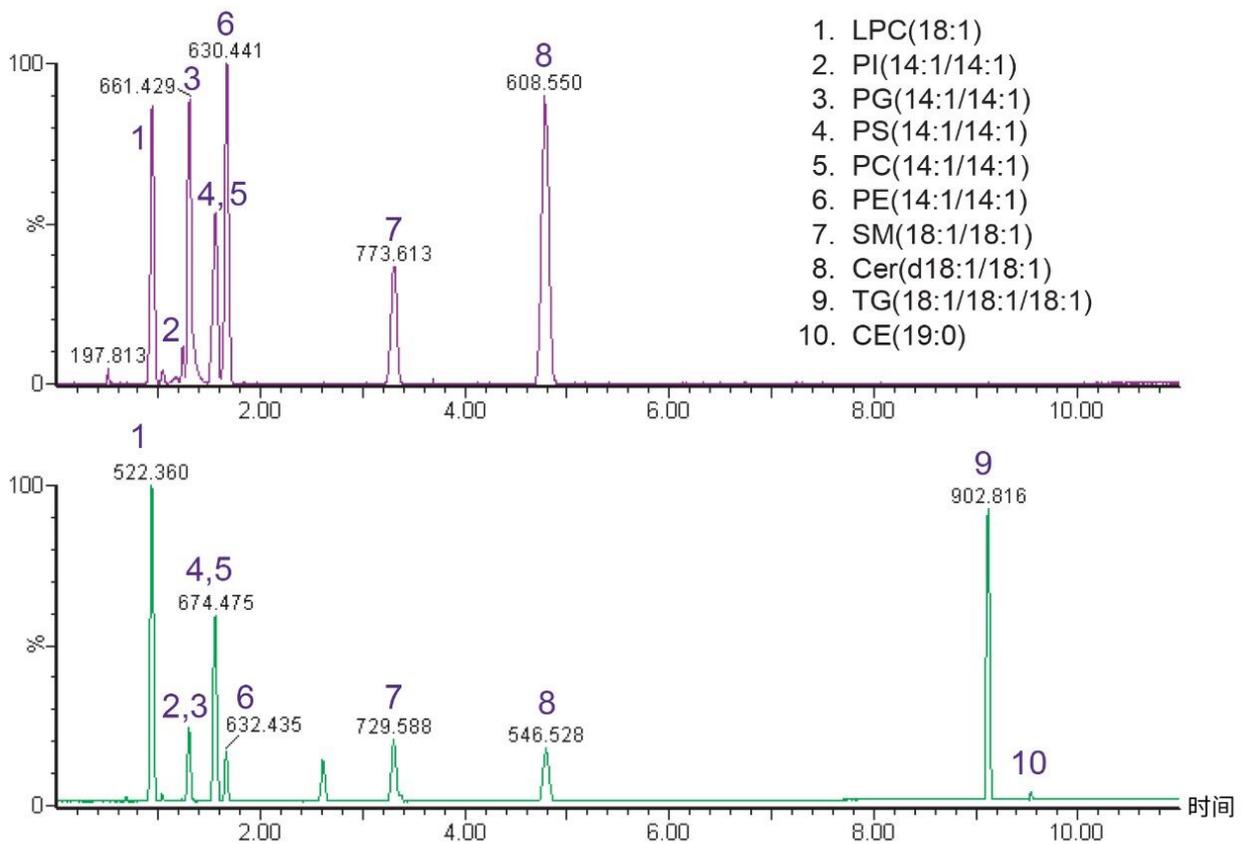


图1.使用Avanti Differential Ion Mobility System Suitability标准品Lipidomix试剂盒作为系统适应性溶液。进样体积为4 μL 的负离子模式基峰强度色谱图（上图），以及进样体积为2 μL 的正离子模式基峰强度色谱图（下图）。使用Avanti储备液和IPA/ACN (50/50)配制浓度为500 ng/mL的溶液。

对于全面筛选，分别在正负电离模式下进行脂质组学实验。为评估此方法在实际生物样品中的脂质覆盖率和适用性，我们使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和CSH C₁₈色谱柱以MS^F连续分辨率模式分析人血浆NIST SRM 1950的总脂质提取物。结果表明，该方法能够清晰地分离样品中的血浆脂质，并且能够分离主要脂质类别，分离度、灵敏度和脂质覆盖率都很高，如图2所示。从图中可以看出，溶血磷脂和游离脂肪酸(FFA)在分离的前2分钟内最先流出（这类脂质极性很强，因此较早流出）。弱极性脂质（甘油二酯、甘油三酯和胆固醇酯）在分离结束时（8-10分钟内）流出。中等极性的各种磷脂和鞘脂（PI、PG、PS、PC、PE、SM和Cer）在2-8分钟内流出，具体取决于脂肪酰基链和双键数量。

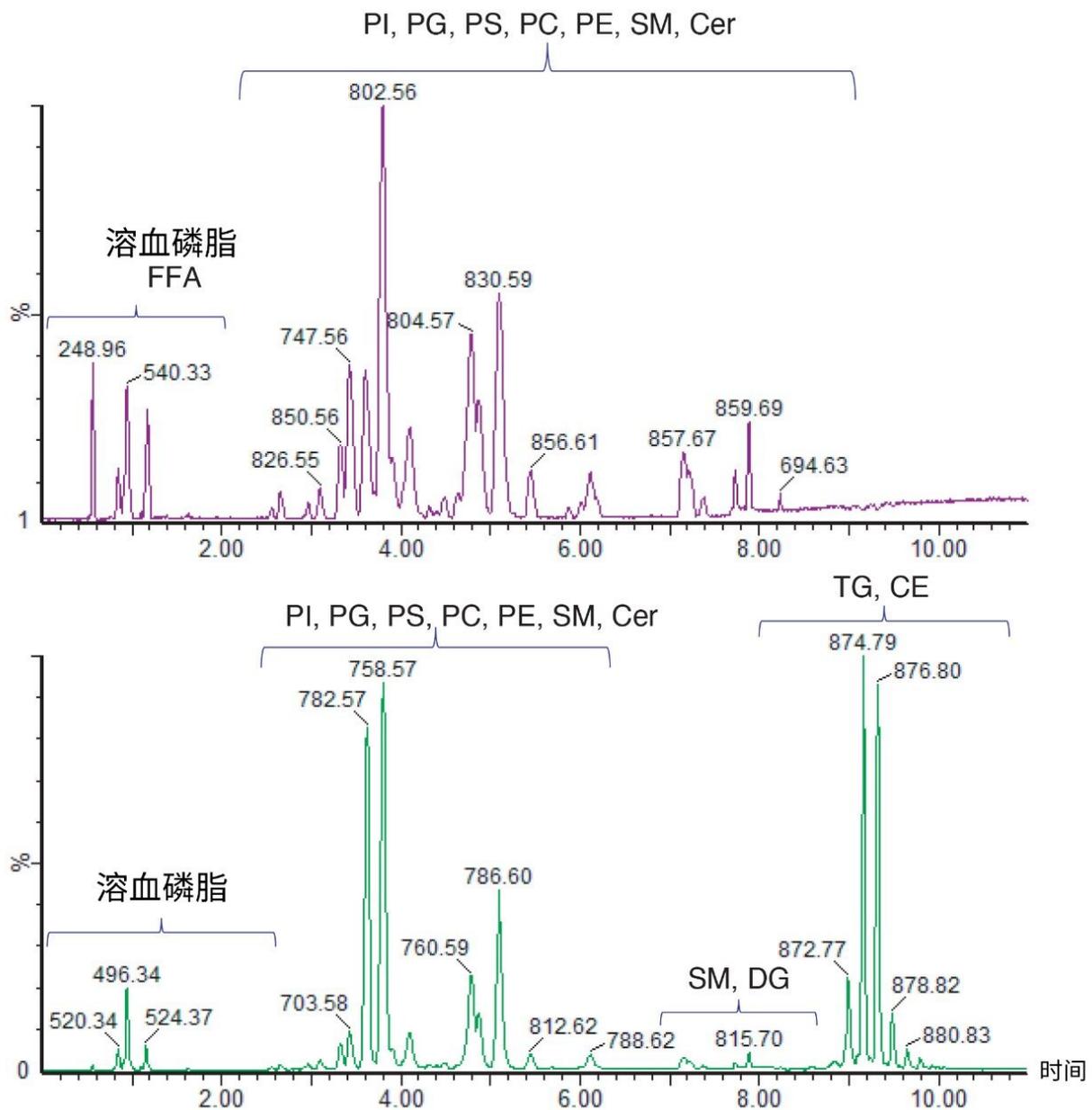


图2.人血浆标准参比物质(SRM 1950)的负离子 (上图) 和正离子模式 (下图) 基峰强度色谱图。

分析重现性是支持通过大规模样品获取脂质组学信息的关键因素。该性能对于大规模样品研究、批次间比较或实验室间数据尤为重要。ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统结合CSH C₁₈色谱柱在多次进样中表现出优异的保留时间重现性 (RSD < 0.19%; n=100)，如图3所示。这对于脂质组学分析至关重要，因为该分析需要对来自多个样品组的大量LC-MS色谱进行对齐和比较。

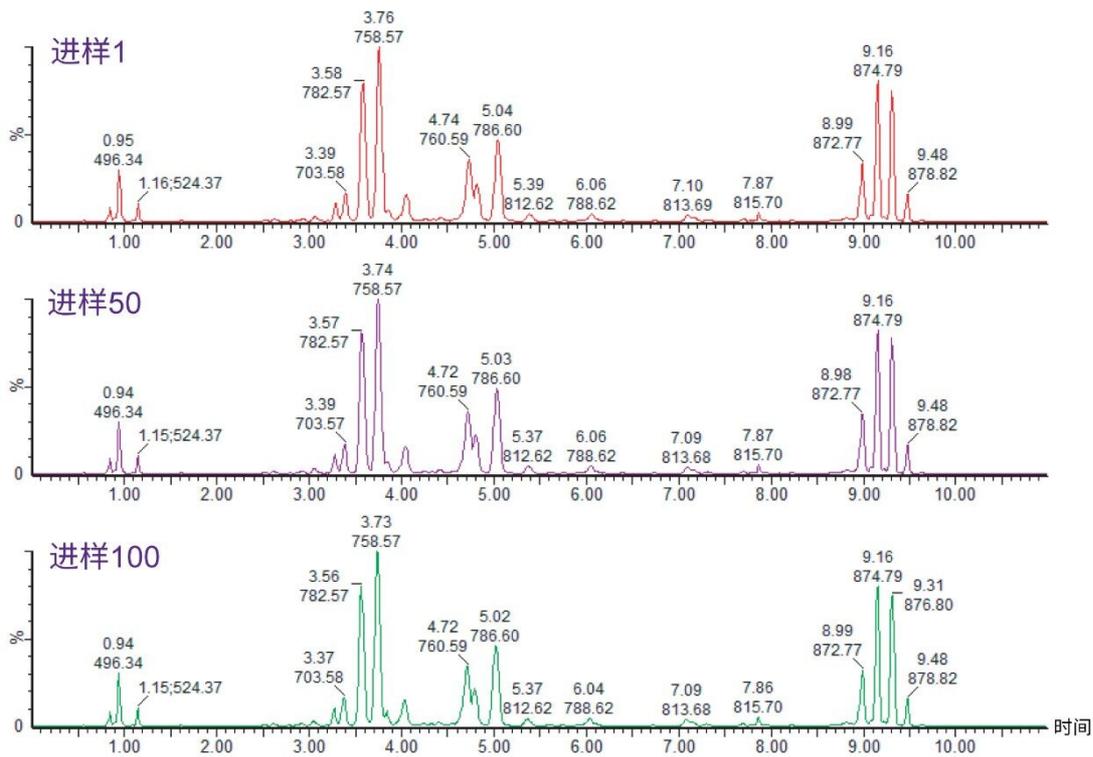


图3. 选定进样编号1、50和100的保留时间重现性，基于LPC(16:0) m/z 496.34、PC(16:0_18:1) m/z 758.57、SM(d18:1_24:1) m/z 813.69 以及 TAG(52:3) m/z 874.79，平均保留时间RSD值 $<0.19\%$ ($n=100$)。

结论

我们开发出一种耐用且可重现的高分离度UPLC-MS方法，用于检测和鉴定血浆中的脂质。整个分析中的平均保留时间相对标准偏差(%)小于0.19 ($n=100$)。尽管分析时间很短，只有10分钟，但该方法产生的峰容量高达90，可很好地分离NIST人血浆样品中的各类脂质。开发的方法适用于各种生物样品，例如体液、组织样品和细胞培养物。

参考资料

1. Stephenson DJ, Hoeflerlin LA, Chalfant CE. Lipidomics in Translational Research and the Clinical Significance of Lipid-Based Biomarkers. *Transl Res.* 2017 Nov;189:13–29.
2. Audano M, Maldini M, Fabiani ED, Mitro N, Caruso D. Gender-related Metabolomics and Lipidomics: From Experimental Animal Models to Clinical Evidence, *J Proteomics* 2018 Apr 30;178:82–9.
3. Isaac G, McDonald S, Astarita G. Lipid Separation using UPLC with Charged Surface Hybrid Technology. Waters Application Note [720004107en](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004107en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004107en.pdf>> .2011 Sep.
4. Damen CWN, Isaac G, Langridge J, Hankemeier T, Vreeken RJ. Enhanced Lipid Isomer Separation In Human Plasma Using Reversed-Phase UPLC with Ion-Mobility/High-Resolution MS Detection. *J Lipid Res.* 2014 Aug;55(8):1772–83.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/135020928>>

720006959ZH, 2020年7月