



色谱对肝脏组织提取物中脂质分析的影响

应用简报

作者

Mark Sartain 和 Theodore Sana
安捷伦科技公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉

前言

脂质组学属于新兴研究领域，其核心工作是生物系统中各种脂类物质的表征和定量分析。质谱法是否能够成功检测和鉴定出给定样品中的数千种潜在脂质，将直接取决于脂质液相色谱分离的策略。

肝脏、脑、心脏组织提取物是脂质组学研究中常见的生物样品。为证明色谱对脂质组学分析的影响，本应用简报以肝脏组织提取物为例，总结了使用反相 (RP) 和正相 (NP) 色谱分离不同类型脂质的优势。

本研究工作采用 Agilent UHPLC 1290 系统（包括二元泵、多孔板自动进样器和柱温箱）进行。液相色谱通过安捷伦喷射流接口与 Agilent 6540 Q-TOF 联用。采用反相和正相色谱两种方法分离组织提取物。



Agilent Technologies

方法

色谱系统

反相液相色谱条件		正相液相色谱条件																													
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18 柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)	色谱柱	Agilent ZORBAX Rx-Sil 柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 828700-901)																												
柱温	50 °C	柱温	25 °C																												
进样量	5.00 μL	进样量	5.00 μL																												
自动进样器温度	4 °C	自动进样器温度	4 °C																												
注射针清洗	放入清洗口 15 秒 (50:50 甲醇/异丙醇)	注射针清洗	放入清洗口 15 秒 (50:50 甲醇/异丙醇)																												
流动相	A) 5:1:4 异丙醇/甲醇/水, 含 5 mM 乙酸铵和 0.1% 乙酸 B) 99:1 异丙醇/水, 含 5 mM 乙酸铵和 0.1% 乙酸	流动相	A) 58:40:2 异丙醇/己烷/水, 含 5 mM 乙酸铵 和 0.1% 乙酸 B) 50:40:10 异丙醇/己烷/水, 含 5 mM 乙酸铵 和 0.1% 乙酸																												
流速	0.350 mL/min	流速	0.300 mL/min																												
梯度程序	<table border="1"><thead><tr><th>时间</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>0</td></tr><tr><td>3.00</td><td>0</td></tr><tr><td>5.00</td><td>20</td></tr><tr><td>25.00</td><td>30</td></tr><tr><td>35.00</td><td>95</td></tr><tr><td>36.00</td><td>95</td></tr><tr><td>38.00</td><td>0</td></tr></tbody></table>	时间	B (%)	0.00	0	3.00	0	5.00	20	25.00	30	35.00	95	36.00	95	38.00	0	梯度程序	<table border="1"><thead><tr><th>时间</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>0</td></tr><tr><td>5.00</td><td>0</td></tr><tr><td>34.00</td><td>100</td></tr><tr><td>36.00</td><td>100</td></tr><tr><td>38.00</td><td>0</td></tr></tbody></table>	时间	B (%)	0.00	0	5.00	0	34.00	100	36.00	100	38.00	0
时间	B (%)																														
0.00	0																														
3.00	0																														
5.00	20																														
25.00	30																														
35.00	95																														
36.00	95																														
38.00	0																														
时间	B (%)																														
0.00	0																														
5.00	0																														
34.00	100																														
36.00	100																														
38.00	0																														
停止时间	38 min	停止时间	38 min																												
后运行时间	3 min	后运行时间	5 min																												

质谱

Agilent 6540 Q-TOF, 配有双安捷伦喷射流离子源	
仪器模式	2 GHz, 宽动态范围, m/z 1,700
极性	正离子或负离子
干燥气温度	300 °C
干燥气 (氮气)	11 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3,500 V (+), 3,000 V (-)
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	150 V
Oct 1 Rf Vpp	750 V
采集速度	仅 MS: 每秒 1 张谱图 (MS) 自动 MS/MS: 每秒 3 张谱图 (MS), 每秒 3 张谱图 (MS/MS)
自动 MS/MS 参数	分离峰宽: 窄 (约 1.3 amu) 碰撞能量: 20 eV
参比较正	2 点: m/z 121.050873 (+), m/z 922.009798 (+) 2 点: m/z 112.985587 (-), m/z 980.016375 (-)

从肝脏组织提取到的脂类物质的分布情况



- 肝脏总脂质提取物购自 Avanti Polar Lipids 公司 (亚拉巴马州阿拉巴斯特), 脂质成分组成见上图
- 将冻干的脂质提取物复溶于 2:1 氯仿/甲醇溶液, 然后用流动相 A 稀释至 200 ng/ μ L
- 进样量 5 μ L (含 1 μ g 提取物), 进行反相或正相液质联用分析 (见方法部分)

分析工作流程中数据分析的第一步是从结果中提取分子特征, 该特征由保留时间和质量数确定。此特征将化合物的所有特定加合物和同位素的丰度浓缩为单个化合物的丰度。分子特征提取由 Agilent MassHunter 定性分析软件 (版本 B.07.00) 通过 Agilent 分子特征提取器 (MFE) 算法进行, 脂质标注通过 Agilent METLIN 脂质 PCDL (B.07) 和 SimLipid 软件 (版本 4.20, PREMIER Biosoft 公司, 加利福尼亚州帕罗奥图) 进行。METLIN 脂质 PCDL 包含 640 张通过

化学标准品获得的 MS/MS 谱图。SimLipid 软件支持脂质谱图的 MS/MS 理论匹配且包含 36,224 个脂质条目。

结果与讨论

我们采用 MFE 算法对反相色谱法分离的肝脏脂质提取物进行分析, 得到了 4,108 种提取化合物 (特征)。然后我们在 METLIN 数据库中搜索化合物, 得到 1,000 余种带有脂质标注的化合物, 单次液质联用分析仅耗时 38 分钟 (图 1)。

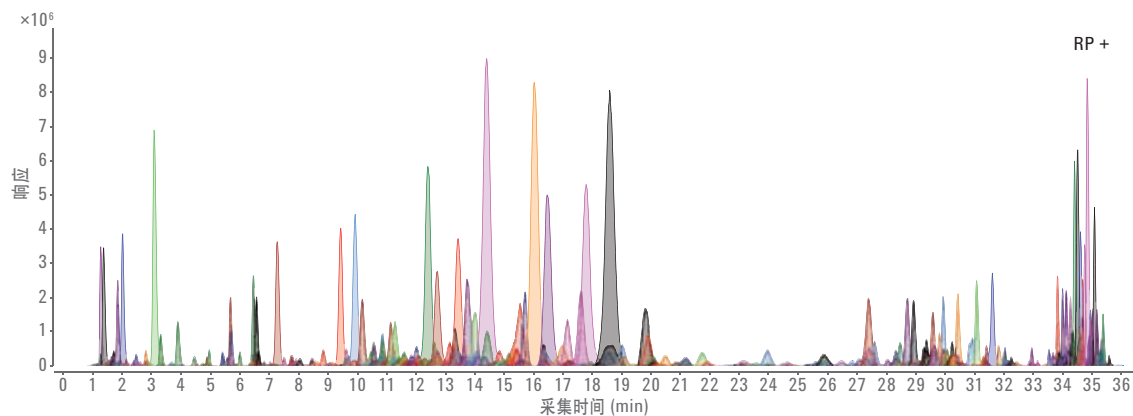


图 1. 提取化合物色谱图 (ECC) 的叠加, 对应 1,061 种已标注化合物, 仅通过单次液质联用分析即完成脂质标注

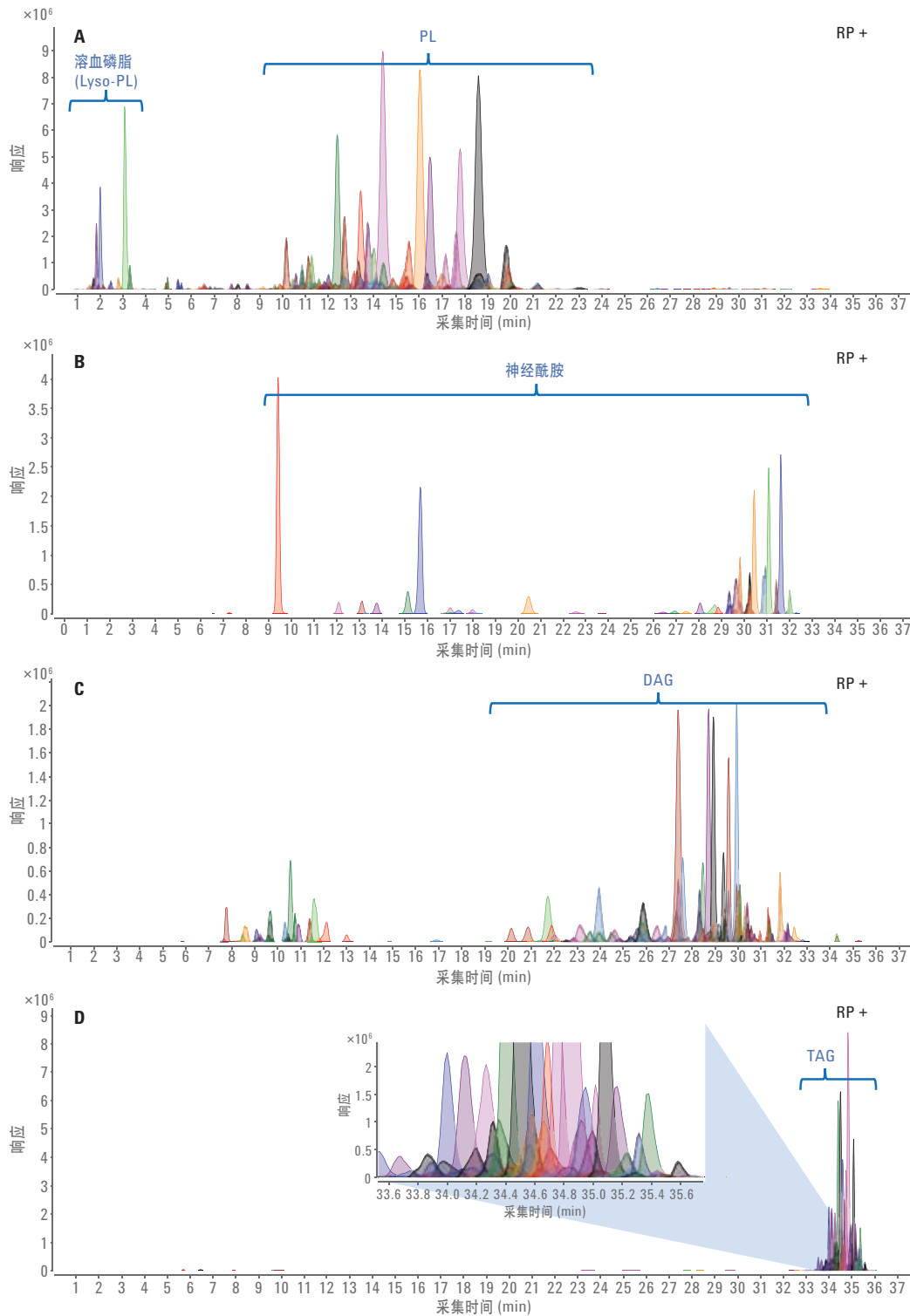


图 2. 来自单个肝脏组织提取物数据文件（反相色谱，正离子源）的主要标注脂类的洗脱曲线示例。A) 431 种经过标注的磷脂 (PL) 和溶血磷脂 (Lyso-PL) 的提取化合物色谱图的叠加；B) 48 种经过标注的神经酰胺的提取化合物色谱图的叠加；C) 172 种经过标注的二酰甘油 (DAG) 的提取化合物色谱图的叠加；D) 123 种经过标注的三酰甘油 (TAG) 的提取化合物色谱图的叠加。34–36 分钟窗口的放大视图说明了采用 UHPLC 法分离和标注共洗脱三酰甘油的优点，以及这类共洗脱三酰甘油的动态检测范围

与基于亲脂性（主要由碳链长度和双键数确定）的反相色谱脂质分离相比，正相色谱分离主要基于脂质头基的极性。图 3 表明正相色谱对于偏极性的脂质和带电脂质的分离非常高效。但会流失中性脂质（如甾醇类、

二酰甘油类和三酰甘油类），因为使用这类流动相时中性脂质不能得到色谱保留。对于能够检测到的化合物，用户可根据已知的脂质分类特征搜索相应的目标数据库，从而提高脂质标注的准确度。例如，我们可以将搜

索范围限制在 PE 脂质中，具体方法有：在限定的保留时间窗口中查询洗脱化合物；仅搜索 METLIN 脂质 PCDL 中 PE 子集下的 PE 条目或进行自定义的 SimLipid 搜索。

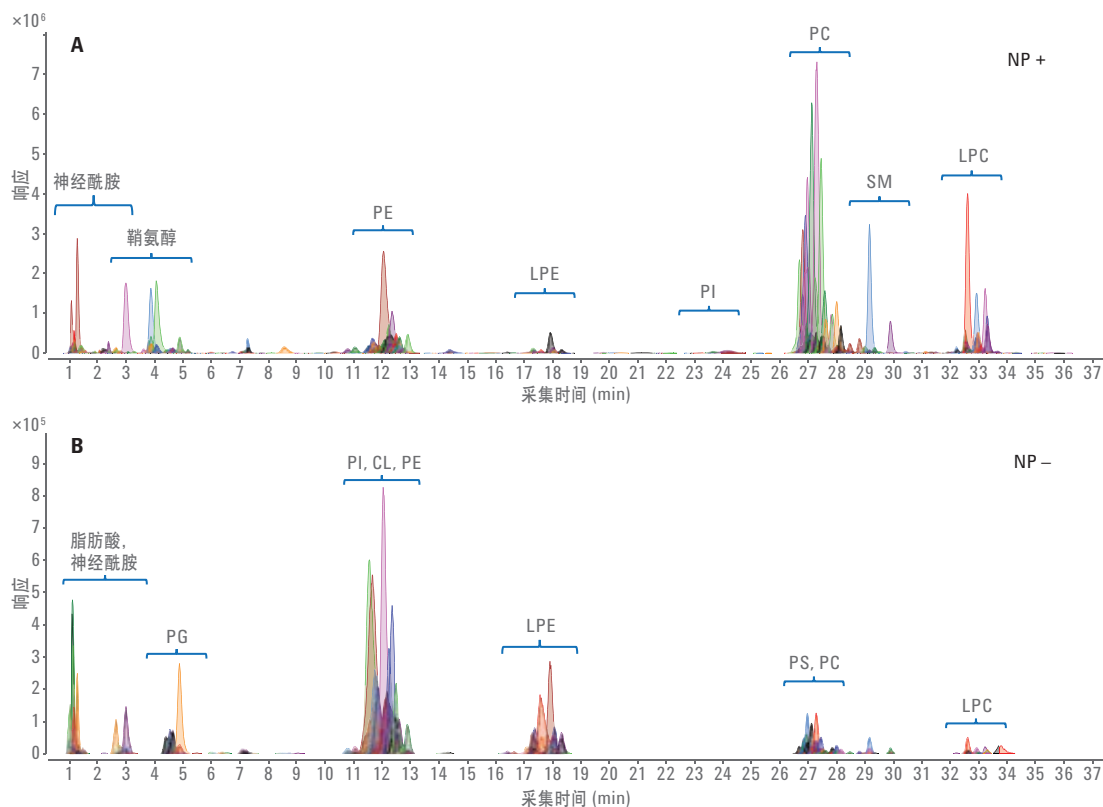


图 3. 正相色谱法分离肝脏脂质提取物时的洗脱曲线（采用正、负离子源模式）。CL：心磷脂；LPC：溶血磷脂酰胆碱；LPE：溶血磷脂酰乙醇胺；PC：磷脂酰胆碱；PE：磷脂酰乙醇胺；PG：磷脂酰甘油；PI：磷脂酰肌醇；PS：磷脂酰丝氨酸；SM：鞘磷脂

表 1 所示为不同数据库的搜索结果，数据文件来自相同肝脏组织提取物在不同色谱法和离子源条件下的分析。我们采用 MFE 算法处理仅通过四极杆 1 获取的数据文件。所得化合物根据 METLIN 脂质 PCDL 标注，也可以使用 SimLipid 软件标注。为实现高准确度的脂质标注，我们也对自动 MS/MS 数据文件进行了 MFE 算法处理，但只有含 MS/MS 数据的化合物才能用于数据库查询。可使用 METLIN 脂质 PCDL 通过谱库匹配标注化合物，也可以使用仅基于 MS/MS 数据的 SimLipid 软件进行标注。重点注意：与 METLIN PCDL（通过可靠化学标准品获得的高质量专业谱库）标注不同，SimLipid 标注是将 MS/MS 谱图与理论模拟生成的 MS/MS 碎片谱图进行匹配。

以上示例表明分析人员可对色谱法进行优化以用于不同类型脂质的分析，反相和正相液质联用系统在脂质组学分析中具有各自的选择性优势。反相液质联用系统的适用范围更加全面，能够分离多种不同类型的脂质，实现更多特征的检测和标注。另外，保留时间具有很好的重现性，有助于色谱比对和差异分析工作流程。正相液质联用系统的优势在于能够根据极性脂类的特征保留行为，对其进行更高准确度的标注。此外用户还能够迅速通过色谱图掌握样品间脂质种类的整体差异。

数据文件类型	MFE 结果特征数	METLIN 脂质 PCDL 标注特征数	SimLipid 4.20 标注特征数
反相色谱 (+) 仅 MS	4,108	1,061	1,172
反相色谱 (+) 自动-MS/MS	972 (612)	5	226
反相色谱 (-) 仅 MS	1,399	586	430
反相色谱 (-) 自动-MS/MS	278 (247)	0	65
正相色谱 (+) 仅 MS	2,281	568	644
正相色谱 (+) 自动-MS/MS	774 (308)	6	141
正相色谱 (-) 仅 MS	561	309	250
正相色谱 (-) 自动-MS/MS	195 (126)	1	72

() 括号仅表示具有 MS/MS 谱图的化合物，并且用于查询。

表 1. 来自单个肝脏脂质提取物液质联用数据文件的脂质标注结果汇总，并对以下条件进行比较：色谱方法 (RP/NP)、离子化模式 (+/-) 和 MS 数据类型 (仅 MS/自动 MS/MS)。数据库搜索时的质量数匹配容差为 5 ppm。注：对于每种标注化合物，常常存在多个匹配脂质标注

结论

本文验证了色谱法对复杂生物样品中多种类型脂质进行全面检测和分析的能力。我们将脂质特异 UHPLC 方法与具有宽动态检测范围的精确质量 Q-TOF 联用，并配合使用先进的特征查找软件进行自动化脂质数据库搜索，实现了在单次液质联用分析中检测和标注出 1,000 余种脂质。分析人员可对色谱方法开发进行优化，以靶向分析不同类型的脂质，如我们使用两种可选的液相色谱分离方法——反相色谱和正相色谱对肝脏组织提取物进行的分离所示。从脂质组学分析的角度来看，这两种方法具有各自的选择性优势，可使脂质检测覆盖更加深入、全面。

更多信息, 请访问

www.agilent.com/lifesciences/dissolution

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2015
2015 年 1 月 29 日, 中国印刷
5991-5494CHCN



Agilent Technologies