

使用 Agilent Bond Elut 脂质萃取 96 孔板对人血浆进行脂质组学分析

液相色谱/质谱应用

作者

Alex Apffel, Limian Zhao
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了一种新型固相萃取 (SPE) 方法，该方法使用 Agilent Bond Elut 脂质萃取 96 孔板进行高通量人血浆脂质组学样品前处理。首先对血浆样品进行蛋白质沉淀。将整个匀浆装入 Bond Elut 脂质萃取微孔板进行重力洗脱。在冲洗和洗脱步骤之后，在 LC/Q-TOF 上运行提取的样品，使用 Agilent MassHunter Lipid Annotator 软件进行脂质分析。此外，使用 LC/TQ 和同位素脂质内标考察主要脂类的回收率。定量回收率和定性分析研究均证明，96 孔板 SPE 高通量方法与之前基于 1 mL 小柱的方法性能相当。与 1 mL 小柱 SPE 方法相比，96 孔板高通量 SPE 方法节省了时间和人力，提高了样品处理效率以及自动化兼容性。

前言

脂质组学是分析生物化学的一个分支，主要用于大规模研究生物系统中的脂质分子。由于人们对生物化学系统中功能性脂质间以及脂质与蛋白质间的相互作用有了新的了解，脂质组学研究在过去十年中受到了更多关注。随着分析技术（包括液相色谱、质谱）和信息学的进步，脂质组学研究得到了迅速发展。与此同时，新的研究动机和先进的分析能力使研究人员对快速、便捷、准确、精确的高通量脂质组学样品前处理工作流程的需求不断增加，以便能扩大生物学研究的规模。

对于任何脂质组学工作流程，样品前处理都是一大瓶颈。常用的传统脂质组学分析样品前处理工作流程采用液液萃取 (LLE) 方法^[1-4]，使用各种萃取溶剂或溶剂混合物。但是，这些方法费时、费力、难以自动化，且重现性不佳。

Bond Elut 脂质萃取产品采用 EMR-Lipid 脂质吸附剂进行开发，经证明其性能等同或略优于传统 LLE 方法^[5]，但能显著节省时间和人力，同时提高易用性及重现性。此前已证明，采用 Bond Elut 脂质萃取 1 mL 小柱进行人血浆脂质组学分析的工作流程^[6]，可在样品数量较少时提供便捷的样品前处理方法。本应用简报中的研究将展示在 Bond Elut 脂质萃取 96 孔板上进行的高通量工作流程。

实验部分

化学品与试剂

LC/MS 级乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH)、二氯甲烷 (DCM) 和异丙醇 (IPA) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。HPLC 级丁醇 (*n*-BuOH)、乙酸铵和亚甲磷酸购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。NIST 人血浆中代谢物标准品 SRM 1950 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。UltimateSPLASH One 和 EquiSPLASH 内标购自 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)。

溶液与标准品

将 95 mL ACN 与 5 mL MeOH 混合，配制蛋白质沉淀 (PPT) 萃取溶剂 ACN/MeOH (95:5, v/v)。此溶剂为新鲜配制，使用前至少在冰箱中储存 10–15 min。将 90 mL ACN 与 10 mL 水混合，配制清洗溶剂 ACN/水 (9:1, v/v)。将 25 mL DCM 与 50 mL MeOH 混合，配制洗脱溶剂 DCM/MeOH (1:2, v/v)。将 25 mL *n*-BuOH 与 25 mL MeOH 混合，配制复溶溶剂 *n*-BuOH/MeOH (1:1, v/v)。

设备与材料

使用配备 ESI 离子源（采用安捷伦喷射流离子化技术）的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 完成脂质分析研究的检测工作。使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪进行色谱分离，该仪器包含高速二元泵、恒温 Multisampler 和高容量柱温箱。

使用配备 ESI 离子源（采用喷射流离子化技术）的 Agilent 6490 LC/TQ 完成脂质回收率研究的检测工作。使用 1290 Infinity II 液相色谱仪进行色谱分离，该仪器包含高速二元泵、恒温 Multisampler 和高容量柱温箱。

样品前处理设备包括：

- Agilent Bond Elut 脂质萃取 96 孔板，2 mL（部件号 5610-2042）
- 安捷伦方孔收集板，2 mL（部件号 5133009）
- 安捷伦方形 96 孔密封垫（部件号 5133005）
- Agilent PlateLoc 微孔板热封膜机（部件号 G5402A/G）
- Agilent PlateLoc 微孔板热封膜（部件号 16985-001）
- 2 mL 玻璃涂层收集板或 2 mL 带玻璃内插管的收集板
- 安捷伦正压 96 孔处理装置 (PPM-96)（部件号 5191-4116）
- 移液管和重复用移液器 (Eppendorf, USA)
- 多管孔板涡旋仪 (VWR, USA)
- 超声仪 (VWR, USA)
- 96 孔板蒸发仪
- ViaFlo 96 液体处理器 (Integra Biosciences, USA)

仪器条件

LC/Q-TOF 方法条件列于表 1，LC/TQ 方法条件列于表 2 和附录表 A1。

表 1. 用于脂质组学分析的 LC/Q-TOF 分析仪器方法条件

| 参数 | 值 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|------|----|------|----|------|-----|------|-----|------|----|
| Agilent 6545 LC/Q-TOF，配备双安捷伦喷射流 ESI 离子源 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 仪器模式 | 2 GHz，宽动态范围， <i>m/z</i> 1700 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 极性 | 正离子和负离子 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 气体温度 | 210 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 干燥气（氮气） | 13 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 雾化器气体 | 45 psi | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 鞘气 | 250 °C，12 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 毛细管电压 | 3500 V (+)，3000 V (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 喷嘴电压 | 0 V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 碎裂电压 | 160 V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Oct 1 Rf Vpp | 750 V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 采集速率 | 仅 MS：每秒 3 张谱图 (MS) 自动 MS/MS：每秒 3 张谱图 (MS)， 每秒 4 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 35 eV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 参比校正 | 2 点： <i>m/z</i> 121.050873 (+)， <i>m/z</i> 922.009798 (+) 2 点： <i>m/z</i> 119.036320 (-)， <i>m/z</i> 980.016375 (-) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Agilent 1290 Infinity II LC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm，窄径液相色谱柱（部件号 695675-902） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温 | 60 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样量 | 1 μL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 自动进样器温度 | 5 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样针清洗 | 放入清洗口 15 s，MeOH:IPA (1:1, v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相 | A) 水:MeOH (9:1, v/v)，加入 10 mmol/L 乙酸铵和 10 μmol/L 亚甲磷酸 B) ACN:MeOH:IPA (3:2:5, v/v/v)，加入 10 mmol/L 乙酸铵 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 | 0.3 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 梯度程序 | <table><tr><td>时间 (min)</td><td>%B</td></tr><tr><td>0.0</td><td>60</td></tr><tr><td>0.5</td><td>60</td></tr><tr><td>3.0</td><td>84</td></tr><tr><td>9.5</td><td>87</td></tr><tr><td>10.5</td><td>95</td></tr><tr><td>14.0</td><td>96</td></tr><tr><td>14.5</td><td>100</td></tr><tr><td>20.0</td><td>100</td></tr><tr><td>20.1</td><td>60</td></tr></table> | 时间 (min) | %B | 0.0 | 60 | 0.5 | 60 | 3.0 | 84 | 9.5 | 87 | 10.5 | 95 | 14.0 | 96 | 14.5 | 100 | 20.0 | 100 | 20.1 | 60 |
| 时间 (min) | %B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.0 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.5 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3.0 | 84 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.5 | 87 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10.5 | 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14.0 | 96 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14.5 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20.0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20.1 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 停止时间 | 22 分钟 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 后运行时间 | 5 分钟 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

表 2. LC/TQ 分析仪器方法条件

| 参数 | 值 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|----------|----|---|----|-----|----|-----|----|-----|----|------|-----|------|-----|------|----|
| Agilent 6490 LC/TQ，配备双安捷伦喷射流 ESI 离子源 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 仪器模式 | 2 GHz，宽动态范围， <i>m/z</i> 1700 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 极性 | 正离子 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 气体温度 | 210 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 干燥气（氮气） | 13 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 雾化器气体 | 45 psi | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 鞘气 | 250 °C，12 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 毛细管电压 | 3500 V (+)，3000 V (-) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 喷嘴电压 | 500 V | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 碎裂电压 | 160 V | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Oct 1 Rf Vpp | 750 V | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 采集条件 | 动态 MRM | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Agilent 1290 Infinity II LC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm，窄径液相色谱柱（部件号 695675-902） | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温 | 60 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样量 | 1 μL | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 自动进样器温度 | 5 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样针清洗 | 放入清洗口 15 s，MeOH:IPA (1:1, v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相 | A) 水: MeOH (9:1, v/v)，加入 10 mmol/L 乙酸铵和 10 μmol/L 亚甲磷酸 B) ACN:MeOH:IPA (3:2:5, v/v/v)，加入 10 mmol/L 乙酸铵 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 | 0.4 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 梯度程序 | <table><tr><td>时间 (min)</td><td>%B</td></tr><tr><td>0</td><td>62</td></tr><tr><td>2.0</td><td>84</td></tr><tr><td>8.0</td><td>86</td></tr><tr><td>8.1</td><td>93</td></tr><tr><td>10.0</td><td>100</td></tr><tr><td>12.9</td><td>100</td></tr><tr><td>13.0</td><td>62</td></tr></table> | 时间 (min) | %B | 0 | 62 | 2.0 | 84 | 8.0 | 86 | 8.1 | 93 | 10.0 | 100 | 12.9 | 100 | 13.0 | 62 |
| 时间 (min) | %B | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 62 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 84 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8.0 | 86 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8.1 | 93 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10.0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12.9 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13.0 | 62 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 停止时间 | 20 分钟 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 后运行时间 | 0 分钟 | | | | | | | | | | | | | | | | |

为了快速评估和比较各参数对脂质萃取效率的影响，使用母离子扫描模式监测总磷脂曲线。扫描设置为 *m/z* 184.1 片段（质子化磷酸胆碱），扫描范围为 *m/z* 100–1300，通过 LC/TQ 检测。

样品前处理

采用蛋白质沉淀法对人血浆进行前处理，然后使用 Bond Elut 脂质萃取 SPE 方法进行脂质萃取、分离和纯化。96 孔板的大体工作流程与 1 mL 小柱工作流程类似，但在 96 孔板上批量处理的具体操作有所不同。

A) 加入稳定同位素标记内标

在稳定同位素标记内标回收率研究中，对血浆样品预加标 UltimateSPLASH One 内标。预加标血浆样品的浓度为 2.5–15 µg/mL，具体取决于脂质。将 100 µL UltimateSPLASH One 内标干燥并在 1 mL SRM 1950 血浆中复溶。涡旋处理混合物，并在冰上超声处理 10 min，在 -80 °C 下储存备用。将 100 µL UltimateSPLASH One 内标干燥，然后复溶于 1 mL n-BuOH:MeOH (1:1 v/v) 中，用于制备后加标样品。将该溶液涡旋并超声处理 10 min，然后用于复溶干燥的基质空白血浆样品。

在脂质分析研究中，按照 Bond Elut 脂质萃取微孔板方案萃取所有人血浆样品，然后用含有 EquiSPLASH 内标的 n-BuOH:MeOH (1:1 v/v) 溶液复溶。将 100 µL EquiSPLASH 内标干燥，然后复溶于 1 mL n-BuOH:MeOH (1:1 v/v) 中，制备复溶溶液。将该混合物进行涡旋，并在冰上超声处理 10 min。

B) Bond Elut 脂质萃取微孔板方案

图 1 分步展示了用于脂质组学研究的人血浆前处理 SPE 流程。下面重点介绍了一些注意事项。

- 进行蛋白质沉淀 (PPT) 时，应在单独的收集板中进行离线 PPT 萃取，而非直接在 Bond Elut 脂质萃取板中进行。这样做的目的是便于后续处理，以提高脂质萃取效率
- PPT 萃取后，整个样品匀浆应转移到 Bond Elut 脂质萃取板中。这是为了防止蛋白质沉淀物结合造成的潜在脂质损失
- 使用冰浴超声可提高脂质萃取效率，并防止因超声处理过程中产生的热量导致的不稳定脂质分子降解
- 液体处理器用于在 96 孔板上进行样品混合和转移。如果实验室没有类似设备，则 96 孔板方案需要多通道移液器

- 将清洗溶液加入收集样品的孔中进行冲洗。额外的冲洗步骤可确保没有沉淀物粘附在孔壁上，防止因转移不完全而造成的样品损失
- 为防止塑料污染，应使用 2 mL 玻璃涂层收集板或 2 mL 带玻璃内插管的微孔板进行样品收集
- 在样品洗脱过程中可能需要中间干燥步骤。其目的是防止大量洗脱液溢出或飞溅导致样品交叉污染
- 强烈建议使用微孔板热封垫以防止样品污染

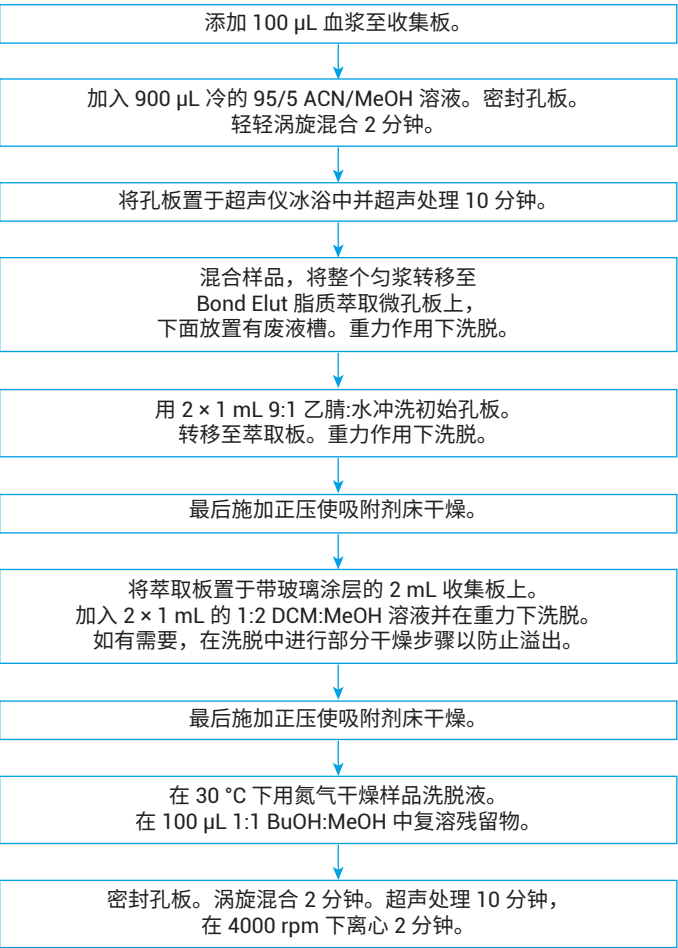


图 1. 使用 Bond Elut 脂质萃取微孔板进行脂质组学研究的人血浆前处理流程

结果与讨论

基于 Bond Elut 脂质萃取的 SPE 方法的背景洁净度

对于使用 DCM 等腐蚀性溶剂的非靶向脂质组学研究，样品前处理过程中可能存在引入污染的问题。因此在样品前处理中应避免使用塑料容器。对于使用 96 孔板 Bond Elut 脂质萃取的 SPE 方法，样品不可避免地会接触塑料表面。然而，Bond Elut 脂质萃取的形式和吸附剂填料可实现平稳快速的洗脱。因此，洗脱溶剂与微孔板塑料表面的接触时间非常有限。使用带玻璃涂层或带玻璃内插管的收集板可防止洗脱液与收集板上的塑料表面发生相互作用。洗脱后快速干燥也限制了接触时间。在整个过程中运行试剂空白以验证清洁度，结果如图 2 所示。

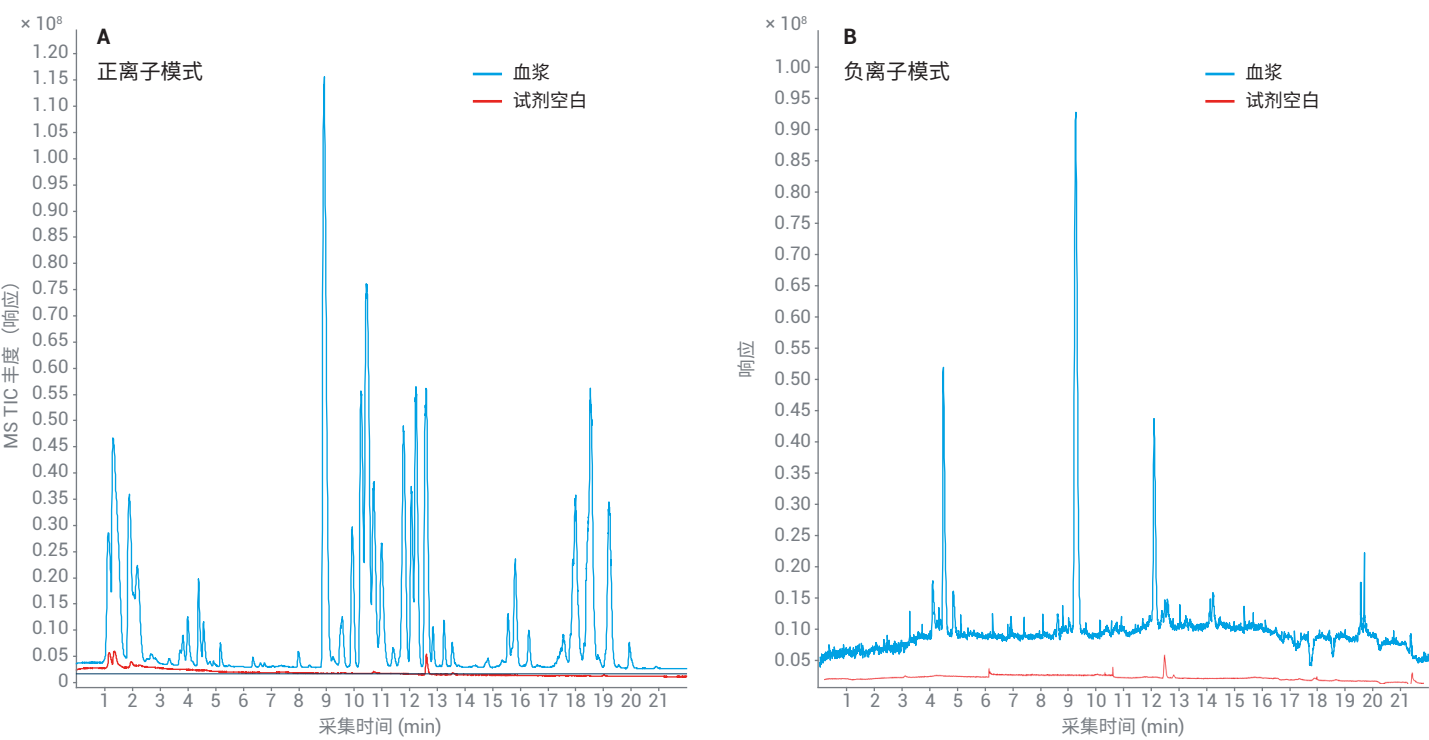


图 2. SPE 血浆提取物（蓝色）与试剂空白（红色）在 LC/Q-TOF 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下的 MS TIC 色谱图

96 孔板与 1 mL 小柱的 Bond Elut 脂质萃取性能比较

之前的研究已证明了在 1 mL 小柱上使用 Bond Elut 脂质萃取 SPE 方法进行人血浆脂质组学研究的方法性能^[6]，并对 SPE 方法与常用的 LLE 方法进行了全面比较^[5]。本研究主要比较 Bond Elut 脂质萃取方法在 96 孔板和 1 mL 小柱上的性能。SPE 方法比较包括三个方面：正离子和负离子模式下血浆提取物总离子流色谱图 (TIC) 比较、稳定同位素标记脂质内标回收率和脂质分析结果。

图 3 显示了使用 Bond Elut 脂质萃取方法在 1 mL 小柱和 96 孔板上萃取的人血浆的 TIC。通过 TIC 比较可以清楚地看出，两种方法的脂质萃取情况相似，但脂质丰度存在一些明显差异。例如，保留时间 (RT) 窗口 17–20 min 内的三酰甘油 (TG) 曲线在两种方法中具有相似的分布，但采用 96 孔板 SPE 方法的

样品丰度更高。同样，TIC 色谱图在 8–14 min RT 窗口内也观察到类似的情况，其中主要洗脱的磷脂酰胆碱 (PC) 和鞘磷脂 (SM) 同样显示出相似的分布，但采用 96 孔板的样品丰度更高。对于在 1–6 min RT 窗口内较早洗脱的极性脂质，可同样观察到两种 SPE 方法前处理的样品具有类似的分布，但丰度不同。

总体而言，通过 96 孔板 SPE 方法获得的脂质丰度更高。造成差异的原因包括：

- 在 Bond Elut 脂质萃取 96 孔板上由重力控制的液流得到改善，使脂质保留和洗脱效率优于 1 mL 小柱
- 吸附剂床质量的细微差别导致脂质保留和洗脱存在轻微差异。1 mL 小柱中装填了 40 mg EMR-Lipid 吸附剂，而为了适应方孔规格，96 孔板上使用了 60 mg 吸附剂

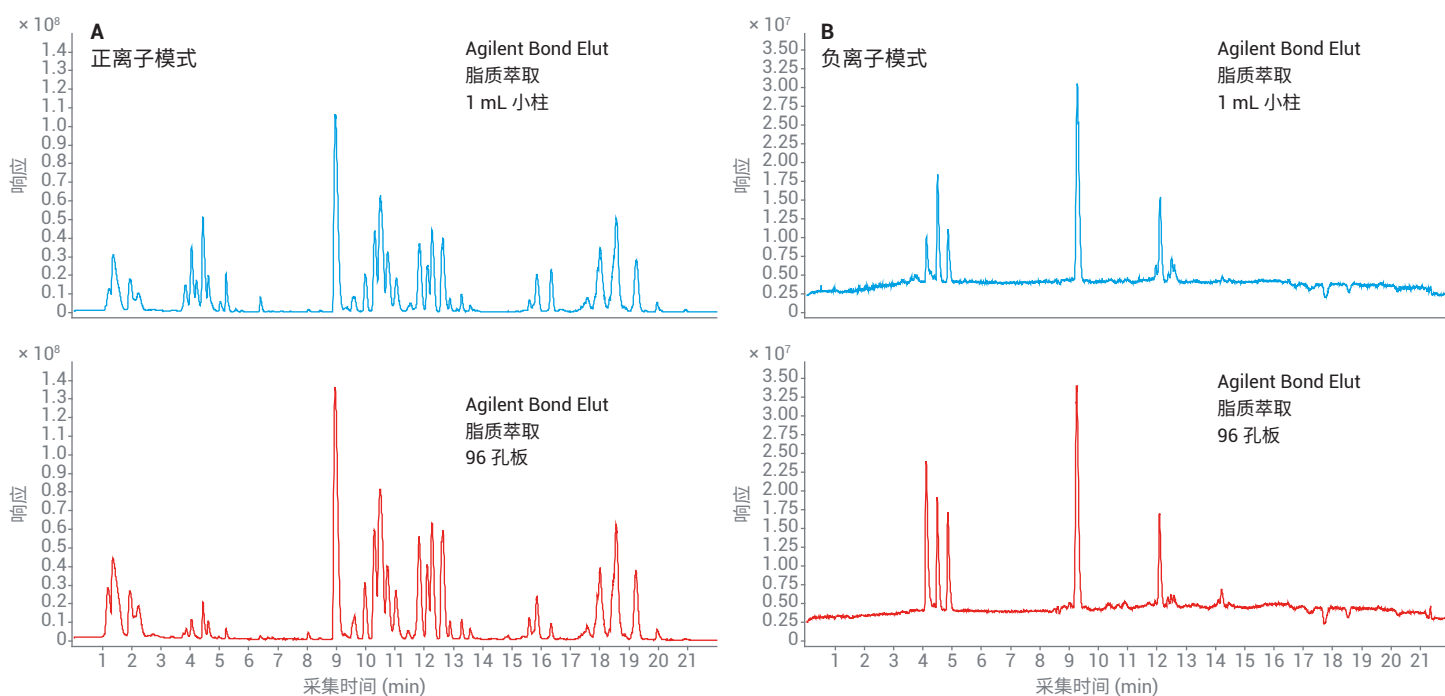


图 3. 使用 Agilent Bond Elut 脂质萃取方法在 1 mL 小柱 (上图) 和 96 孔板 (下图) 上萃取的人血浆的 MS TIC 色谱图。在 LC/Q-TOF 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下采集色谱图

使用 LC/TQ 定量方法评估了代表 15 类脂质的 63 种氘标记脂质的回收率（图 4）。结果表明，无论使用小柱还是微孔板进行 SPE 萃取，所有脂类的回收率均超过 70%。两种 SPE 方法的平均回收率显示出良好的一致性。除了溶血磷酸丝氨酸 (LPS) 和 PC 存在 5%–10% 的差异，两种 SPE 方法间所有脂类的差异均小于 5%。这些差异对于分析方法偏差是可以接受的。

图 5 比较了 96 孔板与 1 mL 小柱 Bond Elut 脂质萃取 SPE 方法鉴定出的脂质类别的分布。对于鉴定出的不同类别脂质化合物的比例和浓度，结果显示高度相似性。

脂质分析研究还表明，使用 96 孔板和 1 mL 小柱的 Bond Elut 脂质萃取 SPE 方法得到的样品结果相当。表 3 列出了在正负离子模式下鉴定出的各种类别的脂质化合物数量以及总浓度。由于对分析应用了严格的过滤，各类别中脂质的总数小于精确保留时间和质量数据库中检测到的最大峰数。

简化的工作流程和基质净化

与用于脂质组学样品前处理的传统 LLE 方法相比，Bond Elut 脂质萃取方法大大简化了整个工作流程，节省了时间和人力。在 LLE 方法中，通常采用重复萃取的方法来提高脂质的萃取

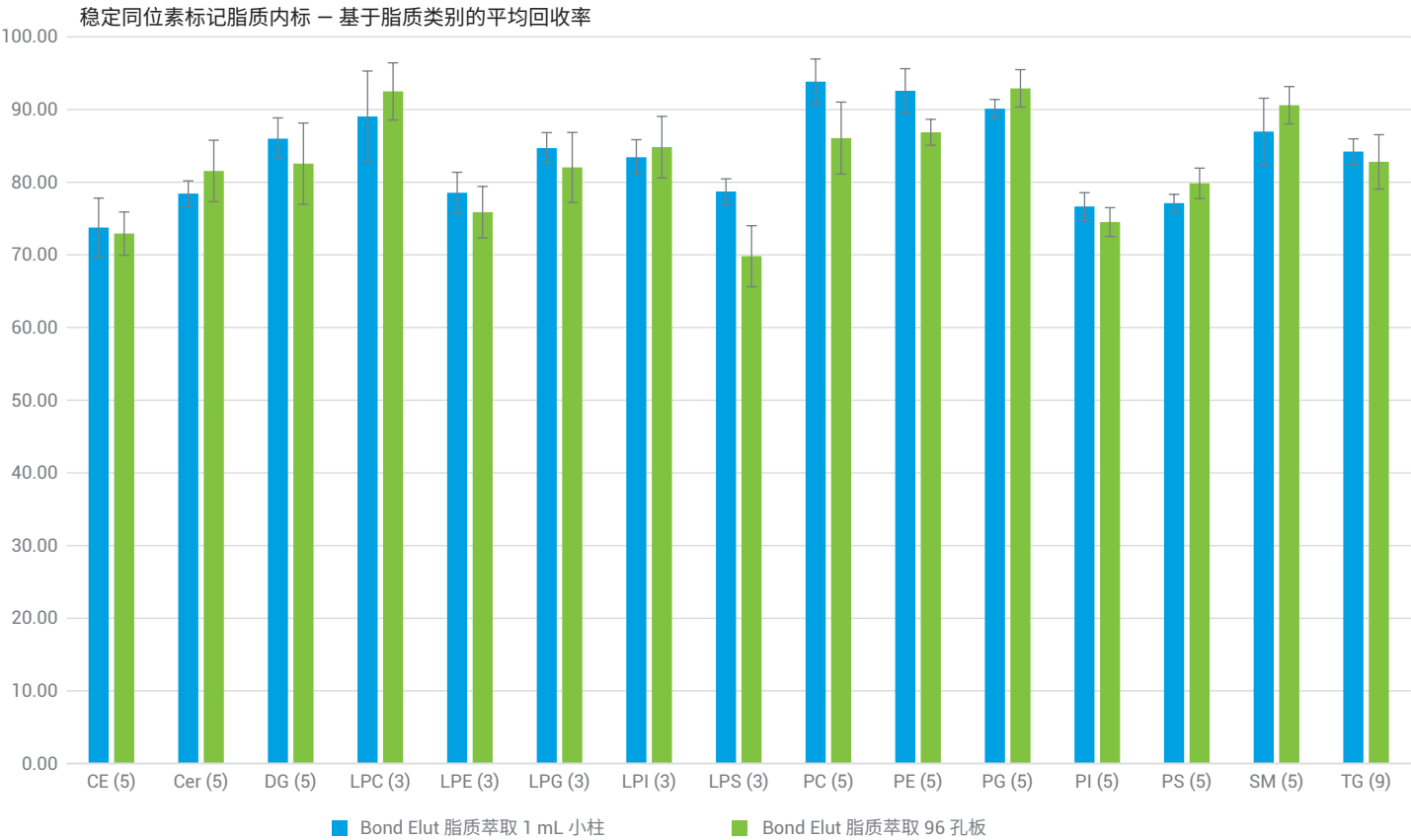


图 4. 基于靶向 LC/TQ 工作流程，按脂质类别划分的氘标记脂质内标平均回收率。每个柱状图代表各脂质类别下 (n) 种脂质的平均值。脂质类别包括：胆固醇酯 (CE)、神经酰胺 (Cer)、二酰甘油酯 (DG)、溶血磷酸胆碱 (LPC)、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷酸甘油 (LPG)、溶血磷脂酰肌醇 (LPI)、溶血磷酸丝氨酸 (LPS)、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、鞘磷脂 (SM) 和三酰甘油 (TG)。括号内为各类别中单个脂质的数量

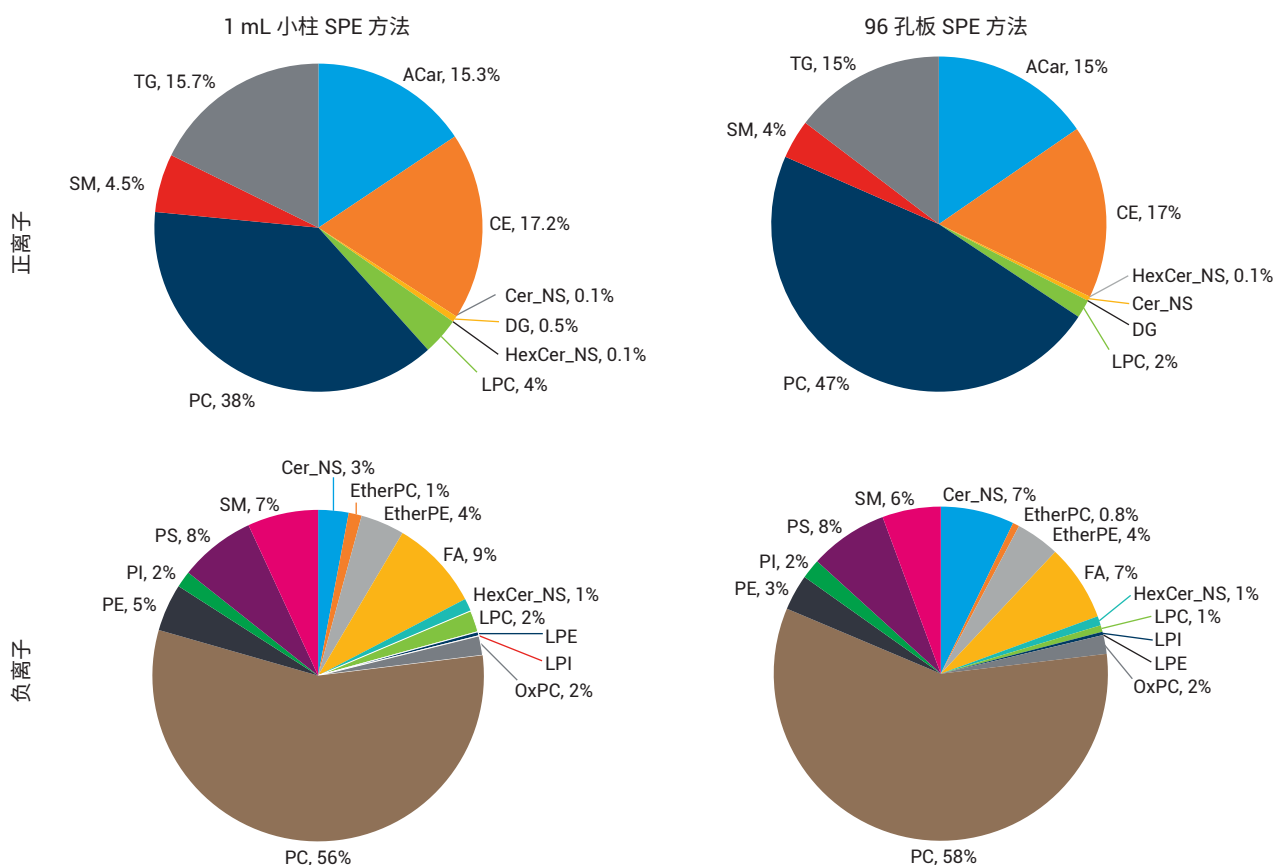


图 5. 基于 LC/Q-TOF 分析研究中校准的摩尔浓度 (nmol/L) 的平均脂质类别分布。分析结果为各前处理样品 5 次前处理重复的 5 次 MS 重复进样的平均值

效率，去除不需要的样品基质共萃取物（如盐类）。这一过程可能费时费力，因为它涉及相分离、有机相转移和样品干燥等多个步骤。对于 Bond Elut 脂质萃取方法，吸附剂可提供与脂类化合物的选择性相互作用，允许使用相对较强的清洗溶剂（9:1 ACN:水）。通过上样和清洗步骤，可以有效、便捷地去除样品基质，尤其是不需要的盐类和没有长脂肪链的其他干扰物质。

SPE 流程只需将溶剂添加到小柱或微板孔中即可，不需要高技巧或专业技术。因此，此类方法可由任何操作人员执行并能获得相似的结果。96 孔板上的批量处理进一步提高了工作流程的易用性，从而显著提高了样品前处理效率。96 孔板 SPE 流程也非常适合自动化。关于优化流程以实现自动化 SPE 脂质萃取的进一步工作正在进行中。

结论

本研究对使用 Agilent Bond Elut 脂质萃取 96 孔板的简便、可靠的 SPE 方法进行了验证，使用其对人血浆进行样品前处理，以用于脂质组学分析。结果表明，基于 96 孔板的 SPE 方法能够为人血浆的非靶向分析提供出色的脂质鉴定，包括所鉴定脂质的数量和峰强度。对稳定同位素标记脂质内标的评估表明，所有主要脂质类别均具有出色的回收率。与使用 1 mL 小柱的 SPE 方法相比，96 孔板 SPE 方法进一步节省了时间和人力，从而提高了样品前处理效率。改进的产品形式和板孔中的吸附剂填料可确保在重力下易于流动和洗脱，使 96 孔板能够轻松兼容自动化平台。

表 3. 鉴定的脂质的数量和相应的总浓度

| MS 模式 | 脂质类别 | Bond Elut 脂质萃取 SPE 1 mL 小柱 | | Bond Elut 脂质萃取 SPE 96 孔板 | |
|-------|-----------|----------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | | 总浓度 (nmol/mL) | 鉴定的脂质数量 | 总浓度 (nmol/mL) | 鉴定的脂质数量 |
| 正离子 | ACar | 1.12 | 9 | 1.61 | 8 |
| | CE | 1.32 | 9 | 1.75 | 9 |
| | Cer_NS | 3.34×10^{-5} | 5 | 1.50×10^{-4} | 7 |
| | DG | 4.35×10^{-2} | 8 | 4.54×10^{-2} | 8 |
| | HexCer_NS | 5.05×10^{-6} | 2 | 1.86×10^{-5} | 2 |
| | LPC | 0.26 | 61 | 0.19 | 57 |
| | PC | 2.73 | 75 | 4.93 | 80 |
| | SM | 0.41 | 38 | 0.39 | 40 |
| | TG | 1.27 | 31 | 1.53 | 31 |
| 负离子 | Cer_NS | 2.20×10^{-2} | 22 | 7.56×10^{-2} | 25 |
| | EtherPC | 9.43×10^{-3} | 13 | 6.76×10^{-3} | 10 |
| | EtherPE | 3.17×10^{-2} | 4 | 4.51×10^{-2} | 3 |
| | FA | 6.57×10^{-2} | 3 | 7.88×10^{-2} | 4 |
| | HexCer_NS | 9.27×10^{-3} | 2 | 9.58×10^{-3} | 2 |
| | LPC | 1.57×10^{-2} | 13 | 6.75×10^{-3} | 11 |
| | LPE | 9.27×10^{-3} | 2 | 3.34×10^{-3} | 4 |
| | LPI | 9.32×10^{-5} | 2 | 2.66×10^{-5} | 1 |
| | OxPC | 1.41×10^{-2} | 3 | 1.94×10^{-2} | 3 |
| | PC | 0.42 | 33 | 0.62 | 34 |
| | PE | 3.44×10^{-2} | 8 | 3.68×10^{-2} | 9 |
| | PI | 1.19×10^{-2} | 11 | 2.04×10^{-2} | 10 |
| | PS | 5.51×10^{-2} | 6 | 8.07×10^{-2} | 6 |
| | SM | 5.12×10^{-2} | 17 | 6.01×10^{-2} | 17 |
| 总计 | | — | 377 | — | 381 |

参考文献

1. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911–917
2. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of biological chemistry* **1957**, 226, 497–509
3. Matyash, V. et al. Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 1137–1146
4. Löfgren, L. et al. The BUME Method: A Novel Automated Chloroform-Free 96-Well Total Lipid Extraction Method for Blood Plasma. *J. Lipid Res.* **2012**, 53, 1690–1700
5. Apffel A.; Zhao L.; Sartain M. J. A Novel Solid Phase Extraction Sample Preparation Method for Lipidomic Analysis of Human Plasma Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Metabolites* **2021**, 11, 294–313
6. Apffel A.; Zhao L. 应用 Agilent 6545 LC/Q-TOF 对经过 Bond Elut 脂质萃取小柱前处理的人体血浆进行脂质组学分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-1783ZHCN, **2020**

附录

表 A1. 使用 LC/TQ 在正离子模式下进行检测的稳定同位素标记脂质内标 (UltimateSPLASH One)
dMRM 参数

| 化合物名称 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | CE (V) | 保留时间 (min) |
|-------------------|--------------|--------------|-----------|---------------|
| CE 14-1 d7 | 619.6 | 376.4 | 10 | 11.274 |
| CE 16-1 d7 | 647.7 | 376.4 | 10 | 11.628 |
| CE 18-1 d7 | 675.7 | 376.4 | 5 | 12.066 |
| CE 20-3 d7 | 699.7 | 376.4 | 10 | 11.722 |
| CE 22-4 d7 | 725.7 | 376.4 | 10 | 11.778 |
| Cer d18-1_d7_16-1 | 543.6 | 525.5 | 8 | 5.062 |
| | 543.6 | 271.2 | 20 | |
| Cer d18-1_d7_18-1 | 571.6 | 553.5 | 8 | 6.261 |
| | 571.6 | 271.2 | 28 | |
| Cer d18-1_d7_20-1 | 599.6 | 581.5 | 8 | 7.755 |
| | 599.6 | 271.2 | 24 | |
| Cer d18-1_d7_22-1 | 627.6 | 609.5 | 8 | 9.168 |
| | 627.6 | 271.2 | 32 | |
| Cer d18-1_d7_24-1 | 655.7 | 637.6 | 12 | 9.684 |
| | 655.7 | 271.3 | 28 | |
| DG 17-0_14-1 d5 | 575.5 | 540.5 | 20 | 6.897 |
| | 575.5 | 332.3 | 20 | |
| DG 17-0_16-1 d5 | 603.6 | 332.2 | 20 | 8.61 |
| | 603.6 | 316.2 | 20 | |
| DG 17-0_18-1 d5 | 631.6 | 596.5 | 20 | 9.436 |
| | 631.6 | 332.3 | 20 | |
| DG 17-0_20-3 d5 | 655.6 | 620.4 | 20 | 9.209 |
| | 655.6 | 332.4 | 20 | |
| DG 17-0_22-4 d5 | 664.6 | 394.2 | 20 | 9.327 |
| | 664.6 | 332.3 | 20 | |
| LPC 15-0 d5 | 487.4 | 184 | 30 | 1.696 |
| | 487.4 | 104 | 24 | |
| LPC 17-0 d5 | 515.4 | 184 | 30 | 2.191 |
| | 515.4 | 104 | 24 | |
| LPC 19-0 d5 | 543.4 | 184 | 28 | 2.648 |
| | 543.4 | 104 | 28 | |
| LPE 15-0 d5 | 445.3 | 304.3 | 12 | 1.718 |
| | 445.3 | 184 | 30 | |
| LPE 17-0 d5 | 473.3 | 332.3 | 20 | 2.215 |
| | 473.3 | 184 | 30 | |
| LPE 19-0 d5 | 501.4 | 483.4 | 8 | 2.661 |
| | 501.4 | 360.3 | 20 | |
| LPG 15-0 d5 | 476.3 | 458.2 | 0 | 1.757 |
| | 476.3 | 304.4 | 8 | |
| LPG 17-0 d5 | 504.3 | 468.1 | 8 | 2.252 |
| | 504.3 | 332 | 20 | |
| LPG 19-0 d5 | 532.4 | 496.3 | 8 | 2.692 |
| | 532.4 | 360.3 | 16 | |

| 化合物名称 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | CE (V) | 保留时间 (min) |
|-----------------|--------------|--------------|--------|---------------|
| LPI 15-0 d5 | 564.3 | 546.3 | 5 | 1.484 |
| | 564.3 | 528.3 | 10 | |
| LPI 17-0 d5 | 592.4 | 574.3 | 5 | 1.844 |
| | 592.4 | 556.3 | 10 | |
| LPI 19-0 d5 | 620.4 | 602.4 | 5 | 2.287 |
| | 620.4 | 584.4 | 10 | |
| LPS 15-0 d5 | 489.3 | 384.3 | 6 | 1.399 |
| | 489.3 | 304.3 | 16 | |
| LPS 17-0 d5 | 517.3 | 412.3 | 16 | 1.856 |
| | 517.3 | 332.3 | 16 | |
| LPS 19-0 d5 | 545.4 | 440.4 | 16 | 2.31 |
| | 545.4 | 360.4 | 20 | |
| PC 17-0_14-1 d5 | 723.6 | 184 | 28 | 4.595 |
| | 723.6 | 125.1 | 50 | |
| PC 17-0_16-1 d5 | 751.6 | 184 | 28 | 5.529 |
| | 751.6 | 125.1 | 50 | |
| PC 17-0_18-1 d5 | 779.6 | 184 | 28 | 6.8 |
| | 779.6 | 125 | 48 | |
| PC 17-0_20-3 d5 | 803.6 | 184 | 32 | 6.216 |
| | 803.6 | 124.9 | 50 | |
| PC 17-0_22-4 d5 | 829.7 | 184 | 28 | 6.709 |
| | 829.7 | 124.8 | 50 | |
| PE 17-0_14-1 d5 | 681.5 | 540.5 | 20 | 4.718 |
| | 681.5 | 184 | 20 | |
| PE 17-0_16-1 d5 | 709.6 | 568.6 | 20 | 5.714 |
| | 709.6 | 184 | 20 | |
| PE 17-0_18-1 d5 | 737.6 | 596.5 | 20 | 7.074 |
| | 737.6 | 184 | 20 | |
| PE 17-0_20-3 d5 | 761.6 | 620.6 | 16 | 6.45 |
| | 761.6 | 184 | 20 | |
| PE 17-0_22-4 d5 | 787.6 | 646.6 | 20 | 6.937 |
| | 787.6 | 184 | 20 | |
| PG 17-0_14-1 d5 | 729.5 | 540.5 | 10 | 3.774 |
| | 712.5 | 540.5 | 10 | |
| PG 17-0_16-1 d5 | 757.6 | 568.5 | 10 | 4.369 |
| | 740.5 | 568.5 | 10 | |
| PG 17-0_18-1 d5 | 785.6 | 596.6 | 20 | 5.213 |
| | 768.6 | 596.6 | 10 | |
| PG 17-0_20-3 d5 | 809.6 | 620.6 | 10 | 4.831 |
| | 792.6 | 620.6 | 10 | |
| PG 17-0_22-4 d5 | 835.6 | 646.6 | 20 | 5.134 |
| | 818.6 | 646.6 | 20 | |
| PI 17-0_14-1 d5 | 817.6 | 540.5 | 25 | 3.636 |
| | 800.5 | 540.5 | 10 | |
| PI 17-0_16-1 d5 | 845.6 | 568.5 | 20 | 4.206 |
| | 828.6 | 568.5 | 15 | |
| PI 17-0_18-1 d5 | 873.6 | 596.6 | 10 | 4.996 |
| | 856.6 | 596.5 | 10 | |

| 化合物名称 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | CE (V) | 保留时间 (min) |
|----------------------|--------------|--------------|--------|---------------|
| PI 17-0_20-3 d5 | 897.6 | 620.6 | 20 | 4.657 |
| | 880.6 | 620.6 | 15 | |
| PI 17-0_22-4 d5 | 923.6 | 646.6 | 15 | 4.927 |
| | 906.6 | 646.6 | 15 | |
| PS 17-0_14-1 d5 | 725.5 | 540.5 | 20 | 3.69 |
| | 725.5 | 296.3 | 32 | |
| PS 17-0_16-1 d5 | 753.5 | 568.5 | 20 | 4.291 |
| | 753.5 | 324 | 32 | |
| PS 17-0_18-1 d5 | 781.6 | 596.5 | 24 | 5.1 |
| | 781.6 | 352.3 | 36 | |
| PS 17-0_20-3 d5 | 805.6 | 620.4 | 20 | 4.776 |
| | 805.6 | 332.4 | 32 | |
| PS 17-0_22-4 d5 | 831.6 | 646.5 | 16 | 5.307 |
| | 831.6 | 332.4 | 40 | |
| SM d18-1_16-1_d7 | 710.6 | 193.2 | 28 | 4.107 |
| | 710.6 | 125 | 50 | |
| SM d18-1_18-1_d7 | 738.7 | 193.2 | 28 | 4.931 |
| | 738.7 | 125 | 50 | |
| SM d18-1_20-1_d7 | 766.7 | 193.2 | 24 | 5.92 |
| | 766.7 | 125 | 50 | |
| SM d18-1_22-1_d7 | 794.7 | 193.2 | 24 | 7.363 |
| | 794.7 | 125 | 50 | |
| SM d18-1_24-1_d7 | 822.7 | 193.2 | 28 | 9.018 |
| | 822.7 | 125 | 50 | |
| TG 14-0_14-0_13-0 d5 | 731.7 | 500.5 | 15 | 10.71 |
| | 731.7 | 486.5 | 19 | |
| TG 14-0_14-0_15-1 d5 | 757.7 | 512.5 | 23 | 10.727 |
| | 757.7 | 500.4 | 20 | |
| TG 14-0_14-0_17-1 d5 | 785.7 | 540.5 | 15 | 10.973 |
| | 785.7 | 500.5 | 15 | |
| TG 16-0_16-0_15-1 d5 | 813.8 | 556.5 | 23 | 11.257 |
| | 813.8 | 540.5 | 27 | |
| TG 16-0_16-0_17-1 d5 | 841.8 | 568.5 | 23 | 11.542 |
| | 841.8 | 556.5 | 19 | |
| TG 16-0_16-0_19-2 d5 | 867.8 | 594.6 | 19 | 11.56 |
| | 867.8 | 556.5 | 23 | |
| TG 18-1_18-1_17-1 d5 | 893.8 | 608.6 | 23 | 11.56 |
| | 893.8 | 594.6 | 19 | |
| TG 18-1_18-1_19-2 d5 | 919.8 | 620.6 | 19 | 11.597 |
| | 919.8 | 608.6 | 35 | |
| TG 18-1_18-1_21-2 d5 | 947.9 | 648.6 | 35 | 11.883 |
| | 947.9 | 608.6 | 31 | |

www.agilent.com

仅限科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44404.7078240741

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（中国）有限公司，2021
2021 年 8 月 30 日，中国出版
5994-3824ZHCN