

应用 Agilent 6545 LC/Q-TOF 对经过 Bond Elut Lipid Extraction 小柱前处理的人体血浆进行脂质组学分析

作者

Alex Apffel 和 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 Lipid Extraction 1 mL 小柱进行人血浆脂质组学样品前处理。蛋白质沉淀后，将血浆样品匀浆上样至萃取柱进行重力洗脱。使用 90:10 乙腈/水清洗，然后用 1:1 氯仿/甲醇洗脱脂质。在 Agilent 6545 LC/Q-TOF 上运行萃取样品，并用 Agilent MassHunter Lipid Annotator 软件进行脂质分析。在人血浆样品中共检测并鉴定出 595 种脂类化合物，其中使用正离子模式方法的有 13 类 347 种，使用负离子模式方法的有 9 类 248 种。方法具有优异的重现性，在不同测试中，3 次以上平行测量的 RSD 小于 10%。与传统液液萃取 (LLE) 方法相比，Bond Elut Lipid Extraction SPE 方法节省了时间和精力，降低了溶剂用量，减少了样品转移步骤，提高了重现性和自动化的可行性。

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。脂质组学研究在过去十年中受到了更多关注，因为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已有了深入了解。随着分析技术（液相色谱 (LC)、质谱 (MS)）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。这也使生物研究队伍日益壮大。

用于脂质组学分析的传统样品前处理工作流程以 LLE 为基础，包括 Bligh-Dyer 方法^[1]、Folch 方法^[2]、Matyash 方法^[3] 和 BUME 方法^[4]。尽管这些方法广泛应用于脂质组学样品前处理，但它们费时、费力、难以自动化，且重现性不佳。

本研究中介绍了一种新型 SPE 方法，使用 Bond Elut Lipid Extraction SPE 柱进行人血浆的脂质组学研究。Bond Elut Lipid Extraction SPE 柱和 96 孔板使用 EMR-Lipid 吸附剂作为填料，该吸附剂对脂质分子有选择性和高效的相互作用。EMR-Lipid 吸附剂与脂质分子的相互作用基于体积排阻和疏水作用两种机制的结合。多数脂质

分子上的无支链长烃链被选择性保留在 EMR-Lipid 吸收剂的孔中，而缺少线型长链的其他分子则留在溶液中。目前 EMR-Lipid 吸附剂主要应用于基质去除，即通过与 EMR-Lipid 吸附剂的相互作用去除基质中的脂质，同时分离目标分析物以备进一步处理或分析。

Bond Elut Lipid Extraction SPE 小柱允许在脂质组学研究的样品前处理中使用 EMR-Lipid 吸附剂，由此打开了一个新的应用领域，其中脂质为目标分析物，可从其他样品基质组分中萃取和分离。与传统 SPE 一样，方法利用了吸附剂的“捕捉和释放”功能。脂类化合物首先保留在 EMR-Lipid 吸附剂上，然后用有机溶剂洗脱。本研究介绍了一种使用 Bond Elut Lipid Extraction 1 mL 小柱进行人血浆脂质组学分析的工作流程。

实验部分

化学品与试剂

LC/MS 级乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH) 和三氯甲烷购自 Honeywell Research Chemicals (Muskegon, MI, USA)。高效液相色谱 (HPLC) 级正丁醇 (*n*-BuOH) 和乙酸铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。人血浆 NIST 标准品中的 SRM 1950 代谢物来自 Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA)。

溶液与标准品

将 99 mL ACN 与 1 mL MeOH 混合，配制沉淀溶剂 ACN/MeOH (99:1, v/v)。将 90 mL ACN 与 10 mL H₂O 混合，配制清洗溶剂 ACN/H₂O (9:1, v/v)。将 50 mL 氯仿与 50 mL MeOH 混合，配制洗脱溶剂氯仿/MeOH (1:1, v/v)。将 50 mL *n*-BuOH 与 50 mL MeOH 混合，配制复溶溶剂 *n*-BuOH/MeOH (1:1, v/v)。

仪器与材料

本研究使用配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统（由二元泵、恒温多孔自动进样器和柱温箱组成）。

样品前处理设备包括：

- 移液管和重复用移液器 (Eppendorf, NY, USA)
- 安捷伦正压 48 孔处理装置 (PPM-48) (部件号 5191-4101)
- 用于 PPM-48 的 1 mL 柱架 (部件号 5191-4102)
- 用于 PPM-48 的废液架和废液箱 (部件号 5191-4112)
- 涡旋仪 (VWR, USA)
- 超声仪 (VWR, USA)
- Agilent Bond Elut Lipid Extraction 小柱，1 mL (部件号 5610-2041)
- Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.0 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 693775-702)
- Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3.0 mm 色谱柱，超高效液相色谱 (UHPLC) 保护柱 (部件号 823750-928)

仪器条件

LC/Q-TOF 仪器条件列于表 1。

用 MassHunter Lipid Annotator 软件进行 MS/MS 计算机谱图匹配，将萃取的 SRM 1950 血浆标样中的 LC/MS/MS 数据标注为特定脂质。软件使用一种结合概率密度、贝叶斯评分和非负最小二乘拟合的算法搜索理论脂质谱库。在整个数据分析过程中，对正离子和负离子模式数据集分别进行处理。

使用 Agilent MassHunter Profinder 10.0 版软件鉴定 LC/MS 数据的各个特征，鉴定是在批处理目标特征提取 (BTFE) 模式下，与 Lipid Annotator 软件中生成的个人化合物数据库和谱库 (PCDL) 相比，需要同时满足质量数和保留时间 (RT) 标准。将得到的特征导出至 Mass Profiler Professional 15.0 版，进行脂质类别分析和统计分析。图 1 显示了脂类化合物鉴定和确认的数据采集与处理的基本方案。

表 1. 用于脂质组学分析的 LC/Q-TOF 分析方法条件

参数	值	
Agilent 6545 LC/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， <i>m/z</i> 1700	
极性	正离子和负离子	
干燥气温度	250 °C	
干燥气（氮气）	11 L/min	
雾化器气体	35 psi	
鞘气	300 °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	
采集速率	仅 MS：3 谱图/秒 (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 (~1.3 amu)	
	碰撞能量：20 eV，35 eV	
参比校正	两个位点， <i>m/z</i> 121.050873(+)，922.009798(+)	
	两个位点， <i>m/z</i> 119.036320(–)，980.016375(–)	
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统		
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.0 × 150 mm, 2.7 μm	
保护柱	Agilent Poroshell HPH-C18, 3.0 mm，UHPLC 保护柱	
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 秒（MeOH/异丙醇，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 (2:2:6, v/v/v)，加入 10 mmol/L 乙酸铵	
流速	0.6 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	%B
	0.0	55
	5.0	57
	25.0	100
	27.0	100
	28.0	55
停止时间	30 min	
后运行时间	5 min	
观察到的柱压	300–600 bar	

样品前处理

采用蛋白质沉淀法 (PPT) 制备人血浆，然后通过 Bond Elut 脂质萃取 SPE 柱进行脂质萃取、分离和纯化。图 2 显示了用于脂质组学研究的人血浆样品前处理的一般步骤。

将 100 μ L SRM 1950 血浆体转移到 2 mL 聚丙烯卡口盖样品瓶，然后添加 900 μ L 冰 ACN/MeOH (99:1, v/v) 进行 PPT。将试管盖紧，涡旋振荡 30 秒，然后在冰上超声处理 10 分钟。在冰中超声处理来释放 PPT 捕集的脂质，提高脂质萃取效率。

将 Bond Elut Lipid Extraction 1 mL 小柱置于 PPM-48 中，柱下放置一个废液瓶。每个样品再涡旋振荡 10 秒，将全部匀浆用大口径移液枪头转移到柱上。必须要转移全部样品匀浆，以防与蛋白质沉淀暂时结合而造成可能的脂质损失。

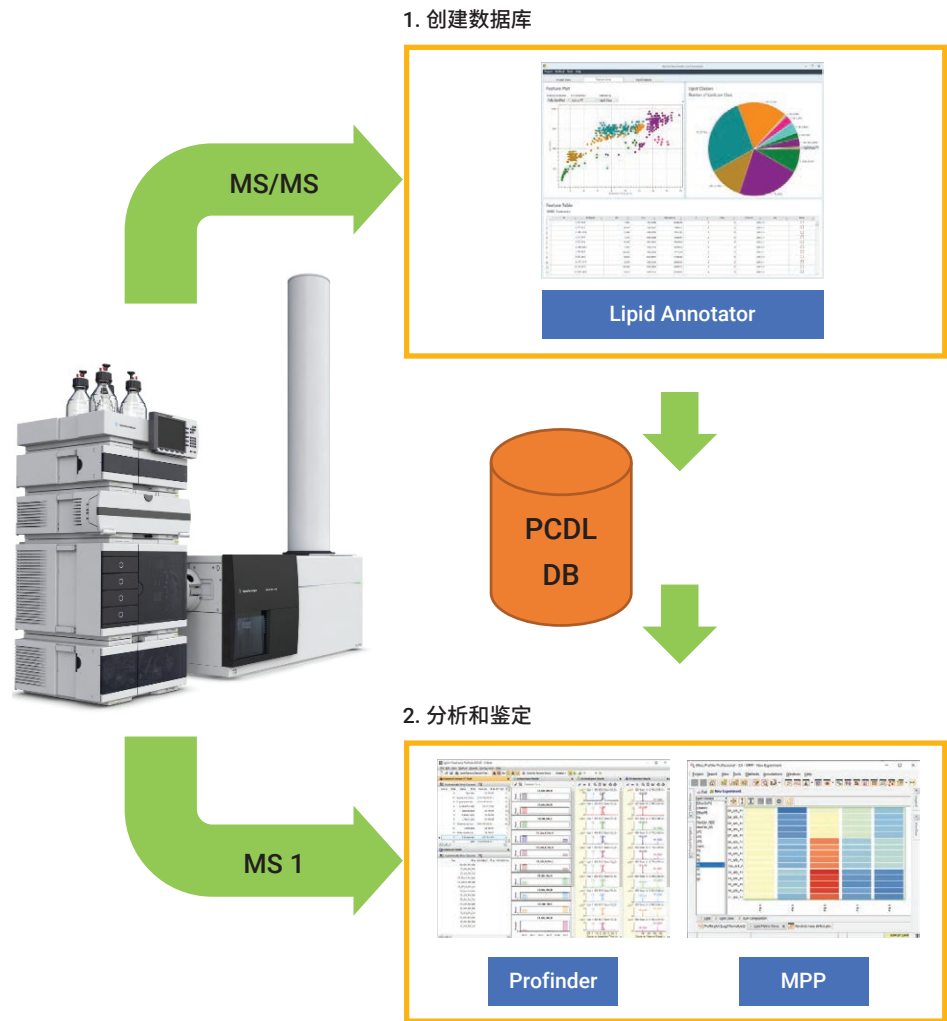


图 1. Agilent 6450 LC/Q-TOF 脂质组学分析的数据采集与处理

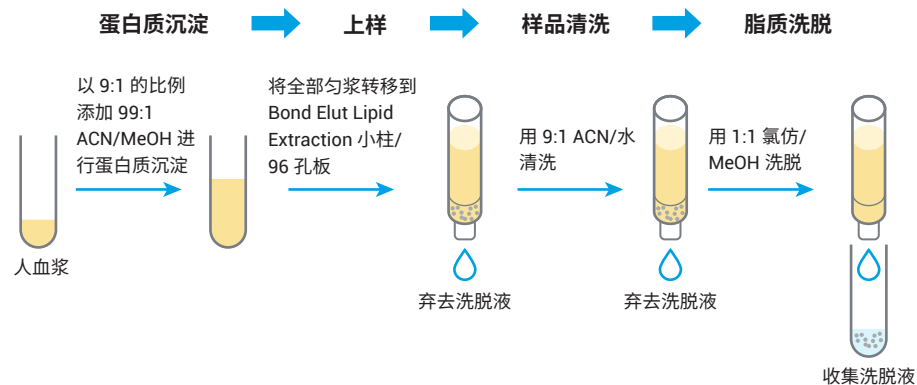


图 2. 用 Agilent Bond Elut Lipid Extraction 1 mL 小柱处理用于脂质组学研究的人血浆样品的工作流程

然后在重力或低压 (2–4 psi) 下，以 3–5 秒/滴的流速进行缓慢洗脱。稳定的洗脱流速是为了让脂类化合物和吸附剂之间有充分的反应时间，以便脂质能有效保留在吸附剂上。当柱内无可见液体时，使用 1 mL ACN/水 (9:1, v/v) (2 × 1 mL) 在 2–4 psi 的压力下进行两个清洗步骤。施加更高的压力 (6–9 psi) 使柱完全干燥。移除废液架，将一个带玻璃试管的收集架放在柱下。根据需要，用 2 × 1 mL 三氯甲烷/MeOH (1:1, v/v) 在重力或低压 (1–3 psi) 条件下洗脱脂质。最后施加高压 (6–9 psi)，使吸附剂完全干燥。在 30 °C 下，用 N₂ 吹干全部洗脱液。

将干燥后的残留物复溶于 100 µL *n*-BuOH/MeOH (1:1, v/v) 中。在室温下将样品涡旋振荡 2 分钟并超声处理 10 分钟。上述复溶程序对于确保干燥脂质残留物完整、一致的复溶非常重要。将样品转移到带玻璃内插管的 2 mL 样品瓶中，等待仪器进样。干燥样品也可以储存在冰箱中，以备将来仪器分析之用。

柱上总磷脂 (PL) 回收率测试

使用表 2 中的方法，在安捷伦 LC/MS/MS 系统上监测总 PL 分析。

经 PPT 处理的血浆样品离心后，移出上清液，干燥，复溶于 100 µL *n*-BuOH/MeOH (1:1, v/v) 中。以该样品作为对照，与经

Bond Elut Lipid Extraction 处理后的样品进行对比。对整个保留时间窗口手动积分，得出总 PL 峰面积。比较仅用 PPT 和 PPT 后用 Bond Elut Lipid Extraction SPE 处理的血浆萃取样总 PL 峰面积，评价快速柱上回收率。

表 2. 总磷脂曲线的方法参数

液相色谱部分				
仪器	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120, HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 683775-924)			
流动相 A	含 0.125% 甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵缓冲液			
流动相 B	含 0.125% 甲酸的 95:5 ACN/10 mmol/L 甲酸铵			
梯度	时间 (min)	MPA	MPB	流速 (mL/min)
	0	5	95	0.3
	1	5	95	0.3
	12	60	40	0.3
	15	停止	停止	停止
质谱部分				
仪器	Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS/MS			
离子源	安捷伦喷射流电喷雾离子源			
扫描时间段	子离子 184 <i>m/z</i> 的正母离子扫描, CE 20 V			

结果与讨论

SPE 方法开发与考虑因素

Bond Elut Lipid Extraction SPE 步骤包括三个部分：将样品上样到吸附剂上保留脂质、清洗进一步去除不需要的基质组分，以及洗脱回收被捕集脂质。蛋白质沉淀用于脂质萃取和蛋白质去除的初始

阶段。采用高比例乙腈/血浆 (9:1) 提高脂类化合物的萃取效率。加入少量甲醇 (1%–5%)，防止在匀浆转移过程中产生大的蛋白质沉淀凝块，由此捕集脂质并堵塞移液管。上样步骤允许不需要的基质共萃取物（包括盐类和缺少线性烷基链的其他基质共萃取物）通过 SPE 柱。由于吸附剂选择性结合脂质，因此本研究使用了高

含量有机溶剂（高达 90% 乙腈）的清洗试剂，可以更有效地清洗并去除其他基质干扰效应。洗脱溶剂为甲醇与氯仿或二氯甲烷的混合物，其中至少 50% 的甲醇对脂质从吸附剂中的释放起重要作用。为避免使用塑料腐蚀性溶剂时萃取出各种塑料提取杂质，务必使用玻璃管收集洗脱液。

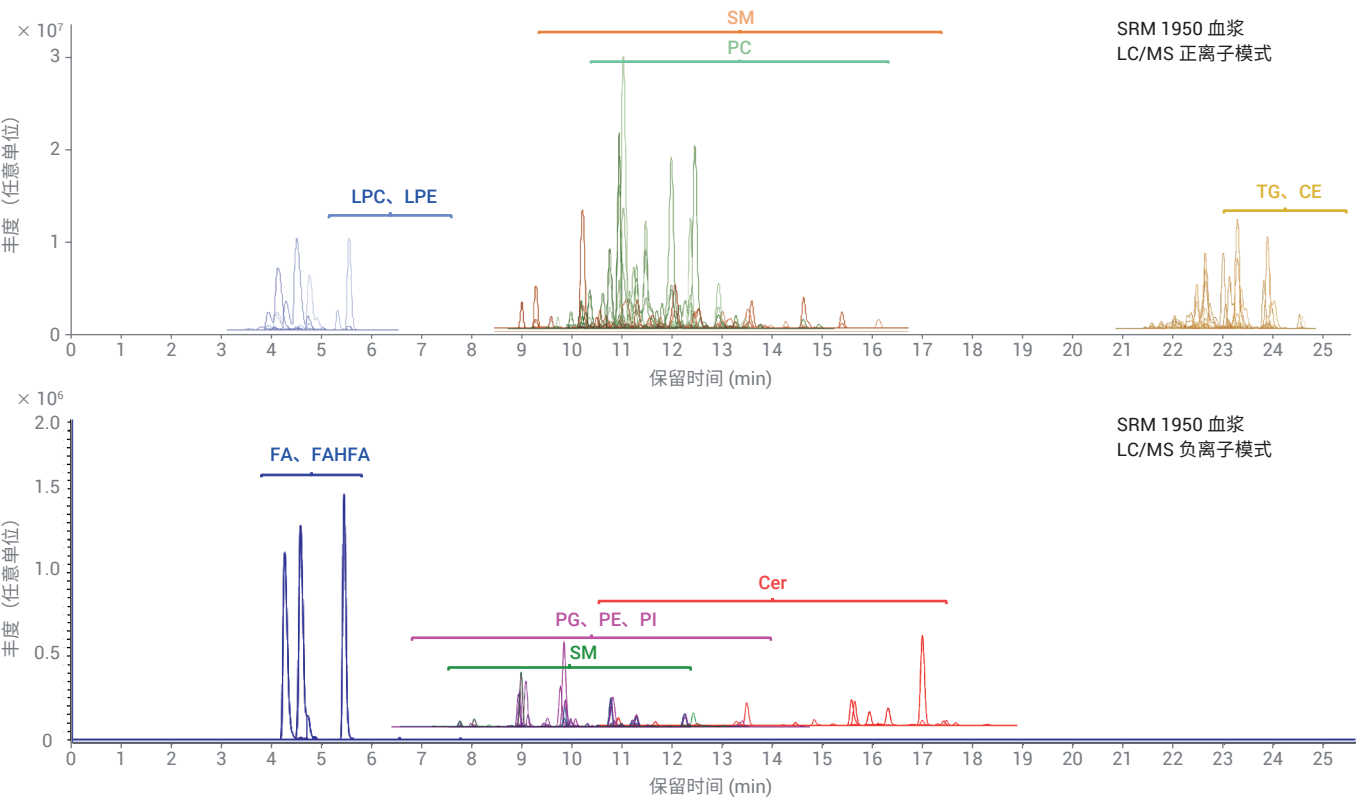


图 3. 用 Agilent Bond Elut 脂质萃取 SPE 方法鉴定人血浆中 11 类脂类化合物的正离子和负离子 EIC

人血浆脂质组学分析

图 3 显示了人血浆中主要脂类化合物在正、负离子模式下的提取离子色谱图 (EIC)。图 4 为根据不同脂质类别对总峰强度占比，得到的所鉴定脂类化合物的分布。根据所鉴定各脂类化合物强度分布，由 3 次平行前处理样品的 LC/MS 平均结果，得到正离子和负离子模式分析结果。所鉴定脂类化合物来源于以下脂质类别：

- 酰基肉碱 (Acar)
- 甘油磷酸胆碱 (PC)
- 甘油磷酸乙醇胺 (PE)
- 甘油磷酸肌醇 (PI)
- 甘油磷酸丝氨酸 (PS)
- 甘油磷酸甘氨酸 (PG)
- 溶血甘油磷酸胆碱 (LPC)
- 溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)
- 鞘磷脂 (SM)
- 神经酰胺 (Cer)
- 胆固醇酯 (CE)
- 二酰甘油酯 (DG)
- 三酰甘油 (TG)
- 脂肪酸 (FA)
- 羟基脂肪酸酯 (FAHFA)

除游离胆固醇外，所鉴定脂类化合物分布与 SRM 1950 的一致分布相似^[5]。游离胆固醇（如胆固醇）因缺少长的线性烷基链，无法有效保留在 EMR-Lipid 吸附剂上。

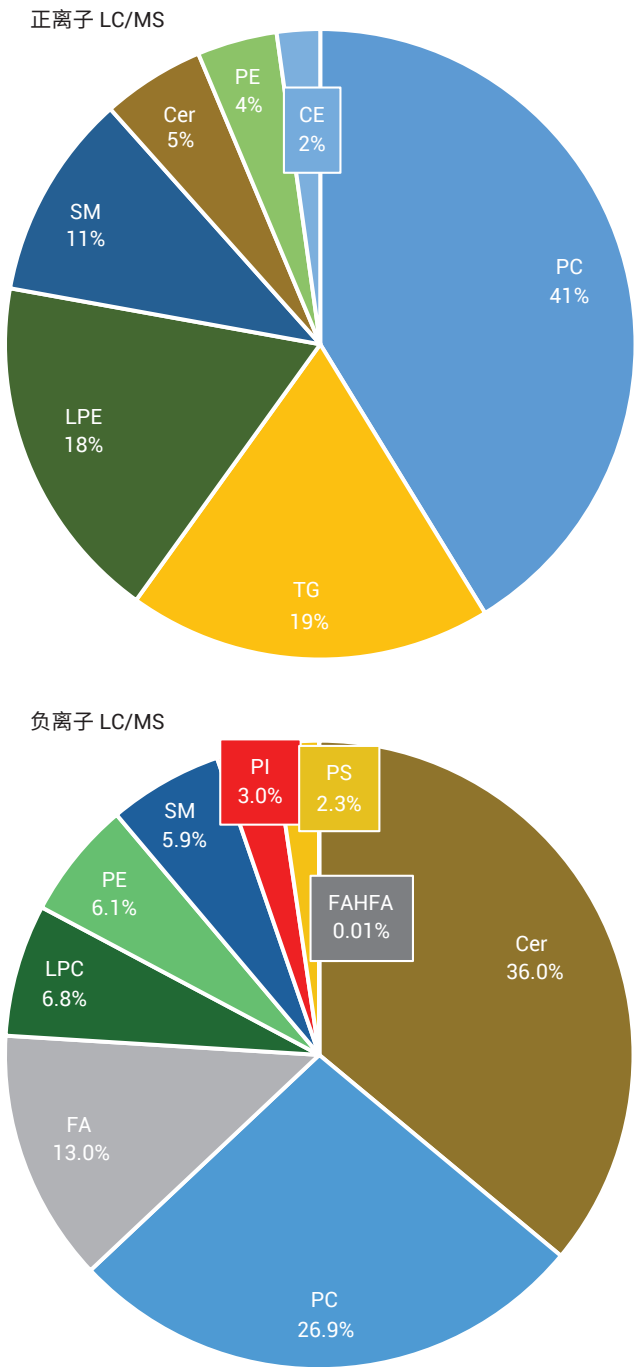


图 4. 根据总峰强度按脂质类别列出的脂类化合物分布结果

表 3 列出了使用 Bond Elut Lipid Extraction SPE 方法在血浆中鉴定出的脂类化合物数量，以及正、负离子模式下的平均总峰面积。使用正离子模式共鉴定出 13 类 347 种脂类化合物，负离子模式共 9 类 248 种脂类化合物。在正离子模式下，总峰面积强度为 1.1E+09，负离子模式下该值为 4.3E+07。

此外，在仪器上对每个经过处理的样品进行 3 次进样，并进行 3 次重复分析，评价方法的重现性，使用鉴定脂类化合物的数量和峰面积进行评价。所有鉴定脂类化

合物均通过四分位距统计测试（小于第一个四分位数 - 1.5 × 四分位数范围，大于第三个四分位数 + 1.5 × 四分位数范围）进行过滤，除去低丰度化合物和异常值。然后计算其余所鉴定脂类化合物总峰强度的 %RSD。仪器重复进样的 RSD% 表示仪器方法的重现性，而样品前处理重复分析的 RSD% 表示整个工作流程的重现性。仪器方法重现性为 6.4%，整个工作流程重现性为 9.4%。结果表明，Bond Elut 脂

质萃取方法提供了良好的样品前处理一致性，并不会导致工作流程发生显著变化。

表 3. 使用 Agilent Bond Elut Lipid Extraction SPE 方法鉴定的人血浆中脂类化合物和峰强度的结果

模式	类别	鉴定的 脂质数量	总峰面积
正离子	PC	93	4.5E+08
	TG	72	2.1E+08
	LPC	44	2.0E+08
	SM	50	1.2E+08
	Cer	18	5.8E+07
	PE	6	4.5E+07
	CE	19	2.4E+07
	DG	20	1.4E+06
	ACar	17	8.0E+05
	LPE	2	3.2E+05
	PI	3	4.4E+04
	PS	2	2.1E+04
	PG	1	9.9E+03
总计		347	1.1E+09
负离子	Cer	47	1.5E+07
	PC	89	1.2E+07
	FA	5	5.6E+06
	LPC	7	2.9E+06
	PE	52	2.6E+06
	SM	26	2.5E+06
	PI	16	1.3E+06
	PS	5	9.9E+05
	FAHFA	1	5.3E+03
总计		248	4.3E+07

柱上总磷脂回收率

磷脂是血浆等生物基质中的一类重要脂质，因此，血浆中的 PL 对脂质组学具有重要意义。利用子离子 184 的母离子扫描可以轻松监测血浆萃取物的总 PL。因此，该方法可作为一种评估柱上总磷脂回收率的快速、简便的方法。此外，由于磷脂分离并不是本测试的主要目的，故用 HILIC 色谱进行柱上快速洗脱，并用较短的液相色谱梯度，尽量减少柱上交叉污染。

图 5 展示了用 PPT 和 SPE 方法处理的样品中总 PL 的色谱图对比。总的来说，两种色谱图在色谱图比较上有很高的相似性，但也有一些细微差异。对于在 0-3.5 分钟保留时间 (RT) 窗口内的色谱图强度，SPE 方法的丰度略低于仅用 PPT 的方法，说明柱上有轻微损失。根据该 RT 窗口内积分的总峰面积，总 PL 回收率为 90%。对于在 3.5-15 分钟的保留时间 (RT) 窗口内的色谱图强度，SPE 方法的丰度略高

于仅用 PPT 的方法。这表明，通过对整个匀浆样品进行 SPE 萃取，可以回收蛋白质沉淀物中捕集的某些脂质。根据该窗口内积分的总峰面积，总 PL 回收率为 143%。根据 SPE 方法与 PPT 方法的总峰面积积分，整个 RT 窗口内的总 PL 回收率为 102%。这一快速对比表明，SPE 过程的 PL 损失不明显，且 SPE 过程可以回收一些被蛋白质沉淀物捕集的脂质。

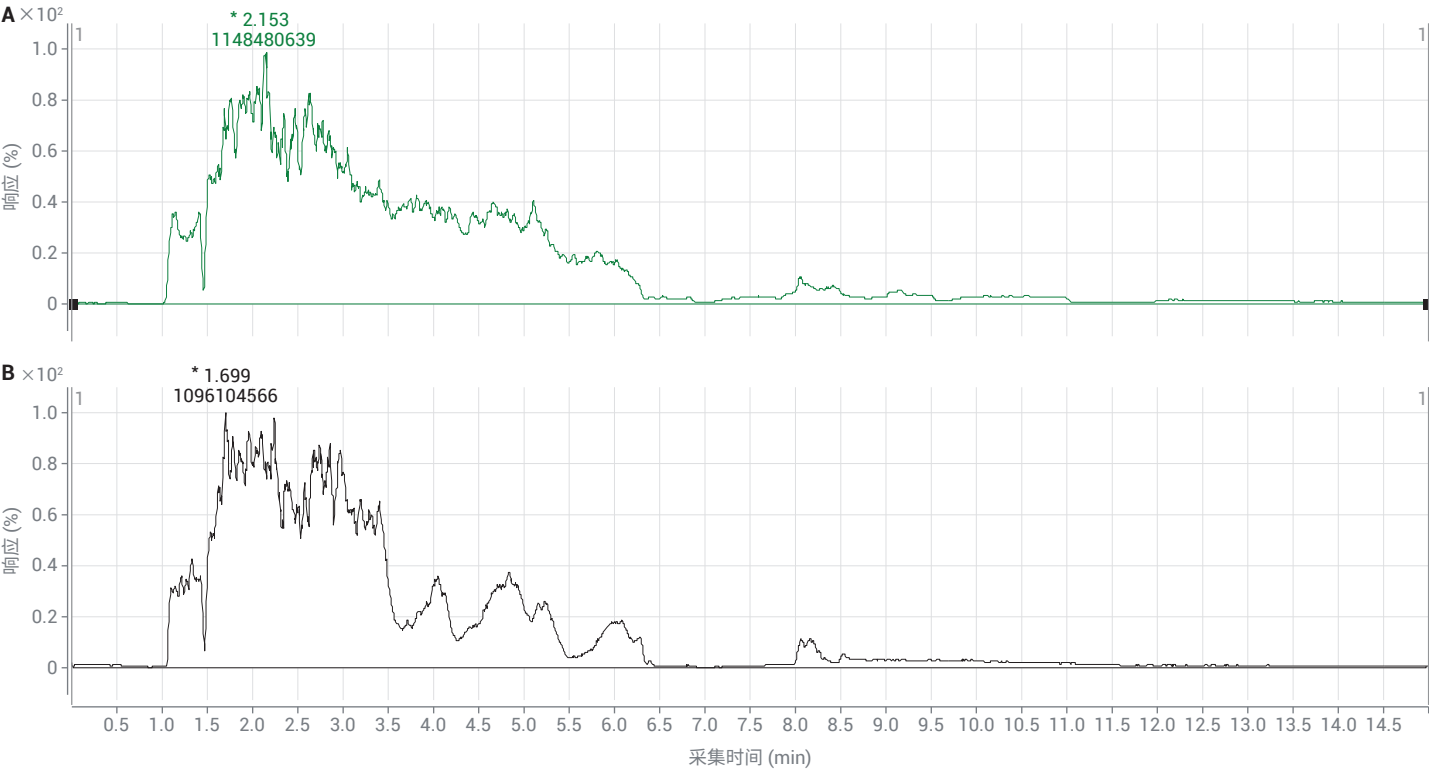


图 5. 使用子离子 184 的母离子扫描进行总磷脂谱图对比。(A) 用 PPT 方法处理血浆样品，然后用 Bond Elut Lipid Extraction SPE 方法；(B) 仅用 PPT 方法处理血浆样品

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 Lipid Extraction SPE 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效率, 去除不需要的样品基质共萃取物 (如盐类)。这个过程可能费时费力, 因为它涉及相分离、有机相转移和样品干燥等多个步骤。这也增加了误差和分析物损失的空间。对于 Bond Elut Lipid Extraction 方法, EMR-Lipid 吸附剂可提供与脂类化合物反应的选择性, 允许使用相对较强的清洗溶剂 (90:10 ACN/水)。通过上样和清洗步骤, 可以有效、便捷地清洗样品基质, 对不需要的盐类和没有长脂肪链的其他干扰物质更是如此。图 6 为仅通过 Bond Elut Lipid Extraction SPE 方法和 PPT 萃取处理的样品干燥后的残留物。图中清晰显示 SPE 方法在 PPT 萃取后实现了显著的基质净化。

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.7036805556

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, 2020
2020 年 3 月 12 日, 中国出版
5994-1783ZHCN

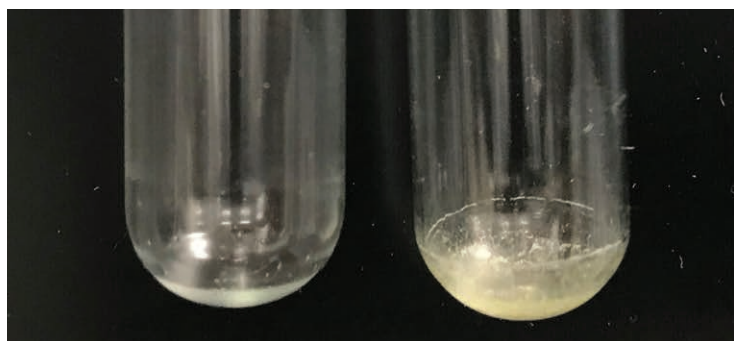


图 6. 用 Bond Elut 脂质萃取方法和仅用 PPT 萃取处理的样品干燥后的残留物

结论

本研究使用 Bond Elut Lipid Extraction 柱开发了一种简便、可靠的人血浆脂质组学分析方法。SPE 方法为人血浆中非靶向类脂组学分析提供了常见的脂质鉴定, 包括所鉴定脂类化合物的数量和峰强度。总磷脂回收率的快速评价结果还表明, 柱上的磷脂损失不明显。与传统 LLE 方法相比, SPE 方法节省了大量时间和精力, 提高了重现性。该方法还显示了利用 96 孔板进行高通量样品前处理的潜力。

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, doi: 10.1139 / o59-099
2. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **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, doi: 10.1194 / jlr.D700041-JLR200
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. Bowden, J. A. et al. Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics Using SRM 1950–Metabolites in Frozen Human Plasma. *J. Lipid Res.* **2017**, 58, 2275–2288