Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用Ostro样品制备产品从血浆中提取磷脂

Mark Ritchie，Mainak Mal和Stephen Wong
沃特世公司，新加坡

应用优势

- 选择性富集特定类型磷脂或萃取全部磷脂
- 96孔设计适用于自动化技术。
- 相比于液液萃取，需要的溶剂体积更少。

沃特世解决方案

Ostro™ 样品制备产品

Xevo® TQ-S质谱仪

ACQUITY UPLC®系统

ACQUITY® BEH HILIC色谱柱

关键词

血浆，磷脂萃取，Ostro

简介

多数“组学”研究的共同目标是鉴定疾病分子标记物、理解疾病作用机理，进而发现潜在的药物靶点。通常情况下，用于研究的体液因为与活体器官和组织密切接触所以其对身体病理状态特定反应非常灵敏。

在脂质组学分析中，通常采用液液提取的方式对血浆的磷脂进行研究[1,2]。过去也曾有固相萃取的应用。氨丙基硅胶柱也可用于分析脂质，但多着重于脂肪酸[3]，或是会根据洗脱条件的不同进行筛选[4]。

Ostro 96孔样品制备板则针对日常生物分析中的小分子进行研究，捕获并去除样本制备过程中大量的磷脂成分。在该通用流程中，脂质保留在Ostro板上，并不进行洗脱。对上样和洗脱条件进行调整，就能实现选择性富集特定类型磷脂或萃取全部磷脂。

实验

ACQUITY UPLC条件

色谱柱：	ACQUITY BEH HILIC 1.7 µm, 2.1 × 100 mm
柱温：	30 °C
流动相A：	乙腈/水（95：5），含10 mM醋酸铵，pH 8.0
流动相B：	乙腈/水（50：50），含10 mM醋酸铵，pH 8.0
梯度：	0-20% B，10 min
流速：	500 µL/min
进样量：	3.0 µL，部分环进样

Xevo TQ-S MS条件

电离模式：	ESI，+/-切换
毛细管电压：	3.0 kV
脱溶剂温度：	450 °C
脱溶剂气体流速：	1000 L/hr
离子源温度：	150 °C
碰撞池压力：	3.6×10^{-3} mBar

样品制备

人血浆样本来源：新加坡国立大学生物科学中心志愿者，或商业样本（Sigma，P/N P9523）。

萃取流程

1. 将Ostro板放置在2 mL收集板上，并安置在真空装置上。
2. 使用移液管将100 µL血浆直接上样到Ostro板中。
3. 在孔中加入800 µL乙醇，使用移液管抽吸10次，确保样本充分混合。
4. 混合过后，应用15″ Hg真空条件，直至溶剂完全排空（约1分钟）。如在15″ Hg条件下没有流出液体，可采用更高的真空条件。
5. 重复步骤3和4，并将收集到的流量标记为“流穿”部分。
6. 从真空装置中移除含有流穿部分的收集板，并重新安装新板用于收集洗脱部分。
7. 加入800 µL洗脱溶剂（4.5:4.5:1/氯仿：甲醇：三乙胺）至孔中。
8. 应用15″ Hg真空条件、直至溶剂完全排空（约1分钟）。
9. 重复步骤6和7，并将收集到的容量标记为“洗脱”部分。
10. 对流穿和洗脱部分进行干燥（使用氮蒸发器，约1.5小时）。
11. 用200 µL 1:1（v/v）氯仿：甲醇复溶洗脱（E）和流穿（FT）部分。

注：请小心确保枪头被放置在样本板的指定位置，避免样本流失或混合。

为便于比较，等量相同的人血浆使用Bligh-Dyer法[1]进行萃取。

鉴于不同的磷脂种类之间动态差异范围极大，我们分析了两种浓度的样本：未经稀释的、用乙腈按照1/100比例稀释的。采用带有正负切换的多反应监测方法，多反应监测时间设定与特定类型磷脂[1]的洗脱时间吻合。该方法的简要介绍如表1所示。

磷脂种类	MS模式	转换数量	多反应监测采集时间（分钟）
LPCs	+	11	6-10
Cer	+	34	0-5
SMs	+	19	5-8.5
PCs	+	48	4-7
LPEs	-	11	4-10
LPIs	-	11	4-10
PIs	-	27	1.5-6
PEs	-	34	1.5-6
PGs	-	20	0-3

表1. 分析用MRM通道一览。

采用预编程TargetLynx™方法对每种成分得到的信号自动积分。平均峰面积阈值设定为1000。

即将分析前，在样本中加入外源性脂类内标作为空白对照，比较两种样本制备方法。该步骤是为了在计算方法或洗脱成分的相对提取率之前对数据进行标准化。加入的脂类及浓度如表2所示。

脂类标品	最终样本浓度（ng/µL）
DMPA	0.5
DMPG	1.0
DMPE	2.5
DMPS	1.0
diC8PI	1.0
DMPC	5.0
SM	1.0
C_{17} Cer	1.0
C_8 GluCer	0.5

表2. 方法比对中数据标准化使用的外源性脂类。

结果与讨论

对比使用Ostro样品制备和Bligh-Dyer方法的萃取率

将混合的志愿者血浆进行萃取，每种两份。因峰面积阈值设定为1000，为检测脂类，MRM通道的峰面积至少要大于这一阈值。采用与后提取加标的同类型外源性磷脂的比率对每种脂类的峰面积值进行标准化操作。随后，综合同一方法的同一萃取液对这些比率计算平均分配值，使每个部分的脂类都能获得唯一的标准值。随后得出的Ostro流穿部分和洗脱部分的脂类数值去除以用相同脂类由Bligh-Dyer方法得出的数据，得到的结果就是每种脂类的萃取率。每种脂类的平均萃取率如表3所示。

磷脂种类	检测到的脂类数量			Ostro与BD的萃取效率	
	BD	Ostro E	Ostro FT	Ostro E	Ostro FT
SM	17	17	0	1.00	0.00
LPC	9	9	0	1.00	0.00
PC	47	47	0	1.01	0.00
Cer	13	3	13	0.03	0.95
PG	15	5	15	0.06	1.37
LPE	10	6	10	0.07	0.60
PE	28	23	28	0.14	0.99
LPI	0	4	5	n/c	n/c
PI	22	18	22	0.16	1.14

表3. 针对志愿者血浆的样品制备效率比对。每个类型中观察到的脂类数量（阈值超过1000）如表所示，含Ostro和Bligh-Dyer两种方法数据。萃取率以标准化强度的比率形式体现，为Ostro样品制备数据与Bligh-Dyer数据的商。绿色阴影标示部分是指该类型脂质中占较大比例的部分。关键词：BD：Bligh-Dyer方法[1]，Ostro E：Ostro样本制备得出的洗出部分，Ostro FT：Ostro样本制备得出的流穿部分，n/c：由于在采用其中一种方法时未观察到样本，因此无法比较。

鞘磷脂（SMs）、磷脂酰胆碱（PCs）和溶血磷脂酰胆碱（LPCs）都通过Ostro板完全保留，仅在洗脱液中出现。同种磷脂在两种萃取方法中强度相同。

神经酰胺（Cer）和磷脂酰甘油（PGs）则在相同条件下几乎无亲和力，主要在流穿部分中出现，只有非常少一部分被保留，并出现在洗脱部分。定性相同PG脂类，使用Ostro板的萃取率与Blgih-Dyer法相比，其峰面积更大。磷脂酰乙醇胺（PEs）和磷脂酰肌醇（PIs）表现一致，其萃取率在Ostro板上和Bligh-Dyer法一致，但在Ostro板上保留更强，在洗脱液中的含量略高。相同的溶血PE（LPE）类在两种萃取方法中都有发现，但使用Ostro板得到的回收率只有Bligh-Dyer法的60%。另一方面，使用Ostro样品制备则大大促进了溶血磷脂酰肌醇（LPIs）的萃取率，使用Ostro板比使用Bligh-Dyer法多观测到5种脂类种类。多数LPI（90%）都没有在Ostro板上保留。

总体来说，SMs、PCs和LPCs都能在Ostro板上进行保留，且洗脱溶液仅能为氯仿：甲醇：三乙胺（4.5:4.5:1）。其他类型磷脂在该条件下均不与板发生明显保留作用，通过板并出现在流穿部分。

Ostro磷脂萃取方法的重复性

使用Ostro萃取市售人血浆的14份样本。分析每种磷脂三份提取物样本在流穿（FT）和洗脱（E）部分中的情况。计算每种脂类在所有复本中峰面积的相对标准偏差百分比（%RSDs），如表4所示。

磷脂种类	MS极性	部分	检测的脂类数量	区域计数%RSD
Cer	+	FT	13	13.3
LPC	+	E	9	14.1
SM	+	E	17	11.3
PC	+	E	46	9.1
LPE	-	FT	10	10.9
LPI	-	FT	7	22.2
PI	-	FT	25	12.5
PE	-	FT	29	16.2
PG	-	FT	18	10.3
全部测量值				16.5

表4. 使用Ostro样本制备得出14种市售血浆复本峰面积的相对标准偏差百分比（%RSD）。关键词：FT：流穿部分，E：洗脱部分。

如上所示的%RSD受离子强度影响，较少的类型却在本实验中产生了更多的误差。相同阈值的情况下[5]，分析（LC-MS）方法的误差在5%以内。

结论

用于磷脂提取的Ostro样品制备方法简单且重复性好。

使用这种方法在血浆中检测到的磷脂种类数目和数量相比标准萃取方法（Bligh-Dyer）更好，Ostro板在LPIs和PGs的回收方面具备明显优势。

该方法适用于小型和大型脂质组学研究。鉴于Ostro板采用96孔式、无需离心，它也能被应用于通过液液萃取无法实现的实验室自动化。相比液液萃取法，Ostro样品制备法同时显著降低了溶剂用量。

该方法既能普遍应用于全部磷脂的萃取，亦可选择性地萃取特定种类磷脂。例如，对流穿部分进行分析，可以研究含量较低的部分种类磷脂，而不会受到含量过大的PCs的线性范围或者离子抑制作用的影响。

参考文献

1. Bligh, E.G and Dyer, W.J.; *Canad.J. Biochem.* Physiol (1959) 27, 911-917
2. Zhao, Z and Xu, Y; *J. Lipid Res* (2010) 51, 652-659
3. Burdge et al.; *British Journal of Nutrition* (2000), 84, 781-787
4. Kim et al.; J. Lipid Res (1990), 31, 2285-2289
5. UPLC BEH HILIC: *"The Preferred Separation Chemistry for Targeted Analysis of Phospholipids"*, Mark Ritchie, Mainak Mal, and Stephen Wong. Waters Application Note no. 720004219EN, January 2012.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，The Science of What's Possible，Xevo，ACQUITY，ACQUITY UPLC，TargetLynex和Ostro是沃特世公司的商标。

©2012 年沃特世公司。印制于中国。2012年1月 720004201ZH IH-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com