Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用UPC²/MS系统对脂质类进行分离

Michael D. Jones,[1,3] Giorgis Isaac,[1] Giuseppe Astarita,[1] Andrew Aubin,[1] John Shockcor,[1] Vladimir Shulaev,[2] Cristina Legido-Quigley,[3] 和 Norman Smith [3]
[1]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)
[2]北德州大学，生物科学系，植物脂质研究中心(美国德克萨斯州丹顿市)
[3]国王学院，生物医学和健康科学学院，药物科学部(英国伦敦)

应用优势

- 提供适用于脂质组类内和组类间综合分析的ACQUITY UPC²™方法学条件
- 突出可在脂质综合分析中用作方法开发工具的方法参数
- 为快速脂质分析提供了一种单一的分离技术和单一的仪器方法

沃特世解决方案

配有MS检测器的ACQUITY UPC²系统

Empower 3®软件

ACQUITY UPC²色谱柱

关键词

UPC²，MS，UPC²/MS^E，脂类组学，代谢组学，方法开发，合相色谱

简介

复杂脂质的分析历来是一项具有挑战性的任务，可能需要多种分析技术。脂质通常被确认为是疏水性化合物，但是含有磷、硫、糖和氮的复杂脂质则具有较宽的极性范围。采用一种单一的技术开发基于分离的方法对于从事脂类组学和代谢组学应用研究的科学家们而言，是一项公认的共同挑战。

近年来随着科技的进步，超临界流体色谱(SFC)作为一种可行的分析技术再次唤醒了人们的探索热情。研究者们针对SFC仪器进行不断的研究和开发，现在能够提供一套整体式设计的色谱系统，该系统使用液态CO_2作为流动相，能够充分发挥正向色谱的优势和选择性，同时还可提供简便易用的反相液相色谱(RPLC)。这种新的分离技术被称作超高效合相色谱 (UltraPerformance Convergence Chromatography™, UPC²™)。

本应用纪要将UPC²技术应用于脂质类的分离分析。我们对方法变量进行了探索，这些变量将对不同极性脂质混合物的峰完整性和色谱分离产生影响。实验目的是通过多种脂质提取物了解脂质在可控条件下的色谱行为。我们使用单一基团标准品对酰基链的长度和双键数量的影响进行了研究。利用由组内组分构成的脂质提取物测试方法学参数。该方法条件适用于生物脂质提取物分析，另外我们还对方法调整进行了研究，根据分析人员的目标来操作色谱仪。通过对这些方法变量处理进行分析，有助于了解靶向脂质分析和筛选方案的发展概况。

实验

脂质缩写

CER	神经酰胺
SM	鞘磷脂
PG	磷脂酰甘油
PE	磷脂酰乙醇胺
PC	磷脂酰胆碱
LPC	溶血磷脂酰胆碱
LPE	溶血磷脂酰乙醇胺

样品描述

样品和标准品均购自Avanti Polar Lipids公司。混合物1和混合物2为去除LPC的脑(猪)提取物和蛋(鸡)提取物PG。储备液使用氯仿/甲醇(50:50)溶液进行配制。工作脂质混合溶液配制为指定浓度。

混合物1:	神经酰胺，SM (0.05 mg/mL) PG、PE和PC (0.1 mg/mL)
混合物2:	LPC，LPE (0.05 mg/mL)
混合物3:	1:1的[混合物1]/[混合物2]

UPC² 条件

系统:	ACQUITY UPC²
色谱柱:	ACQUITY UPC² BEH和HSS C_{18} SB
柱温:	60 ℃
样品温度:	10 ℃
进样体积:	1 µL
流速:	1.85 mL/min
反压:	1500 psi
流动相A:	CO_2
流动相B:	50:50 的甲醇/乙腈溶液，含1 g/L甲酸铵
梯度:	详细信息请参见图示

MS 条件

质谱仪:	ACQUITY® SQD和 SYNAPT® G2 MS
电离模式:	ESI+
采集范围:	100-1500 Da
毛细管电压:	3.5 kV
锥孔电压:	30 V
信息软件:	Empower 3和MassLynx® 软件

结果与讨论

MS优化

ACQUITY UPC²系统配有ACQUITY单四极杆检测器(SQD)，用于本次色谱参数的初步研究。执行[混合物3]的进样，对锥孔电压和毛细管电压进行筛选从而确定最佳的运行条件。根据锥孔电压筛选结果，选定30 V用于控制L-α-磷脂酰甘油(鸡蛋PG)谱图最佳信号的所有源内碎片，从而获得母离子和有价值的碎片信息，如图1A所示。观察[混合物3]中的所有峰确定最佳毛细管电压为3.5-4.0 kV，如图1B所示。最终的MS条件为毛细管电压3.5 kV和锥孔电压30 V。

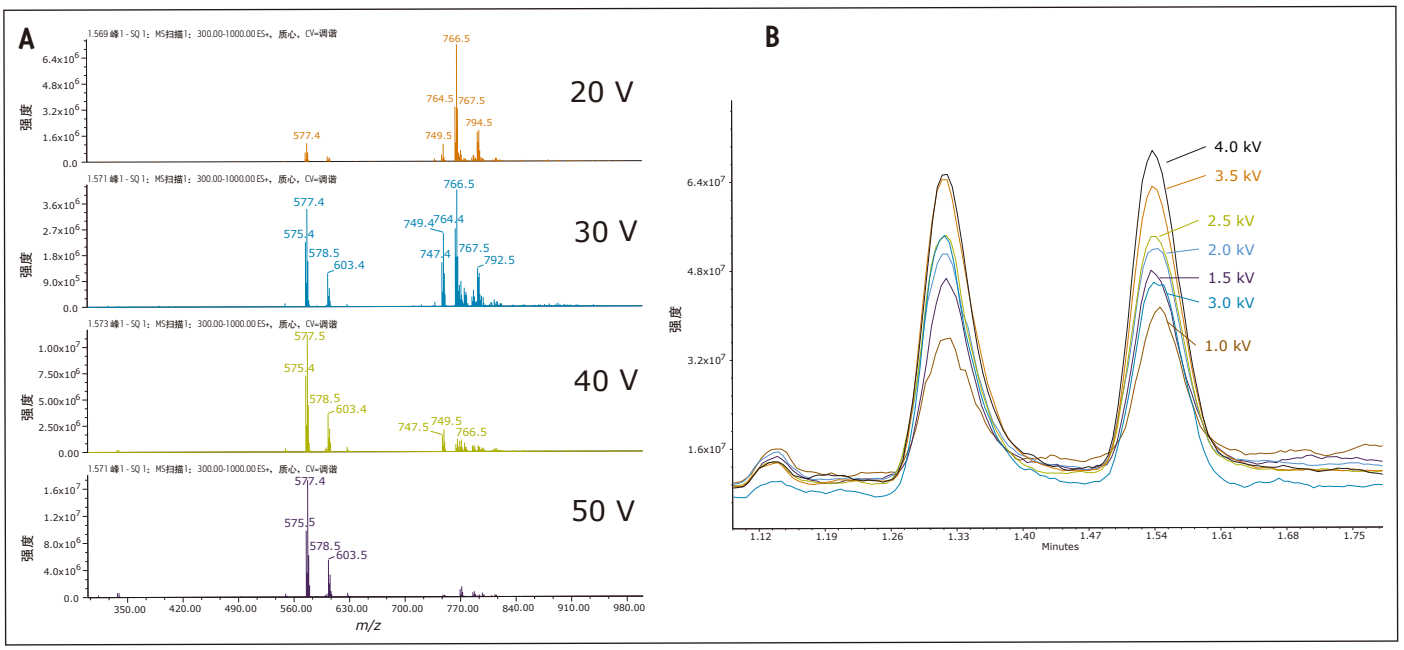

图1. (A)L-α-磷脂酰甘油的锥孔电压筛选结果；(B)L-α-磷脂酰甘油的毛细管电压筛选结果。

色谱方法开发

使用ACQUITY UPC²系统时，样品的制备流程非常简便。稀释剂氯仿/甲醇提供了良好的溶解性并且对峰形无任何显著的不良影响。在典型的RPLC脂质分析中，需将含有脂质的有机提取物蒸干，再使用更合适的溶剂进行复溶。但是，使用UPC²时，含脂质的有机提取物可以直接注入系统，这在分析数百种生物样品时可有效节约时间和成本。在方法开发过程中，筛选不同的色谱柱固定相通常会改变方法的选择性。因此，我们最初的方法是对三种固定相进行筛选，包括UPC² CSH氟-苯基、UPC² BEH 2-EP和UPC² BEH。在UPC² BEH固定相中，脂质混合物的组间分离获得了最佳峰形和选择性，如图2所示。

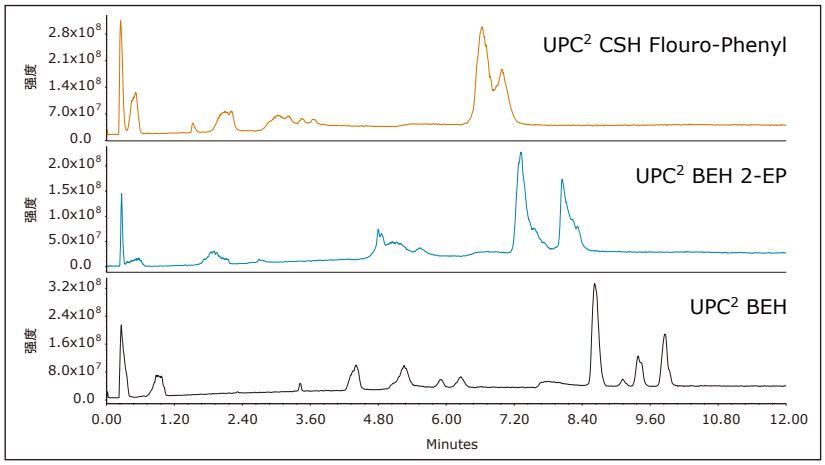

图2. 中性和极性脂质[metdev]混合物的色谱柱筛选。实验所用筛选方法条件为流动相B在12 min内从10%增加至50%。由于BEH 2-EP和CSH氟-苯基色谱柱的保留性较弱，我们对梯度进行了修改(10%-30% B)以调整获取相对适用的分离间隙。流动相共溶剂为含1 g/L甲酸铵的甲醇，该条件沿用自以前发表的报告。[1]

方法开发中色谱柱和改性剂的筛选试验表明亚乙基桥杂化(BEH)颗粒硅胶柱可提供最佳的选择性和峰形。脂质类物质使用通过MS优化实验确定的参数在MS ESI+模式下进行鉴定。执行单个脂质混合物进样确证了当前的谱峰分配。我们围绕[混合物3]中分析物的组间分离对进行色谱柱筛选的方法进行了优化，将以前需运行12 min的方法缩短为在5 min内完成分析，如图3所示。

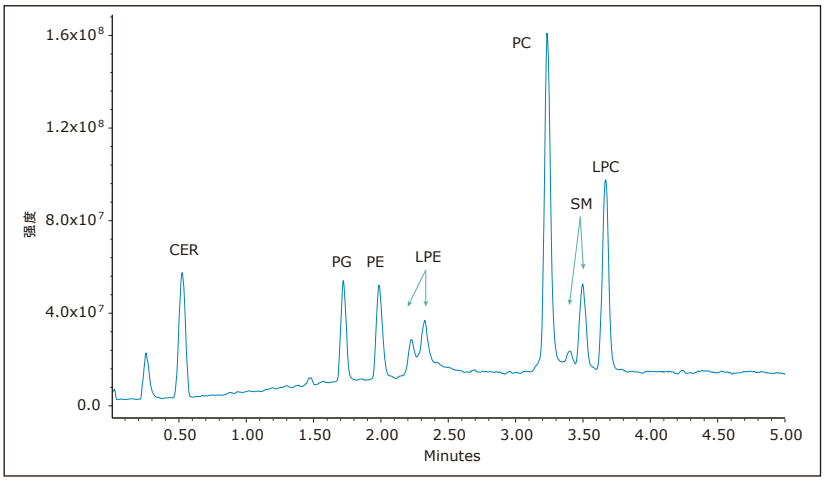

图3. 使用ACQUITY UPC² BEH色谱柱对[混合物3]混合物执行进样分析。初始梯度为流动相B在10 min内以1.85 mL/min的流速从5%增加至50%，达到50%后保持2 min，在下次进样之前使用初始条件对色谱柱重新平衡1 min。梯度修改为流动相B在3 min内以1.85 mL/min的流速从15%增加至50%，达到50% B后保持2min，在下次进样之前使用初始条件对色谱柱重新平衡。

购自Avanti的脂质提取物随附的文档显示各标准提取物中存在有不同比率的脂质类内组分。对色谱图中观测到的两个LPE峰进行的质谱数据评估进一步确证了此信息，如图4所示。结果表明，各类脂质中分子的洗脱顺序由酰基链上的双键数决定。因此，酰基链越饱和，保留时间越短。酰基链长度对各类脂质的洗脱顺序没有影响。有趣的是，在使用UPC² BEH固定相时，还可观测到LPE和SM标准提取物的类内分离。分析所得峰较宽的其它固定相也许能够为Avanti提取物标准品提供更好的类内分离。这一假设将在未来的研究中进行探索。

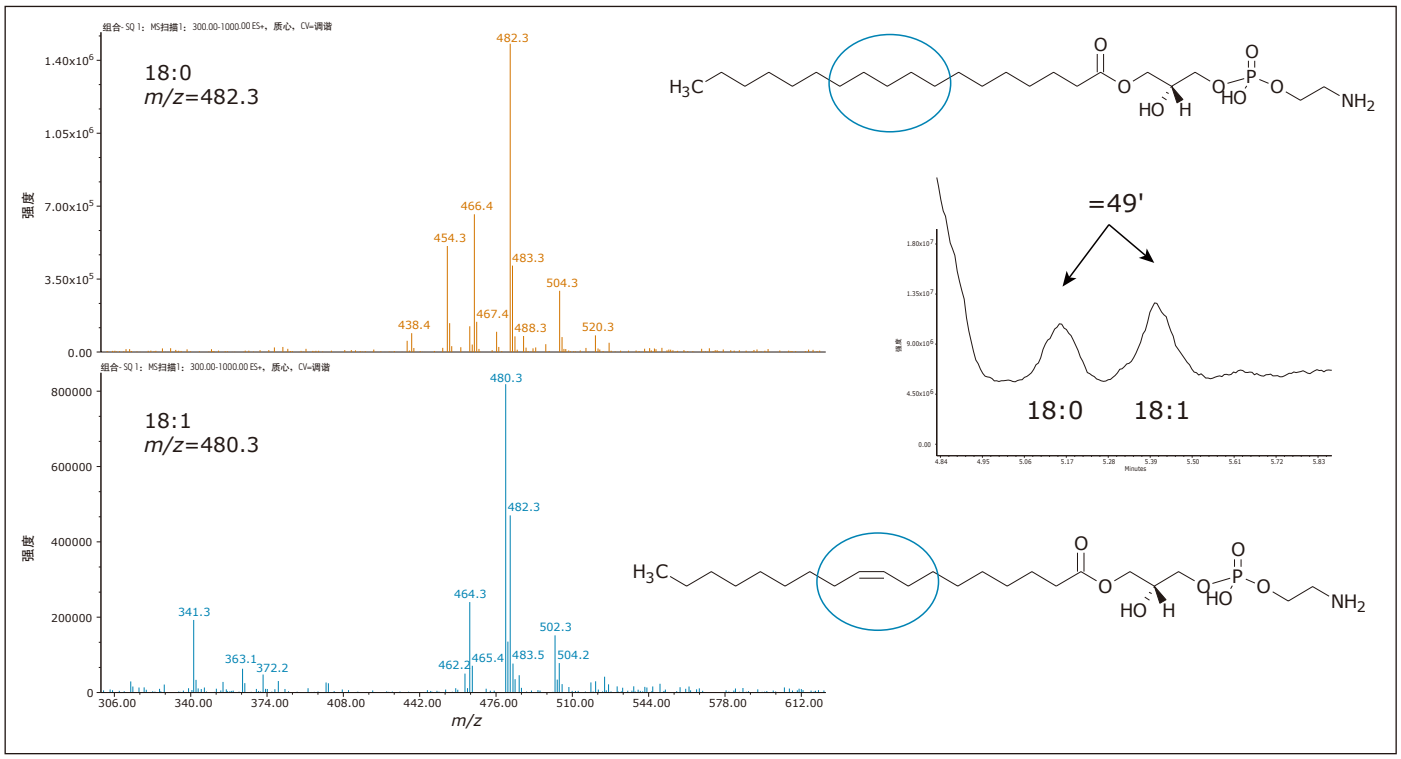

图4. 两个LPE峰的MS谱图分析。

调整保留性

我们在方法开发过程中探索了梯度斜率的变化，但是分离度随梯度斜率的变化并不显著。因此我们通过实验对保留性进行了研究。实验因素的变化使保留性发生极大变化，包括向改性剂加入弱极性溶剂(如乙腈)。研究中进行了两个实验。第一个实验采用初始改性剂(100%甲醇)进行研究，第二个实验以80%:20%的甲醇/乙腈作为改性剂进行研究。两种改性剂中都加入了1 g/L的甲酸铵。一般情况下，在改性剂中使用乙腈可改善分离度，如表1所示。

峰 ID	100% 甲醇 (RS)	80:20 甲醇/乙腈 (RS)	% 差异
PG	–	–	–
PE	2.69	3.54	+31.6
LPE 1	1.96	2.74	+39.8
LPE 2	1.67	2.17	+29.9
PC	10.81	8.56	-20.8
SM (1)	2.24	2.07	-7.6
SM (2)	1.10	1.06	+45.5
LPC	1.33	1.05	+12.8

表1. 改性剂的组成对脂质分离度的影响。由于神经酰胺与其它目标物峰之间存在较大的分离度，因此将其排除在外。

生物样品分析

我们利用试验中建立的方法对两份生物样品进行研究，每份样品的研究目的完全不同。第一个示例中使用运行时间为6 min的方法检查小鼠心脏提取物，对不同极性的脂质进行类间靶向筛选。目的是确定该方法能否从糖尿病治疗研究中收集的数百种样品中检测出存在的特定脂质。此概念验证方法将用于进一步研究，利用MS/MS定量评估治疗期间磷脂质和鞘脂类的增幅。如图5所示，实验通过靶向UPC²/MS方法轻松鉴别出小鼠心脏提取物中的多种磷脂质和鞘脂类。

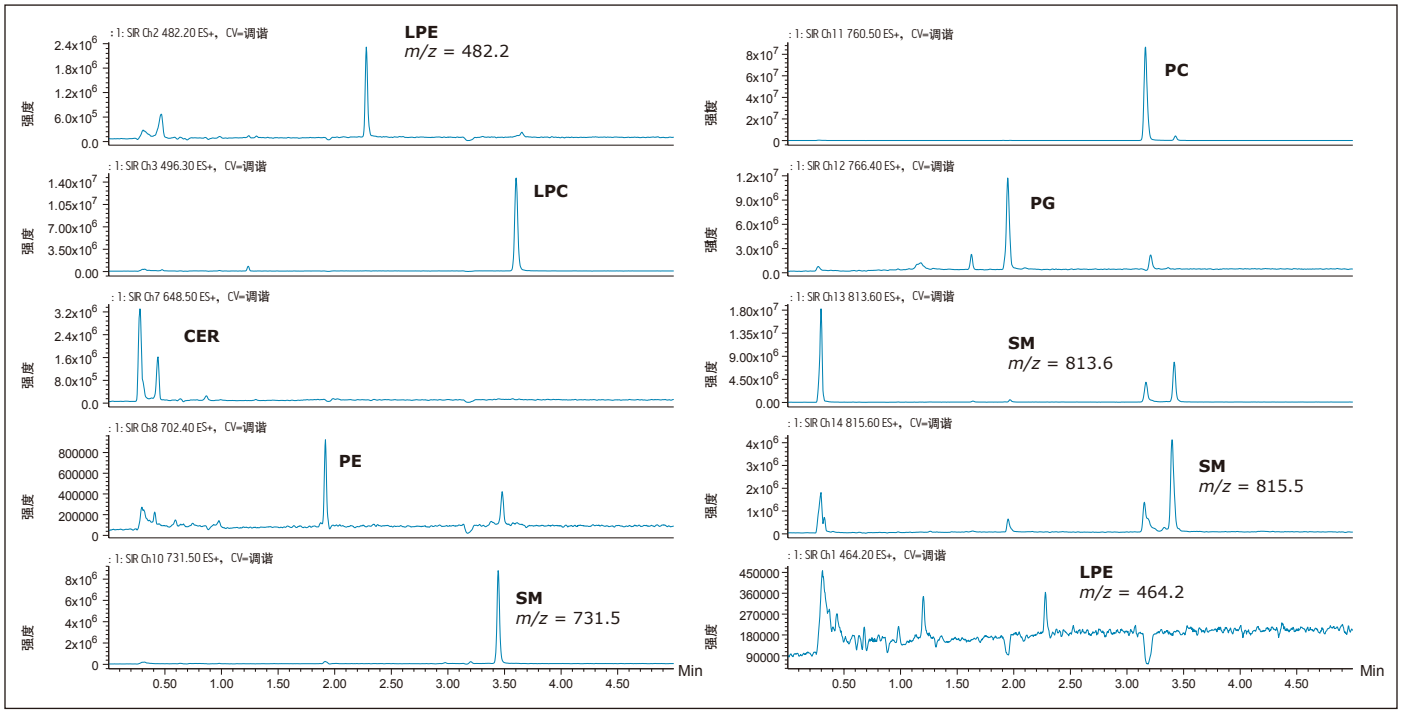

图5. 小鼠心脏提取物的靶向SIR分析。梯度为流动相B在3 min内以1.85 mL/min的流速从15%增加至50%，达到50% B后保持2 min。在下次进样之前用初始条件重新平衡色谱柱1 min。

中性脂质(如酰基甘油酯和胆固醇酯)是典型的非极性脂质。在通常情况下，植物代谢组学分析可区分不均匀分布的中性脂质，例如不同条件下的三酰基甘油和二酰基甘油2。图6所示示例对存在于棉仔油提取物中的脂质进行了研究。使用SYNAPT G2质谱仪的MSE采集数据，通过母离子和子离子校准获得中性脂质的特征。在方法开发过程中，当起始组分梯度中使用甲醇(或甲醇/乙腈)的改性剂大于5%时，多种中性脂质在色谱无效区附近洗脱。在本示例中，通过降低改性剂起始百分比对UPC²/MS方法作了修改，使中性脂质得到保留。将改性剂百分比逐渐升高用以洗脱极性脂质，如目前知晓的棉花胚胎中的细胞膜脂质类2。通过运用此方法可对色谱法进行调整，使其可为中性脂质提供更大的保留时间和更好的专属性。从分析技术的角度来看，此洗脱机制在概念上类似于通过液相色谱法执行流动相梯度洗脱分析。

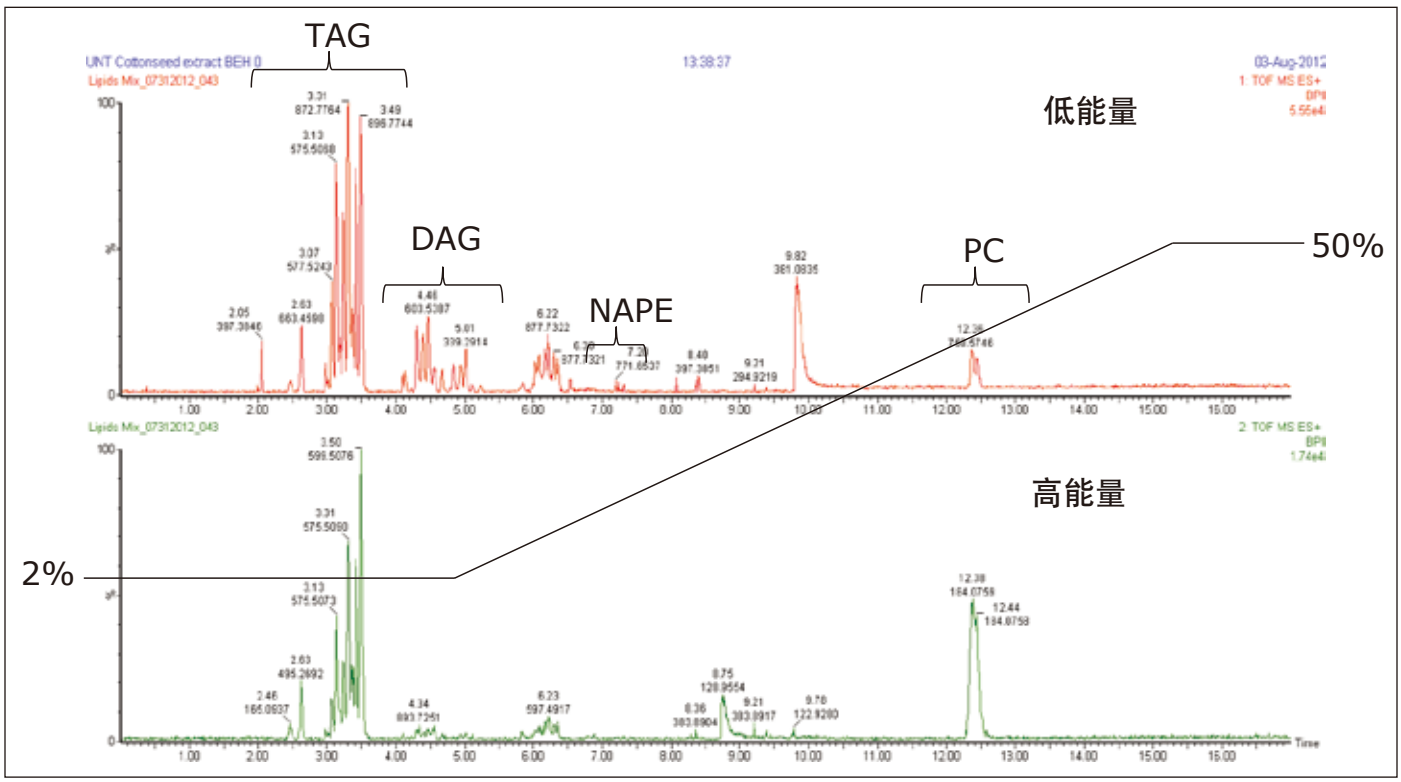

图6. 棉籽油提取物的综合分析。梯度为流动相B以流速1.85 mL/min在5min内从2%增加至5%，然后在10 min内增加至50%，达到50% B后保持2 min。在下次进样之前用初始条件重新平衡色谱柱1 min。

结论

本实验建立了一种灵活通用的分析方法，可对中性和两亲性脂质进行类间分离。由于实验的目标是获取灵活的参数进行脂质类间分离，因此使用ACQUITY UPC^2 BEH色谱柱，甲醇/乙腈为改性剂，甲酸铵为添加剂的核心方法可提供最佳结果。梯度方法和运行时间可针对生物样品中脂质的快速筛选或综合分析进行调整。脂质样品制备工作流程适合于UPC^2。生物脂质提取物的有机相可直接注入配备有SM检测器的ACQUITY UPC^{2}系统，从而节约了时间和运行成本。快速的类间筛查技术使分析在7 min内即可完成，其中还包含了重新平衡时间。MS谱图信息通过区分不同的饱和度(如使用ACQUITY UPC^2 BEH色谱柱进行的溶血磷脂酰乙醇胺分离中所证实)对类内分离的实例进行了确证。添加乙腈可提高色谱空间内的分离度。通过本方法获得的结果中，我们可以观测到大多数分析物中脂类间的分离度可增加30%-40%。从这些实验中获得的方法开发知识为合相色谱脂质分析的适用性奠定了基础。

参考文献

1. Bamba T, Shimonishi N, *et al.* High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics. *J Biosci Bioengin.* 2008 May; 105(5): 460-469.
2. Horn PJ, Korte AR, Neogi PB, *et al.* Spatial Mapping of Lipids at Cellular Resolution in Embryos of Cotton. *Plant Cell.* 2012 Feb; 24(2): 622-636.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY、SYNAPT、Empower和MassLynx是沃特世公司的注册商标。Ultra Performance Convergence Chromatography、UPC^2、ACQUITY UPC^{2}和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 沃特世公司。印制于中国。

2013 年 2月 720004579ZH AG-PDF

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 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

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