

应用SCIEX QTRAP[®] 5500系统建立高通量检测千种脂质成分的分析方法

Establishment of a High Throughput Analytical Method for the Determination of Thousand Species Lipids Components by SCIEX QTRAP[®] 5500 System

陈金梅, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Chen Jinmei, Si Dandan, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

SCIEX, APAC Support Center, China

Key words: SCIEX QTRAP[®] 5500, Lipids, Scheduled MRM[™], High throughput

前言

脂质是自然界中存在的一大类极易溶解于有机溶剂、在化学成分及结构上非均一的化合物, 主要包括脂肪酸及其天然发生的衍生物(如酯或胺), 以及与其生物合成和功能相关的化合物。LIPID MAPS[®]系统命名包括了八大类脂质: 脂肪酸类、甘油酯类、甘油磷脂类、鞘脂类、固醇脂类、糖脂类、孕烯醇酮脂类和多聚乙烯类^[1]。脂质不仅是生物膜的骨架成分和能量贮存物质, 越来越多的证据表明, 脂质也参与细胞的许多重要功能。在医学方面, 已证明人类许多重大疾病都与脂质代谢紊乱有关, 如阿兹海默症、糖尿病、肥胖症以及一些传染病等^[2]。在植物中, 已经发现脂质参与光合作用、气孔运动、信号转导、细胞分泌、小泡运输和细胞骨架重组等过程^[3]。由于脂质种类繁多, 如何通过一种方法快速、准确、全面的检测脂质成分是目前所面临的难题。本文使用QTRAP[®] 5500液相色谱质谱联用系统, 建立了一套高通量、稳定性好、快速准确的Scheduled MRM[™]脂质化合物检测方法。

仪器设备

SCIEX ExionLC[™]液相系统 + QTRAP[®] 5500质谱系统

液相方法

色谱柱: ACQUITY BEH C8 (100×2.1 mm, 1.7 μm)

流动相: A相: 甲醇:乙腈:水 1:1:1 (5 mM乙酸铵)

B相: 异丙醇 (5 mM乙酸铵)



SCIEX ExionLC[™]液相系统 + QTRAP[®] 5500质谱系统

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 °C

进样量: 2 μL

表1. 液相梯度。

Time (min)	A (%)	B (%)
1	80	20
2.5	60	40
4	40	60
14	10	90
15	10	90
15.1	80	20
17	80	20

质谱方法

离子源：ESI源

离子源参数：

IS电压：5500 V

气帘气 CUR: 25 psi

碰撞气 CAD: medium

雾化气 GS1: 50 psi

辅助气 GS2: 55 psi

源温度 TEM: 500 °C

Scheduled MRM™方法

MRM方法专属性好，灵敏度高，是最常用的定量分析数据采集模式，但当MRM离子对个数过多时，就无法保证每个色谱峰均采集到足够的点数，尤其是使用超高压液相时，这就会导致数据重现性不好，若为了保证重现性，就需要减少驻留时间，导致灵敏度降低。正如图1所示，Scheduled MRM™方法是对时间窗口分段，只在相应的色谱保留时间窗口范围内进行检测，这就使得每对MRM都有最恰当的循环时间和驻留时间，从而保证检测的重现性和灵敏度，从而实现高通量检测，大大提高检测效率。

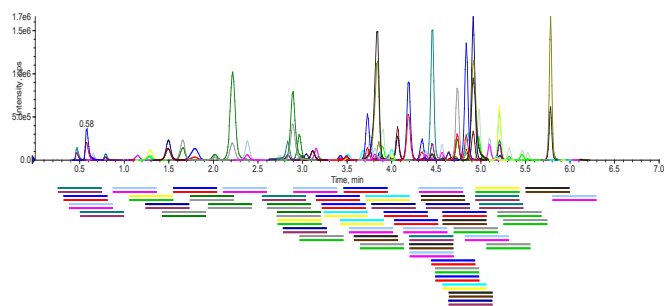


图1. Scheduled MRM™方法原理。

样品制备

取100 μL血浆，加入100 μL甲醇，500 μL甲基叔丁基醚，150 μL水，涡旋1 min，12000 rpm离心20 min，取200 μL上清液，吹干，用100 μL异丙醇：乙腈：水（2:1:1）溶液复溶，离心，取上清液进样分析。

高通量的Scheduled MRM™方法

正离子模式下检测585个化合物，负离子模式下检测603个化合物，包括脂肪酸类26个、甘油酯类495个、甘油磷脂类577个、鞘脂类62个、固醇脂类21个、糖类7个，正负离子两种模式下的提取离子流色谱图如图2所示。

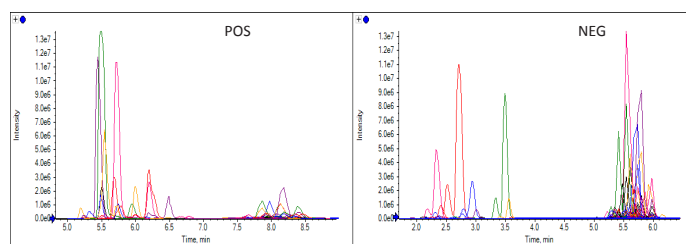


图2. 正负离子两种模式下脂质的提取离子流色谱图。

表2. Scheduled MRM™部分离子对信息。

Q1	Q3	Name	Q1	Q3	Name
754.7	369.4	CE(24:0)	435.2	281.2	LPA(18:1)
510.6	264.4	CER(14:0)	675.5	283.3	PA(16:0/18:0)
512.6	266.4	DCER(14:0)	554.3	255.2	LPC(16:0)
672.5	264.4	HCER(14:0)	844.6	281.2	PC(18:1/18:1)
834.9	264.4	LCER(14:0)	478.3	281.2	LPE(18:1)
612.6	313.2	DAG(16:0/18:1)	690.5	255.2	PE(16:0/16:0)
731.6	184.1	SM(18:0)	665.4	227.2	PG(14:0/14:0)
824.7	579.5	TAG48:0-FA14:0	627.3	311.3	LPI(20:0)
824.7	551.4	TAG48:0-FA16:0	919.6	309.3	PI(20:0/20:1)
824.7	523.5	TAG48:0-FA18:0	814.5	281.2	PS(20:0/18:1)

脂质碳链长度与保留时间规律

由于脂质结构的特点，同一类脂质的保留时间与碳链长度和不饱和度有关，可以根据其保留时间的规律性确保方法的准确性。以图2正离子模式下检测的SM系列化合物为例，由图可见不饱和度相同时，保留时间和碳链长度的关系，随着化合物碳数增加，保留时间增加，每增加一个碳，保留时间增加0.25 min，以此进一步确认化合物，依此类推，其他类别脂质也按照保留时间规律性确认峰位。

脂质不饱和度与保留时间规律

由于脂质结构的特点，同一类脂质的保留时间与碳链长度和不饱和度有关，可以根据其保留时间的规律性确认脂质化合物，以图3负离子模式下检测的LPC和LPE系列化合物为例，由图可见相同碳链时，保留时间和不饱和度的关系，LPC类化合物多一个双键，保留时间减少0.50 min，LPE类化合物多一个双键，保留时间减少0.50 min，依此类推，其他类别脂质也按照保留时间规律性确认峰位。

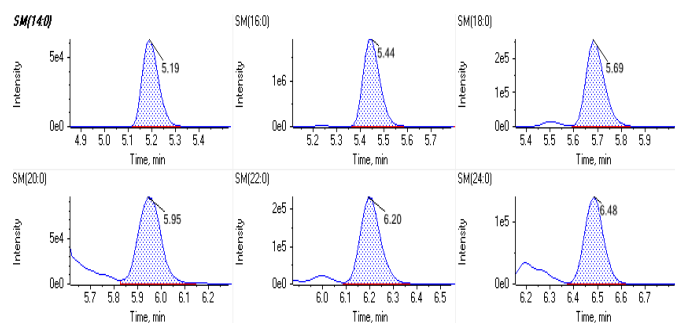


图3. SM系列化合物提取离子流图。

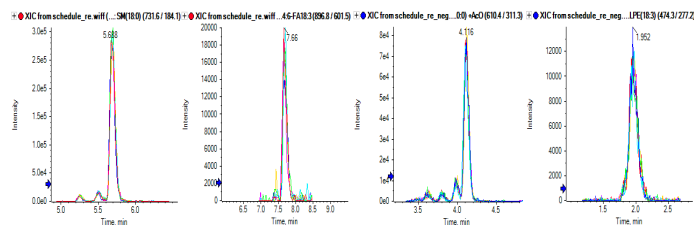


图5. 重现性展示。

总结

本文使用SCIEX QTRAP® 5500系统建立了Scheduled MRM™方法检测脂质。应用此方法可同时检测1188个脂质成分，并根据保留时间规律性确保方法的准确性。Scheduled MRM™方法不仅保证MRM方法特异性，而且显著提高通量，使得所有离子对都有最恰当的循环时间和驻留时间，从而保证检测的重现性和灵敏度。该方法可以应用于靶向脂质组学，临床检测和与脂质相关的学术研究。

参考文献

- [1] Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic acids research*. 2007 Jul 1;35(suppl_2): W606-12.
- [2] 蔡潭溪, 刘平生, 杨福全, 杨福愉. 脂质组学研究进展. 2010,37(2):121-128.
- [3] Wang X. Lipid signaling. *Current opinion in plant biology*. 2004 Jun 1;7(3):329-36.

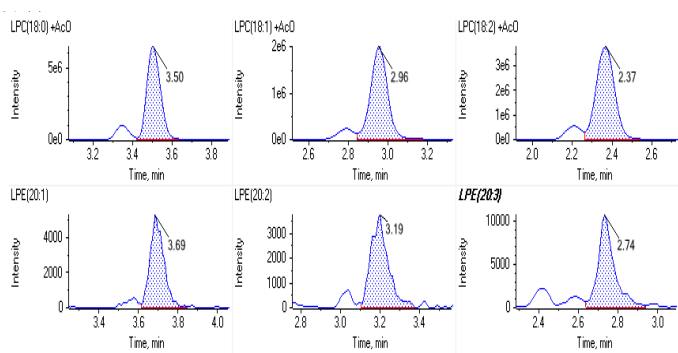


图4. LPC和LPE系列化合物提取离子流色谱图。

Scheduled MRM™方法的重现性

本实验采用Scheduled MRM™工作流程，对样品进行检测，重复进样6次，考察其重现性。结果表明重现性结果良好，以正负离子模式各提取两个化合物为例展示，观察其保留时间和峰面积的重现性，如图4所示，保留时间吻合度好，峰面积CV值小于5%，方法稳定性良好。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9877-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX