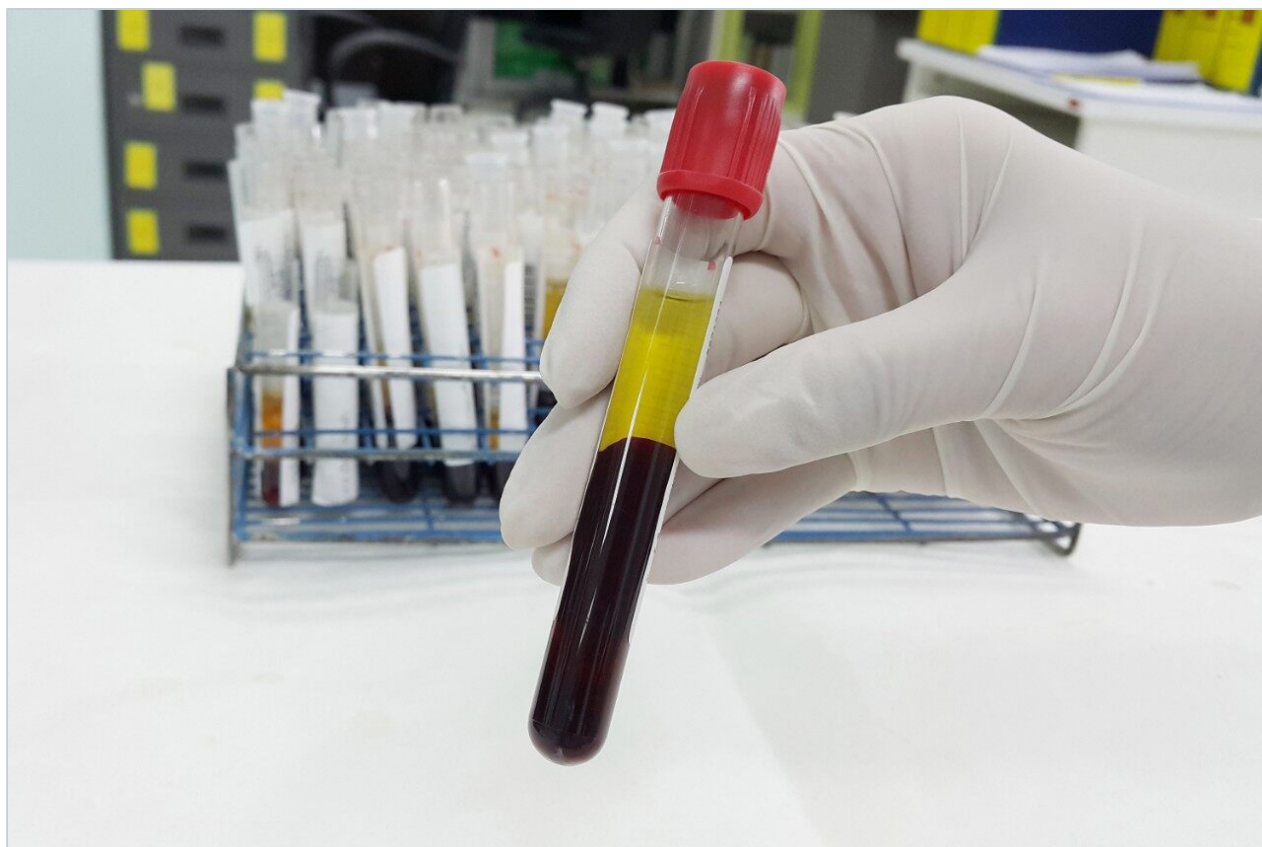


应用纪要

使用LipidQuan-R分析人血清中的二酰基磷脂酰胆碱：一种适用于脂质组学研究的快速、靶向UPLC-MS/MS方法。

Billy J. Molloy

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本研究开发出一种快速、靶向的UPLC-MS/MS方法，可用于对人血清中的57种二酰基磷脂酰胆碱物质进行半定量分析。该研究方法经证实适用于分析人血清中生理相关水平的分析物。该LipidQuan-R方法在同一套通用LC-MS平台上经过优化，该平台之前已用于分析各种化合物，包括胆汁酸、氨基酸、游离脂肪酸、胰蛋白酶肽、酰基肉碱、色氨酸代谢物和各种脂质。这种新方法进一步扩展了LipidQuan-R/MetaboQuan-R方法包，能够在靶向多组学工作流程序列运行中分析更多的代谢物和脂质。

优势

- 在九分钟内的单次分析运行中，同时完成57种二酰基磷脂酰胆碱物质（200多个MRM母子离子对）的靶向UPLC-MS/MS分析
- 高通量分析意味着可以分析更多的样品组
- 使用高特异性的多重反应监测(MRM)可以区分结构异构体
- 通用LC-MS配置实现不同化合物之间的灵活切换

简介

二酰基磷脂酰胆碱（二酰基PC）是由2种脂肪酸组成的脂质分子，通过酯键连接甘油磷酸胆碱头部基团（即1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱）。请参阅图1了解一般结构和特定示例。这些脂质在人体中含量非常丰富，也是构成所有细胞膜的主要脂质之一。生物体中还可能存在其他形式的PC，但大多数PC都是以二酰基形式存在。这类化合物在甘油磷酸胆碱头部基团连接的脂肪酸差异巨大。本文介绍了一种UPLC-MS/MS方法，可用于对57种二酰基磷脂酰胆碱物质进行特异性和半定量测量。过去，这类化合物使用串联四极杆质谱仪以 $m/z = 184$ 子离子进行检测，能够得到非常高的响应。但该母子离子对缺乏特异性，容易对某些分析物产生明显干扰。本文介绍的方法使用四个MRM母子离子对，特异性地靶向分析特定二酰基PC物质。这四个MRM母子离子对来自碎片离子谱图，与分子中丢失的脂肪酸残基有关。因此，它们对检测的脂质具有非常高的特异性，在某些情况下甚至可以区分结构异构体。例如，PC 36:4（即这种二酰基PC的2个脂肪酸由36个碳原子和4个双键组成）可能是两种最常见的PC异构体(18:2_18:2)或PC(16:0_20:4)。本文所用方法可以区分每种PC物质中酯化的脂质并进行定量，进而对各PC物质进行高特异性鉴定。

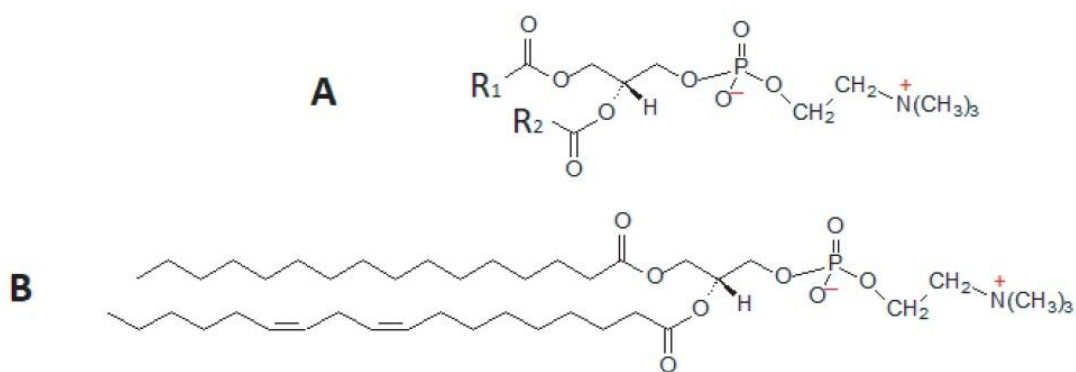


图1.(A)二酰基PC的一般结构。两个R基团即为脂肪酸残基。(B)一种特定的二酰基PC，在本例中为PC(16:0_18:2)。

实验

人血清样品前处理

按4:1的比例混合异丙醇与血清，使人血清蛋白沉淀。以25,000 g的离心力离心三分钟，然后使用去离子水按1:1的比例稀释所得上清液，混匀。取5 μ L注入UPLC-MS/MS系统。

LC条件

UPLC分离采用配有CORTECS T3 2.7 μ m (2.1 x 30 mm)色谱柱的ACQUITY UPLC I-Class系统（固定定量环）。以0.40 mL/min的流速进样5 μ L。流动相A为含0.2 mM甲酸铵和0.01%甲酸的水溶液，流动相B为50%异丙醇（溶于含0.01%甲酸和0.2 mM甲酸铵的乙腈溶液中）。在初始1分钟保持70%流动相B后，4.6分钟内将流动相B由70%梯度增加到98%对磷脂酰胆碱进行分离处理，使其从色谱柱中流出，再用98%流动相B清洗色谱柱2分钟。接下来重新平衡色谱柱，使其恢复初始条件。分析柱温度维持60 $^{\circ}$ C。

MS条件

使用Xevo TQ-S micro质谱仪进行多重反应监测(MRM)分析。所有实验均在正离子电喷雾电离(ESI+)模式下进行。离子源温度和毛细管电压保持不变，分别为150 $^{\circ}$ C和2.0 kV。锥孔气流速50 L/h，脱溶剂气温度650 $^{\circ}$ C，锥孔电压40V，碰撞能量25eV，检测所有MRM母子离子对。

信息学软件

利用MassLynx中的Quanpedia功能将方法信息导入LC-MS系统。这款可拓展且可搜索的数据库不仅包含LC和MS方法，还包含在TargetLynx中用于化合物定量分析的处理方法。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-ClassFL
检测器:	Xevo TQ-S micro
色谱柱:	CORTECS T3 2.7 μm (2.1 x 30 mm)
柱温:	60 °C
样品温度:	60 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	含0.2 mM甲酸铵的0.01%甲酸水溶液
流动相B:	含0.01%甲酸和0.2 mM甲酸铵的50%异丙醇乙腈溶液
梯度:	在初始1.0分钟保持70%流动相B后，在4.6分钟内以线性梯度将流动相B由70%增加至98%，再用98%流动相B清洗色谱柱2分钟，接下来重新平衡色谱柱，使其恢复初始条件

MS条件

MS系统:	Xevo TQ-S micro
电离模式:	ESI+

毛细管电压:

2.0 kV

结果与讨论

使用一系列MRM母子离子对检测二酰基磷脂酰胆碱（二酰基PC），其中母离子质量数为质子化离子 $[M+H]^+$ ，子离子为两个脂肪酸残基其中一个的中性丢失，或者由于脂肪酸烷基烯酮中性丢失导致两个相应溶血磷脂酰胆碱的其中一个碎裂（示例见图2）。表1列出了使用此方法能够测量的57种二酰基PC物质。这种四重MRM方法能够剖析每种PC脂质的结构信息。图3为2种二酰基PC的色谱图，每种PC的2个脂肪酸内含有36个碳原子和4个双键。图3显示，除提供不同的特异性MRM母子离子对外，两种最常见的结构异构体PC(18:2_18:2)和PC(16:0_20:4)也实现了色谱分离。

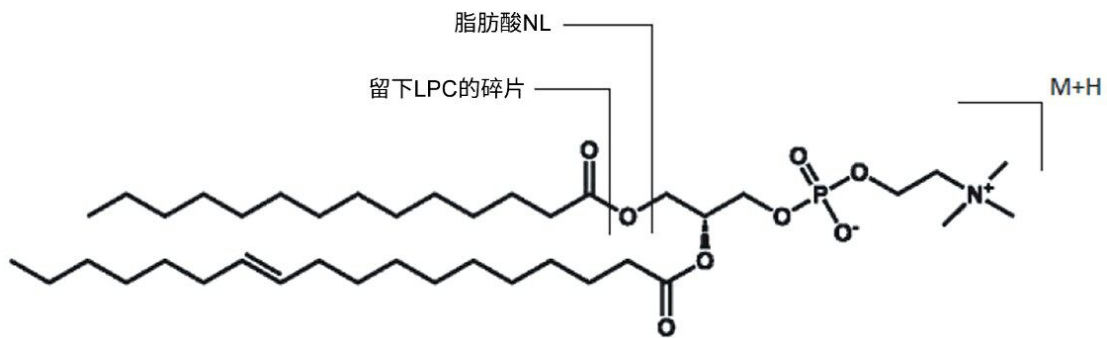


图2.特定二酰基PC (PC 32:1 [18:1_14:0])检测所用特异性MRM通道的碎裂方式。所示的两个通道都可能在两种脂肪酸酯中出现，每个特定的二酰基PC可以有4个特异性MRM通道。

二酰基PC物质	MRM母子离子对		RT (min)	二酰基PC物质	MRM母子离子对		RT (min)
PC (14:0_16:1)	704.55 > 450.35	704.55 > 468.35	2.2	PC (18:0_18:2)	786.55 > 502.35	786.55 > 506.35	2.5
	704.55 > 476.35	704.55 > 494.35			786.55 > 520.35	786.55 > 524.35	
PC (14:0_16:0)	706.55 > 450.35	706.55 > 468.35	2.7	PC (18:1_18:1)	786.55 > 504.35	786.55 > 522.35	3.4
	706.55 > 478.35	706.55 > 496.35					
PC (14:0_18:3)	728.55 > 450.35	728.55 > 468.35	2.0	PC (16:0_20:1)	788.55 > 478.35	788.55 > 496.35	3.8
	728.55 > 500.35	728.55 > 518.35			788.55 > 532.35	788.55 > 550.35	
PC (14:0_18:2)	730.55 > 450.35	730.55 > 468.35	2.4	PC (18:0_18:1)	788.55 > 504.35	788.55 > 506.35	3.8
	730.55 > 502.35	730.55 > 520.35			788.55 > 522.35	788.55 > 524.35	
PC (16:1_16:1)	730.55 > 476.35	730.55 > 494.35	2.3	PC (18:0_18:0)	790.55 > 506.35	790.55 > 524.35	4.2
PC (14:0_18:1)	732.55 > 450.35	732.55 > 468.35	2.8				
	732.55 > 504.35	732.55 > 522.35		PC (16:0_22:6)	806.55 > 478.35	806.55 > 496.35	2.8
					806.55 > 550.35	806.55 > 568.35	
PC (16:0_16:1)	732.55 > 476.35	732.55 > 478.35	2.8				
	732.55 > 494.35	732.55 > 496.35		PC (18:2_20:4)	806.55 > 502.35	806.55 > 520.35	2.6
PC (14:0_18:0)	734.55 > 450.35	734.55 > 468.35	3.2		806.55 > 526.35	806.55 > 544.35	
	734.55 > 506.35	734.55 > 524.35		PC (18:1_20:5)	806.55 > 504.35	806.55 > 522.35	2.7
PC (16:0_16:0)	734.55 > 478.35	734.55 > 496.35	3.2		806.55 > 524.35	806.55 > 542.35	
PC (14:0_20:4)	754.55 > 450.35	754.55 > 468.35	2.4	PC (16:0_22:5)	808.55 > 478.35	808.55 > 496.35	3.0
	754.55 > 526.35	754.55 > 544.35			808.55 > 552.35	808.55 > 570.35	
PC (14:0_20:3)	756.55 > 450.35	756.55 > 468.35	2.6	PC (18:2_20:3)	808.55 > 502.35	808.55 > 520.35	2.8
	756.55 > 528.35	756.55 > 546.35			808.55 > 528.35	808.55 > 546.35	
PC (16:1_18:2)	756.55 > 478.35	756.55 > 494.35	2.5	PC (18:1_20:4)	808.55 > 504.35	808.55 > 522.35	3.0
	756.55 > 502.35	756.55 > 520.35			808.55 > 526.35	808.55 > 544.35	
PC (16:0_18:3)	756.55 > 478.35	756.55 > 496.35	2.7	PC (18:0_20:5)	808.55 > 506.35	808.55 > 542.35	3.1
	756.55 > 500.35	756.55 > 518.35			808.55 > 524.35	808.55 > 542.35	
PC (16:1_18:1)	758.55 > 476.35	758.55 > 494.35	2.9	PC (16:0_22:4)	810.55 > 478.35	810.55 > 496.35	3.3
	758.55 > 504.35	758.55 > 522.35			810.55 > 554.35	810.55 > 572.35	
PC (16:0_18:2)	758.55 > 478.35	758.55 > 496.35	2.9	PC (18:2_20:2)	810.55 > 502.35	810.55 > 520.35	3.2
	758.55 > 502.35	758.55 > 520.35			810.55 > 530.35	810.55 > 548.35	
PC (16:1_18:0)	760.55 > 476.35	760.55 > 494.35	3.4	PC (18:1_20:3)	810.55 > 504.35	810.55 > 522.35	3.2
	760.55 > 506.35	760.55 > 524.35			810.55 > 528.35	810.55 > 546.35	
PC (16:0_18:1)	760.55 > 478.35	760.55 > 496.35	3.3	PC (18:0_20:4)	810.55 > 506.35	810.55 > 524.35	3.4
	760.55 > 504.35	760.55 > 522.35			810.55 > 526.35	810.55 > 544.35	
PC (16:0_18:0)	762.55 > 478.35	762.55 > 496.35	3.7	PC (18:2_20:1)	812.55 > 502.35	812.55 > 520.35	3.5
	762.55 > 506.35	762.55 > 524.35			812.55 > 532.35	812.55 > 550.35	
PC (16:1_20:4)	780.55 > 476.35	780.55 > 494.35	2.5	PC (18:1_20:2)	812.55 > 504.35	812.55 > 522.35	3.5
	780.55 > 526.35	780.55 > 544.35			812.55 > 530.35	812.55 > 548.35	
PC (16:0_20:5)	780.55 > 478.35	780.55 > 496.35	2.6	PC (18:0_20:3)	812.55 > 506.35	812.55 > 524.35	3.6
	780.55 > 524.35	780.55 > 542.35			812.55 > 528.35	812.55 > 546.35	
PC (18:2_18:3)	780.55 > 500.35	780.55 > 502.35	2.3	PC (18:1_20:1)	814.55 > 504.35	814.55 > 522.35	3.8
	780.55 > 518.35	780.55 > 520.35			814.55 > 532.35	814.55 > 550.35	
PC (16:1_20:3)	782.55 > 476.35	782.55 > 494.35	2.7	PC (18:0_20:2)	814.55 > 506.35	814.55 > 524.35	3.9
	782.55 > 528.35	782.55 > 546.35			814.55 > 530.35	814.55 > 548.35	
PC (16:0_20:4)	782.55 > 478.35	782.55 > 496.35	2.9	PC (18:0_20:1)	816.55 > 506.35	816.55 > 524.35	4.2
	782.55 > 526.35	782.55 > 544.35			816.55 > 532.35	816.55 > 550.35	
PC (18:1_18:3)	782.55 > 500.35	782.55 > 504.35	2.7	PC (18:2_22:6)	830.55 > 502.35	830.55 > 520.35	2.5
	782.55 > 518.35	782.55 > 522.35			830.55 > 550.35	830.55 > 568.35	
PC (18:2_18:2)	782.55 > 502.35	782.55 > 520.35	2.7	PC (18:1_22:6)	832.55 > 504.35	832.55 > 522.35	2.9
PC (16:0_20:3)	784.55 > 478.35	784.55 > 496.35	3.1		832.55 > 550.35	832.55 > 568.35	
	784.55 > 528.35	784.55 > 546.35		PC (18:0_22:6)	834.55 > 506.35	834.55 > 524.35	3.3
PC (18:0_18:3)	784.55 > 500.35	784.55 > 506.35	3.2		834.55 > 550.35	834.55 > 568.35	
	784.55 > 518.35	784.55 > 524.35		PC (18:1_22:4)	836.55 > 504.35	836.55 > 522.35	3.4
PC (18:1_18:2)	784.55 > 502.35	784.55 > 504.35	3.1		836.55 > 554.35	836.55 > 572.35	
	784.55 > 520.35	784.55 > 522.35		PC (18:0_22:5)	836.55 > 506.35	836.55 > 524.35	3.5
PC (16:0_20:2)	786.55 > 478.35	786.55 > 496.35	3.4		836.55 > 552.35	836.55 > 570.35	
	786.55 > 530.35	786.55 > 548.35		PC (18:0_22:4)	838.55 > 506.35	838.55 > 524.35	3.7
					838.55 > 554.35	838.55 > 572.35	

表1.二酰基PC物质的MRM母子离子对。

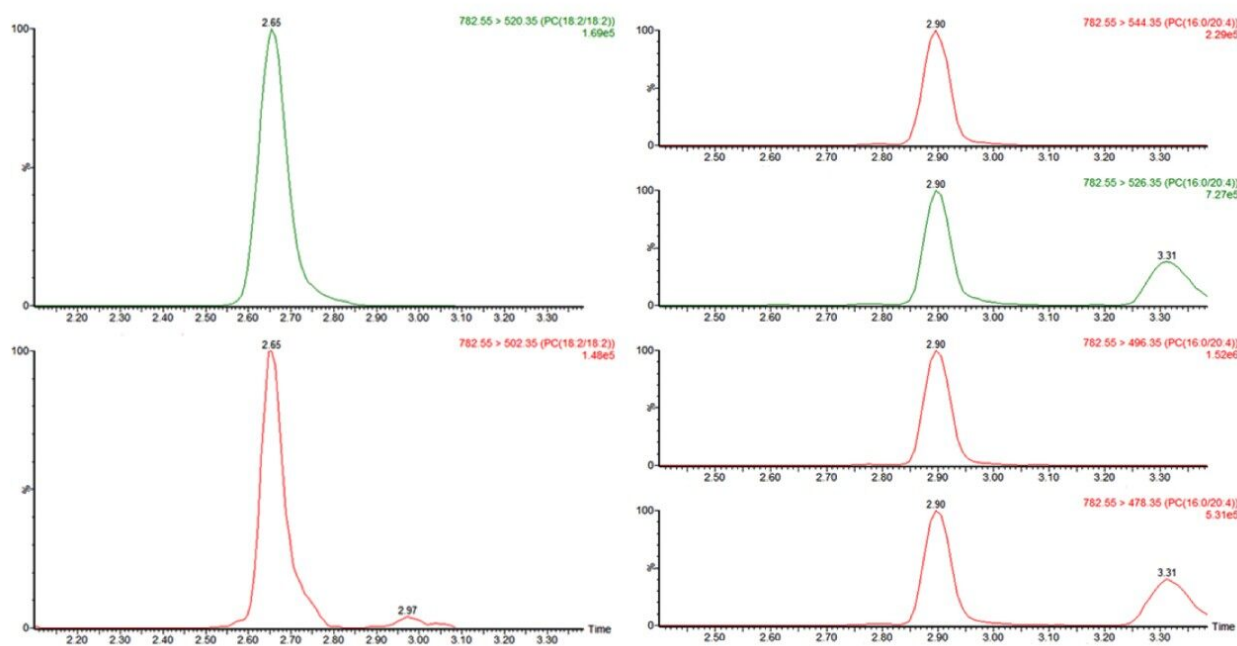


图3.2种结构异构体PC(18:2_18:2) [A]和PC(16:0_20:4) [B]的色谱图。

结论

本研究开发出一种UPLC-MS/MS快速分析方法，在生物医学研究的脂质组学分析中用于二酰基磷脂酰胆碱物质的特异性和半定量分析。该方法经证实适用于在生理相关水平下表征人血清中这一类重要脂质。该方法只使用一套通用LC-MS平台即可分析各类化合物（包括代谢组学、脂质组学和蛋白质组学分析）。将该方法与沃特世靶向组学方法库网站(www.waters.com/targetedomics)上提供的其他补充方法结合使用，可以构建一套全面的靶向多组学工作流程。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

Quanpedia <<https://www.waters.com/10148049>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006935ZH, 2020年6月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.