

ACQUITY Premier液相色谱技术显著改善磷酸化和羧化脂质的灵敏度、峰形和回收率

Giorgis Isaac, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

磷酸化和羧化脂质对金属敏感，容易吸附到UPLC系统流路内的不锈钢表面上，可能导致峰形不佳、回收率低和灵敏度下降。本文表明，与ACQUITY标准色谱柱和ACQUITY UPLC I-Class不锈钢系统相比，采用ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和ACQUITY Premier系统可显著改善磷酸化和羧化脂质的灵敏度、峰形和回收率。

优势

ACQUITY Premier技术具有以下优势：

- 提高磷酸化和羧化脂质的灵敏度、回收率和重现性
- 大幅减少分析物与金属表面相互作用，改善峰形并减少拖尾
- 同时分析磷酸化和羧化脂质与其他脂类，增加脂质组学方法适用范围

简介

磷脂酸(PA)是最简单的一类膜磷脂，其作为磷脂和甘油酯代谢的中间体具有重要作用。由于PA属于中间体，因此在生物膜中检出的含量很低，但它们是细胞生化和生理过程中至关重要的信号传导分子¹⁻²。溶血磷脂酸(LPA)是哺

乳动物生殖系统中具有调节功能的生物合成前体。磷脂酰丝氨酸(PS)是细胞膜的重要成分，占总磷脂含量的5~10%，在调节细胞凋亡、脂质合成和运输中具有重要作用。溶血磷脂酰丝氨酸(LPS)是信号传导磷脂，在炎症过程中起重要作用¹⁻²。PA和PS为酸性脂质，可能携带两个负电荷：PA的两个电荷都在磷酸基团上，PS的一个负电荷在磷酸基团上，另一个负电荷在羧酸基团上³。

过去50年来，不锈钢一直是高效液相色谱(HPLC)仪器和色谱柱常用的结构材料。但是，由于发生非特异性吸附和结合，不锈钢硬件可能对某些分析物的峰形和回收率产生不利影响。表现出这些效应的脂类通常包含可能与铁和其他过渡金属离子形成螯合物的官能团，例如磷酸基团和羧酸基团。对各种生物组织进行全面的脂质组学分析是一项艰巨的任务，因为各种脂类都非常复杂，它们的结构、连接的官能团、极性、解离和电离行为各不相同³。磷酸化和羧化脂质（具有磷酸或羧酸官能团的脂质，例如甘油磷酸酯、甘油磷脂酰丝氨酸、甘油磷酸肌醇、甘油磷酸肌醇单磷酸酯、甘油磷酸肌醇双磷酸酯、甘油磷酸肌醇三磷酸酯、磷酸二甘油酯、磷酸化鞘脂（包括神经酰胺-1-磷酸酯和鞘氨醇碱1-磷酸酯））对金属敏感，容易吸附到色谱系统流路中的不锈钢表面上，可能导致峰形不佳、回收率低和灵敏度下降。

减少磷酸化脂质与金属表面相互作用的备选方法是向流动相或样品中添加螯合剂。LC-MS分析目前已经使用了柠檬酸、乙酰丙酮、甲基膦酸和亚甲基二膦酸等挥发性螯合剂。但是，使用螯合剂会对色谱选择性和MS灵敏度产生不良影响。为解决这些问题，我们尝试使用有机/无机杂化屏障表面作为UPLC仪器和色谱柱的金属基材。结果表明，基于亚乙基桥联硅氧烷聚合物的杂化表面技术非常适合反相(RP)和亲水作用色谱(HILIC)。本应用纪要的主要目的是评估采用该杂化表面技术(HST)的ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱在磷酸化和羧化脂质分析中的色谱性能，并与具有标准不锈钢表面的ACQUITY UPLC I-Class系统和CSH C₁₈色谱柱进行比较。

实验

样品描述

LPA (16:0/0:0)、PA (16:0/18:1)、LPS (18:1/0:0)和PS (16:0/18:1)脂质标准品、蛋鸡PA和猪脑PS提取物购自Avanti Polar Lipids。用氯仿配制PA (16:0/18:1)、LPS (18:1/0:0)和PS (16:0/18:1)的独立储备液，浓度为1 mg/mL。用氯仿/甲醇/水(80/20/2)配制浓度为0.5 mg/mL的LPA (16:0/0:0)溶液，在40 °C下稍微加热并进行超声处理以促进完全溶解。用异丙醇/乙腈(50/50)配制5、50、100和250 ng/mL的工作混合物稀释系列脂质标准品。购回的蛋鸡PA和脑猪PS提取物为粉末状，将其溶于氯仿中，制得浓度为1 mg/mL的溶液。用异丙醇/乙腈(50/50)配制蛋鸡PA和脑猪PS提取物的工作溶液。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	标准ACQUITY UPLC I-Class与ACQUITY Premier
检测器:	SYNAPT XS
样品瓶:	沃特世全回收UPLC样品瓶
色谱柱:	ACQUITY CSH C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) ACQUITY Premier CSH C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)
柱温:	55 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5 μL
流速:	400 μL/min
流动相A:	含0.1%甲酸的600/390/10乙腈/水/1 M甲酸铵水溶液
流动相B:	含0.1%甲酸的900/90/10异丙醇/乙腈/1 M甲酸铵水溶液

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10.0	0.4	1	99	6
11.0	0.4	1	99	1
12.0	0.4	50	50	1

质谱条件

质谱系统：	SYNAPT XS
电离模式：	ESI-
采集范围：	100-1200 Da
毛细管电压：	2.5 kV (负离子模式)
碰撞能量：	线性梯度 (传输CE) 25-45 eV
锥孔电压：	30 V

数据管理

色谱软件: MassLynx v4.2

质谱软件: MassLynx v4.2

结果与讨论

LC-MS法在分析生物样品中的磷酸化和酸性脂质方面发挥着至关重要的作用，对于低丰度信号传导脂类（例如LPA、PA、LPS和PS）而言尤其如此（图1A和1B）。我们之前发表的方法⁴能够准确分析常见的极性和非极性脂类，但磷酸酯和羧酸脂类除外，它们在该方法条件下会产生非常宽的拖尾峰且灵敏度较低³⁻⁶。磷脂酸（PA和LPA）的磷酸基团以及磷脂酰丝氨酸（PS和LPS）的羧酸基团会与金属离子结合形成螯合物，在色谱分析过程中导致峰拖尾和弥散。为解决这一问题，我们开发出有机/无机杂化表面技术应用于ACQUITY Premier CSH C₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱和ACQUITY Premier系统。分别使用标准色谱柱和不锈钢表面ACQUITY UPLC系统以及ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY Premier系统分析LPA、PA、LPS和PS的连续稀释样品。图2A、2B、3A和3B分别并排比较了标准CSH C₁₈色谱柱和不锈钢表面ACQUITY UPLC系统以及ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和ACQUITY Premier系统分析LPA (16:0/0:0)、PA (16:0/18:1)、LPS (18:1/0:0)和PS (16:0/18:1)得到的提取离子流色谱图。ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和ACQUITY Premier系统显著改善了这些化合物的峰拖尾和灵敏度。从图2-A1和2-A2的LPA分析可以看出，在较低浓度水平（5 ng/mL和50 ng/mL）下，ACQUITY Premier系统得到的峰明显大于标准金属表面系统得到的峰，说明灵敏度显著提高。同样，图2-B1和2-B2 (PA)、3-A1和3-A2 (LPS)以及3-B1和3-B2 (PS)表明，与标准色谱柱和系统相比，使用ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和ACQUITY Premier系统获得的灵敏度、峰形和回收率均有所改善。

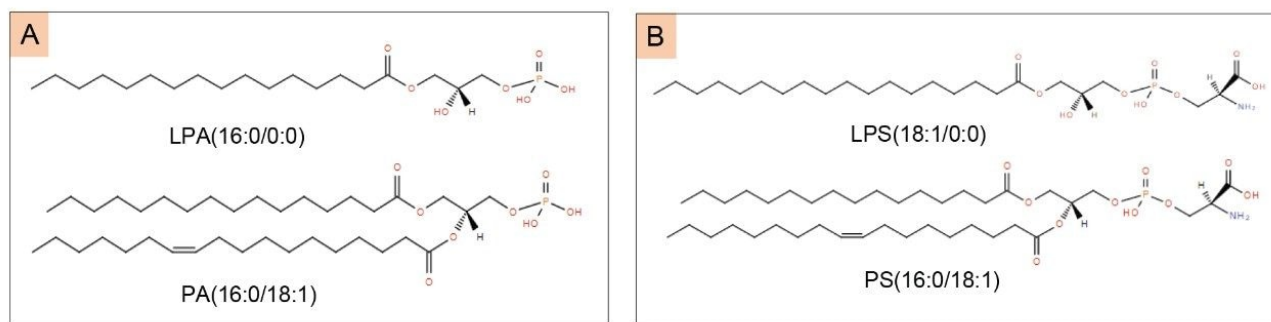


图1.本研究所分析的脂质标准品的化学结构：(A)甘油磷酸酯，包括16:0/0:0溶血磷脂酸(LPA (16:0/0:0))和16:0/18:1磷脂酸(PA (16:0/18:1))，也分别称为单酰基甘油磷酸酯和二酰基甘油磷酸酯；(B)甘油磷酰丝氨酸，包括18:1/0:0溶血磷脂酰丝氨酸(LPS (18:1/0:0))和16:0/18:1磷脂酰丝氨酸(PS (16:0/18:1))，也分别称为单酰基甘油磷酰丝氨酸和二酰基甘油磷酰丝氨酸。

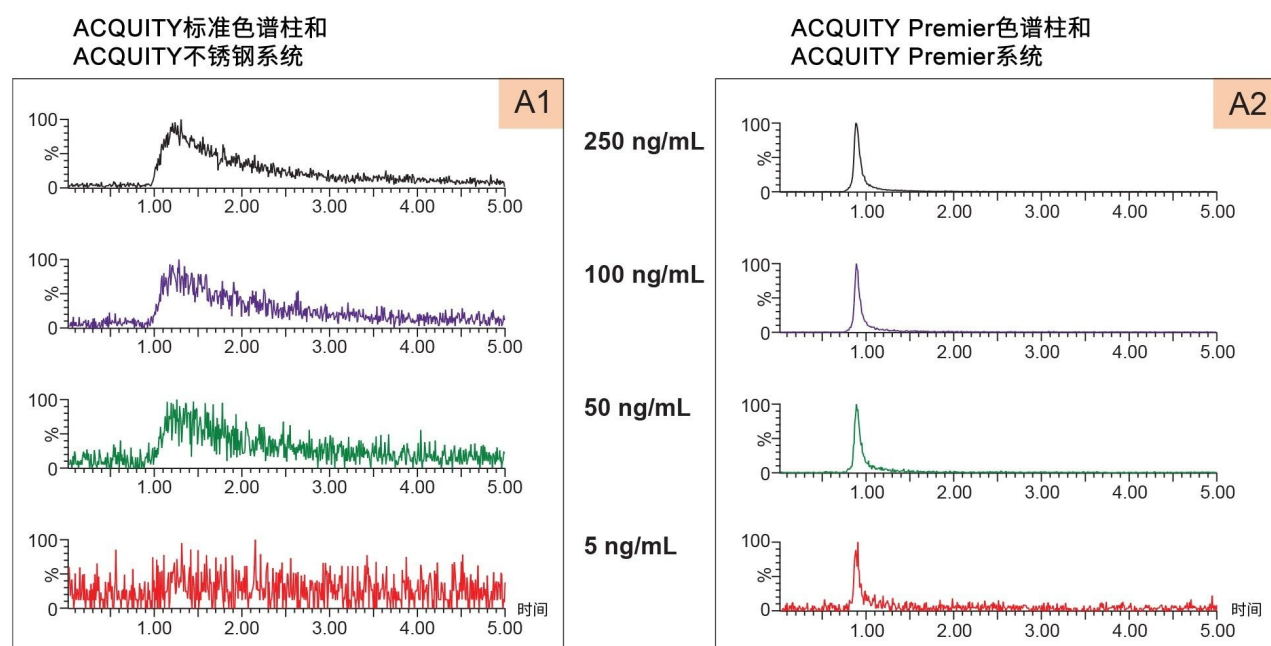


图2A.在负离子模式下分析浓度为5、50、100和250 ng/mL的LPA (16:0/0:0) m/z 409.2355得到的基峰提取离子流色谱图：(A1)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(A2)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。

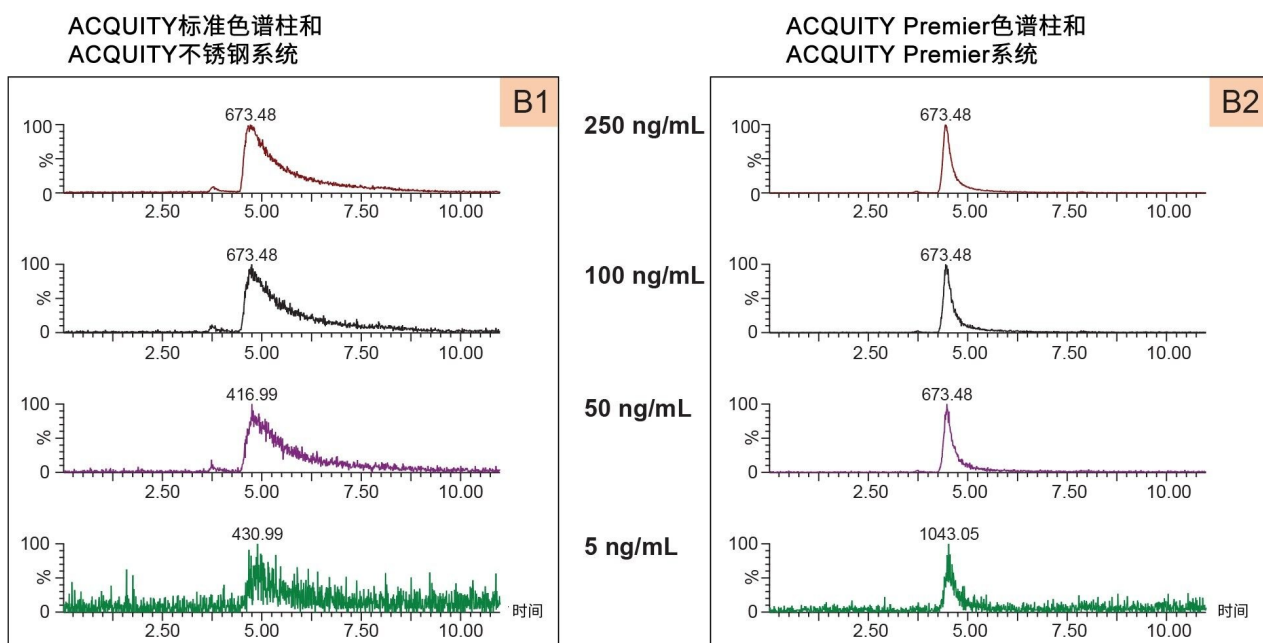


图2B.在负离子模式下分析浓度为5、50、100和250 ng/mL的PA (16:0/18:1) m/z 673.4808得到的基峰提取离子流色谱图：(B1)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(B2)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。

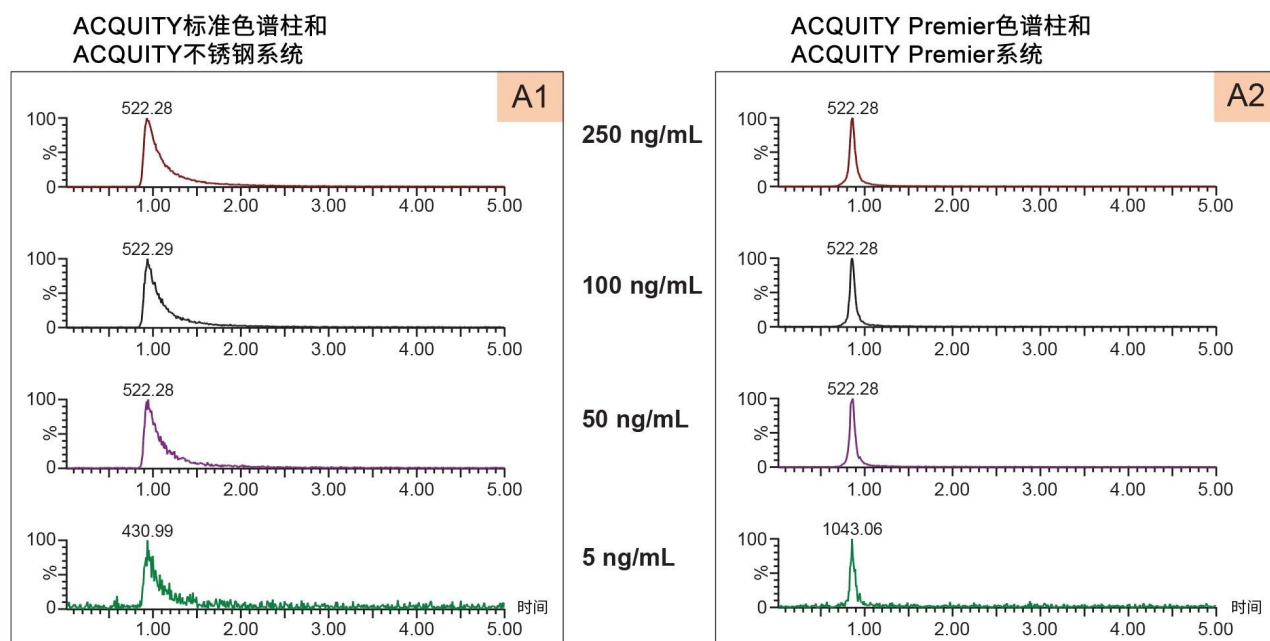


图3A.在负离子模式下分析浓度为5、50、100和250 ng/mL的LPS (18:1/0:0) m/z 522.2832得到的基峰提取离子流色谱图：(A1)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(A2)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。

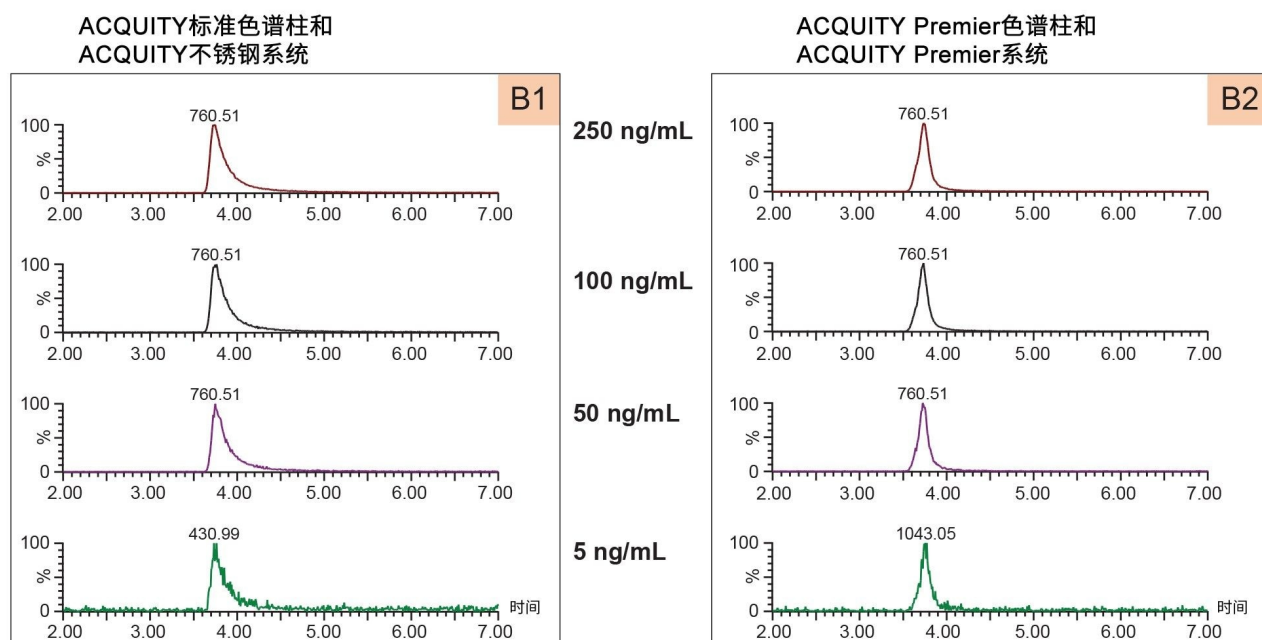


图3B.在负离子模式下分析浓度为5、50、100和250 ng/mL的PS (16:0/18:1) m/z 760.5129得到的基峰提取离子流色谱图：(B1)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(B2)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。

利用本研究开发的方法分析蛋鸡PA和猪脑PS提取物（图4和5）。与ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统（图4B）相比，使用标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY UPLC系统（图4A）分析 m/z 671.47 (16:1_18:1)和673.48 (16:0_18:1)处PA脂质获得的拖尾峰非常宽。图4A和4B下图为PA (16:0_18:1)的提取离子流色谱图，使用标准CSH C_{18} 色谱柱和不锈钢系统获得的峰宽为4.1 min（图4A下图），使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统获得的峰宽为1.2 min（图4B下图）。同样，图5显示了在相同条件下采用标准色谱系统与ACQUITY Premier系统分析猪脑PS提取物得到的分析结果，在PS (18:0_18:1)的提取离子流色谱图中，使用标准CSH C_{18} 色谱柱和不锈钢系统获得的峰宽为1.1 min（图5A下图），使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统获得的峰宽为0.3 min（图5B下图）。

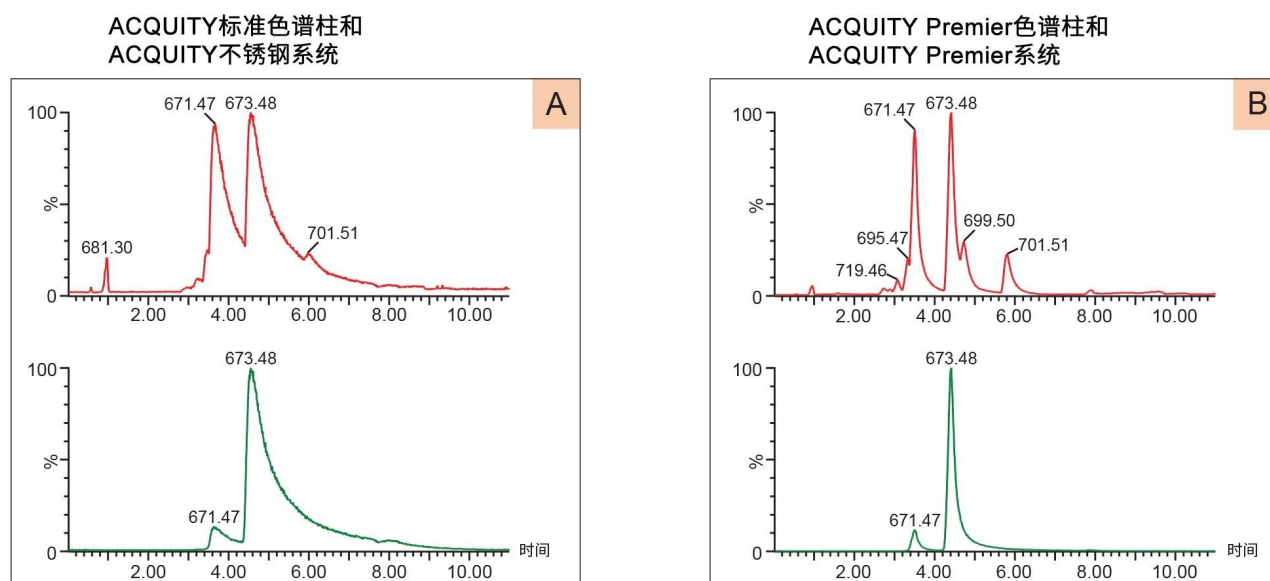


图4. *Avanti Polar Lipids* 蛋鸡PA提取物(10 $\mu\text{g/mL}$)的测定结果：(A)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(B)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。下图为 m/z 673.48处PA (16:0_18:1)的提取离子流色谱图，使用标准CSH C_{18} 色谱柱和不锈钢系统获得的峰宽为4.1 min，使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统获得的峰宽为1.2 min。

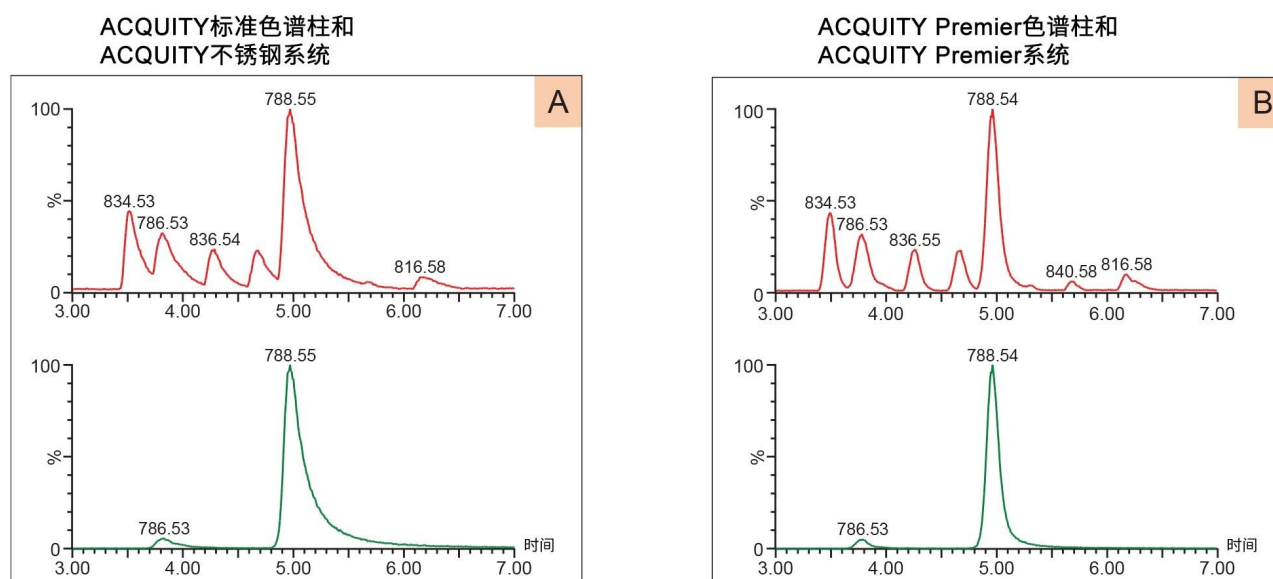


图5. *Avanti Polar Lipids*猪脑PS提取物(10 $\mu\text{g/mL}$)的测定结果：(A)使用ACQUITY标准CSH C_{18} 色谱柱和具有不锈钢表面的ACQUITY系统；(B)使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统。下图为 m/z 788.54处PS (18:0_18:1)的提取离子流色谱图，使用标准CSH C_{18} 色谱柱和不锈钢系统获得的峰宽为1.1 min，使用ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱和ACQUITY Premier系统获得的峰宽为0.3 min。

与之前使用标准反相色谱柱的大多数方法相比⁶，ACQUITY Premier技术可同时分析包含磷酸和羧基团的脂质与不发生显著结合和峰拖尾的其他脂类，增加脂质组学方法适用范围，改善对这些具有重要生物学意义的脂质的分析范围、灵敏度和回收率。

结论

ACQUITY Premier CSH C_{18} 色谱柱结合ACQUITY Premier系统是一种非常可靠的方法，适用于分析LPA、PA、LPS和PS脂质分子，可显著改善磷酸化和羧化脂质的灵敏度、峰拖尾现象和回收率。本研究所开发的方法也可以用于分析其他磷酸化和羧化脂类，例如磷脂酰肌醇磷酸酯与单磷酸酯、双磷酸酯和三磷酸酯、神经酰胺-1-磷酸酯和鞘氨醇1-磷酸酯。

参考资料

1. Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic Acid- and Phosphatidylserine-Binding Proteins. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1761 (2006) 913–926.
2. Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X. Profiling Membrane Lipids in Plant Stress Responses. Role of Phospholipase D Alpha in Freezing-Induced Lipid Changes in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31994.
3. Cífková E, Hájek R, Lída M, Holápek M. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Lysophosphatidic Acids, Lysophosphatidylserines and Other Lipid Classes. *J Chromatogr A.* 2016 Mar 25;1439:65–73.
4. Isaac G, Munjoma N, Gethings LA, Mullin L, Plumb RS. Reversed-Phase Lipid Profiling Method for Large Sample Sets. Waters Application Note [720006959](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html) <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html>> .2020 July.
5. Triebel A, Trötz Müller M, Eberl A, Hanel P, Hartler J, Köfeler HC. Quantitation of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid Molecular Species using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014 Jun 20;1347:104–10.
6. B Gowda SG, Ikeda K, Arita M. Facile Determination of Sphingolipids Under Alkali Condition using Metal-Free Column by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2018 Aug;410(20):4793–4803.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

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

720007092ZH, 2021年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)