

# 基于超临界流体色谱 - 串联质谱的抑郁症 高效拟靶向脂质组学研究方法

## LCMSMS-1039

**摘要：** 本文建立了一种基于超高效超临界流体色谱 - 串联质谱 (SFC-MS/MS) 的拟靶向脂质组学方法，通过 SFC-QTOF 在 DDA 模式下获取脂质的串联质谱数据，并通过 SFC-MS/MS 验证 MRM 离子对参数，最终建立了 SFC-MS/MS 基础的拟靶向脂质组学方法。通过比较该方法与基于 UHPLC-MS/MS 的拟靶向方法和基于 SFC-MS 的非靶向方法，验证了其优越的分析性能，并应用于研究甘草苷对抑郁症的治疗效果。

**关键词：** 超高效超临界流体色谱 拟靶向脂质组学 三重四极杆 抑郁症

### 技术特点：

- ❖ 方法结合了非靶向和靶向脂质组学方法的优势，8 分钟内从血浆样本中检测出 758 种脂质。
- ❖ 将 SFC-MS/MS 拟靶向方法应用于甘草苷治疗抑郁症的脂质组学研究中，筛选出了分属 3 条代谢通路的 33 个差异脂质代谢物。

抑郁症是一种以持久缺乏愉悦感为特征的精神障碍，由于缺乏特异性的生物标志物，目前抑郁症的临床诊断主要依赖于患者的病史和医生的主观判断。研究表明，抑郁症患者脂质成分明显变化，例如神经酰胺和促炎性磷脂的增加。甘草苷从中药甘草中提取，已被报道对大鼠具有类抗抑郁作用，但其具体机制尚不明确。进行脂质分析有助于理解抑郁症的发病机制，从而帮助诊断和治疗。

脂质组学作为一种强有力的分析工具，能够揭示复杂生物样本中因内外因素引起的脂质变化，已广泛应用于各种疾病的生物标志物发现和机制研究，如糖尿病、阿尔茨海默病和中风。由于色谱分离可以减少质谱分析中的离子抑制效应，目前，液相色谱与质谱联用是脂质谱分析的常用方法。脂质组学

的研究策略通常分为非靶向和靶向两种方法，各有优缺点。最近，拟靶向脂质组学方法作为一种新兴的技术出现，使用 MRM 模式对脂质进行分析，能够比靶向分析获得更高的定量精度，并且表现出较高的灵敏度、精度、宽线性范围和高通量。虽然常规 LC-MS 能够检测包括非挥发性和热敏性物质在内的多种化合物，但对脂质同分异构体的分离存在一定的局限性。超临界流体色谱 (SFC) 结合了气相色谱和液相色谱的特点，近年来在脂质组学中逐渐受到关注。

本文通过 SFC-Q-TOF MS 在 MSE 模式下获取脂质的串联质谱数据，并通过 SFC-QqQ-MS 验证 MRM 离子对，建立了基于超高效超临界流体色谱 - 串联质谱 (SFC-MS/MS) 的拟靶向脂质组学方法。

## ■ 实验部分

### 1.1 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法流程

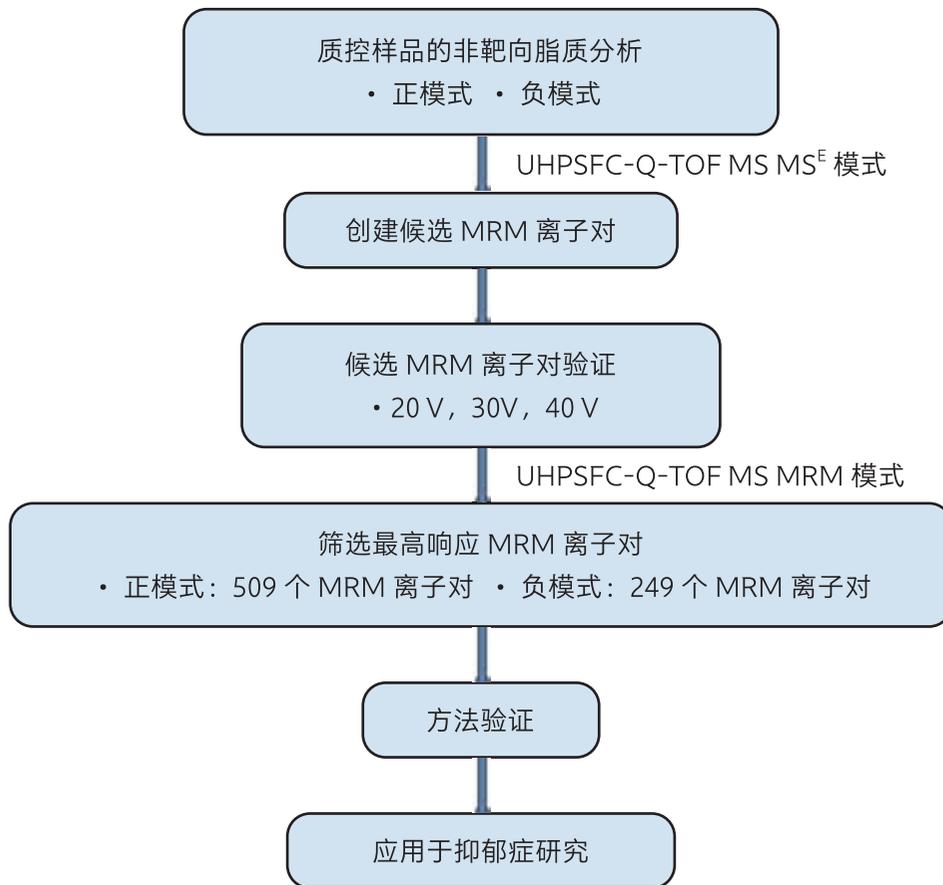


图 1 拟靶向脂质组学方法流程

基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法流程如图 1 所示。首先，使用 SFC-QTOF 在 DDA 模式下进行非靶向分析，以获取脂质的串联质谱数据。随后基于解卷积后的串联质谱数据创建脂质组的候选 MRM 离子对参数，并使用 SFC-MS/MS 在 MRM 模式下（碰撞电压分别为 20 V、30 V 和 40 V）验证这些候选 MRM 离子对参数。最后，通过验证后的 MRM 离子对参数建立拟靶向方法并进行验证。

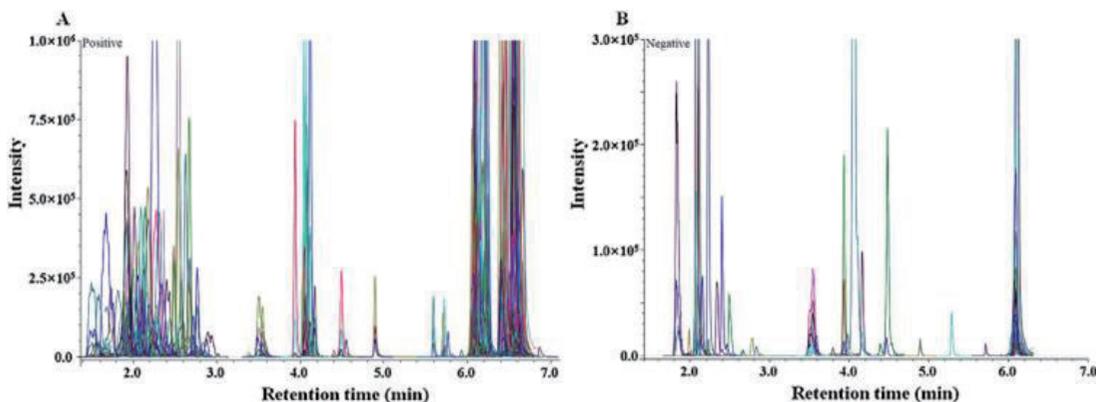


图 2 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法在正负向模式下的典型 MRM 色谱图

## 1.2 仪器

本实验采用 Nexera UC 系统与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060NX 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A  
 脱气机：DGU-20A5R  
 输液泵：LC-20AD XR  
 自动进样器：SIL-30AC  
 CO<sub>2</sub> 输液泵：LC-30ADSF  
 补偿液输送泵：LC-20AD XR  
 背压调节单元：SFC-30A  
 柱温箱：CTO-20AC  
 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118

## 1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：二醇基柱  
 流动相：A: 超临界 CO<sub>2</sub> B: 甲醇水 (99:1, v/v)  
 分析流速：1.8 mL/min  
 补偿液流速：0.25 mL/min  
 质谱补偿液：甲醇溶液  
 进样体积：1 μL  
 柱温：60°C  
 洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1

表 1 液相色谱时间程序 (初始流动相 B 为 1%)

时间 (min)	单元	处理命令	值
4.00	泵	B.Conc	11
8.00	泵	B.Conc	51
9.00	泵	B.Conc	51
10.00	泵	B.Conc	1
12.00	泵	B.Conc	1

质谱条件

离子源：ESI  
 接口电压：+4 kV  
 雾化气：氮气 3.0 L/min  
 干燥气：氮气 10.0 L/min  
 接口温度：300 °C  
 DL 温度：250 °C  
 加热块温度：400 °C  
 加热气：10.0 L/min

## ■ 结果与讨论

### 2.1 基于 SFC-MS/MS 和 UHPLC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法比较

#### 2.1.1 分析速度和峰宽

SFC-MS/MS 仅用 8.0 分钟即可分离所有脂质，而 UHPLC-MS/MS 则耗时 17.0 分钟。由于超临界二氧化碳具有较高的扩散系数和较低的粘度，SFC 的分析速度通常是 LC 的 3-5 倍。在本研究中，使用含甲醇流动相的 SFC 的分析速度是 UHPLC 方法的两倍。两种方法对共同检测到的脂质半峰宽度 (见图 3) 进行了比较，结果表明，SFC-MS/MS 检测的脂质半峰宽度主要在 0.01-0.08 分钟之间，而 UHPLC-MS/MS 的范围则为 0.03-0.17 分钟。此外，84% 的脂质在 SFC-MS/MS 中具有比 UHPLC-MS/MS 更窄的峰，表明 SFC 柱中脂质的扩散小于 LC 柱，这有助于色谱分离。SFC 获得的窄峰宽度归因于其低粘度的超临界流体和较高的线速度 (0.42 cm/s)，而 UHPLC-MS/MS 的线速度为 0.14 cm/s，更容易导致分析物的扩散。

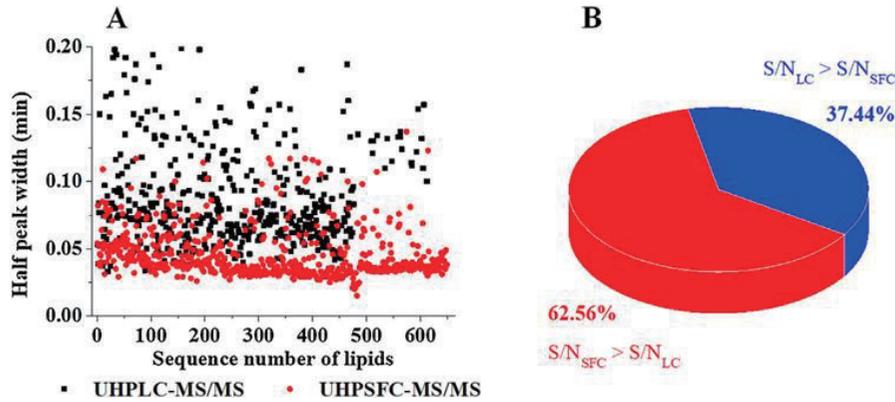


图3 基于UHPLC-MS/MS和SFC-MS/MS的拟靶向脂质组学方法的峰宽和灵敏度比较。  
 (A) UHPLC-MS/MS和SFC-MS/MS在正离子和负离子模式下检测到的脂质的半峰宽。  
 (B) UHPLC-MS/MS和SFC-MS/MS在正离子和负离子模式下检测到的脂质响应的信噪比

### 2.1.2 灵敏度

本文还比较了基于SFC-MS/MS和UHPLC-MS/MS的拟靶向脂质组学方法的灵敏度(见图6)。结果表明,62.56%的脂质在SFC-MS/MS中具有比UHPLC-MS/MS更高的S/N比值。此外,在SFC-MS/MS中,S/N大于500的脂质占74%,而在UHPLC-MS/MS中,仅为51%。这些结果表明,基于SFC-MS/MS的拟靶向脂质组学方法在灵敏度上优于基于UHPLC-MS/MS的方法。

### 2.1.3 脂质同分异构体的分离

脂质谱分析中的一个挑战是脂质同分异构体的分离。在反相LC柱上,分析物通过与固定相的疏水相互作用进行分离,这种分离机制限制了同分异构体的分离。而SFC的分离机制类似于正相色谱,依赖于分析物与固定相的极性相互作用,能够区分分子形状的细微差别,特别是极性功能基团。图4展示了基于UHPLC-MS/MS和SFC-MS/MS的拟靶向方法检测的三组同分异构体的色谱图。结果显示,使用UHPLC-MS/MS无法分离的 $m/z$  628.60 > 264.26、 $m/z$  637.48 > 339.29和 $m/z$  660.56 > 338.27的同分异构体,在SFC-MS/MS中获得了更好的分离效果。因此,基于SFC-MS/MS的拟靶向脂质组学方法在同分异构体的分离上相较于UHPLC-MS/MS具有显著优势。

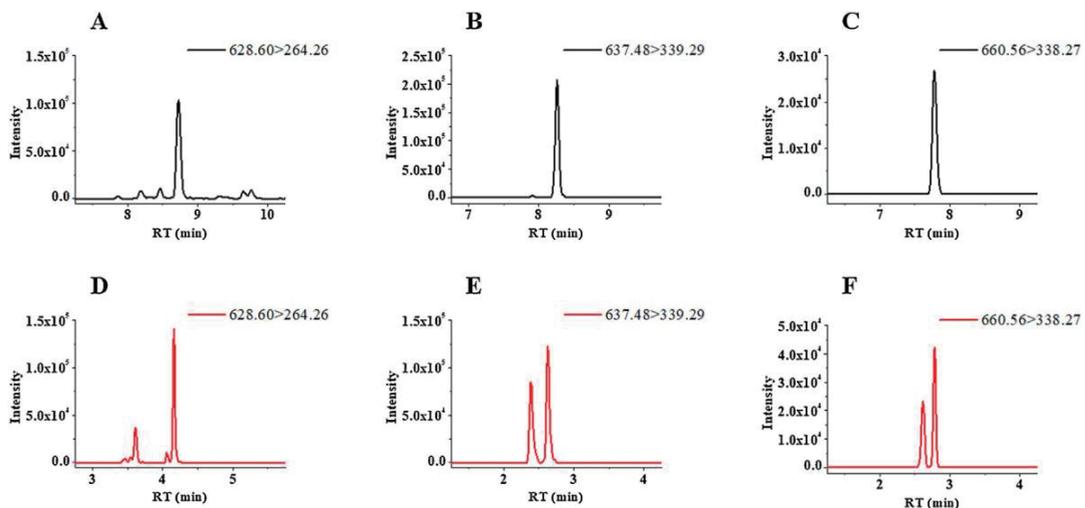


图4 基于UHPLC-MS/MS的拟靶向方法和基于SFC-MS/MS的拟靶向方法检测的三组异构体的提取离子色谱图。  
 黑线(A-C), UHPLC-MS/MS; 红线(D-F), SFC-MS/MS。

## 2.2 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法优于非靶向脂质组学方法

### 2.2.1 灵敏度

对 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法与 SFC-MS/MS 的非靶向方法进行灵敏度比较 (见图 5)。结果显示, 80% 的脂质在拟靶向方法中的 S/N 高于非靶向方法, 且 84% 的脂质在拟靶向方法中的 S/N 大于 300, 而非靶向方法只有 19%。与非靶向方法相比, 拟靶向方法对于 61% 的脂质灵敏度提高了 10 倍。这种显著高灵敏度的原因主要是由于 MRM 模式能够减少生物样本中其他内源性成分的干扰。

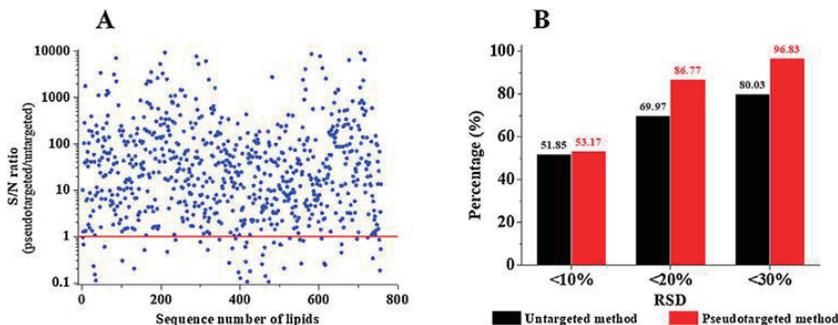


图 5 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向方法与基于 SFC-MS/MS 的非目标方法在正离子和负离子模式下的灵敏度和重复性比较。

(A) 拟靶向方法与非靶向方法的 S/N 比。红线表示 S/N 比为 1, 即两种方法的 S/N 相等。

(B) 拟靶向方法和非靶向方法检测到的所有脂质峰面积的 RSD 分布。

### 2.2.2 重复性

图 5 展示了基于 SFC-MS/MS 的拟靶向方法与非靶向方法的重复性比较。结果显示, 拟靶向方法中约 87% 的脂质的 RSD 小于 20%, 而具有 RSD 小于 30% 的脂质比例约为 97%; 而非靶向方法中 RSD 小于 20% 的脂质比例约为 70%, 具有 RSD 小于 30% 的脂质比例约为 80%。这些结果表明, 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法具有更好的重复性。

### 2.2.3 多变量分析与差异脂质的定义

使用基于 SFC-MS/MS 的拟靶向方法, 研究了甘草苷治疗抑郁症过程中的脂质变化。通过 PLS-DA 模型, 四组样本 (对照组、模型组、甘草苷组、氟西汀组) 之间的全局差异见图 6, PLS-DA 模型的  $R^2Y$  和  $Q^2$  分别为 0.896 和 0.780, 表明模型拟合和预测能力良好。模型组和对照组的聚类明显分离, 揭示了抑郁症发病过程中脂质变化的明显性。此外, 甘草苷组和氟西汀组的聚类向对照组靠近, 表明两者对抑郁症有治疗作用。通过筛选差异变量, 33 个变量被选定为模型组与对照组之间的差异变量。相比健康大鼠, 抑郁大鼠中 22 个差异变量的水平下降, 其他 11 个差异变量的水平上升。所有差异变量在甘草苷治疗后向正常水平恢复, 其中 16 个差异变量显著恢复 ( $FDR < 0.05$ )。氟西汀组中 19 个差异变量恢复到正常水平, 其中 10 个显著恢复。这些结果表明, 甘草苷和氟西汀均能改善抑郁症中的脂质代谢异常。

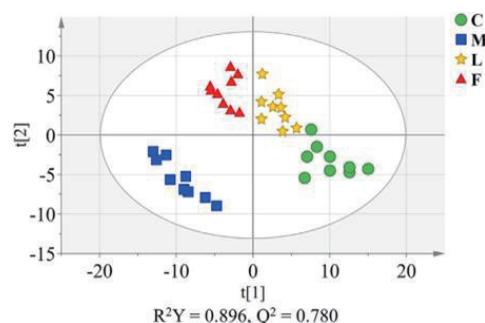


图 6 四组 PLS-DA 模型得分图。C, 对照组; M, 模型组; L; 甘草苷组; F; 氟西汀组。

### 2.2.4 甘草苷干预对抑郁症大鼠的影响

所有鉴定的差异脂质在甘草苷治疗后趋向正常水平, 6 个脂质在模型组与治疗组之间显示出显著差异 (见图 7), 花生四烯酸、PC (18:0/20:2)、PC (20:3/22:6)、Cer (d18:1/16:0)、DG (18:2/18:2/0:0) 和 DG (18:2/22:5/0:0) 等脂质在抑郁症大鼠中具有显著变化。甘草苷和氟西汀对这些脂质的调节作用表明, 它们可能具有相似的抗抑郁机制, 主要通过调节花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢和鞘脂代谢。

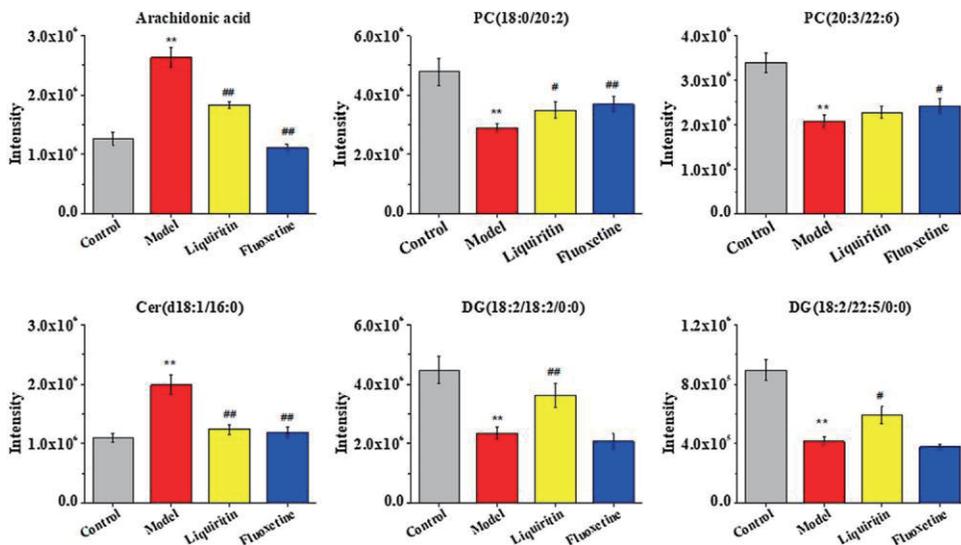


图 7 6 种脂类信号强度对比。\*\*: FDR<0.01, 模型组 vs. 对照组; #: FDR<0.05, 给药组 vs. 模型组; ##: FDR<0.01, 给药组 vs. 模型组。

## ■ 结论

本文建立了一种绿色高效的基于 SFC-MS/MS 的拟靶向脂质组学方法, 该方法结合了非靶向和靶向脂质组学方法的优势。该方法能够在 8 分钟内从 30  $\mu$ L 血浆样本中检测到 758 种脂质, 对应正负离子模式下各 509 和 249 种。除了验证研究中展示的优异分析特性外, 所建立的拟靶向脂质组学方法与基于 UHPLC-MS/MS 的拟靶向方法相比, 具有更短的分析时间、峰形更尖锐、更高的灵敏度以及更好的脂质同分异构体分离能力。此外, 该方法比基于 SFC-MS 的非靶向方法具有更高的灵敏度和更好的重复性。最后, 基于 SFC-MS/MS 的拟靶向方法被应用于甘草苷治疗抑郁症的脂质组学研究, 筛选出了分属 3 条代谢通路的 33 个差异脂质代谢物。

岛津应用云

