

基于在线变相聚焦 -SFE-SFC-MS 技术的 I 型糖尿病大鼠血浆脂质组学研究

LCMS-QTOF-098

摘要： 变相聚焦策略可有效地改善 SFE（超临界流体萃取）和 SFC（超临界流体色谱）在线联用过程中的超临界色谱峰形并提高灵敏度。本研究基于在线变相聚焦 -SFE-SFC 系统与三重四级杆液质系统联用，建立了集提取、分离和检测于一体的脂质组学分析方法，实现了绿色高效的脂质组分析。最后，将在线变相聚焦 -SFE-SFC 系统与 LCMS-9030 联用对 I 型糖尿病（type 1 diabetes, T1D）大鼠血浆进行脂质组学研究，经过多元统计分析和差异脂质筛选，鉴定了 77 种差异脂质。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其实验结果也为 T1D 的诊断和治疗提供了有力依据。

关键词： 在线 SFE-SFC-MS 三重四级杆质谱 四级杆飞行时间质谱 I 型糖尿病 脂质组学

技术特点：

- ❖ 基于在线 SFE-SFC 系统，应用变相聚焦策略，实现了复杂样品的提取、分离及检测一体化分析。
- ❖ 综合使用多元统计分析（PCA、ROC、火山图等）展示 77 种差异脂质筛选流程。

开发绿色高效一体化的分析方法是当前分析领域的前沿课题。由于超临界二氧化碳 (sc-CO₂) 的独特性质，在线超临界流体萃取 - 超临界流体色谱 (SFE-SFC) 发展迅速，在许多领域得到了广泛应用。然而，它仍然面临着一些挑战，如峰展宽和基质效应。为了解决这一问题，我们基于岛津的 Nexera UC 系统和 LCMS-8050 质谱建立了在线变相聚焦 - 超临界流体萃取 - 超临界流体色谱 - 串联质谱（在线变相聚焦 -SFE-SFC-MS/MS）方法。该方法以 CO₂ 为溶剂，

采用变相聚焦策略将分析物堆积在色谱柱上，实现了全体积进样，提高了灵敏度。将建立的方法应用于 I 型糖尿病（type 1 diabetes, T1D）大鼠血浆脂质组学研究，经过多元统计分析和差异脂质筛选，鉴定了 77 种差异脂质。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其实验结果也为 T1D 的诊断和治疗提供了有力依据。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera UC+LCMS-8050 (LCMS-9030)，配置信息如下：

二氧化碳泵：	LC-30AD SF	改性剂泵：	LC-20AD XR
补充液泵：	LC-20AD XR	萃取单元：	SFE-30A
自动进样器：	SIL-30AC	柱温箱：	CTO-20AC
系统控制器：	CBM-20A	背压调节器：	SFC-30A×2
质谱仪：	LCMS-8050/LCMS-9030	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118

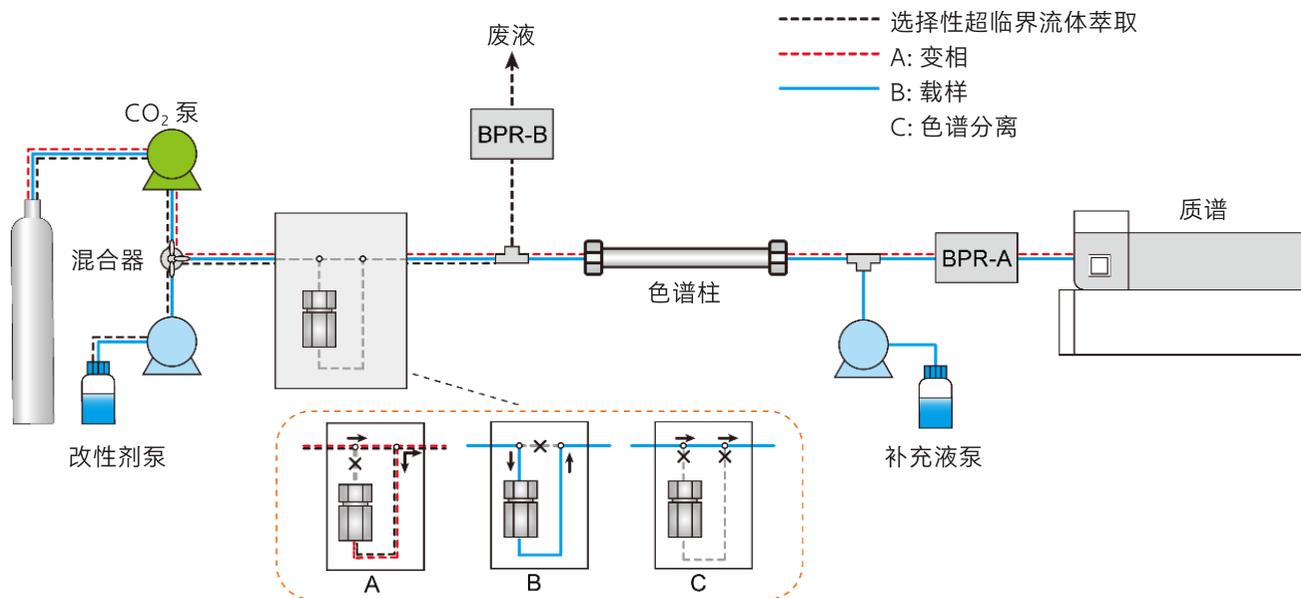


图 1 在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 系统流程图

如图 1 所示，在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 包括四个步骤：

第一步是超临界流体萃取（黑色虚线）：萃取罐中加入血浆样品，当萃取溶剂充满容器时，多余的溶剂通过 BPR-B 排出。

第二步是相变（红色虚线）：改性泵停止输送改性剂，BPR-A 关闭。此时，CO₂ 从超临界状态转变为气态，并充满色谱柱。

第三步是载样和色谱分离（蓝色实线）：BPR-A 的压力恢复，萃取溶剂将所有提取物从萃取罐转移到色谱柱。由于系统压力需要 1.5 min 才能恢复到设定值，色谱柱中的气态 CO₂ 并没有立即过渡到超临界状态。因此，目标物可以堆积在色谱柱头。之后进行色谱分离（蓝色实线）。流动相没有流经萃取单元，而是直接进入色谱柱，对目标物进行梯度洗脱。

第四步是串联质谱对所有分析物进行检测。

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱： Shim-pack UC-X RP (150 mm x 4.6 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30501-01)

流 动 相： A- sc-CO₂; B- 甲醇 (含 1% 水和 10 mM 甲酸铵)

萃 取 温 度： 35°C

进 样 体 积： 5 μL

柱 温： 35°C

洗 脱 模 式： 梯度洗脱，B 相起始浓度为 10%，时间程序如图 2 所示。

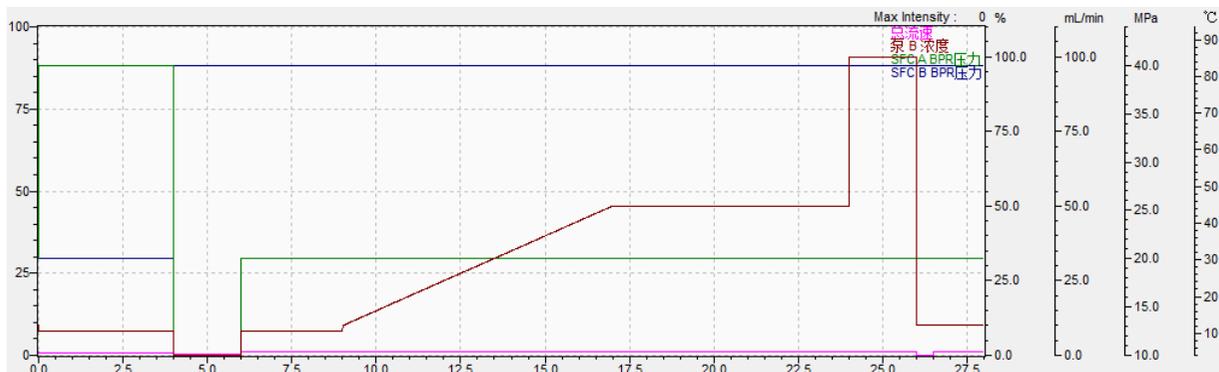


图 2 在线变相聚焦 -SFE-SFC 方法的时间程序

质谱条件

离子源：ESI (+,-)	接口温度：300°C
加热块温度：350°C	DL 温度：250°C
雾化气流速：3.0 L/min	加热块温度：400°C
干燥气流速：10.0 L/min	加热气流速：10.0 L/min
扫描模式：MRM (LCMS-8050) , SCAN+DDA (LCMS-9030)	

■ 样品处理

用移液枪将 5 μ L 血浆样品沿萃取罐罐壁加入，进行萃取。

■ 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图

在线变相聚焦 -SFE-SFC 系统在 28 min 内完成对 16 种脂质标准品的良好分离，色谱图见图 3，具体化合物信息见附表。

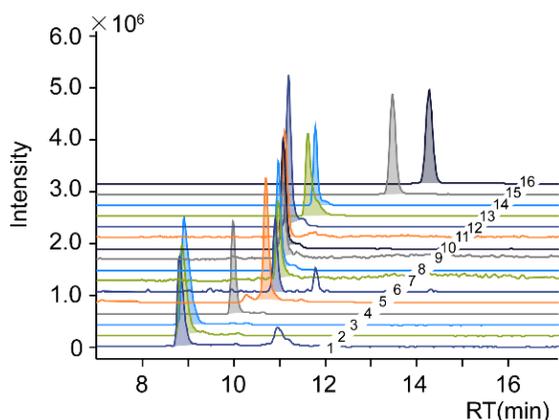


图 3 在线变相聚焦 -SFE-SFC 系统的标准溶液 MRM 色谱图

3.2 变相聚焦效果

如图 4 所示，在传统在线 SFE-SFC 中，出峰时间较早的 6 种脂质 (No. 1-6) 出现了明显的峰展宽现象，而在线变相聚焦 -SFE-SFC 方法获得了更加尖锐对称的色谱峰形，表明变相聚焦策略可以解决传统在线 SFE-SFC 系统中弱保留分析物提前扩散的问题。此外，采用变相聚焦策略后，16 个脂质的相对峰高都有

所增加 (图 4c), 其中包括 4 个脂肪酰类 (fatty acyls, FAs)、2 个甘油二酯 (diglycerides, DGs)、2 个甘油三酯 (triacylglycerols, TGs)、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholines, LPCs) LPC 18:1 和磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PCs) PC 18:1/16:0 在内的 10 个脂质标准品的相对峰高增加了 50% 以上, 而其他几个甘油磷脂类 (glycerophospholipids, GPs) 的相对峰高变化较小。因此, 在线变相聚焦-SFE-SFC 方法可显著改善色谱峰形和灵敏度, 尤其是对 FAs 和甘油酯类 (glycerolipids, GLs), 这有利于提高脂质组学分析的定量准确性。

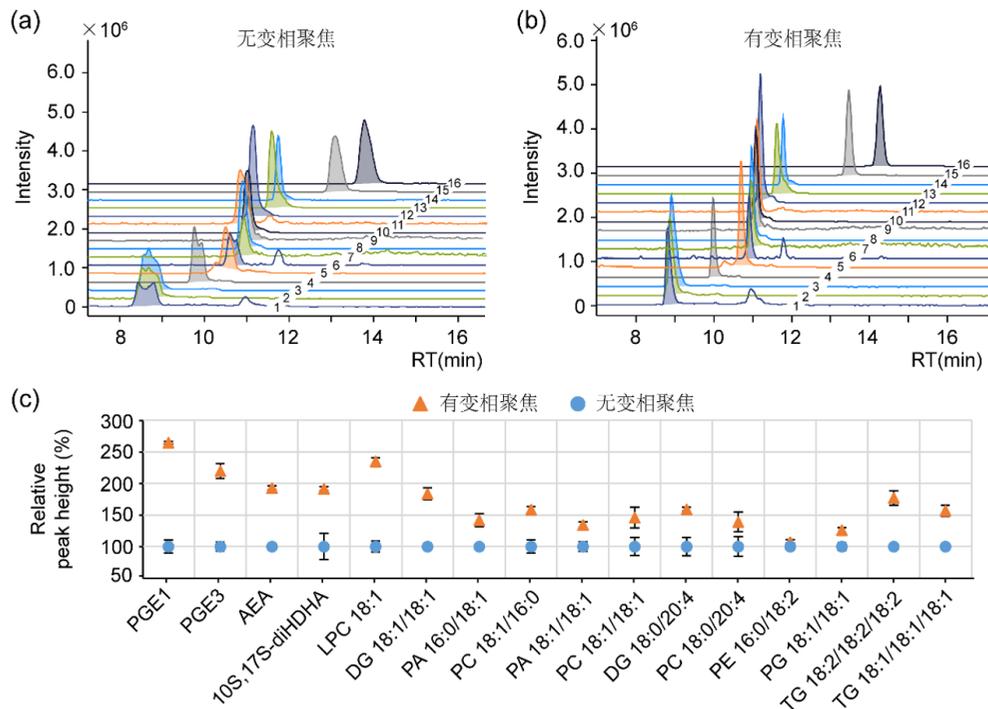


图 4 色谱峰形和相对峰高的对比结果: (a) 有变相聚焦; (b) 无变相聚焦; (c) 相对峰高

3.3 方法稳定性

图 5 分别显示了质控 (quality control, QC) 样本在正离子和负离子模式下的基峰色谱图。图 6a-b 显示在正离子模式和负离子模式下, 9 个 QC 样本的第一主成分投影均在 $\pm 2SD$ 范围内, 表明所建立的方法和所用仪器具有良好的稳定性。

此外, 对 QC 样本进行了重复检测, 将原始数据标准化后计算出脂质变量峰面积的 RSD, 在正离子和负离子模式下分别有 86% 和 83% 的脂质变量峰面积的 RSD 小于 30% (图 6c-d), 并且只有在 QC 样本中峰面积的 RSD 小于 30% 的变量才能继续分析, 这些结果表明了该分析方法在脂质分析过程中重复性良好, 且结果可靠。

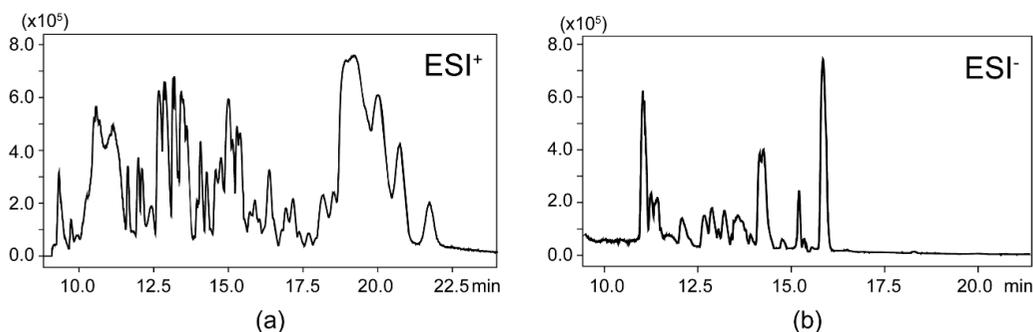


图 5 QC 样本的基峰色谱图: (a) 正离子模式; (b) 负离子模式

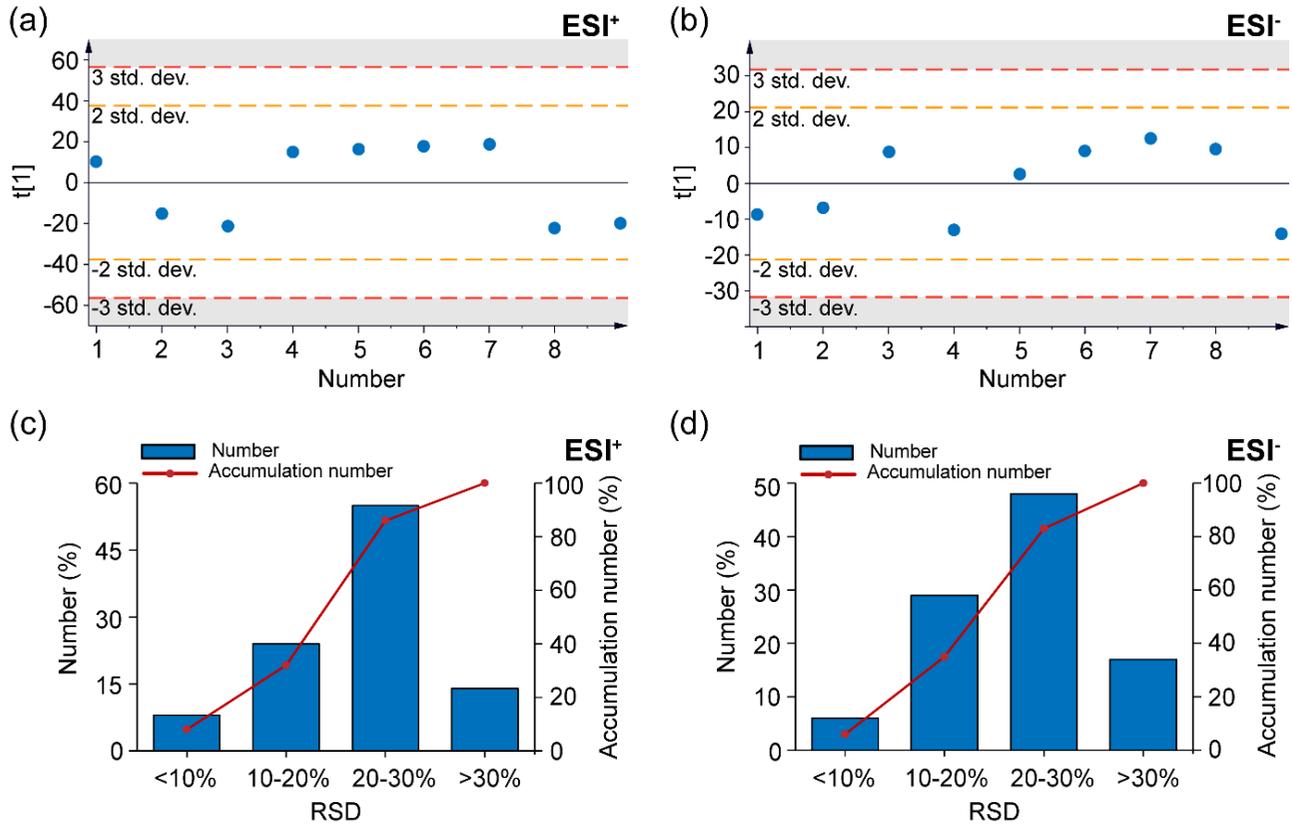
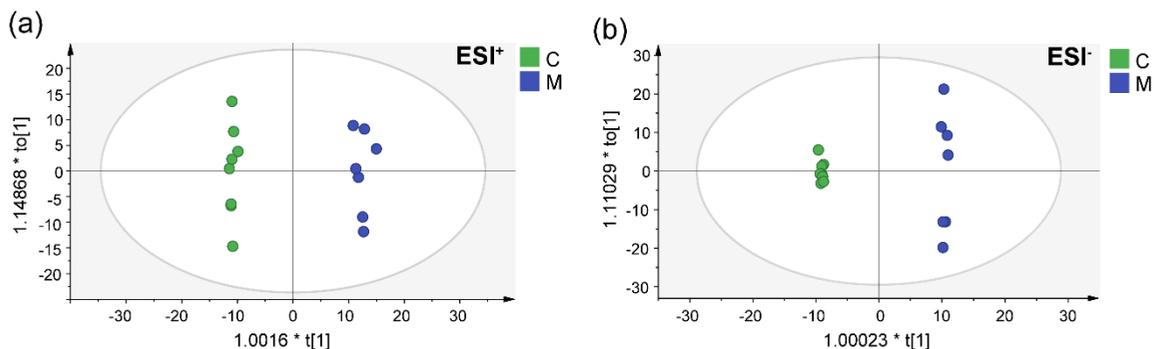


图6 QC 样本的稳定性和重现性: (a) 正离子模式下 QC 样本的 PCA 得分图; (b) 负离子模式下 QC 样本的 PCA 得分图; (c) 正离子模式下 QC 样本的精密密度; (d) 负离子模式下 QC 样本的精密密度

3.4 多元统计分析

将 T1D 大鼠的血浆样品分为对照组 (n=8) 和模型组 (n=7), 通过多元统计分析研究两组间的脂质水平变化, 如图 7 所示, 在有监督的 OPLS-DA 模型中, 模型组和对照组完全分离, 表明两组间的脂质水平差异显著。正离子模式 (图 7a) 下模型的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.994 和 0.83, 负离子模式 (图 7b) 下模型的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.999 和 0.713, 表明该模型的拟合度和预测能力均良好。差异变量的筛选通过比较两组样本中变量的相对丰度实现, 其筛选依据以下三个规则: 1) OPLS-DA 模型分析时所得变量的 VIP 值大于 1; 2) 变量经 t 检验所得的 p 值小于 0.05; 3) 两组样本的 FC 大于 2 或小于 0.5。经过筛选, 正离子模式 (图 7c) 和负离子模式 (图 7d) 下分别获得了 282 个和 105 个差异变量。



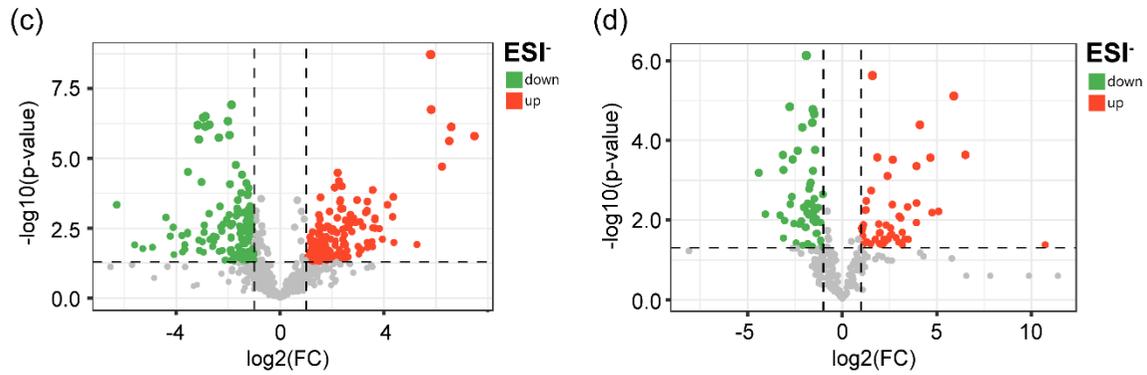


图7 对照和模型组的 OPLS-DA 得分图和差异变量筛选火山图：(a) 正离子模式下的 OPLS-DA 得分图；(b) 负离子模式下的 OPLS-DA 得分图；(c) 离子模式下差异变量筛选火山图；(d) 负离子模式下差异变量筛选火山图

3.5 差异脂质鉴定

差异变量的鉴定是通过 MS-DIAL 软件将一级和二级质谱信息与数据库中的进行匹配，并与 LIPID MAPS 网站和 HMDB 库中的相关信息进行核对，最终鉴定出 77 个差异脂质。

从图 8a 可知，两组样本间的差异脂质种类覆盖范围较广，包括 4 个类别：44.2% 的 GLs、33.8% 的 GPs、14.3% 的鞘脂类 (sphingolipids, SPs) 和 7.8% 的固醇脂类 (sterol lipids, STs)。此外，本研究也比较了差异脂质在对照组和模型组中的相对丰度，结果如图 8b 所示。与对照组相比，模型组中磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamines, PEs) 和神经酰胺 (ceramides, Cers) 的含量较高，而溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholines, LPCs)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositols, PIs)、鞘磷脂 (sphingomyelins, SMs) 和胆固醇酯 (cholesteryl ester, CEs) 的含量较低。在其他脂类中，模型组中 2 种磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PCs)、20 种 TGs 和 1 种 ST 上调，而 9 种 PCs、14 种 TGs 和 1 种 ST 下调。

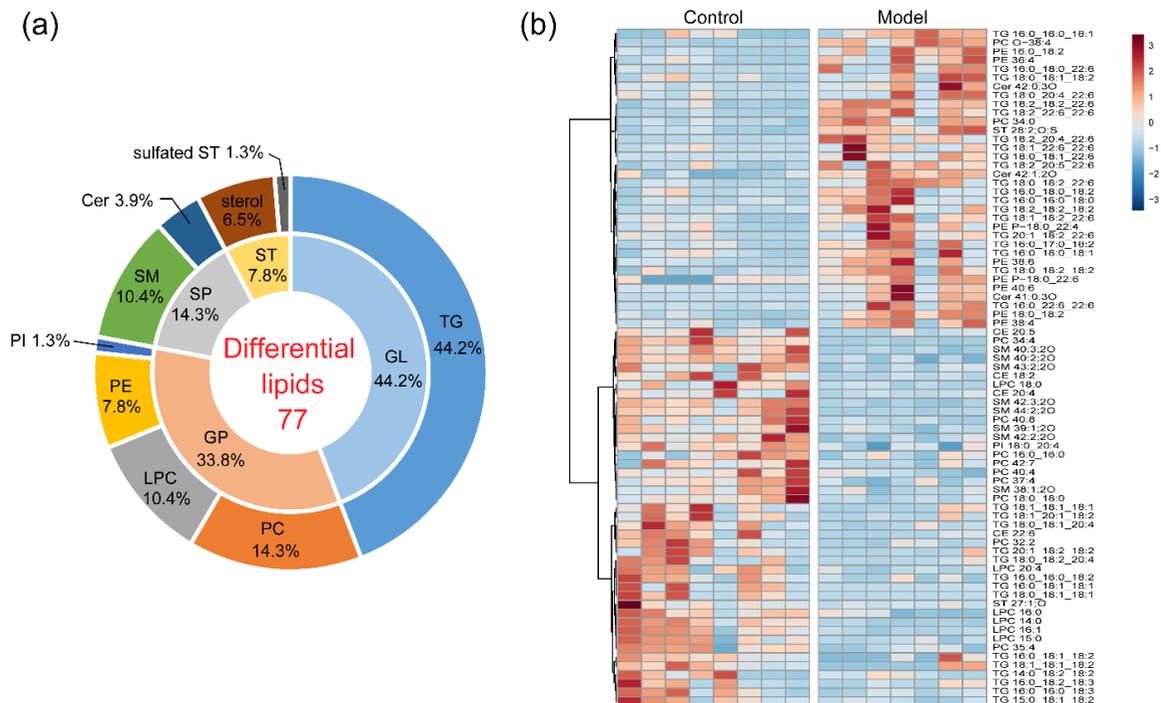


图8 对照和模型组中 77 种差异脂质的分类 (a) 和相对水平 (b)

为了评估差异脂质对区分对照组和模型组的准确性，本研究进行了受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic, ROC）分析，图 9 显示 SM 40:2;2O、TG 18:2_22:6_22:6、TG 18:2_20:4_22:6、PC 34:4、SM 40:3;2O、Cer 41:0;3O、TG 18:0_18:1_22:6 和 PC O-38:4 这 9 种差异血脂的曲线下面积（area under the curve, AUC）值均为 1，表明它们具有很强的诊断能力，有希望成为 T1D 的生物标志物。此外，它们的相对水平如图 10 所示，其中 SM 40:2;2O、SM 40:3;2O 和 PC 34:4 在模型组中显著降低，而其他五种脂质则显著升高。

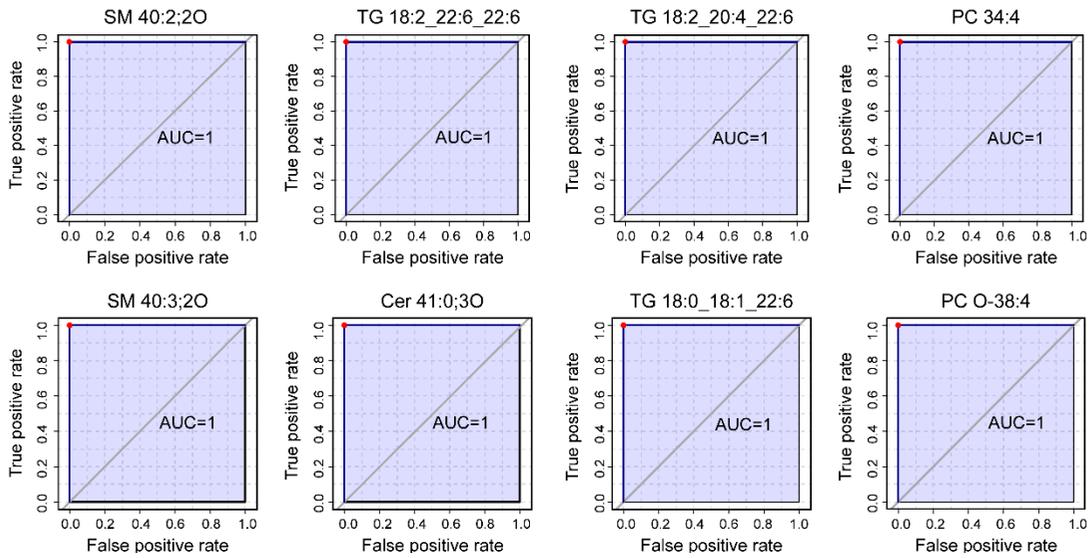


图 9 显著差异脂质的 ROC 分析

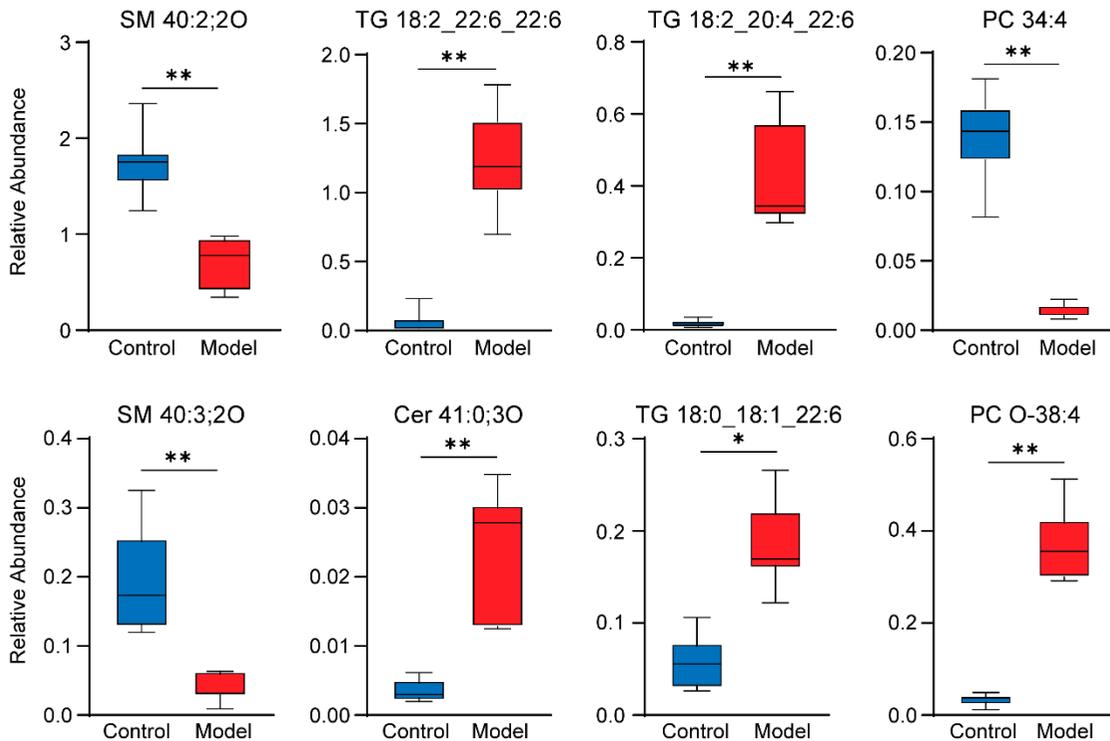


图 10 8 种显著差异脂质的相对水平 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

3.6 代谢通路分析

为了进一步研究与 T1D 相关的生化干扰，我们根据所有差异脂质进行了通路分析。本研究共绘制了 8 条代谢通路（图 11），其中 pathway impact > 0.1 的甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路被认为是与 T1D 脂质紊乱相关的重要通路。

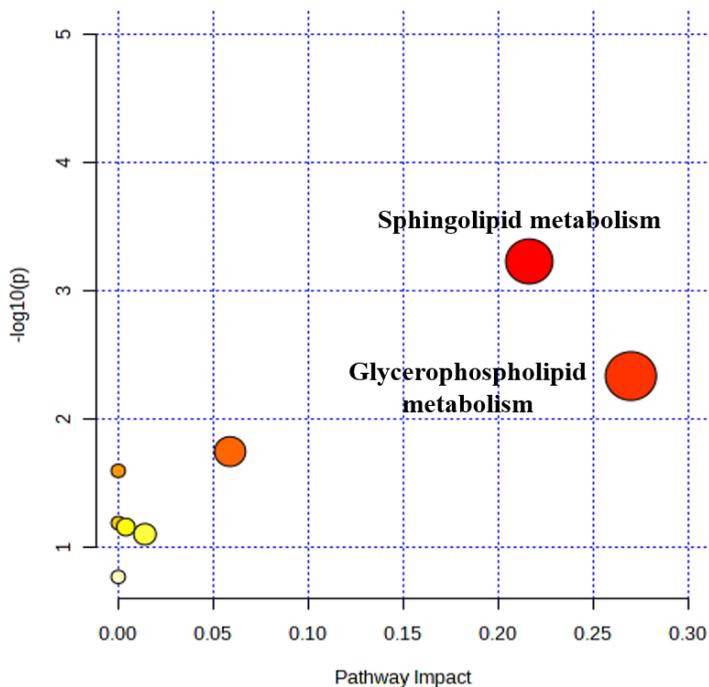


图 11 差异脂质代谢通路气泡图

■ 结论

本研究应用在线变相聚焦 -SFE-SFC-MS 系统进行糖尿病大鼠脂质组学研究。在线系统使用 $sc\text{-CO}_2$ 为主要萃取溶剂和流动相，实现了脂质组学的绿色分析。此外，应用变相聚焦技术获得了尖锐对称的峰形，提高灵敏度，便于定量分析。该绿色分析系统稳定性良好，经过多元统计分析和差异脂质筛选，确定了 77 种差异脂质，其中，模型组中 43 个脂质水平相对于对照组显著下调，其余 34 个脂质则显著上调。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其得到的 8 个显著差异脂质具有很强的诊断能力，有望成为 T1D 诊断和治疗的标志物。

附表

16 种脂质标准品的基本信息与 MRM 参数

序号	化合物名称	分子式	离子类型	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE(V)	Q3 Pre
1	PGE1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	353.25	273.35*	29.0	20.0	29.0
					235.25	16.0	16.0	16.0
2	PGE3	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M-H] ⁻	349.20	313.25*	30.0	11.0	30.0
					189.30	16.0	17.0	12.0
3	AEA	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	[M+H] ⁺	348.35	287.30*	-24.0	-14.0	-19.0
					91.10	-25.0	-48.0	-16.0
4	10S,17S-diHDHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M-H] ⁻	359.25	206.25*	30.0	16.0	23.0
					93.10	16.0	27.0	10.0
5	LPC 18:1	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	522.60	71.20*	-36.0	-41.0	-12.0
					43.20	-36.0	-49.0	-17.0
6	DG 18:1/18:1	C ₃₉ H ₇₂ O ₅	[M+Na] ⁺	643.55	602.30*	-34.0	-13.0	-22.0
					361.25	-22.0	-30.0	-27.0
7	PA 16:0/18:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻	673.45	281.30*	32.0	40.0	13.0
					153.10	30.0	35.0	10.0
8	PC 18:1/16:0	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	782.40	86.00*	-40.0	-55.0	-30.0
					184.10	-22.0	-26.0	-12.0
9	PA 18:1/18:1	C ₃₉ H ₇₃ O ₈ P	[M-H] ⁻	699.45	153.15*	32.0	40.0	14.0
					417.35	32.0	25.0	30.0
10	PC 18:1/18:1	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	786.65	701.40*	-28.0	-22.0	-36.0
					85.95	-28.0	-55.0	-30.0
11	DG 18:0/20:4	C ₄₁ H ₇₂ O ₅	[M+Na] ⁺	667.55	23.10*	-26.0	-35.0	-30.0
					519.25	-34.0	-35.0	-40.0
12	PC 18:0/20:4	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	810.65	386.00*	-24.0	-36.0	-11.0
					184.05	-28.0	-35.0	-20.0
13	PE 16:0/18:2	C ₃₉ H ₇₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻	714.45	255.30*	32.0	35.0	12.0
					146.95	34.0	38.0	15.0
14	PG 18:1/18:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻	773.50	153.00*	36.0	38.0	26.0
					417.30	36.0	30.0	20.0
15	TG 18:2/18:2/18:2	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	901.80	599.55*	-20.0	-42.0	-32.0
					81.10	-20.0	-53.0	-14.0
16	TG 18:1/18:1/18:1	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	[M+Na] ⁺	907.85	625.55*	-26.0	-38.0	-30.0
					265.35	-26.0	-47.0	-30.0

* 表示定量离子

岛津应用云

