

亚心形扁藻中磷脂的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

李海英, 徐继林, 严小军

(宁波大学, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

Analysis of Phospholipids in *Platymonas Subcordiformis* by UPLC-Q-TOF-MS

LI Hai-ying, XU Ji-lin, YAN Xiao-jun

(Marine Biotechnology Laboratory, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A method for phospholipids analysis in *Platymonas subcordiformis* was established by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS). The total lipids in *Platymonas subcordiformis* was extracted by Bligh-Dyer, which dried under nitrogen gas, and dissolved in 0.20 mL methanol/chloroform (1:1) for UPLC-Q-TOF-MS analysis after centrifugation. The mass spectrometry was performed in reflective time-of-flight using electron spraying ionization in both positive and negative mode. Qualitative analysis of phospholipids was based on the characterized product ions and neutral loss yielded by different phospholipids under ESI-MS/MS mode, and confirmed the molecular species by the carboxylate anions produced by phospholipids in negative mode. At last, 3PC, 2PE, 3PS and 2PG are detected in *Platymonas subcordiformis*. Then lipid standards PC, PE, PS and PG are added into totallipids as internal standards for semi-quantitative analysis, the concentration of phospholipids in *Platymonas subcordiformis* is 73.3-1309.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Key words: *Platymonas subcordiformis*; phospholipids; UPLC-Q-TOF-MS; semi-quantitative analysis

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-94-03

生物合成运输和膜脂分类是目前分子膜生物学的研究焦点, 脂类组分被认为是信号传导和内膜运输的重要因子^[1]。磷脂是构成生物膜的重要物质, 是生物膜结构的基本组成成分。对于膜磷脂, 通常可以通过液液萃取和层析分成不同的种类, 衍生后再用薄层层析(TLC)、高效液相色谱(HPLC)或质谱(MS)方法进行分析^[2-3], 这些传统的方法耗时多并缺少分析亚细胞膜所需的灵敏度。ESI-MS已经被成功地用于测定各种不同细胞类型的脂类^[4-5], 但对复杂的脂类缺少足够的分离度和分辨率。

超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱仪(UPLC-ESI-Q-TOF-MS), 大大提高了仪器的分辨率、灵敏度和质量范围, 解决了复杂化合物难以分离的问题, 并且由于高分辨率和高灵敏度, 可以帮助在复杂基质条件下实现对复杂脂类的分离和定性, 彻底解决困扰生物脂类研究中的分离定性问题。本工作利用 UPLC-Q-TOF-MS 分析系统, 以一种海洋绿藻亚心形扁藻作为研究对象, 建立了生物体中磷脂的测定方法, 对生物体内磷脂的合成、积累和代谢过程的研究提供了有效的分析手段。

基金项目: 科技部中国欧盟科技合作项目(国科外(2005)262-0505)、教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(705028)、

浙江省自然科学基金(y504083)资助

作者简介: 李海英(1983~), 女(汉族), 浙江舟山人, 硕士研究生, 从事海洋生物化学研究。E-mail: lihaiying0580@163.com

通讯作者: 严小军(1968~), 男(汉族), 江苏苏州人, 博士生导师, 从事海洋生物化学研究。E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

海洋绿藻亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*): 宁波大学海洋生物实验室藻种室提供; 磷脂标准品磷脂酰胆碱 14:0-18:1-PC, 磷脂酰肌醇 18:0-20:4-PI, 磷脂酸 di18:1-PA: 纯度>98%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司产品; 磷脂酰乙醇胺 di12:0-PE, 磷脂酰丝氨酸 di14:0-PS, 磷脂酰甘油 di14:0-PG: 美国 Avanti Polar Lipids 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1×50 mm); 自动进样 2 μL, 柱温 40 °C, 流动相 A: 水/异丙醇溶液(95: 5); 流动相 B: 乙腈/异丙醇溶液(95: 5), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 洗脱梯度为: 起始梯度 70%A 30%B, 10 min 内 B 升到 92%, 保持 9 min, 2 min 内 B 升到 100%, 保持 4 min, 5 min 内 B 降到 30%。正离子模式下, 流动相中加入 0.1%甲酸; 负离子模式下, 流动相中加入 0.1%氨水。

1.2.2 质谱条件 电喷雾电离(ESI)源; 负离子电离模式, 毛细管电离电压 2.5 kV, 取样锥孔电压 45 V, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂温度 250 °C, 脱溶剂氮气流速 400 L·h⁻¹, 锥孔反吹氮气 0。四极杆质量扫描范围 *m/z* 100~1 000, 碰撞室能量 5 V, TOF 离子飞行方式采用 V 模式; 正离子电离模式, 毛细管电离电压 3.5 kV, 取样锥孔电压 35 V, 其他条件同负离子电离模式。

1.2.3 样品预处理 称取 150.0 mg 亚心形扁藻干品, 参考改进后用 Bligh-Dyer 法^[6]提取总脂, 用来提取总脂的所有溶剂都加入 50 mg·L⁻¹BHT。总脂收集后用 1:1 甲醇/氯仿溶解, 离心过滤后用 1:1 甲醇/氯仿定容到 200 μL, 取 20 μL 溶于 0.5 mL 甲醇中进行液质分析。

2 结果与讨论

2.1 标准磷脂的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

用标准磷脂确定样品中磷脂的 UPLC-MS 分析方法。混合标样中含有 14:0-18:1-PC, 18:0-20:4-PI, di18:1-PA: di12:0-PE, di14:0-PS 和 di14:0-PG 各 10 ppm, 采用 1.2 中分离条件, 在正离子和负离子模式下分别对混合标样进行测定, 在正离子和负离子模式下各磷脂标准品都可以获得良好的分离。

根据对标准磷脂的质谱分析, 不同类型磷脂的 MS/MS 谱图中都有特有的离子碎片或中性丢失, 跟 Pulfer M 等^[7-8]的结果类似。根据这个规律, 就可以在复杂脂类中确定每一种脂的大体种类。再在负离子模式下对磷脂的分子离子峰进行 MS/MS 分析, 会产生 sn-1 和 sn-2 羧基阴离子, 并且随着碰撞能量的增加, sn-1 对 sn-2 羧基阴离子丰度比值会增加。根据此规律, 就可以对每一个磷脂的 sn-1 和 sn-2 基团进行定性。根据以上质谱学规律, 最终可将每一种磷脂定性出来。

2.2 样品的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

加入内标的样品分别在正离子和负离子模式下进行分析, 根据标准磷脂的质谱定性分析方法, 共检出 3 种 PC、2 种 PE、3 种 PS 和 2 种 PG, 而 PI 和 PA 未检出。Shui 等^[9]报道在生物体内不同脂类的离子响应值是线性相关的, 可加入内标对各种生物活性磷脂进行半定量分析, ULF 等^[10]基于 LC-MS 法对复杂脂类混合物进行分析时也采用了类似的半定量分析。所以在样品中加入内标 14:0-18:1-PC, di12:0-PE, di14:0-PS 和 di14:0-PG 各 20 ppm, 对样品中测得的 PC, PE, PS 和 PG 分别进行了半定量分析, 测得该藻中各磷脂的含量在 73.3~1 309.0 μg·g⁻¹之间。

2.3 TOF 高分辨性能在磷脂定性中的应用

高分辨质谱在鉴定 *m/z* 接近而元素组成不一致的基团有着其他质谱无可比美的效果。例如在本实验中, 对 PG 进行 MS/MS 后产生 *m/z* 227.189 4 和 *m/z* 227.020 2 两个峰, 前者为 PG 的羧基阴离子 C₁₄H₂₇O₂⁻, 后者为 PG 的特征离子碎片 C₆H₁₂O₇P⁻, 此时如果用分辨率较低的质谱仪器(±0.5 u)测量, 两者将会重叠, 所以无法正确鉴定出 sn 位的 R 基团种类和作为 PG 的特征离子碎片, 而采用较高分辨质谱(±0.05 u)就可以完全消除两物质间的干扰。

参考文献：

- [1] SIMONS K, TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction[J]. Nature, 2000, 1: 31-39.
- [2] HENRI D, BERNARD G, LOUIS F. Successive isolation and separation of the major lipid fractions including gangliosides from single biological samples[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 249: 67-78.
- [3] JOSEPH C T. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation[J]. Journal of Chromatography B, 1995, 671: 169-195.
- [4] KIM H Y, WANG T C, MA Y C. Liquid Chromatography/mass spectrometry of phospholipids using electrospray ionization[J]. Anal Chem, 1994, 66: 3 977-3 982 .
- [5] HAN X, GROSS R W. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 10 635-10 639.
- [6] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917.
- [7] PULFER M, MURPHY R C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids[J]. Mass Spectrom, 2003, 22: 332-364.
- [8] MURPHY R C, FIEDLER J, HEVKO J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry[J]. Chemical Reviews, 2001,101: 479-526.
- [9] SHUI G H, BENDT A K, PETHE K. Sensitive profiling of chemically diverse bioactive lipids[J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48: 1 976-1 984.
- [10] ULF S, HAVA H, FRANCINE K W, et al. LC-MS based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures [J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47: 804-814..

.....

(上接第 82 页)

3 结论

大鼠口服 AB-8-2 后, 尿样中的代谢产物以槲皮素双葡萄糖醛酸结合物存在的代谢产物为主要形式, 且存在多组共同流出组分。本研究通过其质谱裂解的特征性和合理性, 对尿样中的共流出物提出了合理的解析。

参考文献：

- [1] GENG P, ZHANG R, AISA H A, et al. Fast profiling of the integral metabolism of flavonols in the active fraction of *Gossypium herbaceum* L. using liquid chromatography/multi-stage tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun. Mass Spectrom, 2007, 21 (12):1 877-1 888.