

在线固相萃取-代谢组学技术的功能开发

瞿燕, 肖雪蓉, 杨建红, 梁惠玲, 李小年

(中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650201)

摘要: 运用 UPLC/Q-TOFMS 对生物样品进行代谢组学分析时, 样品中残留的大量蛋白质对仪器和分析结果会产生损伤与干扰。本团队结合在线固相萃取技术和 MPP 平台, 开发研制了新的在线固相萃取-代谢组学技术, 提高样品通量同时减少了生物基质的干扰, 有效延长了色谱柱的使用寿命、提高了仪器的使用率; 降低了化合物鉴定和生物信息学分析难度。以川楝素诱导的肝毒性模型对该技术进行验证, 取得了良好的试验结果。该技术已在研究所范围内应用。

关键词: 在线固相萃取; 液质联用; 代谢组学

Function development of online solid-phase extraction in metabolomics

Qu Yan, Xiao Xue-rong, Yang Jian-hong, Liang Hui-ling, Li Xiao-nian

(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, China)

Abstract: A large number of proteins remaining in the samples will damage the instrument and interfere with the analysis results when using UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics of biological samples. Combining online solid-phase extraction and MPP, our team has developed a new online solid-phase extraction in metabolomics. The new technology improves sample throughput while reducing the interference of biological matrix, effectively prolonging the service life of the chromatographic column and improving the utilization of the equipment. And it can also reduce the difficulty in identification and bioinformatics analysis of compounds. The technology was verified by toosendanin-induced hepatotoxicity experiment, in which we obtained the desired results. This technique has been applied in the authors' institute.

Keywords: online solid-phase extraction; liquid chromatography-mass spectrometry; metabolomics

1 在线固相萃取-代谢组学技术的开发研制意义

固相萃取技术是基于液固色谱理论的一种分离、纯化方法。它利用固体吸附剂将液体样品中的待测物吸附, 与样品体系分离, 然后再用洗脱液或者通过加热将待测物解吸附, 从而达到分离和富集待测物的目的。由于技术具有操作简便、快速、重现性好、高选择性以及低耗性等特点, 该技术在制药、生物医学、食品分析和环境分析等领域里具有广泛的应用。在线固相萃取技术的引用, 对于实验室生物样品中复杂代谢物的测定具有重要意义。

(1) 进一步减少生物样品中基质的干扰, 从而延长液相分离色谱柱的使用寿命。

(2) 固相萃取选用不同的柱填料可以对复杂样品基质中的待测物进行选择性富集，易于对生物样品等复杂体系中的痕量物质检测。

(3) 固相萃取可对分析物进行纯化、富集、浓缩，减小生物基质的干扰，有效缩短液相色谱分离时间，从而提高仪器的有效使用率。

(4) 固相萃取的操作简单，使用条件温和，适应范围广，溶剂消耗少；而且容易与液相色谱质谱等技术联用，实现在线操作，以避免液相萃取过程中会发生乳化现象，保证样品的重现性。

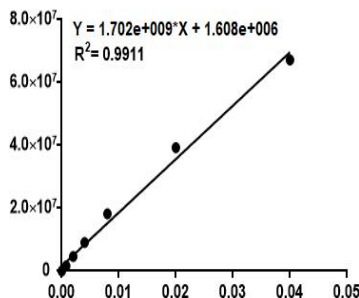
(5) 液相萃取得到的结果很大程度上取决于实验人员的操作过程，对同一个方法，不同实验者得到的结果差异可能会很大。而固相萃取的萃取效率是基于待测物柱填料之间的相互作用对待测物萃取，因此结果重现性好，有利于实现标准化。

(6) 将仪器分析与化学计量学分析进行无缝连接，降低了化合物鉴定及生物信息学分析的难度，提高生物样品的分析效率。

MassProfilerProfessional(MPP) software 是安捷伦公司开发的用于分析高信息量的质谱数据的一个强有力的化学计量学平台，其可在质谱数据的基础上，分析不同变量或不同组别之间的关系，为 GC/MS, LC/MS, CE/MS, ICP/MS 以及 NMR 的数据分析提供了一个可视化的先进分析技术。MPP 可以较好的整合安捷伦仪器配套的 MassHunter Workstation Spectrum Mill 和 ChemStation 软件，是唯一可以提供完整的化合物鉴定以及代谢通路分析技术的平台，可以在很多领域中实现对未知样品的定量分析进行自动聚类分析。

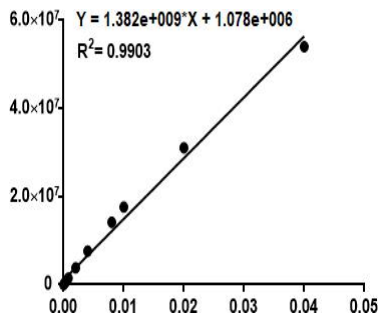
2 在线固相萃取-代谢组学技术的开发研制内容

(1) 项目组的工作重点主要是在原有 UPLC/Q-TOFMS 仪器的基础上，安装在线固相萃取相关装置。根据目标化合物（溶血磷脂）的性质选择相应的固相萃取柱（C18 反相色谱柱），优化样品洗脱方法，选用同类化合物中的一种标准品验证分析方法的线性、精密度、检测限、定量限和回收率（图 A1, A2, B1, B2），监测生物样品中溶血磷脂的日内日间精密度（表 1, 图 2），最终建立在线固相萃取-代谢组学分析方法，结果显示，建立的分析方法各项指标均满足分析方法要求。



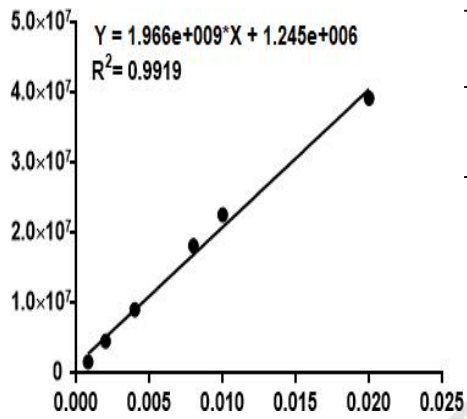
线性范围 (mg/ml)	检测限 (ng/ml)	定量限 (ng/ml)
0.00001-0.04	5	10

图1 A1.标准品LPC12:0的线性范围、检测限、定量限



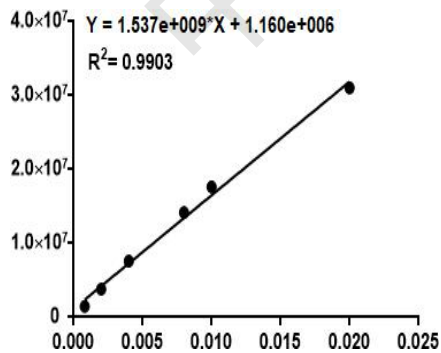
线性范围 (mg/ml)	检测限 (ng/ml)	定量限 (ng/ml)
0.00001-0.04	5	10

图1 A2.标准品LPC12:0基于SPE-UPLC-Q/TOF MS 的线性范围、检测限、定量限



浓度 (mg/ml)	0.002	0.008	0.02
回收率	89.81 ± 4.2 7	110.71 ± 2.26	98.17 ± 0.87

图1 B1.标准品LPC12:0回收率



浓度	0.002	0.008	0.02
回收率	90.75	100.4	109.2

图1 B2.标准品LPC12:0基于SPE-UPLC-Q/TOF MS 的回收率

表1 血浆样品日内和日间精密度

M	日内精密度 (RSD%)		日间精密度 (RSD%)	
	RT	Area	RT	Area
440.2772	0.30	0.29	0.25	2.39
468.3085	0.29	2.74	0.26	1.98
482.3241	0.39	2.39	0.32	5.77
482.3241	0.35	3.73	0.32	3.94
494.3241	0.23	2.93	0.25	3.18
496.3398	0.20	0.38	0.18	2.66
522.3554	0.11	2.74	0.17	4.15
524.3711	0.18	1.08	0.22	3.66
538.3867	0.55	5.91	0.42	4.88
544.3398	0.17	3.18	0.17	3.73
546.3554	0.15	0.73	0.24	2.94
550.3867	0.23	5.22	0.33	8.56
510.3554	0.21	1.01	0.27	3.36
518.3241	0.15	0.28	0.14	3.02
520.3398	0.19	1.39	0.23	3.06
454.2928	0.50	3.33	0.39	4.88
502.2928	0.31	3.38	0.25	3.61
526.2928	0.23	2.59	0.25	3.34

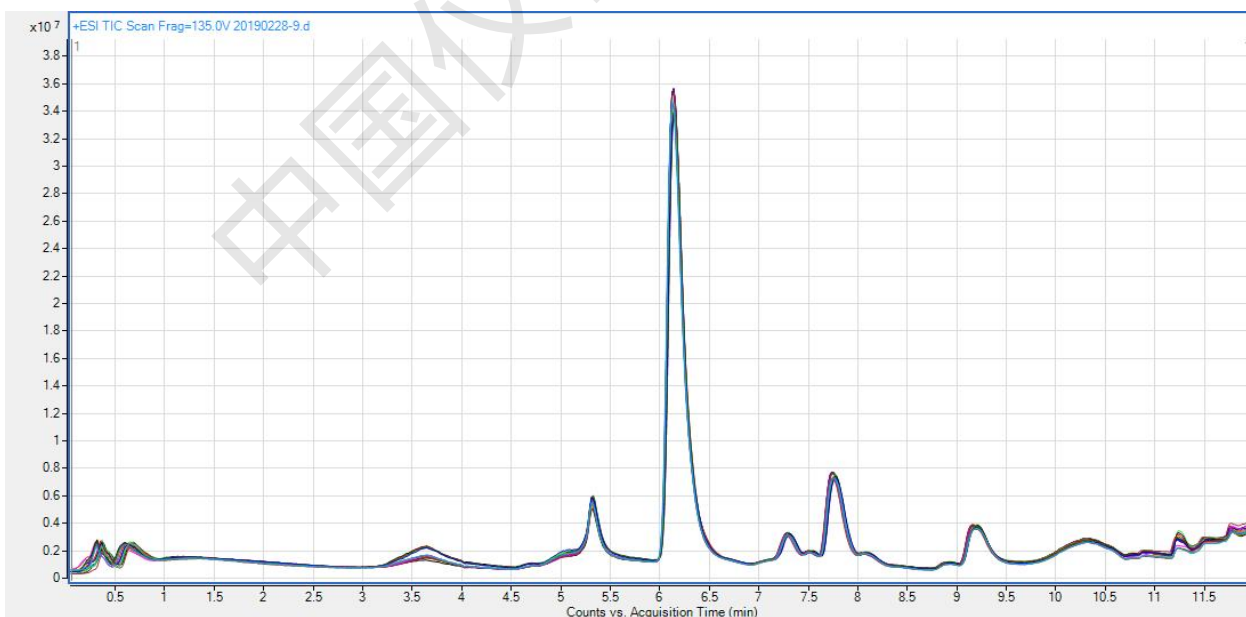


图2 血浆样品日间精密度色谱叠加图

(2) 监测生物样品检测过程中生物大分子基质干扰情况, 结果显示 在线 SPE 的安装可将大分子蛋白的干扰降低 20 倍以上, 这将为降低色谱柱污染、延长的其使用寿命奠定基础, 详见图 3A, 3B。

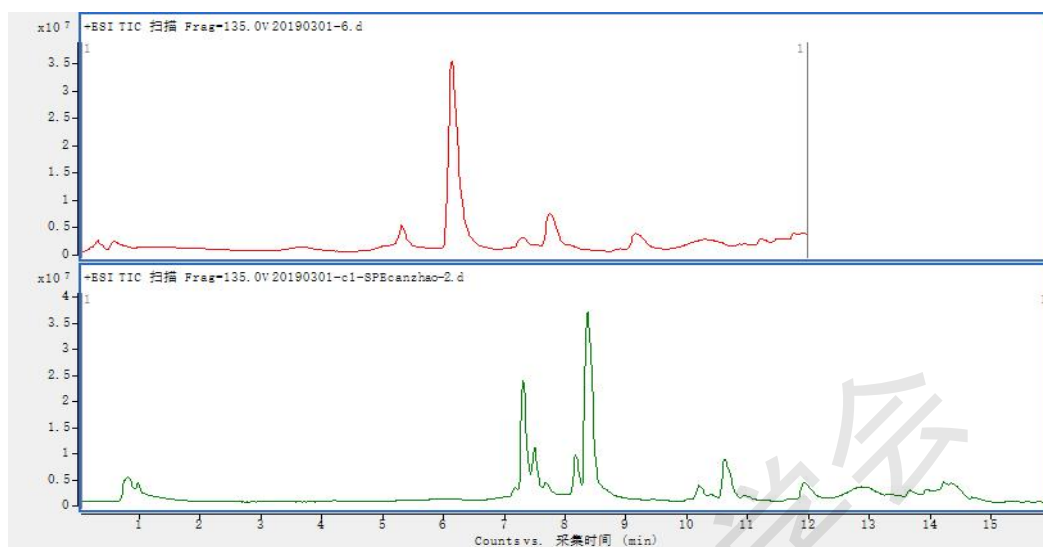


图3 A.血浆样品干扰基质信号响应色谱图

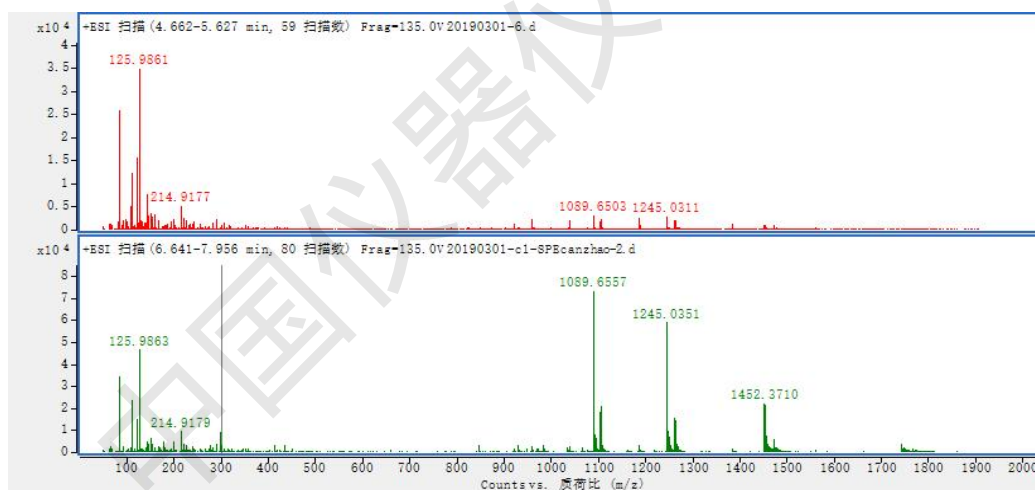


图3 B.血浆样品干扰基质信号响应质谱图

(3) 在线SPE 装置可根据测试者的要求, 一方面节省前处理时间及试剂用量, 另一方面可提高目标物的响应。其次, 对于特定的化合物可选择合适的色谱柱, 除去生物样品中的大分子生物基质干扰, 从而达到更好的检测效果, 详见图 4。

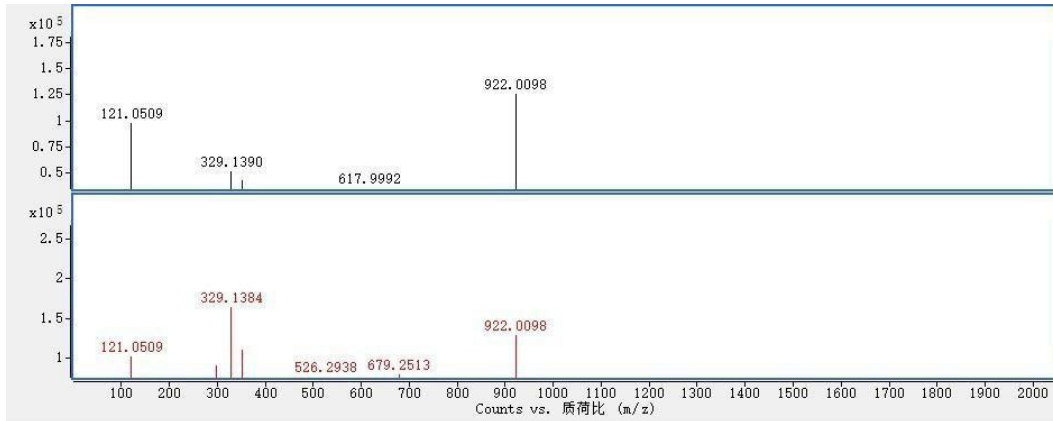


图4 生物样品富集前后质谱响应

(4) 以川楝素诱导的肝毒性模型为基础，收集小鼠空白血浆以及中药川楝素诱导的肝毒性小鼠血浆，进行在线固相萃取-液质联用分析，通过 MPP 软件进行数据分析，结果显示川楝素引起的肝毒性模型中，溶血磷脂发生显著性变化（图 5A, 5B, 5C）该结果与原有 UPLC/Q-TOF MS 分析结果（图 6A, 6B, 6C）进行比对，结果一致。

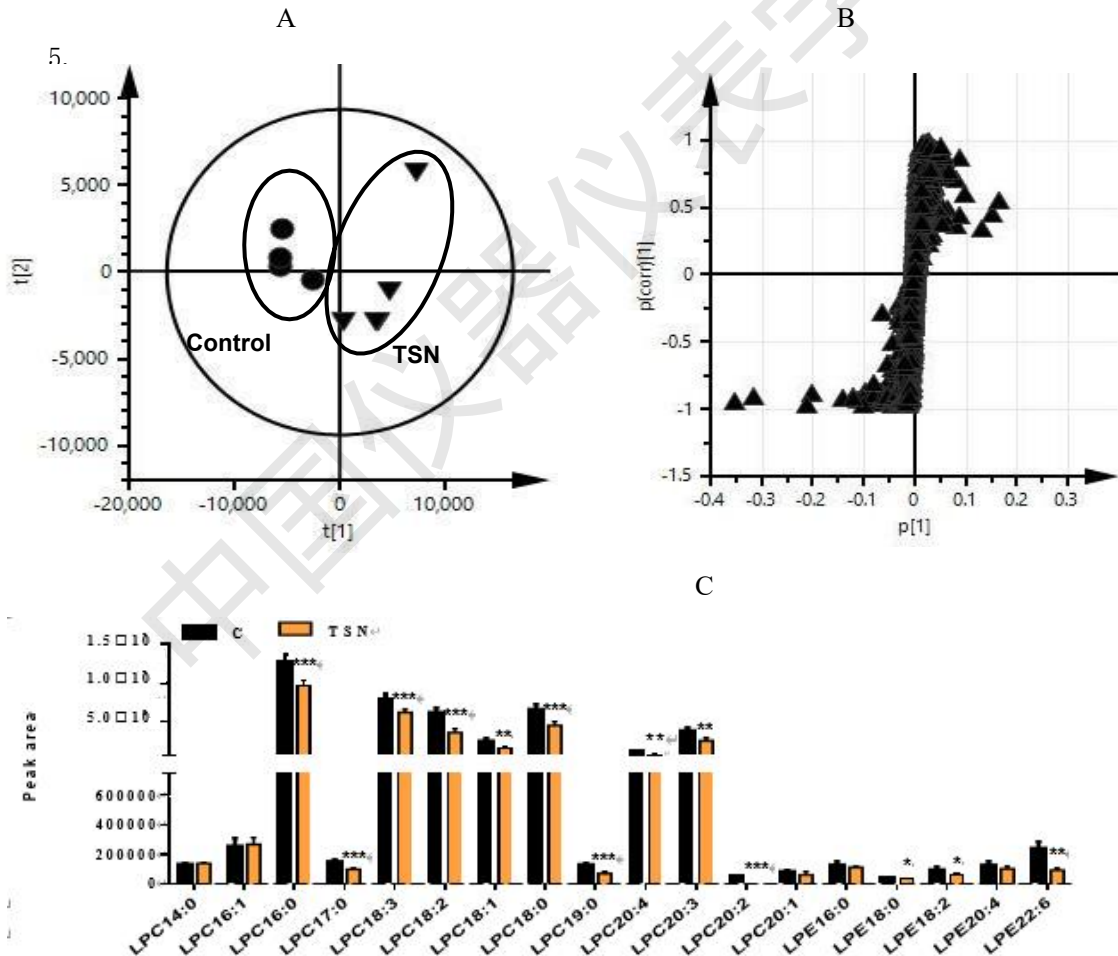


图5 川楝素诱导肝毒性小鼠血浆基于在线 SPE 结合 UPLC-Q/TOF MS 分析结果 A.PCA 得分图；B.OPLS-DA 分析 S-PLOT；图 C.溶血磷脂含量变化

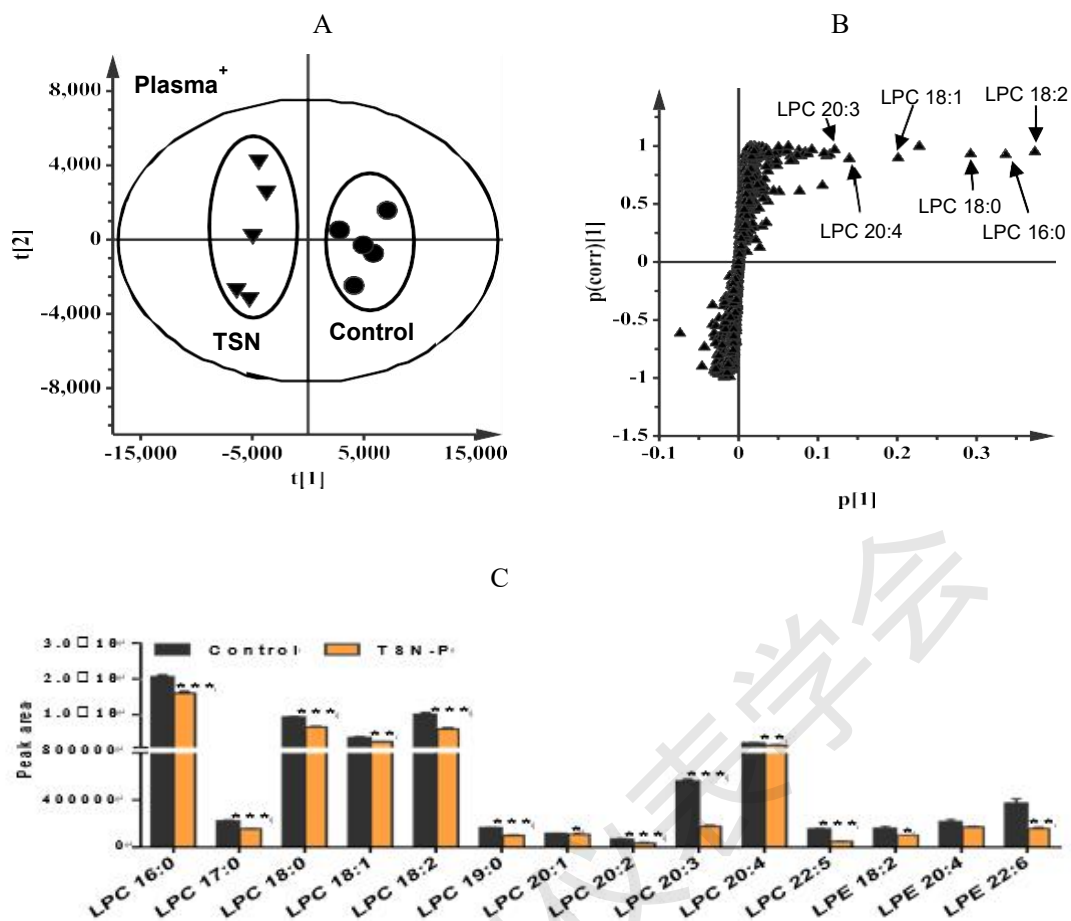


图6 川楝素诱导肝毒性小鼠血浆基于UPLC-Q/TOF MS分析结果
A.PCA 得分图; B.OPLS-DA 分析 S-PLOT 图; C.溶血磷脂含量变化

(5) 主要的技术创新：进一步减少生物样品中基质的干扰，从而延长液相分离色谱柱的使用寿命；在线固相萃取柱缩短了分析时间，大大增加了该仪器的分析通量，使其有效利用率得以提高；降低了化合物鉴定及生物信息学分析的难度，缩短分析周期。

3 在线固相萃取-代谢组学技术的开发研制步骤

(1) 在线分析过程中，样品的转移步骤至关重要，在这个过程中，首先在硬件方面，拟通过一个六通阀和一个八通阀，用有机溶剂含量高的洗脱剂将样品从富集柱上洗脱下来，然后经在线导入分析柱，实现峰聚焦，并加快分析速度。除此之外，在实验过程中，我们考查了样品固相萃取柱的分析的流动相流速以及比例，确保样品较完整的转移。最终达到的效果是，既缩短了分析时间，又将待测物完全的转移至分析柱。

(2) 为了更好地去除基质成分的干扰，拟采用在线固相萃取技术去除生物样品中的蛋白，纯化生物样品。生物样品大多含有大分子生物基质的干扰，容易造成色谱柱的堵塞。根据实验室生物样品的测试情况，我们发现产生干扰的生物基质的极性为中等极性。而我

们进行组学分析的目标物的极性跨度较大，从中等极性跨度到非极性，与干扰机制非常的接近，因此，既要除去生物基质，又要防止目标物损失。为此，我们在实验过程中重点考察了流动相的流速及阀切换的最佳时间，以达到除杂又不损失目标物的目的。

(3) 在 MPP 软件的使用过程中，各项参数的设置对实验结果的准确性具有一定的影响，在项目开发中，聘请安捷伦工程师对 MPP 软件进行培训，并对各个参数进行考察，以确定合适的数据分析方法。

4 结论

该技术借鉴在线固相萃取的成熟经验，充分利用已有仪器设备条件，开发了在线固相萃取-代谢组学技术功能，进一步减少生物样品中基质的干扰，从而延长液相分离色谱柱的使用寿命；缩短了分析时间，大大增加了该仪器的分析通量，使其有效利用率得以提高；并降低了化合物鉴定及生物信息学分析的难度，缩短分析周期。该技术的完成为研究所活性天然产物的成药性研究提供了相应的专业平台。