



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105021758 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510446589. 2

(22) 申请日 2015. 07. 27

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 蔡潭溪 杨福全 舒清博 郭晓静

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所  
11302

代理人 刘杰

(51) Int. Cl.  
G01N 30/88(2006. 01)

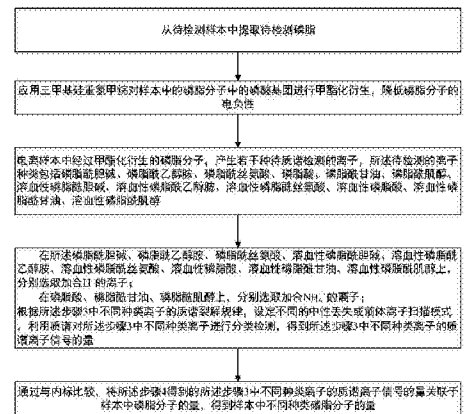
权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法

(57) 摘要

本发明公开一种基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,属于磷脂定量检测方法技术领域。其应用三甲基硅重氮甲烷对待测样本中磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生;电离样本中经过甲酯化衍生的磷脂分子,产生若干种待质谱检测的离子;在相应的待质谱检测的离子的选择上,根据不同磷脂种类选择加合H<sup>+</sup>或者NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的离子;根据不同种类离子的质谱裂解规律设定不同的中性丢失或者前体离子扫描模式,得到不同种类离子的质谱离子型号的量;最后,通过与内标比较及运算,得到样本中不同种类磷脂分子的量。该方法检测速度快,灵敏度高。



1. 一种基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤 1:从待检测样本中提取待检测磷脂;

步骤 2:应用三甲基硅重氮甲烷对样本中的磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生,降低磷脂分子的电负性;

步骤 3:电离样本中经过甲酯化衍生的磷脂分子,产生若干种待质谱检测的离子,所述待检测的离子种类包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇;

步骤 4:在所述磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇上,分别选取加合 H<sup>+</sup>的离子;

在磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇上,分别选取加合 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的离子;

根据所述步骤 3 中不同种类离子的质谱裂解规律,设定不同的中性丢失或前体离子扫描模式,利用质谱对所述步骤 3 中不同种类离子进行分类检测,得到所述步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量;

步骤 5:通过与内标比较,将所述步骤 4 得到的所述步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量关联于样本中磷脂分子的量,得到样本中不同种类磷脂分子的量。

2. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,利用质谱对所述步骤 3 中不同种类离子进行分类检测时,选用液相色谱-质谱联用的方式检测,或者,选用直接进样-质谱联用的方式检测。

3. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述步骤 1 是在甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液体系中进行的,所述甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液体系中,甲基叔丁基醚、甲醇、水的体积比为 10 : 3 : 2.5。

4. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述步骤 2 是在甲基叔丁基醚/甲醇/1N 盐酸溶液体系中进行的,所述甲基叔丁基醚/甲醇/1N 盐酸溶液体系中,甲基叔丁基醚、甲醇、1N 盐酸的体积比为 300 : 90 : 4。

5. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述步骤 3 是在氯仿/甲醇/醋酸铵溶液体系中进行的,所述氯仿/甲醇/醋酸铵溶液体系中,所述醋酸铵的浓度为 5 ~ 10mM,所述氯仿、甲醇的体积比为 (1 ~ 2) : 1。

6. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰肌醇利用中性丢失扫描进行检测和定量。

7. 根据权利要求 6 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,利用中性丢失扫描对所述磷脂酸进行检测和定量时,中性丢失为 143Da (126Da+NH<sub>3</sub>);利用中性丢失扫描对所述磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时,中性丢失为 155Da;利用中性丢失扫描对所述磷脂酰甘油进行检测和定量时,中性丢失为 203Da (186Da+NH<sub>3</sub>);利用中性丢失扫描对所述磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时,中性丢失为 213Da;利用中性丢失扫描对所述磷脂酰肌醇进行检测和定量时,中性丢失为 291Da (274Da+NH<sub>3</sub>);

利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酸进行检测和定量时,中性丢失为 126Da;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时,中性丢失为 155Da;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰甘油进行检测和定量时,中性丢失为 186Da;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时,中性丢失为 213Da;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰肌醇进行检测和定量时,中性丢失为 274Da。

8. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰胆碱利用前体离子扫描进行检测和定量。

9. 根据权利要求 8 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,对所述磷脂酰胆碱进行检测和定量时,所述前体离子的质/荷比为  $198.0 \pm 0.5$ ;对所述溶血性磷脂酰胆碱进行检测和定量时,所述前体离子的质/荷比为  $198.0 \pm 0.5$ 。

10. 根据权利要求 1 所述的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法,其特征在于,所述待测样本为生物样本;

作为优选,所述待测样本中添加有抗氧化剂;

作为优选,所述抗氧化剂为二丁基羟基甲苯;

作为优选,所述二丁基羟基甲苯的添加量为待测样本体积的  $0.01 \sim 0.03\%$ ;

作为优选,向所述待测样本中添加抗氧化剂时,环境温度为  $4 \sim 10^\circ\text{C}$ ;

作为优选,所述待测样本的保存方式为冷冻保存;

作为优选,所述内标的选用原则为每个磷脂种类选用一个内标;

作为优选,所述内标为可单独检测的同位素标记的磷脂分子,

或者,

所述内标为待测样本中不存在或者含量极低的磷脂;

作为优选,所述内标的用量根据不同的待测样本而变化;

作为优选,在所述步骤 1 和步骤 2 之间,还包括洗涤的步骤;

作为优选,利用质谱对所述步骤 2 中离子进行分类检测时,选用直接进样-质谱,所述进样装置为注射泵;

作为优选,利用质谱对所述步骤 2 中离子进行分类检测时,选用直接进样-质谱,所述进样装置为自动纳喷离子源直接进样系统;

作为优选,在所述步骤 5 中,运算方式为:

$$C_{\text{磷脂}}/C_{\text{内标}} = I_{\text{磷脂}}/I_{\text{内标}},$$

其中,  $C_{\text{磷脂}}$  和  $C_{\text{内标}}$  分别代表待测样本中磷脂分子及其对应的内标的浓度而  $I_{\text{磷脂}}$  和  $I_{\text{内标}}$  则分别代表样本中磷脂分子及其相对应的内标的质谱峰强度;

作为优选,所述步骤 2 在带有防护系统的通风橱中进行;

作为优选,所述步骤 2,当三甲基硅重氮甲烷应用过量时,选用乙酸对过量的三甲基硅重氮甲烷进行中和。

## 一种基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及磷脂定量检测方法技术领域,特别是涉及一种基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法。

### 背景技术

[0002] 磷脂不仅是细胞膜的重要组成成分,也广泛参与调节多种生命活动过程,包括能量转换、物质运输、信息识别与传递、细胞发育和分化,以及细胞凋亡等。磷脂的异常代谢与动脉硬化症、糖尿病、肥胖症、Alzheimer 病以及肿瘤发生也密切相关。因此,从“组学”的角度出发,系统性、规模性地研究磷脂分子在不同生理或病理状态下组成及相对量的动态变化分析,对揭示磷脂代谢与细胞、器官乃至机体的生理、病理过程之间的关系及其分子机理,进而发掘与疾病发生相关的重要生物标记物,促进疾病的早期诊断和治疗具有重要的意义。

[0003] 目前,随着质谱离子化技术,特别是电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸离子化(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)等适合于生物大分子的离子化技术的发展,基于生物质谱的磷脂鉴定和定量分析技术因其高灵敏度、高分辨率、高准确性和高通量性等特点,已经成为磷脂组学研究的主要工具。磷脂类脂质分子均可利用 ESI-MS 进行分析,但不同种类的磷脂分子因自身结构(主要是极性头部)及溶液组成的差异具有不同的离子化倾向。磷脂酰胆碱(PtdCho)类脂质分子在中性或碱性 pH 条件下呈电中性,电离后倾向于形成加合 H<sup>+</sup>的正离子。尽管在含有醋酸根的溶液和加大电压的情况下,PtdCho 也可以形成 [M-CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>形式的阴离子,但信号比较低。磷脂酰乙醇胺类脂质分子(PtdEtn)由于含有乙醇胺极性头部,在碱性 pH 条件下,季胺基容易去质子化而携带一个净负电荷。酸性磷脂类脂质,包括磷脂酸(PtdH),磷脂酰甘油(PtdGro)、磷脂酰丝氨酸(PtdSer),磷脂酰肌醇(PtdIns),在生理 pH 条件下携带一个或多个净负电荷,在质谱检测时主要以负离子的形式存在。因此,通常情况下,PtdCho 用正离子模式检测,而 PtdEtn、PtdH、PtdGro、PtdSer 和 PtdIns 则用负离子进行检测,从而导致在利用 ESI-MS 对生物样本中的磷脂组进行定性和定量分析时要结合正离子和负离子模式,从而导致分析时间的增长。同时,在负离子模式下,部分磷脂的检测灵敏度相对较低。

[0004] 另一方面,为进一步发掘与不同生理、病理过程相关的重要磷脂分子及其作用机理,需要对磷脂组在不同生理或病理状态下的相对量的变化进行分析。很多传统的研究利用放射性标记(如 <sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C- 或 <sup>32</sup>P- 标记的碳源或磷脂头部基团)或荧光标记(如 7-nitro benz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl, NBD)的前体,选择性(某一脂类特异性前体,如肌醇)或非选择性(如脂类共同的前体)代谢性标记组织或细胞中的磷脂,从而达到定量的目的,但這些方法比较繁琐,而且费时费力,基于 ESI/MS 的定量分析技术因其高分辨率、高准确性等特点,越来越多地应用于细胞脂质组的定量分析。在优化的条件下(比如 pmol/mL 或更低的浓度条件下),磷脂质谱信号强度与磷脂浓度呈线性关系且相同种类磷脂分子的离子化

效率基本一致,与脂肪酸链的物理性质无关。因此,在正离子和负离子模式中,通过加入特定磷脂种类的内标,可对生物样本中的磷脂进行定量。

[0005] Clark 等(参见 Clark, J., et al. Nat Methods. 2011, 8, 267-72.) 报道了利用三甲基硅重氮甲烷(TMS-diazomethane) 甲酯化磷脂酰肌醇磷酸(PIPs) 的磷酸基团可大大提高磷脂酰肌醇磷酸的检测灵敏度,提示利用 TMS-diazomethane 可使磷酸基团甲酯化,并具有应用于磷脂检测和定量的潜在可能性。尽管如此,将基于三甲基硅重氮甲烷(TMS-diazomethane) 的磷酸甲酯化应用于磷脂的检测仍有诸多问题尚待解答。首先,由于磷脂种类和结构的复杂性,基于三甲基硅重氮甲烷(TMS-diazomethane) 的磷酸甲酯化是否能够应用于磷脂(包括溶血性磷脂) 的检测尚不清楚,也未见相关的报道。其次,基于三甲基硅重氮甲烷(TMS-diazomethane) 的磷酸甲酯化的衍生化效率是否受到磷脂分子的物理或化学性质的影响,诸如磷脂分子的脂肪酸链长度、脂肪酸链的饱和度等,亦尚不清楚。第三,甲酯化衍生的磷脂分子如何利用质谱进行检测和定量也不明了。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种应用三甲基硅重氮甲烷对样本中磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生,并利用质谱,对待测样本中不同种类磷脂分子的量进行定量的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法。

[0007] 为了达到上述目的,本发明主要提供如下技术方案:

[0008] 本发明提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法包括以下步骤:

[0009] 步骤 1:从待检测样本中提取待检测磷脂;

[0010] 步骤 2:应用三甲基硅重氮甲烷对样本中的磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生,降低磷脂分子的电负性;

[0011] 步骤 3:电离样本中经过甲酯化衍生的磷脂分子,产生若干种待质谱检测的离子,所述待检测的离子种类包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇;

[0012] 步骤 4:在所述磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇上,分别选取加合 H<sup>+</sup> 的离子;

[0013] 在磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇上,分别选取加合 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的离子;

[0014] 根据所述步骤 3 中不同种类离子的质谱裂解规律,设定不同的中性丢失或前体离子扫描模式,利用质谱对所述步骤 3 中不同种类离子进行分类检测,得到所述步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量;

[0015] 步骤 5:通过与内标比较,将所述步骤 4 得到的所述步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量关联于样本中磷脂分子的量,得到样本中不同种类磷脂分子的量。

[0016] 本发明的目的及解决其技术问题还可采用以下技术措施进一步实现。

[0017] 作为优选,利用质谱对所述步骤 3 中不同种类离子进行分类检测时,选用液相色谱-质谱联用的方式检测,或者,选用直接进样-质谱联用的方式检测。

[0018] 作为优选,所述步骤 1 是在甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液体系中进行的,所述甲基

叔丁基醚 / 甲醇 / 水溶液体系中, 甲基叔丁基醚、甲醇、水的体积比为 10 : 3 : 2.5。

[0019] 作为优选, 所述步骤 2 是在甲基叔丁基醚 / 甲醇 / 1N 盐酸溶液体系中进行的, 所述甲基叔丁基醚 / 甲醇 / 1N 盐酸溶液体系中, 甲基叔丁基醚、甲醇、1N 盐酸的体积比为 300 : 90 : 4。

[0020] 作为优选, 所述步骤 3 是在氯仿 / 甲醇 / 醋酸铵溶液体系中进行的, 所述氯仿 / 甲醇 / 醋酸铵溶液体系中, 所述醋酸铵的浓度为 5 ~ 10mM, 所述氯仿、甲醇的体积比为 (1 ~ 2) : 1。

[0021] 作为优选, 所述磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰肌醇利用中性丢失扫描进行检测和定量。

[0022] 作为优选, 利用中性丢失扫描对所述磷脂酸进行检测和定量时, 中性丢失为 143Da (126Da+NH<sub>3</sub>) ; 利用中性丢失扫描对所述磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时, 中性丢失为 155Da ; 利用中性丢失扫描对所述磷脂酰甘油进行检测和定量时, 中性丢失为 203Da (186Da+NH<sub>3</sub>) ; 利用中性丢失扫描对所述磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时, 中性丢失为 213Da ; 利用中性丢失扫描对所述磷脂酰肌醇进行检测和定量时, 中性丢失为 291Da (274Da+NH<sub>3</sub>) ;

[0023] 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酸进行检测和定量时, 中性丢失为 126Da ; 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时, 中性丢失为 155Da ; 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰甘油进行检测和定量时, 中性丢失为 186Da ; 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时, 中性丢失为 213Da ; 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰肌醇进行检测和定量时, 中性丢失为 274Da。

[0024] 作为优选, 所述磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰胆碱利用前体离子扫描进行检测和定量。

[0025] 作为优选, 对所述磷脂酰胆碱进行检测和定量时, 所述前体离子的质 / 荷比为 198.0 ± 0.5 ; 对所述溶血性磷脂酰胆碱进行检测和定量时, 所述前体离子的质 / 荷比为 198.0 ± 0.5。

[0026] 作为优选, 所述待测样本为生物样本。

[0027] 作为优选, 所述待测样本中添加有抗氧化剂。

[0028] 作为优选, 所述抗氧化剂为二丁基羟基甲苯。

[0029] 作为优选, 所述二丁基羟基甲苯的添加量为待测样本体积的 0.01 ~ 0.03%。

[0030] 作为优选, 向所述待测样本中添加抗氧化剂时, 环境温度为 4 ~ 10℃。

[0031] 作为优选, 所述待测样本的保存方式为冷冻保存。

[0032] 作为优选, 所述内标的选用原则为每个磷脂种类选用一个内标。

[0033] 作为优选, 所述内标为可单独检测的同位素标记的磷脂分子,

[0034] 或者,

[0035] 所述内标为待测样本中不存在或者含量极低的磷脂。

[0036] 作为优选, 所述内标的用量根据不同的待测样本而变化。

[0037] 作为优选, 在所述步骤 1 和步骤 2 之间, 还包括洗涤的步骤。

[0038] 作为优选, 利用质谱对所述步骤 2 中离子进行分类检测时, 选用直接进样 - 质谱,

所述进样装置为注射泵。

[0039] 作为优选,利用质谱对所述步骤 2 中离子进行分类检测时,选用直接进样-质谱,所述进样装置为自动纳喷离子源直接进样系统。

[0040] 作为优选,在所述步骤 5 中,运算方式为:

[0041]  $C_{\text{磷脂}}/C_{\text{内标}} = I_{\text{磷脂}}/I_{\text{内标}}$ ,

[0042] 其中,  $C_{\text{磷脂}}$  和  $C_{\text{内标}}$  分别代表待测样本中磷脂分子及其对应的内标的浓度而  $I_{\text{磷脂}}$  和  $I_{\text{内标}}$  则分别代表样本中磷脂分子及其相对应的内标的质谱峰强度。

[0043] 作为优选,所述步骤 2 在带有防护系统的通风橱中进行。

[0044] 作为优选,所述步骤 2,当三甲基硅重氮甲烷应用过量时,选用乙酸对过量的三甲基硅重氮甲烷进行中和。

[0045] 本发明提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法应用三甲基硅重氮甲烷对待测样本中磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生;电离样本中经过甲酯化衍生的磷脂分子,产生若干种待质谱检测的离子;在相应的待质谱检测的离子选择上,根据不同磷脂种类,选择加合  $H^+$  的离子或者  $NH_4^+$  的离子;根据不同种类离子的质谱裂解规律设定不同的中性丢失或者前体离子扫描模式,得到不同种类离子的质谱离子型号的量;最后,通过与内标比较及运算,得到样本中不同种类磷脂分子的量。该方法检测速度快,灵敏度高。

## 附图说明

[0046] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。而且在整个附图中,用相同的参考符号表示相同的部件。在附图中:

[0047] 图 1 为本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法的步骤流程图;

[0048] 图 2 为本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法中,以 PtdH, PtdCho, PtdGro 和 PtdSer 为代表阐释甲酯化磷脂分子的质谱裂解规律及中性丢失和前体离子扫描规则的确立。甲酯化的 C17:0/C14:1-PtdH(A), C17:0/C14:1-PtdCho(B), C17:0/C14:1-PtdGro(C) 和 C17:0/C14:1-PtdSer(D) 均可产生质荷比为 535 的碎片离子,对应于带电的 C17:0/C14:1-DAG(C17:0/C14:1-DAG<sup>+</sup>)。DAG<sup>+</sup>离子也可视为是加合  $H^+$  或是  $NH_4^+$  离子的甲酯化磷脂分子的中性丢失峰,即 PtdH, PtdCho, PtdGro 和 PtdSer 分别中性丢失 143Da (126Da+ $NH_3$ ), 193Da, 203Da (186+ $NH_3$ ), 213Da 产生的碎片离子峰。据此,利用中性丢失扫描模式对上述磷脂进行检测。由于 PtdCho 产生的 DAG<sup>+</sup>碎片离子信号比较弱,而对应于甲酯化头部基团的碎片离子峰(质荷比为 198)信号比较强,因此,对于 PtdCho 类磷脂则利用前体离子扫描模式进行检测;

[0049] 图 3 本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法中,以 lysoPtdH, lysoPtdGro, lysoPtdSer 和 lysoPtdIns 为代表阐释甲酯化的溶血性磷脂分子的质谱裂解规律及中性丢失和前体离子扫描规则的确立。甲酯化的 C17:1-lysoPtdH(A), C17:1-lysoPtdGro(B), C17:1-lysoPtdH(C) 和 C17:1-lysoPtdIns(D) 均可产生质荷比为 325 的碎片离子,对应于带电的 C17:1-MAG(C17:1-MAG<sup>+</sup>)。MAG<sup>+</sup>离子也可视为是加合  $H^+$  或是  $NH_4^+$  离子的甲酯化磷脂分子的中性丢失峰,即 lysoPtdH, lysoPtdGro, lysoPtdSer 和

lysoPtdIns 分别中性丢失 126Da, 186Da, 213Da 和 274Da 产生的碎片离子峰。据此, 利用中性丢失扫描模式对上述磷脂进行检测;

[0050] 图 4 本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法中, 磷脂分子甲酯化衍生和基于中性丢失或前体离子扫描的示意图;

[0051] 图 5 本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法中, 磷脂分子的甲酯化衍生效率评估。以 Ptd 的 Cho 为例, 衍生化前 (A) 和衍生化后 (B) 的 PtdCho 的质谱图显示基于三甲基硅重氮甲烷的磷脂分子甲酯化衍生效率不受磷脂分子脂肪酸链的长度和饱和度的影响。

[0052] 图 6 本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法中, 在正离子模式下, 利用质 / 荷比为 198.0 的前体离子对磷脂酰胆碱 (A) 进行快速检测和定量; 利用中性丢失为, 155Da, 203Da, 213Da, 143Da 和 291Da 分别对的磷脂酰乙醇胺 (B), 磷脂酰甘油 (C), 磷脂酰丝氨酸 (D), 磷脂酸 (E), 和磷脂酰肌醇 (F) 进行快速检测和定量。

### 具体实施方式

[0053] 本发明为解决现有技术存在的问题, 提供了一种应用三甲基硅重氮甲烷对样本中磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生, 并利用质谱, 对待测样本中不同种类磷脂分子的数量进行定量的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法。

[0054] 本发明实施例提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法描述了基于化学衍生和直接进样质谱分析的磷脂快速检测和定量方法。该方法利用三甲基硅重氮甲烷将磷脂分子中的磷酸基团甲酯化, 降低磷脂分子的电负性, 提高检测灵敏度的同时, 实现所有磷脂种类在正离子模式下的质谱检测, 大大节省了时间。通过直接进样和电喷雾离子化方式, 将甲酯化衍生的磷脂分子电离, 产生一种或更多种可由质谱法检测的离子, 并确定用于质谱检测的离子。根据离子化的磷脂分子的质谱裂解规律, 设定不同的中性丢失或前体离子扫描模式, 在正离子模式下, 利用质谱对磷脂及其相应的溶血性磷脂 (lyso-) (共 12 个种类) 进行快速检测。通过与内标的比较, 将磷脂分子的质谱离子信号的量关联于样本中磷脂分子的数量。所提供的方法具有增强的灵敏度, 并在较短的时间内完成。

[0055] 为更进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段及功效, 以下结合附图及较佳实施例, 对依据本发明提出的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法, 其具体实施方式、结构、特征及其功效, 详细说明如后。在下述说明中, 不同的“一实施例”或“实施例”指的不一定是同一实施例。此外, 一或多个实施例中的特定特征、结构、或特点可由任何合适形式组合。

[0056] 本文中术语“和 / 或”, 仅仅是一种描述关联对象的关联关系, 表示可以存在三种关系, 例如, A 和 / 或 B, 具体的理解为: 可以同时包含有 A 与 B, 可以单独存在 A, 也可以单独存在 B, 能够具备上述三种任一种情况。

[0057] 本发明提供的基于化学衍生的磷脂分类检测和定量方法包括以下步骤:

[0058] 步骤 1: 从待检测样本中提取待检测磷脂;

[0059] 步骤 2: 应用三甲基硅重氮甲烷对样本中的磷脂分子中的磷酸基团进行甲酯化衍生, 降低磷脂分子的电负性;

[0060] 步骤 3: 电离样本中经过甲酯化衍生的磷脂分子, 产生若干种待质谱检测的离子,



待检测的离子种类包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇；

[0061] 步骤 4:在磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰肌醇上,分别选取加合 H<sup>+</sup>的离子；

[0062] 在磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇上,分别选取加合 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的离子；

[0063] 根据步骤 3 中不同种类离子的质谱裂解规律,设定不同的中性丢失或前体离子扫描模式,利用质谱对步骤 3 中不同种类离子进行分类检测,得到步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量；

[0064] 步骤 5:通过与内标比较,将步骤 4 得到的步骤 3 中不同种类离子的质谱离子信号的量关联于样本中磷脂分子的量,得到待测样本中不同种类磷脂分子的量。

[0065] 其中,利用质谱对步骤 3 中不同种类离子进行分类检测时,选用液相色谱-质谱联用的方式检测,或者,选用直接进样-质谱。

[0066] 其中,步骤 1 是在甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液体系中进行的,甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液体系中,甲基叔丁基醚、甲醇、水的体积比为 10 : 3 : 2.5。

[0067] 其中,步骤 2 是在甲基叔丁基醚/甲醇/1N 盐酸溶液体系中进行的,甲基叔丁基醚/甲醇/1N 盐酸溶液体系中,甲基叔丁基醚、甲醇、1N 盐酸的体积比为 300 : 90 : 4。

[0068] 其中,步骤 3 是在氯仿/甲醇/醋酸铵溶液体系中进行的,氯仿/甲醇/醋酸铵溶液体系中,醋酸铵的浓度为 5 ~ 10mM,氯仿、甲醇的体积比为 (1 ~ 2) : 1。

[0069] 其中,磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰甘油、溶血性磷脂酰丝氨酸、溶血性磷脂酰肌醇利用中性丢失扫描进行检测和定量。

[0070] 其中,利用中性丢失扫描对磷脂酸进行检测和定量时,中性丢失为 143Da (126Da+NH<sub>3</sub>) ;利用中性丢失扫描对磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时,中性丢失为 155Da ;利用中性丢失扫描对磷脂酰甘油进行检测和定量时,中性丢失为 203Da (186Da+NH<sub>3</sub>) ;利用中性丢失扫描对磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时,中性丢失为 213Da ;利用中性丢失扫描对磷脂酰肌醇进行检测和定量时,中性丢失为 291Da (274Da+NH<sub>3</sub>) ;

[0071] 利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酸进行检测和定量时,中性丢失为 126Da ;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰乙醇胺进行检测和定量时,中性丢失为 155Da ;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰甘油进行检测和定量时,中性丢失为 186Da ;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰丝氨酸进行检测和定量时,中性丢失为 213Da ;利用中性丢失扫描对溶血性磷脂酰肌醇进行检测和定量时,中性丢失为 274Da。

[0072] 其中,磷脂酰胆碱、溶血性磷脂酰胆碱利用前体离子扫描进行检测和定量。

[0073] 其中,对磷脂酰胆碱进行检测和定量时,前体离子的质/荷比为 198.0 ± 0.5 ;对溶血性磷脂酰胆碱进行检测和定量时,前体离子的质/荷比为 198.0 ± 0.5。

[0074] 其中,待测样本为生物样本。

[0075] 其中,待测样本中添加有抗氧化剂。

- [0076] 其中,抗氧化剂为二丁基羟基甲苯。
- [0077] 其中,二丁基羟基甲苯的添加量为待测样本体积的 0.01 ~ 0.03%。
- [0078] 其中,向待测样本中添加抗氧化剂时,环境温度为 4 ~ 10℃。
- [0079] 其中,待测样本的保存方式为冷冻保存。
- [0080] 其中,内标的选用原则为每个磷脂种类选用一个内标。
- [0081] 其中,内标为可单独检测的同位素标记的磷脂分子,
- [0082] 或者,
- [0083] 内标为待测样本中不存在或者含量极低的磷脂。
- [0084] 其中,内标的用量根据不同的待测样本而变化。
- [0085] 其中,在步骤 1 和步骤 2 之间,还包括洗涤的步骤。
- [0086] 其中,利用质谱对步骤 2 中离子进行分类检测时,选用直接进样 - 质谱,进样装置为注射泵。
- [0087] 其中,利用质谱对步骤 2 中离子进行分类检测时,选用直接进样 - 质谱,进样装置为自动纳喷离子源直接进样系统。
- [0088] 其中,在步骤 5 中,运算方式为:
- [0089]  $C_{\text{磷脂}} / C_{\text{内标}} = I_{\text{磷脂}} / I_{\text{内标}}$ ,
- [0090] 其中,  $C_{\text{磷脂}}$  和  $C_{\text{内标}}$  分别代表待测样本中磷脂分子及其对应的内标的浓度而  $I_{\text{磷脂}}$  和  $I_{\text{内标}}$  则分别代表样本中磷脂分子及其相对应的内标的质谱峰强度。
- [0091] 其中,步骤 2 在带有防护系统的通风橱中进行。
- [0092] 其中,步骤 2,当三甲基硅重氮甲烷应用过量时,选用乙酸对过量的三甲基硅重氮甲烷进行中和。
- [0093] 如本发明实施例所述,术语“纯化”或“提纯”并非指从样本中去除目标分析物(一种或更多种)之外的所有物质。取而代之,纯化是指相对于样本中可干扰目标分析物检测的其它组分富集一种或更多种目标分析物的量的过程。本文中可通过多种方法纯化样本,以便允许去除一种或更多种干扰物质。例如,会干扰所选磷脂母离子和子离子的质谱检测的一种或更多种物质。
- [0094] 如本文所用,术语“液相色谱法”是指由液体运载的化学混合物分离为组分的过程,这是由于化学实体在固定液相或固相周围流动或流过固定液相或固相时的差别分布而引起的。
- [0095] 如本文所用,术语“直接进样”在本文中是指不需要经过色谱分离,而直接利用注射泵或其他方式,诸如自动纳喷离子源直接进样系统(Triversa Nanomate®, Advion Biosciences),将磷脂样本引入质谱进行分析的一种质谱进样方式。
- [0096] 如本文所用,术语“质谱法”或“MS”指通过其质量识别化合物的分析技术。MS 指基于其质荷比或“m/z”过滤、检测和测量离子的方法。MS 技术一般包括:(1) 电离化合物,形成带电化合物;和(2) 测量带电化合物的分子量,并计算质荷比。可通过任何适当的方法电离和检测化合物。
- [0097] 如本文所用,术语“正离子模式下”指那些生成和检测正离子的质谱法。
- [0098] 如本文所用,术语“离子化”或“电离”指这样的过程:生成具有等于一个或多个电子单位的净电荷的分析物离子。负离子是具有一个或多个电子单位的净负电荷的离

子,而正离子是具有一个或更多个电子单位的净正电荷的离子。

[0099] 如本文所用,术语“基质辅助激光解吸离子化”或“MALDI”指这样的方法:其中将非挥发性样本暴露于激光辐射,其通过多种离子化途径使样本中的分析物解吸和电离,该离子化途径包括光致电离、加质子作用、去质子作用和集群衰变(cluster decay)。对于MALDI,将样本与能量吸收基质混合,这促进分析物分子的解吸。

[0100] 如本文所用,术语“电喷雾离子化”或“ESI”指这样的方法:样品溶液以低流速(0.1~10  $\mu$ L/min)通过末端加有高的正电压或负电压的毛细管,形成液滴,当液滴表面电荷的库仑斥力达到与溶液表面张力相当的临界点时,将产生含有大量电荷的液滴。随着溶剂蒸发,液滴收缩,液滴内电荷间排斥力增大,当到达并超越一定程度时,液滴会发生库仑爆炸,除去液滴表面的过量电荷,生成更小的带电小液滴,如此循环,最后生成可供质谱检测的离子。

[0101] 适当的检测样本包括可包含目标分析物的任何检测样本。在一些优选实施方式中,样本是生物样本,即生物来源的样本,如动物组织、细胞培养物、血浆等。为了避免磷脂的氧化或降解,应当在样本处理过程中加入抗氧化剂,诸如二丁基羟基甲苯(BTH,终浓度为0.01%),并将样本在4 $^{\circ}$ C立即加工,或完全冷冻储存并在使用前解冻。

[0102] 一般地,根据每个磷脂种类选用一个内标的原则,将可单独检测的同位素标记的磷脂分子或选取样本中不存在或含量极低的磷脂加入样本作为内标。本发明选取C17:0/C14:1-PtdCho, C17:0/C14:1-PtdEtn, C17:0/C14:1-PtdGro, C17:0/C14:1-PtdSer, C17:0/C14:1-PtdH, C17:0/C14:1-PtdIns, C17:1-lysoPtdCho, C17:1-lysoPtdEtn, C17:1-lysoPtdGro, C17:1-lysoPtdSer, C17:1-lysoPtdH和C17:1-lysoPtdIns作为内标。在一些优选实施方式中,根据不同来源的生物样本及样本量,加入不同量的内标。在特别优选的实施方式中,诸如血浆(10  $\mu$ L)、细胞( $\sim 5 \times 10^5$ 个)及组织(10mg),每种内标的用量为0.4nmol。

[0103] 液-液萃取是脂质组学研究中磷脂质提取使用最为普遍的方法。本发明参考文献((Matyash et al. J Lipid Res. 2008, 49(5):1137-1146.)报道的方法并做了适当的改进,用于磷脂的提取。因为MTBE密度低,在水相和有机相分开时,有机相在上层,这样简化了收集有机相的操作,减少了吸取的损失,且不可萃取的基质小球处于离心管的底部,易于去除。

[0104] 在甲酯化衍生之前,增加了洗涤的步骤,一方面可以尽可能的去除一种或更多种干扰物质,另一方面,可以将盐酸浓度调整至优选的浓度。

[0105] 本发明选取含5mM醋酸铵的氯仿/甲醇(1:1, v/v)溶液体系作为甲酯化的磷脂分子直接进样的载体,在该溶液体系中甲酯化的磷脂分子可以被电离并产生可供质谱在正离子模式下检测的离子。直接进样的方式可选取注射泵,在一些优选的实施方式中,利用自动纳喷离子源直接进样系统(Triversa Nanomate<sup>®</sup>, Advion Biosciences),该系统无需清洗和手工操作,可连续自动通过电喷雾芯片进行质谱进样,一次可无人看管连续做400个样品,而且由于流速达到纳升级,只需很少样品,就可完成长时间稳定的电喷雾实验,每个样品用新的样品吸头和电喷雾孔,完全没有交叉污染。

[0106] 在上述含5mM醋酸铵的氯仿/甲醇(1:1, v/v)溶液体系中,甲酯化衍生的磷脂分子具有不同的带点倾向。PtdCho、PtdEtn、PtdSer主要形成加合H<sup>+</sup>的离子,虽然PtdH、

PtdGro、PtdIns 类磷脂也可以形成加合  $H^+$  的离子,但信号较低,主要是形成加合  $NH_4^+$  的离子。溶血性磷脂主要形成加合  $H^+$  的离子。进一步的串联质谱分析显示,无论是加合  $H^+$  或是  $NH_4^+$  离子的甲酯化磷脂分子均可产生一个二酰甘油碎片离子 ( $DAG^+$ ),如图附图 1 所示,甲酯化的 C17:0/C14:1-PtdH (质荷比为 678, 加合  $NH_4^+$  的离子), C17:0/C14:1-PtdCho (质荷比为 718, 加合  $H^+$  的离子), C17:0/C14:1-PtdGro (质荷比为 738, 加合  $NH_4^+$  的离子) 和 C17:0/C14:1-PtdSer (质荷比为 748, 加合  $H^+$  的离子) 均可产生质荷比为 535 的碎片离子,对应于带电的 C17:0/C14:1-DAG (C17:0/14:1-DAG<sup>+</sup>)。DAG<sup>+</sup> 离子也可视为是加合  $H^+$  或是  $NH_4^+$  的离子的甲酯化磷脂分子的中性丢失峰,即 PtdH, PtdEtn, PtdCho, PtdGro, PtdSer 和 PtdIns 分别中性丢失 143Da (126Da+ $NH_3$ ), 155Da, 193Da, 203Da (186Da+ $NH_3$ ), 213Da, 291Da (274Da+ $NH_3$ ) 产生的碎片离子峰。据此,利用中性丢失扫描模式对上述磷脂进行检测。由于 PtdCho 产生的 DAG<sup>+</sup> 碎片离子信号比较弱,而对应于甲酯化头部基团的碎片离子峰 (质/荷比为  $198 \pm 0.5$ ) 信号比较强,因此,对于 PtdCho 类磷脂则利用前体离子扫描模式进行检测。相似的,溶血性磷脂分子也会产生一个单酰甘油碎片离子 ( $MAG^+$ ),也可视为 lysoPtdH, lysoPtdEtn, lysoPtdCho, lysoPtdGro, lysoPtdSer 和 lysoPtdIns 分别中性丢失 126Da, 155Da, 193Da, 186Da, 213Da, 274Da 产生的碎片离子峰,因此,利用中性丢失扫描模式对上述磷脂进行检测,同时也同样选择利用前体离子扫描模式进行 lysoPtdCho 的检测。

#### [0107] 实施例

#### [0108] 样本和试剂制备

[0109] ①试剂:各种分析纯的化学试剂(除非有特殊说明)均购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA);实验所需要的水均采用 Milli-Q 超纯水制造系统(美国 Milipore 公司)生产的 Milli-Q 水;三甲基硅基重氮甲烷 (IUPAC name = (diazomethyl)-trimethylsilane, TMS-diazomethane) (2M 溶于正己烷) 购自于 Acros Organics 公司;色谱级纯度甲基叔丁基醚 (methyl tert-butyl ether, MTBE)、甲醇 (methanol)、氯仿 (Chloroform)、乙酸 (Acetic acid) 为 J. T. Baker 公司 (Phillipsburg, PA, USA) 产品。

[0110] ②内标:可选择可单独检测的同位素标记的磷脂分子或选取样本中不存在或含量极低的磷脂加入样本作为内标。本实施例选取 C17:0/C14:1-PtdCho, C17:0/C14:1-PtdEtn, C17:0/C14:1-PtdGro, C17:0/C14:1-PtdSer, C17:0/C14:1-PtdH, C17:0/C14:1-PtdIns, C17:1-lysoPtdCho, C17:1-lysoPtdEtn, C17:1-lysoPtdGro, C17:1-lysoPtdSer, C17:1-lysoPtdH 和 C17:1-lysoPtdIns 作为内标。

[0111] ③溶液配置:(a) 普通衍生化前洗液:甲基叔丁基醚/甲醇/0.01N 盐酸溶液,体积比例为 MTBE:MeOH:0.01N 盐酸 = 100:30:25, 取下相;(b) 衍生化后洗液:甲基叔丁基醚/甲醇/水溶液,体积比例为 MTBE:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:30:25, 取下相。

#### [0112] ④磷脂提取

[0113] 将不同来源生物样本,诸如血浆 (10  $\mu$ L)、细胞 ( $\sim 5 \times 10^5$  个) 及组织 (10mg) 等,放入耐有机溶剂腐蚀的 eppendorf 管,并掺入 (a) 中所述的磷脂内标,每一种内标的用量为 0.4nmol;将 1.3mL 甲基叔丁基醚/甲醇 (10:3, v/v) 溶液,室温震荡 1h;往上述溶液加入 0.25mL 去离子水,充分震荡后,室温放置 10min;1,000g 离心 10 分钟后可见明显的分层,收集上层溶液(有机相)至新的 eppendorf 管;下层溶液则与 1.55mL 甲基叔丁基醚/甲醇/水 (10:3:2.5, v/v/v) 溶液的上层溶液合并,依上述再萃取一次,收集上层溶液与前述

的上层溶液合并；将收集的该上清进行真空、冷冻浓缩干燥，即为提取的磷脂提取物，在进一步处理前，-80℃冰箱冷冻收藏。

[0114] ⑤磷脂的甲酯化衍生

[0115] 衍生化前洗涤：将磷脂提取物重溶于 682.5 μL 甲基叔丁基醚 / 甲醇 / 2N 盐酸 (500:150:32.5, v/v/v)，加入 250 μL 0.1N 盐酸，充分震荡后于 4℃ 离心 (6,500×g) 10 分钟，将上清转移至新的 eppendorft 管并加入 500 μL 甲基叔丁基醚 / 甲醇 / 0.01N 盐酸 (100:30:25, v/v/v) 溶液的下相，依以上步骤再洗涤一次，并收集上层溶液至新的 eppendorft 管，即为洗涤后的磷脂提取物 (~0.5mL)。

[0116] 将 50 μL 三甲基硅重氮甲烷溶液 (2M, 溶于正己烷) 加入上述洗涤后的磷脂提取物 (可见明显的黄色)，室温旋转孵育 20 分钟；加入 3 μL 乙酸中和甲酯化反应 (可见黄色褪尽)；中和后，加入 500 μL 甲基叔丁基醚 / 甲醇 / 水 (100:30:25, v/v/v) 的下相，充分震荡后，1,500×g 离心 3 分钟，收集上相并重复上述洗涤步骤一次；将收集的该上清进行真空、冷冻浓缩干燥，即为甲酯化衍生的磷脂提取物，在质谱分析前，-80℃冰箱冷冻收藏。

[0117] ⑥磷脂甲酯化衍生物的质谱分析

[0118] 利用配备有自动纳喷离子源直接进样系统 (Triversa Nanomate®, Advion Biosciences) 的 TSQ Vantages (ThermoFisher Scientific, Bremen)。纳喷柱的内径为 5.5 μm。软件控制系统为 ChipSoft™ Software (Advion Biosciences)，参数如下：

[0119] a) 正离子模式，离子化电压为 1.25kV；

[0120] b) 气体背压为 0.5psi；

[0121] c) 将预先润洗 Tip 头和吸取样品后继续吸 1 μL 空气的参数设定为开启，以防止 Tip 头中的样品在机械臂移动过程中流出；

[0122] 质谱系统的参数如下：

[0123] a) 离子传输管的温度为 190℃，S-Lens 的 RF Amplitude 为 217；

[0124] b) 中性丢失或前体离子扫描的碰撞能为 40eV, dwelling time 为 500ms, 质谱分辨率为 1Da；

[0125] c) 每个中性丢失或前体离子扫描采集 3min；

[0126] d) 质谱质量范围设定为 m/z 400-1200。

[0127] ⑦磷脂的定量

[0128] 生物样本中的磷脂定量主要通过加入的内标进行参比，计算甲酯化磷脂分子的量，进而关联与样本中相应磷脂的量。磷脂甲酯化衍生物的定量如下：

[0129]  $C_{\text{磷脂}} / C_{\text{内标}} = I_{\text{磷脂}} / I_{\text{内标}}$ ，

[0130]  $C_{\text{磷脂}}$  和  $C_{\text{内标}}$  分别代表样本中磷脂分子及其对应的内标的浓度，而  $I_{\text{磷脂}}$  和  $I_{\text{内标}}$  则分别代表样本中磷脂分子及其相对应的内标的质谱峰强度。

[0131] ⑧安全注意事项

[0132] 尽管 TMS-diazomethane 使用之初是作为一种低毒性的重氮甲烷的替代物。但是吸入过量的 TMS-diazomethane 也会引起肺和中枢神经系统的损伤。因此，建议在衍生化或标记过程均在带有防护的通风橱中进行。过量的 TMS-diazomethane 必须用乙酸中和。乙酸中和的过程是一个产生氮气的过程，在处理大量样本的时候必须小心操作并注意防护。

[0133] 尽管已描述了本发明的优选实施例，但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造

性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0134] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

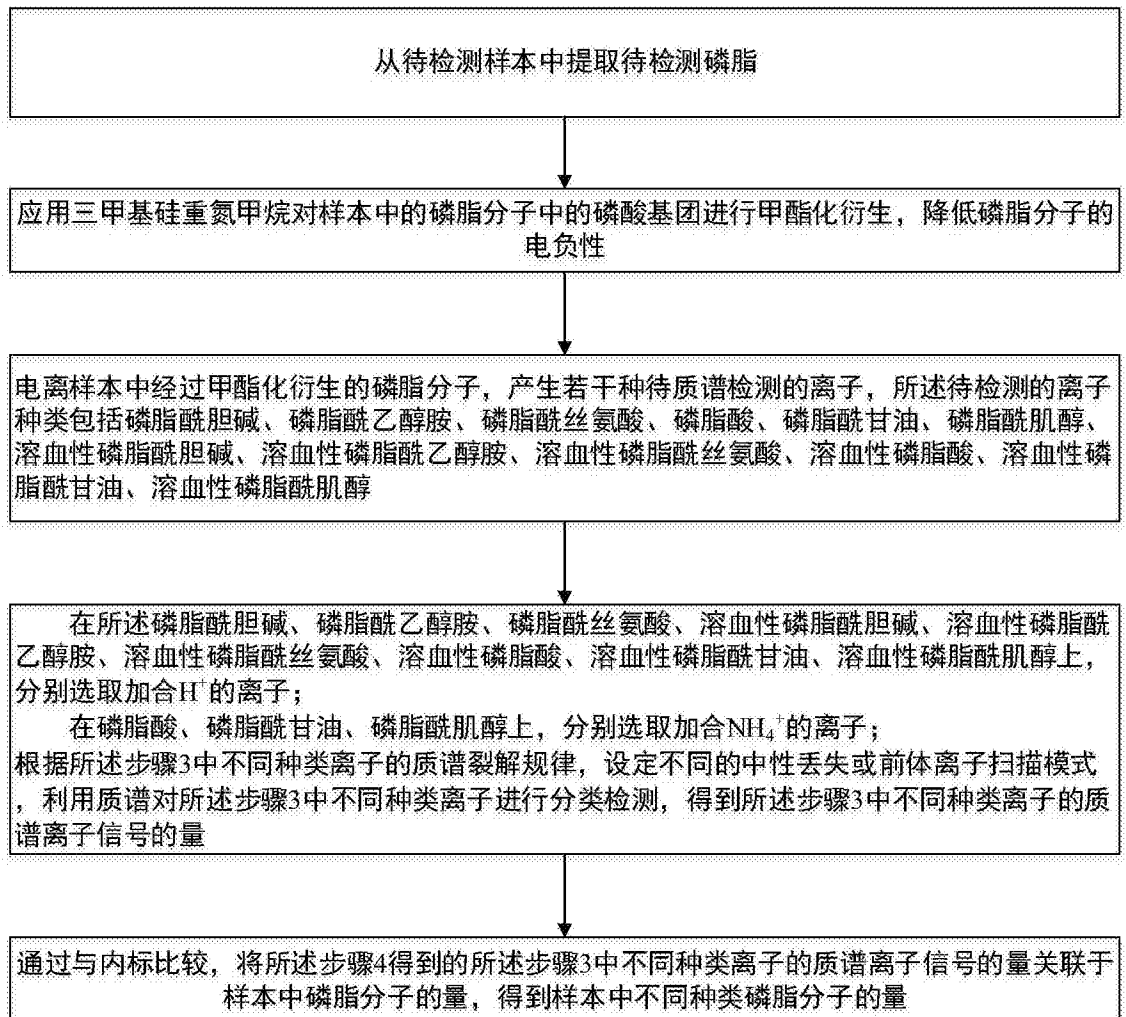


图 1

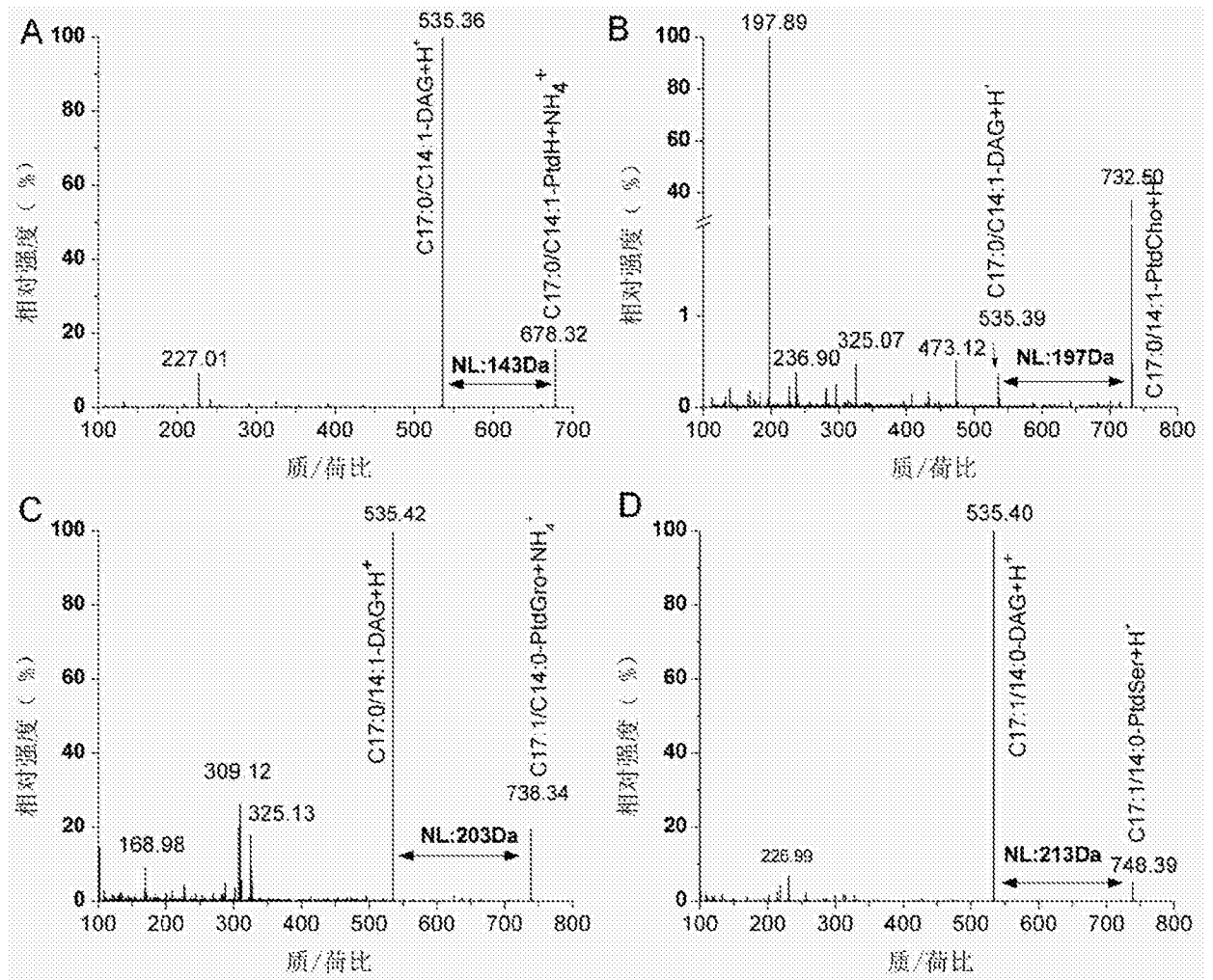


图 2



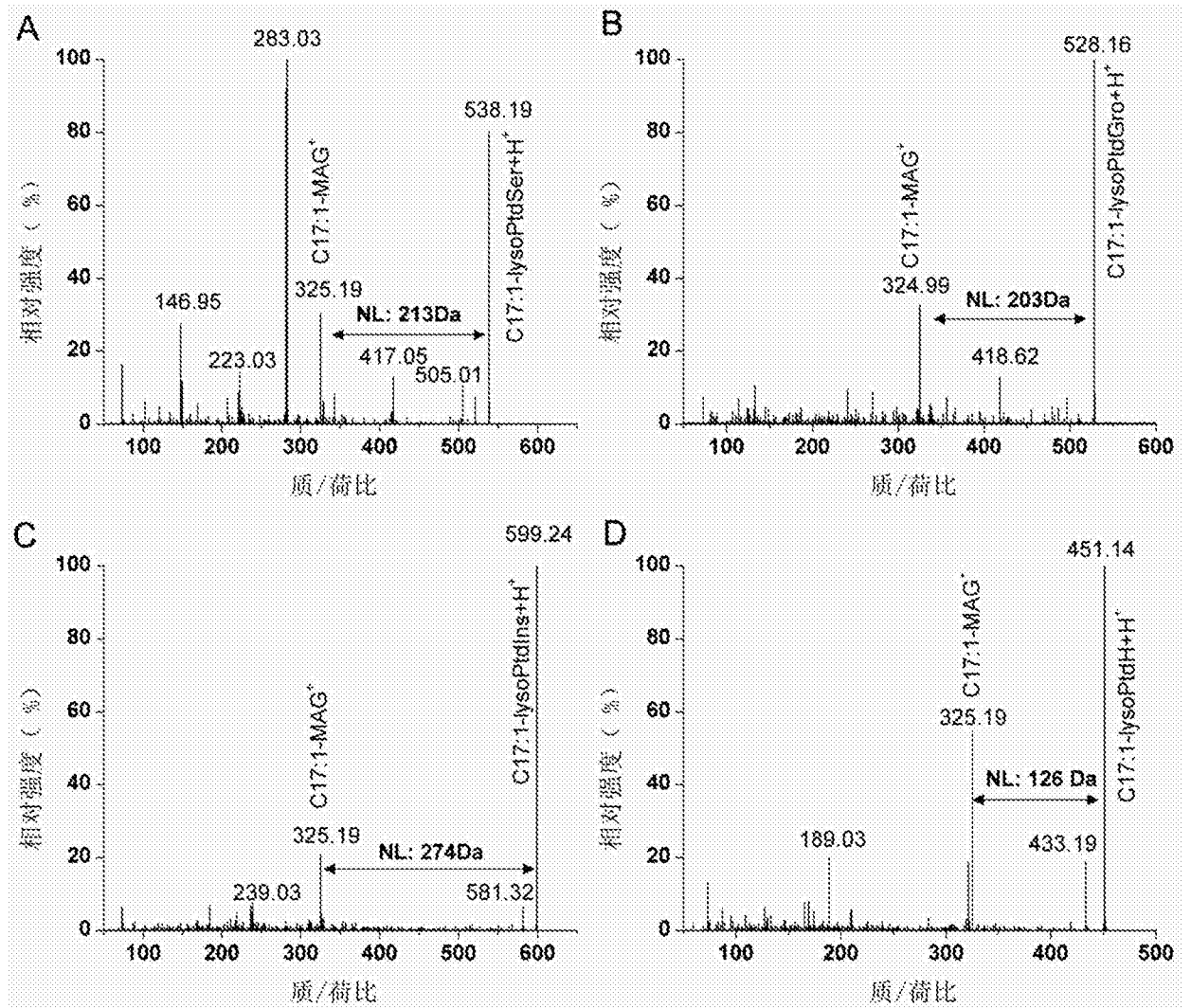


图 3

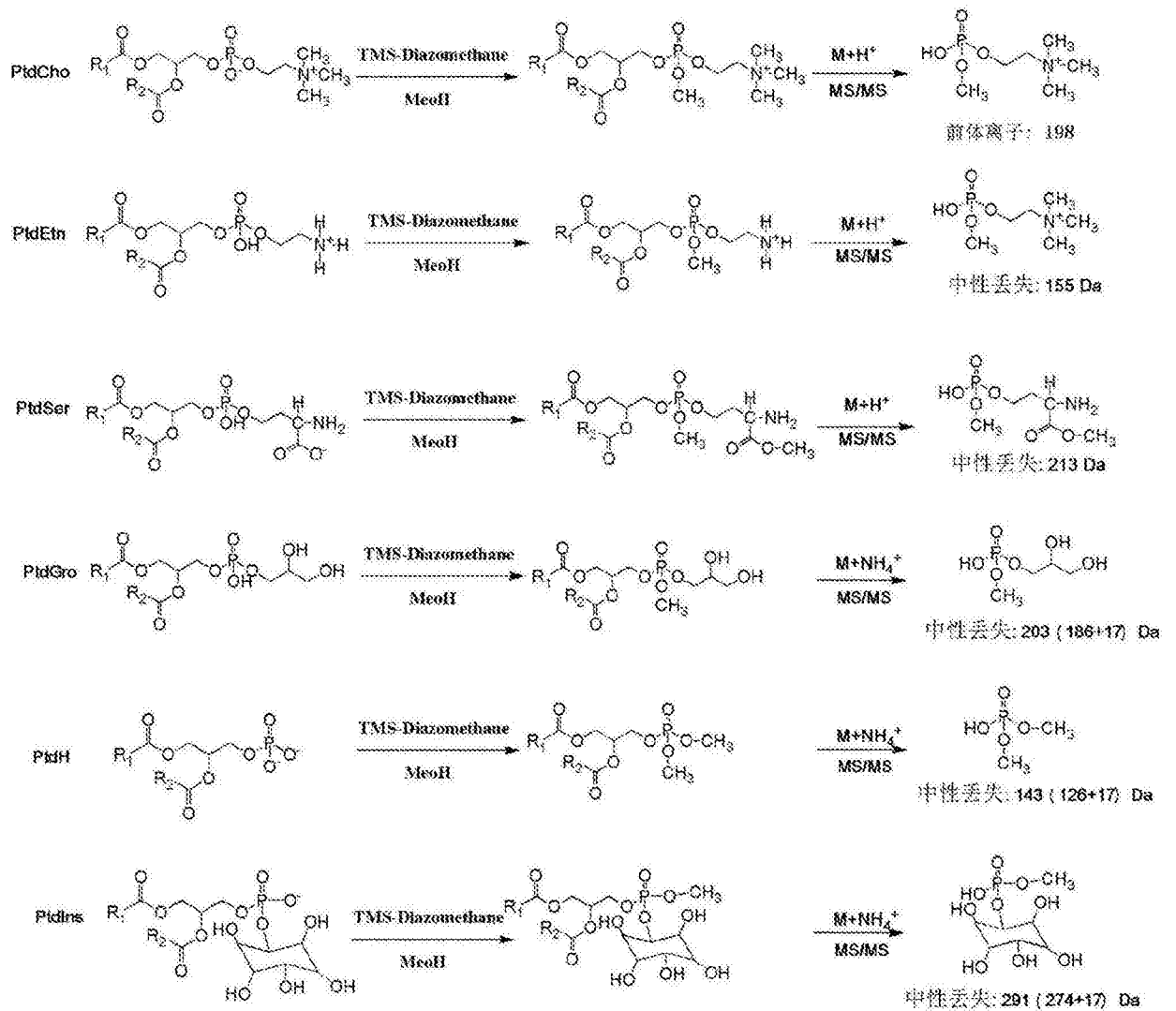


图 4

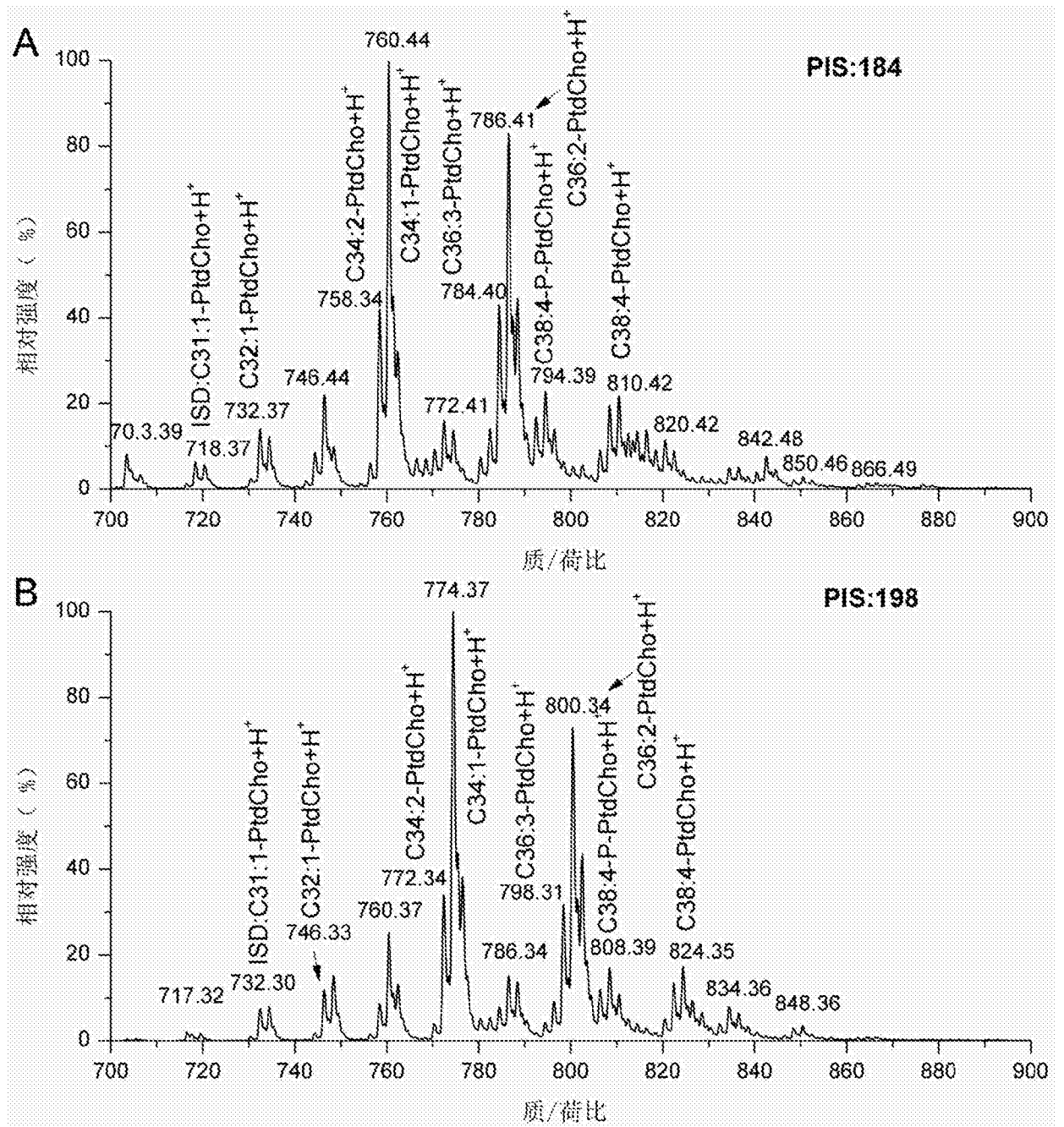


图 5

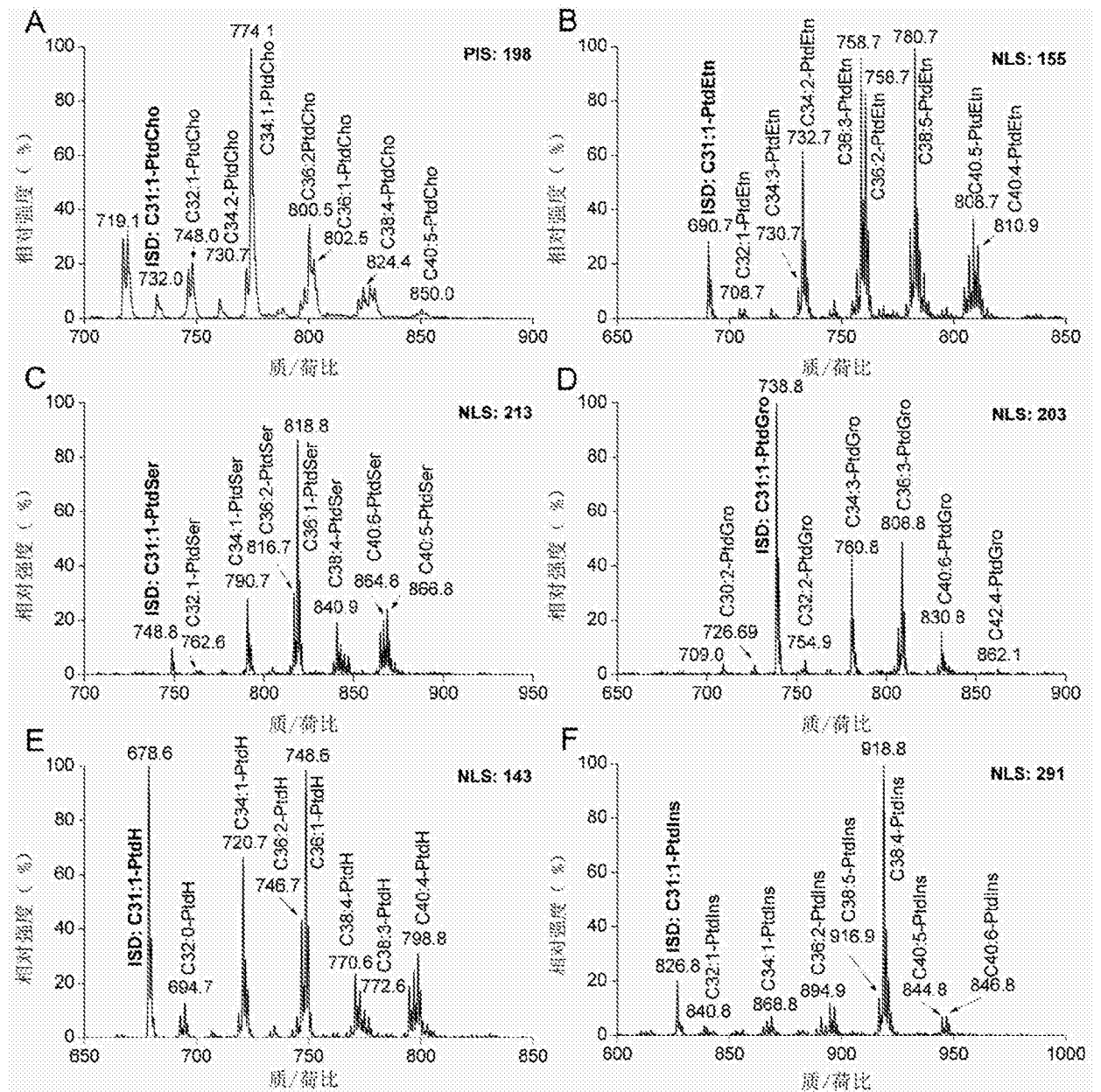


图 6