# 基于质谱技术识别脂质双键位置的研究进展

杨文雯 张小平\* 张兴磊 丁健桦

(东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室 南昌 330013)

摘 要 脂质在能量贮存和信号传递方面发挥着巨大作用,同时还是生物膜的主要组成成分。不饱和 脂质双键位置不同,生理学意义和生物学功能会有很大差异,因此脂质双键位置的识别至关重要。质谱具有 灵敏快速、准确度高等优势,已成为脂质结构研究的重要方法。近年来,不同原理的电离技术与选择性衍生 反应迅速发展起来,与质谱相结合已广泛应用于多种脂质双键位置的识别。本文主要对这些新型质谱技术 进行总结,并展望了其未来发展趋势。

关键词 脂质 双键位置 质谱法

## Identification of Lipid Double Bond Position by Mass Spectrometry

Yang Wenwen, Zhang Xiaoping<sup>\*</sup>, Zhang Xinglei, Ding Jianhua (Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang, 330013)

**Abstract** Lipids play an important role in energy storage and signal transduction. In addition, they are also main components of biofilm. Lipids with different double bond position(s) have different physiological significance. Therefore, the identification of double bond position(s) of unsaturated lipids is of great significance. With the advantages of high sensitivity, high accuracy and fast analysis speed, mass spectrometry has been widely used in lipid structure study. In recent years, ionization techniques and selective derivatization reactions with different principles have developed rapidly. These technologies combined with mass spectrometry have been applied to the identification of double bond position (s) of various lipids. This review mainly summarized these new mass spectrometry technologies and looked forward to their future development trends.

Keywords  $\ Lipids$  , Double bond  $\ position(\ s)$  , Mass spectrometry

脂质又称脂类,是脂肪及类脂的总称。脂质 广义定义是指不溶于水而易溶于非极性有机溶剂 的有机化合物,种类繁多,根据结构可分为脂肪酰 类、糖脂质、甘油脂质、甘油磷脂、鞘脂质、固醇脂 质、聚酮类和丙烯醇脂质八个主要类别<sup>[1]</sup>。脂质 具有多种生物学意义,在能量贮存、信号传递等方 面发挥着巨大作用<sup>[2]</sup>,同时还是细胞膜的重要组 成成分<sup>[3]</sup>。研究表明,人体内多种脂质携带丰富 的生理和病理信息,人体脂质代谢水平与抑郁 症<sup>[4]</sup>、精神分裂症<sup>[5]</sup>和肺癌<sup>[6]</sup>等多种疾病密切相 关,如人体呼出气体中的丙酮可作为癌症、糖尿病 等疾病的生物标志物<sup>[7]</sup>。

不饱和脂质中的 C == C 位置不同,其生物学 功能会有很大差异,研究 C == C 位置有助于深入理

解脂质生理学意义与生物学功能。例如,亚麻酸的 两种异构体 α-亚麻酸、γ-亚麻酸在抑制肿瘤细胞生 长过程中参与不同的细胞途径<sup>[8]</sup>;顺-3-己烯醇可 诱导植物体内防御基因的表达<sup>[9]</sup>,而反-2-己烯醇 是昆虫的信息素成分<sup>[10]</sup>,没有这种功能。因此,实 现不饱和脂质 C == C 位置的精确定位至关重要,研 究脂质 C == C 位置异构体有助于了解脂质结构信 息与生物作用间的能量转化关系,在临床诊断、生 命科学和脂质生物学等领域具有重要作用。

质谱(MS)具有分析速度快、灵敏度高和样品 用量少等优点,在脂质分析领域被广泛使 用<sup>[11-13]</sup>。但由于C=C键能较大,传统碰撞诱导 解离(CID)很难使C=C碎裂,需要使用高能裂 解技术使C=C碎裂或在分析检测之前将C=C

国家自然科学基金项目(22104014)资助

<sup>\*</sup>联系人,张小平 女,博士,副教授,主要从事有机质谱分析研究, E-mail: zhangxpsunshine@163.com

转化成容易裂解的基团,这主要涉及 C == C 的气 相裂解法与选择性衍生化法两种通用策略。本文 主要对近年识别 C == C 位置的新型质谱法的原 理、特点及在实际样品(如生物组织)中的应用进 行总结,并讨论了这些技术在未来发展中需要解 决的当前存在的局限性。

# 1 方法原理与特点

### 1.1 选择衍生化法

#### 1.1.1 臭氧电喷雾解离

臭氧电喷雾解离(OzESI)利用离子源内的臭 氧(O<sub>3</sub>)攻击不饱和脂质的 C == C<sup>[14]</sup>,使其在离子 源内裂解得到两种化学诱导的片段离子,特异性 强,谱图简单,能有效分析简单脂质混合物,但谱 图随着混合物复杂程度的增加变得复杂,且在正 离子模式下的信号较差。

#### 1.1.2 P-B 反应

Paternò-Büchi 反应(P-B 反应)是羰基化合物 与 C == C 的[2+2]光环化加成反应,具有特殊的 区域选择性,有机化学中常用于一些含氧环丁烷 的合成<sup>[15]</sup>。根据羰基化合物和 C == C 键的相对 位置不同,P-B 反应可以生成两种氧杂环丁烷的 位置异构体。如果使能量作用于产物,可通过两 种途径发生逆 P-B 反应:一种途径会分解生成反 应物,另一种途径会生成新的醛或酮,如图式 1。 后一种途径是 P-B 反应与质谱结合实现 C == C 位 置鉴定的基础。该方法操作简便,仪器要求低,分 析快速,耗样量少。



图式1 P-B 反应定位 C == C 原理 Scheme 1 Principle of C == C position identification by P-B reaction

#### 1.1.3 环氧化反应

C == C 的环氧化反应指通过化学方法在 C == C 两端 C 原子间加上一个 O 原子形成三元 环的氧化反应<sup>[16]</sup>。原理为使用特定的氧化剂与 C == C 发生作用生成环氧化产物,进而经 CID 开 环产生 C == C 位置的特征片段离子(图式 2),其 转化率高,仪器要求低,但衍生试剂普遍具有 毒性。



图式 2 环氧化反应定位 C == C 原理 Scheme 2 Principle of C == C position identification by epoxidation reaction

### 1.2 气相裂解法

## 1.2.1 臭氧诱导解离

臭氧诱导解离(OzID)使用改进的线性离子 阱质谱仪分离出电喷雾电离(ESI)过程产生的脂 质离子,再使脂质 C == C 与 O<sub>3</sub> 蒸气发生反应<sup>[17]</sup>。 生成的一对诊断离子可明确识别前体脂质分子的 C == C 位置,见图式 3。OzID 克服了 OzESI 无法 分析复杂混合物的缺陷,样品不需色谱分离,谱图 简单,但需要改装仪器,操作繁琐。



图式 3 OzID 定位 C ----C 原理



1.2.2 自由基定向解离

自由基定向解离(RDD)通过特定波长的紫 外光激发实现键均裂和自由基的产生<sup>[18]</sup>。首先 使用特定的自由基引发剂与脂质结合成加合离 子,接着加合离子经特定紫外光照射释放出高活 性基团;高活性基团进而引发 RDD 过程实现化学 键的断裂。碎片离子丰富,简便快速,但产率较 低,导致灵敏度受限。

#### 1.2.3 有机物的电子激发技术

有机物的电子激发技术(EIEIO)利用电子束 照射样品使其碎片化<sup>[19]</sup>。如图式 4,带正电的脂



图式 4 EIEIO 定位 C —C 原理 Scheme 4 Principle of C —C position identification by EIEIO

质离子与一定能量的电子束相互作用后碎裂成一系列片段,能明确鉴定 C == C 位置。EIEIO 能得到脂质几乎完整的结构信息,但复杂混合物的谱图复杂,需要安装分离单元将脂质分离出来以提高灵敏度。

1.2.4 紫外光解离

紫外光解离(UVPD)是由于 C == C 的电子吸 收一定波长紫外光而引起的电子激发<sup>[20]</sup>,主要有 两种作用形式:第一种是 C == C 的电子吸收光子, 由稳定的基态跃迁至不稳定的激发态,这个 UVPD 过程与传统低能碰撞活化完全不同<sup>[21]</sup>,可 以产生独特的产物离子,跃迁到激发态的电子也 可能弛豫到低能态或基态,发生与常规碰撞活化 类似的 UVPD 过程;第二种是电子吸收光子后从 离子上脱离出来,形成阴离子自由基,进而经碰撞 活化解离(CAD)过程实现 C == C 的裂解。与传 统 CID、CAD 相比,紫外光解离激发速率更高、选 择性更强、分析速度更快。

# 2 选择性衍生化法在双键位置识别 中的应用

# 2.1 臭氧电喷雾解离

2006年,Thomas等<sup>[22]</sup>首次报道利用 O<sub>3</sub>离子 源内诱导 C == C 破碎,成功识别出磷脂酰丝氨酸 (PS)和磷脂酰乙醇胺(PE)等不饱和甘油磷脂 (GPL)的 C == C 位置。然而,离子源内的 O<sub>3</sub> 是氧 气放电产生的,为了产生较高浓度的 O<sub>3</sub>,实验对 毛细管施加的高压并非离子丰度最佳时的电压, 使得正离子模式下的信号不稳定。通过外部产生 O<sub>3</sub>可显著提高 O<sub>3</sub>浓度<sup>[14]</sup>,在正、负离子模式下 均能稳定放电。OzESI目前已成功应用于人晶状 体和牛肾提取物的分析,明确识别出 PE、PS、磷 脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰肌醇(PI) 和心磷脂(CL)等脂质 C == C 键位置<sup>[14,22,23]</sup>,简便 高效,不需改装仪器。但复杂混合物中各种脂质 都会被氧化,OzESI-MS 谱会很难解释,此外 O<sub>3</sub> 是 一种强氧化剂,即使在低浓度下也有一定危险。

### 2.2 P-B 反应

2014年, Ma 等<sup>[24]</sup>在 254nm 紫外光照射及负 离子模式下,通过纳米电喷雾电离(nano-ESI)监 测丙酮和油酸的 P-B 反应及同时进行的逆 P-B 反应,实时监测到 m/z 281.3 和 m/z 339.4 进样 峰(图 1),其中 m/z 339.3 的 MS<sup>2</sup> 谱图中的 m/z 171.1 来自 P-B 反应物原始 C == C 位点的氧杂环 丁烷断裂。这是首次将 P-B 反应用于脂质 C == C 位置的识别。在此基础上,该课题组拓展了研究 脂质的种类,识别出 GPL、胆固醇酯(CE)等脂质 C==C位置,应用于酵母极性提取物的分析<sup>[25,26]</sup>。 除了定性分析外,该方法也能实现 C == C 位置异 构体的定量。2016 年, Ma 等<sup>[27]</sup>将其与鸟枪脂质 组学法联用,首次从鼠脑组织中获得 C == C 位置 异构体的定量信息:同年又将丙酮的在线光化学 标记与质谱结合,成功定量人血浆中的不饱和脂 肪酸(FA)<sup>[28]</sup>,对生物研究和医疗诊断领域有一 定启发。目前,丙酮的 P-B 反应已成功与液相色 谱-质谱联用(LC-MS)工作流程整合,识别出牛肝 提取物中 200 多种不饱和 GPL,并确定了其中 55 组 C == C 位置异构体<sup>[29]</sup>。此外,与反相脂质色谱 (RPLC)结合<sup>[30]</sup>还可使磷脂的分析能力增强。该 方法灵敏度高,在正离子模式下对牛肝提取物和 人血浆提取物 PG 和 PI 的 C == C 位置识别检出 限低至 5nmol/L<sup>[31]</sup>。近年还有研究使用微管针 诱导 C == C 发生 P-B 反应<sup>[32]</sup>,灵敏快速,在单细 胞水平上实现了脂质 C == C 位置的确定,对单细 胞质谱(SCMS)研究有一定启发。

虽然丙酮廉价易得,且作为 P-B 反应试剂与 大部分溶剂混溶,但丙酮的低分子量使得产物 m/z增加有限,易造成谱图重叠。使用分子量较 大的衍生试剂,如苯乙酮<sup>[33]</sup>、二苯甲酮<sup>[34,35]</sup>等, 能有效减少这种情况。2017年,Wäldchen等<sup>[33]</sup>



图 1 P-B 反应与质谱在线耦合用于脂质分析<sup>[24]</sup> Fig. 1 On-line coupling of P-B reactions with MS for lipid analysis<sup>[24]</sup>. (a) Experimental setup; (b) P-B reaction mass spectrum of oleic acid and acetone induced by UV irradiation of nano-ESI; MS<sup>2</sup> CID of the P-B reaction products at (c) m/z 339.3 and (d) m/z 345.3

将 UVPD 与 MS/MS 结合监测苯乙酮(120Da)与 C == C 的 P-B 反应,成功鉴定出蛋黄中的 15 种磷 脂酰胆碱(PC),与 CID 相比反应选择性与 C == C 断裂效率显著提高。2018 年,Xu 等<sup>[34]</sup>报道了用 二苯甲酮(182Da)作为光化学衍生剂,成功识别 出大鼠血清中 GPL 的 C == C 位置并实现相对定 量,这是首次将 P-B 反应与 LC-MS 结合用于脂质 异构体的识别研究。乙酰吡啶也是丙酮的良好替 代试剂<sup>[36,37]</sup>,同样能在单细胞水平<sup>[38]</sup>实现 C == C 位置的鉴定。

P-B 反应与质谱联用操作简便,不需改装仪器,可与鸟枪脂质法、液相色谱和质谱成像等联用 实现复杂生物样品中不饱和脂质结构解析与相对 定量。但 P-B 反应由紫外光激发,对人体与环境 有一定危害。2020年,Li等<sup>[39]</sup>首次在飞行时间 (TOF)质谱仪上实现了可见光促进的 C == C 和 C == O 的选择性[2+2]环加成,杜绝了紫外光污染, 为脂质结构和光环加成反应研究提供了新见解。

## 2.3 环氧化反应

2.3.1 等离子体催化环氧化

2017 年, Ma 等<sup>[40]</sup>将低温等离子体(LTP)吹 入油酸(OA)溶液(丙酮/水为溶剂), 促进 OA 中 的 C == C 与空气中的 O<sub>2</sub> 反应生成 *m/z* 增加 16Da 的环氧化产物, 进而产物经 CID 破碎得到诊断离 子。反应高效快速,无其他主要副反应,反应 2min 收率达90%;此外,由于反应物几乎定量转 化,该方法可定量简单混合物的 C == C 异构体,但 不适用于除 FA 以外的其他脂质的分析。2018 年,他们使用纯乙腈代替丙酮/水为溶剂,成功分 析了 PC、PA、PE、PG 和 PI 在内的多种 GPL,并对 牛肝提取物中 14 种不饱和磷脂进行了 C == C 水 平上的结构表征,拓宽了脂质的研究种类<sup>[41]</sup>。 2.3.2 间氯过氧苯甲酸环氧化

2019年, Feng 等<sup>[16]</sup>首次提出通过间氯过氧 苯甲酸 (m-CPBA) 环氧 化定位 脂质 C = C (MELDI),成功识别出 FA、PE、PS、PA 和 PG 等 的 C == C 位置,从酵母提取物中鉴定出 20 种不饱 和脂质的 C == C 位置异构体, 仪器要求低, 简便快 速(样品处理与数据采集整个过程不到 30min), 反应 10min 转化率达 100%。同年, Kuo 等<sup>[42]</sup>开 发出 MELDI 与 LC-MS 结合分析生物提取物脂质 的工作流程,成功鉴定出了人血清中 100 多种 FA 及 GPL 的 C == C 位置异构体,表明该方法通用性 强。2021年, Tu 等<sup>[43]</sup>直接将 m-CPBA 沉积在样 品载玻片上,使其在大气环境条件下发生环氧化, 通过红外基质辅助激光解吸电喷雾电离质谱(IR-MALDESI-MS)对环氧化产物进行原位电离,成功 鉴定了几种 FA 标准品,并快速分析出大鼠肝脏 和人膀胱组织异构成分,实时原位,但反应 10min 的转化率较低,只有44%~60%。

2.3.3 过酸或过酸盐环氧化

2019年, Song 等<sup>[44]</sup>报道了一种将 FA 的环氧 化反应与多反应监测(MRM)模式下的高效液相 色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)结合的新方法。 以过氧硫酸氢钾复合盐为氧化剂,二氧化酮、四氢 硫代吡喃-4-酮、环砜烷为催化剂诱导脂质 C == C 发生环氧化反应,快速定量了人血浆中的 FA, 5min 产率接近 100%,无副产物存在,定量准确。 2021 年, Zhang 等<sup>[45]</sup>以过氧乙酸(FAA) 为氧化剂 建立了 C == C 的环氧化方法,在离子阱质谱仪上 检测出人胰腺细胞样品中 37 种 FA 的 C == C 位 置,反应效率接近100%,对单不饱和脂肪酸的检 出限低至 nmol/L 级,但多不饱和脂肪酸的谱图复 杂,且反应速度慢。最近,Chen 等<sup>[46]</sup>利用 Mn<sup>2+</sup>催 化 FAA 与 C == C 的环氧化反应,从蛋黄 PC 提取 物检测出 19 种 C == C 位置异构体,环氧化反应快 速(几秒以内)。过氧化物的环氧化法朝着反应 更快速、灵敏度更高、检出限更低的方向发展,但 过酸通常会产生酸废物,预计未来会有更多反应 效率高且环保无害的氧化剂被开发出来。

2.3.4 水自由基环氧化

水自由基阳离子[(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub><sup>+-</sup>]具有高反应活 性,可与苯<sup>[47]</sup>、丙酮<sup>[7]</sup>和烯醇<sup>[48]</sup>等多种有机物发 生反应。2019年,笔者课题组<sup>[48]</sup>使用自制常压 电晕放电装置将空气中的水蒸气电离生成 (H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub><sup>+-</sup>团簇,快速实现了法国葡萄酒中己烯醇 C=C位置异构体的区分与定量,整个分析过程 只需 5min,对顺-2-己烯醇的检出限约为 0.91 $\mu$ mol/L。图2(b~d)是己烯醇与水自由基阳 离子(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>+-</sup>作用生成环氧化产物的MS<sup>2</sup>谱图, 3-己烯醇、4-己烯醇和 5-己烯醇与(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>+-</sup>作用 后分别产生3对*m/z* 差为14Da的诊断离子,明确 识别出己烯醇 C=C分别在C3、C4和C5位置。 该方法操作简便,反应快速(几秒以内),以水为 初级试剂廉价易得、绿色无污染,并且消除了有机 衍生剂参与。





#### hexenol isomers.

(a) [M+0]<sup>++</sup>(m/z 116) generated from the epoxidation reaction between *cis*-3-hexenol and (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>++</sup>;
(b) [M+0]<sup>++</sup>(m/z 116) generated from the epoxidation reaction between *trans*-3-hexenol and (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>++</sup>;
(c) [M+0]<sup>++</sup>(m/z 116) generated from the epoxidation reaction between *cis*-4-hexenol and (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>++</sup>;
(d) [M+0]<sup>++</sup>(m/z 116) generated from the epoxidation reaction between

5-hexenol and  $(H_2O)_2^{+\cdot [48]}$ 

2.3.5 电催化环氧化

电催化(电化学)环氧化指在直流电或交流 电作用下使不饱和脂质的 C == C 发生环氧化,进

而经 CID 碎裂实现 C == C 定位,通常不需要样品 预处理,很大程度上简化了工作流程。2019年, Wan 等<sup>[49]</sup>报道了基于负离子纸喷雾(PS)质谱法 对脂质 C == C 位置的识别。直接对滴有样品的湿 三角滤纸施加交流电压,在负离子模式下实时原 位监测 C == C 的环氧化,成功实现了人血浆中 FA 的 C == C 位置异构体的定性与定量,检出限为  $\mu$ mol/L级。Tang 等<sup>[50]</sup>发现,通过调节交流电压 可实现按需环氧化,结合 nano-ESI 在正离子模式 和负离子模式下成功实现对大豆极性脂质提取物 中 PE、PA、PG、PI 等 GPL 的 C ==C 位置的识别。 有研究以 Ir 和 Ru 金属为活性电极,通过直流电 催化 C == C 环氧化直接检测人血清原样,快速识 别出血清中 FA 的 C == C 位置[51],简便快速,整个 过程只需 2min,但定量能力不佳。近年已开发出 利用大面积摩擦电纳米发电机(TENG)对鸡蛋 PC 提取物中 PC 双键位置异构体的识别<sup>[52]</sup>.所获 结构信息丰富。

# 2.4 其他衍生化法

近年,基于电荷转换(Charge-switch)概念的 衍生化策略应用越来越多<sup>[53-56]</sup>。该法使用特定 的电荷反转试剂将脂质阴离子转变为阳离子后再 进行 CID 裂解,已实现 FA<sup>[53,54]</sup>、GPL<sup>[55]</sup>、CL<sup>[56]</sup>等 脂质 C == C 位置的识别,应用于玉米油、牛肝、人 血浆、大肠杆菌提取物等实际样品的脂质结构研 究。其中 FA 能通过现有的标准谱库表征,很大 程度上节约了分析时间。

# 3 气相裂解法在双键位置识别中的 应用

## **3.1** 臭氧诱导解离

Thomas 等<sup>[17]</sup>将电离脂质暴露在 O<sub>3</sub> 蒸气中 与其发生反应,成功识别出 SM、甘油三酯 (TAG)、PC、PE 等不饱和脂质 C == C 位置,并应 用于人晶状体、牛肾和橄榄油提取物等复杂样品 中不饱和脂质的分析,分析速度快,采集时间短 (30s 左右)。OzID 与 CID 结合能够提供丰富完 整的结构信息,已在 C == C 水平上实现对 SM、 TAG、PC、FA、PG、PA、PE、PS、PI、CE 等不饱和脂 质的定性与定量分析,应用于人晶状体、人血浆、 橄榄油、牛脑、牛肾、蛋黄、羊脑等复杂生物样品中 脂质结构的研究<sup>[57-62]</sup>。这对医疗领域和生物研 究有一定指导意义,但需要改装质谱仪,广泛应用 存在困难。

### 3.2 自由基定向解离

2012年, Pham 等<sup>[63]</sup>将4-碘苯胺、4-碘苯甲酸 与脂质样品结合形成加合离子,进而在 266nm 紫 外光照射下释放出高活性苯基引发后续 RDD,成 功实现了 GPL、SM 和 TAG 中 C == C 位置的鉴定, 并应用于橄榄油和人极低密度脂蛋白中的脂质结 构研究。脂质裂解后得到的 RDD 谱含有丰富的 m/z 差为 14Da 与 12Da 的离子, 一系列 m/z 差值 为14Da的碎片离子由 C-C 断裂产生, m/z 差为 12Da 的离子片段由 C == C 断裂产生,可明确识别 C=C位置。2020年, Zhao等<sup>[18]</sup>将SM的[M+ HCO, ]<sup>-</sup>加成物的 CID 和 RDD 结合, 从猪脑提取 物中鉴定出包括 6 种 C == C 位置异构体在内的 40种 SM 脂质,拓宽了脂质组学的研究领域。随 后,他们又将 RDD 与 MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> CID 相结合,确定 了 PC 脂肪酰基上的 C == C 位置<sup>[64]</sup>。RDD 目前 已实现由低能 CID 启动<sup>[65]</sup>,用于 GPL、SM、TAG 和 PC 等复杂脂质的结构研究。RDD 产生的碎片 离子丰富,可用于区分 C == C 位置不同或含有不 同支链的异构体,但产率较低导致分析的灵敏度 受到限制。

### 3.3 有机物的电子冲击激发

EIEIO 作为 CID 的替代方案由 Cody 等<sup>[66]</sup>在 1979 年提出。2015 年, Baba 等<sup>[19]</sup>使用带有电子 俘获解离(ECD)单元的 TOF 质谱仪对不饱和脂 质进行结构解析,首次通过单个实验获得包括脂 酰链中 C == C 的位置在内的给定 GPL 物种几乎 完整的结构信息。通过对各种脂质标准物及蛋黄 脂质提取物的进一步研究表明, EIEIO 技术实用 性很强,但复杂混合物中不同脂质相互间会造成 信号干扰。

研究表明,在离子源与质谱仪之间安装差分 迁移率谱(DMS)单元将样品中的待测脂质分离 出来,可减少其他脂质的等压干扰<sup>[67-69]</sup>。2016 年,Baba等<sup>[67]</sup>使用装有 DMS 单元的质谱仪分离 出混合脂质中的 SM,实现了 SM 双键位置及酰基 结构的解析,并在牛乳、猪脑、蛋黄等脂质提取物 中识别出近 200 个 SM 分子种。同年,他们<sup>[68]</sup>结 合 DMS 与 EIEIO 成功确定 TAG 酰基链上的 C == C 位置,应用于食用油中的 TAG 研究。 EIEIO 技术与 DMS 单元结合<sup>[69]</sup>已建立起一套完 善的结构分析体系,成功在 C == C 水平上鉴定出 复杂混合物中的 GPL,SL 和 GL等,并对猪脑脂质 提取物超 300 种脂质进行了 C == C 位置解析。目前 EIEIO 技术已经发展较成熟、完善,可用于脂质 结构深度表征,但随着样品变复杂 EIEIO 谱图也 变复杂,需要计算机辅助光谱解释,且需对仪器进 行改造,操作繁琐。

#### 3.4 紫外光解离

近年已成功应用于脂质 C == C 识别的主要有 193nm UVPD 和 213nm UVPD。2017 年, Klein 等<sup>[70]</sup>首次利用 193nm UVPD 使不饱和脂质 C == C 附近的 C == C 的裂解产生 m/z 差为 24Da 的独特产物离子对,成功在高分辨质谱仪上识别 出牛肝极性提取物中 17 种 PC 的 C == C 位置。 类似地, 2017 年, Ryan 等<sup>[71]</sup>将 HCD 与 193nm UVPD结合,快速鉴定出一系列 SM 的 C == C 位 置,应用于猪脑提取物的研究。近年, Macias 等<sup>[72]</sup>利用三甲基硅重氮甲烷(TMSD)将 CL 衍 生化,进而通过 HCD 和 UVPD 碎裂产生诊断离 子,成功识别了大肠杆菌 CL 提取物中大部分 CL的C=C位置。与CID相比, HCD裂解提供 了稳定的高能裂解方式,能有效改善低能 CID 存在的低质量碎片丢失现象,为物质结构解析 和鉴定提供更全面的质谱信息,但应用不如 CID 普遍。基于 MS<sup>3</sup> 与 193nm UVPD 的脂质研究工 作流程已被开发出来,与 CID 结合成功对大肠 杆菌和甲状腺乳头状癌组织中的 CL 进行 C == C 水平的结构表征<sup>[73]</sup>.并快速定位了大肠杆菌和 鲍曼不动杆菌中 GPL 的 C =  $C^{[74]}$ 。此外, 193nm UVPD 与反相液相色谱耦合<sup>[75]</sup>可对 C == C 异构体进行相对定量,已用于牛肝、鸡蛋 提取物等中的 GPL 研究。

2020 年, Buenger 等<sup>[76]</sup> 将碰撞激活解离 (CAD)与213nm UVPD 结合,基于 MS<sup>3</sup> 工作流程 快速实现了羟基脂肪酸脂肪酸酯(FAHFA)脂质 C — C 位置在内的详细结构表征。该方法分析复 杂脂质混合物不需色谱分离,操作简便,已经明确 识别出 FAHFA<sup>[76]</sup>、CE<sup>[77]</sup>、PC 和 PE<sup>[78]</sup>等脂质酰 基链上不饱和位点的位置,成功用于小鼠脑组织 中 PE 和 PC<sup>[78]</sup>包括 C — C 位置在内的详细结构 表征。与 193nm UVPD 碎片现象相似,但碎片化 效率较低,需要较长时间来激活。

#### 3.5 其他气相裂解法

还有一些基于电子/电荷解离的技术与 CID 结合用于脂质 C == C 位置的表征。2014 年, Thomas 等<sup>[79]</sup>将电荷定向解离与 ESI 结合,确定了 含 3 个及 3 个以上 C == C 的多不饱和脂肪酸的 C == C 位置。2015 年, Jones 等<sup>[80]</sup> 采用电子诱导 解离技术在配有 ESI、MALDI(基质辅助激光解吸 电离)双离子源的质谱仪上识别出几种 PC 标准 品的 C == C 位置, 谱图信息丰富, 但效率不高。 2017 年, Li 等<sup>[81]</sup> 采用电荷转移解离技术, 利用高 压 He 阳离子束激发 ESI 过程中形成的 PC 阳离 子,快速实现了几种 PC 标准品中 C == C 的定位, 但信噪比低, 光谱复杂。未来可能会对这些方法 的解离效率、信噪比等进行改善以用于活性生物 样品研究。

MAD、HAD和OAD也被证明用于脂质 C == C 的解析。2016年,Li 等<sup>[82]</sup>利用He-MAD(He 的亚 稳态原子激发解离)技术将1-棕榈酰基-2-油酰基 卵磷脂(POPC)与H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>等的加合离子转换为 磷脂自由基阳离子[POPC]<sup>++</sup>,进而进行低能 CID 实现 C-C、C == C 和 C == O 的广泛裂解,再由离子 分布的不同推断出 C == C 位置。2018年, Takahashi 等<sup>[83]</sup>扩展了HAD的原始概念,利用微 波驱动的电容耦合等离子体(CCP)产生·OH 和<sup>3</sup>O,结合 MALDI 在 TOF 质谱仪上成功鉴定出 PC(16:0/24:4)的 C == C 位置<sup>[84]</sup>。该方法可以 有效对单电荷小分子进行 C == C 位置分析,但复 杂混合物的 HAD 谱图信噪比低,谱图难以解释。 2020年,他们<sup>[85]</sup>用微波驱动电感耦合等离子体 (ICP)代替 CCP 产生·OH 和三线态氧(<sup>3</sup>O),将 OAD 与 LC-MS 结合成功识别出 8 种 PC 混合物 中每种 PC 的 C == C 位置,与 HAD 相比通量更 高。这些方法通量大,但信噪比亟待提高,给应用 带来限制。

# 4 总结与展望

综上所述,本文将近年常见的基于质谱识别 不饱和脂质 C == C 位置的方法分为选择衍生化法 和气相裂解法,首先对这些方法的原理与特点展 开了详细介绍,接着重点终结了这些方法在脂质 结构研究中的应用及当前存在的局限性,旨在为 科研工作者对脂质更深层次的研究提供理论指 导。这些技术各自的优点和局限性总结列于 表1。

表1 脂质双键位置分析技术总结

Tab. 1 Summary of techniques used for the analysis of double bond position in tiplus							
	方法名称	脂质	样品	能否定量	优势	劣势	参考文献
选择衍生化	OzESI	FA、PE、PA、PG、PS、 PI、CL、TAG、SM、PC 等	人晶状体、牛肾	否	谱图简单	正离子模式下信 号差,不利于复 杂混合物分析	[14,22,23]
	P-B 反应	FA、CE、PG、PA、PI、 PS、PC、PE、CE、TAG 等	牛肝、人血浆、人血液、 鼠脑、鼠肝、鼠肾等	是	操作简便,仪器 要求低,快速灵 敏,耗样量小	_	[24~34,86,87]
	环氧 化法	FA、PC、PA、PG、LPE、 PS、GSL、TAG、CER(神 经酰胺)、SM、CE、 GPL等	酵母提取物、人血清	是	反应完全,仪器 要求低	衍生试剂通常具 有毒性,原子利 用率低	[16,40~44,88,89]
	电荷 转换	FA、GPL、CL	玉米油、牛肝、人血浆、 大肠杆菌提取物	否	灵敏快速	需要结合计算, 较麻烦	[53~56]
气相裂 解法	OzID	SM、TAG、PC、FA、PG、 PA、PE、PG、PS、PI、 CE 等	人晶状体、人血浆、橄 榄油、牛脑、牛肾、蛋 黄、羊脑等	是	谱图简单,样品 不需色谱分离	需改装仪器	[17,57~62]
	RDD	PC、SM、TAG 等	猪脑、人血浆,橄榄油、 大肠杆菌提取物等	是	碎片离子丰富	产率较低,灵敏 度受限	[18, 63~65]
	EIEIO	PC、PE、PI、PS、SM、 TAG 等	牛乳、猪脑、牛心脏、牛 肝,橄榄油、椰子油、亚 麻籽油、牛油果油、鱼 油等	是	应用范围广	需改装仪器	[19,67~69]
	UVPD	PC、PE、CER、SM、CL、 FA 等	牛肝、牛心脏、猪脑、鼠 脑、大肠杆菌、鲍曼不 动杆菌等	是	不需色谱分离, 分析速度快,灵 敏度高	紫外光污染	[70~78,90,91]
	RID	PC、FA	无	否	通量较大	复杂混合物的谱 图 复 杂,信 噪 比低	[84,85]

随着质谱技术的不断细化和改善,灵敏度、准 确率等不断提升,同时质谱与鸟枪脂质组学、质谱 成像、液相色谱、气相色谱和直接质谱等技术的兼 容性越来越强,这使得复杂生物样品中脂质的完 整结构表征和量化变得可行。在临床诊断方面, 对 C == C 位置异构体的研究有助于阐明人体代谢 途径与体内脂质水平的关系,了解人体脂质代谢 紊乱与疾病的关系;在生物研究领域,脂质 C == C 异构体的研究有助于其生物功能与生理学意义的 阐明,有助于细胞信号传导、能量贮存和炎症等重 要生理过程的深入研究。但实现复杂生物样品中 脂质 C == C 位置的自动化、高通量分析还具有一 定挑战,预计未来将会有更简便、更完善的计算机 软件和分析单元被开发出来用于复杂数据处理。 可以预见,未来不饱和脂质 C == C 位置异构体识 别和定量技术会朝着更简便、更快速、更灵敏、更 准确的方向发展,同时与临床医学、脂质生物学等 领域的渗透越来越强。

#### 参考文献

- [1] Fahy E, Subramaniam S, Brown H A, et al. J. Lipid Res., 2005, 46(5): 839~861.
- [2] Luzzati V. Curr. Opin. Struc. Biol., 1997, 7(5): 661 ~668.
- [3] Harayama T, Riezman H. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2018, 19(5): 281~296.
- [4] Lueno M, Dobrowolny H, Gescher D, et al. Front. Psychiatry, 2022, 13: 819607.
- [5] Jiang C, Dobrowolny H, Gescher D M, et al. World J. Biol. Psychia., 2022, 23(10): 773~784.
- [6] Soufi G, Bagheri H, Yeganeh Rad L, et al. Anal. Chim. Acta, 2022, 1198: 339550.
- Zhang X, Ren X, Zhong Y, et al. Analyst, 2021, 146
   (16); 5037~5044.
- [8] González-Fernández M J, Ortea I, Guil-Guerrero J L. Toxicol. Res., 2020, 9(4): 474~483.
- [9] 李舒雯, 郭洙鹃, 焦春阳, 等. 植物生理学报, 2021, 57 (05): 1001~1006.
- [10] Mitchell R F, Ray A M, Hanks L M, et al. Environ. Entomol., 2018, 47(6): 1547~1552.
- [11] 李宝强,张众垚,孔景临,等.质谱学报,2020,41(03): 221~235.
- [12] 王珊珊, 张强, 郭寅龙. 质谱学报, 2021, 42(06): 995~1013.
- [13] 马潇潇,胡清源,瑕瑜.分析测试学报,2020,39(01):19~27.
- [14] Thomas M C, Mitchell T W, Harman D G, et al. Anal. Chem., 2007, 79(13): 5013~5022.
- [15] Becker M R, Richardson A D, Schindler C S. Nat.

Commun., 2019, 10(1): 5095.

- [16] Feng Y, Chen B, Yu Q, et al. Anal. Chem., 2019, 91 (3): 1791~1795.
- [17] Thomas M C, Mitchell T W, Harman D G, et al. Anal. Chem., 2007, 80(1): 303~311.
- [18] Zhao X, Wu G, Zhang W, et al. Anal. Chem., 2020, 92 (21): 14775~14782.
- [19] Campbell J L, Baba T. Anal. Chem., 2015, 87(11): 5837 ~5845.
- [20] Zhang W, Jian R, Zhao J, et al. J. Lipid Res., 2022, 63 (7): 100219.
- [21] Lyon Y A, Riggs D, Fornelli L, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2018, 29(1): 150~157.
- [22] Thomas M C, Mitchell T W, Blanksby S J. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(1): 58~59.
- [23] Thomas M C, Mitchell T W, Blanksby S J. Methods Mol. Biol., 2009, 579: 413~441.
- [24] Ma X, Xia Y. Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53(10): 2592~2596.
- [25] Stinson C A, Xia Y. Analyst, 2016, 141(12): 3696~3704.
- [26] Ren J, Franklin E T, Xia Y. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2017, 28(7): 1432~1441.
- [27] Ma X, Chong L, Tian R, et al. PNAS, 2016, 113(10): 2573~2578.
- [28] Ma X, Zhao X, Li J, et al. Anal. Chem., 2016, 88(18): 8931~8935.
- [29] Zhang W, Zhang D, Chen Q, et al. Nat. Commun., 2019, 10(1): 79.
- [30] Zhang W, Shang B, Ouyang Z, et al. Anal. Chem., 2020, 92(9): 6719~6726.
- [31] Xia T, Ren H, Zhang W, et al. Anal. Chim. Acta, 2020, 1128: 107~115.
- [32] Zhu Y, Wang W, Yang Z. Anal. Chem., 2020, 92(16): 11380~11387.
- [33] Wäldchen F, Becher S, Esch P, et al. Analyst, 2017, 142
   (24):4744~4755.
- [34] Xu T, Pi Z, Song F, et al. Anal. Chim. Acta, 2018, 1028: 32~44.
- [35] 蒋潇潇,王姜,管启圆,等.分析化学,2017,45(12): 1988~1995.
- [36] Esch P, Heiles S. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2018, 29 (10): 1971~1980.
- [37] Cao W, Cheng S, Yang J, et al. Nat. Commun., 2020, 11 (1): 375.
- [38] Li Z, Cheng S, Lin Q, et al. Nat. Commun., 2021, 12 (1): 2869.
- [39] Li H F, Cao W, Ma X, et al. J. Am. Chem. Soc., 2020, 142(7): 3499~3505.
- [40] Zhao Y, Zhao H, Zhao X, et al. Anal. Chem., 2017, 89 (19): 10270~10278.
- [41] Cao W, Ma X, Li Z, et al. Anal. Chem., 2018, 90(17): 10286~10292.

- [42] Kuo T H, Chung H H, Chang H Y, et al. Anal. Chem., 2019, 91(18); 11905~11915.
- [43] Tu A, Garrard K P, Said N, et al. Rapid Commun. Mass Spectr., 2021, 35(13): e9119.
- [44] Song C, Gao D, Li S, et al. Anal. Chim. Acta, 2019, 1086: 82~89.
- [45] Zhang H, Xu M, Shi X, et al. Chem. Sci. , 2021, 12(23): 8115~8122.
- [46] Chen X, Tang S, Freitas D, et al. Analyst, 2022, 147 (21): 4838~4844.
- [47] Mi D, Mao Y, Wei B, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2022, 33(1): 68~73.
- [48] Zhang X, Ren X, Chingin K, et al. Anal. Chim. Acta, 2020, 1139: 146~154.
- [49] Wan L, Gong G, Liang H, et al. Anal. Chim. Acta, 2019, 1075: 120~127.
- [50] Tang S, Fan L, Cheng H, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2020, 32(9): 2288~2295.
- [51] Chintalapudi K, Badu-Tawiah A K. Chem. Sci., 2020, 11
   (36): 9891~9897.
- [52] Bouza M, Li Y, Wang A C, et al. Anal. Chem., 2021, 93 (13): 5468~5475.
- [53] Randolph C E, Foreman D J, Betancourt S K, et al. Anal. Chem., 2018, 90(21): 12861~12869.
- [54] Randolph C E, Foreman D J, Blanksby S J, et al. Anal. Chem., 2019, 91(14): 9032~9040.
- [55] Randolph C E, Blanksby S J, McLuckey S A. Anal. Chem., 2019, 92(1): 1219~1227.
- [56] Randolph C E, Shenault D M, Blanksby S J, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2020, 32(2): 455~464.
- [57] Poad B L, Pham H T, Thomas M C, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2010, 21(12): 1989~1999.
- [58] Pham H T, Maccarone A T, Thomas M C, et al. Analyst, 2013, 139(1): 204~214.
- [59] Kozlowski R L, Campbell J L, Mitchell T W, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2015, 407(17): 5053~5064.
- [60] Marshall D L, Criscuolo A, Young R S E, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2019, 30(9): 1621~1630.
- [61] Brown S H, Mitchell T W, Blanksby S J. Biochim. Biophys.
   Acta, 2011, 1811(11): 807~817.
- [62] Vu N, Brown J, Giles K, et al. Rapid Commun. Mass Spectr., 2017, 31(17): 1415~1423.
- [63] Pham H T, Ly T, Trevitt A J, et al. Anal. Chem., 2012, 84(17): 7525~7532.
- [64] Zhao X, Xia Y. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2021, 32(2): 560~568.
- [65] Lin Q, Li P, Jian R, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2022, 33(4): 714~721.
- [66] Cody R B, Freiser B S. Anal. Chem., 1979, 51(4): 547~ 551.

- [67] Baba T, Campbell J L, Le Blanc J C Y, et al. J. Lipid Res., 2016, 57(5): 858~867.
- [68] Baba T, Campbell J L, Le Blanc J C Y, et al. J. Lipid Res., 2016, 57(11): 2015~2027.
- [69] Baba T, Campbell J L, Le Blanc J C Y, et al. J. Lipid Res., 2018, 59(5): 910~919.
- [70] Klein D R, Brodbelt J S. Anal. Chem., 2017, 89(3): 1516~1522.
- [71] Ryan E, Nguyen C Q N, Shiea C, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2017, 28(7): 1406~1419.
- [72] Macias L A, Brodbelt J S. Anal. Chem., 2022, 94(7): 3268~3277.
- [73] Macias L A, Feider C L, Eberlin L S, et al. Anal. Chem., 2019, 91(19): 12509~12516.
- [74] Klein D R, Blevins M S, Macias L A, et al. Anal. Chem., 2020, 92(8): 5986~5993.
- [75] Macias L A, Garza K Y, Feider C L, et al. J. Am. Chem. Soc., 2021, 143(36): 14622~14634.
- [76] Buenger E W, Reid G E. Eur. J. Mass Spectr., 2020, 26 (5): 311~323.
- [77] West H, Reid G E. Anal. Chim. Acta, 2021, 1141: 100 ~109.
- [78] Blevins M S, Shields S W J, Cui W, et al. Anal. Chem., 2022, 94(37): 12621~12629.
- [79] Thomas M C, Altvater J, Gallagher T J, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2014, 25(11): 1917~1926.
- [80] Jones J W, Thompson C J, Carter C L, et al. J. Mass Spectr., 2015, 50(12): 1327~1339.
- [81] Li P, Jackson G P. J. Mass Spectr., 2017, 52(5): 271
  ~282.
- [82] Li P, Hoffmann W D, Jackson G P. Int. J. Mass Spectr., 2016, 403: 1~7.
- [83] Takahashi H, Sekiya S, Nishikaze T, et al. Anal. Chem., 2016, 88(7): 3810~3816.
- [84] Takahashi H, Shimabukuro Y, Asakawa D, et al. Anal. Chem., 2018, 90(12): 7230~7238.
- [85] Takahashi H, Shimabukuro Y, Asakawa D, et al. Mass Spectr., 2020, 8(2): S0080.
- [86] Murphy R C, Okuno T, Johnson C A, et al. Anal. Chem., 2017, 89(16): 8545~8553.
- [87] Esch P, Heiles S. Analyst, 2020, 145(6): 2256~2266.
- [88] Takashima S, Toyoshi K, Yamamoto T, et al. Sci. Rep., 2020, 10(1): 12988.
- [89] Coniglio D, Ventura G, Calvano C D, et al. J. Am. Soc. Mass Spectr., 2022, 33(5): 823~831.
- [90] Williams P E, Klein D R, Greer S M, et al. J. Am. Chem. Soc., 2017, 139(44): 15681~15690.
- [91] Fang M, Rustam Y, Palmieri M, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2020, 412(10): 2339~2351.