

生物样品里中长链酰基辅酶A的方法建立

Method Establishment of Medium and Long Chain Acyl-coenzyme A in Biological Samples

查海红, 龙志敏, 郭立海

Zha Haihong, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX China

Keywords: Medium and Long Chain Acyl-coenzyme A, Biological Samples

前言

辅酶A (coenzyme A) 是一种辅酶, 由泛酸、半胱氨酸和三磷酸腺苷等组成的大分子。辅酶A是体内70多种酶反应通路的辅助因子, 包括糖类的分解, 脂肪酸的氧化, 氨基酸的分解, 丙酮酸的降解, 激发三羧酸循环, 提供机体生命所需90%的能量, 因此是调节糖、脂肪和蛋白质代谢的重要因子。同时, 辅酶A还参与机体大量必需物质的合成。在脑部合成神经肌肉信使和神经递质乙酰胆碱以及促进睡眠的褪黑激素等。神经肌肉信使可在神经和肌肉之间交换资讯, 神经递质可在神经与大脑之间传递情感、外界刺激、记忆、学习等方面的资讯。另外, 辅酶A还是重要的乙酰基和酰基传递体。所以, 通过对酰基辅酶A的检测, 可以更清楚了解体内的代谢路径。

本文的目的是在没有标准品的情况下建立中长链酰基辅酶A的方法, 于是先从细胞样本中提取中长链酰基辅酶A, 然后采用SCIEX QTRAP®质谱特有的“线-阱”转换功能, 发现并确证生物样本中的中长链酰基辅酶A, 进而建立生物样本中通用的中长链酰基辅酶A的采集方法。

仪器设备

SCIEX ExionLC™系统 + QTRAP®质谱系统

液相方法

色谱柱: C18 (50 × 2.1 mm)

流动相: A相: 水 (10 mM 甲酸铵, 0.005% 氨水)

B相: 乙腈



SCIEX ExionLC™系统

流速: 0.3 mL/min

柱温: 30 °C

进样量: 10 µL

表1. 液相洗脱梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
0.3	90	10
1.0	55	45
4.5	2	98
5.0	2	98
5.1	90	10
6.0	90	10

质谱方法

离子源：ESI源，正离子模式

离子源参数：

IS电压：5500 V 气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 50 psi 雾化气 GS2: 50 psi

碰撞气 CAD: Medium 源温度 TEM: 550 °C

样品前处理

以细胞样品为例，配置甲醇：异丙醇：水（1:1:1）作为提取液；在冰上操作，加入200 μL提取液到样品，充分涡旋20 s，在液氮中反复冻融4次，超声（70 W, 10 s/4次，每次间隔20 s）；在冰上操作，加入二氯甲烷500 μL，充分涡旋30 s，涡旋两次；加入130 μL H₂O，涡旋30 s；将上述样品放置在4 °C冰箱，静置10 min（有分层，上层为水相）；离心（4 °C，10 min，15,000 g），取上清液150 μL到进样瓶待检测。

采集方法建立

本文的宗旨是在没有标准品的情况下，实现对生物样本中的中长链酰基辅酶A的检测。因此本文的思路是先从生物样本中提取出中长链酰基辅酶A，然后根据文献及化合物的裂解规律编辑MRM离子对用于发现中长链酰基辅酶A，最后利用SCIEX QTRAP®质谱独有的MRM-IDA-EPI复合扫描方式，在MRM出峰的同时，对色谱峰进行MS/MS采集，获得完整的二级质谱图帮助我们进行化合物确证。

通过文献查阅^[1]以及酰基辅酶A类化合物的裂解规律，我们确定了8种酰基辅酶A的MRM离子对信息，分别为带有4碳、6碳、8碳、10碳、12碳、14碳、16碳以及18碳链长度的酰基辅酶A，即C4_COA、C6_COA、C8_COA、C10_COA、C12_COA、C14_COA、C16_COA和C18_COA，详细的质谱采集参数见表2和图1。

实验结果

我们在细胞样品中对这8种酰基辅酶A进行了检测与确证，图2展示了这8种酰基辅酶A对应的MRM离子对的色谱峰，根据酰基辅酶A出峰规律，链越长，极性越小，保留时间越靠后，初步推测了每个酰基辅酶A的出峰位置。

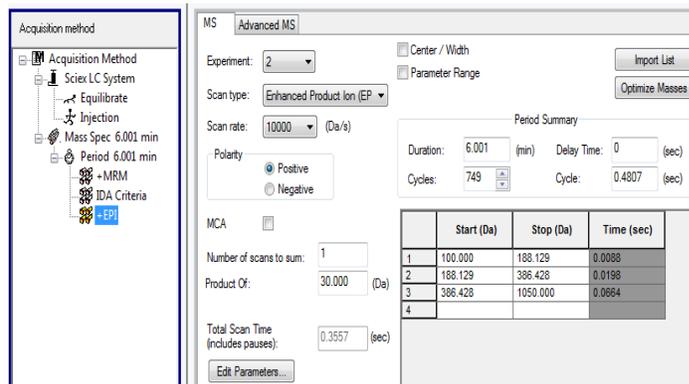


图1. MRM-IDA-EPI参数

表2. 8种酰基辅酶A的质谱参数

化合物	Q1/Q3	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)
C4_COA	838.2/331.2	130	40
C6_COA	866.2/359.2	130	40
C8_COA	894.2/387.2	130	40
C10_COA	922.2/415.2	130	44
C12_COA	950.2/443.2	130	44
C14_COA	978.2/471.2	130	44
C16_COA	1006.2/499.2	130	44
C18_COA	1034.2/527.2	130	44

接着，我们利用SCIEX QTRAP®质谱独有的MRM-IDA-EPI复合扫描方式，在MRM出峰的同时，可以对色谱峰进行MS/MS采集，从而获得完整的二级质谱图帮助我们进行化合物确证。于是，我们找到每个酰基辅酶A推测出峰位置的二级谱图进行进一步的验证，详细的二级谱图见图3。因为我们从采集的酰基辅酶A的二级质谱图中，发现明显m/z 428的特征峰和有规律的差28Da的CH₂-CH₂的碎片峰，m/z 331.3(C4-CoA)\m/z 359.3(C6-CoA)\m/z 387.3(C8-CoA)\m/z 415.3(C10-CoA)\m/z 443.4(C12-CoA)\m/z 471.4(C14-CoA)\m/z 499.4(C16-CoA)\m/z 527.5(C18-CoA)，所以我们通过二级谱图对这8种酰基辅酶A得到进一步的验证。

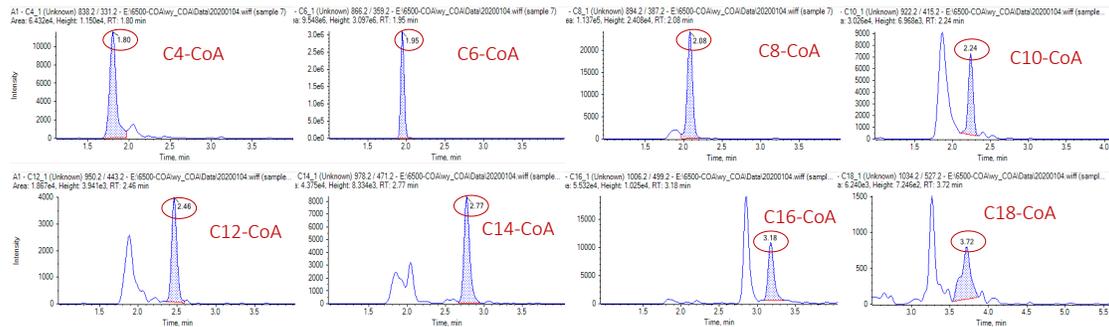


图 2. 8种酰基辅酶A在细胞中的色谱图

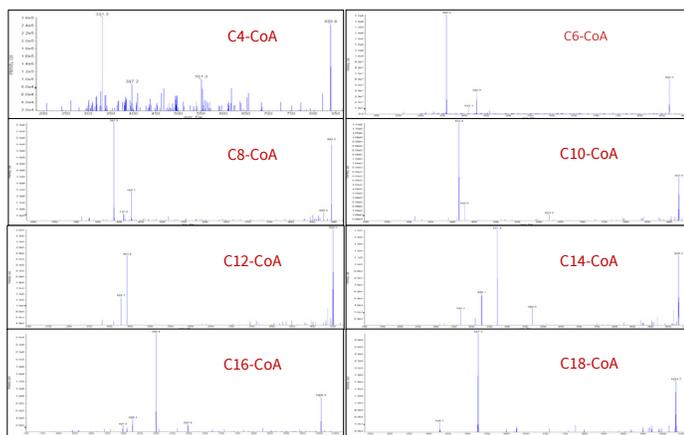


图3. 8种酰基辅酶A的EPI二级谱图

总结

本文在没有标准品的情况下，采用SCIEX QTRAP®质谱特有的“线-阱”转换功能，在生物样品中建立中长链酰基辅酶A的方法。首先通过文献搜索及结构分析确定MRM离子对信息，进而在生物样品中通过酰基辅酶A的保留时间规律及二级谱图规律来确定酰基辅酶A，从而最终确定并建立中长链酰基辅酶A的质谱检测方法。

参考文献

- [1]. Wang S, Wang Z, Zhou L, et al. Comprehensive Analysis of Short-, Medium-, and Long-Chain Acyl-Coenzyme A by Online Two-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2017:12902.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12392-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)