

液质联用结合化学衍生技术测定生物体内羟基脂肪酸支链脂肪酸酯 (FAHFA)

Determination of branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFA) by LC/MS/MS coupled with chemical derivatization

江汉鹏, 龙志敏, 郭立海

Hanpeng Jiang, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

Keywords: FAHFA; LC/MS; chemical derivatization

前言

2014年, 首次在哺乳动物脂肪组织中发现了一类具有抗糖尿病、抗炎的新型脂肪酸, 称为支链脂肪酸酯化羟基脂肪酸 (branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids, FAHFAs)。是由脂肪酸和羟基支链脂肪酸组成, 其结构如图1所示。目前, 至少已经发现了十六类FAHFA家族: 主要包括十六烷酸 (PA)、十八烷酸 (SA)、十六烯酸 (PO) 和十八烯酸 (OA) 与9-羟基-十八烷酸的酯化物 (HSA), 即PAHSA、SAHSA、OAHSA和POHSA。由于生物体内基质复杂, 脂质种类多且含量跨度大, 而FAHFA的含量极低, 所以目前发现和定量FAHFA仍然具有很大挑战。

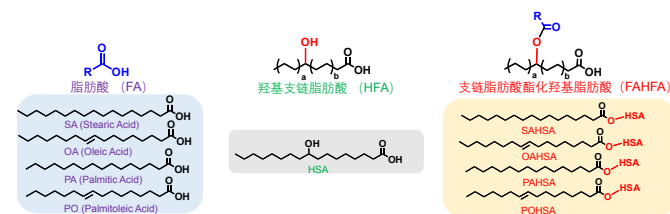


图1. FAHFA的分子结构

羧酸化合物通常在负离子模式下进行检测, 色谱流动的弱酸性也会抑制羧酸化合物在ESI源内的电离, 制约了MRM模式下的灵敏度。因此, 本文使用液质联用结合化学衍生技术测定生物体内

的FAHFAs。使用化学衍生技术, 将叔胺基团衍生至FAHFA结构上, 可以将负离子模式下检测的脂肪酸转变为正离子模式检测, 其衍生化后的产物, 又可产生强度高并且稳定的碎片离子, 提高了其检测灵敏度和准确度。

方法特点

1. 通过稳定的化学衍生技术, 在复杂的生物基质中, 检测含量极低的FAHFAs。
2. 该衍生化试剂可产生稳定的中性丢失离子, 可对样品中羧酸类化合物靶向刷查。

样品及试剂

衍生试剂为N,N-二甲基乙二胺 (DMED), 反应所需催化剂为2-氯-1-甲基吡啶碘化物 (CMPi) 和三乙胺 (TEA)。

样品前处理

血浆样本前处理流程如下。对于提取FAHFA, 可采用液液萃取 (LLE) 和SAX固相萃取 (SPE) 两种方式。LLE方法如下, EP管加入2.25 ml甲醇, 加入200 μ l血浆, 最大速度涡旋10 s, 加入7.5 ml MTBE (甲基叔丁基醚), 最大速度涡旋10S, 室温静置30min后加入1.88 ml质谱级水, 涡旋20s后再室温放置10min, 低温 (4 $^{\circ}$ C) 离心机, 高速 (12000 rpm) 离心15 min, 取上清, N2吹干后备用。SPE方法参考以下文献^[1], 简述如下, 100 μ l血浆中加入1mL

含有0.1%氨水的ACN溶液，涡旋，在4 °C下以12000 × g的速度离心10 min，取上层萃取液。将萃取液加入到已平衡好的SAX小柱（1 mL, 30 mg）中，然后分别用1.5 mL的丙酮/H₂O (1/9, v/v)溶液和1.5 mL的丙酮溶液进行清洗。清洗完后，加入2 mL含有1%甲酸的丙酮溶液进行洗脱。收集洗脱液，并在氮气下吹干备用。

化学衍生流程参考以下文献^[2]，反应流程如下（图2），过前处理吹干生物样品用100 μL的ACN进行复溶。加入10 μL CMPI (20 μmol/mL) 和20 μL TEA (20 μmol/mL)混匀，随后加入20 μL DMED (20 μmol/mL) 进行化学衍生。将反应液置于40°C下以1400 rpm的速度震荡1 h。待反应完成后，氮气吹干，除去溶剂和过量的衍生化试剂。用100 μL IPA/ACN/H₂O 18/50/32 (v/v/v)溶液复溶，进样。

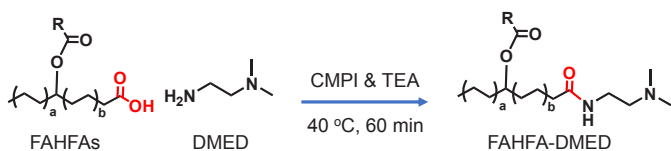


图2. FAHFAs化学衍生反应

仪器设备

ExionLC™ 系统+ SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS系统



液相条件 (FAHFA) :

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 (100mm × 2.1 mm, 2.6 μm)

柱温: 40 °C

进样体积: 10 μL

流动相: A为水/乙腈 (4/6, 含0.1%甲酸, v/v) ,

B为异丙醇/乙腈 (9/1, 含0.1%甲酸, v/v)

流速: 0.4 mL/min

梯度如下: 见表1

表1. FAHFA色谱分离梯度

Time [min]	A.Conc [%]	B.Conc [%]
0.00	80.0	20.0
0.50	80.0	20.0
3.00	0.0	100.0
8.00	0.0	100.0
8.10	80.0	20.0
11.00	80.0	20.0

质谱条件

离子源: ESI源; POS模式;

扫描方式: MRM

离子源参数 (FAHFA) :

IS电压: 5500 V;

气帘气CUR: 25 psi;

雾化气GS1: 50 psi;

辅助气GS2: 50 psi;

离子源温度为550 °C;

碰撞气: High

MRM参数如表2所示 (*: 定量离子对)

表2. FAHFA的MRM参数

ID	Q1	Q3	DP	CE
PAHSA-1*	609.5	308.3	80	40
PAHSA-2	609.5	353.4	80	30
OAHSA-1*	635.5	308.3	80	40
OAHSA-2	635.5	353.3	80	30
SAHSA-1*	637.5	308.3	80	40
SAHSA-2	637.5	353.3	80	30
POHSA-1*	607.5	308.3	80	40
POHSA-2	607.5	353.3	80	30

实验结果与讨论

1. 化学衍生后质谱碎裂规律

脂肪酸通常在负离子模式下进行检测，但色谱流动的弱酸性会抑制其在ESI源内的电离，影响了检测灵敏度。为了解决以上问题，本文采用化学衍生的方法，方法如图3，将含有叔胺的基团标记在脂肪酸上，标记后化合物可以在正离子模式下检测，解决了负离子离子化抑制的问题，衍生产物在碰撞池内可以产生稳定且强的碎片离子（图3），且有稳定的45Da的中性丢失，也可作为非靶筛查的线索。

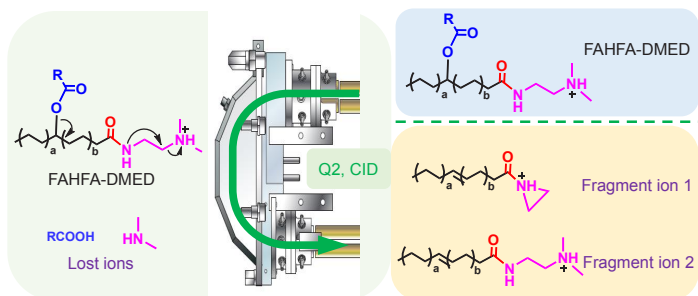


图3. 衍生化产物在质谱碰撞池中碎裂模式

2. 血浆中FAHFAs检测

FAHFAs分子碳数极多，机型弱，在C18色谱柱上保留极强，据以往的文献[3]报道，直接用C18色谱柱分析，其色谱分离时间长，且分离效果不好。为了解决以上问题，并且提升灵敏度，本文选用DMED作为衍生化试剂对血浆中FAHFA做了化学衍生。因为DMED的碳数较少，所以衍生后的FAHFA的分子极性会变大，这样可以减弱在C18色谱柱上的保留，既可以保证分离度的同时，减少色谱洗脱时间，加之其含有叔胺基团，衍生产物在正离子模式下检测，提升了灵敏度。

最终通过LLE或SAX固相萃取的前处理方法，结合衍生化技术，在小鼠和人的血浆中检测到了4个FAHFA家族（OAHSAs, PAHSAs, SAHSAs和POHSAs）中的部分FAHFA，如图4所示，由于同家族的FAHFA根据羟基取代位置不一致，导致其含有很多同分异构体，所以如图所以，一个离子通道下，可能会有多个色谱峰。

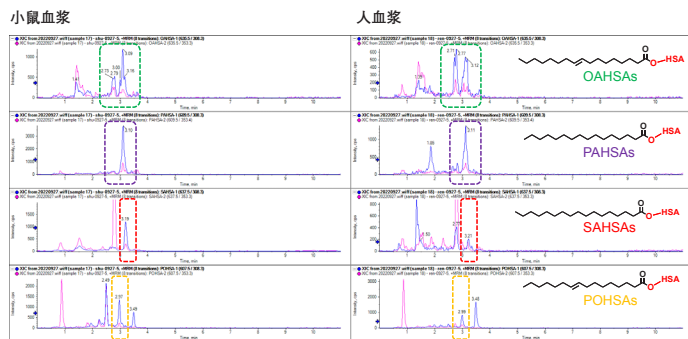


图4. 小鼠和人类血浆中4种FAHFAs的提取离子图

最后，对比了两种血浆前处理方法的差异，如图5所示，SPE的前处理方法较LLE的方法来说，选择性更好，所以除杂能力更强，基质效应更低，导致了其色谱峰的峰高较LLE方法的更高，如PAHSAs, OAHSAs, SAHSAs, 用SPE前处理可使得峰强度至少提高2倍；并且也可能会检测到更多的同分异构体，比如SAHSAs和POHSAs, 用SPE前处理后检测到的峰更多。综上，由于衍生后信号响应的提高，SPE和LLE前处理方法均可检测到血浆中低含量的FAHFAs，虽然SPE的前处理后检测信号较好，但SPE的前处理较LLE的前处理更为复杂，需综合考量。

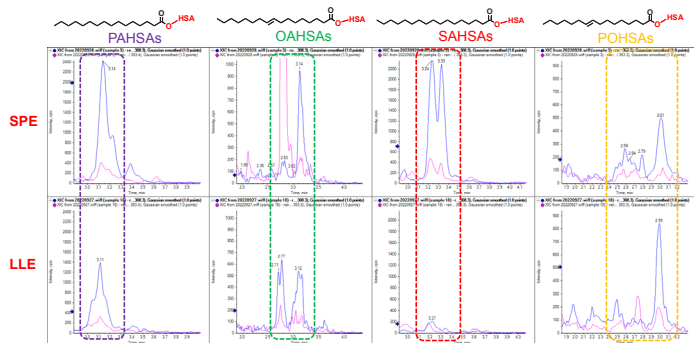


图5. SPE和LLE两种前处理方法检测4个家族FAHFA对比

结论

本文运用前处理结合化学衍生的方法，检测到了生物体中的FAHFAs，该方法衍生简单，灵敏度高，稳定，重现好。对于FAHFAs的检测，LLE和SPE两种血浆前处理方法均可检测到血浆中FAHFAs，SPE的前处理方式可能会更好。

参考文献

1. Zhu Q.F., Yan J.W., Gao Y., Zhang J.W., Yuan B.F., Feng Y.Q., Highly sensitive determination of fatty acid esters of hydroxyl fatty acids by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2017, 1061-1062, 34
2. Huang Y.Q., Wang Q.Y., Liu J.Q., Hao Y.H., Yuan B.F., Feng Y.Q., Isotope labelling – paired homologous double neutral loss scan-mass spectrometry for profiling of metabolites with a carboxyl group, *Analyst*, 2014, 139, 3446
3. Zhang T., Chen S., Syed I., Ståhlman M., Kolar M.J., Homan E.A., Chu Q., Smith U., Borén J., Kahn B.B., Saghatelian A, A LC-MS-based workflow for measurement of branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids, *Nature Protocols*, 2016, 11, 747

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15355-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：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)