

## 液质联用结合化学衍生技术测定生物体内短链脂肪酸(SCFA)

# Analysis of short-chain fatty acids (SCFAs) 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:** Short-chain fatty acids (SCFAs), LC/MS, 化学衍生

### 前言

短链脂肪酸 (SCFA, 乙酸, 丙酸, 丁酸等) 是生物体内很常见的物质, 由于其分子结构小且稳定, 其在CID下产生的碎片离子少且强度低, 所以在液质联用MRM检测下往往基线较高, 限制其灵敏度, 碎片离子少导致MRM离子对少, 通常使用MIM的模式检测, 既Q1和Q3均扫描母离子, 在基质干扰下无法区分干扰峰和目标峰, 也限制了其检测准确度。所以在使用液质联用技术检测短链脂肪酸仍然有一定的难度。

因此, 本文使用液质联用结合化学衍生技术测定生物体内SCFAs。使用化学衍生技术, 将叔胺基团衍生至脂肪酸结构上, 既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, 可在正离子模式下检测脂肪酸, 衍生后产物可产生稳定高强度的碎片离子, 既每种脂肪酸至少又二对以上MRM离子对对其检测, 不仅提高了检测灵敏度也提高了的准确度。仅需不到1  $\mu$ L即可检测到SCFAs。

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

用于化学衍生的试剂为N,N-二甲基1,4-丁二胺 (DMBA), 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SCFAs, 10  $\mu$ L血浆加入40  $\mu$ L乙腈沉淀蛋白, 蛋白充分沉淀后, 放置低温 (4  $^{\circ}$ C) 离心机, 高速 (12000 rpm) 离心10 min, 取上清, N<sub>2</sub>吹干后备用。

化学衍生流程参考以下文献<sup>[1]</sup>, 反应流程如下 (图1), 过前处理吹干生物样品用100  $\mu$ L的ACN进行复溶。加入10  $\mu$ L CMPI (20  $\mu$ mol/mL) 和20  $\mu$ L TEA (20  $\mu$ mol/mL) 混匀, 随后加入20  $\mu$ L DMBA (20  $\mu$ mol/mL) 进行化学衍生。将反应液置于40  $^{\circ}$ 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1mL纯水复溶后纯水稀释500倍后进样。

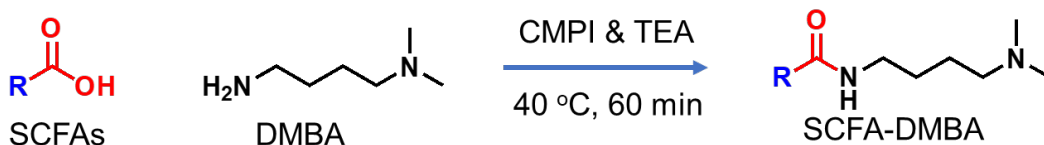


图1. SCFAs化学衍生反应

## 仪器设备

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



### 液相条件:

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

柱温: 40 °C

进样体积: 1 μL

流动相: A为水 (含0.1%甲酸, v/v), B为乙腈

流速: 0.4 mL/min

梯度如下: 见表1

表1. SCFA色谱分离梯度

Time [min]	A.Conc [%]	B.Conc [%]
0.00	95.0	5.0
0.50	90.0	10.0
3.00	5.0	95.0
4.00	5.0	95.0
4.10	95.0	5.0
6.00	95.0	5.0

### 质谱条件

离子源: ESI源; POS模式;

扫描方式: MRM

离子源参数:

IS电压: 5500 V;

气帘气CUR: 35 psi;

雾化气GS1: 60 psi;

辅助气GS2: 65 psi;

离子源温度为550 °C;

碰撞气: Medium

MRM参数如表2所示 (SCFA\*: 定量离子对)

表2. SCFA的MRM参数

ID	Q1	Q3	DP	CE
AA-DMBA-1	159.1	114	10	17
AA-DMBA-2*	159.1	100.1	10	19
AA-DMBA-3	159.1	72.1	10	21
BA-DMBA-1	187.1	142.1	15	19
BA-DMBA-2*	187.1	100	15	23
BA-DMBA-3	187.1	72.1	10	24
PA-DMBA-1*	215.1	170.2	20	21
PA-DMBA-2	215.1	100.1	20	25
PA-DMBA-3	215.1	72.1	15	26

### 数据处理及数据分析

使用Analyst软件采集数据, SCIEX OS软件对采集的数据进行分析。

## 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, 由于短链脂肪酸分子的结构特征, 其无法产生强度高并且典型的碎片离子, 往往采用SIM模式或者MIM模式对其检测, 既仪器扫描时只选择母子, 这往往导致了基线过高, 并且色谱流动的弱酸性会抑制其在ESI源内的电离, 进一步的影响了检测灵敏度。另一方面, 检测时, 没有至少两对离子对来辅助定性, 在复杂的生物基质下, 杂峰也会干扰定性, 造成假阳性结果。为了解决以上问题, 本文采用化学衍生的方法, 方法如图2, 将含有叔胺和四个碳链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; 其次, 衍生产物由于碳数的增加, 使得使用反相色谱时, 其衍生产物的保留增强, 解决了短链脂肪酸在反

相色谱上保留差的问题，避免了共流出产生的相互干扰和信号抑制；最后衍生产物可以产生稳定且强的碎片离子（图2），比如稳定的45Da的中性丢失，以及质荷比100和72两个碎片离子，所以，对于SCFAs的检测，每种SCFAs的检测MRM离子对，增加至3对，由于不是SIM和MIM方式，其大大的降低了基线，提升了检测灵敏度，并且有多个离子对辅助定性，在复杂的生物基质下，造成假阳性概率大大降低。

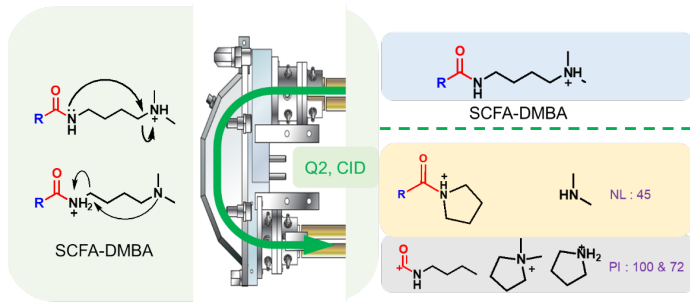


图2. 衍生产物在质谱碰撞池中碎裂模式

## 2. 血浆中SCFAs检测

以乙酸（AA），丁酸（BA）和戊酸（PA）为例，对人和小鼠的血浆建立分析方法。色谱图，标曲和线性范围如图3所示。三种SCFAs线性良好， $r^2 > 0.99$ 。0.1ng/mL浓度下重复8次RSD均小于5%（3.6%），提取离子色谱图如图4所示，三种浓度（0.1, 10和200 ng/mL）下准确度在85.0%至111.5%之间，重复性和准确度良好，如表3所示。方法对于乙酸，丁酸和戊酸的定量下限分别为0.01, 0.05和0.1ng/mL。

建立分析方法后，对人及小鼠血浆内三种SCFA进行了定量检测。色谱图如图5所示。血浆稀释50000倍后，仍然可检测到，仅需不到1  $\mu$ L即可检测到血浆中的SCFAs，可用于痕量血浆中SCFAs的检测。最后定量小鼠和人血浆中三种SCFA，浓度在120.5至490.2 mg/L范围内，如表4所示。

表3. 乙酸，丁酸，戊酸的LOQ，准确度和重复性

	Linear range ng/ml	LOQ ng/ml	Accuracy (ng/mL, %)			Repeatability (RSD%, n=8) 0.1 ng/mL
			0.1	10	200	
Acetic acid-DMBA	0.1-200	0.01	111.5	97.4	100.7	2.7
Butanoic acid-DMBA	0.1-200	0.05	85.0	113.4	99.1	3.6
Pentanoic acid-DMBA	0.1-200	0.1	107.7	99.4	97.2	3.6

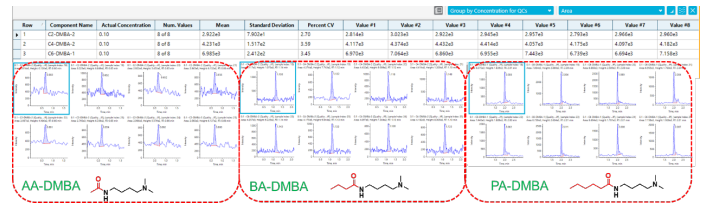


图4. 0.1 ng/mL浓度下连续进样8针色谱图及稳定性

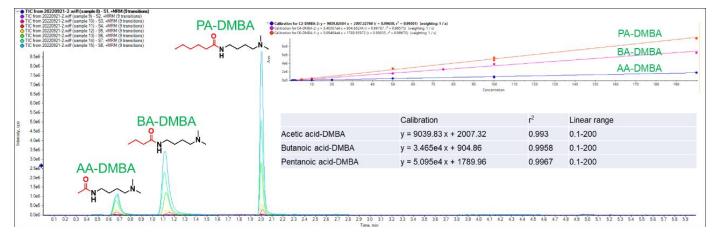


图3. 乙酸，丁酸，戊酸的色谱图，标准曲线及线性范围

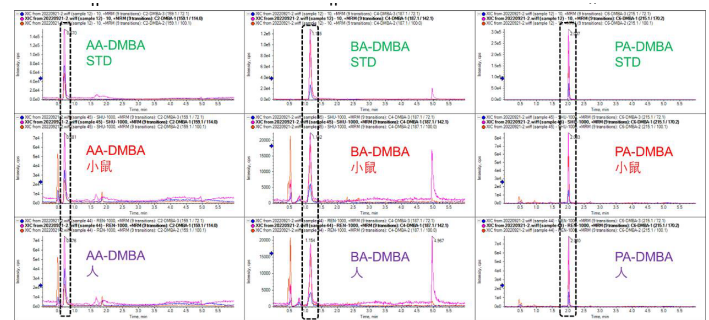


图5. 标准品，小鼠和人血浆中乙酸，丁酸，戊酸衍生产物色谱图

表4. 小鼠和人血浆中乙酸, 丁酸, 戊酸浓度

	人血浆 (mg/L)	小鼠血浆(mg/L)
Acetic acid	484.8	490.2
Butanoic acid	104.5	120.5
Pentanoic acid	158.3	173.4

## 结论

本文运用前处理结合化学衍生的方法, 检测到了生物体系中的SCFAs, 该方法衍生简单, 灵敏度高, 稳定, 重现好。对于检测SCFAs, 仅用不到1微升血浆即可检测出其中的SCFAs, 后期可运用于痕量生物样本——比如干血斑——中SCFAs的检测。

## 参考文献

- 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

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15699-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](http://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](#)