

应用电子活化解离技术在一次实验中完成脂质结构表征

ZenoTOF™ 7600系统结合液相短梯度完成分析

Complete structural elucidation of lipids in a single experiment using electron activated dissociation (EAD)

Mackenzie Pearson¹, Christie Hunter¹, Takashi Baba²

¹ SCIEX, USA, ² SCIEX, Canada

近几十年来，脂质研究领域得到了极大的发展。最初脂质被认为只是细胞膜的简单结构成分，但正在进行的脂质及其功能的研究已经表明这些不同的脂质分子在许多生物活动过程中发挥着积极的作用。最近的一些研究表明，脂质在许多疾病发生过程中起着直接作用或者存在因果关系，如老年痴呆症、代谢综合征以及溶酶体储存障碍等疾病¹。这些脂质也被认为是潜在的生物标志物。例如，磷脂的双键位置从 $\Delta 7$ 位转移至 $\Delta 9$ 位的变化可能成为乳腺癌的生物标志物²，以及磷脂酰肌醇中酰基链 sn-1和sn-2位置的变化有可能成为前列腺癌的尿液标志物³。

脂质在疫苗、遗传物质和其他小分子药物等传递过程中的作用也引起了广泛的关注。脂质纳米粒（LNP）是一种新型的药物载体传递系统，它是由一种脂质外壳将药物包裹在中间形成的。脂质纳



single experiment \rightarrow *de novo* analysis \rightarrow PC 16:0 / 18:1(n-9:cis)

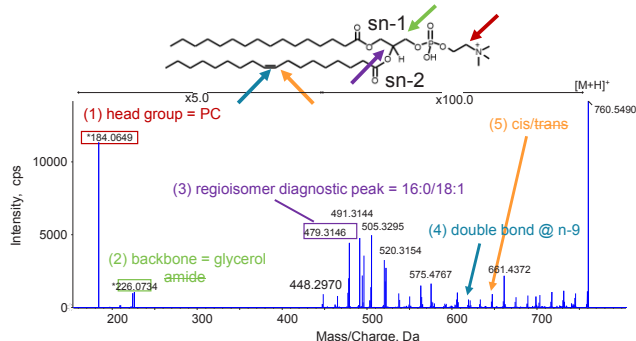


图1.脂质的完整表征。一张MS/MS质谱图可鉴别脂质为PC 16:0/18:1(n-9:cis)，可鉴别到脂质类别，头基，脂肪酸，脂肪酸连接位置（位置异构）、双键位置以及立体化学结构（顺式/反式）。

米粒目前已被批准用于多种治疗药物以及SARS-CoV-2疫苗，mRNA-1273（Moderna）和BNT162b2（BioNTech）⁴。

虽然脂类通常分为特定的亚类和构型，但脂质的种类依然非常庞大。脂类的鉴定不仅仅包括分子组成的鉴定，也包括特征部分的详细信息，例如种类、头基、不同脂肪酸链的长度，修饰，连接点，双键的数目和位置，甚至顺式/反式结构。因此，脂质分子的完整的结构表征通常是一项艰巨的任务，需要使用不同的方法进行一系列的表征鉴定工作。

在这里，ZenoTOF™ 7600系统的电子活化解离（EAD）技术可以在一次实验中表征甘油磷脂、鞘磷脂和酰基甘油的完整结构。与更常用的碰撞活化解离（CID）相比，电子活化解离（EAD）技术提供了丰富的特征碎片离子，这对完整表征脂质结构至关重要。

EAD和ZenoTOF 7600系统用于脂质分析的主要特点

- 电子活化解离 (EAD) 技术与碰撞活化解离 (CID) 技术是完全不一样的碎裂机理, 可提供更丰富的碎片信息从而进行更完整的脂质结构表征
- 针对不同的应用, 可调能量进行不同碎片离子的优化
- EAD与Zeno™ trap(Zeno阱)相结合可保证快速液质联用 (LC-MS) 分析和数据依赖型采集 (IDA) 所需要的高灵敏度

脂质表征鉴定面临的挑战

脂质代谢途径研究计划 (LIPID MAPS) 联合会将脂质分为8种不同的类别: (1) 脂肪酰基, (2) 甘油酯, (3) 甘油磷脂, (4) 鞘脂, (5) 固醇脂质, (6) 丙烯醇脂质, (7) 糖脂, (8) 聚酮化合物。每类脂质可根据脂质结构的详细信息再进一步划分成不同的亚类, 例如, 对于甘油磷脂, 如果去确认它具体的亚类必须通过完整的结构表征才能确定。包括

- 种类
- 总的成分组成
- 脂肪酸水平
- 位置异构体
- 双键位置

- 顺式/反式构型

考虑到所有这些因素可进行不同的组合形成不同的亚类。甚至组成超过10000多种的不同的甘油磷脂都是有可能的。如果脂肪酸的修饰的因素也考虑在内, 那么可能形成的脂质类型会更多。

举个例子, 对于特定成分组成的脂质PC34:1, 仅这一种脂质就有40种不同的排列组合方式, 如在线动画所示。这就需要一种费时费力的方法进行该类脂质的完整表征工作。这些表征工作的实现需要用到如图2所示的利用各种各样的分析技术和实验方法。

电子活化解离技术 (EAD) 分析脂质

ZenoTOF™ 7600系统配备有电子活化解离技术⁵。基于电子的碎裂模式通常情况来说灵敏度相对较低。但是与ZenoTOF 7600系统的Zeno™ trap(Zeno阱)配合使用, 在液相短梯度条件下进行分析, 可以获得高灵敏度、快速, 重现性好的基于电子的MS/MS质谱碎裂信息。此外, 调节碎裂的电子能量可以优化感兴趣的化合物。电子捕获解离 (ECD) 模式用于多电荷前体离子, 例如多肽。高能电子模式, 例如电子轰击提取离子 (EIEIO) 技术主要用于单电荷离子 (如脂类) 的碎裂。ZenoTOF 7600系统的电子能量可从从小于0.2 eV调整到20 eV以上, 因此适用于大范围的化合物分析。

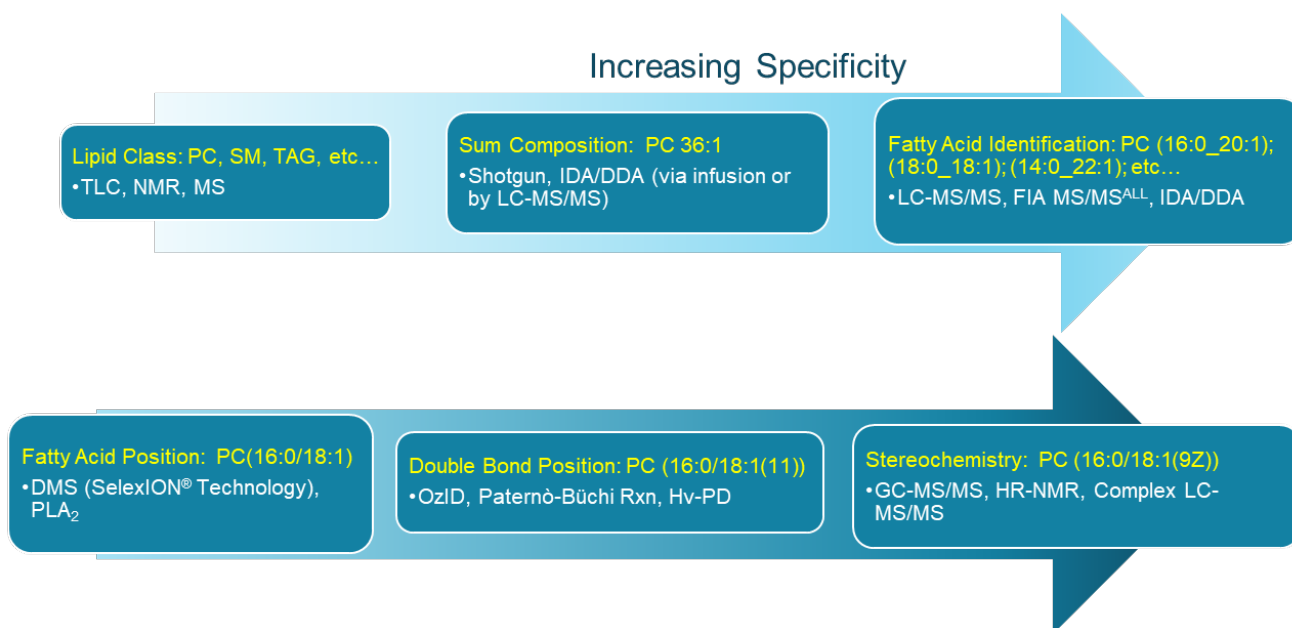


图2. 脂质结构特异性的多个层面。目前, 没有一种商业技术能够完全表征脂质。一般需要多个不同的技术、平台和实验。而使用ZenoTOF 7600系统的EAD技术可以在一个实验内获得上述黄色字体标记的所有信息从而实现脂类的完整表征

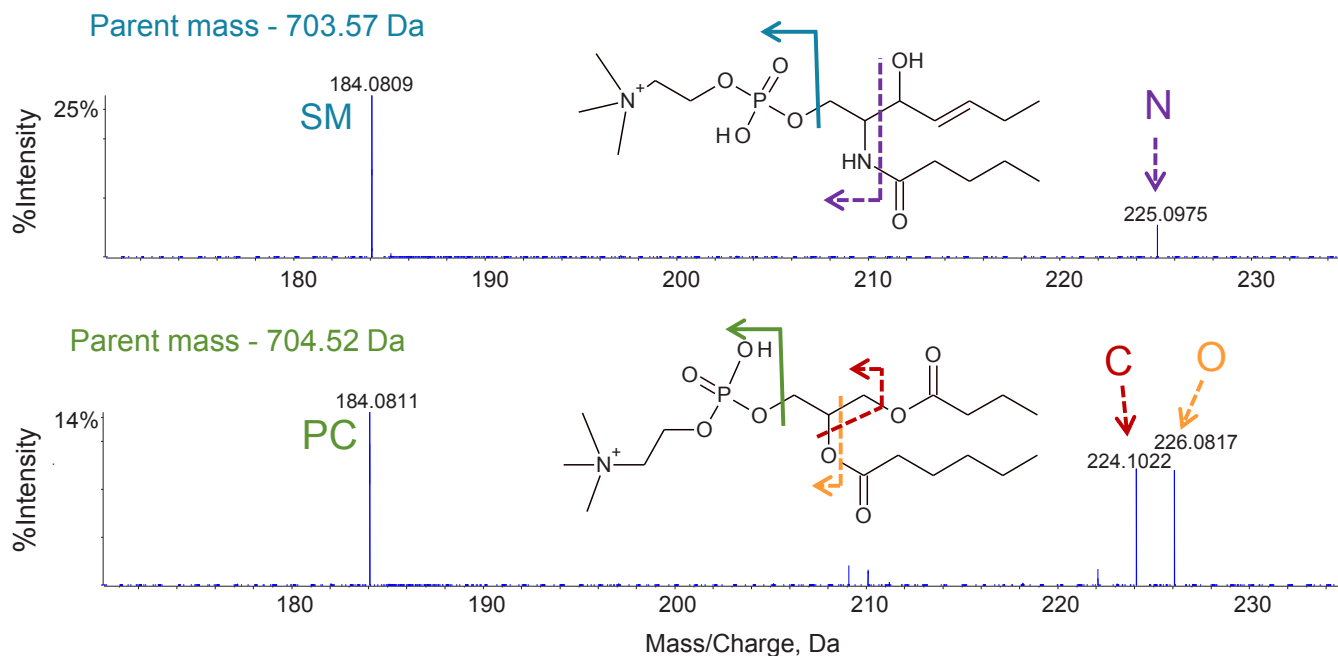


图3. 鞘磷脂和磷脂酰胆碱的EAD MS/MS质谱图。低质量端的特异碎片离子 m/z 184确定了PC头基，用含有氮 (m/z 225) 或者碳和氧 (m/z 224和226) 的碎片离子区分鞘磷脂 (上图) 和磷脂酰胆碱 (下图)。不同颜色显示每个碎片离子来自主干的具体位置。

使用ZenoTOF 7600系统和EAD电子活化解离技术，通过一次EAD实验就可以获得如图2中黄色字体的所有信息。与图1所展示的一样，之前讨论过的甘油磷脂 (PC 34:1)，一次Zeno EAD实验就确定了脂质的类别，头基，脂肪酸类型，脂肪酸连接位点 (区域异构)，是否存在双键以及双键的位置。它还显示了该脂质是顺式还是反式结构，从而揭示了完全的脂质表征结果为PC 16:0/18:1(9Z)。

通过鉴定羰基位置区分鞘磷脂与磷脂酰胆碱

脂质头基的化学成分有很大的差异，它们影响着不同的结构特征，如细胞膜流动性和渗透性以及可以调节各种生物功能，例如底物运输和细胞信号传递。脂质头基的鉴定就是进行脂质结构表征中一个最直接的任务，而Zeno™ EAD(Zeno电子活化解离)中仍然可以观察到特征的碎片离子信息。

磷脂酰胆碱 (甘油磷脂的一种) 和鞘磷脂在结构和分子量上相似，并且共用一个磷脂酰胆碱 (PC) 的头基。图3清晰地展示了通过磷脂酰胆碱 (PC) 特征碎片 m/z 184来鉴定拥有共同头基的鞘磷脂 (上图) 和磷脂酰胆碱 (下图) 的过程。

为了区分这两类脂质，分析了碎片离子对应的胆碱头基在脂质主干结构上的连接位点。甘油磷脂的甘油单元位于脂质分子的中间，并且其头基连接到脂质分子的一端。EAD产生两个特征碎片离子： m/z 224含有一个碳原子和 m/z 226甘油主链含有一个氧原子 (图3，下图)。这一对离子是磷脂酰胆碱特异性的碎片信息。然而，对于鞘磷脂，它并不是甘油主链骨架，而是长链氨基醇鞘氨醇位于分子的中心。EAD可进行酰胺碎裂从而产生 m/z 225含有酰胺氮原子的特征碎片离子 (图3，上图)。另外一些特异性的碎片离子也在最近的一些文献资料中发表，有助于进一步区分和表征这些亚类的脂质^{6,7}。

区分位置异构体

甘油和甘油磷脂的脂肪酸链可以在几个不同的连接位点上进行连接，不同位置连接可定义为sn-1、sn-2和sn-3 (“sn”表示立体特异性编号)。虽然这些结构看起来非常相似，但近年来发现位置异构体在物理和生物学属性上有着非常明显的差异⁸。因此，鉴定连接位点现在在脂质结构表征的过程中也是一个至关重要的问题。

TAG 18:1(N-12Z)/18:1(N-9Z)/18:1(N-12Z) – Neat Standard

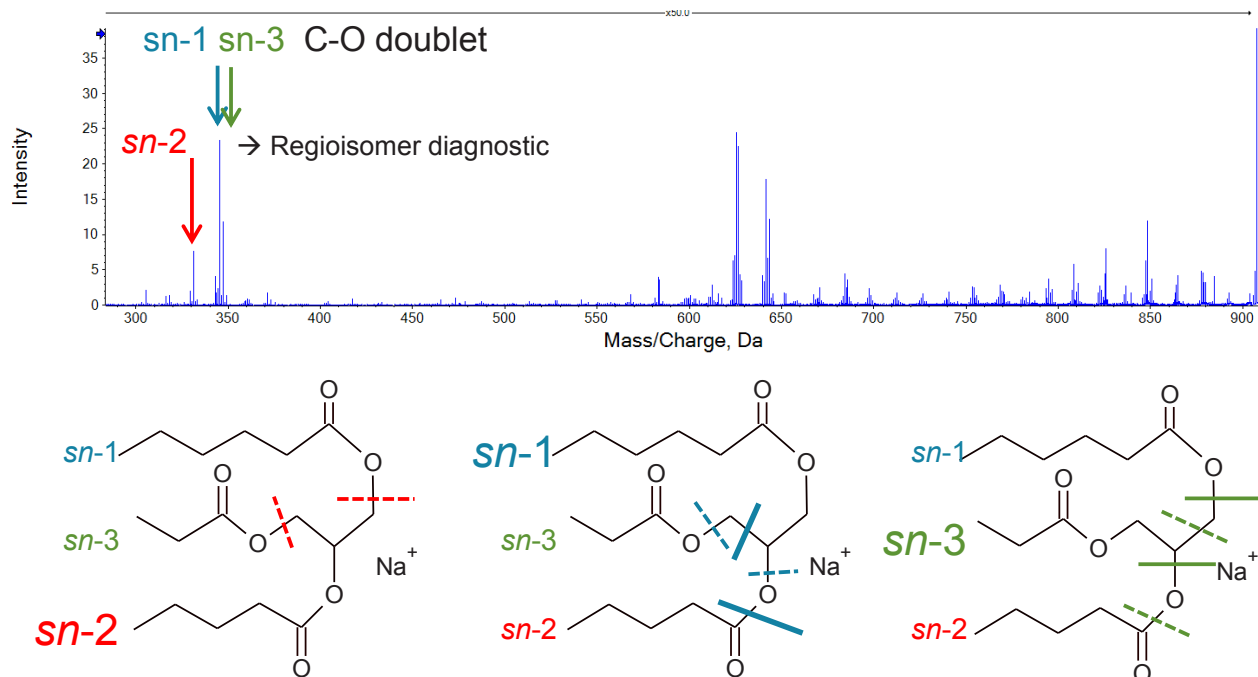


图4. 位置异构体的区分。 sn-2连接位点与sn-1/sn-3连接位点的位置可以通过双链的丢失碎片离子检测来进行区分。对于sn-2型结构，只能观察到单个碎片离子，因为所有碎片模式会产生相同的分子式产物离子。相反，对于sn-1或sn-3型结构，可以观察到一对碎片峰，其中一个裂解模式终止于亚甲基 ($-CH_2-$) 而另一种断裂模式终止于氧

图4显示了甘油三酯标准品的Zeno-EAD质谱图，三种脂肪酸中有两种是相同的 (18:1 (N-12Z))，第三种区别于另两种主要是双键位置的转移 (18:1 (N-9Z))。脂肪酸的sn-1、sn-2或sn-3连接位点可以通过区分两条链的丢失碎片来实现，这些丢失碎片依然含有脂肪酸链及其链接位点。每种位置异构体的两种不同的碎片模式可在近期发表的刊物文献中看到。在sn-2情况下，两种模式的两个断裂位点会产生相同质量的相同产物。因此，只能观察到一个碎片峰。然而，在sn-1或sn-3情况下，两个断裂位点就会出现在碳（对于一种模式）之后，以及碳和氧之后（另一种模式）。因此，就会出现一对离子，且低质量离子峰强度更高。此外，成对峰之间的1.98da差异指示较轻片段包含 CH_2 基团而较重的碎片含有氧而不是 CH_2 基团。

确定脂肪链的长度和双键的位置

连接在脂质分子上的脂肪酸残基是促使脂质具有生物活性的基本成分。这些长碳链的长度变化很大，可以是完全饱和碳链或者通过有单个或多个双键形成不饱和区域。因为脂肪链的长度以及任何不饱和键的存在及位置都会极大地影响脂质结构和功能，因此脂肪

酸链的完整表征对于研究脂质的生物活性是必不可少的。

两条链丢失碎片之间的质量差异（在上一节中讨论）和完整的前体离子提供了关于每一条链含有的碳数以及是否有双键等信息。此外，EAD还产生一系列丰富的碎片，这些碎片主要是源于完整的前体离子从脂肪酸链上连续丢失 CH_2 产生的一系列碎片。这些碎片通常跨越脂肪酸链的整个长度，从而帮助确认链条本身的长度。通过观察分析每个连续的碳丢失产生的碎片峰可以揭示双键的位置。

图5显示了从C2C12肌管中提取的脂质混合物的二维洗脱曲线。数据是使用数据依赖型采集 (Zeno IDA) 实时快速采集EAD MS/MS数据，采用正相色谱系统进行脂类色谱分离。这些样品中含有多种不同脂类的混合物，使用IDA谱图查看可对不同脂类进行同时可视化。在这里我们可以清楚地观察到脂链延伸（添加2个碳）时常见的C2间隔。每个蓝色的框内里都含有一系列相差2个碳的脂质。每个蓝框内不同的洗脱时间都具有不同程度不饱和度的脂类。这项研究通过LC-MS/MS法对这种复杂混合物进行了几乎全部总脂质的表征，并鉴定和表征了许多常见的以及不常见的脂质种类，包括浆细胞以及磷脂酰胆碱与多种加合物的醚键结构连接。

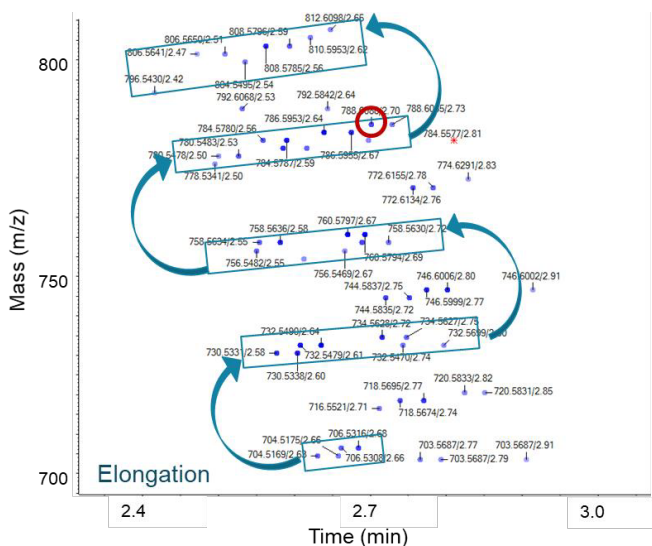


图5. Zeno EAD IDA采集从C2C12肌管中提取的脂质数据。不同链长的脂质呈阶间隔质量增加。不同链长的不同饱和度的脂质随时间洗脱（蓝色框）。红色圆圈脂质在图6中展示，红色星号标记表示含有与钾加合的脂质。

举个例子，EAD可以提供的完整信息的一个例子，即使在非常快速LC-MS/MS时间梯度维度上，图6也显示了图5中红色圆圈表示脂质的质谱图。高质量端区域做了放大以显示脂肪酸链碎片的细节。可以清楚的观察到前体离子连续丢失碳的相差14Da (-CH₂-)的紧密连续峰群。当在链长中观察到双键时会发现到特征的相差12Da (-C=)的峰。

区分双键的顺式与反式结构

最难解释的结构问题之一就是饱和脂肪酸双键周围的立体化学结构问题，到底是顺式还是反式结构。顺式结构，也称为“Z”（来自德语zusammen）是将所有重要的结构成分沿着双键的同一侧对齐，而反式结构或者“E”（来自德国entgegen）则将这些结构成分分布在双键的两侧。使用EAD电子活化离解技术，由双键旁边的C-C单键断裂产生的峰强度比值可用于确定是顺式或是反式结构。明确地说，就是在碳链的甲基末端，自由基断裂和丢氢的非自由基断裂，在顺式和反式异构体中具有不同的强度。这些离子在固定能量下的强度比，可以图解说明这些双键的立体化学结构（数据未显示），Baba等人（2017）发表的文献中有更详细的描述⁹。

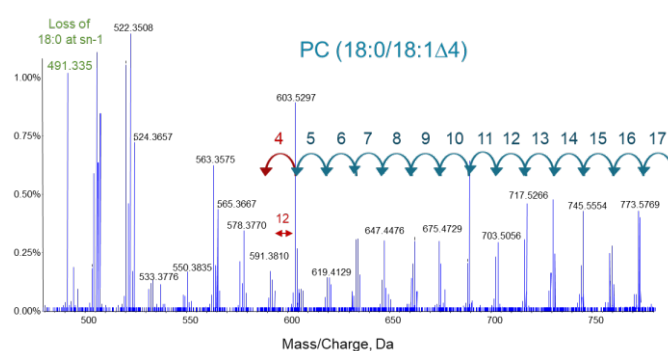


图6. 不饱和脂质的EAD MS/MS图谱，高质量端区域做了放大以显示烷基链的碎片信息，双键的位置信息可通过检测一系列碳丢失产生的离子来确定。此外，对于对应于双键位置的离子，这些碎片峰的强度通常较低。

结论

本文展示了使用ZenoTOF™ 7600系统的电子活化离解（EAD）进行脂质结构完整表征的新方法。电子活化离解（EAD）可产生丰富的MS/MS数据并且能够产生特异性的碎片离子，这些碎片离子的碎裂模式以及峰强度可以用来解析完整的脂质结构。另外，结合Zeno™ trap(Zeno阱)进行电子活化离解（EAD）实验是一种高灵敏度，重现性好，快速高效的分析方法，可以在液相分离过程中对于复杂混合物中脂类进行实时动态的表征鉴定。

- 脂质的完整表征在一个单一的实验过程内就可以完成，包括
 - 脂质的分类和头基的鉴定-在这里强调了鞘磷脂和磷脂酰胆碱的区分，同样对于许多其他脂类来说也是可以进行表征¹⁰
 - 脂肪酸链长度和连接位点的测定可进行脂质的表征（sn-1/sn-3和sn-2位置异构化）
 - 双键的位置以及顺式反式立体结构的测定
- 使用Zeno trap大大增强了电子碎裂的灵敏度，从而获得灵敏度更好的MS/MS质谱图
- 由于灵敏度的提高，Zeno EAD可与数据依赖型采集（IDA）技术相结合在超高液相色谱系统的短梯度分离方法进行实时分析
- 利用Zeno EAD产生的特异性的碎片离子可以用于区分密切相关的脂类
- 能量可以进行调节，这就可以保证快速高效获得感兴趣的碎片离子，单电荷离子的碎裂解离需要高能量而多电荷离子碎裂解离需要非常低的能量

参考文献

1. Finkelstein J, Heemels MT, Shadan S, Weiss U. (2014) Lipids in health and disease. *Nature*. 510(7503): 47.
2. Perrotti, F., et al. (2016) Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. *Int J Mol Sci*. Nov 28;17(12):1992.
3. Ma, X., et al. (2016) Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: A shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 8;113(10):2573-8.
4. Anselmo, A., Mitragotri, S. (2019) Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med*. Sep; 4(3): e10143.
5. Qualitative flexibility combined with quantitative power -Using the ZenoTOF 7600 system, powered by SCIEX OS Software. SCIEX technical note RUO-MKT-02-13053-A.
6. Campbell, J. L., Baba, T. (2015) Near-complete structural characterization of phosphatidylcholines using electron impact excitation of ions from organics *Anal. Chem*. 87, 5837-5845.
7. Baba, T., et al. (2016) In-depth sphingomyelin characterization using electron impact excitation of ions from organics and mass spectrometry *J Lipid Res*. 57(11):858-867.
8. Baba, T., et al. (2016) Structural identification of triacylglycerol isomers using electron impact excitation of ions from organics (EIEIO) *J Lipid Res*. 57(11): 2015-2027.
9. Baba, T., et al. (2017) Distinguishing cis and trans isomers in intact complex lipids using electron impact excitation of ions from organics mass spectrometry. *Anal. Chem*. 89(14), 7307-7315.
10. Baba, T., et al. (2018) Quantitative structural multiclass lipidomics using differential mobility: electron impact excitation of ions from organics (EIEIO) mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. 59: 910-919.
11. Complexity of the lipidome. SCIEX community post RUO-MKT-11-13093-A.

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。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13050-ZH-B



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：SCIEX-China