

银离子高效液相色谱-质谱法分析血清中 甘油三酯类化合物的组成

杨 芹, 石先哲*, 单圆鸿, 窦阿波, 许国旺

(中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 针对甘油三酯(TAG)类化合物的复杂性,建立了分析小鼠血清中TAG类化合物的方法。采用经典的氯仿-甲醇溶剂体系对血中的TAG类化合物进行提取。脂质提取物经 Varian ChromSpher 5 Lipids 柱分离,在 0.75 mL/min 的流速下以乙腈-正己烷(1:99, v/v)为流动相进行等度洗脱,采用大气压化学电离源正离子模式电离,质谱增强型全扫描、增强型子离子扫描和中性丢失扫描模式检测。根据银离子色谱对双键的保留规律以及质谱所给出的碎片离子信息,对血清中TAG类化合物进行了结构鉴定。结果表明采用该方法可以从小鼠血清中鉴定到 66 个 TAG 类化合物以及 5 个胆固醇酯。该方法简单,重现性好,可通用于其他样品中TAG类化合物的检测。

关键词: 银离子高效液相色谱; 大气压化学电离质谱; 甘油三酯类化合物; 血清

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)09-0876-07

Triacylglyceride profiling in serum by silver ion high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

YANG Qin, SHI Xianzhe*, SHAN Yuanhong, DOU Abo, XU Guowang

(CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences (CAS), Dalian 116023, China)

Abstract: A simple and effective method was developed to investigate triacylglyceride (TAG) compounds in biological matrices using silver ion high performance liquid chromatography-mass spectrometry (Ag^+ -HPLC-MS). The TAG compounds from mouse serum were extracted by a modified Folch method using the classical CHCl_3 -MeOH solvent system. The extract was separated on a Varian ChromSpher 5 Lipids column with isocratic elution using acetonitrile-hexane (1:99, v/v) as mobile phase at a flow rate of 0.75 mL/min, and detected by a mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source in positive ion mode to acquire sufficient MS information of TAG compounds by enhanced mass spectrometry (EMS), enhanced product ion (EPI) and neutral loss (NL) scans. The identification of TAG compounds was based on their chromatographic behaviors and MS data. Besides, the NL scans of thirty fatty acids were performed to further validate the results. Finally, 66 TAG compounds as well as 5 cholesteryl ether (CE) compounds were obtained from the mouse serum extract. This method is simple, reproducible and also suitable for the analysis of TAG compounds in other samples.

Key words: silver ion high performance liquid chromatography (Ag^+ -HPLC); atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS); triacylglyceride compounds; serum

甘油三酯(triacylglyceride, TAG)类化合物由 1 个甘油分子与 3 个脂肪酸酯化而成,是生物体内重要的储能物质^[1,2]。TAG 的结构随脂肪酸种类及其

与甘油分子结合位点的不同(stereo-specific number, sn-1, 2, 3)而呈多样性,这使得 TAG 类化合物成为一类极具复杂性的化合物。在大多数研究 TAG 的

* 通讯联系人: 石先哲, 博士, 副研究员, 主要从事色谱-质谱联用及代谢组学研究。E-mail: shixianzhe@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060086, 20805045)和国家“973”计划课题(2012CB720801)。

收稿日期: 2012-05-11

文献中, 单个 TAG 分子多用其等价碳数(equivalent carbon number, ECN) 及双键个数(double bond number, DB) 来表示^[2]。这一方面是由于 TAG 脂肪酸组成不易得到, 另一方面则可能是在生物学上生物体对 TAG 的利用更多的与其 ECN 有关。TAG 的等价碳数也称分离数(partition number, PN), 与组成 TAG 的 3 个脂肪酸链的总碳数(carbon number, CN) 和 DB 有关, 其关系是: $PN = CN - 2DB$ ^[3]。

目前诸多分析手段已成功应用于 TAG 类化合物的分离分析。临床上广泛使用的酶解法一般采用商品化的试剂盒, 方便快捷, 结果准确。但其所得到的信息是关于血清中 TAG 的总量, 并不能提供 TAG 组成的具体信息^[4, 5]。对此, 需借助于色谱或光谱学的方法^[6, 7]。这类分析方法可以得到 TAG 类化合物单体的信息, 更有利于我们了解单个 TAG 分子的作用及结构。已被应用于 TAG 的分析中的色谱方法包括薄层色谱法^[8]、气相色谱法^[9, 10]、高效液相色谱法^[11, 12]、银离子色谱法^[13, 14]、超临界流体色谱法^[15]及体积排阻色谱法^[16]等。其中应用最广泛的是非水反相色谱和银离子色谱。在反相色谱中, 由于影响 TAG 极性的不只有脂肪酸链的长短, 还有其双键个数, 所以 TAG 类化合物在反相色谱中的保留行为是其分子中的双键和 PN 共同作用的结果。对银离子色谱而言, TAG 类化合物的保留主要与其分子中双键个数相关。双键个数多的 TAG 类化合物在银离子柱上的保留较强。Lisa 等^[17]通过随机酯交换反应得到了一系列包括位置异构体在内的 TAG 标准品, 然后通过 3 根银离子柱的串联分离了部分 TAG 的位置异构体。反相色谱和银离子色谱方法还可以离线或在线联用二维系统分析 TAG 类化合物^[3, 18]。用于 TAG 类化合物的检测手段则囊括了紫外^[19]、质谱(MS)^[12, 19-26]、蒸发光散射^[12, 19]、火焰离子化^[21]、示差折光^[27]等方法, 其中占主导地位的是质谱方法。

本研究采用银离子高效液相色谱-大气压化学电离质谱(Ag^+ -HPLC/APCI-MS) 联用技术, 根据甘油三酯在银离子柱上的保留规律及其在 APCI 电离模式下的质谱裂解规律来检测和鉴定小鼠血清中的 TAG 类化合物。为了验证 TAG 类化合物中脂肪酸的种类及定性结果的准确性, 我们还对组成 TAG 类化合物的 30 种脂肪酸做了中性丢失扫描。本实验同时还检测到了与 TAG 极性相近的胆固醇酯(cholesteryl ester, CE) 类化合物。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Shimadzu Prominence 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan) 包括二元输液泵(LC-20AB)、脱气机(DGU-20A₅)、自动进样器(SIL-20A); QTrap LC/MS/MS 质谱仪(Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA) 作检测器。色谱柱为瓦里安 ChromSpher 5 Lipids 银离子色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Varian, CA)。

TAG 类化合物标准品: 十四烷酸甘油三酯(tritetradeceanoic acid, MMM0-42), 十六烷酸甘油三酯(trihexadecanoic acid, PPP0-48), 三油酸甘油酯(triolein, OOO3-48), 十六碳烯酸甘油三酯(trihexadecenoic acid, PoPoPo3-42), 三岩芹酸甘油酯(tripetroselin, PePePe3-48), 1, 2-亚油酸-3-油酸甘油酯(1, 2-dilino-oleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol, OLL5-44), 十八碳二烯酸甘油三酯(trioctadecadienoic acid, LLL6-42) 和十八碳三烯酸甘油三酯(trioctadecatrienoic acid, LnLnLn9-36) 购自百灵威公司(J&W Scientific Ltd., Germany)。

乙腈、正己烷、乙酸乙酯、氯仿、甲醇及异丙醇等溶剂皆为色谱纯, 购自 Tedia 公司(USA)。

1.2 样品处理

血清中 TAG 类化合物的提取采用经典的氯仿-甲醇($CHCl_3$ -MeOH) 溶剂体系方法^[28]。取 300 μL 小鼠血清加入 700 μL 去离子水, 混匀后加入 5 mL 甲醇, 超声 1 min 后再加入 10 mL 氯仿, 超声 1 min, 室温放置 1 h。然后于 $2\ 600 \times g$ 离心力下离心 10 min。取下层有机溶液, 氮气吹干, 封口置于 $-20\ ^\circ C$ 。在上样前复溶于 300 μL 正己烷。

1.3 分析条件

色谱分离采用等度洗脱, 流动相为含 1% 乙腈的正己烷, 流速为 0.75 mL/min, 进样量为 5 μL。

质谱检测采用 APCI 正离子模式电离, 扫描方式为增强型全扫描(enhanced MS scan, EMS)、增强型子离子扫描(enhanced product ion, EPI) 和中性丢失扫描(neutral loss scan, NL)。质谱扫描的质量范围为 m/z 300 ~ 1 200, 电晕电流 2 μA, 离子源温度 $350\ ^\circ C$, 气帘气压力 0.3 MPa, 加热气压力 0.4 MPa, 雾化气压力 0.2 MPa。

2 结果与讨论

2.1 样品处理及复溶溶剂的选择

在提取血清中的 TAG 类化合物时, 我们比较了

两种经典的脂类化合物提取方法的效率。方法一改编自 Folch 等^[28]的方法,具体的操作方法见 1.2 节。方法二是在 Bligh & Dyer 的方法^[29]上稍作改动,具体如下:在 500 μL 血清中加入 1.875 mL CHCl_3 -MeOH (1:2, v/v),混匀后加入 0.625 mL CHCl_3 ,超声提取 1 min 后,再加入 0.625 mL 水,静置、离心后取下层有机相,用氮气吹干,分析前用 500 μL 的复溶溶剂复溶。在选择复溶溶剂时,考虑到 TAG 类化

合物的极性都比较小,因此选择了脂溶性强的氯仿和正己烷。图 1 表明两种样品处理方法在提取得到的 TAG 类化合物的数量上无明显差异,但是方法一所得到的 TAG 类化合物的离子强度明显高于方法二。此外,复溶溶剂对分析结果的影响很大,极性较小的正己烷明显优于极性相对大的氯仿。因此在本实验中,选用方法一处理样品,用正己烷作为复溶溶剂。

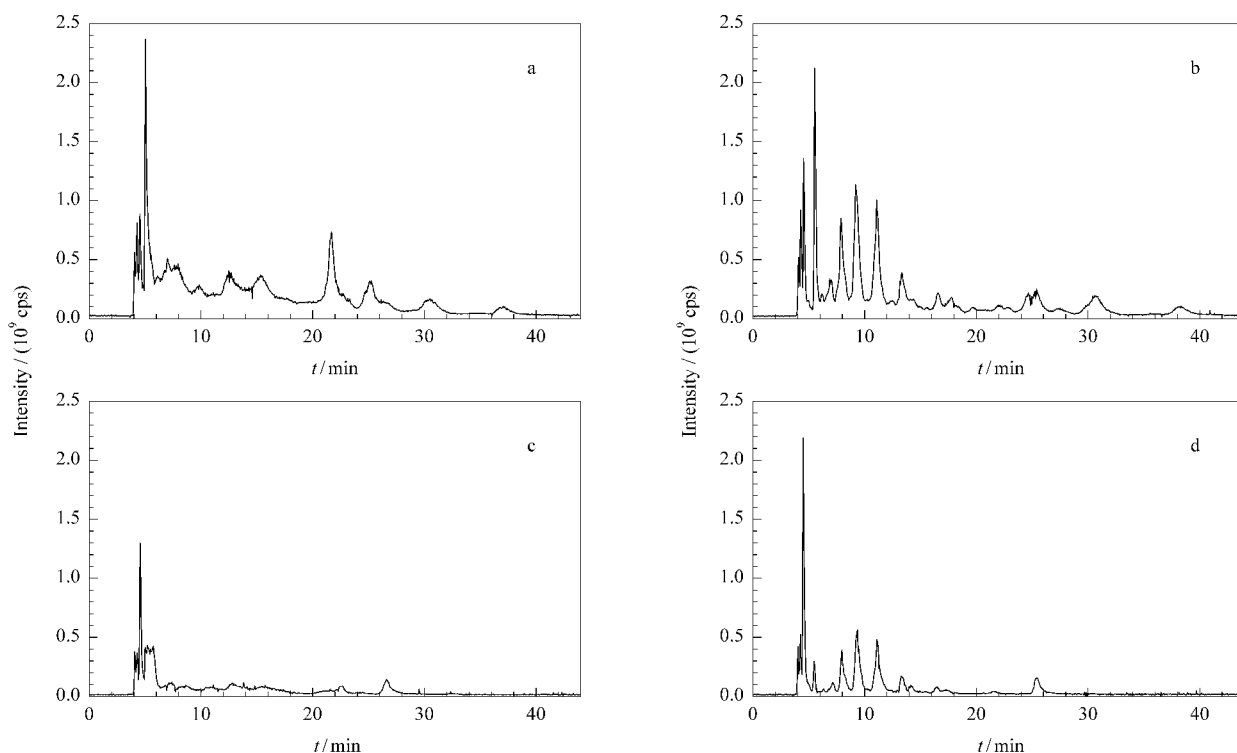


图 1 样品处理方法及复溶溶剂对血清中 TAG 类化合物分析结果的影响

Fig. 1 Effects of different sample preparations and sample solvents on the separation

a. extracted by modified Folch method (reconstructed in CHCl_3); b. extracted by modified Folch method (reconstructed in hexane); c. extracted by modified Bligh & Dyer method (reconstructed in CHCl_3); d. extracted by modified Bligh & Dyer method (reconstructed in hexane).

2.2 色谱条件的选择及优化

最初用于高效液相色谱分析的银离子柱是在阳离子交换色谱柱上灌注硝酸银溶液,使之吸附银离子制成。自制银离子柱虽然方便,但其银离子的载荷量受操作者等因素的影响,所得数据在实验室及批次间的可比性难以保证。鉴于此,本实验中我们采用商品化的银离子柱。银离子色谱所用到的洗脱溶剂大致分为 3 类,即分别基于甲苯、正己烷和二氯甲烷-二氯乙烷混合溶剂的溶剂体系。我们比较了正己烷-乙腈和二氯甲烷-乙腈这两种溶剂体系分析含有 TAG 样品的结果,发现前者的分离效果要远好于后者。因此在后续分析时,我们选择了正己烷-乙腈溶剂体系。

TAG 分子中的双键电子云可与银离子柱中的

银离子相互作用,作用力的强弱与分子中双键的个数、位置以及构型等有关。为了将 TAG 从银离子柱上洗脱下来,常规做法是在流动相中加入乙腈与 TAG 分子竞争银离子位点,通过调节乙腈浓度可达到对 TAG 类化合物的分离。实际分析中乙腈的用量很少,一般占整个洗脱溶剂的 2% 以下。我们考察了含 0.3%、0.5% 及 1% 乙腈的正己烷的分离能力,最终选定用含 1% 乙腈的正己烷进行等度洗脱。图 2a 是该条件下银离子柱对 8 个 TAG 类化合物标准品 (DB=0 3 5 6 9) 的分析结果。该流动相能在 1 h 内将 DB 为 9 的 TAG (LnLn9-36) 洗脱,又对 DB 相对较小的 TAG 有较好的分离能力。将此条件用于实际样品分析,图 2b 为 Ag^+ -HPLC/APCI-MS 分析血清中脂类的谱图。

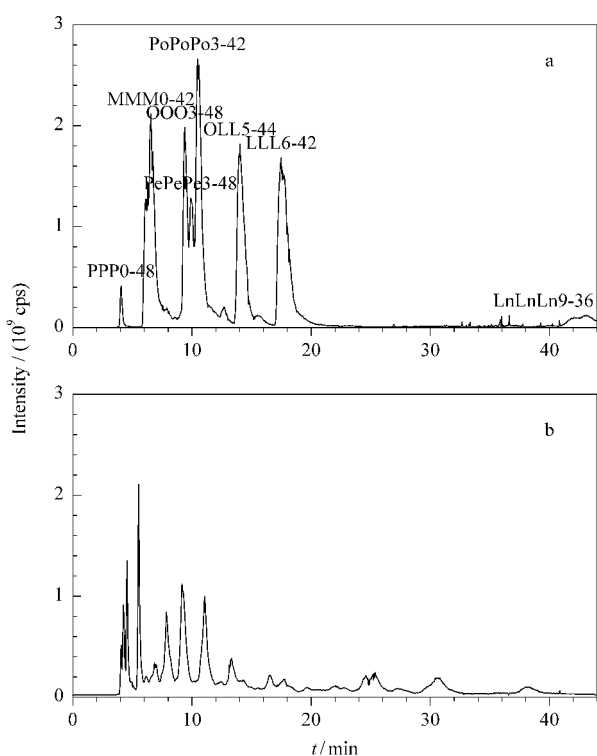


图2 Ag^+ -HPLC/APCI-MS 分析 (a) TAG 类化合物标准品及 (b) 血清提取物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of (a) nine TAG compound standards and (b) a serum extract by Ag^+ -HPLC/APCI-MS

Chromatographic conditions: column, Varian ChromSpher 5 Lipids (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); mobile phase, acetonitrile/*n*-hexane (1:99, v/v); flow rate, 0.75 mL/min.

2.3 TAG 结构的鉴定

因 TAG 极性中等,可采用 APCI 离子源进行质谱分析。通常由不饱和脂肪酸组成的 TAG 所形成的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 或 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 的离子强度比饱和脂肪酸组成的 TAG 强,而后者有时不能形成 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 或 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 离子。在碎裂时, TAG 失去一个脂肪酸链得到碎片离子 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 及 $[\text{RCO}]^+$ 可以提供该 TAG 中脂肪酸组成的信息,是鉴定 TAG 结构的主要依据。因此,在 APCI 正离子模式下 TAG 的碎片一般分布在高、中、低 3 个质量区间,分别是 $[\text{M} + \text{H}]^+ / [\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 、 $[\text{RCO}]^+$ 。在利用质谱信息解析 TAG 结构式时一般的步骤如下:首先根据 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 的差值推定分子中脂肪酸的种类,有时也可以根据 $[\text{RCO}]^+$ 来推测;然后根据 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 的个数,判断 TAG 的类型(AAA, AAB/ABA, ABC)。分别举例说明这 3 类 TAG 的鉴定方法。最简单的 AAA 型:该类 TAG 类化合物只含一种脂肪酸,因此裂解时在中质量区间只能产生一个离子碎片。例如保留时间在 11.5 min 左右的 m/z

885.8 离子。从保留时间和母离子的质量数可以推知该 TAG 的双键个数为 3、等价碳数为 48。唯一的 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ (m/z 603.7) 说明该 TAG 由单一脂肪酸组成,且此脂肪酸含有一个双键。由碎片 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 与 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 的质量数差值为 282.1 可知所含脂肪酸为 C18:1,于是此 TAG 为 C18:1-C18:1-C18:1。对于 AAB/ABA 和 ABC 型,情况则复杂些:首先根据碎片的个数来判断分子中脂肪酸的种类数,然后由 TAG 分子中 *sn*-1(3) 脂肪酸较 *sn*-2 脂肪酸易失去的规律大致推断各脂肪酸的位置。图 3a 是分子离子峰为 m/z 833.8 的 TAG 的 EPI 图,由该分子的出峰位置(7 min)及 m/z 值可以确定其双键个数为 1、等价碳数为 48。由两个中端质量数碎片 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 可知该 TAG 为 AAB/ABA 类型。根据母离子 m/z 833.8 与两个中端质量碎片 m/z 577.6、 m/z 551.6 的差值 m/z 256.2 及 m/z 282.4 得到其脂肪酸为油酸(C18:1)和棕榈酸(C16:0),结合相对分子质量可以判断该 TAG 由 2 个 C16:0 及 1 个 C18:1 的脂肪酸组成。最复杂的 ABC 型 TAG 在质谱碎裂时产生 3 个中端质量数碎片 $[\text{M} + \text{H} - \text{RCOOH}]^+$ 。图 3b 是分子离子峰为 m/z 861.8 的该类型 TAG 的 EPI 图。根据其

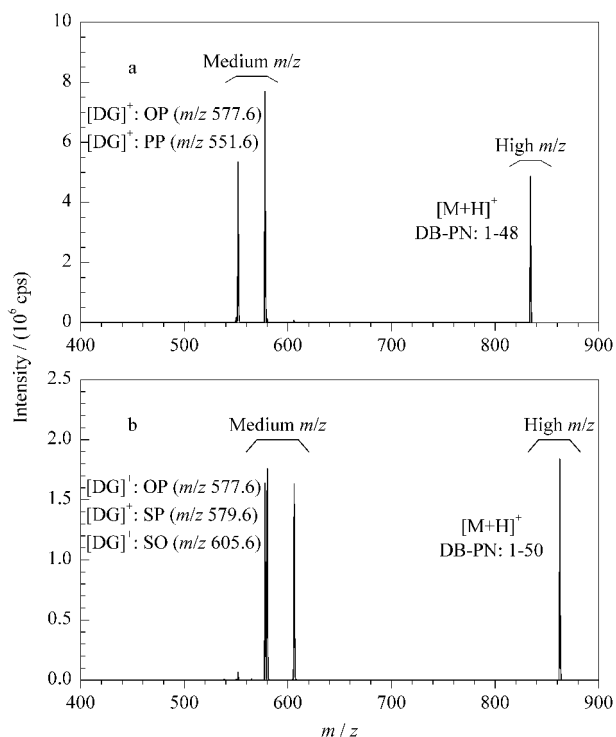


图3 TAG 类化合物的质谱定性示例
Fig. 3 Examples of the identification of TAG compounds by MS

a. EPI spectrum of m/z 833.8 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) and the assignment of the fragments; b. EPI spectrum of m/z 861.8 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) and the assignment of the fragments.

双键个数为 1、等价碳数为 50 以及中质量端的碎片 m/z 577.6、579.6、605.6 给出其脂肪酸组成的信息分别为 C16:0、C18:0 和 C18:1。为了进一步验证 TAG 鉴定结果中脂肪酸的组成,我们还对组成 TAG 的 30 个可能脂肪酸做了中性丢失扫描,30 个可能的脂肪酸包括 C8:0、C10:0、C12:0、C14:0、C16:1、C16:0、C17:1、C17:0、C18:4、C18:3、C18:2、C18:1、C18:0、C20:6、C20:5、C20:4、C20:3、C20:2、C20:1、C20:0、C22:6、C22:5、C22:4、C22:3、C22:2、C22:1、C22:0、C24:7、C24:6、C24:0。

利用上述方法得到的是 TAG 脂肪酸的组成,由于位置异构的存在,要确定 TAG 脂肪酸链的位置非常困难。在实际分析中,若要得到 TAG 分子中的脂肪酸位置排列有两种方法,一是用标准品验证保留时间及质谱碎片,二是对照文献报道的相同质谱条件下 TAG 碎片离子强度的比值(AB/AA, AB/AC/BC)。对第一种方法来说,因为实际样品中 TAG 的种类繁多,而能够得到的标准品较少,所以仅靠标准品来定性非常困难。至于第二种方法则涉及不同质谱仪得到的数据的可比性^[18]。例如图 3a 的 TAG

分子,两个 $[M + H - RCOOH]^+$ 分别对应的是 OP (C18:1-C16:0) 及 PP (C16:0-C16:0),但却不能给出 TAG 的排列是 OPP (C18:1-C16:0-C16:0) 还是 POP (C16:0-C18:1-C16:0)。查阅文献^[27]发现,OPP 标准品的 OP/PP 强度比值接近 1/2,而 POP 标准品中二者的比例接近 5/1。在本实验仪器数据与文献可比的前提下,由实验结果中 OP 与 PP 的比例接近 3:1,可以推测此 TAG 为同分异构体 OPP 和 POP 的混合物。Holčapek 等^[20]用 5 种不同的质谱仪测定了 TAG 同分异构体的 APCI 质谱图,得到的结论是仪器对 $[M + H - RCOOH]^+$ 碎片强度比值的影响要小于化合物本身 DB 及酰基链位置的影响。同时,他们也给出了可以用来鉴定同分异构体的部分 TAG 的 $[M + H - RCOOH]^+$ 比值。但多数研究工作^[2]只是根据碎片的强弱给出了脂肪酸排列可能性最大的 TAG 结构。由于没有足够的 TAG 标准品及 $[M + H - RCOOH]^+$ 碎片强度比值的文献数据,本文中我们沿袭大部分文献的做法,在表 1 中列出了从小鼠血清中鉴定的 66 个 TAG 分子可能性最大的脂肪酸排列顺序。

表 1 小鼠血清中鉴定的 TAG 类化合物
Table 1 TAG compounds identified from mouse serum

Index	DB-PN	$[M + H]^+$	Assigned TAG	Diacylglycerol (DG) ion (m/z)		
				DG ion I	DG ion II	DG ion III
1	1-46	805.7	14:0-18:0-16:1	577 (16:1-18:0)	551 (14:0-18:0)	521 (14:0-16:1)
2	1-46	805.7	18:1-14:0-16:0	549 (14:0-18:1)	523 (14:0-16:0)	577 (16:0-18:1)
3	1-48	833.8	18:1-16:0-16:0	577 (16:0-18:1)	551 (16:0-16:0)	
4	1-50	861.8	18:1-18:0-16:0	605 (18:0-18:1)	579 (16:0-18:0)	577 (16:0-18:1)
5	2-46	831.8	16:0-16:1-18:1	575 (16:1-18:1)	549 (16:0-16:1)	577 (16:0-18:1)
6	2-46	831.8	18:2-18:0-14:0	603 (18:0-18:2)	551 (14:0-18:0)	547 (14:1-8:20)
7	2-48	859.7	18:1-16:0-18:1	577 (16:0-18:1)	603 (18:1-18:1)	
8	2-50	887.8	20:1-18:1-16:0	631 (18:1-20:1)	577 (16:0-18:1)	605 (16:0-20:1)
9	2-50	887.8	18:1-18:1-18:0	603 (18:1-18:1)	605 (18:0-18:1)	
10	3-46	857.8	18:1-18:2-16:0	601 (18:1-18:2)	575 (16:0-18:2)	577 (16:0-18:1)
11	3-46	857.8	16:0-18:0-18:3	601 (18:0-18:3)	579 (16:0-18:0)	573 (16:0-18:3)
12	3-46	857.8	18:2-16:1-18:0	577 (16:1-18:0)	573 (16:1-18:2)	603 (18:0-18:2)
13	3-48	885.8	18:1-18:1-18:1	603 (18:1-18:1)		
14	3-48	885.8	18:2-20:1-16:0	629 (18:2-20:1)	605 (16:0-20:1)	575 (16:0-18:2)
15	3-48	885.8	16:0-20:0-18:3	629 (18:3-20:0)	607 (16:0-20:0)	573 (16:0-18:3)
16	3-48	885.8	18:0-18:0-18:3	607 (18:0-18:0)	601 (18:0-18:3)	
17	4-42	827.7	18:2-18:2-14:0	599 (18:2-18:2)	547 (14:0-18:2)	
18	4-42	827.7	14:0-18:1-18:3	599 (18:1-18:3)	549 (14:0-18:1)	545 (14:0-18:3)
19	4-42	827.7	18:3-16:0-16:1	573 (16:0-18:3)	549 (16:0-16:1)	571 (16:1-18:3)
20	4-42	827.7	18:2-16:1-16:1	573 (16:1-18:2)	547 (16:1-16:1)	
21	4-44	855.7	18:1-18:3-16:0	599 (18:1-18:3)	577 (16:0-18:1)	573 (16:0-18:3)
22	4-44	855.7	18:2-18:1-16:1	575 (16:1-18:1)	601 (18:1-18:2)	573 (16:1-18:2)
23	4-46	883.7	18:0-18:2-18:2	599 (18:2-18:2)	603 (18:0-18:2)	
24	4-46	883.7	18:1-18:1-18:2	603 (18:1-18:1)	601 (18:1-18:2)	
25	4-46	883.7	18:1-18:0-18:3	601 (18:0-18:3)	605 (18:0-18:1)	599 (18:1-18:3)
26	4-46	883.7	16:0-20:1-18:3	605 (16:0-20:1)	627 (18:3-20:1)	573 (16:0-18:3)

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

Index	DB-PN	[M + H] ⁺	Assigned TAG	Diacylglycerol (DG) ion (<i>m/z</i>)		
				DG ion I	DG ion II	DG ion III
27	5-40	825.9	18:2-18:3-14:0	597 (18:2-18:3)	545 (14:0-18:3)	547 (14:0-18:2)
28	5-42	853.7	18:1-18:3-16:1	599 (18:1-18:3)	571 (16:1-18:3)	575 (16:1-18:1)
29	5-42	853.7	18:3-18:2-16:0	597 (18:2-18:3)	573 (18:3-16:0)	575 (16:0-18:2)
30	5-44	881.8	18:2-18:0-18:3	603 (18:0-18:2)	601 (18:0-18:3)	597 (18:2-18:3)
31	5-44	881.8	18:1-18:3-18:1	599 (18:1-18:3)	603 (18:1-18:1)	
32	5-44	881.8	18:1-18:2-18:2	601 (18:1-18:2)	599 (18:2-18:2)	
33	5-44	881.8	18:0-18:4-18:1	599 (18:0-18:4)	597 (18:1-18:4)	605 (18:0-18:1)
34	5-44	881.8	18:1-16:0-20:4	625 (18:1-20:4)	599 (16:0-20:4)	577 (16:0-18:1)
35	5-44	881.8	16:0-16:0-22:5	625 (16:0-22:5)	551 (16:0-16:0)	
36	6-40	851.8	18:3-18:3-16:0	595 (18:3-18:3)	573 (16:0-18:3)	
37	6-40	851.8	18:2-18:4-16:0	595 (18:2-18:4)	575 (16:0-18:2)	571 (16:0-18:4)
38	6-40	851.8	18:2-18:3-16:1	597 (18:2-18:3)	571 (16:1-18:3)	573 (16:1-18:2)
39	6-40	851.8	16:1-18:1-18:4	569 (16:1-18:4)	575 (16:1-18:1)	597 (18:1-18:4)
40	6-42	879.7	18:1-18:4-18:1	597 (18:1-18:4)	603 (18:1-18:1)	
41	6-42	879.7	18:3-18:0-18:3	601 (18:0-18:3)	595 (18:3-18:3)	
42	6-42	879.7	18:2-18:3-18:1	597 (18:2-18:3)	599 (18:1-18:3)	601 (18:1-18:2)
43	6-42	879.7	18:2-18:2-18:2	599 (18:2-18:2)		
44	6-42	879.7	18:2-18:0-18:4	603 (18:0-18:2)	599 (18:0-18:4)	595 (18:2-18:4)
45	6-42	879.7	18:2-16:0-20:4	575 (16:0-18:2)	623 (18:2-20:4)	599 (16:0-20:4)
46	6-42	879.7	18:1-16:1-20:4	575 (16:1-18:1)	625 (18:1-20:4)	597 (16:1-20:4)
47	6-42	879.7	16:0-16:1-22:5	549 (16:0-16:1)	625 (16:0-22:5)	623 (16:1-22:5)
48	6-44	907.7	16:0-22:4-18:2	627 (16:0-22:4)	651 (18:2-22:4)	575 (16:0-18:2)
49	6-44	907.7	18:1-16:0-22:5	577 (16:0-18:1)	651 (18:1-22:5)	625 (16:0-22:5)
50	6-44	907.7	16:0-20:1-20:5	651 (20:1-20:5)	597 (20:5-16:0)	605 (16:0-20:1)
51	6-44	907.7	16:0-20:3-20:3	651 (20:3-20:3)	601 (16:0-20:3)	
52	7-40	877.7	18:2-18:3-18:2	599 (18:2-18:2)	597 (18:2-18:3)	
53	7-40	877.7	18:1-18:4-18:2	597 (18:1-18:4)	601 (18:1-18:2)	595 (18:2-18:4)
54	7-40	877.7	18:1-18:3-18:3	595 (18:3-18:3)	599 (18:1-18:3)	
55	7-40	877.7	16:0-16:1-22:6	549 (16:0-16:1)	621 (16:1-22:6)	623 (16:0-22:6)
56	7-40	877.7	18:1-14:0-22:6	549 (14:0-18:1)	595 (14:0-22:6)	649 (18:1-22:6)
57	7-42	905.8	18:1-16:0-22:6	577 (16:0-18:1)	623 (16:0-22:6)	649 (18:1-22:6)
58	7-42	905.8	18:1-16:1-22:5	575 (16:1-18:1)	651 (18:1-22:5)	623 (16:1-22:5)
59	7-42	905.8	18:2-16:0-22:5	575 (16:0-18:2)	649 (18:2-22:5)	625 (16:0-22:5)
60	7-42	905.8	20:1-18:3-18:3	627 (18:3-20:1)	595 (18:3-18:3)	
61	7-42	905.8	18:1-18:2-20:4	601 (18:1-18:2)	623 (18:2-20:4)	625 (18:1-20:4)
62	7-42	905.8	18:0-18:3-20:4	601 (18:0-18:3)	621 (18:3-20:4)	627 (18:0-20:4)
63	7-42	905.8	18:2-18:3-20:2	597 (18:2-18:3)	625 (18:3-20:2)	627 (18:2-20:2)
64	7-42	905.8	18:1-18:1-20:5	603 (18:1-18:1)	623 (18:1-20:5)	
65	7-42	905.8	18:0-18:2-20:5	603 (18:0-18:2)	625 (18:0-20:5)	627 (18:2-20:5)
66	7-44	933.7	18:1-20:2-20:4	651 (20:4-20:2)	629 (18:1-20:2)	625 (18:1-20:4)

除了 TAG 外, 实验中还得到几个 CE 类化合物。因为 CE 的特征离子 m/z 369 与含 C20:0 的 TAG 所产生的脂肪酸碎片相同, 为了确定 m/z 369 碎片离子的来源, 我们对其做了前体母离子扫描和子离子扫描。结果发现 m/z 369 的 EPI 谱图与文献^[30]报道的胆固醇酯得到的碎片一致。与 TAG 的质谱图不同, CE 除了 $[M + H]^+$ 外还同时产生 $[M + K]^+$ 的离子峰。在银离子色谱柱上, CE 的保留要远弱于 TAG, 在 5 min 左右含 C20:4 的 CE 即被洗脱。从小鼠血清中得到的 5 个 CE 类化合物, 按其出峰顺序分别为 CE(C16:0)、CE(C18:1)、CE(C18:2)、CE

(C20:4)、CE(C20:5)。

3 结论

本研究建立了银离子柱色谱与大气压化学电离-质谱联用方法, 并用于小鼠血清中甘油三酯类化合物的组成分析。通过两种样品处理方法的比较, 选择了提取效率较高的 modified Folch 方法用于提取血清中的 TAG。处理后的样品复溶于正己烷, 在 Varian ChromSpher 5 Lipids 色谱柱上得到了很好的分离。根据银离子色谱的双键保留规律以及增强型全扫描和增强型子离子扫描以及中性丢失扫描给出

的质谱信息,在小鼠血清脂质提取物中鉴定出 66 个甘油三酯类化合物及 5 个胆固醇酯类化合物。这为研究血中 TAG 类化合物提供了较全面的信息。本方法也可以作为常规手段来分离分析其他样品如组织、植物油等中的 TAG 类化合物。

参考文献:

- [1] Listenberger L L, Han X L, Lewis S E, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6): 3077
- [2] Bird S S, Marur V R, Sniatynski M J, et al. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6648
- [3] Dugo P, Favoino O, Tranchida P Q, et al. *J Chromatogr A*, 2004, 1041(1/2): 135
- [4] Li J, He B X, Chen W W, et al. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine* (李津, 何宝祥, 陈雯雯, 等. 广西牧畜兽医), 2011, 27(5): 265
- [5] Schwartz D M, Wolins N E. *J Lipids Res*, 2007, 48(1): 2514
- [6] Andrikopoulos N K. *Crit Rev Food Sci*, 2002, 42(5): 473
- [7] Buchgraber M, Ulberth F, Emons H, et al. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2004, 106(9): 621
- [8] Marekov I, Panayotova S, Tarandjiiska R. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 2010, 33(7/8): 1013
- [9] Ruiz-Samblas C, Cuadros-Rodriguez L, Gonzalez-Casado A, et al. *Anal Methods*, 2012, 4(3): 753
- [10] Buchgraber M, Androni S, Anklam E. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(9): 3275
- [11] Zhu T H, Fan L, Qian X M, et al. *China Oils and Fats* (朱桃花, 范璐, 钱向明, 等. 中国油脂), 2011, 36(5): 59
- [12] Rocha J M, Kalo P J, Ollilainen V, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(18): 3013
- [13] Morris L J. *J Lipids Res*, 1966, 7(6): 717
- [14] Nikolova-Damyanova B, Christie W W, Herslöf B. *J Chromatogr A*, 1995, 694(2): 375
- [15] Liu S C, Zhang C H, Hong P Z, et al. *China Oils and Fats* (刘书成, 章超桦, 洪鹏志, 等. 中国油脂), 2006, 31(9): 48
- [16] Aryee A N A, Phillip L E, Cue R I, et al. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(1): 155
- [17] Líska M, Velínská H, Holčápek M. *Anal Chem*, 2009, 81(10): 3903
- [18] Yang Q, Shi X Z, Gu Q, et al. *J Chromatogr B*, 2012, 895/896: 48
- [19] Holčápek M, Líska M, Jandera P, et al. *J Sep Sci*, 2005, 28(12): 1315
- [20] Holčápek M, Dvořáková H, Líska M, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(52): 8186
- [21] Byrdwell W C, Neff W E, List G R. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(1): 446
- [22] Camera E, Ludovici M, Galante M, et al. *J Lipids Res*, 2010, 51(11): 3377
- [23] Cai S S, Short L C, Syage J A, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1173(1/2): 88
- [24] Stübiger G, Belgacem O. *Anal Chem*, 2007, 79(8): 3206
- [25] Han X, Gross R W. *Anal Biochem*, 2001, 295(1): 88
- [26] Fauconnot L, Hau J, Aeschlimann J M, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(2): 218
- [27] Stefanoudaki E, Kotsifaki F, Koutsafakis A. *Food Chem*, 1997, 60(3): 425
- [28] Folch J, Lees M, Stanley G H S. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497
- [29] Bligh E G, Dyer W J. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911
- [30] Butovich I A. *J Lipids Res*, 2009, 50(3): 501