

甲基化结合高分辨质谱的 磷脂酸高通量分析方法的建立和应用

王雪颖^{1,2} 宗兆运² 焦玉佩^{1,2} 许丽娜^{1,2}
王昱淞^{1,2} 栗琳² 刘晓蕙^{*1,2}

¹(清华大学蛋白质研究技术中心, 北京 100084) ²(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘 要 基于甲基化反应,建立了同时测定磷脂酸和溶血磷脂酸的超高压液相色谱-静电轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q Exactive Orbitrap MS)高通量定性与定量分析方法,并用于小鼠衰老模型脑组织样品的测定。样品经氯仿-甲醇溶剂进行全脂提取,使用三甲基硅烷化重氮甲烷衍生化试剂改善磷脂酸和溶血磷脂酸的色谱峰形,并采用高分辨质谱的数据依赖型扫描模式(Full MS/dd-MS²),利用 Tracefinder 软件自建本地二级碎片数据库,结合正离子和负离子两种扫描模式下的碎片规律进行高通量的鉴定和定量分析。在本实验条件下,标准品 PA(14:0/14:0)的线性相关指数大于 0.99,定量限为 0.125 μg/mL,日内和日间精密度小于 8.5%。将本方法用于 C57BL/6 小鼠衰老模型脑组织中,成功鉴定并定量检测了 14 个溶血磷脂酸和磷脂酸分子。脂肪酸链的数据分析结果表明,含有多不饱和脂肪酸链的磷脂酸在衰老过程中呈现下降趋势。本方法具有较高灵敏度及准确度,适用于生物体内磷脂酸和溶血磷脂酸的定性与定量分析。

关键词 溶血磷脂酸; 磷脂酸; 甲基化; 高分辨质谱; 高通量

1 引言

磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)是生物体内最简单的一类甘油磷脂。其分子以甘油为骨架,甘油 3 位的羟基被磷酸基团取代,1 和 2 位羟基分别被两个脂酰基取代,形成 PA。虽然 PA 在生物体内含量很少,但其作为生物膜的组成成分、线粒体形态的影响因子和脂质的第二信使等,在生物体内具有重要功能^[1~4]。PA 在磷脂酶 A₂(Phospholipase A₂, PLA₂)的作用下可生成溶血磷脂(Lysophosphatidic acid, LPA)^[5]。LPA 作为一种细胞间的磷脂信使,可以激活 G 蛋白偶联受体,进而产生多种生物效应^[6,7]。在临床方面,LPA 在多种重大疾病(如心脑血管病、肿瘤等)的发生和发展过程中起着重要作用^[8]。

目前,关于磷脂酸类化合物的分析方法有很多,如薄层色谱法(TLC)^[9]、毛细管电泳法(CE)^[10]、气相色谱法(GC)^[11]和质谱法(MS)^[12]等。TLC 可以分析磷脂酸总脂含量,但是不能进行分子分析,而 CE 和 GC 可以对脂质分子进行高灵敏分析,但是重现性不佳和复杂基质解析能力低使得该技术受到一定限制。随着分析技术的快速发展,液相色谱-质谱联用技术因其选择性好、灵敏度高、样品前处理简单等优势,成为检测脂质的主流技术^[13~15]。然而,由于其化学结构的特性,磷脂酸在液相色谱系统的分离检测具有一定的挑战性。Ogiso 等^[16]在反相色谱系统中添加磷酸,改善磷脂酸的色谱行为,该方法虽然改善了磷脂酸的分析,但磷酸的使用与质谱的兼容性不佳。Cifkova 等^[17]在亲水相互作用色谱系统中建立了包括磷脂酸在内的脂质检测方法。但反相色谱系统因其良好的稳定性、重复性及分子分离能力,仍然被广泛应用于脂类分析。Clark 等^[18]在检测多磷酸磷脂酰肌醇时,提出用三甲基硅烷化重氮甲烷试剂(TMS)与磷酸基团上的羟基反应。该反应专一性很强,反应效率很高。Lee 等^[19]也成功地将此反应应用于心磷脂的相对定量分析。本研究基于反向液相色谱与高分辨质谱联用技术,将甲基化反应引入到磷脂酸的检测中,改善其色谱行为,提高了检测灵敏度,并结合本地自建数据库,实现对生物体复杂样品中的溶血磷脂酸和磷脂酸的高通量定性与定量分析。

2018-09-26 收稿; 2018-11-02 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 81501776, 81871093)资助

* E-mail: xiaohuiliu@biomed.tsinghua.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 超高效液相色谱系统、Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); F6/10 超细匀浆器(上海弗鲁克公司); TDZ4 常温台式低速离心机(湖南湘仪公司); 氮气吹干仪(上海乔跃电子有限公司); ME104 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

磷脂酸标准品 1,2-二豆蔻酰-甘油-3-磷酸单钠盐(1,2-Ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphate sodium salt, PA(14:0/14:0))和 1,2-双硬脂酰基-甘油-3-磷酸钠(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphate sodium salt, PA(18:0/18:0))(美国 Avanti 公司); 异丙醇、甲醇、乙腈、氯仿、甲基叔丁醚(MTBE)、水和乙酸铵(色谱级,美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 三甲基硅烷化重氮甲烷(TMS, 2.0 mol/L 己烷溶剂)、冰乙酸(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

2.2 脂质的提取和甲基化

2.2.1 脂质的提取 取 C57BL/6 小鼠脑组织约 200 mg 于 4 mL 玻璃管中,按重量比例加入约 2 mL 氯仿-甲醇溶液(2:1, V/V),匀浆两次,匀浆 10 s 停 10 s。按水相与有机相 1:4(V/V)的比例,加入 500 μ L 水进行萃取,涡旋混合 30 s,静置 10 min,如此反复 3 次,充分抽提后,以 3000 r/min 离心 15 min,等体积取出下层有机相,氮吹至干,备用。

2.2.2 甲基化反应 于上述备用样品中加入 200 μ L 复溶试剂(甲基叔丁醚-甲醇, 20:6, V/V),加入 25 μ L TMS,涡旋混匀,在室温下反应 20 min,加入 2.5 μ L 冰乙酸终止反应。加入 45 μ L 水,混匀,静置分层, 3000 r/min 离心 10 min,取上层液于上样瓶中,备用。

2.3 仪器分析条件

液相色谱条件: Cortecs C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μ m, 美国 Waters 公司); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流速: 0.22 mL/min; 流动相 A 为 60% 乙腈-40% 水(含 10 mmol/L 乙酸铵), B 为 90% 异丙醇-10% 乙腈。线性梯度洗脱: 0 ~ 2.5 min, 33% B; 2.5 ~ 25 min, 33% ~ 98% B; 25 ~ 30 min, 98% B; 30 ~ 31 min, 98% ~ 33% B; 31 ~ 35 min, 33% B; 进样量 2 μ L。

质谱条件: 加热电喷雾离子源(HESI), 离子传输管温度 320 $^{\circ}$ C; 辅助气温度 300 $^{\circ}$ C; 鞘气: 35 arb; 辅助气: 10 arb; 扫描模式: 数据依赖型扫描模式(Full MS/dd-MS²), 一级质谱分辨率为 70000 FWHM, 二级质谱分辨率为 17500 FWHM; 正离子检测模式: 喷雾电压 3.0 kV, 扫描范围 m/z 240 ~ 2000; 负离子检测模式: 喷雾电压 2.8 kV, 扫描范围 m/z 150 ~ 2000。

2.4 定性定量软件 Tracefinder 的参数设置

基于商业 Tracefinder 3.2 软件系统,根据溶血磷脂酸和磷脂酸的母离子和特征子离子的精确质量数信息建立本地数据库。一级和二级质谱的质量精度分别设置为 8 和 15 ppm,通过选择相同质量数下的最高色谱峰,并以 ICIS 的积分方式对其进行积分,得到色谱峰峰面积。积分参数设置如下:平滑点数为 3,基线宽度为 40,面积噪音为 5,峰噪音为 10。

3 结果与讨论

3.1 甲基化后溶血磷脂酸和磷脂酸的高通量分析的工作流程

3.1.1 溶血磷脂酸和磷脂酸的甲基化反应 三甲基硅烷的甲基化反应已经广泛应用于心磷脂、多磷酸磷脂酰肌醇等多种磷脂的质谱分析中^[19~21]。其反应机理是在磷脂的磷酸基团羟基位点进行甲基化反应,从而改变磷脂的化学性质。以三甲基硅烷化重氮甲烷试剂(TMS)为衍生化试剂(图 1),甲基叔丁醚-甲醇(20:6, V/V)为反应溶剂,在室温条件下反应 20 min。此反应条件温和,操作简单,衍生化反应效率稳定。

本研究建立了一种包含自建数据库在内的溶血磷脂酸和磷脂酸高通量分析方法,此方法使用了甲基化修饰结合高分辨质谱仪的分析手段,本地数据库的建立可以高效完成磷脂酸的鉴定与定量工作,分析流程如图 2 所示。首先,获取新鲜的小鼠脑组织,利用经典的氯仿-甲醇提取方法^[22,23]进行脂质萃取,

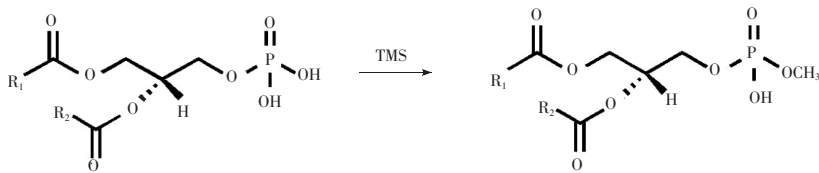


图 1 磷脂酸与 TMS 的反应示意图, R_1 和 R_2 为不同碳数和双键数的脂酰基

Fig. 1 Chemical reaction of methylation for phosphatidic acids, R_1 and R_2 represent each fatty acid chains

并取下层有机相氮吹至干。样品甲基化反应后先经过液相色谱分离,再分别使用质谱的正离子和负离子模式进行检测分析。得到原始数据后,使用 Tracefinder 自建二级数据库进行溶血磷脂酸和磷脂酸分子鉴定,进而得到可靠的定性和定量信息。

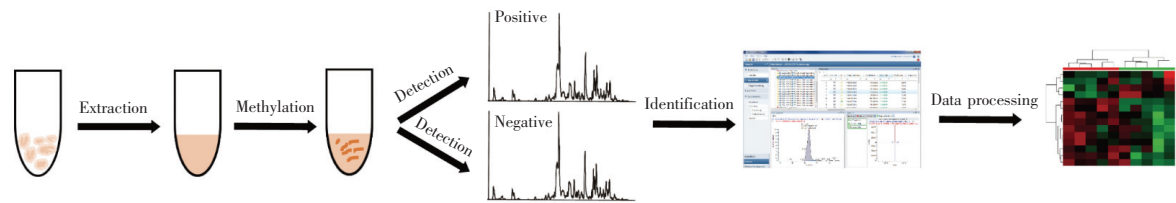


图 2 甲基化后溶血磷脂酸和磷脂酸的高通量定性定量流程图

Fig. 2 Flowchart of ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)-Q exactive orbitrap mass spectrometry (MS) based molecular profiling with prior methylation

3.1.2 甲基化后磷脂酸的色谱与质谱行为 在液相色谱-质谱联用系统中,反相色谱被广泛用于脂质组学的常规分析中^[16,24]。甲基化对于 PA 的色谱行为有很大的影响。本研究以标准品 PA(18:0/18:0)为例,考察甲基化反应前后的色谱行为,由 PA(18:0/18:0)的色谱图(图 3A)可见,色谱峰形很差,这使其很难在液相色谱-质谱系统中被分离和鉴定。由甲基化后的 PA(18:0/18:0)(为 Me-PA(18:0/18:0))的色谱图(图 3B)可见,色谱峰形大大改善,响应信号也提高数倍。上述结果表明,甲基化反应可以大大改善溶血磷脂酸和磷脂酸在反相色谱系统中的色谱行为,提高检测的灵敏度,进而增加该类脂质定量分析的准确性。

在高通量脂质分析中,脂质分子的可靠鉴定需要依赖二级质谱的匹配。而甲基化之后,磷脂酸在高分辨质谱中也展现出了独特的碎裂规律。通过两个标准品 PA(18:0/18:0)和 PA(14:0/14:0)考察了其二级质谱的碎裂规律。图 4A 和 4C 为 Me-PA(18:0/18:0)和 Me-PA(14:0/14:0)负离子 $[M-H]^-$ 的二级质谱图。在负离子模式中,磷脂酸的特征碎片为脂肪酸链 FA(18:0)和 FA(14:0)的碎片离子,荷质比分别为 m/z 283.2639 和 m/z 227.2014。图 4B 和 4D 为 Me-PA(18:0/18:0)和 Me-PA(14:0/14:0)正离子 $[M+NH_4]^+$ 的二级质谱图。在正离子模式中,特征性碎片为中性丢失磷酸基团后剩下的碎片, m/z 分别为 607.5639 和 495.4401。由于单模式的分子鉴定会有一定的假阳性干扰,因此本方法使用正负离子结合的方式鉴定溶血磷脂酸和磷脂酸,可以进一步提高分子鉴定的可靠性。

3.1.3 本地数据库的建立及检索 本研究建立了甲基化磷脂酸的二级鉴定数据库,并用于高通量的数据分析。由于甲基化磷脂酸在正离子和负离子二级谱图中都展现了特有的碎裂规律(图 4),因此,利用该碎裂规律预测了不同磷脂酸分子的特征性二级碎片。数据库包含了预测的一级精确荷质比及正负离

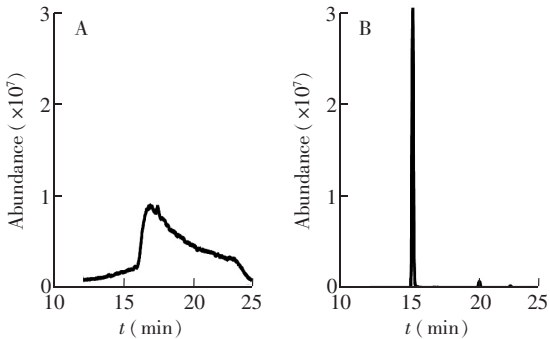


图 3 标准品 PA(18:0/18:0)(A)和甲基化反应后的 Me-PA(18:0/18:0)(B)的色谱图

Fig. 3 Extracted chromatograms of phosphatidic acid (PA(18:0/18:0)) (A) and chemical reaction of methylation for PA(18:0/18:0) (Me-PA(18:0/18:0)) (B)

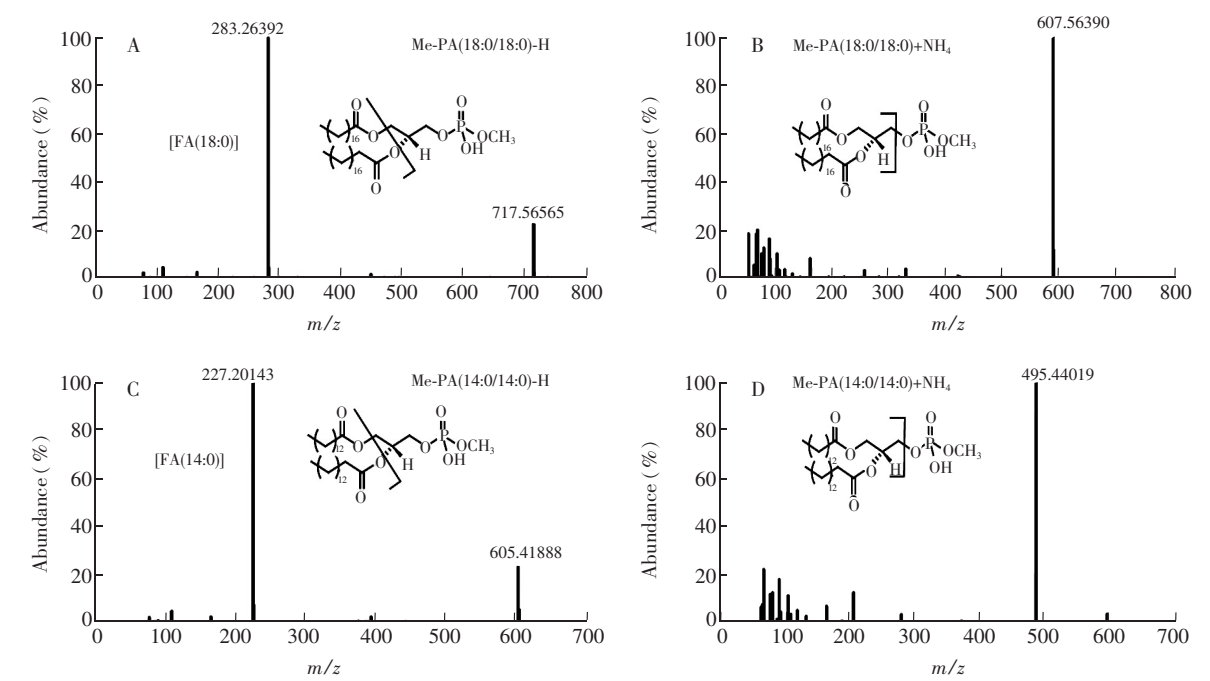


图4 标准品 Me-PA(18:0/18:0)和 Me-PA(14:0/14:0)的负离子二级质谱图(A、C)和正离子模式的二级质谱图(B、D)

Fig. 4 MS/MS spectra of Me-PA (18:0/18:0) and Me-PA (14:0/14:0) in negative (A, C) and positive (B, D) mode

子的碎片荷质比。其一级和二级质谱的精确荷质比计算方法如表 1 所示,其中 x 和 y 分别为两条脂肪酸链的碳原子数, m 和 n 为每个酰基链的双键数,各元素的精确质量数如下:碳为 12.000000;氢为 1.007825;氧为 15.994915;磷为 30.973762;氮为 14.003074;质子为 1.007276。

利用自建数据库使用 Tracefinder (Thermo Fisher Scientific, CA) 进行化合物二级鉴定。在数据库检索中首先进行一级质谱精确质量数的匹配,其中正离子为 $[M+NH_4]^+$,负离子为 $[M-H]^-$ 。一级匹配完成后,再进行二级质谱碎片信息的鉴定,其中正离子以中性丢失羟甲基磷酸后剩下的碎片为 PA 或 LPA 的特征离子,负离子以脂酰基为特征碎片。正离子的特征性碎片信息增加了复杂基质的定性能力,而相同色谱保留时间下的负离子特征性碎片又丰富了脂肪酸链信息。正负离子模式两次进样得到的数据分析结果可以实现溶血磷脂酸和磷脂酸高通量的定性筛选和准确定量分析。

表 1 溶血磷脂酸/磷脂酸的一级二级质谱精确质量数的计算方法

Table 1 Algorithm to calculate precursors and featured fragments of methylated lysophosphatidic acid (LPA) and PA for lipid identification

溶血磷脂酸/溶脂酸 LPA/PA	正离子质量数 (+NH ₄) Positive adduct m/z (+NH ₄)	负离子质量数 (-H) Negative adduct m/z (-H)
母离子 Precursors	$12 * (x+y+4) + 1.007825 * (2x+2y-2m-2n+10) + 15.994915 * 8 + 30.973762 + 14.003074 + 1.007276$	$12 * (x+y+4) + 1.007825 * (2x+2y-2m-2n+7) + 15.994915 * 8 + 30.973762 - 1.007276$
特征碎片离子 1 Featured fragment 1	$12 * (x+y+3) + 1.007825 * (2x+2y-2m-2n+2) + 15.994915 * 4 + 1.007276$	$12 * x + 1.007825 * (2x-2m) + 15.994915 * 2 - 1.007276$
特征碎片离子 2 Featured fragment 2	--	$12 * y + 1.007825 * (2y-2n) + 15.994915 * 2 - 1.007276$

3.2 方法的灵敏度、准确度和精密度

对甲基化磷脂酸的灵敏度、准确度、精密度及线性范围进行了评估。由于被测的磷脂酸为生物体内源物质,为降低基质效应对测定结果的影响,本研究采用野生型小鼠脑作为基质,以自然界生物体内含量极低的 PA(14:0/14:0)为标准品,分别考察了标准曲线的线性范围、最低定量限、准确度和精密度。

3.2.1 标准曲线的线性范围和最低定量限 称取约 1.5 mg 的标准品 PA(14:0/14:0),以氯仿-甲醇(2:1, V/V)为溶剂,配制成 2 mg/mL 的母液。取 2.2.1 节中脑组织的全脂样品作为空白基质,配制一系列浓度的溶液,根据 2.2.2 节的衍生化条件进行甲基化反应,然后检测。以 PA(14:0/14:0)的峰面积为纵坐标,标准品的浓度值为横坐标,进行线性回归分析,结果表明,在 0.125 ~ 500 μg/mL 范围内,PA(14:0/14:0)的线性良好,线性方程为 $Y=2882250X-455460$ ($R^2=0.9934$),反应效率稳定,适用于磷脂酸的高灵敏度定量分析。权重因子为 1/ X 。标品 PA(14:0/14:0)在脑基质中能被检测到的最低定量限(Lower limit of quantification, LLOQ)为 0.125 μg/mL。

3.2.2 准确度和精密度 选取 2.2.1 节中脑组织的全脂样品作为空白基质稀释 PA(14:0/14:0)母液,分别配制成高、中、低 3 个浓度水平的样品。按照 2.2.2 节方法进行甲基化修饰后,进行检测。每个浓度进行 3 个样本的生物重复,且连续进样 3 天,根据标准曲线得到 3 个浓度的测量值,计算日内和日间的精密度。3 个浓度的测量值与真值的准确度以相对误差表示(表 2)。结果表明,本方法的准确度与精密度可以满足日常检测的要求。

表 2 Me-PA(14:0/14:0)的准确度和精密度

Table 2 Accuracy and precision (RSD) of Me-PA(14:0/14:0)

化合物 Compound	浓度 Concentration (μg/mL)	日内精密度 Intra-day RSD (%, n=3)	日间精密度 Inter-day RSD (%, n=3)	准确度 Accuracy (RE, %)
Me-PA (14:0/14:0)	4	1.6	8.5	13.7
	20	4.9	5.5	-7.4
	100	0.6	6.0	-8.3

3.3 实际样本定量分析
采用本方法对 16 和 24 周龄的 C57BL/6 小鼠脑组织进行测定。采用数据依赖二级质谱扫描模式进行数据采集,以自建的本地数据库进行

数据检索和定量分析,其分析结果以热图形式显示(图 5)。在实验中,两组小鼠各选 5 只,分别进行磷脂酸和溶血磷脂酸的差异分析。共鉴定及定量分析了 10 个磷脂酸分子和 4 个溶血磷脂酸分子。结果表明,14 周小鼠脑组织中磷脂酸含量及分布与 24 周小鼠显示出明显的不同,其中 4 个磷脂酸分子与 1 个溶血磷脂酸在 24 周小鼠脑组织中的含量显著低于 14 周年轻小鼠($p<0.05$),在显著降低的 4 个磷脂酸分子 PA(16:1/20:4)、PA(22:6/22:6)、PA(22:4/22:6)和 PA(16:0/20:4)中,多不饱和脂肪酸 FA(20:4)、FA(22:6)和 FA(22:4)为主要组成脂肪酸链。因此,可以推测小鼠在衰老过程中脑组织多不饱和脂肪酸的代谢产生了下降趋势。

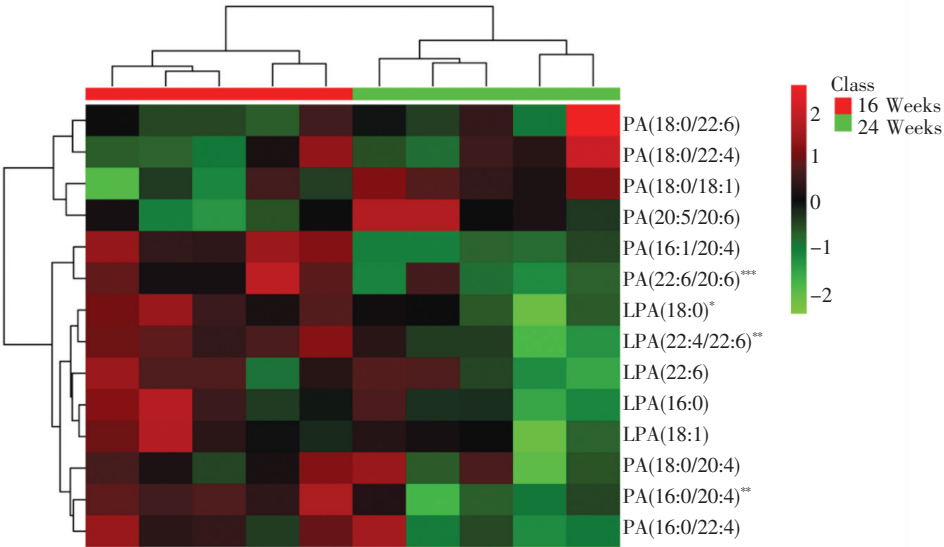


图 5 16 和 24 周龄的小鼠鼠脑检测到的溶血磷脂酸和磷脂酸的热图

Fig. 5 Heatmap of LPA and PA in mouse brain at 16 and 24 week

* : $p<0.01$, * * : $p<0.001$, * * * : $p<0.0001$

4 结论

建立了基于液相色谱与高分辨质谱联用法,采用三甲基硅烷化重氮甲烷试剂封闭磷脂酸磷酸羟基反应技术,结合二级质谱正负离子相互验证的方法,从脂肪酸链的信息出发,对生物体内的溶血磷脂酸和磷脂酸进行定量分析的新方法。本方法在自建数据库的基础上可以对磷脂酸和溶血磷脂酸进行高通量鉴定及定量分析,具有较好的灵敏度、线性范围、精密度和准确度。检测了 16 和 24 周龄的 C57BL/6 小鼠衰老模型中的脑组织,成功鉴定并定量分析了 14 种磷脂酸和溶血磷脂酸分子。在 24 周小鼠的脑组织中,含有多不饱和脂肪酸链的多个磷脂酸分子含量明显低于 14 周小鼠,预示多不饱和脂肪酸的代谢在衰老过程中呈下降趋势。

感谢: 清华大学蛋白质研究技术中心代谢组学平台的技术支持

References

- 1 Tanguy E, Kassas N, Vitale N. *Biomolecules*, **2018**, 8(2): 20
- 2 Zegarłinska J, Piascik M, Sikorski A F, Czogalla A. *Acta Biochim. Polonica*, **2018**, 65(2): 163–171
- 3 Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, Nakao K, Nakanishi H, Kinoshita M, Frohman M A, Yamamoto A, Tani K. *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289(16): 11497–11511
- 4 Li J J, Gao Y, Guan L H, Zhang H Z, Sun J H, Gong X, Li D S, Chen P, Ma Z, Liang X Y, Huang M, Bi H C. *Front. Physiol.*, **2018**, 9: 14
- 5 JIANG Bo, JIANG Lin-Yong, ZHOU Han-Liang. *Progress in Physiological Sciences*, **2002**, 33(2): 159–162
江波, 江林勇, 周汉良. *生理科学进展*, **2002**, 33(2): 159–162
- 6 Anliker B, Chun J. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(20): 20555–20558
- 7 Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. *J. Biochem.*, **2015**, 157(2): 81–89
- 8 ZHANG Yong-Hui, LI Yue-Chun. *Chin. J. Convalescent Med.*, **2010**, 19(11): 1012–1014
张永慧, 李月春. *中国疗养医学*, **2010**, 19(11): 1012–1014
- 9 Xiao Y J, Schwartz B, Washington M, Kennedy A, Webster K, Belinson J, Xu Y. *Anal. Biochem.*, **2001**, 290(2): 302–313
- 10 Chen Y L, Xu Y. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 753(2): 355–363
- 11 Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K, Yoshioka Y, Tokumura A. *J. Lipid Res.*, **2002**, 43(12): 2049–2055
- 12 Tanaka T, Tsutsui H, Hirano K, Koike T, Tokumura A, Satouchi K. *J. Lipid Res.*, **2004**, 45(11): 2145–2150
- 13 Jesionowska A, Cecerska E, Dolegowska B. *Anal. Biochem.*, **2014**, 453: 38–43
- 14 Meleh M, Pozlep B, Mlakar A, Meden-Vrtovec H, Zupancic-Kralj L. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 858(1-2): 287–291
- 15 Lisa M, Cifkova E, Holcapek M. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(31): 5146–5156
- 16 Ogiso H, Suzuki T, Taguchi R. *Anal. Biochem.*, **2008**, 375(1): 124–131
- 17 Cifkova E, Hajek R, Lisa M, HolLapek M. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1439: 65–73
- 18 Clark J, Anderson K E, Juvin V, Smith T S, Karpe F, Wakelam M J O, Stephens L R, Hawkins P T. *Nat. Methods*, **2011**, 8(3): 267–272
- 19 Lee J C, Byeon S K, Moon M H. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(9): 4969–4977
- 20 Cai T, Shu Q, Hou J, Liu P, Niu L, Guo X, Liu C C, Yang F. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(1): 513–521
- 21 Wang C, Palavicini J P, Wang M L, Chen K, Yang P, Crawford A, Han X. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(24): 12137–12144
- 22 Bligh E G, Dyer W J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**, 37(8): 911–917
- 23 Folch J, Lees M, Stanley G H S. *J. Biol. Chem.*, **1957**, 226(1): 497–509
- 24 Tang H, Wang X, Xu L, Ran X, Li X, Chen L, Zhao X, Deng H, Liu X. *Talanta*, **2016**, 156-157: 163–171

Methylation Assisted High Throughput Analysis of Phosphatidic Acid by High Resolution Mass Spectrometry

WANG Xue-Ying^{1,2}, ZONG Zhao-Yun², JIAO Yu-Pei^{1,2}, XU Li-Na^{1,2},

WANG Yu-Song^{1,2}, LI Lin², LIU Xiao-Hui^{*1,2}

¹(National Protein Science Facility (Beijing), Tsinghua University, Beijing 100084, China)

²(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract A methylation-based approach for analysis of phosphatidic acids (PAs) using ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry with incorporation of in-house database was established. This method allowed high throughput analysis with confident molecular identification and quantitation. Phosphatidic acids were extracted using the mixture of chloroform and methanol with subsequent derivatization using (trimethylsilyl) diazomethane. Derivatized PAs (Me-PA) were analyzed in data dependent acquisition (Full MS/dd-MS²) mode of high resolution mass spectrometer. In-house database compatible with Tracefinder was derived allowing lipid identification based on MS/MS spectra. In this work, to achieve confident molecular identification and quantitation, combinatorial analysis of positive and negative ion modes was performed. The method was evaluated by the linearity, lower limit of detection (LLOQ), inter- and intra-day precision using standard molecule PA(14:0/14:0), and $R^2 > 0.99$, LLOD of 0.125 $\mu\text{g/mL}$, inter- and intra-day precision $< 8.47\%$ were achieved. PAs in aged mice brains were analyzed using this high throughput approach. A total of 14 phosphatidic acid molecules were identified and quantified in C57BL/6 mice brain. Moreover, decreased level of phosphatidic acid containing polyunsaturated fatty acid chain was observed in aged brains. Conclusively, this orbitrap-based platform with methylation provides a sensitive and accurate approach to analyze phosphatidic acid quantitatively.

Keywords Phosphatidic acid; Lysophosphatidic acid; Methylation; High resolution mass spectrometry; High throughput

(Received 26 September 2018; accepted 2 November 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81501776, 81871093), and we are grateful for the help of Metabolomics Center and Animal Core Facility at Tsinghua University.