第45卷 第1期 质 谱 学 报 Vol. 45 No. 1
2024年1月 Journal of Chinese Mass Spectrometry Society Jan. 2024

自由基化学-串联质谱用于脂质精细结构解析的研究进展

简瑞君，瑕 瑜
（清华大学化学系，生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室，北京 100084）

摘要：脂质作为六大营养素之一，与细胞膜构建、信号传导和能量代谢等多种生物学过程密切相关。然而，脂质分子结构多样性给分析带来了挑战。基于碰撞诱导解离（collision-induced dissociation，CID）的传统串联质谱（tandem mass spectrometry，MS/MS）技术仅可以鉴定分子种类和脂肪酰基链组成，难以分析C═C位置、*sn*-位置、官能团取代及位置等精细结构。近年来，在多种结构层次上分辨脂质异构体的质谱方法迅速发展，其中，自由基的引入在脂质气相离子活化和引发化学反应等方面发挥着独特作用。本文综述了近10年来自由基化学结合串联质谱技术在脂质精细结构解析方面的应用进展，主要包括气相的自由基诱导解离（radical-induced dissociation，RID）和自由基参与反应的衍生化-串联质谱技术。

关键词：脂质精细结构；自由基化学；串联质谱；自由基诱导解离
中图分类号：O657.63 **文献标志码**：A **文章编号**：1004-2997(2024)01-0057-12
doi：10.7538/zpxb.2023.0109

Research Progress of Free Radical Chemistry-Tandem Mass Spectrometry for Fine Structure Analysis of Lipids

JIAN Rui-jun, XIA Yu
(*MOE Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing* 100084, *China*)

Abstract: As one of the six major nutrients, lipids play important roles in various biological processes, including cell membrane construction, signal transduction, and energy metabolism. The diverse functions of lipids are intricately linked to the distinct structures. More than 48 000 molecular lipid structures have been curated in the database which can be further categorized into 8 categories and more than one hundred lipid classes and subclasses. The diverse structures of lipids pose challenges for their lipidomic analysis, especially the co-existence of isomers and isobar. Traditional tandem mass spectrometry (MS/MS) techniques based on collision-induced dissociation (CID) can provide the informations of molecular species and acyl chain composition of various types of lipids in a sensitive fashion. However, they typically fall short in providing detailed

国家自然科学基金面上项目(22074075)；国家杰出青年科学基金(22225404)
本文通信作者瑕瑜

structural information, including C═C positions, *sn*-positions, functional group substitutions and their locations on the fatty acyl chains. In recent years, mass spectrometry methods capable of distinguishing lipid isomers at various structural levels have been developed, among which radical chemistry plays important role in both gas-phase ion activation and chemical derivatization. This article summarized the MS/MS techniques for lipid structural analysis at detailed structural levels *via* harnessing the power of both radical chemistry and tandem mass spectrometry in the past decade. Radical-induced dissociation (RID) refers to a group of gas-phase dissociation methods which can generate intrachain C—C cleavages in the fatty acyl chain and thus produce fragmentation patterns useful for identification of chain modification. Ultraviolet photodissociation (UVPD) and CID triggered radical-directed dissociation, and electron impact excitation of ions from organics (EIEIO) are the major RID methods. By coupling RID with separation methods, such as reversed-phase liquid chromatography (RPLC), identification and quantitation of lipid isomers consisting of methyl branching, hydroxy group, and cyclopropane modification and their locations have been achieved. The two major derivatization methods utilizing radical chemistry for C═C bond modification were discussed, including radical initiated epoxidation reactions and the Paternò-Büchi reaction. Furthermore, the future direction of combining radical chemistry and tandem mass spectrometry for deep lipidotyping was discussed, which included the coupling with advanced separation methods, integrated workflows for multi-level structure analysis, and development of automated annotation tools for data analysis.

Key words: fine structure of lipids; radical chemistry; tandem mass spectrometry; radical-induced dissociation

随着软电离技术,特别是电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)的出现以及串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)的发展,实现了复杂脂质分子的高灵敏分析,推动了脂质组学在21世纪的迅速兴起[1-2]。2003年,Han和Gross提出[3],脂质组学是通过对生物体系脂质组进行全面地定性定量分析来揭示脂质生物学功能,阐明脂质代谢及其与疾病和健康联系的科学。脂质组学研究的内容主要包括:脂质定性(结构分析)和准确定量,脂质空间分布和动态变化,以及与其他生物分子的相互作用。脂质结构解析是脂质分析的基础,但脂质分子种类繁多、结构层次多、存在大量的异构体,这给质谱分析带来了极大的挑战。

1 脂质的多层次结构与分析挑战

脂质的结构表征通常包含多级结构信息[4-5],以甘油磷脂为例,复杂脂质的完整结构解析包含6个层次(示于图1):1) 分子种类水平,以磷脂的头部基团进行划分,如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE);2) 脂肪酰基/醚链组成;3) 碳碳双键(C═C)位置;4) 甘油主链上酰基或醚链的*sn*位置;5) 官能团取代的特征及位置(如甲基支链或羟基);6) 立体化学,包括C═C的*Z*/*E*构型和官能团的手性。根据"脂质代谢途径研究计划(lipid metabolites and pathways strategy, LIPIDMAPS)"记载,目前已有超过48 000种脂质分子。

高分辨质谱和传统的低能碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)技术通常只能提供前2个层次的信息,这是常规脂质组学所能达到的解析层面。而对于更深的结构层次,即脂质的精细结构,CID无法直接解析。近年来,基于异构体分辨的质谱技术发展迅速[5-6],主要分为新型气相离子活化技术和化学衍生结合CID串联质谱技术。自由基的活泼性

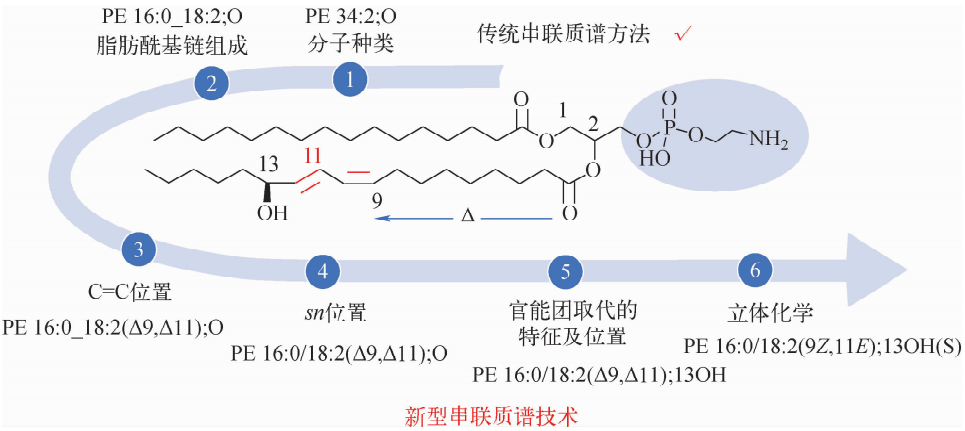


图 1　甘油磷脂多层次结构解析示意图

Fig. 1　Schematic diagram of multi-level structure analysis of glycerophospholipids

使自由基诱导解离(radical-induced dissociation, RID)成为重要的离子活化技术，另外，还有许多基于自由基反应的化学衍生技术。本文将综述近 10 年来自由基诱导解离和自由基参与反应的衍生化方法结合串联质谱在脂质精细结构解析方面的应用。

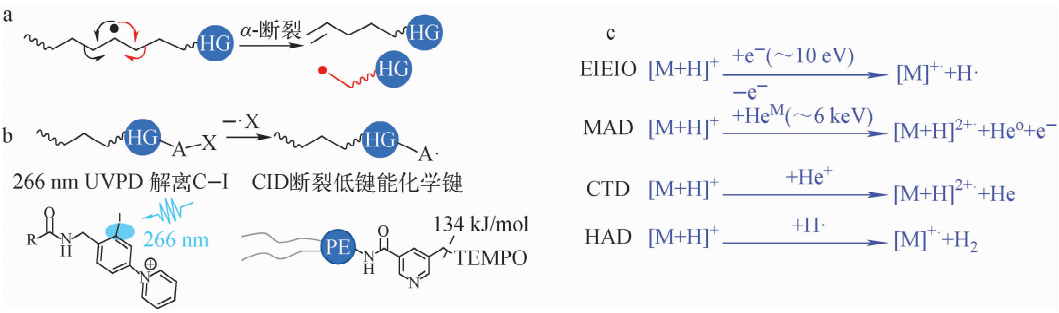
2　自由基诱导解离

对于软电离产生的脂质偶电子离子，低能 CID 易引发电荷诱导的极性键异裂得到偶电子离子碎片[7-8]，例如，磷脂在 CID 下断裂 C—O 键得到酰基链碎片，而无法得到精细结构信息。脂肪酸(fatty acid, FA)结构仅含 C—H、C—C 键等非极性基团，不易发生电荷诱导异裂。因此，电荷远程碎裂(charge remote fragmentation, CRF)是解析 C═C 和甲基支链等非极性官能团修饰的一种策略。通过衍生化(如，*N*-[4-(氨甲基)苯基]吡啶(*N*-[4-(aminomethyl)phenyl]pyridinium, AMPP)[9])或者气相离子/离子反应([FA—H＋Mgphen]$^+$)[10]将电荷固定以引入脂肪酸，CID 引发碳链上的 1，4-H_2 消除反应，断裂 C—C 键。然而，含极性键的复杂脂质会优先发生电荷诱导碎裂而非电荷远程碎裂。

与偶电子离子的碎裂行为不同，电子电离(electron ionization, EI)会使离子源产生的自由基离子发生进一步碎裂得到丰富的结构信息[11]。基于此，对于通过软电离才能保持完整结构的蛋白质[12]、脂质[13]等生物分子，研究者采用多种方法使其在气相活化时产生自由基离子，经碰撞激活发生进一步碎裂得到更丰富的结构信息，即自由基诱导解离(RID)。脂质 RID 是指以不同方式形成缺电子脂质自由基离子，在碰撞活化中，自由基经由 H•攫取过程转移至碳链，进而发生 *α*-裂解，示于图 2a。自由基诱导碎裂受电荷影响较小，相较于电荷远程碎裂，还可应用于复杂脂质链内修饰的鉴定。产生脂质自由基离子的方式主要有 2 类：1) 将自由基前体通过衍生引入脂质，以紫外光解离(ultraviolet photodissociation, UVPD)C—I 键[11,14]或 CID 断裂低键能化学键[15-16]的方式在特定位置引入自由基，示于图 2b，称为自由基定向解离(radical-directed dissociation, RDD)；2) 高能粒子束与脂质离子作用诱导产生能量较高的不定点自由基离子，示于图 2c，如有机物离子电子激发裂解(electron impact excitation of ions from organics, EIEIO)和亚稳态原子激发裂解(metastable atom-activated dissociation, MAD)。

2.1　紫外光解离 C—I 键

根据芳基 C—I 键在 266 nm 紫外光下可高效解离[17]的特点，Blanksby 和 Julian 等利用非共价形成脂质复合物[13,18]或共价修饰[14,19]的形式，将芳基 C—I 键引入脂质。在 266 nm 紫外光激发下，C—I 键均裂产生高活性的苯自由基，其前体离子在碰撞活化后引发 RDD，产生脂肪酰基的链内碎裂，可用于定位C═C键、甲基支链等修饰位置。



注：EIEIO：有机物离子电子激发裂解；MAD：亚稳态原子激发裂解；CTD：电荷转移解离；HAD：氢原子攫取解离

图 2 自由基诱导碎裂途径(a)，脂质离子产生定点(b)和不定点(c)自由基离子的方法

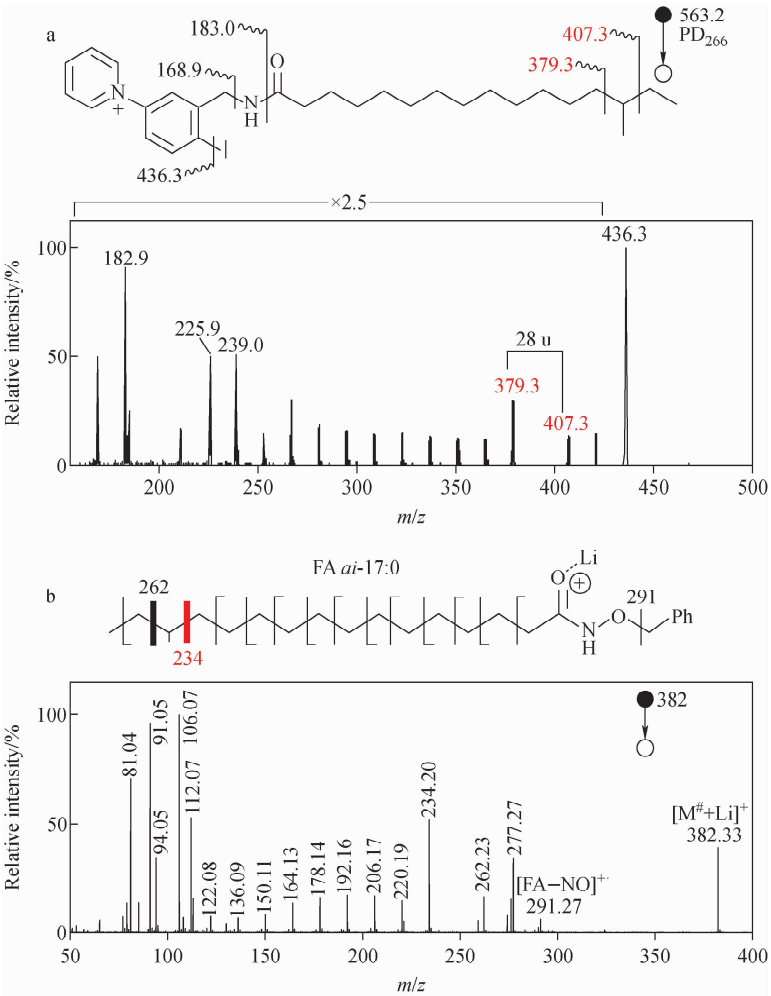
Fig. 2 Radical-induced fragmentation pathway (a), methods to generate site-specific (b) and nonspecific (c) lipid radical ions

2019 年，Blanksby 课题组[14]发展了对脂肪酸衍生、既包含固定电荷又含有光解离基团的 4-I-AMPP 试剂，示于图 2b。AMPP 固定电荷将脂肪酸的电离效率提高了百倍。苯自由基引发的 RID 可对 C═C 键、环丙烷修饰、甲基支链等进行鉴定和定位。对于直链饱和脂肪酸，碳链上的 RID 会形成一系列相差 14 u(CH_2)的谱图序列，多为偶电子碎片。当存在C═C时，双键烯丙位两侧的碎裂明显增强，而双键处的碎裂较微弱且出现多峰，从而形成相隔 54 u 的“V”形区域，可大致判断C═C位置。对于环丙烷修饰，则形成相隔 40 u 的“V”形区域，由于C═C和自由基的同时存在使自由基诱导重排增加，导致双键和环丙烷 2 种碎裂模式趋同，且不够清晰，较难实现复杂样品中 C═C 的定性定量分析。对于甲基支链修饰，RDD 碎裂模式会在支链两侧产生28 u的间隔，并在靠近羧酸端的支链位点出现信号增强，示于图 3a，这是由于仲碳自由基比伯碳自由基更易丢失。将 RDD 碎裂与反相色谱(reversed-phase liquid chromatography，RPLC)结合，发现在胎儿皮脂水解的脂肪酸中 FA 17∶0 可能有 7 种支链，但由于支链脂肪酸的分离度不足，定性结果不够明确且无法实现定量。

2.2 CID 断裂低键能化学键

2005 年，Beauchamp 等[20]提出了 FRIPS (free radical initiated peptide sequencing)技术，通过 CID 断裂低能化学键产生定点自由基离子，从而进行 RDD 产生 c/z 离子对多肽进行测序。2，2，6，6-四甲基哌啶(2，2，6，6-tetramethylpiperidoxIl，TEMPO)自由基较稳定，近年来以 TEMPO 为基础的 FRIPS 试剂得以发展，如 TEMPO-苄基-NHS 酯(TBN)[21]和 TEMPO-吡啶甲基-NHS 酯(TPN)[22]，其中，NHS 酯用于多肽 N 端的衍生化。本课题组[15]将 TPN/TBN 衍生至氨基磷脂 PE，示于图 2b。由于 TEMPO-吡啶甲基/苄基的键能低至 134 kJ/mol，由 CID 释放吡啶甲基/苄基自由基连接的脂质离子，随后产生的碳中心自由基引发酰基链内的 RDD，可用于鉴定、定位链内修饰(包括 C═C、环丙烷环和甲基支链)。TPN 衍生化结合 CID 触发的 RDD 还被用于准确定位氧化磷脂酰乙醇胺(OxPE)中的—OH[23]。本课题组[16]将 *O*-苄基羟胺(*O*-benzylhydroxylamine，*O*-BHA)衍生至脂肪酸羧基上，在加入锂离子作为固定电荷的情况下，*NO*-苄基键在 CID 下均裂产生氮氧自由基，从而引发脂肪酸链的 RDD。在脂肪链存在甲基支链时的碎裂模式与 I-AMPP 在 UVPD 下引发的 RDD 相似，即 14 u 的连续序列在支链两侧被中断而形成 28 u 的间隔，示于图 3b。将该衍生方法与反相色谱-串联质谱(RPLC-MS/MS)结合，在血浆中鉴定了 10 种支链脂肪酸并进行异构体间的相对定量分析，首次发现了血浆中的 FA17∶0 可能存在 *n*-5 甲基支链。

本课题组[24]发现，PC 分子的磷酸胆碱头基可与碳酸氢根形成较强的氢键，生成的复合物在 CID 下会诱导胆碱内 C—N 键发生均裂，并形成以碳原子为中心的磷酸乙酯自由基。在优势构象的驱使下，高丰度RDD碎片离子为



注：a. *ai*-17∶0-I-AMPP 在 266 nm 下的 UVPD 谱图[14]；b. [*ai*-17∶0-OBHA+Li]$^+$ 的 CID 谱图[16]

图 3　不同自由基诱导解离方式对支链脂肪酸鉴定的串联质谱图

Fig. 3　MS/MS spectra for identification of branched chain fatty acids using different RDD methods

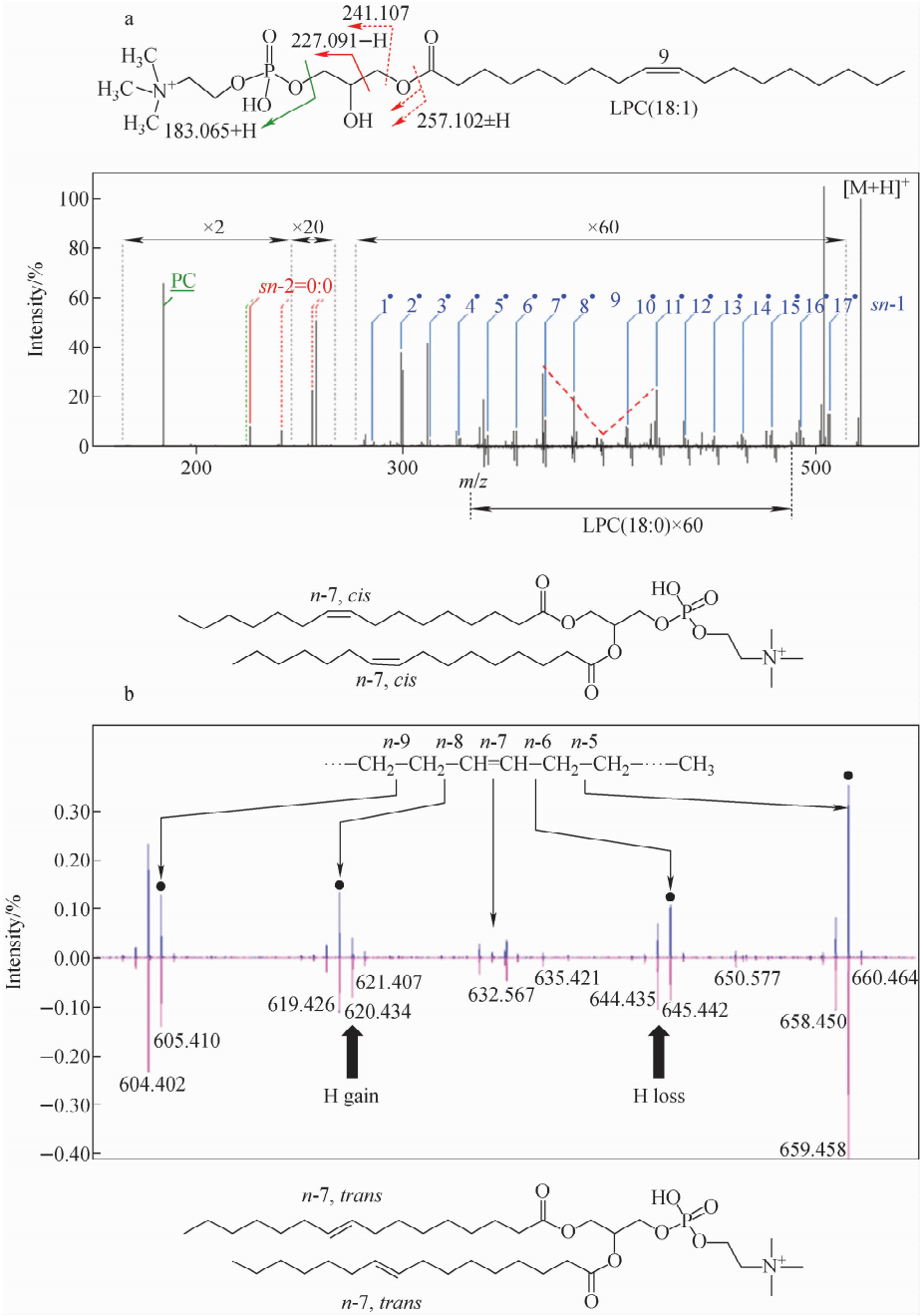
只含有 *sn*-1 位置酰基链的“*sn*-1 诊断离子”。通过检测 *sn*-1 诊断离子可准确定量同时存在的 PC 的 *sn* 异构体，而无需分离异构体。向喷雾溶剂中加入碳酸氢铵可以直接用于解吸电喷雾电离（desorption electrospray ionization，DESI）成像[25]，酰基链上的低丰度 RDD 碎片离子可用于 PC 和溶血磷酰胆碱（lysophosphatidylcholine，LPC）的链内修饰表征[26]。链内 RDD 成功整合到 RPLC-MS 系统，实现了对人血浆 LPC 17∶0 中 *iso* 和 *anteiso* 异构体的定性和相对定量分析。此外，该方法还被用于鞘磷脂（sphingomyelin，SM）中鞘氨醇骨架异构的鉴别[27]。

2.3　EIEIO 产生脂质自由基离子

以电子/离子反应为基础的解离技术是产生自由基离子的重要方法[28]。对于多电荷的多肽，通过电子捕获解离（electron capture dissociation，ECD）等方法可得到富电子自由基离子。而脂质离子通常为单电荷离子，可采用 EIEIO 方式解离。EIEIO 又称电子诱导解离（electron-induced dissociation，EID），是 Freiser 和 Cody 在 1979 年开发的单电荷/电子反应解离技术[29]，直到 2015 年 Baba 和 Campbell 通过改造 Q-TOF 质谱实现了 EIEIO 首次用于脂质分析[30]。在 EIEIO 中，带正电的脂质离子与动能约为 10 eV 的电子束相互作用，许多高能和自由基诱导的解离通道被激活。EIEIO 是一种非官能团特异的裂解技术，可以产生丰富的碎片离子，提取多级结构信息，包括头基、C═C 位置及构型、*sn* 位置，甚至是复杂脂质中的聚糖

信息[30-33]。但是，EIEIO 的碎片离子强度低，且谱图复杂，手动解谱较为困难，灵敏度受到限制。

对于不饱和脂肪酰基链，乙烯基 C—C 和 C═C 键的直接裂解相对于烯丙基 C—C 键裂解更不易发生，相对峰强度上的差异形成“V”形碎裂模式，可用于定位C═C，示于图 4a。用 C═C 附近 C—C 碎裂模式的差异可区分顺式和反式双键的同分异构体，对于 *n*-7 的双键，反式较顺式在 *n*-8“H 获得”和 *n*-6“H 丢失”形成的偶电子碎片强度更高，示于图 4b。然而，在含 2 条及以上酰基链的复杂脂质中，不同酰基链的链内碎裂谱图可能会相互干扰，从EIEIO



注：a. LPC 18∶1(9*Z*)和 LPC 18∶0 的 EIEIO 谱图[30]；

b. 质子化 PC 16∶1(9*Z*)/16∶1(9*Z*)和 PC 16∶1(9*E*)/16∶1(9*E*)的 EIEIO 谱图中双键区域[33]；黑点代表自由基碎片

图 4 EIEIO 鉴定复杂脂质双键位置及顺反异构质谱图

Fig. 4 EIEIO spectra for identifying double bond positions and *cis*/*trans* isomers of complex lipids

谱中定位 C═C 通常需要借助计算机软件解卷积解谱[34]。由于 EIEIO 谱图的复杂性，预先分离脂质同重素或同分异构体有利于提高脂质鉴定的可信度。Baba 等[32]将差分离子淌度与 EIEIO 联用，实现了猪脑脂质提取物中 400 多种脂质分子（包括甘油磷脂、甘油酯和鞘脂）的精细结构解析。目前，商用质谱 Zeno TOF 7600 配备了 EIEIO 模块，使其更易应用于脂质分析。

2.4　其他气相活化方法

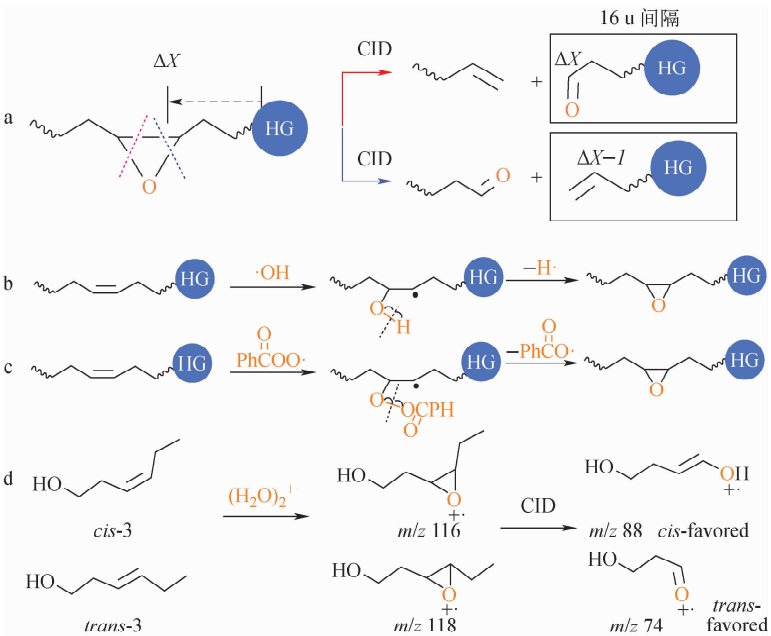
其他产生不定点脂质自由基的气相活化方法示于图 2c。Jackson 课题组利用 MAD[35] 和电荷转移解离[36]（charge transfer dissociation，CTD）产生 PC 自由基阳离子，从而引发 RID 进行 C═C 位置鉴定。在 MAD 中，PC 单电荷阳离子与亚稳态氦原子束（～6 keV）发生碰撞反应生成二价自由基阳离子；在 CTD 中，PC 单电荷阳离子与高电子亲和能（24.6 eV）的 He^+ 反应生成二价自由基阳离子。Takahashi 等[37]开发了氢原子攫取解离（hydrogen abstraction dissociation，HAD）技术，脂质离子与离子阱内的中性氢原子（·H）相互作用生成自由基离子诱导沿脂质酰基链的RID。MAD、CTD 和 HAD 生成的碎片模式与 EIEIO 相似。虽然这些方法在脂质分析方面具有潜力，但需要复杂的质谱改造且灵敏度有限，因此尚未用于大规模的脂质分析。此外，Gavin Reid 等[38]用 213 nm 紫外光激发金属离子或铵根加合的甾醇产生 $[M]^{+\cdot}$，继而进行 MS^3 的 CID 可产生有关结构碎片。

3　自由基相关衍生化方法-串联质谱

除气相离子活化技术外，异构体分辨质谱的另一策略是将不能在 CID 下碎裂的基团进行衍生化修饰使其产生特征碎裂。目前，发展的衍生化策略多针对 C═C，如 Paternò-Büchi（PB）反应[39]、环氧化反应[40] 和氮杂环丙烷化[41]。下面将讨论经自由基路径实现脂质衍生化的方法，包括自由基为衍生化试剂的环氧化和 PB 反应。

3.1　自由基为衍生化试剂的环氧化反应-MS/MS

C═C 可通过环氧化转化为具有极性且不稳定的三元环。通过对脂质环氧化物进行 CID，可得到 1 对相差 16 u 的碎片离子，实现 C═C的鉴定，示于图 5a。脂质的环氧化多通过向溶液中加入过氧酸[40,42]或原位生成过氧



注：a. 环氧化-MS/MS 碎裂；b. 等离子体羟基自由基驱动环氧化反应；c. 光引发苯甲酰过氧自由基环氧化；d. 水自由基阳离子环氧化-MS/MS

图 5　以自由基为衍生化试剂的环氧化反应-MS/MS

Fig. 5　Epoxidation reactions of free radicals as derivatization reagents-MS/MS

化物[43-44]，经由亲电加成反应实现。最近，研究发现，可以利用一些含氧自由基实现 C═C 的氧插入。Zhong 等[45]发现在 MALDI 成像中以金纳米线和有氧化还原活性的间氯过氧苯甲酸作为基质，产生的热电子在静电场加速下被间氯过氧苯甲酸俘获，迅速产生羟基自由基和偶电子负离子。羟基自由基体积、空间位阻小，与双键发生加成，能在纳秒内与脂肪酸双键发生快速的环氧化，示于图 5b，结合 MS/MS 可以实现组织切片脂肪酸原位 C═C 异构体成像。苯甲酰过氧自由基是一种快速环氧化试剂，Xu 等[46]以苯偶姻为前体，254 nm 光照下生成的苯甲酰自由基与空气中 O_2 反应生成苯甲酰过氧自由基，可对脂质进行环氧化，示于图 5c，可在 5 min 内实现溶液中 80%的脂肪酸环氧化。此外，还可以将苯偶姻喷涂在组织切片上，通过离线环氧化-解吸附电喷雾电离-串联质谱(DESI-MS/MS)进行脂肪酸异构体成像[47]。

Chen 等[48]发展了一种特殊的水自由基阳离子环氧化方法。水蒸气等离子体中的 $(H_2O)_2^{+\cdot}$ 与喷雾中己烯醇的 C═C 反应生成环氧自由基阳离子，CID 下产生的碎片可用于区分己烯醇双键异构体。然而，不同位置双键的反应效率差别较大，在甲基末端和链中间形成的碎片形式不同，难以实现 C═C 位置异构体的定量分析。但碎片离子强度对 *cis*/*trans* 构型有偏好性，示于图 5d，基于此，作者建立了标准曲线对红酒中3-己烯醇的顺反异构体进行相对定量分析。

3.2 PB-MS/MS 及自由基诱导异构化

PB 反应是光激发后的醛或酮与 C═C 之间的[2+2]环加成反应。PB 反应产物所产生的 2 个区域异构体(P_1 和 P_2)在 CID 裂解中会形成 1 对 C═C 诊断离子，其中一个在断裂位点处包含烯烃(F_O)，另一个包含醛(F_A)，这些诊断离子为 C═C 的位置鉴定提供了明确信息，并可进行异构体的相对定量分析。2014 年，本课题组[39]以丙酮作为 PB 试剂和 ESI 溶剂，报道了 Paternò-Büchi-串联质谱(PB-MS/MS)在脂质双键分析中的应用。作为第一代 PB 试剂，丙酮有以下优点：1) 对各种极性或非极性脂质具有良好的溶解性；2) 与水和许多其他有机溶剂具有高度的混溶性；3) 与 ESI 相容。因此，可以大量使用丙酮，在 10 s 内可达到 30%产率。此外，本课题组分别建立了丙酮 PB 反应的“鸟枪法脂质组学”分析平台[49]和“LC-PB-MS/MS”高通量解析 C═C 位置异构体分析平台[50]。然而，丙酮 PB 反应会出现包括 Norrish Ⅰ/Ⅱ类型在内的副反应，导致产率不高，且只适合衍生极性脂质。因此，近年来多个研究小组不断开发新的 PB 衍生试剂以提高反应产率[51-52]和电离效率[53]等，并用于各种脂质(极性[54]、中性[55-56])和分析场景(如 MALDI 成像[57]、单细胞分析[58])中。已有文章[59]总结了 PB-MS/MS 相关的发展和应用。

三线态 PB 试剂与 C═C 形成的双自由基中间体除了可以发生[2+2]环加成外，还可以发生自由基消除，重新生成 PB 试剂和顺反异构化的 C═C，在顺式和反式构型之间可以发生相互转化且在平衡时以反式构型为主[60-61]，示于图 6。Chen 等[61]用苯甲酰甲酸甲酯作为 PB 试剂，以 $Ir[dFppy]_2(dtbbpy)PF_6$ 作为光催化剂，建立了光环加成-光异构化的可见光激发双反应体系，以实现脂质 C═C 位置和构型的定性定量分析。在该体系中：1) PB-MS/MS 用于鉴定和定量 C═C 位置异构体；2) 脂质分别于光反应前后进入 RPLC-MS，反式产物比顺式产物的保留时间更长，会在其右侧出现新的色谱峰，而顺式产物会在其左侧出现新的色谱峰。此特异性为不饱和脂质顺反异构体引入第二维度的身份标签，实现其可靠的鉴定分析，可以通过反应前色谱面积比对 *Z*/*E* 异构体定量。

4 结论与展望

近年来，在多个结构层次的脂质异构体分辨质谱技术发展迅速，其中，C═C 解析技术相对成熟，已广泛用于生物样本分析。自由基诱导解离为除 C═C 外的其他链内官能团修饰(如甲基支链、羟基、环丙烷)的鉴定提供可能，但仍处于技术发展早期阶段，还需在以下方面进行发展：1) 由于异构体的 RID 谱图碎片离子繁杂，除特征碎裂间隙外，碎片离子基本重叠，需要将 RID 与异构体分离技术整合，特别是 LC 分离。离子迁移谱可以在毫秒级实现异构体分离，若其可以分离链内修饰异构体，将有

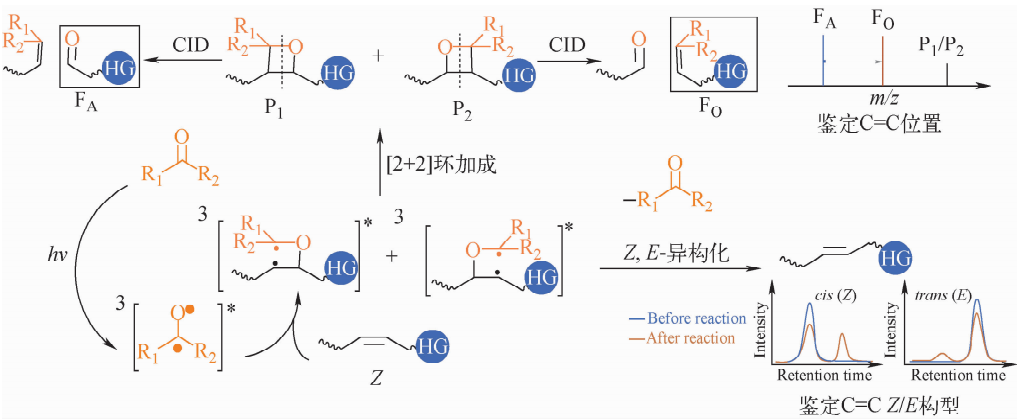


图 6　PB-MS/MS 用于 C═C 位置鉴定及自由基诱导异构化-LC 用于 C═C 构型分析

Fig. 6　PB-MS/MS for the identification of C═C bond positions and radical-induced isomerization-LC for C═C configuration analysis

望实现链内异构体的质谱成像。2）各层次的异构体解析技术需要有机结合，以实现复杂样品中同一脂质分子各层次的精确解析。例如，氧化脂质同时存在 C═C 和 OH 修饰，目前通过反相色谱-自由基定向解离（RPLC-RDD）可实现 oxPE 混合物 OH 的精确解析，但对于双键定位需将每种 oxPE 单独制备分离，使用 PB-MS/MS 进行确定[23]。3）自由基诱导解离碎片离子分散，该方法用于链修饰鉴定的检出限通常在数十 nmol/L 到亚 μmol/L 级，比不区分脂质异构体的检出限（nmol/L）高出 1～2 个数量级。为实现低丰度脂质的深度结构解析，通过与预富集方法整合将有助于提高 LC-RDD 灵敏度。4）发展深层结构水平的数据分析工具和自动化脂质注释工具。

参考文献：

[1] WENK M R. The emerging field of lipidomics [J]. Nat Rev Drug Discovery, 2005, 4(7): 594-610.

[2] WENK M R. Lipidomics: new tools and applications[J]. Cell, 2010, 143(6): 888-895.

[3] HAN X, GROSS R W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics[J]. J Lipid Res, 2003, 44(6): 1 071-1 079.

[4] LIEBISCH G, FAHY E, AOKI J, DENNIS E A, DURAND T, EJSING C S, FEDOROVA M, FEUSSNER I, GRIFFITHS W J, KOFELER H, Jr MERRILL A H, MURPHY R C, O'DONNELL V B, OSKOLKOVA O, SUBRAMANIAM S, WAKELAM M J O, SPENER F. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures[J]. J Lipid Res, 2020, 61(12): 1 539-1 555.

[5] ZHANG W, JIAN R, ZHAO J, LIU Y, XIA Y. Deep-lipidotyping by mass spectrometry: recent technical advances and applications[J]. J Lipid Res, 2022, 63(7): 100 219.

[6] BONNEY J R, PRENTICE B M. Perspective on emerging mass spectrometry technologies for comprehensive lipid structural elucidation[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(16): 6 311-6 322.

[7] XING S, HUAN T. Radical fragment ions in collision-induced dissociation-based tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1 200: 339 613.

[8] DEMARQUE D P, CROTTI A E M, VESSECCHI R, LOPES J L C, LOPES N P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products[J]. Nat Prod Rep, 2016, 33(3): 432-455.

[9] WANG M, HAN R H, HAN X. Fatty acidomics: global analysis of lipid species containing a carboxyl group with a charge-remote fragmentation-assisted approach[J]. Anal Chem, 2013, 85(19): 9 312-9 320.

[10] RANDOLPH C E, BEVERIDGE C H, IYER S, BLANKSBY S J, MCLUCKEY S A, CHOPRA G. Identification of monomethyl branched-chain lipids by a combination of liquid chromatography tandem mass spectrometry and charge-switching chemistries[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2022, 33(11): 2 156-2 164.

[11] RAN-RESSLER R R, LAWRENCE P, BRENNA J T. Structural characterization of saturated branched chain fatty acid methyl esters by collisional dissociation of molecular ions generated by electron ionization[J]. J Lipid Res, 2012, 53(1): 195-203.

[12] OH H B, MOON B. Radical-driven peptide backbone dissociation tandem mass spectrometry[J]. Mass Spectrom Rev, 2015, 34(2): 116-132.

[13] PHAM H T, LY T, TREVITT A J, MITCHELL T W, BLANKSBY S J. Differentiation of complex lipid isomers by radical-directed dissociation mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2012, 84(17): 7 525-7 532.

[14] NARREDDULA V R, BOASE N R, AILURI R, MARSHALL D L, POAD B L J, KELSO M J, TREVITT A J, MITCHELL T W, BLANKSBY S J. Introduction of a fixed-charge, photolabile derivative for enhanced structural elucidation of fatty acids[J]. Anal Chem, 2019, 91(15): 9 901-9 909.

[15] LIN Q, LI P, JIAN R, XIA Y. Localization of intrachain modifications in bacterial lipids via radical-directed dissociation[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2022, 33(4): 714-721.

[16] JIAN R, ZHAO X, LIN Q, XIA Y. Profiling of branched-chain fatty acids via nitroxide radical-directed dissociation integrated on an LC-MS/MS workflow[J]. Analyst, 2022, 147(10): 2 115-2 123.

[17] THOEN K K, PÉREZ J, FERRA J J, KENTTÄMAA H I. Synthesis of charged phenyl radicals and biradicals by laser photolysis in a Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9(11): 1 135-1 140.

[18] PHAM H T, JULIAN R R. Mass shifting and radical delivery with crown ether attachment for separation and analysis of phosphatidylethanolamine lipids[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(6): 3 020-3 027.

[19] PHAM H T, TREVITT A J, MITCHELL T W, BLANKSBY S J. Rapid differentiation of isomeric lipids by photodissociation mass spectrometry of fatty acid derivatives[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2013, 27(7): 805-815.

[20] HODYSS R, COX H A, BEAUCHAMP J L. Bioconjugates for tunable peptide fragmentation: free radical initiated peptide sequencing (FRIPS)[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(36): 12 436-12 437.

[21] LEE M, KANG M, MOON B, OH H B. Gas-phase peptide sequencing by TEMPO-mediated radical generation[J]. Analyst, 2009, 134(8): 1 706-1 712.

[22] GASPAR K, FABIJANCZUK K, OTEGUI T, ACOSTA J, GAO J. Development of novel free radical initiated peptide sequencing reagent: application to identification and characterization of peptides by mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2018, 30(3): 548-556.

[23] LIN Q, JIAN R, WANG S, XIA Y. Characterization of oxidized glycerophosphoethanolamines via radical-directed dissociation tandem mass spectrometry and the Paterno-Büchi derivatization[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(25): 9 422-9 427.

[24] ZHAO X, ZHANG W, ZHANG D, LIU X, CAO W, CHEN Q, OUYANG Z, XIA Y. A lipidomic workflow capable of resolving *sn*- and C=C location isomers of phosphatidylcholines[J]. Chem Sci, 2019, 10(46): 10 740-10 748.

[25] ZHAO X, LIANG J, CHEN Z, JIAN R, QIAN Y, WANG Y, GUO Z, ZHANG W, ZHANG Y, YIN H, XIA Y. *sn*-1 Specificity of lysophosphatidylcholine acyltransferase-1 revealed by a nass spectrometry-based assay[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, 62(6): e202215556.

[26] ZHAO X, XIA Y. Characterization of fatty acyl modifications in phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholines via radical-directed dissociation[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2021, 32(2): 560-568.

[27] ZHAO X, WU G, ZHANG W, DONG M, XIA Y. Resolving modifications on sphingoid base and

N-acyl chain of sphingomyelin lipids in complex lipid extracts[J]. Anal Chem, 2020, 92(21): 14 775-14 782.

[28] CHEN X, WANG Z, WONG Y E, WU R, ZHANG F, CHAN T D. Electron-ion reaction-based dissociation: a powerful ion activation method for the elucidation of natural product structures[J]. Mass Spectrom Rev, 2018, 37(6): 793-810.

[29] CODY R B, FREISER B S. Electron impact excitation of ions from organics: an alternative to collision induced dissociation[J]. Analytical Chemistry, 1979, 51(4): 547-551.

[30] CAMPBELL J L, BABA T. Near-complete structural characterization of phosphatidylcholines using electron impact excitation of ions from organics[J]. Anal Chem, 2015, 87(11): 5 837-5 845.

[31] BABA T, CAMPBELL J L, le BLANC J C Y, BAKER P R S. In-depth sphingomyelin characterization using electron impact excitation of ions from organics and mass spectrometry[J]. J Lipid Res, 2016, 57(5): 858-867.

[32] BABA T, CAMPBELL J L, LE BLANC J C Y, BAKER P R S, IKEDA K. Quantitative structural multiclass lipidomics using differential mobility: electron impact excitation of ions from organics (EIEIO) mass spectrometry[J]. J Lipid Res, 2018, 59(5): 910-919.

[33] BABA T, CAMPBELL J L, LE BLANC J C Y, BAKER P R S. Distinguishing *cis* and *trans* isomers in intact complex lipids using electron impact excitation of ions from organics mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(14): 7 307-7 315.

[34] BABA T, CAMPBELL J L, le BLANC J C Y, BAKER P R S. Structural identification of triacylglycerol isomers using electron impact excitation of ions from organics (EIEIO)[J]. J Lipid Res, 2016, 57(11): 2 015-2 027.

[35] DEIMLER R E, SANDER M, JACKSON G P. Radical-induced fragmentation of phospholipid cations using metastable atom-activated dissociation mass spectrometry (MAD-MS)[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2015, 390: 178-186.

[36] LI P, JACKSON G P. Charge transfer dissociation of phosphocholines: gas-phase ion/ion reactions between helium cations and phospholipid cations[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2017, 52(5): 271-282.

[37] TAKAHASHI H, SHIMABUKURO Y, ASAKAWA D, YAMAUCHI S, SEKIYA S, IWAMOTO S, WADA M, TANAKA K. Structural analysis of phospholipid using hydrogen abstraction dissociation and oxygen attachment dissociation in tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2018, 90(12): 7 230-7 238.

[38] WEST H, REID G E. Hybrid 213 nm photodissociation of cationized sterol lipid ions yield $[M]^{+\cdot}$ Radical products for improved structural characterization using multistage tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1 141: 100-109.

[39] MA X, XIA Y. Pinpointing double bonds in lipids by Paterno-Büchi reactions and mass spectrometry[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(10): 2 592-2 596.

[40] FENG Y, CHEN B, YU Q, LI L. Identification of double bond position isomers in unsaturated lipids by m-CPBA epoxidation and mass spectrometry fragmentation[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(3): 1 791-1 795.

[41] YANG T, TANG S, KUO S T, FREITAS D, EDWARDS M, WANG H, SUN Y, YAN X. Lipid mass tags *via* aziridination for probing unsaturated lipid isomers and accurate relative quantification[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2022, 61(39): e202207098.

[42] KUO T H, CHUNG H H, CHANG H Y, LIN C W, WANG M Y, SHEN T L, HSU C C. Deep lipidomics and molecular imaging of unsaturated lipid isomers: a universal strategy initiated by mCPBA epoxidation[J]. Anal Chem, 2019, 91(18): 11 905-11 915.

[43] ZHAO Y, ZHAO H, ZHAO X, JIA J, MA Q, ZHANG S, ZHANG X, CHIBA H, HUI S P, MA X. Identification and quantitation of C horizontal line C location isomers of unsaturated fatty acids by epoxidation reaction and tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2017, 89(19): 10 270-10 278.

[44] CAO W, MA X, LI Z, ZHOU X, OUYANG Z. Locating carbon-carbon double bonds in unsatu-

rated phospholipids by epoxidation reaction and tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2018, 90(17): 10 286-10 292.

[45] JIA S, CHANG S, ZHANG L, GUI Z, LIU L, MA Z, LI S, HUANG X, ZHONG H. Plasmonic hydroxyl radical-driven epoxidation of fatty acid double bonds in nanoseconds for on-tissue mass-spectrometric analysis and bioimaging[J]. Anal Chem, 2023, 95(8): 3 976-3 985.

[46] ZHANG J, ZHANG Z, JIANG T, ZHANG Z, ZHANG W, XU W. Rapidly identifying and quantifying of unsaturated lipids with carbon-carbon double bond isomers by photoepoxidation [J]. Talanta, 2023, 260: 124 575.

[47] ZHANG J, ZANG Q, XU W, TANG F. Rapid imaging of unsaturated lipids at isomer level using photoepoxidation[J]. Talanta, 2023, 261: 124 643.

[48] ZHANG X, REN X, CHINGIN K, XU J, YAN X, CHEN H. Mass spectrometry distinguishing C═C location and *cis/trans* isomers: a strategy initiated by water radical cations[J]. Anal Chim Acta, 2020, 1 139: 146-154.

[49] MA X, CHONG L, TIAN R, SHI R, HU T Y, OUYANG Z, XIA Y. Identification and quantitation of lipid C═C location isomers: a shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(10): 2 573-2 578.

[50] ZHANG W, ZHANG D, CHEN Q, WU J, OUYANG Z, XIA Y. Online photochemical derivatization enables comprehensive mass spectrometric analysis of unsaturated phospholipid isomers[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 79.

[51] ZHAO J, XIE X, LIN Q, MA X, SU P, XIA Y. Next-generation Paterno-Büchi reagents for lipid analysis by mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2020, 92(19): 13 470-13 477.

[52] SHI H, TAN Z, GUO X, REN H, WANG S, XIA Y. Visible-light Paterno-Büchi reaction for lipidomic profiling at detailed structure levels[J]. Anal Chem, 2023, 95(11): 5 117-5 125.

[53] ESCH P, HEILES S. Charging and charge switching of unsaturated lipids and apolar compounds using Paternò-Büchi reactions[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2018, 29(10): 1 971-1 980.

[54] XIA T, ZHOU F, ZHANG D, JIN X, SHI H, YIN H, GONG Y, XIA Y. Deep-profiling of phospholipidome via rapid orthogonal separations and isomer-resolved mass spectrometry[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4 263.

[55] XIA T, YUAN M, XU Y, ZHOU F, YU K, XIA Y. Deep structural annotation of glycerolipids by the charge-tagging Paterno-Büchi reaction and supercritical fluid chromatography-ion mobility mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(23): 8 345-8 353.

[56] XIE X, ZHAO J, LIN M, ZHANG J L, XIA Y. Profiling of cholesteryl esters by coupling charge-tagging Paterno-Büchi reaction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2020, 92(12): 8 487-8 496.

[57] WÄLDCHEN F, MOHR F, WAGNER A H, HEILES S. Multifunctional reactive MALDI matrix enabling high-lateral resolution dual polarity MS imaging and lipid C═C position-resolved MS^2 imaging[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(20): 14 130-14 138.

[58] LI Z, CHENG S, LIN Q, CAO W, YANG J, ZHANG M, SHEN A, ZHANG W, XIA Y, MA X, OUYANG Z. Single-cell lipidomics with high structural specificity by mass spectrometry [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2 869.

[59] MA X, ZHANG W, LI Z, XIA Y, OUYANG Z. Enabling high structural specificity to lipidomics by coupling photochemical derivatization with tandem mass spectrometry[J]. Acc Chem Res, 2021, 54(20): 3 873-3 882.

[60] XIE X, XIA Y. Analysis of conjugated fatty acid isomers by the Paterno-Büchi reaction and trapped ion mobility mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2019, 91(11): 7 173-7 180.

[61] FENG G, GAO M, WANG L, CHEN J, HOU M, WAN Q, LIN Y, XU G, QI X, CHEN S. Dual-resolving of positional and geometric isomers of C═C bonds *via* bifunctional photocycloaddition-photoisomerization reaction system [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2 652.

(收稿日期:2023-09-14;修回日期:2023-10-31)