

基于高分辨质谱的甲基化心磷脂高通量 分析方法的建立和应用

焦玉佩^{1,2}, 王雪颖^{1,2}, 许丽娜^{1,2}, 王昱淞^{1,2}, 刘紫琪^{1,2}, 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 生命学院, 北京 100084)

摘要: 该文基于心磷脂标准品的甲基化反应, 建立了高灵敏度高通量分析甲基化心磷脂的液相色谱-高分辨质谱方法。由于甲基化后的心磷脂具有特征性的碎片, 因此建立了包含780个分子特征片段的模拟数据库用于脂质鉴定。衍生化后, CL(14:0/14:0/14:0/14:0)信号提高了10倍, 定量下限(LOQ)达到10 ng/mL。将该方法应用于小鼠衰老过程中心磷脂的调控研究, 通过Tracefinder本地二级数据库共鉴定了43个心磷脂分子, 其中21个心磷脂在衰老的大脑中有差异变化。结果发现: 含有FA(20:4)、FA(22:6)长链多不饱和脂肪酸的心磷脂在衰老过程中呈下降趋势。高分辨质谱平台为甲基化的心磷脂分析提供了一种高通量筛选方法, 对于低丰度心磷脂的检测具有很大潜力。

关键词: 心磷脂; 甲基化; 高分辨质谱; 高通量

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-4957(2022)05-0717-07

Establishment and Application of High Throughput Analysis Method for Methylcardiolipin Based on High Resolution Mass Spectrometry

JIAO Yu-pei^{1,2}, WANG Xue-ying^{1,2}, XU Li-na^{1,2}, WANG Yu-song^{1,2},
LIU Zi-qi^{1,2}, 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: Cardiolipin is important for assembly and integrity of mitochondrial electron transfer complex. A sensitive and high throughput method via liquid chromatography-high resolution mass spectrometry was developed for the detection of low abundant cardiolipin based on methylation reaction. Unique fragmentation pattern was derived from methylated cardiolipins. Therefore, a simulated database including the featured fragments of 780 molecules was established for lipid identification. After derivatization, the signal of CL(14:0/14:0/14:0/14:0) was increased by 10 times, and 10 ng/mL of the limit of quantitation(LOQ) was achieved in the analysis. This method was applied to study the cardiolipin regulation in mouse brain during aging. A total of 43 cardiolipin molecules were identified using Tracefinder coupled with in-house MS/MS database, of which 21 cardiolipin molecules were differentially changed in aged brains. Cardiolipins with polyunsaturated acyl-component e. g. FA(20:4) and FA(22:6) were decreased during the aging process. The orbitrap-based platform with methylation provides a high throughput screening approach for cardiolipin analysis, which is potentially beneficial to the detection of low abundant lipids.

Key words: cardiolipin; methylation; high resolution mass spectrometry; high throughput

心磷脂(Cardiolipin, CL)广泛存在于高等动物、植物和微生物界, 在高等动物的心肌中甚至占总磷脂的15%, 发挥着调节线粒体功能和氧化应激的作用^[1-2]。心磷脂几乎完全位于线粒体内膜上, 在电子传导、三磷酸腺苷(ATP)产生、能量代谢及细胞凋亡等方面发挥了重要作用, 是线粒体氧化磷酸化所必需的磷脂^[3-5]。此外, 在线粒体凋亡的不同阶段和线粒体膜动力学中, 心磷脂均发挥着不可替代的作用^[6-7]。糖尿病和心力衰竭等常见疾病与心磷脂含量或组成的变化息息相关^[8]。巴氏综合症, 作为一个心磷脂代谢缺陷疾病, 为研究者提供了研究心磷脂代谢和调节异常模型, 为探索疾病病理学提供

收稿日期: 2021-10-06; 修回日期: 2021-11-05

基金项目: 清华大学实验室创新基金(100001169)

* 通讯作者: 刘晓蕙, 博士, 副研究员, 研究方向: 利用质谱技术进行代谢小分子研究, E-mail: xiaohui2013@mail.tsinghua.edu.cn

了动机^[9]。因此,通过对心磷脂的定量检测有助于了解心磷脂的代谢调控机制,进一步阐明发病机理,从而对靶向治疗相关疾病提供一定的技术支持。

心磷脂作为一种双磷脂酰甘油分子,由4条不同长度、不同饱和度的脂肪酸链和1分子的三甘油骨架构成。心磷脂的检测方法有直接注射质谱法^[10-11]、液相色谱-质谱联用法^[12-14]等,这些传统方法均是在负离子模式下基于心磷脂不同脂肪酸链的断裂进行定性定量分析。心磷脂的4种不同脂肪酸链的排列组合,使得数据分析变得异常困难。由于不同长度、不同饱和度脂肪酸链的离子化效率差异和高丰度物质的离子抑制作用,导致低丰度物质的定量会受到一定影响^[15]。同时,该模式下心磷脂存在单电荷、双电荷2种价态,使心磷脂的检测灵敏度也有所降低。液相色谱-高分辨质谱联用的方法通常采用数据依赖采集模式(DDA)记录二级谱图,由于扫描速度的限制,一般每个时间点只会采集10~20张二级谱图。导致很多低丰度的化合物会丢失二级碎片信息,因此此类化合物很难进行准确的分子鉴定。

甲基化方法已广泛应用于磷脂的检测,且甲基化可以明显提高磷脂化合物的响应信号^[16-19]。本研究基于液相色谱-高分辨质谱联用技术,将甲基化反应用于心磷脂的检测中,提高了心磷脂的检测灵敏度;同时依据甲基化后标准品的二级碎裂规律,预测甲基化心磷脂的特征性二级碎片并建立了本地数据库,实现了生物体复杂样品中心磷脂的高通量定性定量分析,对于在线粒体中发现的特异性低丰度心磷脂检测有很大的应用潜力。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Ultimate 300超高效液相色谱系统、Q-Exactive HF四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);F6/10-4G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);EYELA MG-2200氮吹仪(上海爱朗仪器公司);VELP SCIENTIFICA涡旋仪(意大利VELP公司);ME104电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

心磷脂标准品:CL(14:0/14:0/14:0/14:0)、CL(16:0/16:0/16:0/16:0)和CL(18:1/18:1/18:1/18:1)(美国Avanti公司);水、异丙醇、甲醇、乙腈、氯仿、甲基叔丁基醚(MTBE)(均为色谱纯,美国Honeywell公司);乙酸铵(色谱纯,上海阿拉丁试剂公司);衍生化试剂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,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 脂质提取及甲基化反应

1.2.1 心磷脂的提取 取C57BL/6小鼠脑组织约100 mg于4 mL离心管中,按每100 mg组织加入约1 365 μ L的甲基叔丁基醚:甲醇:2 mol/L盐酸溶液(200:60:13,体积比)^[20],样本在室温下匀浆3次(每次匀浆10 s,间歇10 s)并静置15 min,每5 min涡旋振荡30 s。之后加入250 μ L 0.1 mol/L HCl进行萃取。充分抽提后,12 000 g常温离心20 min,等体积取出上层有机相,转移至新的1.5 mL离心管中并用氮气吹干备用。

1.2.2 甲基化反应 向上述备用样品中加入400 μ L甲基叔丁基醚:甲醇(20:6,体积比)和50 μ L TMS,涡旋混匀,在室温下反应20 min进行甲基化^[21],每5 min涡旋振荡30 s。随后加入5 μ L冰乙酸终止反应,样本颜色变为无色。加入92 μ L水,涡旋混匀,静置分层,于12 000 g常温离心20 min,取上层液于上样瓶中待检测。

1.2.3 液相色谱-质谱分析条件 液相色谱条件: Cortecs C₁₈色谱柱(1.6 μ m $\times$ 2.1 mm $\times$ 100 mm,美国Waters公司);柱温:40 $^{\circ}$ C;流速:0.22 mL/min;流动相:A为乙腈/水(60:40,含10 mmol/L乙酸铵);B为异丙醇/乙腈(90:10)。线性梯度洗脱:0~3 min,40% B;3~23 min,40%~98% B;23~30 min,98% B;30~30.5 min,98%~40% B;30.5~35 min,40% B;进样量1 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60 000 FWHM,二级质谱分辨率为15 000 FWHM;正、负离子模式的喷雾电压分别为3.0、2.8 kV,扫描范围: m/z 500~1 800。

1.2.4 Tracefinder软件定性定量的参数 基于商业软件Tracefinder 3.3(Thermo Fisher Scientific, CA)

系统, 根据心磷脂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、15 ppm, 通过选择相同质荷比(m/z)下的最高色谱峰, 积分得到对应的色谱峰峰面积。

2 结果与讨论

2.1 甲基化后心磷脂的高分辨高通量分析流程

2.1.1 心磷脂的甲基化反应 三甲基硅烷化的甲基化反应是在磷脂的磷酸基团羟基位点进行, 从而改变磷脂的化学性质, 其反应机理如图1所示。以TMS为衍生化试剂, 甲基叔丁基醚: 甲醇(20:6)为反应溶剂, 在室温条件下反应20 min。

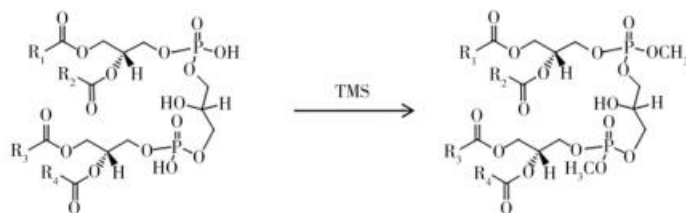


图1 心磷脂TMS衍生化反应示意图

Fig. 1 Chemical reaction of methylation for cardiolipins

R_1 , R_2 , R_3 and R_4 represent each fatty acid chains

结合高分辨质谱仪的分析手段, 本研究建立了一种包含本地数据库在内的甲基化心磷脂高通量分析方法, 可以高效完成心磷脂的定性与定量, 分析流程如图2所示。

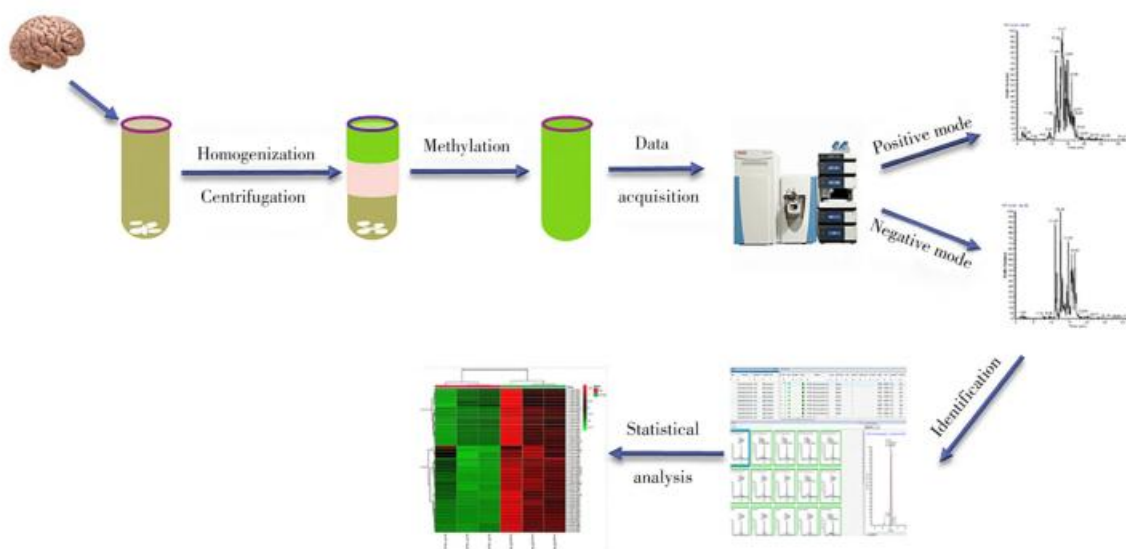


图2 甲基化心磷脂的高通量定性定量流程图

Fig. 2 High-throughput qualitative and quantitative workflow of methylated cardiolipins

2.1.2 甲基化后心磷脂的色谱与质谱行为 以标准品CL(14:0/14:0/14:0/14:0)为例, 考察了甲基化反应前后心磷脂的色谱行为。结果显示, 心磷脂在正、负离子模式下均有一定的响应信号, 且负离子模式的信号强度高于正离子模式。而甲基化后, 相同浓度下心磷脂的信号强度比甲基化前提高了近10倍。

在高通量的脂质分析中, 脂质的定性主要依赖于二级质谱碎片的匹配。但商业甲基化心磷脂数据库缺乏, 因此, 建立高通量的甲基化心磷脂本地数据库迫在眉睫。本研究以心磷脂标准品CL(14:0/14:0/14:0/14:0)、CL(16:0/16:0/16:0/16:0)、CL(18:1/18:1/18:1/18:1)为例, 其中加和离子正离子为 $[M + NH_4]^+$, 负离子为 $[M + CH_3COO]^-$ 。通过提取甲基化后的二级质谱图发现: 正离子模式二级质谱图中, 甲基化后的14:0心磷脂(图3A)、16:0心磷脂(图3C)和18:1心磷脂(图3E)以中性丢失羟甲基磷酸甘油后剩下的碎片为特征性离子碎片, 分别为 m/z 495.439 97、551.502 62和603.533 51。负离子模式二级质谱图中, 甲基化后的14:0心磷脂(图3B)、16:0心磷脂(图3D)和18:1心磷脂(图3F)以脂酰基 $[FA(14:0) - H]$ 、 $[FA(16:0) - H]$ 、 $[FA(18:1) - H]$ 以及中性丢失 $[C_3H_6O]$

后剩下的碎片为特征性离子碎片, 分别为 m/z 227.200 85、605.416 81; 255.232 59、661.481 57; 281.248 08、713.513 67。

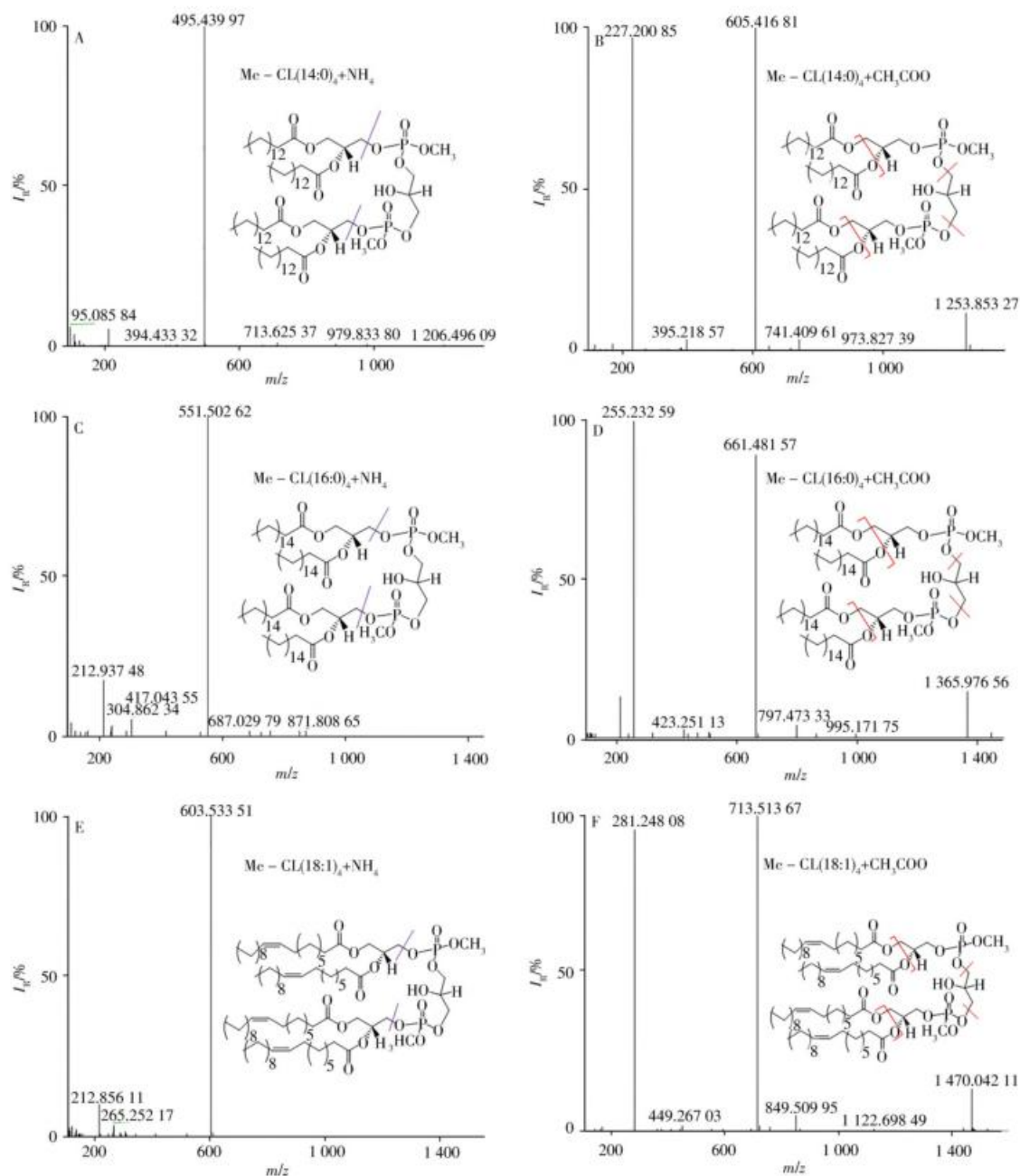


图3 甲基化后标准品 14:0 心磷脂、16:0 心磷脂、18:1 心磷脂在正离子模式 (A、C、E) 和负离子模式 (B、D、F) 的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of Me-CL(14:0)₄, Me-CL(16:0)₄ and Me-CL(18:1)₄ in positive (A, C, E) and negative (B, D, F) mode

purple lines displays collision induced fragments generated in positive mode and red lines are fragments in negative mode

2.1.3 甲基化心磷脂本地数据库的建立 由于甲基化心磷脂在正离子和负离子二级质谱图中均呈现特有的碎裂规律, 因此, 利用该碎裂规律预测了约 780 个含有不同心磷脂分子的特征性二级碎片, 并建立了本地数据库。数据库包含了预测的一级精确 m/z 及正、负离子模式下的二级特征碎片。其一级和二级质谱的精确 m/z 计算方法如表 1 所示, 其中 a 、 b 、 x 和 y 分别为 4 条脂肪酸链的碳原子个数, m 、 n 、 s 和 t 为各酰基链的双键个数。各元素的精确质量数如下: C 为 12.000 00; H 为 1.007 83; O 为 15.994 91; N 为 14.003 07; P 为 30.973 76; 质子为 1.007 28。

Tracefinder 软件系统基于本地数据库的化合物二级鉴定, 首先进行一级质谱精确 m/z 的匹配。其中加和离子正离子为 $[M + NH_4]^+$, 负离子为 $[M + CH_3COO]^-$ 。在一级质量数匹配的基础上, 进行二级质

谱碎片信息的鉴定。正离子的特征性碎片信息得到两条脂肪酸链的加和, 而相同色谱保留时间下负离子的特征性碎片又丰富了每条脂肪酸链的信息。两种模式得到的数据结果可以实现心磷脂的高通量定性筛选和准确定量分析。

表1 甲基化心磷脂的一级、二级质谱精确质量数的计算方法

Cardiolipin	Positive adduct m/z (+ NH_4)	Negative adduct m/z (+ CH_3COO)
Precursors	$12^*(a+b+x+y+11)+1.007\ 825^*$ $(2a+2b+2x+2y-2m-2n-2s-2t+22)+$ $15.994\ 915^*17+30.973\ 762^*$ $2+14.003\ 074$	$12^*(a+b+x+y+13)+1.007\ 825^*$ $(2a+2b+2x+2y-2m-2n-2s-2t+21)+$ $15.994\ 915^*19+30.973\ 762^*2$
Featured fragment 1	$12^*(a+b+3)+1.007\ 825^*$ $(2a+2b-2m-2n+3)+$ $15.994\ 915^*4$	$12^*a+1.007\ 825^*(2a-2m)+15.994\ 915^*2-1.007\ 276; 12^*b+$ $1.007\ 825^*(2b-2n)+15.994\ 915^*2-1.007\ 276; 12^*x+$ $1.007\ 825^*(2x-2s)+15.994\ 915^*2-1.007\ 276; 12^*y+$ $1.007\ 825^*(2y-2t)+15.994\ 915^*2-1.007\ 276$ (4 fatty acid chains)
Featured fragment 2	$12^*(x+y+3)+1.007\ 825^*$ $(2x+2y-2s-2t+3)+15.994\ 915^*4$	$12^*(a+b+4)+1.007\ 825^*(2a+2b-2m-2n+6)+$ $30.973\ 762+15.994\ 915^*8$
Featured fragment 3		$12^*(x+y+4)+1.007\ 825^*(2x+2y-2s-2t+6)+$ $30.973\ 762+15.994\ 915^*8$

2.2 色谱条件的优化

根据实验室的前期研究^[22-23], 心磷脂的疏水性较强, C_{18} 色谱柱条件下的出峰时间比较靠后。因此, 为了提高心磷脂的检测效率, 以标准品 CL(14:0/14:0/14:0/14:0) 为例, 对比了流动相 B 相不同起始洗脱梯度(40%、50%、60%)时, 正、负离子模式下甲基化心磷脂的峰面积。由图 4 可知, 随着起始洗脱梯度的升高, 甲基化心磷脂的色谱保留时间逐渐前移, 但丰度逐渐减小。为尽可能地检测低丰度的化合物, 实验选取 40% 的起始洗脱梯度作为最佳色谱条件。

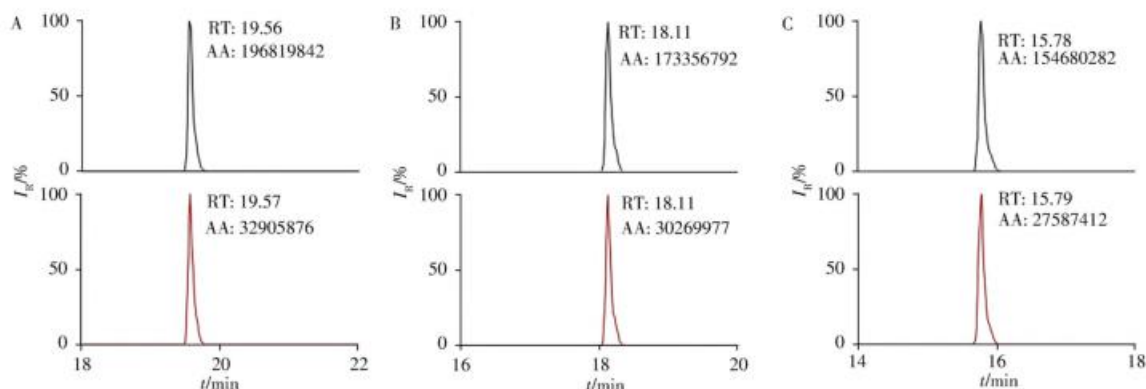


图4 不同起始洗脱梯度下甲基化心磷脂在正(上)、负离子(下)模式的信号响应强度

Fig. 4 Intensity of methylated cardiolipin under positive(up) and negative(down) mode at different initial elution gradients
A: 40%; B: 50%; C: 60%

2.3 方法学评价

2.3.1 衍生化效率 为考察心磷脂甲基化方法的重复性和可靠性, 以标准品 CL(14:0/14:0/14:0/14:0) 为例, 选取了一系列的质量浓度进行衍生化效率评估, 通过衍生化后的未甲基化 CL(14:0/14:0/14:0/14:0) 丰度与衍生化前 CL(14:0/14:0/14:0/14:0) 的丰度比值来计算衍生化效率。表 2 结果显示, 不同浓度下的衍生化效率均在 99% 以上。

表2 不同浓度下 CL(14:0/14:0/14:0/14:0) 的衍生化效率

Table 2 Derivatization efficiency of CL(14:0/14:0/14:0/14:0) at different concentrations

Concentration($\mu\text{g/mL}$)	Abundance prior to methylation	Abundance after methylation	Derivatization efficiency(%)
5	6.56×10^7	2.51×10^5	99.6
10	1.70×10^8	1.10×10^6	99.4
20	4.12×10^8	2.52×10^6	99.4
50	1.05×10^9	5.47×10^6	99.5
100	2.70×10^9	1.03×10^7	99.6

2.3.2 精密度、线性范围以及灵敏度 称取约2.0 mg的CL(14:0/14:0/14:0/14:0)标准品,以甲基叔丁基醚:甲醇(20:6)为溶剂,配制2 mg/mL的CL(14:0/14:0/14:0/14:0)标准品母液,并将其稀释至80、800 ng/mL。按照“1.2.2”方法进行甲基化反应,上机检测。每个浓度选取3个生物重复,连续运行序列3 d,得到80、800 ng/mL浓度下的日内相对标准偏差(RSD)分别为2.2%和1.9%,日间RSD分别为9.3%和15%,准确度(以测量值与真值的相对误差表示)分别为10.2%和9.9%。结果表明,该方法可以满足日常的检测需求。

按照“1.2.1”方法,选取小鼠脑组织提取的脂质样本作为空白基质,稀释标准品CL(14:0/14:0/14:0/14:0)母液,分别配制成1 ng/mL~20 μ g/mL的系列质量浓度标准曲线溶液,分成2份。一份直接上机检测,另一份按照“1.2.2”方法进行甲基化反应后上机检测。以标准品的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归分析。结果表明:甲基化后的14:0心磷脂在0.010~20 μ g/mL范围内线性良好,线性方程为 $Y = 350\,731 + 842\,203.5X$ ($r^2 = 0.994\,3$),权重因子1/X;在脑基质中,CL(14:0/14:0/14:0/14:0)的定量下限(LOQ, $S/N = 10$)为10 ng/mL。而未甲基化的14:0心磷脂的线性范围为0.2~50 μ g/mL,线性方程为 $Y = -3\,334\,890 + 20\,441.8X$ ($r^2 = 0.996\,1$),权重因子1/X,LOQ为200 ng/mL。同时,通过数据库检索匹配发现,直接上机检测的脑组织可检测到30种心磷脂,而甲基化后的脑组织样品可检测到43种化合物。因此,甲基化对痕量心磷脂样品的检测具有很大优势。

2.3.3 基质效应、平均回收率和相对标准偏差 选取“2.3.2”中标准溶液的低、中、高3个浓度点进行基质效应和加标回收实验。每个浓度做3个重复,计算基质效应、平均回收率和RSD(表3)。结果表明,3个加标水平下的基质效应差异不大,在1.0~1.4之间,说明基质对于分析物均有一定的促进作用。Me-CL(14:0)₄的平均回收率为92.8%~119%,RSD为6.0%~14%。

表3 Me-CL(14:0)₄ 在小鼠脑组织样品中的基质效应、平均回收率和相对标准偏差($n = 3$)

Table 3 Matrix effects, average recoveries and relative standard deviations (RSD) of Me-CL(14:0)₄ in mouse brain tissues ($n = 3$)

Compound	Added (ng/mL)	Matrix effect	Average recovery (%)	RSD (%)
Me-CL(14:0) ₄	100	1.3	119	14
	1 000	1.0	107	6.0
	10 000	1.4	92.8	7.0

2.4 实际样本的检测

通过上述甲基化方法分别对24周龄(Young)和48周龄(Old)的野生型C57BL/6雄性小鼠的脑组织进行心磷脂的差异化分析,每组各选取3只小鼠,原始数据基于甲基化心磷脂的本地数据库进行检索。本实验共鉴定到43种心磷脂分子,选取两组间有差异的21种心磷脂分子($P < 0.05$)进行热图分析(图5),结果表明,老龄化小鼠与年轻小鼠脑组织中的心磷脂均呈现显著的下调趋势,心磷脂含量分布有明显差异。结合前期研究成果^[24],小鼠脑组织中心磷脂的脂肪酸链组成主要集中在脂肪酸链FA(16:0)、FA(16:1)、FA(18:1)、FA(20:4)、FA(22:6)。由此可以推断,在小鼠衰老过程中脑组织中的脂肪酸链发生了重排,且FA(20:4)、FA(22:6)长链多不饱和脂肪酸呈现下降趋势。

3 结论

本研究建立了基于液相色谱-高分辨质谱的甲基化心磷脂检测方法,并通过心磷脂标准品甲基化后的二级碎裂规律,开发了可对心磷脂进行高通量定性及定量分析的本地数据库。该方法具有较好的灵敏度、线性范围、精密度,对于痕量心磷脂样品的检测具有很大优势。检测了24和48周龄的C57BL/6小鼠衰老模型中的脑组织,成功筛选出21种心磷脂分子。在48周小鼠的脑组织中,多个含FA(20:4)、FA(22:6)多不饱和脂肪酸链的心磷脂分子含量明显低于24周小鼠,预示FA(20:4)、FA(22:6)多不饱和脂肪酸的代谢在衰老过程中发生了重排并呈下降趋势。

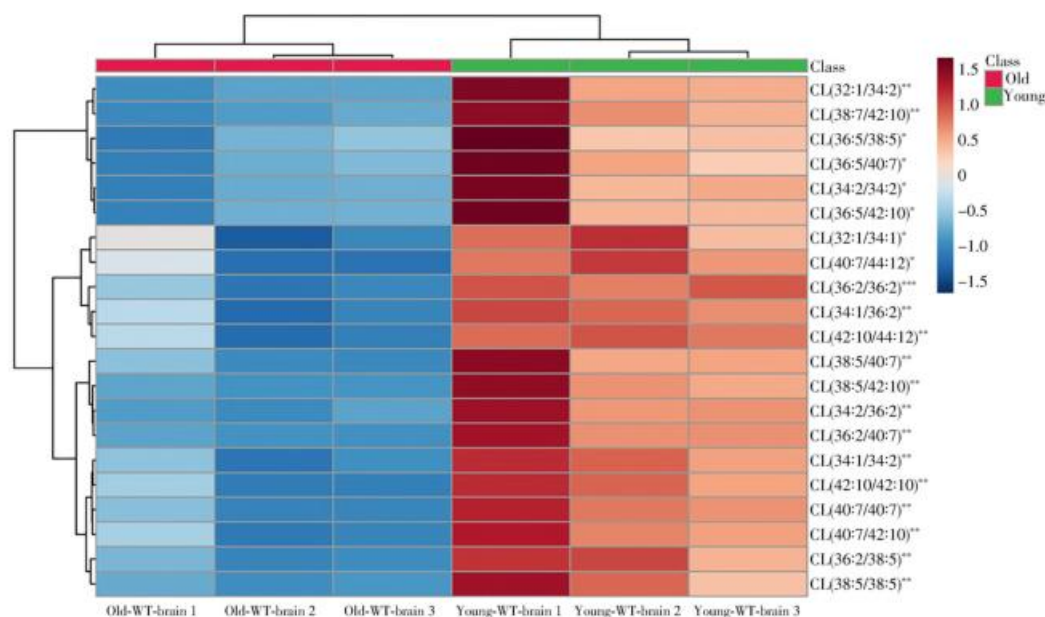


图5 24和48周龄小鼠脑组织的心磷脂热图

Fig. 5 Heatmap of cardiolipin in mouse brain at 24 and 48 weeks

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

参考文献:

- [1] Cullis P R, Hope M J, Tilcock C. *Chem. Phys. Lipids*, **1986**, 40(2/4): 127–144.
- [2] Hoch F L. *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1113(1): 71–133.
- [3] Hatch G M. *Int. J. Mol. Med.*, **1998**, 1(1): 33–74.
- [4] Hatch G M. *Mol. Cell. Biochem.*, **1996**, 159(2): 139–148.
- [5] Hsu F F, Turk J, Rhoades E R, Russell D, Shi Y X, Groisman E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16(4): 491–504.
- [6] Ostrander D B, Sparagna G C, Amoscato A A, McMillin J B, Dowhan W. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276(41): 38061–38067.
- [7] Mcmillin J B, Dowhan W. *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids*, **2002**, 1585(2): 97–107.
- [8] Houtkooper R H, Vaz F M. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65(16): 2493–2506.
- [9] Scherer M, Schmitz G, Liebisch G. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(21): 8794–8799.
- [10] Han X L, Yang J Y, Cheng H, Yang K, Abendschein D, Gross R. *Biochemistry*, **2005**, 44(50): 16684–16694.
- [11] Han X L, Yang K, Yang J Y, Cheng H, Gross R. *J. Lipid Res.*, **2006**, 47(4): 864–879.
- [12] Schlame M, Otten D. *Anal. Biochem.*, **1991**, 195(2): 290–295.
- [13] Houtkooper R H, Rodenburg R J, Thiels C, Van Lenthe H, Stet F, Bwee T P, Stone J E, Steward C G, Wanders R J, Smeitink J, Kulik W, Vaz F M. *Anal. Biochem.*, **2009**, 387(2): 230–237.
- [14] Minkler P E, Hoppel C L. *J. Lipid Res.*, **2009**, 51(4): 856–865.
- [15] Lee J C, Byeon S K, Moon M H. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(9): 4969–4977.
- [16] Wang M, Palavicini J P, Cseresznye A, Han X L. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(16): 8490–8495.
- [17] Lee J W, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1279(7): 98–107.
- [18] Wang C Y, Han X L. *Oil Crop Sci.*, **2017**, 2(4): 195–210.
- [19] Canez C R, Shields S W J, Bugno M, Wasslen K V, Weinert H P, Willmore W G, Manthorpe J M, Smith J C. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(14): 6996–7004.
- [20] Cai T X, Shu Q B, Hou J J, Liu P B, Niu L L, Guo X J, Liu C C, Yang F Q. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(1): 513–521.
- [21] Wang X Y, Zong Z Y, Jiao Y P, Xu L N, Wang Y S, Li L, Liu X H. *Chin. J. Anal. Chem.* (王雪颖, 宗兆运, 焦玉佩, 许丽娜, 王昱淞, 栗琳, 刘晓蕙. 分析化学), **2019**, 47(2): 249–255.
- [22] Tang H P, Wang X Y, Xu L N, Ran X R, Li X J, Chen L G, Zhao X B, Deng H T, Liu X H. *Talanta*, **2016**, 156: 163–171.
- [23] Xu L N, Wang X Y, Jiao Y P, Liu X H. *Talanta*, **2018**, 178: 287–293.
- [24] Xu L N, Schmitt M V, Ruan H B, Jiao Y P, Wang X Y, Wang Y S, Yang T, Lienau P, Reichel A, Liu X H. *Int. J. Anal. Chem.*, **2020**, (9): 1–11.

(责任编辑: 丁 岩)