

# 基于QTRAP®质谱系统对生物样本中1-O-酰基神经酰胺类脂质化合物的检测

## Identification of 1-O-acylceramides by QTRAP® Mass Spectrometry System in Biological Samples

钟晨春, 龙志敏

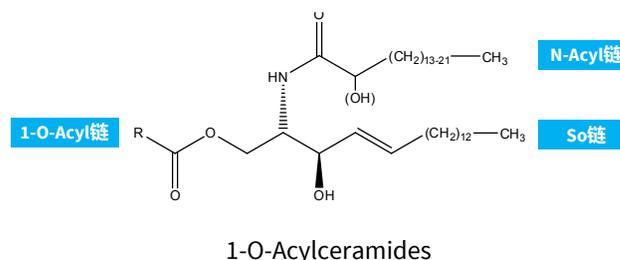
SCIEX中国, 应用支持中心

**Keywords:** 1-O-acylceramides, QTRAP, lipidomics, MRM-IDA-EPI, Bioanalysis

神经酰胺 (Ceramide, Cers) 存在于所有的真核细胞中, 对细胞分化、增殖、凋亡、衰老等生命活动具有重要调节作用。最近, 神经酰胺通过二酰基甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, Dgat) 生成1-O-酰基神经酰胺 (1-O-Acylceramides, 1-OAC) 类化合物并贮存于细胞脂滴中, 被认为是作为高脂饮食引起的肝脏细胞中产生过量神经酰胺后的主要变化形式。1-OAC作为组织器官特异性脂质化合物, 1-OAC类脂质化合物在不同细胞、器官、组织部位中差异很大: 在大部分器官中, 1-OAC含量较低, 约为0.25-1.3 pmol/mg; 在肝脏、小肠、大肠中, 1-OAC含量较高, 为4-13 pmol/mg。同时, 与其他脂质化合物类似, 1-OAC有三个可以和脂肪酸链形成酯键的位点, 由于脂肪酸链所含碳数和不饱和度不同, 使得1-OAC化合物的数量也变得十分庞大, 且同分异构体较多 (见图1), 而这些化合物能获得标准品的也十分有限。因此, 对生物样本中1-OAC类化合物开展准确的分析检测工作, 需要仪器具有良好的检测灵敏度的同时, 还能具有良好的定性能力, 对缺乏标准品的1-OAC化合物进行结构确证以及同分异构体的区分。

SCIEX QTRAP®质谱系统是三重四极杆和线性离子阱质谱的巧妙结合, 兼具了两者的优势: 三重四极杆质谱检测的高灵敏度、分析重现性、抗污染能力, 以及在信息依赖型采集 (information dependent acquisition, IDA) 工作模式下, 实现四极杆和线性离子阱功能的快速转换, 将母离子在碰撞池产生的子离子进行富集, 进而实现增强型子离子扫描 (enhanced product ion, EPI), 在三重四极杆多反应监测模式 (multiple reactions monitoring, MRM) 对化合物准确定量的同时获得EPI扫描获得的化合物高质量的二级质谱图, 实现化合物的定性判定; 即利用QTRAP®质谱系统特有的MRM-IDA-EPI

采集模式, 一针分析可以实现对化合物同时准确定量和定性分析的工作。将此工作模式应用于1-OAC类化合物的检测, 可以很好的解决对低含量、缺乏标准品且数量庞大的脂质化合物快速定量、定性工作。



**图1. 1-OAC化合物结构。**1-OAC类化合物有三个脂肪酸链结合位点分别为N-Acyl链、So链、1-O-Acyl链; N-Acyl链中alpha位C可能发生氧化形成羰基, So链由含18个碳的烷烃链组成其中不饱和度为0或1, 1-O-Acyl链为碳数为16-26不饱和度为0-6的脂肪酸链。

### 实验方法

**样品前处理:** 15 mg匀浆后的组织中添加5 mL 二氯甲烷: 甲醇: 水(10:10:1, v/v/v)提取两次, 5 mL 二氯甲烷: 甲醇: 水(30/60/8, v/v/v)提取一次, 离心后取上清合并并用N<sup>2</sup>吹干, 最终用1 mL二氯甲烷: 甲醇: 水(10:95:5, v/v/v)溶液复溶, 用于质谱联用分析。

**液质联用条件:** 样品通过串联ExionLC™系统的SCIEX QTRAP®质谱系统进行分析。详尽方法列于表1和2。

**数据处理:** 数据通过SCIEX OS软件 2.0中的定量功能 (点击“Analytics”) 进行处理。

表1. 色谱条件

| 参数   | 数值  |
|------|---|
| 色谱柱  | Phenomenex Kinetex C18,<br>100 × 2.1 mm, 2.6 μm |
| 流动相A | 水:甲醇:乙腈<br>(1:1:1, 含5 mM乙酸铵)                    |
| 流动相B | 异丙醇 (含5 mM乙酸铵)                                  |
| 流速   | 0.3 mL/min                                      |
| 柱温   | 45 °C   |
| 进样体积 | 1 μL  |

| 时间 (min) | 流动相A (%) | 流动相B (%) |
|----------|----------|----------|
| 0        | 50       | 50       |
| 1        | 50       | 50       |
| 12       | 2        | 98       |
| 13       | 2        | 98       |
| 13.1     | 50       | 50       |
| 17       | 50       | 50       |

表2. SCIEX QTRAP系统的质谱参数

| 参数      | 数值     | 参数     | 数值                                  |
|---------|--------|--------|-------------------------------------|
| 气帘气     | 40 psi | 源温度    | 350 °C                              |
| 雾化气     | 55 psi | 辅助气    | 55 psi                              |
| 碰撞诱导解离气 | 12     | 离子喷雾电压 | 5200 V                              |
| 去簇电压    | 80 V   | 入口电压   | 10 V                                |
| 碰撞池出口电压 | 15 V   | EPI设置  | 100-1000 (50 ± 20 V, Top 2, DBS on) |

## 1-OAC类化合物MRM-IDA-EPI检测结果

### 1. 1-OAC类化合物质谱碎片解析

通过检测发现1-OAC类化合物在N-Acyl是否发生alpha氧化, 对化合物产生的质谱二级碎片影响较大(见图二); 根据是否发生氧化可分为原型1-OAC和氧化型1-OAC。氧化型1-OAC由于具有2个

羟基结构, 可以形成特征的单脱水和双脱水峰, 而原型1-OAC由于只有1个羟基, 因此仅能形成单脱水峰。脱水峰组成的不同可以快速的对氧化与否进行判断。So链若饱和度为1, 则会产生特征的m/z 264.3碎片离子, 若饱和度为0则会产生m/z 266.3, 根据特征离子的不同可对So链组成进行区分; 此外, 1-OAC类化合物还会产生由So链以及N-Acyl链共同组成的特征碎片, 由于So链可以判定, 则利用组合加减原理可以计算出N-Acyl链的脂肪酸链组成, 例如C16:0 d18:1 Ceramide-1-O-16:0, 有m/z 264.3的特征碎片则So链为d18:1, 又有m/z 502.6, 则N-Acyl组成通过(502.6-264.3)可判定为16个碳不饱和度为0。

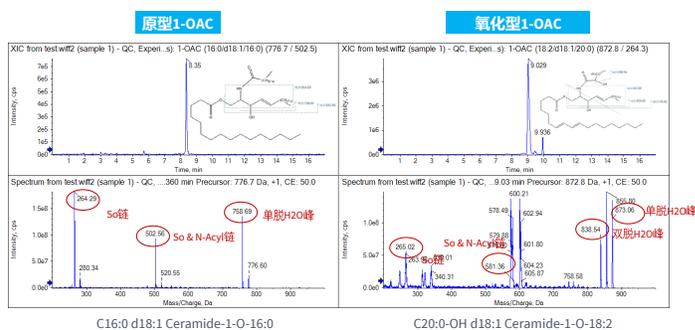


图2. 1-OAC类化合物质谱碎片规律。原型1-OAC类化合物以C16:0 d18:1 Ceramide-1-O-16:0为例(左), 会形成So链、So&N-Acyl链、单脱水峰的特征碎片离子, 分别为m/z 264.3, 502.6, 758.7; 氧化型1-OAC类化合物以C20:0-OH d18:1 Ceramide-1-O-18:2为例(右), 会形成 So链、So & N-Acyl链、双脱水峰、单脱水峰的特征碎片离子, 分别为m/z 266.3, 581.4, 838.5, 873.1。

### 2. 根据裂解规律和碳链组成预测不同1OAC的MRM列表

根据原型和氧化型1-OAC类化合物各自的质谱碎片规律以及3条连接的脂肪酸链可能的组成, 我们可以对可能存在的1-OAC类化合物进行理论MRM离子对的预测(见图3)。按照N-Acyl链、So链、1-O-Acyl链可能的碳数以及不饱和度, 共建立了528个MRM离子对, 并通过MRM-IDA-EPI的检测对检测到的峰进行质谱二级确认。

### 3. 保留时间规律进一步验证

对于同一类脂质化合物在C18色谱体系上的保留时间呈现明显的规律: 随着碳数的增加, 保留时间靠后; 随着不饱和度的增加, 保留时间靠前(见图4)。根据这一规律, 我们可以对MRM-IDA-EPI判定的1-OAC化合物进行进一步的相互确认。

原型1-OAC

| Q1      | Q3    | ID                     | DP | CE |
|---------|-------|------------------------|----|----|
| 748.718 | 474.5 | 1-OAC (16:0/18:1/14:0) | 80 | 46 |
| 776.749 | 502.5 | 1-OAC (16:0/18:1/16:0) | 80 | 46 |
| 804.780 | 530.5 | 1-OAC (16:0/18:1/18:0) | 80 | 46 |
| 802.765 | 528.5 | 1-OAC (16:0/18:1/18:1) | 80 | 46 |
| 832.812 | 558.6 | 1-OAC (16:0/18:1/20:0) | 80 | 46 |
| 830.796 | 556.5 | 1-OAC (16:0/18:1/20:1) | 80 | 46 |
| 858.827 | 586.6 | 1-OAC (16:0/18:1/22:0) | 80 | 46 |
| 856.812 | 584.6 | 1-OAC (16:0/18:1/22:1) | 80 | 46 |
| 886.859 | 614.6 | 1-OAC (16:0/18:1/24:0) | 80 | 46 |
| 884.843 | 612.6 | 1-OAC (16:0/18:1/24:1) | 80 | 46 |
| 914.890 | 642.7 | 1-OAC (16:0/18:1/26:0) | 80 | 46 |
| 912.874 | 640.6 | 1-OAC (16:0/18:1/26:1) | 80 | 46 |
| 776.749 | 474.5 | 1-OAC (18:0/18:1/14:0) | 80 | 46 |
| 804.780 | 502.5 | 1-OAC (18:0/18:1/16:0) | 80 | 46 |
| 832.812 | 530.5 | 1-OAC (18:0/18:1/18:0) | 80 | 46 |
| 830.796 | 528.5 | 1-OAC (18:0/18:1/18:1) | 80 | 46 |
| 860.843 | 558.6 | 1-OAC (18:0/18:1/20:0) | 80 | 46 |
| 858.827 | 556.5 | 1-OAC (18:0/18:1/20:1) | 80 | 46 |
| 888.874 | 586.6 | 1-OAC (18:0/18:1/22:0) | 80 | 46 |

氧化型1-OAC

| Q1      | Q3    | ID                        | DP | CE |
|---------|-------|---------------------------|----|----|
| 764.713 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/14C14:0) | 80 | 46 |
| 792.744 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/16C16:0) | 80 | 46 |
| 820.775 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/18C18:0) | 80 | 46 |
| 818.760 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/18C18:1) | 80 | 46 |
| 848.807 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/20C20:0) | 80 | 46 |
| 846.791 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/20C20:1) | 80 | 46 |
| 874.822 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/22C22:0) | 80 | 46 |
| 872.807 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/22C22:1) | 80 | 46 |
| 902.854 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/24C24:0) | 80 | 46 |
| 900.838 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/24C24:1) | 80 | 46 |
| 930.885 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/26C26:0) | 80 | 46 |
| 928.869 | 264.3 | 1-OAC (16:0/18:1/26C26:1) | 80 | 46 |
| 792.744 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/14C14:0) | 80 | 46 |
| 820.775 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/16C16:0) | 80 | 46 |
| 848.807 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/18C18:0) | 80 | 46 |
| 846.791 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/18C18:1) | 80 | 46 |
| 876.838 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/20C20:0) | 80 | 46 |
| 874.822 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/20C20:1) | 80 | 46 |
| 904.869 | 264.3 | 1-OAC (18:0/18:1/22C22:0) | 80 | 46 |

图3. 1-OAC类化合物MRM离子对预测。原型1-OAC以So & N-Acyl链特征离子建立MRM，氧化型1-OAC以So链特征离子建立MRM；通过MRM-IDA-EPI检测，获得这些离子对检测到的峰的二级碎片，以便进行定性确认。

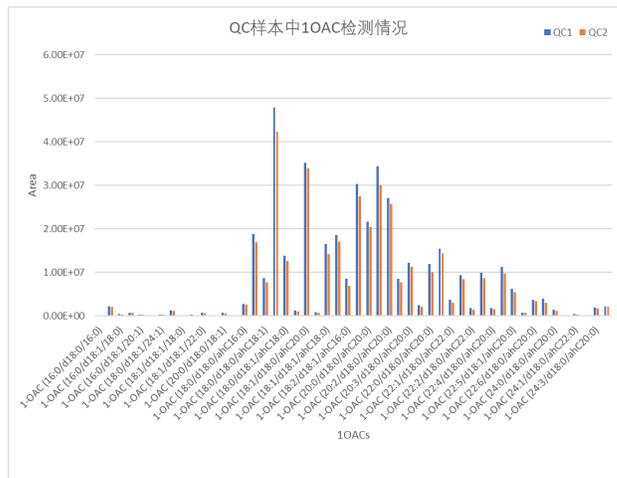


图5. MRM-IDA-EPI检测两个质控样本中50个1-OAC化合物的相对含量。

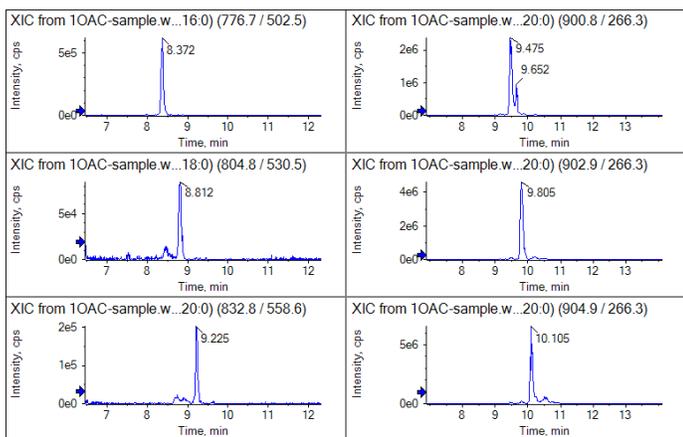


图4. 1-OAC类化合物保留时间变化规律。对于其他脂肪酸链组成相同的1-OAC化合物，碳数增加，保留时间延后（左）；不饱和度减小，保留时间延后（右）。

#### 4. 1-OAC类化合物定量检测结果

按照上述方法，制备了两个质控样本，并对其中含有的1-OAC类化合物进行了定量定性分析（见图5）。在所制备的质控样本中共检测到原型1-OAC化合物14个，氧化型1-OAC化合物36个。

#### QTRAP®系统检测1-OAC类化合物的必要性

通过QTRAP®质谱系统我们可以建立MRM-IDA-EPI的检测方法，实现一针进样同时对化合物进行定量和定性分析。如果是在普通三重四极杆上开展，那么我们仍然可以通过预测的MRM离

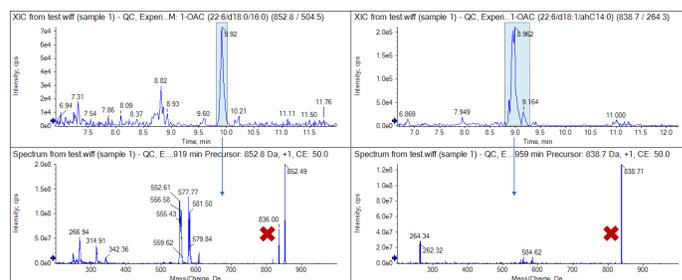


图6. QTRAP®系统对1-OAC假阳性的判定。对于MRM离子对预测为原型1-OAC的化合物质谱二级发现有连续的脱水峰（左），而预测为氧化型1-OAC的化合物质谱二级没有发现脱水峰（右），均与各自化合物应该产生的特征离子不符。

子对对样品中可能存在的1-OAC化合物进行检测，但是如果如果没有QTRAP®系统通过EPI模式获得的质谱二级数据，可能对化合物的判定发生错误（见图6）。

## 结论

- 本文在SCIEX QTRAP®质谱系统上建立了1-OAC类化合物MRM-IDA-EPI检测方法，可以实现一针进样同时定性和定量。
- SCIEX QTRAP®质谱系统为低含量、同分异构体多、缺乏标准品的生物样本分析工作提供了准确、可靠的分析平台。

## 参考文献

1. Aline Bayerle, et al. Endogenous levels of 1-O-acylceramides increase upon acidic ceramidase deficiency and decrease due to loss of Dgat1 in a tissue-dependent manner. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2020 09;1865(9)

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15325-ZH-A



### 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：021-2419-7201  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)