

论著·基础研究

基于超高效液相色谱-质谱联用技术的神经酰胺定量分析

黄庆霞^{1,2}, 雷和花¹, 唐惠儒³, 王玉兰⁴

1. 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉磁共振中心, 武汉 430071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 复旦大学附属中山医院, 生命科学院, 遗传工程国家重点实验室, 人类表型组研究院, 代谢组学与系统生物学实验室, 上海 200433; 4. 新加坡南洋理工大学李光前医学院, 新加坡表型中心, 生命科学院, 新加坡 639646

[摘要] 目的· 研发一种具有高通量、高灵敏度和准确度的神经酰胺定量分析方法。方法· 应用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱 (ultrahigh-performance liquid chromatography tandem triple-quadrupole mass spectrometry, UHPLC-MS) 对 14 种神经酰胺进行定量分析, 使用的色谱柱为 ZORBAX Eclipse plus C8 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), 流动相 A 为超纯水, 流动相 B 为甲醇, 流动相 A 和 B 中均加入 2.5 mmol/L 乙酸铵。采用多反应监测模式和正离子模式分析神经酰胺。结果· 该方法能在 10 min 内定量分析 14 种神经酰胺, 检测限 (limit of detection, LOD) 和定量限 (limit of quantification, LOQ) 分别为 0.06 ~ 0.42 nmol/L 和 0.17 ~ 1.26 nmol/L。准确度范围为 73.02% ~ 122.39%, 保留时间和积分面积的相对标准偏差分别为 0.07% ~ 0.54% 和 2.26% ~ 13.98%。结论· 基于 UHPLC-MS 技术的神经酰胺定量分析方法灵敏度高、重现性好、分析效率高, 可用于检测细胞等生物样品中的神经酰胺含量。

[关键词] 神经酰胺; 超高效液相色谱; 三重四极杆质谱; 定量分析

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.003 **[中图分类号]** R-331 **[文献标志码]** A

Quantitative analysis of ceramides by ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

HUANG Qing-xia^{1,2}, LEI He-hua¹, TANG Hui-ru³, WANG Yu-lan⁴

1. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, National Center for Magnetic Resonance in Wuhan, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Zhongshan Hospital and School of Life Sciences, Laboratory of Metabolomics and Systems Biology, Human Phenome Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China; 4. Singapore Phenome Center, Lee Kong Chian School of Medicine, School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore 639646, Singapore

[Abstract] Objective· To develop a method that can quantitatively analyze a wide range of ceramides with high throughout, sensitivity and accuracy.

Methods· Ultrahigh-performance liquid chromatography tandem triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS) was employed for quantitative analysis of 14 ceramides by using ZORBAX Eclipse plus C8 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) column. Solvent A consisted of water, solvent B consisted of methanol, and 2.5 mmol/L ammonium acetate was added to both. Multiple reaction monitoring (MRM) mode and positive ion mode were used to analyze the ceramides. Results· This method can quantitatively analyze 14 ceramides in 10 minutes with the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) between 0.06–0.42 nmol/L and 0.17–1.26 nmol/L, respectively. The accuracy ranged from 73.02% to 122.39%, and the relative standard deviation (RSD) of retention time and peak area were between 0.07%–0.54% and 2.26%–13.98%, respectively. Conclusion· Quantitative analysis of ceramides based on UHPLC-MS has high sensitivity, reproducibility and efficiency, which can be used to analyze the ceramides in biological samples such as cells.

[Key words] ceramide; ultrahigh-performance liquid chromatography; triple-quadrupole mass spectrometry; quantitative analysis

神经酰胺 (ceramide) 是真核细胞中存在的一类复杂的脂质, 不仅是细胞膜结构的重要成分, 而且可作为第二信使参与细胞生长、增殖、分化和凋亡等信号转导过程, 同时也是鞘磷脂信号途径的重要中间产物^[1-4]。因此, 神经酰胺含量的测定在神经酰胺的生物学功能以及

相应的机制研究中具有重要意义。神经酰胺由鞘氨醇通过酰胺键与不同碳链长度的脂肪酸结合形成, 其结构具有多样性和复杂性, 因此增加了检测的难度。神经酰胺定量检测的研究^[5-9]有很多, 且各有侧重, 如: 靶向分析方法能够高通量检测多种神经酰胺, 但结构鉴定不够准确^[5]; 通

[基金项目] 国家重点研发计划 (2017YFC0906800) (National Key Research and Development Program, 2017YFC0906800)。

[作者简介] 黄庆霞 (1990—), 女, 博士生; 电子信箱: qiangxuang@126.com。

[通信作者] 王玉兰, 电子信箱: yulan.wang@ntu.edu.sg。



过使用标准品建立的靶向分析方法只定量分析包含 16 个碳到 24 个碳 (C16 ~ C24) 长度酰基链的几种神经酰胺，缺少含短链酰基链的神经酰胺^[7, 9]。反相高效液相色谱 [reversed-phase high performance liquid chromatography, (RP)-HPLC] 常基于酰基链的碳数和不饱和键数的不同来分离脂质^[10-11]。因此本研究采用反相超高效液相色谱串联质谱技术对包含 C2 ~ C24 长度脂肪酸的 14 种神经酰胺进行定量分析并应用于生物样本分析，为测定更多种类神经酰胺的含量提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

分析纯的甲酸、乙酸铵和二丁基羟基甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。色谱纯的甲醇和氯仿购于美国 ThermoFisher Scientific 公司。超纯水 (电阻率超过 18.2 MΩ/cm) 使用德国默克密理博 Elix Advantage 超纯水系统制备。包含 C2 ~ C24 长度脂肪酸的 15 种神经酰胺标准品 (包括 1 种含奇数碳脂肪酸的神经酰胺内标) 购于美国 Avanti Polar Lipids 公司。将 15 种神经酰胺标准品用氯仿 - 甲醇 ($V/V=1:1$) 分别配制成 1 mmol/L 的母液于 -20 °C 储存，使用前稀释至合适的浓度。

1.2 样品前处理

人类肝癌细胞系 HepG2 和含有稳定遗传和表达乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 基因组的细胞系 HepG2.2.15 购于中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。HepG2 和 HepG2.2.15 细胞系均在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养在含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 MEM (minimum essential medium) 培养基中 (Gibco)。当细胞在 T75 培养瓶中聚集接近 100% 时，采用 0.25% 胰酶 (Gibco) 消化和收集细胞，然后用预冷 PBS (phosphate-buffered saline) 缓冲液洗 3 次后保存于 -80 °C 待提取。

神经酰胺的提取方法是基于 Bligh 和 Dyer 的方法^[12]加以改进。细胞神经酰胺代谢物的提取方法如下：称取约 10 mg 细胞样品加入 2 mL 样品管，加入 10 μL 内标 (神经酰胺 d18:1/17:0, 20 μmol/L)、10 μL BHT (50 mg/mL, 溶于甲醇)、1 mL 氯仿 - 甲醇 ($V/V=1:1$) 和 0.45 mL 水，

然后涡旋混匀，在室温下 11 060 × g 离心 5 min；收集下层，残留物用氯仿 - 甲醇 ($V/V=1:1$) 和水再次提取。将 2 次收集的下层液体挥干，上机检测前用 80 μL 氯仿 - 甲醇 ($V/V=1:1$) 溶剂溶解待分析。

1.3 UHPLC-MS 系统

超高效液相色谱 (ultrahigh-performance liquid chromatography, UHPLC) 系统为配备 G4220A 二元泵和 G4226 自动进样器的 Agilent 1290 系列。质谱 (mass spectrum, MS) 系统为配备带有 Agilent 喷射流技术的 Jet-ESI 源和 QQQ 串联质量分析器的 Agilent 6460 三重四极杆质谱系列。所有的谱图数据处理使用 Mass Hunter 定性软件 (Agilent, B.06.00) 和 Mass Hunter 定量软件 (Agilent, B.06.00) 处理。

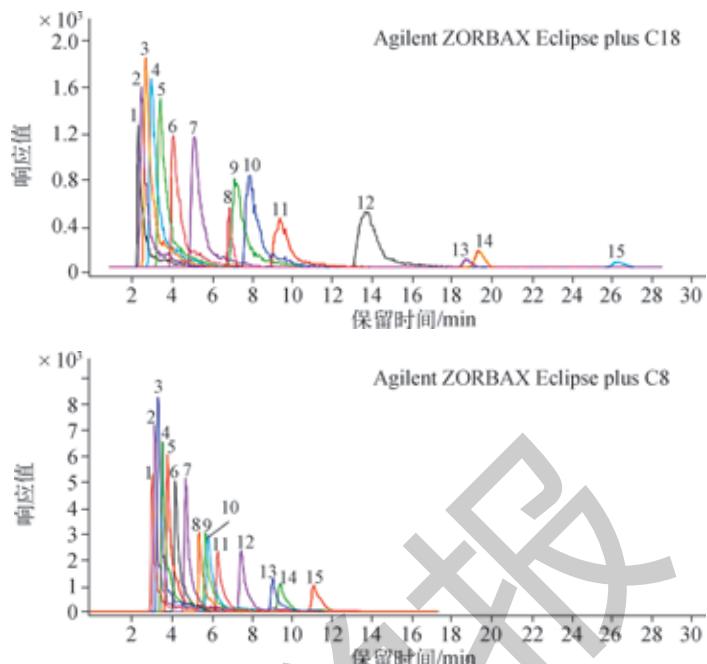
1.4 统计分析方法

使用软件 R (3.6.1) 进行统计学分析，定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单变量统计分析方法，如果数据符合正态分布采用 *t* 检验，不符合正态分布则采用 Mann-Whitney *U* 检验；*P*<0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UHPLC-MS 检测条件优化

为了选择合适的色谱柱，我们比较了 Agilent ZORBAX Eclipse plus C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 和 Agilent ZORBAX Eclipse plus C8 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 2 款色谱柱，结果表明 Agilent ZORBAX Eclipse plus C8 色谱柱的峰型和峰强度均较好 (图 1)。此外，我们还对流动相组成、流动相梯度、流速、柱温等参数进行优化 (数据未给出)。最终用于分析神经酰胺的 UHPLC-MS 检测条件为使用 ZORBAX Eclipse plus C8 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 作为分析色谱柱，流动相 A 为超纯水，流动相 B 为甲醇，流动相 A 和 B 中均加入 2.5 mmol/L 乙酸铵；梯度为 0 ~ 3 min, 94% B ~ 98% B，流速 0.35 mL/min；3 ~ 9 min, 98% B，流速 0.25 mL/min；9 ~ 10 min, 94% B，流速 0.35 mL/min。柱温控制在 45 °C，进样体积为 2 μL。质谱采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 正离子模式，鞘气流速和温度分别为 10 L/min 和 350 °C，毛细管电压为 4 000 V。



注: 神经酰胺的命名参照 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>)。以 LIPID MAPS 中 Cer[d18:1/2:0] 为例, d18:1 代表神经酰胺的基本骨架鞘氨醇, 2:0 表示与鞘氨醇的氨基相连的酰基链的碳链长度为 2 个碳 (C2), 不饱和键数为 0; 本文简写为 d18:1/2:0。1—d18:1/2:0, 2—d18:1/4:0, 3—d18:1/6:0, 4—d18:1/8:0, 5—d18:1/10:0, 6—d18:1/12:0, 7—d18:1/14:0, 8—d18:1/16:0, 9—d18:1/18:1(9z), 10—d18:1/17:0 (内标), 11—d18:1/18:0, 12—d18:1/20:0, 13—d18:1/22:0, 14—d18:1/24:1(15z), 15—d18:1/24:0。

图 1 2 种不同色谱柱比较 (MRM 色谱图)

Fig 1 Comparison of different columns (MRM)

2.2 神经酰胺定量分析

神经酰胺结构定性通过结合 MRM 定量离子对和定性离子对以及与标准品保留时间比对的方法来实现。神经酰胺定量

MRM 方法以 $[M+H]^+$ 作为前体离子, 以特征碎片 264 和 82 分别作为定量子离子和定性子离子, 而碎裂电压 (fragmentor)、碰撞能等参数则根据每个神经酰胺结构进行优化, 结果见表 1。

表 1 神经酰胺 MRM 方法参数

Tab 1 Parameters of ceramide MRM method

| 神经酰胺 | 母离子 > 子离子 | 碎裂电压 /V | 碰撞能 /V |
|------------------|---------------------|---------|--------|
| d18:1/2:0 | 324.2>264, 324.2>82 | 100 | 12; 30 |
| d18:1/4:0 | 352.2>264, 352.2>82 | 130 | 11; 30 |
| d18:1/6:0 | 380.3>264, 380.3>82 | 130 | 13; 30 |
| d18:1/8:0 | 408.3>264, 408.3>82 | 130 | 14; 30 |
| d18:1/10:0 | 436.3>264, 436.3>82 | 130 | 14; 30 |
| d18:1/12:0 | 464.3>264, 464.3>82 | 150 | 15; 30 |
| d18:1/14:0 | 492.4>264, 492.4>82 | 160 | 15; 30 |
| d18:1/16:0 | 520.4>264, 520.4>82 | 160 | 20; 30 |
| d18:1/17:0 | 534.4>264, 534.4>82 | 170 | 20; 30 |
| d18:1/18:1 (9z) | 546.4>264, 546.4>82 | 170 | 19; 30 |
| d18:1/18:0 | 548.4>264, 548.4>82 | 170 | 20; 30 |
| d18:1/20:0 | 576.5>264, 576.5>82 | 180 | 19; 30 |
| d18:1/22:0 | 604.4>264, 604.4>82 | 190 | 25; 30 |
| d18:1/24:1 (15z) | 630.4>264, 630.4>82 | 170 | 25; 30 |
| d18:1/24:0 | 632.4>264, 632.4>82 | 180 | 25; 30 |

注: 神经酰胺的命名参照 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>)。以 LIPID MAPS 中 Cer[d18:1/18:1(9z)] 为例, d18:1 代表神经酰胺的基本骨架鞘氨醇, 18:1 表示与鞘氨醇的氨基相连的酰基链的碳链长度为 18 个碳 (C18), 不饱和键数为 1, 9z 表示酰基链中不饱和键的位置; 本文简写为 d18:1/18:1(9z)



本研究采用内标标准曲线法进行定量计算,以含有奇数碳酰基链的神经酰胺d18:1/17:0为内标,以14种神经酰胺标准品混合溶液配置一系列浓度做标准曲线(0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、1、10、20、50 μmol/L),其中每个浓度点添加的内标浓度与样品中添加的内标浓度一致(终浓度为2.5 μmol/L)。以待测物和内标的峰面积比为横坐标,浓度比为纵坐标制作标准曲线。

表2 15种神经酰胺(含1个内标)的线性范围、LOD和LOQ
Tab 2 Linear range, LOD and LOQ of 15 ceramides (including one internal standard)

| 神经酰胺 | 线性范围/(nmol/L) | 线性曲线 | | LOQ/(nmol/L) | LOD/(nmol/L) |
|------------------|-------------------|-------------------------|----------------|--------------|--------------|
| | | 线性方程 | R ² | | |
| d18:1/2:0 | 0.29 ~ 146 412.88 | y=5 330.81 x+40 148.92 | 0.995 | 0.29 | 0.10 |
| d18:1/4:0 | 0.54 ~ 135 318.00 | y=6 175.95 x+51 158.40 | 0.995 | 0.54 | 0.18 |
| d18:1/6:0 | 1.26 ~ 125 786.16 | y=8 237.30 x+67 770.45 | 0.995 | 1.26 | 0.42 |
| d18:1/8:0 | 0.47 ~ 117 508.81 | y=8 556.62 x+52 529.33 | 0.996 | 0.47 | 0.16 |
| d18:1/10:0 | 0.44 ~ 110 253.58 | y=8 027.10 x+57 107.72 | 0.994 | 0.44 | 0.15 |
| d18:1/12:0 | 0.42 ~ 103 842.16 | y=8 006.94 x+52 597.28 | 0.997 | 0.42 | 0.14 |
| d18:1/14:0 | 0.39 ~ 98 135.43 | y=8 418.31 x+41 557.01 | 0.996 | 0.39 | 0.13 |
| d18:1/16:0 | 0.37 ~ 93 023.26 | y=7 681.01 x+38 502.09 | 0.997 | 0.37 | 0.12 |
| d18:1/17:0 | 0.36 ~ 90 661.83 | y=6 606.31 x+41 304.01 | 0.996 | 0.36 | 0.12 |
| d18:1/18:1 (9z) | 0.35 ~ 17 683.47 | y=4 562.08 x+141 862.17 | 0.998 | 0.35 | 0.12 |
| d18:1/18:0 | 0.18 ~ 17 746.23 | y=5 665.98 x+38 660.01 | 0.995 | 0.18 | 0.06 |
| d18:1/20:0 | 0.17 ~ 16 849.20 | y=5 784.24 x+45 374.00 | 0.994 | 0.17 | 0.06 |
| d18:1/22:0 | 0.32 ~ 16 090.10 | y=4 137.20 x+35 607.86 | 0.992 | 0.32 | 0.11 |
| d18:1/24:1 (15z) | 0.31 ~ 15 396.46 | y=4 186.11 x+32 724.18 | 0.994 | 0.31 | 0.10 |
| d18:1/24:0 | 0.77 ~ 15 444.02 | y=3 964.02 x+34 505.30 | 0.992 | 0.77 | 0.26 |

注: LOD—limit of detection, 检测限; 信噪比值为3时定义为LOD。LOQ—limit of quantification, 定量限; 信噪比值为10时定义为LOQ

将14种神经酰胺标准品混合成1个混合标准品后稀释成低、中、高3个浓度进行本方法的准确度和基质效应评估。培养并收集约200 mg细胞,用PBS混匀后等分为21份,其中9份用于提取前分别加入低(小于3倍LOQ)、中(线性范围内的中间浓度)、高(线性范围内最高浓度的75%~80%)浓度的神经酰胺混合标准品,9份用于提取后分别加入低、中、高浓度的神经酰胺混合标

2.3 神经酰胺定量分析方法评估

用15种神经酰胺标准品混合后稀释成不同浓度的标准溶液确定各类神经酰胺的线性范围,结果表明15种神经酰胺(含1种内标)的线性范围最小浓度为0.17~1.26 nmol/L,最高浓度为15 396.46~146 412.88 nmol/L。线性方程的R²值均大于0.99(表2)。

准品,3份不加任何标准品作为基质空白组。最终准确度采用回收率来表示,结果发现14种神经酰胺的准确度为73.02%~122.39%,低、中、高浓度的回收率的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于16.00%(表3)。14种神经酰胺的基质效应为71.31%~122.48%,低、中、高浓度的基质效应的RSD均小于16.00%(表3)。

表3 神经酰胺分析方法的回收率和基质效应

Tab 3 Recovery rate and matrix effect of ceramide analysis method

| 神经酰胺 | 回收率/% | | | 基质效应/% | | |
|-----------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| d18:1/2:0 | 97.78 | 122.19 | 81.66 | 113.73 | 94.30 | 85.02 |
| d18:1/4:0 | 107.58 | 99.41 | 92.17 | 89.88 | 80.65 | 81.97 |
| d18:1/6:0 | 112.47 | 81.90 | 80.55 | 109.68 | 88.47 | 105.68 |
| d18:1/8:0 | 74.89 | 82.27 | 86.90 | 91.59 | 107.71 | 92.78 |

(续表 3)

| 神经酰胺 | 回收率 /% | | | 基质效应 /% | | |
|------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| d18:1/10:0 | 86.21 | 85.49 | 118.48 | 92.20 | 82.92 | 116.87 |
| d18:1/12:0 | 105.27 | 80.96 | 116.82 | 92.00 | 84.28 | 106.32 |
| d18:1/14:0 | 103.14 | 93.11 | 91.99 | 90.54 | 106.80 | 111.50 |
| d18:1/16:0 | 104.75 | 114.67 | 122.39 | 83.07 | 84.90 | 71.31 |
| d18:1/18:1 (9z) | 73.02 | 111.27 | 99.36 | 94.00 | 88.58 | 82.16 |
| d18:1/18:0 | 92.25 | 93.70 | 94.21 | 81.21 | 106.28 | 102.06 |
| d18:1/20:0 | 111.30 | 87.30 | 79.92 | 94.55 | 102.54 | 116.70 |
| d18:1/22:0 | 100.99 | 83.59 | 83.17 | 76.46 | 98.66 | 82.95 |
| d18:1/24:1 (15z) | 113.10 | 78.50 | 85.65 | 79.02 | 83.83 | 84.34 |
| d18:1/24:0 | 102.67 | 86.69 | 80.24 | 122.48 | 96.02 | 103.43 |
| RSD/% | 13.08 | 14.94 | 15.97 | 14.22 | 10.45 | 15.38 |

注: 低浓度为小于 3 倍 LOQ, 中浓度为线性范围内的中间浓度, 高浓度为线性范围内最高浓度的 75% ~ 80%。其中 d18:1/2:0 到 d18:1/12:0 的低浓度为 0.5 nmol/L, 中浓度为 500 nmol/L, 高浓度为 100 000 nmol/L; d18:1/14:0 和 d18:1/16:0 的低浓度为 0.25 nmol/L, 中浓度为 250 nmol/L, 高浓度为 50 000 nmol/L; d18:1/18:1 (9z) 到 d18:1/24:0 的低浓度为 0.1 nmol/L, 中浓度为 100 nmol/L, 高浓度为 20 000 nmol/L。

将 15 种神经酰胺标准品混合成 1 个混合标准品后稀释成一系列浓度进行本方法的 LOD 和 LOQ 评估。LOD 和 LOQ 的评估结果表明, 15 种神经酰胺的 LOD 范围为 0.06 ~ 0.42 nmol/L, 而 LOQ 范围为 0.17 ~ 1.26 nmol/L (表 2)。将 15 种神经酰胺标准品混合成 1 个混合样后稀释成 3 个浓度 (0.05、1、10 μmol/L) 进行日内精密度

(早上、中午和晚上) 和日间精密度 (连续 3 d, 中午) 评估, 每个浓度重复采集 5 次。其保留时间和积分面积的 RSD 用来表示日间精密度和日内精密度。结果表明保留时间的 RSD 值为 0.07% ~ 0.54% [均值为 (0.25 ± 0.11)%], 积分面积的 RSD 值为 2.26% ~ 13.98% [均值为 (7.65 ± 3.22)%] (表 4)。

表 4 日内精密度和日间精密度
Tab 4 Intra-day and inter-day precision

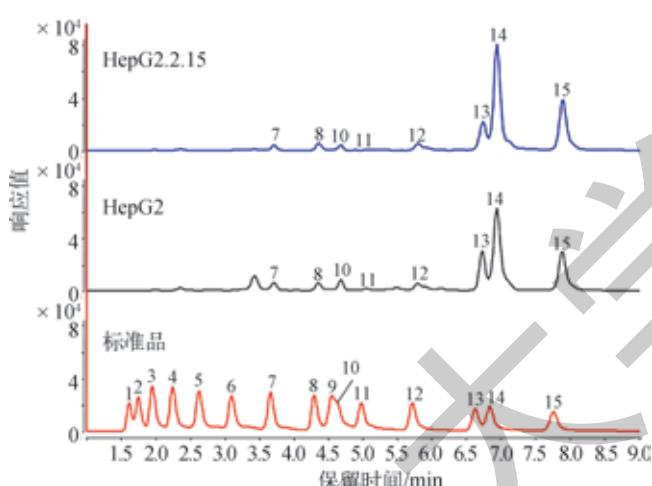
| 神经酰胺 | 日内精密度 (RSD) /% | | | | | | 日间精密度 (RSD) /% | | | | | |
|------------------|----------------|-------|----------|-------|-----------|-------|----------------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| | 0.05 μmol/L | | 1 μmol/L | | 10 μmol/L | | 0.05 μmol/L | | 1 μmol/L | | 10 μmol/L | |
| | RT | A | RT | A | RT | A | RT | A | RT | A | RT | A |
| d18:1/2:0 | 0.22 | 4.90 | 0.31 | 6.85 | 0.22 | 13.55 | 0.36 | 5.28 | 0.26 | 4.85 | 0.34 | 5.49 |
| d18:1/4:0 | 0.32 | 3.27 | 0.31 | 6.73 | 0.15 | 10.80 | 0.54 | 3.65 | 0.32 | 4.03 | 0.30 | 2.26 |
| d18:1/6:0 | 0.32 | 2.98 | 0.13 | 5.99 | 0.14 | 9.92 | 0.46 | 5.96 | 0.32 | 3.76 | 0.48 | 3.70 |
| d18:1/8:0 | 0.33 | 4.72 | 0.16 | 6.20 | 0.19 | 11.67 | 0.50 | 7.87 | 0.25 | 4.57 | 0.42 | 6.43 |
| d18:1/10:0 | 0.42 | 7.15 | 0.26 | 5.85 | 0.26 | 13.72 | 0.54 | 10.43 | 0.24 | 5.30 | 0.28 | 10.72 |
| d18:1/12:0 | 0.45 | 5.44 | 0.17 | 6.88 | 0.14 | 12.35 | 0.49 | 6.62 | 0.28 | 5.70 | 0.28 | 5.66 |
| d18:1/14:0 | 0.38 | 6.07 | 0.19 | 8.95 | 0.13 | 12.14 | 0.42 | 4.89 | 0.24 | 6.37 | 0.28 | 3.55 |
| d18:1/16:0 | 0.38 | 5.69 | 0.18 | 5.83 | 0.19 | 12.12 | 0.35 | 5.85 | 0.20 | 5.75 | 0.12 | 5.19 |
| d18:1/17:0 | 0.34 | 11.90 | 0.17 | 11.21 | 0.15 | 13.68 | 0.30 | 13.48 | 0.18 | 9.19 | 0.14 | 9.46 |
| d18:1/18:1 (9z) | 0.34 | 8.63 | 0.17 | 9.74 | 0.14 | 12.25 | 0.34 | 9.82 | 0.16 | 6.59 | 0.16 | 7.71 |
| d18:1/18:0 | 0.31 | 9.97 | 0.17 | 11.12 | 0.17 | 13.98 | 0.26 | 13.12 | 0.15 | 11.58 | 0.13 | 2.37 |
| d18:1/20:0 | 0.29 | 12.07 | 0.14 | 12.11 | 0.17 | 9.10 | 0.22 | 7.12 | 0.14 | 6.58 | 0.10 | 2.95 |
| d18:1/22:0 | 0.35 | 10.02 | 0.14 | 11.01 | 0.14 | 8.09 | 0.25 | 6.33 | 0.17 | 5.89 | 0.09 | 3.15 |
| d18:1/24:1 (15z) | 0.32 | 11.64 | 0.13 | 11.47 | 0.14 | 8.55 | 0.25 | 5.11 | 0.14 | 5.85 | 0.11 | 3.16 |
| d18:1/24:0 | 0.35 | 5.55 | 0.14 | 10.92 | 0.14 | 8.15 | 0.26 | 5.33 | 0.15 | 6.09 | 0.07 | 3.22 |

注: 日内精密度和日间精密度分别用 3 个浓度的混合标准品重复测 5 次后所得的保留时间和积分面积的 RSD 来表示。RT—retention time, 保留时间; A—area, 面积



2.4 生物样品中的神经酰胺分析

为了评估本方法在生物样品中的可行性和适用性, 我们用已建立的神经酰胺分析方法分析 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞系, 结果见图 2。我们在 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞系中总共定量分析了 9 种神经酰胺(表 5)。与 HepG2 相比, 转染了 HBV 的 HepG2.2.15 细胞中 d18:1/14:0、d18:1/16:0、d18:1/18:1(9z)、d18:1/20:0、d18:1/22:0 和 d18:1/24:0 这 6 种神经酰胺的浓度升高, 而 d18:1/12:0 这 1 种神经酰胺的浓度降低, d18:1/18:0 和 d18:1/24:1(15z) 2 种神经酰胺的浓度未发生显著性改变。



注: 1—d18:1/2:0, 2—d18:1/4:0, 3—d18:1/6:0, 4—d18:1/8:0, 5—d18:1/10:0, 6—d18:1/12:0, 7—d18:1/14:0, 8—d18:1/16:0, 9—d18:1/18:1(9z), 10—d18:1/17:0(内标), 11—d18:1/18:0, 12—d18:1/20:0, 13—d18:1/22:0, 14—d18:1/24:1(15z), 15—d18:1/24:0

图 2 细胞和混合标准品的神经酰胺总离子流色谱图

Fig 2 Total ion current chromatograms of ceramides for cells and mixed standards

表 5 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中的神经酰胺组成
Tab 5 Ceramides of HepG2 and HepG2.2.15 cells

| 神经酰胺 | HepG2/(nmol/g) | HepG2.2.15/(nmol/g) | P 值 |
|-----------------|----------------|---------------------|-------|
| d18:1/12:0 | 0.13±0.06 | 0.10±0.02 | 0.022 |
| d18:1/14:0 | 0.92±0.37 | 2.17±0.70 | 0.000 |
| d18:1/16:0 | 3.74±0.75 | 6.58±1.68 | 0.000 |
| d18:1/18:1(9z) | 0.04±0.01 | 0.06±0.01 | 0.001 |
| d18:1/20:0 | 3.24±1.09 | 6.33±2.15 | 0.001 |
| d18:1/22:0 | 22.72±5.19 | 35.20±12.19 | 0.010 |
| d18:1/24:0 | 43.75±19.25 | 60.72±21.34 | 0.044 |
| d18:1/18:0 | 1.27±0.28 | 1.08±0.30 | 0.270 |
| d18:1/24:1(15z) | 158.42±18.88 | 147.99±64.38 | 0.522 |

3 讨论

在本研究中, 我们开发了一种基于 UHPLC-MS 的 14 种常见的神经酰胺定量分析方法, 通过对色谱和质谱等条件的优化, 最终选定的色谱条件为以 ZORBAX Eclipse plus C8 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) 为分析色谱柱, 柱温 45 ℃, 流动相 A 为超纯水, 流动相 B 为甲醇, 流动相 A 和 B 中均加入 2.5 mmol/L 乙酸铵; 使用梯度洗脱, 进样体积为 2 μL。质谱采用 MRM 正离子模式, 鞘气流速和温度分别为 10 L/min 和 350 ℃, 毛细管电压为 4 000 V。以含有奇数碳酰基链的神经酰胺 d18:1/17:0 为内标通过内标标准曲线法进行定量, 兼顾了外标法和内标法的优势, 使定量更准确。而且本方法每个样品分析仅需 10 min (图 2), 与已报道的研究^[9]相比具有较高的分析效率, 适用于大批量样品的定量分析。

通过线性范围、准确度、LOQ、LOD、精密度等参数对本方法进行评估。结果表明 15 种神经酰胺(含 1 种内标)的线性范围的最小浓度为 0.17~1.26 nmol/L (0.0001~0.0005 μg/mL), 最高浓度为 15 396.46~146 412.88 nmol/L (10~50 μg/mL)。与 Chuang 等^[13]的方法的线性范围 (0.6~9 μg/mL) 相比, 本方法的线性范围更宽。同时本方法的线性关系也较好 (线性方程的 R^2 值均大于 0.99)。而 14 种神经酰胺的回收率范围为 73.02%~122.39%, 基质效应范围为 71.31%~122.48%, 低、中、高浓度的回收率和基质效应的 RSD 均小于 16.00% (表 3)。这表明本方法的准确度和基质效应基本都在可接受范围 ($\pm 20\%$)。而 LOD 和 LOQ 可以分别达到 0.06~0.42 nmol/L 和 0.17~1.26 nmol/L。与以前的研究^[7]相比, LOQ 提高了 166~1 094 倍, 表明本方法的灵敏度得到了提升。保留时间的 RSD 值为 0.07%~0.54%, 积分面积的 RSD 值为 2.26%~13.98% (表 4), 这表明本方法的保留时间的稳定性和重现性很好, 而积分面积的稳定性和重现性也在可接受范围^[13]。

将本方法应用于分析 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞系的神经酰胺组成, 在 2 种细胞系中共定量分析了 9 种神经酰胺 (表 5)。HBV 感染后导致宿主细胞的神经酰胺浓度发生改变, 其中有 6 种神经酰胺升高, 1 种神经酰胺降低。这可能是由于 HBV 感染宿主后, 神经酰胺触发的细胞外小泡可作为 HBV DNA 的载体, 将 HBV DNA 传递到肝细胞^[14]。

综上所述, 我们开发了一种基于 UHPLC-MS 的含有短链和长链酰基链的神经酰胺的定量分析方法。该方法具有良好的灵敏度、准确度、精密度和较强的可行性和适用性, 可为测定更多种类神经酰胺的含量提供技术支持。

参·考·文·献

- [1] Czubowicz K, Jesko H, Wencel P, et al. The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(8): 5436-5455.
- [2] Fekry B, Jeffries KA, Esmaeilnia Kooshkghazi A, et al. C16-ceramide is a natural regulatory ligand of p53 in cellular stress response[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4149.
- [3] Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, et al. Tumor suppressive functions of ceramide: evidence and mechanisms[J]. Apoptosis, 2015, 20 (5): 689-711.
- [4] Castro BM, Prieto M, Silva LC. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties[J]. Prog Lipid Res, 2014, 54: 53-67.
- [5] Tsugawa H, Ikeda K, Tanaka W, et al. Comprehensive identification of sphingolipid species by *in silico* retention time and tandem mass spectral library[J]. J Cheminform, 2017, 9: 19.
- [6] Laffet GP, Genette A, Gamboa B, et al. Determination of fatty acid and sphingoid base composition of eleven ceramide subclasses in stratum corneum by UHPLC/scheduled-MRM[J]. Metabolomics, 2018, 14 (5): 69.
- [7] Kauhanen D, Sysi-Aho M, Koistinen KM , et al. Development and validation of a high-throughput LC-MS/MS assay for routine measurement of molecular ceramides[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408 (13): 3475-3483.
- [8] Chuang WL, Pacheco J, Zhang K. A simple, high-throughput method for analysis of ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside in dried blood spots by LC/MS/MS[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1378: 263-272.
- [9] 邱丽萍, 孙文均. 应用高效液相色谱串联质谱法检测细胞内神经酰胺的含量[J]. 浙江大学学报(医学版), 2015, 44 (4): 429-434.
- [10] Sandra K, Pereira Ados S, Vanhoenacker G, et al. Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217 (25): 4087-4099.
- [11] Gao X, Zhang Q, Meng D, et al. A reversed-phase capillary ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) method for comprehensive top-down/bottom-up lipid profiling[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402 (9): 2923-2933.
- [12] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37 (8): 911-917.
- [13] Chuang WL, Pacheco J, Zhang K. A Simple, high-throughput method for analysis of ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside in dried blood spots by LC/MS/MS[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1378: 263-272.
- [14] Sanada T, Hirata Y, Naito Y, et al. Transmission of HBV DNA mediated by ceramide-triggered extracellular vesicles[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3 (2): 272-283.

[收稿日期] 2019-05-10

[本文编辑] 徐 敏

学术快讯

范先群教授荣获 2019 何梁何利基金科学与技术进步奖

2019 年 11 月 18 日, 2019 何梁何利基金科学与技术奖揭晓, 上海交通大学医学院范先群教授荣获 2019 何梁何利基金科学与技术进步奖。

何梁何利基金由香港爱国金融家何善衡、梁𨱇琚、何添、利国伟于 1994 年创立, 是目前国内规模最大的公益性科技奖励基金。何梁何利基金的宗旨是通过对我国取得杰出成就的科技工作者进行奖励, 营造全社会尊重知识、重视人才、崇尚科学的社会风尚, 激励科技工作者勇攀科学技术高峰, 促进祖国科学技术进步与创新。

范先群教授多年来带领团队开展眼眶病眼肿瘤研究, 创立眼眶外科手术关键技术, 开创精准微创眼眶手术; 创建眼恶性肿瘤治疗新策略, 提高保眼率和生存率, 引领我国眼眶病眼肿瘤专业走向国际。范先群教授因其在眼科的杰出成就而被授予了本年度的何梁何利基金科学与技术进步奖。

