

SCIEX液相色谱串联质谱法同时测定人血清中1-磷酸鞘氨醇, 鞘氨醇和二氢神经鞘氨醇

Quantification of Sphingosine 1-Phosphate , Sphingosine and Dihydrosphingosine in Human Serum by SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅, 刘丹, 黄超

Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao

Keywords: Sphingosine 1-Phosphate ; Sphingosine ; Dihydrosphingosine ; LC-MS/MS

引言

鞘脂是存在于所有真核细胞中的一类主要脂质, 对生物体的发育和维持至关重要, 这组脂类包括超过300个成员, 它们有一个共同的名为鞘氨醇(Sphingosine, Sph)的鞘氨醇基, 这是一种氨基醇主链, 通常由18个碳组成, 形成非极性尾部。鞘脂是调节细胞生物学和命运的生物活性分子, 如细胞周期, 衰老, 增殖和迁移, 具有生物活性的鞘脂包括神经酰胺 (Ceramides, Cer)、1-磷酸鞘氨醇 (Sphingosine 1-Phosphate, S1P) 神经酰胺-1-磷酸 (ceramide-1-phosphate, C1P)、Sph 等。它们在许多生理过程中至关重要, 如免疫反应、炎症、癌症、代谢和心血管疾病和神经退行性变。

液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 以其卓越的特异性, 极高的检测灵敏度和高通量样本测定等优点, 受到广大检测人员的青睐。

本方法基于SCIEX 液相色谱串联质谱系统, 采用同位素内标校正法, 建立了一次分析, 同时准确检测血清中S1P, Sph和二氢神经鞘氨醇 (Dihydrosphingosine, dhSph) 的定量方法。本实验采用蛋白沉淀法进行样品前处理, 步骤较简单, 实验耗时较短, 可以满足临床检测样品的需求。检测化合物相关信息如下。

表1 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
1-磷酸鞘氨醇	Sphingosine 1-Phosphate	S1P	26993-30-6	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
鞘氨醇	Sphingosine	Sph	123-78-4	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂
二氢神经鞘氨醇	Dihydrosphingosine	dhSph	3102-56-5	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂

实验部分

样品前处理

本实验采用蛋白沉淀法对血浆进行处理, 步骤如下:

取一定体积的血清样品加入内标溶液再加入含5%甲酸的甲醇进行蛋白沉淀, 涡流混匀后低温高速离心, 然后取上清加入含甲酸的甲醇溶液, 涡流混匀离心, 进样分析。

色谱条件

色谱柱: Kinetex C18, 100 × 2.1mm, 2.6 μm;

流动相: A相为含甲酸的甲酸铵的水溶液, B相为含甲酸的90%乙腈-甲酸铵水溶液;

流速: 0.6 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样体积：10.00 μ L。

洗脱方式：梯度洗脱，见表2；

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	45	55
2.5	45	55
3.5	2	98
4.0	2	98
5.0	45	55

质谱条件

质谱平台：AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD

电离方式：电喷雾离子源，正离子模式；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

离子源温度 (TEM): 500°C； 雾化气 (Gas1): 50 psi；

辅助气 (Gas2): 50 psi； 气帘气 (Gurtain Gas): 30psi；

电喷雾电压：5500V；

对应MRM通道及参数见表3。

结果与讨论

1-磷酸鞘氨醇、鞘氨醇和二氢神经鞘氨醇在各自出峰位置峰形对称，响应良好。在本方法条件下，三种化合物不存在互相干扰。典型液相色谱图如图1 (S1P浓度为500 ng/mL；Sph浓度为50.0 ng/mL；dhSph浓度为50.0 ng/mL)。

标准曲线

以去磷脂血清为替代基质，配制标准工作曲线。各待测物在各自的曲线范围内线性良好， $r^2 > 0.99$ ，符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数 (正离子模式)

中文名	英文名	Q1	Q3	DP	CE
1-磷酸鞘氨醇	Sphingosine 1-Phosphate	380.3	264.4*	70	40
		380.3	82.2	70	45
鞘氨醇	Sphingosine	300.4	252.3*	63	26
		300.4	264.3	63	26
二氢神经鞘氨醇	Dihydrosphingosine	302.4	254.3*	65	30
		302.4	60.2	65	40
1-磷酸鞘氨醇-d7	Sphingosine 1-Phosphate-d7	387.3	271.3	70	26
		307.4	271.3	86	25
鞘氨醇-d7	Sphingosine-d7	307.4	271.3	86	25
		309.4	261.3	89	31
二氢神经鞘氨醇-d7	Dihydrosphingosine-d7	309.4	261.3	89	31

*为定量离子对

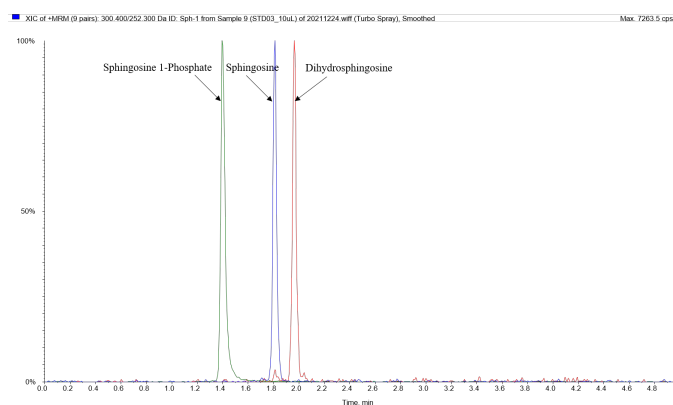


图1. S1P, Sph和dhSph典型液相色谱图

表4. S1P、Sph和dhSph的标准曲线

化合物	斜率	截距	r^2	LLOQ ng/mL	ULOQ ng/mL	拟合方程
S1P	5.007e-4	0.00342	0.99593	100	10000	$y=5.007e-4x+0.00342$
Sph	0.00237	0.01192	0.99512	10.0	1000	$y=0.00237x+0.01192$
dhSph	8.09082e-4	0.00266	0.99694	10.0	1000	$y=8.09082e-4x+0.00266$

加标回收率

向实际血清样本中分别添加低、中、高三个浓度的混标溶液，得到低、中、高三个添加浓度的加标样品。数据表明S1P、Sph和dhSph三个化合物血清的平均回收率均在85%~115%范围内，符合生物样本检测要求。具体结果见表5。

表5. S1P、Sph和dhSph的平均加标回收率

S1P			Sph			dhSph		
加标1	加标2	加标3	加标1	加标2	加标3	加标1	加标2	加标3
104.38%	97.7%	97.58%	107.73%	95.2%	89.19%	101.64%	93.28%	85.5%

总结

本实验在SCIEX液质联用平台上，实现了1-磷酸鞘氨醇（S1P）、鞘氨醇（Sph）和二氢神经鞘氨醇（dhSph）同时检测。采用蛋白沉淀法对样本进行前处理，并加入同位素内标进行校准，对血清中1-磷酸鞘氨醇（S1P）、鞘氨醇（Sph）和二氢神经鞘氨醇（dhSph）进行定量。方法线性良好，加标回收率、精密度准确度均满足相关文件要求。可用于临床实际样本的检测。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

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. 或在和美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14654-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China