

液-质联用法对生物样本中鞘氨醇 1-磷酸的微量测定

郭守东¹, 于杨², 冯蕾¹, 刘帅^{1,2}, 李和楼³, 崔英杰¹, 秦树存^{1,2}

(1. 山东省高校动脉粥样硬化重点实验室脂质分析实验室, 泰山医学院动脉粥样硬化研究所; 2. 山东省高校动脉粥样硬化重点实验室基因功能实验室, 泰山医学院动脉粥样硬化研究所; 3. 山东省泰山医学院附属医院, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 鞘氨醇 1-磷酸; 液-质联用仪; 生物样本

[摘要] **目的** 本文旨在建立一种简便的鞘氨醇 1-磷酸分离提取方法, 并结合液-质联用法快速检测生物样本中纳克水平的鞘氨醇 1-磷酸。**方法** 采用甲醇沉淀结合超声萃取的方法分离鞘氨醇 1-磷酸, 高速离心去除大颗粒后的上清液采用液-质联用仪在选择性离子监测模式下进行定量分析。**结果** 该分离提取鞘氨醇 1-磷酸的方法简便快捷, 鞘氨醇 1-磷酸在选择性离子监测模式下的定量限为 159.7 pg, 其在人血浆中的含量为 $128.8 \pm 33.3 \mu\text{g/L}$; 在 C57 BL/6 小鼠血浆、心、肝、肺、肾和脑中的含量分别为 $181.8 \pm 21.1 \mu\text{g/L}$, $37.6 \pm 2.8 \text{ ng/g}$, $54.9 \pm 4.9 \text{ ng/g}$, $230.1 \pm 60.5 \text{ ng/g}$, $21.5 \pm 6.7 \text{ ng/g}$, $102.2 \pm 23.8 \text{ ng/g}$ 。**结论** 甲醇提取分离法可简便快捷地获得血浆及脏器中的鞘氨醇 1-磷酸, 结合液-质联用仪可对血浆、组织脏器中的鞘氨醇 1-磷酸进行定量检测具有高效、重现性好等优点, 特别适用于大量生物样本的快速处理与分析。

[中图分类号] R313

[文献标识码] A

Microdetermination of Sphingosine 1-phosphate from Biological Samples by Liquid Chromatography Mass Spectrometry

GUO Shou-Dong¹, YU Yang², FENG Lei¹, LIU Shuai^{1,2}, LI He-Lou³, CUI Ying-Jie¹, and QIN Shu-Cun^{1,2}

(1. Lipid Analysis Laboratory of Key Laboratory of Atherosclerosis in University of Shandong, Institute of Atherosclerosis, Taishan Medical University; 2. Laboratory for Gene Functions in Metabolism, Key Laboratory of Atherosclerosis in University of Shandong, Institute of Atherosclerosis, Taishan Medical University; 3. Clinical Laboratory of the Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Taian, Shandong 271000, China)

[KEY WORDS] Sphingosine 1-phosphate; LC-MS; Biological Sample

[ABSTRACT] **Aim** To establish a simplified extraction method from biological sample, and quantify sphingosine 1-phosphate (S1P) at the level of nanogram. **Methods** The methanol precipitation combing with ultrasonic extraction method was used to extract and separate S1P, then the supernatant was analyzed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) under the selective ion monitoring mode. **Results** The extraction method was effective and time saving, the limitation of quantification of S1P was 159.7 pg; The S1P content in human plasma was $128.8 \pm 33.3 \mu\text{g/L}$, and the S1P content in plasma, heart, liver, lung, kidney and brain of the C57 BL/6 mouse was $181.8 \pm 21.1 \mu\text{g/L}$, $37.6 \pm 2.8 \text{ ng/g}$, $54.9 \pm 4.9 \text{ ng/g}$, $230.1 \pm 60.5 \text{ ng/g}$, $21.5 \pm 6.7 \text{ ng/g}$ and $102.2 \pm 23.8 \text{ ng/g}$, respectively. **Conclusion** Methanol precipitation combing with ultrasonic extraction could effectively separate S1P from plasma and organ, and the extract could be quantified by LC-MS directly. This method is effective with good reproducibility, and is suitable for quick quantitative analysis of a great deal of biological sample.

[收稿日期] 2012-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30971098; 81070247); 山东省泰山学者岗专项基金 (ZD056, ZD057); 2012 年泰山医学院高层次课题培养计划项目(330033)

[作者简介] 郭守东, 博士, 脂质分析实验室主任, 研究方向为信号脂质异常与动脉粥样硬化, E-mail 为 ilovetcm@126.com。秦树存, 博士, 教授, 博士研究生导师, 泰山学者, 研究方向为脂蛋白代谢分子机制与心脑血管疾病干预靶点, E-mail 为 shucunqin@hotmail.com。于杨, 博士, 基因功能实验室主任, 研究方向为基因调控与动脉粥样硬化, E-mail 为 thereismywill@hotmail.com。

鞘氨醇 1-磷酸(S1P)既可在细胞外作为 G-蛋白偶联受体的配体也可在细胞内作为信使与尚未发现的靶位结合而发挥多种生物和病理学功能^[1-3]。S1P 可介导细胞增殖、分化和迁移等^[4-6]。其广泛的生物学功能及相关的机制是近年来关注的焦点^[7-10]。1995 年至今,国外先后报道了几种 S1P 的定量检测方法^[11-14],但在实际应用中存在缺陷。例如:衍生后的 HPLC 法^[15-20],费时费力不能满足对大样样品的快速分析,且衍生产物的不稳定性不可避免。目前,国外较为流行的检测手段是采用液相串联质谱法^[21-23]。国内对 S1P 定量检测的报道很少,且采用的是衍生后的 HPLC 法^[24]。鉴于国内对 S1P 研究的逐步升温,我们建立了一种便捷地分离提取 S1P 并结合液-质联用仪对其快速定量的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

鞘氨醇 1-磷酸(D-erythro-Sphingosine-1-phosphate)及内标十七碳鞘氨醇 1-磷酸(D-erythro-C17-Sphingosine-1-phosphate, C17-S1P)购于美国 Avanti Polar Lipids 公司;甲醇、甲酸和甲酸铵购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;蛋白测定试剂盒购于美国 Invitrogen 公司;去离子水由 Millipore 纯水机获取;本研究的化学试剂为分析纯。人血浆样本由泰山医学院附属医院检验科提供。C57 BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 样本处理

动物使用征得泰山医学院动物使用与关怀伦理委员会同意,并严格遵从相关的伦理方针。C57BL/6 小鼠眼眶静脉丛取血,脱臼处死后摘取心、肝、肺、肾和脑等脏器,动物样本立刻置 4 °C 冰箱中保存。抗凝血液经 1100 r/min 离心 10 分钟获得血浆。

1.2.1 血浆样本中 S1P 的提取 人或小鼠血浆 10~50 μL ,加入适量的甲醇及内标 C17-S1P,沉降血浆中的大分子蛋白等颗粒,10,000 g 离心 10 分钟,所得上清液直接上机检测。

1.2.2 组织脏器中 S1P 的提取 称取心、肝、脾、肺、肾和脑各 200.0 mg(湿重)。样本处理过程如下:将脏器或组织剪碎后加入 1.0 mL 甲醇及适量内标 C17-S1P 用手动研磨器将脏器研磨,倾出混悬液后再加入 1.0 mL 甲醇研磨,合并研磨后的样本,超声波萃取 15 分钟,10 000 g 离心 10 分钟,上清液采用氮气吹干,剩余物质重溶于适量甲醇中上机

检测。

1.3 标准曲线的制备

用乙醇配制的 S1P 储备液,分装后于 -20 °C 保存。标准曲线的工作液是将储备液采用甲醇稀释而成,浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 至 100 $\mu\text{g/L}$,内标的终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 。

1.4 LC-MS 分析

LC-MS 由 Waters HPLC (2695)和 Waters 单级质谱(micromass ZQ)组成。本研究采用的色谱柱为 Waters C18 分析柱(Waters Symmetry, 3.5 μm , 2.1 mm i. d. \times 100 mm),同时配备 Waters 保护柱(3.5 μm , 2.1 mm i. d. \times 10 mm);采用线性洗脱,流动相为含有 4 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的 80% 的甲醇溶液。进样体积为 5.0 μL ,流动相流速为 0.2 mL/min。

质谱采用电喷雾离子源(ESI)在正离子模式下进行检测。毛细管电压(capillary voltage)和锥孔电压(cone voltage)分别设定为 3500 V 和 18 V。离子源温度和去溶剂温度分别为 150 °C 和 300 °C。去溶剂气和锥孔气的流速分别为 600 L/h and 60 L/h。在选择性离子扫描模式下,以质荷比为 m/z 380.2 和 m/z 366.2 的分子离子峰,即 $[M+H]^+$,分别进行 S1P 和 C17-S1P 的检测。数据分析采用 Waters 分析软件 Masslynx V4.0。

2 结果

2.1 方法的可靠性分析

如先前报道,S1P 在正离子模式下比在负离子模式下具有更高的灵敏度。因此,本研究的质谱图均在正离子模式下完成。采用方法中优化后的质谱条件,S1P 的检测限(limit of detection, LOD),定义为信噪比等于 3 ($S/N = 3$),为 45.6 pg;定量限(limit of quantification, LOQ),定义为信噪比等于 10 ($S/N = 10$),为 159.7 pg。

标准曲线的制作采用标准添加法,人血浆和小鼠血浆用以制备不同基质下的 S1P 标准曲线。所得图谱如图 1 所示,可见 S1P 在 5 $\mu\text{g/L}$ 至 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内存在很好的线性关系,相关系数 $R^2 > 0.995$ 。加入生物基质的情况下,所得 S1P 标准曲线的斜率不同(图 1)。加入小鼠的血浆中或肝脏组织中,S1P 与 C17S1P 面积之比的斜率发生了明显变化(图 1A, 1B)。可见,生物基质可对 S1P 的响应值产生明显影响。此外,同种基质的斜率差异很小,但不同基质间的斜率差异较大。

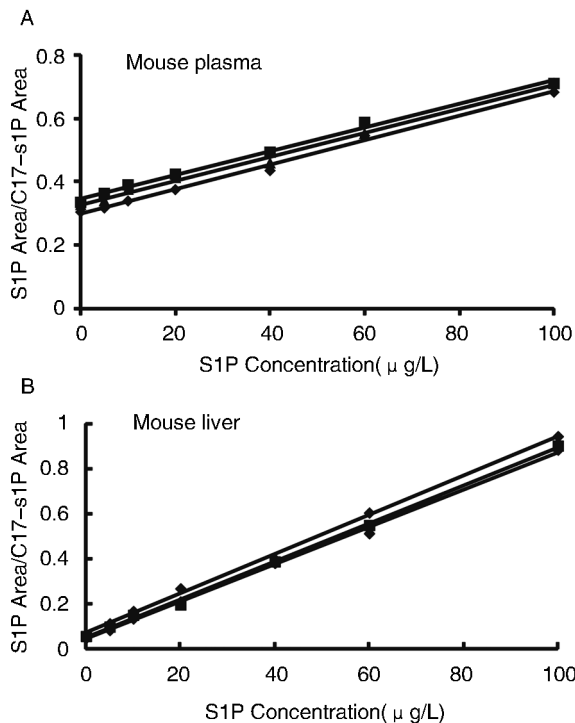


图1. 鞘氨醇1-磷酸在不同生物基质下的标准曲线 A为在小鼠血浆基质下的标准曲线, B为在小鼠肝脏基质下的标准曲线。
Figure 1. The typical standard curve of S1P obtained in different biological matrix

浓度为 50、400 $\mu\text{g/L}$ 和 800 $\mu\text{g/L}$ 的 S1P 标准品工作液用于准确度考查, 每个浓度测定 6 次, 检测结果用当天制作的标准曲线进行校正。结果表明, 3 个不同浓度的 S1P 标准品测定的准确度 [$\% \pm \text{RSD}(\%)$] 依次为: $99.7\% \pm 3.3\%$, $99.9\% \pm 3.8\%$ 和 $100.3\% \pm 4.1\%$ 。

浓度为 400 $\mu\text{g/L}$ 的 S1P 标准品工作液用于精密密度 [$\% \pm \text{RSD}(\%)$] 考查。将上述 S1P 标准品连续进样 6 次, 测定的日间精密密度为 $100.2\% \pm 3.9\%$ 。将 400 $\mu\text{g/L}$ 的 S1P 标准品连续 3 天进行检测, 每天连续检测 6 次, 计算所得日间精密密度为 $99.8\% \pm 4.0\%$ 。

2.2 生物样品中 S1P 的检测

在生物样品的质谱图中出现了少量的杂质峰, 但杂质峰与 S1P 峰已实现基线分离, 故不影响 S1P 的定量分析(图 2)。本研究中, 我们对 9 个人血浆样本进行了检测(如图 3A), 结果发现 S1P 在人血浆中的含量为 $128.8 \pm 33.3 \mu\text{g/L}$; 在小鼠血浆(如图 3B)、心、肝、肺、肾和脑(如图 4)中的含量分别为 $181.8 \pm 21.1 \mu\text{g/L}$ 、 $37.6 \pm 2.8 \text{ ng/g}$ 、 $54.9 \pm 4.9 \text{ ng/g}$ 、 $230.1 \pm 60.5 \text{ ng/g}$ 、 $21.5 \pm 6.7 \text{ ng/g}$ 和 $102.2 \pm 23.8 \text{ ng/g}$ 。

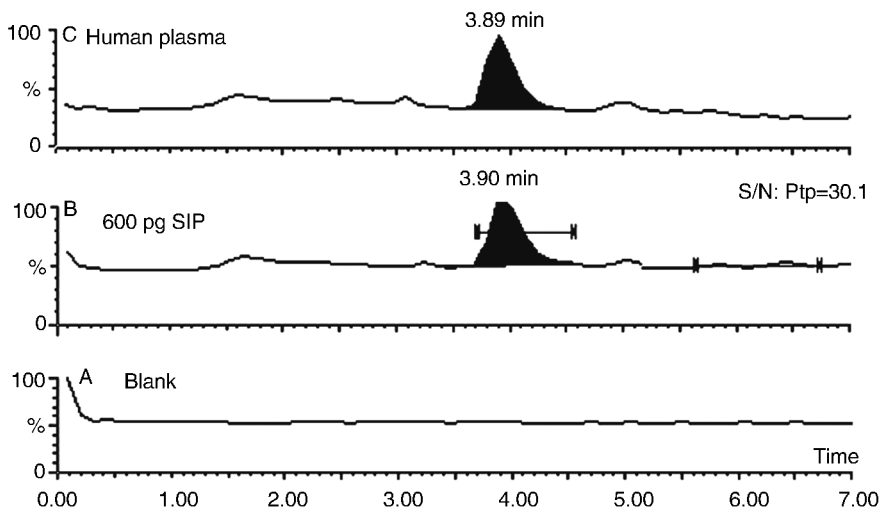


图2. 液-质联用仪检测空白、鞘氨醇1-磷酸标准品和血浆中的鞘氨醇1-磷酸的图谱 A为空白对照甲醇的液-质联用图谱, B为600 pg 鞘氨醇1-磷酸标准品的液-质联用图谱, C为10 μL 人血浆样品经提取后直接进样所得液-质联用图谱。

Figure 2. The chromatogram of blank, S1P standard and S1P from plasma as determined by LC-MS

3 讨论

Folch 法和 Bligh Dye 法是脂质提取的常规方法, 上述两种方法报道于上世纪六七十年代, 一直沿用至今。上述两种方法可将生物样本中的绝大多

数脂质提取出来, 用于定性或定量分析, 但操作过程异常繁琐, 处理一个样本即需要转移样本数次, 约需 20 分钟, 给大批生物样本的处理带来不便。

本文中采用甲醇沉淀结合超生萃取的方法, 方便快捷地除去生物样本中的蛋白等大型颗粒物质,

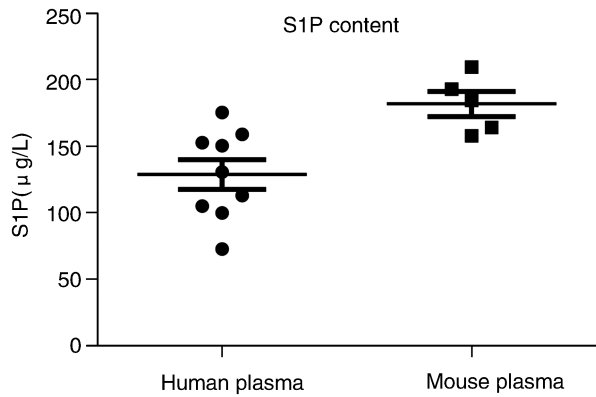


图 3. 鞘氨醇 1-磷酸在人 ($n=9$) 血浆和 C57 BL/6 小鼠 ($n=5$) 血浆中的含量

Figure 3. The plasma S1P content of human ($n=9$) and C57 BL/6 mouse ($n=5$)

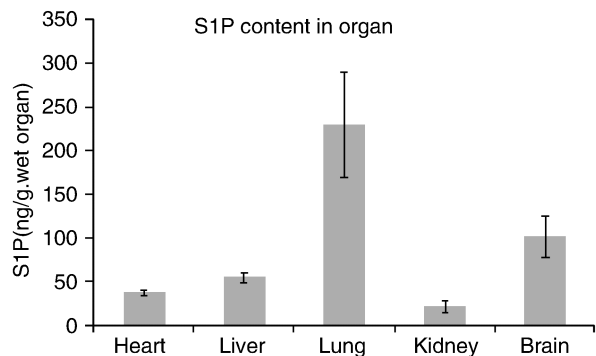


图 4. 鞘氨醇 1-磷酸在 C57 BL/6 小鼠主要脏器中的含量 ($n=3$)

Figure 4. The content of S1P in the major organs of C57 BL/6 mouse

样本经高速离心 ($>10\ 000\ g$) 后即可上机检测, 一个小时之内可处理数十个生物样本。较之以往的 Folch 法和 Bligh Dye 法, 提取效率显著提升。本文采用液-质联用法进行 S1P 的定量检测, 较之以前的柱前衍生法缩短分析时间 5~6 倍。

制作标准曲线时, 生物基质可显著影响 S1P 的标准曲线斜率。因此, 本文采用标准添加法制作标准曲线。在制作标准曲线的过程中, 我们发现不同生物基质可对 S1P 的提取及检测产生不同影响, 但同种基质对其影响则无显著差异 (图 1), 表现为同种基质条件下 S1P 与内标 C17-S1P 的峰面积之比的斜率的一致性。所以, 在对不同生物样本中的 S1P 进行检测时, 需要分别制作相应的标准曲线, 且该类型的标准曲线每次制作一条即可。

本文采用上述方法对人和小鼠血浆及主要脏器中的 S1P 含量进行了分析。其中, 人血浆和 C57

BL/6 小鼠血浆中 S1P 的含量与先前报道的含量相近, 即介于 $75.8 \sim 341.4\ \mu\text{g/L}$ 之间。采用该法测定的主要脏器中的 S1P 含量表现出显著的分布差异性。以组织样本的单位湿重作为单位, 肺中 S1P 含量最高, 其次是脑、肝、心和肾。该测定结果与 2000 年 Murata 等^[12]人采用放射性受体结合实验测定的大鼠中的 S1P 分布趋势一致。

[参考文献]

- [1] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2): 139-150.
- [2] Takabe K, Paugh SW, Milstien S, et al. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(2): 181-195.
- [3] Yatomi Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780(3): 606-611.
- [4] Roger H, Kazuaki Takabe K, Milstien S, et al. Export and functions of sphingosine-1-phosphate [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1791(7): 692-696.
- [5] Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1582(1-3): 132-137.
- [6] Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, et al. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release [J]. *Prostaglandins*, 2001, 64(1-4): 107-122.
- [7] Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, et al. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol apolipoproteins [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 178(1): 199-205.
- [8] Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, et al. HDL-like lipoproteins in cerebrospinal fluid affect neural cell activity through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3): 649-654.
- [9] Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, et al. Plasma concentration of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(9-10): 765-770.
- [10] Oskeritzian CA, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate in allergic responses, asthma and anaphylaxis [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 115(3): 390-399.
- [11] Yatomi Y, Ruan F, Ohta J, et al. Quantitative measurement of Sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride [J]. *Anal Biochem*, 1995, 230(2): 315-320.

- [12] Murata N, Sato K, Kon J, et al. Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay [J]. *Anal Biochem*, 2000, 282(1): 115-120.
- [13] Andréani P, Gräler MH. Comparative quantification of sphingolipids and analogs in biological samples by high-performance liquid chromatography after chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 2006, 358(2): 239-246.
- [14] Siow DL, Wattenberg BW. An assay system for measuring the acute production of sphingosine 1-phosphate in intact monolayers [J]. *Anal Biochem*, 2007 (2), 371: 184-193.
- [15] Ruwisch L, Schäfer-Korting M, Kleuser B. An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001, 363(3): 358-363.
- [16] He X, Dagan A, Gatt S, et al. Simultaneous quantitative analysis of ceramide and sphingosine in mouse blood by naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization after hydrolysis with ceramidase [J]. *Anal Biochem*, 2005, 340(1): 113-122.
- [17] Lee YM, Venkataraman K, Hwang S, et al. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) [J]. *Prostaglandins other Lipid Mediat*, 2007, 84(3-4): 154-162.
- [18] Cho YH, Yoo HS, Min JK, et al. Comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and o-phthalaldehyde fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid bases [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 977(1): 69-76.
- [19] Caligan TB, Peters K, Ou J, et al. A high-performance liquid chromatographic method to measure sphingosine 1-phosphate and related compounds from sphingosine kinase assays and other biological samples [J]. *Anal Biochem*, 2000, 281(1): 36-44.
- [20] He X, Huang CL, Schuchman EH. Quantitative analysis of sphingosine-1-phosphate by HPLC after naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) derivatization [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(10): 983-990.
- [21] Schmidt H, Schmidt R, Geisslinger G. LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples [J]. *Prostaglandins other Lipid Mediat*, 2006, 81(3-4): 162-170.
- [22] Scherer M, Leuthauser-Jaschinski K, Ecker J, et al. A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(7): 2001-011.
- [23] Cutignano A, Chiuminatto U, Petruzzello F, et al. UPLC-MS/MS method for analysis of sphingosine 1-phosphate in biological samples [J]. *Prostaglandins other Lipid Mediat*, 2010, 93(1-2): 25-29.
- [24] 李长勇, 姜向明, 俞豪, 等. 高效液相色谱法测定生物样品中磷酸鞘氨醇的含量 [J]. *首都医科大学学报*, 2008, 29(4): 460-461.

(此文编辑 李小玲)