

## 使用SELECT SERIES™ Cyclic™ IMS分离半乳糖基和葡萄糖基神经酰胺异构体

---

Giorgis Isaac, Hernando Olivos, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

半乳糖基神经酰胺(GalCer)和葡萄糖基神经酰胺(GlcCer)涉及许多生理和病理现象。正确分类和表征这些脂质对于了解它们的生物学作用和功能非常重要。脂质可以以多种异构形式存在，而传统的脂类分析方法往往无法将其分离。化学成分和分子构象的微小差异导致其物理化学性质和生物学功能方面存在巨大差异。SELECT SERIES Cyclic离子淌度具有创新的多圈淌度分离能力，可提高离子淌度分辨率应对特定挑战。在本文中，我们展示了GalCer和GlcCer异构体的完全分离过程，需要290  $\Omega/\Delta\Omega$  (20圈) 的离子淌度分辨率，而这只有通过SELECT SERIES Cyclic IMS的多圈淌度分离功能才能实现。

### 优势

- 使用SELECT SERIES Cyclic IMS完全分离以前无法区分的脂质异构体
- SELECT SERIES Cyclic IMS提供创新的多圈环形离子淌度能力，可调整离子淌度分辨率从而应对特定挑战。
- 用快至毫秒级的分析时间提高通量

---

## 简介

脂质是一类生物分子，具有许多重要作用和功能，如能量储存、细胞信号转导等，并与许多疾病的病理生理学有关（包括癌症、神经退行性疾病、感染、糖尿病等）<sup>1,2</sup>。脂质组学已被用于分析所有类型的脂质，以此检测和鉴定八种常见脂质类别中的数千种脂质。这些类别包括脂肪酸类、甘油酯类、甘油磷脂类、鞘脂类、糖脂类、多聚酮类、固醇类和异戊烯醇类。脂质组学通常使用液相色谱 - 质谱(LC-MS)、气相色谱 - 质谱(GC-MS)或超临界流体色谱 - 质谱(SFC-MS)进行分析，色谱系统按照类别（HILIC、SFC）或基于其亲脂性（反相LC、GC）对分离脂质，使用数据库和化合物库根据精确质量数、碎片离子模式、色谱保留时间和最近的碰撞截面(CCS)鉴定目标脂质。虽然这些数据库具有很高价值，但它们经常面临需要明确鉴定脂质异构体的挑战。这些异构体可能是结构异构体或立体异构体，例如非对映异构体、对映异构体、顺式/反式异构体或旋转异构体。

Waters SELECT SERIES Cyclic IMS在MS分析器之前采用高分辨率离子淌度(IM)进行分离，提供分析物分离的正交机制。IM分离基于分子的电荷和形状而具有分离异构体的潜力，并能够通过适当的校准测量分子的CCS。GalCer和GlcCer的化学构型和分子构象（即糖的C-4上的羟基）略有不同，这导致它们的物理化学性质和生物学功能存在巨大差异<sup>3</sup>。由于GalCer和GlcCer的结构高度相似，因此很难使用传统脂质分析方法进行分离和鉴定。本研究展示了使用多圈环形离子淌度MS来完全分离GalCer和GlcCer异构体（图1）的方法。

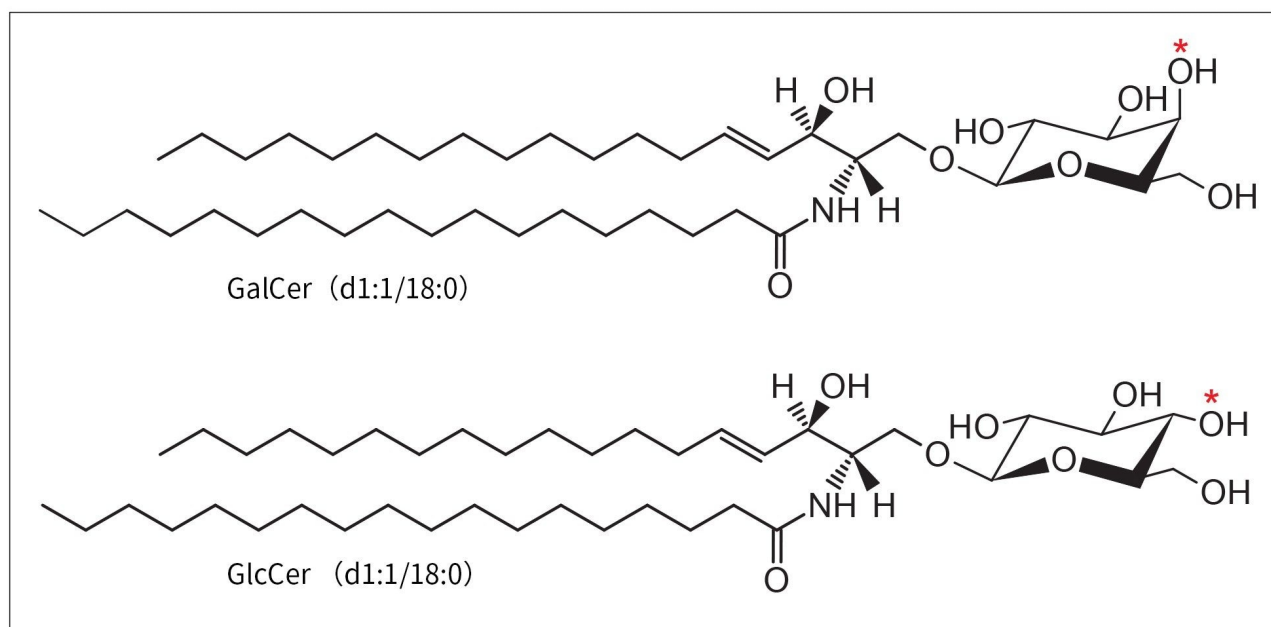


图1.分析的GalCer和GlcCer异构体的化学结构。羟基在C-4位置上的位置差异用红色星号表示。

## 实验

### 样品前处理

GalCer d18:1/18:0 (部件号: 860844) 和GlcCer d18:1/18:0 (部件号: 860547) 标准品购自Avanti Polar Lipids。用氯仿/甲醇/水(80/20/2)溶液为每种标准品制备1 mg/mL储备液。制备最终浓度为1 ng/ $\mu$ L的单标溶液和等摩尔混合物,并以5  $\mu$ L/min的速度注入SELECT SERIES Cyclic IMS的ESI源中。

### 质谱条件

在使用低捕集和转移碰撞能量的四极杆中选择了 $m/z$  726.54  $[M-H]^-$ 处的去质子化离子。分离后的离子被转移到环形淌度池进行多圈离子淌度分离。根据所需的圈数调整仪器上的分离设置。

质谱系统:

SELECT SERIES Cyclic IMS

电离模式:	负离子电喷雾
采集范围:	50–800 <i>m/z</i>
毛细管电压:	2 kV
锥孔电压:	30 V
捕集碰撞能量:	6 V
转移碰撞能量:	4 V
锥孔电压:	30 V
TW静态高度:	30 V
TW速度:	375 m/s
注样流速:	5 $\mu$ L/min

## 数据管理

质谱软件:	MassLynx™ 4.2
-------	---------------

---

## 结果与讨论

GalCer和GlcCer分别由D-半乳糖和D-葡萄糖残基组成，通过 $\beta$ 1-1'-糖苷键与由D-赤型鞘氨醇和长链脂肪酸组成的神经酰胺键合而相连（图1）。这两种化合物代表了非常相似的结构，因为D-半乳糖是D-葡萄糖的差向异构体（存在多个不对称手性碳原子时，只有一个不对称原子构型不同），两种糖仅在C-4位的构型上有所不同<sup>3</sup>。因此，使用传统的脂质分析方法很难分离GalCer和GlcCer异构体。SELECT SERIES Cyclic IMS采用新型环形离子淌度分离

装置，允许在MS或MS<sup>n</sup>模式下以超过400 Ω/ΔΩ的离子淌度分辨率进行多圈离子淌度分离。将两种神经酰胺的等摩尔混合物以5 μL/min的流速注入质谱仪。离子淌度池的初始单圈分辨率约为65 Ω/ΔΩ，最终到达时间分布(ATD)为22.57 ms，没有成功分离神经酰胺异构体，*m/z* 726.54 [M-H]<sup>-</sup> (图2A)。将IMS流通池的圈数增加到5 (IMS分辨率约为145 Ω/ΔΩ)，两种去质子化物质边缘开始出现分离，ATD为61.91和62.96 ms (图2B)。将圈数增加到10 (IMS分辨率约为205 Ω/ΔΩ)，两种脂质能够成功分离，谷值为15%，ATD为111.47和113.58 ms (图2C)。将IM流通池的圈数增加到20 (IMS分辨率约为290 Ω/ΔΩ)，去质子化GalCer和GluCer实现完全分离，ATD为210.53和214.49 ms (图2D)。

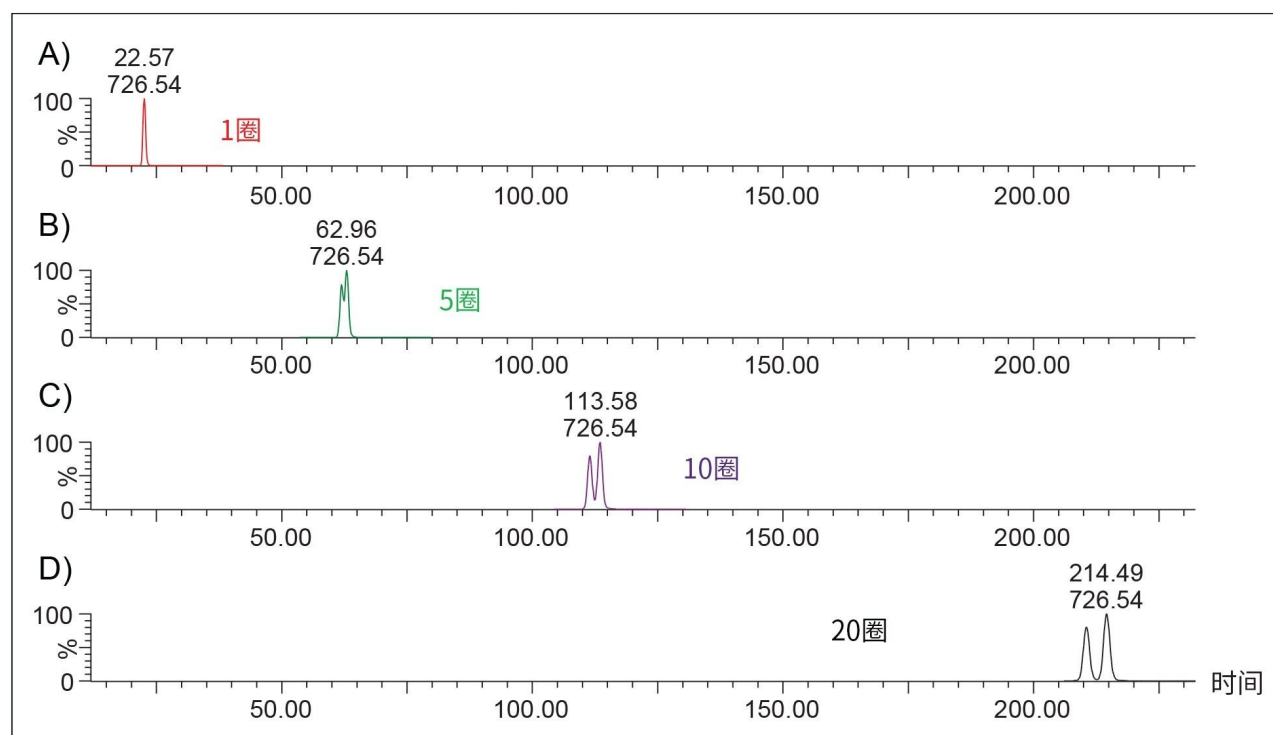


图2.使用1(A)、5(B)、10(C)和20(D)圈离子淌度装置分离GalCer (*d18:1/18:0*)和GlcCer (*d18:1/18:0*) *m/z* 726.5440混合物的到达时间分布(ATD)图。

图3中的数据显示了在注入GalCer (图3A)、GluCer (图3B)和两种神经酰胺的等摩尔混合物 (图3C)后，使用IM池进行20圈离子淌度分离后获得的分离结果。获得的数据表明，GalCer的到达时间最短，为210.53 ms，而GlcCer (B)的到达时间较长，为214.63 ms。这导致IMS分辨率达到290 Ω/ΔΩ。从单独注入GalCer和GlcCer鞘脂获得的谱图可以看出，GalCer和GlcCer鞘脂中存在其他异构体。很可能是由于储备液中存在少量杂质。本研究展示了SELECT SERIES Cyclic IMS在测定立体异构体杂质方面的潜力。

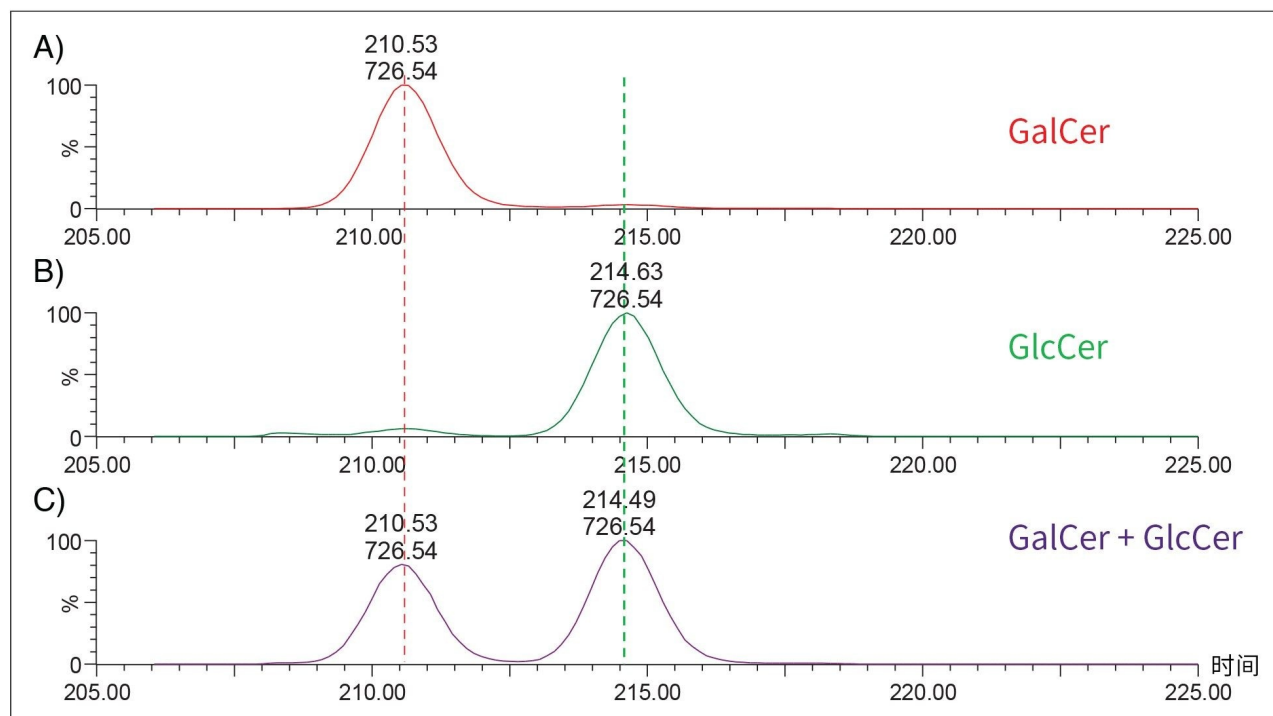


图3.将单个GalCer (A)、GlcCer (B)或两种神经酰胺(C)的等摩尔混合物通过20圈离子淌度设备进行分离，得到的到达时间分布(ATD)图。

## 结论

凭借其创新的多圈环形离子淌度功能，可以调整离子淌度分辨率以应对特定的挑战。本文展示了使用20圈IM流通池（IMS分辨率为 $290 \Omega/\Delta\Omega$ ）实现的脂质异构体GalCer (d18:1/18:0)和GlcCer (d18:1/18:0)的基线分离。此外，10圈就能为神经酰胺提供足够的分辨率，使脂质分辨率达到80%，为存在两种不同的物质提供了明确证据。该方法还展示了SELECT SERIES Cyclic IMS在测定立体异构体杂质方面的潜力。

## 参考资料

1. Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic Acid- and Phosphatidylserine-Binding Proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 2006, 1761, 913–926.
2. Han X. Lipidomics for Studying Metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016, 12, 668–679.
3. Reza S, Ugorski M and Suchanski J. Glucosylceramide and Galactosylceramide, Small Glycosphingolipids with Significant Impact on Health and Disease. *Glycobiology*, 2021, 31, 1416–1434.

---

## 特色产品

[SELECT SERIES Cyclic IMS](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

[MassLynx MS软件](https://www.waters.com/513662) <<https://www.waters.com/513662>>

720007539ZH, 2022年2月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号