

## 基于UHPLC/Q-TOF-MS技术的人血浆磷脂类成分快速分析及质谱裂解规律初探

钟询龙<sup>1</sup>, 王若伦<sup>1</sup>, 陈莉诗<sup>2</sup>, 钟艳梅<sup>2\*</sup>

(1. 广州医科大学附属第二医院药学部, 广东 广州 510260; 2. 广东药科大学新药研发中心, 广东 广州 510006)

**摘要:** 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC/Q-TOF-MS)对人血浆磷脂类成分进行快速分析并推测其质谱裂解规律。本文采用Acquity UHPLC™ BEH C18色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以含10 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵和0.1%甲酸的水溶液(A)与含10 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵和0.1%甲酸的乙腈-异丙醇(体积比为1:1)有机溶液(B)作为流动相进行梯度洗脱, 流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温50 °C, ESI源正、负离子模式下采集质谱数据。根据Masslynx 4.1软件计算的精确相对分子质量和元素组成, 并通过与对照品、二级质谱碎片离子以及脂质数据库的对比, 共鉴定出82个血浆脂质成分, 其中包括14个溶血磷脂酰胆碱(LysoPCs)、39个磷脂酰胆碱(PCs)、17个鞘磷脂(SMs)、7个神经酰胺(Cers)、4个磷脂酰乙醇胺(PEs)、1个磷脂酰肌醇(PI)。本实验建立了一种简便高效、快捷、稳定的分析方法, 可对人血浆磷脂类成分进行较为全面地定性分析, 同时总结了主要磷脂类成分的质谱裂解规律, 为进一步以血浆磷脂作为研究对象的代谢组学研究奠定基础。本实验获得广州医科大学附属第二医院临床研究与伦理委员会的审查和批准(批准号: 2020-hs-07)。

**关键词:** 血浆磷脂; UHPLC/Q-TOF-MS; 磷脂酰胆碱; 鞘磷脂; 神经酰胺; 裂解规律

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3214-09

## Rapid analysis and determination of the fragmentation regularity of phospholipids in human plasma based on UHPLC/Q-TOF-MS

ZHONG Xun-long<sup>1</sup>, WANG Ruo-lun<sup>1</sup>, CHEN Li-shi<sup>2</sup>, ZHONG Yan-mei<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China;

2. New Drug Research and Development Center of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS) was applied to rapidly identify the phospholipids in human plasma and explore the mass spectrometric fragmentation pattern. An acquity UHPLC™ BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was utilized and eluted with a gradient system; the mobile phase consisted of 10 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate aqueous solution-0.1% formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile-isopropanol (1:1) organic solution (B) containing 10 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate-0.1% formic acid. The flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was set at 50 °C. An electrospray ionization (ESI) source was used to collect mass spectra in positive and negative ion mode. Based on the precise relative molecular weight and elemental composition calculated by Masslynx 4.1 software, comparison with references, and secondary mass spectrometry fragment ions and lipid databases, a total of 82 plasma lipids were identified, including 14 lysophosphatidylcholines (LysoPCs), 39 phosphatidylcholines (PCs), 17 sphingomyelins (SMs), 7 ceramides (Cers), 4 phosphatidylethanolamines (PEs), and 1 phosphatidylinositol

收稿日期: 2022-05-23; 修回日期: 2022-08-08.

基金项目: 广东省中医药局面上项目(20221242, 20212118); 广州市中医药和中西医结合科技项目(20222A011017); 广州市卫生健康科技一般引导项目(20191A011085).

\*通讯作者 Tel: 86-20-39352523, E-mail: zhongyanmei33@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0627

(PI). A simple, efficient, fast and stable analytical method was established in this study for the qualitative analysis of phospholipids in human plasma, and the fragmentation regularity of the main phospholipids was determined. This work provides a good foundation for further metabolomics studies of plasma phospholipids. This study was approved by the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University Clinical Research and Application Institutional Review Board Approval (No. 2020-hs-07).

**Key words:** plasma phospholipid; UHPLC/Q-TOF-MS; phosphatidylcholine; sphingomyelin; ceramide; fragmentation regularity

磷脂是一种具有重要生物学作用的脂类,作为细胞膜和细胞器膜的重要组成部分,磷脂参与了细胞生长、增殖、分化、凋亡,能量转换、物质运输、炎症反应、激素调节与分泌以及细胞信号转导等多种重要的生理过程<sup>[1,2]</sup>。脂质对维持细胞结构和器官功能具有系统性影响,脂质稳态和脂质代谢在健康或疾病中发挥着至关重要的作用。最新研究表明,磷脂代谢异常与糖尿病、肥胖、心血管疾病、代谢综合征、肿瘤、阿尔茨海默症等多种疾病发生发展密切相关<sup>[3-8]</sup>。

磷脂主要包括甘油磷脂(glycerophospholipid, GP)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM),甘油磷脂的结构主要由极性头部基团、甘油骨架结构和一条或两条侧链脂肪酸酯基团组成<sup>[9]</sup>,根据头部基团中与磷酸相连的取代基不同,甘油磷脂可分为磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)等。鞘磷脂主要由神经酰胺(ceramide, Cer)和磷酸胆碱组成,SM和Cer的核心结构为鞘氨醇或二氢鞘氨醇,其侧链脂肪酸通过酰胺键与氨基结合<sup>[10]</sup>。由于头部基团取代基与侧链脂肪酸不饱和双键数目的不同,增加了病理性磷脂生物标志物的鉴定和筛选难度。

近年来,随着电喷雾离子化技术的不断成熟,尤其与四级杆-飞行时间质谱联用,实现了同时对生物样品中近百种脂质成分的定性定量分析<sup>[11]</sup>,具有高灵敏度、高分辨率、高质量准确度等特性,为脂质高通量研究奠定基础,同时将脂质组学研究拓展到对信号通路调控的分子水平,并逐渐认识到脂质在细胞和组织病理进程中起着非常重要的作用。尽管脂质组学的研究目的并不是鉴定所有检出的脂质成分,但具备分离和鉴定复杂脂质的能力并在此基础上总结各类脂质成分的质谱裂解规律,是确保差异性脂质生物标志物的准确筛选并对其生物学意义进行科学阐释的前提和基础,然而目前鲜见相关研究报道。本研究旨在建立一种基于UHPLC/Q-TOF-MS联用技术的简便高效、快捷、稳定的分析方法,对人血浆磷脂类成分进行快速识别鉴定并初步探讨其质谱裂解规律,为探寻与疾病相关的血

浆磷脂生物标志物奠定基础。

## 材料与方法

**仪器** Acquity UPLC™超高效液相色谱/四级杆飞行时间串联质谱仪(美国Waters公司),配Masslynx 4.1数据处理系统;低温高速离心机(美国Thermo公司),DL-720A超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),MG-2200氮气吹干仪(日本EYELA东京理化集团),SK-1快速混匀器(常州澳华仪器有限公司)。

**试剂与对照品** 质谱级乙腈、甲醇、异丙醇购自德国Merck公司,HPLC级甲酸溶液购自上海安谱实验科技股份有限公司,分析纯氯仿、甲酸铵购自天津市大茂化学试剂厂,亮氨酸脑啡肽购自美国Sigma-Aldrich公司,屈臣氏双蒸水。对照品LysoPC(16:0/0:0)(批号:855675P)、LysoPC(18:1/0:0)(批号:845875P)、LysoPC(18:0/0:0)(批号:855775P)、PC(16:0/18:1)(批号:850457P)、PC(18:0/18:2)(批号:850468P)、SM(d18:1/18:0)(批号:860586P)和SM(d18:1/16:0)(批号:860584P)均购自美国Avanti polar lipids公司。

**血浆样品采集** 血浆样本采集自2019年8月至2019年10月期间于广州医科大学附属第二医院体检中心参加体检的32例健康人群,实验方案和操作流程均经过广州医科大学附属第二医院临床研究与伦理委员会的审查和批准(批准号:2020-hs-07)。

**色谱条件** 色谱柱采用美国Waters公司Acquity UHPLC™ BEH C18(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相组成:A相为超纯水(含10 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵+0.1%甲酸),B相为乙腈-异丙醇(体积比为1:1)(含10 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵+0.1%甲酸)。梯度洗脱程序:0~4 min, 39%~18.6% A; 4~5 min 18.6%~18% A; 5~8 min, 18% A; 8~9 min, 18%~17% A; 9~12 min, 17% A; 12~15 min, 17%~5% A; 15~16 min, 5%~1% A; 16~17 min, 1%~0% A; 17~22 min, 100% B。柱温50 °C,自动进样器温度4 °C,流速:0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量:5 μL。

**质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下采集质谱数据,质量数扫描范围为 $m/z$  100~1 500 Da。实验中采用Lockmass通路对实验数据进行

实时校正,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的亮氨酸-脑啡肽标准品溶液, 在正、负离子模式下的质量校正质核比分别为  $m/z$  556.277 1 和 554.261 5, 校正切换频率为  $10 \text{次}\cdot\text{s}$ 。毛细管电压为 3 kV, 锥孔电压为 35 V, 脱溶剂气流量为  $500 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 锥孔气流量为  $50 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 脱溶剂气温度为  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , 离子源温度为  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , 离子能量为 1 V, 碰撞能量为 10 V。二级质谱碰撞能量设置范围为  $20\sim 30 \text{V}$ 。

**血浆样品的制备** 取血浆  $150 \mu\text{L}$ , 加入氯仿-甲醇 (2:1) (含  $0.1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  2,6-二叔丁基-4-甲基酚,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 混合溶剂  $1.5 \text{mL}$ , 涡旋并静置, 加入水  $400 \mu\text{L}$ , 离心后移取下层有机相氮气吹干, 加入含  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲酸铵的乙腈-异丙醇 (1:1) 混合溶剂  $300 \mu\text{L}$  复溶,  $12\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清液进样。

**精密度** 随机选取 8 个血浆样品, 各取  $20 \mu\text{L}$  混合均匀, 按“血浆样品的制备”方法制备质控 (quality control, QC) 样本, 连续进样 6 次, 每次进样  $5 \mu\text{L}$ , 按“色谱条件”进行 UHPLC-MS 分析。选取 7 个对照品色谱峰并计算其相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

**稳定性** 主要考察血浆样品处理后的稳定性, 即将处理后的血浆 QC 样本置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  自动进样器中, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 精密吸取 QC 样本  $5 \mu\text{L}$ , 按“色谱条件”进行 UHPLC-MS 分析。选取 7 个对照品色谱峰并计算其相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

**重复性** 随机选取 8 个血浆样品, 各取  $20 \mu\text{L}$  混合均匀, 按“血浆样品的制备”方法平行制备 5 份 QC 样本, 按“色谱条件”进行 UHPLC-MS 分析。选取 7 个对照品色谱峰并计算其相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。

## 结果

### 1 方法学验证

**1.1 精密度** 7 个对照品色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 为  $3.6\%\sim 6.7\%$ , 表明仪器精密度良好, 符合脂质组学血浆样品的分析要求。

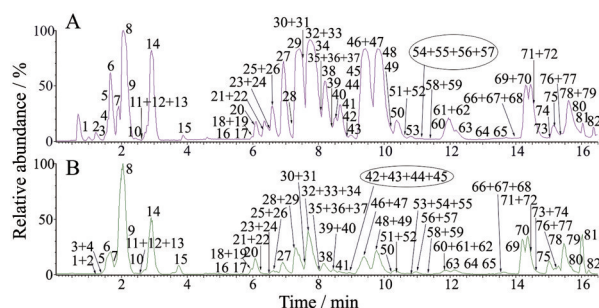
**1.2 稳定性** 7 个对照品色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 为  $6.9\%\sim 9.2\%$ , 表明处理后的血浆样品在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  自动进样器中放置 24 h 内稳定。

**1.3 重复性** 7 个对照品色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 为  $7.9\%\sim 10.5\%$ , 表明该血浆样品的制备方法重复性良好, 符合血浆脂质的分析要求。

### 2 人血浆磷脂类成分的 UHPLC/Q-TOF-MS 分析鉴定及质谱裂解规律探讨

人血浆样品在正、负离子模式下的总离子流图, 如图 1 所示。根据 Masslynx4.1 软件计算的精确相对分子

质量和元素组成 (分子质量测量值与理论值的限定误差范围在 5 ppm 内), 结合 MS、MS/MS 质谱数据和对照品, 并通过 The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipid Maps 等脂质代谢物数据库的检索比对, 初步鉴定出 82 个血浆脂质成分, 其中包括 14 个溶血磷脂酰胆碱 (LysoPCs)、39 个磷脂酰胆碱 (PCs)、17 个鞘磷脂 (SMs)、7 个神经酰胺 (Cers)、4 个磷脂酰乙醇胺 (PEs)、1 个磷脂酰肌醇 (PI)。具体结果详见表 1。



**Figure 1** Base peak ion chromatogram of human plasma in both positive (A) and negative (B) ion modes

在正离子模式下, 甘油磷脂类成分主要形成  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰, 在二级质谱中裂解出丰度较高的特征碎片离子峰  $m/z$  184  $[\text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P}]^+$ <sup>[12]</sup>; 在负离子模式下, 由于流动相中含有甲酸, 甘油磷脂类成分主要形成  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  准分子离子峰, 在二级质谱中首先丢失一个甲基, 形成  $[\text{M}-\text{CH}_3]^-$  离子峰, 继而通过酯键部位或烷基键部位 (*sn*-1/*sn*-2) 的裂解形成一条或两条长链脂肪酸酯基团的碎片离子峰, 以及磷酸胆碱基团特征碎片离子峰  $m/z$  168  $[\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{P}]^+$ <sup>[13]</sup>。

以 LysoPC(16:0/0:0) 和 PC(18:0/18:2) 为例来解释甘油磷脂类成分的结构推导。如图 2 所示, 在正离子模式下, 峰 8 的一级质谱显示  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子峰为  $m/z$  496.340 6, 二级质谱提示其容易脱去一个水分子, 形成  $m/z$  478  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  离子峰, 或脱去长链脂肪酸形成  $m/z$  258  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{CO}]^+$  碎片离子峰, 或脱去磷酸胆碱基团分别形成  $m/z$  313  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{P}]^+$  碎片离子峰和  $m/z$  184 特征碎片离子峰, 后者继续裂解形成  $m/z$  104  $[\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}]^+$  碎片离子峰, 推测其为磷脂酰胆碱类化合物。在负离子模式下, 峰 8 的一级质谱显示  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  准分子离子峰为  $m/z$  540.330 7, 二级质谱提示其首先脱去一个甲基形成  $m/z$  480  $[\text{M}-\text{CH}_3]^-$ , 继而在甘油骨架 *sn*-1 位裂解形成丰度较高的长链脂肪酸酯基团  $m/z$  255  $[\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COO}]^-$ , 裂解的碎片离子继续脱去甘油骨架结构形成  $m/z$  168 特征碎片离子峰。

如图 3 所示, 峰 48 在正、负离子模式下的  $[\text{M}+\text{H}]^+$  和  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  准分子离子峰分别为  $m/z$  786.600 3 和

**Table 1** Identification of human plasma phospholipids in the ESI positive and negative ion mode

No.	$t_R$ / min	Adduct ion	Measured mass ( $m/z$ )	Calculated mass ( $m/z$ )	Mass accuracy (ppm)	MS/MS ( $m/z$ )	Formula	Abbreviation	Metabolite
1	1.35	[M+H] <sup>+</sup>	518.325 4	518.324 7	1.4	500, 335, 258, 184, 104	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(18:3)	LysoPC(18:3/0:0)
	1.27	[M+HCOO] <sup>-</sup>	562.312 6	562.314 5	-3.4	502, 277, 168			
2	1.38	[M+H] <sup>+</sup>	468.307 8	468.309 0	-2.6	450, 285, 258, 184, 104	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(14:0)	LysoPC(14:0/0:0)
	1.29	[M+HCOO] <sup>-</sup>	512.298 4	512.298 8	-0.8	452, 227, 168			
3	1.48	[M+H] <sup>+</sup>	494.326 7	494.324 7	4.0	476, 311, 258, 184, 104	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(16:1)	LysoPC(16:1/0:0)
	1.39	[M+HCOO] <sup>-</sup>	538.314 0	538.314 5	-0.9	478, 253, 168			
4	1.49	[M+H] <sup>+</sup>	568.340 5	568.340 3	0.4	550, 385, 258, 184, 104	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(22:6)	LysoPC(22:6/0:0)
	1.43	[M+HCOO] <sup>-</sup>	612.329 7	612.330 1	-0.7	552, 327, 283, 168			
5	1.61	[M+H] <sup>+</sup>	544.339 0	544.340 3	-2.4	526, 361, 258, 184, 104	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(20:4)	LyspPC(20:4/0:0)
	1.58	[M+HCOO] <sup>-</sup>	588.328 9	588.330 1	-2.0	528, 303, 168			
6	1.67	[M+H] <sup>+</sup>	520.339 7	520.340 3	-1.2	502, 337, 258, 184, 104	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(18:2)	LysoPC(18:2/0:0)
	1.66	[M+HCOO] <sup>-</sup>	564.329 7	564.330 1	-0.7	504, 279, 168			
7	1.92	[M+H] <sup>+</sup>	546.356 9	546.356 0	1.6	528, 363, 258, 184, 104	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(20:3)	LysoPC(20:3/0:0)
	1.86	[M+HCOO] <sup>-</sup>	590.345 2	590.345 8	-1.0	530, 305, 168			
8	2.06	[M+H] <sup>+</sup>	496.340 6	496.340 3	0.6	478, 313, 258, 184, 104	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(16:0)	LysoPC(16:0/0:0)
	2.05	[M+HCOO] <sup>-</sup>	540.330 7	540.330 1	1.1	480, 255, 168			
9	2.18	[M+H] <sup>+</sup>	522.356 0	522.356 0	0	504, 339, 258, 184, 104	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(18:1)	LysoPC(18:1/0:0)
	2.18	[M+HCOO] <sup>-</sup>	566.345 3	566.345 8	-0.9	506, 281, 168			
10	2.34	[M+H] <sup>+</sup>	480.344 4	480.345 4	-2.1	462, 297, 240, 184, 104	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>6</sub> P	PC(P-16:0)	LysoPC(P-16:0/0:0)
	2.34	[M+HCOO] <sup>-</sup>	524.336 4	524.335 2	2.3	464, 239, 224, 168			
11	2.42	[M+H] <sup>+</sup>	482.360 5	482.361 1	-1.2	464, 299, 240, 184, 104	C <sub>24</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>6</sub> P	PC(O-16:0)	PC(O-16:0/0:0)
	2.41	[M+HCOO] <sup>-</sup>	526.351 0	526.350 9	0.2	466, 224, 168			
12	2.49	[M+H] <sup>+</sup>	510.354 3	510.356 0	-3.3	492, 327, 258, 184, 104	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(17:0)	LysoPC(17:0/0:0)
	2.49	[M+HCOO] <sup>-</sup>	554.344 8	554.345 8	-1.8	494, 269, 168			
13	2.54	[M+H] <sup>+</sup>	508.375 7	508.376 7	-2.0	490, 325, 240, 184, 104	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>6</sub> P	PC(P-18:0)	LysoPC(P-18:0/0:0)
	2.53	[M+HCOO] <sup>-</sup>	552.367 4	552.366 5	1.6	492, 281, 168			
14	2.92	[M+H] <sup>+</sup>	524.372 8	524.371 6	2.3	506, 341, 258, 184, 104	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(18:0)	LysoPC(18:0/0:0)
	2.91	[M+HCOO] <sup>-</sup>	568.363 7	568.361 4	4.0	508, 283, 168			
15	3.84	[M+H] <sup>+</sup>	552.401 7	552.402 9	-2.2	534, 369, 258, 184, 104	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(20:0)	LysoPC(20:0/0:0)
	3.83	[M+HCOO] <sup>-</sup>	596.391 4	596.392 7	-2.2	536, 311, 168			
16	5.71	[M+H] <sup>+</sup>	804.555 6	804.554 3	1.6	786, 184	C <sub>46</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:7)	PC(16:1/22:6)
	5.69	[M+HCOO] <sup>-</sup>	848.540 0	848.544 2	-4.9	788, 327, 168			
17	5.78	[M+H] <sup>+</sup>	854.569 5	854.570 0	-0.6	836, 671, 568, 544, 184	C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(42:10)	PC(22:6/20:4)
	5.80	[M+HCOO] <sup>-</sup>	898.557 3	898.559 7	-2.8	838, 327, 303, 168			
18	5.99	[M+H] <sup>+</sup>	675.542 8	675.544 1	-1.9	657, 474, 264, 184	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d32:1)	SM(d18:1/14:0)
	5.96	[M+HCOO] <sup>-</sup>	719.534 9	719.533 9	1.4	659, 588, 282, 227, 168			
19	6.01	[M+H] <sup>+</sup>	830.572 9	830.570 0	3.5	544, 526, 184	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(40:8)	PC(20:4/20:4)
	5.97	[M+HCOO] <sup>-</sup>	874.559 1	874.559 8	-0.8	814, 303, 168			
20	6.09	[M+H] <sup>+</sup>	701.560 5	701.559 8	1.0	683, 500, 262, 184	C <sub>39</sub> H <sub>77</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d34:2)	SM(d18:2/16:0)
	6.07	[M+HCOO] <sup>-</sup>	745.548 2	745.549 6	-1.9	685, 614, 279, 255, 168			
21	6.30	[M+H] <sup>+</sup>	730.536 4	730.538 7	-3.1	547, 520, 468, 184	C <sub>40</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(32:2)	PC(14:0/18:2)
	6.24	[M+HCOO] <sup>-</sup>	774.529 7	774.528 5	1.5	714, 279, 227, 168			
22	6.35	[M+H] <sup>+</sup>	806.571 0	806.570 0	1.2	623, 544, 520, 184	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:6)	PC(18:2/20:4)
	6.25	[M+HCOO] <sup>-</sup>	850.560 3	850.559 8	0.6	790, 303, 279, 168			
23	6.40	[M+H] <sup>+</sup>	756.554 0	756.554 3	-0.4	573, 502, 494, 184	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(34:3)	PC(16:1/18:2)
	6.63	[M+HCOO] <sup>-</sup>	800.543 8	800.544 2	-0.5	740, 279, 253, 168			
24	6.45	[M+H] <sup>+</sup>	780.553 2	780.554 3	-1.4	597, 524, 496, 478, 184	C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:5)	PC(16:0/20:5)
	6.66	[M+HCOO] <sup>-</sup>	824.543 9	824.544 2	-0.4	764, 301, 255, 168			
25	6.56	[M+H] <sup>+</sup>	887.565 7	887.565 0	0.8	627, 341, 287, 267	C <sub>47</sub> H <sub>83</sub> O <sub>13</sub> P	PI(38:4)	PI(18:0/20:4)
	6.70	[M-H] <sup>-</sup>	885.550 2	885.549 3	1.0	303, 283, 241			
26	6.59	[M+H] <sup>+</sup>	782.571 5	782.570 0	1.9	599, 520, 502, 184	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:4)	PC(18:2/18:2)
	6.75	[M+HCOO] <sup>-</sup>	826.558 0	826.559 8	-2.2	766, 279, 168			
27	6.94	[M+H] <sup>+</sup>	806.572 3	806.570 0	2.9	623, 568, 550, 496, 478, 184	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:6)	PC(16:0/22:6)
	6.91	[M+HCOO] <sup>-</sup>	850.557 3	850.559 8	-2.9	790, 327, 255, 168			
28	7.34	[M+H] <sup>+</sup>	703.575 0	703.575 4	-0.6	685, 520, 502, 264, 184	C <sub>39</sub> H <sub>79</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d34:1)	SM(d18:1/16:0)
	7.30	[M+HCOO] <sup>-</sup>	747.564 1	747.565 2	-1.5	687, 616, 281, 255, 168			
29	7.41	[M+H] <sup>+</sup>	782.571 0	782.570 0	1.3	599, 544, 526, 496, 478, 184	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:4)	PC(16:0/20:4)
	7.41	[M+HCOO] <sup>-</sup>	826.557 2	826.559 8	-3.1	766, 303, 255, 168			

Continued

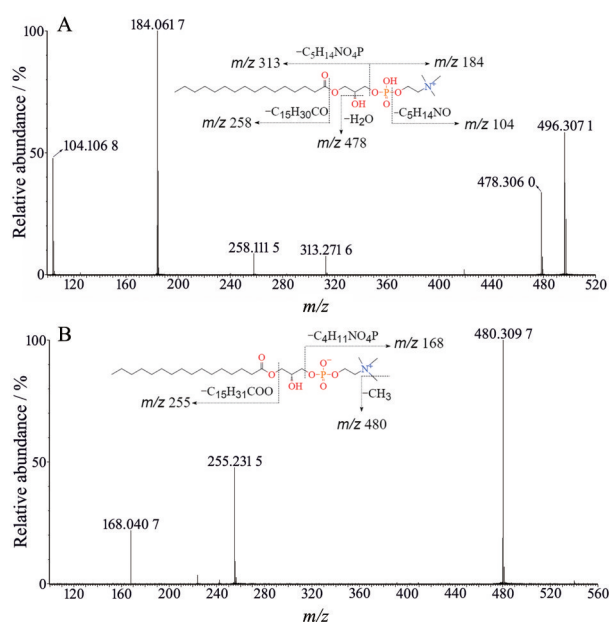
No.	<i>t<sub>R</sub></i> /min	Adduct ion	Measured mass ( <i>m/z</i> )	Calculated mass ( <i>m/z</i> )	Mass accuracy (ppm)	MS/MS ( <i>m/z</i> )	Formula	Abbreviation	Metabolite
30	7.48	[M+H] <sup>+</sup>	808.586 4	808.585 6	1.0	625, 544, 526, 522, 504, 184	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:5)	PC(18:1/20:4)
	7.45	[M+HCOO] <sup>-</sup>	852.577 8	852.575 5	2.7	792, 303, 281, 168			
31	7.53	[M+H] <sup>+</sup>	729.591 9	729.591 1	1.1	711, 264, 184	C <sub>41</sub> H <sub>81</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d36:2)	SM(d18:1/18:1)
	7.51	[M+HCOO] <sup>-</sup>	773.580 7	773.580 9	-0.3	281, 168			
32	7.66	[M+H] <sup>+</sup>	780.553 5	780.554 3	-1.0	597, 520, 502, 184	C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:5)	PC(18:2/18:3)
	7.64	[M+HCOO] <sup>-</sup>	824.540 5	824.544 2	-4.5	764, 279, 277, 168			
33	7.77	[M+H] <sup>+</sup>	758.573 5	758.570 0	4.6	575, 520, 502, 496, 478, 184	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(34:2)	PC(16:0/18:2)
	7.70	[M+HCOO] <sup>-</sup>	802.562 3	802.559 8	3.1	742, 279, 255, 168			
34	7.87	[M+H] <sup>+</sup>	784.584 0	784.585 6	-2.0	601, 522, 520, 504, 502, 184	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:3)	PC(18:1/18:2)
	7.82	[M+HCOO] <sup>-</sup>	828.578 0	828.585 6	0.2	768, 281, 279, 168			
35	8.07	[M+H] <sup>+</sup>	808.584 5	808.585 6	-1.4	625, 524, 506, 184	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:5)	PC(18:0/20:5)
	7.99	[M+HCOO] <sup>-</sup>	852.575 9	852.575 5	0.5	792, 301, 283, 168			
36	8.09	[M+H] <sup>+</sup>	705.592 5	705.591 1	2.0	687, 266, 184	C <sub>39</sub> H <sub>81</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d34:0)	SM(d18:0/16:0)
	8.03	[M+HCOO] <sup>-</sup>	749.581 8	749.580 9	1.2	255, 168			
37	8.10	[M+H] <sup>+</sup>	766.575 6	766.575 1	0.7	526, 480, 184	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(P-36:4) or PC(P-16:0/20:4) or PC(O-36:5)	PC(P-16:0/20:4) or PC(O-16:1/20:4)
	8.06	[M+HCOO] <sup>-</sup>	810.563 8	810.564 9	-1.4	750, 303, 168			
38	8.21	[M+H] <sup>+</sup>	784.583 9	784.585 6	-2.2	601, 546, 528, 496, 478, 184	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:3)	PC(16:0/20:3)
	8.16	[M+HCOO] <sup>-</sup>	828.576 4	828.575 5	1.1	768, 305, 255, 168			
39	8.46	[M+H] <sup>+</sup>	768.589 4	768.590 7	-1.7	585, 526, 482, 464, 184	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-36:4)	PC(O-16:0/20:4)
	8.44	[M+HCOO] <sup>-</sup>	812.583 6	812.580 5	3.8	752, 464, 303, 168			
40	8.54	[M+H] <sup>+</sup>	794.604 9	794.606 4	-1.9	611, 526, 508, 490, 184	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(P-38:4) or PC(P-18:0/20:4) or PC(O-38:5)	PC(P-18:0/20:4) or PC(O-18:1/20:4)
	8.55	[M+HCOO] <sup>-</sup>	838.597 1	838.596 2	1.1	778, 303, 168			
41	8.67	[M+H] <sup>+</sup>	834.600 3	834.601 3	-1.2	651, 568, 524, 184	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(40:6)	PC(18:0/22:6)
	8.64	[M+HCOO] <sup>-</sup>	878.588 1	878.591 1	-3.4	818, 327, 283, 168			
42	9.00	[M+H] <sup>+</sup>	744.587 6	744.590 7	-4.2	561, 184	C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-34:2)	PC(O-16:0/18:2)
	8.91	[M+HCOO] <sup>-</sup>	788.582 8	788.580 5	2.9	728, 464, 279, 241, 168			
43	9.09	[M+H] <sup>+</sup>	770.606 4	770.606 4	0	184	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(P-36:2) or PC(P-18:0/18:2) or PC(O-36:3)	PC(P-18:0/18:2) or PC(O-18:1/18:2)
	8.95	[M+HCOO] <sup>-</sup>	814.557 6	814.559 8	-2.7	279, 168			
44	9.29	[M+H] <sup>+</sup>	734.568 8	734.570 0	-1.6	551, 496, 478, 184	C <sub>40</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(32:0)	PC(16:0/16:0)
	9.20	[M+HCOO] <sup>-</sup>	778.560 0	778.559 8	0.3	718, 255, 168			
45	9.34	[M+H] <sup>+</sup>	810.601 5	810.601 3	0.2	627, 544, 524, 184	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:4)	PC(18:0/20:4)
	9.29	[M+HCOO] <sup>-</sup>	854.593 2	854.591 1	2.5	794, 303, 283, 168			
46	9.38	[M+H] <sup>+</sup>	731.609 2	731.606 7	3.4	713, 548, 530, 264, 184	C <sub>41</sub> H <sub>83</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d36:1)	SM(d18:1/18:0)
	9.36	[M+HCOO] <sup>-</sup>	775.595 4	775.596 5	-1.4	715, 644, 283, 281, 168			
47	9.42	[M+H] <sup>+</sup>	760.583 9	760.585 6	-2.2	577, 522, 496, 184	C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(34:1)	PC(16:0/18:1)
	9.39	[M+HCOO] <sup>-</sup>	804.577 4	804.575 5	2.4	744, 281, 255, 168			
48	9.86	[M+H] <sup>+</sup>	786.600 3	786.601 3	-1.3	603, 524, 520, 184	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:2)	PC(18:0/18:2)
	9.77	[M+HCOO] <sup>-</sup>	830.590 9	830.591 1	-0.2	770, 283, 279, 168			
49	10.24	[M+H] <sup>+</sup>	836.618 5	836.616 9	1.9	653, 524, 184	C <sub>48</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(40:5)	PC(18:0/22:5)
	10.15	[M+HCOO] <sup>-</sup>	880.608 8	880.606 8	2.3	820, 329, 283, 168			
50	10.37	[M+H] <sup>+</sup>	812.613 4	812.616 9	-4.3	629, 524, 184	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:3)	PC(18:0/20:3)
	10.34	[M+HCOO] <sup>-</sup>	856.605 2	856.606 8	-1.9	796, 305, 283, 168			
51	10.65	[M+H] <sup>+</sup>	774.602 3	774.601 3	1.3	/	C <sub>43</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	PE(38:1)	PE(20:0/18:1)
	10.57	[M+HCOO] <sup>-</sup>	818.593 8	818.591 1	3.3	281, 196, 140			
52	10.73	[M+H] <sup>+</sup>	822.636 4	822.637 7	-1.6	184	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-40:5)	PC(O-18:0/22:5)
	10.63	[M+HCOO] <sup>-</sup>	866.672 0	866.627 5	-0.6	806, 343, 255, 168			
53	10.81	[M+H] <sup>+</sup>	796.621 6	796.622 0	-0.5	613, 510, 184	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-38:4)	PC(O-18:0/20:4)
	10.71	[M+HCOO] <sup>-</sup>	840.612 8	840.611 8	1.2	780, 303, 269, 168			
54	10.84	[M+H] <sup>+</sup>	746.607 1	746.606 4	0.9	563, 508, 478, 184	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-34:1)	PC(O-18:1/16:0)
	10.71	[M+HCOO] <sup>-</sup>	790.597 1	790.596 2	1.1	730, 281, 255, 168			
55	10.86	[M+H] <sup>+</sup>	720.589 1	720.590 7	-2.2	537, 482, 184, 104	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-32:0)	PC(O-16:0/16:0)
	10.77	[M+HCOO] <sup>-</sup>	764.579 3	764.580 5	-1.6	704, 255, 168			
56	11.00	[M+H] <sup>+</sup>	752.561 3	752.559 4	2.5	/	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>7</sub> P	PE(P-38:4)	PE(P-18:0/20:4)
	10.95	[M-H] <sup>-</sup>	750.544 9	750.543 8	1.5	464, 446, 303, 267, 259, 196, 140			
57	11.06	[M+H] <sup>+</sup>	838.633 0	838.632 6	0.5	655, 552, 544, 184	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(40:4)	PC(20:0/20:4)
	11.06	[M+HCOO] <sup>-</sup>	882.618 4	882.622 4	-4.5	822, 331, 303, 168			
58	11.41	[M+H] <sup>+</sup>	772.622 8	772.622 0	-2.1	589, 510, 492, 184	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-36:2)	PC(O-18:0/18:2)

Continued

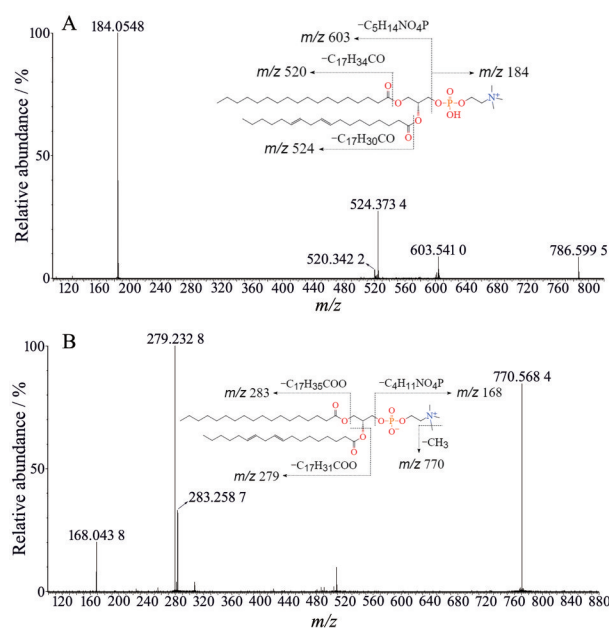
No.	$t_R$ / min	Adduct ion	Measured mass ( $m/z$ )	Calculated mass ( $m/z$ )	Mass accuracy (ppm)	MS/MS ( $m/z$ )	Formula	Abbreviation	Metabolite
	11.33	[M+HCOO] <sup>-</sup>	816.609 6	816.611 8	-2.7	756, 279, 269, 168			
59	11.74	[M+H] <sup>+</sup>	728.560 4	728.559 4	1.4	/	C <sub>41</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>7</sub> P	PE(P-36:2)	PE(P-18:0/18:2)
	11.60	[M-H] <sup>-</sup>	726.545 3	726.543 8	2.1	464, 446, 279, 267, 196, 140			
60	11.84	[M+H] <sup>+</sup>	762.604 2	762.601 3	3.8	579, 524, 506, 496, 478, 184	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(34:0)	PC(18:0/16:0)
	11.77	[M+HCOO] <sup>-</sup>	806.588 8	806.591 1	-2.9	746, 283, 255, 168			
61	11.96	[M+H] <sup>+</sup>	788.618 8	788.616 9	2.4	603, 524, 184	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(36:1)	PC(18:0/18:1)
	11.81	[M+HCOO] <sup>-</sup>	832.606 4	832.606 8	-0.5	772, 283, 281, 168			
62	11.96	[M+H] <sup>+</sup>	811.669 4	811.669 3	0.1	793, 628, 610, 262, 184	C <sub>47</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d42:3)	SM(d18:2/24:1)
	11.89	[M+HCOO] <sup>-</sup>	855.659 8	855.659 1	0.8	795, 724, 303, 168			
63	12.00	[M+H] <sup>+</sup>	759.638 3	759.638 0	0.4	741, 576, 558, 264, 184	C <sub>43</sub> H <sub>87</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d38:1)	SM(d18:1/20:0)
	11.96	[M+HCOO] <sup>-</sup>	803.628 8	803.627 8	1.2	743, 672, 281, 279, 168			
64	12.18	[M+H] <sup>+</sup>	785.654 9	785.653 7	1.5	767, 602, 584, 262, 184	C <sub>45</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d40:2)	SM(d18:2/22:0)
	12.15	[M+HCOO] <sup>-</sup>	829.640 6	829.643 5	-3.5	769, 698, 303, 279, 168			
65	12.19	[M+H] <sup>+</sup>	814.632 9	814.632 6	0.4	631, 548, 530, 524, 506, 184	C <sub>46</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	PC(38:2)	PC(18:0/20:2)
	12.45	[M+HCOO] <sup>-</sup>	858.620 8	858.622 4	-1.9	307, 283, 168			
66	13.57	[M+H] <sup>+</sup>	773.651 4	773.653 7	-3.0	755, 590, 572, 264, 184	C <sub>44</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d39:1)	SM(d18:1/21:0)
	13.50	[M+HCOO] <sup>-</sup>	817.644 5	817.643 5	1.2	757, 686, 607, 309, 281, 168			
67	13.70	[M+H] <sup>+</sup>	799.671 2	799.669 3	2.4	781, 616, 598, 262, 184	C <sub>46</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d41:2)	SM(d18:2/23:0)
	13.64	[M+HCOO] <sup>-</sup>	843.661 3	843.659 1	2.6	783, 712, 633, 307, 279, 168			
68	14.02	[M+H] <sup>+</sup>	730.576 8	730.575 1	2.3	/	C <sub>41</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	PE(P-36:1)	PE(P-18:0/18:1)
	13.88	[M-H] <sup>-</sup>	728.560 1	728.559 4	1.0	464, 446, 281, 267, 196, 140			
69	14.30	[M+H] <sup>+</sup>	813.685 8	813.685 0	1.0	795, 630, 612, 264, 184	C <sub>47</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d42:2)	SM(d18:1/24:1)
	14.20	[M+HCOO] <sup>-</sup>	857.677 1	857.674 8	2.7	797, 726, 647, 365, 281, 168			
70	14.46	[M+H] <sup>+</sup>	787.672 9	787.669 3	4.6	769, 604, 586, 264, 184	C <sub>45</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d40:1)	SM(d18:1/22:0)
	14.36	[M+HCOO] <sup>-</sup>	831.662 0	831.659 1	3.5	771, 700, 621, 339, 279, 168			
71	14.63	[M+H] <sup>+</sup>	813.685 7	813.685 0	0.9	795, 630, 612, 262, 184	C <sub>47</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d42:2)	SM(d18:2/24:0)
	14.46	[M+HCOO] <sup>-</sup>	857.676 1	857.674 8	1.5	797, 726, 647, 367, 168			
72	14.68	[M+H] <sup>+</sup>	784.654 9	784.658 4	-4.5	766, 282, 264	C <sub>46</sub> H <sub>90</sub> NO <sub>6</sub> P	CerP(d44:2)	CerP(d18:1/26:1)
	14.64	[M+HCOO] <sup>-</sup>	828.649 6	828.648 2	1.7	620, 263			
73	14.96	[M+H] <sup>+</sup>	878.697 5	878.700 3	-3.2	184	C <sub>52</sub> H <sub>96</sub> NO <sub>7</sub> P	PC(O-44:5)	PC(O-22:2/22:3)
	14.85	[M+HCOO] <sup>-</sup>	922.689 2	922.690 1	-1.0	862, 303, 168			
74	15.07	[M+H] <sup>+</sup>	789.682 4	789.685 0	-3.3	771, 606, 266, 184	C <sub>45</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d40:0)	SM(d18:0/22:0)
	14.91	[M+HCOO] <sup>-</sup>	833.672 5	833.674 8	-2.8	773, 702, 623, 279, 168			
75	15.15	[M+H] <sup>+</sup>	801.686 3	801.685 0	1.6	783, 618, 600, 264, 184	C <sub>46</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d41:1)	SM(d18:1/23:0)
	15.01	[M+HCOO] <sup>-</sup>	845.674 2	845.674 8	-0.7	785, 714, 635, 616, 281, 168			
76	15.26	[M+H] <sup>+</sup>	648.628 2	648.629 5	-2.0	630, 612, 280, 262	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d42:2)	Cer(d18:2/24:0)
	15.21	[M+HCOO] <sup>-</sup>	692.620 1	692.619 3	1.2	367			
77	15.36	[M+H] <sup>+</sup>	622.614 1	622.613 8	0.5	604, 586, 282, 264	C <sub>40</sub> H <sub>79</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d40:1)	Cer(d18:1/22:0)
	15.31	[M+HCOO] <sup>-</sup>	666.603 0	666.603 7	-1.1	364, 263			
78	15.61	[M+H] <sup>+</sup>	815.700 3	815.700 6	-0.4	797, 632, 614, 264, 184	C <sub>47</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	SM(d42:1)	SM(d18:1/24:0)
	15.56	[M+HCOO] <sup>-</sup>	859.690 3	859.690 4	-0.1	799, 728, 649, 367, 168			
79	15.62	[M+H] <sup>+</sup>	624.630 9	624.629 5	2.2	606, 588, 284, 266	C <sub>40</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d40:0)	Cer(d18:0/22:0)
	15.59	[M+HCOO] <sup>-</sup>	668.619 4	668.619 3	0.1	364			
80	15.72	[M+H] <sup>+</sup>	636.631 5	636.629 5	3.1	618, 600, 282, 264	C <sub>41</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d41:1)	Cer(d18:1/23:0)
	15.68	[M+HCOO] <sup>-</sup>	680.620 2	680.619 3	1.3	352, 263			
81	16.03	[M+H] <sup>+</sup>	650.643 3	650.645 1	-2.8	632, 614, 602, 282, 264	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d42:1)	Cer(d18:1/24:0)
	16.03	[M+HCOO] <sup>-</sup>	694.633 2	694.635 0	-2.6	630, 618, 408, 392, 367, 263, 237			
82	16.23	[M+H] <sup>+</sup>	652.661 9	652.660 8	1.7	634, 616, 284, 266	C <sub>42</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>3</sub>	Cer(d42:0)	Cer(d18:0/24:0)
	16.23	[M+HCOO] <sup>-</sup>	696.651 9	696.650 6	1.9	367			

$m/z$  830.590 9。在正离子模式下, 峰48的二级质谱显示其脱去磷酸胆碱基团产生  $m/z$  603 [M+H-C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>P]<sup>+</sup> 碎片离子峰和  $m/z$  184 特征碎片离子峰, 或脱去长链脂肪酸基团形成  $m/z$  524 [M+H-C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>CO]<sup>+</sup> 和 520 [M+H-C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>CO]<sup>+</sup> 碎片离子峰; 在负离子模式下, 峰48的二级

质谱提示其首先丢失一个甲基形成  $m/z$  770 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 然后在甘油骨架的 *sn*-1 位和 *sn*-2 位分别裂解出两条长链脂肪酸酯碎片离子  $m/z$  279 [C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>COO]<sup>-</sup> (C18:2) 和 283 [C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>COO]<sup>-</sup> (C18:0), 且与  $m/z$  283 相比,  $m/z$  279 的信号强度更强, 提示 C18:2 键合在甘油骨架的 *sn*-2



**Figure 2** The MS/MS spectra of peak 8 in positive (A) and negative (B) ion modes and its proposed fragmentation patterns



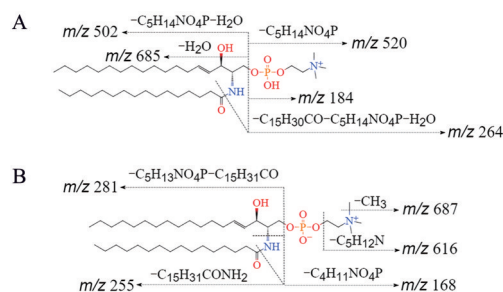
**Figure 3** The MS/MS spectra of peak 48 in positive (A) and negative (B) ion modes and its proposed fragmentation patterns

位<sup>[14]</sup>, 最终通过脱去甘油骨架结构形成磷酸胆碱基团  $m/z$  168 特征碎片离子峰。通过与对照品和 HMDB、Lipid Maps 等脂质数据库比对, 推断峰 8 和峰 48 分别为 LysoPC(16:0/0:0) 和 PC(18:0/18:2)。以此类推, 按上述裂解规律推导和鉴定其他甘油磷脂类成分。

鞘磷脂和神经酰胺的骨架结构是鞘氨醇、神经酰胺与磷酸胆碱结合形成鞘磷脂。在正离子模式下, 鞘磷脂主要形成  $[M+H]^+$  准分子离子峰, 二级质谱产生  $m/z$

266  $[C_{18}H_{36}N]^+$ 、264  $[C_{18}H_{34}N]^+$  或 262  $[C_{18}H_{32}N]^+$  的鞘氨醇骨架结构以及丰度较高的磷酸胆碱基团  $m/z$  184 的特征碎片离子峰<sup>[15]</sup>; 在负离子模式下, 鞘磷脂主要形成  $[M+HCOO]^-$  准分子离子峰, 二级质谱首先脱去一个甲基或胆碱骨架基团形成  $[M-CH_3]^-$  或  $[M-C_5H_{12}N]^-$  离子峰, 继而裂解出鞘氨醇骨架基团、长链脂肪酸基团和磷酸胆碱基团  $m/z$  168 特征碎片离子峰<sup>[13]</sup>。在正离子模式下, 神经酰胺的二级质谱首先脱去一个水分子形成  $[M+H-H_2O]^+$  离子峰, 继而通过酰胺键部位的裂解形成鞘氨醇骨架结构  $m/z$  282  $[C_{18}H_{36}NO]^+$  或二氢鞘氨醇骨架结构  $m/z$  284  $[C_{18}H_{38}NO]^+$ , 继续脱去一个水分子, 产生丰度较高的  $m/z$  264  $[C_{18}H_{34}N]^+$  或 266  $[C_{18}H_{36}N]^+$  特征碎片离子峰<sup>[16]</sup>。

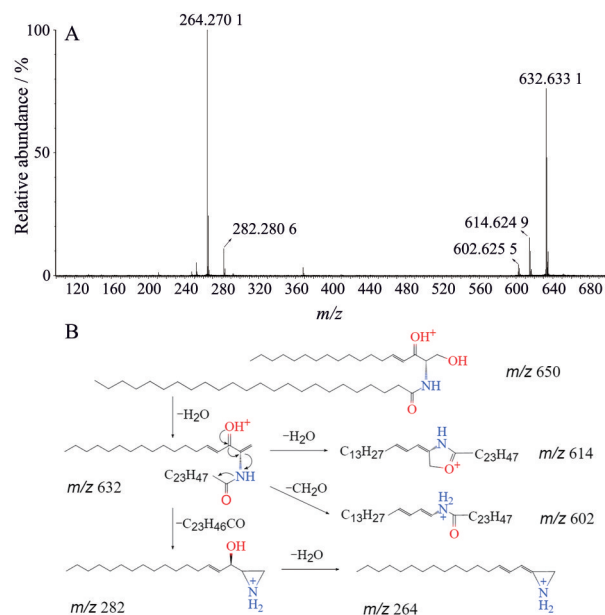
以 SM(d18:1/16:0) 和 Cer(d18:1/24:0) 为例来解释鞘磷脂和神经酰胺类成分的结构推导。峰 28 在正、负离子模式下分别形成  $m/z$  703.575 0  $[M+H]^+$  和 747.564 1  $[M+HCOO]^-$  准分子离子峰。在正离子模式下, 峰 28 的二级质谱提示其首先相继脱去一个水分子或/和磷酸胆碱基团, 分别形成  $m/z$  685  $[M+H-H_2O]^+$ 、520  $[M+H-C_5H_{14}NO_4P]^+$  和 502  $[M+H-C_5H_{14}NO_4P-H_2O]^+$  碎片离子峰以及丰度较高的  $m/z$  184 特征碎片离子峰,  $m/z$  520 继续通过脱去长链脂肪酸基团  $C_{15}H_{30}CO$  和一分子  $H_2O$  后, 形成脱水鞘氨醇骨架基团  $m/z$  264  $[C_{15}H_{29}CH=C(NH_2)CH_2]^+$  ( $C_{18}H_{34}N$ ) 特征碎片离子峰。在负离子模式下, 峰 28 的二级质谱提示其首先脱去一个甲基或胆碱骨架基团 ( $C_5H_{12}N$ ), 分别形成  $m/z$  687  $[M-CH_3]^-$  和 616  $[M-C_5H_{12}N]^-$  碎片离子峰,  $m/z$  687 继续裂解可产生鞘氨醇骨架基团  $m/z$  281  $[C_{15}H_{29}CH(OH)CH(NH)CH_2]^-$  和长链脂肪酸酰胺基团  $m/z$  255  $[C_{15}H_{31}CONH_2]^-$ , 最终形成  $m/z$  168 特征碎片离子峰。峰 28 在正、负离子模式下可能的裂解途径如图 4 所示。



**Figure 4** The proposed fragmentation patterns of peak 28 in positive (A) and negative (B) ion modes

峰 81 在正、负离子模式下的  $[M+H]^+$  和  $[M+HCOO]^-$  准分子离子峰分别为  $m/z$  650.643 3 和 694.633 2。如图 5 所示, 在正离子模式下, 峰 81 的二级质谱提示其首先

通过相继脱去一个或两个水分子, 分别形成  $m/z$  632  $[M+H-H_2O]^+$  和 614  $[M+H-2H_2O]^+$  的碎片离子峰, 而后  $m/z$  632 一方面通过继续丢失一分子  $CH_2$  和 O 形成碎片离子峰  $m/z$  602, 另一方面通过酰胺键 (CO-NH) 部位的裂解脱去右端长链脂肪酸基团  $C_{23}H_{46}CO$ , 形成  $m/z$  282 的鞘氨醇骨架结构, 继续脱去一个水分子, 形成丰度较高的  $m/z$  264 特征碎片离子峰。在负离子模式下, 峰 81 的二级质谱裂解方式与鞘磷脂类似, 可裂解产生脱水鞘氨醇骨架基团  $m/z$  263  $[C_{15}H_{29}CH=C(NH)CH_2]^-$  ( $C_{18}H_{33}N$ ) 和长链脂肪酸酰胺基团  $m/z$  367  $[C_{23}H_{47}CONH_2]^-$ 。通过与对照品和 HMDB、Lipid Maps 等脂质数据库对比, 推测峰 28 和峰 81 分别为 SM (d18:1/16:0) 和 Cer(d18:1/24:0)。同理鉴定其他鞘磷脂和神经酰胺类成分。



**Figure 5** The MS/MS spectra of peak 81 in positive ion mode (A) and its typical fragmentation patterns (B)

## 讨论

在已报道的研究<sup>[17,18]</sup>中, 人血浆磷脂类成分的定性分析多采用 HPLC-MS 技术, 由于该方法存在分析时间长、分离度低等缺点, 远不能满足大样本人群血浆脂质组学的分析要求。此外, 既往研究主要集中在甘油磷脂类成分的分离和鉴定, 而对占比小且含量低的人血浆鞘脂类成分 (SM 和 Cer) 的定性分析研究较少, 同时甘油磷脂和鞘脂类成分的质谱裂解规律亦未得到系统阐释。基于此, 本研究建立的高速度、高分离度、高灵敏度的 UHPLC-MS 分析新方法能在 16 min 内快速分离鉴定出甘油磷脂、鞘磷脂和神经酰胺三类脂质成分, 更适用于脂质组学研究中潜在脂质生物标志物的

筛选和鉴定。

本研究发现, PC、SM、Cer 和 PE 类磷脂成分在 ESI 源正、负离子模式下均有响应, 但在正离子模式下响应更强, 而 PI 类磷脂成分则在负离子模式下响应更强。通过高碰撞能量诱导解离的碎片离子获取关于脂质头部极性基团和键合长链脂肪酸酯基团的信息, 并根据这些特征性碎片离子鉴定该脂质类别及化学结构。经本研究考察, 磷脂类成分的二级质谱选择 20~30 eV 碰撞能量时可获得丰富的碎片信息。在正离子模式下, PC 和 SM 的二级质谱主要形成  $m/z$  184 的特征性碎片离子峰, 该碎片是由裂解的极性头部即磷酸胆碱基团所形成的信号。然而仅通过该信号并不能有效区分 PC 和 SM 类磷脂。由于 SM 和 Cer 具有共同骨架结构-鞘氨醇, 因此可裂解产生鞘氨醇骨架结构  $m/z$  282 或 284, 继续脱去一水分子形成  $m/z$  264 或 266 特征碎片离子峰, 据此特征信号可区分 PC 和 SM 磷脂类别, 但由于缺乏脂肪酸酯侧链相关碎片信息, 仍无法推断键合脂肪酸酯侧链的分子式。与此同时, 负离子裂解碎片相比于正离子碎片含有更丰富的极性头部碎片信息和脂肪酸酯侧链信息, 对辅助验证脂质结构至关重要。在负离子模式下, PC 和 SM 类磷脂的极性头部裂解形成  $m/z$  168 特征性碎片离子, PC 侧链脂肪酸断裂并形成相应的长链脂肪酸酯基团, 且根据脂肪酸侧链所键合的位置不同其碎片信号的强度也不同。sn-2 位结合的脂肪酸链比 sn-1 位的脂肪酸链更容易断裂, 因此相应的  $[R_2COO]^-$  信号比  $[R_1COO]^-$  信号强, 这有利于确定长链脂肪酸酯基团的键合位置。SM 和 Cer 还可在酰化脂肪酸链部位裂解形成长链脂肪酸基团、长链脂肪酸酰胺基团或鞘氨醇骨架结构。在负离子模式下, PE 和 PI 类磷脂的裂解规律与 PC 类似, 二者均通过相继裂解两条侧链脂肪酸, PE 类磷脂成分最终形成极性头部-甘油磷酸乙醇胺基团  $m/z$  196  $[C_5H_{11}NO_3P]^-$  和磷酸乙醇胺基团  $m/z$  140  $[C_2H_7NO_4P]^-$  特征碎片离子<sup>[19]</sup>; PI 类磷脂成分则最终形成去羟基的极性头部-磷酸肌醇基团  $m/z$  241  $[C_6H_{10}O_8P]^-$ <sup>[20]</sup>。通过结合正、负离子模式下的 MS 和 MS/MS 质谱信息基本可以鉴定脂质化合物的结构和种类, 然而脂肪酸长链上饱和双键的位置及其构型仍无法确定。

本实验采用 UHPLC/Q-TOF-MS 技术对人血浆磷脂类成分进行定性分析, 根据精确分子质量、元素组成以及二级质谱碎片信息并结合脂质数据库匹配等初步鉴定出 82 个脂质成分, 并在此基础上总结了不同种类磷脂成分的二级质谱裂解规律, 为人血浆磷脂类成分的分离和鉴定提供了一种简便、快捷、稳定的分析方法, 同时也为后期疾病的人血浆脂质组学研究以及脂质

生物学意义的阐述奠定了基础。

**作者贡献:** 本文由钟询龙、钟艳梅、王若伦负责研究思路设计; 陈莉诗、钟询龙、钟艳梅负责实验实施; 钟询龙、钟艳梅负责数据处理; 钟询龙负责论文撰写; 钟询龙、钟艳梅负责论文修改。

**利益冲突:** 本文作者及研究内容均无任何利益冲突。

## References

- [1] Wenk MR. Lipidomics: new tools and applications [J]. *Cell*, 2010, 143: 888-895.
- [2] Yang K, Han XL. Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 954-969.
- [3] Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, et al. Lipidomics: potential role in risk prediction and therapeutic monitoring for diabetes and cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143: 12-23.
- [4] Mousa A, Naderpoor N, Mellett N, et al. Lipidomic profiling reveals early-stage metabolic dysfunction in overweight or obese humans [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864: 335-343.
- [5] Kohno S, Keenan AL, Ntambi JM, et al. Lipidomic insight into cardiovascular diseases [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2018, 54: 590-595.
- [6] Gong LL, Yang S, Zhang W, et al. Discovery of metabolite profiles of metabolic syndrome using untargeted and targeted LC-MS based lipidomics approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 177: 112848.
- [7] Zhang LL, Zhu BJ, Zeng YM, et al. Clinical lipidomics in understanding of lung cancer: opportunity and challenge [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 75-83.
- [8] Sabogal-Guáqueta AM, Arias-Londoño JD, Gutierrez-Vargas J, et al. Common disbalance in the brain parenchyma of dementias: phospholipid profile analysis between CADASIL and sporadic Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866: 165797.
- [9] Li L, Wang LL, Shangguan DH, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for accurate analysis of glycerophospholipids and sphingolipids in drug resistance tumor cells [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1381: 140-148.
- [10] Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 688: 1-23.
- [11] Li MH, Li QL, Kang SM, et al. Characterization and comparison of lipids in bovine colostrum and mature milk based on UHPLC-QTOF-MS lipidomics [J]. *Food Res Int*, 2020, 136: 109490.
- [12] Allen F, Greiner R, Wishart D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification [J]. *Metabolomics*, 2015, 11: 98-110.
- [13] Liebisch G, Lieser B, Rathenberg J, et al. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1686: 108-117.
- [14] She YQ, Xiao XR, Wu X, et al. Rapid analysis of glycerophospholipids in RAW264.7 macrophage with UHPLC-QTOF/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1451-1457.
- [15] Liao HW, Lin SW, Lin YT, et al. Identification of potential sphingomyelin markers for the estimation of hematocrit in dried blood spots via a lipidomic strategy [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1003: 34-41.
- [16] Yamane M. Simultaneous quantitative determination method for ceramide species from crude cellular extracts by high-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 783: 181-190.
- [17] Lee JY, Min HK, Moon MH. Simultaneous profiling of lysophospholipids and phospholipids from human plasma by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400: 2953-2961.
- [18] Ferreira-Vera C, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Comparison of sample preparation approaches for phospholipids profiling in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1240: 21-28.
- [19] Dong W, Shen Q, Baibado JT, et al. Phospholipid analyses by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry using 1, 5-diaminonaphthalene as matrix [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2013, 343-344: 15-22.
- [20] Xia T, Ren HL, Zhang WP, et al. Lipidome-wide characterization of phosphatidylinositols and phosphatidylglycerols on C=C location level [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1128: 107-115.