

高通量靶向脂质组学方法实现广泛的脂质定量

基于超灵敏的SCIEX Triple Quad™ 和QTRAP® LC-MS/MS系统实现脂质的分离和定量

Mackenzie Pearson, Santosh Kumar Kapil, Paul Norris, Christie Hunter

SCIEX, USA

脂质组学中直接进样的鸟枪法是一种广泛使用的脂质组学分析方法¹。该方法快速简单，但是会受到明显的离子抑制效应，同时，由于脂质分子众多并伴有大量同分异构体的峰重叠，从而使得精确辨认每一种脂质十分困难²。正相和反相液相色谱与质谱联用也被广泛应用于脂质组学研究。液质联用方法可以根据脂类物质理化性质的不同对其进行分离，但是建立一个能够同时检测尽可能多的不同类别的脂质分子的定量方法仍然极具挑战³。另外，定性分析方法比如数据依赖性扫描（Information Dependent Acquisition, IDA），由于分析重现性不佳也会导致定量结果不准确⁴。

利用高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）结合三重四极杆质谱的多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）扫描模式能够提高数据采集的灵敏度和特异性。首先，液相分离是该分析方法的关键。经过液相分离，所有脂质按类别或亚类被逐渐洗脱分离⁵。



本研究项目中，我们描述了一种使用靶向MRM离子对和商业化的脂质内标混合物的方法。该方法提供了对约1900种不同脂质分子种类进行准确定量分析(图1)。脂质MRM列表可以根据研究需要减少，以用于特定类别的研究，或可扩展以包括新的脂质类别。

不同类别脂质化合物数量
(所有被测物)

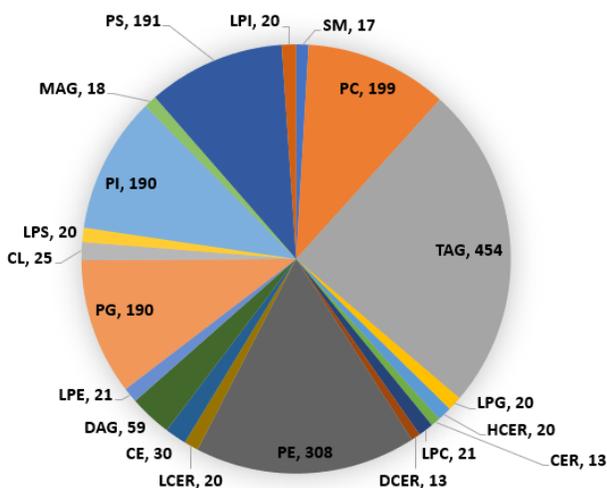


图1. 基于液相分离的靶向MRM分析方法概述。基于LC-MS/MS的靶向脂质组学方法快速定性并定量分析多种基质中的多种脂类物质。

基于SCIEX Triple Quad 或 QTRAP 系统的LC-MRM 分析方法在靶向脂质组学研究中的优势：

- 优化各种脂类物质的色谱分离效果，减少不同类脂质分子的相互干扰（每个样品17分钟）。
- 每种脂质分子在较窄的保留时间窗口洗脱出峰使得利用保留时间对脂质分子的识别变得简单，从而利用分段 MRM（Scheduled MRM）扫描模式完成约1900个脂质分子的同时检测。
- SCIEX质谱系统提供广泛的动态检测范围，快速的正负极性切换（<5 ms），同时兼有高灵敏度和快采集速度（3-5 ms驻留时间）
- MRM扫描模式的应用更大化的提高目标物检测的灵敏度和特异性，实现快速且准确的定量分析。
- 利用脂质内标混合物建立Scheduled MRM扫描方法，用于多种脂质的靶向分析，从而准确的鉴定每个脂质分子。

- 通过 SCIEX OS 软件，采用预设的数据处理方法进行自动的数据处理过程。

实验方法

样品制备：血浆提取物 (Plasma extract, NIST, 1 g/100mL) 是一种商业化的脂质混合物，包括多种脂质。用于确定保留时间和定量的内标混合物，包括Avanti 公司的SPLASH混合标准品和SCIEX Lipidzyer™ 平台试剂盒⁶。

LC-MS分析：液相分离采用Exion LC™系统，包括一个二元高压混合脱气泵，一个控温自动进样器以及一个柱温箱。质谱分析采用SCIEX QTRAP® 6500+系统，配备IonDrive™ Turbo V™离子源，主要采用低质量段极性切换扫描模式，通过Analyst™软件运行，或者采用SCIEX Triple Quad 7500系统，配备OptiFlow™ Pro离子源，通过SCIEX OS软件运行。采用含有混标的NIST血浆样品或具有代表性的基质样品，先进行普通MRM (unscheduled MRM) 扫描，粗略确定保留时间。根据这一初步的结果，建立保留时间依赖的Scheduled MRM方法。该方法可以利用Scheduled MRM™ 算法进一步优化相关高级参数。详细的色谱质谱分析方法见广泛靶向的全面脂质组学分析方法 (Comprehensive Targeted Method for Global Lipidomics Screening) ⁷。

数据分析：数据分析采用SCIEX OS软件，积分算法为自动积分算法 (AutoPeak algorithm)，使用sMRM Pro Builder软件 v1.3 可以实现最终Scheduled MRM方法中时间的自动匹配⁸。

| | | |
|---------------------------------------|----------------|---------------|
| 正离子模式检测策略： (M+H) | PC 34:2 | (758.5/184.1) |
| 负离子模式检测策略： (M+CH ₃ COO) | PC (14:0_20:2) | (816.6/307.3) |
| | PC (14:0_20:2) | (816.6/309.3) |
| | PC (14:0_20:2) | (816.6/279.2) |
| | PC (14:0_20:2) | (816.6/281.2) |

图2. 更复杂的磷脂识别的负模式策略。在经典的MRM分析中，MRM离子对多数情况下采用磷脂头部组份的质谱碎片正离子模式。在负MRM离子对模式下，则是通过构建脂肪酸质谱碎片离子信息进行检测，这样以提供脂质分子水平上的信息。

MRM方法鉴定脂质

该方法提供了众多的MRM离子对用于多种脂类物质的靶向检测。该列表可以检测约1900种脂质分子，包括磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) /溶血磷脂酰胆碱 (lyso-phosphatidylcholine, LPC)，磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidyl ethanolamine, PE) / 溶血磷脂酰乙醇胺

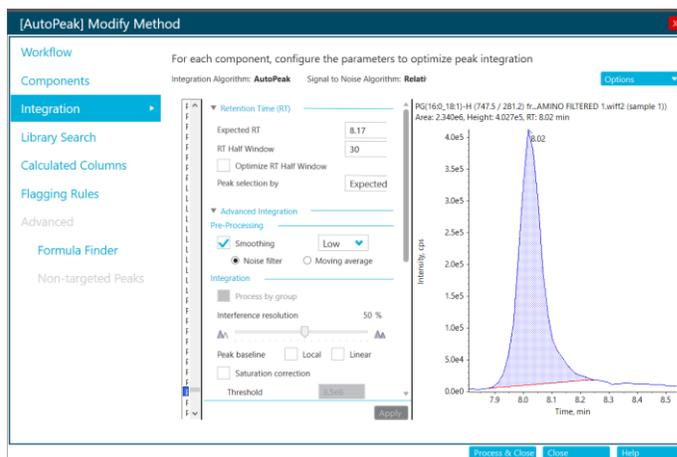


图3. 用于脂质MRM数据处理的SCIEX OS软件。SCIEX OS软件可以快速处理MRM或s-MRM方法获取的数据。通过最终优化的方法，就可输出出色谱峰的各种信息如保留时间，峰面积和峰宽。

(lyso-phosphatidylethanolamine, LPE)，磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) /溶血磷脂酰丝氨酸 (lyso-phosphatidylserine, LPS)，磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) /溶血磷脂酰肌醇 (lyso-phosphatidylinositol, LPI)，磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol, PG) /溶血磷脂酰甘油 (lyso-phosphatidylglycerol, LPG)，单酰甘油 (monoacylglycerol, MAG)，二酰甘油 (diacylglycerol, DAG)，三酰甘油 (triglyceride, TAG)，游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA)，胆固醇酯 (cholesterol ester, CE)，神经酰胺 (ceramide, CER)，二氢神经酰胺 (dihydroceramide, DCER)，葡萄糖酰神经酰胺 (glucosylceramide, HCER)，乳糖神经酰胺 (lactosylceramide, LCER)，鞘脂 (sphingolipids, SM)。当前的脂质质谱库可以充分覆盖哺乳动物的血浆、组织和细胞中的常见脂质。另外，针对特定的待测物质，也可直接在MRM列表中添加其它想要检测分析的脂质离子对。

一般来说，正离子模式就可以检测到大量的脂质分子。然而，对于磷脂的分析，除了采用正离子模式下检测极性头部的常用方法，该方法还加入了负离子模式下检测脂肪酸侧链断裂的方式去判定磷脂 (PC, PE, PS, PI, PG) 的不同脂肪酸组成。如图2所示，在正离子的模式下，可以得知PC34:2的分类。同时，在负离子的模式下，根据不同的MRM离子对设置，可以得知其不同的侧链组成，从而直接准确的判断PC34:2的脂质分子组成。这些分子组成的特异性往往是理解特定生物学现象的关键节点。该方法之所以能够成功判断脂质的分子组成，是由于SCIEX质谱系统上快速的极性切换，保证了正负离子模式下的所有MRM离子对均被扫描。

流程化的方法开发

由于该方法涉及的脂质数量较多，因此在获取生物数据集时，使用Scheduled MRM 方法获取高质量的定量结果是非常重要的。为了建立最终的分析方法，本研究开发了一个基于sMRM Pro Builder8的Excel表格，可以帮助用户更好的优化方法。

首先，用户利用基质样品（含有或没有内标均可）采集MRM数据，用于即将进行的生物学研究（3-5次重复）。通过传统MRM扫描得到的数据，再用SCIEX OS软件（图3）分析后，利用sMRM Pro Builder工具，可确定大致的保留时间。之后，利用初步建立的时间依赖式scheduled MRM扫描方法重复进样5-10次以判断方法的可行性，该方法中虽可选用基质样品，但最好选择本方法提供的生物样本的混合样品。此时，数据分析集中在峰宽、保留时间偏差及脂质信号强度方面，同时利用sMRM Pro Builder 进一步计算出优化后的Scheduled MRM数据采集方法（图4）。

方法建立后，用Analyst软件中的分时间段MRM算法并发工具（Scheduled MRM Algorithm Concurrency tool）⁹或者SCIEX OS软件中的sMRM 总结¹⁰检查方法的同步情况，最终确定方法中每个MRM的驻留时间。

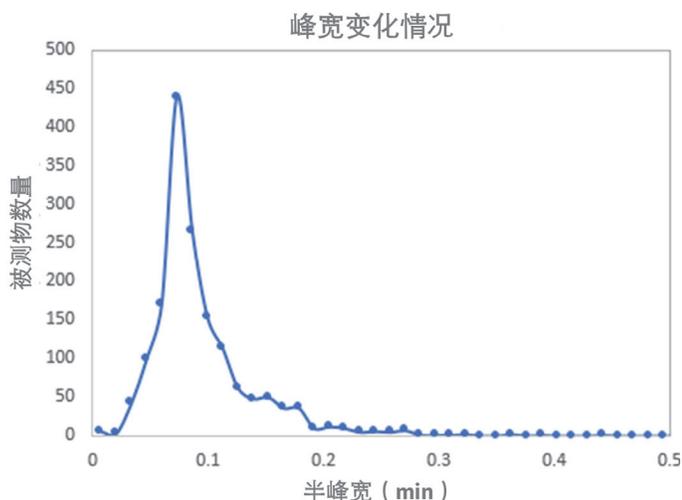


图4. 利用sMRM Pro Builder 模板 对Scheduled MRM 算法分析方法进行优化。为了获得高质量的数据，使用Scheduled MRM 算法中的高级功能进一步优化MS分析方法。通过软件对峰宽和保留时间偏差的计算，使得每个脂质分子都含有一个最优的MRM检测窗口。增加驻留时间，维持数据采集的循环时间，可以有效的改善Scheduled MRM分析方法。

色谱重现性

LC-MS/MS-MRM的重现性通过注射NIST血浆脂质提取物（10次重复）评价，其数据采集策略使用最后确定的MRM Pro方法。根据实验结果，大量脂质分子的保留时间标准偏差都在0.05分钟以下，展现了该方法优异的色谱重现性（图5）。

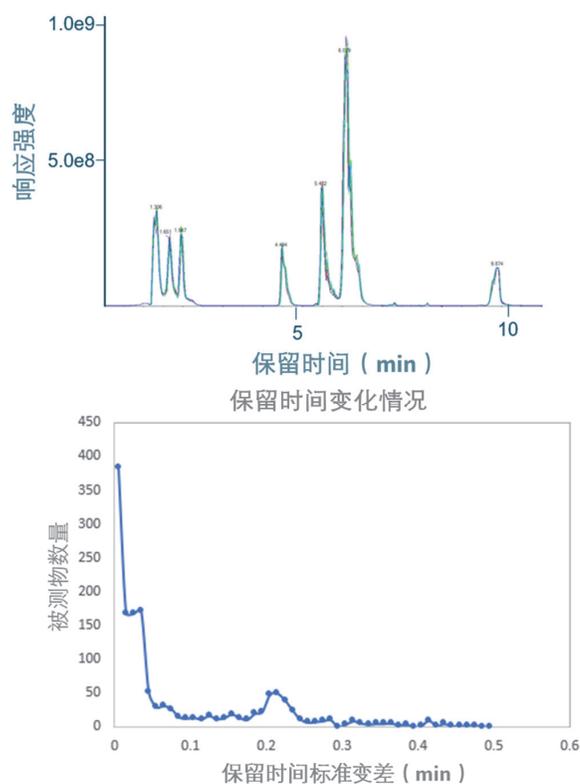


图5. 多血浆样品的色谱重现性。色谱分析重现性优异（上部），大部分脂质分子的保留时间偏差低于0.05 min（下部）。

定量重现性

采用已优化的Scheduled MRM 采集方法，用SCIEX Triple Quad™ 7500系统对血浆样品进行5次重复进样。多次重复进样后，定量的重现性通过计算每一类脂质峰面积的相对标准偏差（%CV）来评估。图6显示了每类脂质在其% CV水平上的累积分数。例如，通过计算血浆中各类脂质的峰面积，9种HCEr含量的总和在所有的脂质中居第五位（上部），并且其重现性最高（中部）。其他脂质（SM, PC, CER, DCER, HCEr, LPC）的重复性也很好，80%的脂质其相对标准偏差<20%，可用于定量。TAG作为大类脂质之一（可检测454种），血浆样本中可以检测到201种，也有良好的定量重现性（下部）。

用Scheduled MRM Pro 算法策略提高数据质量

利用Scheduled MRM Pro 算法中的高级功能，如驻留时间和窗口可变宽度，可以进一步优化Scheduled MRM方法，得到更好的实验结果。首先利用sMRM Pro Builder模板编辑初步的采集方法，然后采用LC-MS/MS-MRM采集的数据，通过多次重复，进一步优化参数。sMRM Pro Builder模板可以自动从最终方法种去除对低丰度峰（不确定检出）的检测，减少MRM繁忙程度，提高数据采集的质量。10次重复后，利用Pro算法通过比较可以获得优化后的实验结果。

内标法定量

根据总脂质质谱数据精确定量每种脂质是十分困难的。现在已经有一些方法可以定量样品中的脂质水平。从相对定量来说，每类脂质都需要一个单一脂质分子。虽然该方法对样本的提取效率和系统误差进行了校正，但是，它只能用于两个样本之间的比较分析，使用该方法进行定量后，可以发现样本中某种脂质的增加或减少。但是，该方法并不能准确定量每个脂质分子的浓度，这是因为同类脂质中不同脂质分子发生断裂的效率是不均一的，在负离子模式下，不同脂肪酸侧链的断裂程度主要取决于链长和双键的数目，这也就说明了所选择的代表脂质分子并不能替代所有的脂质，因而不能准确定量每个脂质分子。Avanti Polar Lipids 公司的SPLASH混合物是一个商业化的脂质混标，可以应用于该定量方法。

第二种定量策略是使用多种标记的内标进行精确定量（定量偏差<10%）。精确定量时，需要每种分析物对应的同位素内标，但是在实际实验中是十分困难的。因此，该方法中的精确定量主要是利用一些与所测分析物结构相似（不需完全一致）的物质作为内标。最近，Lipidyzer™ 平台推出了一种标记的混标，可以直接应用于多种脂质的精确定量，但不能覆盖该靶向检测方法中的全部脂类（SM/DAG/CE/CER/TAG/LPE/LPC/PC/PE/FFA）。

该方法中，内标既可以加入样品中，也可以加入建立的MRM方法中。

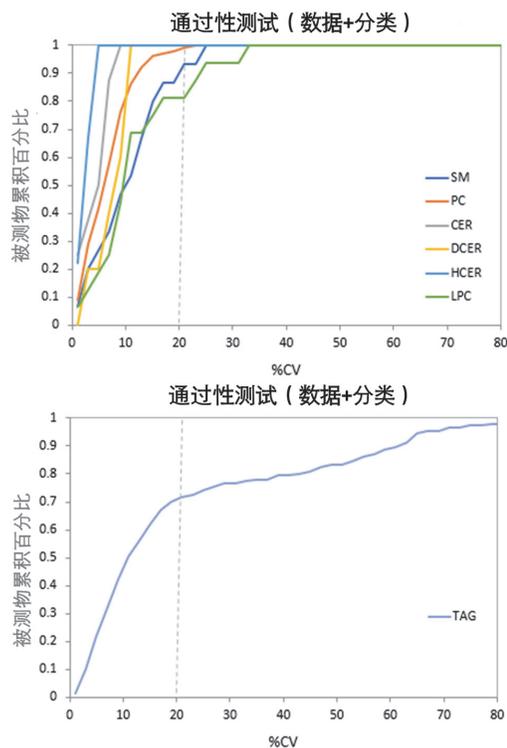
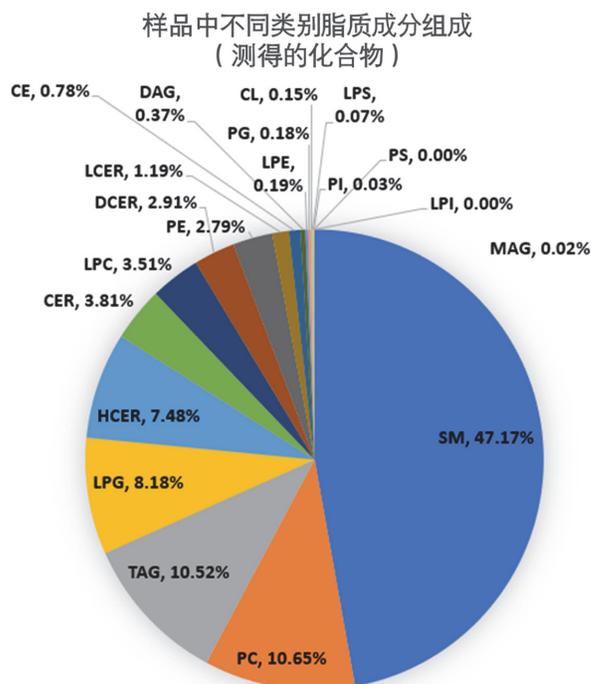


图6. Scheduled MRM Pro算法提高定量分析的重现性。利用每类脂质中所有分子的峰面积之和作为NIST血浆中脂质成分评估的标准（上部）。经过重复进样后，计算所展示脂质峰面积的相对标准偏差（%CV）（中部）。方法建立过程中，可以过滤保留能检出的脂质化合物通道。TAG作为一大类脂质，过滤掉未检出的TAG化合物后，数据重现性得到了明显的提高（下部）。

小结

本研究提出了一种靶向的脂质组学分析策略，该策略能够在脂质分子水平上对多种不同的脂质进行定量(~1900个分子种类)。该方法可以对不同脂类进行色谱分离，减少同分异构体的干扰，更加快速和特异的进行脂质筛选。靶向脂质列表十分全面，涵盖了大部分脂类。所选取的MRMs离子对覆盖12-26个碳、0-6个双键的脂肪酸、包括奇数侧链的脂类物质。该MRM列表是个性化定制的，可以添加新的脂类、亚类和多种脂质分子。利用血浆基质结合LC-MRM分析进行实验，方法灵活度高，得到的结果可靠稳定。开发的简单工具 (sMRM Pro Builder 模板) 可以将靶向MRM方法的优化过程流程化，从而在进行大量Scheduled MRM离子对扫描时得到高质量的结果。

参考文献

- Han X, Yang K, Gross RW. Multi-Dimensional Mass Spectrometry-Based Shotgun Lipidomics And Novel Strategies For Lipidomic Analyses. *Mass Spectrometry Reviews*. 2012; 31(1): 134-178.
- Bielow C, Mastrobuoni G, Orioli M, Kempa S. On Mass Ambiguities in High-Resolution Shotgun Lipidomics. *Anal Chem*. 2017; 89: 2986-2994.
- Ovčačíková M, Lída M, Cífková E, Holčapek M. Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr A*. 2016; 10(1450), 76-85.
- Koelmel JP, Kroeger NM, Gill EL, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Yost RA, Garrett TJ. Expanding Lipidome Coverage Using LC-MS/MS Data-Dependent Acquisition with Automated Exclusion List Generation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017. 28(5), 908-917.
- Hines KM, Herron J, Xu L., Assessment of Altered Lipid Homeostasis by HILIC-Ion Mobility-Mass Spectrometry-Based Lipidomics. *J Lipid Res*. 2017. 58(4), 809-819.
- Novel Chemical Standards Kits Enable Facile Lipid Quantitation. SCIEX Technical note RUO-MKT-02-3879-A.
- Download method information.
- Download the sMRM Pro Builder Template.
- Download sMRM Concurrency Calculator for use with Analyst Software.
- Using Scheduled MRM™ Algorithm in SCIEX OS Software. SCIEX community post RUO-MKT-18-11941-A.

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-8482-ZH-B



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: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)