

非靶向高分辨率脂质组学数据的靶向 数据挖掘和标注

全面、高可信度的工作流程



作者

Sheher Banu Mohsin,
Layla Cosovic, Mark Sartain,
Tracy Blethen,
Pietro Morlacchi 和
Daniel Cuthbertson
安捷伦科技有限公司

摘要

在非靶向脂质组学方法中，对脂质进行全面且明确的表征仍然是一项具有挑战性的任务。为了应对这一挑战，我们创建了一个适用于 LC/Q-TOF 和离子淌度 LC/Q-TOF 的高度优化的脂质组学数据库，以及易于在许多实验室环境中实施的标准化方法。为了实现这一目标，我们使用了一种经过高度优化的全面、可靠的 LC/TQ 方法，覆盖了所有主要脂质类别中的共 763 种脂质^[1]。这组脂质是创建个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 的起点，其中包括保留时间 (RT)、MS/MS 谱图和碰撞截面。这些作为正交测量参数，可确保更高可信度的脂质鉴定。在本应用简报中，我们展示了在非靶向脂质组学工作流程中使用这一高度优化的 PCDL^[2]，旨在帮助用户从脂质组学数据中获得关键的生物学见解。

前言

基于质谱的脂质组学分析依赖于在一次分析运行中分离并随后鉴定多种结构不同的脂质。通过色谱技术高效分离脂质对于准确、明确的鉴定至关重要，尤其对于复杂的生物提取物而言。鉴于每种脂质类别中存在大量同分异构体和同量异位化合物，再加上它们的色谱行为相似，脂质分离和标注面临着显著的挑战。

用于分离脂质同分异构体和同量异位化合物的液相色谱技术在过去几年中取得了重大进展。反相方法、正相方法以及 SFC 方法均有所涉及。然而，尽管取得了这些重大进展，通过质谱法鉴定脂质仍然具有挑战性。对脂质进行全面、明确的表征（通过 LC/MS）通常需要鉴定其类别、元素组成、R 基团位置、双键的数量、位置和几何构型以及其他参数。大部分结构信息可以通过高分辨质谱 (HRMS) 串联 MS/MS 实验获得，即根据碎片谱库分析质谱数据以进行化合物鉴定。虽然有来自真实标准品的小型 MS/MS 质谱库可供使用，但许多脂质 MS/MS 质谱都是使用计算机谱库进行标注的。这可能有助于提供一些关于脂质类别和 R 基团链长的信息，但通常无法提供其他重要的分子信息，从而使完整的脂质标注成为一个不切实际的目标。

为了增加脂质鉴定的可信度并克服其标注中的不确定性，在质谱分析中通常会使用真实的标准品。这些标准品用于根据其 RT、精确质量和碎裂模式（如果可用）来匹配质量特征。不幸的是，这种方法可能存在局限性，因为无法获得数千种脂质的纯标准品。为了应对这些挑战，需要其他高可信度脂质标注策略。

对血浆中的脂质实现了高可信度分析。该方案首先采用经过高度优化的全面、可靠的 LC/TQ 方法（涵盖 763 种脂质）^[1]。该方法覆盖了血浆中的所有主要脂质类别，从小的溶血脂质到较大的非极性三酰甘油。该方法经过了高度优化，旨在促进对大量脂质异构体的标注，这也需要合成具有特定异构体特征的脂质标准品^[3]。

将该方法转移到 LC/Q-TOF 和离子淌度 LC/Q-TOF，这需要将每个母离子/碎片对的单位质量分辨率质量转换为相应的精确质量。在使用 LC/Q-TOF 系统进行的靶向和非靶向实验中，这些精确质量及其相应的 RTs 均被用作母离子。这些实验中使用的 HPLC 分离方法与原始 LC/TQ 方法相同。然后导出 LC/Q-TOF 生成的 MS/MS 谱图以创建 PCDL，该 PCDL 可用于根据精确质量、RT 和 MS/MS 谱图来鉴定可能的脂质分子。

RT 是高可信度脂质标注最重要的参数之一。使用来自四个不同地点的实验室间研究的 RTs 相对标准偏差 (RSDs) 来确定 RT 的日间和实验室间差异^[4]。结果表明，超过 600 种脂质的 RT 的 RSDs < 0.2%。为了进一步增加脂质标注的可信度，我们生成了一组离子淌度 LC/Q-TOF 碰撞截面 (CCS) 值。通过纳入 CCS 值，现在可以通过精确质量、RT、MS/MS 谱图匹配和 CCS 筛选来进行鉴定搜索，从而提高标注的可信度。

安捷伦出版物 5994-7627EN 详细介绍了生成高可信度 PCDL 的过程以及为确保实现高度优化而采取的步骤^[2]。

本文讨论了使用高可信度 PCDL 标注脂质的工作流程的实施，涵盖了从脂质萃取和数据采集到最后一步使用高可信度数据库进行脂质标注。

工作流程实施

本工作流程介绍了一种方法，使用 10 μL 血浆样品或者等量细胞或组织匀浆分析来自 44 种脂质类别的 677 种不同脂质。采用反相液相色谱分离脂质，然后用高分辨质谱仪进行分析。使用单色谱柱方法时，每个样品的总分析时间为 16 分钟，而使用双柱系统时运行时间则为 13 分钟。使用 Agilent MassHunter Workstation 软件进行数据处理。

实验部分

样品前处理

安捷伦之前的出版物中介绍了样品前处理（包括分离）程序^[1]。简而言之，使用聚丙烯外置活塞式移液器在 1.5 mL 微量离心管中进行脂质提取。将 10 µL 血浆与 100 µL 萃取溶剂混合，萃取溶剂由含有 10 mM 甲酸铵的丁醇:甲醇 (1:1) 和内标混合物组成。然后将每个样品涡旋混合 5 秒，并超声水浴处理 1 小时，温度保持在 21–25 °C。然后对样品进行离心 (13000 rpm, 10 分钟, 20 °C)，并将上清液转移至带有 200 µL 玻璃内插管（部件号 5183-2085）的 1.5 mL 玻璃样品瓶（部件号 5190-9062）中。使用 PTFE/硅橡胶盖（部件号 5185-5820）盖好样品并储存于 -80 °C 下以待分析。

LC 仪器

安捷伦最近推出了一种标准的多组学液相色谱配置，有助于在任何质谱仪型号上轻松实施代谢物、脂质和蛋白质分析方法。在分析中采用了这种液相色谱配置，并进一步展示了通过液相色谱标准化可以实现的 RT 比对。

液相色谱由 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- 配备恒温箱的 Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)

靶向脂质分析的液相色谱配置使用了 LC/TQ。对于非靶向分析实验，使用 Agilent Revident LC/Q-TOF 和 Agilent 6560 离子淌度 LC/Q-TOF 进行质谱和离子淌度测量。常用色谱条件见表 1。

表 1. 使用 Agilent Revident LC/Q-TOF 和 Agilent 6560 离子淌度 LC/Q-TOF 进行脂质组学分析的色谱条件

| 参数 | 值 |
|---------|---|
| 分析柱 | Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 959758-902) |
| 在线过滤器 | Agilent 1290 Infinity II 在线过滤器, 0.3 µm, 2 mm 内径, 1300 bar (部件号 5067-6189) |
| 柱温 | 45 °C |
| 进样量 | 1 µL (相当于 0.1 µL 血浆) |
| 自动进样器温度 | 20 °C |
| 进样针清洗 | 清洗瓶, 3 s, 1:1 丁醇:甲醇 或者, 用 1:1 流动相 A:B 冲洗端口 10 秒 |
| 流动相 | A) 含 10 mM 甲酸铵, 5 µM Agilent InfinityLab 去活剂添加剂 (部件号 5191-3940) 的 5:3:2 水:乙腈:异丙醇溶液 B) 含 10 mM 甲酸铵的 1:9:90 水:乙腈:异丙醇溶液 (注：请勿向流动相 B 中添加 InfinityLab 去活剂添加剂) |
| 流速 | 0.4 mL/min |
| 梯度程序 | 时间 %B 0 15 2.5 50 2.6 57 9 70 9.1 93 11 96 11.1 100 12 100 12.2 15 16 15 |
| 停止时间 | 16 min |
| 后运行时间 | 无 |

Agilent Revident LC/Q-TOF 采集方法

使用配备安捷伦喷射流 ESI 离子源的 Revident LC/Q-TOF 平台采集 MS/MS 数据。在正离子和负离子两种模式下采集数据。用于色谱分析的详细实验方法和自动 MS/MS 质谱参数如表 2 所示。

表 2. Agilent Revident LC/Q-TOF 自动 MS/MS 参数

| 参数 | 值 |
|---------------------------|--|
| 气体温度 | 300 °C |
| 气体流速 | 10 L/min |
| 雾化器压力 | 25 psig |
| 鞘气温度 | 300 °C |
| 鞘气流速 | 12 L/min |
| 毛细管电压 | 3500 V (+), 3000 V (-) |
| 喷嘴电压 | 0 V |
| 碎裂电压 | 150 V |
| 锥孔电压 | 45 V |
| 八极杆 RF Vpp | 750 V |
| 参比质量 | m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-) |
| MS 和 MS/MS 范围 | m/z 50–3000 (+) |
| MS 和 MS/MS 最小采集速率 | 3 幅谱图/秒 |
| 分离峰宽 | 窄 (约 1.3 m/z) |
| 碰撞能量 | 25 eV |
| 每个循环的最大母离子数 | 3 |
| 基于母离子丰度的扫描速率与基于母离子丰度的采集速率 | 是, 目标物为 25000 响应值/质谱图 |
| 使用 MS/MS 累积时间限 | 是 |
| 剔除未达到目标 TIC 的母离子 | 否 |
| MS/MS 阈值 | 5000 响应值和 0.001% |
| 启用主动排除 | 是, 重复一次, 然后排除 0.05 min |
| 纯度 | 严格性 70%, 截留率 0% |
| 同位素模型 | 常见有机分子 |
| 母离子排序 | 1, 2, 未知 |
| 静态排除范围 | m/z 40–151 (+) m/z 40–210 (-) |

Agilent 6560 离子淌度 LC/Q-TOF 采集方法

使用配备安捷伦喷射流 ESI 离子源的 Agilent 6560 离子淌度 LC/Q-TOF 平台测定脂质的 CCS 值。在正负离子模式下采集离子淌度 (IM) 质谱数据, m/z 为 50 至 3000, 循环时间为 1 s/质谱图, IM 捕集阱填充时间为 3800 μ s, 捕集阱释放时间为 250 μ s。采用四位脉冲序列长度进行多重分析。采用非数据依赖型采集全离子方法以及每帧交替使用 0 V 和 25 V 碰撞能量, 通过碰撞诱导解离对脂质进行碎裂。IM LC/Q-TOF 的采集参数如表 3 所示。

表 3. Agilent 6560 离子淌度 LC/Q-TOF 非数据依赖型采集参数

| 参数 | 值 |
|---------------|--|
| 气体温度 | 300 °C |
| 气体流速 | 10 L/min |
| 雾化器压力 | 25 psig |
| 鞘气温度 | 350 °C |
| 鞘气流速 | 11 L/min |
| 毛细管电压 | 3500 V (+), 3000 V (-) |
| 喷嘴电压 | 1000 V |
| 碎裂电压 | 400 V |
| 八极杆 RF Vpp | 750 V |
| 参比质量 | m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-) |
| MS 和 MS/MS 范围 | m/z 50–3000 (+) |
| 帧率 | 0.9 帧/s |
| IM 瞬态速率 | 17 个 IM 瞬态/帧 |
| 碰撞能量 | 25 eV |
| 最大漂移时间 | 60 ms |
| 漂移管入口电压 | 1750 V |

数据分析软件

使用 Agilent ChemVista 软件来管理和编辑脂质谱库 (PCDLs)。使用数据分析方法 Lipids.m 来进行批量目标特征提取, 正离子勾选 (+H) 和 (+NH₄), 负离子勾选 (-H) 和 (+CH₃COO)⁻。

利用 Agilent MassHunter Mass Profiler Professional (MPP) 15.1 版软件进行差异分析。使用“脂质组学”实验类型创建了两个实验（正离子或负离子）。采用百分位移位归一化算法 (75%)，将数据集基线校正到所有样品的中值。Agilent MassHunter Mass Profiler (MP) 软件和 MPP 提供了用于查看和解析复杂脂质组学结果的统计分析软件工具。MP 和 MPP 可对各个样品的特征进行 RT 和 m/z 比对、进行响应归一化以及统计分析，以确定不同样品之间的显著差异。MPP 增加了用于标注脂质分析的实验类型，允许基于脂质类别的归一化并提供可视化工具。

MPP 中利用 Agilent MassHunter ID 浏览器 10.0 版在非靶向工作流程中进行标注，标准要求为质量数在 ± 5 ppm 范围内，RTs 在 ± 0.10 分钟范围内。

IM LC/Q-TOF 和 LC/Q-TOF 数据文件的数据分析

使用 MP 软件处理文件。请注意，对于多重分析的数据文件，在使用 MP 之前首先对文件进行拆分。简而言之，以批处理模式将来自 IM LC/Q-TOF 的已拆分的数据文件或来自 LC/Q-TOF 的 .d 文件导入 MP 或 MPP。特征提取之后，使用高可信度 PCDL 对实体进行标注。标注基于精确质量、RT 和 MS/MS 谱图匹配。对于 IM LC/Q-TOF 数据文件，也会匹配 CCS 值，以便为脂质标注提供更高的可信度。图 1 为数据采集和数据分析工作流程的一般示意图。图 2 为数据分析的步骤和工作流程。

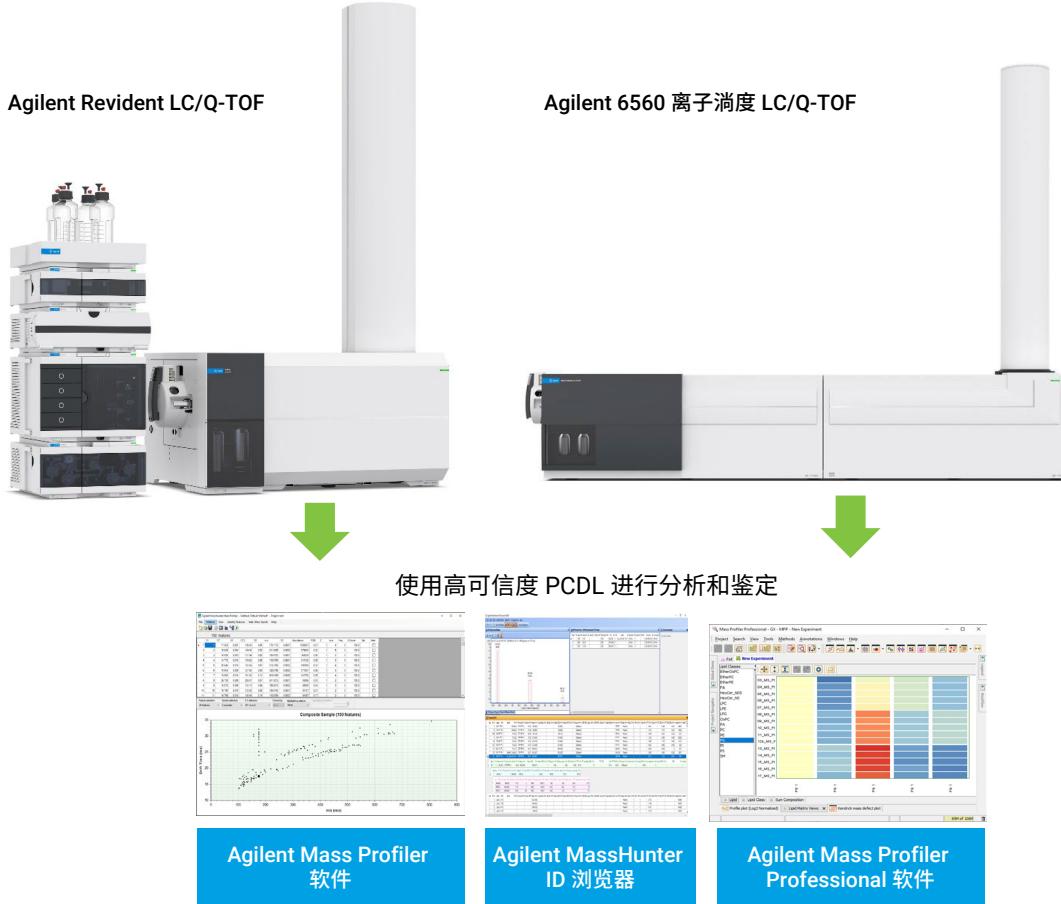
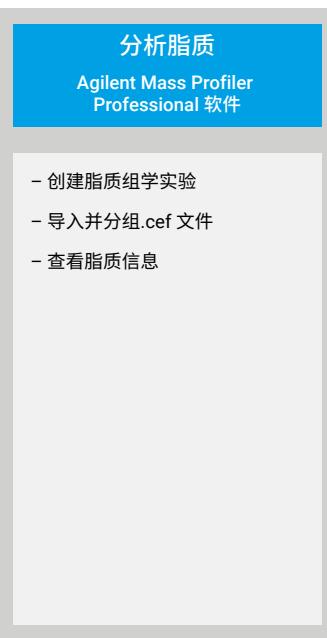


图 1. 数据采集和数据处理工作流程

第 1 步. 使用 Agilent Mass Profiler 软件
处理数据文件。



第 2 步. 使用 Agilent Mass Profiler Professional 软件和第 1 步中导出的 .cef 文件进行统计分析。



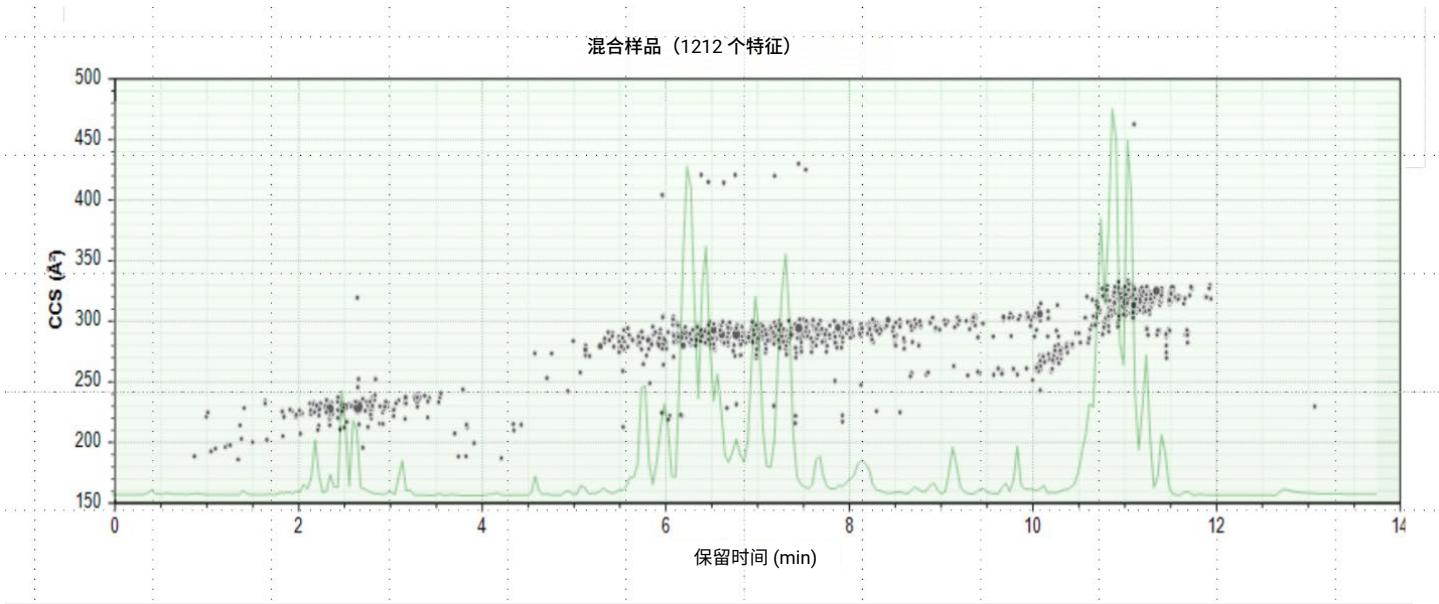
结果与讨论

图 3 显示了图 2 中数据处理步骤第 1 步的结果，其中包括特征发现和标注。可以更详细地查看图 3 表格中的每一行，以显示提取离子色谱图和所选特征的质谱。

脂质矩阵是 MPP 中可用于查看脂质数据的几种可视化工具之一。矩阵图显示了样品中 PC 类脂质中每种脂质的丰度水平。蓝色表示丰度较低。红色表示丰度较高，蓝色和红色之间的颜色表示丰度逐渐增加（从黄色到橙色再到红色）。图 4 和图 5 为用于查看脂质数据的几个图表之一。图 5 显示了质量与 RT 的关系，颜色根据脂质类别而定。

Kendrick 质量亏损图是可视化同系物的出色工具，如图 6 所示^[5]。杂原子数、环数和双键数相同，但 CH₂ 基团数不同的化合物将具有相同的 Kendrick 质量亏损。这些化合物在图上排列成一条水平线。任何潜在的数据库不匹配或标注缺失都可以轻松识别。

图 2. 数据分析工作流程示意图



| 6121 个特征 | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----|--------------------|------------------|--------|-------------|----------|--------|-------|--------|-------|--------|------|----------|--------|---------|
| ID | 名称 | 分子式 | 保留时间 (数据库) | 离子形态 | 质量 (数据库) | 保留时间 | SD | DT | SD | CCS | SD | m/z | SD | 丰度 | |
| 1 | 1 | SM (d18:1/16:0) | C39 H79 N2 O... | 5.856 | (M+H)+ | 702.5676 | 5.955 | 0.008 | 33.818 | 0.059 | 282.42 | 0.49 | 703.5746 | 0.0009 | 3348672 |
| 2 | 2 | LPC (16:0) [sn1] | C24 H50 N O7 P | 2.591 | (M+H)+ | 495.3325 | 2.645 | 0.007 | 27.273 | 0.042 | 229.55 | 0.35 | 496.3407 | 0.0015 | 2749995 |
| 3 | 3 | PC (18:1_18:1) | C44 H84 N O8 P | 7.239 | (M+H)+ | 785.5935 | 7.523 | 0.011 | 34.848 | 0.039 | 290.43 | 0.32 | 786.5994 | 0.0011 | 2521345 |
| 4 | 4 | PC (16:0_18:1) | C42 H82 N O8 P | 7.055 | (M+H)+ | 759.5778 | 7.184 | 0.011 | 34.331 | 0.035 | 286.29 | 0.29 | 760.5849 | 0.0011 | 2278330 |
| 5 | 5 | LPC (18:0) [sn2] | C26 H54 N O7 P | 3.111 | (M+H)+ | 523.3638 | 3.290 | 0.009 | 28.224 | 0.029 | 237.22 | 0.25 | 524.3704 | 0.0008 | 2185121 |
| 6 | 6 | TG (52:2) [SIM] | C55 H102 O6 | 11.314 | (M+NH4)+ | 858.7676 | 11.313 | 0.003 | 38.602 | 0.058 | 321.16 | 0.48 | 876.7991 | 0.0029 | 2108318 |
| 7 | 7 | PC (18:1_18:2) | C44 H82 N O8 P | 6.494 | (M+H)+ | 783.5778 | 6.766 | 0.010 | 34.705 | 0.045 | 289.25 | 0.37 | 784.5845 | 0.0008 | 2080693 |
| 8 | 8 | PC (16:0_18:2) | C42 H80 N O8 P | 6.355 | (M+H)+ | 757.5622 | 6.460 | 0.009 | 34.044 | 0.175 | 283.91 | 1.46 | 758.5683 | 0.0016 | 2009853 |
| 9 | 9 | LPC (18:2) [sn2] | C26 H50 N O7 P | 2.174 | (M+H)+ | 519.3325 | 2.340 | 0.008 | 27.095 | 0.076 | 227.77 | 0.64 | 520.3397 | 0.0009 | 1995130 |
| 10 | 10 | TG (52:3) [SIM] | C55 H100 O6 | 11.16 | (M+NH4)+ | 856.7520 | 11.156 | 0.006 | 38.486 | 0.075 | 320.21 | 0.62 | 874.7841 | 0.0007 | 1977839 |
| 11 | 11 | PC (15:0_18:1) ... | C41 H73 D7 N ... | 6.517 | (M+H)+ | 752.6061 | 6.634 | 0.010 | 34.102 | 0.191 | 284.43 | 1.59 | 753.6113 | 0.0012 | 1967886 |
| 12 | 12 | | C32 H52 N2 O4 | | (M+H)+ | 528.3927 | 2.774 | 0.007 | 27.776 | 0.091 | 233.40 | 0.77 | 529.3991 | 0.0005 | 1943741 |
| 13 | 13 | PC (38:6) (a) | C46 H80 N O8 P | 5.767 | (M+H)+ | 805.5622 | 6.206 | 0.008 | 34.749 | 0.043 | 289.49 | 0.36 | 806.5679 | 0.0019 | 1915518 |
| 14 | 14 | PC (16:0_18:2) | C42 H80 N O8 P | 6.355 | (M+H)+ | 757.5622 | 6.460 | 0.009 | 34.319 | 0.130 | 286.20 | 1.09 | 758.5696 | 0.0013 | 1796827 |

图 3. 使用高可信度 PCDL 对 NIST 血浆提取物进行标注的结果

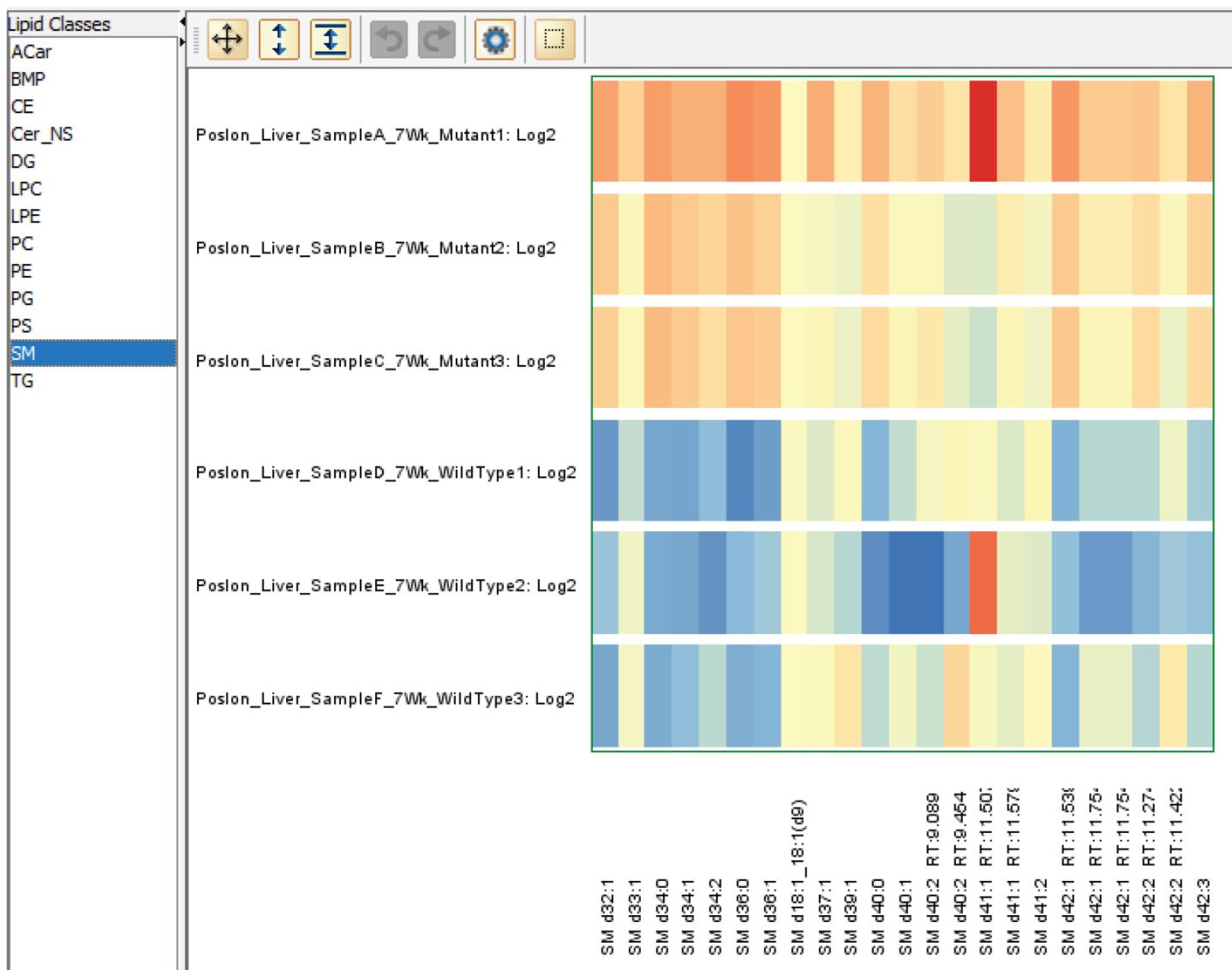


图 4. 使用图 2 步骤 2 中的 Agilent Mass Profiler Professional 软件生成的脂质矩阵。图中显示了 PC 的结果

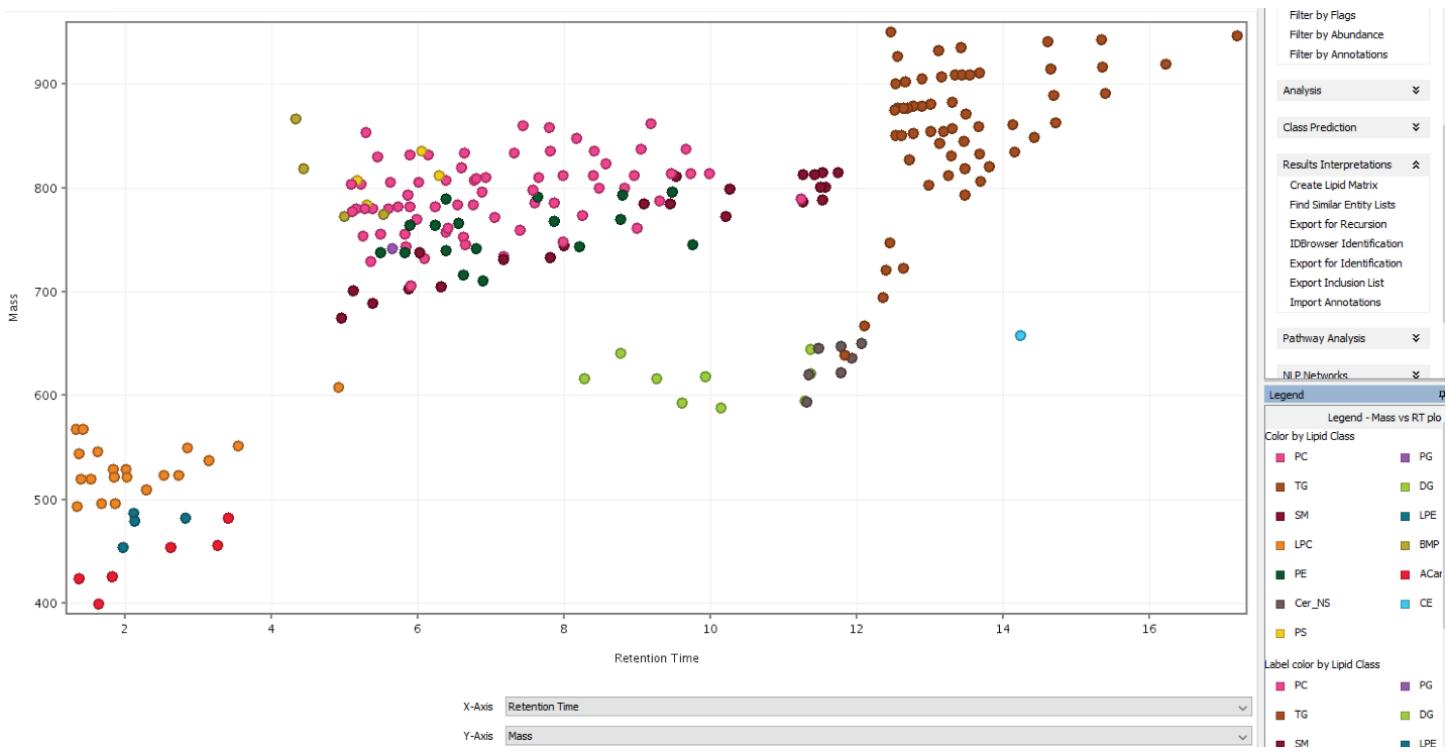


图 5. 不同类别脂质的质量与 RT 的关系图

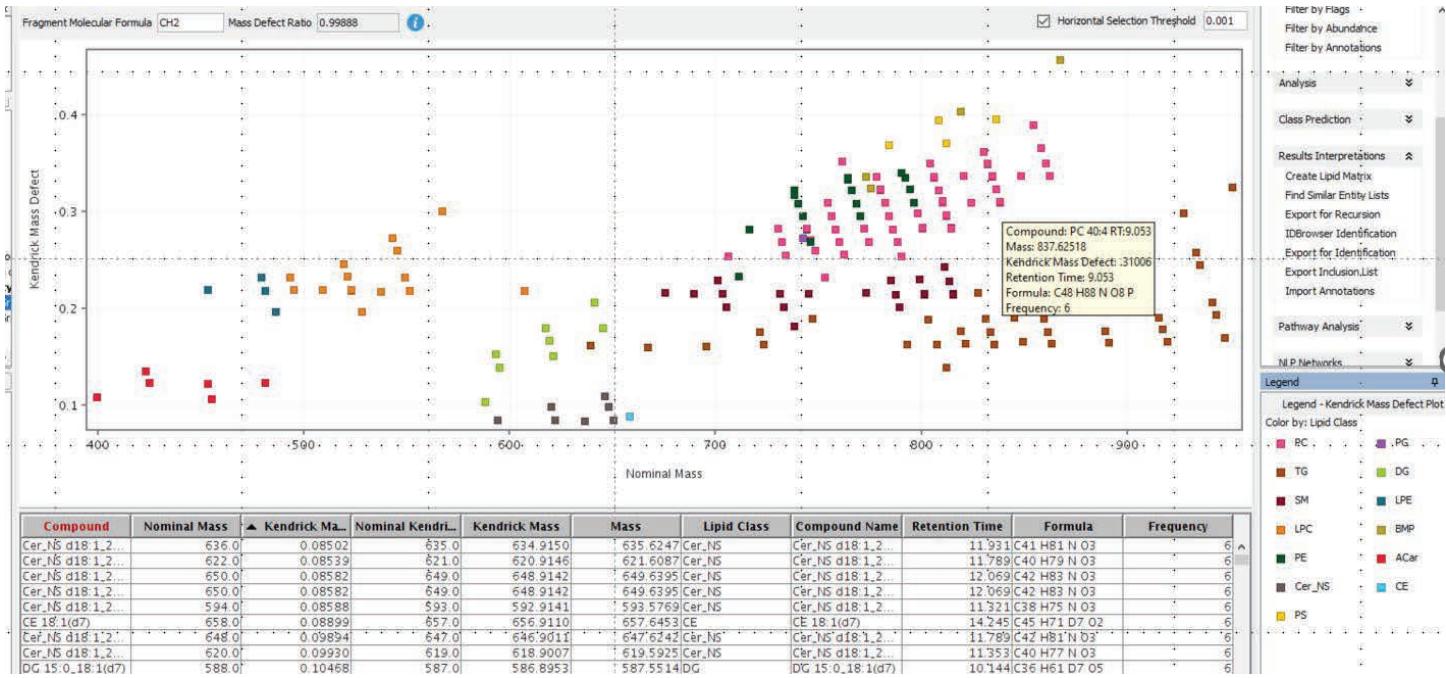


图 6. Kendrick 质量亏损图, 显示了 CH₂ 基团数不同的脂质

结论

- 本文介绍了通过非靶向 LC/Q-TOF 和 IM LC/Q-TOF 数据生成高质量、高可信度脂质标注的工作流程
- 创建了涵盖所有主要脂质类别的 PCDL
- LC/Q-TOF 和 IM LC/Q-TOF 工作流程使用具有精确质量、RT、MS/MS 和碰撞截面目的高可信度脂质 PCDL
- 该工作流程涵盖样品前处理、数据采集和数据分析，可为非靶向 LC/Q-TOF 和 IM LC/Q-TOF 数据提供高可信度脂质标注

参考文献

1. Huynh, K.; Sartain, M. 等. 用于血浆脂质组详细分析的综合、优化、高通量方法, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-3747ZHCN, 2021
2. Mohsin, S.; et al. Creation of a High-Confidence Lipidomics Personal Compound Database Library – for Targeted Data Mining and Annotation of Untargeted High-Resolution Lipidomics Data (创建高可信度脂质个人化合物数据库—用于非靶向高分辨率脂质组学数据的靶向数据挖掘和标注), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-7627EN, 2024
3. Huynh, K.; Barlow, C. K.; Jayawardana, K.S; Weir, J. M.; Mellett, N. A.; Cinel, M.; Magliano, D. J.; Shaw, J. E.; Drew, B. G.; Meikle, P. J. High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chem. Biol.* **2019**, 26(1), 71–84. DOI: [10.1016/j.chembiol.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.008)
4. Sartain, M.; et al. An Interlaboratory Evaluation of a Targeted Lipidomics Method in Plasma (血浆靶向脂质组学方法的实验室间评估), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-6830EN, 2024
5. Korf, A.; Vosse, C.; Schmid, R.; Helmer, P. O.; Jeck, V.; Hayen, H. Three-Dimensional Kendrick Mass Plots as a Tool for Graphical Lipid Identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2018**, 32(12), 981-991. DOI: [10.1002/rcm.8117](https://doi.org/10.1002/rcm.8117)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA45484.6137962963

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2024

2024 年 8 月 12 日, 中国出版

5994-7588ZHCN