

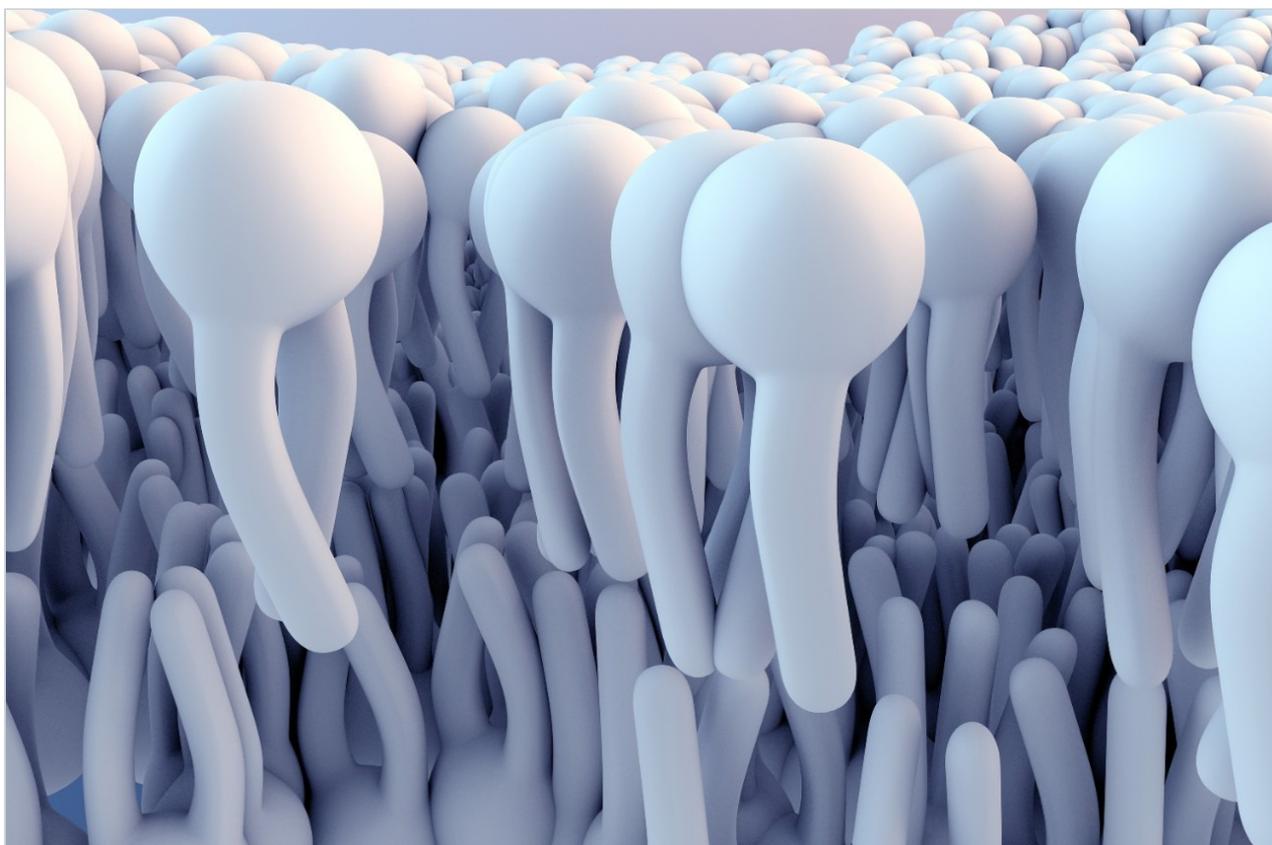
应用纪要

## 利用搭载SmartMS技术的ACQUITY RDa检测器和UNIFI应用程序进行脂质分析

---

Robert S. Plumb

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

---

摘要

ACQUITY RDa检测器与ACQUITY UPLC I-Class PLUS、waters\_connect软件平台和UNIFI应用程序结合使用有利于在大规模群体研究中检测和确认脂质。ACQUITY RDa检测器的质量精度、稳定性和重现性与UNIFI智能数据库筛查流程相结合，简化了常规操作且结果清晰显示，使各种水平的用户都能操作，有利于快速制定决策并确认脂质。

## 插图声明

证明ACQUITY RDa检测器能够对生物体液中的目标脂质进行稳健且可重现的分析。

---

## 简介

近年来，随着高通量基因测序和代谢组学等技术的出现，大规模群体研究（例如流行病学、生物样本库、转化医学等）中的“组学”分析不断增加<sup>1,2</sup>。这些样品组的规模可能在数百至数千的范围内，因此需要高通量、可重现的数据以帮助理解以下不同的领域：疾病进展、民众健康、年龄、性别、环境和饮食影响<sup>3</sup>。脂质组学近来在了解癌症和糖尿病等疾病方面表现出巨大潜力，在这些大型研究中被用作一线组学研究工具<sup>4,5</sup>。

检测、鉴定和分类感兴趣生物学脂质的过程通常极为耗时且具有挑战性，需要借助液相色谱分离、HRMS-MS/MS数据和统计分析来全面表征样品，尤其是在复杂异构体的分析中。对疾病的潜在生物标志物提出假设，并确定特定目标脂质或类别所需的重点分析后，即可进行更改以检验生物医学假设的正确性。在大规模群体研究中，对血液和组织样品进行脂质组学分析需要采用稳定、快速且简单的LC-MS平台来检测和确认样品中的这些研究脂质。

ACQUITY RDa检测器是一种高分辨率飞行时间(ToF)质量分析器，其实现了质量精度与稳定性、重现性和操作简便性的有机结合。搭配ACQUITY UPLC系统使用时，ACQUITY RDa检测器可简化脂质组学样品的分析。本文重点介绍了该系统与UNIFI应用程序联用分析大型生物学数据集中脂质的能力。

---

## 实验

### 样品前处理

进样前，用IPA将Avanti Lipidomics SPLASH混合物稀释50倍，涡旋混合。LC-MS分析采用市售Avanti Lipids SPLASH混合物和NIST血浆。使用冰冷的IPA通过简单的蛋白沉淀法制备血浆（用600  $\mu$ L IPA和200  $\mu$ L 稀释后的SPLASH混合物稀释20  $\mu$ L血浆），涡旋混合，在2–8  $^{\circ}$ C下放置2 h，然后离心以去除颗粒。未进行额外的净化步骤。

## 方法条件

LC-MS分析采用与ACQUITY RDa检测器连接的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统，数据分析由搭载UNIFI应用程序的waters\_connect软件平台进行。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH C <sub>18</sub> 1.7 μm (2.1 × 100 mm)
柱温:	55 °C
样品温度:	8 °C
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	60:40乙腈:水, 含0.1%甲酸和10 mM甲酸铵
流动相B:	90:10异丙醇:乙腈, 含0.1%甲酸
进样体积:	1 μL

12 min方法和20 min方法的梯度曲线

时间 (min)	缓冲液A (%)	缓冲液B (%)
初始	50	50
0.5	47	53
4.0	45	55
7.0	35	65
7.5	20	80
10.0–11.0	1	99
11.1–12.0	50	50

时间 (min)	缓冲液A (%)	缓冲液B (%)
初始	60	40
2.0	57	43
2.1	50	50
12.0	46	54
12.1	30	70
18.0	1	99
18.1–20	60	40

## 质谱条件

质谱系统： ACQUITY RDa检测器

电离模式： ESI+和ESI-

采集范围： 100-800 m/z

毛细管电压： 3 kV

ACQUITY RDa检测器采用缺省设置，碎裂能量设为自定义值150–170 V。

## 数据管理

质谱软件： waters\_connect

信息学软件： waters\_connect

## 结果与讨论

分析血液制品（例如血清和血浆）中的脂质时，常用的色谱方法是反相液相色谱或HILIC。在反相液相色谱中，极性较强的脂质最先洗脱，极性最弱的脂质最后洗脱；而在HILIC分析中，脂质按不同类别从色谱柱洗脱，极性最弱的脂质最先洗脱。反相液相色谱具有更高的色谱分离度，因此是生物体液中脂质分析的理想平台。本研究采用两种不同的反相方法，分离时间分别为12 min和20 min，第一种方法速度较快，用于筛选；第二种方法分离度更高，用于表征。图1所示数据为使用12 min方法进样NIST市售血浆观察到的谱图，上面的LC-MS色谱图显示了正离子模式采集结果，下面的BPI色谱图显示了负离子模式采集结果。LPC、LPE和FFA脂质在0.75 min~1.7 min之间洗脱，其中FFA在负离子模式下表现出更强的响应；PI、PE、PG、PS、PC和Cer脂质在2.5 min~5.5 min之间洗脱，且都在正离子模式下观察到更强的响应；SM和DG在6.5 min~8 min之间洗脱，其中DG同样在正离子模式下表现出更强的响应；最后洗脱的是亲脂性最强的TAG和CE，它们在8.5 min~9.5 min之间洗脱，并且仅在正离子模式下检出。

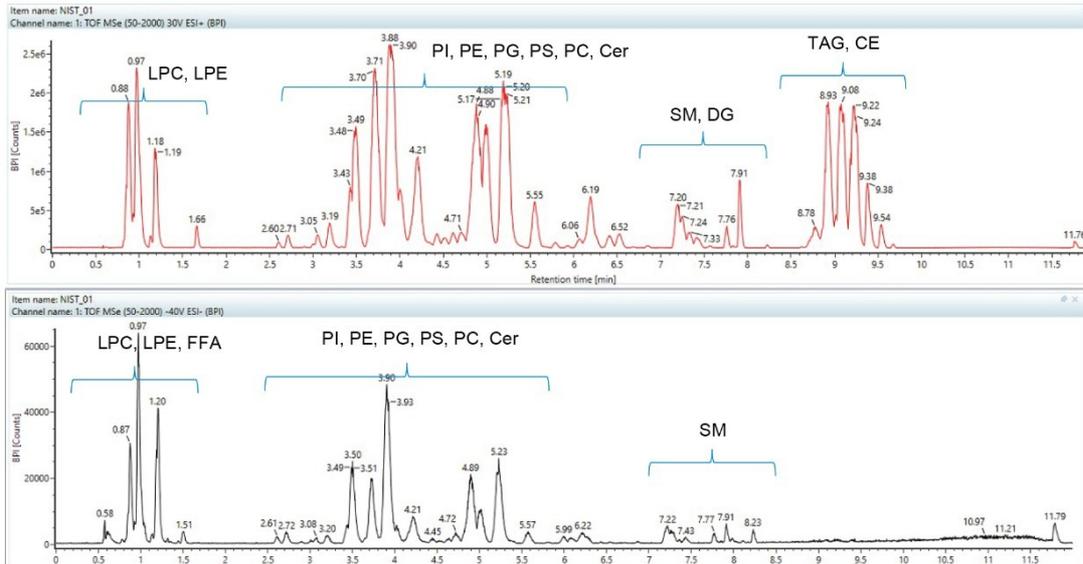


图1.将NIST血浆样品进样至ACQUITY RDa质谱检测器得到的代表性BPI色谱图：正电离模式（上图/红色）；负电离模式（下图/黑色）

## 稳定性和重现性

通过400次重复进样分析添加有SPLASH脂质混合物的NIST血浆提取物，测定ACQUITY RDa检测器结合UPLC-MS系统的重现性，该测试采用20 min方法，连续分析时间共6天。图2的数据显示该系统分析三种代表性内源性脂质及其各自内标的重现性，其中一种脂质在梯度开始时洗脱（LPC 16:0，tR为1.1 min），一种脂质在中间洗脱（PC 34:1，tR为5.8 min），一种脂质在梯度结束时洗脱（TAG 52:4，tR为15.4 min）。这三种脂质及其内标（LPC、LPC IStd d7 LPC、PC、IStd d7 PC、TAG和IStd d7 TAG）的保留时间重现性RSD分别为0.77%、0.81%、0.52%、0.56%、0.07%和0.09%。在400次进样的整个分析过程中，LPC的保留时间有0.1 min变化，PC的保留时间有0.15 min变化，TAG的保留时间变化小于0.1 min。400次进样分析得到的MS信号响应显示，LPC、IStd d7 LPC、PC、IStd d7 PC、TAG和IStd d7 TAG的信号方差(RSD)分别为3.2%、4.1%、4.1%、4.7%、5.5%和9.8%。

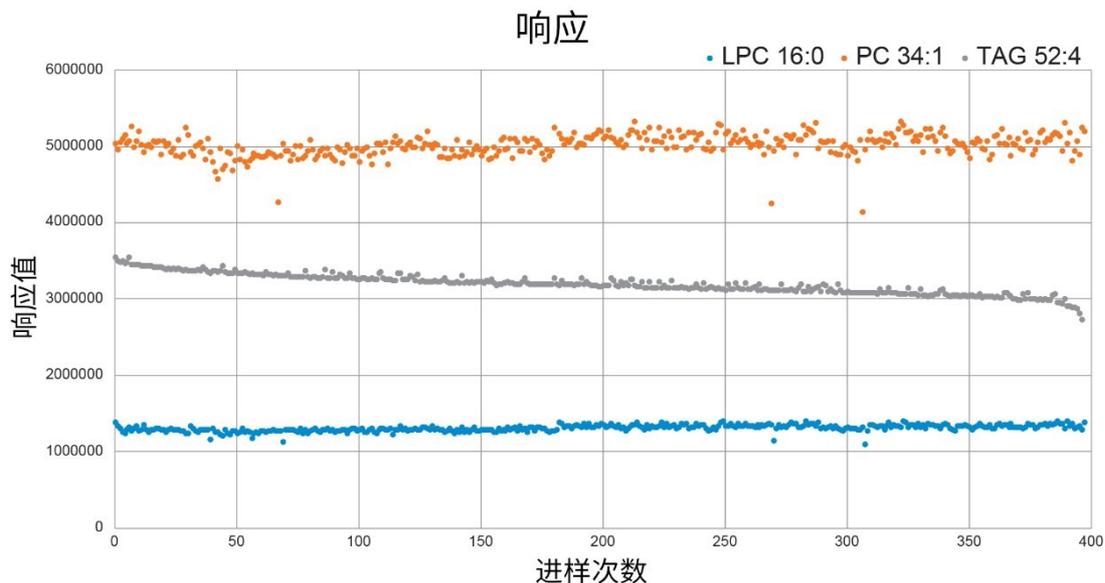


图2.本应用中考察的三种内源性脂质在400次进样分析中的响应稳定性（未经归一化）

使用Avanti SPLASH混合物评价ACQUITY RDa检测器在正离子和负离子模式下的质量精度。在正离子模式下共分析9种脂质，这些脂质通常以[M+H]、[M+NH<sub>4</sub>]和[M+Na]的形式观察到。测得的平均系统质量精度为±2.4 mDa/±2.0 ppm，观察到的最大偏差为1.9 mDa/4.8 ppm。在负离子模式下评价了6种脂质，测得的平均系统质量精度为±1.2 mDa/±1.7 ppm，观察到的最大偏差为-1.8 mDa/-2.7 ppm。鉴定出的脂质通常以M-H和M+COOH-两种形式存在。在包含400个样品的分析批次中测得各化合物的质量精度如下：LPC，±0.7 mDa (±1.5 ppm)；IStd d7 LPC，±1.0 mDa (±1.9 ppm)；PC，±6.0 mDa (±7.9 ppm)；IStd d7 PC，±4.7 mDa (±6.2 ppm)；TAG，±8.9 mDa (±10.2 ppm)；IStd d7 TAG，±9.5 mDa (±11.3 ppm)。图3所示数据为ACQUITY RDa UPLC-MS UNIFI系统分析15:0、18:1 (d7) PC脂质的示例。

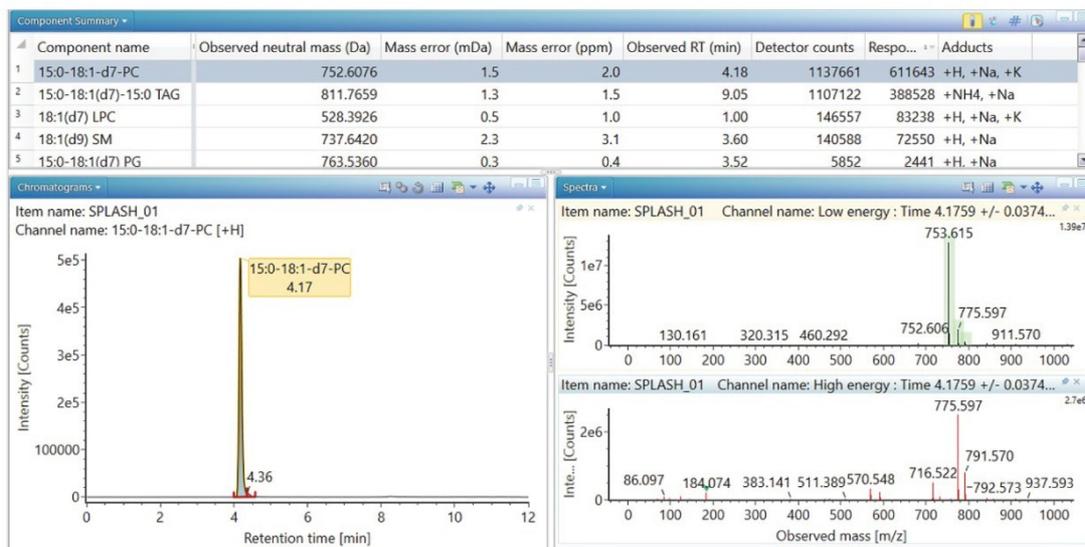


图3.显示SPLASH Lipidomics进样结果鉴定表的UNIFI软件界面，包括各化合物概要、已鉴定脂质PC的XIC，及其低锥孔电压质谱图（上图/绿色）和高锥孔电压质谱图（下图/红色）。

上述结果证明，ACQUITY RDa检测器在较长的采集时间和较大的样品组规模下可以提供稳定的可重现数据；表现出优异的保留时间重现性、一致的质量精度和稳定的响应。因此非常适合用于对大型脂质数据集进行常规分析，其中的目标脂质先前已经过表征。

## 靶向库搜索

目标脂质的检测和确认不仅要求MS准确度、MS响应和色谱性能具有较高重现性，还需要借助特征碎片离子信息和信息学工具来处理这些数据集。脂质母离子和碎片离子数据分别在质谱仪离子源中采用低锥孔电压和高锥孔电压采集。图4显示了内源性脂质LPC 16:0的数据示例，其中母体脂质的碎片信息使用高能量锥孔电压梯度获得。高锥孔电压谱图上标注了（蓝色标记）谱图中与匹配的理论碎片对应的离子，展开标记即可显示碎片离子的详细信息（包括结构和质量精度匹配结果）。使用UNIFI应用程序处理所采集的LC-MS数据来确认脂质鉴定结果，具体方法为：将脂质保留时间、母离子和碎片离子信息与UNIFI数据库比对。根据市售的质谱库生成一个定制数据库。在UNIFI应用程序中，还可以通过导入.mol文件生成数据库。在该数据中生成结构和化学式，还可以输入其他信息（例如针对单个方法的保留时间）。

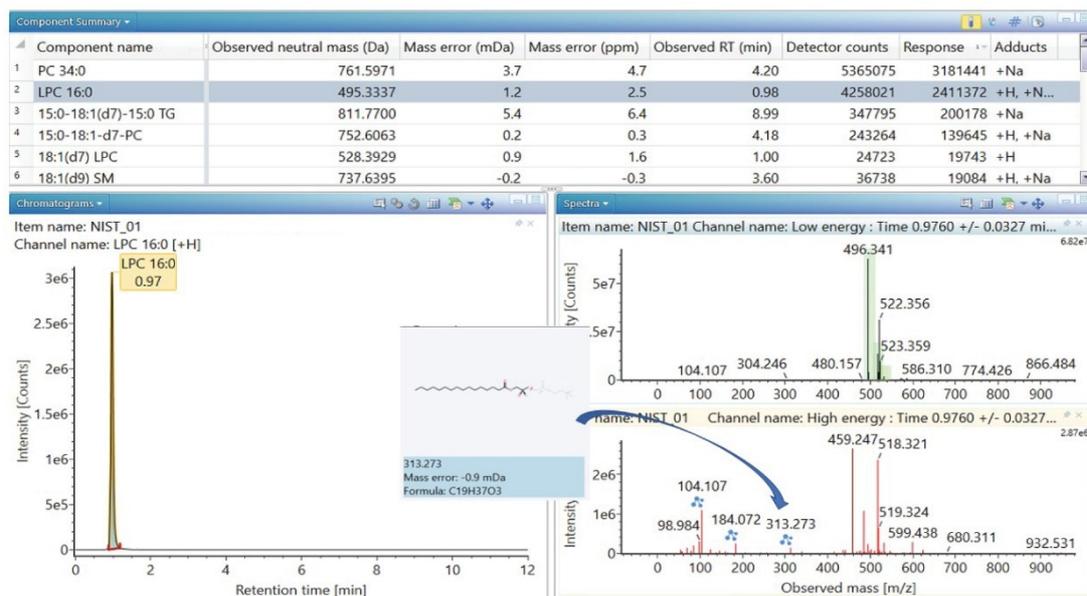


图4.显示处理后NIST血浆数据的UNIFI软件界面，包括鉴定结果表（提供了由库搜索匹配的各化合物概要）。还显示了已鉴定脂质LPC 16:0的XIC及其低锥孔电压质谱图（顶部/绿色）和高锥孔电压质谱图（底部/红色），在高锥孔电压谱图中，蓝色标记表示鉴定出的对应于已鉴定脂质的碎片离子。

将样品中脂质的鉴定结果与质量精度、保留时间、检测器计数、响应与加合物等信息一起用作脂质指认的鉴定标准。UNIFI谱图查看功能可用于鉴定单个脂质碎片离子，并与根据.mol文件产生的理论碎片数据匹配。

## 结论

ACQUITY RDa检测器结合ACQUITY UPLC I-Class PLUS和搭载UNIFI应用程序的waters\_connect软件平台，提供了一套稳定的系统，可使用保留时间、精确质量数据库对脂质进行简单的常规分析。UNIFI应用程序提供了一种易于定制的解决方案，其集成库搜索工具，可简化并加快分析和处理过程。由此产生清晰显示的结果，这些结果可轻松转换为报告格式以便快速制定决策。ACQUITY RDa检测器所提供的数据表现出优异的质量精度和覆盖率，与强大的软件平台结合使用时，非常适合研究实验室中的靶向分析应用。

## 参考资料

1. Goldfeder, R.L.; Wall, D.P.; Khoury, M.J.; Ioannidis, J.P.A.; Ashley, E.A. Human Genome Sequencing at the Population Scale: A Primer on High-Throughput DNA Sequencing and Analysis.2017 Am J Epidemiol.15;186(8):1000–1009.
2. Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Kinross, J. M.; Darzi, A. W.; Takats, Z.; Lindon, J. C. Metabolic Phenotyping in Clinical and Surgical Environments.2012 Nature, 491(7424), 384–392.
3. Coppola, L.; Cianflone, A.; Grimaldi, A. M.; Incoronato, M.; Bevilacqua, P.; Messina, F.; Baselice, S.; Soricelli, A.; Mirabelli, P.; Salvatore, M. Biobanking in Health Care: Evolution and Future Directions. 2019 J Transl Med.17(1), 172.
4. Hilvo, M.; Denkert, C.; Lehtinen, L.; Müller, B.; Brockmöller, S.; Seppänen-Laakso, T.; Budczies, J.; Bucher, E.; Yetukuri, L.; Castillo, S.; Berg, E.; Nygren, H.; Sysi-Aho, M.; Griffin, J. L.; Fiehn, O.; Loibl, S.; Richter-Ehrenstein, C.; Radke, C.; Hyötyläinen, T.; Kallioniemi, O.; Iljin, K.; Oresic, M. Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of Altered Membrane Lipid Metabolism in Breast Cancer Progression.2011 Cancer research, 71(9), 3236–3245.
5. Markgraf, D. F.; Al-Hasani, H.; and Lehr, S. Lipidomics-Reshaping the Analysis and Perception of Type 2 Diabetes.2016 Int J Mol Sci., 17(11), 1841.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

waters\_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007257ZH, 2021年5月

