

应用纪要

一种在发现脂质组学中使用离子淌度DIA UPLC/MS和Lipostar™的快速、 workflow驱动的方法

Nyasha Munjoma, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb, Graham Mullard, Paolo Tiberi, Laura Goracci

Waters Corporation, University of Perugia, Molecular Discovery Ltd

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本研究使用基于离子淌度技术的高分辨率质谱仪结合强大的 workflow 驱动信息学软件，来表征吉非替尼（一种具有选择性的表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶结构域抑制剂）给药后小鼠肝脏脂质组的变化。所得数据显示给药后脂质代谢途径失调，且轨迹与时间相关。给药组中几种LPC含量增加，PC含量减少。与已知的癌症代谢途径进行比较的研究数据表明，磷脂酰胆碱代谢途径发生了变化。

优势

- 简单而又稳定的采集策略：
 1. 生成高质量、信息丰富且全面的数据
 2. 有助于快速分析
- 简单的自定义 workflow
- 一种灵活的脂质鉴定方法，包括：
 1. 谱图匹配方法
 2. 高通量、自下而上的方法，根据特定类别识别碎片离子
 3. 高通量鉴定氧化物
 4. 利用 m/z 、CCS 和保留时间值
- 各种多变量统计分析工具
- 定量和代谢途径分析工具

简介

脂质组学是组学科学中一个快速发展的领域，它使研究人员能够探究疾病、治疗、环境暴露、生活方式等导致的脂质组变化。脂质组很复杂，包含数千种来自极性游离脂肪酸的脂质、中等极性生物活性脂质（例如 LPC、LPE、鞘磷脂、神经酰胺等），以及非极性甘油酯（如甘油三酯和胆固醇酯）。分析这些脂质具有挑战性，在发现模式下，通常采用反相液相色谱 (RPLC) 结合精确质谱法进行分析。虽然分析技术在不断发展，但目标脂质的检测和鉴定仍然是一项重大挑战，难点主要在数据处理、数据库搜索和脂质鉴定上。

本研究展示了 UltraPerformance LC™ 结合离子淌度质谱和强大的 workflow 驱动软件 Lipostar 2，在快速、客观、可靠地发现目标化合物方面的优势。我们通过分析吉非替尼（一种用于治疗各种癌症的表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶结构域抑制剂）静脉 (IV) 给药后小鼠肝组织得出的脂质组学数据证明了此方法的优势。本文重点介绍 UPLC-IM-MS 与 Lipostar 结合使用的关键功能和优势。所得数据显示给药后脂质代谢途径失调，且轨迹与时间相关。

实验

研究设计

小鼠肝脏样品来自之前吉非替尼药代动力学研究中的雄性C57Bl/6Jrj小鼠¹。本研究由Evotec SAS（法国图卢兹）根据国家和欧盟指导原则进行全面管理审查。简言之，吉非替尼在含0.5%羟丙基甲基纤维素HMPC的0.1%聚山梨酯80中配制，并以10 mg/Kg的剂量静脉(IV)给药。在给药前和给药后0.5、1、3、8和24小时采集肝脏样品。

样品前处理

使用Want等人所述的步骤提取肝脏样品中的脂质²。称取50–60 mg组织样品，加入预先填充硅胶珠的1.5 mL试管中。向试管中加入1 mL二氯甲烷/甲醇(3:1, v/v)溶液，其中含有3000 ng/mL纯氘代神经酰胺LIPIDOMIX™（Avanti，美国亚拉巴马州伯明翰）、SPLASH LIPIDOMIX™（Avanti，美国亚拉巴马州伯明翰）和吉非替尼(d6)（Cayman Chemical，美国密歇根安娜堡）的250倍稀释液作为内标。将组织匀浆化，然后将所得的有机层转移到玻璃样品瓶中，用氮气干燥。对剩余团块重复提取程序以优化提取。

提取物干燥后，用1 mL异丙醇/乙腈(1:2, v/v)重溶，超声处理10分钟，然后离心5分钟以去除碎屑。将上清液转移至最大回收样品瓶中进行LC/MS分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ UPLC I-Class流通针式(FTN)
样品瓶:	经认证的螺纹颈口最大回收玻璃样品瓶(P/N: 186000326c)
色谱柱:	ACQUITY Premier UPLC CSH C ₁₈ 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (P/N: 186009488)
柱温:	55 °C
样品温度:	10 °C

进样体积： 0.5 μ L ESI+和2 μ L ESI-

流速： 0.4 mL/min

流动相A： 60%乙腈，40% 10 mM乙酸铵(v/v)

流动相B： 90%异丙醇，10%乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
5	0.4	20	80	6
6.5	0.4	1	99	6
7.5	0.4	1	99	1
8	0.4	50	50	1

质谱条件

质谱系统： Waters™ SYNAPT™ XS

电离模式： ESI(+/-)

毛细管电压： 2.5 kV(+); 1.7 kV (-)

采集模式： HDMS^E

采集范围： 50–1200 Da

碰撞能量： 线性梯度（传输CE） 25–45

	eV
锥孔电压：	30 V
离子源温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	550 °C
锥孔气流速：	150 L/h
脱溶剂气流速：	1000 L/h

脂质分析的关键TWIMS-MS设置

氦气池气体流速：	180.00 mL/min
IMS气体流速（氮气）：	90.00 mL/min
IMS波速：	650 m/s
IMS波高：	40.0 V

结果与讨论

脂质鉴定过程所需的方法开发包括研究设计、样品前处理、分析方法、数据采集、数据组分化、分析后统计、数据库搜索、药物代谢物鉴定（如果适用）、组分审查、生物学方面的衍生结果，以及最后的报告出具。为解决此问题，提升通量和准确度，业界已经采用了很多方法。HDMS^E以单一方法提供母离子、子离子和碰撞截面(CCS)信息，因此成为一种理想的解决方案。准确鉴定“推定的”生物标志物或任何成分，是代谢组学和脂质组学研究中面临的一道棘手难题。为保证这些结果的质量，业界制定了多个计划，例如代谢组学质量保证和质量控制联盟(metabolomics quality assurance and quality control consortium, mQACC <<https://www.mqacc.org/>>)或

最近的脂质组学标准计划(Lipidomic Standards Initiative, LSI <<https://lipidomicstandards.org/>>)^{3,4,5}。为简化数据采集和分析过程，我们开发出一个结合离子淌度质谱仪（例如SYNAPT XS或SELECT SERIES™ Cyclic™ IMS 质谱仪）属性的 workflow，数据分析由Molecular Discovery的Lipostar软件提供支持。 workflow描述见图1。



图1.Lipostar workflow概述

Lipostar软件是一款综合性软件工具，用于处理基于LC-MS/MS的脂质组学数据，它可以结合多种MS采集类型，例如数据依赖型采集(DDA)和数据非依赖型采集(DIA)数据集（包括离子淌度(HDMS^E)和SONAR）。Lipostar软件解决方案简化了原始数据导入、峰检测、脂质鉴定、定量、统计分析、趋势分析、流分析和生物通路分析。它适用于非靶向和半靶向实验，包括稳定同位素标记研究。在Lipostar分析会话中，可以结合不同的脂质组学分析模式来增加知识量，并获得更全面的脂质谱分析。我们将Waters UPLC-IM-MS系统与Lipostar应用程序软件相结合，用于分析雄性C57Bl/6J小鼠接受吉非替尼静脉(IV)给药后的肝组织提取物，来说明该平台的强大功能。正离子和负离子模式下脂质的典型复合色谱图如图2所示。

峰提取/特征发现

将高分辨率仪器生成的沃特世数据文件(.raw)直接导入到最新版本的Lipostar (Lipostar 2)中。用户可以在LC-MS Settings (LC-MS设置) 窗口根据所使用的LC-MS仪器选择缺省设置或自定义并保存新设置。

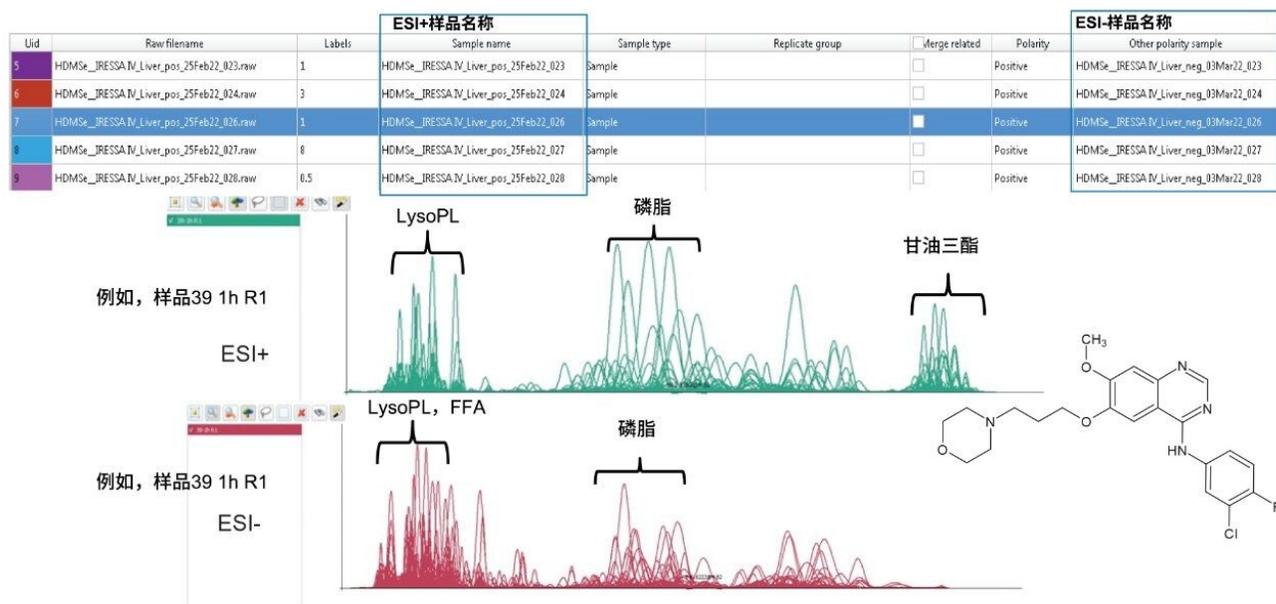


图2. 吉非替尼小鼠肝脏提取物的正离子模式和负离子模式分析数据可以导入到同一会话中。

该信息学解决方案可以将正极性和负极性模式的数据文件添加到同一分析会话中，手动分配标记或使用正确格式的.csv文件进行样本比较和多变量统计。图2展示了在吉非替尼研究中导入与肝脏脂质提取物相关的正离子和负离子数据的示例数据集。两种极性模式所用的色谱条件相同，因此可以方便、轻松地进行比较，最终提高鉴定结果的可信度。Lipostar的数据处理分五步进行：(1)基线和降噪；(2)峰提取；(3)平滑；(4)信噪比；(5)去同位素和去卷积^[6]。

对齐和统计

非靶向脂质组学研究通常需要大批量比较多个样品的脂质谱。完成峰提取后的数据处理包括每个分析样品的脂质谱，最初定义为给定保留时间处的一系列质荷比($m/z@t_R$)；在此阶段，脂质的同位素峰以及与不同加合物相关的峰未聚集，因此被视为不同的化合物。然后对齐定义的脂质谱形成数据矩阵，行代表所分析的样品，列代表 $m/z@t_R$ 条目，如图3所示。对齐后，对 t_R 相同的峰执行同位素模式的逐列搜索，然后将这些峰简化为一个条目。

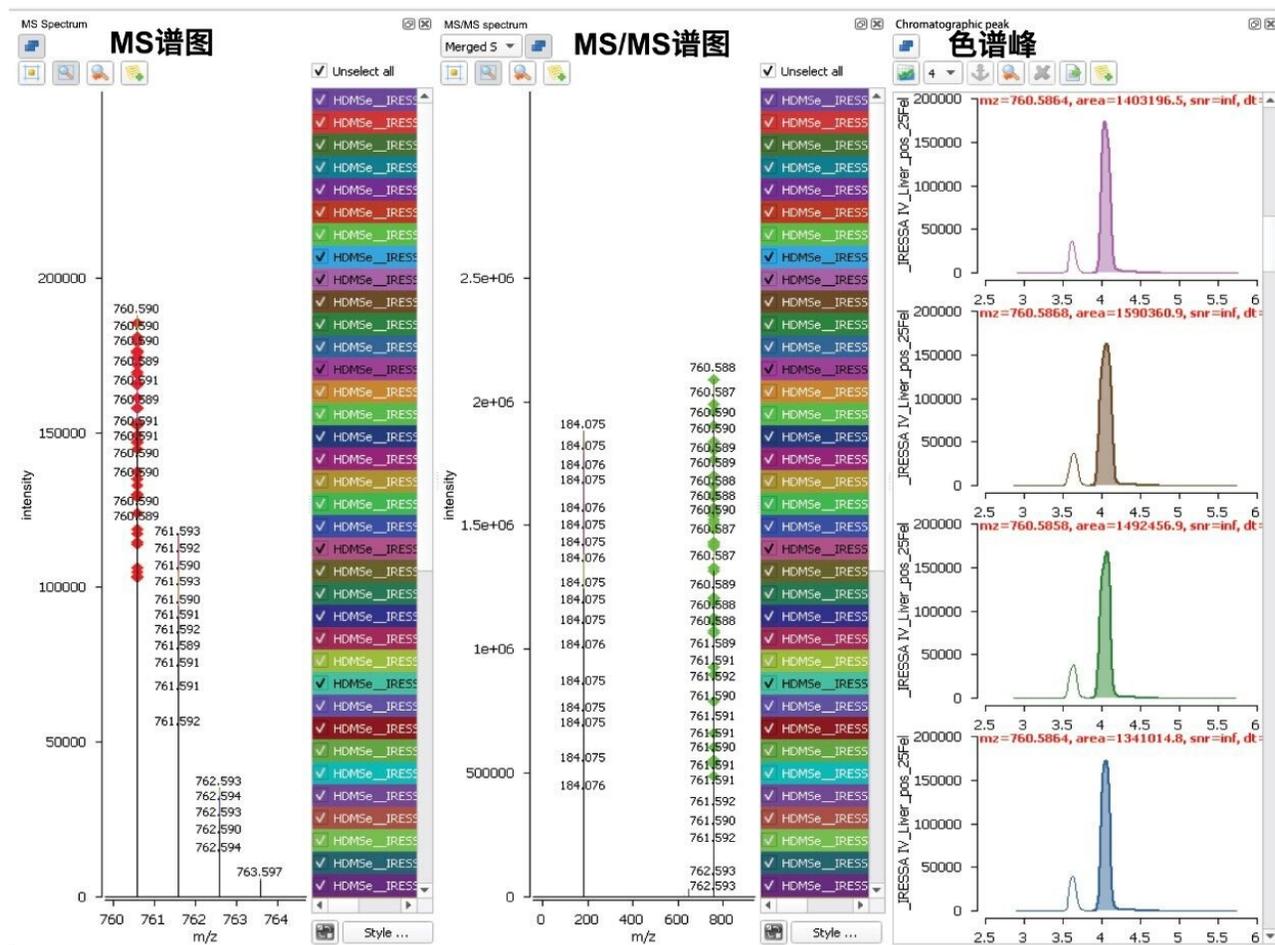


图3.与特征760.5879@4.14 ($m/z@t_R$)相关的小鼠肝脏数据矩阵示例，显示所分析样品的MS和MS/MS谱图合并后对齐良好。

接下来可以对得到的质荷比 - 保留时间对特征表进行多变量分析(MVA)，以揭示数据中的任何潜在模式。Lipostar软件中提供各种无监督（例如主成分分析：PCA、共识PCA）和监督式（例如偏最小二乘法：PLS、PLS-DA、O-PLS）算法用于多变量分析。图4显示了使用负离子模式从PLS-DA模型获得的MVA数据和S plot数据。所得的内源性脂质和药物相关代谢物数据组合显示出明显的时间相关轨迹。也可以使用更高级的工具来对统计分析进行可视化和解释，以及评估稳定性。例如，在选择统计变量（即脂质）之前，可以使用频率图（变量出现的频率与样品数的关系图）。

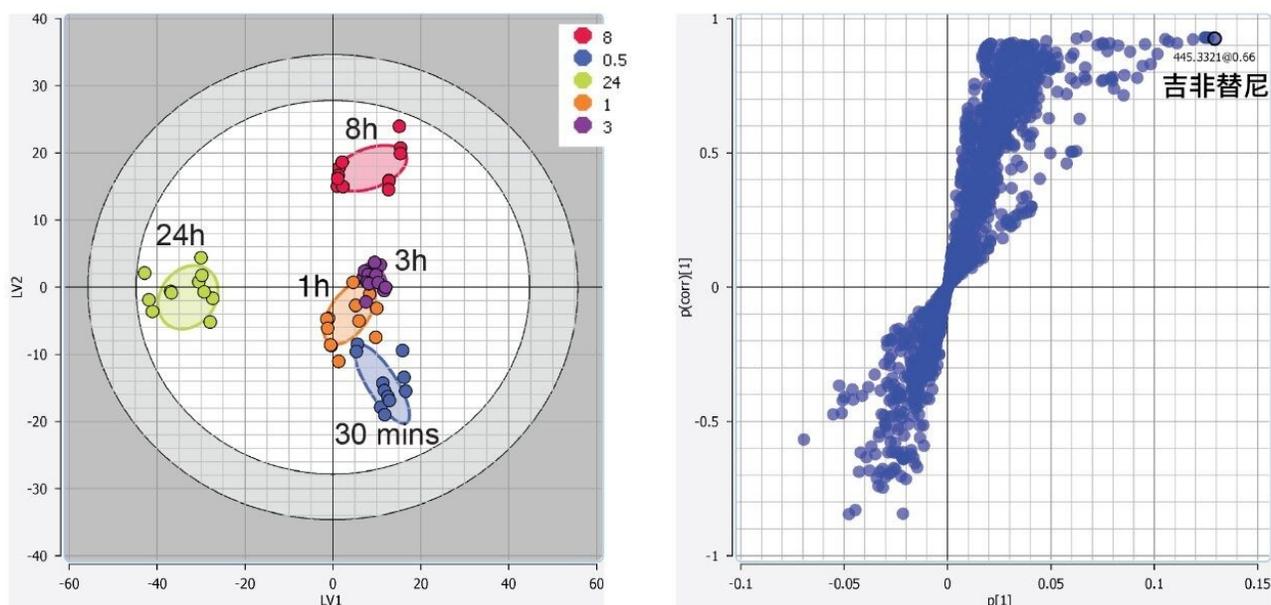


图4. Lipostar中提供的统计工具示例。这张图显示了吉非替尼药物给药后不同时间点肝脏提取物样品的负离子模式 PLS-DA LV1与LV2评分图（左）和S plot（右）。

鉴定和定量

如前所述，随着数据库的广泛使用，准确鉴定推定的脂质极具挑战性。Goracci等人详细讨论了Lipostar鉴定工作流的描述³。简单来讲，Lipostar通常通过DB Manager模块导入或构建脂质结构数据库来鉴定脂质。除脂质的精确质量数外，用户还可以导入其他信息，例如保留时间和CCS值。在Lipostar中处理的沃特世文件可以导入沃特世脂质组学分析CCS库（如果可用）。最后，数据库中的脂质结构可以通过DB Manager模块中基于规则的方法进行碎裂。基于文献中的实验证据或内部数据，标记了几个碎裂规则（根据这些规则在脂质注释中的重要性进行标记）。例如，碎裂规则可以标记为“强制”（例如，定义质子化二酰基甘油磷脂酰胆碱碎片离子 m/z 184.074的规则）或“推荐”（指对最终得分有显著影响，但本身不足以明确确定脂质注释的碎片离子匹配）。生成的碎片离子也与分子量有关（用户可根据使用的仪器条件调整）。

评分函数是实验质量数和理论质量数之间差值(Δ ppm)的组合，数据库中的MS/MS和CCS值（如果可用）与每个鉴定结果有关。定义鉴定方法时，用户可以设置要分配给每部分得分的分子量（例如，使用全扫描采集时，MS/MS分数可以设置为零）。此外，基于鉴定结果的置信度，特别是基于MS/MS碎片离子匹配，将鉴定的特征用颜色编码来说明鉴定结果的可靠性和稳定性（图5），编码颜色如下：

- 深绿色：首先建议的匹配是置信度高且MS/MS谱图匹配度好的鉴定结果。
- 橙色：首先建议的匹配是待批准/审查的鉴定结果，因为总成分或脂质类别冲突，或MS/MS信息不可用。
- 红色：未鉴定。

深绿色标记的结果必须满足“强制”和“推荐”碎裂规则。虽然Lipostar中的鉴定主要是使用脂质数据库，但当MS/MS数据可用时，也可以将不使用数据库的鉴定算法应用于类别或子类别注释级别；这种方法基于软件中嵌入的类别特定碎片离子集合。

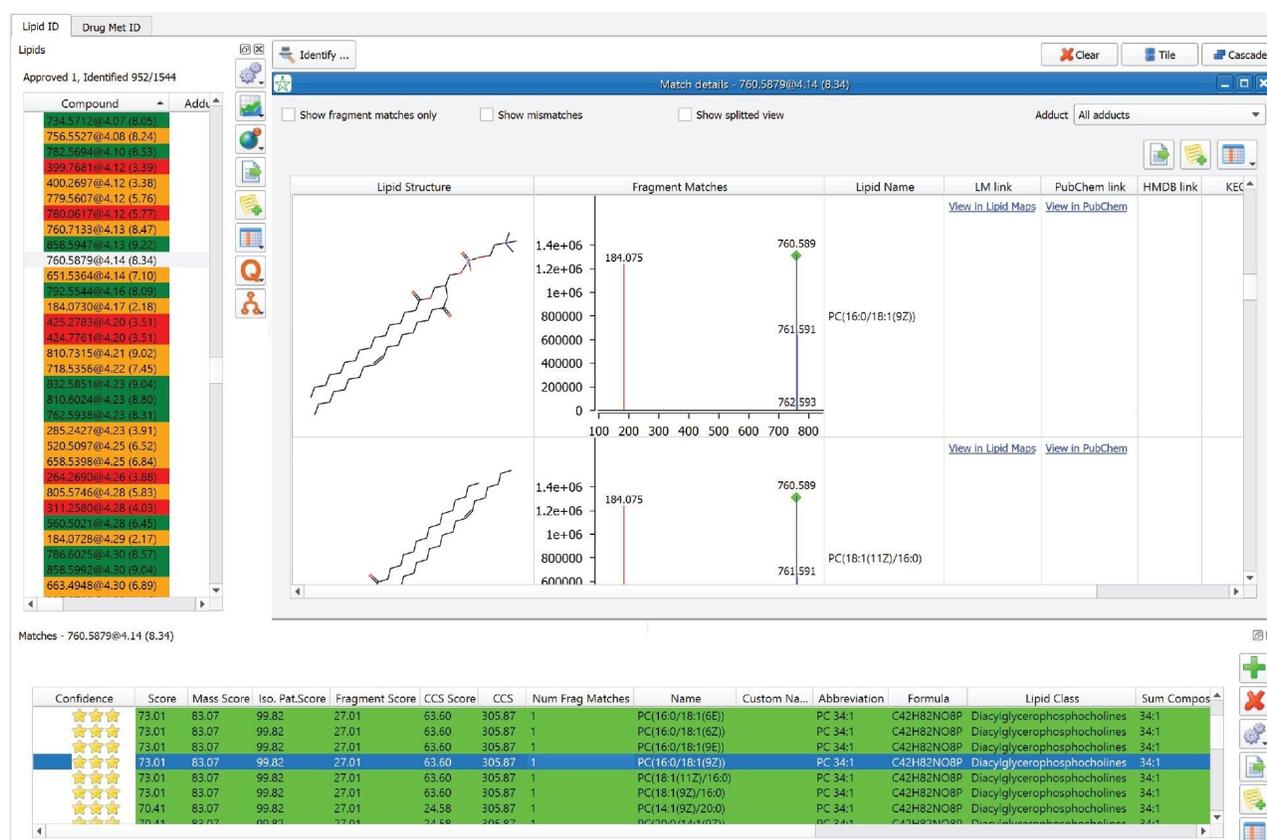


图5.高置信度鉴定结果示例。在此示例特征中，760.5879@4.14被鉴定为PC (34:1)。提供了MS/MS谱图，建议的脂质的所有组分（即酰基链）都能轻松鉴定（深绿色标签）。

当使用基于脂质数据库的鉴定方法时，未鉴定的 m/z 条目将根据精确质量数比对和MS/MS谱图的初步检查进一步

处理，以鉴定潜在的氧化形式⁶。

Lipostar还包含一个简化版的Mass-MetaSite算法，可以自动检测药物及其代谢物⁷。当监测药物治疗后脂质组的变化时，特别是亲脂性药物，这种药物可以与脂质一起提取，在样品组中搜索这些物质非常有用。以药物的化学结构作为输入文件，通过计算机模拟常见代谢反应生成潜在代谢物的结构。对于每个预测的代谢物，都会自动生成一个碎片离子库，并通过谱图匹配方法鉴定样品组中的代谢物。

本研究使用Lipostar中的Mass-MetaSite算法来鉴定体内形成的吉非替尼药物相关代谢物，并将这些物质从分析中去除，来确定仅与内源性脂质水平相关的变化。图6显示了通过在Lipostar中应用Mass-MetaSite算法，在检测到的特征中鉴定出的吉非替尼代谢物示例。这种代谢物的 m/z 值为421.1441，Molloy等人已在之前的报告中将其鉴定为代谢物M6¹。

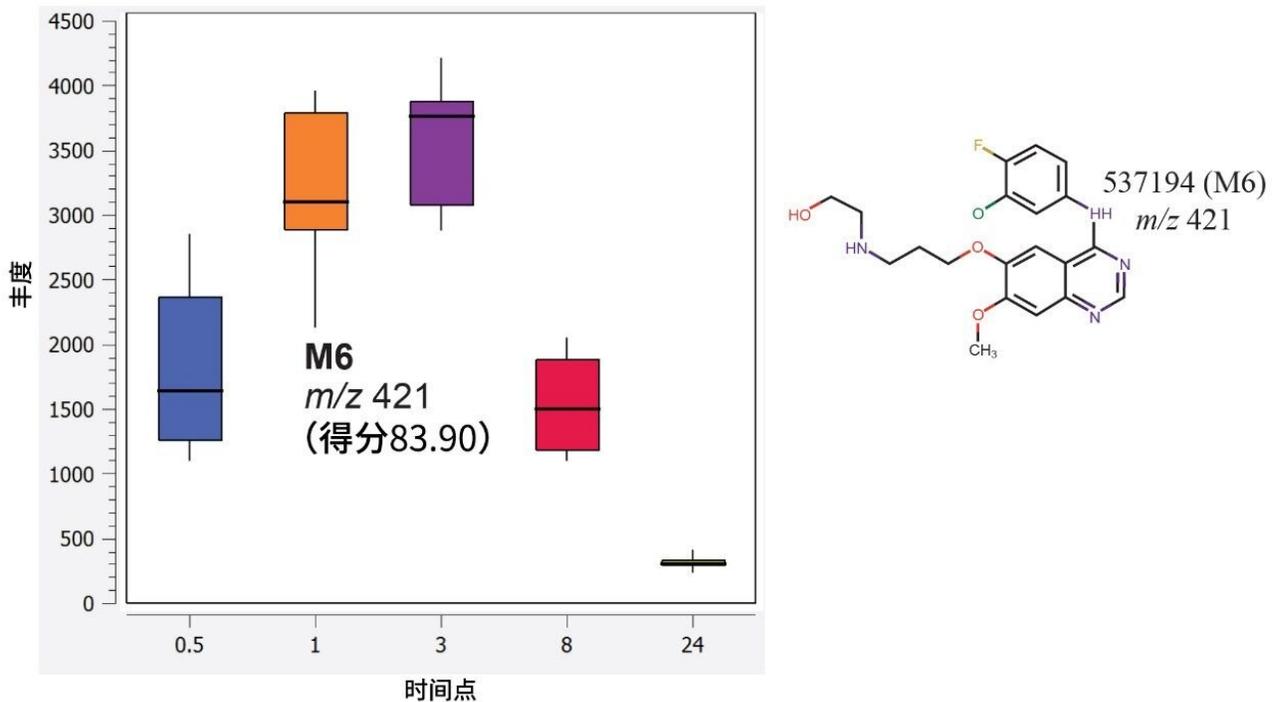


图6.使用Mass-MetaSite预测M6代谢物(C₂₀H₂₂ClFN₄O₃)。箱线图显示了不同时间点小鼠肝脏提取物中该代谢物的相对丰度。

完成数据集统计分析和脂质鉴定后，下一个任务通常是测定脂质浓度。Lipostar定量工具也可以用于在靶向和非靶向实验中定量内源性脂质。Lipostar使脂质分析科学家既可以选择线性范围对应的浓度来改进线性回归，也可以在

整个区间应用多项式回归。还可以生成校正物的各种加合物的校正曲线。

LOQ和LOD使用以下公式计算：

$$\text{LOQ} = 10 * \text{标准误差/斜率}$$

$$\text{LOD} = 3.3 * \text{标准误差/斜率}$$

其中，标准误差仅使用计算回归的启用点。

数据解析

趋势分析是一种强大的工具，可以根据预期趋势将脂质丰度分组。此外，通过应用聚类算法和“按趋势分组”功能，不仅可以鉴定潜在的生物标志物，还可以检查新的加合物和源内碎片。图7显示了两种密切相关的脂质（即LPC和PC）在吉非替尼时程研究中显示出的明显差异。

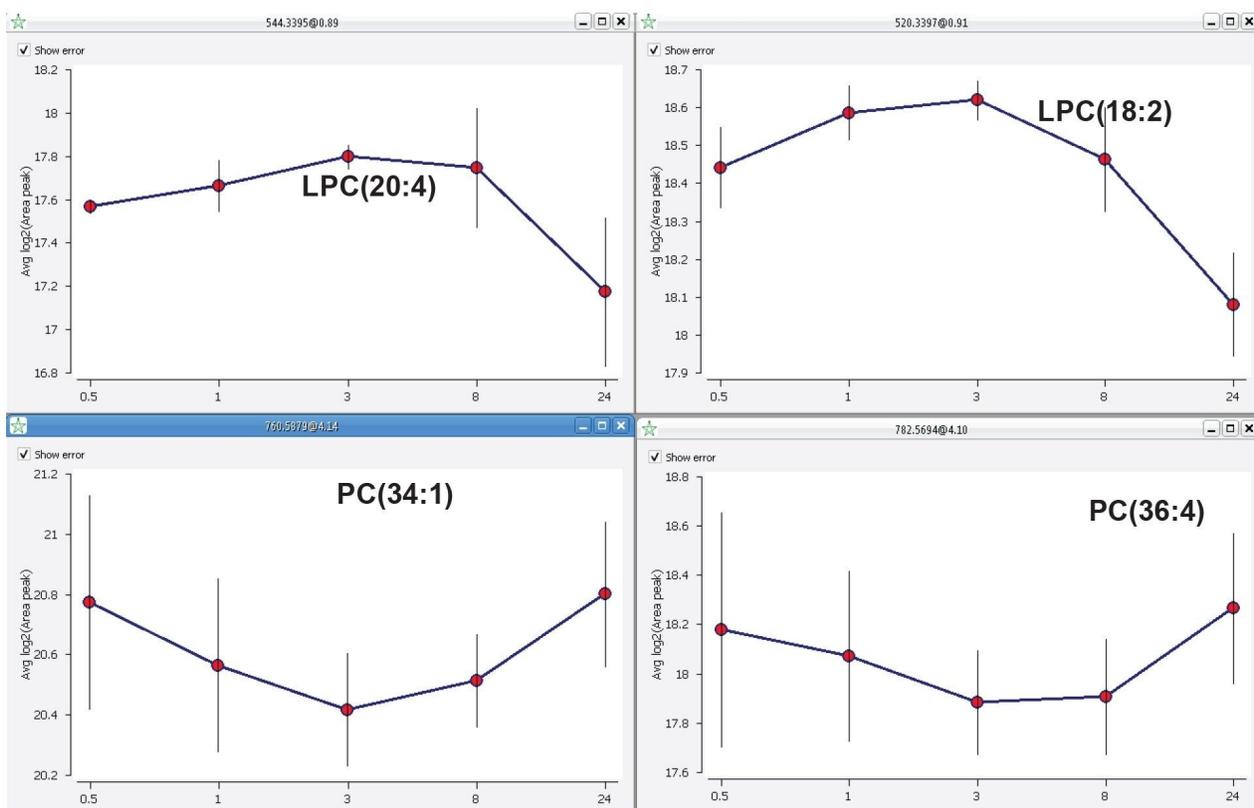


图7.脂质丰度趋势示例：给药后肝脏提取物样品中的LPC在不同时间点丰度相似（上图）以及关键PC在相同时间点的趋势（下图）。

代谢途径分析

了解脂质代谢途径图具有生物学意义，有助于解释相关机制和过程。Lipostar有一组脂质代谢途径图（即全局、代谢和疾病），可以链接到脂质碎片数据库或脂质鉴定结果。图8显示了“前列腺癌”疾病图中描述的部分代谢途径。使用癌症相关代谢途径是因为吉非替尼是为治疗肺癌而开发的。例如，PC (34:1)是一种磷脂酰胆碱脂质，因此被投射到PC节点中，与LPC1节点（单酰基甘油磷酸胆碱）直接链接，已知后者在前列腺癌中的浓度有所降低（以蓝色突出显示）。相反，其他脂质水平升高（以红色突出显示）也显示出间接相关。

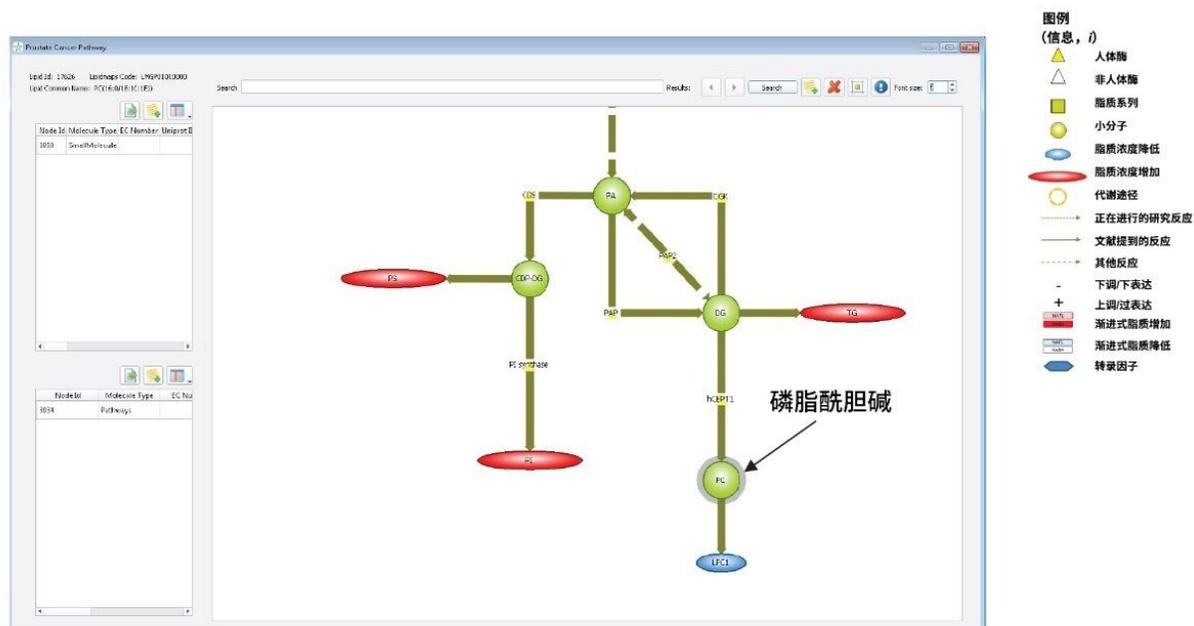


图8. Lipostar的“前列腺癌”疾病图中描述的部分代谢途径。图中突出显示了包含PC (34:1)的节点，吉非替尼小鼠肝脏提取物的多变量模型主要来自该节点。有文献指出，用红色表示的相关脂质在前列腺癌中的浓度增加，而用蓝色表示的相关脂质预计会降低。

代谢途径图也可以链接到鉴定结果。Lipostar还可以在图中同时显示所有批准的化合物。

结论

将反相UPLC、基于离子淌度技术的高分辨率质谱和智能工作流驱动的软件结合使用，能够对生物样品进行快速准确的脂质组学分析。Lipostar软件使用数据库搜索、可直接处理的沃特世LC-MS数据集（基于DDA或DIA），包括基于离子淌度技术的MS，准确定量和鉴定化合物。上述用户友好、易于使用的工作流有助于快速处理脂质组学数据，例如本文所述吉非替尼研究生成的数据。使用Lipostar 2软件中提供的工具对吉非替尼研究产生的数据进行广泛的统计分析，以完成生物学解释。软件中的代谢途径分析工具可用于查明受脂质扰动影响最大的代谢途径。

致谢

感谢Paolo Tiberi (Molecular Discovery Ltd, 英国赫特福德郡) 和Laura Goracci (佩鲁贾大学, 意大利佩鲁贾) 付出的时间和精力。

参考资料

1. Molloy B.J, King A, Mullin L.G, Gethings L.A, Riley R, Plumb R.S, Wilson I.D. Rapid Determination of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Gefitinib in the Mouse Using a Combination of UPLC/MS/MS, UPLC/QToF/MS, and Ion Mobility (IM)-enabled UPLC/QToF/MS. *Xenobiotica* 2021, 51, 434-446.
2. Want, E., Masson, P., Michopoulos, F. *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc*, 2013, 8, 17–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135>.
3. Beger RD, Dunn WB, Bandukwala A, Bethan B, Broadhurst D, Clish CB, Dasari S, Derr L, Evans A, Fischer S, Flynn T, Hartung T, Herrington D, Higashi R, Hsu P-C, Jones C, Kachman M, Karuso H, Kruppa G, Lippa K, Maruvada P, Mosley J, Ntai I, O'Donovan C, Playdon M, Raftery D, Shaughnessy D, Souza A, Spaeder T, Salholz B, Tayyari F, Ubhi B, Verma M, Walk T, Wilson I, Witkin K, Bearden DW, Zanetti KA. Towards quality assurance and quality control in untargeted metabolomics studies. *Metabolomics*. 2019 Jan 3; 15(1): 4.
4. Evans AM, O' Donovan C, Playdon M, Beecher C, Beger RD, Bowden JA, Broadhurst D, Clish CB, Dasari S, Dunn WB, Griffin JL, Hartung T, Hsu P-C, Huan T, Jans J, Jones CM, Kachman M, Kleensang A, Lewis MR, Monge ME, Mosley JD, Taylor E, Tayyari F, Theodoridis G, Torta F, Ubhi BK, Vuckovic D on behalf of the Metabolomics Quality Assurance, Quality Control Consortium (mQACC). Dissemination and analysis of the quality assurance (QA) and quality control (QC) practices of LC-MS based untargeted metabolomics practitioners. *Metabolomics*. 2020 Oct 12; 16(10): 113.
5. O' Donnell, V. B., Ekroos, K., Liebisch, G. & Wakelam, M. Lipidomics: Current state of the art in a fast-moving field. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 12, 1–6 (2020).
6. Laura Goracci, Sara Tortorella, Paolo Tiberi, Roberto Maria Pellegrino, Alessandra Di Veroli, Aurora Valeri, and Gabriele Cruciani (2017) LipoStar, a Comprehensive Platform-Neutral Cheminformatics Tool for Lipidomics, *Analytical Chemistry* 2017 89 (11), 6257–6264, DOI: [10.1021/acs.analchem.7b01259](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b01259) <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b01259>> .

7. Zamora I, Fontaine F, Serra B, Plasencia G. High-throughput, computer assisted, specific MetID.A Revolution for Drug Discovery.*Drug Discov Today Technol.* 2013 Spring;10(1): e199-205.doi: 10.1016/j.ddtec.2012.10.015 <<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.10.015>> .PMID: 24050248.

特色产品

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

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

720007817ZH, 2022年12月

© 2023 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