

使用Xevo™ MRT QTof对类花生酸进行高灵敏度、高通量LC-MS分析

Nyasha Munjoma, Gemma Molyneux, Lee A. Gethings, Jayne Kirk, Richard Lock

Waters Corporation

摘要

前列腺素(PG) (例如前列腺素E2 (PGE2)、前列腺素D2 (PGD2)、前列腺素F2 α (PGF2 α)和血栓烷B2 (TXB2)) 具有多种生理和病理生理功能, 表现为疼痛、发烧和过敏反应。本研究将Xevo MRT QTof与UltraPerformance LC™联用, 动态范围覆盖四个数量级。检测限示例如下: 白三烯B4 (LTB4)的LOD和LOQ分别为<0.05 ng/mL (柱上进样量<0.00015 ng) 和0.1 ng/mL (柱上进样量0.0003 ng) ; PGD2的LOD和LOQ分别为0.1 ng/mL (柱上进样量0.0003 ng) 和0.5 ng/mL (柱上进样量0.0015 ng) 。三次重复进样在低、中、高浓度水平下均表现出良好的重现性, 峰面积重现性CV <3.5%。质量精度和分辨率表现优异 (例如PGD2 (C₂₀H₃₂O₅)理论 m/z [M-H]等于351.2770 m/z), 质量数误差为-0.05 ppm, 分辨率为69000 FWHM。RMS通常小于1 ppm, 确保可靠鉴定。使用waters_connect轻松完成数据处理, 但也可使用Lipostar和Skyline等第三方软件来提高工作流程的灵活性。

优势

Xevo MRT QTof与超高效液相色谱联用, 提供一种简单稳定的采集策略, 能够快速高效地获得高质量、全面的数据。Xevo MRT MS具备多项关键功能, 使其成为代谢组学和脂质组学研究人员的理想选择, 尤其适用于需结合高灵敏度、质量精度、质量分辨率与高通量方法的场景。

- 占用空间小, 提升实验室效率
- 分辨率高/扫描速度快

- 灵敏度高
- 线性动态范围宽
- 质量精度优

简介

研究表明，炎性疼痛的特征是通过环氧合酶(COX)途径从外周以及中枢神经系统组织（例如脑和脊髓）释放脂质介质，例如内源性大麻素、前列腺素(PG)、血栓烷、白三烯等¹。前列腺素（例如PGE2、PGD2、PGF2 α 和血栓烷B2 (TXB2)）具有多种生理和病理生理功能，表现为疼痛、发烧和过敏反应²。由于生物样品中富含异构体且其丰度较低，因此监测循环系统中COX类花生酸含量的动态变化较为复杂³。常见类花生酸的结构如图1所示。

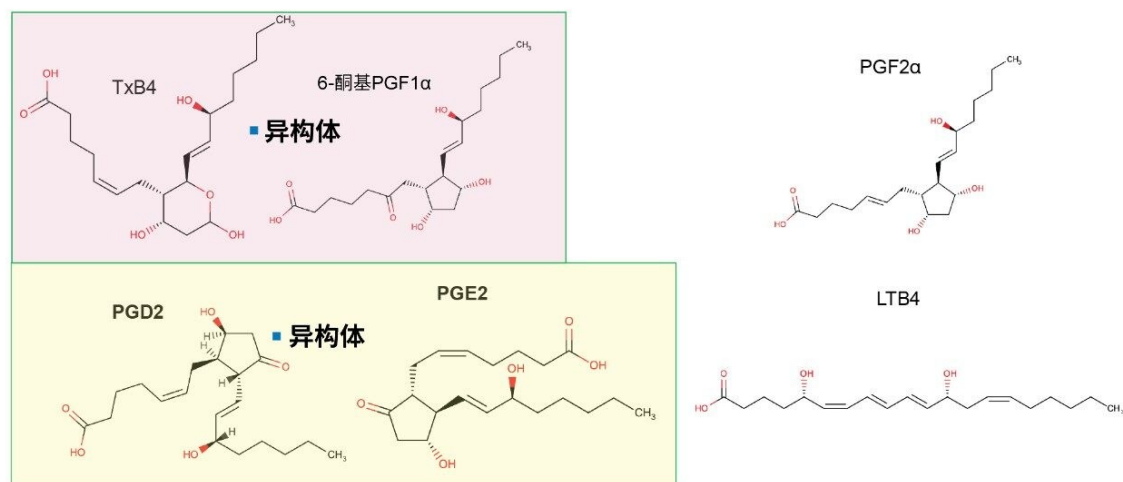


图1. 脂质的典型结构。

此前对这类脂质的分析主要采用放射计量法和酶联免疫分析法，但这些方法选择性不足，仅能靶向有限类别的化合物⁴。还使用过气相色谱(GC-MS)法，但需要复杂的衍生化处理步骤。近年来，液相色谱(LC)与串联四极杆质谱(MS)联用技术逐渐成为主流。Schmidt等人（2005年）验证了一种LC-MS/MS方法，用于定量大鼠微透析样本中的PGE2和PGD2，LLOQ分别为25 pg/mL和50 pg/mL⁵。同样，使用近期研究中用于定量人血浆或痰液样本中LTB4的一种经验证方法测定了微胶质细胞中的PGE2和PGD2，定量限分别为0.2 ng/mL和0.078 ng/mL⁶。

本文展示了超高效液相色谱(UPLC™)与Xevo MRT质谱仪联用的主要优势。得益于质谱仪灵敏度与动态范围的提升，我们开发了一种更精简的数据采集与分析工作流程，不仅拥有串联四极杆质谱仪的灵敏度水平，还能兼具高质量精度与质量分辨率。为提高灵活性，也可以使用Lipostar 2或Skyline <<https://skyline.ms/project/home/begin.view>> 等第三方软件分析数据⁷。

实验

样品前处理

将含有LTB4、PGF2α、PGE2、PGD2、6-酮基-前列腺素F1α（6-酮基PGF1α）和TxB2的1000 ng/mL混标（Cayman Chemicals，美国密歇根州安娜堡）溶于甲醇，制备了浓度范围为1000 ng/mL~0.05 ng/mL的14点标准曲线，如下表所示。

样品制备表

	水平	浓度 (ng/mL)	稀释
校准品14	1	1000	
校准品13	2	750	1.33
校准品12	3	500	2
校准品11	4	200	5
校准品10	5	100	10
校准品9	6	50	20
校准品8	7	20	50
校准品7	8	10	100
校准品6	9	5	200
校准品5	10	2.5	400
校准品4	11	1	1000
校准品3	12	0.5	2000
校准品2	13	0.1	10000
校准品1	14	0.05	20000

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY Premier流通针式(FTN)超高效液相色谱系统

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：	CORTECS™ T3色谱柱, 120 Å, 1.6 µm, 2.1 mm x 50 mm, 1根/包 - P/N: 186008497
柱温：	35 °C
样品温度：	8 °C
进样体积：	3 µL (ESI-)
流速：	0.6 mL/min
流动相A：	0.01%甲酸的水溶液
流动相B：	0.01%甲酸的乙腈溶液

梯度表

#	时间 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B	曲线
1	初始	0.65	70.0	30.0	初始
2	3.00	0.65	70.0	30.0	6
3	3.65	0.65	10.0	90.0	6
4	4.80	0.65	10.0	90.0	6
5	5.50	0.65	70.0	30.0	1

MS离子源设置

变量：	说明（负）
毛细管电压：	2.0 kV

采样锥孔电压:	30
电离源补偿:	30
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	650 °C
锥孔气流速:	50 L/h
脱溶剂气流速:	600 L/h
Lockspray流速:	10 µL/min

TOF设置

变量:	说明
实验类型:	ToF MS ^e
扫描速率:	10 Hz
质量范围:	50~1200 Da
数据格式:	连续
碰撞能量:	30~40 eV
Lockspray设置:	单一模式 参比 m/z 554.26202 1.5 min间隔, 采样时间0.30 s, 毛细管电压2.5 kV, 锥孔电压30 V

信息学软件

使用waters_connect™采集和处理数据，然后通过mzML文件传输至Lipostar 2软件（Mass Analytica，西班牙巴塞罗那）和Skyline（MacCoss Lab Software，华盛顿大学）。

结果与讨论

检测限和动态响应

在本研究中，检测限(LOD)定义为信噪比大于3的峰，而定量下限(LLOQ)定义为信噪比大于10、且分析物响应具有重现性和线性的峰⁸。定量上限(ULOQ)定义为校准曲线上最高浓度的校准标准品。实验结果表明该方法具有优异的灵敏度（柱上进样量低于1 pg）和宽泛的线性动态范围。图2展示了白三烯B4 (LBT4)的典型数据示例。如果在空白样中未检出目标m/z信号，则可确认LOD。

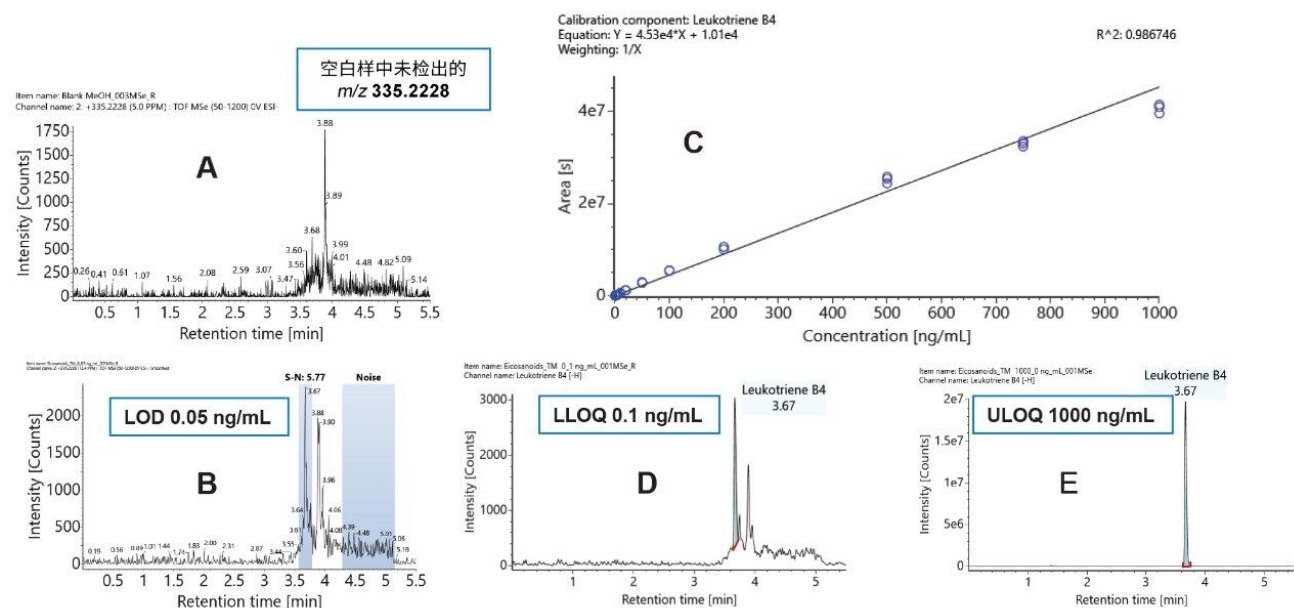


图2. LTB4的检测限和线性数据示例。(A)溶剂空白中未检出的m/z 335.2228处的峰。(B)峰到峰信噪比5.77，代表LOD的峰。(C)LTB4的线性响应。还显示了LLOQ色谱图(D)和ULOQ色谱图(E)。

表1汇总了所有化合物的检测限，以及检测限的柱上进样量值，以便与使用不同进样体积的方法进行对比。

化合物	LOD		LLOQ		ULOQ	
	浓度 (ng/mL)	柱上进样量 (ng)	浓度 (ng/mL)	柱上进样量 (ng)	浓度 (ng/mL)	柱上进样量 (ng)
白三烯B4	<0.05	0.00015	0.1	0.0003	1000	3
前列腺素F2 α	<0.05	0.00015	0.5	0.0015	1000	3
前列腺素E2	0.1	0.0003	0.5	0.0015	1000	3
前列腺素D2	0.1	0.0003	0.5	0.0015	1000	3
6-酮基前列腺素F1 α	0.1	0.0003	0.5	0.0015	1000	3
血栓烷B2	0.1	0.0003	0.5	0.0015	1000	3

表1. 各种类花生酸的检测限汇总。

峰面积精密度

本研究所用的方法在低(5 ng/mL)、中(50 ng/mL)、高(500 ng/mL)浓度样品的三次进样（进样体积为3 μ L）中表现出良好的精密度。CV均小于3.5%。图3显示了6-酮基PGF1 α 、PGE2、PGF2 α 、LTB4、PGD2和TXB2的响应和CV。

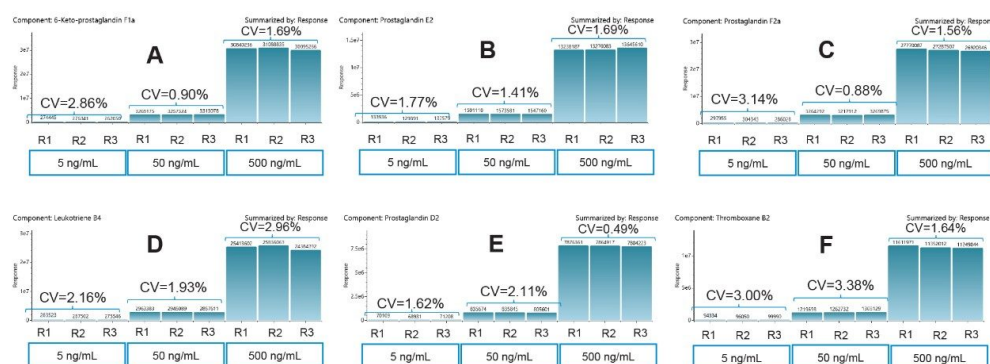


图3. 低(5 ng/mL)、中(50 ng/mL)、高(500 ng/mL)浓度样品3次进样的结果汇总。(A) 6-酮基PGF1 α 、(B) PGE2、(C) PGF2 α 、(D) LTB4、(E) PGD2和(F) TXB2。

分辨率/质量精度

QToF仪器的质量精度高，与单同位素真实计算值的偏差在ppm以内，使我们可以根据质量数亏损确定经验公式。LC-MS Toolkit是waters_connect中的一款应用程序，用于评估分析中目标化合物的质量分辨率和质量精度。图4显示了PGD2 (C₂₀H₃₂O₅)的分辨率(69000 FWHM)，表明其 m/z 精度较高。由于质量误差较低，通过LC-MS Toolkit中的“元素组成”分析获得了高i-FIT置信度评分。PGD2的理论[M-H]⁺加合物 m/z 值为351.2770。高能量谱

图中PGD2碎片离子的质量误差极低，从而实现了准确的结构表征。

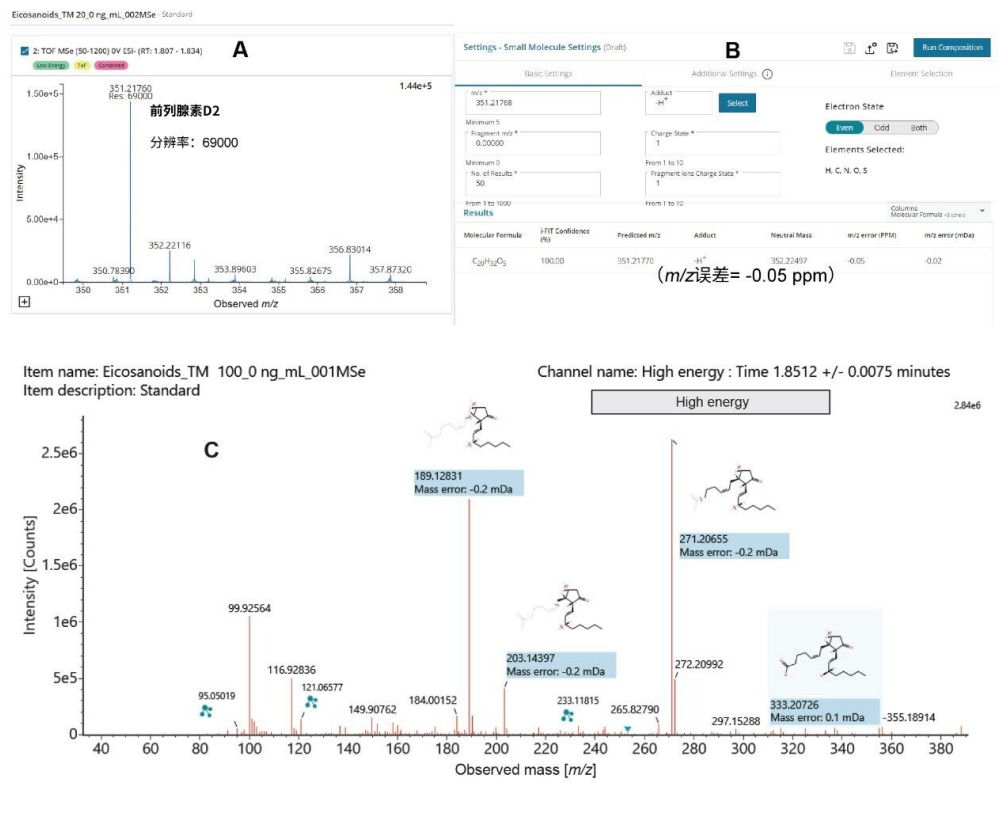


图4.(A): PGD2的质量分辨率为69000 $FWHM$ ，使用元素组成工具计算出的质量数误差为-0.05 ppm。(B): PGD2的高能量谱图显示其碎片离子的质量数误差也很低。

整个分析的质量数误差值通常小于1 ppm，所有化合物的RMS误差均小于1 ppm，如图5所示。这种高水平的质量精度有利于采用更窄的数据库检索窗口，进一步降低假阳性鉴定结果的可能性。

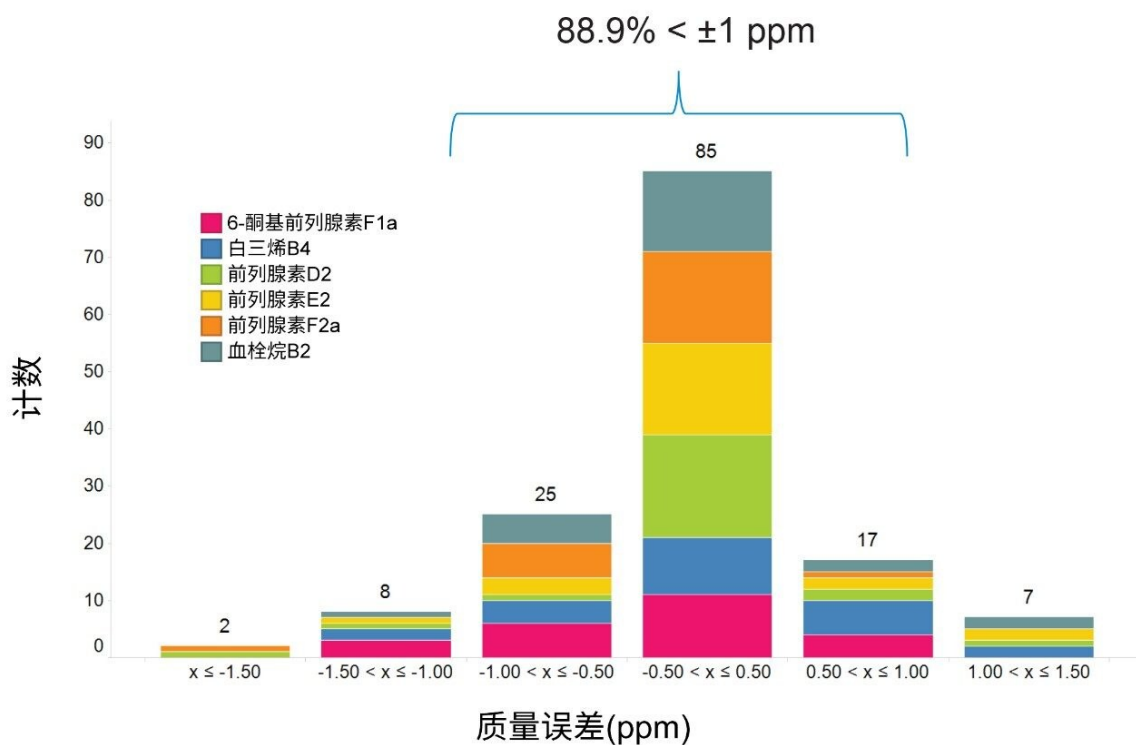


图5.整个分析中质量数误差值分布的直方图

第三方软件

许多实验室均已配备信息学软件 and 数据处理流程，为提高灵活性，可将数据转换为广泛使用的mzML格式，以便在流行的第三方软件中进行数据处理。图6展示了如何使用Skyline处理mzML文件。用户可使用包含 m/z 值的简单模板将DDA和MSe数据以mzML文件形式上传至Skyline进行处理。校准曲线根据Skyline官网提供的简明教程生成。Lipostar 2通过DB Manager模块采用基于规则的碎裂方法辅助脂质鉴定。图6 (B)为Lipostar数据库示例，展示了6-酮基PGF1 α 的预期碎片离子，并说明了如何根据质量精度碎片和保留时间鉴定化合物。

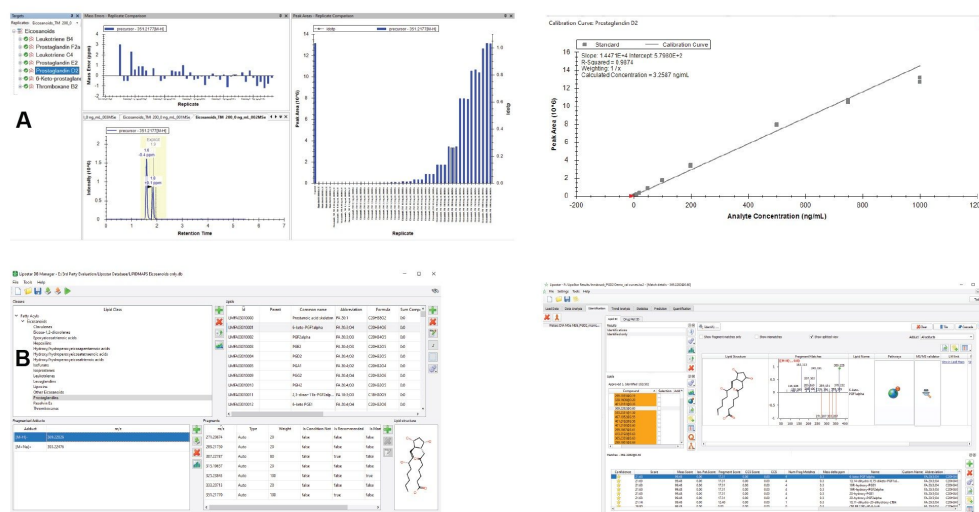


图6. 借助灵活的数据工作流程，用户可以使用Skyline (A)和Lipostar (B)等各种第三方软件处理数据。

结论

使用Xevo MRT QTof与超高效液相色谱联用系统建立的校准曲线表现出宽动态范围，线性覆盖四个数量级。这款高灵敏度仪器对于大多数此类化合物（例如白三烯B4 (LTB4)和前列腺素F2a) 的LOD和LOQ可媲美串联四极杆仪器。具体而言，LTB4的LOD和LOQ分别为<0.05 ng/mL（柱上进样量<0.00015 ng）和0.1 ng/mL（柱上进样量0.0003 ng）；前列腺素D2 (PGD2)的LOD和LOQ分别为0.1 ng/mL（柱上进样量0.0003 ng）和0.5 ng/mL（柱上进样量0.0015 ng）。峰面积重现性良好：使用3 μ L进样量对低(5 ng/mL)、中(50 ng/mL)、高(500 ng/mL)浓度水平的样品进行三次重复进样，不同浓度下均表现出优异的重现性，CV <3.5%。

PGD2的质量分辨率为69000 FWHM，具有较高的 m/z 精密性。母离子和碎片离子在整个分析中均表现出优异的质量精度和较低RMS误差（通常 $\leq \pm 1.0$ ppm），与串联四极杆仪器相比，可以更可靠地鉴定类花生酸。

此外，高质量精度、高质量分辨率和高灵敏度的优势可与快速数据采集相结合，从而实现高通量方法，并能够在需要时扩展分析规模，以应对大规模群体研究。

数据兼容Skyline、Lipostar等第三方软件，使该工作流程高度灵活。通过简单教程即可轻松生成校准曲线、LOD/LOQ及质量数误差表。

参考资料

1. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* 87(1), 3–11, 2001.
2. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(5), 986–1000, 2011.
3. Tans, R., Bande, R., van Rooij, A., Molloy, B. J., Stienstra, R., Tack, C. J., Wevers, R. A., Wessels, H. J. C. T., Gloerich, J., & van Gool, A. J. (2020). Evaluation of cyclooxygenase oxylipins as potential biomarker for obesity-associated adipose tissue inflammation and type 2 diabetes using targeted multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102157> <<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102157>> .
4. Billy J. Molloy, 脂氧化物的靶向UPLC-MS/MS分析, 沃特世应用纪要, 720007030ZH. 2020年.
5. Schmidt R, Coste O, Geisslinger G. LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E2 and D2 in microdialysis samples of rats. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 826(1–2), 188–197 (2005).
6. Gandhi, A. S., Budac, D., Khayrullina, T., Staal, R., & Chandrasena, G. (2017). Quantitative analysis of lipids: A higher throughput LC-MS/MS-based method and its comparison to ELISA. *Future Science OA*, 3(1). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0067> <<https://doi.org/10.4155/fsoa-2016-0067>> .
7. 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>> .
8. A. Lister, Chapter 7 - Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis, *Separation Science and Technology*, Vol.6, Academic Press, 2005, [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80051-0](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80051-0) <[https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80051-0](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80051-0)> .

特色产品

[ACQUITY Premier系统](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

Xevo MRT质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/xevo-mrt.html>>

waters_connect软件解决方案 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect.html>

720008647ZH, 2024年12月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)