

# 基于SCIEX X500R QTOF系统全面分析鲜牛奶与母乳中脂质

## Rapid Characterization of the Cow Milk and Human Breast Milk Lipidome using High Resolution Mass Spectrometry X500R System

徐晓燕 ( Xu Xiaoyan ) ; 刘婷 ( Liu Ting )  
SCIEX China

**Key Words:** Cow Milk, Human Breast Milk, Lipidome, X500R

### 引言

“每天1杯奶，强壮一代人”，可见牛奶对大众生活的重要性。市售的鲜牛奶有多种，不同品牌，甚至同一品牌，不同产地与工艺，市售价格有不同。这些牛奶在脂质成分和含量上，具体有什么不同，与母乳的差异在哪里<sup>[1]</sup>，是一个难题。液相色谱质谱联用技术在分析复杂样品，多组分同时定性定量的分析的优势日益突出，广泛应用于越来越多的分析检测难题。

SCIEX X500R QTOF系统，可以在复杂基质中进行高灵敏度、高分辨、高质量准确质荷未知化合物分析，结合智能化的TOF MS-IDA-MS/MS采集模式，可真正实现一针进样即可采集到高质量的一级与二级质谱数据。结合 MS-DIAL 软件<sup>[2,3]</sup>，快速高效地提供最准确地脂质定性定量分析结果。本实验利用SCIEX X500R QTOF系统建立牛奶及母乳脂质非靶向测定方法，进行脂质鉴定与定量分析，为牛奶及母乳的营养成分质量评价提供方法；同时从脂质种类，含量，不饱和度等多个维度分析比较3种奶的差异。

### 实验设计

- 1、查阅文献，确定合适的前处理条件
- 2、利用SCIEX OS方法模板快速建立LC-MS/MS方法，通过TOF-IDA-MS/MS模式采集数据，可以实现一针进样，实时采集化合物的一级母离子和二级子离子。同时利用SWATH功能采集质控样本MS2，提高MS2覆盖度。
- 3、利用MS-DIAL软件，结合脂质数据库，分析QTOF采集MS及MS/MS数据，定性定量分析脂质。
- 4、通过MarkerView™软件，可以非靶向或者靶向分析样品，快速进行样品差异分析，发现潜在标志物。



SCIEX ExionLC™ 液相系统/SCIEX X500R QTOF系统/ SCIEX OS软件

### 材料与方法

本试验购买了A品牌鲜牛奶（A样品）、B品牌鲜牛奶（B样品）、母乳（C样品）。

### 前处理方法

前处理方法参考文献<sup>[4]</sup>，取0.1 ml牛奶，加0.9 ml超纯水，4 ml 二氯甲烷:甲醇2:1，室温混匀10 min，离心10 min（3000 r·min<sup>-1</sup>，如果分层不好，多离心一会儿），吸取下层2 ml至新的离心管，N<sub>2</sub>下吹干，用甲醇:二氯甲烷1:1（含10 mM乙酸铵）1 ml复溶，离心取上清，稀释10倍后装入进样瓶进行LC-MS/MS分析。

### LC-MS/MS分析

液质联用系统：SCIEX ExionLC AD联用X500R QTOF系统，色谱柱Kinetex C18 column（100×2.1 mm，2.6 μm）流动相：A相水:甲醇:乙腈（3:1:1含5 mM 乙酸铵）；B相 异丙醇（含5 mM 乙酸铵）。液相条件见表1，LC方法梯度见表2，质谱参数见表3。

表1. 液相条件。

参数	设定值
流速	0.4 ml/min
自动进样器控温	8 °C
进样体积	1 µL
柱温	60 °C

表2. 液相梯度洗脱程序。

Time ( min )	B%
0.0	20
0.5	20
1.5	40
3	60
13	98
13.1	20
17	20

表3. 质谱参数。

参数	设定值
MS扫描范围	100-1200
MS/MS扫描范围	100-1200
扫描方式	TOF-IDA-MS/MS & SWATH
TOF MS accumulation time	150 ms
TOF MS/MS accumulation time	40 ms
Collision energy	45
Collision energy spread	20
CUR	35
GS1	60
GS2	60
TEM	500
DP	80
ISVF (Positive)	5500
ISVF (Negative)	-4500

## 质谱参数设置一目了然

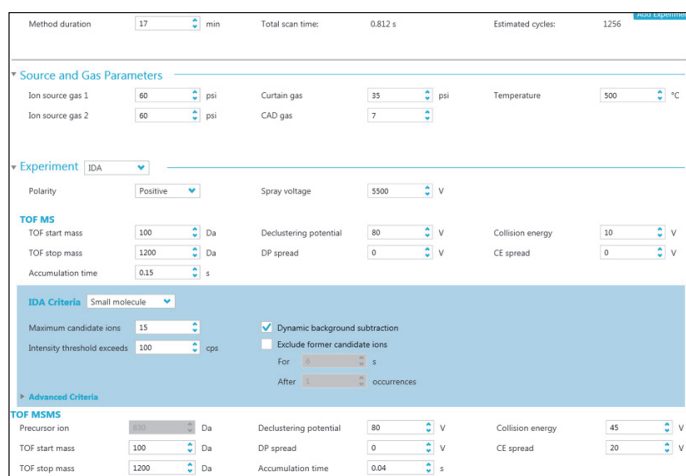


图1. TOF MS-IDA-TOF MS/MS方法编辑。

## 色谱图

A样品, B样品, C样品总离子流图 (TIC), 如下图2所示:

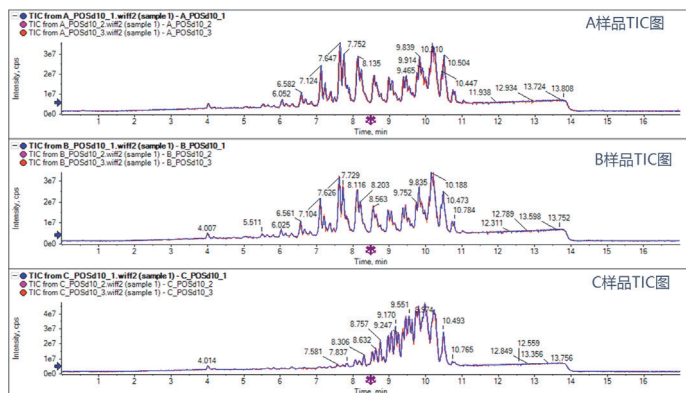


图2. ABC样品TIC (3个样本, 3次重复进样, 保留时间RT以及峰强度的稳定性均良好, 仪器具有很好的稳定性及重现性)。

从TIC图上可以看出, 牛奶A和B主要成分上并没有非常明显的差异, 母乳和牛奶样品在主成分含量和种类差异明显。MarkerView软件同时验证, A与B差异小, AB与C差异大。

## 脂质鉴定

使用MS-DIAL软件 (版本号3.98) 处理TOF-MS及MS/MS数据。

A, B, C三种样品在正离子模式和负离子模式下总共鉴定到671种脂质（见表4）。MS-DIAL软件在自动查找峰，保留时间对齐，结合谱库MS/MS及保留时间进行脂质定性分析，同时提供同分异构体手动确认功能，大约1小时完成脂质鉴定。

表4. A, B, C三种样品脂质鉴定结果汇总。

脂质种类	数目
Free fatty acid (FFA)	74
Phosphatidylcholine (PC)	60
Phosphatidylethanolamine (PE)	75
Phosphatidylserine (PS)	17
Phosphatidylinositol (PI)	13
Monoacylglycerol (MAG)	22
Diacylglycerol (DAG)	107
Triacylglycerol (TAG)	240
Cholesteryl ester (CE)	5
Sphingomyelin (SM)	11
Ceramide (Cer)	13
Hexosylceramide (HexCer)	14
Dihexosylceramide(Hex2Cer)	20

从鉴定结果可以看出，AB含较多奇数链、短链C<14、饱和度较高的脂肪酸组成的DAG与TAG；C中含较多偶数链、中长链、多不饱和脂肪酸组成的TAG。检测C样本发现二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA) (FFA 22:4)含量较高，与样本提供者沟通发现哺乳期间一直在补充DHA。母乳中基本不含有PC 18:1-18:1，类似情况在TAG/DAG/PE中均存在，母乳中含不饱和度较高的脂肪酸(18:2-18:3)的脂质比例较牛奶中高。

### 脂质定量与统计分析

利用MS-DIAL将鉴定结果与峰面积导入MarkerView统计分析软件，进行无监督性地PCA分析，得到其Score和Loading图（见图3）。从图中可以看出，AB之间差异小（PC2为1.8%），AB与C差异大（PC1 97.8%）。主要差异化合物TAG，不饱和度高的TAG 母乳>牛奶（见图4 Heatmap），饱和度高的TAG 母乳<牛奶，牛奶A和B样品，主要体现为FFA含量差异。

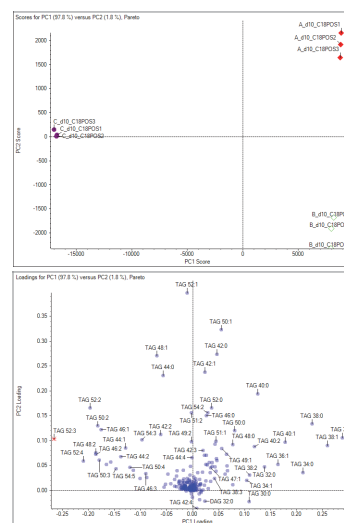


图3. A、B、C样品脂质鉴定结果PCA分析（上图为Score图，下图为Loading图）。

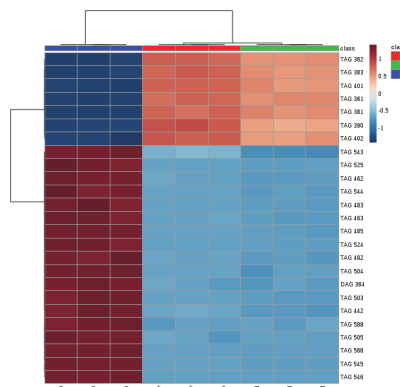


图4. 差异最大的前25个组分Heatmap分析。

### 总结

X500R高分辨率液质联用同时采集高分辨一级与二级数据，结合SWATH®功能，可以采集到所有脂质的MS2，利用MS-DIAL软件进行脂质定性定量分析，整个流程方便快捷。利用SCIEX QTOF系统建立牛奶及母乳脂质分析的方法，同时从脂质种类，含量，不饱和度等多个维度分析比较3种奶的差异，母乳中含较多不饱和度中长链脂肪酸组成的脂质，利于消化吸收。不同品牌的牛奶脂质种类与含量差异不大，但是脂肪酸含量与种类有差异。

## 参考文献

1. GARWOLIŃSKA D, HEWELT-BELKA W, NAMIEŚNIK J, et al. Rapid Characterization of the Human Breast Milk Lipidome Using a Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Approach[J]. Journal of Proteome Research, 2017,16(9):3200-3208.
2. HIROSHI TSUGAWA A H K I. High-Throughput Lipid Profiling with SWATH® Acquisition and MS-DIAL[J]. 2019.
3. TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis[J]. Nature Methods, 2015,12(6):523-526.
4. LIU Z, MOATE P, COCKS B, et al. Comprehensive polar lipid identification and quantification in milk by liquid chromatography–mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2015,978-979:95-102.

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。AB SCIEX™ 商标经许可使用。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10824-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

上海公司及中国区应用支持中心  
地址：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

广州分公司  
地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：sciex.com.cn 官方微信：ABSciex-China