Skyline 小分子方法开发与 CE 优化

Skyline 靶向质谱环境能直观呈现导入 Skyline 文档的原始质谱仪数据信息。Skyline 最初系为蛋白质组学应用而开发，其应用范畴现已延伸到普遍分子领域。本教程探讨使用 Skyline 进行小分子的靶向定量。

在本教程中，您将了解如何为 LC-MS/MS（三重四极杆）中的所选能量代谢物制定多元方法。通过分析该数据集，您将了解：

- 基于三重四极杆质谱仪 (TQMS) 的靶向定量工作流
- 以推定的相关分子（收集这些分子使用的三重四极杆质谱仪来自于不同的仪器供应商）的已发布离子对列表作为切入点
- 使用该列表中的碰撞能量 (CE) 值构建未安排时序的 Skyline 方法
- 使用未安排时序的方法创建测量出保留时间的已安排时序方法
- 使用已安排时序的方法创建优化了 CE 值的已安排时序最终方法

您还可以查看本教程所依据的第 16 堂 Skyline 教程网络研讨会的后半部分。

Skyline 旨在提供一个不区分质谱仪供应商且可用于靶向定量质谱研究的平台。该平台可以导入在不同仪器供应商的质谱仪上采集的原始数据， 例如 Agilent、SCIEX、Bruker、Shimadzu、Thermo-Scientific 和 Waters。通过导入不同仪器平台的数据，可极大地促进不同仪器之间的比较和多站点研究。这种方法在蛋白质组学领域已使用多年，因此在将其用于目标小分子时同样奏效。

如果您尚未观看过“Skyline 小分子目标”教程，请现在查看教程，以掌握一些有关 Skyline 如何处理小分子描述（包括化学公式和加合物）的基础知识。

入门指南

要开始本教程，请下载下列 ZIP 文件：

https://skyline.ms/tutorials/SmallMoleculeMethodDevAndCEOptimization.zip

将文件解压到您电脑上的某个文件夹，比如：

C:\Users\bspratt\Documents

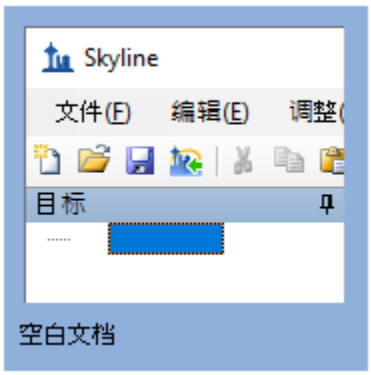
该操作将创建一个新文件夹：

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMolMethodCE

其中将包含本教程所需的所有文件。

如果您在开始学习本教程之前就一直在用 Skyline，最好将 Skyline 恢复为默认设置。要恢复默认设置：

- 启动 Skyline。
- 在**起始页**上单击**空白文档**，显示如下：

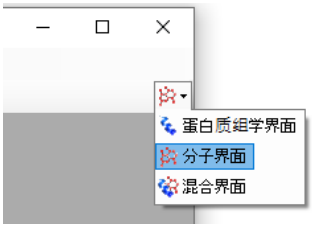


- 在**设置**菜单中单击**默认值**。
- 在询问您是否保存当前设置时，单击表单上的**否**。

该 Skyline 实例中的文档设置现已重置为默认值。

由于本教程涵盖小分子主题，您可以执行以下操作来选择分子界面：

- 单击 Skyline 窗口右上角的用户界面控件，然后单击类似于如下的**分子界面**：



Skyline 将在分子模式下运行，Skyline 窗口右上角 随之显示分子图标 。原始蛋白质组学菜单和控件现已隐藏，便于您专心从事小分子分析。

将小分子离子对列表导入 Skyline 文档

本教程中的离子对列表来自于高速 HILIC 方法，其依据为 Guder 等人，《分析化学》，2017 年 2 月 7 日；89(3):1624-1631。然后，结合使用 Acquity UPLC 与 Waters Xevo TQ-S 三重四级杆质谱仪，收集本教程中使用的原始数据。

以下就是发布的离子对列表：

Functional Category	Metabolite	KEGG id	Q1 -12C	Q3-12C	Q1-13C	Q3-13C	CE	Mode
Central Metabolism	a-Ketoglutaric acid	C00026	145	101	150	105	5	Negative
Central Metabolism	Phosphoenolpyruvate	C00074	167	79	170	79	29	Negative
Central Metabolism	Dihydroxyacetone-P	C00111	169	79	172	79	29	Negative
Central Metabolism	Pentose-P	C00199	229	79	234	79	45	Negative
Central Metabolism	Hexose-P	C01094	259	79	265	79	53	Negative
Central Metabolism	Seduheptulose 7-P	C05382	289	97	296	97	17	Negative
Central Metabolism	Fructose-1,6-Bisphosphate	C00354	339	241	345	247	16	Negative
Central Metabolism	UDP-N-acetyl-D-Glucosamine	C00043	606	385	623	394	29	Negative
Central Metabolism	Acetyl-CoA	C00024	808	408	831	418	37	Negative
Cofactor metabolism	NAD	C00003	662	540	683	555	20	Negative
Cofactor metabolism	NADP	C00006	742	620	763	635	20	Negative
Nucleotide metabolism	Orotate	C00295	155	111	160	115	9	Negative
Nucleotide metabolism	Dihydroorotate	C00337	157	113	162	117	5	Negative
Nucleotide metabolism	UDP	C00015	403	79	412	79	69	Negative
Amino acid metabolism	GABA	C00334	104	69	108	73	37	Positive
Amino acid metabolism	Phenylpyruvic acid	C00166	165	95	174	101	13	Positive
Amino acid metabolism	Diaminopimelic acid	C00666	191	128	198	134	13	Positive
Central Metabolism	D-Alanyl-Alanine	C00993	161	44	167	46	13	Positive
Cofactor metabolism	D-Pantothenic acid	C00864	220	90	229	93	13	Positive
Cofactor metabolism	Oxidized glutathione	C00127	613	355	633	365	25	Positive
Nucleotide metabolism	Hypoxanthine	C00262	137	55	142	57	37	Positive
Nucleotide metabolism	Guanine	C00242	152	110	157	114	21	Positive
Nucleotide metabolism	UMP	C00105	325	97	334	102	17	Positive
Nucleotide metabolism	cAMP	C00575	330	136	340	141	29	Positive
Nucleotide metabolism	AMP	C00020	348	136	358	141	21	Positive
Nucleotide metabolism	ADP	C00008	428	136	438	141	37	Positive
Nucleotide metabolism	UTP	C00075	485	97	494	102	21	Positive
Nucleotide metabolism	ATP	C00002	508	136	518	141	37	Positive

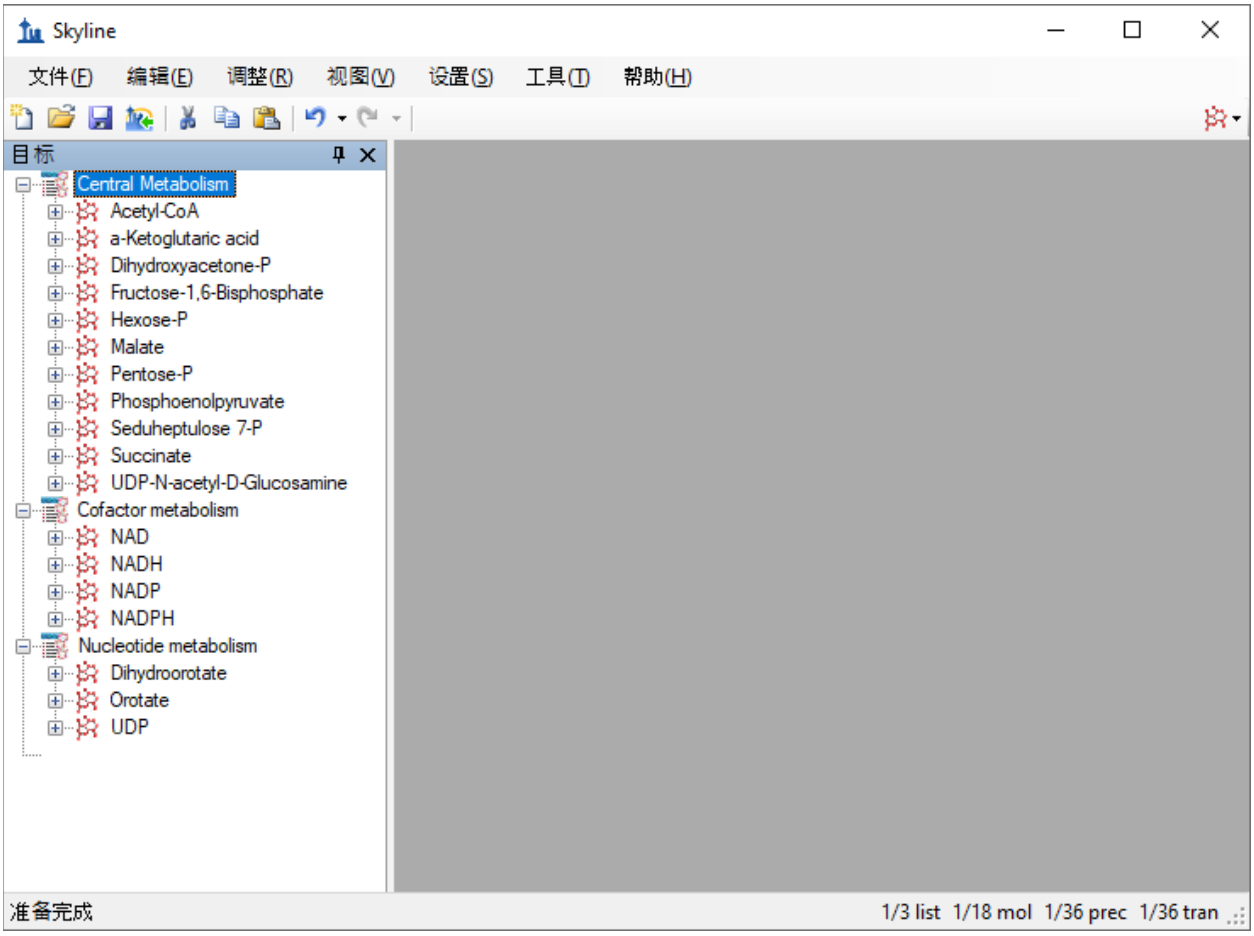
它提供有关轻母离子 (12C)、重母离子 (13C)、片段离子*质荷比*以及每个分子电荷的信息。本教程中仅使用负离子模式条目。碰撞能量 (CE) 值来自 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪。与过去收集所使用数据文件的操作一样，即便您要为 Waters Xevo TQ-S 制定新方法，也要将这些作为切入点。

您只需在 Excel 或其他电子表格编辑器中略施操作，就能重新格式化上表，以便 Skyline 进行读取。例如，每个离子对的重母离子和轻母离子应位于仪器离子对列表中的不同行。在本教程开始时创建的文件夹包含的“Energy_TransitionList.csv”文件内，可以找到此重新格式化的结果。

由于“Energy_TransitionList.csv”文件格式化为包含 Skyline 能够识别的列标题，因此您可以通过菜单选项**编辑** > **插入** > **离子对列表**来绕过**插入离子对列表**表单，直接将所有信息（包括标题行）粘贴到 Skyline **目标**视图中。若要这样做，请执行下列步骤：

- 从 Excel 或任何文本编辑器中，打开本教程开始时创建的文件夹包含的“Energy_TransitionList.csv”文件。
- 先进行**全选** (Ctrl-A)，然后进行**复制** (Ctrl-C)。确保已包含标题行。
- 切换回 Skyline，然后在**编辑**菜单上单击**粘贴** (Ctrl-V)。

此时 Skyline 窗口将显示如下：

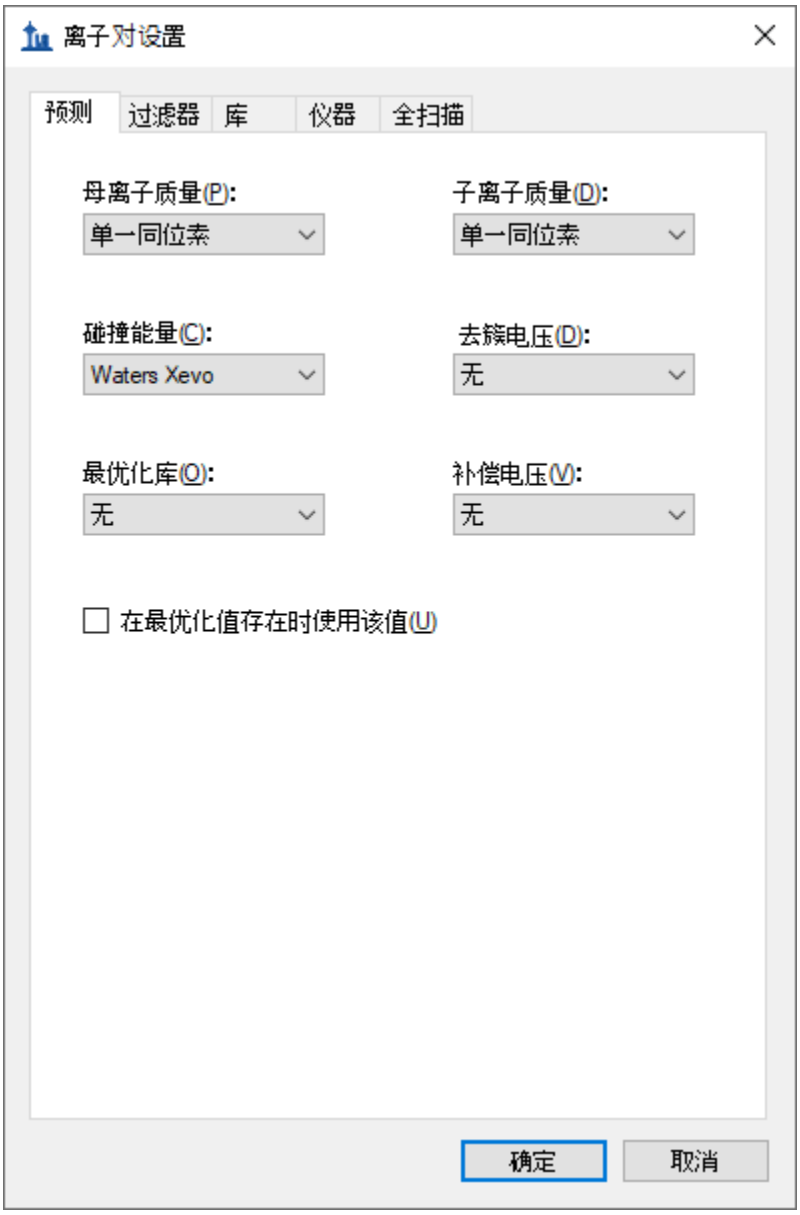


注：在本教程中，您仅提供这些目标的*质荷比*和电荷值。 Skyline 可以接受更高级别的描述，包括化学公式和重同位素标记等。提供化学公式对于处理全扫描、高分辨率数据特别有用，因为它支持由 Skyline 计算同位素分布；但是，对于这样的 SRM 数据，使用*质荷比*和电荷便足矣。

离子对设置

接下来，您将执行以下步骤来更新**离子对设置**，以匹配本教程中的仪器方法和质谱仪实验结果：

- 在**设置**菜单中单击**离子对设置**。
- 在**预测**选项卡上的**碰撞能量**下拉列表中，选择“Waters Xevo”。



稍后，您将在 Waters Xevo 中执行碰撞能量优化，这是方法制定和优化过程的一部分，因为从文中粘贴的起始碰撞能量最初用于 Agilent 仪器上。

- 单击**过滤器**选项卡。
- 在**母离子加合物**和**片段加合物**字段中，将文本更改为“[M-]”。

您在离子对设置中已指出，此实验仅测量负电荷离子对。Skiline 加成物描述支持任何类型的电离描述（“[MH]”、“[M+Na]”等），其中包括未知的电离模式（此处使用的“[M-]”表示“负离子模式，电荷 1，没有任何已知的化学成分用于解释它”）。在**离子类型**字段中，值“f”表示将仅测量片段离子的离子对。如果还想测量母离子，则可以使用“f，p”。

- 单击**确定**按钮。

其余三个选项卡的状态则为不适用（**库**和**全扫描**）或已设置可以接受的默认值（**仪器**）。

现在按如下方式保存当前的 Skyline 文档：

- 在**文件**菜单中，单击**保存** (Ctrl-S)。
- 导航到您创建的 SmallMolMethodCE 文件夹。
- 在**文件名**字段中输入“EnergyMet”。
- 单击**保存**按钮。

导出未安排时序的方法

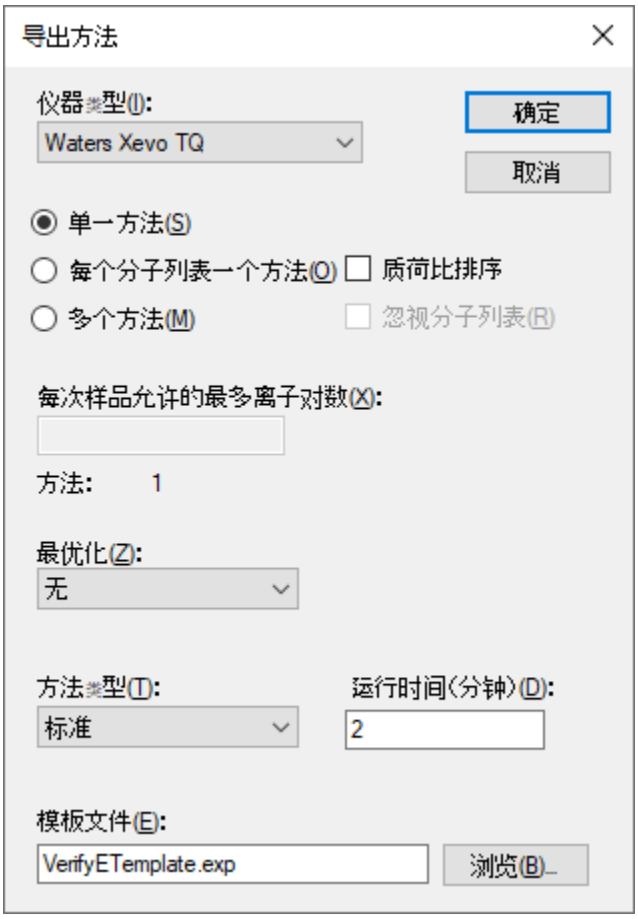
通常来说，如果在运行 Skyline 的电脑上安装了用于质谱仪的仪器控制软件，则 Skyline 可以使用指定的模板方法文件导出为原生仪器方法。某些 Thermo 仪器要求在仪器控制电脑上完成这项操作。

如果尚未安装 Waters MassLynx，可跳至下一节 - “导出离子对列表”。

否则会导出两种方法，其中一种方法需要 2 分钟，另一种方法需要 5 分钟，如下所示：

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**方法**。
- 在**仪器类型**下拉列表中选择“Waters Xevo TQ”。
- 在**运行时间**字段中输入“2”。
- 单击**浏览**按钮，然后选择教程文件夹中的“VerifyETemplate.exp”。

导出方法表单现在应显示如下：



- 单击**确定**按钮。
- 将该方法另存为“EnergyMet_2minutes”。
- 重复执行上述步骤，将“运行时间”更改为 5，然后另存为“EnergyMet_5minutes”。

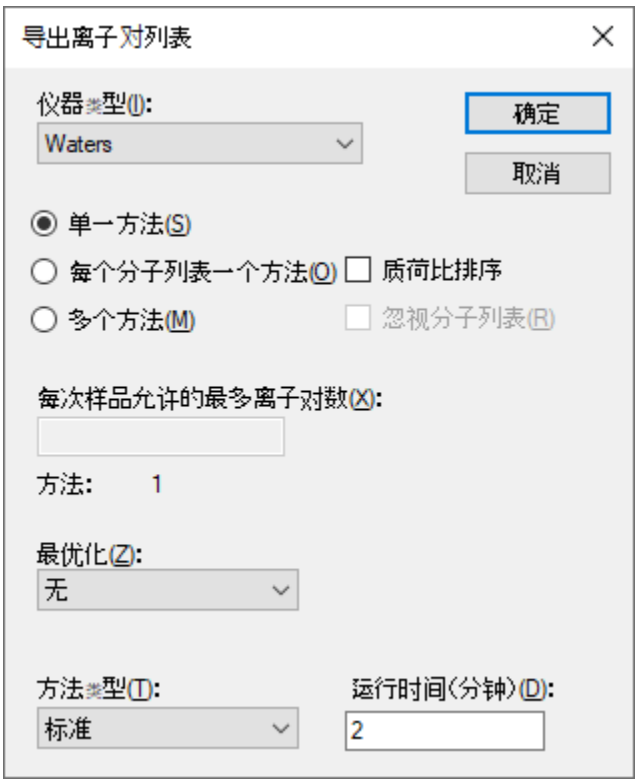
导出未安排时序的离子对列表

如果您的电脑上没有必备的仪器供应商软件用来直接导出到仪器方法文件，则可以导出特定于仪器的离子对列表，日后再用供应商软件将其导入仪器方法。导出离子对列表的步骤与导出未安排时序方法的步骤非常相似，不同之处在于没有模板文件：

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**离子对列表**。
- 在**仪器类型**下拉菜单中，Skyline 会根据您之前在**离子对设置 - 预测**选项卡中设置的**碰撞能量**值自动选择“Waters”。

- 在**运行时间**字段中输入“2”。

导出方法表单现在应显示如下：



- 单击**确定**按钮。
- 将该离子对列表另存为“EnergyMet_2minutes.csv”。
- 重复执行上述步骤，将“运行时间”更改为 5，然后另存为“EnergyMet_5minutescsv”。

导入质谱仪运行

此时，您将以 2 分钟和 5 分钟的梯度时间来收集样品数据。本实验中使用的样品来自市售试剂盒，是从大肠杆菌提取的轻：重代谢物按照 1:1 的比例混合而成（来自 Cambridge Isotope Laboratories 且通过认证的大肠杆菌裂解液）。

两次的质谱仪运行结果位于本教程开始时创建的文件夹下的“Unscheduled”子文件夹中。名称中包含“01a”的文件以 2 分钟的梯度时间收集，名称中包含“02a”的文件以 5 分钟的梯度时间收集。您要检查这些结果，以确定哪个梯度时间对该实验最为有效。

执行以下步骤，将这些文件导入您创建的文档中：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 在**导入结果**表单中，可以使用默认的**导入单项注射重复测定**选项。在**要同时导入的文件**下拉列表中，确保选择“许多个”以并行导入两个文件。
- 单击**确定**按钮。
- 导航到“Unscheduled”子文件夹，然后同时选定这两个文件。

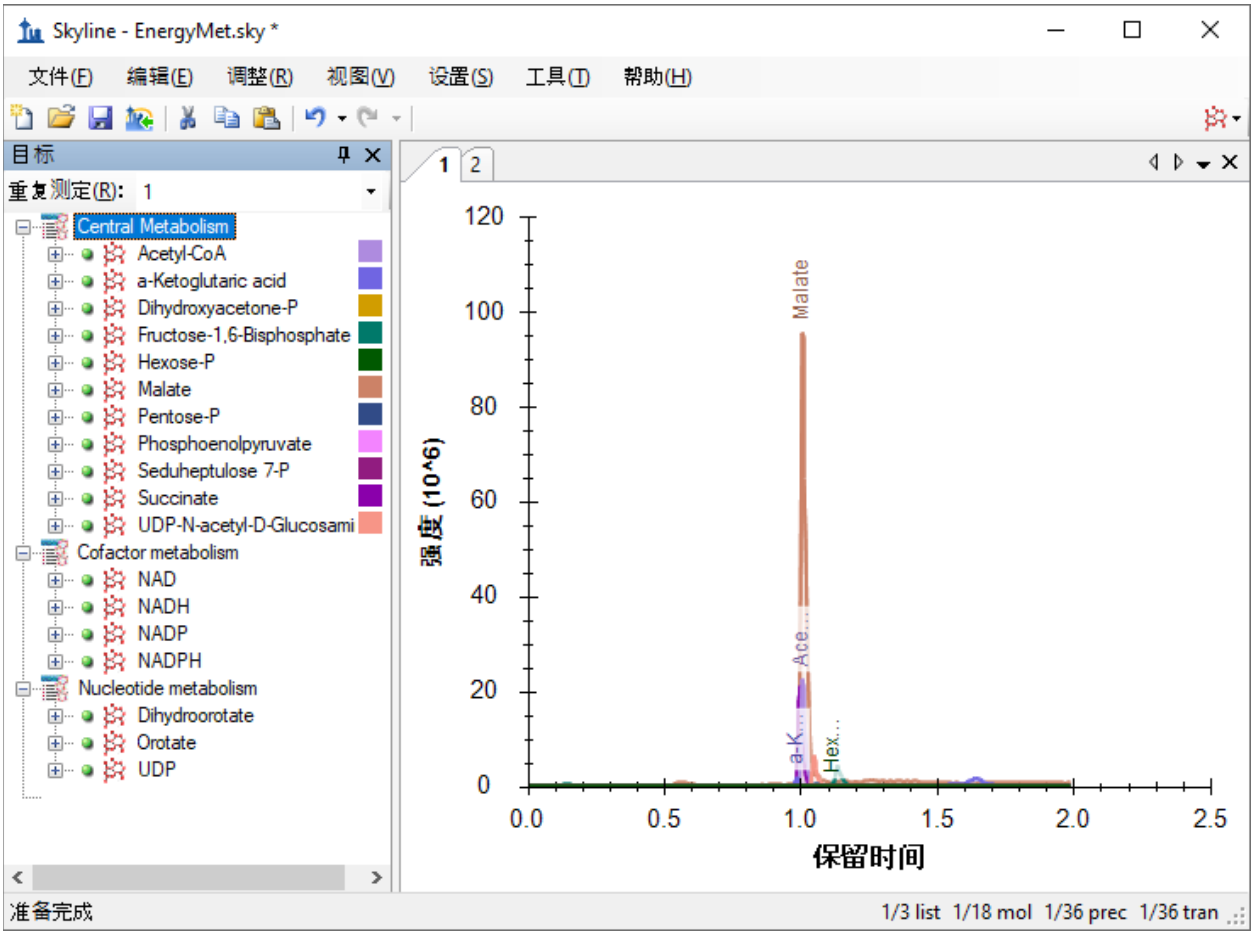
导入结果文件表单应显示如下：

- 单击**打开**按钮。

Skyline 会注意到这些文件名含有共同的前缀和后缀，并显示以下表单：

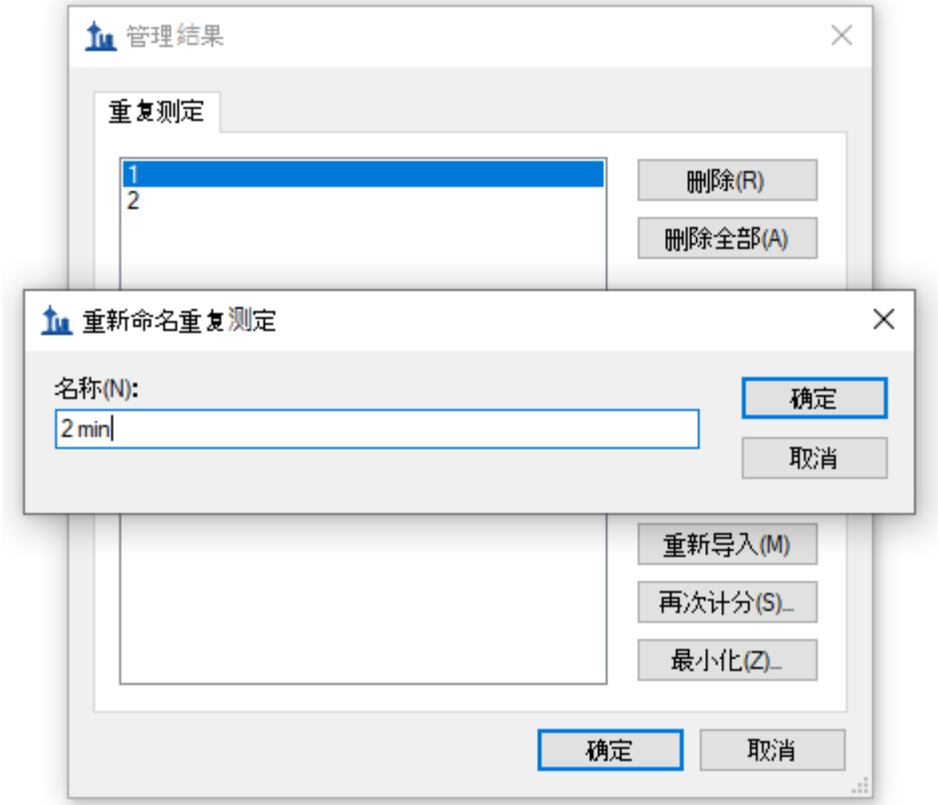
- 单击**确定**按钮，以接受缩短后的重复测定名称“1”和“2”。

这些文件应相对快速地导入，您的 Skyline 主窗口将显示如下：



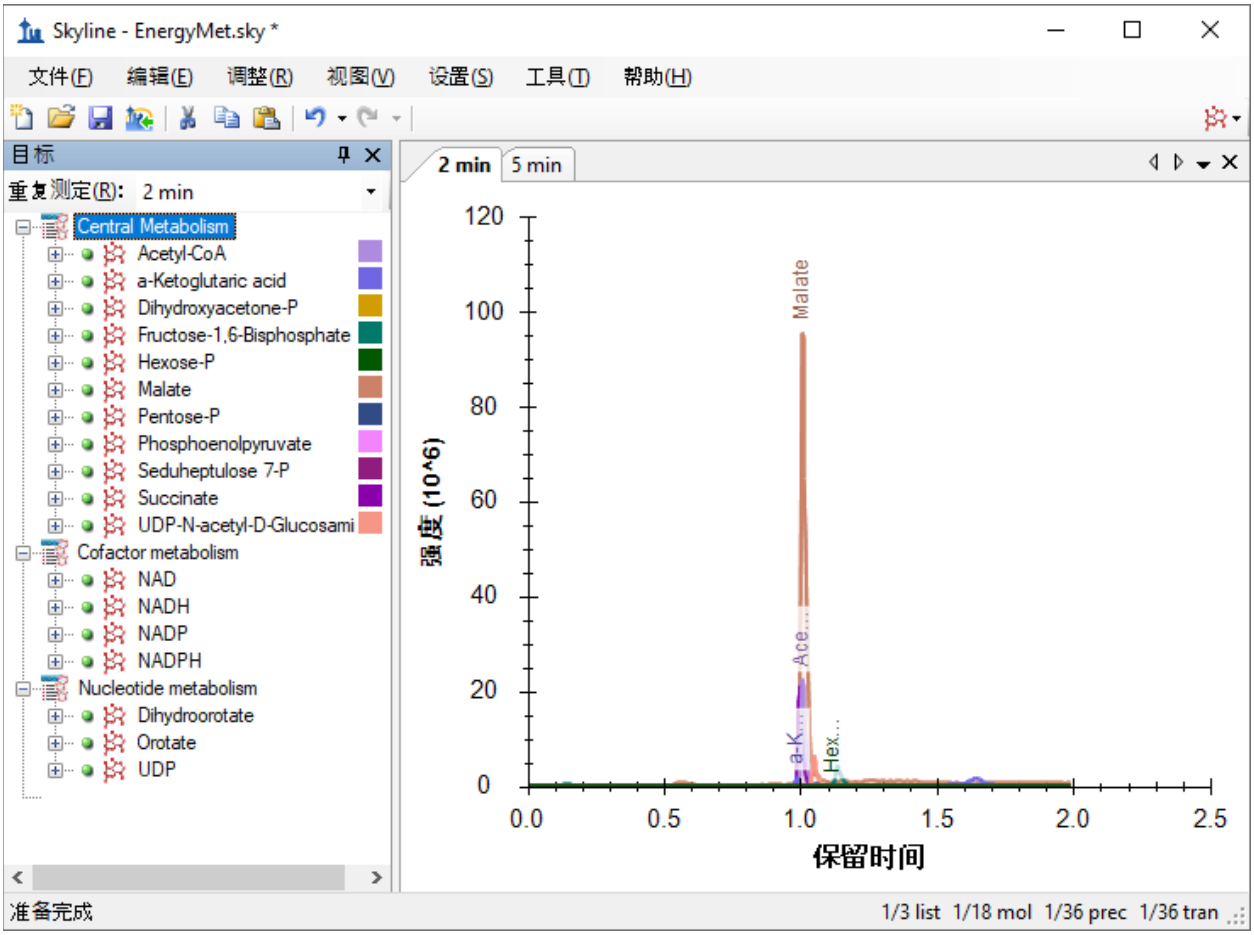
重复测定名称“1”和“2”不是很有意义，但是您可以执行以下操作，将它们更改为更具描述性的名称：

- 在**编辑**菜单中，选择**管理结果**。
- 双击第一个重复测定“1”（或选择并单击**重命名**按钮）。
- 在**重命名重复测定**表单的**名称**字段中，输入“2 min”。



- 单击**确定**按钮。
- 重复上述步骤，将重复测定名称“2”更改为“5 min”。
- 在**管理结果**表单中，单击**确定**按钮。

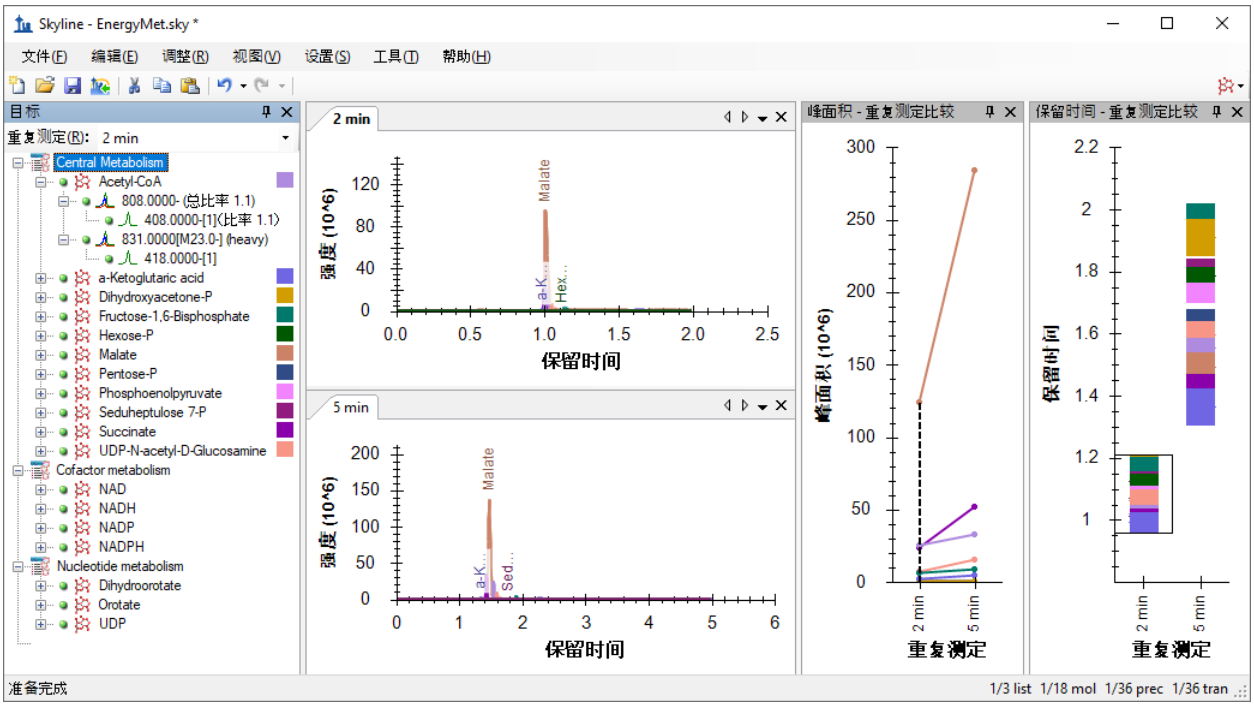
执行该操作后，Skyline 主窗口应显示如下：



要利用 Skyline 摘要图在一个屏幕上查看多个重复测定的统计信息，请执行以下操作：

- 在**视图**菜单中选择**峰面积**，并单击**重复测定比较** (F7)。
- 在**视图**菜单中选择**保留时间**，然后单击**重复测定比较** (F8)。
- 单击**重复测定比较**图的标题栏，然后将其拖放至 Skyline 主窗口的右边。
- 在**视图**菜单中选择**排列图**，然后单击**平铺** (Ctrl-T)。

Skyline 窗口将显示如下：



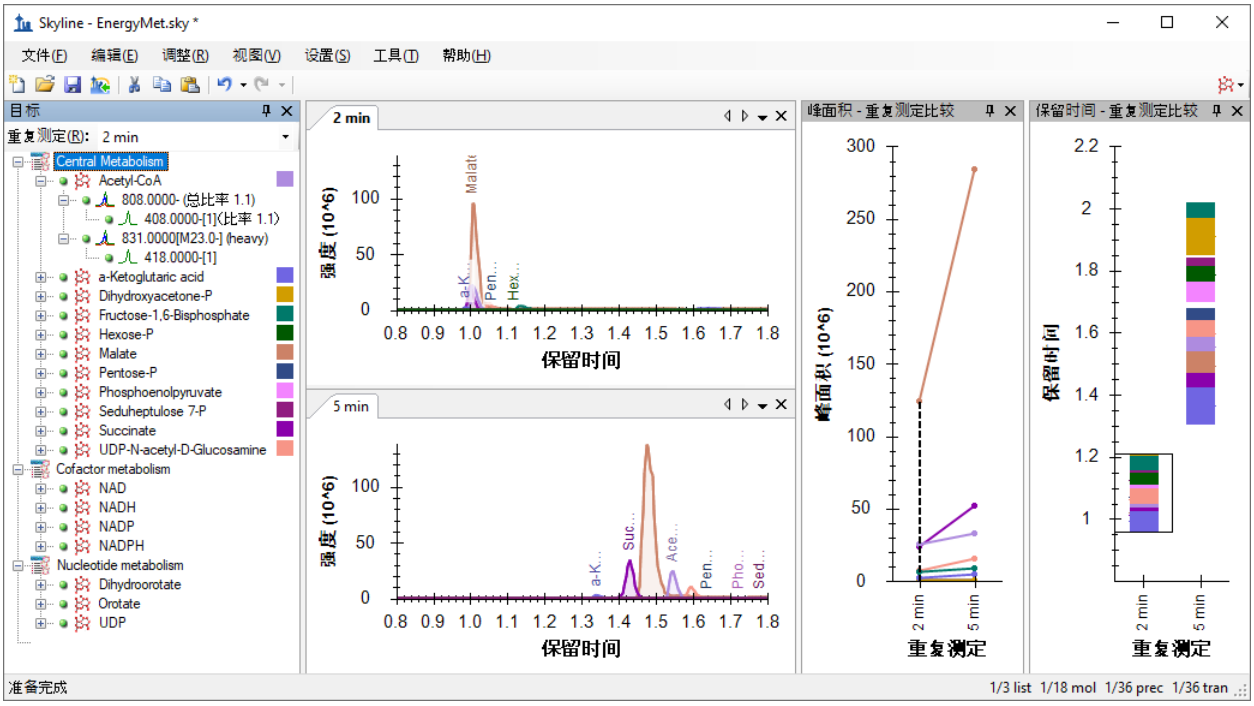
比较峰面积和分辨率

查看**峰面积 – 重复测定比较**视图，可以发现 5 分钟梯度时间的峰面积通常比 2 分钟梯度时间的峰面积大。您可以选择执行技术性重复测定，以确保这并非随机变化。在这种情况下，使用梯度时间为 5 分钟的方法时，虽然许多分析物显示出更高的峰面积，但并非全部都显示出更高的峰面积，这可能是由于分析物进行了更好的分离，以及离子抑制降低（也称为“基质效应”）。基于此，5 分钟的梯度时间对于本实验来说或许是更好的色谱选择。

仔细检查色谱峰也很有用：

- 右键单击任一色谱图，并确保已选中**同步缩放**。
- 在任一色谱图中单击并拖动，将时间范围从 0.8 分钟缩放至 1.8 分钟。

Skiline 将如下图显示，从中可以看到使用 5 分钟的梯度时提供的峰分离更出色。这一点不足为奇，再加上信号强度得到改善，这就证明了选择更长梯度时间的合理性。



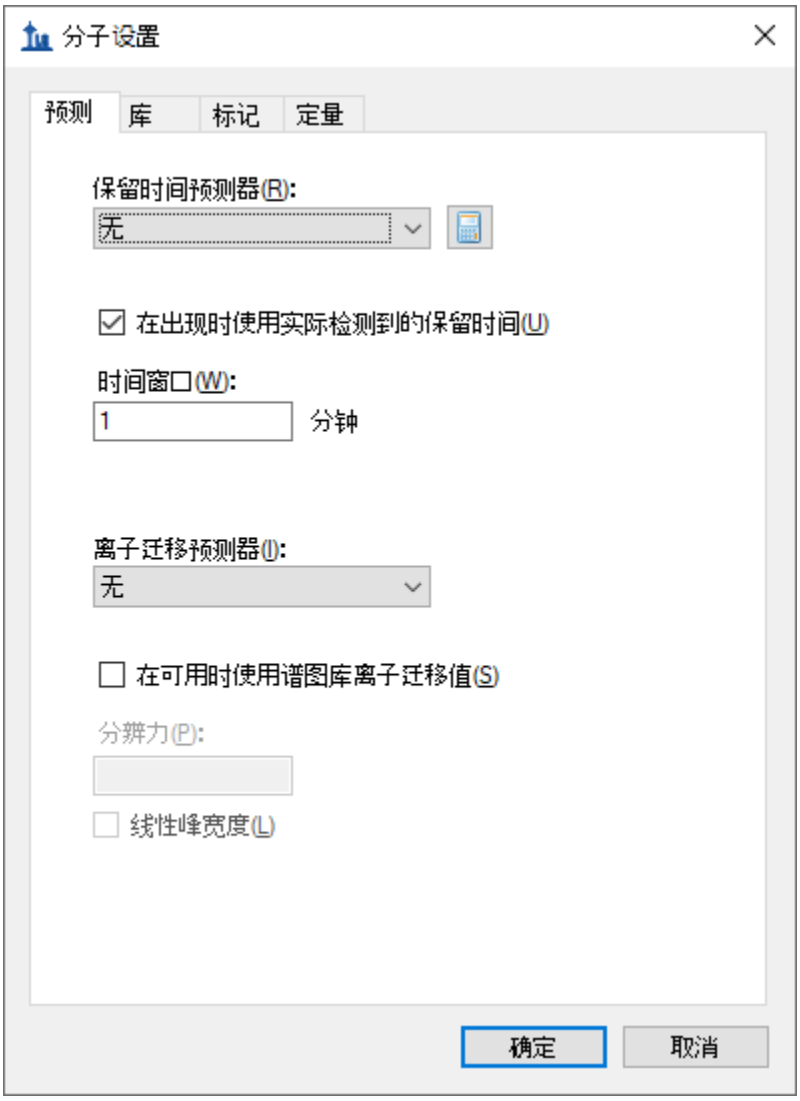
生成已安排时序的方法

确定 5 分钟的梯度时间后，现在可以生成已安排时序的方法或离子对列表。在本教程的其余部分中，假定您尚未安装 MassLynx 仪器控制软件，并且将生成离子对列表，而不是生成原生方法。根据上文介绍的仪器方法的创建方式，您可以在需要时使用模板方法进行替代。

首先设置一个保留时间窗口，该窗口将导出到离子对列表。

- 在**设置**菜单中单击**分子设置**。
- 单击**预测**选项卡。
- 确保选中**在出现时使用实际检测到的预测时间**。
- 在**时间窗口**字段中，对 1 分钟的时序安排窗口输入“1”。

分子设置表单现在应显示如下：

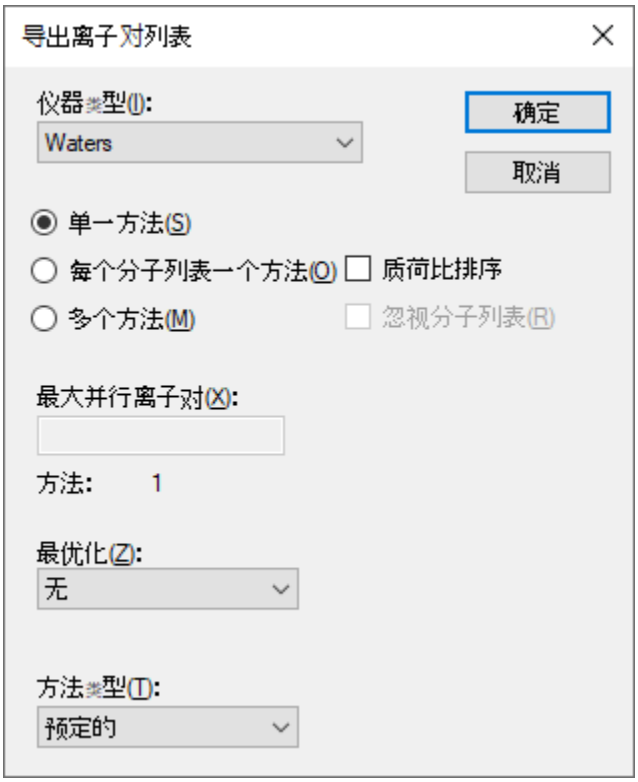


- 单击**确定**按钮。

现在可以按以下方式导出离子对列表文件：

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**离子对列表**。
- 在**仪器类型**下拉列表中，Skyline 应当会自动选择“Waters”。
- 在**方法类型**下拉列表中选择“预定的”。

执行此操作后，**导出离子对列表**表单应显示如下：

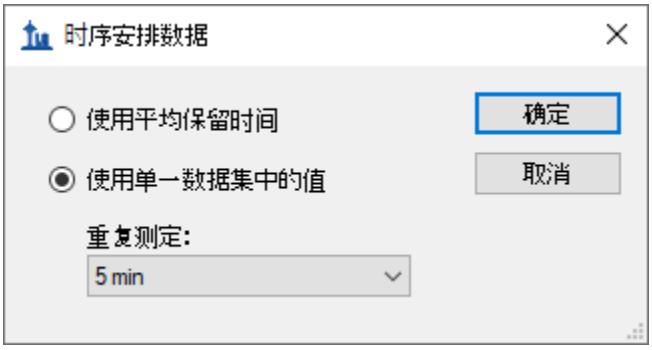


- 单击**确定**按钮。

系统将询问您要使用哪项重复测定进行洗脱。

- 单击**使用单一数据集中的值**。
- 在**重复测定**下拉列表中，选择“5 min”以安排 5 分钟的梯度时间。

时序安排数据表单应显示如下：



- 单击**确定**按钮。

系统将提示您输入离子对列表文件名。

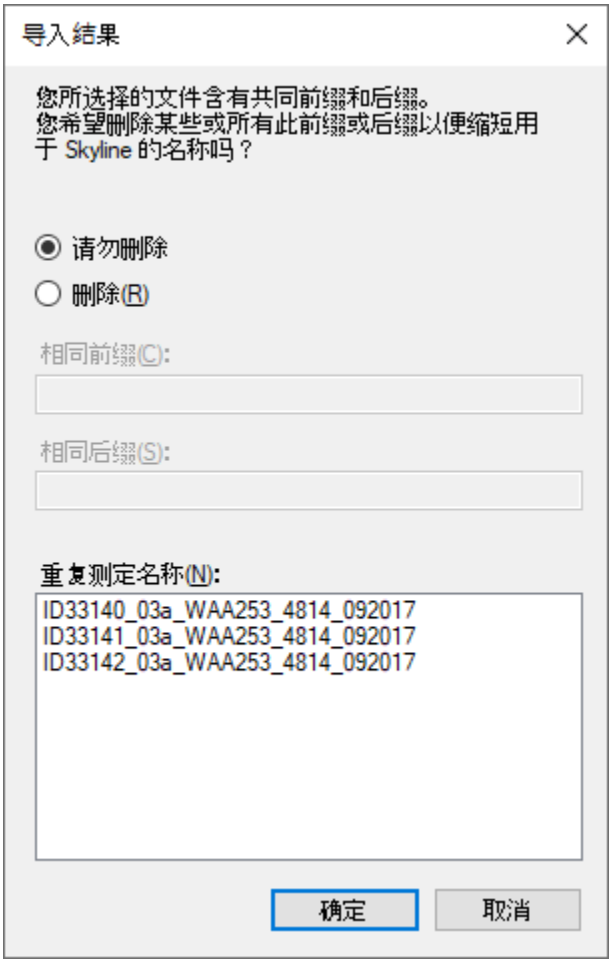
- 将该离子对列表另存为“EnergyMet_5minutes_scheduled.csv”。

收集和导入已安排时序的运行

现在您将使用已安排时序的新生成离子对列表来收集质谱仪上的新结果。本教程是在有着不同轻重比率的三次运行中收集的数据。混合比率有 1:1、1:2 和 2:1。要将这些运行导入文档中，请执行以下操作：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 单击**确定**按钮以接受默认设置。
- 导航至教程文件夹的“Scheduled”子文件夹，将三个文件全部选定。
- 单击**确定**按钮。
- 这一次，在 Skyline 提出简化重复测定名称时，选择**请勿删除**。

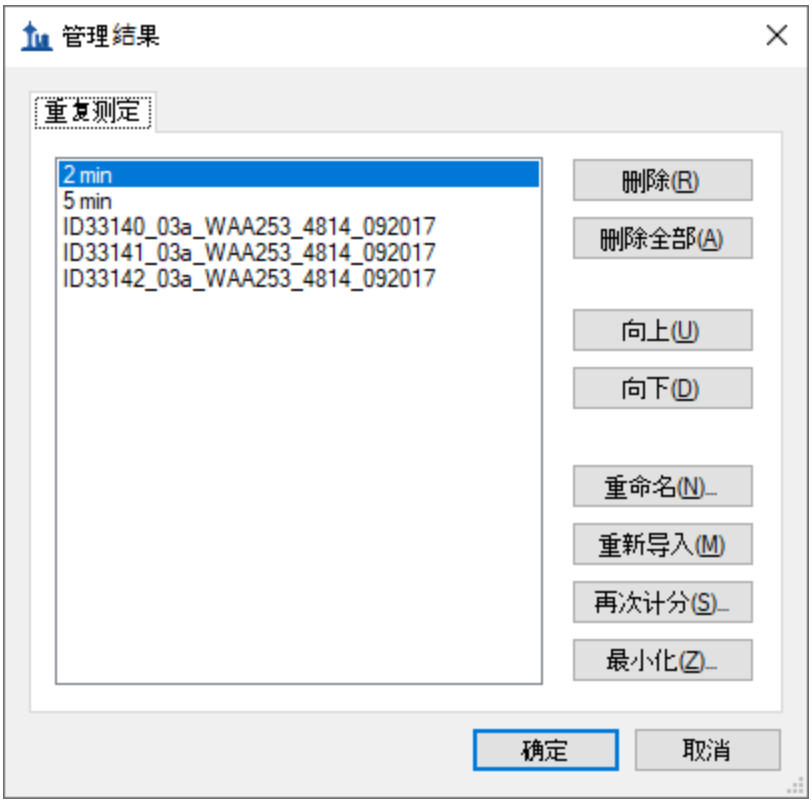
这样一来，**导入结果**表单将显示完整的文件名（已去除扩展名），与 Skyline 将使用的文件名保持一致，如下所示：



- 单击**确定**按钮。

以 2 分钟为梯度处理数据后，可按以下步骤将其从文档中删除：

- 在**编辑**菜单中，单击**管理结果** (Ctrl-R)。
- 选择“2 min”重复测定。



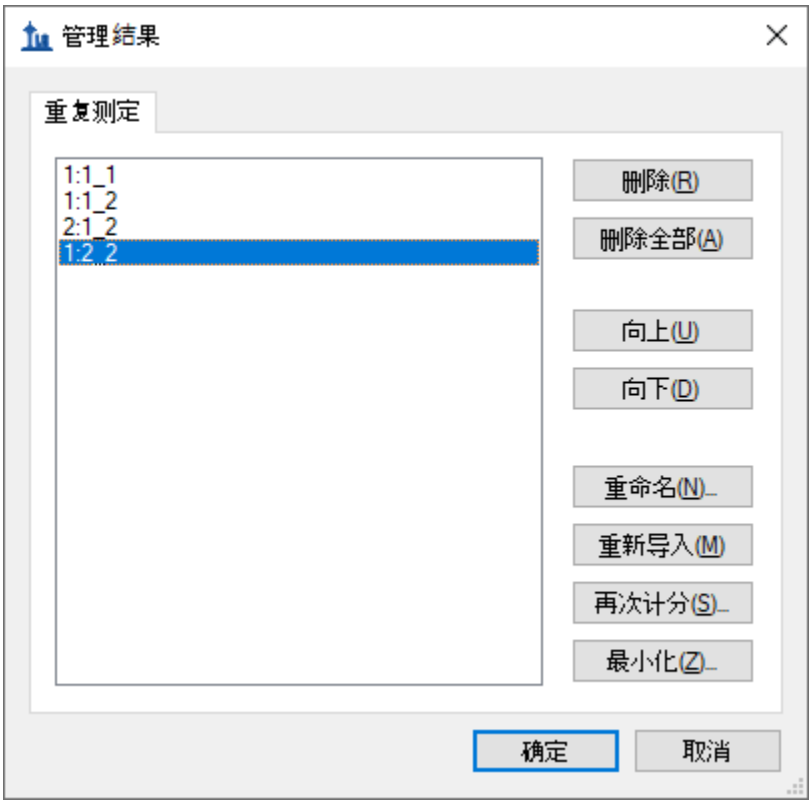
- 单击**删除**按钮。

现在按以下方式重命名其余 4 项重复测定：

- 双击“5 min”重复测定。
- 将其名称更改为“1:1_1”。（这种简短的命名约定显示了轻重离子对的混合比率和运行次数 - 不过日后可以使用您喜欢的命名方案。）
- 对于开头为“ID33140”、“ID33141”和“ID22142”的重复测定，将其他名称分别更改为“1:1_2”、“2:1_2”和“1:2_2”。

> 注：也可以使用包含**重复测定 > 重复测定名称**字段的自定义报告模板，在**文档网格**中完成重命名。

完成后，**管理结果**表单应显示如下：



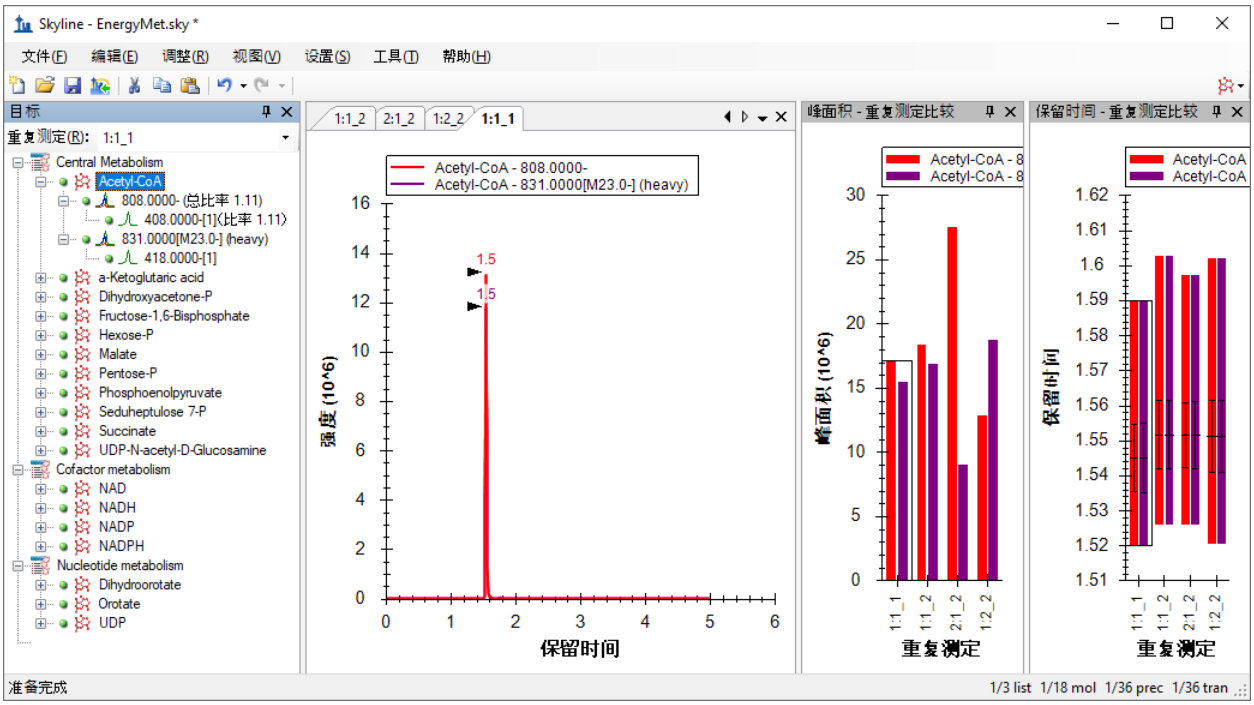
- 单击**确定**按钮。
- 在**视图**菜单中选择**排列图**，然后单击“选项卡式” (Ctrl-Shift-T)。

评估导入的运行

通过查看**峰面积 - 重复测定比较**视图，可以直观地确认样品的已知比率。

- 在**目标**视图中，选择“Acetyl-CoA”。
- 单击“Acetyl-Coa”及其两个子项（808 和 831）左侧的加号 (+)，将其展开，并查看下面的各个轻重离子对。

可以看到，这些峰面积的预期比率与已知的混合物比率相符。在**保留时间 - 重复测定比较**视图中还可以看到，在每次运行中的 1.55 分钟左右，Acetyl-CoA 洗脱呈稳定状态，尤其是在已安排时序的运行保持一致时。



评估响应中的线性度

您可以使用 Skyline 校准功能评估已知浓度比和积分色谱峰面积之间响应的线性度。

- 在**视图**菜单上，单击**文档网格** (Alt-3)。
- 在**文档网格**中，单击**报告**菜单，然后单击**重复测定**。
- 将每行中的**样本类型**设置为**标准**。
- 将**分析物浓度**设置为重复测定名称中下划线前比率的响应十进制数字，或分别设置为 **1、1、2、0.5**。

完成上述操作后，**文档网格**应显示如下：

	重复测定	样品类型	分析物浓度
▶	1:1_1	标准	1
	1:1_2	标准	1
	2:1_2	标准	2
	1:2_2	标准	0.5

在检查这些运行的校准曲线之前，还需执行以下操作以指定一些定量设置：

- 在**设置**菜单中单击**肽段设置**。
- 单击**定量**选项卡。
- 在**回归拟合**下拉列表中选择“线性”。
- 在**归一化方法**下拉列表中，选择“相对于 Heavy 的比率”。
- 在**单位**字段中，输入“ratio to heavy ”。

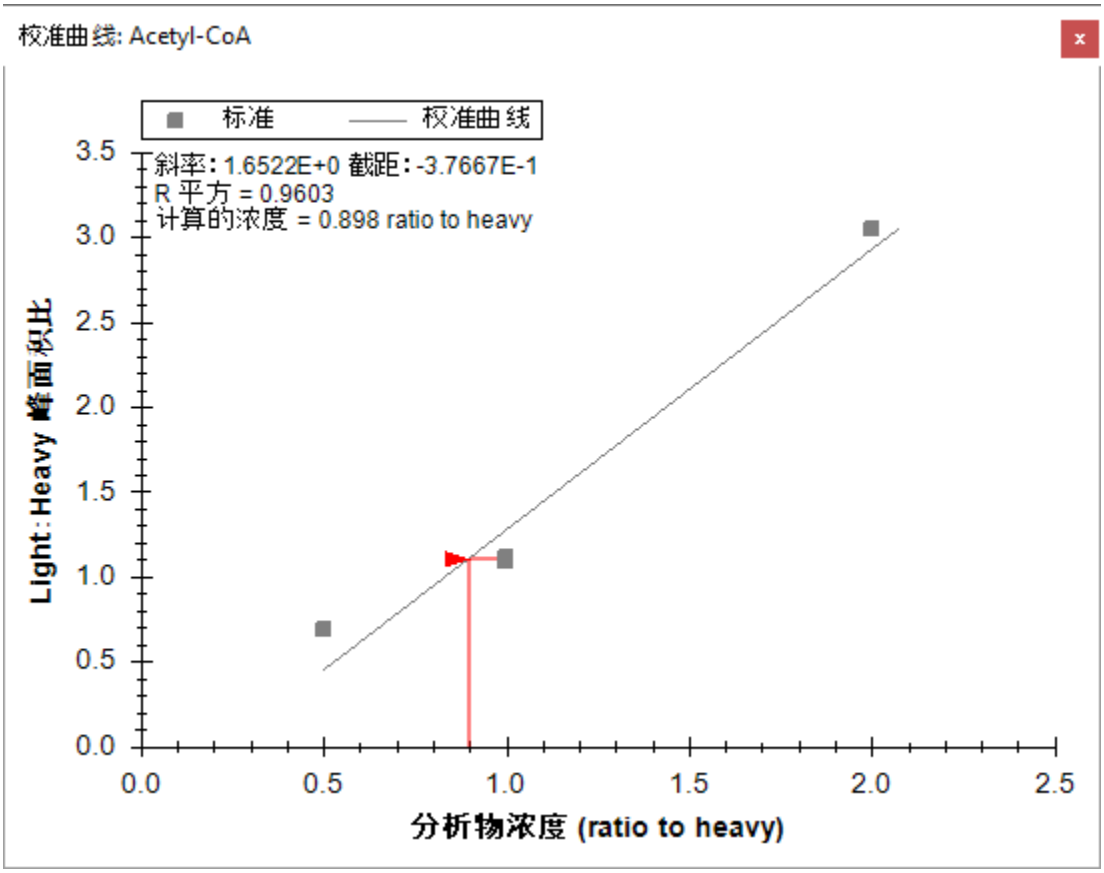
分子设置表单现在应显示如下：

- 单击**确定**按钮。

要检查校准曲线图，请执行以下操作：

- 选择**文档网格**视图。
- 在**视图**菜单中，单击**校准曲线**。

您应当看到如下所示的图：



此处评估的三种稀释比率显然并非预想的那样呈线性。因此，需要额外执行一些工作，才能获得这项特定测定的线性动态范围信息。

碰撞能量优化

为确定每个离子对的最佳碰撞能量，以期这项测定中的分析物获得尽可能高的灵敏度，接下来您需要收集数据。请记住，原始碰撞能量值来自于在不同供应商提供的仪器 (Agilent 6495) 上执行且已发布的实验。Skyline 将帮助生成一系列已排定时序的离子对列表，其碰撞能量将围绕原始离子对列表中指定的初始明确碰撞能量而自动变化。在本教程中，对于其他运行中使用的相同 Waters Xevo TQ-S，为了收集新结果，我们使用了相同的离子对列表。您将导入这些运行，并使用 Skyline 为 Waters 仪器选择最佳 CE 值。

首先检查碰撞能量设置，如下所示：

- 在**设置**菜单中单击**离子对设置**。
- 单击**预测**选项卡。
- 在**碰撞能量**下拉列表（应已设置为“Waters Xevo”）中，单击**<编辑当前...>**。

随即打开**编辑碰撞能量方程式**表单，其中的**优化**部分中的设置应确保为：

- 在**步长**字段中输入“2”。
- 在**步数**字段中输入“5”（应已进行此设置）。

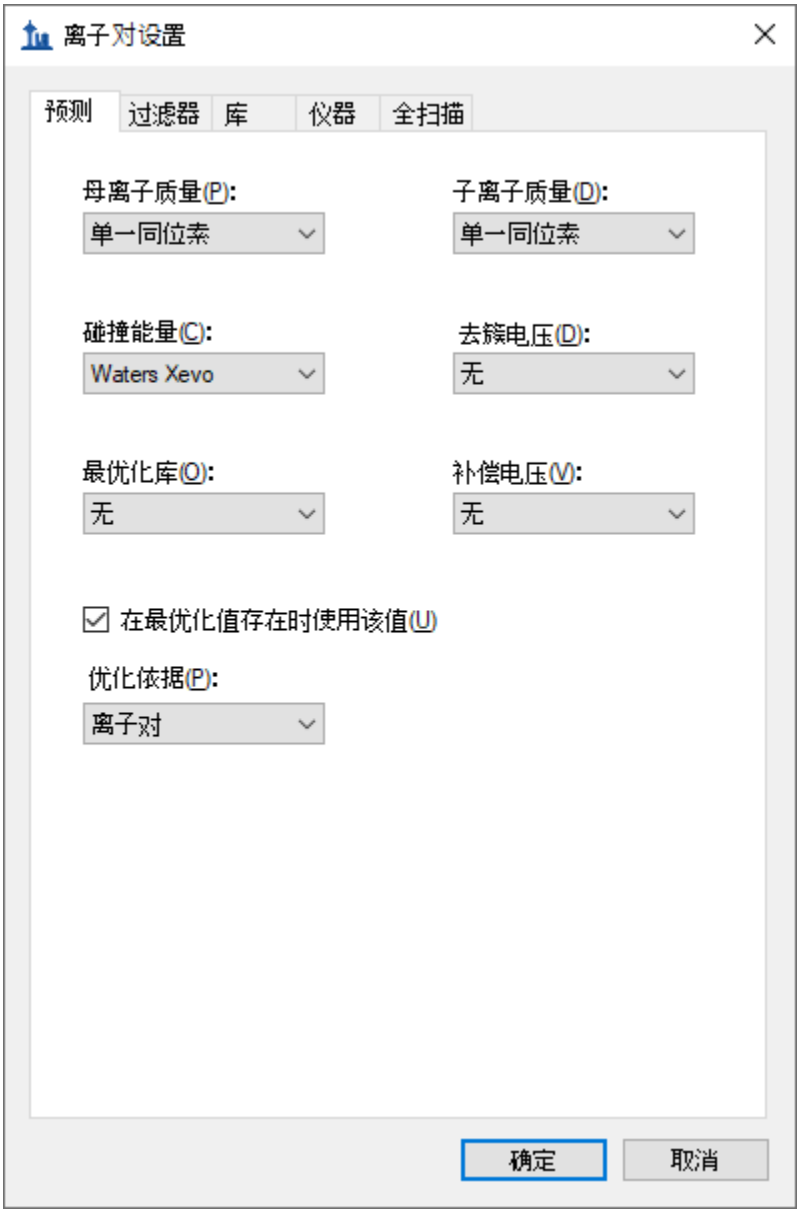
- 单击**确定**按钮。

进行这些设置后，Skyline 对每个离子对生成 11 项测量值，其中碰撞能量以 2 伏特的增量上下变化，围绕指定的原始值在每个方向上前进 5 步，总共前进 11 次。通常的建议是从较大的**步长**（2 伏或 3 伏）开始，然后可以选择以较小的**步长**（1 伏）重复优化，以便在步长之间的信号变化看似足以保证这种额外工作时微调优化结果。

在导出用于执行优化的离子对列表之前，请在**离子对设置 - 预测**”选项卡中进行以下最终调整：

- 选中**在最优化值存在时使用该值**。
- 在执行此操作时出现的**优化依据**下拉列表中，选择**离子对**。

离子对设置表单现在应显示如下：



- 单击**确定**按钮。

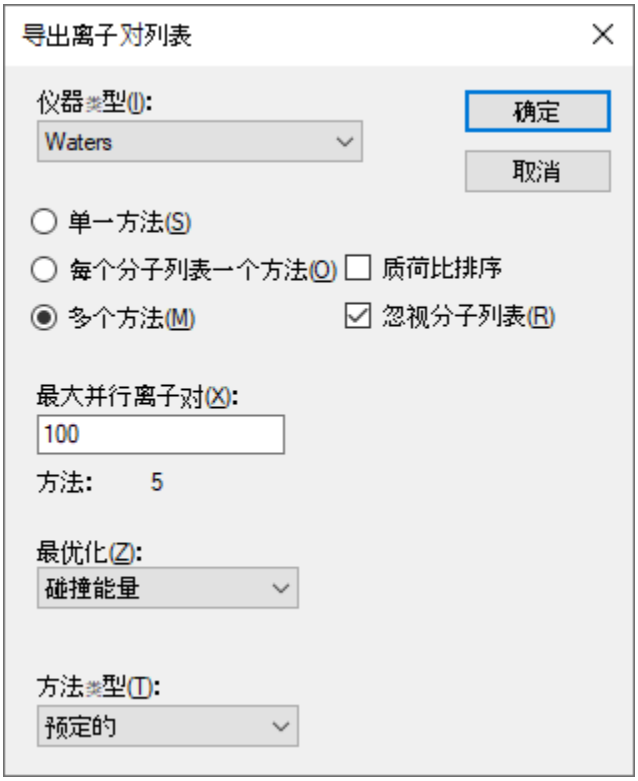
现在，您可以导出已安排时序的离子对列表，这样 Skyline 就可以为本实验中的目标确定最佳 CE 值。同样，在安装了仪器控制软件的电脑上进行处理时，一般最好导出原生方法，但在本教程中将继续导出离子对列表。

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**离子对列表**。
- 在**仪器类型**下拉列表中，Skyline 应当会自动选择“Waters”。
- 单击**多种方法**选项。

请记住，通过优化会将**目标**列表中的 36 个离子对乘以 11，即总共提供仪器必须测量的 396 个离子对。

- 选中**忽视分子列表**。
- 在**每次进样的最大离子对数量**字段中输入“100”。
- 在**优化**下拉列表中选择“碰撞能量”。
- 在**方法类型**下拉列表中选择“预定的”。

导出离子对列表表单现在应当显示如下：



请注意，当您选择进行这种已安排时序的采集时，**每次进样的最大离子对数量**字段名称已变为**最大并行离子对**。考虑一下怎样的时序安排可能不允许在每个周期中测量运行中的所有离子对。Skyline 会自动执行这种计算，以确保仪器在任何周期内测量的数量都不超过 100，以及确保所需的驻留时间和色谱峰上的点均可以实现。尽管如此，该表单中的**方法：5** 标记指明，它将采用 5

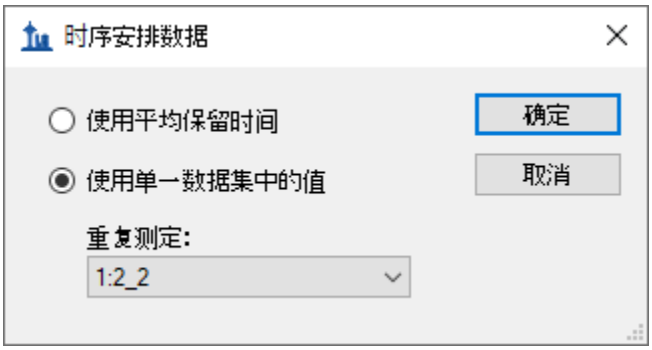
个单独的离子对列表，并在质谱仪中运行 5 次，以测量执行优化所需的 396 个离子对，同时在同一次运行中对每种分析物的所有离子对进行测量。

- 单击**确定**按钮。

系统将询问您要使用哪项重复测定进行洗脱。

- 单击**使用单一数据集中的值**。
- 在**重复测定**下拉列表中，选择“1:2_2”。

时序安排数据表单应显示如下：



- 单击**确定**按钮。

系统将提示您输入离子对列表文件名。

- 另存为“EnergyMet_5minutes_ceopt.csv”。

这将生成 5 个文件：

- EnergyMet_5minutes_ceopt_0001.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0002.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0003.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0004.csv
- EnergyMet_5minutes_ceopt_0005.csv

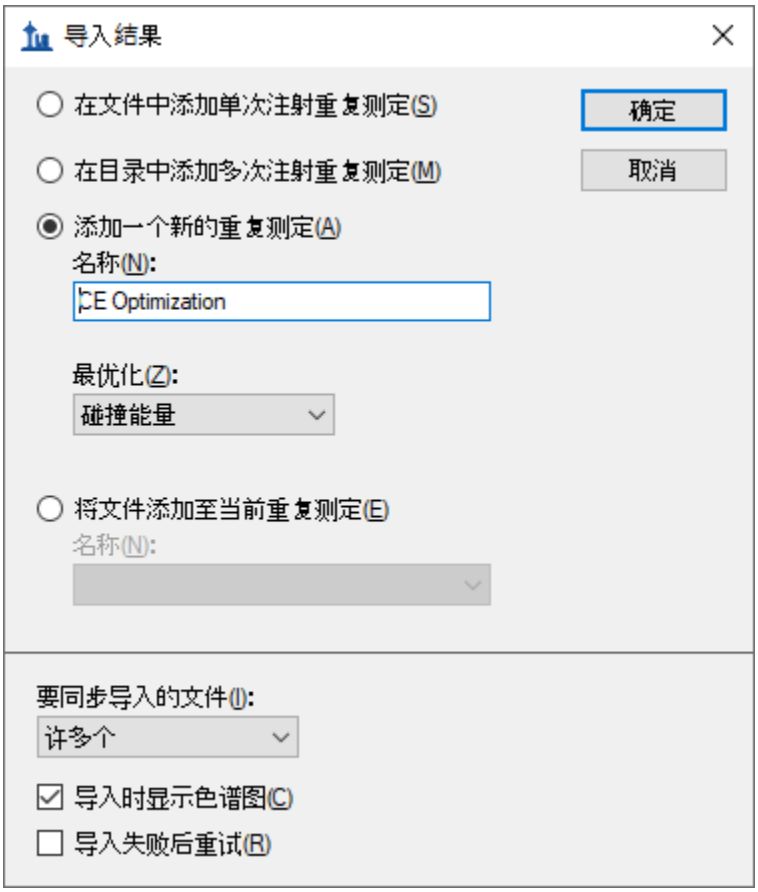
我们使用相同的离子对列表对每个 1:1 混合样本进行一次测量。要执行预期的优化，现在应按以下指示导入生成的数据文件：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。

在先前的每项导入中，您是想将每个数据文件视为对所有目标离子对进行的一整套测量结果。但在本例中，您想将五个 CE 优化运行组合成一套符合逻辑的目标测量结果。若要执行此操作，请对**导入结果**表单进行以下调整：

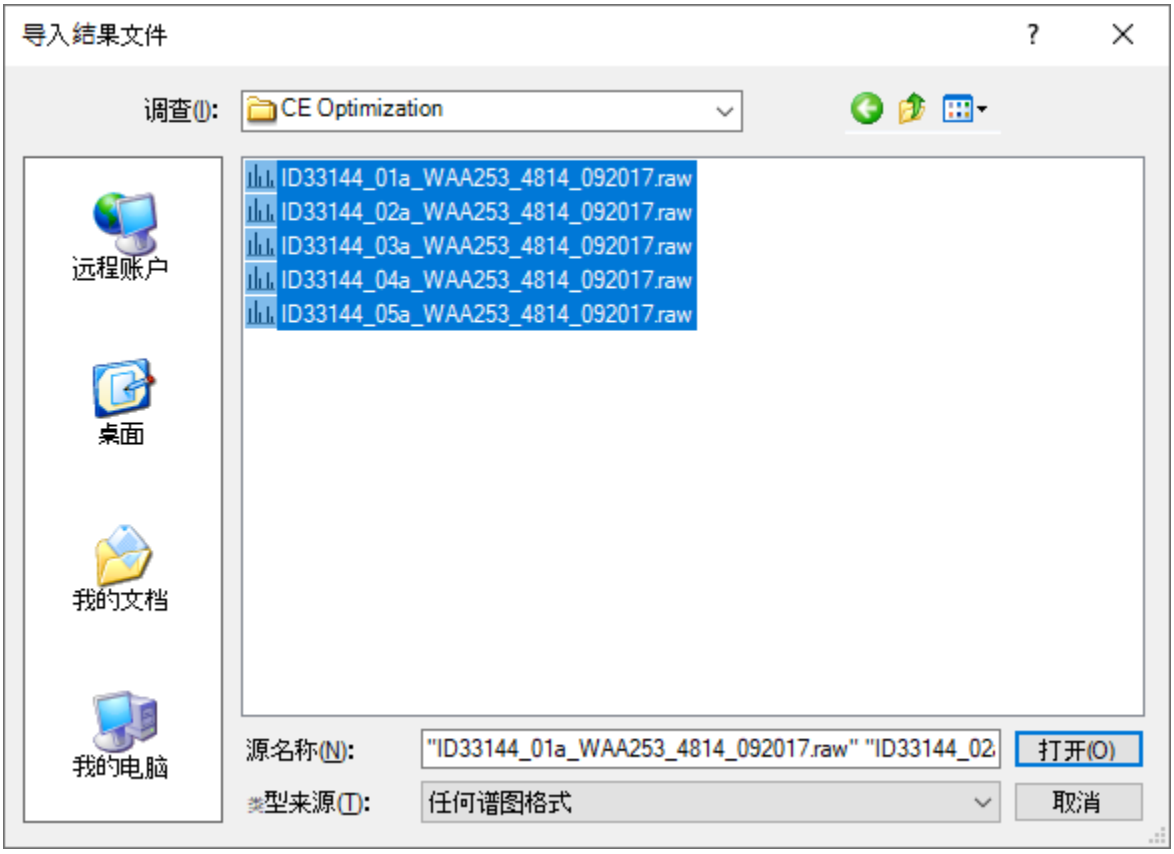
- 单击**添加一个新的重复测定**选项。
- 在下面的**名称**字段中输入“CE Optimization”。
- 在**最优化**下拉列表中选择“碰撞能量”。

该表单现在应显示如下：



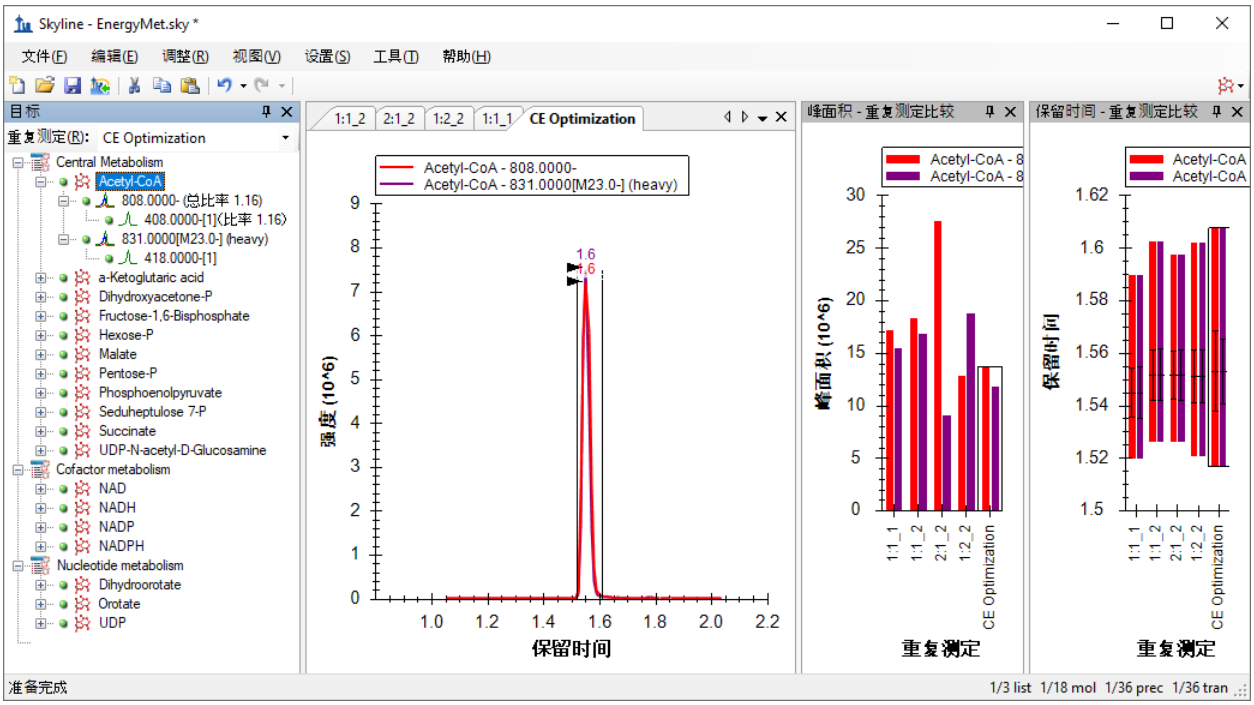
- 单击**确定**按钮。
- 导航到“CE Optimization”子文件夹，将其中 5 个文件全部选定。

导入结果文件表单应显示如下：



- 单击**确定**按钮。

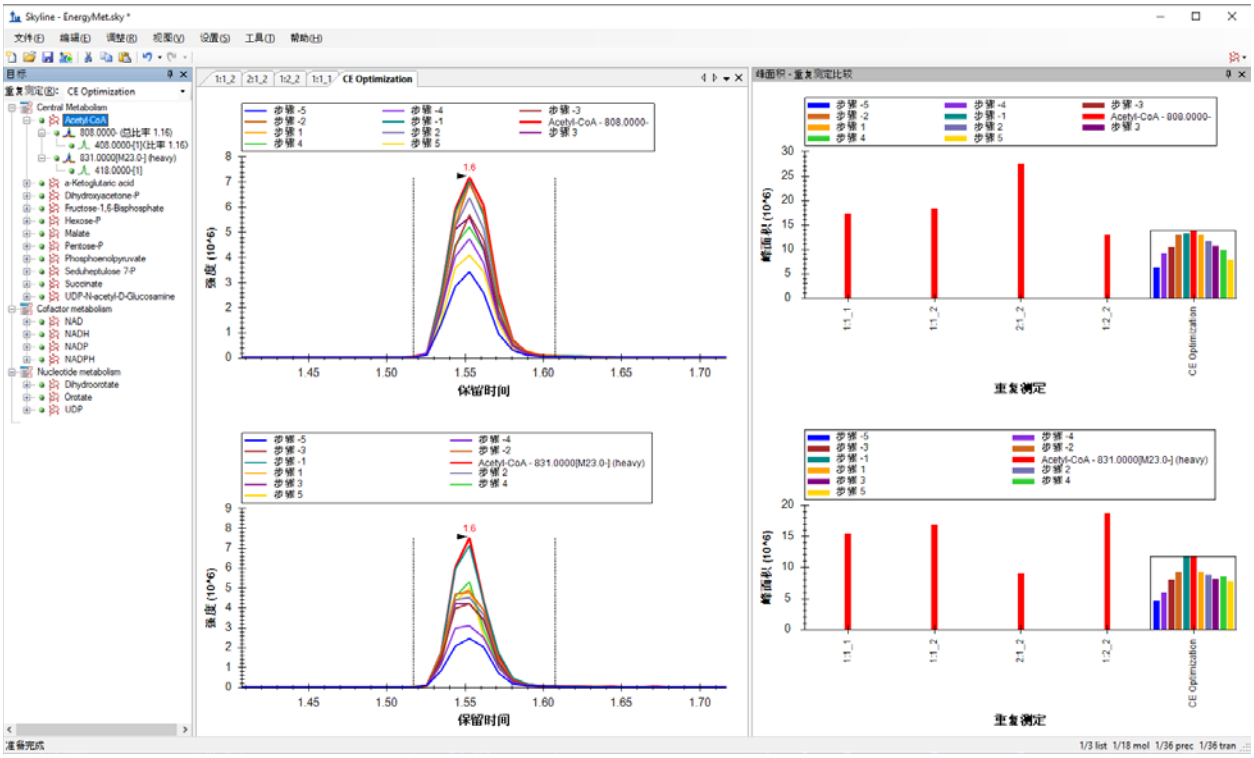
这些文件将作为单个名为“CE Optimization”的重复测定进行加载，如**重复测定比较**图中最右侧的值以及色谱图中最右侧选项卡中所示，该重复测定应出现在**目标**视图的**重复测定**下拉列表中，如下所示：



但是，您仍需执行以下操作，才能在**目标**视图中直观显示于 11 种不同 CE 电压下对每个离子对进行的 11 次不同测量：

- 在**视图**菜单上选择**离子对**，然后单击**单一**。
- 在**视图**菜单上选择**自动缩放**，然后单击**最佳峰值** (F11)。
- 单击标题栏中的 X，可以隐藏**保留时间 - 重复测定比较**图。
- 在色谱图上单击鼠标右键，选择**离子对**，然后单击**拆分图**。

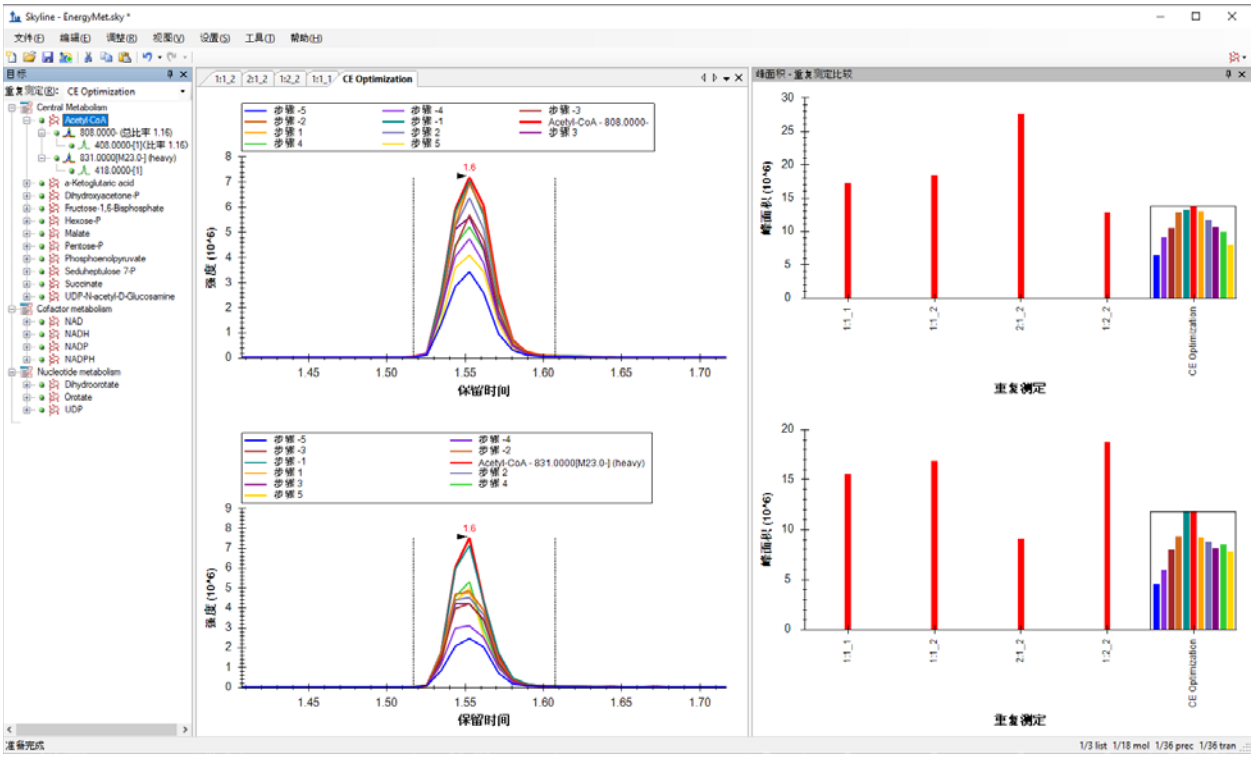
Skyline 主窗口应显示如下：



峰面积 - 重复测定比较视图现在在单独的窗格中显示重离子对和轻离子对，并且轻离子对在重离子对上方。在“CE Optimization”重复测定中，各个条形表示逐步提高碰撞能量的效果。红色表示原始 CE 值（在与 Agilent 6495 仪器结合使用时），其他条形表示距该值 2eV 步的效果。您可以看到，对于 Acetyl-CoA 而言，至少使用原始值或 -2eV 步长时可实现最大的峰面积。关闭图例后更容易看出是否释放了图中的空间：

- 在**峰面积 - 重复测定比较**窗口中单击鼠标右键，然后单击**图例**以取消选中。

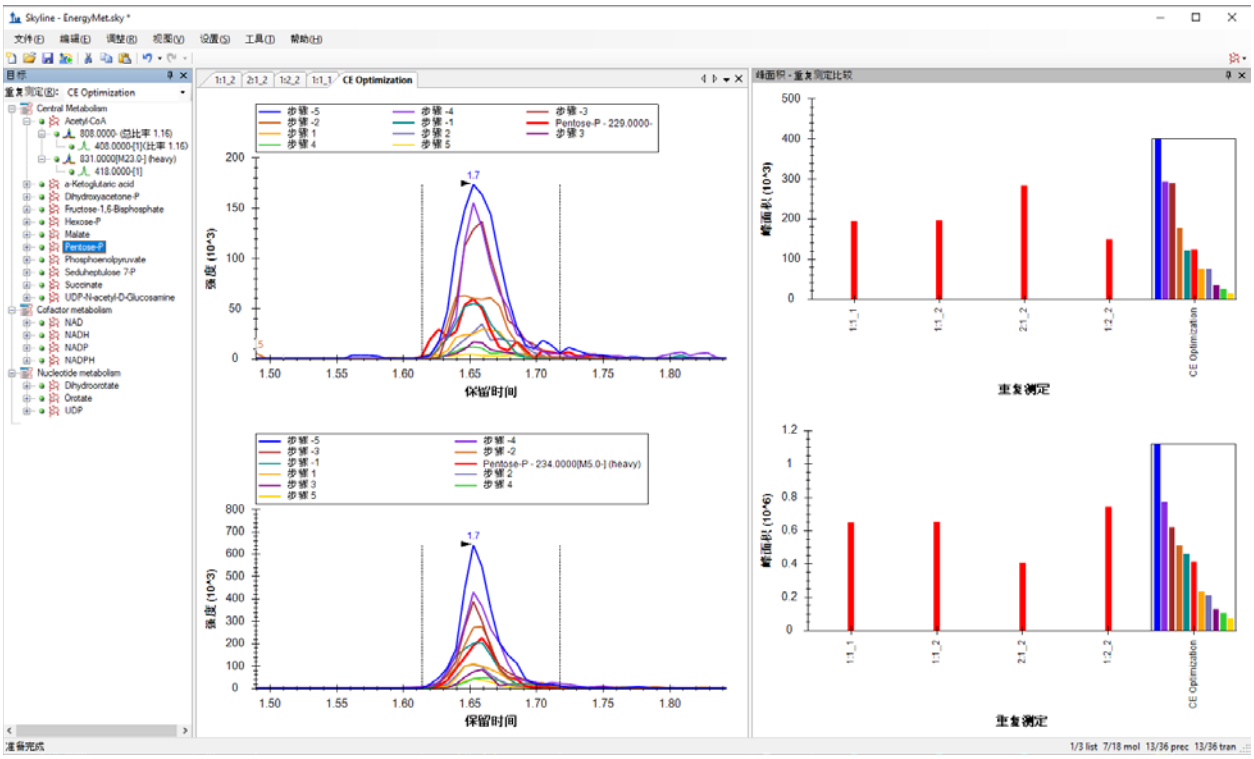
Skyline 应显示如下：



现在您可以探索其他分子，了解原始碰撞能量接近最佳状态的程度。为此，请执行以下操作：

- 单击**目标**视图中的任何分子，或在第一次单击后使用向上和向下箭头键在列表中进行选择。
- 然后在**目标**窗口中单击“Pentose-P”。

查看 Pentose-P 的各种 CE 步长值的色谱图，很显然，资料中的 CE 值对于 Waters Xevo TQ-S 上的该分子并非最佳值。最佳 CE 值（步长为 -5，最左侧的蓝色条形）是测得的最低 CE 值。



考虑到该范围末尾的趋势，可能需要进一步研究才能得出该化合物真正最佳的 CE 值。因此，在像这样的仪器供应商之间进行转换时，也可能需要从较大的步长（例如 3 伏）开始。即便如此，“步长 -5”（蓝色条形）CE 值相较于初始（红色条形）CE 值有了明显改善。

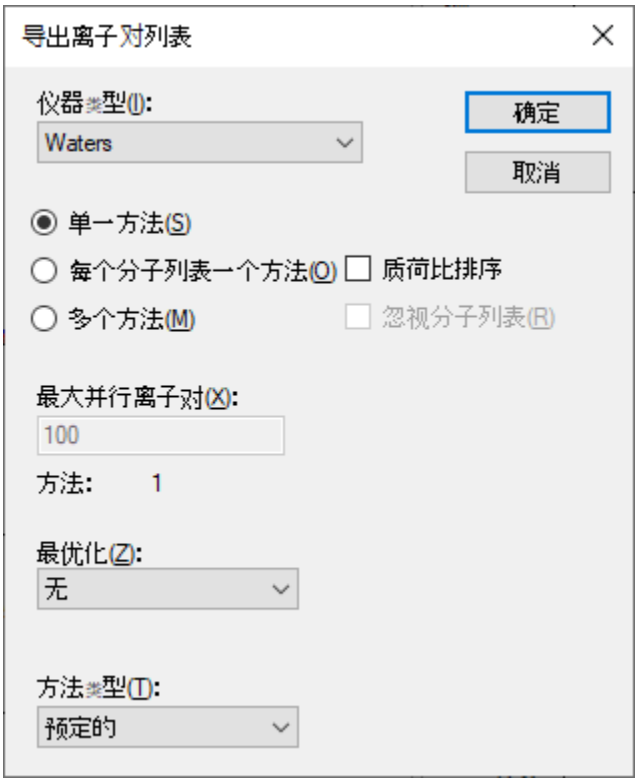
您可以继续创建一个已安排时序的新离子对列表，该列表使用观察到的最有效的 CE 值，如下所示：

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**离子对列表**。
- 在**仪器类型**下拉列表中，Skyline 应当会自动选择“Waters”。
- 单击**单一方法**选项。

这次只需再次使用单一方法，因为只要对每个离子对使用一个最佳 CE 值。

- 在**方法类型**下拉列表中选择“预定的”。

导出离子对列表表单现在应当显示如下：



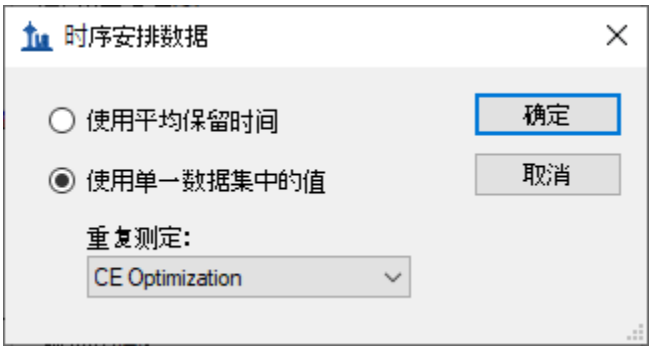
- 单击**确定**按钮。

系统将询问您要使用哪项重复测定进行洗脱。

- 单击**使用单一数据集中的值**。
- 在**重复测定**下拉列表中，选择“CE Optimization”。

您可以使用您认为其保留时间最具代表性的运行（通常是最近的运行），因为保留时间会随着色谱柱的时间变化而漂移。本例中的保留时间非常稳定，这意味着此表单中的几乎所有选项都可以用于先前分配的时序安排为 1 分钟的窗口。无论您选择何种选项，都是从具有 CE 优化数据的唯一重复测定来获取最佳 CE 值。

时序安排数据表单应显示如下：



- 单击**确定**按钮。

系统将提示您输入离子对列表文件名。

- 另存为“EnergyMet_5minutes_optimal.csv”。

比较初始 CE 值与优化的 CE 值

此时比较切入点和实现的目标会很有趣。切入点是使用以简单平面文件形式发布的 Agilent 6495 质谱仪资料中的 SRM 离子对和 CE 值；实现的目标则是针对 18 种能量代谢物的保留时间时序安排和进行了 CE 优化的 SRM 方法，以及您计划使用的仪器的内标（或至少提供我们在制作本教程时所用的仪器 Waters Xevo TQ-S 的内标）。

- 在 Excel 或其他任何合适的查看器中打开初始（来自 Agilent 6495）离子对列表 Energy_TransitionList.csv 和最终的（经过 Waters Xevo TQ-S 优化）离子对列表 EnergyMet_5minutes_optimal.csv。
- 比较匹配行中的 CE 值，并记录以下要点：
    - Acetyl-CoA 对于这两种仪器都具有相同的最佳 CE 值。
    - Pentose-P 具有截然不同的值：初始值为 45eV，最佳值为 35eV。

如果您希望进一步优化 Pentose-P 的 CE（请注意，确定的最佳 CE 值位于测试范围的边缘），则可以使用 EnergyMet_5minutes_optimal.csv 离子对列表作为新一轮 CE 优化的切入点来重复该过程，并且步长可能为 1 伏，步数可能更少。

如前所述，在执行迭代优化时，最好从较大的步长值开始测试广泛的 CE 值，然后在以后的迭代中改为较小的步长，以缩小最终值。执行 CE 优化时，如果在**设置**菜单、**离子对设置**、**预测**下面选中了**使用优化值**按钮，新导出的方法或离子对列表自动将把最佳碰撞能量整合到这种方法中。除了检查是否需要探索更广泛的 CE 优化范围之外，无需手动管理 CE 优化数据。

结语

在本教程中，您从已发布的实验中学到了如何创建以稳定同位素标记的小分子为目标的 Skyline 文档，这些小分子指定为母离子*质荷比*、子离子*质荷比*和碰撞能量值。通过导入来自于 Waters Xevo TQ-S（使用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪的初始 CE 值）的多个重复测定数据集，您对小分子执行了保留时间时序安排和碰撞能量优化。您了解了最初为靶向蛋白质组学应用而创建的 Skyline 功能中，有多少现成的功能现在可以应用于普遍分子数据。对于 Skyline 而言，非蛋白质组分子支持仍是一个相对较新的功能领域。因此，它肯定会不断获得快速改善。