

Skyline 小分子定量

Skyline 靶向质谱环境能直观呈现导入 Skyline 的原始质谱仪数据信息。Skyline 最初为蛋白质组学应用而开发，其应用范畴现已延伸到小分子领域。本教程中探讨一个相对简单的示例，该例使用外部标准曲线和稳定同位素标记的内标，针对单个小分子使用 Skyline 进行靶向定量。

在本教程中，您将从可能已在运行的方法（例如药代动力学分析）入手，了解基于 TQ-MS 的靶向定量（本例中为血浆去蛋白）。通过分析该数据集，您将学会：

- 插入一组简单的已知离子对
- 非蛋白质分子的数据分析和峰积分
- Skyline 中的小分子定量工作流程

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 如何处理小分子信息（比如化学式和加合物）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/SmallMoleculeQuantification.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\SmallMoleculeQuant
```

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：

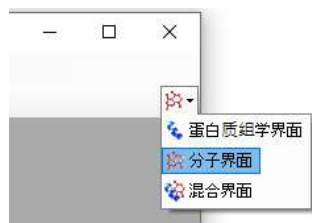



- 在**设置**菜单中单击**默认值**。
- 在询问您是否保存当前设置时，单击表单上的**否**。

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：

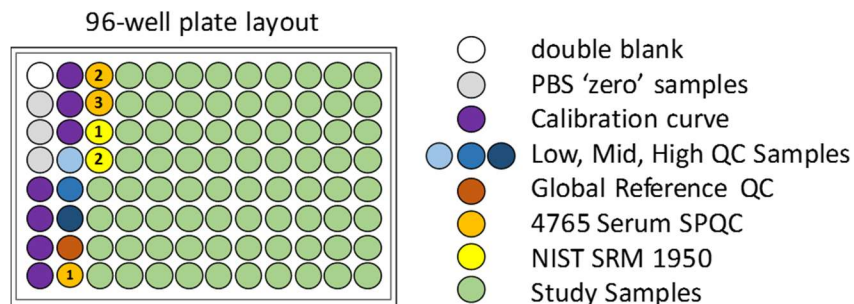
- 单击 Skyline 窗口右上角的用户界面控件，然后单击如下**分子界面**：



Skyline 将在小分子模式下运行，Skyline 窗口右上角 随之显示蛋白质图标 。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。

实验设计

本实验根据《FDA 生物分析方法学确证指南》设计而成，因此所包含的不仅仅是研究样品。此类研究所采用的常见检测板样品布局和分析顺序的完整描述现在已经发布 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29039849>)。简单来说，该数据集的样品按如下方式分布在 96 孔检测板中：



空白或“零”标准品仅包含内标，双空白则完全不含标准品。

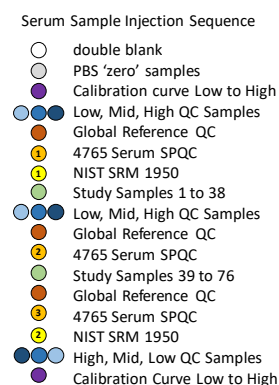
标准曲线样品就是用于计算标准曲线的一系列按不同比例稀释的标准品。

QC 样品是“已知的未知”。这些是质量控制样品，在本研究中视为未知。实际上，由于这些结果已知，因此可以将其用于核实测量准确性。

血清 SPQC 即混合血清 QC (Serum Pooled QC)，合并了每一份研究样品的一小部分，会在实验开始、中间和结束时的多个时间点运行，以验证定量结合重复性在整个研究过程中是否保持稳定。

NIST SRM 1950 是来自于美国国家标准与技术研究院的混合血浆标准品，所有研究人员均可将其用作“正常”血浆代谢物测量的参考标准品。它可作为比较不同实验室的研究结果的参考信息。

按以下顺序进样：



总共进样 113 次以收集这些样品的质谱数据。

内标

本研究只有两个研究目标：一个小分子，一个内标。内标是该小分子的同位素标记变体，与目标小分子在色谱上共洗脱。将一个不相关的小分子设置为替代标准品，也可以在不相关的小分子之间建立关系。[Skyline 高分辨率代谢组学](#)教程中介绍了替代标准品方法。

将小分子离子对列表导入 Skyline 文档

将小分子离子对列表导入 Skyline 文档的捷径是从一个空文档开始，然后使用**编辑 > 插入 > 离子对列表**菜单项。

首先执行以下操作：

- 在 Skyline **编辑**菜单上选择**插入**，然后单击**离子对列表**。

Skyline 将显示**插入离子对列表**表单：



您通常要从 Excel 或其它外部来源复制和粘贴离子对列表，但本例中的离子对列表小到足以直接显示在这里：

- 拖动下面的两行，将其选定，然后单击**复制 (Ctrl-C)**。

```
DrugX, Drug, light, 283.04, 1, 129.96, 1, 26, 16, 2.7
```

```
DrugX, Drug, heavy, 286.04, 1, 133.00, 1, 26, 16, 2.7
```

- 在 Skyline 中，单击**插入离子对列表**表单的空白区域。
- 按 **Ctrl-V** 粘贴。

Skyline 将显示导入离子对列表：标识列表单，从中可以告知 Skyline 每列的含义。



- 确保选中**分子**单选按钮。

由于所复制的数据没有列标题，所以最初每列都设置为“忽略列”。

- 使用**每一列中的下拉控件**设置列的类型。
- 这些列的名字从左至右依次为：分子列表名称、分子名称、标签类型、母离子质荷比、母离子电荷、子离子质荷比、子离子电荷、锥孔电压、明确碰撞能量、明确保留时间。

导入离子对列表：标识列表现在应显示如下：

列 1	列 2	列 3	列 4	列 5	列 6	列 7	列 8
分子列表名称	分子名称	标记类型	母离子质荷比	母离子电荷	子离子质荷比	子离子电荷	锥孔号
DrugX	Drug	light	283.04	1	129.96	1	26
DrugX	Drug	heavy	286.04	1	133.00	1	26

肽段(P) 分子(M) 显示未使用的列

检查错误 **确定** 取消

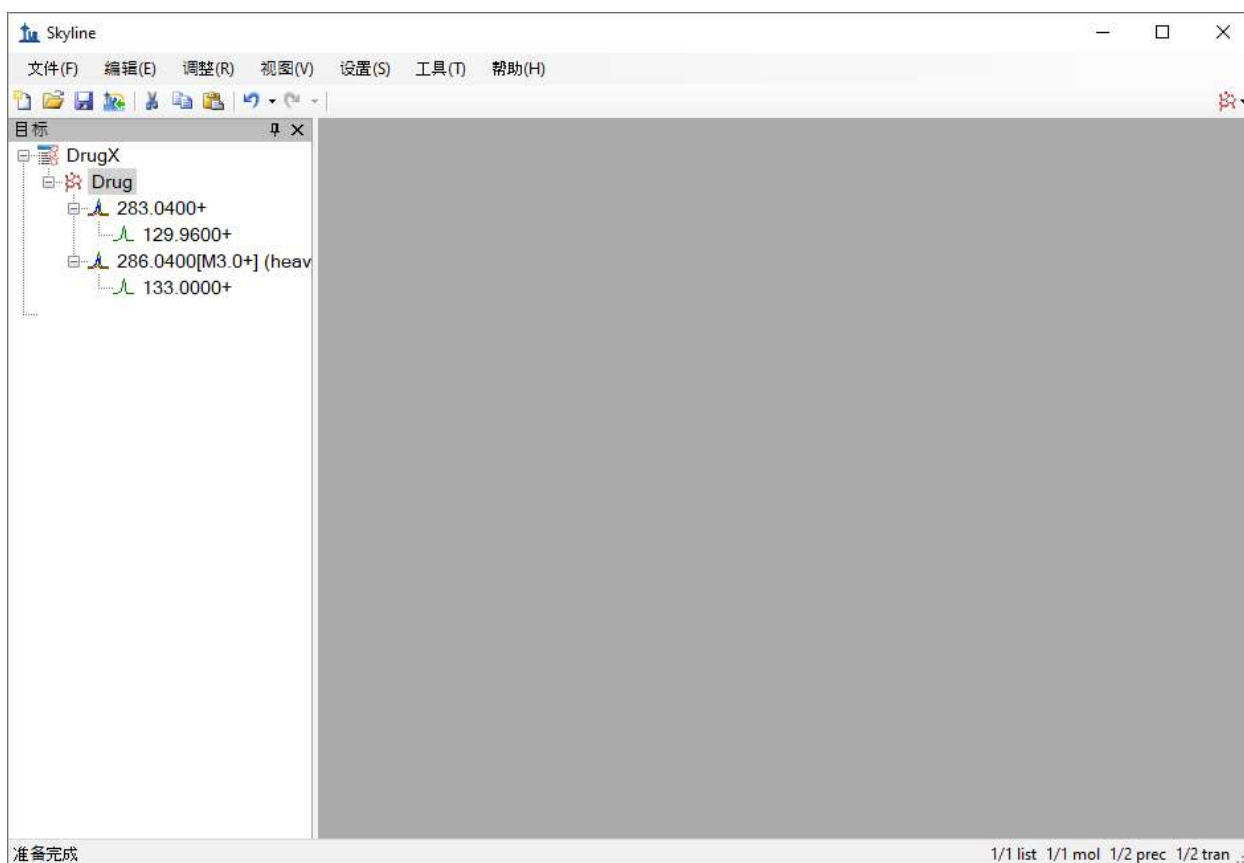
- 单击**确定**按钮。

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信息，包括化学式和重同位素标记等。提供化学式对于处理全扫描、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。

要详细查看新导入的目标，请执行以下操作：

- 在**编辑**菜单上选择**全部展开**，然后单击**母离子**。

此时 Skyline 窗口将显示如下：



离子对设置

下一步是确保离子对的设置适合于导入质谱仪产生的原始数据。请执行下列步骤：

- 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”。
- 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：

离子对设置

预测 过滤器 库 仪器 全扫描 离子迁移

母离子质量(P): 单一同位素

子离子质量(D): 单一同位素

碰撞能量(C): Waters Xevo

去簇电压(D): 无

最优化库(O): 无

补偿电压(V): 无

在最优化值存在时使用该值(U)

优化依据(P): 离子对

确定 取消

- 单击过滤器选项卡。
- 在母离子加合物字段中，将文本更改为“[M+H]”。
- 在片段加合物字段中，将文本更改为“[M+]”。

离子对设置表单现在应显示如下：

离子对设置

预测 过滤器 库 仪器 全扫描 离子迁移

分子

母离子加合物(A):
[M+H]

片段加合物(N):
[M+]

离子类型(T):
f

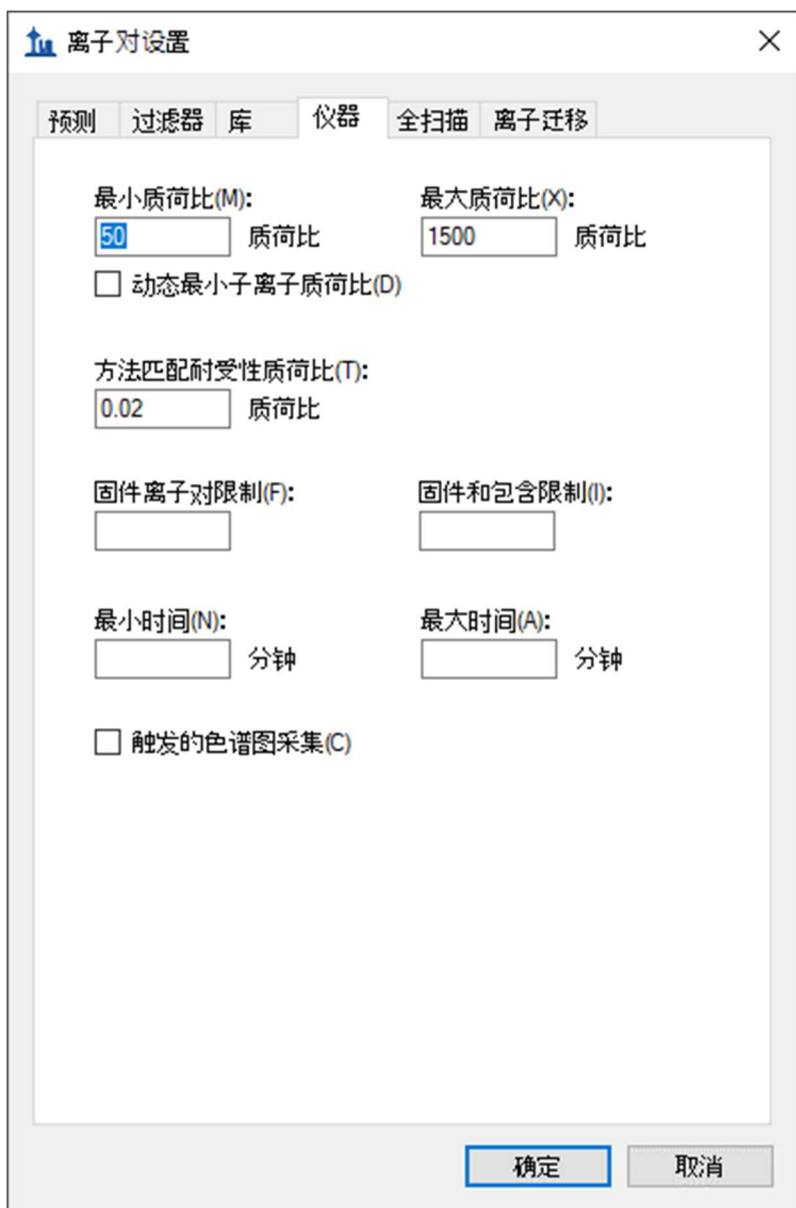
母离子质荷比排除窗口(X):
质荷比

自动选择所有匹配的离子对(A)

确定 取消

在离子类型字段中，值“f”表示将仅测量碎片离子的离子对。如果还想测量母离子，则可以使用“f, p”。

仪器选项卡中的默认值适用于本实验。但在您自己进行实验时，请确保最小和最大质荷比值对您实际使用的仪器是有意义的。这些设置的目的是防止您添加质谱仪实际上无法测量的目标离子对。



方法匹配耐受性是仪器选项卡中的另一项重要设置。它决定仪器方法（存储在原始数据文件中）中的质荷比值必须与 Skyline 目标列表中的质荷比值相匹配的程度。Skyline 中的默认值为 0.055，因为测试中使用的原始 SRM 文件虽然指定为小数点后一位（例如 784.3），但其中包含一些细微的舍入误差。如果从 Skyline 导出方法，可以使用更小的容差。

- 单击**确定**按钮。

下一步是导入质谱仪产生的原始数据。

导入质谱仪产生的原始数据

本实验有 113 个相关的质谱仪数据文件。在这种情况下，起初只导入少量未知样品以及所有标准曲线数据和质量控制 (QC) 数据会很有用。但是，您可能还希望从不太复杂的文档开始验证数据质量，仅导入几次分析结果即开始验证，比如从最高浓度的标准曲线开始。

在这里，您将执行以下步骤：

- 在文件菜单上，单击**保存**。(Ctrl-S)
- 将此文档以名称“SMQuant_v1.sky”另存到为本教程创建的文件夹中。
- 在文件菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 在**导入结果**表单中，选择在**文件中添加单次注射重复测定**。在表单底部的**要同步导入的文件**下拉列表中，选择**许多个**，使用该选项可以提供最佳导入性能。

导入结果表单现在应显示如下：

导入结果

在文件中添加单次注射重复测定(S) 确定

最优化(O):
无

在目录中添加多次注射重复测定(M) 取消

添加一个新的重复测定(A)
名称(N):

将文件添加至当前重复测定(E)
名称(N):

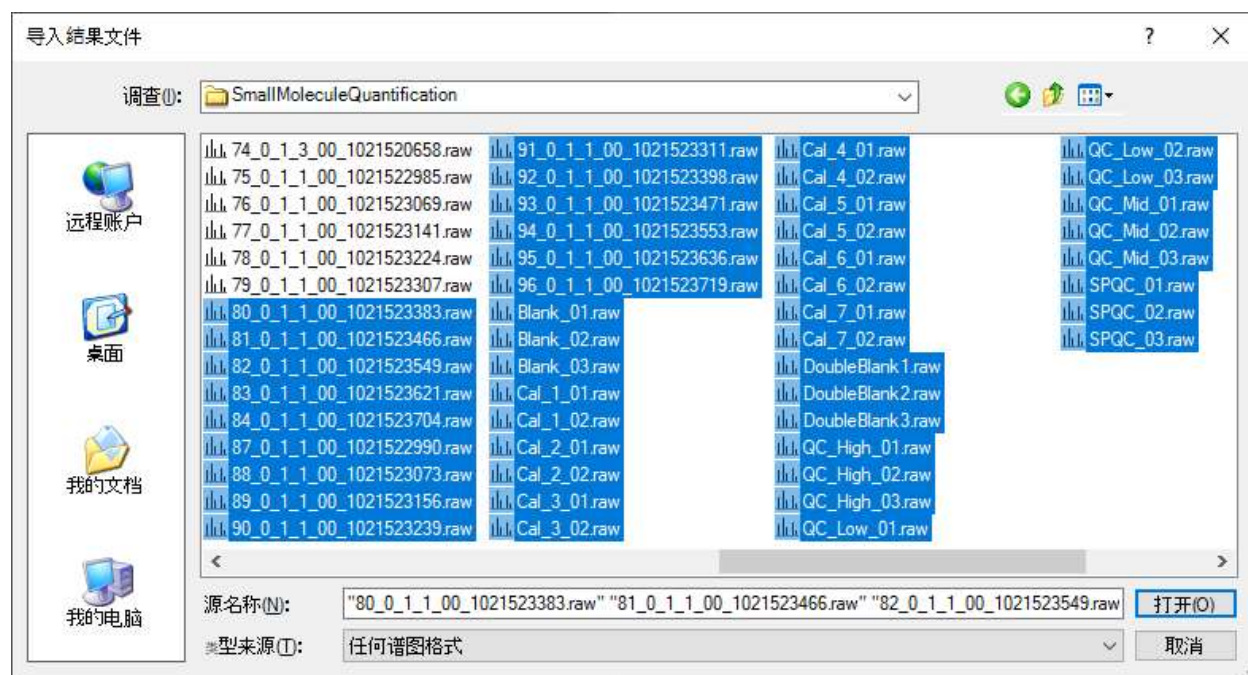
要同步导入的文件(I):
许多个

导入时显示色谱图(C)

导入失败后重试(R)

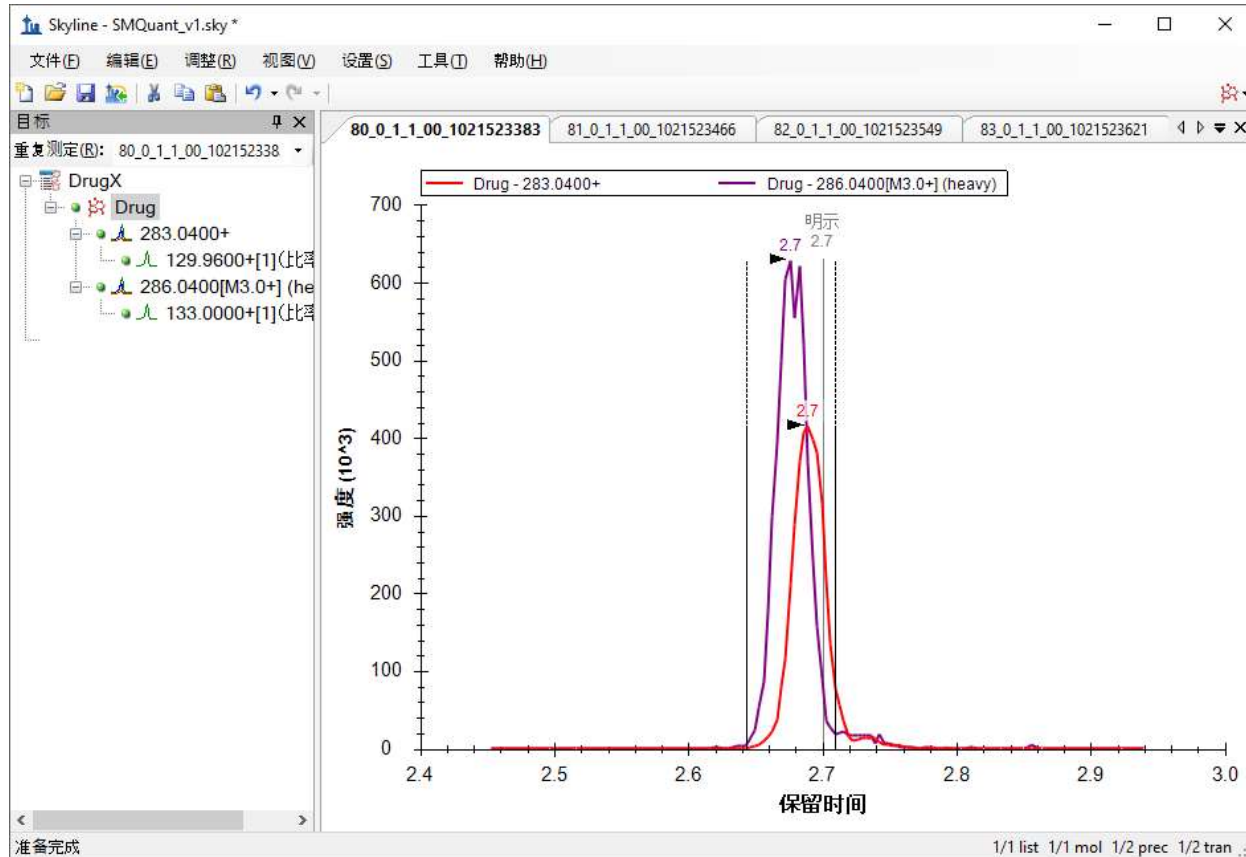
- 单击**确定**按钮。
- 在出现的**导入结果**文件表单中，单击“80_0_1_1_00_1021523383.raw”文件，然后按住 Shift 键并单击列表中的最后一个文件，以选定最后 16 个未知样品和所有 QC 样品。

导入结果文件表单应显示如下：



- 单击打开按钮。

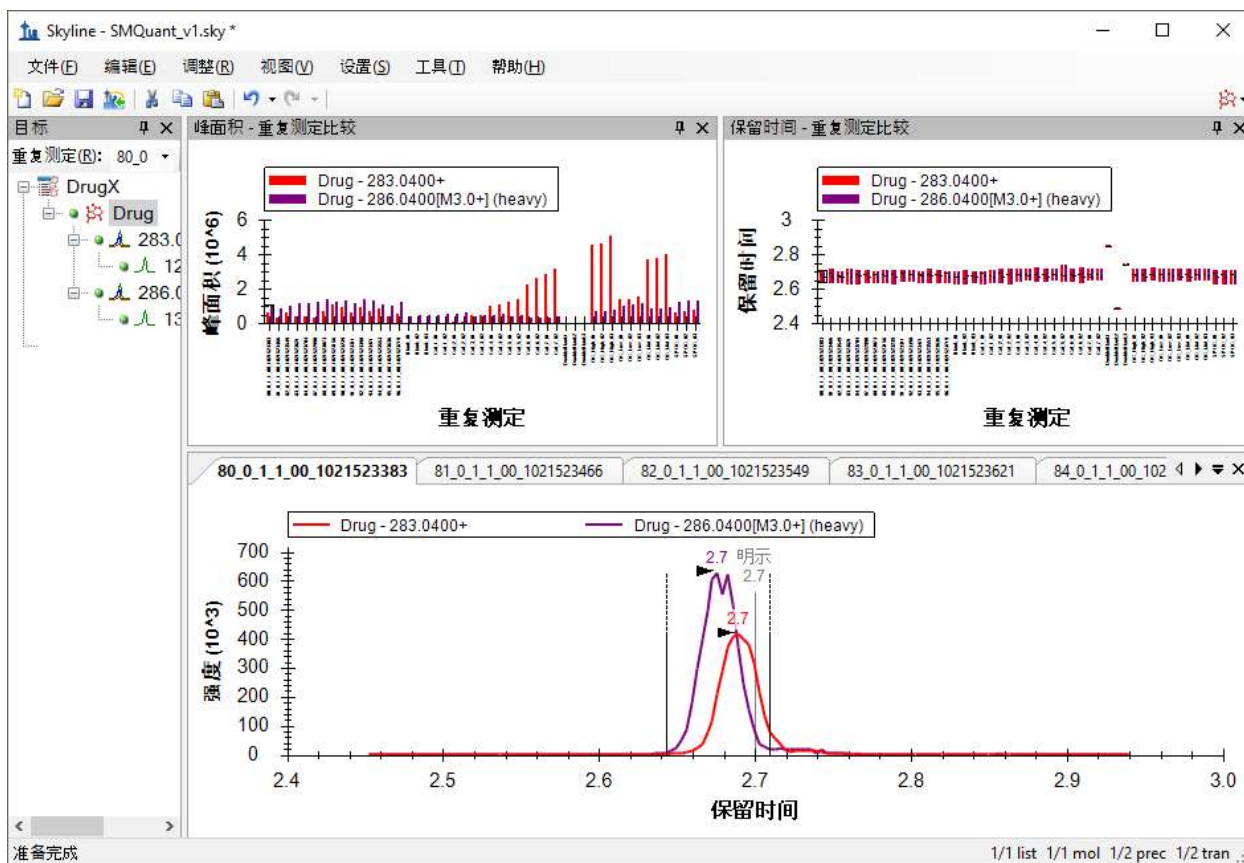
此文件应在 30 秒左右内导入，之后 Skyline 窗口将显示如下：



要利用 Skyline 摘要图查看各个目标，请执行以下操作：

- 在视图菜单中选择峰面积，然后单击重复测定比较。
- 在视图菜单中选择保留时间，然后单击重复测定比较。
- 单击并拖动这些视图，以将其停靠在色谱图上方。
- 在目标视图中，选择第一个目标“Drug”。

此时 Skyline 窗口将显示如下：



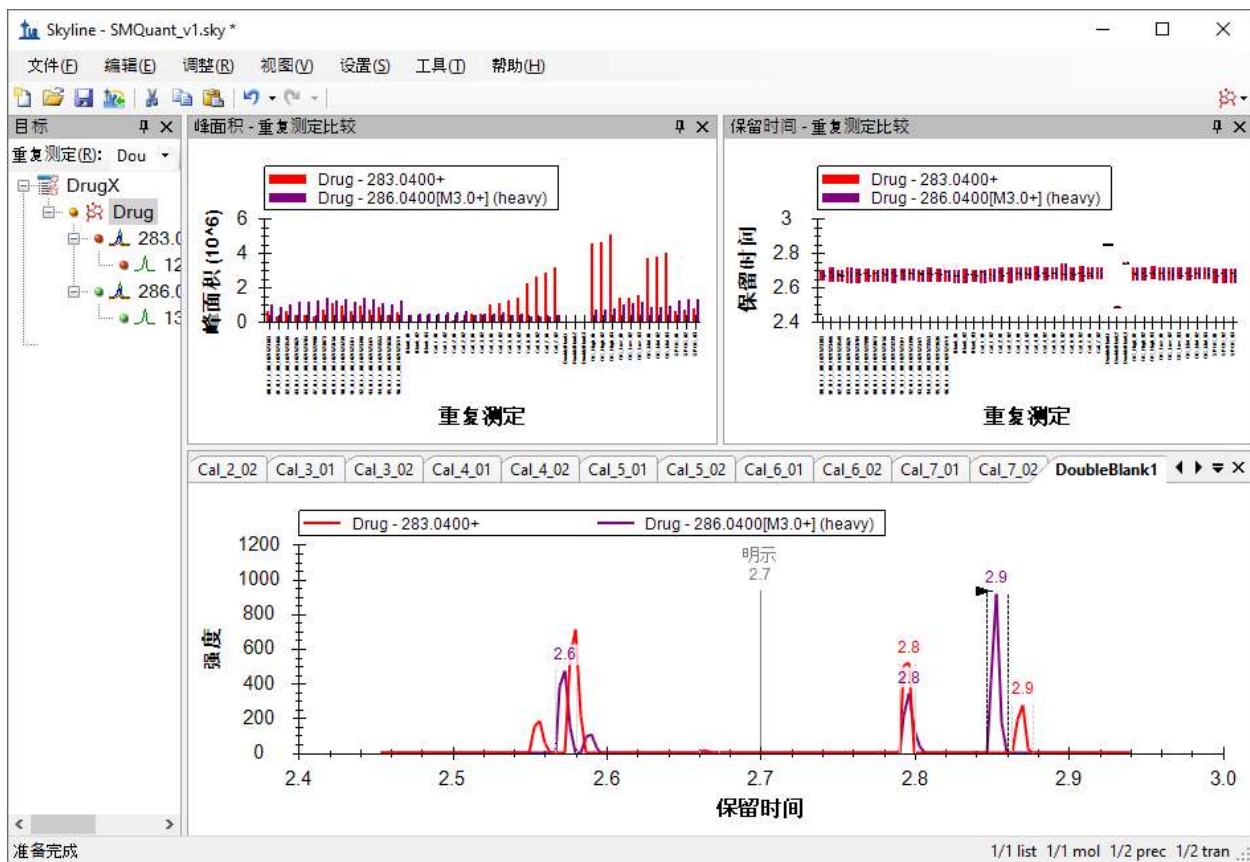
检查峰积分

在保留时间 - 重复测定比较窗口中，可以看到名称中含有“DoubleBlank”的重复测定中的异常值，Skyline 未选择与其它重复测定相一致的保留时间峰值。

要仔细查看其中某次进样分析的色谱图，请执行以下操作：

- 在保留时间 - 重复测定比较视图中，单击第一个异常值 DoubleBlank1 对应的条形。

Skyline 其实并不会为该重复测定中药物的轻/重离子对找到一个良好的峰，因为“DoubleBlank”一词表示二者在该样品中都不存在。色谱图现在显示了 Skyline 不得不选择的色谱峰：



- 在保留时间 - 重复测定比较视图中，单击另外两个离群值对应的条形。

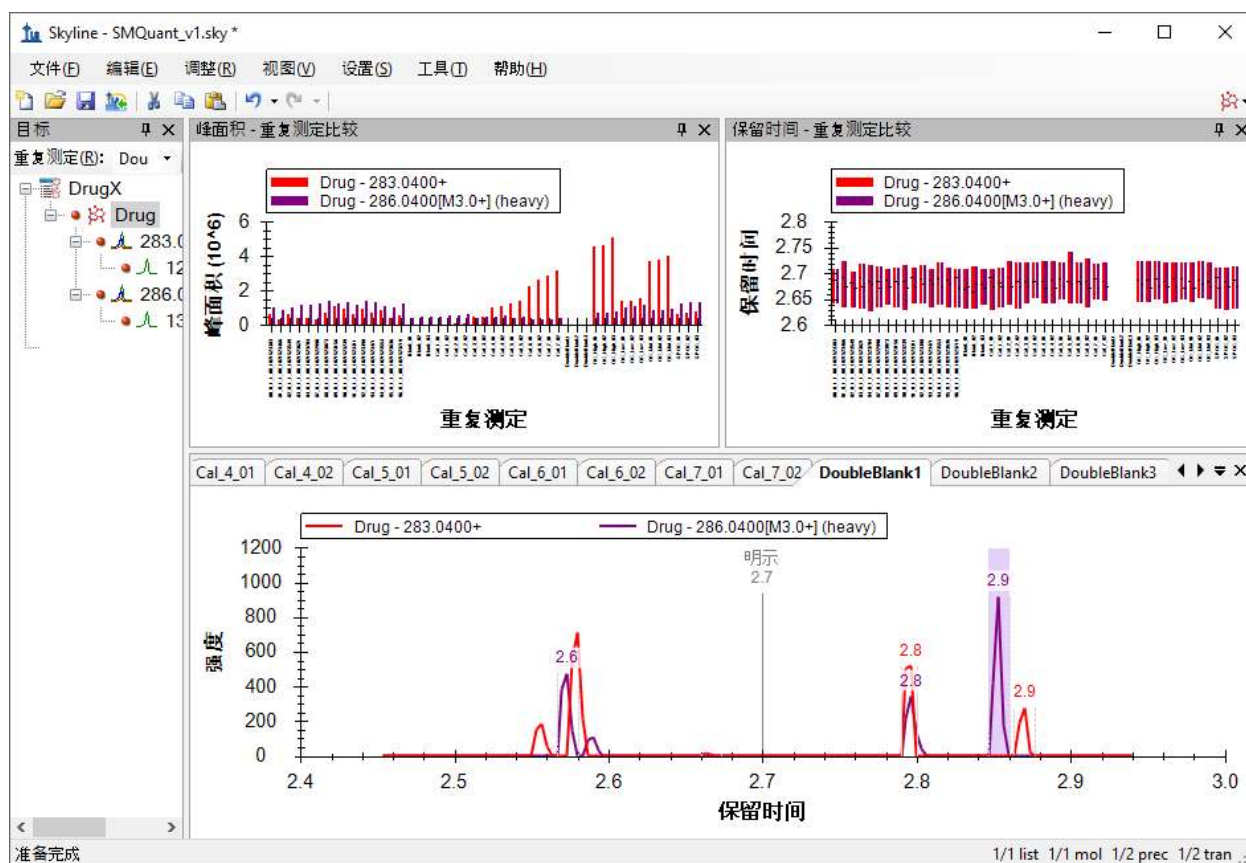
这应表明，DoubleBlank2 和 DoubleBlank3 在标有“明示”的 2.7 分钟附近也没有任何明确的峰，意味着该方法明确指定了 2.7 分钟作为预期的洗脱时间。由于这些也是双空白，可以预想这些重复测定中没有任何实际的峰，因此接下来要手动调整每个双空白重复测定的积分，以在 2.7 分钟处位于低信号区域的中心。

调整峰积分

要调整峰积分，请执行以下步骤：

- 在目标视图重复测定下拉列表中，选择“DoubleBlank1”重复测定。
- 将鼠标光标置于保留时间轴下方（光标变为东西双向箭头：↔）。
- 单击保留时间轴下方大约 2.65 分钟的位置，然后拖动到大约 2.75 分钟处。

峰边界将变更为这些新值，初始范围用阴影区域标记，如下所示：



对其他两个“DoubleBlank”重复测定重复执行上述步骤。

准备定量

接下来设置定量标准曲线，请执行以下步骤：

- 在**设置**菜单中单击**分子设置**。
- 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**回归权重**下拉列表中，选择“ **$1 / (x*x)$** ”
- 在**MS 级别**下拉列表中，可以保留选项“**全部**”。
- 在**单位**字段中输入“**uM**”。

分子设置表单现在应显示如下：

分子设置

预测 库 标记 定量

回归拟合(R):
线性

归一化方法(N):
相对于Heavy的比率

简单母离子比率(S)

回归权重(W):
 $1 / (x * x)$

MS 级别(M)
全部

单位(U)
uM

品质因数

最大 LOQ 偏差(B): %

最大 LOQ CV(V): %

计算 LOD 的方式是(C):
无

定性离子比阈值(A): %

确定 取消

本实验使用线性回归拟合，对重标药物实施归一化。Skyline 提供了曲线随 x 而变化的权重选项：无、 $1/x$ 和 $1/(x*x)$ 。本教程使用“ $1 / (x*x)$ ”的回归权重，这会增加较低浓度校准样品的权重。单位的设置只是为了展示结果，可以设置为对您的实验有意义的任何单位。本实验中的浓度为微摩尔每升，因此单位字段设置为“uM”。

- 单击确定按钮。

此时还没有完成标准曲线的设置，还需要设置各种重复测定的标准样品类型和浓度。

设置标准曲线样品类型

系统将使用**文档网格**来检查和添加重复测定的标准品相关信息。**文档网格**是 Skyline 中一款非常有用的工具，它以类似于电子表格的形式，提供许多文档详细信息视图，其中许多信息可以在网格中直接编辑。在本例中，您需要提供各种重复测定的详细信息，如下所示：

- 在**视图**菜单上，单击**文档网格**。
- 单击网格左上角的**报告**，然后选择**重复测定**。

文档网格应显示如下：

重复测定	样品类型	分析物浓度
80 0 1 1 00 1...	未知	
81 0 1 1 00 1...	未知	
82 0 1 1 00 1...	未知	
83 0 1 1 00 1...	未知	
84 0 1 1 00 1...	未知	
87 0 1 1 00 1...	未知	
88 0 1 1 00 1...	未知	
89 0 1 1 00 1...	未知	
90 0 1 1 00 1...	未知	
91 0 1 1 00 1...	未知	
92 0 1 1 00 1...	未知	
93 0 1 1 00 1...	未知	
94 0 1 1 00 1...	未知	
95 0 1 1 00 1...	未知	
96 0 1 1 00 1...	未知	
Blank_01	未知	

- 需要时可以展开**文档网格**，这样在屏幕足够大时可以同时查看所有重复测定。
- 单击“重复测定”列标题并选择“升序排列”，按字母顺序对列表排序。

默认情况下，所有重复测定的**样品类型**值均为“未知”。对于名称以数字开头的所有重复测定，这是合乎需要的类型。除了这些操作，还应执行以下操作：

- 单击“Blank_01”的**样品类型**字段。
- 将其值从“未知”更改为“空白”。
- 现在按住 **Shift** 键并单击“Blank_03”的**样品类型**，以同时选定这三个空白的重复测定。
- 右键单击所选项目，然后单击**向下填充**。

现在，选定的所有项目都具有与选定对象中的第一项相同的值。

根据需要反复执行操作（或跳至下表）：

- 将“Cal_”重复测定设置为“标准”样品类型
- 将“DoubleBlank_”重复测定设置为“双空白”样品类型
- 将“QC_”重复测定设置为“质量控制”样品类型

记住，“SPQC_”重复测定是质量控制样品（混合了每一份样品的一小部分），因此将其保留为“未知”。

您也可以手动输入标准品浓度，但复制后再粘贴到网格中要容易得多。

- 导航到“SmallMoleculeQuant”文件夹，然后在 Excel 或任何文本编辑器中打开“Concentrations.xlsx”文件。其显示如下：

Blank_01	Blank	
Blank_02	Blank	
Blank_03	Blank	
Cal_1_01	Standard	10
Cal_1_02	Standard	10
Cal_2_01	Standard	20
Cal_2_02	Standard	20
Cal_3_01	Standard	100
Cal_3_02	Standard	100
Cal_4_01	Standard	200
Cal_4_02	Standard	200
Cal_5_01	Standard	400
Cal_5_02	Standard	400
Cal_6_01	Standard	600
Cal_6_02	Standard	600
Cal_7_01	Standard	800
Cal_7_02	Standard	800
DoubleBlank1	Double Blank	
DoubleBlank2	Double Blank	
DoubleBlank3	Double Blank	
QC_High_01	Quality Control	589
QC_High_02	Quality Control	589
QC_High_03	Quality Control	589
QC_Low_01	Quality Control	121
QC_Low_02	Quality Control	121
QC_Low_03	Quality Control	121
QC_Mid_01	Quality Control	346
QC_Mid_02	Quality Control	346
QC_Mid_03	Quality Control	346
SPQC_01	Unknown	
SPQC_02	Unknown	
SPQC_03	Unknown	

- 确保列序与文档网格相符。
- 在 Excel 中进行全选 (Ctrl-A)，然后进行复制 (Ctrl-C)。
- 在文档网格中单击“Blank_01”单元格，然后单击粘贴 (Ctrl-V)。

完成操作后，文档网格应显示如下：

文档网格: 重复测定

报告 47 of 47 导出... 操作 查找:

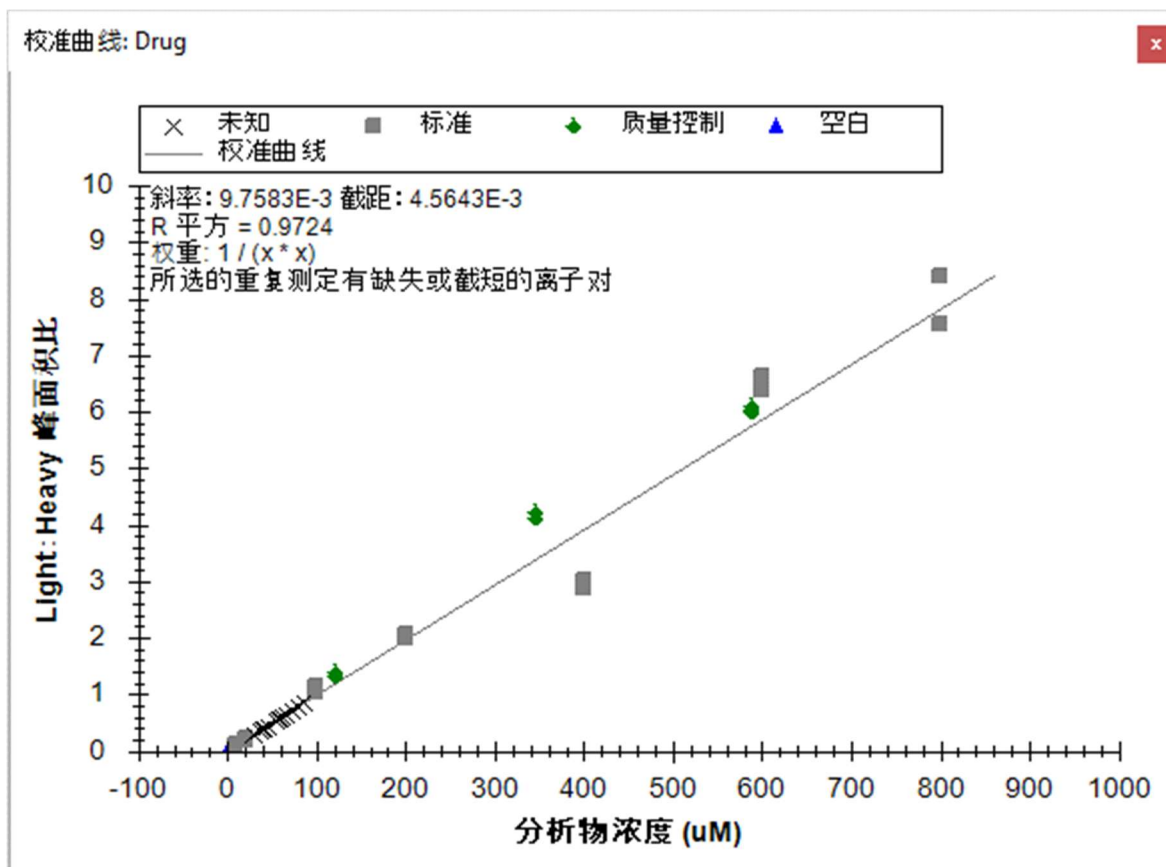
重复测定	样品类型	分析物浓度
95 0 1 1 00 1...	未知	
96 0 1 1 00 1...	未知	
Blank 01	空白	
Blank 02	空白	
Blank 03	空白	
Cal 1 01	标准	10
Cal 1 02	标准	10
Cal 2 01	标准	20
Cal 2 02	标准	20
Cal 3 01	标准	100
Cal 3 02	标准	100
Cal 4 01	标准	200
Cal 4 02	标准	200
Cal 5 01	标准	400
Cal 5 02	标准	400
Cal 6 01	标准	600
Cal 6 02	标准	600
Cal 7 01	标准	800
Cal 7 02	标准	800
DoubleBlank1	双空白	
DoubleBlank2	双空白	
DoubleBlank3	双空白	
QC High 01	质量控制	589
QC High 02	质量控制	589
QC High 03	质量控制	589
QC Low 01	质量控制	121
QC Low 02	质量控制	121
QC Low 03	质量控制	121
QC Mid 01	质量控制	346
QC Mid 02	质量控制	346
QC Mid 03	质量控制	346
SPQC 01	未知	
SPQC 02	未知	
SPQC 03	未知	

检查标准曲线

现在检查标准曲线图。

- 关闭**文档网格**。
- 在**视图**菜单中，单击**标准曲线**。

标准曲线表单应显示如下：



当前选择的重复测定为双空白时，会出现有关所选重复测定缺少离子对的注释。

从该图中可以看到，“未知”显示为 X 标记，主要出现在 Light:Heavy 峰面积比为 1.0 和 0 之间。

您可能还会注意到，某些标准样品不像所期望的那样靠近回归线。使用**文档网格**对它们之间的距离有了定性认识后，即可排除任何不合适的样品。若要这样做，请执行以下步骤：

- 在**视图**菜单上，单击**文档网格**。
- 单击网格左上角的**报告**，然后单击**重复测定**。
- 再次单击网格左上角的**报告**，然后单击**自定义报告**。
- 单击搜索按钮 并在**查找**字段中输入“准确性”。
- 单击**查找下一个**按钮。
- 单击**查找**列表中的**关闭**按钮。

- 在自定义报告表单中，**准确性**应高亮显示在**定量**子类别下。
- 选中**准确性**复选框。
- 在**分子结果**（位于**定量**的正上方）中，选中**从标准曲线中排除**。
- 在自定义视图表单顶部的**查看名称**字段中，输入“Replicates_custom_quant”。
- 单击**确定**按钮。

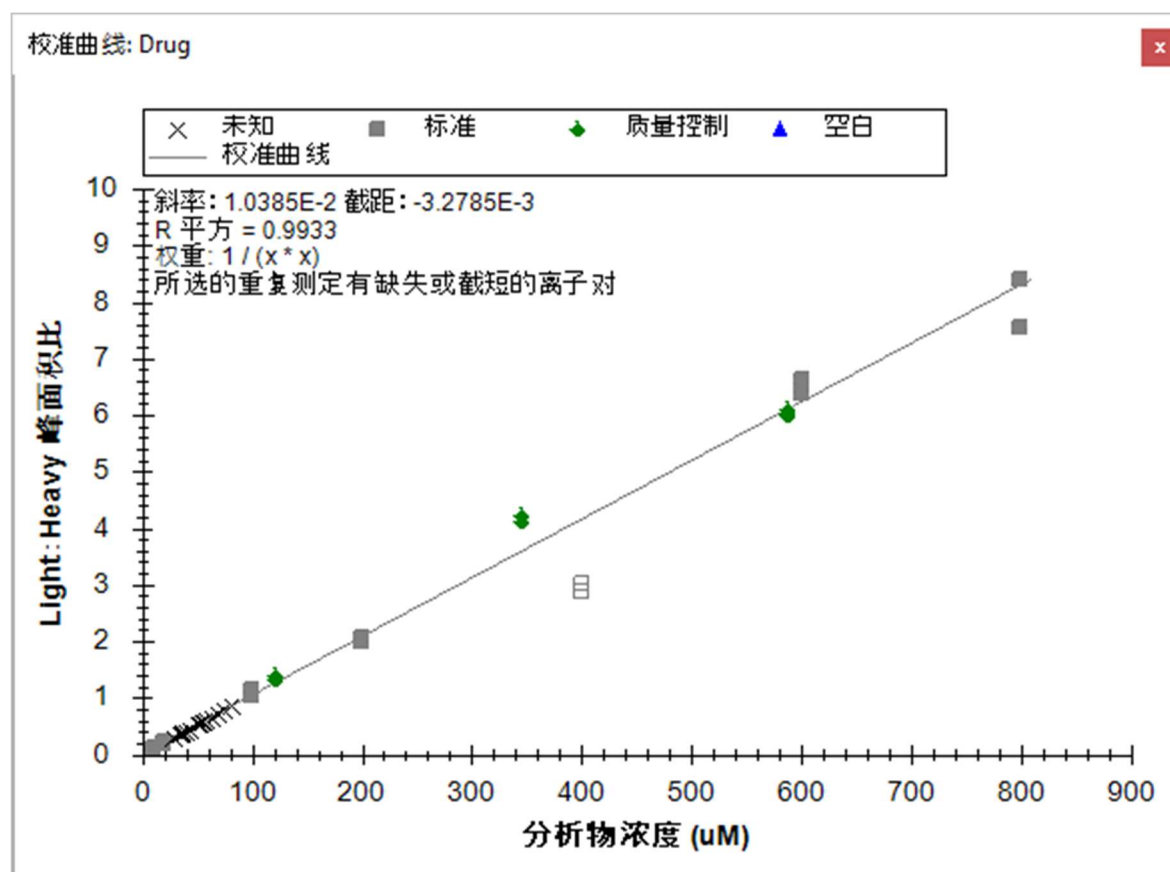
文档网格现在应显示如下：

重复测定	样品类型	分析物浓度	准确性	从校准中排除
96_0_1_1_00_1...	未知		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_01	空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_02	空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_03	空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
Cal_1_01	标准	10	103%	<input type="checkbox"/>
Cal_1_02	标准	10	97.4%	<input type="checkbox"/>
Cal_2_01	标准	20	95.7%	<input type="checkbox"/>
Cal_2_02	标准	20	100.5%	<input type="checkbox"/>
Cal_3_01	标准	100	114.6%	<input type="checkbox"/>
Cal_3_02	标准	100	106.4%	<input type="checkbox"/>
Cal_4_01	标准	200	105.1%	<input type="checkbox"/>
Cal_4_02	标准	200	101.8%	<input type="checkbox"/>
Cal_5_01	标准	400	73.4%	<input type="checkbox"/>
Cal_5_02	标准	400	76.6%	<input type="checkbox"/>
Cal_6_01	标准	600	108.9%	<input type="checkbox"/>
Cal_6_02	标准	600	112.8%	<input type="checkbox"/>
Cal_7_01	标准	800	107.5%	<input type="checkbox"/>
Cal_7_02	标准	800	96.5%	<input type="checkbox"/>
DoubleBlank1	双空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
DoubleBlank2	双空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
DoubleBlank3	双空白		#N/A	<input type="checkbox"/>
QC_High_01	质量控制	589	104.2%	<input type="checkbox"/>
QC_High_02	质量控制	589	104.4%	<input type="checkbox"/>
QC_High_03	质量控制	589	106%	<input type="checkbox"/>
QC_Low_01	质量控制	121	116.6%	<input type="checkbox"/>
QC_Low_02	质量控制	121	111.2%	<input type="checkbox"/>
QC_Low_03	质量控制	121	111.1%	<input type="checkbox"/>
QC_Mid_01	质量控制	346	121.4%	<input type="checkbox"/>
QC_Mid_02	质量控制	346	125%	<input type="checkbox"/>
QC_Mid_03	质量控制	346	121.6%	<input type="checkbox"/>
SPQC_01	未知		#N/A	<input type="checkbox"/>
SPQC_02	未知		#N/A	<input type="checkbox"/>
SPQC_03	未知		#N/A	<input type="checkbox"/>

这项分析所依据的 FDA 指南指出，校准点在已知浓度和标准曲线的反算浓度之间的偏差应小于 15%（准确性介于 85% 和 115% 之间）。准确性列显示“Cal_5”不符合该项测试。选中**文档网格**中的**从标准曲线中排除**列对应的复选框，或是右键单击**标准曲线**表单中的异常值，然后单击**从标准中排除**，可将这些重复测定剔除考虑范围。请按照以下步骤从校准回归中删除 Cal_5 重复测定：

- 在**文档网格**中，单击“Cal5_01”重复测定的**从标准中排除**列对应的复选框，然后按向下箭头键。
- 对“Cal5_02”重复执行此操作。

标准曲线现在应如下图所示。请注意，通过排除“Cal_5”异常值，R 平方值从 0.97 提高到 0.99 以上。



接下来要执行以下步骤，导入其余的未知样品：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 在**导入结果**表单中，选择在**文件中导入**单次注射重复测定。
- 在表单底部的**要同步导入的文件**下拉列表中，单击**许多个**，使用该选项可以提供最佳导入性能。
- 单击**确定**按钮。
- 此时会出现**导入结果文件**表单，并显示一系列原始数据文件。选择名称小于 80 的文件（即最多以“79_”为前缀）开头的未知运行。（注：Skyline 应当会忽略与已导入文件重叠的部分。）

- 单击**确定**按钮。

查看定量数据的一种捷径是再次使用**文档网格**，这次查看的是**肽段比率结果**视图。

- 在**视图**菜单上，单击**文档网格**。
- 在**报告**下拉列表中，单击**肽段比率结果**。
- 单击**重复测定**列标题，然后选择**升序排列**。

文档网格应显示如下：

文档网格: 肽段比率结果

报告 | 47 of 113 | 导出... 操作 | 查找:

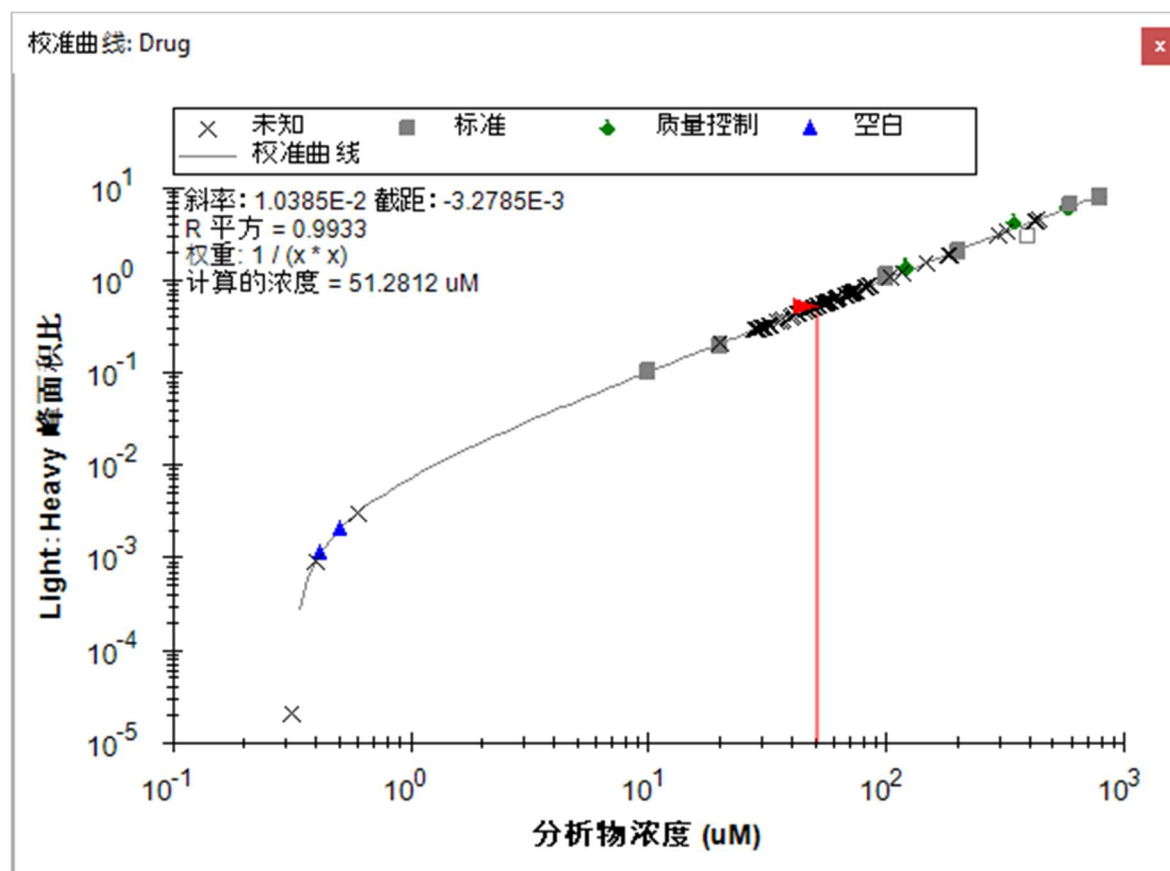
肽段	蛋白质	重复测定	肽段峰值检出比	肽段保留时间	相对于标准品比率	定量
Drug	DrugX	Blank_01	0.5	2.67	0	0.3157 uM
Drug	DrugX	Blank_02	1	2.67	0.002	0.5048 uM
Drug	DrugX	Blank_03	1	2.68	0.0011	0.4218 uM
Drug	DrugX	Cal_1_01	1	2.68	0.105	10.4297 uM
Drug	DrugX	Cal_1_02	1	2.68	0.0996	9.9036 uM
Drug	DrugX	Cal_2_01	1	2.68	0.1913	18.7352 uM
Drug	DrugX	Cal_2_02	1	2.68	0.2007	19.6453 uM
Drug	DrugX	Cal_3_01	1	2.68	1.1231	108.4626 uM
Drug	DrugX	Cal_3_02	1	2.68	1.0426	100.7119 uM
Drug	DrugX	Cal_4_01	1	2.68	2.0557	198.2779 uM
Drug	DrugX	Cal_4_02	1	2.68	1.9907	192.0188 uM
Drug	DrugX	Cal_5_01	1	2.68	2.8707	276.759 uM
Drug	DrugX	Cal_5_02	1	2.68	2.9928	288.5146 uM
Drug	DrugX	Cal_6_01	1	2.68	6.3822	614.9043 uM
Drug	DrugX	Cal_6_02	1	2.68	6.6078	636.6334 uM
Drug	DrugX	Cal_7_01	1	2.68	8.3953	808.7618 uM
Drug	DrugX	Cal_7_02	1	2.68	7.5365	726.0585 uM
Drug	DrugX	DoubleBlank1	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	DoubleBlank2	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	DoubleBlank3	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	QC_High_01	1	2.68	5.9928	577.41 uM
Drug	DrugX	QC_High_02	1	2.68	6.0076	578.8339 uM
Drug	DrugX	QC_High_03	1	2.68	6.0969	587.4288 uM
Drug	DrugX	QC_Low_01	1	2.68	1.3809	133.2886 uM
Drug	DrugX	QC_Low_02	1	2.68	1.3179	127.2255 uM
Drug	DrugX	QC_Low_03	1	2.68	1.3159	127.0333 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_01	1	2.68	4.1029	395.4108 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_02	1	2.68	4.2251	407.1797 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_03	1	2.68	4.1094	396.0431 uM
Drug	DrugX	SPQC_01	1	2.68	0.5318	51.5299 uM
Drug	DrugX	SPQC_02	1	2.68	0.5545	53.7163 uM
Drug	DrugX	SPQC_03	1	2.68	0.586	56.7468 uM
Drug	DrugX	04_0_1_1_00_1...	1	2.68	0.5293	51.2812 uM

在删除两个“Cal_5”数据点，进一步查看数据后发现，其中一个“Cal_7”点的准确性 <85%，故而应将其删除。由于没有样品在级别“Cal_6”以上，并且只有四个样品的级别在“Cal 4”和“Cal 6”之间，因此这对样品的测量几乎没有影响。

为了更容易地直观呈现出样品沿标准曲线的动态范围：

- 在标准曲线窗口中单击鼠标右键，然后单击**记录 X 轴**。
- 在标准曲线窗口中单击鼠标右键，然后单击**记录 Y 轴**。
- 单击并拖动最低和最高标准品点（灰色矩形）周围的矩形，以放大它们之间的范围。

标准曲线应如下所示：



在呈现的这种视图中，您可以一目了然地看到，样品大部分落在“Cal_2”(20 uM) 和“Cal_3”(100 uM) 之间，并且恰好位于这项分析的线性标准范围内。质量控制样品（已知的未知样品，图中的绿色菱形）的准确性介于 85% 至 115% 之间，符合 FDA 指导标准。

从这里开始，下一步是导出数据用其它工具进行后续统计分析，或在此文档中建立生物学分组，并利用 Skyline 中的某些统计分析工具或插件进行分析。这些选项在其它教程中介绍。

结语

在本教程中，您了解了如何创建以小分子定量分析为目标的 Skyline 文档，这些小分子指定为母离子化学式和加合物以及子离子质荷比值。您导入了在三重四极杆质谱仪上使用 LC-MS/MS 收集的多重重复测定数据集，了解了最初为靶向蛋白质组学应用而创建的 Skyline 功能中，有多少现成的功能可以应用于小分子数据。