

SELECT SERIES™ MRT提高分辨率和质量精度，从而改进代谢物结构解析

Adam King, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

供体外诊断使用。仅在部分国家/地区销售。

摘要

本应用简报着重说明SELECT SERIES MRT在分析人血浆样品方面的优势，显示质量分辨率和质量精度都有所提高。

优势

用于LC-MS代谢组学发现研究，扫描速度快、质量分辨率高、质量精度高且稳定。

简介

研究人类代谢组可以获取有关健康和疾病进展方面的重要信息，并有助于确定潜在的靶向和个性化治疗方法。在代谢组学发现研究中，识别重要的新生物标志物通常涉及到利用高分辨率质谱，为识别假定的生物标志物提供可重现且准确的质量信息。在识别未知分子时，该质量信息至关重要，质量精度的变化可能使识别失败，从而导致最终生物解析的错误。

飞行时间(Tof)质谱仪的质量分辨率取决于目标离子在真空中的移动距离，并与仪器飞行管的长度成正比，因此，实验室可用空间和仪器设计限制了传统Tof仪器的质量分辨率。此外，长飞行路径中的离子传输损失和反射器网格会极大地影响这些仪器的灵敏度。

实验

人血浆样品前处理

血浆样品来自六名确诊COVID-19的男性患者。根据病情严重程度将患者分为轻度和重度两组。轻度组的患者在住院期间只采集了一份血液样品，重度组的两名患者在住院期间各采集了三份血液样品。

使用甲基叔丁基醚(MTBE)萃取方法简单地萃取每份血浆样品中的脂质和小分子[1]；100 μ L样品与800 μ L MTBE混合后，再加入200 μ L甲醇。将样品置于2-8 $^{\circ}$ C温育2小时，然后再加入300 μ L水进行相分离。将样品涡旋混合2分钟，然后在4 $^{\circ}$ C下以4,500 g离心10分钟。

离心后，在不影响下层相的情况下，小心地将每份萃取物的上层有机脂质相转移到单独的HPLC样品瓶中。用氮气干燥该有机脂质相，然后用IPA复溶，并保存于-80 $^{\circ}$ C以备未来分析。然后，在不影响沉淀物的情况下小心地将下层水相转移到HPLC样品瓶中，用氮气干燥，再用乙腈:水复溶，以供亲水作用色谱(HILIC)发现方法分析。

另外，在进行如上所述的萃取之前，通过将每份研究样品的一部分混合起来，制备了混合质量控制(QC)样品。每进样10份研究样品后进样一份QC样品，以确保分析数据的质量。采用HILIC进行液相色谱分离，所用参数如表1所示。

HILIC发现方法					
液相色谱系统	Waters ACQUITY™ UPLC™ I-Class系统				
流动相A	5:95 乙腈:水, 0.1%甲酸, 10 mM甲酸铵				
流动相B	95:5 乙腈:水, 0.1%甲酸, 10 mM甲酸铵				
密封件清洗液	10%异丙醇水溶液				
弱清洗液	80:20 (v/v)水/乙腈				
强清洗液	异丙醇				
Lockspray	亮氨酸脑啡肽200 pg/μL				
色谱柱	ACQUITY™ Premier BEH™ Amide, 1.7μm, 2.1 × 100 mm (P/N 186009505)				
柱温	40 °C				
进样体积	2 μL				
运行时间	10 min				
自动进样器温度	4 °C				
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
1	初始	0.700	0	100	初始
2	0.1	0.700	0	100	6
3	5.0	0.700	20	80	6
4	6.0	0.700	50	50	6
5	6.5	0.700	50	50	6
6	7.0	0.700	0	100	6
7	10.0	0.700	0	100	6

表1.ACQUITY I-Class仪器参数。

所有SELECT SERIES MRT数据均在连续MSe模式下采集, 包含正极性和负极性ESI, 碰撞能量范围为20-40 eV。MS在EFP (扩展飞行路径) 模式下运行, 以提供理想的Tof分辨率。ESI毛细管电压设置为2.0 kV, 离子源温度和脱溶剂气温度分别设置为120 °C和500 °C, 锥孔气流速和脱溶剂气流速分别设置为50和800 L/h。数据采集的质量范围为50-2400 m/z , 扫描时间为0.1分钟。

结果与讨论

与传统的Tof仪器相比, SELECT SERIES MRT独特的飞行时间(Tof)设计使离子飞行路径可以延长至50 m, 而不影响仪器的尺寸和离子传输损失。图1展示了带有无网格镜反射器的仪器的原理图, 这对于每次通过管路时实现多次

反射而不损失离子至关重要。

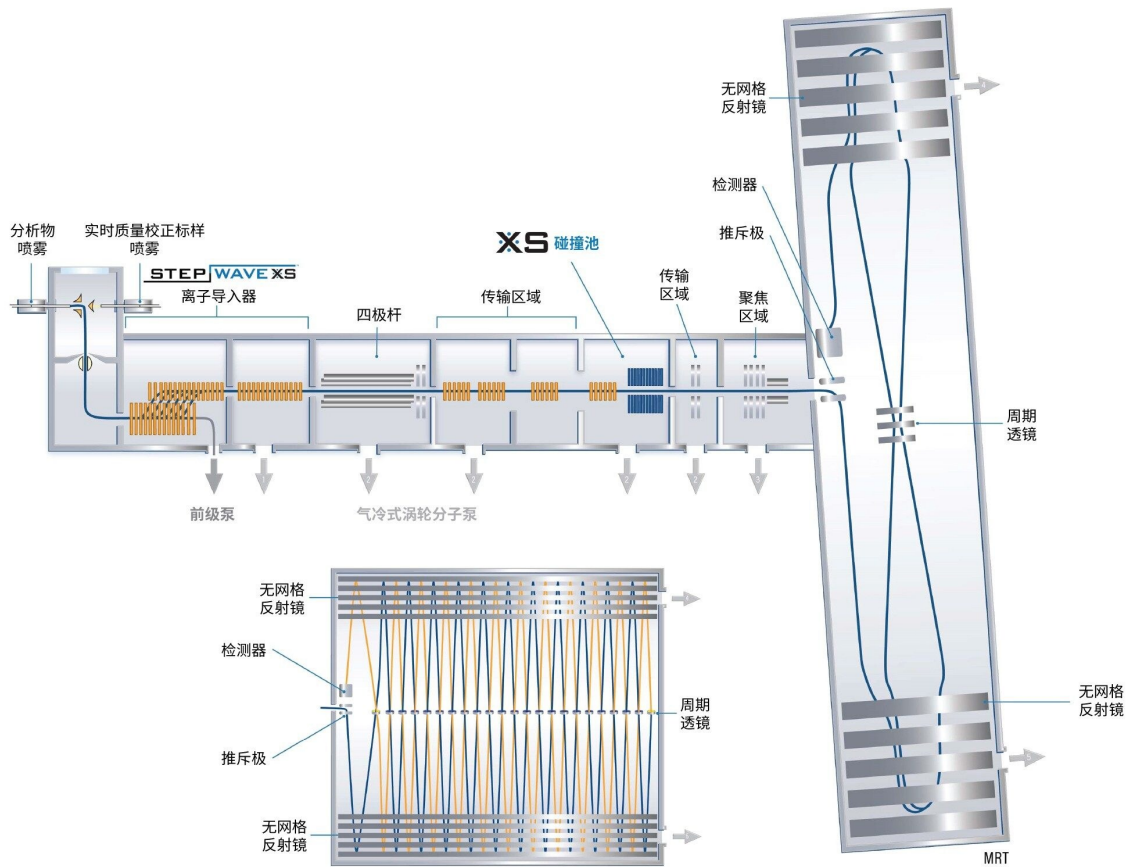


图1.SELECT SERIES MRT原理图。

表2展示了另外5个内源性化合物的示例，计算了实测 m/z 值与化合物注释的理论质量数相比的质量精度。MRT数据显示质量精度显著提高，所有化合物的亚ppm质量精度都在21-134 ppb之间。这种质量精度和高质量分辨率提高了确定分子元素组成的可信度，因此可以提高化合物注释和鉴定的准确度。

化合物	分子式	加合物	单同位素质 量数	SELECT SERIES MRT		
				实测质量数	PPM误差	PPB误差
PC (36:3)	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	M+H	806.569431	806.56946	0.04	38
PC (38:3)	C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P	M+H	812.616382	812.61649	0.13	134
牛磺次胆酸-7-硫酸酯	C ₂₆ H ₄₅ NO ₉ S ₂	M+NH ₄	597.287399	597.28739	-0.02	-21
乙酰左旋肉碱	C ₉ H ₁₇ NO ₄	M+H	204.123034	204.12303	-0.03	-28
碘海醇	C ₁₉ H ₂₆ I ₃ N ₃ O ₉	M+H	821.887586	821.88751	-0.09	-87

表2.使用SELECT SERIES MRT测量的人血浆萃取物中所选内源性化合物的质量精度示例。

对于高效、有效的LC-MS代谢组学分析来说，质谱仪保持高MS分辨率的同时，能够以足够快的速度采集数据以正确定义检测到的LC峰至关重要。这可以确保在MS中保持LC分离度，且峰可以准确积分。SELECT SERIES MRT的采集速率可达20张谱图/秒，因此即使在UPLC分离所需的快速扫描数据采集过程中（产生狭窄的分析物峰）也可以保持高质量分辨率和质量精度。图2所示酰基肉碱的提取离子流色谱图突出显示了在6秒的峰内获得的数据点数，其中MRT采集了28次扫描的数据。这证明了SELECT SERIES不仅能用于定性分析，还能用于化合物的定量分析。此外，观察色谱峰上不同点的单个扫描谱图，可以看到，在保持高质量分辨率的同时，峰上低和高强度处的质量都是稳定的。

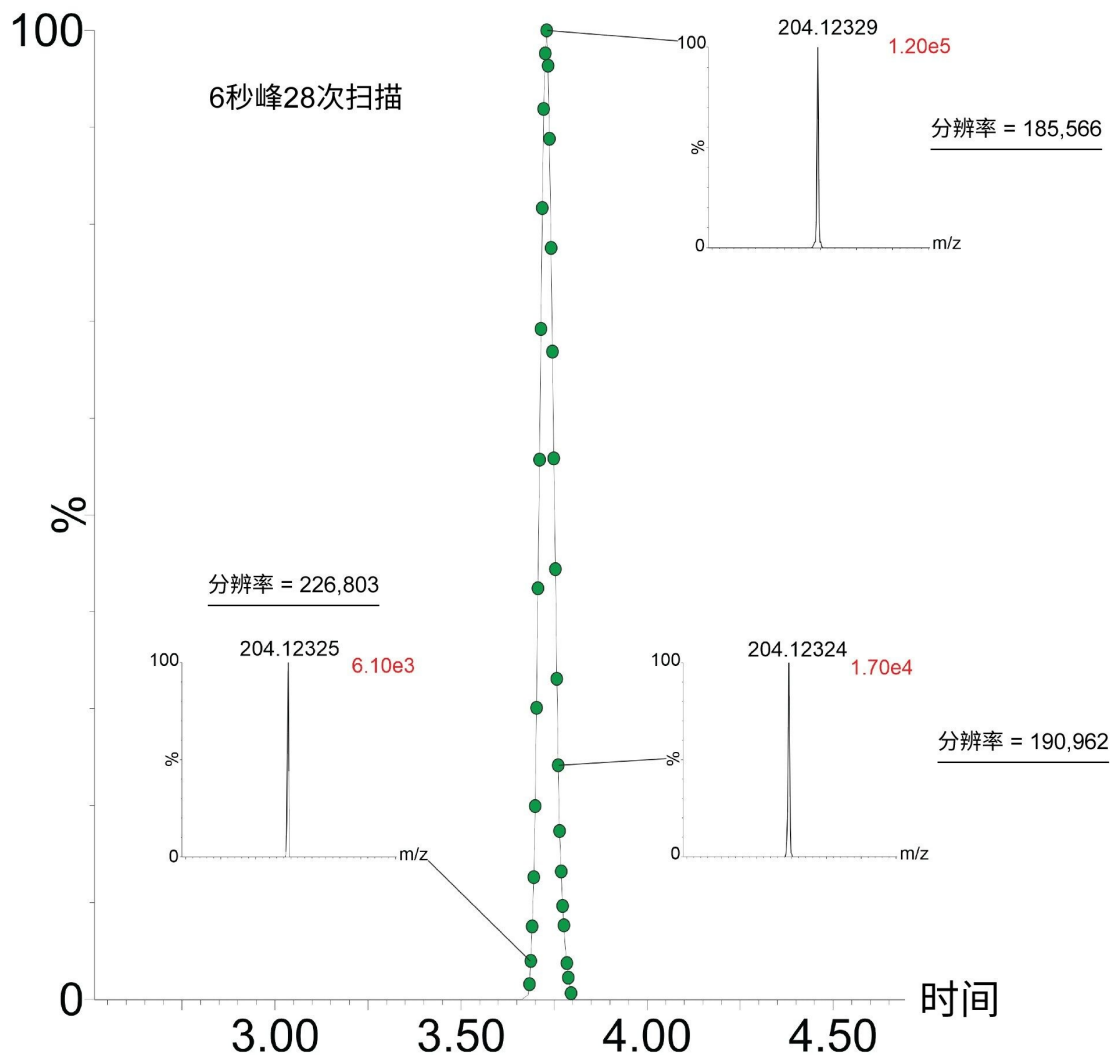


图2.内源性乙酰肉碱的提取离子流色谱图，显示峰上采集的数据点以及插入的单个扫描谱图。

精确的质量精度并不是高质量分辨率仪器的唯一优势。MRT的高质量精度使从数据库搜索返回的识别结果更具可信度。此外，MRT的高质量分辨率还允许检测具有非常相似的精确质量数的分析物，而这对于传统的高分辨率平台是一项具有挑战性的任务。图3所示的示例谱图是其中一个血浆样品中的脂质峰，其保留时间 $t^R = 1.5$ 分钟。第一个谱图（图3A）显示了 $m/z = 758.5705$ 处的脂质母离子的MRT数据和相应的离子同位素分布，以及 $m/z = 760.5859$ 处离子周围区域的扩展谱图。由于仪器的质量分辨率为224,770 FWHM，这里可以看到两种不同的离子（[1] $m/z = 760.5779$ 和[2] $m/z = 760.5859$ ），然而使用更低的质量分辨率（图3B）检测时，由于分辨率只有53,372 FWHM，同一区域仅显示一种离子。研究单个离子峰可知图3中的峰(2)对应于一个单独的共洗脱脂质，而

不是脂质的第三个同位素峰 ($m/z = 758.5705$ 处的峰(1))。图4进一步突出了这一点，其中通过搜索LIPID MAPS数据库[2]得到两种共洗脱脂质的质量数。阈值设置为 $\pm 0.01 m/z$ ，结果显示可能的注释为a) PC 34:2 ($m/z = 758.5705 [M+H]^+$)和b) PC 34:1 ($m/z = 760.5859 [M+H]^+$)。测量了a1峰和a2峰之间的质量数差为1.003 Da，对应于 ^{13}C 同位素 (元素组成 = $^{12}C_{41} ^{13}C ^1H_{80} ^{14}N ^{16}O_8 ^{31}P$)。a2和a3离子之间的质量数差也为1.003 Da，对应于PC (34:2)的第三个同位素峰以及两个 ^{13}C 同位素。因此，测量a2和b1离子之间的质量数差显示其差异大于 ^{13}C 同位素，因此可以认为b1是第二个共洗脱脂质。此外，进一步研究了 $t^R = 1.5$ 分钟的谱图以及图4和图5中注释的脂质的 $M+K^+$ 加合物，显示了详细的PC(34:2)的精细同位素图 (图5)，其中 ^{41}K 同位素峰很容易从 $^{13}C ^{39}K$ 离子和PC (34:1) $M+^{39}K^+$ 离子中分离出来。

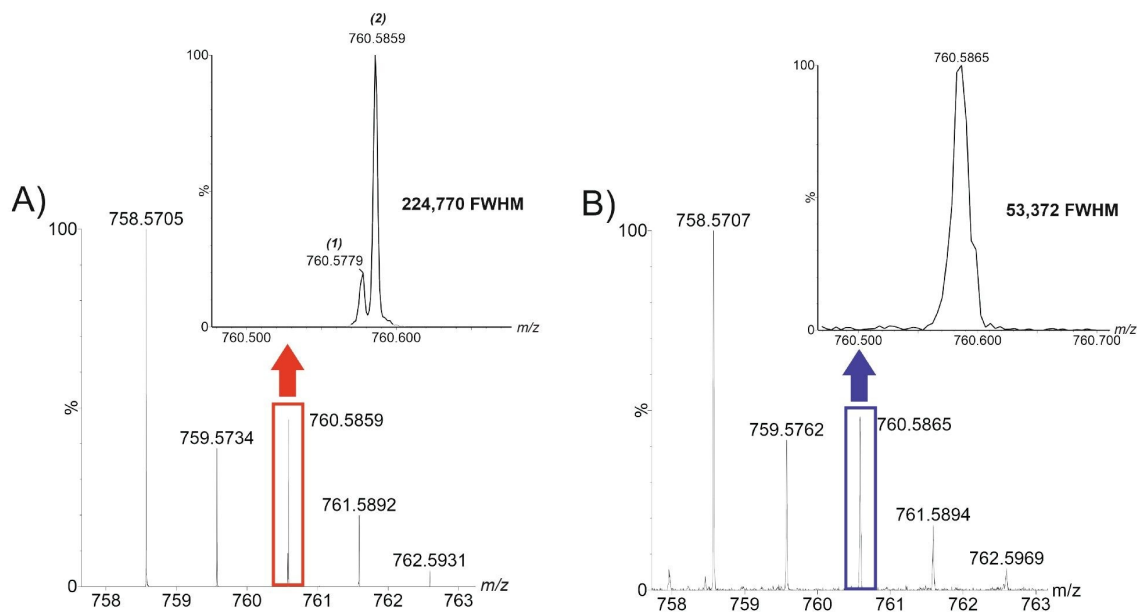


图3.使用高质量分辨率(A)的SELECT SERIES MRT获得的来自人血浆萃取物的脂质峰的示例谱图 (保留时间为1.5分钟) 和以更低分辨率(B)获得的数据，显示了MRT从PC(34:1)共洗脱质量数中分离出PC(34:2)同位素的能力。

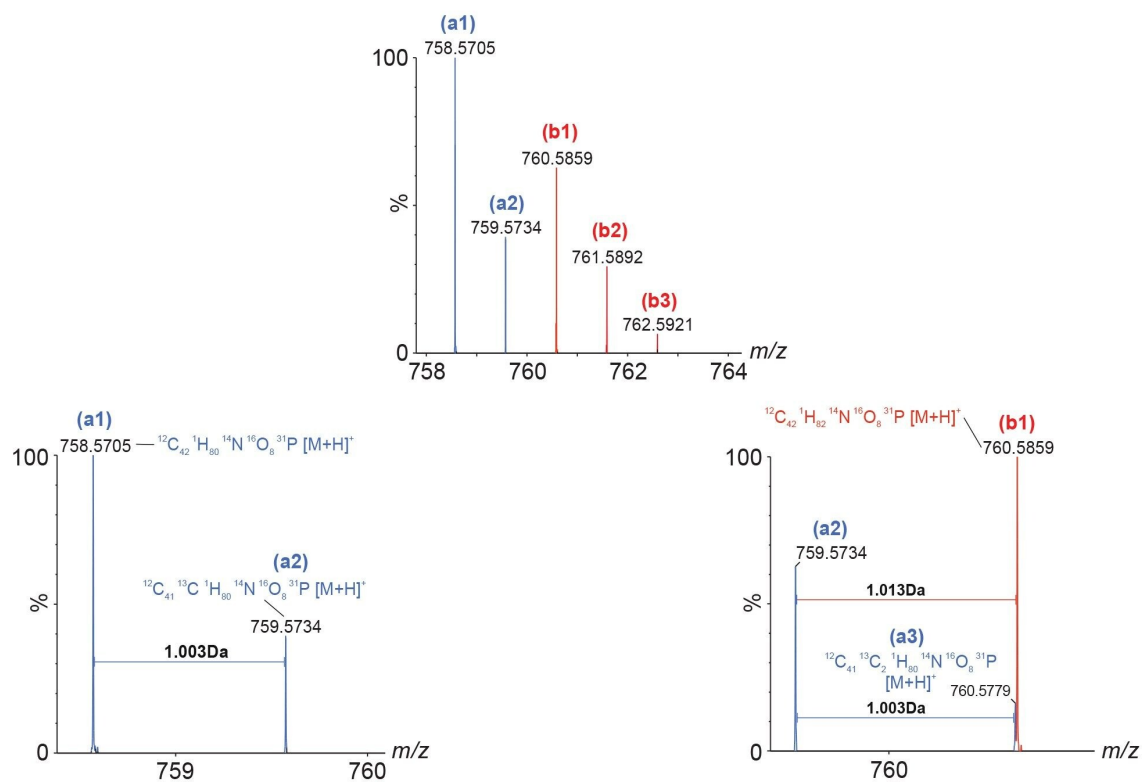


图4.脂质PC (34:2) (a)和PC (34:1) (b)的母离子和同位素谱图，突出显示了从分子PC(34:1)离子(b1)中分离出来的对应的 $^{13}\text{C}_1$ 离子(a2)和 $^{12}\text{C}_2$ 离子(a3)。

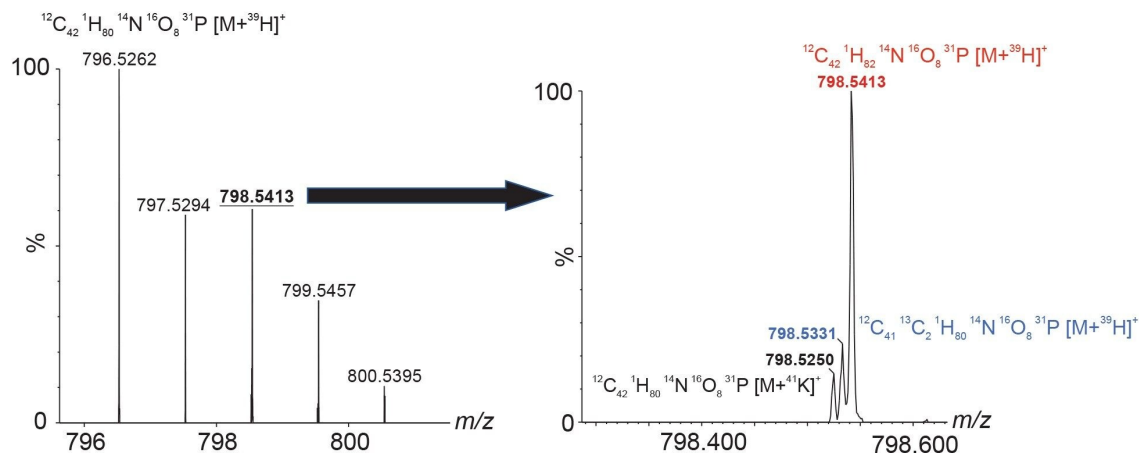


图5. PC (34:2) $M+K^+$ 加合物的精细同位素图，显示了 ^{39}K 、 ^{41}K 和 $^{12}C_2$ 的峰。

结论

生物标志物发现研究需要可重现且高精度的质量数测量。代谢组学尤其依赖于通过数据库搜索获得的可靠且准确的鉴定。SELECT SERIES MRT仪器具有高质量分辨率且质量精度可达ppb水平，可进行高度精确的化合物鉴定，并且使结构解析具有可信度。ToF技术的一个公认优势是能快速扫描，从而提供定量和定性数据集。本文列出的数据展示了通过UPLC分离收集定量数据的能力，通常在不到10秒宽的峰形上可提供超过25个数据点，同时保持高质量精度和分辨率。

参考资料

1. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia TV., Schevchenko A., Schwudke D., Lipid Extraction by Methyl-Tert-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 49(5):1137–46.
2. Fahy E., Subramaniam S., Murphy R., Nishijima M., Raetz C., Shimizu T., Spener F., Van Meer G., Wakelam M., and Dennis E. Update of the Lipid Maps® Comprehensive Classification System for Lipids. , *Journal of Lipid Research* 50, S9–S14 (2009).

特色产品

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

[SELECT SERIES Cyclic IMS <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297)

[Progenesis QI <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134790652>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134790652)

720007753ZH, 2022年10月



© 2024 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](#)