

## 使用SELECT SERIES™ MRT高分辨率质谱技术对人尿液样品进行代谢分析

---

Adam King, Isabel Riba, Martin Palmer, Emma Marsden-Edwards

Waters Corporation

---

### 摘要

对复杂生物基质进行代谢分析有助于了解外源性因素对人类健康和疾病进展的影响。这些代谢组学研究中使用的基质包含许多不同的分析物，因此需要高分辨率仪器来对检测到的许多不同化合物进行去卷积处理。本研究使用SELECT SERIES MRT技术，能够对人尿液中的未知代谢物进行可靠的亚ppm级注释，该技术的高质量分辨率还可以通过分辨精细同位素分布进一步提高元素组成解析的可信度。

### 优势

- 鉴定结果的可信度更高，减轻后续验证步骤的负担
- 具有超高分辨率和ppb级质量精度，不受限于采集速率，提高兼容性，能够支持多种方法
- 支持精细同位素结构解析，提高元素组成计算的可信度
- 高效的引导式信息学工作流程，有助于数据解析和结果生成

### 简介

---

高分辨率质谱技术已广泛应用于代谢组学研究中，可以为生物基质中检测到的未知分子提供有价值的精确质量数测量结果。鉴定这些来自人体研究的未知化合物对于帮助了解潜在的生物学机理、疾病进展标志物或外源性因素对身体的影响至关重要。因此，测量结果的准确度和精密度越高，化合物鉴定的可信度就越高。此外，高质量分辨率的现代仪器可以解析更精细的同位素分布，有助于确定元素组成和确认加合物信息。这些高分辨率的仪器还可以帮助区分分子量相似的两种共洗脱化合物，而低分辨率仪器很难做到。将高分辨率质谱本身的强大功能特性与液相色谱相结合，非常有利于进一步提高代谢物组覆盖率。相关领域的研究人员使用各种不同的工作流程选项来处理数据，但都遵循相同的原则：峰提取、归一化、统计分析和最终的特征注释<sup>1</sup>。本文将介绍SELECT SERIES MRT质谱仪在人尿液样品分析中的应用，以及该仪器与Waters™代谢组学工作流程和第三方统计工具的整合<sup>2</sup>。SELECT SERIES MRT拥有众多特有的功能，包括亚ppm级质量精度和高质量分辨率，以及较快的UPLC采集速率，有助于提高重要特征注释的可信度。

---

## 实验

### 样品描述

美国国家标准与技术研究院(NIST)的人尿液样品购自MERCK，包括来自三组志愿者（吸烟者、不吸烟者和被动吸烟者）的混合尿液。从每个混合样品中取一部分，用去离子水按1:4的比例稀释，涡旋混合样品，并在13,000 rpm下离心10 min。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ Premier UPLC™
色谱柱：	ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm
柱温：	45 °C
样品温度：	4 °C
进样体积：	5 μL
流速：	0.6 mL/min

流动相A: 含0.1%甲酸的水溶液

流动相B: 含0.1%甲酸的乙腈溶液

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.6	99	1	6
0.3	0.6	99	1	6
7	0.6	50	50	6
8	0.6	30	70	6
8.1	0.6	1	99	6
9	0.6	1	99	6
9.1	0.6	99	1	6
10	0.6	99	1	6

## 质谱条件

质谱系统: SELECT SERIES MRT

电离模式: ESI+和ESI-

采集范围: 50-2400 *m/z*

采集模式: MS<sup>E</sup>

仪器模式: MRT

毛细管电压: 3.0 kV

碰撞能量范围: 10-40 eV

锥孔电压： 40 V

## 数据管理

色谱软件： MassLynx™ V4.2

质谱软件： MassLynxV4.2

信息学软件： Progenesis QI V3.0

---

## 结果与讨论

### 数据采集和处理

每个混合尿液样品重复分析三次，在批次的开始和结束时分析混合的质控样品，进样穿插在样品列表中间进行。在批次开始前，通过进样沃特世LCMS QC参比标准品采集系统适应性测试结果，评估仪器性能（包括保留时间和质量精度）。随后进样QC样品(n=10)以活化系统，然后再分析研究样品。所有SELECT SERIES MRT数据都是在MRT正离子和负离子模式下通过MS<sup>F</sup>技术采集到的，并使用200 pg/ μL亮氨酸脑啡肽进行了锁定质量数校正。将得到的原始数据文件导入Progenesis QI软件处理，对齐样品运行结果，进行峰提取和归一化。在从QC样品提取的特征中，标记出%CV大于30%的特征，然后隐藏这些特征，不作进一步的统计分析。

### 统计分析

在代谢组学研究中，得到的LC-MS数据可重现至关重要，这样才能确保检测到的特征差异是来自样品的实际差异，而不是因为分析方法变异。将Progenesis QI软件生成的峰列表导入Metaboanalyst中进行统计分析<sup>3-4</sup>。图1显示了主成分分析(PCA)的结果，可以看出不同样品组之间实现了良好的分离，混合QC样品（深蓝色）紧密聚集，各组的重复进样结果也紧密聚集在一起。这证明仪器具有良好的稳定性（质量精度、保留时间和信号强度），并表明分析系统在该批进样中表现出耐用性。系统的耐用性可减少分析变异，使分析人员能够充分探索生物学变异。

通过PCA评估各组样品的分离情况后，使用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对各组样品进行二元比较。OPLS-DA用于判定两组不同样品之间的差异，从而评估哪些特征载荷（精确质量数-保留时间对）对两组目标样品之间的差异造成了具体影响，如S-plot（图1）所示，图中标出了对两组样品造成最大差异的特征。三组样品都进行了OPLS-DA分析（吸烟者与不吸烟者、吸烟者与被动吸烟者以及不吸烟者与被动吸烟者），图1示例的S-plot用黑框突出显示了每组比较中的前三个显著特征。

图2的箱线图突出显示了吸烟者与不吸烟者之间选定特征的显著性和归一化丰度，表明这些特征是造成研究组之间差异的主要因素。

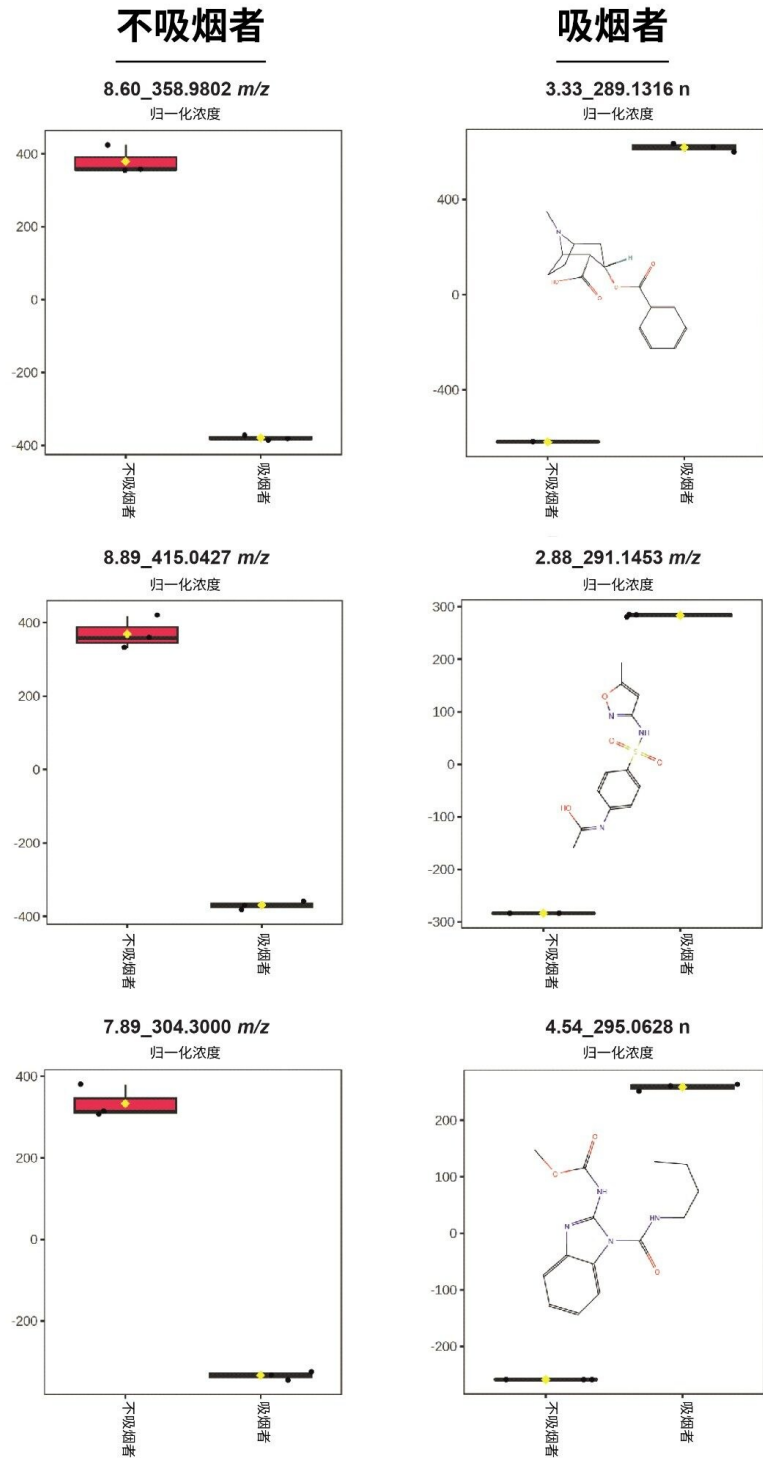


图2.不吸烟者和吸烟者之间前三种特征的OPLS-DA箱线图

## 利用超高精确质量数实现可靠的化合物注释

SELECT SERIES MRT可提供准确的亚ppm水平质量数测量，这对于确保现有数据库和谱库中化合物注释的可信度非常重要。结合准确的MS/MS碎片离子信息，可进一步提高注释的可信度。在数据库（包括HMDB和内部FDA药物数据库）中搜索OPLS-DA确定的主要差异性特征，母离子和碎片离子的容差为1 ppm，得到的注释见表1。经过数据库搜索后，发现许多热门匹配结果对应于药物或药物代谢物，包括广泛使用的镇痛药对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸、治疗消化性溃疡和反流的药物雷尼替丁、作为联合抗生素（复方新诺明）用于治疗与慢性阻塞性肺病(COPD)相关肺部感染的抗生素乙酰磺胺甲恶唑和甲氧苄啶，以及娱乐性药物可卡因及其生物标志物代谢物苯甲酰爱康宁<sup>5-6</sup>。有四个特征无法在所用的数据库中鉴定出来，但其中两个初步分配了元素组成，对其余两个特征的光谱检查显示出可能存在二氯化物同位素分布的分子，这些分子可能是含卤素的药物（如双氯芬酸）经过代谢结合产生的。

特征	显著特征分组	初步注释	质量误差 (ppm)	说明	数据库来源
1.70_327.0956 n	被动吸烟者	对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸	0.69	对乙酰氨基酚的代谢物	HMDB
4.54_295.0628 n	吸烟者	乙酰磺胺甲恶唑	0.40	抗生素的代谢物	HMDB
2.88_291.1453 m/z	吸烟者	甲氧苄氨嘧啶	0.50	抗生素	HMDB
3.86_304.1545 m/z	被动吸烟者	可卡因	0.55	娱乐性药物	HMDB
3.33_289.1316 n	吸烟者	苯甲酰爱康宁	0.59	可卡因的代谢物	HMDB
2.08_314.1414 n	被动吸烟者	雷尼替丁	0.57	治疗消化性溃疡的药物	FDA数据库
3.60_390.0975 n	被动吸烟者	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub> S 或 C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> PS	0.64 0.13		
7.89_304.3000 m/z	不吸烟者	C <sub>21</sub> H <sub>37</sub> N	0.40		
8.60_358.9802 m/z	不吸烟者				
8.89_415.0427 m/z	不吸烟者				

表1.Progenesis QI对各组OPLS-DA分析中前三个显著特征的注释列表

图3展示了表1中列出的两个初步注释示例，以及相应的模拟碎裂匹配、质量精度和同位素相似性。数据可信度很高，表明分配正确，例如，注释为苯甲酰爱康宁的特征3.33\_289.1316n显示质量误差为0.59 ppm，达到亚ppm水平，同位素相似性超过99%。此外，有多个模拟碎片离子与谱图中的碎片离子匹配，且这些碎片离子的质量精度均小于2 ppm。

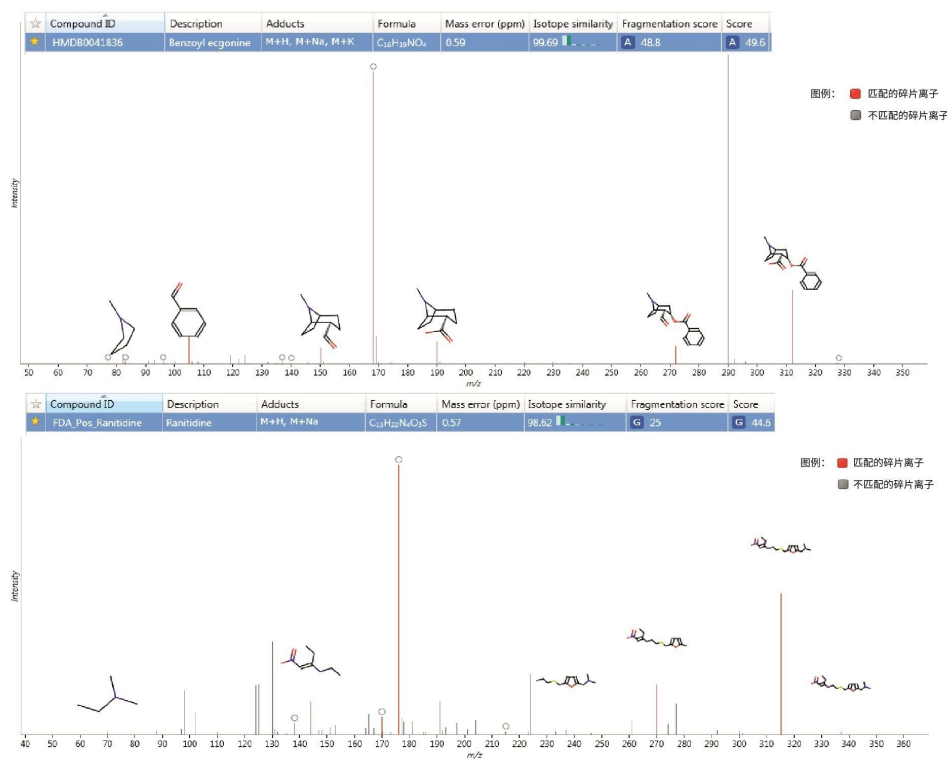


图3.在Progenesis Q1中搜索数据库得到的初步化合物注释，显示了模拟碎裂的匹配结果

除了通过精确质量数测定和详细的碎片离子匹配提高注释的可信度外，通过对比理论元素组成检验同位素分布和精细同位素分布，还可以进一步提高注释的可信度。图4的谱图显示了特征分配为苯甲酰爱康宁(C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>)的第二个同位素峰簇的扩展区域。图中蓝色表示理论同位素谱图，叠加的粉色表示理论质心质量数，最后绿色表示NIST尿液分析的质心(经锁定质量数校正)原始数据。如图所示，每种离子的理论数据和实验数据较为吻合，计算的质量误差范围为0.09 ppm~1.86 ppm，相对丰度几乎相同。表2中的数据进一步检验了该特征(3.33\_289.1316n)同位素的相对丰度和重现性，并再次与理论值进行了比较。将每个同位素主峰的相对丰度百分比与预期理论丰度进行比较，可以发现三次重复进样的重现性良好，丰度百分比保持一致。此外，表中还比较了图4所示的精细同位素分布在不同进样间的重现性，并与理论值进行了对比，结果表明这些低强度离子的重现性良好。



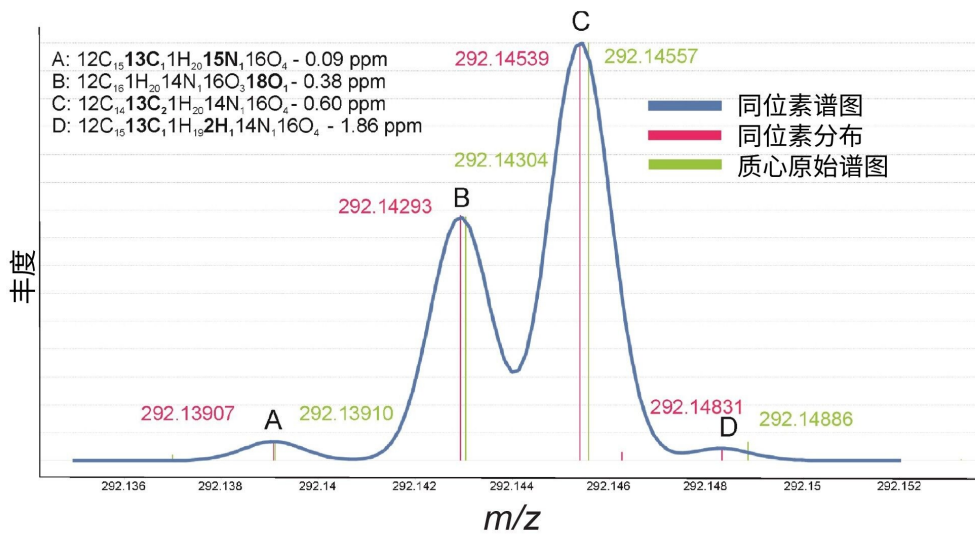


图4.扩展谱图示例，显示了特征3.33\_289.1316n（注释为苯甲酰爱康宁）第二个同位素峰的精细理论同位素分布（粉色），与质心原始谱图（绿色）叠加，并插入了同位素与理论值相比的质量精度。

		%同位素丰度		
同位素		单	1	2
离子 <i>m/z</i>		290.13868	291.14204	292.14539
进样	1	83.8	15.1	1.1
	2	83.7	15.1	1.2
	3	83.7	15.1	1.2
理论		84.2	14.6	1.2

		%同位素丰度			
同位素		2a	2b	2c	2d
离子 <i>m/z</i>		292.13907	292.14293	292.14539	292.14832
进样	1	3.5	35.5	61.0	—
	2	2.8	35.5	60.1	2.6
	3	3.4	31.8	62.4	2.3
理论		2.7	35.3	60.3	1.7

表2.比较吸烟者样品中特征3.33\_289.1316*n*的同位素主峰丰度(a)和精细同位素离子丰度(b)与理论丰度的重现性

确定并注释目标特征后，即可在Progenesis QI中查看归一化丰度曲线，确定不同样品组中代谢物水平的变化。图5所示的曲线图显示了三组不同样品中注释为尼古丁及其代谢物（包括可替宁、尼古丁葡萄糖苷酸、可替宁葡萄糖苷酸、羟基可替宁、尼古丁N-氧化物和反式-羟基可替宁葡萄糖苷酸）的特征的变化。这些丰度曲线有助于提高注释的可信度，因为不同样品组之间的丰度变化符合预期，吸烟者组中的尼古丁代谢物水平最高，被动吸烟者组中的丰度有所降低，而不吸烟者组中丰度为零。尼古丁代谢物的误鉴不符合这一趋势，因此可以排除这种情况。

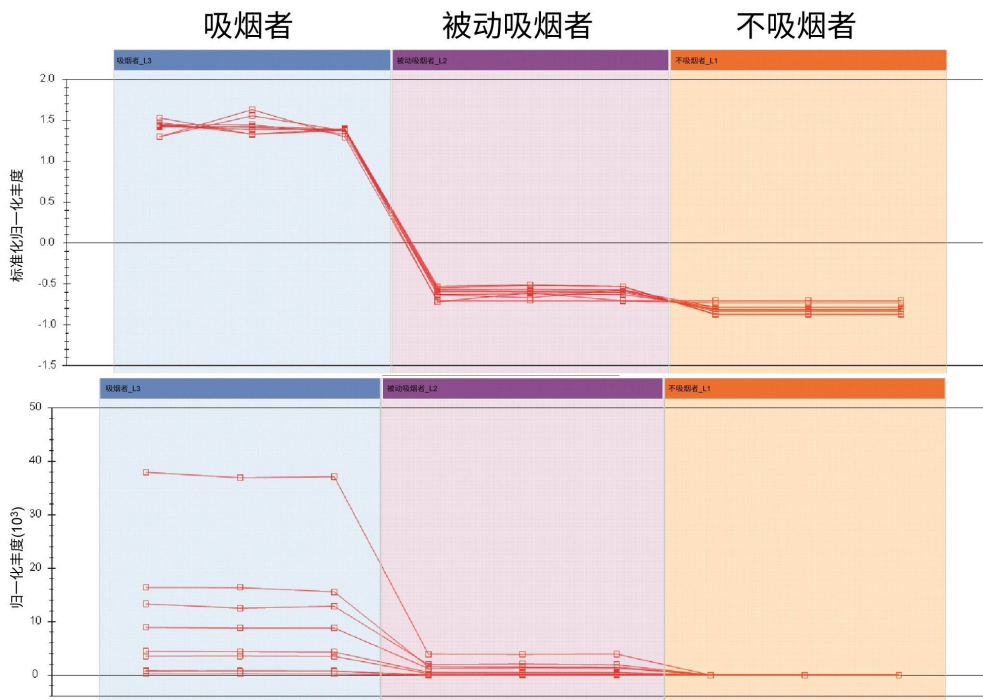


图5.各组样品进样中尼古丁代谢物的丰度曲线

为充分了解吸烟带来的生物学影响（或药物影响），务必要准确鉴定所有外源性特征及其代谢物并将其去除，使它们不会影响进一步的统计分析。图6的PCA图显示了去除外源性特征的统计影响。在未去除这些特征之前，吸烟者组和被动吸烟者组在主成分2上分离，但在去除尼古丁和可卡因代谢物后，它们不再分离。现在的统计数据表明，影响吸烟者的潜在生物学机制也会影响被动吸烟者。

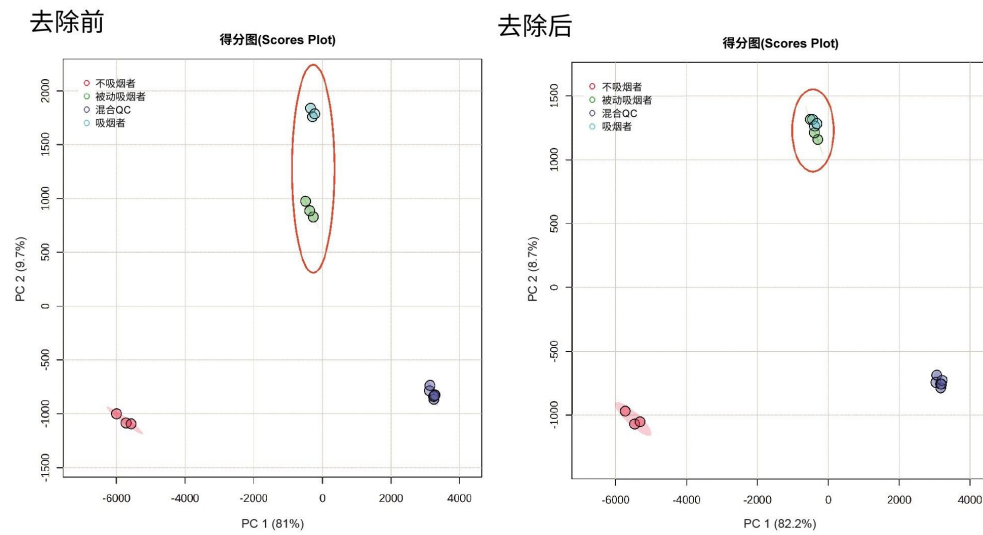


图6. NIST尿液样品和QC样品中所有特征以及去除与药物和尼古丁代谢物相关的特征后得到的PCA图

## 结论

发现代谢组学研究在常规工作中需要分析大量样品，在分析过程中，质量分辨率低和质量精度差异性可能降低潜在生物标志物鉴定的可信度，影响下游对结果的解析。本应用纪要重点介绍了如何将SELECT SERIES MRT与UPLC和沃特世代谢组学工作流程相结合来生成数据，并概述了该仪器的独特功能如何提高数据质量。高质量精度和高质量分辨率与优质的MS/MS数据相结合，大大提高了尿液样品间重要目标特征注释的准确度和可信度。此外，本文还强调了确定分析物初步鉴定对于进一步解析相关生物学机理的重要性。

## 参考资料

1. Smith, C. A, Want, E. J, O'Maille, G, Abagyan, R, Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* 2006, 78 (3), 779–787.

2. Cooper-Shepherd, D. A, Wildgoose, J, Kozlov, B, Johnson, W. J, Tyldesley-Worster, R, Palmer, M. E, Hoyes, J. B, McCullagh, M, Jones, E, Tonge, R, Marsden-Edwards, E, Nixon, P, Verenchikov, A, Langridge, J. I. Novel Hybrid Quadrupole-Multireflecting Time-of-Flight Mass Spectrometry System. *J Am Soc Mass Spectrom* 2023, 34 (2), 264–272.
3. Pang, Z, Zhou, G, Ewald, J, Chang, L, Hacariz, O, Basu, N.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS Spectra Processing, Multi-Omics Integration and Covariate Adjustment of Global Metabolomics Data. *Nat Protoc* 2022, 17 (8), 1735–1761.
4. Xia, J, Psychogios, N, Young, N, Wishart, D. S. MetaboAnalyst: A Web Server for Metabolomic Data Analysis and Interpretation. *Nucleic Acids Res* 2009, 37 (Web Server issue), W652–60.
5. Mwenya, D. M, Charalambous, B. M, Phillips, P. P, Mwansa, J. C, Batt, S. L, Nunn, A. J, Walker, S, Gibb, D. M, Gillespie, S. H. Impact of Cotrimoxazole on Carriage and Antibiotic Resistance of *Streptococcus Pneumoniae* and *Haemophilus Influenzae* in HIV-infected Children in Zambia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54 (9), 3756–62.
6. Sohy, C, Pilette, C, Niederman, M. S, Sibille, Y. Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Antibiotics: what studies are still needed? *Eur Respir J* 2002, 19 (5), 966–75.

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <

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

SELECT SERIES MRT <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/select-series-mrt.html>>

MassLynx <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/mass-spectrometry-software/masslynx-mass-spectrometry-software.html>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/mass-spectrometry-software/progenesis-qi-software/progenesis-qi.html>>

720008296ZH, 2024年4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](#)