

新内源性保留指数校正代谢组学保留时间偏差

陈钦盛¹, 张晨晗¹, 宋沛东¹, 唐惠儒¹

(1.复旦大学人类表型组研究院, 上海 201203)

摘要: 基于超高效液相色谱-质谱法的非靶向代谢组学数据中代谢物保留时间 (t_R) 随着实验条件 (如洗脱梯度与流速) 差异会发生不同程度地偏差。然而, t_R 是与质谱数据正交可用于代谢物结构鉴定的一个重要信息, 但市售标准品有限。内源性饱和直链酰基肉碱不仅有效校正不同实验条件 (流动相组成、洗脱梯度、流速、洗脱时间、色谱柱类型与柱温) 与仪器平台所引起的 t_R 偏差, 且相较于外源添加 (或合成的) 标准品或衍生化反应可减少数据采集与分析的干扰。因此, 该内源性保留指数校正可用于无外源添加的不同代谢组学 t_R 数据库或实验数据的匹配与比较。

关键词: 直链酰基肉碱; 内源性保留指数; 代谢组学; 超高效液相色谱-质谱法; 代谢分析
中图分类号: Q591 **文献标识码:** 期刊[J]

A novel endogenous retention-index for minimizing retention-time variations in metabolomic analysis

Chen Qinsheng¹, Zhang Chenhan¹, Song Peidong¹, Tang Huiru¹

(1. Human phenome Institute, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract : The metabolite retention time (t_R) of untargeted metabolomics data based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry varies with experimental conditions (such as elution gradient and flow rate). However, t_R is an important information that can be used to identify metabolite structures orthogonal to mass spectrometry data, but less commercially available standards. Endogenous straight-chain acylcarnitines not only corrected t_R deviations caused by different experimental conditions (mobile phase composition, elution gradient, flow rate, elution time, columns and temperature) and instrument platforms, but also reduced interference in data acquisition and analysis compared to exogenous (or synthetic) standards or derivatization reactions. Therefore, the endogenous retention-index correction can be used to match and compare different metabolomic t_R databases or experimental data without exogenous additions.

Keywords : Straight-chain acylcarnitines; Endogenous retention-index; metabolomics; Ultrahigh-performance liquid-chromatography mass spectrometry; Metabolic profiling

1 实验仪器和材料

1.1 仪器

Waters ACQUITYH-Class 色谱系统 (Waters, Milford, USA), 包括 WatersACQUITYBSM 二元溶剂管理系统和 WatersACQUITYSampleManagerFTN 样品管理系统。Xevo G2-XS QTOF 质谱系统 (Waters, Milford, USA)。

1.2 试剂和药品

质谱级纯甲酸、甲醇和乙腈全部购买于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。超纯水均取自于 Milli-Q (德国 Merck Millipore 有限公司) 超纯水系统 (电阻率 $>18.2\text{ M}\Omega/\text{cm}$)。酰基肉碱分析纯标准品购买于 Sigma-Aldrich 试剂有限公司 (中国)、百灵威科技有限公司 (中国) 或阿拉丁化学试剂有限公司 (上海)。

2 实验方法

2.1 生物基质代谢物提取

(1) 取肝组织、粪便或 A549 细胞各约 50 mg, 分别加入 600 μL 预冷 80% 水溶液 MeOH, 用 TissueLyser (Qiagen, Germany) 匀浆 6 min, 在冰浴中超声 10 min (45 kHz, 200 W), 离心 10 min (14000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$) 得到上清。重复两次, 得到三种上清液, 在室温下用氮气混合干燥。提取液再溶于 200 μL 50% 的水溶液中。

(2) 取 50 μL 血清或血浆与 200 μL MeOH 混合, 离心 10 min (14000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), 得到 200 μL 提取物用于 UPLC-MS 分析。

(3) 将 20 μL 尿液与 80 μL MeOH/ACN/H₂O (1:1:8, v/v/v) 混合, 纺丝 10 min (14000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), 得到 100 μL 提取物, 用于 UPLC-MS 分析。

2.2 超高效液相色谱-质谱法参数

(1) UPLC-QTOFMS 系统包括 Waters ACQUITY HSS T3 色谱柱 (100 mm*2.1 mm i.d., 1.8 μm)、Waters ACQUITY®UPLC 与 Xevo G2-XS QTOFMS 建立数据库和获取代谢组学数据。含有 0.1% FA 的水与 CAN 分别作为洗脱溶剂 A 与 B, 并采用 2 种色谱洗脱方法 (M₀ 与 M₁, 具体参数见表 1)。其中, 流速均为 0.5 min, 色谱柱温均为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 M₀与 M₁色谱洗脱梯度

M ₀ 时间/min	B%	M ₁ 时间/min	B%
0	1	0	1
1	1	0.5	1
3	15	2	15
6	50	7	50
9	95	9	95
12	95	12	95
12.1	1	12.1	1
15	1	15	1

质谱采集模式为 MSECcentroid Sensitivity，低能量为 4 eV，高能量为 10-50 eV。动态范围为 Normal，质量范围为 50-1000 Da，扫描时间为 0.1 secs。使用 Lockspray 进行实时采集并校正，内参校准液使用亮氨酸-脑啡肽（[M + H]⁺，*m/z* 556.2771），浓度 200 pg/μL，流速 10 μL/min。源参数及事件参数见表 2、表 3。采用 HMDB、METLIN 和内部数据库 Progenesis QI 与 Masslynx^T 进行代谢物鉴定分析。

表 2 质谱源参数信息

源参数	数值
喷针位置	7
毛细管电压(KV)	2
样品锥孔电压	30
离子源补偿	80
源温度(°C)	120
脱溶剂温度(°C)	500
锥孔反吹气流量(L/hr)	50
脱溶剂气流量(L/hr)	800
自动增益控制 AGC	On
Quad Profile	Auto
Lockspray 实时校正液流速(μL/min)	10

表 3 质谱事件参数信息

时间/mins	事件	动作	系统
0	Flow State	LC	Sample
0	Reservoir	B	LockSpray
0	Refill	Auto-Refill	LockSpray
0	Infusion	Start	LockSpray
10.00	Flow State	Waste	Sample

2.3 酰基肉碱保留时间确定与代谢物保留时间偏差校正

首先, 酰基肉碱可采用商业标准品确定保留时间, 也可根据保留时间与碳链长度的对数进行良好线性拟合进行鉴定与预测。再者, 16 种直链酰基肉碱 (C0-C26) 通过将其酰基碳数的 100 倍定义为保留指数 (RI) 来建立内源性保留指数, 并基于式 1 进行 M_0 参数条件下内源性代谢物的 RI 计算。然后, 采用式 2 计算从 M_1 参数条件下代谢物 i 的校正后 t_{Ri}^C 。

$$RI_i = RI_m + (RI_n - RI_m) \times \frac{t_{Ri}^E - t_{Rm}^E}{t_{Rn}^E - t_{Rm}^E} \quad \text{式 1}$$

其中, t_{Rm}^E 、 t_{Ri}^E 、 t_{Rn}^E 为代谢物 i 和相邻的两个酰基肉碱 m 和 n 的实验 t_R ($t_{Rm}^E < t_{Ri}^E < t_{Rn}^E$); RI_i 、 RI_m 与 RI_n 表示代谢物 i 和相邻的两个酰基肉碱 m 和 n 的 RI。

$$t_{Ri}^C = t_{Rm}' + (t_{Rn}' - t_{Rm}') \times \frac{RI_i - RI_m}{RI_n - RI_m} \quad \text{式 2}$$

其中 t_{Ri}' 、 t_{Rm}' 与 t_{Rn}' 为 M_1 参数条件下分析物 i 和相邻的两个酰基肉碱 m 和 n 的实验 t_R 。

3 结果与讨论

3.1 实验结果

采用内源性保留指数 (endoRI) 校正色谱条件变化引起的人源血清、血浆、尿液、粪便、A549 细胞和兔肝脏样本中数百种特征的 t_R 偏差。经内源性保留指数校正后, M_1 参数条件下血清、肝脏和尿液代谢组中 95% 代谢物的 t_R 偏差由 1 min 降至 0.2 min 内 (图 1)。另外, 同批次内单独运行中连续获取酰基肉碱正离子和负离子下相应的 t_R 变化很小 (< 0.12 min), 正离子数据中的内源性保留指数仍然可以用于负离子模式。

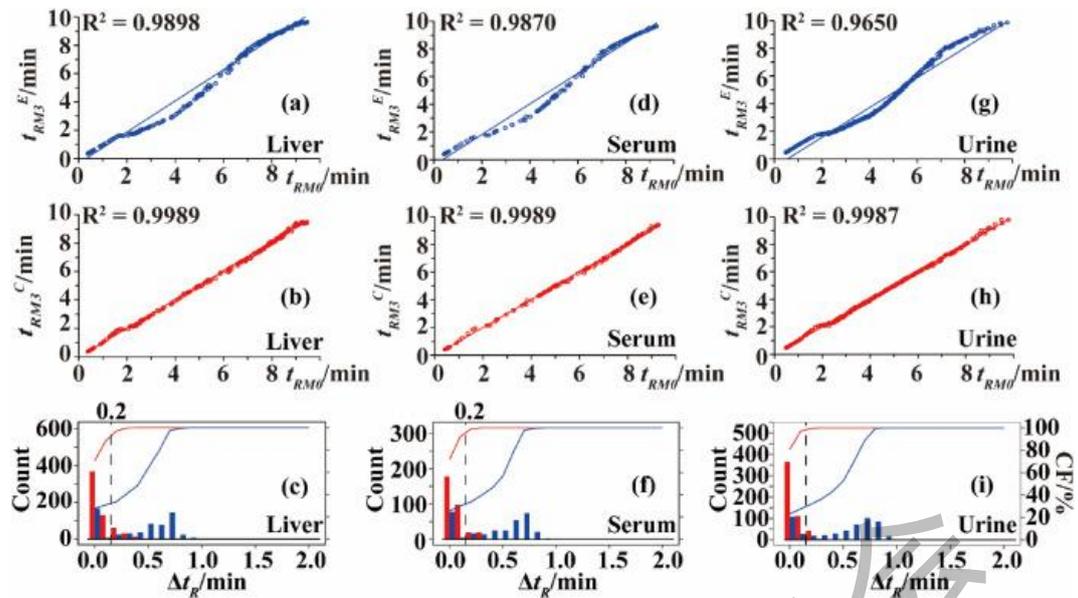


图1 endoRI 校正 M1 参数下 (a-c) 兔肝脏、(d-f) 人血清和 (g-i) 尿样品的代谢物 t_R 偏差

3.2 结论

在基于 UPLC-MS 且无添加外源性化合物 (或衍生化试剂反应) 的非靶向代谢组学数据中, 内源性保留指数可有效校正洗脱梯度变化引起的各种代谢物 t_R 偏差, 从而造成不同来源的非靶向或/和靶向代谢组学实验数据间进行批次间匹配与相互转换。

参考文献:

- [1]Chen Q, Lu Q, Zhang L, Zhang C, Zhang J, Gu Y, Huang Q, Tang H. A novel endogenous retention-index for minimizing retention-time variations in metabolomic analysis with reversed-phase ultrahigh-performance liquid-chromatography and mass spectrometry[J]. Talanta, 2023, 268(Pt 1): 125318.