

基于直接进样-串联质谱法的柠檬酸异构体和等重体的可靠定量分析

孙玉婷¹, 唐惠儒¹

(1.复旦大学人类表型组研究院, 上海 201203)

摘要: 直接进样-串联质谱 (DI-MS/MS) 是大样本高通量定量代谢组学、质谱成像和单细胞研究的绝佳工具, 但却无法区分具有相似质谱特征的异构体/等重体。在此, 我们采用实验和理论计算的方法, 全面研究了尿液等生物样品中共存的三种柠檬酸异构体 (柠檬酸、异柠檬酸、葡萄糖二酸-1,4-内酯) 和一种异构体 (奎宁酸) 的裂解途径和差分离子迁移谱 (DMS) 的特征, 并开发了一种 DI-DMS-MS/MS 方法, 可同时定量分析这四种异构体/等重体。上述化合物的定量限均低于 5.5 nM, 准确度均在 94% 以上。此技术方案已用于对人类和小鼠尿样中这些化合物的定量分析, 结果显示个体间和物种间存在明显的水平差异, 结果已发表在 *Talanta* 上。

关键词: 柠檬酸异构体; 直接进样-串联质谱法; 碰撞诱导解离; 差分离子迁移率质谱法

中图分类号: Q591

文献标识码: 期刊[J]

Reliable quantification of citrate isomers and isobars with direct-infusion tandem mass spectrometry

Sun Yuting¹, Tang Huiru¹

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

Abstract: Direct-infusion tandem mass spectrometry (DI-MS/MS) is an excellent tool for large cohort high-throughput quantitative metabolomics, MS imaging and single cell studies but incapable of discriminating isomers/isobars with similar MS spectral features. With experimental and density-functional theory (DFT) approaches, here, we comprehensively investigated the fragmentation pathways and characteristics of differential ion-mobility spectrometry (DMS) for three citrate isomers (citrate, isocitrate, glucaro-1,4-lactone) and an isobar (quinic acid) co-existing in biological sample such as urine. A DI-DMS-MS/MS method was then developed to simultaneously quantify these four isomers/isobars with m/z 191-87 (CoV, -5.5 V), 191-73 (CoV,

-3.5 V), 191-85 (CoV, -29.5 V) and m/z 191-93(CoV, -41.5V) for citrate, isocitrate, glucaro-1,4-lactone and quinate, respectively. The limit-of-quantification was below 5.5 nM whilst accuracy was above 94% for all above compounds. This technical protocol has been used for the quantitative analysis of these compounds in human and mouse urine samples, and the results, which showed significant inter-individual and inter-species differences in levels, have been published in *Talanta*.

Keywords : Citrate isomers; Direct-infusion tandem mass spectrometry; Collision-induced dissociation; Differential ion-mobility spectrometry

利用直接进样-串联质谱法 (DI-MS/MS) 进行定量代谢组学分析是一种高通量方法, 可揭示生理和病理生理过程的生化细节。然而, 几乎所有生物样本都是极其复杂的代谢物混合物, 在同一样本中同时存在许多异构体和同分异构体, 但其生化意义却完全不同。在这种情况下, 可靠的异构体/等重体区分和定量就变得至关重要, 也极具挑战性, 尤其是在使用低分辨率三重四极杆质谱仪、质谱成像方法或进行单细胞研究时。

在这项工作中, 我们系统地研究了柠檬酸异构体/等重体在碰撞诱导解离下的裂解碎片以及密度泛函理论 (DFT) 计算得出的电离势。我们的目标是: (1)找到异构体/等重体的特征子离子; (2)开发一种在一次运行中同时定量复杂混合物样品中异构体/等重体的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂和样本

柠檬酸 (CA)、异柠檬酸 (ICA)、葡萄糖二酸-1,4-内酯 (1,4-GL) 和奎尼酸 (QA) 标准品购于 Sigma Aldrich (MO, USA)。LC 级的甲醇 (MeOH), 乙腈 (ACN) 和异丙醇 (2-PrOH), LC-MS 级甲酸购买自美国 Fisher Scientific 公司 (NJ USA)。超纯水 (电阻率 >18.2 MΩ/cm) 使用 Millipore Elix Advantage 超纯水系统 (German) 制备。标准品使用 50% 甲醇溶液配置成 1 μM 进行质谱分析。

成年健康人尿液样本采集自作者晨间中段尿。20 μL 尿液样本使用含有 0.1% 甲酸的 80% 甲醇溶液 (v/v) 稀释 100 倍, 至于 -20°C 冰箱 1 小时除盐。高速离心 (4°C, 12000 rpm, 10 min) 后取上清待测。

1.2 DI-ESI-DMS-MSⁿ 实验

多级串联质谱 (MS^n) 实验和差分离子淌度 (DMS) 使用 Sciex 6500+ SelecXION®-QTRAP-MS 仪器直接进样 (DI) 完成分析。直接进样注射器流速为 10 μ L/min, 毛细管电压设置为 -3500 V, 离子源温度为 200 $^{\circ}$ C, 气帘气 (CUR) 压力为 20 psi。MSn 实验使用阱内 CID (In-trap CID) 的增强子离子扫描 (EPI) 和 MS3 模式, 逐步施加 -5eV~30 eV 采集二级和三级质谱图; 使用四极杆 CID (Beam-type CID) 模式获得碎片离子的碰撞能依赖丰度曲线。DMS 实验使用异丙醇作为流动相改性剂, 淌度管温度设置为 Medium, 分辨率 DR 设置为 High, 分离电压 (SV) 为 3500 V, DMO offset 设置为 Low。固定 SV 电压扫描补偿电压 (CoV) 获得分子离子的 DMS 分离曲线。

2 结果与讨论

离子迁移谱 (IMS) 和差分离子迁移谱 (DMS) 技术被广泛报道用于鸟枪法代谢组分析。IMS 根据离子在惰性气体 (如 N_2 和 Ar) 中的碰撞截面 (CCS) 来分离离子, 而 DMS 则通过在惰性气体 (如 N_2) 和异丙醇等改性剂 (图 1a) 的电场 (SV) 中施加结构敏感电压 (CoV) 来分离离子。然而, IMS 方法无法同时区分这四种异构体/等重体, 这可能是因为它们的 CCS 值相似且 CCS 分辨率有限。相比之下, 我们的 DMS 结果显示, 以异丙醇为改性剂、分离电压为 3500 V 时, 1,4-GL (CoV, -29.5 V) 和 QA (CoV, -41.5 V) 与 CA (CoV, -5.5 V) 和 ICA (CoV, -3.5 V) 的分离效果很好 (图 1b)。尽管我们已经对 CoV、SV、DMS 温度、不同的修饰剂及其水平进行了全面优化, 但 CA 和 ICA 在 DMS 下仍无法分离。尽管如此, CA (m/z 191-87) 和 ICA (m/z 191-73) 完全不同的离子对使得它们能够在 DMS 从 QA 和 1,4-GL 分离出来后进行精确定量。因此, 使用 DI-DMS-MS/MS 方法可同时定量这四种化合物: CA 的 CoV 为 -5.5 V, m/z 191-87; ICA 的 CoV 为 -3.5 V, m/z 191-73; 1,4-GL 的 CoV 为 -29.5 V, m/z 191-85; QA 的 CoV 为 -41.5 V, m/z 191-93。

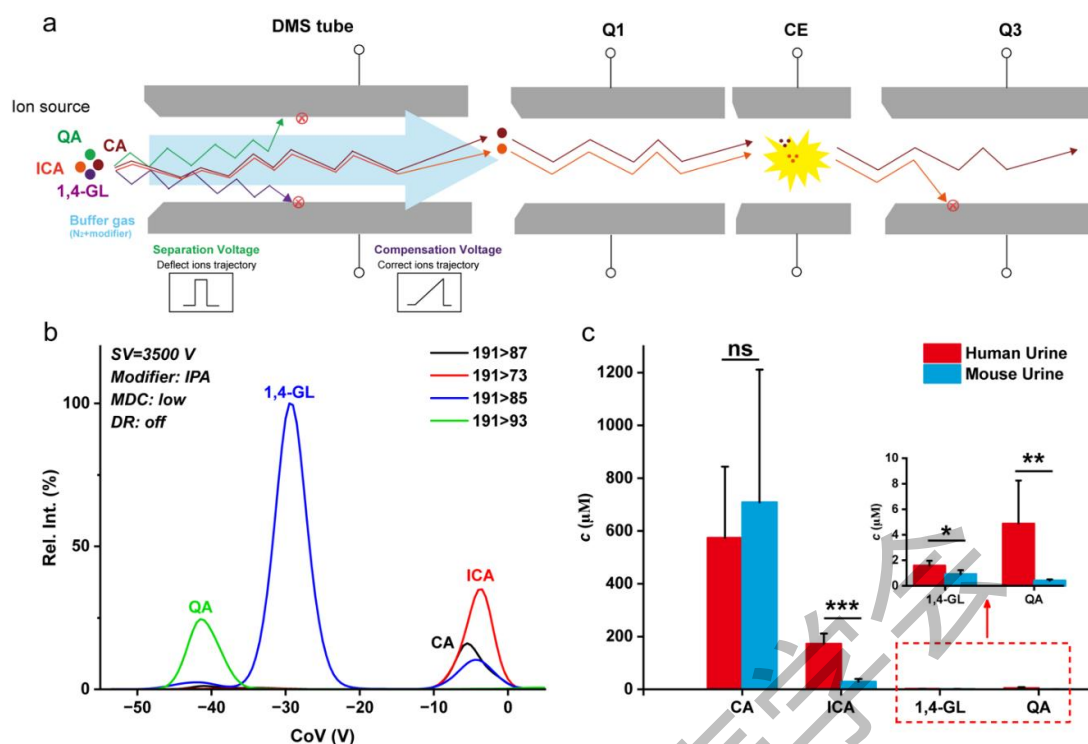


图 1 (a) 结合 DMS 和 MS/MS 进行离子分离的原理。(b) 以异丙醇 (IPA) 为改性剂, 分离电压 (SV) 优化为 3500 V 的柠檬酸异构体 (CA、ICA、1,4-GL) 和等重体 (QA) 的 DMS 分离效果; (c) 使用 DI-DMS-MS/MS 测定的人类 (n=5) 和小鼠 (n=6) 尿液中 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 的浓度 (ns: 无显著差异; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001)

此外, 我们还评估了该方法的定量准确性和适用性。我们首先以 CA-d₄ 为内标 (IS), 分析了相同浓度的 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 混合物。CA、ICA、1,4-GL 和 QA 对 IS 的相对响应因子 (RRF) 分别为 0.62、0.40、0.06 和 0.29。然后, 我们分析了另一种浓度比为 1:2:4:8 的 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 混合物。以 CA-d₄ 作为 IS 并使用上述 RRF, 所有四种化合物的定量准确度均在 94% 以上。根据上述信噪比, 估计 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 的定量低限 (LLOQ) 分别为 3.43、5.33、1.11 和 1.51 nM。最后, 我们利用这种 DI-DMS-MS/MS 方法对人尿样和小鼠尿样中的这四种代谢物进行了定量分析 (图 1c)。人和 C57BL/6 小鼠尿液中的 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 均在 200 nM 以上, 个体差异和两个不同物种之间的差异明显; 人尿液中的 ICA、1,4-GL 和 QA 浓度明显高于 C57BL/6 小鼠尿液。这些结果表明, 柠檬酸异构体和异构体确实共存于生物样本中, 要想准确了解它们的生物化学特性, 尤其是 CA 和 ICA 在 TCA 循环中的具体步骤以及 1,4-GL 和 QA 在饮食中的影响, 就必须同时对它们进行定量。此外, 这些尿液同分异构体/等重体的种间差异也会影响到它们的生物化学性质。

3 结论

样品中共存的柠檬酸异构体（柠檬酸、异柠檬酸、1,4-GL）和等重体（奎宁酸）在负离子模式下比在正离子模式下显示出更好的质谱图。在无色谱分离的 QqQ 或 QTRAP 系统上，本文开发的基于 DMS 的 MRM 方法能够在一次运行中同时定量 1,4-GL、QA、CA 和 ICA 这些异构体/等重体。所有四种化合物的 LLOQ 均低于 5.5 nM，准确度均高于 94%。对人类和 C57BL/6 小鼠样本尿液中的 CA、ICA、1,4-GL 和 QA 浓度进行了定量分析，结果显示出个体间和物种间的差异；后三种化合物在小鼠样本中的含量明显低于人类样本。这提供了一种高通量代谢组学方法，可在了解生物样本中同分异构体和等重体代谢物的详细碎裂途径的基础上对其进行定量，该方法可作为类似的基于质谱的高通量代谢组学分析的模板。

参考文献:

- [1]Hu, Q. Y., Y. T. Sun, X. Y. Mu, Y. L. Wang and H. R. Tang (2023). "Reliable quantification of citrate isomers and isobars with direct-infusion tandem mass spectrometry." *Talanta* 259: 124477-124485.