

多种生物基质中数百种酰基肉碱的定量分析

陈钦盛¹, 张婧娴¹

(1. 复旦大学人类表型组研究院, 上海 201203)

摘要: 酰基肉碱是脂肪酸和支链氨基酸的代谢中间体, 具有重要的生物功能和病理生理意义。该方法在 10 分钟内同时理论定量 1136 个酰基肉碱 (C0-C26), 且灵敏度、线性度、准确度、精度、稳定性与技术员一致性均优。基于构建的定量的结构-保留关系能够在无标准的情况下预测酰基肉碱的保留时间 (t_R), 从而建立其多反应监测参数 (t_R 、离子对与碰撞能) 的数据库。更重要的是, 该方法可测定人源血浆与尿、小鼠肾、肝、心、肺与肌肉中的 514 种酰基肉碱, 为多种生物基质中酰基肉碱的定量与功能研究提供了一种快速的方法。

关键词: 酰基肉碱; 超高效液相色谱串联质谱; 定量结构; 分子表型

中图分类号: Q591

文献标识码: 期刊[J]

Quantitative analysis of hundreds of acylcarnitines in various biological substrates

Chen Qinsheng¹, Zhang Jingxian¹

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

Abstract: Acylcarnitine is a metabolic intermediate of fatty acids and branched-chain amino acids having important biological functions and pathophysiological significances. The method can theoretically quantify 1136 acylcarnitines (C0-C26) simultaneously in 10 minutes with excellent sensitivity, linearity, accuracy, accuracy, stability and technician consistency. Based on the constructed quantitative structure-retention relationship, the retention time (t_R) of acylcarnitines can be predicted without any criteria, thereby establishing a database of its multiple reaction monitoring parameters (t_R , ion-pairs and collision energy). More importantly, the method can determine 514 acylcarnitines in human plasma and urine, mouse kidney, liver, heart, lung and muscle, providing a rapid method for the quantitative and functional study of acylcarnitines in a variety of biological substrates.

Keywords: Acylcarnitine; UPLC-MS/MS; quantitative structure-retention relationship; molecular phenotype

1 实验仪器和材料

1.1 仪器

Shimadzu 色谱系统结合 SCIEX QTRAP 6500 Plus 用于酰基肉碱定性定量分析。

1.2 试剂和药品

HPLC 级甲醇 (MeOH)、异丙醇 (IPA) 和二氯甲烷 (DCM) 购自 Merck (Darmstadt, Germany), 乙腈 (ACN)、甲酸和乙酸购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。超纯水 (H₂O) 来自 milliq 系统 (Millipore, Billerica, MA, USA)。49 个酰基肉碱标准品和 26 个酰化标准品从 Sigma-Aldrich 等公司购买。

2 实验方法

2.1 储备液与工作溶液准备

将每个酰基肉碱标准品溶于 MeOH 或 CH₂Cl₂:MeOH (3:2, V/V) 至配制的单个储备液 (1-15 mM)。将这些溶液混合, 用氮气干燥, 再溶于水溶液 (90%, V/V) 中, 得到酰基肉碱混合物的工作溶液。然后将混合溶液依次稀释至 13 个溶液, 用于构建校准曲线 (Level 1-13)。然后, 以 26 个酰化酰基肉碱溶于 90% (V/V) 水溶液中作为内标 IS。

2.2 生物基质酰基肉碱提取

将 20 μ L 人源血浆或尿液依次与 500 μ L 含 0.5% (V/V) 乙酸的预冷 IPA、20 μ L 混合 IS 溶液和 30 μ L 水混合, 在冰浴中超声 5 min, 在 4 $^{\circ}$ C、16,000 g 离心 10 min 后, 得到 520 μ L 上清。再次重复上述过程, 所得的两种上清液用氮气混合并干燥。

每个组织样品 (10 mg) 加入含有 0.5% (V/V) 乙酸、20 μ L 混合 IS 和 30 μ L 水的 400 μ L 预冷 IPA, 用 20 μ L 组织破碎机匀浆 3 min, 离心 10 min (4 $^{\circ}$ C, 16,000 g), 得到上清液, 重复提取 2 次, 合并 3 个上清液并干燥。分别用 40 μ L 的 90% (V/V) MeOH 水溶液复溶。

2.3 超高效液相色谱-质谱法参数

QTRAP 6500 Plus (SCIEX, Chromos, Singapore) 与两台 Shimadzu Nexera UPLC 系统 (Kyoto, Japan) 结合, 基于 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m), 使用预定 MRM 同时定量酰基肉碱。数据采集和处理采用 Analyst 和 OS (v1.7, SCIEX,

Chromos, Singapore)。色谱柱温度 40℃，进样量 0.5 μL，流速为 0.5 mL/min。以 H₂O 和 ACN（均含 0.1%（V/V）甲酸）分别作为流动相 A 和流动相 B，洗脱梯度见表 1。

表 1 色谱洗脱梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	99.0	1.0
0.2	99.0	1.0
1.0	99.0	1.0
3.0	85.0	15.0
6.0	50.0	50.0
9.0	3.0	97.0
10.2	3.0	97.0

质谱 ESI 源采用正模式，且最佳 MRM 参数为:气帘气 (CUR), 35 psi; 碰撞气体(CAD), medium; IS 参数, 5500 V; 源温度, 400 °C; GS1, 45 psi; GS2, 45 psi; 去簇电压, 50V; 入口电位 (EP), 10 V; 碰撞电池出口电位 (CXP), 11V。对不同酰基链长度的酰基肉碱分别采用各自优化的碰撞能值。

2.4 定量结构-保留关系(QSRR)和 MRM 参数数据库

利用 R 软件包 (v4.1.0) 中的 LM 函数，通过逐步回归和全子集回归对酰基链的各种结构特征的 t_R 依赖模型进行优化，其中特征包括碳原子数 (c)、支链甲基 (b)、碳-碳双键 (d)、羟基 (h)、羧基 (j)、支链位置 (p) 和双键 (q)。通过 10 次交叉验证，得到预测误差最小、调整拟合优度较好的优化模型 (式 1)。基于实验和计算的 t_R 结果，平均绝对误差 (MAE, 采用式 2) 和 Pearson 相关系数 (r^2) 来评估模型的整体性能。

$$R_a^2 = 1 - \frac{\left(1 - \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}\right)^{(n-1)}}{n-m-1} \quad (\text{式 1})$$

$$\text{MAE} = \frac{\sum_{i=1}^N |y_i - \hat{y}_i|}{n} \quad (\text{式 2})$$

3 结果与讨论

3.1 实验结果

(1) 在正离子模式下，所有酰基肉毒碱都可以观察到更强烈的信号，包括母离子 $[M]^+$ (源于左旋肉碱季铵阳离子)， $[M - 59.0735]^+$ ($N(\text{CH}_3)_3$ 的中性损失) 和来自左旋肉碱部分

的三个片段离子 (m/z 144.1019、85.0284 和 60.0808)。同时，所有共轭酰基肉碱都有母离子 $[M]^+$ ， $[M - \text{共轭物} - 59.0735]^+$ 和来自肉碱部分的三个片段离子。由于片段离子 m/z 85.0284 响应均最强，故 MRM 离子对 $[M]^+/85.0284$ 可用于酰基肉碱。 $[M - \text{共轭物} - 59.0735]^+$ 是共轭酰基肉碱唯一的强烈片段离子，故 $[M]^+/[M - \text{共轭物} - 59.0735]^+$ 可用于定量离子对。

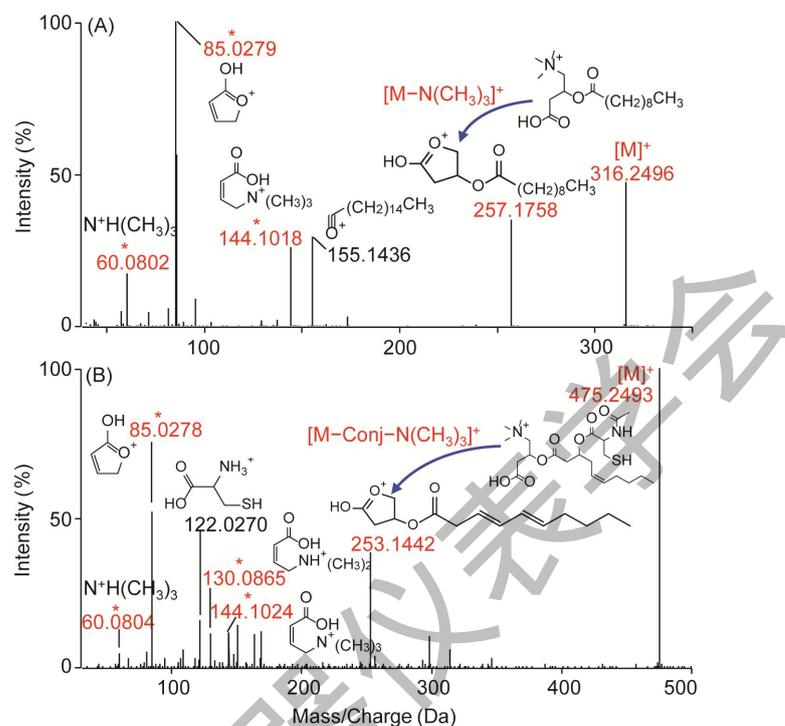


图 1 (A) 酰基肉碱 (C10:0) 与 (B) N-乙酰半胱氨酸共轭-羟基酰基肉碱 (N-acetylcys-C10:1-OH-CA) 在正离子模式下的碎裂模式。

(2) 通过使用 45 酰基肉碱标准品 (不含肉碱与酰基肉碱)，构建了该色谱条件下酰基肉碱的 QSRR 模型 (式 3)，45 种酰基肉碱标准品的计算保留时间 (t_R^C) 与实验结果 (t_R^E) 具有良好的线性相关性 ($r^2 > 0.998$) 和准确性 ($\Delta t_R < 0.20$ min, MAE < 0.07 min)。模型对于混合样品中检测到的所有 211 个酰基肉碱均具有良好的 t_R^C 与 t_R^E 相关性 ($r^2 \sim 0.984$) 和预测精度 (MAE < 0.21 min 和 $\Delta t_R < 0.9$ 分钟)，其中这些酰基肉碱含有不同的酰基碳链、支链、双键、羟基或二羧基数目。即使在这些结构特征同时存在的情况下，从混合样品中鉴定出 97% 的酰基肉碱的模型计算 t_R^C 与 t_R^E 相关性和准确性均优。在此基础上，一个 MRM 参数 (t_R 、MRM 离子对和碰撞能量) 数据库被建立并涵盖了含 398 个化学结构式的 1136 种酰基肉碱 (包括酰基肉碱、共轭肉碱及其异构体)。

$$t_R^C = k_0 + k_1c^3 + k_2c^2 + k_3c + k_4b + k_5d + k_6h + k_7j + k_8p + k_9q + k_{10}ch \quad (\text{式 3})$$

其中, $k_0 = -0.252$, $k_1 = 8.54 \times 10^{-4}$, $k_2 = -4.82 \times 10^{-2}$, $k_3 = 1.06$, $k_4 = -0.487$, $k_5 = -0.172$, $k_6 = -1.65$, $k_7 = -1.55$, $k_8 = 0.152$, $k_9 = -1.59 \times 10^{-2}$, and $k_{10} = 7.20 \times 10^{-2}$ 。模型中变量 c 、 b 、 d 、 h 、 j 分别表示酰基链碳、支链甲基、碳碳双键、羟基、羧基的个数, p 、 q 表示支链和双键的位置。

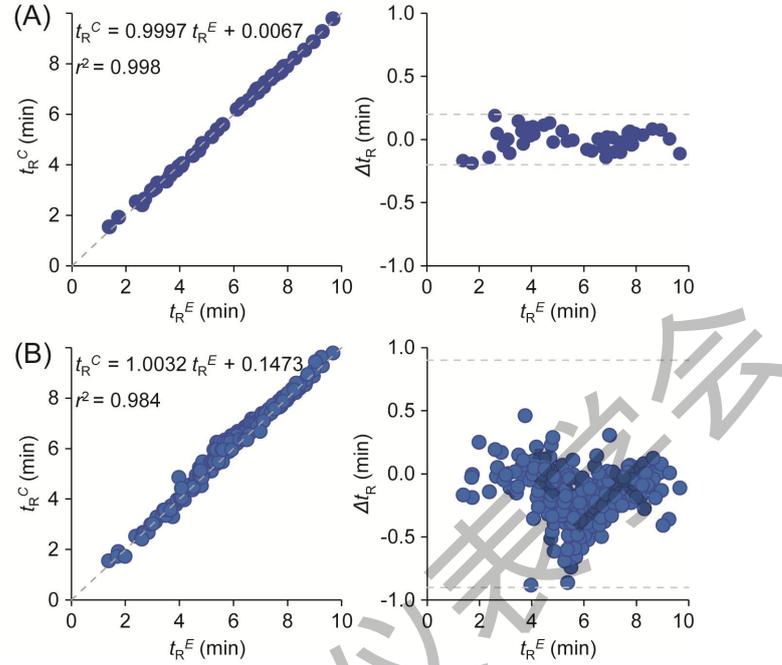


图2 (A) 45个酰基肉碱标准品与(B)生物样品中检测到的酰基肉碱模型计算保留时间(t_{RC})与实验结果(t_{RE})的比较。

(3) 该定量方法在两种典型的人源生物液体(血浆和尿液)和五种小鼠组织(肾脏、肝脏、心脏、肺和肌肉)中定量了514种酰基肉碱,用于表征它们的代谢组分子表型。其中,人源尿液样本中含有的酰基肉碱种类(421种)多于人源血浆(149种)和小鼠组织,包括肾(211种)、肝(195种)、心(189种)、肺(188种)和肌肉(169种),尤其是共轭酰基肉碱与含有羟基和羧基的酰基肉碱。

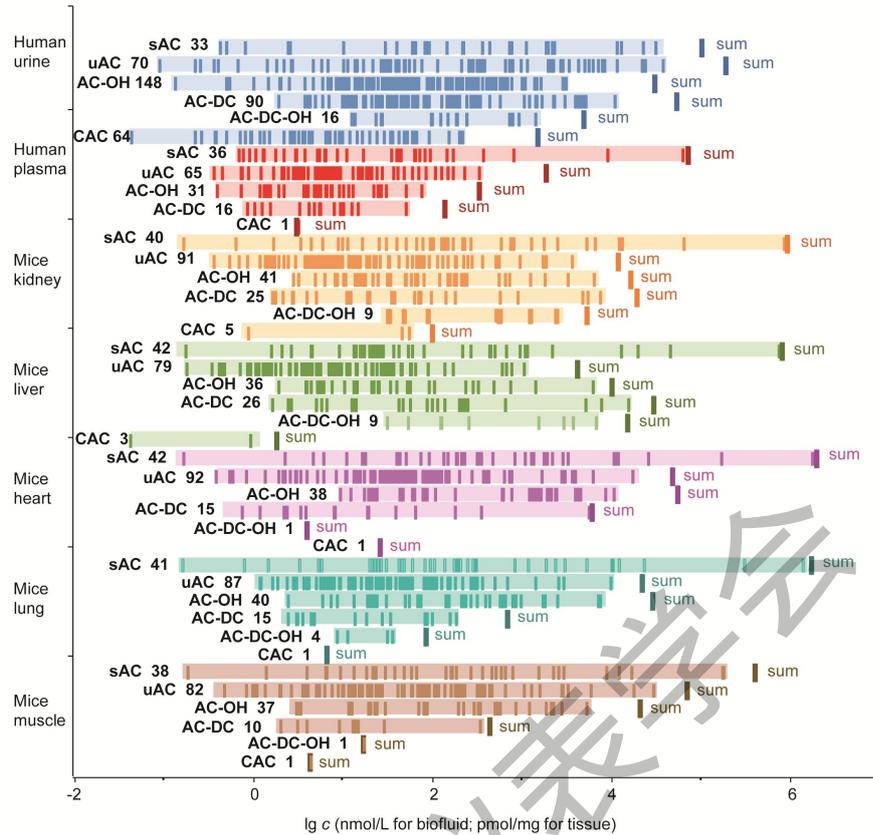


图3 多种生物基质中酰基肉碱种类和不同类型的饱和 (sAC)、不饱和 (uAC)、羟基化 (AC-OH)、羧化 (AC-DC) 链和共轭酰基肉碱 (CAC) 链的浓度 (c)。其中粗线 (sum) 和细线表示每一类和每一种的总浓度。

3.2 结论

建立的高通量 UPLC-MS 方法可实现多种生物基质中数百种酰基肉碱和共轭酰基肉碱的定量分析。同时, 构建的定量结构-保留关系模型, 可用于无标准条件下预测酰基肉碱的 t_R 值。最后, 该定量方法通过量化两种人类生物体液和五种小鼠组织中的 500 多种酰基肉碱, 不仅为这些生物基质的分子表型提供了数据, 也为大型队列疾病研究提供了一种重要且可靠的分析技术。

参考文献:

- [1]Zhang JX, Chen QS, Lu QW, Zhang LL, Shi BR, Yu M, Huang QX, Tang HR. Simultaneously quantifying hundreds of acylcarnitines in multiple biological matrices within ten minutes using ultrahigh-performance liquid-chromatography and tandem mass spectrometry[J]. J. Pharm. Anal., 2023 (online). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.10.004>