

全谱二维液相系统与LCMS-8060NX联用 建立生物样本分析方法并应用于膀胱癌代 谢组学研究

LCMSMS-851

摘要：基于全谱二维液相系统与 LCMS-8060NX 联用，建立了可用于同时分析各种生物样品中的亲水性和疏水性代谢物的分析方法。该方法同时测量 417 种 LogP 值介于 -10.3~21.9 的生物代谢物；各化合物均具有良好的日内、日间重复性以及良好的线性关系。用不同的生物样品（如血浆、血清、尿液、粪便、精浆和肝脏）进行了适用性测试，发现在所有生物样品中均检测到了 208 种（417 种中的一部分）相同的代谢物。将该方法应用于膀胱癌的病例 / 对照代谢组学研究中，鉴定出了 30 种差异代谢物，这些代谢物参与了碳水化合物和氨基酸代谢。

关键词：全谱二维液相 三重四极杆质谱 膀胱癌病例对照研究

技术特点：

- ❖ 基于全谱二维液相 + 三重四极杆质谱，建立了一种同时分析亲水性和疏水性代谢物的方法。
- ❖ 将方法应用于临床不同生物样本分析，方法适用性广。

目前，液相色谱 - 质谱联用 (LC-MS) 是代谢组分析中的主流分析技术。在基于 LC-MS 的代谢组研究中，分别使用高分辨质谱 (HRMS) 和三重四极杆质谱 (TQMS) 进行非靶向和靶向分析。非靶向 HRMS 采集和靶向 TQMS 分析的结合，提供了对特定途径的深入洞察和对生物代谢网络的全面理解。由于生物样品中同时含有亲水性和疏水性代谢物，在使用传统的一维 LC-MS 系统进行单次分析中获取这两类代谢物的信息是非常困难的。因此，在目前代谢组学的研究中，二维液相色谱 (2D-LC) 的使用是非常广泛的。

为了实现广泛的极性范围和高覆盖度的定向代谢组学分析，本文采用全谱二维液相系统 (Polarity-Extended Liquid Chromatography, PELC) 作为前端分离手段。该系统能够在单次分析中检测到 417 种重要的代谢物 (logP 值 -10.3 ~ 21.9)。该方法表现出良好的日内和日间重复性，以及良好的线性关系和宽线性范围；本文还验证了该方法在多种生物样品 (如血浆、血清、尿液、粪便、精浆和组织) 中的可靠性，并成功地应用于鉴定膀胱癌 (BC) 患者尿液中的异常代谢物。

■ 实验部分

1.1 标准品信息

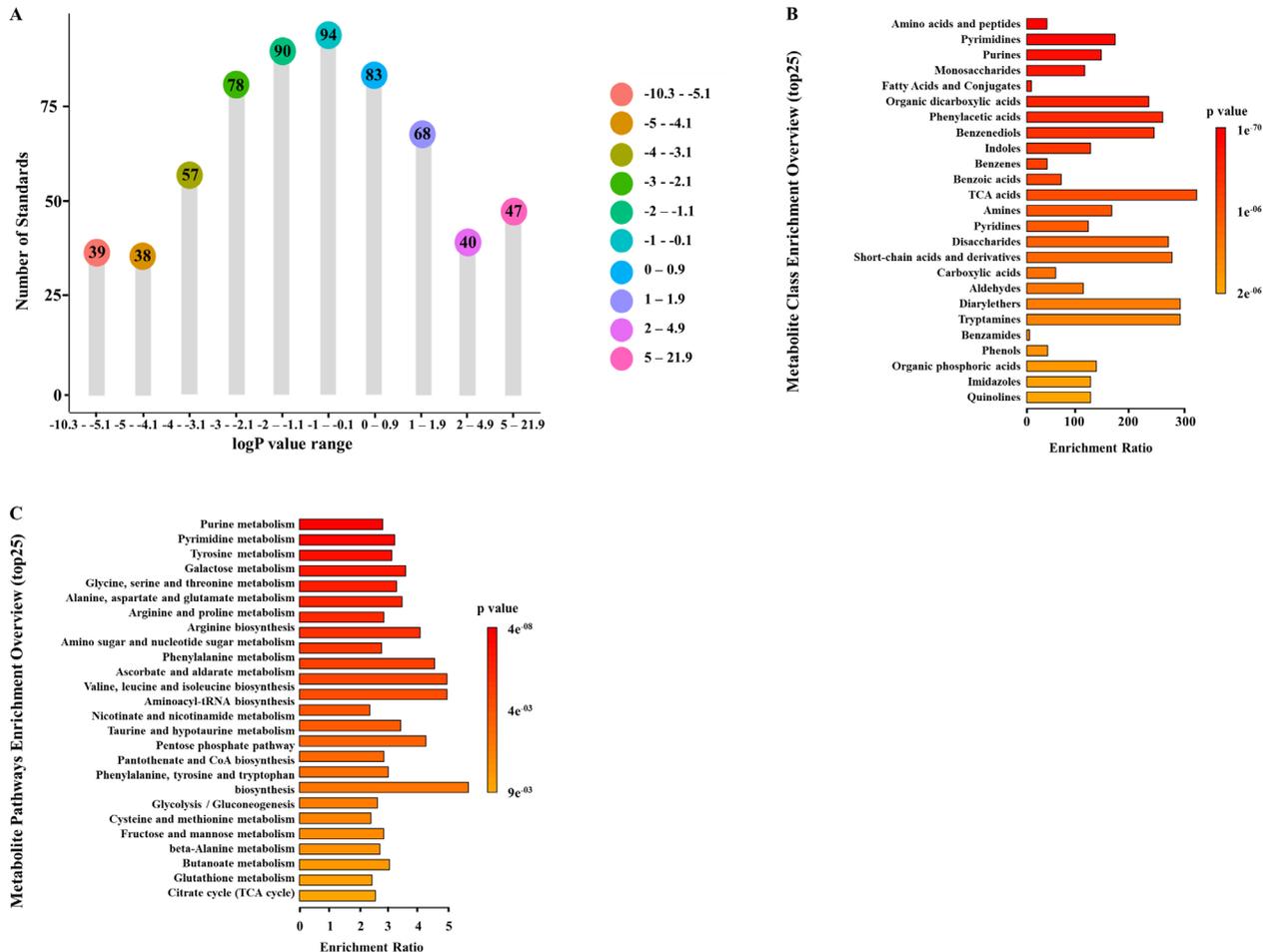


图 1 标准品信息 (A: 标准品 logP 值范围; B: 标准品类别富集; C: 标准品通路富集)

本实验所使用代谢物标准品共计 634 个。其中图 1A 展示了标准品的 logP 值范围 (依据 PubChem 数据库统计, 最新更新日期 2021 年 5 月 7 日), 图 1B 和图 1C 分别显示了这些标准品的 KEGG 类别富集和通路富集的结果。经筛选和方法优化后, 最终保留 417 种代谢物建立方法。

1.2 方法建立流程

岛津全谱二维液质系统拥有在线稀释专利技术和极性分流、双重梯度特色技术, 适合于代谢组学中全组分分析, 可作为宽极性多目标物数据库的通用分离平台, 并适用于极性相差较大的两类关联物质的同时分析, 而且该系统内含一个 UHPLC 子系统, 方便日常常规检测。该系统为新一代多功能质谱前端平台, 可与三重四极杆和飞行时间质谱联用, 助力复杂基质中宽极性痕量物质的定性、定量、筛查和分析。

方法建立流程如下图所示: 首先, 在一维 LC-MS 上获取标准品单标离子对信息。其次, 逐步优化亲水柱 (第一维) 和反相柱 (第二维) 色谱分离条件。最后, 建立二维液相的靶向代谢组学方法并验证。

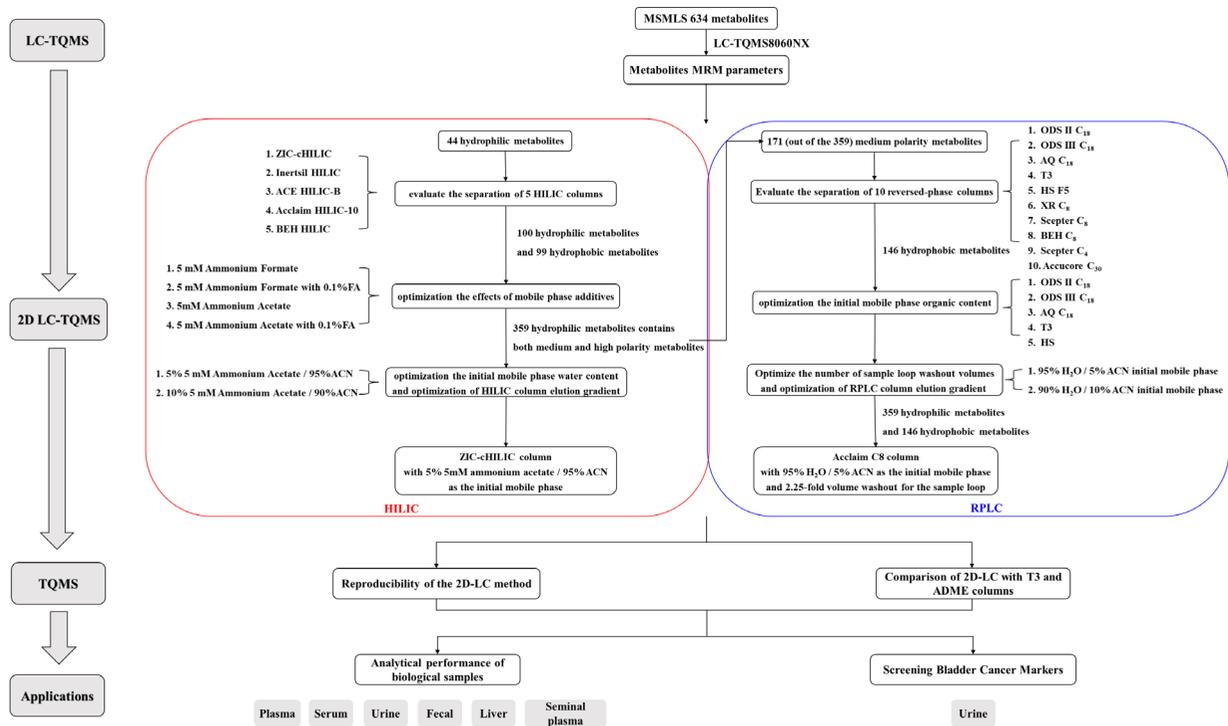


图 2 方法建立流程图

1.3 仪器

本实验采用全谱二维液相系统与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060NX 联用系统，具体配置为：

系统控制器：SCL-40

脱气机：DGU-405

输液泵：LC-40B XR × 2；LC-40B X3 × 2

自动进样器：SIL-40C X3

定量环：500 μL

柱温箱：CTO-40C

十通阀：FCV-36AH

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99.2

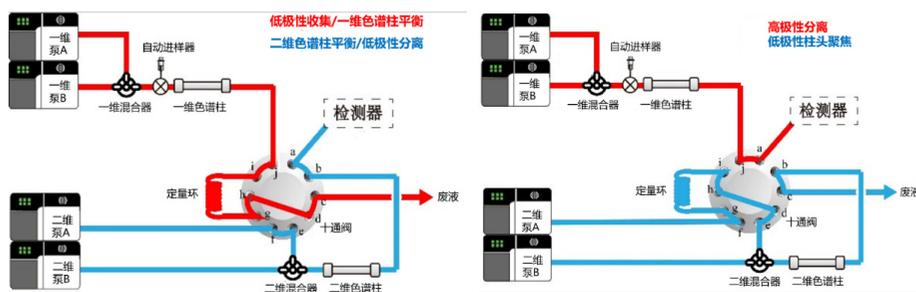


图 3 全谱二维系统流程图（左图：初始状态；右图：切阀后）

1.4 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：第一维：ZIC-cHILIC (2.1×150 mm, 3 μm)

第二维：Acclaim C8 (3.0×150 mm, 3 μm)

流动相：第一维：A相 - 5mM 乙酸铵水溶液；B相 - 乙腈

第二维：A相 - 0.1% 甲酸水溶液；B相 - 乙腈

分析流速：第一维：0.3 mL/min；第二维：0.4 mL/min；

表 4 第一维 HILIC 色谱柱的物理化学参数

Column	Provider	Functionality / Support	Size (mm)	Particle size (μm)
ZIC-cHILIC	Merck	Zwitterionic / Silica	2.1×150	3
Inertsil HILIC	GL Sciences	Diol (Dihydroxypropyl) / Silica	2.1×150	3
ACE HILIC-B	Phenomenex	Hydrophilic layer / Silica	2.1×100	1.7
Acclaim HILIC-10	Thermo Fisher	Hydrophilic layer / Silica	2.1×150	3
BEH HILIC	Waters	Amide / Silica	2.1×100	1.7

表 5 第一维 RPLC 色谱柱的物理化学参数

Column	Provider	Functionality / Support	Size (mm)	Particle size (μm)
ODS II	Shimadzu	C18 / Silica	3×100	2.2
ODS III	Shimadzu	C18 / Silica	2×150	2.2
AQ C18	Shimadzu	C18 with polar silane / Silica	2.1×100	1.9
T3	Waters	Alkyl functionality / Silica	2.1×100	1.8
HS F5	Merck	Pentafluorophenylpropyl / Silica	2.1×150	3
XR C8	Shimadzu	C8 / Silica	2.1×100	2.2
Scepter C4	Shimadzu	C4 / Silica	2.1×100	1.9
Acclaim C8	Thermo Fisher	C8 / Silica	3.0×150	3
Scepter C8	Shimadzu	C8 / Silica	2.1×100	3
Accucore C30	Thermo Fisher	C30 / Silica	2.1×150	2.6
ADME-HR	DaiSO	Adamantane / Silica	2.1×100	2

■ 结果与讨论

2.1 第一维 HILIC 柱筛选结果

如图 4 所示，对一维色谱柱进行筛查，其中 ZIC-cHILIC 性能最佳。优化后的色谱条件：流动相 A-5 mM 乙酸铵溶液、流动相 B- 乙腈；B 相初始浓度 5%。

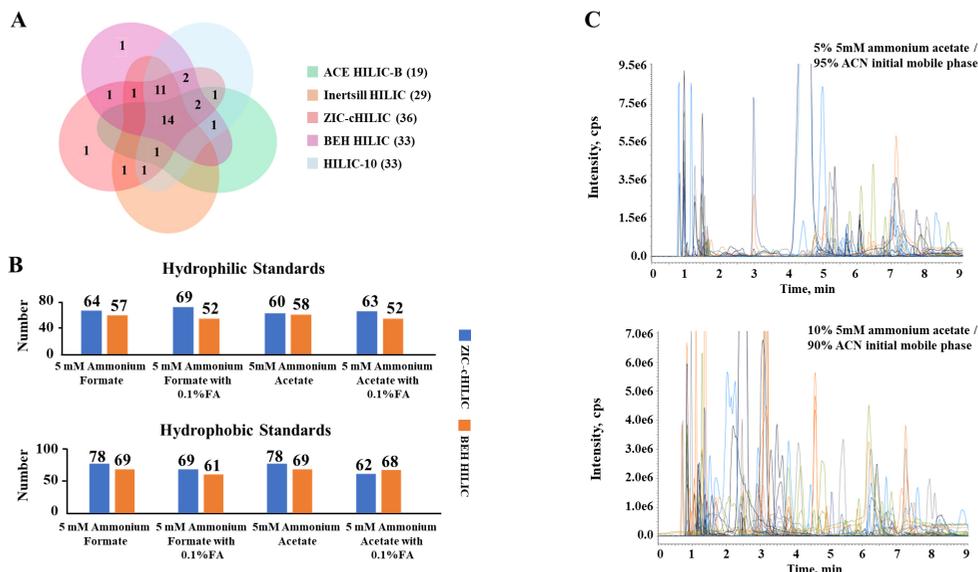


图 4 第一维 HILIC 柱筛选结果

2.2 第二维 RPLC 及样品环冲洗倍数筛选结果

如图 5 所示, 对二维色谱柱进行筛查, 其中 Acclaim C8 性能最佳。优化后的色谱条件: 流动相 A-0.1%FA 溶液、流动相 B- 乙腈; B 相初始浓度 5%。样品环冲洗倍数为 2.25 倍。

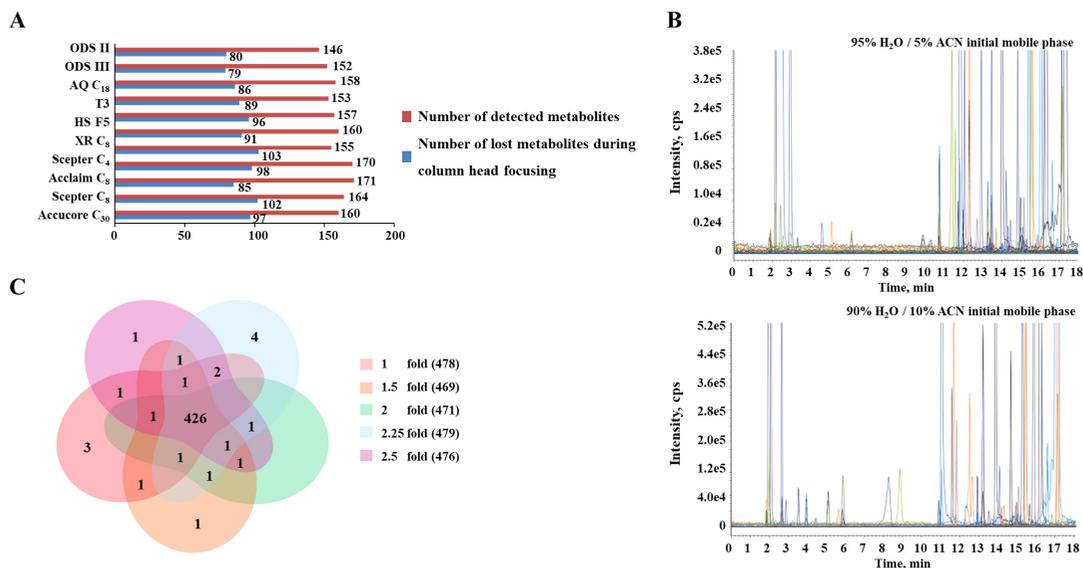


图 5 第二维 RPLC 及样品环冲洗倍数筛选结果

2.3 重现性评价以及与一维宽极性覆盖范围色谱对比

亲水性代谢物和疏水性代谢物在不同的保留时间范围内洗脱, 分别为 RT 2-20 min 和 RT 20-38 min。如图 6A 所示, 考察日内重现性, 超过 92% 的代谢物的保留时间 RSD 值小于 2%, 超过 95% 的代谢物的峰面积 RSD 值小于 30%; 考察日间重现性, 超过 92% 的代谢物的保留时间 RSD 值小于 2%, 超过 85% 的代谢物的峰面积 RSD 值小于 30%, 重现性良好。

全谱二维液相 +LCMS-8060NX 代谢组学方法在 2-20 分钟内采用 ZIC-cHILIC 梯度洗脱 (用于亲水性代谢物分离), 之后在 20 分钟后采用 Acclaim C8 梯度洗脱 (用于疏水性代谢物分离)。图 6B 所示, 在亲水分离过程中 (RT 0-20 分钟), T3 和 ADME 柱对 295 种亲水代谢物的保留能力较弱, 导致大部分亲水代谢物在前 8 分钟内被洗脱。相比之下, 二维液相色谱系统中的一维 HILIC 色谱柱能够分离这些中高极性代谢物。在疏水分离时间 (RT 20-38 分钟) 内, 二维液相色谱系统中 Acclaim C8 柱对 122 种疏水代谢物的色谱分离效果优于 T3 和 ADME 柱。

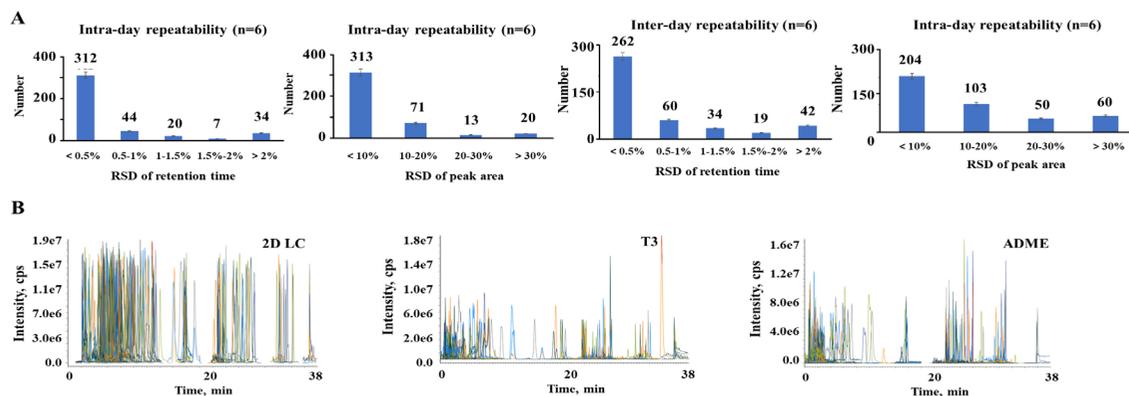


图 6 重现性评价以及与一维宽极性覆盖范围色谱对比

2.4 全谱二维液相 +LCMS-8060NX 代谢组学方法对不同生物样本的分析性能

如图 7 所示，代谢物在生物样本中的分布差异很大。在所有基质中都能检测到的代谢物为 208 种，占 49.8%。这些代谢物主要包括氨基酸和肽、单糖、嘌呤和其他类型的代谢物。肝脏中检测到了最多的代谢物（344 个），其次是尿液（312 个）、血浆（312 个）和精浆（309 个）。这表明该方法能够全面检测各种生物样本中的代谢物。

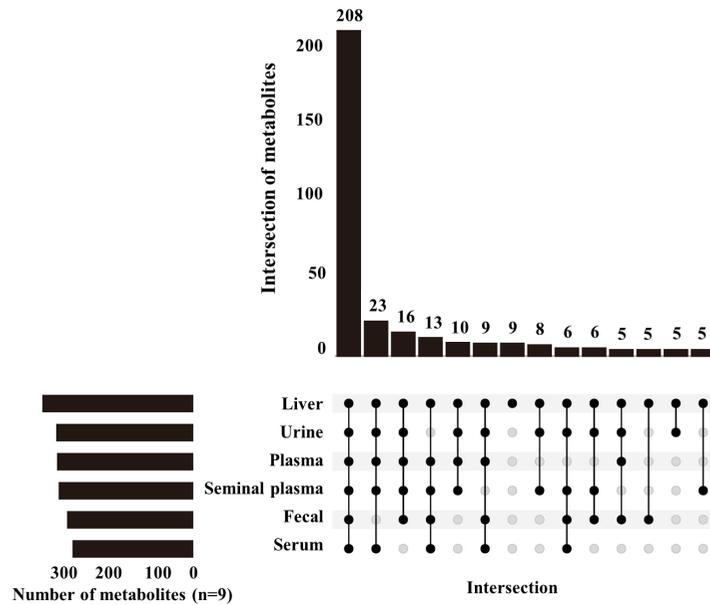


图 7 2D LC 广泛靶向代谢组学对不同生物样本的分析性能

2.5 临床应用 - 膀胱癌尿液病例对照研究

在临床应用中，共筛选出了 30 种差异代谢物。筛选条件：1、VIP 值 > 1；2、峰面积变化倍数 > 2 或 < 0.5；3、p 值 < 0.05。

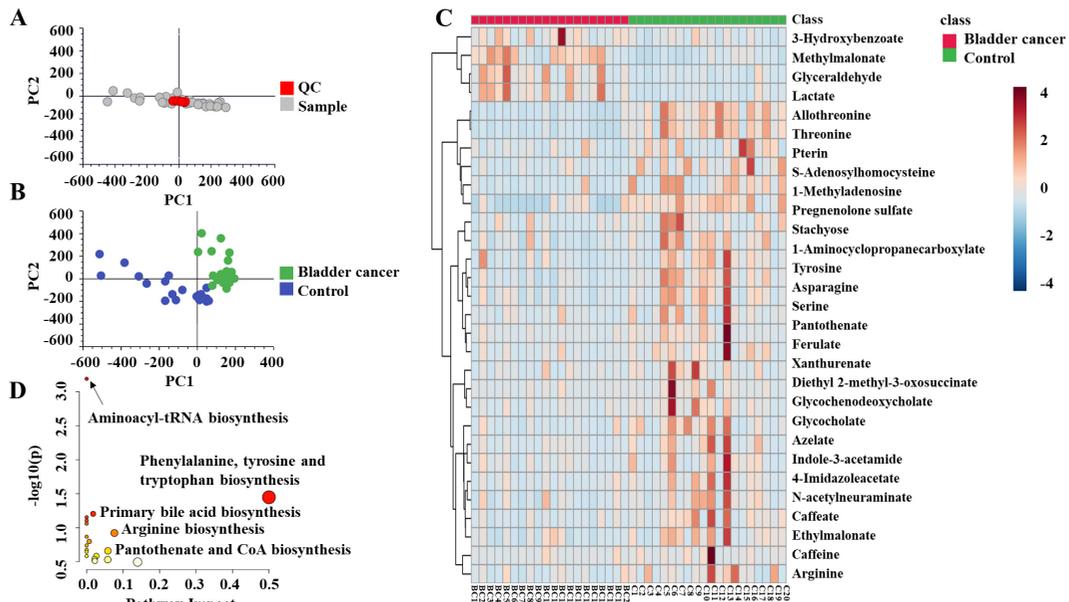


图 8 临床应用 - 膀胱癌尿液病例对照研究

■ 结论

本文建立了一种基于全谱二维液相 +LCMS-8060NX 的代谢组学分析方法，具有广泛的极性覆盖范围，良好的日内和日间重复性，良好的线性关系和较宽的线性范围。并在多种生物基质和一项膀胱癌尿液病例对照研究中进行了方法适用性验证。

岛津应用云

