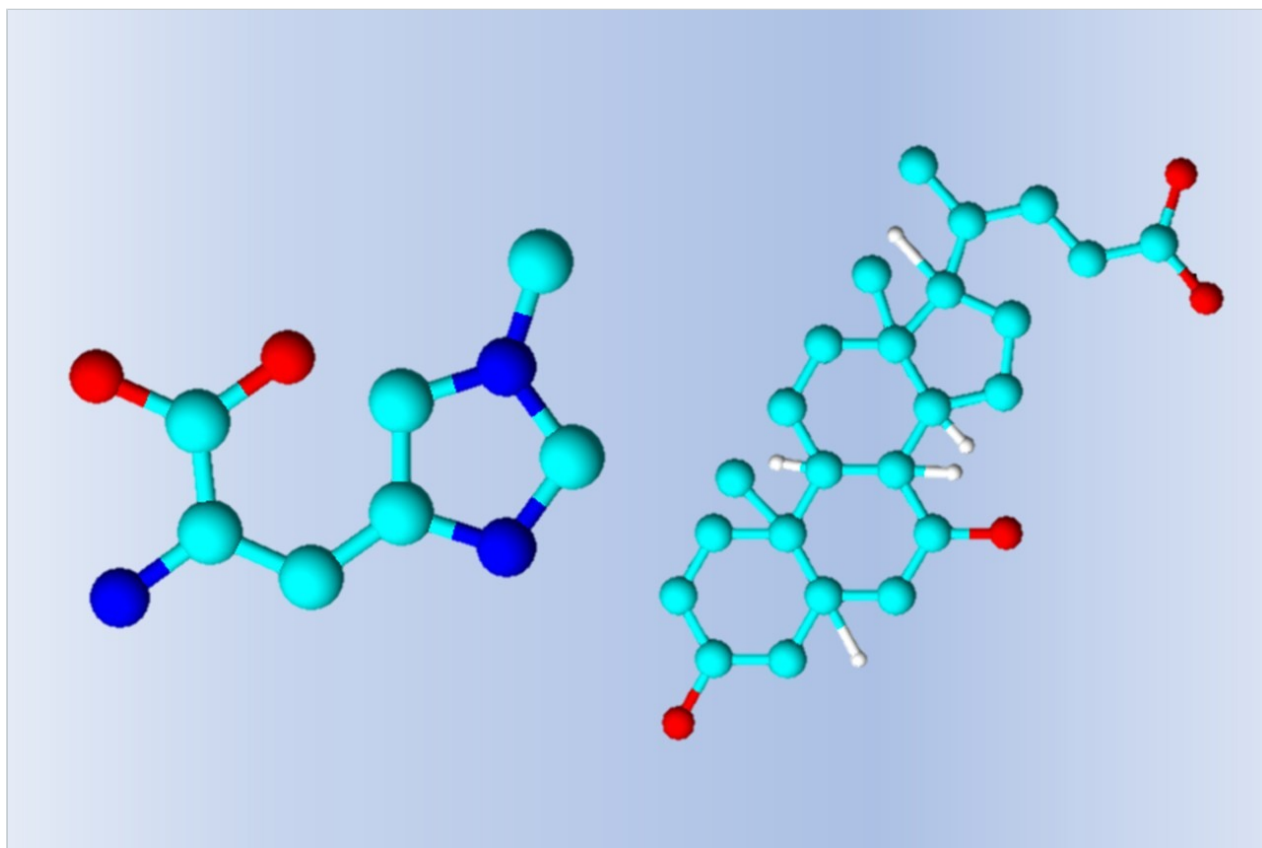


应用纪要

利用环形离子淌度技术分离生物相关的内源性代谢物异构体

Adam King, Dale Cooper-Shepherd, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报证明Cyclic IMS能够借助多圈通过实验分离小分子异构体，从而改进代谢物检测和鉴定。

优势

基于Cyclic IMS (cIMS)质谱仪的多圈通过实验能够提升结构异构体的淌度分离效果。

简介

多年来，分离技术的进步使我们能够检测和定量过去难以分析的化合物。在代谢组学领域，许多构成目标分析物核心的小分子化合物都属于上述难以分析的一类。代谢过程中化合物的修饰差异会产生差别细微的异构体代谢物。在深入探究疾病和根本生化机制时会发现这些异构体所经历的生物过程差异巨大。虽然超临界流体色谱(SFC)技术一定程度上已经能够在短期分析采集时间内对这些异构体实现手性分离^{1,2}。但SFC需要使用一套单独的色谱系统，而非传统的液相色谱(LC)系统，因此缺少与传统LC相关的方法灵活性。

离子淌度技术使质谱仪能够在目标离子进入检测器之前便对其进行额外的正交分离，这使得质荷比相似的分子能够按其碰撞截面(CCS)进行分离，从而提高特异性、提升鉴定能力并得到更清晰的MS/MS谱图。尽管如此，在使用传统离子淌度平台测定时，一些关联非常密切的结构异构体仍然会出现CCS值和漂移时间相同或相近的情况，此时仅通过该方法难以实现准确测定。

SELECT SERIES Cyclic IMS仪器过去已用于辅助分离肽、多糖和脂质等较大分子³，方法是执行多圈IMS_n采集(IMSⁿ)，其中离子包会先绕IMS区域环行多次，然后再射入检测器。本应用简报证明Cyclic IMS仪器能够利用多圈通过功能提升极性小分子代谢物异构体的分离效果。

结果与讨论

氨基酸和胆汁酸也均存在异构体，且不同异构体最终的生物学作用明显不同，这突出了代谢组学分析研究在区分不同异构体方面的重要性。甲基组氨酸之前已被确定为多种疾病和缺陷的相关标志物，其中就包括经证明会导致尿液中1-甲基组氨酸增加的维生素E缺乏症⁴。而该物质血浆浓度的增加则与肌肽酶活性降低相关。此外，3-甲基组氨酸还被确定为机体损伤后骨骼肌分解的潜在标志物⁵。利用内部CCS预测工具得出1-甲基组氨酸和3-甲基组氨酸的CCS预测值分别为133 Å²和134 Å² ([M-H]⁻离子)，这表明要精准确认上述化合物可能存在

困难。

胆汁酸存在于体内胆固醇代谢过程中，在脂质和脂溶性维生素吸收过程中起着重要作用（用作表面活性剂）^{6,7}。鹅去氧胆酸是人体内的初级胆汁酸，与肠道细菌发生相互作用后通过生物转化产生次级胆汁酸（例如，猪去氧胆酸）⁷。鹅去氧胆酸水平过高会导致胆汁淤积所带来的毒性作用。哺乳动物的胆汁酸分泌会在这些次级胆汁酸的葡糖醛酸化完成后进行。猪去氧胆酸的羟基位置使这种次级胆汁酸的葡糖醛酸化速度更快，最终导致尿排泄率增加⁸。这些胆汁酸的水平差异对微生物组的功能有指示作用。两种胆汁酸的CCS预测值均为207 Å²（[M-H]⁻离子）。

本研究使用乙腈:水(1:1)作为稀释剂制备了一种含有两组内源性代谢物异构体（来自两种不同的化合物类别）的混标用于直接注射。此外，还使用各确证单标制备了单独的注射溶液用于进一步确认。注射混标包含两种胆汁酸（鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸）和两种经过修饰的组氨酸代谢物（1-甲基组氨酸和3-甲基组氨酸）（图1）。

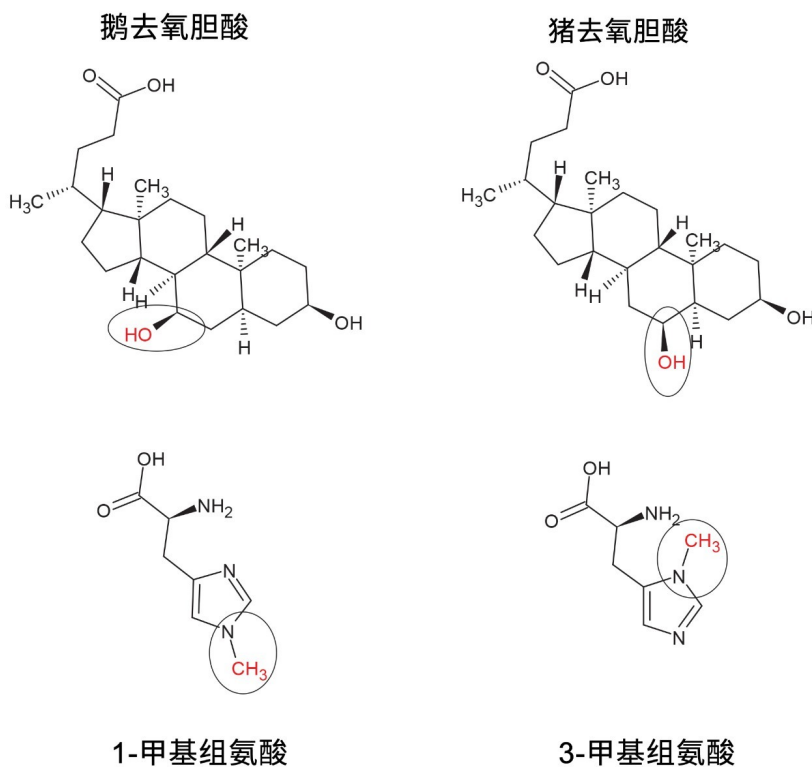


图1.受试化合物胆汁酸和甲基组氨酸的化学结构

所有质谱数据均使用负离子电喷雾电离(ESI)和ToF在V光学模式下采集。离子源条件（即毛细管电压、离子源温度和气体流量）已针对每种化合物类别完成优化，可为评估IMS分离效果提供出色响应。为执行多圈通过实验，Cyclic IMS仪器采用无任何转移碰撞能量的MS/MS模式运行，同时配备了按照胆汁酸($m/z = 391.28$ [M-

H]⁻)和甲基组氨酸(m/z = 168.07 [M-H]⁻)所对应分子离子(带负电)的质量数设置的四极杆。所有注样溶液均通过注射泵(流速设定: 10 μL/min)直接注入离子源。

注入标准溶液时,胆汁酸和甲基组氨酸所对应的离子会多次被单独送入环形离子淌度(IM)池,直至各异构体按其到达时间分离(图2)。甲基组氨酸在环形IM池内绕行5圈后实现基线分离(图2b),而胆汁酸在20圈后达到明显分离(图2a)。胆汁酸分离所需的20圈在200 ms内完成,IMS分辨率为290,而甲基组氨酸异构体的5圈在50 ms内完成,IMS分辨率为145。为鉴定谱峰所对应的正确异构体,还注入了单标以确定各自具体的到达时间(图3)。

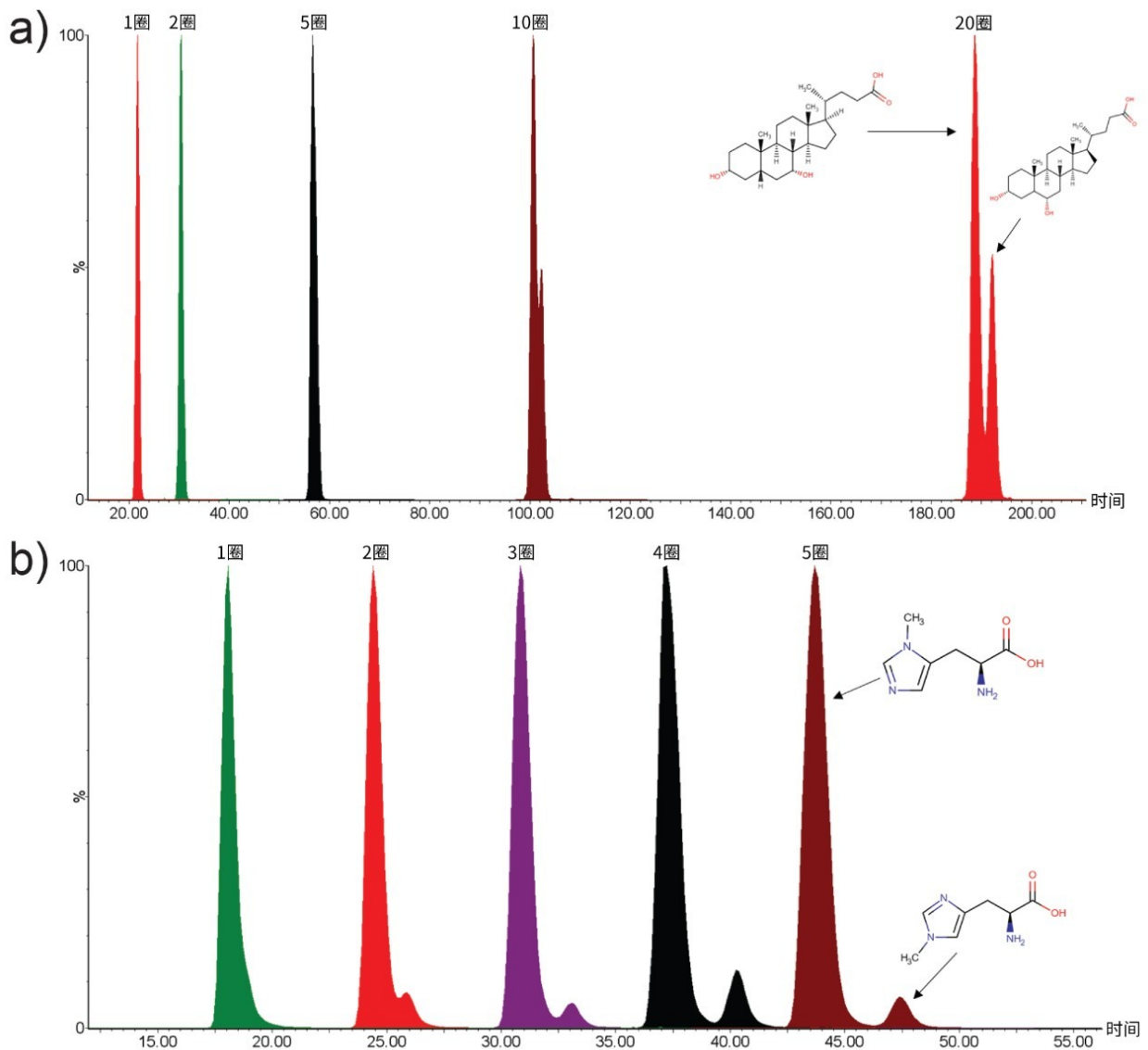


图2.混标注样的离子淌度谱图,展示了(a)胆汁酸(鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸)1~20圈Cyclic IMS运行(<200 ms)以及(b)1-甲基组氨酸和3-甲基组氨酸1~5圈IMS运行(<50 ms)后峰分离度的增加。

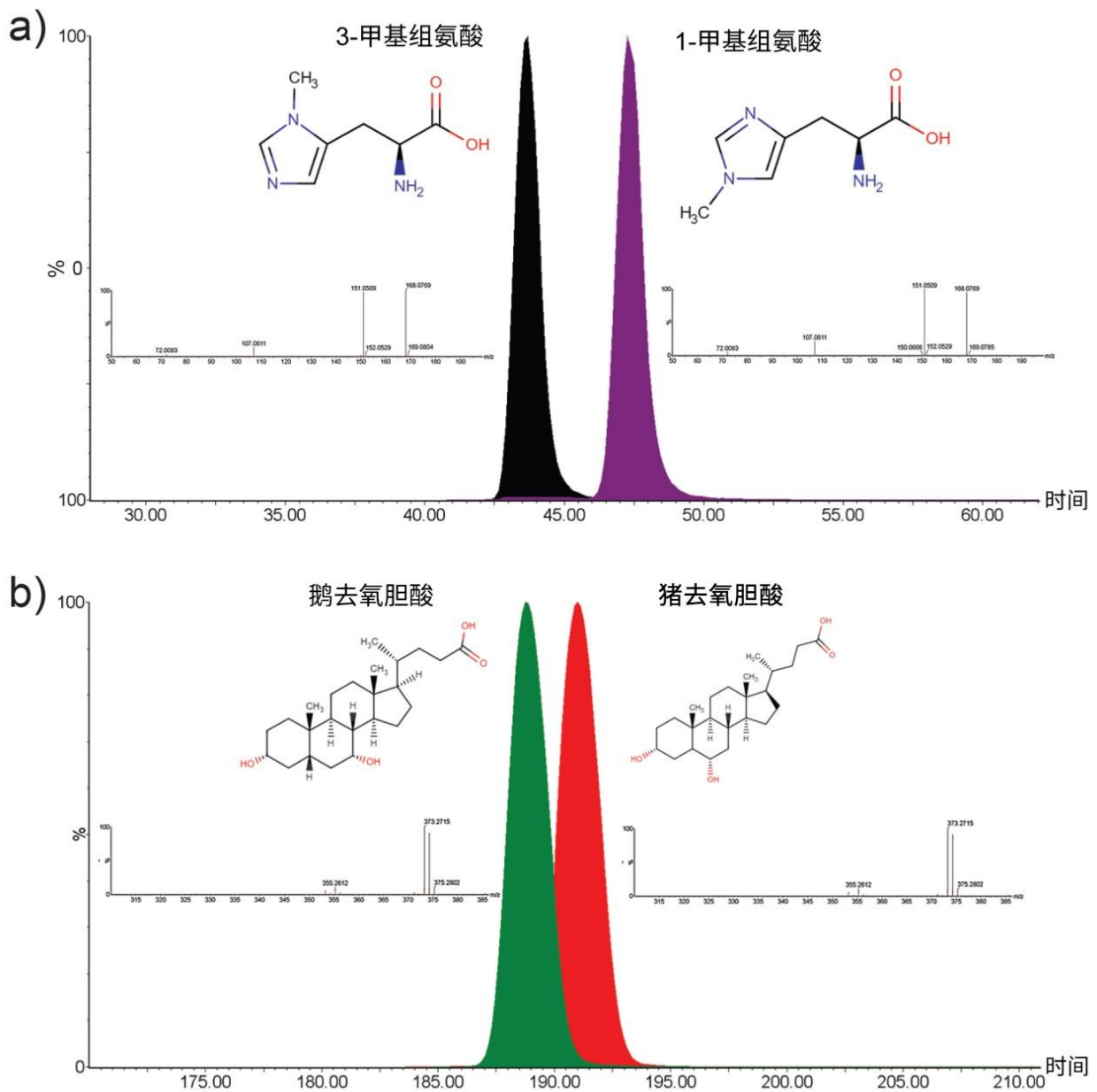


图3.注入化合物单标得到的离子淌度谱图，用于确认各异构体的到达时间（插图为对应的高碰撞能量谱图）；(a) 1-甲基组氨酸和3-甲基组氨酸绕行5圈后的谱图，(b) 鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸绕行20圈后的谱图。

结论

所有生化过程本身均涉及小分子代谢物，或为代谢途径的目标，或为代谢产物。因此，这些分子有助于理解基

因异常、疾病和生活方式影响所引发的代谢途径功能紊乱。许多化合物天然存在不同的异构体，这反过来可能与不同的代谢途径有关，并对潜在的生物学机制以及相关的健康状况产生不同的影响。本研究已证明SELECT SERIES Cyclic IMS仪器能够在绕Cyclic IMS池20圈内(<200 ms)准确分离2组生物相关的异构体。这样有助于按照不同的到达时间分离异构体，从而实现准确鉴定，且无需开发新的LC方法。

参考资料

1. Yamada T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Nishiumi S, Yoshida M, et al. Supercritical Fluid Chromatography/Orbitrap Mass Spectrometry based Lipidomics Platform Coupled with Automated Lipid Identification Software for Accurate Lipid Profiling. *J Chromatogr A*. 2013;1301:237-42.
2. Sen A, Knappy C, Lewis MR, Plumb RS, Wilson ID, Nicholson JK, et al. Analysis of Polar Urinary Metabolites for Metabolic Phenotyping Using Supercritical Fluid Chromatography and Mass Spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016;1449:141-55.
3. Giles K, Ujma J, Wildgoose J, Pringle S, Richardson K, Langridge D, et al. A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal Chem*. 2019;91(13):8564-73.
4. Fink K, Williams AD, Fink RM. 1-Methylhistidine Excretion by Vitamin E-deficient Rabbits. *Journal of Biological Chemistry*. 1959;234(5):1182-5.
5. Chinkes DL. Methods for Measuring Tissue Protein Breakdown Rate In Vivo. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005;8:534-7.
6. Staels B, Fonseca VA. Bile acids and Metabolic Regulation: Mechanisms and Clinical Responses to Bile acid Sequestration. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S237-45.
7. Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal Transport and Metabolism of Bile Acids. *J Lipid Res*. 2015;56(6):1085-99.
8. Matern H, Lappas N, S M. Isolation and Characterization of Hyodeoxycholic-acid: UDP-Glucuronosyltransferase from Human Liver. *European Journal of Biochemistry*. 1991(200):393-400.

特色产品

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/135021297>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007206ZH, 2021年4月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.