

血浆代谢组同时定性定量分析方法研究

蒲倩伦¹, 廖 晗¹, 陈艳华¹, 高 杨¹, 丁 贤¹, 贺玖明¹,
张瑞萍¹, 再帕尔·阿不力孜^{1,2}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;

2. 中央民族大学生物成像与系统生物学研究中心, 北京 100081)

摘要: 数据非依赖的质谱采集是近年来发展的一种新型多级质谱分析方法, 只需一次进样便可同时快速获取所有母离子及其子离子信息。本研究以肺癌血浆样本为研究对象, 采用数据非依赖的 SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions) 采集技术, 建立了液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 同时定性定量分析血浆代谢组。基于代谢物数据库识别比对, 成功识别了 93 个代谢物, 实现了代谢物的定性分析。对成功识别的代谢物建立定量分析方法并进行方法学考察。结果表明, 其中 90 个代谢物的线性相关系数大于 0.99, 定量限在 1.25~12 000 $\mu\text{g/L}$ 之间; 其中有 86 个代谢物可以满足生物样本定量分析的要求, 其连续 4 天的日内精密度和日间精密密度均小于 20%; 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 96 h 内的放置稳定性在 0.62%~19.35% 之间。该方法的覆盖率高, 能同时快速准确地对肺癌血浆中癌症相关代谢物进行定性定量分析, 也适用于其他生物样品, 可以为定量代谢组学分析提供重要的方法学平台。

关键词: 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS); 同时定性定量分析; SWATH 采集技术; 代谢组学; 血浆

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2020)04-0297-10

doi: 10.7538/zpxb.2019.0042

Development of Simultaneous Qualitation and Quantification of Plasma Metabolome Based on Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ions (SWATH)

PU Qian-lun¹, LIAO Han¹, CHEN Yan-hua¹, GAO Yang¹, DING Xian¹,
HE Jiu-ming¹, ZHANG Rui-ping¹, ZEPER Abliz^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Center for Imagine and Systems Biology, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: Data independent acquisition (DIA) mode, is a novel multi-stage mass spectrometry (MS) acquisition technology and it can achieve rapid detection of full MS and

收稿日期: 2019-04-02; 修回日期: 2019-05-28

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC2000600); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017-I2M-3-010) 资助

作者简介: 蒲倩伦 (1995—), 女 (汉族), 四川人, 硕士研究生, 药学专业。E-mail: puqianlun@imm.ac.cn

通信作者: 再帕尔·阿不力孜 (1961—), 男 (维吾尔族), 新疆人, 研究员, 从事药物分析研究。E-mail: zeper@imm.ac.cn

网络出版时间: 2019-06-27; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20190626.1514.004.html>

all product ion spectra in a single liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) run. Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions (SWATH) is one of DIA mode. The scanning range of SWATH acquisition is divided into multiple continuous intervals which contains a certain width (usually 25 u), and all ions in the interval are fragmented and quickly scanned in order to acquire all MS and MS/MS information. On one hand, it can provide relatively simple MS/MS spectra of ions due to its relatively narrow m/z isolation window when comparing with other DIA mode, so it is widely used in untargeted metabonomics analysis. On the other hand, it can exhibit comparative sensitivity and quantitative accuracy when comparing with multiple reaction monitoring (MRM) and can be used for quantitative analysis. Thus, SWATH acquisition can show the advantage of high sensitivity, high coverage and high scanning speed. In this study, a simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple metabolites in the plasma was developed based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with SWATH acquisition. 93 metabolites in the plasma can be successfully identified by home-made metabolites database searching which consists of metabolites related to cancers based on our previous metabonomics studies, thus achieving untargeted analysis. Quantification method was further developed for identified metabolites and methodology was examined. The analysis result shows that calibration curves were linear (the linearity of 95% metabolites more than 0.99) with limits of detection from 1.25 to 12 000 $\mu\text{g/L}$. In order to ensure the reliability of method, accuracy and stability of the method were further investigated, and 86 of metabolites in the plasma can achieve the quantification requirements in biological samples; Intra-day relative standard deviation (RSD) and inter-day RSD are both lower than 20%, and stability for 96 hours at 4 $^{\circ}\text{C}$ is from 0.62% to 19.35%. It's worth noting that for metabolites with low content in the plasma or serious matrix interference, quantitation by its product ion can exhibit better linearity, wider dynamic ranges and lower limit of quantitation. The established method provides a reliable and rapid method for identifying and quantifying multiple metabolites simultaneously in the plasma with high coverage and high sensitivity, and it is also applicative in the analysis of other biological samples.

Key words: liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); simultaneous qualitative and quantitative analysis; Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions (SWATH); metabonomics; plasma

代谢是机体维持一切生命活动的基础,代谢组学为揭示机体生理和病理变化及其作用机制提供了新的突破口^[1-2]。代谢组学分为非靶向和靶向代谢组学分析。非靶向代谢组学分析具有全面性,旨在无偏差地同时测量生物样本中尽可能多的代谢物,从而进行全面的代谢组评估,寻找具有意义的差异代谢物;而靶向代谢组学研究通常需要在复杂的生物样品中针对特定代谢物进行准确定量,从而

实现对目标代谢物或代谢途径的深入研究,现已被有效地运用于药物代谢研究、评估治疗或遗传修饰对特定酶的影响、以及非靶向代谢组学发现的差异代谢物的定量验证中^[3-5]。目前,越来越多的研究旨在建立新型的代谢组学研究策略,实现代谢物的同时定性定量分析。

近年来,数据非依赖方式(data independent acquisition, DIA)的质谱采集技术受到了

广泛关注,因为其能够连续无偏差地捕获所有代谢物离子,增加了数据维度,并且由于其较宽的扫描窗口,提高了碎片离子的传输效率和丰度,进而提高了 MS^2 的灵敏度^[6]。其中,SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions)是一项受到广泛关注的新型多级质谱扫描技术,其可在单次液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)运行中同时获取一级扫描和所有母离子的子离子信息。该方法将扫描范围分为多个连续区间(通常以25 u为间隔),然后对区间内所有离子进行碎裂和快速扫描,并获得其全部碎片信息,具有高灵敏度、高覆盖率和扫描速率等特点^[7-8]。目前,SWATH技术主要用于蛋白组学的定量研究中^[9],同时也逐渐应用在代谢组学研究中^[10-11]。Arnhard等^[12]基于SWATH方法建立了一套系统的毒理学研究方法,结果表明,SWATH方法在基质干扰下可以成功地检测和鉴别微量的咪达唑仑和吗啡,实现了复杂样品中低丰度代谢物的分析。

基于SWATH采集技术可以实现一次进样同时定性定量分析目标物。一方面,因SWATH方法的 m/z 扫描范围较窄,可获得较简单的子离子谱图,且只需一次进样便可同时快速获取所有可检测离子的MS和MS/MS信息,覆盖率广,可广泛应用于非靶向代谢组学的定性分析;另一方面,SWATH技术具有与多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)技术相当的灵敏度和定量准确度,可用于定量分析,其定量范围可达4个数量级,且重现性好^[13]。

本研究首先采用SWATH数据采集方式对人肺癌血浆样本进行分析,基于本课题组前期建立的代谢物定性识别数据库比对识别代谢物;然后对成功识别的代谢物进行靶向定量分析,考察并选择不同代谢物的质谱定量扫描模式,建立定量分析方法,考察方法的线性、精密度和准确性。旨在建立一种快速的代谢组同时定性定量分析方法,实现对血浆样本中代谢组高通量分析的同时,针对前期发现的与癌症密切相关的代谢物进行定量分析,为深入研究肿瘤机制、寻找生物标志物提供分析依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

四极杆-飞行时间串联5600型质谱仪:美国AB Sciex公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及Analyst 1.7.TF数据处理系统;Agilent1200系列高效液相色谱仪:美国Agilent公司产品;XPE205型分析天平:美国Mettler Toledo公司产品;SpeedVac SPD 121P离心浓缩仪:美国Thermo公司产品;S3-30K高速台式冷冻离心机:美国Sigma公司产品;MS3旋涡混合器:德国IKA公司产品。

93个靶向定量化合物标准品、L-酪氨酸-苯基-3,5- d_2 、DL-谷氨酸-2,3,3,4,4- d_5 、L-甲硫氨酸-甲基- ^{13}C 、 d_3 、DL-缬氨酸- d_8 、L-色氨酸- d_5 、L-肉毒碱-甲基- d_3 盐酸盐、7-甲基黄嘌呤-2,4,5,6- $^{13}C_4$ 、1,3,9- $^{15}N_3$ 、尿嘧啶核苷- $^{15}N_2$ 、雄烯二酮- $^{13}C_3$ 、16:0- d_{31} 溶血磷脂酰胆碱、丙酰基(3,3,3- D_3)-肉碱盐酸盐、硬脂酰基(D_3)-肉碱盐酸盐同位素内标:美国Sigma-Aldrich公司产品。

乙腈、甲醇和甲酸:均为色谱纯,德国Merck公司产品;实验用水:纯净水,杭州娃哈哈公司产品。

1.2 标准品溶液的配制

标准品储备液:分别精密称取适量的93个标准品,加入甲醇或甲醇-水溶液(1:1,V/V)超声溶解并定容,储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,备用。

混合标准品储备溶液:精密吸取适量的上述标准品储备液于10 mL容量瓶中,用甲醇定容后配制标准品混合溶液,每个代谢物的浓度依据它们在血浆中的浓度而定,浓度范围在 $1\sim 10^3\text{ mg/L}$ 之间。

标准品混合工作溶液:取适量的混合标准品储备溶液,用甲醇逐级稀释,制成系列浓度的标准品混合工作溶液。

内标混合溶液:分别精密称取适量的稳定同位素标准品,加入甲醇或者甲醇-水溶液(1:1,V/V)超声溶解并定容,得1 g/L的储备液;吸取适量的各储备液,用甲醇定容,配制成内标混合溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 血浆样品前处理 将冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 的血浆样本于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下解冻。精密吸取 $60\text{ }\mu\text{L}$ 血

浆,加入 180 μL 冷藏乙腈,以 3 000 r/min 涡旋 300 s,混匀;然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于离心浓缩仪中离心浓缩 2 h;收集挥干样品,加入 60 μL 乙腈-水溶液(2:98,V/V)复溶,以 3 000 r/min 涡旋 300 s,混匀后,以 10 000 r/min 离心 10 min,过 96 孔板后转移至进样小瓶,待测。

1.3.2 标准曲线工作溶液的制备 吸取 60 μL 系列混合标准工作溶液,加入 10 μL 内标混合溶液,再加入 180 μL 冷乙腈,按 1.3.1 节方法操作,制备标准曲线工作溶液。

1.3.3 质控样本的制备 取适量所有血浆样本混合,按 1.3.1 节方法操作,制备质控样本。样本量比例分别为肺癌:健康=1:1,肺癌男:肺癌女=3:1,健康男:健康女=3:1。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 Acquity UPLC Hss T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm \times 1.8 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为纯乙腈;梯度洗脱程序:0~8 min(98%A),8~15 min(98%~40%A),15~26 min(40%A);流速 0.25 mL/min;进样量 20 μL ;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;平衡时间 8 min。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源正离子扫描模式,结合 SWATH 采集模式;电喷雾电压 4 500 V;辅助气流速 50 L/h;气帘气流速 30 L/h;离子源温度 450 $^{\circ}\text{C}$;解簇电压 80 V;碰撞电压 30 eV;SWATH 扫描间隔为 25 u。

2 结果与讨论

2.1 血浆样本中代谢物的定性识别

首先采用 AB-Sciex OS 软件对采集的血浆样本原始数据进行数据预处理,包括峰提取、峰识别、峰对齐、解卷积等,获取所有被测离子的高分辨 MS 和 MS/MS 信息。然后利用本课题组前期建立的与癌症相关的代谢物数据库对数据进行代谢物识别:在代谢物与数据库代谢物保留时间一致的同时,其主要子离子均匹配。结果表明,此方法对数据库中的 93 个代谢物均可匹配,可实现肺癌血浆中癌症相关代谢物的非靶向定性分析。

值得注意的是,此方法针对含量相对较低的代谢物,在基质干扰下也可实现定性鉴别。5-甲基胞苷(m/z 258.108 4)和 1-甲基鸟嘌呤

(m/z 166.072 3)的色谱保留时间相近且含量较低,在不提前设定母离子的情况下难以直接获得二级谱图;而采用 SWATH 采集方式时,由于扫描范围在不同 m/z 区间快速切换,即使不提前设定母离子,也可由分子质量差异分别获得较干净的混合子离子谱图,便于下一步的数据库比对,以实现代谢物的识别,识别过程示于图 1。

2.2 定量分析质谱条件的选择和优化

针对成功识别的血浆中 93 个代谢物,建立了基于 SWATH 数据采集模式的定量分析方法。由于获得的数据中包含一级质谱图和二级子离子扫描谱图,本研究首先考察并选择各代谢物的质谱定量离子。部分代谢物采用母离子定量时易受基质干扰,采用子离子定量可降低背景噪音的干扰,从而具有更高的选择性和灵敏度,往往表现为线性更佳或者定量限更低。以 5-甲硫腺苷为例,由于在血浆中易受到分子质量相近的基质干扰,其提取离子色谱的本底较高,定量时难以获得较好的线性,且定量限较高;而 MS/MS 扫描通道的特征子离子(m/z 136.061 0)由于特异性和专属性的提高,可减少基质干扰,使信噪比增加,更适合作为定量离子。定量结果表明,采用子离子(m/z 136.061 0)定量时,5-甲硫腺苷的线性拟合度更佳,能获得更好的结果,示于图 2。

经比较发现,有 73 个代谢物采用母离子进行定量,20 个代谢物采用子离子定量,线性关系良好,且定量限较低,结果列于表 1。93 个代谢物的总离子流图和提取离子流图示于图 3。

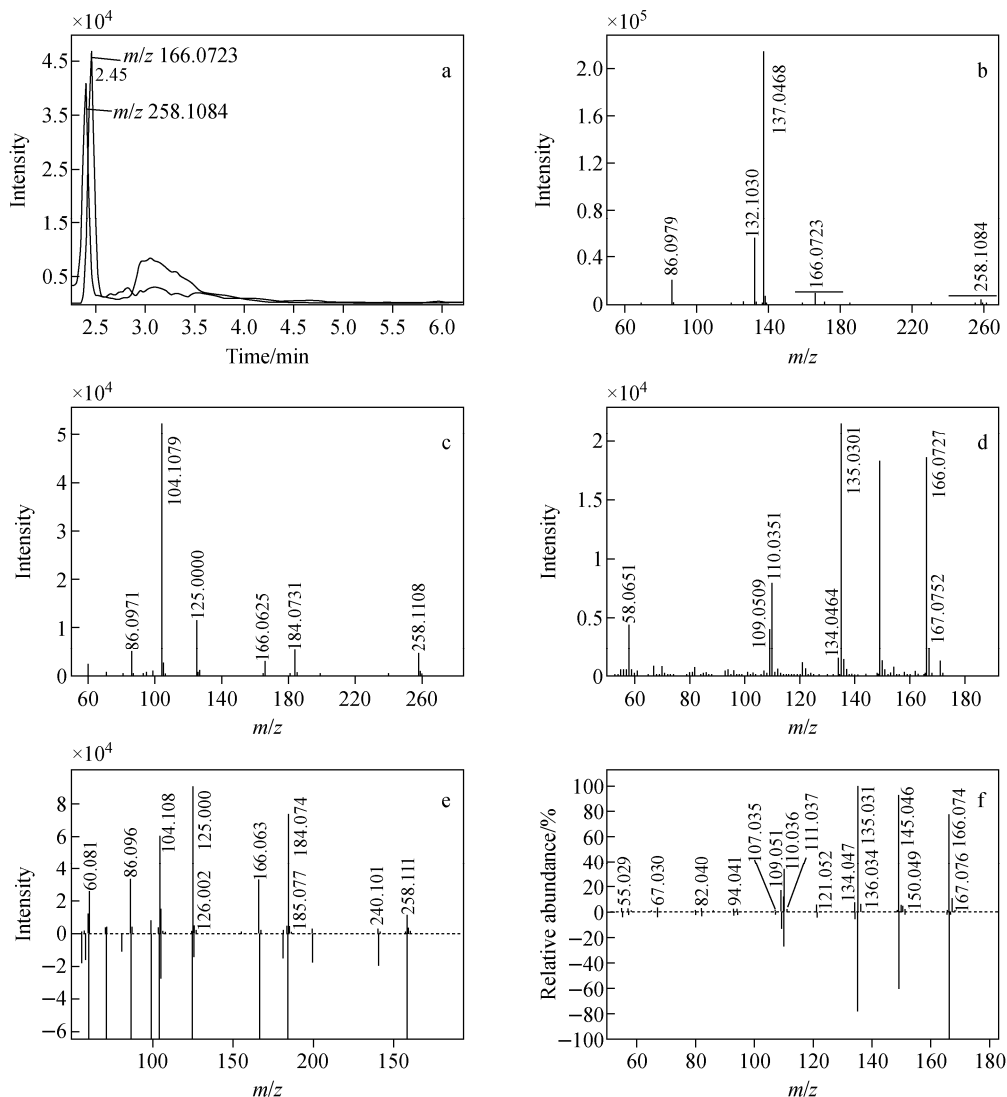
2.3 代谢物定量分析方法学考察

2.3.1 方法的线性及线性范围 以待测物浓度(x)为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值(y)为纵坐标,采用加权($w=1/x$)最小二乘法进行回归运算,即得标准曲线的线性方程和线性相关系数,结果列于表 1。结果表明,约 96% 以上的代谢物在 1.25~12 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性关系良好($r^2>0.99$)。

2.3.2 方法精密度和稳定性 为了检验方法的可靠性,取血浆质控样本每天平行检测 6 次,连续检测 4 天,根据随行标准曲线计算代谢物绝对浓度的相对标准偏差(RSD),考察方法的

日内和日间精密度;并且平行检测 3 份血浆样本经前处理后在自动进样器中放置 96 h 内的稳定性,每 12 h 测定 1 次,考察方法的稳定性。结果表明,有 86 个代谢物(除丝氨酸、鸟氨酸、孕酮、3-脱氧胸苷、胱氨酸、N-乙酰天冬酸和 N-4-乙酰基胞嘧啶核苷之外)的日内、日间精密度良好,于 4 °C 放置 4 天内的稳定性良好,能够满足生物样本定量分析的要求,精密度和稳定性

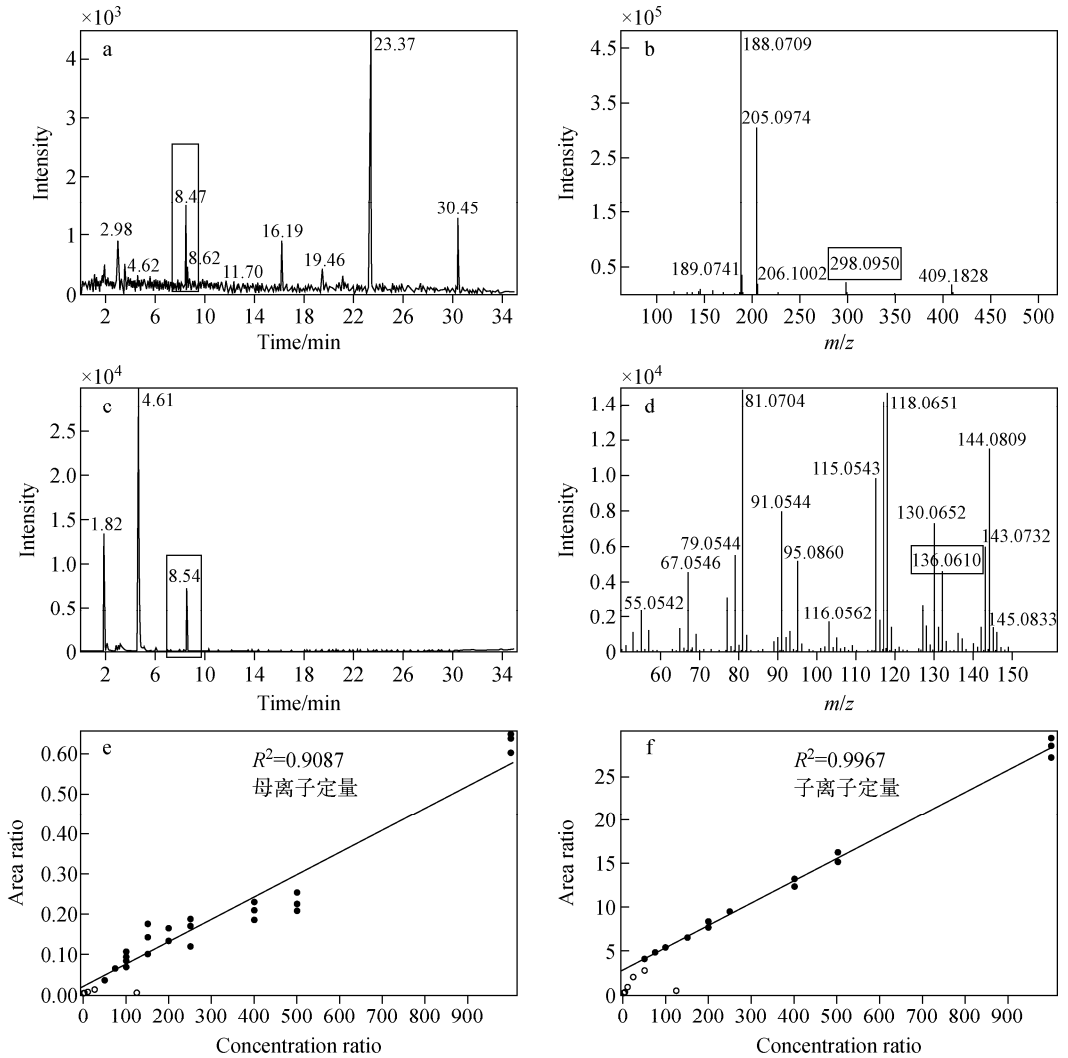
结果示于图 4。其中,代谢物连续 4 天的日内精密度($n=6$)分别为 0.19%~13.36%、0.27%~14.07%、0.33%~14.58%和 0.34%~14.54%,日间精密度为 0.37%~16.86%,均小于 20%;在 4 °C 下,96 h 内的稳定性在 0.62%~19.35%之间,小于 20%;表明方法的精密度和稳定性良好。



注: a. 5-甲基胞苷和 1-甲基鸟嘌呤的提取离子流图; b. 保留时间为 2.4~2.5 min 的质谱图;
c. 保留时间为 2.5 min, m/z 249~275 的混合 MS/MS 信息;
d. 保留时间为 2.5 min, m/z 149~175 的混合 MS/MS 信息;
e. 5-甲基胞苷与数据库比对结果; f. 1-甲基鸟嘌呤与数据库的比对结果

图 1 基于 SWATH 采集模式下的 5-甲基胞苷和 1-甲基鸟嘌呤的定性识别过程

Fig. 1 Identification of 5-methyl cytidine and 1-methyl guanine based on SWATH acquisition



注: a. 5-甲硫腺苷母离子的分子离子峰 m/z 298.0950 的提取离子流图; b. 保留时间为 8.47 min 的质谱图;
c. 5-甲硫腺苷特征子离子 m/z 136.0610 的提取离子流图; d. 保留时间为 8.54 min, m/z 124~150 的 MS/MS 谱图;
e, f. 5-甲硫腺苷母离子定量与子离子定量的线性结果比较

图 2 5-甲硫腺苷质谱定量模式的对比和选择

Fig. 2 Selection of preferable quantification mode of 5-methylthioadenosine

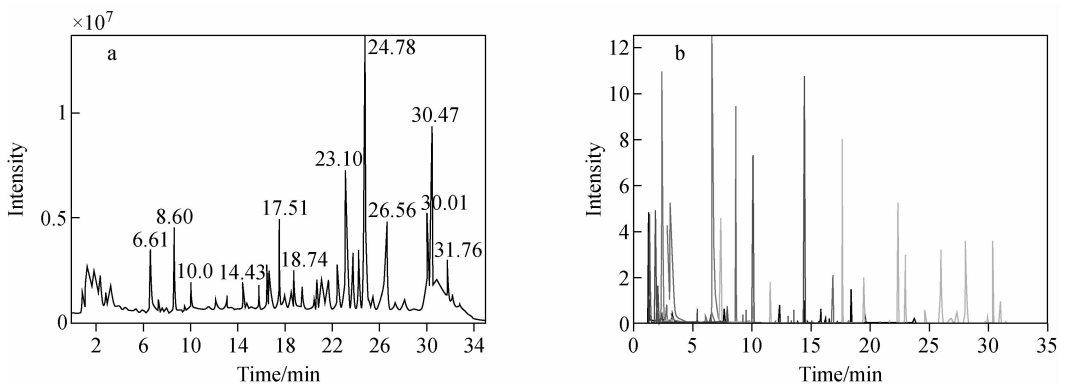


图 3 代谢物总离子流图 (a) 和提取离子流图 (b)

Fig. 3 Total ion chromatography (a) and extract ion chromatography (b) of targeted metabolites

表1 靶向定量代谢物的内标、线性范围、回归方程、相关系数及定量模式
 Table 1 Internal standard, regression equation, correction coefficient (r^2),
 dynamic range and preferred quantification mode of targeted metabolites

化合物 Compound	内标 Internal standard	回归方程 Regression equation	线性相关系数 Correction coefficient (r^2)	线性范围 Dynamic range/($\mu\text{g/L}$)	定量模式 Preferred quantification
苏氨酸	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}_3$, d_3	$y=2.07965 \times 10^{-4}x-0.00219$	0.9919	$5.00 \times 10^2 \sim 2.00 \times 10^4$	MS
烟酰胺	丙酰基- D_3 -肉碱	$y=8.62671 \times 10^{-4}x-0.00763$	0.9902	$1.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^2$	MS
苯丙氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=4.45855 \times 10^{-4}x-0.13507$	0.9922	$6.25 \times 10^2 \sim 1.25 \times 10^5$	MS
酪氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=2.13789 \times 10^{-4}x-0.56574$	0.9931	$2.75 \times 10^3 \sim 1.10 \times 10^5$	MS
天冬氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=4.75597 \times 10^{-5}x+0.00179$	0.9937	$1.25 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
天冬酰胺	谷氨酸- d_5	$y=0.06062x+5.02220$	0.9913	$1.25 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS ²
丝氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.58556 \times 10^{-5}x+0.00183$	0.9913	$2.50 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
羟脯氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.46453 \times 10^{-5}x+0.00262$	0.9920	$3.75 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
谷氨酰胺	色氨酸- d_5	$y=7.51715 \times 10^{-8}x+7.01804 \times 10^{-5}$	0.9936	$2.50 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$	MS
组氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=4.36635 \times 10^{-5}x-0.00519$	0.9913	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
瓜氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=9.27507 \times 10^{-6}x-1.66021 \times 10^{-4}$	0.9957	$7.50 \times 10^2 \sim 1.50 \times 10^4$	MS
丙氨酸	缬氨酸- d_8	$y=2.28916 \times 10^{-5}x-9.92310 \times 10^{-4}$	0.9906	$6.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
谷氨酸	缬氨酸- d_8	$y=1.38240 \times 10^{-5}x-0.00123$	0.9944	$1.25 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^4$	MS
1-甲基组氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.96292 \times 10^{-4}x-0.00726$	0.9923	$6.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
3-甲基组氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.95955 \times 10^{-4}x-0.00749$	0.9922	$6.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
<i>L</i> -肌肽	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}_3$, d_3	$y=1.63215 \times 10^{-4}x-0.00183$	0.9941	$2.50 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
精氨酸	缬氨酸- d_8	$y=2.07099 \times 10^{-4}x-0.05133$	0.9923	$3.13 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^4$	MS
γ -氨基丁酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.85305 \times 10^{-5}x-6.81209 \times 10^{-5}$	0.9964	$2.50 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
3-氨基异丁酸	酪氨酸-苯基- d_2	$y=1.18266 \times 10^{-5}x-3.97778 \times 10^{-4}$	0.9935	$6.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
脯氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.07348 \times 10^{-4}x+0.17373$	0.9954	$5.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$	MS
鸟氨酸	酪氨酸-苯基- d_2	$y=3.02018 \times 10^{-5}x+5.51979 \times 10^{-5}$	0.9970	$3.75 \times 10 \sim 1.50 \times 10^4$	MS
胱硫醚	谷氨酸- d	$y=0.00768x-0.03928$	0.9938	$1.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS ²
赖氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=7.63765 \times 10^{-5}x-0.00299$	0.9941	$5.00 \times 10 \sim 2.00 \times 10^3$	MS
甲硫氨酸	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}_3$, d_3	$y=0.00208x-1.28354$	0.9949	$7.50 \times 10^2 \sim 3.00 \times 10^4$	MS
缬氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=4.446 \times 10^{-5}x+5.647 \times 10^{-2}$	0.9948	$1.88 \times 10^2 \sim 3.75 \times 10^4$	MS
同型半胱氨酸	缬氨酸- d_8	$y=2.04415 \times 10^{-5}x-0.00465$	0.9909	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
异亮氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.77486 \times 10^{-4}x+0.00940$	0.9940	$1.56 \times 10^3 \sim 1.25 \times 10^5$	MS
亮氨酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=2.52727 \times 10^{-4}x-0.88316$	0.9948	$6.25 \times 10^3 \sim 1.25 \times 10^5$	MS
色氨酸	色氨酸- d_5	$y=1.22149 \times 10^{-4}x-0.01785$	0.9934	$3.13 \times 10^2 \sim 2.00 \times 10^4$	MS
胆碱	缬氨酸- d_8	$y=4.85777 \times 10^{-4}x+0.04646$	0.9909	$5.00 \times 10^2 \sim 2.00 \times 10^4$	MS
烟酰胺	肉毒碱-甲基- d_3	$y=0.00125x-0.11364$	0.9959	$1.25 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
孕酮	谷氨酸- d_5	$y=2.37418 \times 10^{-4}x-0.00611$	0.9902	$3.13 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS ²
睾酮	雄烯二酮- $^{13}\text{C}_3$	$y=0.00457x-0.15517$	0.9937	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
皮质甾酮	硬脂酰基- D_3 -肉碱	$y=0.00318x-0.16851$	0.9942	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
肉碱	肉毒碱-甲基- d_3	$y=3.40486 \times 10^{-4}x-0.15178$	0.9972	$7.50 \times 10^2 \sim 3.00 \times 10^4$	MS
马尿酸	肉毒碱-甲基- d_3	$y=1.85748 \times 10^{-4}x-0.05808$	0.9958	$5.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS

续表 1

化合物 Compound	内标 Internal standard	回归方程 Regression equation	线性相关系数 Correction coefficient (r^2)	线性范围 Dynamic range/($\mu\text{g/L}$)	定量模式 Preferred quantification
泛酸	色氨酸-d ₅	$y=4.95261 \times 10^{-4}x-0.02207$	0.9924	$6.25 \times 10 \sim 1.25 \times 10^3$	MS
犬尿酸	色氨酸-d ₅	$y=1.34157 \times 10^{-4}x-0.05315$	0.9937	$5.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
吡啶乳酸	色氨酸-d ₅	$y=2.56637 \times 10^{-4}x-0.02575$	0.9917	$1.25 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
尿刊酸	L-甲硫氨酸-甲基- ¹³ C, d ₃	$y=0.00630x-0.22462$	0.9952	$6.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
N ₂ -乙酰赖氨酸	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=3.39660 \times 10^{-4}x-0.01229$	0.9931	$6.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
1-甲基鸟嘌呤	酪氨酸-苯基-d ₂	$y=3.09733 \times 10^{-4}x+1.12323 \times 10^{-4}$	0.9979	$1.25 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
次黄嘌呤	缬氨酸-d ₈	$y=4.98631 \times 10^{-4}x-1.34699$	0.9936	$7.50 \times 10^3 \sim 1.50 \times 10^5$	MS
帕拉黄嘌呤	色氨酸-d ₅	$y=0.00143x-0.04231$	0.9927	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
3-甲基黄嘌呤	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=3.21639 \times 10^{-4}x-0.01551$	0.9924	$6.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
7-甲基黄嘌呤	7-甲基黄嘌呤- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂	$y=0.00188x-0.07923$	0.9967	$6.25 \times 10 \sim 1.25 \times 10^3$	MS
环磷酸腺苷	谷氨酸-d ₅	$y=0.13739x-3.58471$	0.9932	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS ²
环磷酸鸟苷	谷氨酸-d ₅	$y=0.01607x+0.89361$	0.9949	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS ²
5'-甲硫腺苷	谷氨酸-d ₅	$y=0.02544x+2.86254$	0.9957	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS ²
尿囊素	谷氨酸-d ₅	$y=0.00772x+3.75263$	0.9962	$5.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS ²
5-甲基尿苷	7-甲基黄嘌呤- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂	$y=3.67552 \times 10^{-4}x-3.02864 \times 10^{-4}$	0.9934	$3.20 \sim 3.75 \times 10^2$	MS ²
尿苷	尿嘧啶核苷- ¹⁵ N ₂	$y=3.71517 \times 10^{-4}x-2.88774 \times 10^{-4}$	0.9984	$1.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS ²
3'-脱氧胸苷	色氨酸-d ₅	$y=2.37551 \times 10^{-5}x-1.38945 \times 10^{-4}$	0.9940	$6.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS ²
腺苷	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=0.00109x-0.01013$	0.9956	$1.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
胱氨酸	缬氨酸-d ₈	$y=1.00630 \times 10^{-5}x-2.43908 \times 10^{-4}$	0.9938	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
5-甲基胞嘧啶核苷	缬氨酸-d ₈	$y=0.05496x-0.92078$	0.9954	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
肌苷	色氨酸-d ₅	$y=1.67017 \times 10^{-5}x-6.52014 \times 10^{-5}$	0.9978	$2.50 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
3-吡啶乙酸	色氨酸-d ₅	$y=1.53830 \times 10^{-4}x-0.02013$	0.9931	$2.50 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
N,N-二甲基甘氨酸	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=3.22396 \times 10^{-5}x+0.00350$	0.9970	$1.88 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
氧脯氨酸	谷氨酸-d ₅	$y=0.00233x+34.171571$	0.9922	$7.50 \times 10^3 \sim 1.50 \times 10^5$	MS ²
喹啉酸	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=0.00130x-0.02300$	0.9953	$2.50 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
N- α -乙酰谷氨酰胺	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=7.01979 \times 10^{-4}x+0.03318$	0.9898	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
肌酸酐	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=7.10111 \times 10^{-5}x-0.00511$	0.9952	$1.25 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
嘧啶酸	缬氨酸-d ₈	$y=5.58022 \times 10^{-4}x-0.10109$	0.9921	$7.50 \times 10^2 \sim 1.50 \times 10^4$	MS
N-乙酰-氨基葡萄糖	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=4.41309 \times 10^{-6}x+6.17410 \times 10^{-4}$	0.9977	$1.25 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
5-乙酰-羟基吡啶乙酸	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=8.81663 \times 10^{-4}x-0.01430$	0.9929	$2.50 \times 10 \sim 5.00 \times 10^2$	MS
3-吡啶乙酸	酪氨酸-苯基-d ₂	$y=1.78262 \times 10^{-4}x+0.00134$	0.9981	$1.25 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
黄嘌呤	7-甲基黄嘌呤- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂	$y=5.29471 \times 10^{-4}x+0.00317$	0.9847	$2.50 \times 10 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
N-乙酰天冬酸	谷氨酸-d ₅	$y=6.80901 \times 10^{-4}x-0.01285$	0.9919	$5.00 \times 10 \sim 1.00 \times 10^4$	MS ²
盐酸水苏碱	缬氨酸-d ₈	$y=0.00151x-0.00278$	0.9928	$5.00 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
苯乙酰谷氨酰胺	色氨酸-d ₅	$y=6.56031 \times 10^{-4}x-0.02497$	0.9940	$6.25 \times 10 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
N-4-乙酰胞嘧啶核苷	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=2.52545 \times 10^{-6}x-1.57783 \times 10^{-4}$	0.9919	$1.25 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS
二甲基精氨酸	肉毒碱-甲基-d ₃	$y=3.36214 \times 10^{-4}x-0.01037$	0.9933	$4.95 \times 10 \sim 9.90 \times 10^3$	MS
可可碱	丙酰基-D ₃ -肉碱	$y=7.51800 \times 10^{-4}x-0.02321$	0.9902	$6.25 \times 10 \sim 1.25 \times 10^3$	MS

续表 1

化合物 Compound	内标 Internal standard	回归方程 Regression equation	线性相关系数 Correction coefficient (r^2)	线性范围 Dynamic range/ $(\mu\text{g/L})$	定量模式 Preferred quantification
鸟嘌呤	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}, \text{d}_3$	$y=5.30321 \times 10^{-4}x-0.10783$	0.9951	$3.75 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
维生素 B8	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}, \text{d}_3$	$y=0.00296x-2.18783$	0.9906	$1.50 \times 10^3 \sim 3.00 \times 10^4$	MS
β 假尿苷	缬氨酸- d_8	$y=7.56707 \times 10^{-6}x+8.55772 \times 10^{-4}$	0.9950	$3.13 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^4$	MS
辛酰肉碱	色氨酸- d_5	$y=0.00116x-0.02182$	0.9895	$2.50 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
甘氨酸-甘氨酸	谷氨酸- d_5	$y=0.02894x-0.20698$	0.9969	$1.25 \times 10^2 \sim 2.50 \times 10^3$	MS ²
5-羟色胺	缬氨酸- d_8	$y=8.32803 \times 10^{-4}x+0.00592$	0.9950	$1.25 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^3$	MS ²
甜菜碱	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}, \text{d}_3$	$y=0.00781x-1.49040$	0.9933	$3.13 \times 10^2 \sim 1.25 \times 10^4$	MS
甘露糖胺	色氨酸- d_5	$y=2.22647 \times 10^{-6}x+1.49096 \times 10^{-4}$	0.9951	$9.38 \times 10^2 \sim 7.50 \times 10^3$	MS
乙酰胆碱	缬氨酸- d_8	$y=5.16475 \times 10^{-4}x+0.01082$	0.9940	$5.00 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
15:0 溶血磷脂酰胆碱	16:0- d_{31} 溶血磷脂酰胆碱	$y=6.75400 \times 10^{-6}x-2.62075 \times 10^{-4}$	0.9932	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS ²
16:0 溶血磷脂酰胆碱	16:0- d_{31} 溶血磷脂酰胆碱	$y=2.74927 \times 10^{-5}x+0.34247$	0.9975	$8.00 \times 10^3 \sim 1.60 \times 10^5$	MS ²
丙酰-肉碱	丙酰基- D_3 -肉碱	$y=1.33848 \times 10^{-5}x+7.83365 \times 10^{-4}$	0.9991	$1.00 \times 10^2 \sim 2.00 \times 10^3$	MS
己酰-肉碱	丙酰基- D_3 -肉碱	$y=9.42131 \times 10^{-4}x-0.00887$	0.9937	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^3$	MS
油酰基-肉碱	硬脂酰基- D_3 -肉碱	$y=2.87185 \times 10^{-4}x-0.00561$	0.9942	$7.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^3$	MS ²
17:0 溶血磷脂酰胆碱	16:0- d_{31} 溶血磷脂酰胆碱	$y=1.12935 \times 10^{-5}x+0.00322$	0.9962	$3.13 \times 10^2 \sim 1.25 \times 10^4$	MS ²
18:1 溶血磷脂酰胆碱	16:0- d_{31} 溶血磷脂酰胆碱	$y=6.79867 \times 10^{-6}x-0.00299$	0.9883	$1.25 \times 10^3 \sim 5.00 \times 10^4$	MS ²
肌氨酸	缬氨酸- d_8	$y=5.33721 \times 10^{-6}x+6.29666 \times 10^{-4}$	0.9950	$2.50 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS
<i>N</i> -乙酰甘氨酸	<i>L</i> -甲硫氨酸-甲基- $^{13}\text{C}, \text{d}_3$	$y=4.11209 \times 10^{-5}x+5.45868 \times 10^{-4}$	0.9955	$1.25 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^3$	MS
丁内铵盐	谷氨酸- d_5	$y=0.01270x+5.36773$	0.9950	$5.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^4$	MS ²

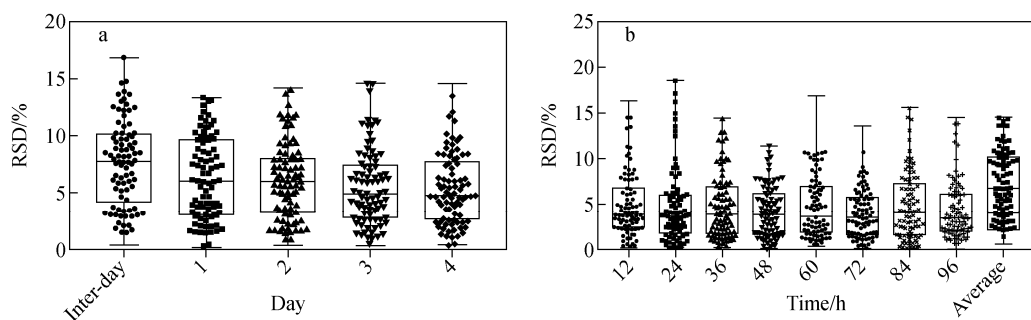


图 4 方法的精密度(a)和稳定性(b)

Fig. 4 Stability (a) and precision (b) of targeted metabolites

3 结论

本研究基于数据非依赖的 SWATH 采集技术,以血浆样本为研究对象,结合本课题组前期建立的癌症相关代谢物数据库,成功识别并鉴定了 93 个代谢物。对这 93 个代谢物进行靶

向定量分析,建立了其定量分析方法并进行方法学考察。结果发现有 86 个代谢物可以满足生物样本定量分析的要求。方法学验证结果表明,基于 SWATH 方法的定量分析能够满足血浆样本分析测定要求,能够准确可靠地

对人血浆中的代谢物进行同时定性定量分析。此外,对含量较低或易受基质干扰的化合物,采用高分辨子离子定量有利于去除基质干扰,提高信噪比,从而可获得更佳的线性结果、更宽的定量范围以及更低的定量限。综上所述,SWATH方法可实现血浆样本中癌症相关代谢物的同时定性定量分析,有望成为定量代谢组学的标准分析方法。

参考文献:

- [1] PATTI G, YANES O, SIUZDAK G. Innovation; Metabolomics; the apogee of the omics trilogy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 263-269.
- [2] ARMITAGE E G, BARBAS C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 87: 1-11.
- [3] ARMITAGE E G, CIBOROWSKI M. Applications of metabolomics in cancer studies[M]. Germany: Springer Cham, 2017: 209-234.
- [4] SCHRIMPE-RUTLEDGE C A, CODREANU S G, SHERROD S D, MCLEAN J A. Untargeted metabolomics strategies-challenges and emerging directions[J]. *J Am Soc Mass Spectrometry*, 2016, 27: 1 897-1 905.
- [5] ZHOU J, YIN Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2016, 141(23): 6 362-6 373.
- [6] TSOU C C, AVTONOMOV D, LARSEN B, TUCHOLSKA M, CHOI H, GINGRAS A C, NESVIZHSHKII A I. DIA-Umpire; comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 258-264.
- [7] BRUDERER T, VARESIO E, HIDASI A O, DUCHOSLAV E, BURTON L, BONNER R, HOPFGARTNER G. Metabolomic spectral libraries for data-independent SWATH liquid chromatography mass spectrometry acquisition[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(7): 1 873-1 884.
- [8] CHEN G, WALMSLEY S, CHEUNG G C M, CHEN L, CHENG C Y, BEUERMAN R W, WONG T Y, ZHOU L, CHOL H. Customized consensus spectral library building for untargeted quantitative metabolomics analysis with data independent acquisition mass spectrometry and metaboDIA workflow[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 4 897-4 906.
- [9] GILLET L C, NAVARRO P, TATE S, ROST H, SELEVSEK N, REITER L, BONNER R, AEBERSOLD R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(6): O111.016717.
- [10] BRUDERER T, VARESIO E, HOPFGARTNER G. The use of LC predicted retention times to extend metabolites identification with SWATH data acquisition[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1 071: 3-10.
- [11] BONNER R, HOPFGARTNER G. SWATH acquisition mode for drug metabolism and metabolomics investigations[J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(16): 1 735-1 750.
- [12] ARNHARD K, GOTTSCHALL A, PITTLERL F, OBERACHER H. Applying 'Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra' (SWATH) for systematic toxicological analysis with liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(2): 405-414.
- [13] ZHA H H, CAI Y P, YIN Y D, WANG Z Z, KANG L, ZHU Z J. SWATH to MRM: development of high-coverage targeted metabolomics method using SWATH technology for biomarker discovery[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(6): 4 062-4 070.