

基于高分辨质谱进行代谢物鉴定的高效流程：四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱Q Exactive鉴定人尿样中乌头碱及其代谢产物

江峥，叶芳挺（赛默飞世尔科技）

引言

体内代谢物研究主要针对各类生物基质样本，如全血、血浆、血清、尿样、胆汁或组织等，对其中痕量的代谢物进行分离、结构鉴定或定量分析。液相色谱质谱联用技术（LC-MS）以其分离效率高、检测速度快、定性和定量能力强等优势，被广泛应用于体内代谢物研究，而其中高分辨质谱的使用更是趋于普及。以高分辨静电场轨道阱orbitrap为核心的串联质谱平台Q Exactive，具有分辨率高、质量精度高、灵敏度高、质量轴稳定性好、可快速正负切换扫描等优点，可有效提高代谢物研究的分析通量和分析效果，尤其对于复杂基体中的痕量代谢组分的识别效率好、同时定性和定量能力强。配合相应的代谢物研究软件，Q Exactive为生物基质样品中目标或非目标代谢物的定性鉴别和定量分析提供了完整高效的高分辨质谱分析流程。

乌头属（Aconitum）类植物中的生物碱类成分具有镇痛、抗炎、抗癫痫、抗肿瘤、提高免疫力等生理活性，用以治疗跌打损伤等病症。但其中所含的乌头碱（Aconitine）等双酯二萜生物碱安全系数小，治疗剂量与中毒剂量接近，加之对毒物耐受性的个体差异、误服或投毒等原因，常引起乌头碱中毒。乌头碱中毒无特异性临床表现，至今没有准确的法医鉴定及临床诊断方法。此外，乌头碱在体内浓度低、代谢速度快，因此研究乌头碱在人体内的代谢过程，通过代谢产物表征其中毒情况和中毒程度，对于刑侦断案以及临床施救都有着实际应用价值。乌头碱体内代谢物研究主要面临以下几个难点：一是乌头碱代谢迅速，尿样中的原药及代谢物浓度低；二是生物样品复杂，内源性干扰严重；三是代谢途径多样，代谢物众多。因而，对于高分辨质谱系统要求其全质量轴的扫描灵敏度、特异性强、质量精度高、动态范围宽且可采用多种扫描方式用以最完整和可靠的代谢物鉴定。

实验目的

建立以Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱为核心的代谢物鉴定高效流程，用于准确、快速地筛选和定性目标及非目标代谢产物，提高代谢物鉴定的覆盖率，尤其是含量较低的代谢产物的检出效率。以人体内乌头碱代谢物鉴定为例，对24、48、72小时所采集尿样中的代谢产物进行高分辨质谱分析。

实验条件

液相色谱条件

- 色谱系统：Thermo Scientific Accela 600快速液相色谱系统
- 色谱柱：Hypersil Gold C18 (50×2.1mm, 1.9μm)
- 进样量：10 μL

流动相A:	10mM醋酸铵水溶液		
流动相B:	乙腈		
流速:	300 μL/min		
梯度:	时间 (min)	A%	B%
	0.00	95	5
	1.00	95	5
	14.00	50	50
	14.01	5	95
	17.00	5	95
	17.01	95	5
	20.00	95	5

质谱条件

- 质谱系统：Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱
- 参数设置：

离子源参数		扫描参数	
离子化方式	HESI (+)	MS分辨率	70,000 FWHM
喷雾电压	3000V	MS2分辨率	17,500 FWHM
鞘气	35 arb	扫描范围	m/z 200-1200
辅助气	10 arb	裂解方式	HCD
离子传输管温度	350° C	碰撞能量	35%

数据分析

Q Exactive采集的数据文件由专业的代谢物鉴定软件MetWorks进行处理，自动筛选并定性可能的代谢产物。MetWorks支持高分辨质谱数据，软件中集成了I相、II相和III相代谢通路，仅需提供母体药物的分子式或者结构就能够依据精确质量数自动检索数据文件中已知代谢方式的目标产物。除次之外，MetWorks也能够通过MMDF（多重质量亏损过滤）排除总离子流色谱图中的干扰信号，放大低浓度代谢物的响应。对于非目标代谢产物，软件可以通过二级谱图相关性、空白及样品中组分对比分析、同位素匹配、色谱峰检索等多个角度进行代谢物的筛查，以确保最为完整的代谢物鉴定覆盖率。

关键词：

- Q Exactive
- MetWorks
- 乌头碱
- 代谢物鉴定

结果

代谢物鉴定通常以体内或体外生物基质样品为研究对象，代谢产物结构迥异且浓度高低不一，因此对于质谱系统要求具备足够高的分辨率以区别与目标分析物质量数接近的干扰组分，足够准确和稳定的精确质量数测定能力以在整个分析周期内获得有效的样品数据，同时也需要足够高的灵敏度和足够宽的动态范围以满足各种浓度水平代谢物的检测。基于Orbitrap静电场轨道阱高分辨质谱技术的Q Exactive LC-MS/MS系统不仅具有分辨率高、质量精度高、灵敏度高的特点，还能够提供正负切换扫描、数据关联MS/MS扫描、中性丢失扫描等多种高分辨数据采集模式，以便获得最为全面的代谢物筛选和鉴定所需的数据。所采集的高分辨数据文件可直接导入MetWorks代谢物鉴定软件，仅需在软件中输入母药的分子式或结构式，即能自动根据内置的代谢通路、MS/MS谱图相关性、同位素特征等信息对目标及非目标代谢产物进行多角度的定性分析，最终生成报告。Q Exactive高分辨质谱与MetWorks代谢物鉴定软件，构成了一套完整、高效、快速的代谢物鉴定流程，无论是目标还是非目标、高浓度还是低浓度的代谢物，都能够获得最佳的鉴定效果（图1为代谢物鉴定流程）。

根据上述代谢物鉴定流程，对24hr、48hr、72hr采集的尿样中乌头碱的代谢物进行筛查，分别鉴定出49、40、14种代谢产物。图2为24hr采集尿样中所鉴定出的部分代谢产物，以精确质量数对目标组分信号进行提取，提取窗口为5ppm。表1中列出了主要代谢产物的代谢修饰方式、保留时间及实测精确质量数等信息，大部分化合物的质量精度均在1ppm以内。

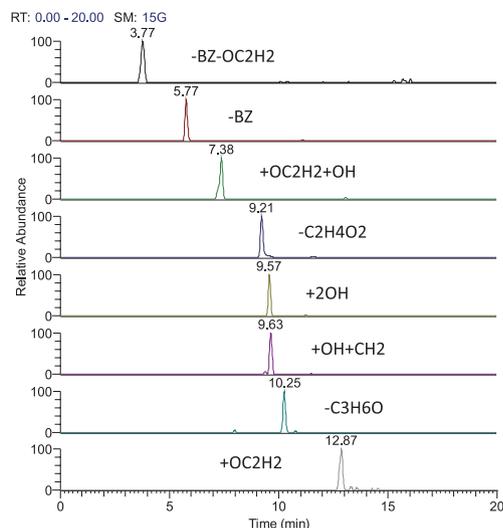


图2: 24hr尿样中部分代谢产物的提取离子流色谱图（质量提取窗口5ppm）

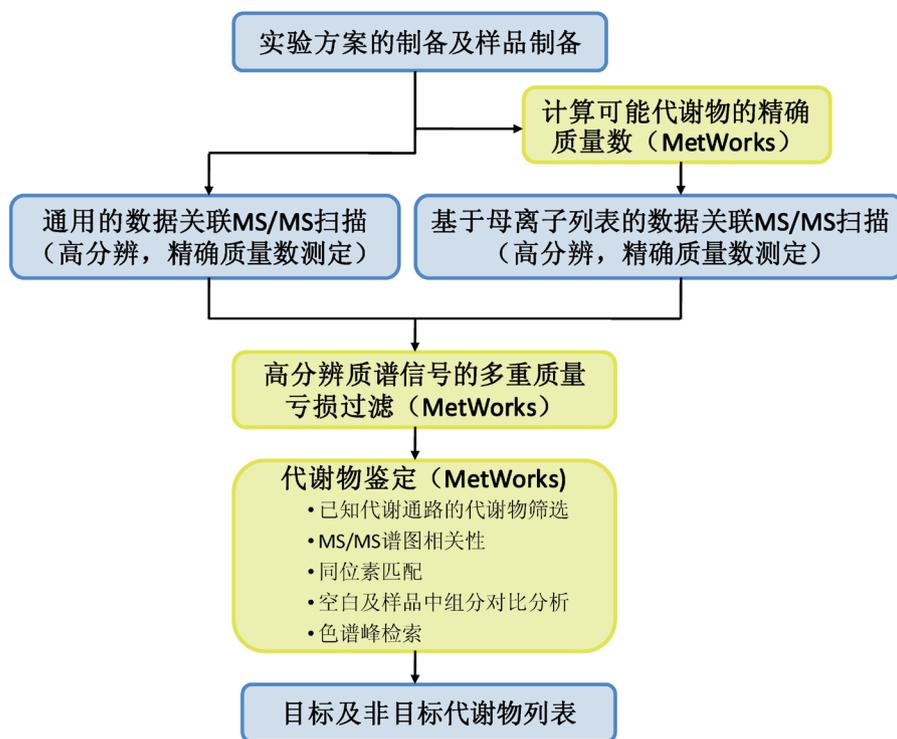


图1: 基于Q Exactive高分辨质谱及MetWorks软件的代谢物鉴定流程

表1: 所鉴定出的主要代谢产物及精确质量数测定结果

No.	Modification	RT (min)	Formula	Theoretical Mass	Measured Mass	Precision (ppm)
M1	+O-C2H2O	7.53	C32H45NO11	620.30654	620.30719	1.0479
M2	-C3H6	8.33	C31H41NO11	604.27524	604.2757	0.7612
M3	-C3H6	9.51	C31H41NO11	604.27524	604.27502	-0.3641
M4	+O-C2H4	9.28	C32H43NO12	634.2858	634.28644	1.0090
M5	+O-C2H4	9.58	C32H43NO12	634.2858	634.28644	1.0090
M6	-C2H4	9.49	C32H43NO11	618.29089	618.2915	0.9866
M7	-C2H4	9.89	C32H43NO11	618.29089	618.29108	0.3073
M8	-H2-C2H2O	10.75	C32H43NO10	602.29597	602.29633	0.5977
M9	-CH2	9.84	C33H45NO11	632.30654	632.30707	0.8382
M10	-CH2	11.44	C33H45NO11	632.30654	632.30652	-0.0316
M11	-H2-CH2	9.35	C33H43NO11	630.29089	630.2912	0.4918
M12	-H2-CH2	11.87	C33H43NO11	630.29089	630.29132	0.6822
M13	-H2-CH2	12.26	C33H43NO11	630.29089	630.29108	0.3014
M14	-C4H8	6.70	C30H39NO11	590.25959	590.25897	-1.0504
M15	-CH2-OC2H2	7.99	C31H43NO10	590.29597	590.29645	0.8132
M16	+O-CH2	8.99	C33H45NO12	648.30145	648.30164	0.2931
M17	+O-CH2	10.17	C33H45NO12	648.30145	648.3017	0.3856
M18	+O-H2	10.00	C34H45NO12	660.30145	660.30188	0.6512
M19	-H2	10.45	C34H45NO11	644.30654	644.30701	0.7295
M20	+H2O	10.86	C34H49NO12	664.33275	664.33252	-0.3462
M21	+O	9.10	C34H47NO12	662.3171	662.31757	0.7096
M22	+O	11.98	C34H47NO12	662.3171	662.31769	0.8908
M23	+CH2	12.59	C35H49NO11	660.33784	660.33838	0.8178
M24	+CH2	15.24	C35H49NO11	660.33784	660.33844	0.9086
M25	-BZ-OC2H2	3.77	C25H41NO9	500.28541	500.28534	-0.1399
M26	-BZ	5.77	C27H43NO10	542.29597	542.29626	0.5348
M27	+OC2H2+O	7.38	C36H49NO13	704.32767	704.32782	0.2130
M28	-C2H4O2	9.21	C32H43NO9	586.30106	586.30157	0.8699
M29	+2O	9.57	C34H47NO13	678.31202	678.31165	-0.5455
M30	+O+CH2	9.63	C35H49NO12	676.33275	676.33276	0.0148
M31	-C3H6O	10.25	C31H41NO10	588.28032	588.28101	1.1729
M32	+OC2H2	12.87	C36H49NO12	688.33275	688.3327	-0.0726
M33	-C2H2O	8.50	C32H45NO10	604.31162	604.31177	0.2482
M34	-CH2O	10.17	C33H45NO10	616.31162	616.31219	0.9249
M35	-CH2+H2	10.19	C33H47NO11	634.32219	634.32257	0.5991
M36	-O	12.15	C34H47NO10	630.32727	630.32758	0.4918

辨质谱数据，分别采用MS和MS/MS精确质量数对代谢物进行定性筛查和结构确证。Q Exactive的超高分辨率和精确的质量数测定功能，大幅减少了假阳性结果，提升整体的数据结果质量。MetWorks代谢物鉴定软件中的MMDF功能有效滤除基质中的信号干扰，从多维角度对痕量代谢组分进行自动筛查。对24hr、48hr、72hr采集的人体尿样中的乌头碱及其代谢物进行鉴定，共鉴定出近50种代谢产物，即使在服药3天后依然能检出14种代谢物。所采用MS和MS/MS数据关联扫描，使得一次进样同时获得高分辨一级和二级质谱数据，用于代谢产物研究。Q Exactive的特异性和灵敏度也使其成为兼具优异的同时定性和定量功能，成为最佳的体内或体外代谢物研究的全能高分辨质谱平台。

对于通过一级全扫描鉴定出的代谢产物，Q Exactive可通过母离子列表形式，有针对性的采集目标代谢物的二级高分辨质谱数据，用于进一步的结构确证。以脱乙酰基的代谢产物M33为例，图3中显示了M33的二级高分辨质谱对比图。M33碎裂后可产生与乌头碱类似的碎片离子，提示其主要结构与乌头碱类似，为其脱侧链乙酰基后的产物。Q Exactive的HCD高能碰撞碎裂模式可获得M33丰富的碎片离子用于结构确证（图3），且基本所有MS/MS二级离子的精确质量数均在1ppm以内，可通过软件确定碎片离子的元素组成，对其碎裂途径进行合理归属，用于该代谢物的结构确证。

结论

通过应用Q Exactive四极杆-静电场轨道阱串联高分辨质谱系统，大大提高了体内代谢物的鉴定和结构确证的效率，简化了仪器操作和数据解析的流程。通过精准的一级高分辨全扫描、数据关联MS/MS扫描以及正负切换扫描，全面采集可能代谢产物的高分

参考文献

- [1] 王朝虹等. 液相色谱质谱联用测定乌头碱在大鼠体内代谢物. 中国法医学杂志. 2006, 21(2): 88-90
- [2] 张宏桂等. 兔血液中乌头碱代谢物的研究. 吉林大学学报. 2006, 44(2): 284-286

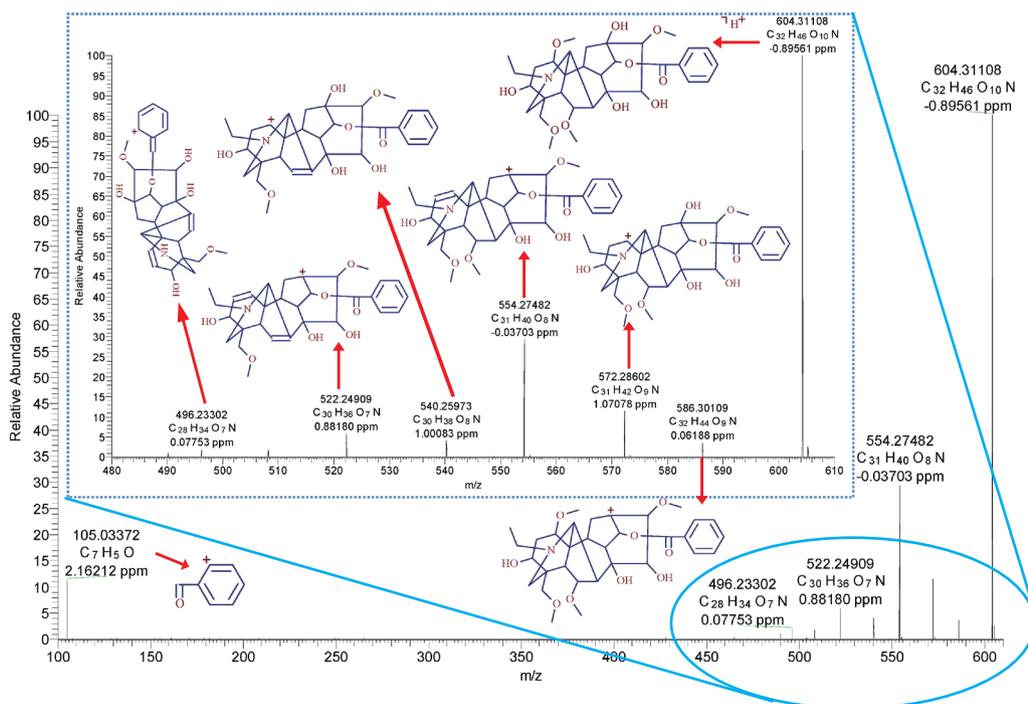


图3: 脱乙酰基代谢产物M33的二级高分辨质谱图及质量精度和碎片结构

赛默飞世尔科技

上海
上海浦东新金桥路27号6号楼
电话: 021-6865 4588
传真: 021-6445 7830

北京
北京市东城区安定门东大街28号雍和大厦西楼七层
电话: 010-8419 3588
传真: 010-6621 0851

广州
广州东风中路410-412号时代地产中心3003-04室
电话: 020-8314 5188
传真: 020-8314 5288

服务热线
800 810 5118
400 650 5118

analyze.cn@thermofisher.com
www.thermo.com.cn

ISO REGISTERED COMPANY
9001

Thermo Fisher Scientific
San Jose, CA USA is ISO Certified.

ANCM0074 12/21