

使用高分辨 GC/Q-TOF 分析心力衰竭 患病个体的代谢特征差异

作者

Luis Valdiviez 和 Oliver Fiehn
加州大学戴维斯分校
西海岸代谢组学中心,
美国加利福尼亚州

Sofia Nieto 和
Andrew McEachran
安捷伦科技有限公司

摘要

研究心血管和其他疾病的代谢基础对于更好地了解疾病生物学以及潜在的干预方案的影响至关重要。实现这一目标的关键在于开发能够提供深入分子见解的工作流程。本应用简报介绍了一种 GC/Q-TOF 非靶向代谢组学工作流程，该工作流程使用安捷伦精确质量代谢组学个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 以及单位质量谱库进行化合物鉴定。它还采用新的谱库管理软件工具 Agilent ChemVista，将第三方谱库整合到筛查工作流程中。在本研究中，对患有心力衰竭 (HF) 的个体进行了代谢分析，以确定可能有助于设计有效治疗的病理潜在机制。总而言之，本文展示的工作流程为寻求了解疾病分子机制的研究人员提供了示例。

前言

心力衰竭 (HF) 是一种严重影响生活质量和寿命的临床疾病,也是影响世界各地 2300 万人的主要全球公共卫生问题^[1]。大约一半的 HF 病例表现出左心室射血分数 (HFrEF) 下降,另一半则表现出射血分数保留 (HFpEF)^[2]。两种病理具有相似的发病率和死亡率,然而,尚无针对 HFpEF 的有效治疗方法^[2]。进一步了解 HF 个体相对于健康受试者的代谢特征可以为潜在疗法的开发带来启发。因此,为促进未来开发出成功的 HF 疗法,在健康受试者以及患有 HfrEF 和 HfpEF 的个体中进行了血浆代谢分析研究。

使用 GC/MS 进行代谢分析的独特优势之一是由于 GC/MS 谱库包含大量高重现性电子轰击电离 (EI) 谱图,因此有可能实现快速、高效的化合物鉴定^[3-6]。为帮助进一步加快化合物鉴定并提高其可靠性,通常需要以下 EI 谱库特征:大量谱图,以帮助鉴定众多化合物;存在保留指数 (RI),以提高通用性;并且,就高分辨仪器而言,需要精确质谱图以有效降低假阳性率。

因此,本研究使用多种 GC/MS EI 谱库,以尽可能提高化合物鉴定的可能性。其中包括精确质量代谢组学 PCDL、NIST23 以及使用 ChemVista 软件导出到 PCDL 中的来自 MassBank of North America (MassBank.us)^[7] 的谱图。

本应用简报中使用的精确质量代谢组学 PCDL 包含衍生化合物 (包括生物基质中常见的代谢物和外源性物质) 的 900 多幅优化谱图^[8]。还包括标准 Fiehn 代谢组学方法的 RT 以及基于脂肪酸甲酯 (FAME) 和烷烃两者的 RI^[6]。将精确质量代谢组学 PCDL 整合到该工作流程中,通过多个确认点提供了高度准确的化合物标注。

本研究证明,用于代谢组学的精确质量和单位质量谱库的组合、MassBank.us 和 NIST23 与 SureMass 精确质量解卷积相结合,对于代谢物鉴定至关重要。在各样品组中鉴定出大量代谢物,能够观察到 HF 与健康个体之间的统计学差异。总之,该工作流程及其结果有助于理解 HF 的代谢特征。

实验部分

样品前处理

采集 HFrEF 和 HFpEF 组受试者以及健康个体的血浆 (每组 10 份样品)。使用 1 mL 乙腈:异丙醇:水 (3:3:2) 提取 30 μ L 各血浆样品,并将 450 μ L 提取物干燥,通过 O-甲基化进行衍生,然后用 MSTFA + 1% TMCS 进行三甲基硅烷化,如其他文献所述^[9]。

数据采集和数据处理

利用精确质量高分辨 Agilent 7250 GC/Q-TOF 系统采集数据。如其他文献所述,将 GC 方法的保留时间锁定至 d_{27} 肉豆蔻酸^[10]。在 70 eV 以及低能量 EI 和化学电离 (CI) 模式下采集数据。将 MS/MS 进一步用于目标未知化合物的结构解析。数据采集方法的更多详细信息如表 1 所示。

表 1. 数据采集参数

电离模式	EI	CI
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF	
GC	Agilent 8890 GC	
色谱柱	Agilent DB-5ms 超高惰性柱, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m, 配备 DuraGuard, 10 m	
进样口	分流/不分流进样口, 4 mm 安捷伦超高惰性进样口衬管, 单细径锥	
进样量	0.2 μ L	0.5 μ L
进样模式	不分流	
进样口温度	280 $^{\circ}$ C	
柱温箱升温程序	50 $^{\circ}$ C (保持 0.5 min); 以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 325 $^{\circ}$ C, 保持 10 min	
载气	氦气	
色谱柱流速	1 mL/min, 恒流模式	
传输线温度	290 $^{\circ}$ C	
四极杆温度	150 $^{\circ}$ C	
离子源温度	200 $^{\circ}$ C	280 $^{\circ}$ C
电子能量	70 eV (标准 EI), 以及 15、12 和 10 eV (低能量 EI)	60 eV
发射电流	5 μ A (标准 EI), 0.4-0.8 μ A (低能量 EI)	30 μ A
谱图采集速率	5 Hz	
质量数范围	m/z 50-1200	

采用 Agilent MassHunter 未知物分析软件 11.1 进行 Agilent SureMass 解卷积和谱库搜索。使用 ChemVista 1.0 从第三方数据库 (本例中为 MassBank of North America (massbank.us)) 中导出 GC/MS 谱图。利用精确质量代谢组学 PCDL、单位质量 Fiehn 代谢组学谱库、NIST23 以及 MassBank.us 进行初始化合物鉴定。将所有谱库中的烷烃和 FAME 保留指数用于确认化

合物 ID。采用 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 15.1 进行统计分析。使用 Agilent MassHunter 分子结构关联 (MSC) 8.2 软件将碎片离子映射至其拟定的结构, 进行结构解析。

结果与讨论

使用 ChemVista 将第三方谱库纳入代谢组学工作流程中

ChemVista 是一款独立的软件应用程序, 可将第三方谱库纳入工作流程中, 来补充代谢组学研究中产生的化合物鉴定结果。ChemVista 能够管理谱图、RT/RI 信息以及其他化合物元数据, 并支持包括 SDF 和 PCDL 在内的多种数据格式^[1]。它还可用于创建 PCDL 的过程, 以添加化合物结构和标识符。

为了在本研究中使用第三方谱库谱图, 从 MassBank.us 网页下载 SDF 格式的所有 GC/MS 谱图数据 (包含超过 18000 幅谱图), 并导入 ChemVista 中 (图 1A)。然后对导入的内容进行筛选, 以仅纳入 EI 谱图, 并以 PCDL 格式导出, 以便在下游工作流程中进一步使用。新创建的 MassBank.us PCDL 包括 9000 多种 EI GC/MS 化合物及其谱图 (图 1B)。请注意, ChemVista 输出中的一个代谢物条目可以包含多幅谱图, 包括使用不同 GC/MS 分析仪获得的谱图, 这使分析人员能够灵活选择用于采集数据的仪器。图 1C 显示了图 1B 中所示的相同化合物在 GC/Q-TOF 精确质量代谢组学 PCDL 中的谱图用于比较。

A

The image shows two screenshots of the ChemVista software interface. The left screenshot displays the 'Import Files' dialog box. It has a 'Source type' dropdown set to 'SDF (*.sdf)' and 'Open file(s)' with '1 files selected'. The 'List name' is 'MoNA GCMS Spectra' and the 'Description' is 'All GCMS spectra exported from MoNA (MassBank of North America)'. There is an 'Import selected files' button at the bottom right. The right screenshot shows the 'ChemVista Library Manager' window. It displays a table titled 'List: MoNA GCMS Spectra' with columns for 'Substance Name', 'Formula', 'CAS', 'Mass', 'Molecular Weight', 'Agilent ID', and 'Spectra Count'. The table lists various chemical compounds such as 'p-CHLOROPHENOL', 'p-CHLOROPHENOL', 'p-CHLOROPHENOL', etc. To the right of the table, there is a chemical structure diagram for 'PCB 101' and its corresponding data fields like 'CAS', 'Formula', 'MolWt', 'SMILES', and 'Spectra'.

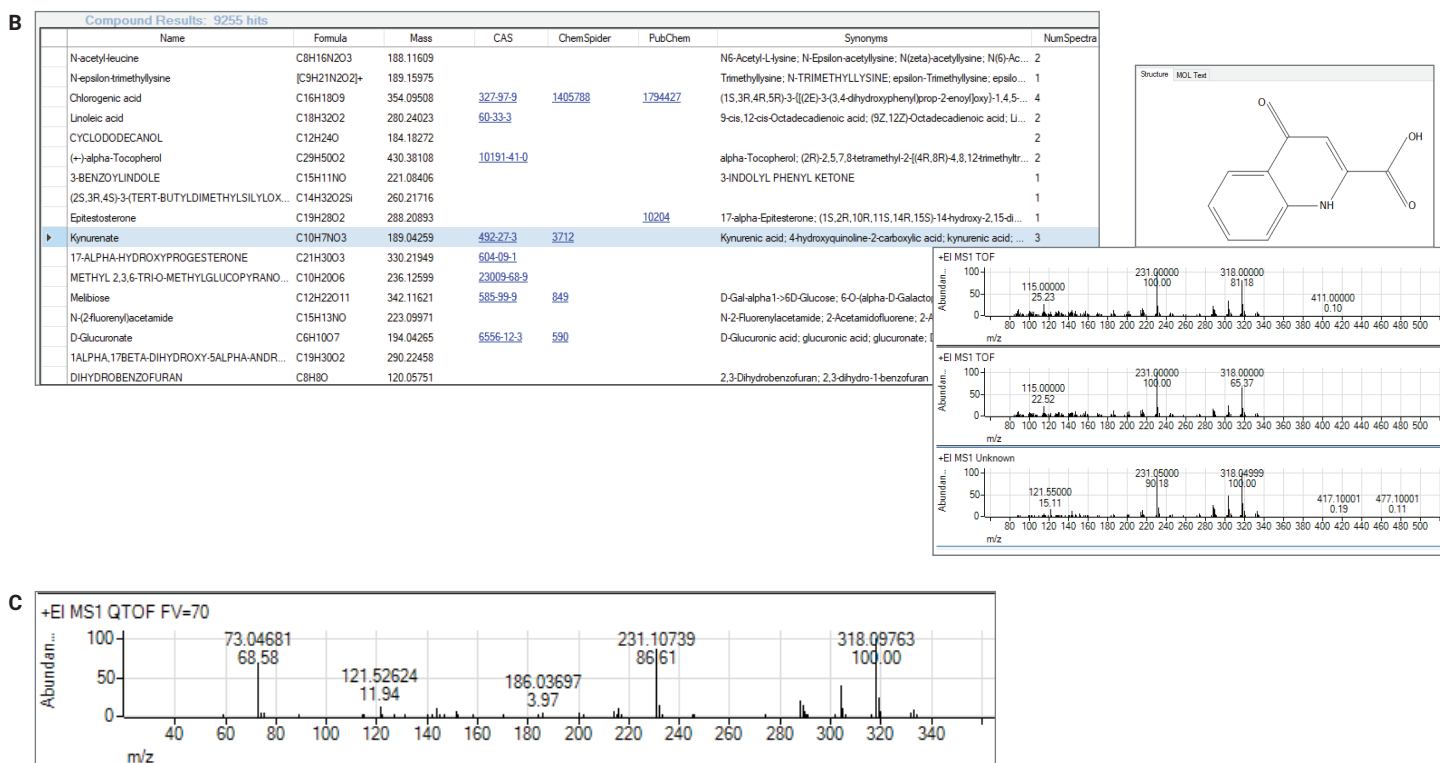


图 1. 将第三方谱库添加至代谢组学工作流程中。(A) 从 MassBank.us 提取 GC/MS EI 谱图和元数据。(B) Agilent ChemVista 输出包含 EI 谱图的 MassBank.us。(C) 来自安捷伦精确质量代谢组学 PCDL 中的相同化合物 (犬尿酸 2TMS) 的 GC/Q-TOF 谱图

使用精确质量和单位质量谱库的组合进行代谢分析

为鉴定参与 HF 病理生理学的代谢物，使用 7250 GC/Q-TOF 对 HF 受试者和健康个体进行非靶向代谢血浆分析。使用基于分析数据的 SureMass 算法进行色谱解卷积，并专门针对复杂的高分辨精确质量 EI 数据进行优化，以提供高灵敏度并增加解卷积质谱图的动态范围和质量数准确度。

在相同的未知分析方法中同时使用所有谱库，其中谱库搜索参数可以针对每个谱库单独选择，确保获得理想的结果。

在搜索 NIST 等单位质量谱库时，基于所采集数据的精确质量和谱库匹配结果的分子式，未知物分析软件中的 ExactMass 工具有助于显著减少假阳性结果的数量。该工具将匹配结果分

子式的分子式子集归属为解卷积质谱图的离子，并计算碎片离子的质量误差。图 2 显示了两个示例，其中 NIST 匹配结果之一，即谱库匹配得分为 91.8 的 2,3,4-三羟基丁酸 4TMS，归属到分子式子集的所有碎片离子均表现出低质量误差 (图 2A)，由此使用精确质量信息确认了 ID。然而，另一个匹配结果甲基丙烯酰胺的谱库匹配得分为 89.1，在 10 ppm 质量误差范围内不存在任何与分子式匹配的离子 (图 2B)，表明该谱库匹配结果为假阳性结果，从而突出了利用精确质量 GC/MS 优化谱图匹配结果的优势。请注意，GC/Q-TOF 谱图提供了与 NIST 和基于 GC 单四极杆谱图的其他谱库的出色谱库匹配结果，这些谱图未呈现出其他精确质量分析仪裂解过度的特征。

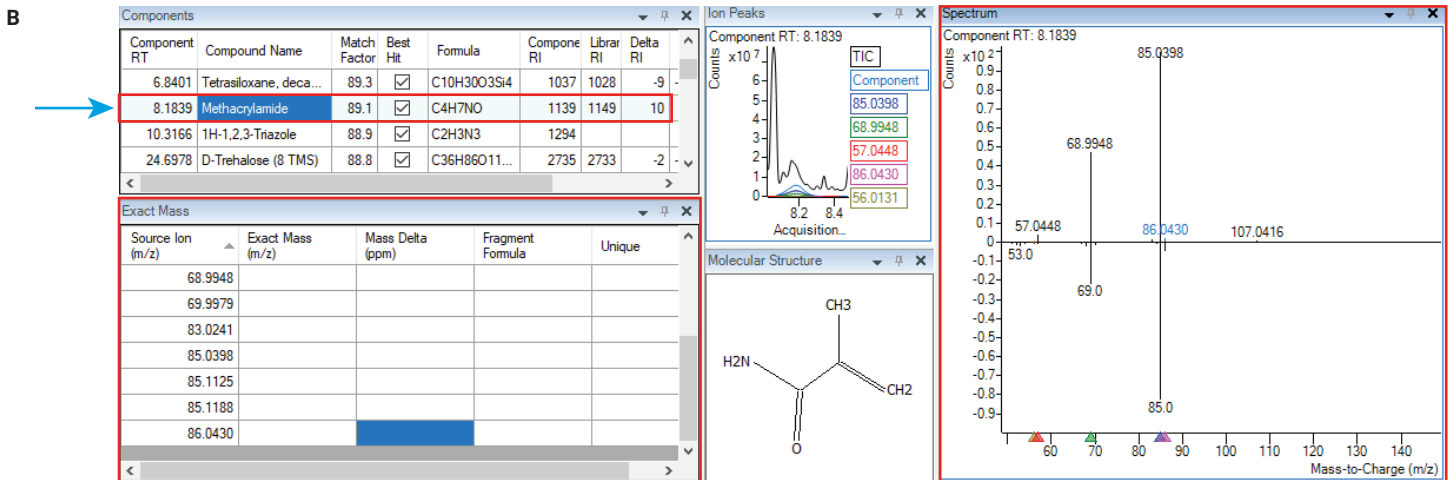
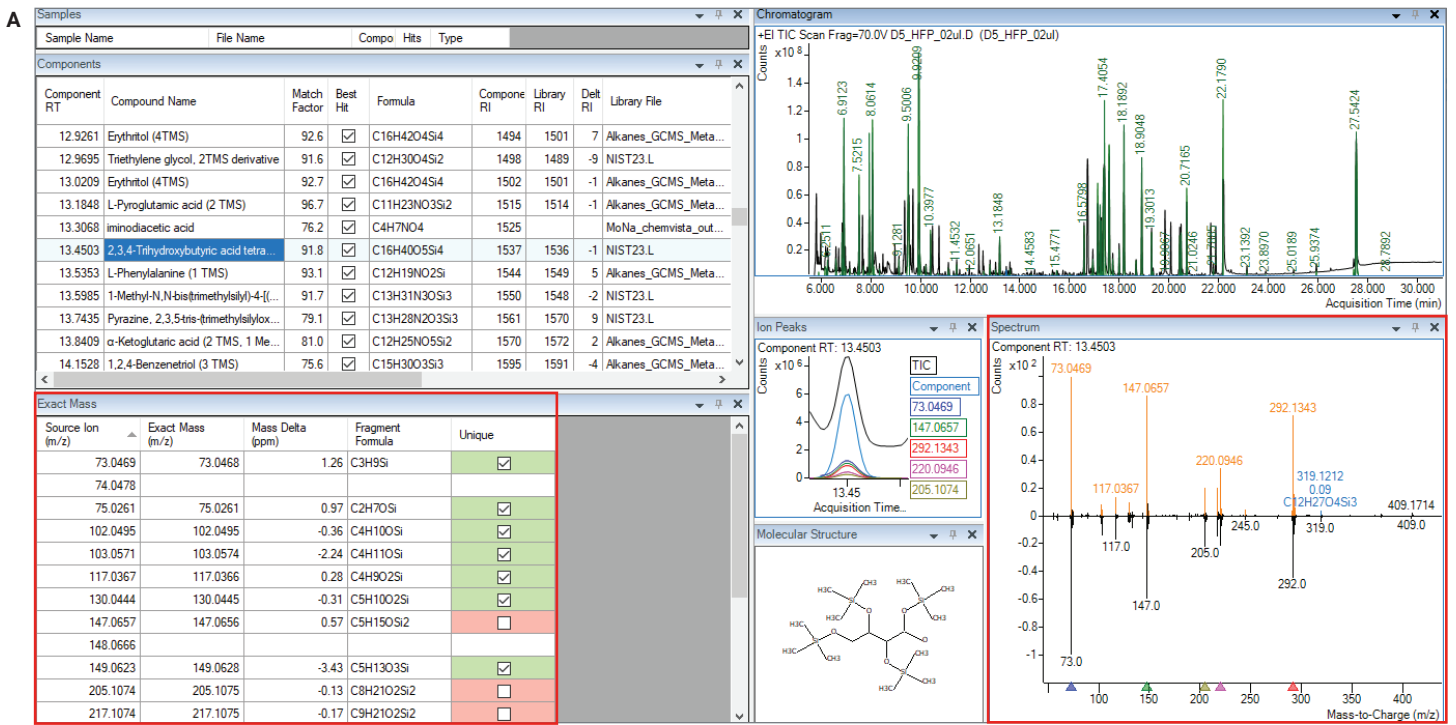


图 2. 使用 Agilent MassHunter 未知物分析软件的 ExactMass 功能，根据精确质量数确认单位质量谱库匹配结果。(A) 解卷积化合物的精确质谱图与 NIST 谱库匹配分子式匹配。在 10 ppm 内与分子式匹配的各离子的质量误差如 ExactMass 表所示，并在镜象图中突出显示了化合物离子。(B) 箭头指向假阳性结果，该结果可基于空 ExactMass 表轻松识别

在扣除空白并用 ExactMass（用于 NIST）或内置于未知物分析软件中的精确质量数允许误差函数（用于精确质量 PCDL）消除假阳性结果后，NIST23 和代谢组学 PCDL 在每个样品中均产生了 100 多个匹配结果。当使用 MassBank.us 搜索数据时，每个样品的平均匹配结果数量略低于 100（表 2）。NIST 和代谢组学 PCDL 使用的谱库匹配得分临界值均为 70，MassBank.us 使用的谱库匹配得分临界值则为 75。后者使用更高的谱库匹配得分的原因在于，MassBank.us 中的大多数化合物不包含保留指数，它们的分子式往往不反映生化，更难过滤掉假阳性结果。

表 2. 扣除空白并消除假阳性结果后，分别通过各个谱库检出的匹配结果数量。最后两列指示用 NIST 或代谢组学 PCDL 鉴定出的非重叠匹配结果

样品	谱库				
	NIST23	PCDL	MoNA	NIST 唯一	PCDL 唯一
C1	140	130	95	52	43
C4	124	117	88	46	42
C5	126	115	85	46	37
D5	128	125	74	47	43
D6	138	126	92	55	42
D8	130	118	95	47	35

使用 NIST 或 PCDL 鉴定出很大一部分独有的化合物（表 2），充分展示了在代谢组学研究中多个谱库的优势，并凸显了类似 ChemVista 的软件在整合多种来源谱图方面的优势。

比较健康受试者和心力衰竭个体血浆代谢物的差异分析

采用 MPP 软件进行统计分析，其中对 HF 受试者与健康对照之间的差异进行了评估。为比较 HF 受试者与健康个体的代谢特征，将呈现两种 HF 病理的受试者样品归为一组，形成与对照（健康个体）的不同集群，如主成分分析 (PCA) 图所示（图 3）。

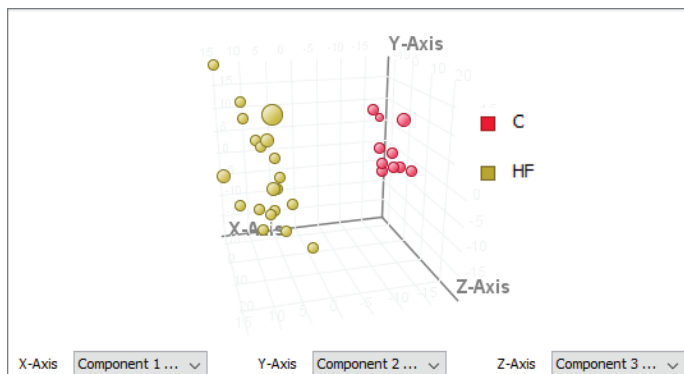


图 3. PCA 图，显示 HF (HF) 与健康个体 (C) 的血浆样品簇之间明显分离

使用火山图上显示的倍数变化分析时，HF 受试者与健康个体的代谢特征之间存在显著差异（图 4）。

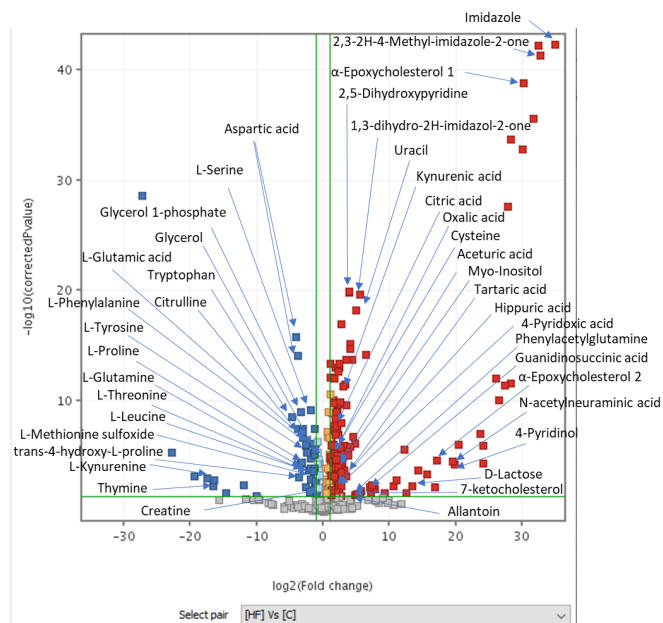


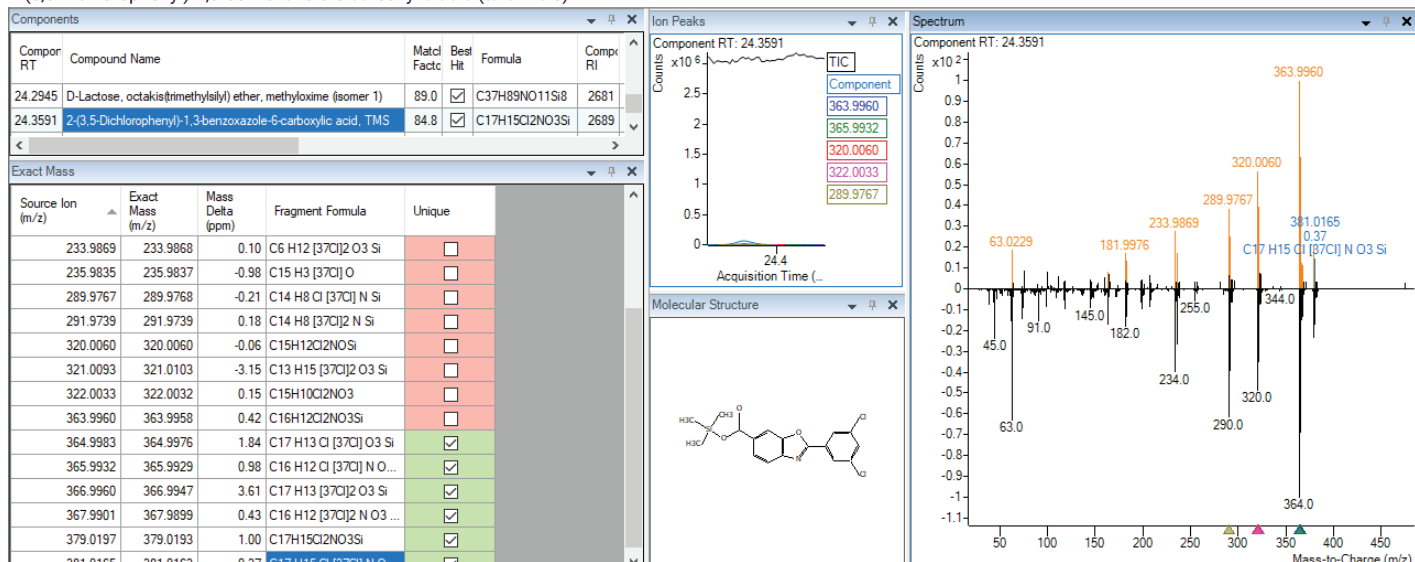
图 4. 火山图，示出 HF 受试者与健康个体的倍数变化对数（临界值 2）与 p 值对数（临界值 0.05）的关系

值得注意的是，在对照样品中以较高浓度鉴定出的代谢物主要为蛋白氨基酸，而在 HF 受试者血浆中以较高浓度鉴定出的代谢物为有机酸、固醇类和含氮化合物，其中一些可能是咪唑类药物的代谢物。

在一些 HF 受试者的血浆中鉴定出一些额外的外源性物质，但在其他受试者中则未鉴定出这些物质。图 5 显示了两个此类示例，其中在个体 D5 的血浆中鉴定出抗心肌病药物氯苯唑酸 (图 5A)，并在 D6 受试者的血浆中检测到 2-(4-氯苯氧基)乙酸 (除草剂) (图 5B)。

这些示例展示了使用 GC/Q-TOF 系统结合先进的精确质量软件工具和多个谱库进行非靶向分析的优势，该方法能够扩大研究范围，并能高效、可靠地鉴定潜在的目标化合物。

A 2-(3,5-Dichlorophenyl)-1,3-benzoxazole-6-carboxylic acid (tafamidis)



B 2-(4-Chlorophenoxy)acetic acid

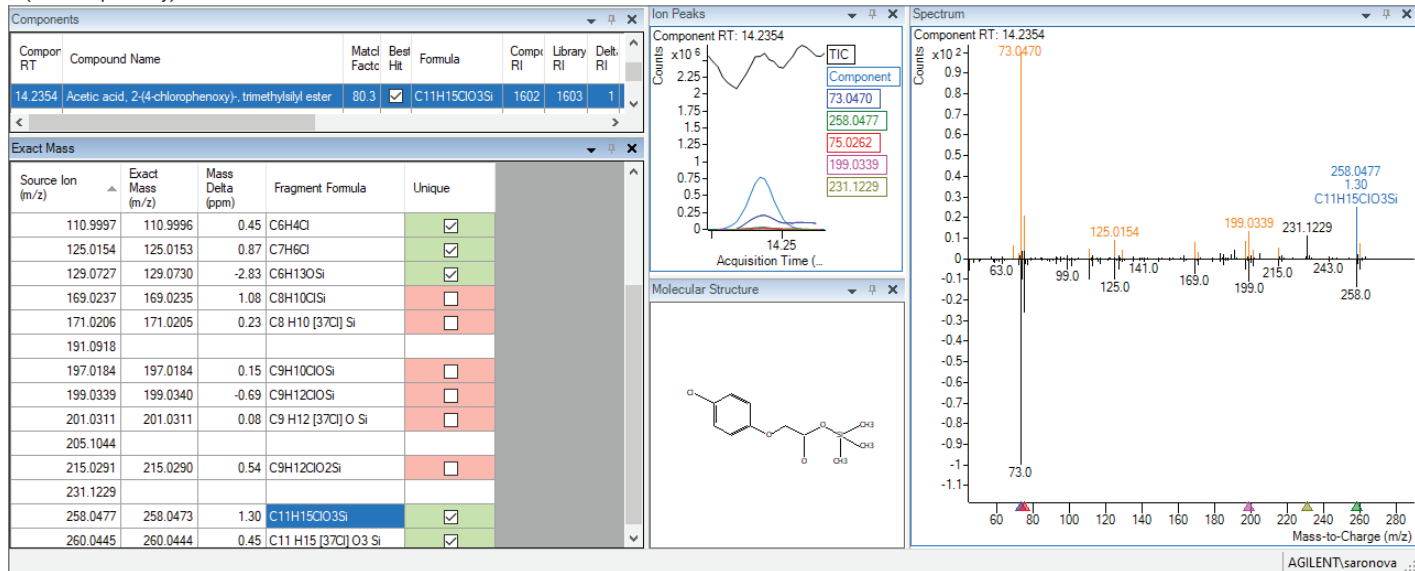


图 5. 在一些患有 HF 的个体中鉴定出的外源性物质示例。(A) 2-(3,5-二氯苯基)-1,3-苯并噁唑-6-甲酸 (氯苯唑酸)。(B) 2-(4-氯苯氧基)乙酸

未知代谢物的鉴定

尽管在鉴定工作流程中使用多个谱库，但 HF 组与健康对照组之间以不同水平存在的少数化合物均为未知物。因此，采用多种工具和技术对这些化合物进行结构解析。作为结构解析的第一步，使用低电子能量鉴定 HF 患者血浆中高于健康对照者水平的未知代谢物中的其中一种分子离子。该代谢物的 70 eV

谱图以及在 15、12 和 10 eV 下获得的相同化合物的低能量谱图如图 6 所示。观察到谱图中 m/z 较高的离子之一 (344) 的相对丰度逐渐增加，在 70 与 10 eV 之间从 19% 左右增加至 100%。相对丰度的这一变化可能反映出 m/z 344 的离子为分子离子。

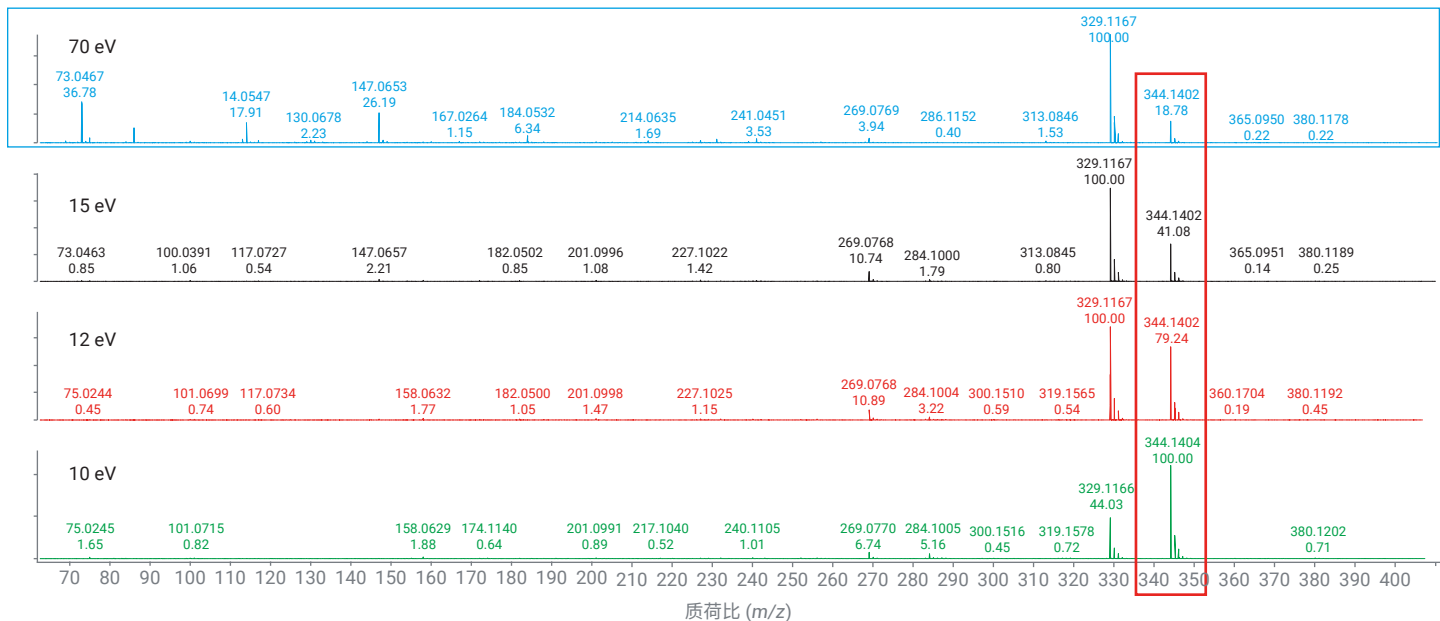


图 6. 使用低电子能量鉴定分子离子

与低能量数据一致，使用甲烷作为试剂气体的正离子 CI 根据 $[M+H]^+$ 和 $[M+C_2H_5]^+$ 加合物的存在进一步确认了未知物的分子离子（图 7）。

确认未知物的分子离子后，利用 MSC 软件进行结构解析。该方法基于 EI MS/MS 数据，使用候选分子离子作为前体，精确质量 MS/MS 碎裂模式与谱库数据库（如分子结构来源

ChemSpider）匹配（图 8）。在复杂基质（如血浆）中，与全谱图采集 EI 数据相比，MS/MS 谱图在未知物的结构解析中具有优势，因为无法通过色谱完全分离的其他谱图中的噪音明显更低，从而促进了未知物的鉴定过程。

基于 MSC 得分和参考文献数量，排名靠前的结构之一是嘧啶-2,4,6-三醇的 TMS 衍生形式。

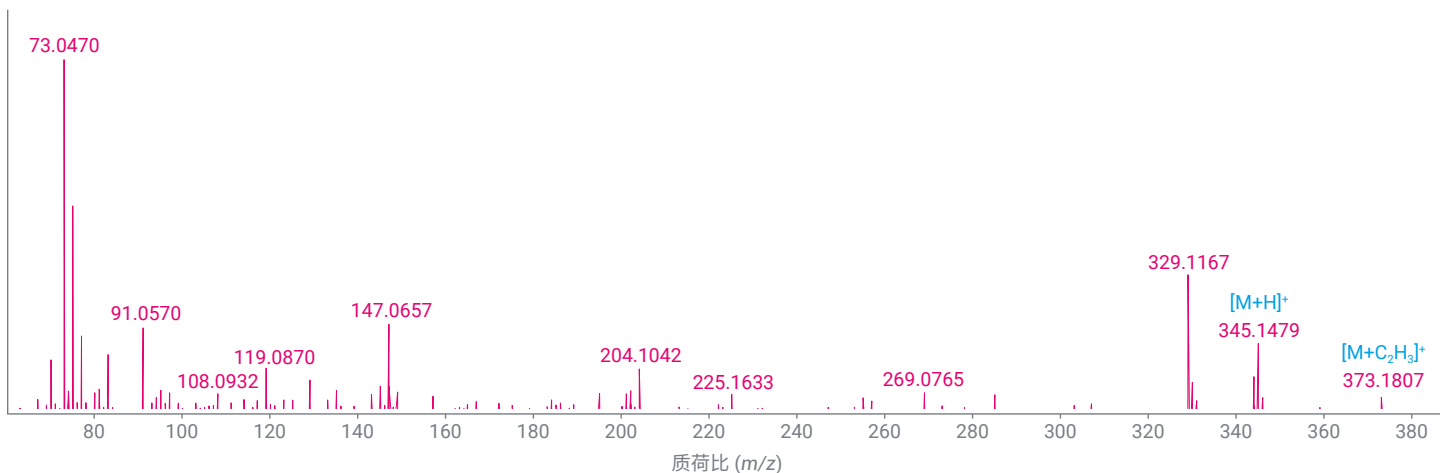
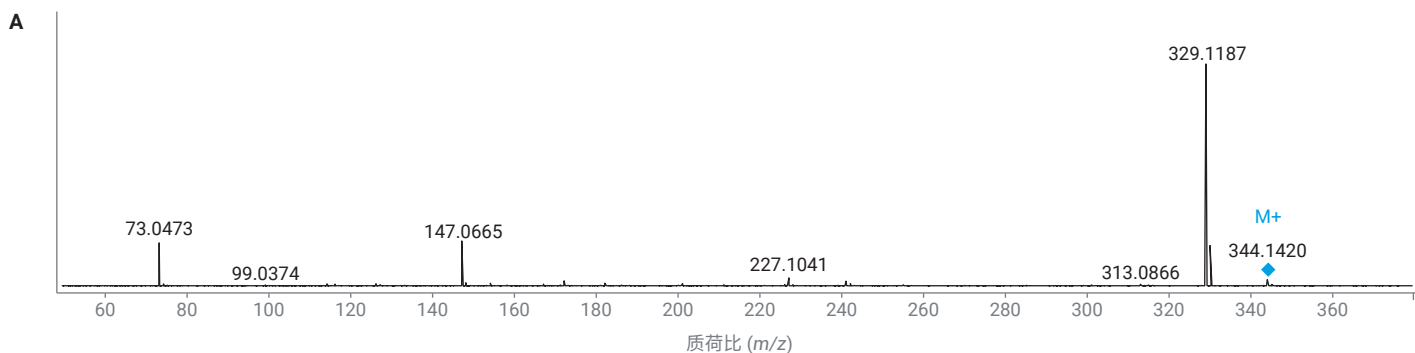


图 7. 未知代谢物的正离子 CI 谱图确认了在低能量实验中鉴定出的分子离子



B

48 structures found for rt=14.408:ce20

Sort by # Reference: Show structures for C13H28N2O3Si3

Structure #1 -- elucidated: 75.0% ions, 98.2% Weight Display Filter

	Mass	Intensity	Weight(%)	No. of candid.	Best score
▶ 1	329.1187	50455.72	78.7	2	90.7
2	147.0665	10204.34	3.2	4	42.2
3	73.0473	9762.28	0.7	1	98.6
4	330.1197	9215.45	14.5	2	55.4
5	227.1041	1790.00	1.3	0	0.0
6	172.0981	1129.09	0.5	0	0.0
7	241.0467	1073.97	0.9	2	95.0
8	148.0672	707.77	0.2	1	66.9

Penalty=1.0 dM=-5.9ppm F.D.S.=91.0 1 Of 9 Penalty=9.5 dM=-5.9ppm F.D.S.=91.0 1

C12H26N2O3Si3-H Score=90.7 C12H30N2O3Si3-5H Score=65.1

C13H28N2O3Si3; 461809

Scores MFG=90.6 MSC-

ChemSpider:

C13H28N2O3Si3; 481642

Scores MFG=90.6 MSC-

ChemSpider:

C13H28N2O3Si3; 481658

Scores MFG=90.6 MSC-

ChemSpider:

图 8. Agilent MassHunter 分子结构关联软件中基于 EI MS/MS 数据对未知杂质的结构解析。(A) 未知物的 EI MS/MS 谱图，使用初步鉴定出的分子离子作为前体。(B) 使用 ChemSpider 数据库得到的 MSC 结果，其中示出最可能的候选物之一

结论

本应用简报展示了理解 HF 的代谢特征时所受到的实际影响。本文介绍了一种使用 Agilent 7250 GC/Q-TOF 与多个谱库（包括新的安捷伦精确质量代谢组学 PCDL 以及 Agilent ChemVista 软件中管理的第三方谱库）进行代谢组学研究的方法。虽然本研究的重点是对心力衰竭 (HF) 病理学进行代谢分析，以了解这种疾病的潜在机制，但该方法可轻松应用于任何其他健康状况和疾病状态。将 40 多种代谢物（包括氨基酸、有机酸和固醇类）鉴定为 HF 与健康个体之间差异的潜在原因，因此该领域的研究人员将能够更好地了解疾病和疾病干预的代谢影响，并有望合理地设计未来的干预方案。

参考文献

1. Funk, M. Epidemiology of Heart Failure. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* **1993**, 5(4), 569–73. PMID: 8297547
2. Borlaug, B. A.; Paulus, W. J. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Eur. Heart J.* **2011**, 32(6), 670–679. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq426
3. Beale, D. J.; Pinu, F. R.; Kouremenos, K. A.; Poojary, M. M.; Narayana, V. K.; Boughton, B. A.; Kanojia, K.; Dayalan, S.; Jones, O. A. H.; Dias, D. A. Review of Recent Developments in GC-MS Approaches to Metabolomics-Based Research. *Metabolomics* **2018**, 14(11), 152. DOI: 10.1007/s11306-018-1449-2
4. Grapp, M.; Maurer, H. H.; Desel, H. Systematic Forensic Toxicological Analysis by GC-MS in Serum Using Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System. *Drug Test. Anal.* **2016**, 8(8), 816–825. DOI: 10.1002/dta.1848
5. Schauer, N.; Steinhauser, D.; Strelkov, S.; Schomburg, D.; Allison, G.; Moritz, T.; Lundgren, K.; Roessner-Tunali, U.; Forbes, M. G.; Willmitzer, L.; et al. GC-MS Libraries for the Rapid Identification of Metabolites in Complex Biological Samples. *FEBS Letters* **2005**, 579(6), 1332–1337. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.029
6. Stein, S. Mass Spectral Reference Libraries: an Ever-Expanding Resource for Chemical Identification. *Anal. Chem.* **2012**, 84(17), 7274–7282. DOI: 10.1021/ac301205z
7. Wohlgemuth, G.; Mehta, S. S.; Meija, R. F.; Neumann, S.; Pedrosa, D.; Pluskal, T.; Schymanski, E. L.; Willighagen, E. L.; Wilson, M.; Wishart, D. S.; et al. SPLASH, a Hashed Identifier for Mass Spectra. *Nat. Biotechnol.* **2016**, 34, 1099–1101. <https://massbank.us/>
8. Valdiviez, L.; Wang, S.; Sandhu, W.; Ye, H.; Fiehn, O.; Nieto, S. 全面的精确质量代谢组学谱库及其在靶向和非靶向数据分析工作流程中的评估, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5994-5832ZHCN, **2023**
9. Fiehn, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the Combination of Targeted and Untargeted Profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2016**, 114, 30.4.1–30.4.32. DOI: 10.1002/0471142727.mb3004s114
10. Agilent GC/Q-TOF PCDL User Guide (安捷伦 GC/Q-TOF PCDL 用户指南), 安捷伦科技公司用户指南, 版本号 D0030675 <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/D0030675%20GC-QTOF%20PCDL%20User%20Guide.pdf>
11. Agilent ChemVista Library Manager (Agilent ChemVista 谱库管理软件). 安捷伦科技公司技术概述, 版本号 5994-5924EN, **2023**

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA45230.6108564815

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2023
2023 年 11 月 15 日, 中国出版
5994-6858ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



Trusted Answers