
HPLC-QTOF/MS联用技术的原理、应用及代谢组学介绍

王文昭

中科院微生物研究所真菌学国重室

wangwz@im.ac.cn

提纲

- **HPLC-QTOF/MS**联用技术的原理及应用
 - 分析方法的建立与验证
 - 代谢组学的基本策略及重要应用
-

液质联用仪平台对所内外服务网页



中国科学院微生物研究所
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences



首页 概况简介 机构设置 人才队伍 研究生/博士后 院地合作 国际交流 科研装备 学术出版物 党建 文化 科学传播 信息服务

大型仪器中心

- 中心人员
- 设备情况
- 检测项目和收费标准

您现在的位置：首页 > 机构设置 > 支撑体系 > 大型仪器中心 > 设备情况

AGILENT液质联用仪

2011-05-31 | 作者： | 【大】 【中】 【小】 【打印】 【关闭】



基本信息：

型号： AGILENT 1200HPLC/6520QTOFMS

厂家： 美国，Agilent公司

现安装地点： 微生物所真菌室北楼113

状态： 良好 对外服务

使用时间： 周一至周五

操作： 由工作人员操作

申请服务方式： 预约

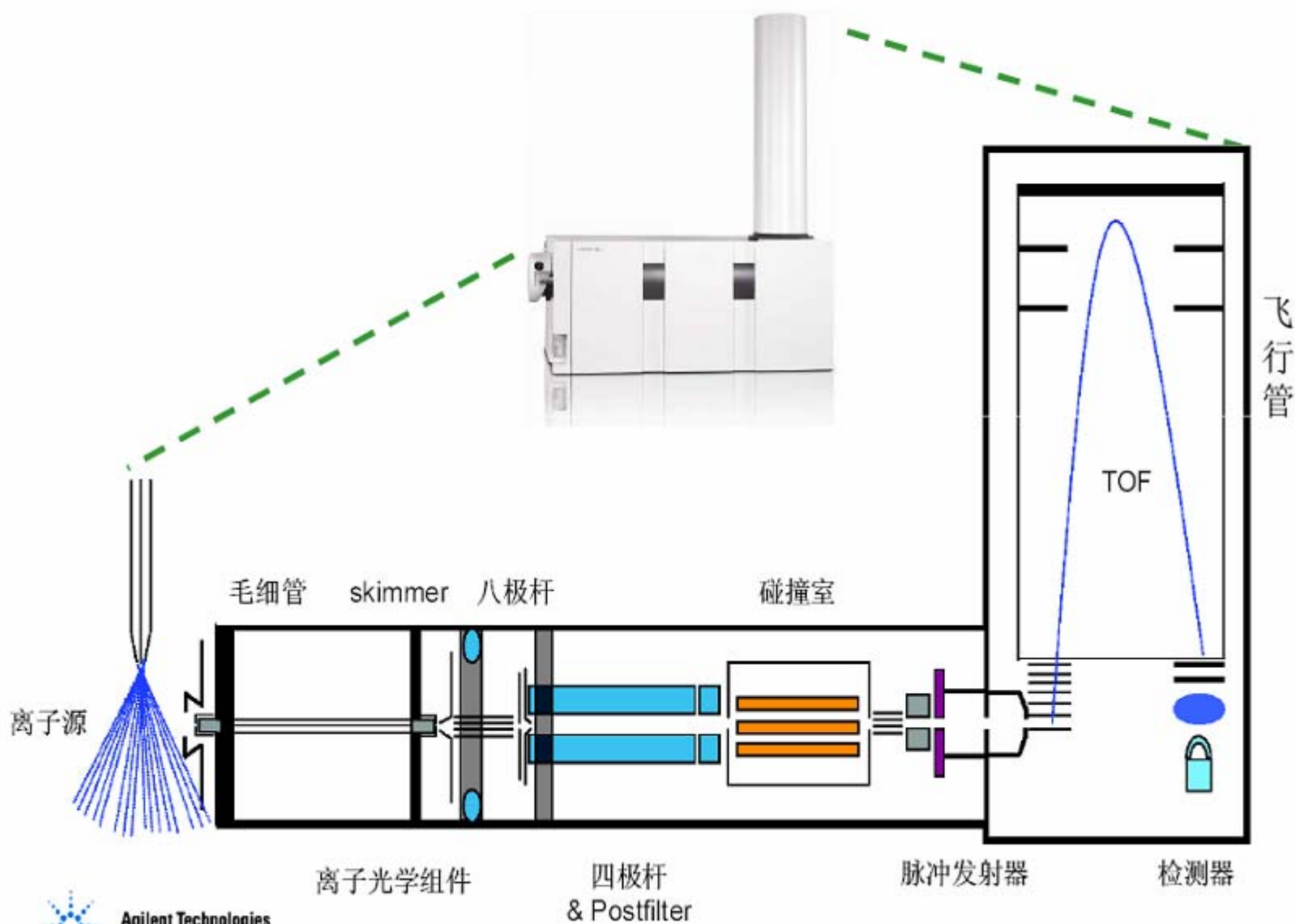
收费标准： 根据检测指标而定（见收费表）

仪器负责人： 王文昭博士

电话： 13661081561

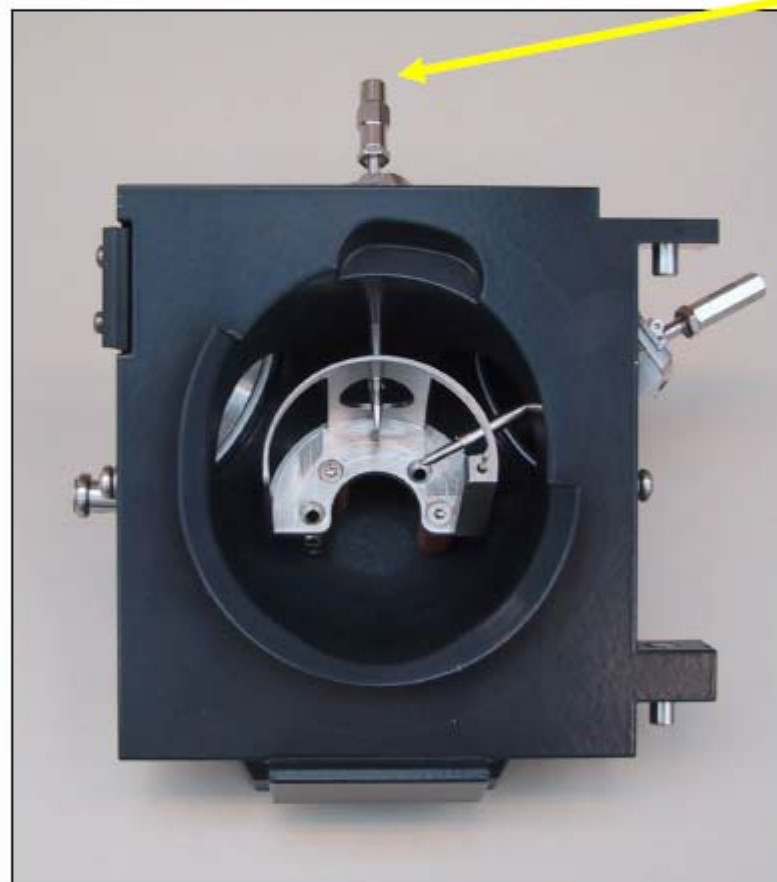
邮箱： wangwz@im.ac.cn

Agilent Q-TOF 系统框图



Agilent LC/MSD TOF

双喷口电喷雾离子源：内标物自动导入，实时校正质量轴



分析喷雾口

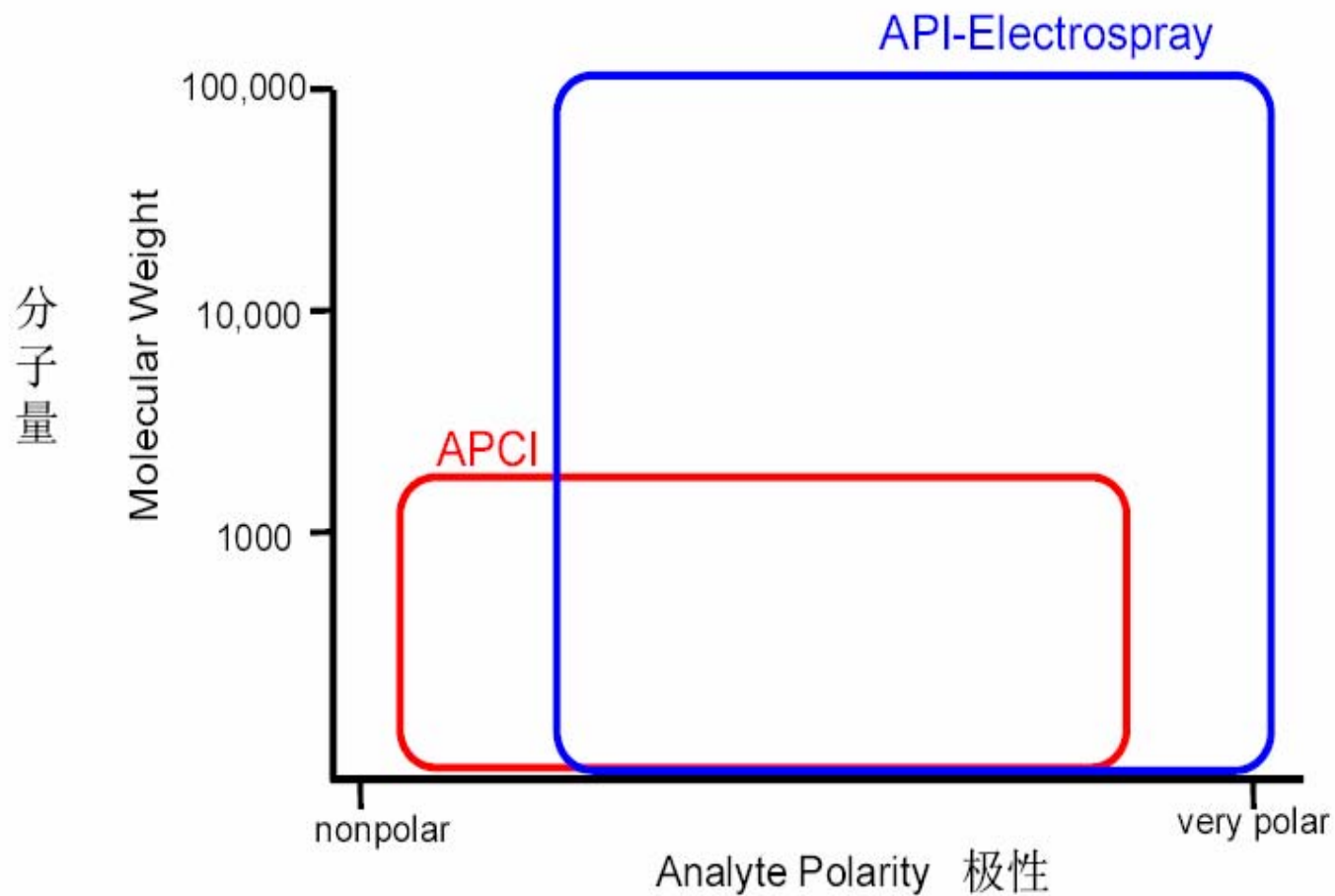
参比喷雾口

双喷雾口ESI 源和校正液输送系统 (CDS)，自动导入参比溶液

LC流速可达1mL/min

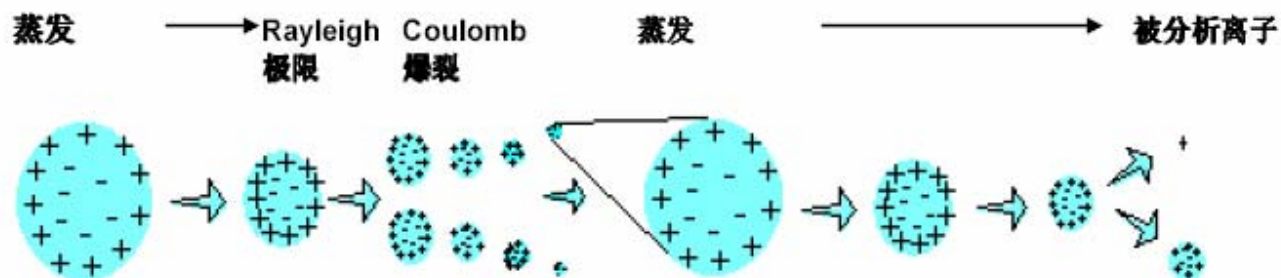
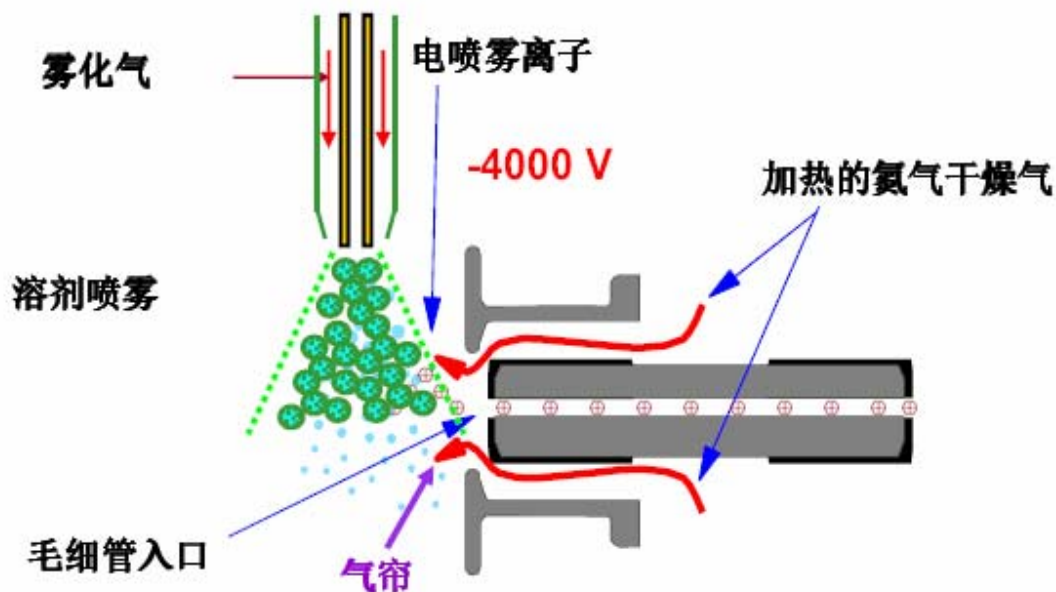


离子源的适用范围

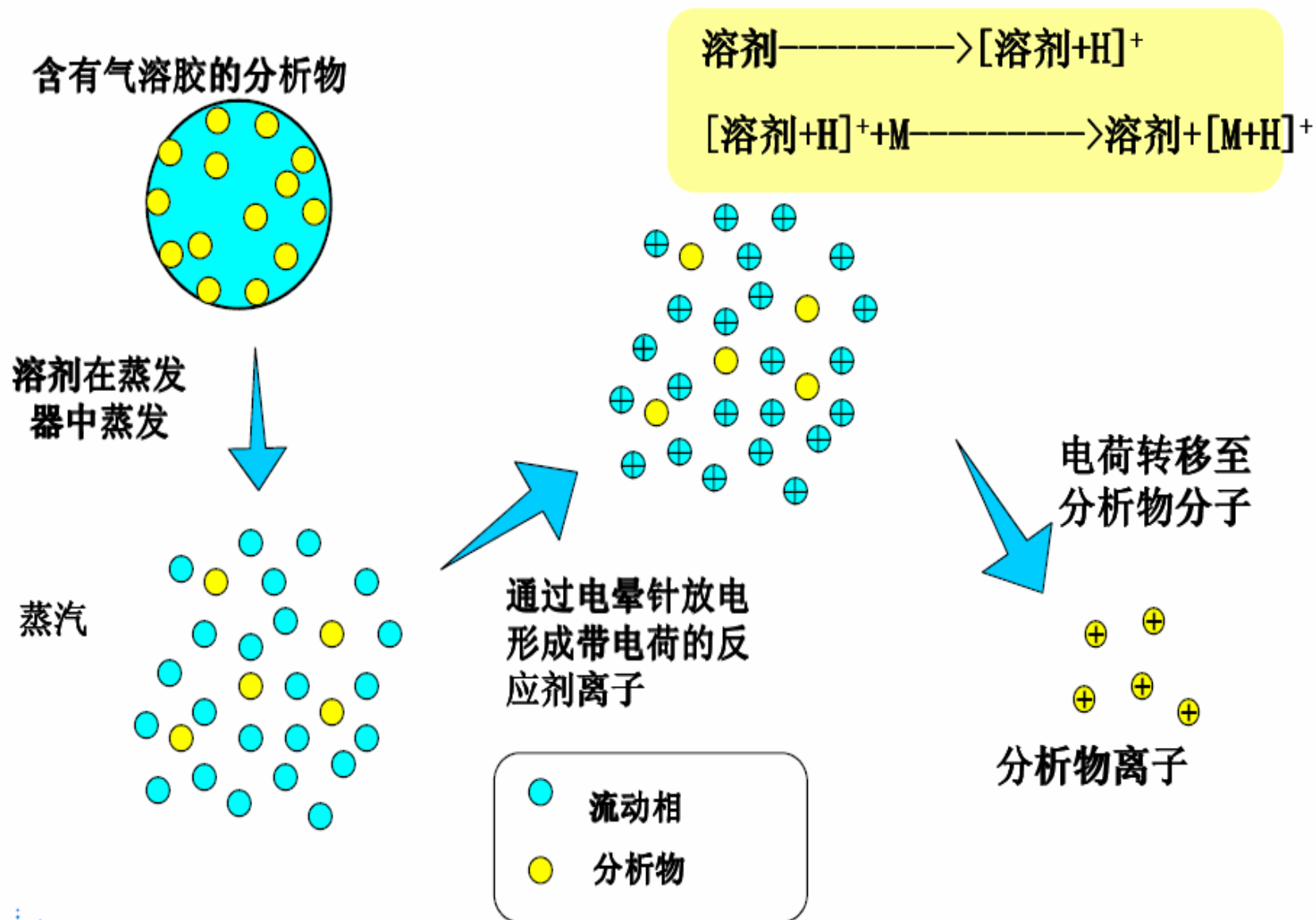


大气压电离-电喷雾电离 (API-Electrospray Ionization)

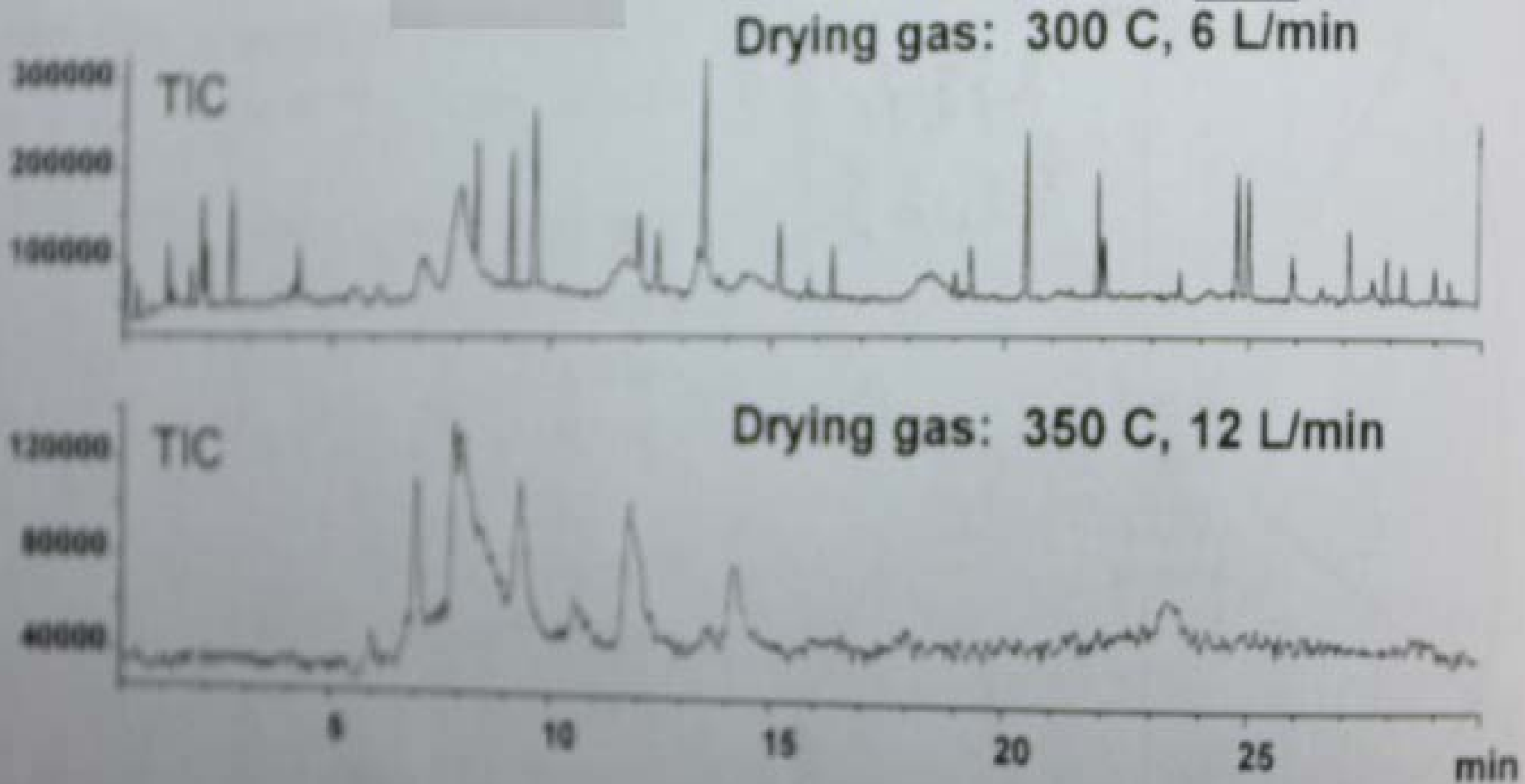
雾化器组件
(nebulizer)
是同轴套管的设计



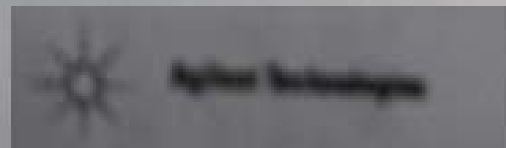
APCI 电离过程



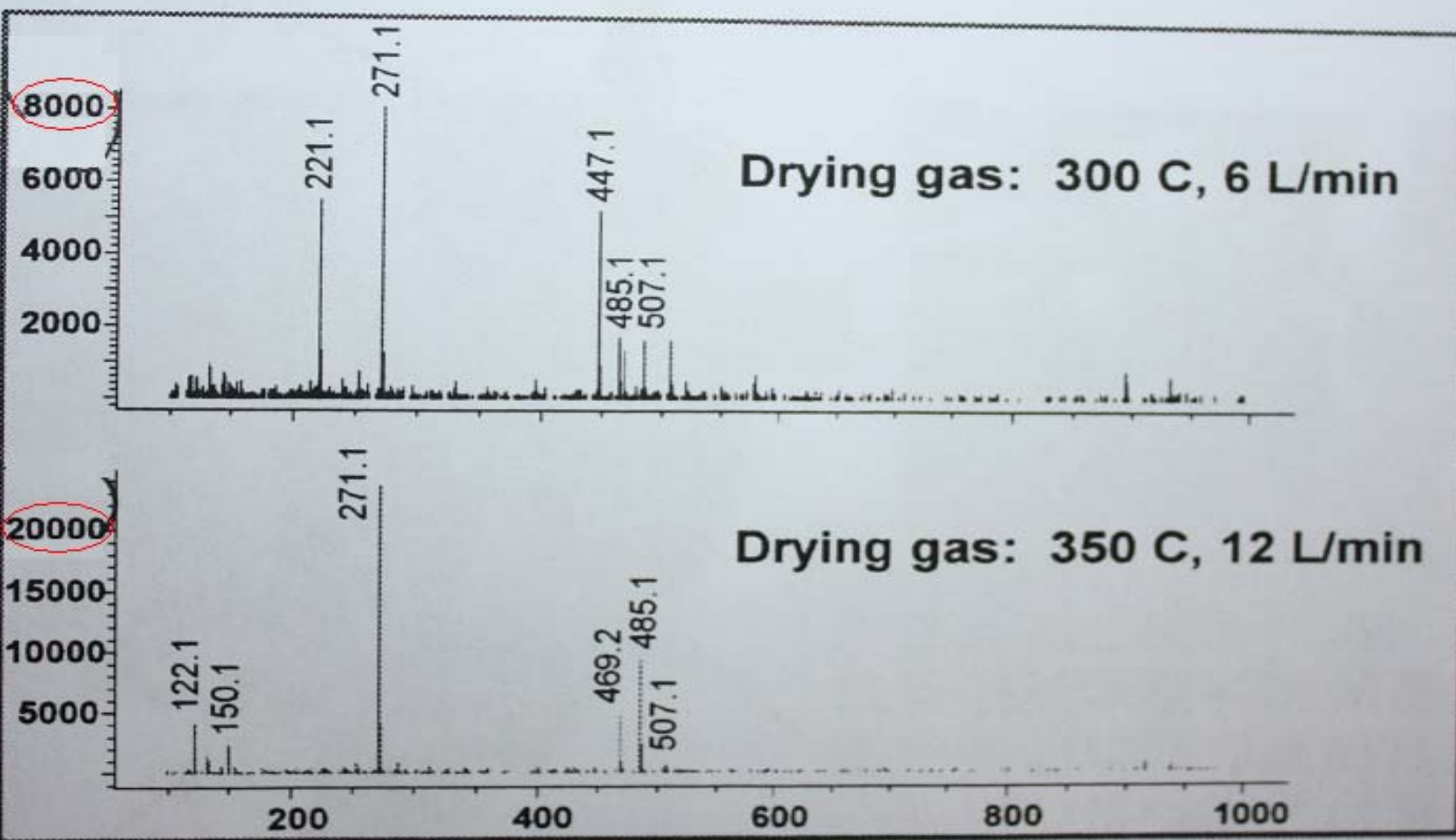
ES中干燥气设置的作用



由于液滴不完全干燥导致的尖峰

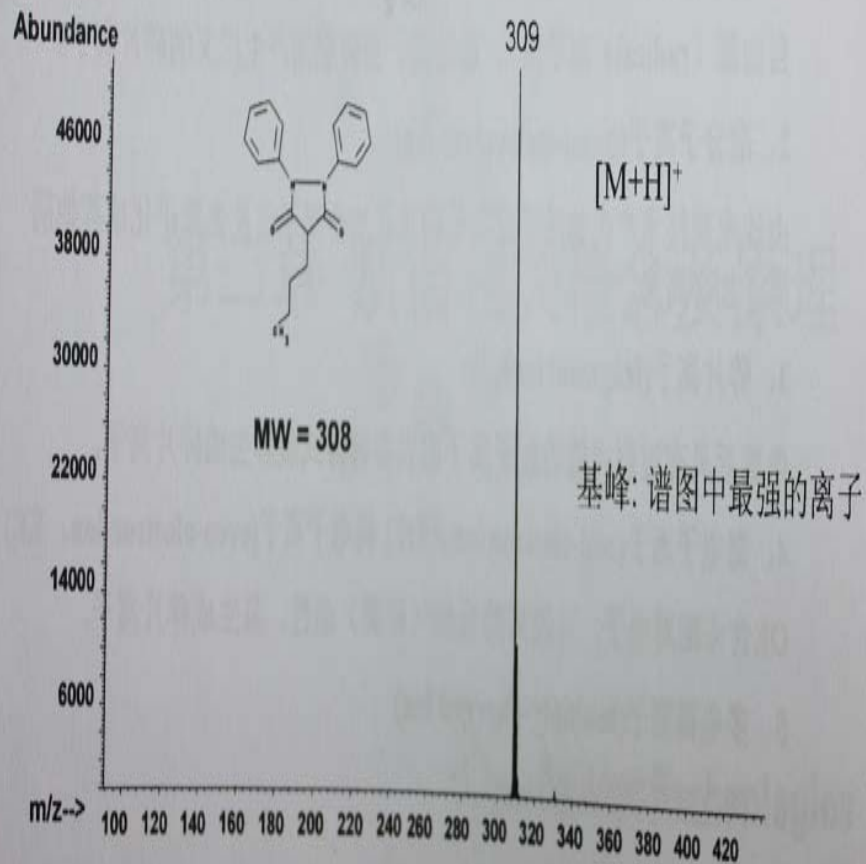


ES中干燥气设置的作用

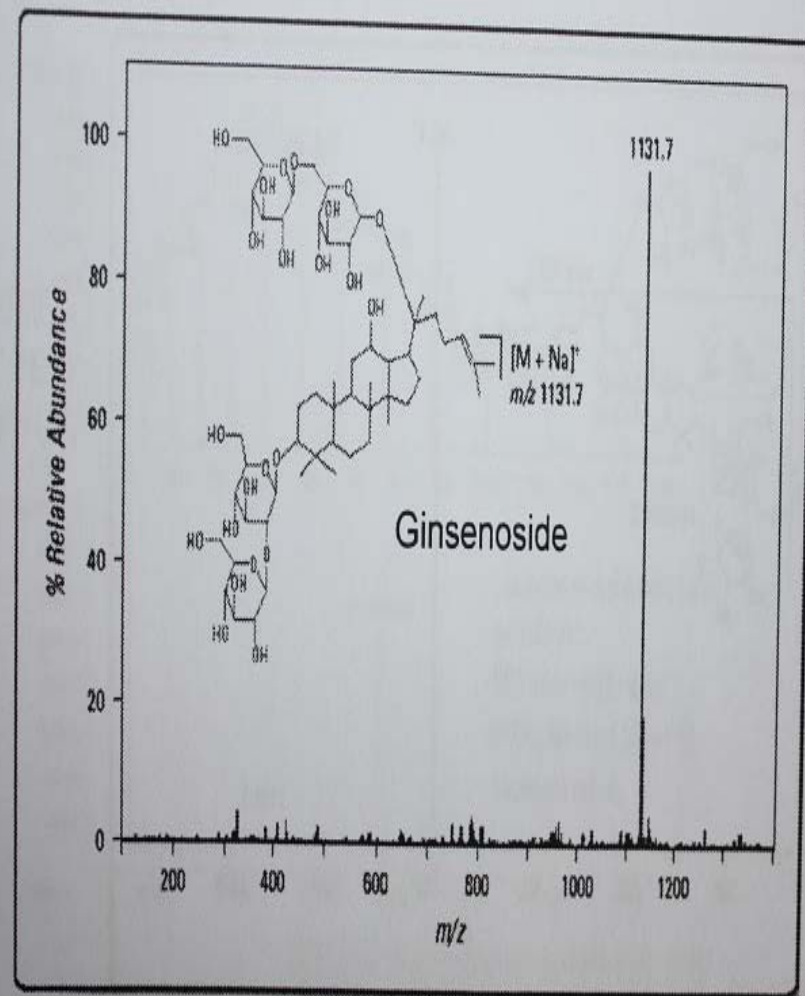


液滴使谱图的噪音更大

单电荷离子



苯基丁氮酮 (Phenylbutazone) 的API-ES 谱图



检测到的离子种类依赖于溶剂添加剂和分析所用的条件

正离子检测

- $[M+H]^+$ 酸性条件

- $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$

- $[M+NH_4]^+$ 有铵盐缓冲溶液

- $[M+X]^+$ X = 溶剂或缓冲溶液中的阳离子

- $[2M+H]^+$ 在高浓度时形成的二聚体

- $[M+H+S]^+$ 溶剂加合离子

负离子检测

- $[M-H]^-$ 碱性条件

- $[M+X]^-$ X = 溶剂或缓冲溶液中的阴离子

- $[M-H+S]^-$ 溶剂加合离子



CID质谱图解析——常见的中性丢失

Even loss

$(M+X)^+ - 18$

水

$(M+X)^+ - H_2O$

$(M+X)^+ - 20$

氟化氢

$(M+X)^+ - HF$

$(M+X)^+ - 28$

一氧化碳或乙烯

$(M+X)^+ - CO$ or $(M+X)^+ - C_2H_4$

$(M+X)^+ - 30$

甲醛

$(M+X)^+ - H_2CO$

$(M+X)^+ - 31$

甲胺

$(M+X)^+ - CH_3NH_2$

$(M+X)^+ - 32$

甲醇

$(M+X)^+ - CH_3OH$

$(M+X)^+ - 36$

氯化氢

$(M+X)^+ - HCl$

$(M+X)^+ - 44$

二氧化碳

$(M+X)^+ - CO_2$

$(M+X)^+ - 46$

二氧化氮

$(M+X)^+ - NO_2$

$(M+X)^+ - 60$

乙酸

$(M+X)^+ - CH_3CO_2H$

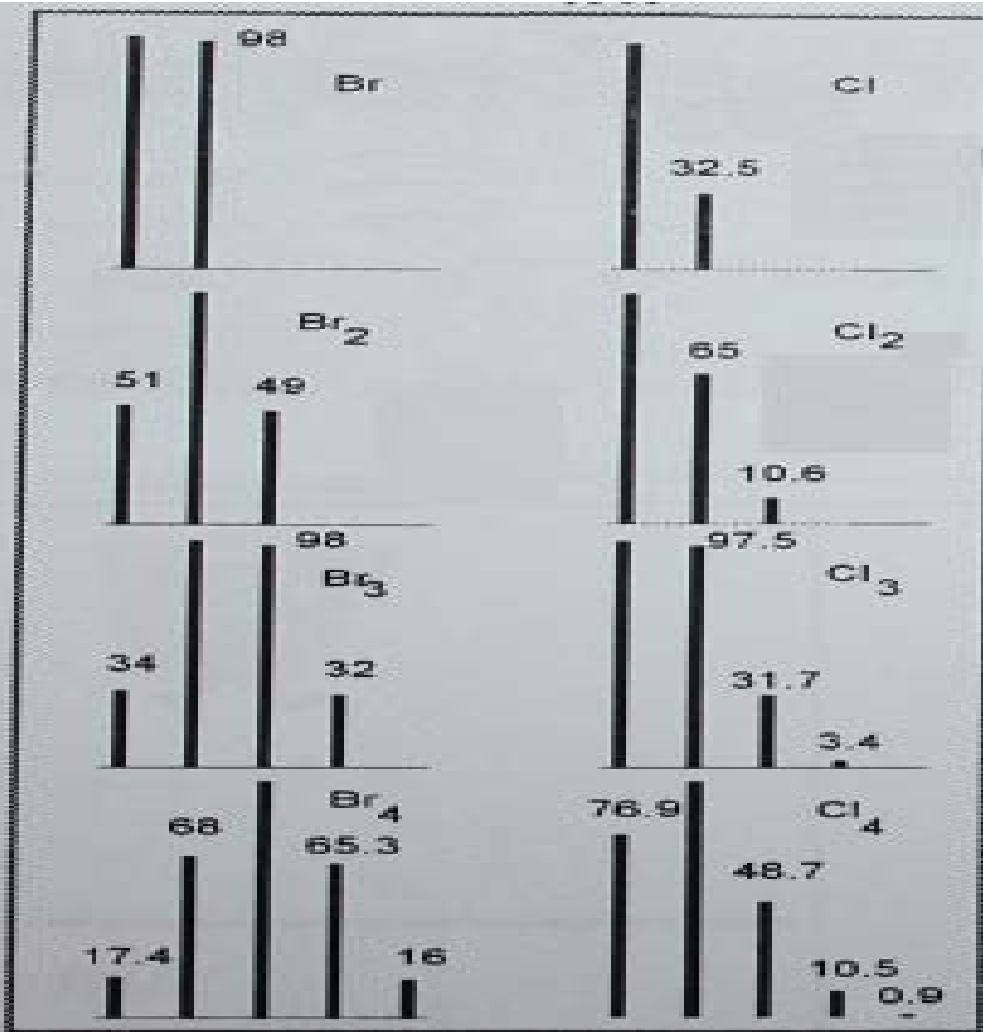
$(M+X)^+ - 90$

硅醇

$(M+X)^+ - HO-Si-(CH_3)_3$



常见的A+2同位素峰值



- 一元多项式展开式
- $Cl=3:1, (3+1)^2=9+6+1$
- $Br=1:1, (1+1)^1=1+1$

$[M+H]^+$ 离子的N规则

- 分子量为奇数 $[M+H]^+$ 为偶数的离子，有奇数个N
- 分子量为偶数 $[M+H]^+$ 为奇数的离子，有偶数个N或不合N

e.g. 在 m/z 300 的 $[M+H]^+$ 离子

$mw = 299$

化合物一定有奇数个氮

e.g. 在 m/z 301 的 $[M+H]^+$ 离子

$mw = 300$

化合物含有偶数个氮 (偶数个氮为 0, 2, 4 ...)



质量准确度 Mass Accuracy

$$\text{ppm error} = (\text{mass error} / \text{MW}) \times 10^6$$

- 利血平 (C₃₃H₄₀N₂O₉) 离子的m/z为 609.28066。
- 单四极杆质谱 +/-0.1 质量准确度=165 ppm (0.1 / 609.28 X 10⁶ = 164.128)

在仅使用C, H, O和N时, 可能分子式的数目为:

165 ppm	584
10 ppm	36
5 ppm	17
3 ppm	10
2 ppm	8
1 ppm	4
0.5 ppm	1

精确的质量可降低得出错误分子式的风险

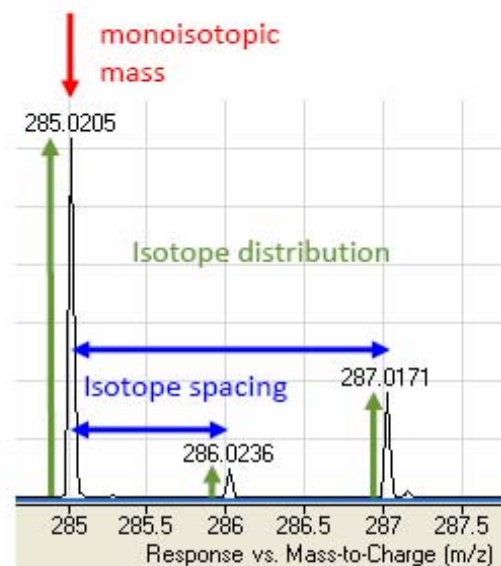


Agilent Personal Compound Database

Accurate mass and optional RT databases (AMRT)

Name	Formula	Mass Submitted	Mass	Delta Mass (ppm)	RT Submitted	RT (min)	CAS
Mipalox	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₂ P		182.06943				371-86-8
Codlemone	C ₁₂ H ₂₂ O		182.16707				33996-49-9
Acetate	C ₂ H ₃ O ₂		103.01190				35590-19-1
Delicopyloneton	C ₇ H ₁₃ N ₅ O		183.11201				13395-86-1
Hydroxylazine	C ₇ H ₁₃ N ₅ O		183.11201				2999-11-7
Sebutylazine desethyl 2OH	C ₇ H ₁₃ N ₅ O		183.11201				33124-62-9
Tebutylazine desethyl 2OH	C ₇ H ₁₃ N ₅ O		183.11201				96793-06-8

Scoring based on

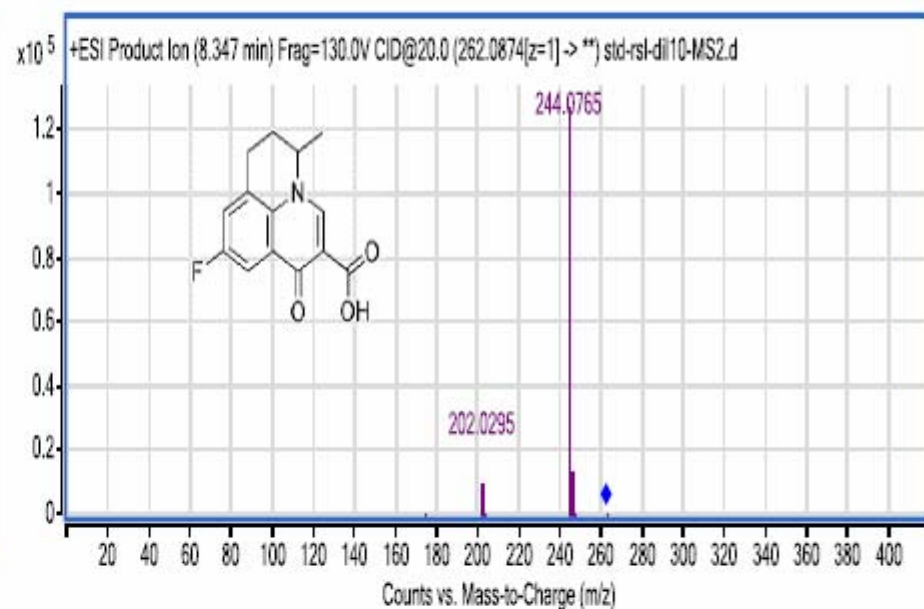
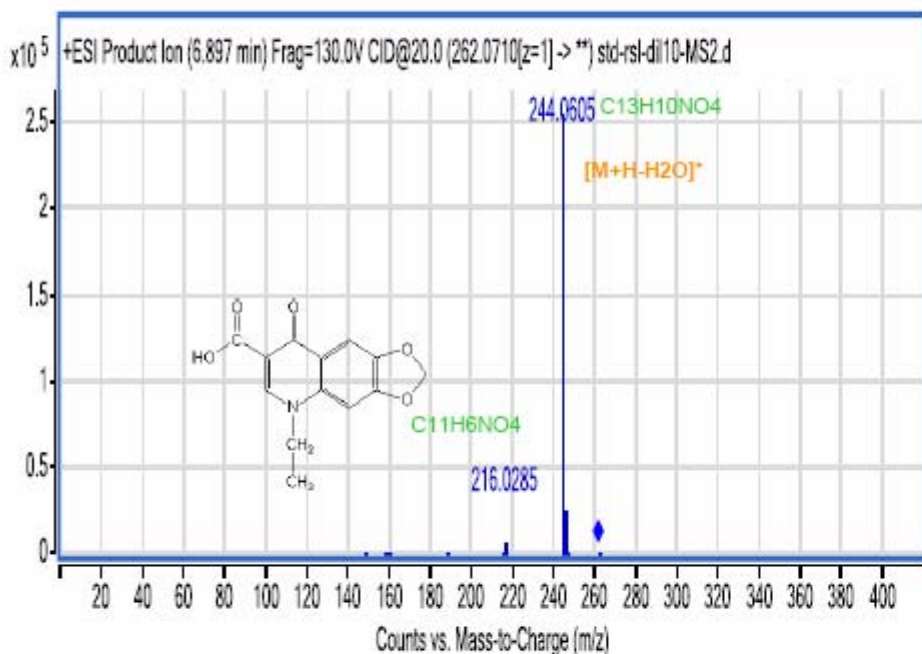


New for TOF-based screening

- Endogenous metabolites database (METLIN) 23,000 compounds
- Pesticide database 1,600
- Forensics database 7,000



用Target MS/MS分析碎片离子，化合物1主要的两个碎片离子为m/z 244.0605及216.0286。通过碎片离子的精确质量数计算元素组成，质量精度分别为-0.27ppm及2.95ppm。结合恶奎酸的结构，推断了碎片的合理性，从而确证了化合物1为恶奎酸，化合物2为氟甲喹Flumequine(C₁₄H₁₂NO₃F)



与TOF/QTOF数据处理相关的软件模块分类

数据库/谱库软件-筛查及定性分析

- MassHunter Pesticide PCD B.04.00
- METLIN AMRT PCD B.04.00
- METLIN PCDL B.04.00
- MassHunter Forensics/Tox PCD B.04.00
- MassHunter Forensics/Tox PCDL B.04.00

质谱数据差异分析软件-代谢组学

- MassHunter Mass Profiler B.03.00 SP1
- MassHunter Mass Profiler Professional B.02.01

蛋白分析软件-蛋白鉴定、生物医药

- MassHunter BioConfirm B.04.00
- Spectrum Mill A.03.03

代谢物鉴定软件-药物代谢

- MassHunter Metabolite ID Software B.02.00



Qualitative and Quantitative Analysis



Unknown Screening –
what's in the sample?



Target Screening –
are specific
compounds present
& how much?



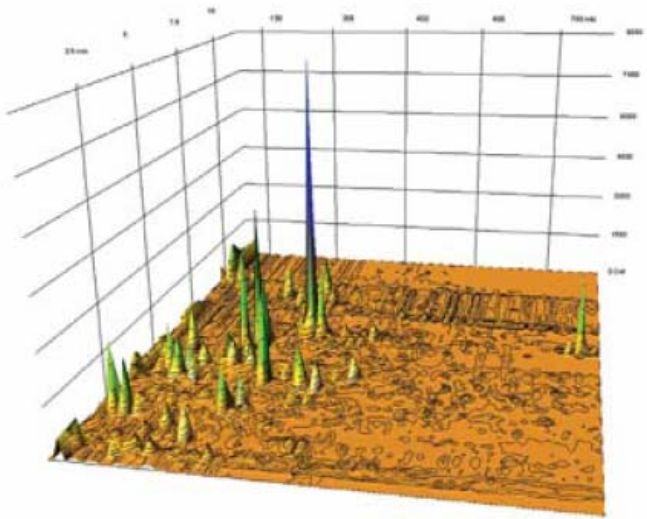
Quantitation – how
much compound(s) is
in the sample?

Non-Selective

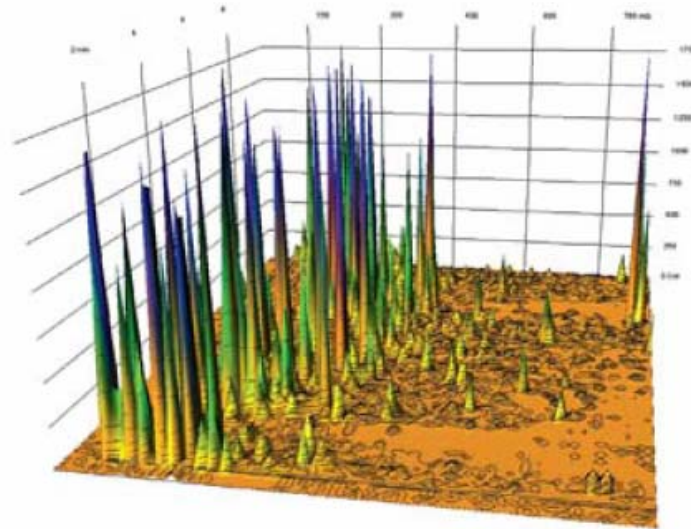
Selective



分析方法的建立

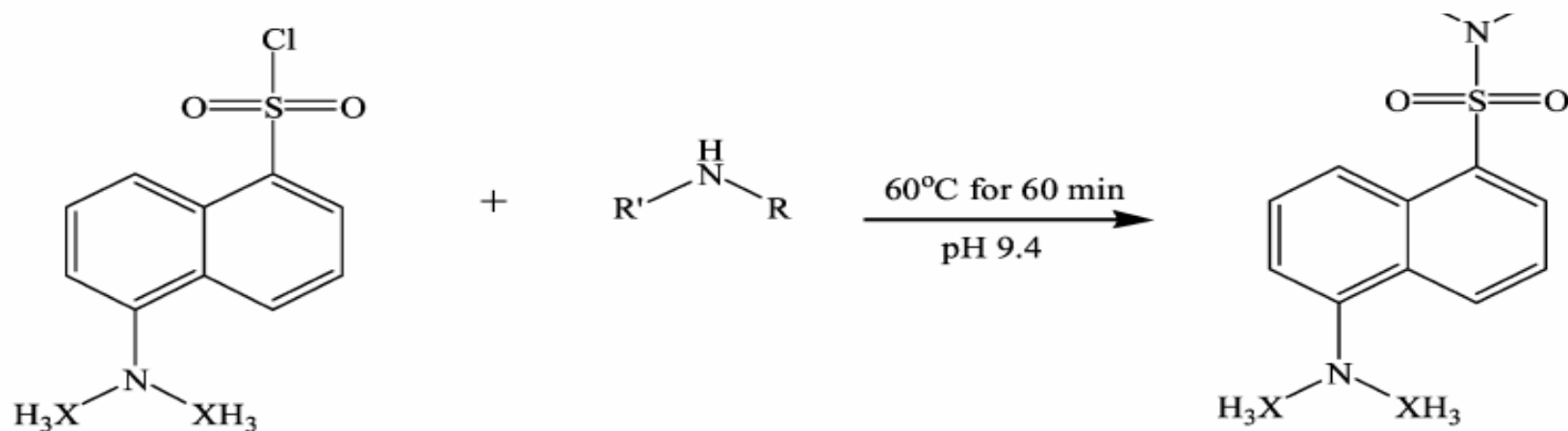


HPLC

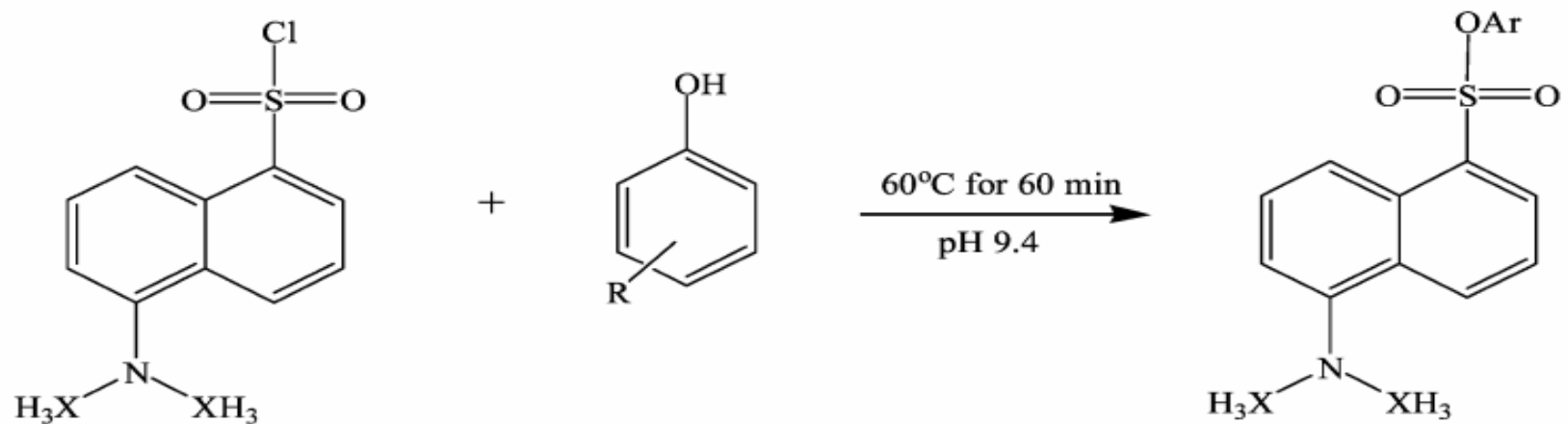


UPLC™

Differential ^{12}C -/ ^{13}C -Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome

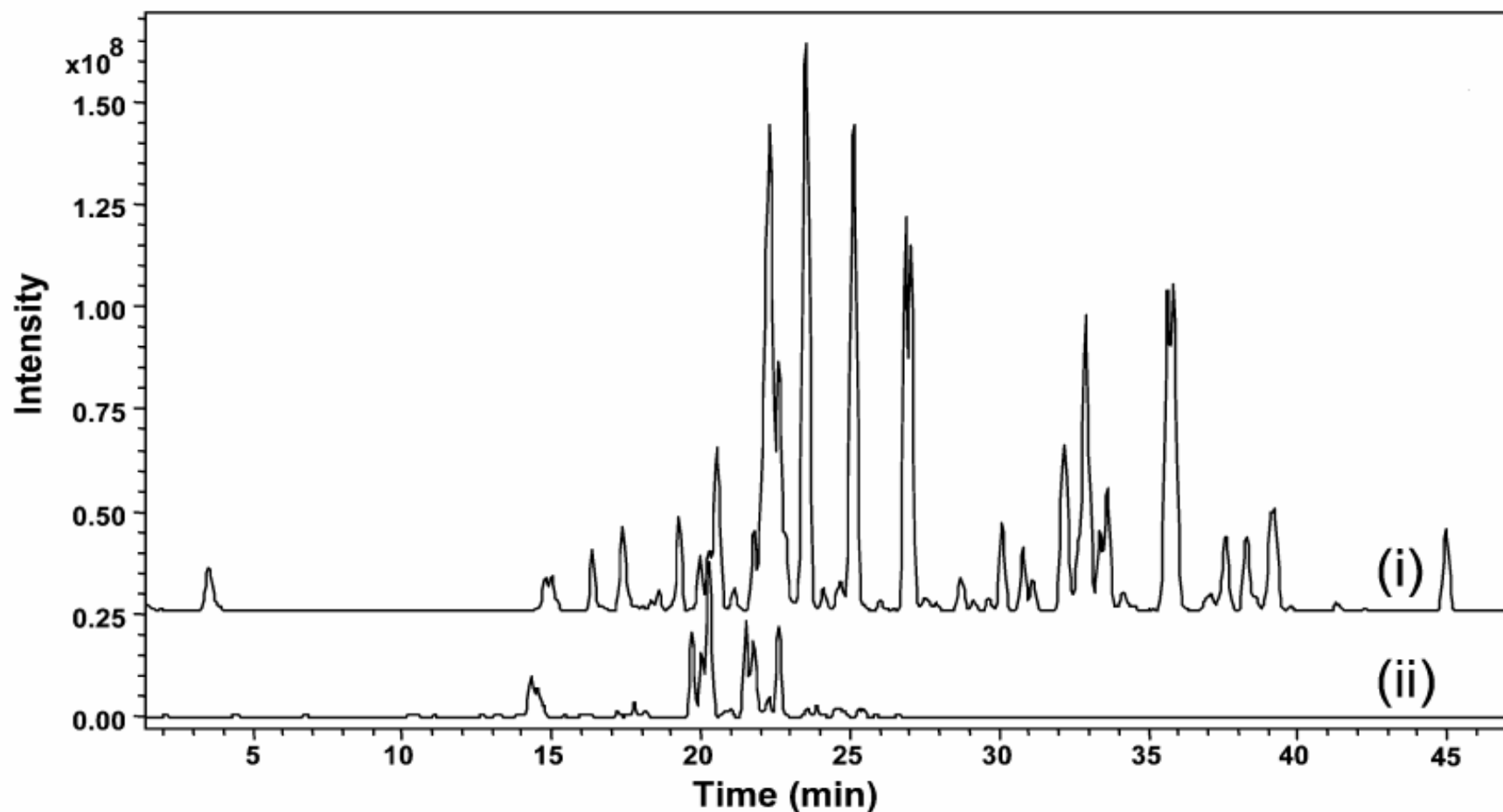


primary, secondary amines or phenols

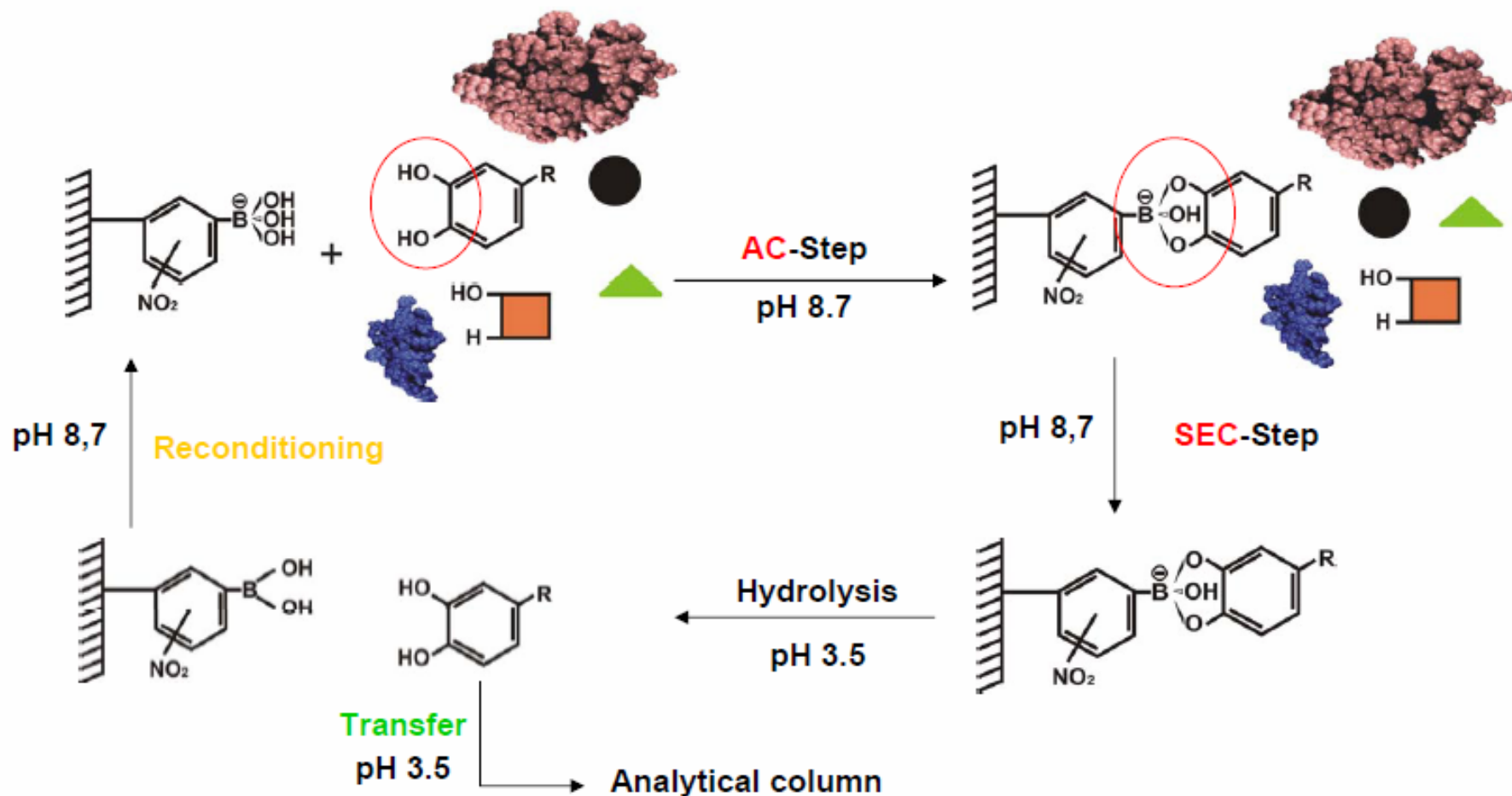


X = ^{13}C : ^{13}C -dansyl chloride

Differential ^{12}C -/ ^{13}C -Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome



On-line SPE (AC / SEC) of cis-diol Compounds in Biofluids

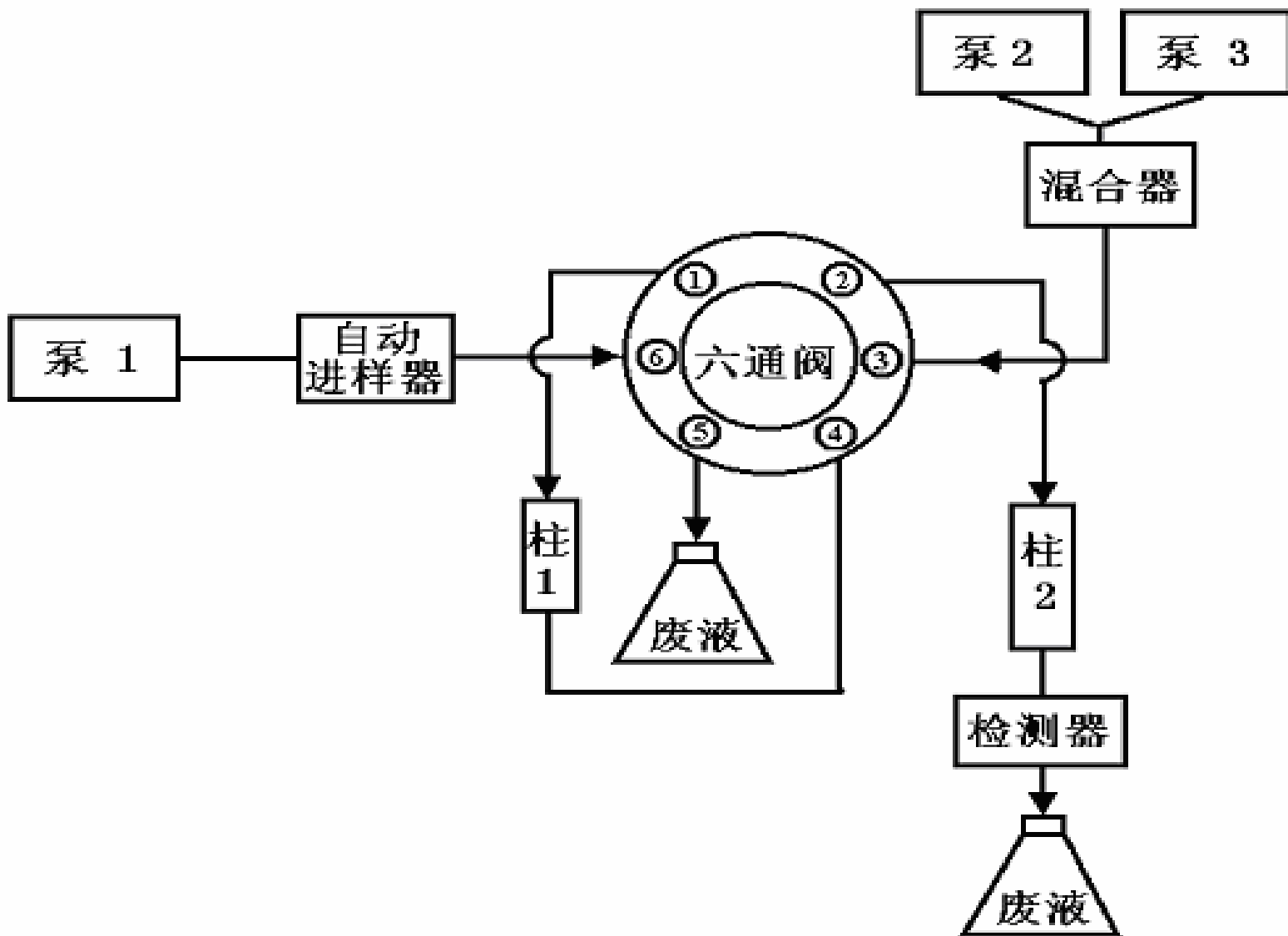


Basis material :
Ligand :
SPE-column:

Hydrophilic porous Copolymer; size exclusion limit: approx. 10^4 Dalton
Nitrophenylboronic acid
CAT-PBA, 30 x 4 mm ID (RECIPE GmbH, Munich, Germany)



液相色谱分析在线系统流程图示意图



分析方法的验证

- 样品适用范围

血液、尿液、组织、微生物等生物样品

- 分析方法

GC、LC以及与其联用的质谱
酶联免疫法

方法验证六要素

- Accuracy
 - Precision
 - Selectivity
 - Sensitivity
 - Reproducibility
 - Stability
-

Selectivity

- blank sample
- six sources
- **Lower limit of quantification (LLOQ)**

至少高于5倍的空白响应

Accuracy在80-120%， Precision在20%。

峰形应为可辨认的、不连续和可重现的

Accuracy

- 标样加入实际样品（标准加入法）
 - 至少包括低、中、高3个浓度、每个浓度至少平行重复5次
 - 平均值/真实值在85-115%以内，LLOQ在80-120%以内
-

Precision

- 标样加入实际样品（标准加入法）
 - 至少包括低、中、高3个浓度、每个浓度至少平行重复5次
 - RSD在15%以内，LLOQ在20%以内
 - 包括日内、日间precision以及单针重复进样6次
-

Recovery

- 实际样品预处理后加标/实际样品加标后预处理
 - 标样分别为低中高**3**个浓度，平行作**6**次
-

Calibration/Standard Curve

- Blank sample (matrix sample processed without internal standard)
 - a zero sample (matrix sample processed with internal standard)
 - six to eight non-zero samples covering the expected range, including LLOQ
 - 反算值在15%内，LLOQ可在20%内
 - 不符合条件的标样不能定量但不影响方法的建立
-

Stability

- **Freeze and Thaw Stability**

样品在低、高2个浓度平行作3个样本冻融循环
3次

- **Short-Term Temperature Stability**

常温解冻并保持4h-24h

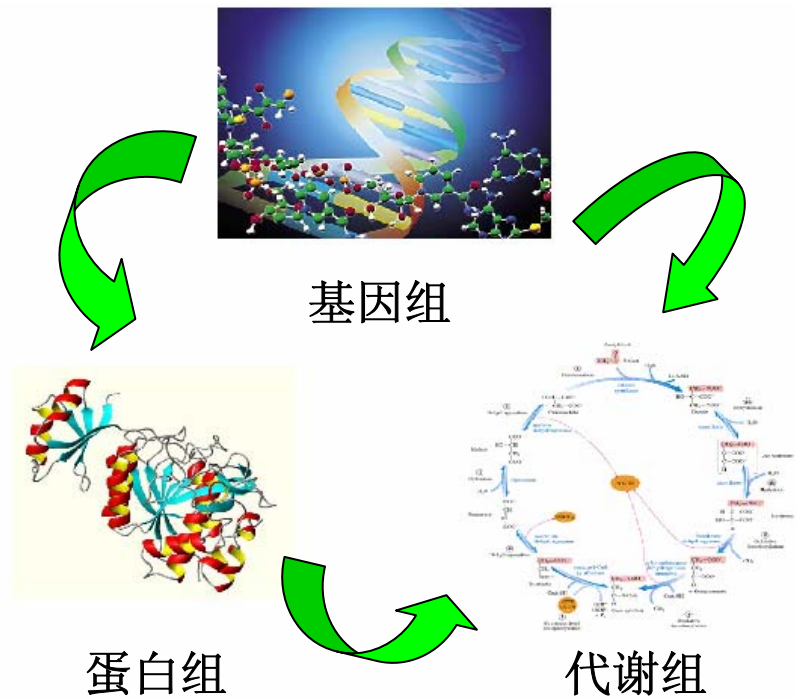
- **Long-Term Stability**

QC (Quality control sample)

- 低中高三种浓度
低：LLOQ的3倍
中：标曲中间值
高：接近标曲上限
- 分散在进样序列之内，数量至少为样品的5%
并为3的倍数且不小于6
- 实验进程中总体QC应有2/3在其真实值的15%
置信区间内，1/3可溢出

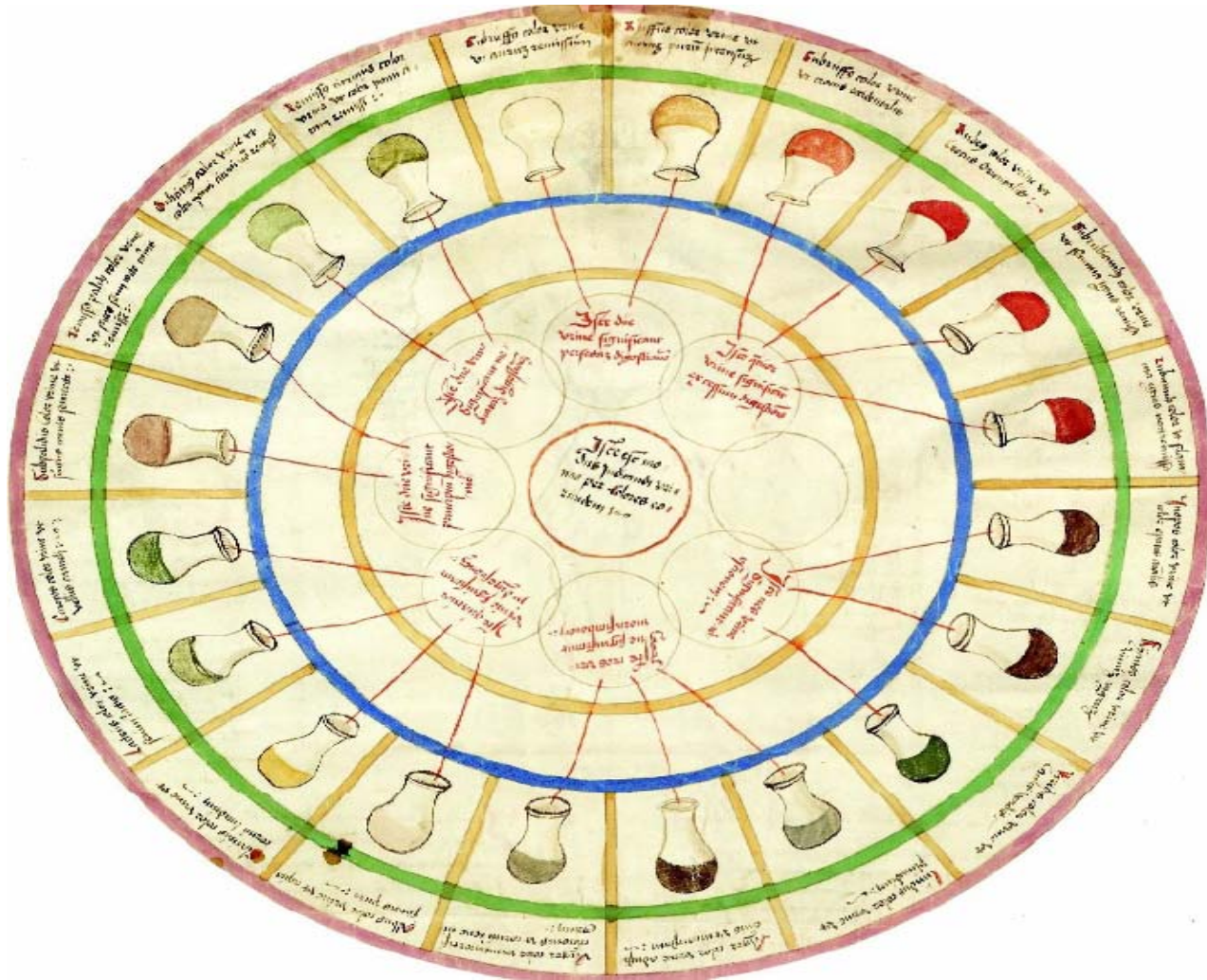
代谢组学简介

“通过考察生物体系受刺激或扰动后的代谢应答，来研究复杂多细胞体系随时间变化而发生的全面的动态的系统改变的一种技术”



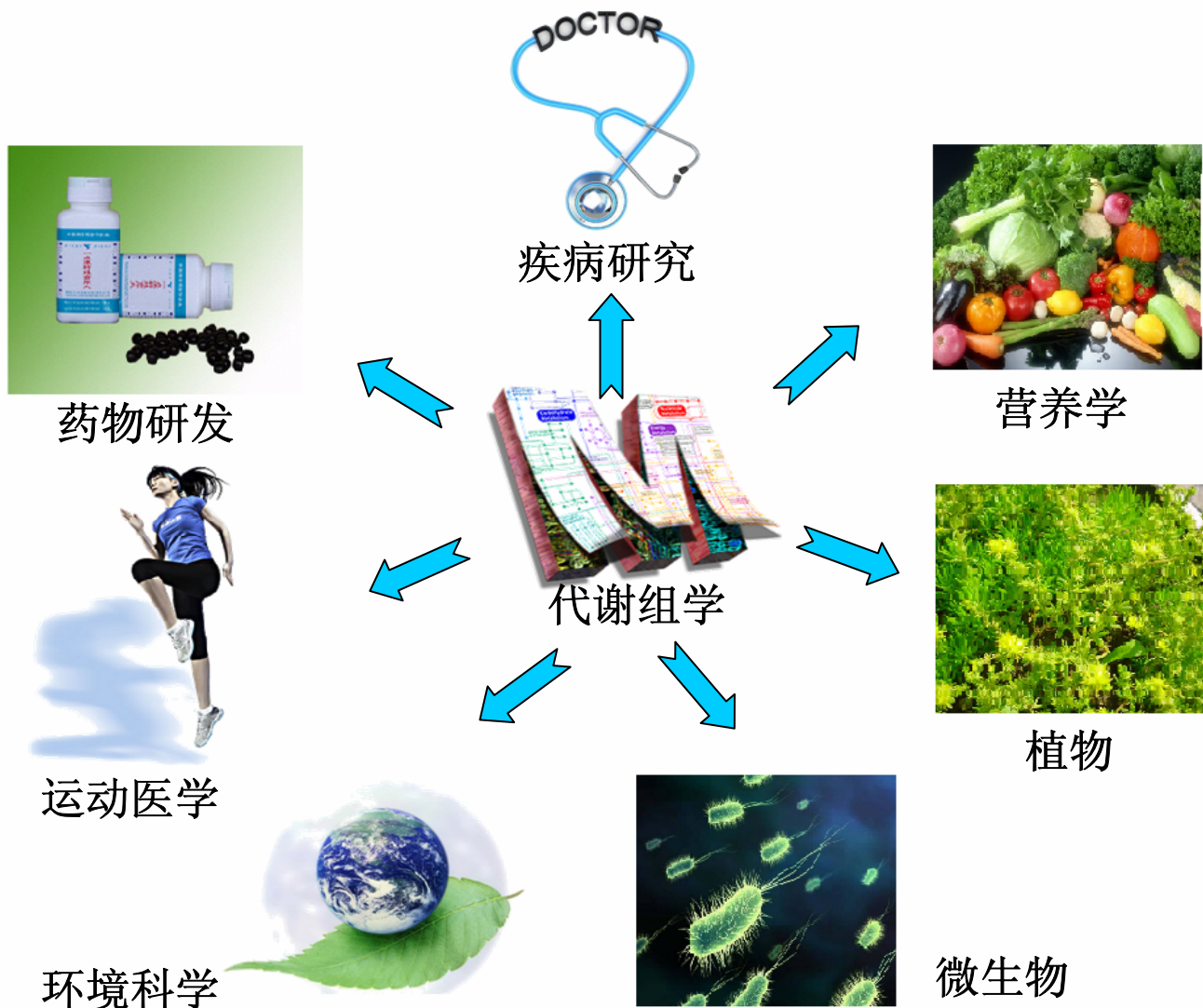
从系统生物学角度出发，整体地了解基因的表达及调控

Urine Charts

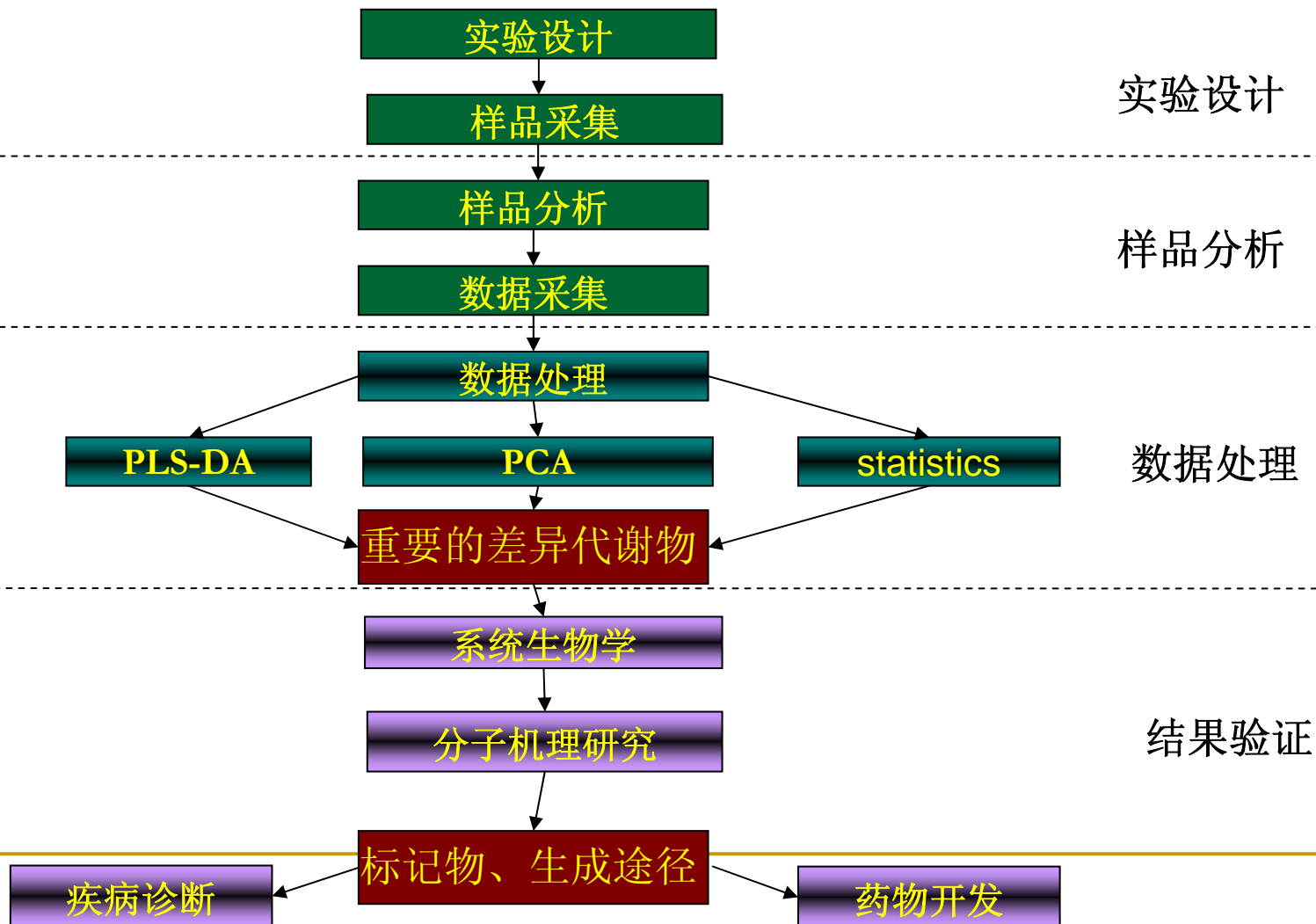


起源于古希腊，中世纪开始广泛应用

代谢组学的应用领域



代谢组学研究的基本流程



实验设计

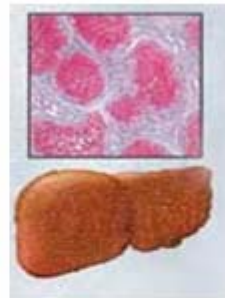
模型的建立



正常



肝炎



肝硬化



原发性肝癌

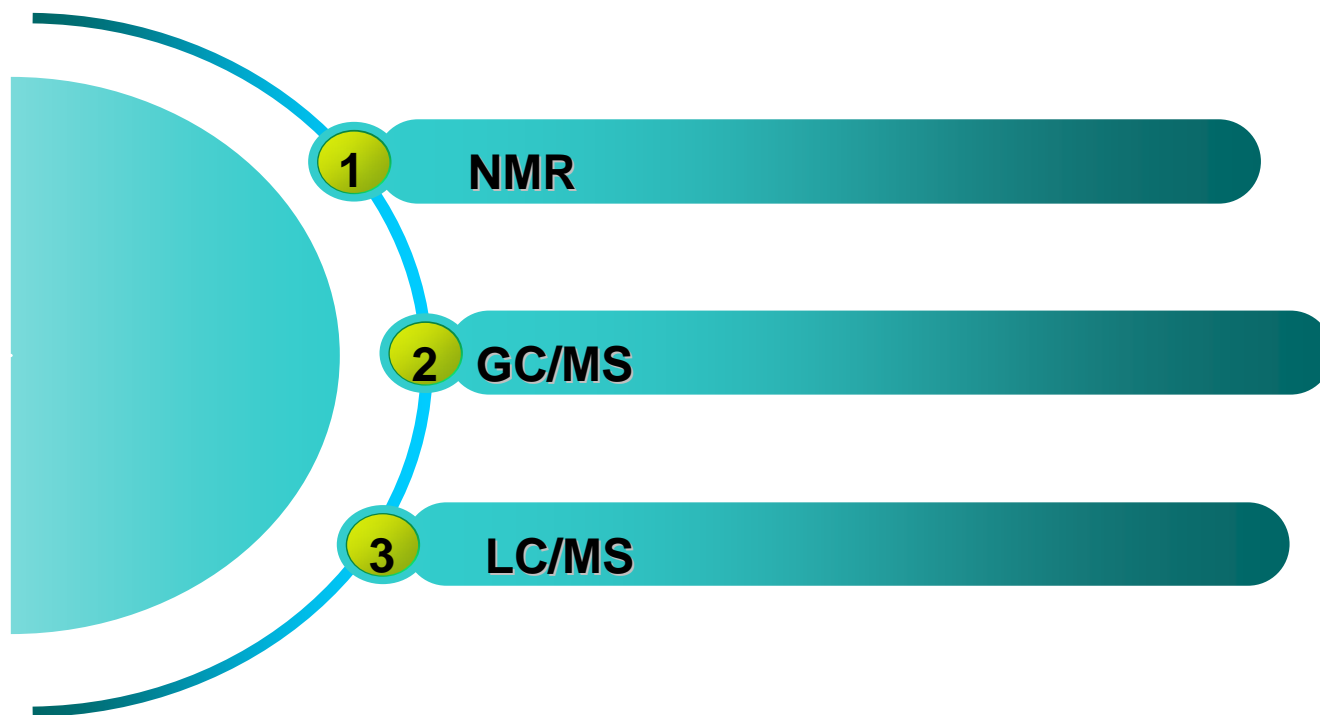


样本采集

- 根据实验目的收集样品
 - 标准化的样品采集流程
 - 完善的样本信息
-

样品分析

■ 主要分析手段



毛细管电泳、红外光谱、电化学检测

■ 实验目的 → 分析目标和方法

1

**Metabolite
Target
analysis**

2

**Metabolic
profiling
analysis**

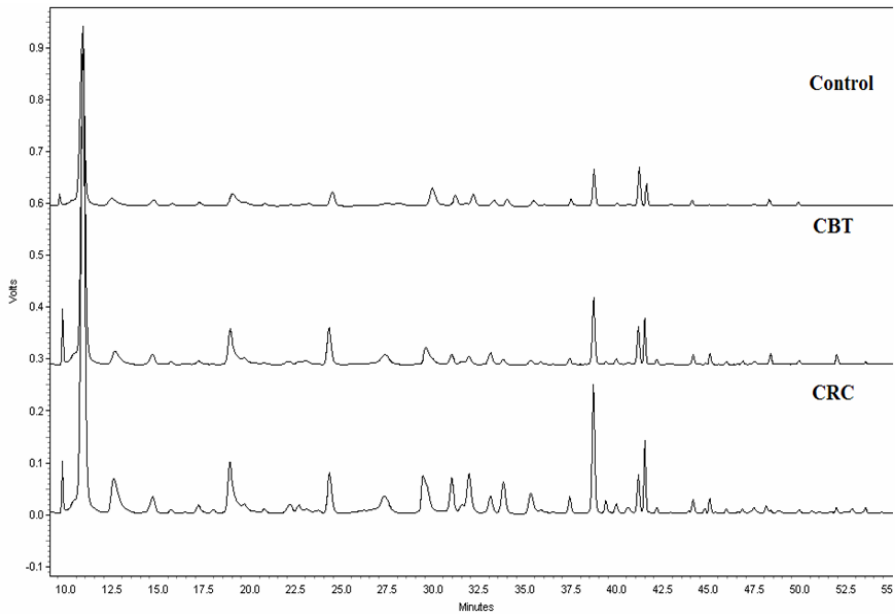
3

Metabonomics

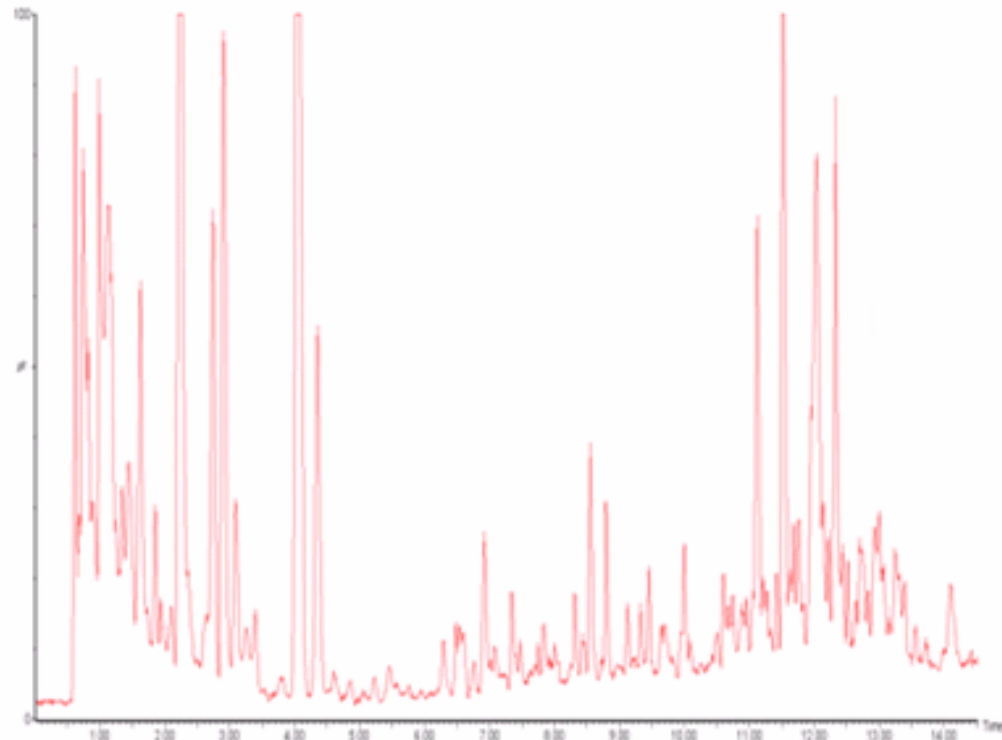
4

**Metabolic
fingerprinting
analysis**

数据处理

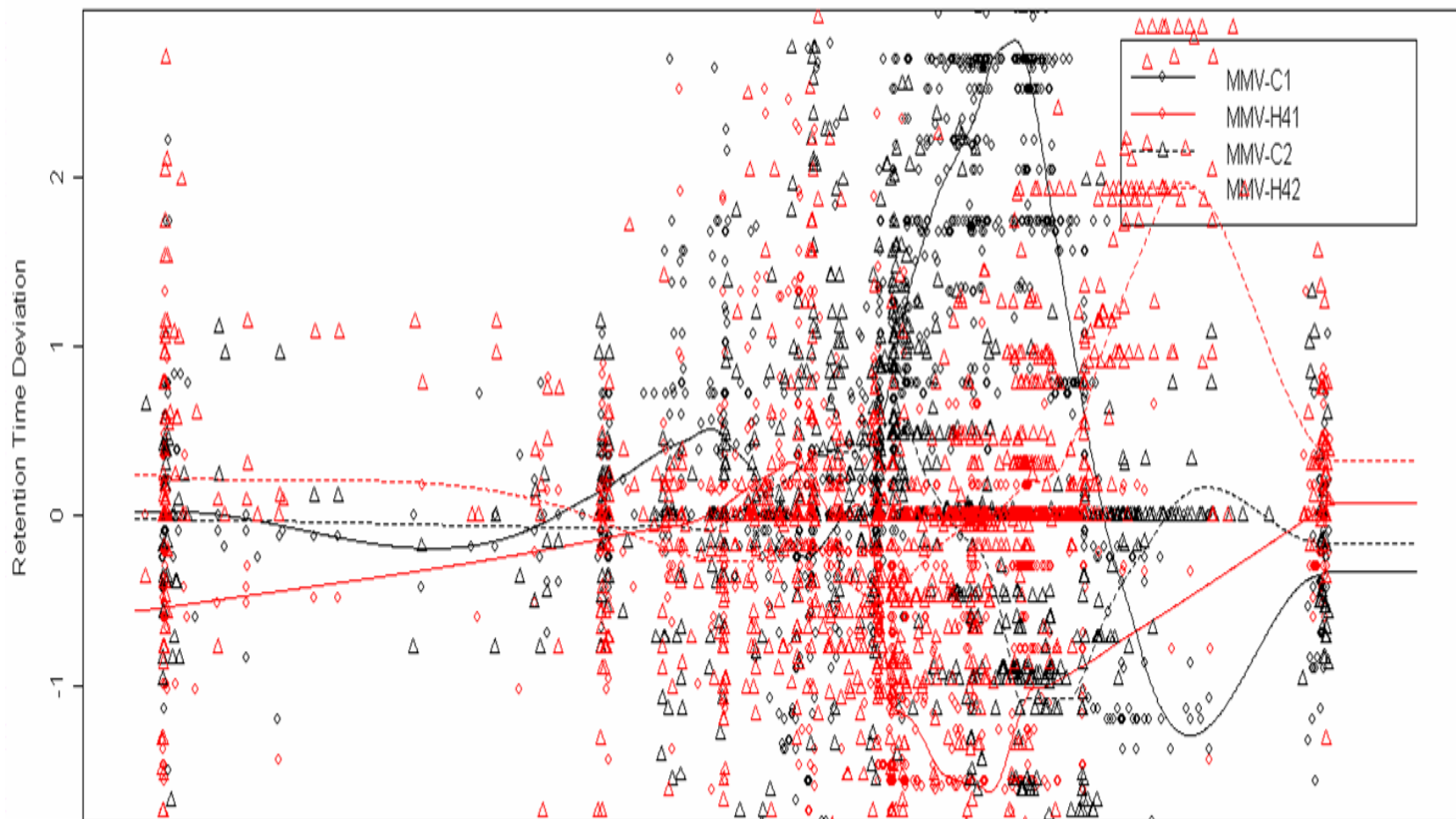


'Global' metabolic profiling



峰匹配

Retention Time Deviation vs. Retention Time



数据处理

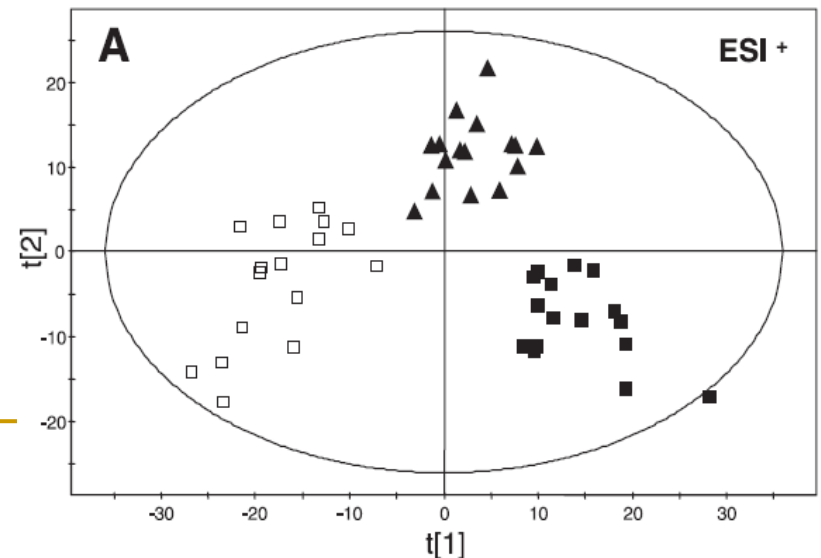
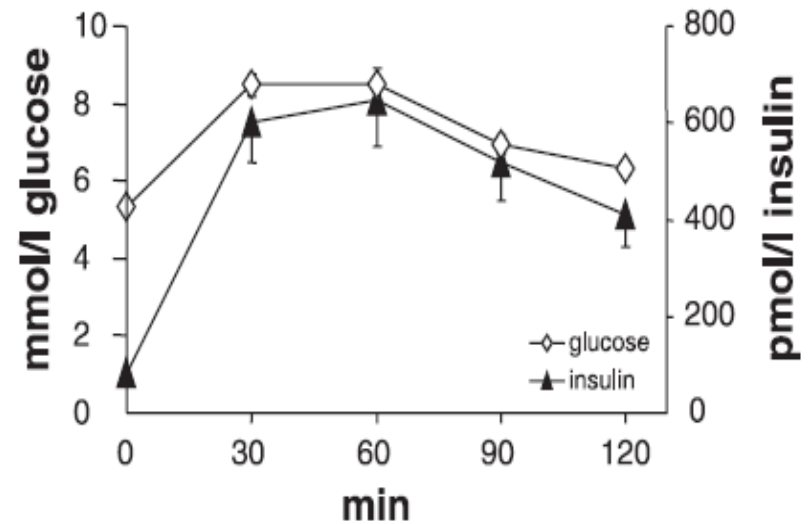
■ 单变量分析

■ 多变量分析

PCA

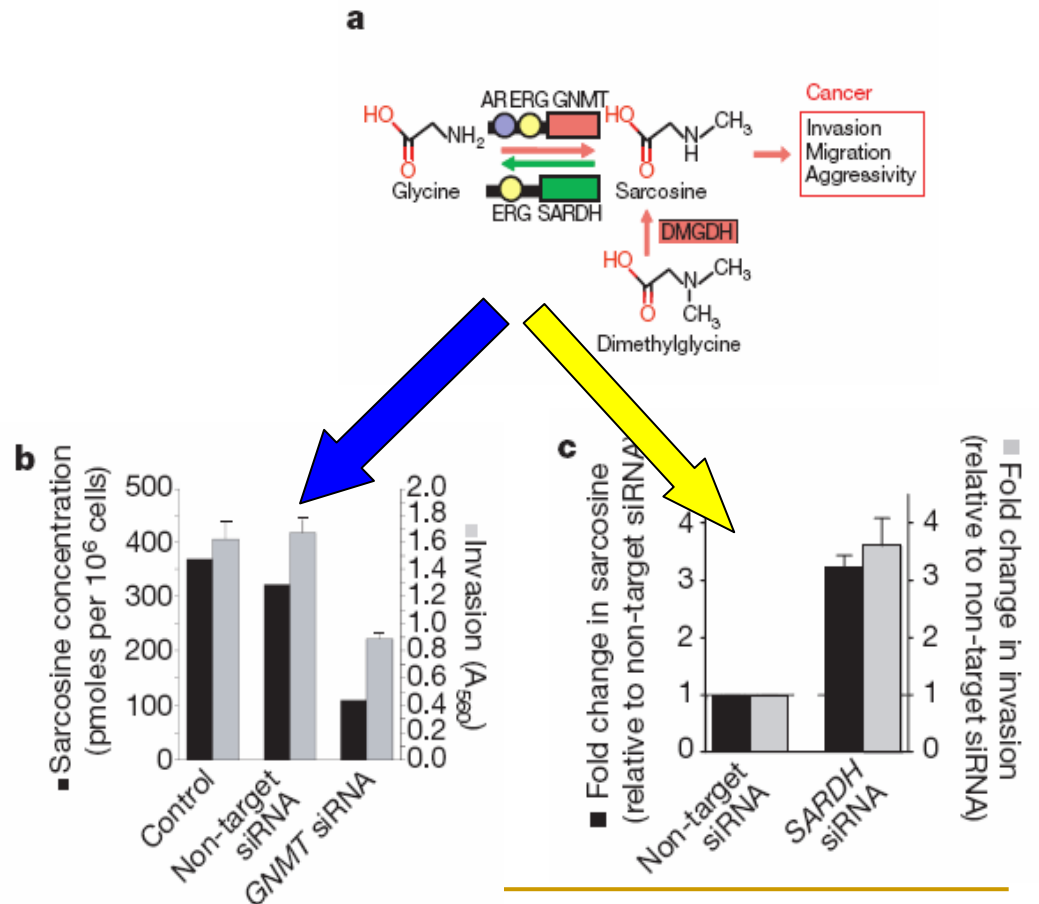
PLS-DA

■ HPLS、Range scaling

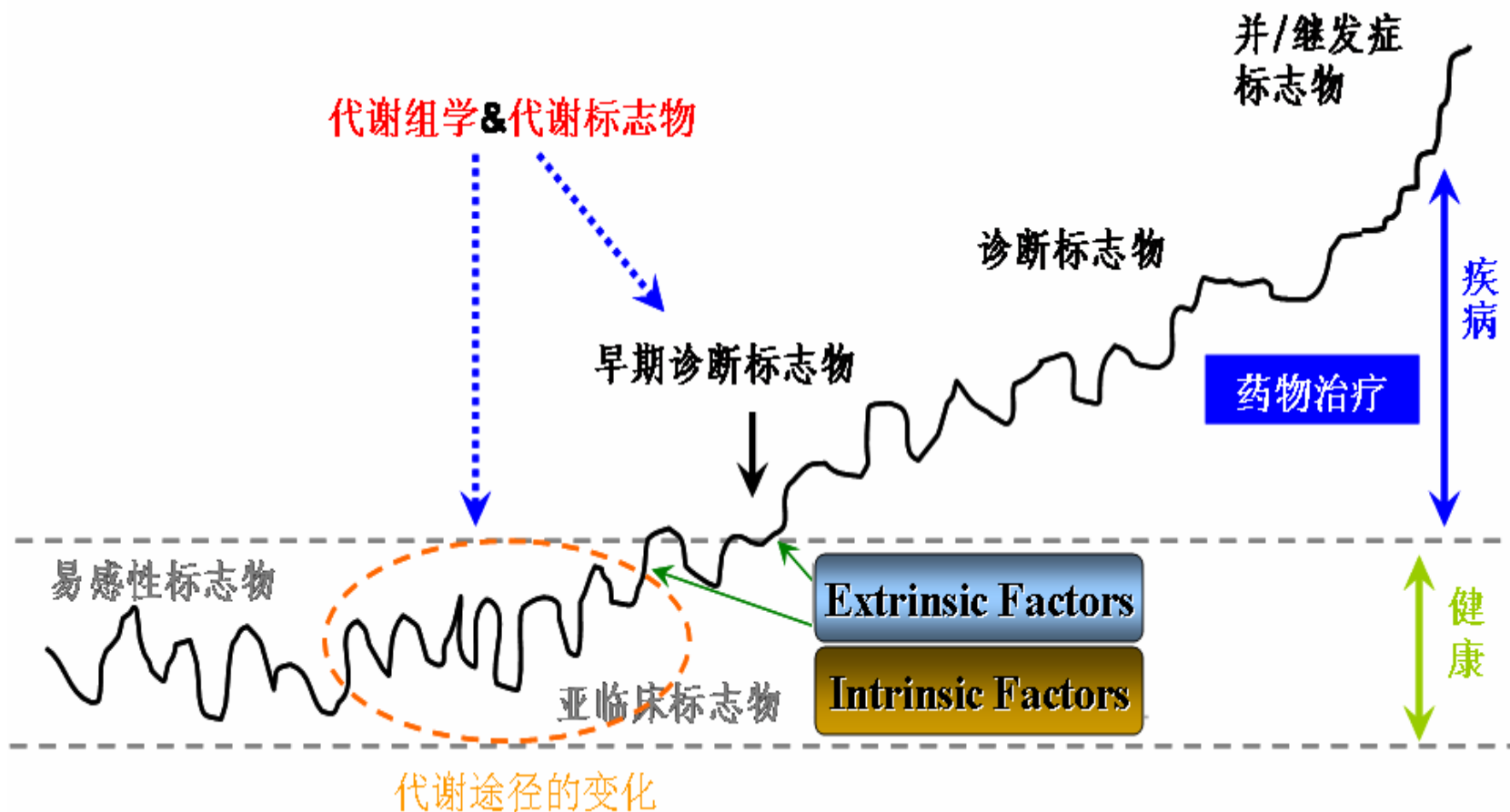


验证

- 大样本量验证
- 分子机理等研究



代谢组学在疾病研究中的作用



几种医学上常用的辅助诊断标志物

标志物	疾病	诊断灵敏度
AFP	原发性肝癌（睾丸和卵巢癌）	50-75%
CEA	大肠癌（肝癌、胰腺癌、肾癌）	40-80%
CA125	卵巢癌（乳腺癌、胰腺癌、胃癌、肺癌、结肠直肠癌）	26-75%
CA199	胰腺癌（结直肠癌、肝癌和胃癌）	30-85%

原发性肝癌的可切除率10-30%

■ 空腹血糖 → 糖尿病

■ 尿中苯丙氨酸 → 苯丙酮尿症

代谢组学在疾病研究中的应用进展

■ 心肌梗塞诊断标志物的研究



正常对照

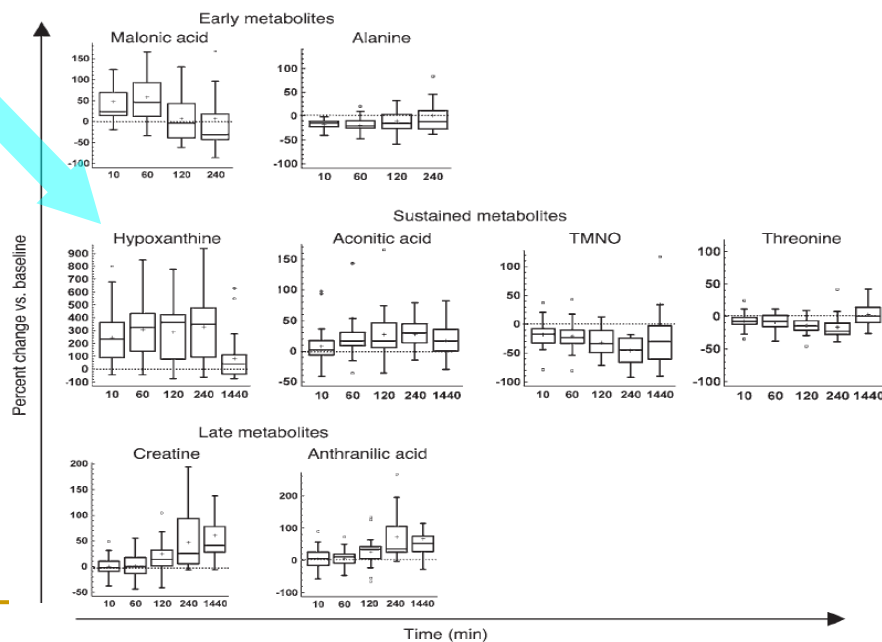


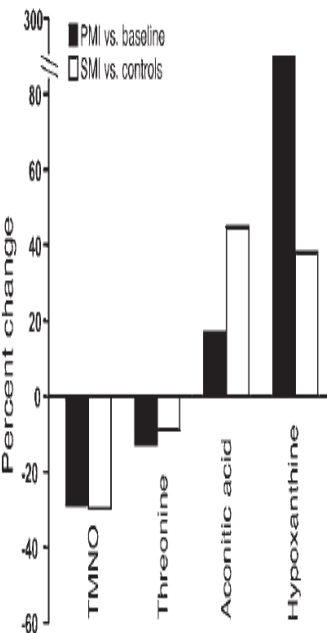
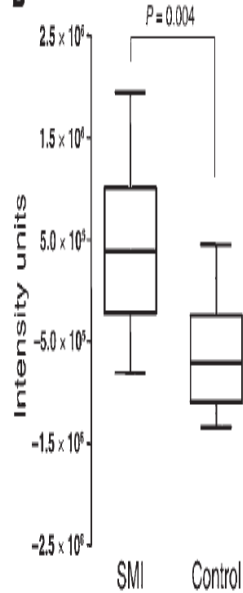
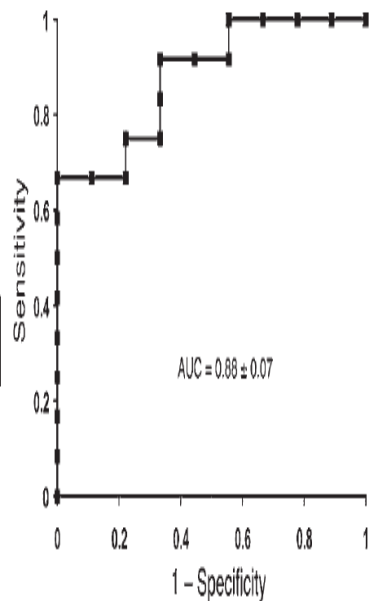
自发性心梗



酒精消融术致心梗

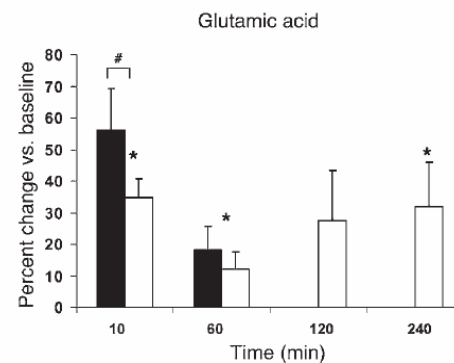
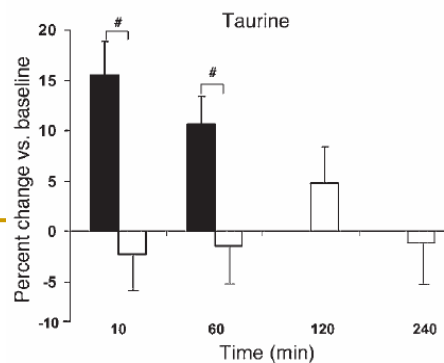
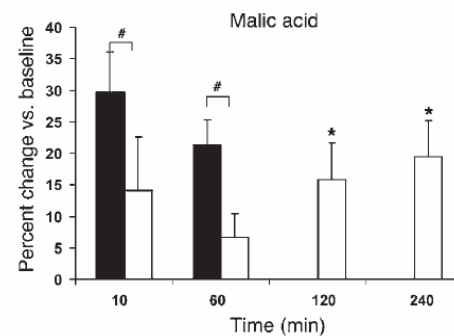
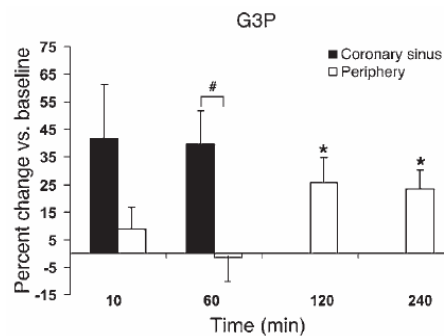
收集时间序列样品



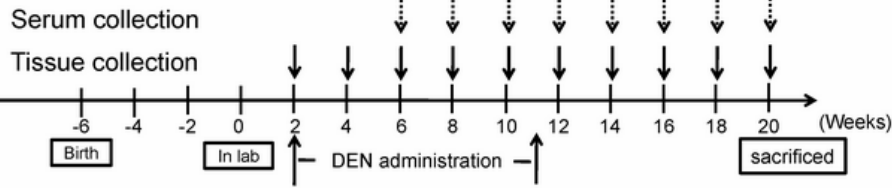
A**B****C**

诊断特性评价

冠状动脉血与外周血的比较



肝癌的代谢组学研究

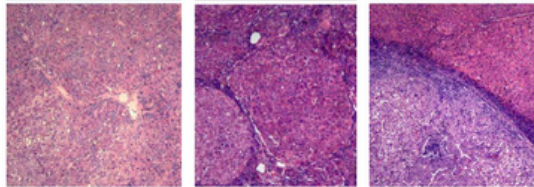


老鼠模型

Gross anatomy



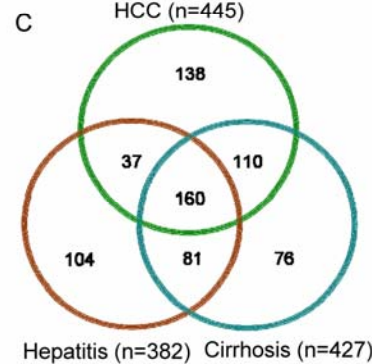
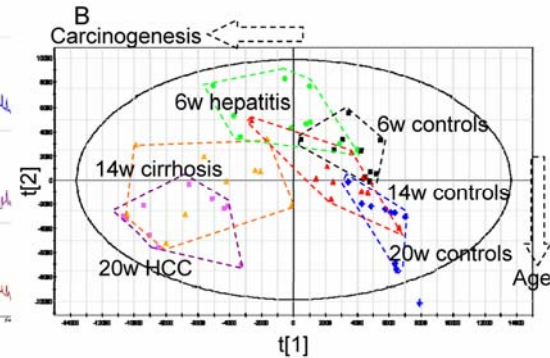
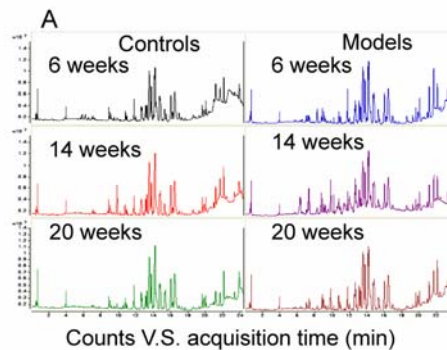
Histological section



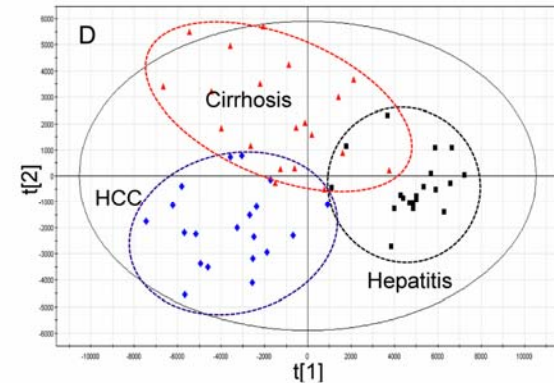
Inflammation

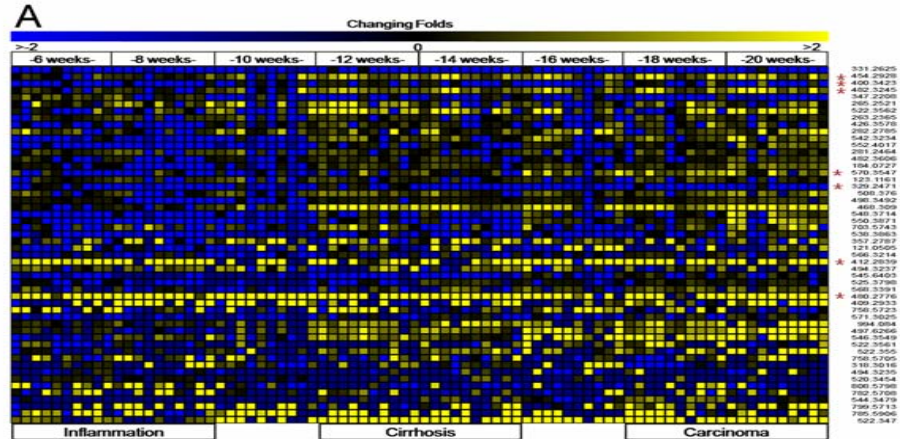
Cirrhosis

HCC

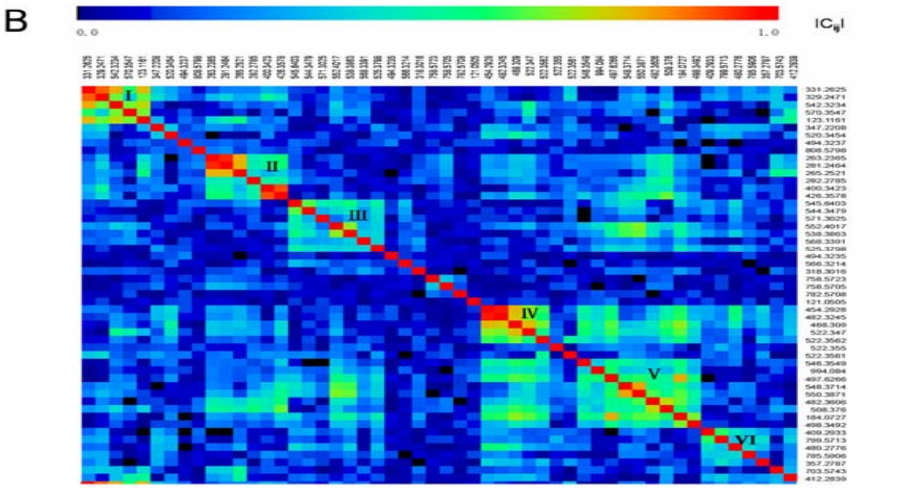


建立模型

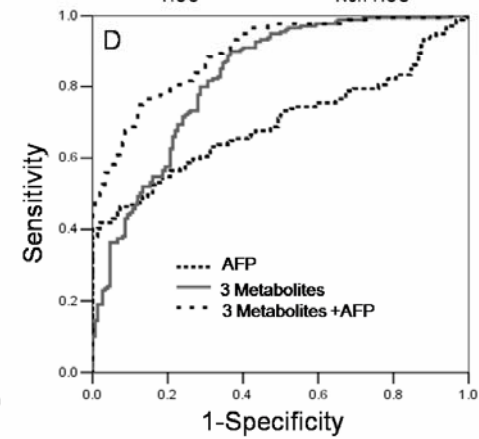
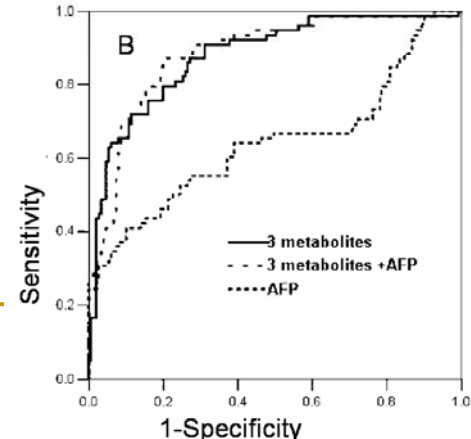
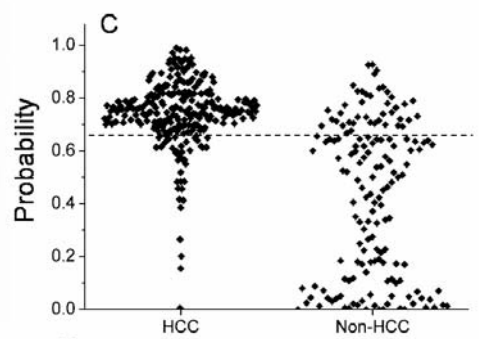
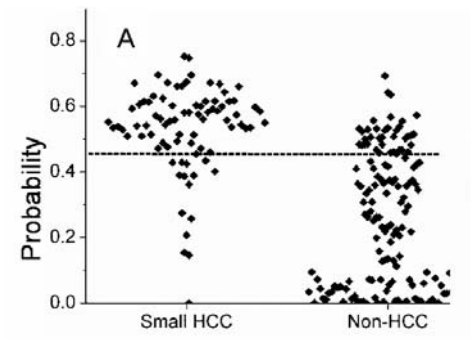




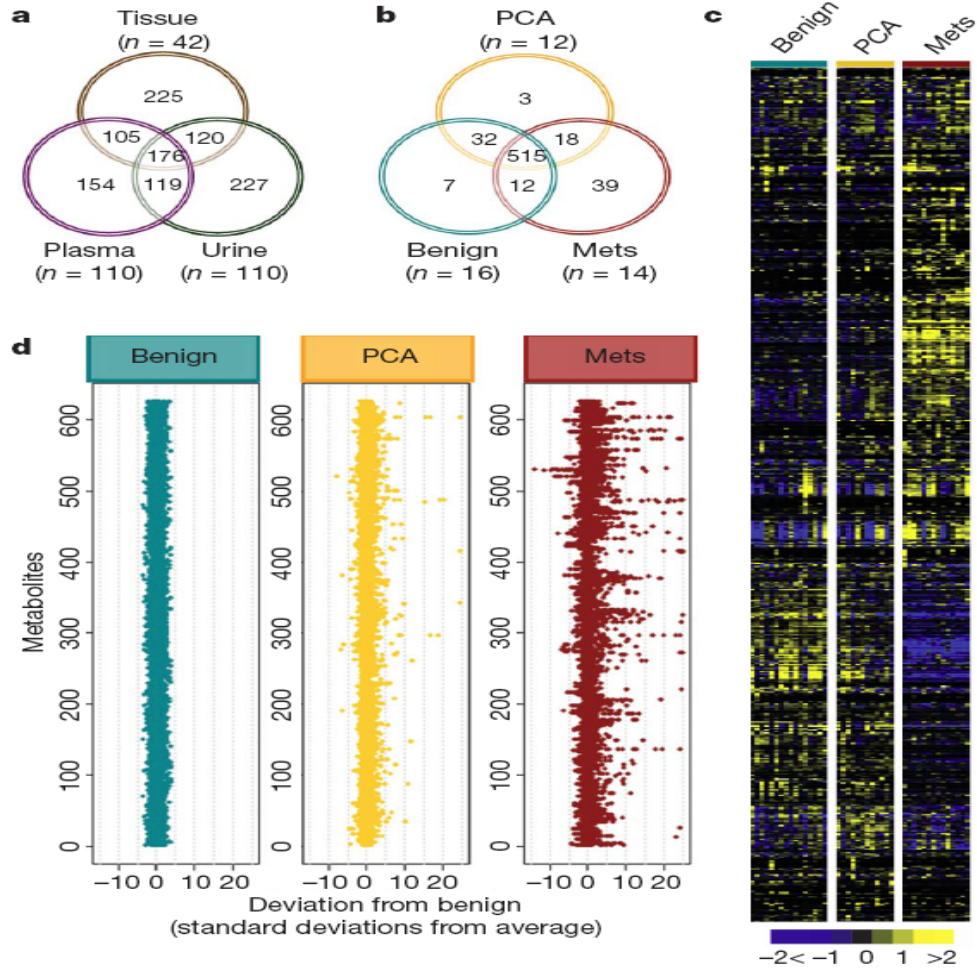
标志物筛选



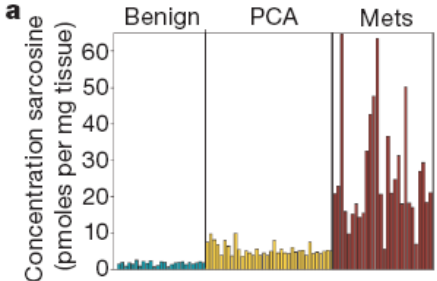
辅助诊断



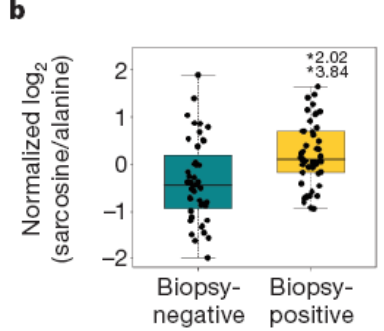
前列腺癌的诊断标志物研究



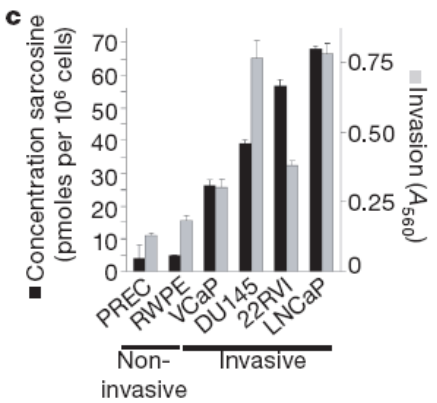
代谢标志物的筛选



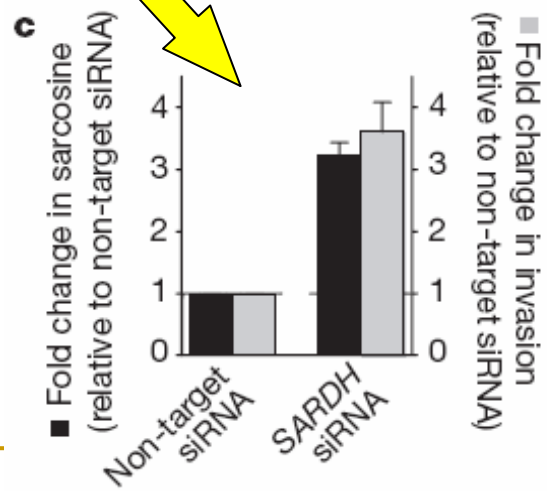
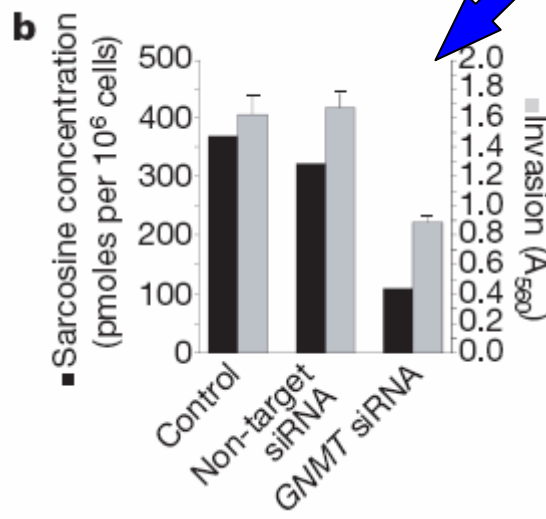
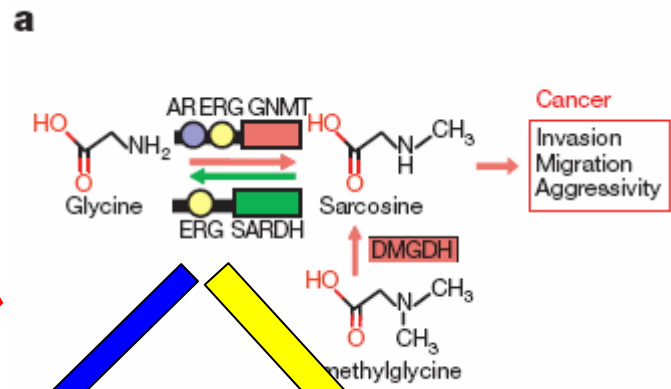
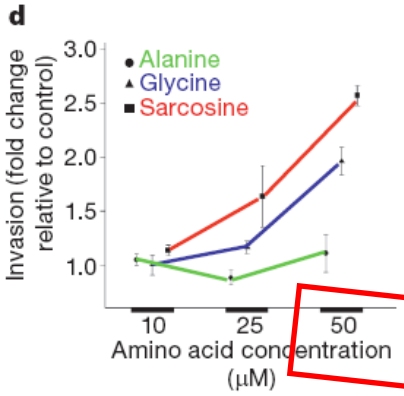
组织分布



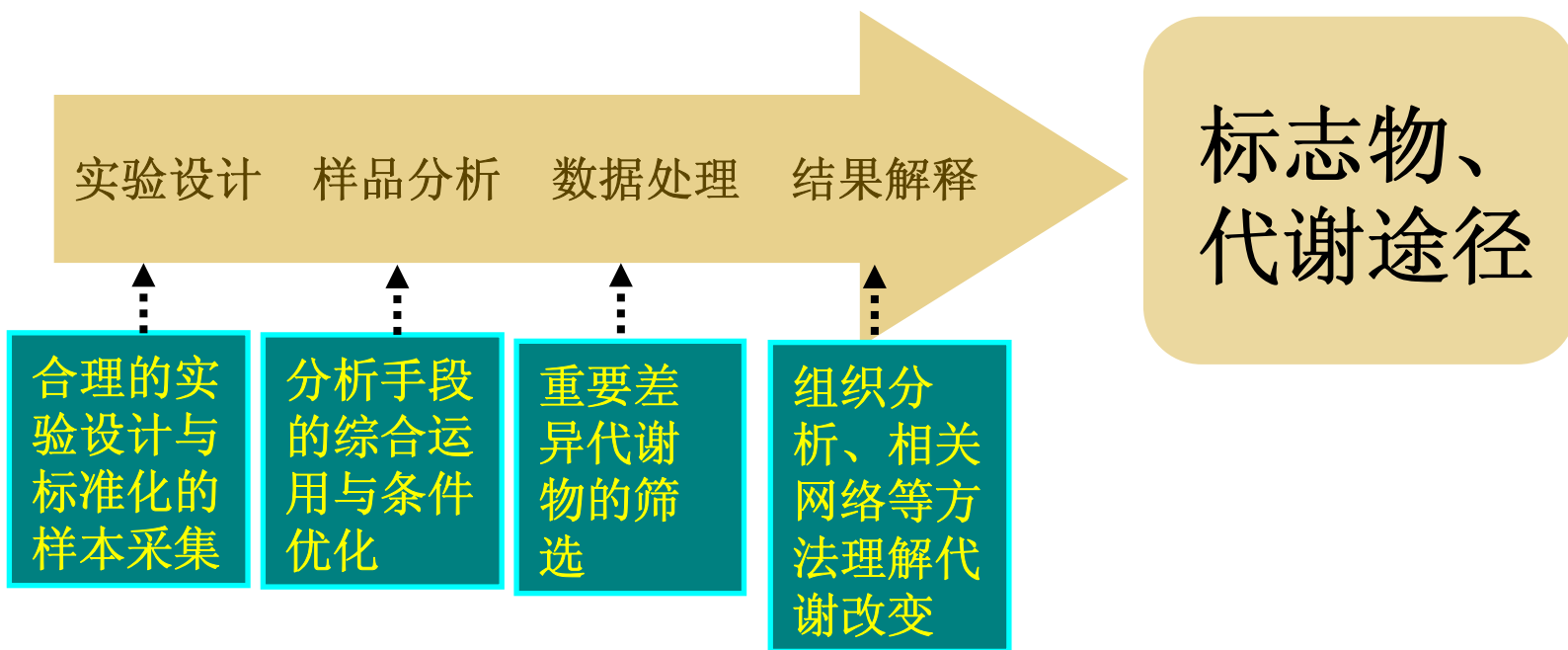
分子机理研究



侵袭性



代谢组学方法



谢谢！
