

# Perfeccionando la Identificación de Metabolitos Utilizando una Adquisición Independiente de los Datos para Metabolómica

## Utilizando el Sistema TripleTOF® 6600 LC-MS/MS y la Adquisición SWATH®

Robert Proos, SCIEX, USA

La identificación completa de metabolitos con la compatibilidad espectral de la biblioteca MS/MS puede ser problemática para los flujos de trabajo de adquisición dependiente de datos (DDA), ya que a menudo requiere múltiples inyecciones para cada muestra para obtener toda la información MS/MS necesaria para la identificación y el muestreo para MS / MS es estocástico. Los flujos de trabajo de adquisición independiente de datos (DIA) son de creciente interés al analizar muestras biológicas complejas debido a la naturaleza integral del enfoque de adquisición.<sup>1</sup> Además de capturar los espectros de MS/MS para todos los analitos detectables, la adquisición de SWATH también proporciona datos cuantitativos tanto en MS como en niveles de MS/MS, que permiten un análisis exhaustivo cualitativo y cuantitativo de los metabolitos en muestras biológicas complejas como el plasma en una sola inyección. Aquí, se explorarán las tasas de detección de metabolitos en plasma utilizando los flujos de trabajo DDA y DIA en el sistema TripleTOF 6600.

La identificación exacta de compuestos sigue siendo un cuello de botella en el campo de la metabolómica en la traducción de características experimentales a la interpretación biológica. El

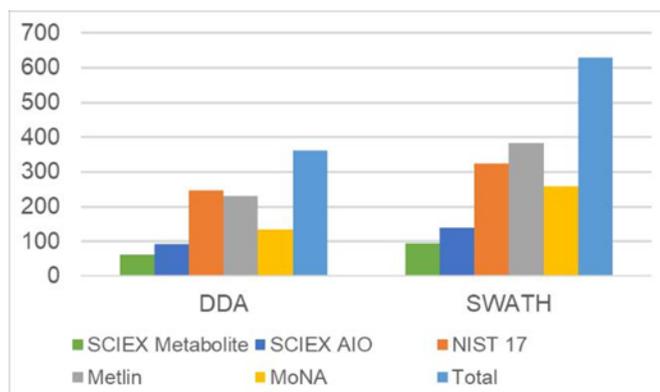


uso de enfoques de búsqueda de bibliotecas, donde la información de MS y MS/MS se compara con las bibliotecas espectrales, es un enfoque común cuando se exploran muestras complejas.

En este estudio, se realizó una evaluación de varias bibliotecas espectrales en los datos de los flujos de trabajo DDA y DIA, para comparar el número de metabolitos identificados con exactitud en una muestra de plasma extraída en un flujo de trabajo de inyección única.<sup>2</sup> Las bibliotecas LC-MS / MS evaluadas en este estudio incluyen las bibliotecas NIST 17, MoNA (MassBank of North America), METLIN y SCIEX.

### Principales Ventajas de la Adquisición de SWATH para Estudios de Metabolómica

- La adquisición SWATH con ventanas Q1 variables proporciona mapas digitales completos en MS y MS/MS de una muestra compleja, lo que permite una interrogación en profundidad para la identificación y cuantificación de metabolitos.
- La velocidad de adquisición del X500R QTOF y el sistema TripleTOF 6600 QTOF permite el uso de la selección de los 20 mejores espectros en DDA o la adquisición SWATH de 20 ventanas variables en DIA.
- El tiempo de ciclo resultante de 651 ms es fácilmente compatible con la cromatografía rápida.
- Debido a la naturaleza integral de la Adquisición SWATH, la coincidencia con bibliotecas de compuestos da como resultado la identificación de compuestos inesperados
- La adquisición SWATH identifica 50% más compuestos que un método optimizado de adquisición dependiente de datos (DDA)



**Figura 1. Comparación del Número de Compuestos Identificados.** El número total de compuestos identificados a partir de plasma extraído utilizando diferentes bibliotecas se compara entre la adquisición dependiente de datos (DDA) y la adquisición independiente de los datos (DIA) utilizando la Adquisición SWATH. En todos los casos, se identificaron más compuestos usando la Adquisición SWATH que con DDA, en general se identificaron 50% más compuestos usando la Adquisición SWATH.

- La flexibilidad del flujo de trabajo permite el uso de bibliotecas específicas más pequeñas para la interrogación focalizada, así como grandes bibliotecas integrales para un examen amplio

## Métodos

**Preparación de la Muestra:** Se transfirieron 100 µL de plasma agrupado (AA 45/32 Phys Control Plasma, SCIEX) a un microtubo de 2 ml, se agregaron 800 µL de metanol para extraer metabolitos y precipitar proteínas. Las muestras se sometieron a agitación en un vortex y luego se centrifugaron a 14,000 RPM durante 10 min. Se transfirió una alícuota de 800 µL del sobrenadante, que contiene los metabolitos, a un microtubo de 2 ml. La muestra se secó hasta tener un pellet usando un concentrador CentriVap sin usar calor. Luego, el sedimento se reconstituyó en 100 µL de agua desionizada, se centrifugó a 14,000 RPM durante 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un inserto de vial de HPLC.

**Cromatografía:** Se utilizó un sistema ExionLC™ AD HPLC (SCIEX) con una columna Phenomenex Kinetex® F5 (150 x 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å) a 30 °C con un flujo de 200 µL/min. Fase móvil A = agua con ácido fórmico al 0,1 %. Fase móvil B = acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. El método de gradiente de fase inversa se enumera en la Tabla 1. El volumen de inyección fue de 3 µL.

**Tabla 1. Gradiente de LC para análisis del metabolismo del plasma.**

Tiempo	%A	%B
0.0	100	0
2.1	100	0
14.0	5	95
16.0	5	95
16.1	100	0
20.0	100	0

**Espectrometro de Masas:** Se utilizó un sistema TripleTOF 6600 con una fuente DuoSpray™ (SCIEX) y una sonda de ionización por electrospray (ESI) con ionización en modo positivo. Para los métodos de adquisición de DDA y SWATH, los datos de MS de TOF se recopilaron entre 50 y 1000 m/z con un tiempo de acumulación de 100 ms. La adquisición de DDA se realizó utilizando los 20 mejores MS/MS con un umbral de 500 cps, sustracción dinámica de fondo, acumulación dinámica, con un tiempo mínimo de acumulación de 25 ms. No se utilizaron listas de inclusión o exclusión para el análisis DDA. La adquisición de SWATH se realizó con 20 ventanas de

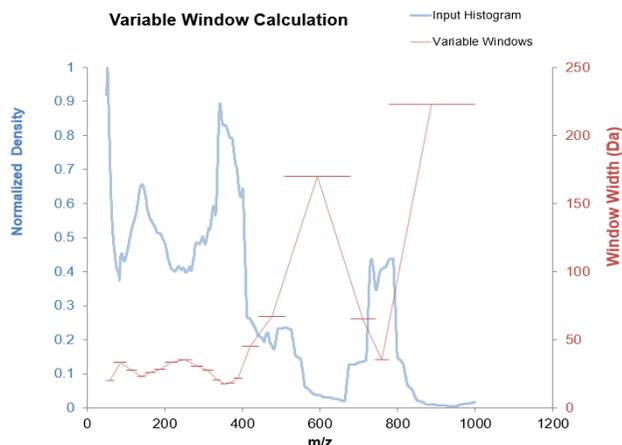
aislamiento Q1 variables, optimizadas con base a los datos de MS de TOF (Figura 2), usando el calculador de ventana variable de adquisición de SWATH.<sup>3</sup> Cada espectro de MS/MS usó un tiempo de acumulación de 25 ms. El tiempo del ciclo fue de 651 ms para los métodos DDA y DIA.

**Procesamiento de Datos:** Los datos se procesaron utilizando el software SCIEX OS para la búsqueda de picos no dirigidos (Tabla 2) en las siguientes bibliotecas espectrales MS/MS de masa exacta NIST 17, METLIN, MoNA y SCIEX All-in-One. Solo los espectros de LC-MS/MS obtenidos experimentalmente se usaron en el análisis. La identificación del compuesto requería tanto la masa precursora de nivel MS como la coincidencia espectral de nivel MS/MS.

- La biblioteca Espectral de Metabolitos de alta Resolución de SCIEX 2.0 (AMMSL, por sus siglas en inglés Accurate Mass Metabolite Spectral Library) 2.0 - Esta conformada por 650 compuestos que cubren muchas vías metabólicas biológicamente relevantes, recientemente se adicionaron 93 nuevos compuestos.
- La Biblioteca SCIEX All-in-One: incluye AMMSL más otras bibliotecas SCIEX para 4108 compuestos en total.
- NIST 17 - 13808 compuestos que proporcionan la cobertura más amplia de compuestos exógenos y endógenos con 29507 Espectros de MS/MS.
- METLIN - 14027 metabolitos y entidades químicas que van desde lípidos, esteroides, metabolitos vegetales y bacterianos, péptidos pequeños, metabolitos de carbono central y sustancias tóxicas
- MoNA: un reservorio colaborativo centralizado de metadatos y auto revisado de 13038 metabolitos

**Tabla 2. Criterios utilizados para la determinación de picos no dirigidos**

Peak Finding Criteria	Threshold
Algoritmo de integración	MQ4
Ancho mínimo de pico	6 points
Altura mínima de pico	400 cps
Señal/Ruido	10



**Figura 2. Optimización del Método de Ventana Variable en la Adquisición SWATH.** Usando los datos de TOF MS recopilados en el plasma humano extraído, las ventanas se optimizan de tal manera que se encuentran densidades de iones equivalentes dentro de cada ventana SWATH. La calculadora de ventana variable de adquisición SWATH se utilizó para esta optimización.<sup>3</sup>

**Tabla 3. Resumen de Detección de Funciones.** Resultados Resumidos de la adquisición de DDA y DIA.

Criterios de búsqueda de picos	Adquisición DDA	Adquisición SWATH
Cantidad de Funciones <sup>§</sup>	14,573	16,799
Número promedio de puntos en el pico en la línea de base	21.4	21.8
Número promedio de puntos en el pico a media altura	11.6	9.8
Número total de espectros MS/MS generados	4864	N/A*
Número de características únicas con espectros MS/MS	2408	N/A*
Número de compuestos identificados por masa y coincidencia de biblioteca MS/MS	362	628

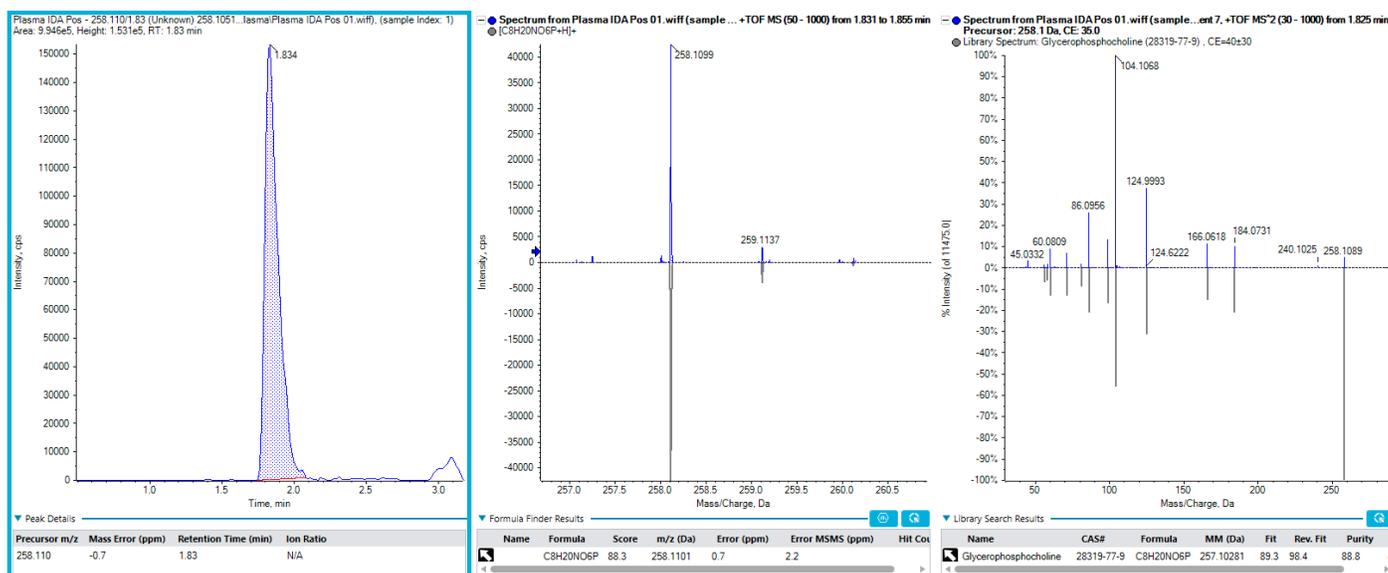
<sup>§</sup> Características encontradas por el hallazgo de pico no dirigido de datos TOF MS en el software SCIEX OS

\* En la Adquisición SWATH, se obtienen datos de MS / MS para todas las especies detectables

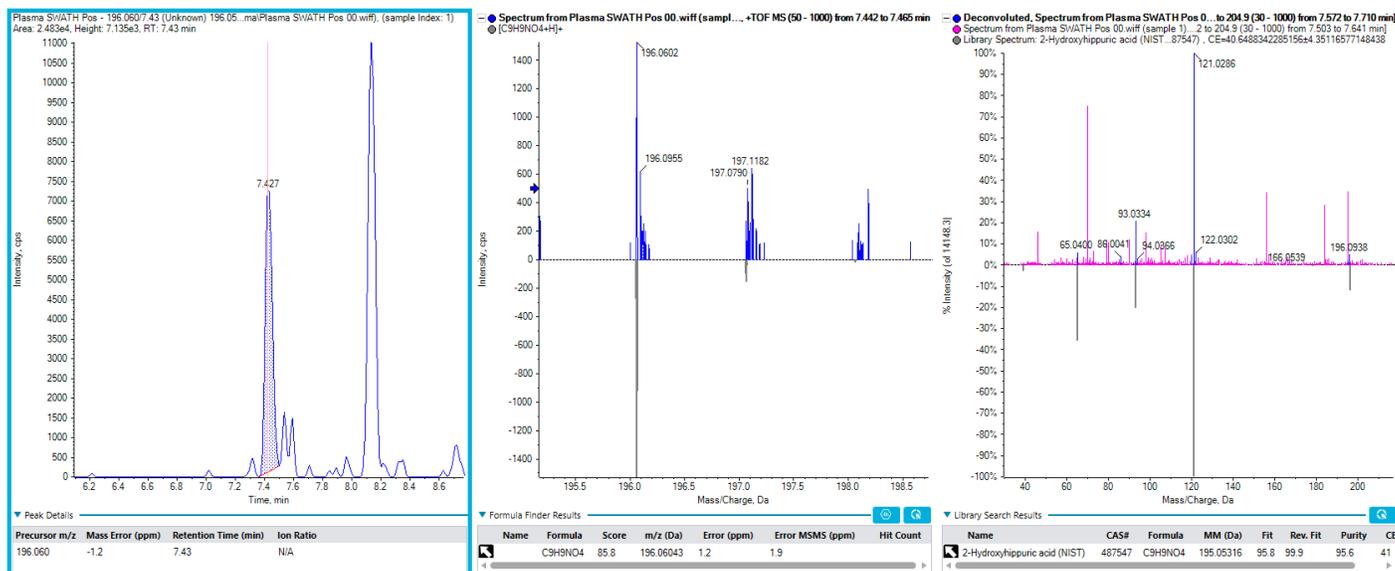
## Análisis DDA

En el análisis DDA, de las 14,573 características encontradas en el MS, un total de 4864 iones precursores fueron seleccionados para el análisis de MS/MS. De ellos, 2456 fueron espectros replicados del mismo precursor en exploraciones posteriores, lo que resultó en 2408 iones candidatos únicos fragmentados. Se proporciona un resumen de las características detectadas en la Tabla 3.

El filtro de sustracción de fondo dinámico utilizado en el proceso de selección se utiliza para mejorar la calidad de los espectros de MS/MS activando solo iones candidatos cerca del vértice del pico. Lo hace creando una XIC del ion candidato en los últimos 3 puntos de datos, tomando la primera derivada y determinando si el ion candidato se está acercando a la cima del pico. Este filtro reduce el número total de iones candidatos seleccionados para MS/MS, eliminando los iones de fondo y no se activa en frentes



**Figure 3. Ejemplo de un compuesto identificado usando DDA.** La glicerofosocolina se identificó del plasma humano extraído usando adquisición de DDA con la búsqueda de coincidencia con la biblioteca SCIEX Accurate Mass Metabolite Spectral Library 2.0. La identificación se basa en la exactitud de la masa de MS y la coincidencia de patrones de isótopos, y también en la coincidencia de MS/MS con el espectro de la biblioteca que se muestra aquí.



**Figure 4. Figura 4. Ejemplo de un compuesto identificado mediante la Adquisición de SWATH.** El ácido 2-hidroxipirúrico se identificó en el plasma humano extraído usando la adquisición SWATH y comparando contra la biblioteca NIST 17. En el panel MS /MS (extremo derecho), los picos rosados en el espectro adquirido (arriba) fueron eliminados por el software por no estar asociados con el precursor m / z 196.060 por PCVG. Los picos azules que se asociaron con el precursor m / z 196.060 coincidían con el espectro de la biblioteca para el ácido 2-hidroxipirúrico. Este compuesto no se identificó en el análisis DDA.

o colas máximos, incluso cuando está por encima del umbral de intensidad.

Como el tiempo de ciclo en el método es fijo, en ciclos cuando se selecciona menos del número máximo de iones candidatos, los 500 msec de tiempo MS / MS se distribuyen entre los precursores seleccionados. Los tiempos de acumulación más largos provocan una disminución del ruido, lo que mejora la calidad de los datos. La opción de acumulación dinámica también utilizada en este método mejora aún más la calidad de los datos al asignar más tiempo a los iones precursores de menor intensidad. El resultado general son datos MS / MS de alta calidad que permiten una mejor coincidencia con la biblioteca espectral.

En el análisis DDA de inyección única con 2408 iones candidatos únicos en los que se obtuvieron datos MS/MS, 362 de estas características se identificaron tanto por la coincidencia de la masa precursora como de la biblioteca MS/MS usando el software SCIEX OS para el análisis. En la Figura 3 se proporciona un ejemplo de identificación de metabolitos a partir de la adquisición de DDA.

## Análisis DIA usando la Adquisición SWATH

Contrariamente a la adquisición de DDA, donde un ion precursor se selecciona individualmente y se aísla para su fragmentación, en DIA, se usan ventanas de aislamiento más amplias de modo que se adquiere MS / MS en todos los compuestos detectables

en la muestra. La adquisición de SWATH de ventana variable garantiza un equilibrio óptimo entre la sensibilidad y la especificidad para cada tipo de muestra.<sup>1</sup> En este método, se utilizó el Calculador de ventana variable de adquisición SWATH3 para determinar los tamaños óptimos de ventana ajustando el tamaño de la ventana para normalizar el número total de iones por ventana. Un resumen de estas ventanas se presenta en la Figura 2.

A partir de los datos de adquisición de SWATH, todas las señales detectables se pueden buscar en bibliotecas espectrales para su identificación. La asignación de iones producto a iones precursores específicos se determina mediante el software utilizando la sustracción de fondo o la alineación de iones producto a iones precursores por PCVG. En este ejemplo,

**Table 4. Comparación del Número de Compuestos Identificados.** Utilizando una variedad de bibliotecas ordenados de forma creciente por tamaño, se comparó el número de analitos identificados de una muestra de plasma para la adquisición de DDA frente a SWATH.

Bibliotecas	Adquisición DDA	Adquisición SWATH
SCIEX AMMSL 2.0	62	94
SCIEX All-in-One libraries	93	140
NIST 17	248	325
Metlin	230	384
MoNA	134	259
Total	362	628

se realizaron búsquedas en las 16799 señales encontradas en los datos de adquisición SWATH en las bibliotecas espectrales, en comparación con solo 4864 señales con espectros del análisis DDA.

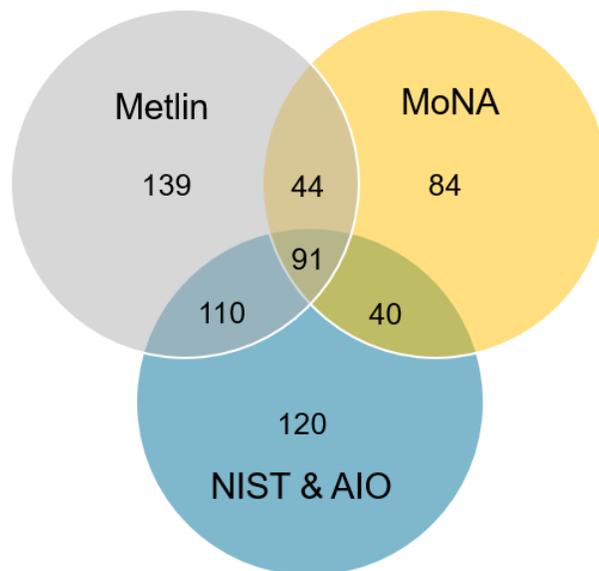
Las 12 mil señales adicionales no seleccionadas por DDA probablemente sean analitos de baja intensidad, ya que no se activaron en el método de los 20 principales DDA. Los datos de adquisición de SWATH arrojaron 266 compuestos adicionales que fueron identificados, aumentando el número total de compuestos de 362 a 628 identificados por coincidencia de precursores y coincidencia espectral MS/MS de una sola inyección de plasma humano extraído.

En la Figura 4 se muestra un ejemplo de un compuesto identificado por Adquisición SWATH que no fue identificado por el método DDA.

### Comparación de Bibliotecas Espectrales

Con el software SCIEX OS, se puede usar una variedad de bibliotecas para buscar los datos de adquisición DDA o SWATH.

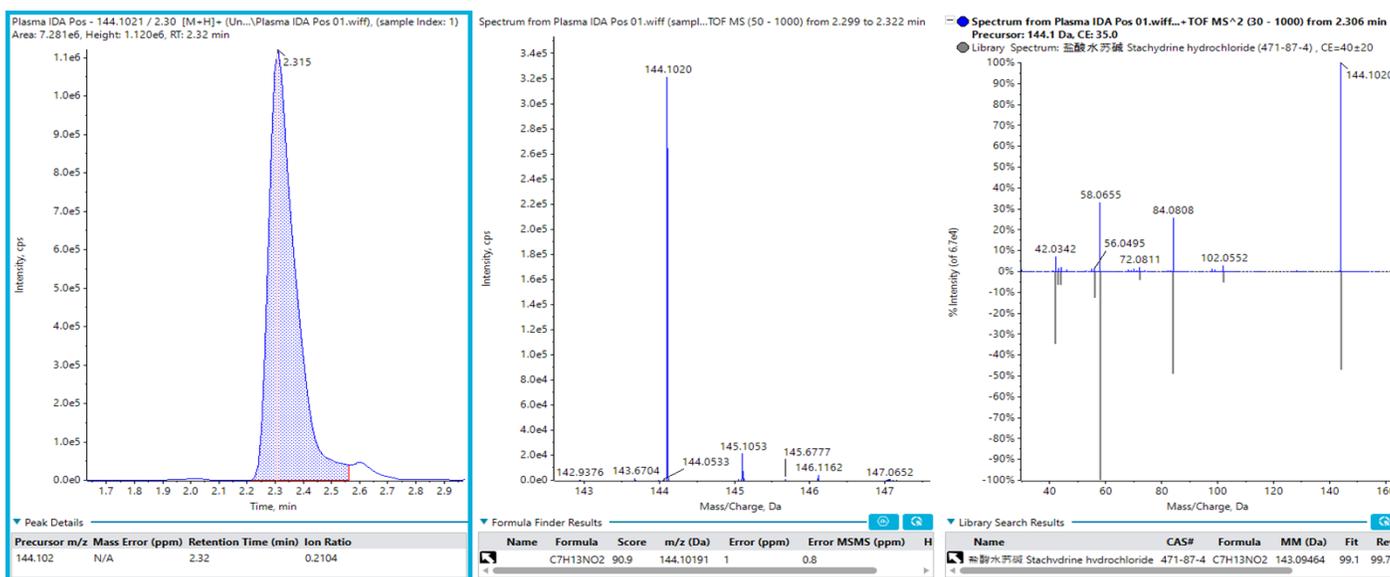
Aquí, se usaron varias bibliotecas diferentes que varían en tamaño y fuente para investigar la cantidad de metabolitos observados a partir de los datos de adquisición de DDA y SWATH. La Tabla 4 y la Figura 1 resumen los resultados de todas las búsquedas en la biblioteca en ambos conjuntos de datos. No es sorprendente que las bibliotecas grandes proporcionen más identificaciones. Además, los datos de adquisición de SWATH proporcionan identificaciones consistentemente más altas que DDA, también como se



**Figure 5. Superposición de Coincidencias de las Bibliotecas.** La distribución de los 628 compuestos identificados utilizando SWATH Acquisition se compara entre las bibliotecas individuales y su combinación.

esperaba debido a la naturaleza integral de la adquisición de datos.

A continuación, para comprender las diferencias proporcionadas mediante el uso de diferentes bibliotecas, los compuestos encontrados por cada enfoque se compararon y resumieron en la Figura 5. Como era de esperar, cuanto más grande es la biblioteca espectral, más coincidencias de biblioteca podrían obtenerse como se ve en la Tabla 4. Como el plasma a menudo



**Figure 6. Identificación de estaquidrina a partir de datos DDA.** La estaquidrina es un componente de los cítricos y, por lo tanto, no está incluida en la biblioteca AMMSL centrada en los metabolitos biológicos centrales. Esto se identificó en plasma extraído que una coincidencia con las bibliotecas SCIEX All-in-One y NIST 17.

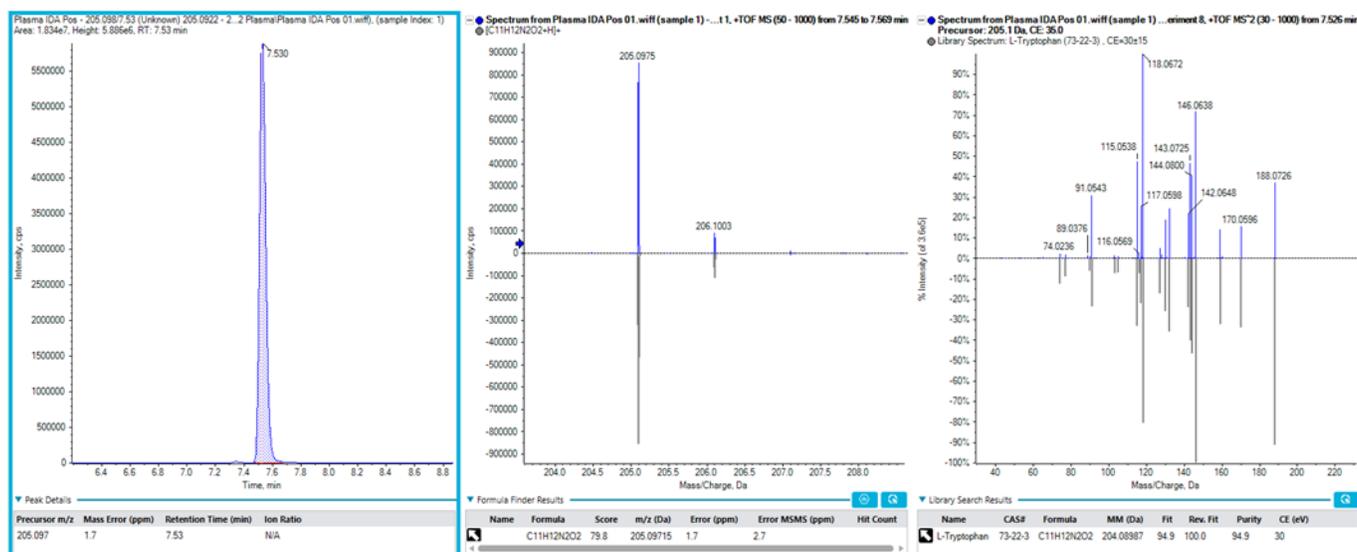


Figure 7. La identificación del triptófano en plasma extraído al presentar una coincidencia con la biblioteca de metabolitos SCIEX.

contiene más que solo metabolitos endógenos, el uso de bibliotecas con una cobertura más amplia puede proporcionar más identificaciones de características. Sin embargo, si centrarse en la biología humana es un componente clave del estudio, el uso de una biblioteca centrada en metabolitos endógenos (como el AMMSL) puede simplificar un estudio biológico.

Además, se descubrió que las bibliotecas variaban ampliamente en las identificaciones de compuestos encontradas, incluso entre las bibliotecas centradas en metabolitos. En el diagrama de Venn (Figura 5), había 249 señales identificadas usando la biblioteca METLIN que no fueron identificadas usando solo la biblioteca MoNA. De manera similar, se identificaron 124 señales usando la biblioteca MoNA que no se identificaron usando solo la biblioteca Metlin. Se identificaron 508 compuestos usando estas dos bibliotecas; sin embargo, solo 135 de esos compuestos fueron identificados usando ambas bibliotecas.

También se muestra en la Figura 5 que hubo 120 señales adicionales que se identificaron utilizando las bibliotecas NIST 17 y SCIEX All-in-One que no tenían coincidencias espectrales MS / MS en las bibliotecas METLIN o MoNA. Las bibliotecas todo en uno NIST 17 y SCIEX incluyen compuestos de clases adicionales que incluyen medicamentos, extraíbles, lixiviables, pesticidas, drogas ilícitas, alimentos, productos naturales, PFAS y más, que podrían estar presentes en matrices biológicas. Un ejemplo de una de estas coincidencias de biblioteca se presenta en la Figura 6, la estaquidrina se encuentra en cítricos y, por lo

tanto, no es un metabolito endógeno en plasma humano, sino un posible biomarcador para el consumo de cítricos.

## Conclusiones

Se usó un método RP-LC simple de 20 minutos para adquirir datos de adquisición de DDA y SWATH en una muestra de plasma humano extraída usando un sistema TripleTOF 6600. El método de los 20 principales DDA pudo identificar 362 de las señales en función de la masa precursora y la coincidencia espectral MS / MS. El método de Adquisición SWATH de 20 ventanas variables resultó en la identificación de 266 señales adicionales, para un total de 628 compuestos identificados en una sola inyección. Este estudio ha demostrado que la Adquisición SWATH de ventana variable puede ser útil para mejorar la identificación de compuestos cuando se utilizan enfoques de adquisición no dirigidos para metabolómica. En el análisis global de metabolómica global de los biofluidos, y especialmente del plasma u orina humanos, estarán presentes numerosos analitos que no son metabolitos, que provienen de fuentes como el medio ambiente, los alimentos y los medicamentos. Estos analitos tienen el potencial de complicar el análisis de datos que aparecen como incógnitas, posiblemente mostrando perfiles similares a biomarcadores o diferencias de sobre o sub regulación. Este estudio demostró que la inclusión de bibliotecas no metabolómicas puede aumentar la identificación de otras características en el conjunto de datos. Además, se demostró que incluso en bibliotecas centradas en la metabolómica, todavía existen diferencias significativas en la cobertura de identificación de metabolitos.

## References

1. Improved Data Quality Using Variable Q1 Window Widths in SWATH® Acquisition. SCIEX Technical note RUO-MKT-02-2879-B.
2. SWATH® Acquisition Improves Metabolite Coverage over Traditional Data Dependent Techniques for Untargeted Metabolomics, SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-7128A
3. SWATH Acquisition Variable Window Calculator - <https://sciex.com/software-support/software-downloads>

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10617-A. AB SCIEX™ is being used under license.



**Headquarters**  
500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA  
Phone 508-383-7700  
[sciex.com](https://sciex.com)

**International Sales**  
For our office locations please call the division  
headquarters or refer to our website at  
[sciex.com/offices](https://sciex.com/offices)