

应用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统检测生物样品中90种胺类代谢物

Determination of 90 Amine- and Phenol-Containing Metabolites in Biological Samples on SCIEX Triple Quad™ 4500 system

陈慧敏, 龙志敏, 郭立海

Chen Huimin, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Keywords: SCIEX Triple Quad™ 4500 System, Amino Acids, Metabolomics, Biological Samples

引言

氨基酸及其衍生物是人类生理过程的常用生物标志物。它们在人体体液中的识别和定量提供了对人类健康的深刻见解。许多研究发现, 在癌症患者和其他增生性疾病患者的生物液和受影响的组织中, 多胺及其代谢物的含量明显较高。一些治疗性多胺类似物已被证明在治疗癌症和其他高增殖性疾病方面具有潜在的用途。含胺代谢物的检测可能用于癌症及其他疾病研究^[1-2]。

目前利用LC-MS/MS同时检测多种含胺代谢物类的主要挑战在于生物基质中大量极性代谢物的检测。亲水性化合物在反相(RP)LC固定相上保留很差, 在复杂生物基质中易发生信号抑制。在本文的研究中通过衍生化可以有效改善代谢物色谱行为和灵敏度。本文采用丹磺酰氯作为衍生化试剂对含伯胺、仲胺的代谢物进行衍生化, 从而增加胺类物质在反相色谱中的保留能力, 并提高在质谱检测中的离子化效率, 达到提高胺类物质定量准确性和检测灵敏度的目的, 并利用SCIEX Triple Quad™ 4500系统建立了15 min一针同时检测90个含胺代谢物的定量方法。该方法对胺类代谢物覆盖面广(包括氨基酸及其甲基化、乙酰化产物等), 利用小鼠组织样本中检测72种胺类代谢物, 提供了胺类物质代谢组的轮廓信息, 并进行差异分析。另外利用该方法分别检测了小鼠血浆和尿液样本中71种和88种胺类代谢物。

仪器设备

ExionLC™ AD系统 + SCIEX Triple Quad™ 4500系统



样本前处理:

血浆样本: 取100 μL血浆, 加入300 μL甲醇, 震荡1 min, 静置1 h (4 °C), 14000 rpm离心10 min, 取上清冻干保存。

尿液样本: 50 μL尿液用水稀释1倍, 之后同血浆样本处理方法。

组织样本: 样本称重20-30 mg置于EP管中, 加入800 μL遇冷至-80 °C的甲醇, 匀浆破碎, 4 °C下14000 rpm离心10 min, 上清转移冻干保存于-80 °C中。

衍生化反应：

复溶冻干样本，取上清液50 μL ，加入30 μL 丹磺酰氯乙腈溶液(10 mg/mL)和40 μL 的0.5 M碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液，封口并迅速混匀，置于60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应30 min，取出加入10 μL 0.25 M NaOH，再次60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应10 min。随混合物冷却至室温后加入70 μL 的10%甲酸溶液，1 μL 进样。整个处理过程应尽可能迅速，且避光^[3]。

丹磺酰氯衍生化伯胺或仲胺的反应原理如图1a，如果一个化合物有多个相应基团可能会和多个丹磺酰氯发生反应。经过衍生后的化合物在LC-MS/MS中的特征裂解碎片见图1b，对应质荷比分别为m/z 170和m/z 156。

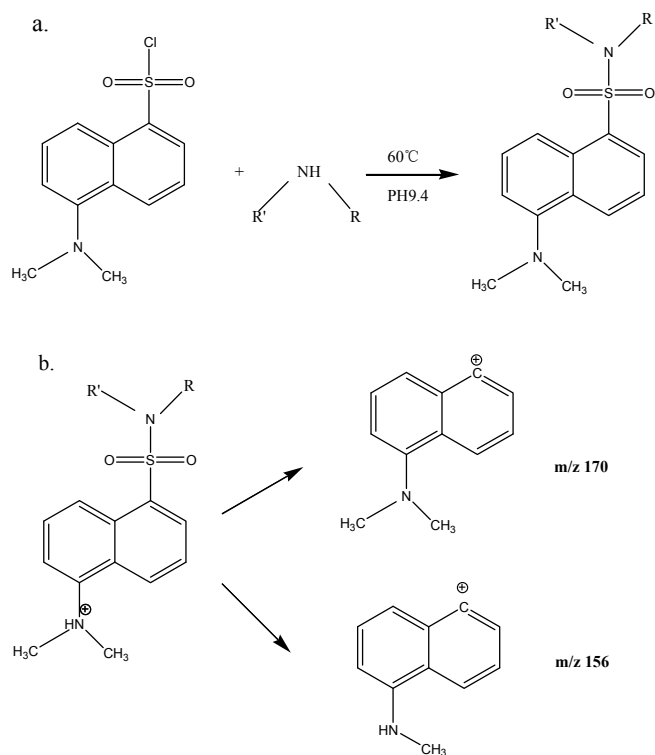


图1. a丹磺酰氯衍生化伯胺或仲胺的反应原理，b衍生后的待测物离子在LC-MSMS中易裂解产生的两个碎片。

液相条件：

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18, 2.1 \times 50 mm, 2.6 μm ；

流动相：采用梯度洗脱

A为水（0.1%的甲酸）；

B为乙腈（0.1%的甲酸）；

流速：0.17 mL/min；

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量：1 μL ；

表1. 液相洗脱梯度。

时间 (min)	A (%)	B (%)
2	85	15
3.5	65	35
6	60	40
8.5	58	42
10.5	40	60
11.5	5	95
12	5	95
12.5	0	100
13	0	100
13.1	85	15
15	85	15

质谱方法：

扫描方式：ESI+

ESI离子源参数：

气帘气CUR：35 psi；

碰撞气CAD：7 psi；

IS电压：5500 V；

源温度：550 $^{\circ}\text{C}$ ；

雾化气GAS 1：55 psi；

辅助气GAS 2：55 psi；

实验结果：

1. 尿液，组织和血浆样本的检测结果

本文根据标准品以及相关文献^[3-4]利用SCIEX Triple Quad™ 4500系统建立了复杂生物样品中90种胺类代谢物的检测方法。图2a,b和c分别为小鼠尿液、组织和血浆中检测到的代谢物提取离子流图。其中在尿液中88种代谢物都能被检测到，而组织和血浆中分别能检测到72和71种。

表2. 90种胺类代谢物的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	Dwell Time	DP	CE
Glucosamine	413.14	170.1	8	60	35
2-Aminoadipic acid	395.13	170.1	8	60	30
4-Aminobutyric acid	337.12	170.1	8	60	30
4-Hydroxyproline	365.12	170.1	8	60	30
5-Glutamylcysteine	484.12	170.1	8	60	40
5-Oxoproline	363.10	170.1	8	60	30
Alanine	323.11	170.1	8	60	30
Alanyl-glutamine	451.16	170.1	8	60	40
Arginine	204.60	156.1	8	60	30
Asparagine	366.11	170.1	8	60	30
Aspartic acid	367.10	170.1	8	60	35
Citrulline	409.15	170.1	8	60	35
Cystathionine	345.09	170.1	8	60	35
Cysteine	355.08	170.1	8	60	35
Cystine	354.07	170.1	8	60	40
Glutamic acid	381.11	170.1	8	60	30
Glutamine	380.13	170.1	8	60	30
Glycine	309.09	170.1	8	60	30
Histidine	622.18	170.1	8	60	45
Isoleucine	365.15	170.1	8	60	30
DL-Kynurenine	442.14	170.1	8	60	30
Leucine	365.15	170.1	8	60	30
Lysine	307.10	170.1	8	60	30
Methionine	383.11	170.1	8	60	30
Methionine sulfoxide	399.10	170.1	8	60	35
N-Acetylaspartic acid	409.11	170.1	8	60	35
N-Acetylcysteine	397.09	170.1	8	60	35
Ornithine	599.20	170.1	8	60	45
Phenylalanine	399.14	170.1	8	60	35
Pipecolic acid	363.14	170.1	8	60	30
Proline	349.12	170.1	8	60	30
Serine	339.10	170.1	8	60	35
Threonine	353.12	170.1	8	60	30
Tryptophan	438.15	170.1	8	60	30
Tyrosine	208.10	156.1	8	60	35
Valine	351.14	170.1	8	60	30
4-Aminobenzoic acid	371.11	156.1	8	80	45
Guanine	385.11	170.1	8	60	30
2-Aminoethanol	295.11	170.1	8	60	30
4-Hydroxyphenyllactic acid	416.12	170.1	8	60	30
Histamine	578.19	170.1	8	60	30
O-Phosphoethanolamine	375.08	170.1	8	60	30
Boc-D-Tyr-OH	515.18	170.1	8	60	45
D-Homoserine	353.12	170.1	8	60	30
Saccharopine	510.19	170.1	8	60	45

Compound	Q1	Q3	Dwell Time	DP	CE
Argininosuccinic acid	759.25	170.1	8	60	45
β -alanine	323.11	170.1	8	60	35
L-Homoarginine	422.19	170.1	8	60	40
L-Homocitrulline	423.17	170.1	8	60	40
DL-3-Aminoisobutyric acid	337.12	170.1	8	60	30
2-Aminoisobutyric acid	337.13	170.1	8	60	25
5-Aminovaleric acid	351.13	170.1	8	60	30
L-2-Aminobutyric acid	337.13	170.1	8	60	30
DL-2,6-Diaminopimelic acid	424.15	170.1	8	60	40
6-Aminocaproic acid	365.15	170.1	8	60	30
L-Norvaline	351.14	170.1	8	60	30
D-(-)- α -Phenylglycine	385.12	170.1	8	60	35
L-Norleucine	365.15	170.1	8	60	30
Serotonin	643.20	170.1	8	80	35
Tryptamine	394.16	170.1	8	60	30
4-aminohippuric acid	428.13	170.1	8	60	40
5-Hydroxyindoleacetic acid	425.12	170.1	8	80	35
3-Aminosalicylic acid	387.11	170.1	8	60	30
Taurine	359.07	170.1	8	60	25
Hypotaurine	343.08	170.1	8	60	40
Djenkolic Acid	488.10	170.1	8	60	40
DL-Ethionine	397.13	170.1	8	60	30
DL-Homocysteine	369.09	170.1	8	60	30
DL-Lanthionine	675.16	170.1	8	60	40
L-Carnosine	460.16	170.1	8	60	30
L-Anserine	354.12	170.1	8	60	30
Ala-leu	436.19	170.1	8	60	40
Sarcosine	323.11	170.1	8	60	25
3-Methyl-L-histidine	403.14	170.1	8	60	35
N ϵ , N ϵ , N ϵ -Trimethyllysine	422.21	170.1	8	60	40
Asymmetric dimethylarginine	436.20	170.1	8	60	40
O-acetyl-L-serine	381.11	170.1	8	60	30
N α -Acetyl-L-lysine	422.17	170.1	8	60	40
DL-5-Hydroxylysine	315.11	170.1	8	60	30
5-Hydroxy-L-tryptophan	687.19	170.1	8	60	40
4-Hydroxy-L-isoleucine	381.15	170.1	8	60	30
Prolinamide	348.14	170.1	8	60	30
2-Amino-2-methyl-1-propanol	323.14	156.1	8	60	40
Methylguanidine	307.12	170.1	8	60	30
Homocarnosine	354.12	156.1	8	60	30
Aminolevulinic acid	365.12	170.1	8	60	30
Metanephine	431.16	170.1	8	60	40
Salicylic acid	429.11	170.1	8	60	35
3-Hydroxyanthranlic acid	387.10	170.1	8	60	30
3-Methyl-L-histidamine	359.15	170.1	8	60	35

图2a

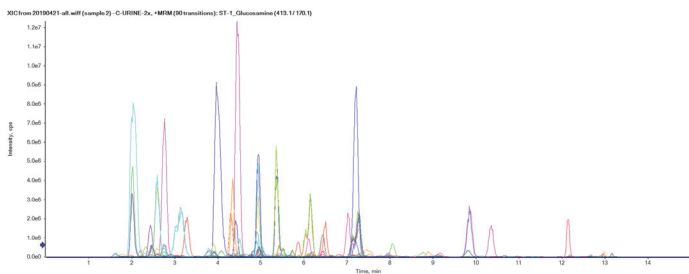


图2b

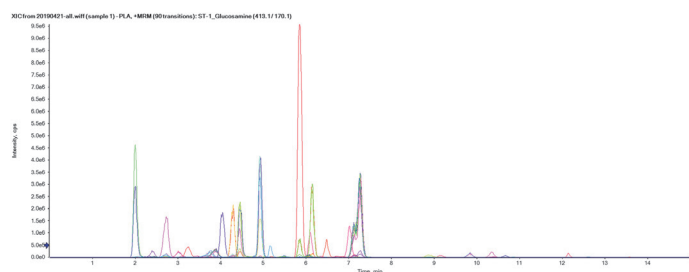


图2c

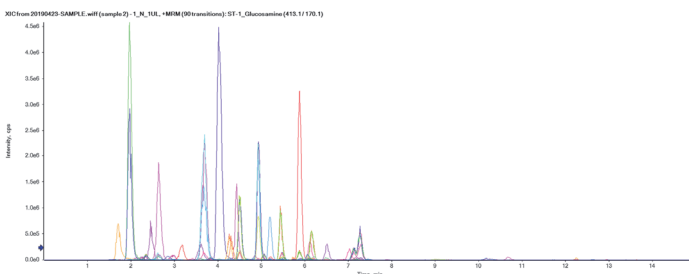


图2. a尿液、b组织和c血浆中90种胺类代谢物的提取离子流图。

另外为验证该方法在生物样品中的稳定性以及可靠性，我们利用测得的峰面积对6个批次处理组织样本（进行了批间精密度考察，另外对一个批次处理的6个平行样做了批内精密度考察。精密考察结果中测得的所有化合物的RSD<20%。其中批内精密度考察结果内52个化合物RSD<10%，批间精密度考察结果中58个化合物RSD<10%，详细结果见表3。该结果表明该方法的稳定可靠，可用于生物样本中胺类代谢物的检测。

2. 癌组织和癌旁组织中胺类代谢物的靶向差异分析

此外，本文共检测了16个组织样品用于差异性分析，实现该方法在靶向代谢组学中的应用。16个样本中8个为癌症模型小鼠的癌组织，另外8个为对应癌旁组织。利用该LC-MS/MS方法对这批样本中胺类代谢物进行了半定量的分析。

首先，我们对这两组样品测得峰面积结果进行了PLSDA分析，从图3中可以看出这两组样品很明显的被区分开来，说明胺类代谢物在癌组织及癌旁组织中有显著差异。

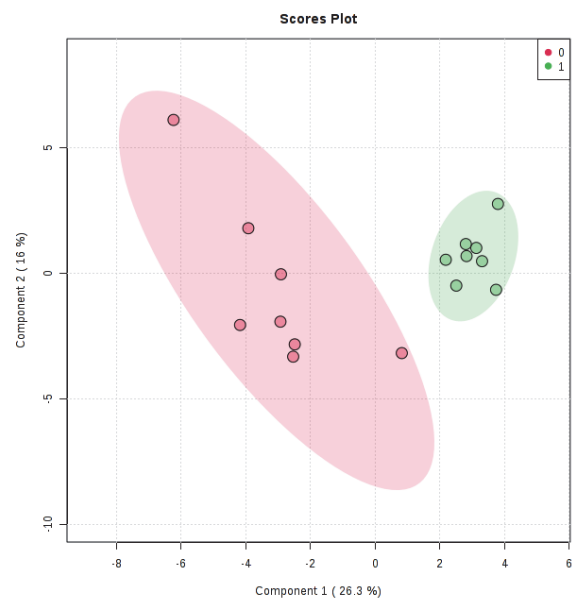


图3. 两组组织样品的PLSDA图（0对应癌组织，1对应癌旁组织）。

接着，我们对这两组数据进行了热图分析，从图4中可以更直观地看出每种代谢物含量在不同组别中的变化。

最后，为了找出变化差异明显的氨基酸成分，我们对组织中测得的胺类代谢物进行了统计分析，得到每种代谢物在两组样品中的p-value和fold change (FC) 值（图5），通过p-value < 0.05和FC>2的筛选，共有7种代谢物有显著变化。癌组织中Cystathionine、Methylguanidine、Guanine、Histamine 4种胺类代谢物含量比癌旁组织低，β-alanine、DL-Kynurenine和Aminolevulinic acid 3种胺类代谢物的含量更高，详情见表4，箱状图见图6。

表3. 方法的批间和批内精密度考察。

化合物	批内精密度 (n=6)		批间精密度 (n=6)	
	Mean (cps)	RSD (%)	Mean (cps)	RSD (%)
D-Homoserine	2.44E+03	9.95	2.42E+03	6.97
Argininosuccinic acid	2.71E+03	16.91	5.22E+03	5.49
β -alanine	2.67E+04	7.47	6.52E+04	4.80
L-Homoarginine	6.14E+03	8.00	6.44E+03	5.83
L-Homocitrulline	4.81E+03	9.49	4.11E+03	4.36
DL-3-Aminoisobutyric acid	1.37E+04	11.57	4.00E+04	9.67
5-Aminovaleric acid	2.75E+05	6.15	3.67E+06	3.00
L-2-Aminobutyric acid	2.88E+05	8.38	2.25E+05	4.99
DL-2,6-Diaminopimelic acid	1.60E+04	9.16	1.44E+04	9.78
L-Norvaline	2.34E+06	7.17	8.47E+06	6.89
D-(-)-α -Phenylglycine	2.19E+03	13.63	1.75E+03	10.17
L-Norleucine	5.76E+04	8.35	2.87E+05	4.53
Taurine	3.04E+07	3.95	2.53E+07	7.19
Hypotaurine	2.10E+03	10.42	1.77E+03	10.42
DL-Homocysteine	8.69E+03	12.10	2.23E+04	4.83
Ala-leu	5.28E+03	6.07	5.05E+03	4.80
Sarcosine	1.05E+05	9.60	1.60E+05	1.71
3-Methyl-L-histidine	4.68E+04	7.13	5.39E+04	7.28
N ε ,N ε ,N ε - Trimethyllysine	1.22E+05	9.86	1.48E+05	2.26
Asymmetric dimethylarginine	6.93E+04	9.83	2.54E+05	6.16
N α -Acetyl-L-lysine	5.02E+04	8.46	2.02E+04	7.77
4-Hydroxy-L-isoleucine	8.63E+03	8.07	8.74E+03	13.67
Prolinamide	3.17E+04	8.44	9.31E+03	6.52
2-Amino-2-methyl-1-propanol	1.91E+03	12.93	8.76E+03	7.56
Methylguanidine	5.25E+03	9.99	1.77E+03	15.31
aminolevulinic acid	1.17E+05	6.19	3.33E+04	7.33
3-Methyl-L-histidamine	8.13E+05	3.35	1.99E+05	9.34
2-Amino adipic acid	1.66E+04	11.35	7.50E+04	5.98
4-Aminobutyric acid	1.07E+06	6.89	6.01E+05	0.30
4-Hydroxyproline	4.26E+05	10.34	3.73E+05	3.27
5-Glutamylcysteine	2.32E+07	8.53	1.30E+07	7.79
5-Oxoproline	1.77E+04	9.64	7.11E+03	7.36

化合物	批内精密度 (n=6)		批间精密度 (n=6)	
	Mean (cps)	RSD(%)	Mean (cps)	RSD(%)
Alanine	9.06E+06	6.36	2.11E+07	4.55
Arginine	1.46E+05	9.26	4.82E+05	2.02
Asparagine	2.19E+05	9.53	2.53E+06	2.15
Aspartic acid	3.39E+06	2.69	6.45E+06	7.38
Citrulline	2.02E+06	6.70	4.50E+05	3.66
Cystathionine	6.01E+05	3.62	3.71E+05	7.20
Cysteine	6.20E+04	5.67	2.35E+05	5.25
Cystine	4.68E+03	9.44	1.10E+04	3.81
Glutamic acid	1.39E+07	4.18	3.66E+07	5.76
Glutamine	5.68E+06	4.88	6.47E+06	4.24
Glycine	5.89E+06	6.78	1.39E+07	1.27
Histidine	3.99E+05	7.44	6.10E+05	4.41
Isoleucine	3.59E+05	7.29	1.83E+06	4.73
DL-Kynurenine	1.45E+03	7.23	1.38E+05	11.37
Leucine	2.55E+06	7.66	8.66E+06	6.02
Lysine	1.47E+05	8.52	9.06E+05	8.30
Methionine	7.40E+05	8.45	3.84E+06	4.60
D-Methionine sulfoxide	7.32E+04	4.56	1.70E+05	8.66
N-Acetylaspartic acid	1.15E+04	13.73	6.12E+03	10.49
Ornithine	5.98E+04	12.71	4.57E+04	10.38
Phenylalanine	1.41E+06	9.05	2.27E+06	4.61
Pipecolic acid	1.02E+04	11.37	6.39E+03	5.72
Proline	4.99E+06	6.12	1.79E+07	6.09
Serine	9.34E+05	4.17	3.35E+06	4.49
Threonine	1.57E+06	7.99	5.62E+06	6.56
Tryptophan	6.50E+04	8.23	1.28E+05	12.85
Tyrosine	5.79E+04	9.20	1.02E+05	9.51
Valine	2.35E+06	8.58	8.00E+06	5.47
4-Aminobenzoic acid	1.62E+03	12.75	4.50E+03	6.90
Guanine	1.61E+04	10.38	2.20E+04	4.24
2-Aminoethanol	7.80E+05	8.17	1.57E+06	6.24
4-Hydroxyphenyllactic acid	5.93E+03	14.61	4.44E+03	8.26
Histamine	5.97E+03	6.40	2.76E+04	3.00
O-Phosphoethanolamine	6.36E+05	4.35	7.88E+06	8.91

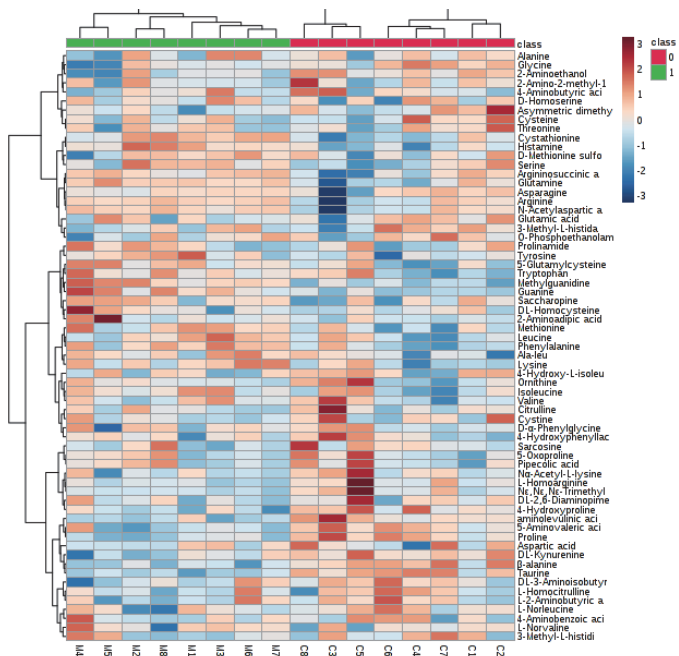


图4. 两组组织样品的热图（0对应癌组织，1对应癌旁组织）。

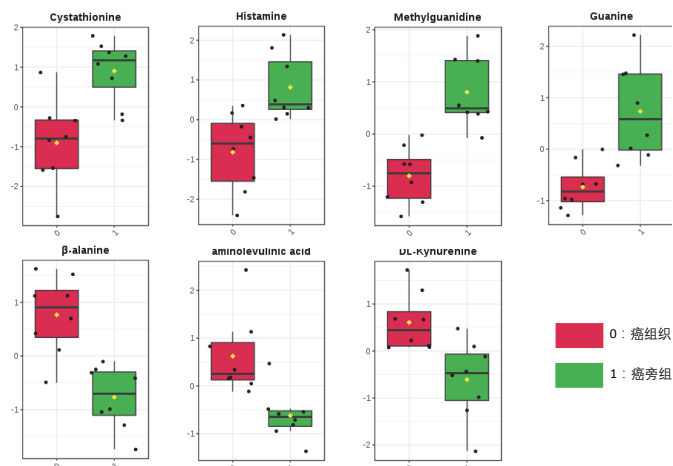


图6. 两组组织样品中7个差异化合物的箱状图。

通过该方法在靶向代谢组学中的应用，利用检测到的差异物结合体内代谢通路分析，并结合文献分析，癌症与氨基酸代谢通路有着显著相关性，可以为癌症机制及临床治疗方案研究提供基础。

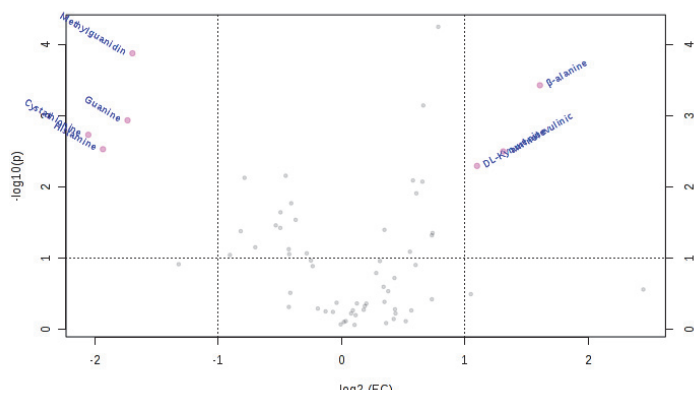


图5. 两组组织样品中胺类代谢物含量的火山图。

表4. 癌组织和癌旁组织中差异明显的化合物。

差异化合物名称	Fold Change	p.value	癌组织含量
Cystathionine	0.24103	0.00013145	Down
Histamine	0.2617	0.00036933	Down
Guanine	0.30046	0.0011478	Down
Methylguanidine	0.30888	0.0018332	Down
β-alanine	3.0461	0.0029219	Up
Aminolevulinic acid	2.4787	0.0031365	Up
DL-Kynurenine	2.1398	0.005015	Up

小结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500系统建立了高效快速的90种胺类代谢物LC-MS/MS检测方法，可用于组织、血浆和尿液中胺类代谢物的靶向研究。该方法耗时短，所用色谱柱常规易得，并在多个复杂的生物样品中进行了验证，不仅能高效准确地检测出样品中的代谢物成分，而且能够提供有效地差异性分析，为高通量分析不同疾病模型下胺类代谢物的差异提供了快速可靠的方法。

参考文献

1. Casero, R. A., Marton, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2007, 6, 373-390;
2. Khuhawar, M. Y., Qureshi, G. A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chromatogr., B* 2001, 764, 385-407;
3. Kevin Guo, Liang Li. Differential 12C-/13C-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome. *Anal. Chem*, 2009, 81, 3919-3932;

4. Khamis M.M. et al. Comparison of accuracy and precision between multipoint calibration, single point calibration, and relative quantification for targeted metabolomic analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11082-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)