

UHPLC-MS为基础的靶标代谢组学方法快速

定量分析氨基代谢物

王琪¹

(1.复旦大学人类表型组研究院 生命科学学院, 上海 200438)

摘要: 生物体中含有氨基的代谢物很多, 包括氨基酸, 氨基酸衍生物, 生物胺, 儿茶酚胺, 芳香胺等等。这些氨基代谢物在生物体中都发挥着重要的作用。对这些氨基代谢物的检测分析显然能够反映机体的不同生理病理状态, 对疾病诊断, 生理病理的研究具有重要意义。

本研究采用新的柱前衍生化试剂 5-氨基异喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯应用 UHPLC-ESI-MS/MS 对含氨基代谢物进行分析。本方法可以同时定量含巯基, 二硫键氨基代谢物以及易氧化的氨基代谢物, 芳香胺等 124 种代谢物包括 4 种氨基糖, 20 种蛋白氨基酸, 57 种非蛋白氨基酸, 17 种修饰氨基酸, 26 种脂肪胺, 8 种芳香胺, 22 种含硫物质, 14 种神经递质, 8 种小肽。定量分析的氨基代谢物涵盖了超过 20 多种代谢通路如蛋白质合成/降解, 肠道菌群的代谢, 精氨酸, 谷胱甘肽和神经递质的合成, 尿素循环, 尿苷分解, 多胺通路等等。本方法已广泛应用。

关键词: 氨基类代谢物; 超高效液相质谱联用; 衍生化;

中图分类号: Q591

文献标识码: 期刊[J]

Target metabolomics method for rapid Quantitative analysis of amino metabolites based on UHPLC-MS/MS

Wang Qi¹

(1. Human phenome Institute, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: Amino metabolites are widely involved in living organisms, including amino acids, amino acid derivatives, biogenic amines, catecholamines, aromatic amines, and so on. These amino metabolites play important roles in organisms. The detection and analysis of these amino metabolites can clearly reflect the different physiological and pathological states of the body, which is of great significance for disease diagnosis and physiological and pathological research. This study used a new pre column derivatization reagent, 5-aminoisoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate, to analyze amino metabolites using UHPLC-ESI-MS/MS. This method can simultaneously quantify 124 metabolites including sulfhydryl, disulfide, and easily oxidized amino groups, including 4 amino sugars, 20 protein amino acids, 57 non protein amino acids, 17 modified amino acids, 26 fatty amines, 8 aromatic ami

nes, 22 sulfur containing substances, 14 neurotransmitters, and 8 small peptides. Quantitative analysis of amino metabolites encompasses over 20 metabolic pathways, such as protein synthesis/degradation, gut microbiota metabolism, synthesis of arginine, glutathione and neurotransmitters, urea cycle, uridine breakdown, polyamine pathway, and more. This method has been widely applied.

Keywords: Paraquat, UHPLC-MS/MS, *Arabidopsis*,

生物体中含氨基的代谢物很多, 包括蛋白氨基酸和含有羰基, 磺基的非蛋白氨基酸, 甲基化, 乙酰化, 磷酸化的修饰氨基酸, 脂肪胺, 芳香胺, 小肽, 儿茶酚胺, 含巯基和二硫键的氨基代谢物。这些氨基代谢物在生物体内涵盖多个代谢通路, 都发挥着重要的生物学作用。这些代谢物的缺乏会引起相应代谢紊乱, 对这些氨基代谢物的检测显然能够反映机体的不同生理病理状态, 对疾病诊断, 生理病理的研究具有重要意义。含氨基代谢物的检测通常选用衍生化的方法, 传统的衍生化方法主要用光学检测器, 现在也有很多报道设计新的衍生化试剂适合质谱检测。目前, 对氨基代谢物的检测大多是针对性质稳定的氨基酸等物质检测, 而对于容易氧化氨基酸如半胱氨酸, 儿茶酚胺等含氨基代谢物, 通常选择单独做前处理有针对性的进行检测。

本方法使用已合成的衍生化试剂, 建立对含氨基代谢物的 UHPLC-ESI-MS/MS 的靶标代谢组学检测方法, 并且方法可以同时多种类型的含氨基代谢检测, 包括蛋白氨基酸和含有羰基, 磺基的非蛋白氨基酸, 甲基化, 乙酰化, 磷酸化的修饰氨基酸, 脂肪胺, 芳香胺, 小肽, 儿茶酚胺, 含巯基和二硫键的氨基代谢物。成功建立的方法应用于生物样品中检测。本文建立的对氨基代谢物的靶标代谢组学的方法可以用于多种生物样品的分析检测, 还可以为临床诊断, 生物标志物发现等领域, 提供可信的分析数据。

1 材料与amp;方法

1.1 衍生化试剂的准备

衍生化试剂 5-AIQC 溶液干燥乙腈溶液中浓度为 20mg/mL。80 μ L NEM 溶液 (2.5mM, 溶于 100mM pH7.0 磷酸缓冲溶液, 其中含有 10mM 抗坏血酸 10mM EDTA, 7%DMSO), 加入 10 μ L 标准溶液或生物样品中, 涡旋 1min, 再加入 10 μ L TBBT 溶液 (1M, DMSO), 涡旋混合 2min。然后, 加入 700 μ L 200mM pH 8.8 硼酸缓冲溶液 (20mM TCEP, 1mM 抗坏血酸), 最后加入 200 μ L 5-AIQC 溶液, 55 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10min, 反应混合溶液室温冷却, 加入 10 μ L 甲酸。衍生反应完全后在进入 UHPLC 系统分析之前, 于 -20 $^{\circ}$ C 密封储存。

1.2 UHPLC-ESI-MS/MS 方法

色谱柱是 Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HD 2.1 x100 mm, 1.8 μ m Agilent Technologies US。柱温为 50 流动相为 A 超纯水 MilliQ 流动相 B 为 0.1% 甲酸的甲醇溶液。洗脱梯度: (B%): 0-2 min=1%, 2-4 min=1-3.8%, 4-8 min=3.8-22%,

8–12min=22-25%, 12–13min=25-60%, 13.5–13.51min=60-80%, 13.51–16 min=95%。流速为 0.6mL/min, 进样量为 1 μ L。

ESI-QqQ-MS 采用正离子模式的 MRM 方法: 扫描模式为 MRM 模式, 共同的子离子为 m/z 171, 碰撞能和 DP 分别对每个衍生标准品进行优化。

2 结果及结论

5-AIQC 与氨基反应产物为对称脲形式, 所有衍生物具有共同的来源于 5-AIQC 的氨基异噻啉基团的碎片离子 m/z 171。这些氨基衍生物疏水性更强, 适合反相 UHPLC-MS/MS 分析且具有更高的灵敏度。开发的方法可以同时定量 124 种氨基代谢物, 包括 4 种氨基糖, 20 种蛋白氨基酸, 57 种非蛋白氨基酸, 17 种修饰氨基酸, 26 种脂肪胺, 8 种芳香胺, 22 种含硫物质, 14 种神经递质, 8 种小肽 (如 Figure 1)。此方法可以鉴别大多数具有相同 m/z 的物质或同分异构体。

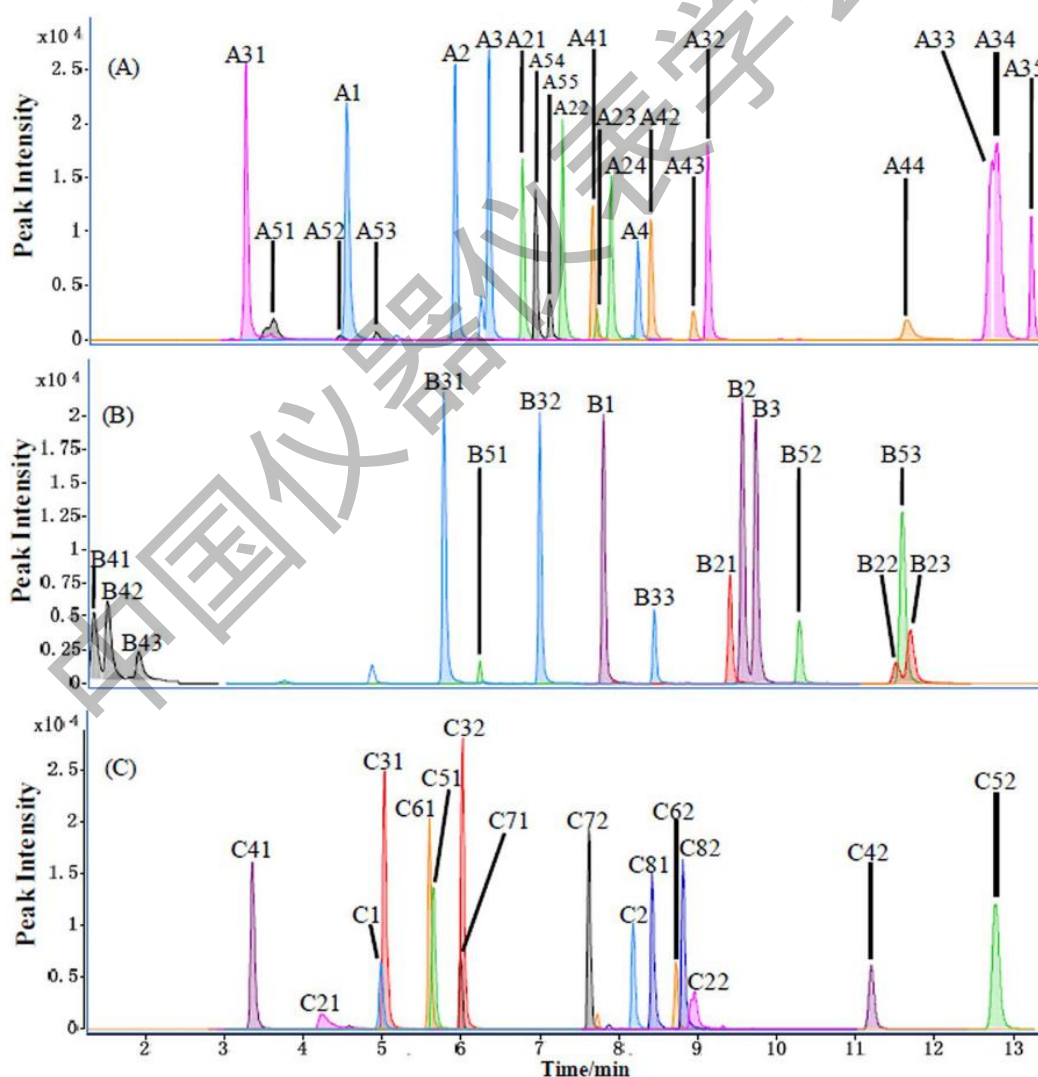


Figure1 5-AIQC 标记的氨基分析物组的 UHPLC-MS/MS 色谱图。(A) 离子 m/z 260 (A1: sarcosine; A2: β -alanine; A3: L-alanine; A4: 2-amino-2-methyl-1-propanol); ion m/z 274 (A21: γ -aminobutyric acid;

A22: DL-3- aminoisobutyric acid; A23: 2-aminoisobutyric acid; A24: L-2-aminobutyric acid); ion m/z 302 (A31: trans-4- hydroxy-L-proline; A32: 6-aminocaproic acid; A33: L-isoleucine; A34: L-leucine; A35: L-norleucine); ion m/z 324 (A41: (±)-octopamine; A42: dopamine; A43: 3-hydroxyanthranilic acid; A44: 3-aminosalicylic acid); ion m/z 340 (A51: L-cysteic acid; A52: 3-methyl-L-histidine; A53: 1-methyl-L-histidine; A54: (-)-norepinephrine; A55: 5-hydroxydopamine). (B) 离子 m/z 288 (B1: 5-aminovaleric acid; B2: L-valine; B3: L-norvaline); ion m/z 308 (B21: tyramine; B22: 3-aminobenzoic acid; B23: 4-aminobenzoic acid); ion m/z 318 (B31: L-glutamic acid; B32: o-acetyl-L-serine; B33: 4-hydroxy-L-isoleucine); ion m/z 350 (B41: D-mannosamine; B42: D-(+)- glucosamine; B43: D-(+)-galactosamine); ion m/z 373 (B51: asymmetric dimethylarginine; B52: cysteamine; B53: Ala-Leu). (C) 离子 m/z 280 (C1: hypotaurine; C2: 4-aminophenol); ion m/z 282 (C21: histamine; C22: cystathionine); ion m/z 290 (C31: D-homoserine; C32: L-threonine); ion m/z 334 (C41: 1-deoxynojirimycin; C42: DL-ethionine); ion m/z 336 (C51: DL-methionine sulfoxide; C52: DL-phenylalanine); ion m/z 352 (C61: DL-methionine sulfone; C62: L-tyrosine); ion m/z 359 (C71: L-homoarginine; C72: Na-acetyl-L-lysine); ion m/z 208 (C81: 1,3-diaminopropane; C82: 1,2-diaminopropane).

以上方法应用到多项研究上, 氨基代谢物的定量方法[1]和按蚊通过肠道微生物群中的色氨酸分解代谢来防止寄生虫感染研究中[2]及天冬氨酸增强 mTORC1 信号传导, 促进脂肪组织的产热和糖酵解的研究中[3]。

参考文献:

- [1]Wang J, Zhou L, Lei H, et al. Simultaneous quantification of amino metabolites in multiple metabolic pathways using ultra-high performance liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Sci Rep*[J]. 2017;7(1):1423. doi:10.1038/s41598-017-01435-7
- [2]Feng Y, Peng Y, Song X, et al. Anopheline mosquitoes are protected against parasite infection by tryptophan catabolism in gut microbiota. *Nat Microbiol*[J]. 2022;7(5):707-715. doi:10.1038/s41564-022-01099-8
- [3]Xu Y, Shi T, Cui X, et al. Asparagine reinforces mTORC1 signaling to boost thermogenesis and glycolysis in adipose tissues[J]. *EMBO J*. 2021;40(24):1-14. doi:10.15252/emboj.2021108069