

论著·基础研究

氨基类神经递质的 *N*-乙基化法 UHPLC-MS/MS 定量分析技术

薛海斯, 唐惠儒

复旦大学生命科学学院, 上海 200438

[摘要] **目的**·为了研究氨基类神经递质的含量变化对生物体的生理及病理生理过程的影响, 探讨这类代谢物的高灵敏定量分析方法。**方法**·使用乙醛与氰基硼氢化钠 (NaBH_3CN) 的一对稳定同位素标记试剂分别对氨基类神经递质进行 *N*-乙基化柱前衍生, 采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS), 对 20 种氨基类神经递质进行一次高灵敏内标定量分析。**结果**·方法学验证表明该 20 种氨基类神经递质均呈现良好的线性关系 (相关系数 $R^2 > 0.9910$); 除组胺检测限为 36.5 fmol 外, 其余物质均在 0.5 ~ 10 fmol 范围; 日间差及日内差的相对标准偏差低于 15%。使用该方法对人尿液、血清及唾液样本中的氨基类神经递质进行定量检测分析, 分别可检测到 14、10 及 8 种神经递质。**结论**·该方法具有较高检测灵敏度及精密度, 可用于人尿液、血清及唾液样本中神经递质的定量分析; 与已有方法相比, 此方法具有反应条件温和、操作简便、反应原料易于淬灭、灵敏度与精密度高等优势, 可实现多种氨基类神经递质的一次性高灵敏定量分析。

[关键词] 氨基; 神经递质; *N*-乙基化柱前衍生; 超高效液相色谱-串联质谱联用技术; 定量分析

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.11.005 **[中图分类号]** O657.63 **[文献标志码]** A

N-Ethylation facilitates simultaneous quantification of amino neurotransmitters using UHPLC-MS/MS

XUE Hai-si, TANG Hui-ru

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of content changes of neurotransmitters on multiple physiological and pathophysiological processes in mammals, and explore simultaneous sensitive quantification of these metabolites. **Methods**·An efficient and sensitive method for simultaneous quantification of 20 amino neurotransmitters was achieved through pre-column *N*-ethylation of neurotransmitters with acetaldehyde and NaBH_3CN followed with quantitative analysis using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). And NaBH_3CN and NaBD_3CN were used as a pair of stable isotope labeling reagents together with natural isotopic standards to achieve accurate quantification. **Results**·The analysis showed all 20 neurotransmitters had excellent linearity with R^2 over 0.9910 and sensitivity with the limits of detection (LOD) in the range of 0.5–10 fmol except for histidine with an LOD of 36.5 fmol. The result also showed good robustness with the interday and intraday RSD (relative standard deviation) below 15%. The method was further applied to human urine, serum and saliva samples for validation, in which 14, 10 and 8 neurotransmitters were detected, respectively. **Conclusion**·The method is of high sensitivity and precision. Compared to previous ones, this method is of great applicability in different matrices, with mild reaction and straightforward procedures. Besides, the reaction reagents are easy to be removed by simple quenching thus avoiding interference in the subsequent analysis.

[Key words] amino-group; neurotransmitters; pre-column *N*-ethylation; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); quantitative analysis

神经递质是一类内源性化合物, 大部分神经递质为小分子胺类或氨基酸类物质, 其主要功能是在神经元之间传递化学信息^[1-2]并对生物体功能产生重要影响。定量分析这类物质是认识生理与疾病的关键。

目前, 主要分析手段有核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 及液相色谱-质谱 (liquid

chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[3-6]联用。其中, LC-MS 具有高灵敏、高特异性、高通量等检测优势^[7-10], 从而成为分析这类代谢物的有效手段^[11]。由于神经递质大多极性较强、离子化效率低且其稳定同位素标准品难以获得, 因此基于 LC-MS 的定量分析仍存在色谱保留弱、质谱响应低以及内标定量困难的问题。化学同位素标记法可解决上述难题^[12-15]。已有研究采用 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 标记的丹酰氯

[基金项目] 国家自然科学基金 (81590953); 上海市科学技术委员会重大研究项目 (16JC1400500); 上海市市级科技重大专项 (2017SHZDZX01) (National Natural Science Foundation of China, 81590953; Major Research Project from Science and Technology Commission Shanghai Municipality, 16JC1400500; Municipal Level Key Science and Technology Project of Shanghai, 2017SHZDZX01)。

[作者简介] 薛海斯 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: 15210700069@fudan.edu.cn。

[通信作者] 唐惠儒, 电子信箱: huiru_tang@fudan.edu.cn。



(DnsCl) 对氨基代谢物进行定量研究^[16-17], 但该反应温度较高, 易破坏样品。另有研究采用同位素 *N*-甲基化还原胺化反应对氨基代谢物进行衍生处理, 该反应条件温和、效率高且易淬灭^[18], 但 *N*-甲基化标记对分析物疏水性改善有欠缺。目前还没有合适便捷的方法用于同步定量分析多种神经递质的报道。

本文建立了 1 种能够以 *N*-乙基化柱前衍生超高效液相色谱—串联质谱联用技术 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 对 20 种氨基类神经递质进行高灵敏同步内标定量检测的方法。此方法反应条件温和、操作简便且具有较高灵敏度与精密度, 可有效应用于人类体液样本中神经递质的检测。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

乙酸、氰基硼氢化钠 (NaBH_3CN)、醋酸钠购自阿拉丁试剂有限公司。氰基硼氘化钠 (NaBD_3CN) 购自美国 Cambridge Isotope Laboratories。乙腈、甲酸、乙醛、抗坏血酸购自 Sigma-Aldrich 有限公司。*L*-精氨酸、*D*-丝氨酸、肾上腺素、脱氧肾上腺素、苯乙胺购自阿拉丁试剂有限公司。*L*-组氨酸、甘氨酸、*L*-天冬氨酸、*L*-谷氨酸、 γ -氨基丁酸、*L*-天冬酰胺、去甲肾上腺素、章鱼胺、多巴胺、酪胺、5-羟基-*L*-色氨酸、组胺、5-羟色胺盐酸盐、甲氧酪胺、色胺等购自 Sigma-Aldrich 有限公司。20 种氨基类神经递质用含有 0.3% 甲酸的 34% 乙腈水溶液配制成 20 ~ 600 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准溶液 (表 1), 密封后于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 贮存。乙酸钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 5.0) 用乙酸钠与乙酸配制, 含 1 mmol/L 抗坏血酸。

1.2 生物体液样本的准备

尿液样本取自健康女性中段晨尿, 在 100 μL 尿样中加入 400 μL 甲醇, 涡旋混匀, 以 $11\ 060\times g$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液。血清样本取自健康志愿者, 在 40 μL 血清中加入 160 μL 甲醇, 涡旋混匀, 以 $11\ 060\times g$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液。唾液样本取自健康男性志愿者, 先以 $11\ 060\times g$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液, 取 40 μL 上清液, 加入 160 μL 甲醇, 涡旋混匀, 再次以 $11\ 060\times g$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 并收集此次上清液。以上样本使用前均密封于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 氨基类神经递质的衍生化

取 100 μL 神经递质类代谢物标准品, 用 750 μL

0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0, 1 mmol/L 抗坏血酸) 稀释, 加入 50 μL 2 mol/L NaBH_3CN 或 NaBD_3CN , 涡旋混匀后加入 100 μL 2 mol/L 乙醛水溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应过夜后用甲酸调节反应液 pH 值至 2 ~ 3 以淬灭反应。取 10 μL 生物样本, 用 840 μL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0, 1 mmol/L 抗坏血酸) 稀释, 加入 50 μL 2 mol/L NaBH_3CN , 涡旋混匀, 加入 100 μL 2 mol/L 乙醛水溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应过夜后用甲酸调节反应液 pH 值至 2 ~ 3 以淬灭反应。反应液经滤膜过滤后待测。

1.4 UHPLC-MS/MS 检测

使用 Agilent 1290 UHPLC 6495 QqQ MS 系统, 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 C18 反相色谱柱 (1.8 μm , $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$)。流动相 A 配制为含有 0.1% 甲酸的双蒸水, 流动相 B 为含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液。洗脱梯度以流动相 B 百分比表示为: 0 ~ 2 min, 1%; 2 ~ 4 min, 1% ~ 3.8%; 4 ~ 8 min, 3.8% ~ 22%; 8 ~ 8.5 min, 22%; 8.5 ~ 9.5 min, 22% ~ 60%; 9.5 ~ 10.5 min, 60%; 10.5 ~ 11 min, 60% ~ 80%; 11 ~ 11.1 min, 80% ~ 95%; 95% 到 13 min。流速 0.50 mL/min, 进样量 1 μL , 柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 。

对于 MS 系统, 采用 ESI 离子源, 干燥气温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$, 干燥器流量 12 L/min, 雾化器压力 50 psi, 鞘气温度 $350\text{ }^\circ\text{C}$, 鞘气流量 12 L/min, 毛细管电压 4 000 V, 喷嘴电压 500 V。数据采集使用正离子、质谱多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式 (表 1), 采样前 0.5 min 进度液瓶。

1.5 方法验证

对所建方法进行方法学验证, 包括 20 种神经递质标准曲线的建立以及检测限 (limits of detection, LOD)、定量限 (limits of quantification, LOQ)、日间差和日内差的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 的测定。

对于标准曲线的建立, 采用同位素内标定量, 稀释 5 倍后的轻标按 1:2:2.5:2:2:5:2:5:2 的比例逐级稀释成 9 个浓度梯度, 重标稀释 100 倍; 将 9 个浓度梯度的轻标与重标等体积混合后进入 UHPLC-MS/MS 检测分析 (浓度从高到低依次表示为 mix1、mix2、mix3、mix4、mix5、mix6、mix7、mix8、mix9)。以轻标与重标的峰面积之比作为纵坐标, 以轻标的浓度作为横坐标, 每个浓度比例做 3 个平行, 每个样重复进样 2 次, 得到标准曲线、相关系数 R^2 以及线性范围。LOD 及 LOQ 分别为信噪比等于 3 和 10 时所对应的样本柱上量。选取 mix2、mix5、mix7 分别代表高、中、低 3 个浓度水平的比例, 3 组平行样本, 每个

样本重复进样 2 次, 24 h 内分析 3 次, 作为日内差评价; 连续分析 3 d, 作为日间差评价。

2 结果

2.1 乙基化衍生反应

乙基化衍生反应方案参照文献^[18]。对 20 种氨基类神

经递质标准品的 *N*-乙基化反应 (图 1) 产物进行 LC-MS 检测, 衍生化产物均可在反相柱上保留; 反应物转化率均可达到 100%, 且无明显副产物产生, 乙基取代数目与氨基所含氢的数目一致。例如, 甘氨酸的伯胺基团被 2 个乙基取代, 无单取代产物存在; 肾上腺素的仲胺基团被 1 个乙基取代。由此可见该衍生反应产率高, 具有可操作性。

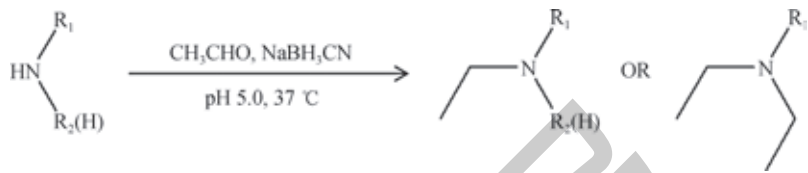


图 1 神经递质的 *N*-乙基化衍生反应
Fig 1 Reductive amination of neurotransmitters with acetaldehyde

2.2 同位素的色谱效应

化学同位素标记法常用于对分析物进行内标定量分析。在理想情况下, 分析物与其同位素类似物应当具有相同的色谱行为能够在色谱内共流出, 即两者在保留性质上无同位素效应, 从而可避免基质效应对定量的影响。相较

于外标定量法, 同位素内标定量结果更为精准。为探究本文所用氘代试剂的同位素效应的影响, 对 20 种神经递质类代谢物的重标 (²H-) 与轻标产物 (¹H-) 的保留时间进行了比对 (表 1)。其中, 17 种代谢物的重标与轻标产物保留时间差值小于 1 s, 其余 3 种均小于 2 s。

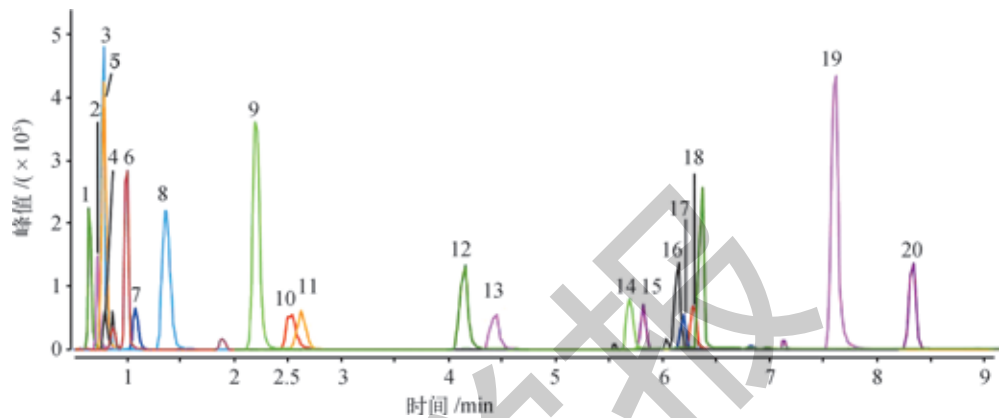
表 1 20 种神经递质的配制浓度、轻标与重标乙基化产物的保留时间及离子对信息
Tab 1 Concentrations of 20 neurotransmitters and retention time (RT), precursor (Q1) and fragment (Q3) ions, collision energy (CE) of ²H-/¹H-ethyl labeling products

序号	化合物	分子式	浓度 / (μmol/L)	¹ H- 标记 / (RT/ min)	² H-/ ¹ H- 标记 / (RT difference/s)	轻标 Q1	轻标 Q3	重标 Q1	重标 Q3	CE
1	<i>L</i> - 组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	96.7	0.633	0.01 ± 0.16	212	166	214	168	15
2	<i>L</i> - 精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	315.9	0.768	-0.05 ± 0.16	231	114	233	114	15
3	甘氨酸	C ₂ H ₅ NO ₂	515.5	0.769	-0.21 ± 0.48	132	86	134	88	15
4	<i>L</i> - 天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	96.2	0.799	-0.06 ± 0.95	190	144	192	146	20
5	<i>D</i> - 丝氨酸	C ₃ H ₇ NO ₃	404.6	0.808	-0.12 ± 0.17	162	144	164	146	10
6	<i>L</i> - 谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	220.2	0.984	-0.34 ± 0.59	204	158	206	160	15
7	γ- 氨基丁酸	C ₄ H ₉ NO ₂	101.8	1.057	-0.38 ± 0.50	160	87	162	87	15
8	肾上腺素	C ₉ H ₁₃ NO ₃	273.1	1.407	-0.38 ± 0.47	212	194	213	195	10
9	脱氧肾上腺素	C ₉ H ₁₃ NO ₂	314.2	2.247	-0.35 ± 0.50	196	178	197	179	10
10	<i>L</i> - 天冬酰胺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	99.2	2.453	-1.16 ± 0.97	245	130	247	130	15
11	去甲肾上腺素	C ₈ H ₁₁ NO ₃	97.5	2.814	-0.99 ± 1.14	226	208	228	210	15
12	章鱼胺	C ₈ H ₁₁ NO ₂	97.0	4.108	-0.82 ± 1.03	210	192	212	194	15
13	多巴胺	C ₈ H ₁₁ NO ₂	101.7	4.580	-1.22 ± 0.81	210	137	212	137	15
14	酪胺	C ₈ H ₁₁ NO	94.8	5.659	-0.65 ± 0.60	194	121	196	121	20
15	5- 羟基色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃	98.5	5.799	-0.60 ± 0.68	277	204	279	204	15
16	组胺	C ₅ H ₉ N ₃	112.5	6.148	-1.70 ± 0.72	168	86	170	88	15
17	5- 羟色胺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	125.5	6.165	-0.40 ± 0.56	233	160	235	160	25
18	甲氧酪胺	C ₉ H ₁₃ NO ₂	24.6	6.260	-0.32 ± 0.69	224	151	226	151	15
19	苯乙胺	C ₈ H ₁₁ N	398.1	7.620	-0.42 ± 0.46	178	105	180	105	20
20	色胺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	101.7	8.362	-0.47 ± 0.81	217	86	219	88	15

2.3 UHPLC-MS/MS 检测

对氨基类神经递质进行乙基化处理后, 衍生产物疏水性增强且离子化效率提高, 适合用于反相 UHPLC-MS/MS 的检测分析。所建方法可在 9 min 内同步定量分析 20 种神经递质 (图 2), 其中包括 *L*-组氨酸、*L*-精氨酸、甘氨酸、*L*-天冬氨酸、*D*-丝氨酸、*L*-谷氨酸、 γ -氨基丁酸和 *L*-天冬酰胺等 8 种氨基酸, 以及肾上腺素、脱氧肾上腺素、去甲肾上腺素、章鱼胺、多巴胺、酪胺、5-羟色胺、组胺、5-羟色胺、甲氧酪胺、苯乙胺和色胺等 12 种胺类物质。

酸、*L*-天冬氨酸、*D*-丝氨酸、*L*-谷氨酸、 γ -氨基丁酸和 *L*-天冬酰胺等 8 种氨基酸, 以及肾上腺素、脱氧肾上腺素、去甲肾上腺素、章鱼胺、多巴胺、酪胺、5-羟色胺、组胺、5-羟色胺、甲氧酪胺、苯乙胺和色胺等 12 种胺类物质。



注: 谱峰对应的代谢物分别为 1. *L*-组氨酸, 2. *L*-精氨酸, 3. 甘氨酸, 4. *L*-天冬氨酸, 5. *D*-丝氨酸, 6. *L*-谷氨酸, 7. γ -氨基丁酸, 8. 肾上腺素, 9. 脱氧肾上腺素, 10. *L*-天冬酰胺, 11. 去甲肾上腺素, 12. 章鱼胺, 13. 多巴胺, 14. 酪胺, 15. 5-羟色胺, 16. 组胺, 17. 5-羟色胺, 18. 甲氧酪胺, 19. 苯乙胺, 20. 色胺。

图 2 20 种神经递质的 UHPLC-MS/MS 色谱图
Fig 2 UHPLC-MS/MS chromatograms for 20 ethyl labeling neurotransmitters

2.4 方法验证

为了对所建方法进行验证, 本文对 20 种神经递质的线性范围、 R^2 、LOD、LOQ 以及日间差和日内差的 RSD 值进行了探究。

通过对 20 种神经递质的 9 个浓度梯度的检测, 建立其线性方程、 R^2 及线性范围, 并求得 LOD 及 LOQ 值 (表 2)。除了肾上腺素的 R^2 为 0.991 4, 余下 19 种神经递质的 R^2 均大于 0.996 0, 表明该方法具有良好的线性关系。对于 LOD 的检测, 除了组胺的 LOD 值在 40 fmol 左右, 其

余 19 种神经递质的 LOD 值均在 0.5 ~ 10 fmol 之间, 证明该方法具有较高的检测灵敏度。

选取 mix2、mix5 和 mix7 作为高、中、低浓度比例的代表分析了 20 种神经递质浓度的日间差及日内差 RSD 值 (表 2)。除了组胺的低浓度的日间差 RSD 值稍大于 15%, 其余 19 种神经递质的 RSD 值均低于 15%。总体来说, 该方法的日间差和日内差 RSD 值符合要求, 证明了该方法具有良好的精密度。

表 2 20 种神经递质乙基化产物的标准曲线及灵敏度与精密度评估
Tab 2 Calibration curves, coefficients (R^2), linear range, on-column limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), intra- and inter-day precisions (RSD) for 20 ethyl labeling neurotransmitters

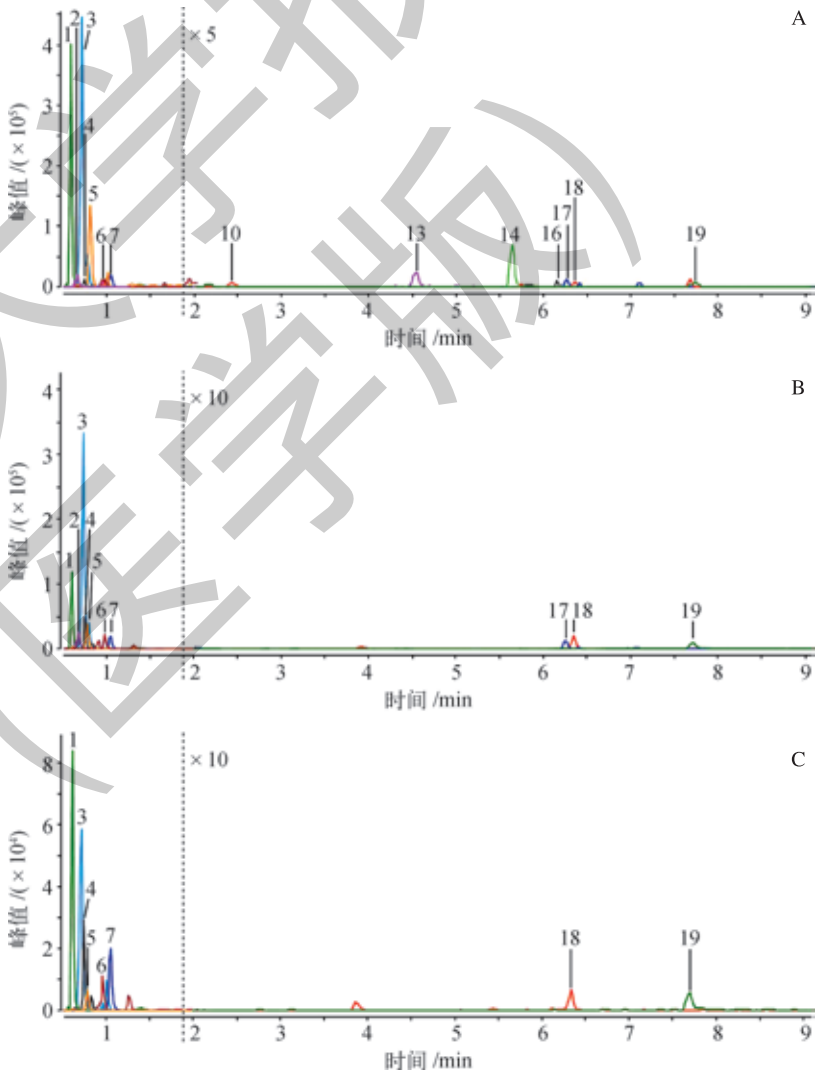
序号	代谢物	线性方程	R^2	线性范围 / (nmol/L)	LOD/fmol	LOQ/fmol	日内差 ($n=3$, RSD, %)			日间差 ($n=3$, RSD, %)		
							C_H	C_M	C_L	C_H	C_M	C_L
1	<i>L</i> -组氨酸	$y=0.018\ 3x+0.033\ 0$	0.996 4	0.50 ~ 1 000	0.7	2.5	4.1	6.0	9.2	4.4	8.8	9.7
2	<i>L</i> -精氨酸	$y=0.006\ 1x+0.081\ 0$	0.998 8	1.50 ~ 3 000	0.2	0.8	3.5	2.3	3.8	3.8	4.2	2.1
3	甘氨酸	$y=0.003\ 8x+0.038\ 5$	0.997 5	2.60 ~ 5 200	1.1	3.6	5.2	5.8	5.1	7.9	7.0	7.7
4	<i>L</i> -天冬氨酸	$y=0.022\ 6x+0.046\ 2$	0.997 2	0.50 ~ 1 000	3.0	10.0	7.2	6.3	14.8	9.9	6.8	8.2
5	<i>D</i> -丝氨酸	$y=0.004\ 5x+0.021\ 2$	0.998 1	2.00 ~ 4 000	1.2	4.2	4.0	13.1	3.4	5.4	2.3	2.6
6	<i>L</i> -谷氨酸	$y=0.010\ 8x+0.122\ 2$	0.998 0	1.10 ~ 200	2.1	7.2	8.9	8.1	6.3	10.3	8.5	7.7
7	γ -氨基丁酸	$y=0.016\ 9x+0.015\ 3$	0.999 1	0.50 ~ 1 000	2.9	9.7	5.7	3.3	6.9	5.4	6.8	7.9
8	肾上腺素	$y=0.004\ 1x+0.048\ 5$	0.991 4	1.00 ~ 500	3.5	11.5	1.1	3.9	11.4	0.9	6.3	12.3
9	脱氧肾上腺素	$y=0.004\ 2x+0.021\ 0$	0.999 9	1.50 ~ 3 000	0.7	2.4	0.8	0.8	2.9	1.1	1.2	2.8
10	<i>L</i> -天冬酰胺	$y=0.020\ 1x+0.060\ 5$	0.999 3	0.50 ~ 1 000	8.9	29.5	3.6	5.7	6.2	4.8	4.5	6.5

(续表 2)

序号	代谢物	线性方程	R^2	线性范围 / (nmol/L)	LOD/fmol	LOQ/fmol	日内差 ($n=3$, RSD, %)			日间差 ($n=3$, RSD, %)		
							C_H	C_M	C_L	C_H	C_M	C_L
11	去甲肾上腺素	$y=0.016\ 1x+0.034\ 3$	0.998\ 9	0.50 ~ 1\ 000	7.0	23.3	2.3	5.9	8.3	6.9	7.7	6.7
12	章鱼胺	$y=0.017\ 1x+0.098\ 0$	0.997\ 9	0.50 ~ 1\ 000	4.0	13.4	4.2	4.3	4.3	4.3	4.5	6.0
13	多巴胺	$y=0.019\ 4x+0.008\ 5$	0.999\ 8	0.50 ~ 1\ 000	3.9	13.2	9.4	9.3	3.2	5.6	9.5	9.1
14	酪胺	$y=0.021\ 8x-0.063\ 2$	0.998\ 0	0.50 ~ 1\ 000	6.4	21.5	3.2	6.4	5.5	4.9	6.0	4.8
15	5- 羟基色氨酸	$y=0.022\ 4x+0.044\ 8$	0.997\ 4	0.50 ~ 1\ 000	1.1	3.8	7.5	7.8	11.5	6.3	7.2	9.8
16	组胺	$y=0.023\ 7x+0.127\ 5$	0.998\ 1	0.60 ~ 1\ 100	36.5	121.8	9.6	12.7	12.4	9.8	11.9	15.8
17	5- 羟色胺	$y=0.020\ 6x-0.044\ 6$	0.998\ 5	0.60 ~ 1\ 200	2.8	9.3	5.3	6.5	6.8	5.2	5.6	6.0
18	甲氧酪胺	$y=0.086\ 4x-0.053\ 5$	0.998\ 4	0.12 ~ 250	0.5	1.5	4.1	6.5	6.5	4.3	6.5	8.9
19	苯乙胺	$y=0.012\ 0x-0.079\ 1$	0.999\ 8	2.00 ~ 4\ 000	1.1	3.5	1.2	1.7	1.6	1.3	1.5	1.6
20	色胺	$y=0.022\ 0x+0.017\ 6$	0.999\ 1	0.50 ~ 1\ 000	1.9	6.4	5.2	4.8	5.7	6.4	6.4	7.3

2.5 普适性验证

该方法可在人尿液中检测到 *L*- 组氨酸 (285.27 μmol/L)、*L*- 精氨酸 (162.48 μmol/L)、甘氨酸 (1 189.81 μmol/L)、*L*- 天冬氨酸 (11.02 μmol/L)、丝氨酸 (390.59 μmol/L)、*L*- 谷氨酸 (26.87 μmol/L)、 γ - 氨基丁酸 (9.07 μmol/L)、*L*- 天冬酰胺 (4.17 μmol/L)、多巴胺 (0.54 μmol/L)、酪胺 (0.99 μmol/L)、组胺 (24.26 μmol/L)、5- 羟色胺 (1.11 μmol/L)、甲氧酪胺 (0.28 μmol/L)、苯乙胺 (0.55 μmol/L) 等 14 种神经递质 (图 3); 可在人血清中检测到 *L*- 组氨酸 (110.87 μmol/L)、*L*- 精氨酸 (104.52 μmol/L)、甘氨酸 (291.09 μmol/L)、*L*- 天冬氨酸 (29.78 μmol/L)、丝氨酸 (199.97 μmol/L)、*L*- 谷氨酸 (91.86 μmol/L)、 γ - 氨基丁酸 (3.53 μmol/L)、5- 羟色胺 (1.48 μmol/L)、甲氧酪胺 (0.69 μmol/L)、苯乙胺 (0.66 μmol/L) 等 10 种神经递质 (图 3); 可在人唾液中检测到 *L*- 组氨酸 (33.90 μmol/L)、甘氨酸 (82.01 μmol/L)、*L*- 天冬氨酸 (13.26 μmol/L)、丝氨酸 (32.72 μmol/L)、*L*- 谷氨酸 (49.43 μmol/L)、 γ - 氨基丁酸 (14.38 μmol/L)、甲氧酪胺 (0.33 μmol/L)、苯乙胺 (0.64 μmol/L) 等 8 种神经递质 (图 3)。



注:A. 尿液;B. 血清;C. 唾液。谱峰对应的代谢物分别为 1. *L*- 组氨酸, 2. *L*- 精氨酸, 3. 甘氨酸, 4. *L*- 天冬氨酸, 5. *D*- 丝氨酸, 6. *L*- 谷氨酸, 7. γ - 氨基丁酸, 8. 肾上腺素, 9. 脱氧肾上腺素, 10. *L*- 天冬酰胺, 11. 去甲肾上腺素, 12. 章鱼胺, 13. 多巴胺, 14. 酪胺, 15. 5- 羟基色氨酸, 16. 组胺, 17. 5- 羟色胺, 18. 甲氧酪胺, 19. 苯乙胺, 20. 色胺。

图 3 人体液样本中神经递质的 UHPLC-MS/MS 色谱图

Fig 3 UHPLC-MS/MS chromatograms for neurotransmitters in human urine, serum and saliva samples

3 讨论

本研究建立了 1 种能够对 20 种氨基类神经递质的 *N*-乙基化柱前衍生 UHPLC-MS/MS 高灵敏同步内标定量检测方法。氨基的还原胺化反应最初广泛用于蛋白质的标记修饰^[19-24], 是以甲醛和氰基硼氢化钠为原料对蛋白质中的氨基进行甲基化处理。考虑到甲基化对分析物疏水性的改善略有欠缺, 而脂肪链过长又会导致过大的空间位阻, 因此本文最终选择乙醛作为还原胺化反应原料。*N*-乙基化还原胺化反应可有效用于氨基类神经递质的衍生化处理。该衍生化反应具有以下优势: 第一, 乙醛价格低廉且 NaBH_3CN 的氘代试剂具有商业化产品, 可实现同位素内标定量; 第二, 反应条件温和, 操作简便, 且几乎无副反应; 第三, 加入甲酸使反应淬灭, 对后续检测无干扰; 第四, 可提高分析物疏水性, 增强反相柱保留同时提高离子化效率; 第五, 衍生产物易带电荷, 可提高质谱响应。此外, 该方法引入氰基硼氢化钠的一对稳定同位素标记试

剂 (NaBH_3CN , NaBD_3CN), 研究表明所采用的氘代同位素标记试剂对色谱的负效应不明显, 因而可有效减弱基质效应对离子化效率的影响, 实现准确的内标定量。所建方法可同步检测 20 种神经递质, 包括 8 种氨基酸及 12 种胺类物质。通过方法学验证表明所测代谢物均具有良好的线性关系, 除肾上腺素的 R^2 为 0.991 4, 其余代谢物的 R^2 均大于 0.996 0; 检测限在 0.4 ~ 36.5 fmol 范围, 其中 19 种物质的检测限低于 10 fmol, 仅组胺在 40 fmol 左右; 日内差、日间差的 RSD 值除低浓度的组胺外均低于 15%; 这些表明该方法具有较高检测灵敏度及精确度。将所建方法应用于人尿液、血清及唾液样本的检测分析, 分别可提取 14、10 及 8 种神经递质的色谱峰, 进一步验证了该方法的普适性。

综上所述, 利用还原胺化反应的优势可实现氨基类神经递质的 UHPLC-MS/MS 同步高灵敏定量分析, 为研究氨基类神经递质在病理生理过程中的作用机制提供了重要的方法学基础。

参·考·文·献

- [1] Henstridge MC, Wildgoose GG, Compton RG. Generator/collector experiments with a single electrode: introduction and application to exploring the oxidation mechanism of serotonin[J]. *J Phys Chem C*, 2009, 113(32): 14285-14289.
- [2] Yang JL, Sykora P, Wilson DM, et al. The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency[J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(8/9): 405-411.
- [3] Cobice DF, Mackay CL, Goodwin RJA, et al. Mass spectrometry imaging for dissecting steroid intracrinology within target tissues[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(23): 11576-11584.
- [4] García-Cañas V, Simó C, Herrero M, et al. Present and future challenges in food analysis: foodomics[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(23): 10150-10159.
- [5] Debarber AE, Sandlers Y, Pappu AS, et al. Profiling sterols in cerebrotendinous xanthomatosis: utility of girard derivatization and high resolution exact mass LC-ESI-MSn analysis[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(17/18): 1384-1392.
- [6] Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(4): 939-965.
- [7] Tang DQ, Zou L, Yin XX, et al. Hilic-ms for metabolomics: an attractive and complementary approach to RPLC-MS[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2016, 35(5): 574-600.
- [8] Nguyen DT, Lee G, Paik MJ. Keto acid profiling analysis as ethoxime/tert-butyltrimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 913-914: 48-54.
- [9] Kiefer P, Delmotte NL, Vorholt JA. Nanoscale ion-pair reversed-phase HPLC-MS for sensitive metabolome analysis[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(3): 850-855.
- [10] Burgess K, Creek D, Dewsbury P, et al. Semi-targeted analysis of metabolites using capillary-flow ion chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(22): 3447-3452.
- [11] 李晶, 刘思, 雷和花, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术分析人类唾液代谢组的性别依赖性[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(8): 1079-1084.
- [12] Huang YQ, Liu JQ, Gong H, et al. Use of isotope mass probes for metabolic analysis of the jasmonate biosynthetic pathway[J]. *Analyst*, 2011, 136(7): 1515.
- [13] Guo N, Peng CY, Zhu QF, et al. Profiling of carbonyl compounds in serum by stable isotope labeling double precursor ion scan - mass spectrometry analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 967: 42-51.
- [14] Wang YL, Zhu QF, Cheng LM, et al. Stable isotope labeling - dispersive solid phase extraction - liquid chromatography - tandem mass spectrometry for quantitative analysis of transsulfuration pathway thiols in human serum[J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1083: 12-19.
- [15] Yu Q, Shi X, Greer T, et al. Evaluation and application of dimethylated amino acids as isobaric tags for quantitative proteomics of the TGF-beta/Smad3 signaling pathway[J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(9): 3420-3431.
- [16] Guo K, Li L. Differential C-12/C-13-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(10): 3919-3932.
- [17] Huan T, Wu YM, Tang CQ, et al. DnsID in MyCompoundID for rapid identification of dansylated amine- and phenol-containing metabolites in LC-MS-based metabolomics[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(19): 9838-9845.
- [18] Guo K, Ji CJ, Li L. Stable-isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(22): 8631-8638.
- [19] Jentoft N, Dearborn DG. Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride[J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(11): 4359-4365.
- [20] Gidley MJ, Sanders JKM. Reductive methylation of proteins with sodium cyanoborohydride. identification, suppression and possible uses of N-cyanomethyl by-products[J]. *Biochem J*, 1982, 203(1): 331-334.
- [21] Jentoft N, Dearborn DG. Protein labeling by reductive alkylation[J]. *Methods Enzymol*, 1983, 91: 570-579.
- [22] Metz B, Kersten GFA, Hoogerhout P, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins - reactions with model peptides[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6235-6243.
- [23] Wang FJ, Chen R, Zhu J, et al. A fully automated system with online sample loading, isotope dimethyl labeling and multidimensional separation for high-throughput quantitative proteome analysis[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(7): 3007-3015.
- [24] Kleifeld O, Doucet A, Prudova A, et al. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(10): 1578-1611.

[收稿日期] 2018-05-13

[本文编辑] 张慧俊

