

色氨酸代谢物的LC-MS/MS定量分析

Yeqing Peng¹, Huiru. Tang¹, Ting.Liu², Zheng.Jiang²

1. Human Phenome Institute, Metabonomics and Systems Biology Laboratory at Shanghai International Centre for Molecular Phenomics, Fudan University, Shanghai, China

2. SCIEX, Shanghai, China.

Keywords: Tryptophan metabolites, LC-MS/MS.

前言

色氨酸 (Tryptophan, Trp) 是必需氨基酸之一。色氨酸通过血清素通路 (Serotonin pathway)、犬尿氨酸通路 (Kynurenine pathway) 和吲哚通路 (Indole pathway) 而产生一批具有多种生理功能的代谢物, 在生物体和植物体内发挥着重要作用 (图1)。譬如, 色氨酸就是按蚊的必需氨基酸, 主要是由所吸的血液供应。在按蚊体内, 色氨酸除了供应蛋白合成, 大多数游离色氨酸通过犬尿氨酸代谢途径被氧化, 从而生成犬尿酸 (kynurenine, Kyn), 3-羟基犬尿酸 (3-hydroxykynurenine, 3-HK) 和黄尿酸 (xanthurenic acid, XA)。为了研究按蚊体内微生物对色氨酸和其代谢物的影响变化, 本文建立了色氨酸及其15种代谢物的液相串联质谱 (LC-MS/MS) 定量测定方法, 该方法也可应用于其他生物体或植物体的色氨酸和其代谢物的测定。

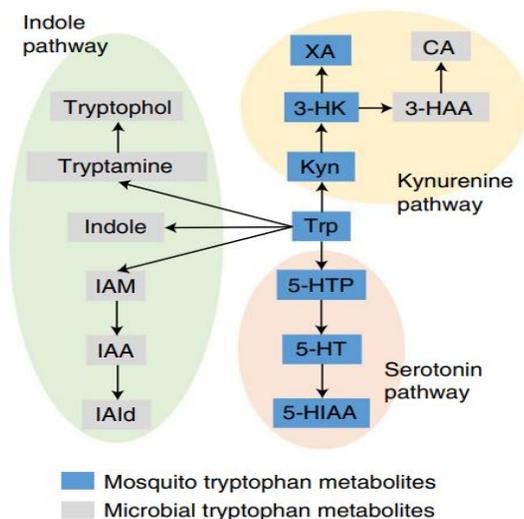


图1. 色氨酸及其主要代谢通路¹

本文实验方法特点

1. 灵敏度高, 满足多种基质的检测需求;
2. 方法覆盖率全, 基本覆盖了色氨酸和其代谢物;
3. 方法准确性和重现性良好, 符合方法学要求;

仪器设备

样品前处理

收集15只雌性按蚊 (~30mg) 作为1份生物样本。将样本液氮速冻, 使用400 μ L预冷的80%甲醇-双蒸馏水 (ddH₂O) 溶液(含10 μ L内标, 内标具体信息详见质谱方法) 匀浆样本。14000 g, 4 $^{\circ}$ C离心10 min后, 保存上清, 再使用400 μ L预冷甲醇-双蒸馏水溶液进行2次萃取。混合所有上清液, 14000g, 4 $^{\circ}$ C离心10 min。然后, 将1 mL上清液转移到新管中, 冷冻干燥待用。LC-MS/MS分析前, 使用200 μ L 80% methanol-双蒸馏水溶液复溶样本。

液相方法

色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18
(2.1mm \times 50mm, 1.8 μ m);

流动相: A相: 水 (0.1% 甲酸) B相: 乙腈 (0.1% 甲酸)

柱温: 35 $^{\circ}$ C

自动进样器温度: 4 $^{\circ}$ C

质谱方法

质谱系统: QTRAP[®] 5500三重四极杆线性离子阱复合型质谱系统和QTRAP[®] 6500+三重四极杆线性离子阱复合型质谱系统均可进行分析;

1) QTRAP[®] 5500质谱系统

离子源: ESI源, 正、负离子模式

表1. 液相梯度

| Time (min) | Flow Rate (mL/min) | A Phase (%) | B Phase (%) |
|------------|--------------------|-------------|-------------|
| 0 | 0.3 | 98 | 2 |
| 2.95 | 0.3 | 98 | 2 |
| 3 | 0.5 | 98 | 2 |
| 6 | 0.5 | 20 | 80 |
| 8 | 0.5 | 20 | 80 |
| 8.05 | 0.3 | 98 | 2 |
| 10 | 0.3 | 98 | 2 |

离子源参数:

IS电压: +5500 V/ -4500 V; 气帘气 CUR: 35 psi;
 雾化气 GS1: 55 psi; 辅助加热气 GS2: 55psi;
 碰撞气源温度 TEM: 500 °C; 入口电压 EP: 10 V/ -10V;
 碰撞池出口电压 CXP: 10V/ -10V。

2) QTRAP® 6500+质谱系统

离子源: ESI源, 正、负离子模式

离子源参数:

IS电压: +5500 V/ -4500 V; 气帘气 CUR: 35 psi;
 雾化气 GS1: 55 psi; 辅助加热气 GS2: 60psi;
 碰撞气源温度 TEM: 400 °C; 入口电压 EP: 10 V/ -10V;
 碰撞池出口电压 CXP: 10V/ -10V。

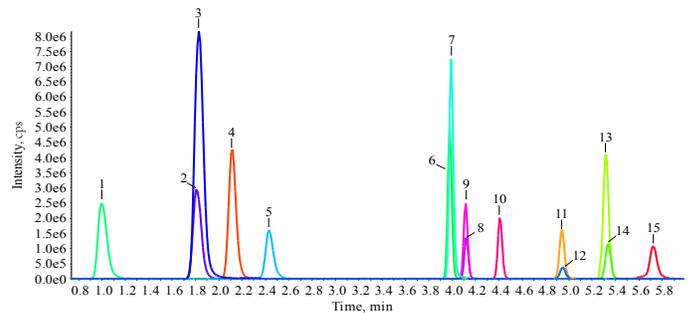
| Q1 (Da) | Q3 (Da) | R.T. (min) | ID | DP | CE |
|---------|---------|------------|--------------------------------------|------|-----|
| 177.1 | 160.1 | 1.81 | Serotonin | 57 | 31 |
| 221.1 | 204.1 | 1.79 | 5-hydroxytryptophan | 63 | 16 |
| 224.1 | 207.1 | 1.8 | 5-hydroxytryptophan-4,6,7-d3 | 63 | 16 |
| 161.1 | 144.1 | 4.12 | Tryptamine | 54 | 34 |
| 194.1 | 148.2 | 4.11 | 5-hydroxyindole-3-acetic-2,2-d2 acid | 130 | 36 |
| 192.1 | 146.1 | 4.12 | 5-Hydroxyindole acetic acid | 130 | 36 |
| 175 | 130 | 4.41 | Indole-3-acetamide | 85 | 27 |
| 301.1 | 283.1 | 5.71 | Cinnabarinic acid | 100 | 24 |
| 209.1 | 192 | 2.1 | kynurenine | 57 | 26 |
| 118 | 91 | 4.95 | indole | 107 | 30 |
| 162.2 | 144.1 | 5.31 | Tryptophol | 87 | 35 |
| 176.2 | 130.2 | 5.33 | indole acetic acid | 130 | 25 |
| 178.1 | 132.2 | 5.33 | Indole-3-acetic-2,2-d2 acid | 130 | 25 |
| 205.1 | 188.1 | 3.98 | tryptophan | 65 | 30 |
| 208.1 | 191.1 | 3.98 | tryptophan-2,3,3-d3 | 65 | 30 |
| 225.1 | 208 | 1 | 3-Hydroxy-kynurenine | 65 | 26 |
| 206 | 160 | 3.99 | xanthurenic acid | 100 | 40 |
| 152 | 108 | 2.42 | 3-Hydroxyanthranilic acid | -100 | -20 |
| 144 | 115 | 4.95 | Indole-3-carboxaldehyde | -160 | -38 |

表2. 色氨酸、15种代谢物和4种同位素内标的MRM离子对信息; 4个内标分别为: D3-羟色氨酸 (5-hydroxytryptophan-4,6,7-d3), D2-5羟基吲哚乙酸 (5-hydroxyindole-3-acetic-2,2-d2 acid), D2-吲哚乙酸 (indole-3-acetic-2,2-d2 acid), D3-色氨酸 (tryptophan-2,3,3-d3)。

实验结果

化合物色谱图

色氨酸及其代谢物, 色谱峰型良好。



* 图中编号同表

灵敏度和线性范围

色氨酸及其代谢物, LOD (最低定量下线) 为0.03-3.20 fmol, 线性范围大于3个数量级, 线性相关系数R²均大于0.9900。

表3. 色氨酸及其代谢物LOD, 线性范围和R²。

| Num. | Component Name | LOD (fmol) | Linear range (µM) | R ² |
|------|-----------------------------|------------|-------------------|----------------|
| 1 | 3-Hydroxy-L-kynurenine | 0.29 | 0.0015 - 1.9213 | 0.9997 |
| 2 | 5-hydroxytryptophan | 0.21 | 0.0004 - 0.4797 | 0.9997 |
| 3 | Serotonin | 0.48 | 0.0009 - 1.0858 | 0.9987 |
| 4 | kynurenine | 0.51 | 0.0032 - 4.0428 | 0.9998 |
| 5 | 3-Hydroxyanthranilic acid | 3.20 | 0.0066 - 8.2303 | 0.9987 |
| 6 | tryptophan | 0.13 | 0.0025 - 3.1341 | 0.9993 |
| 7 | xanthurenic acid | 0.14 | 0.0002 - 0.2398 | 0.9993 |
| 8 | Tryptamine | 0.10 | 0.0003 - 0.4148 | 0.9999 |
| 9 | 5-Hydroxyindole acetic acid | 1.50 | 0.0021 - 2.5735 | 0.9998 |
| 10 | Indole-3-acetamide | 0.03 | 0.0002 - 0.2824 | 0.9994 |
| 11 | indole | 10.64 | 0.0171 - 21.4189 | 0.9988 |
| 12 | Indole-3-carboxaldehyde | 0.09 | 0.0005 - 0.6406 | 0.9987 |
| 13 | Tryptophol | 0.70 | 0.0029 - 3.5893 | 0.9995 |
| 14 | indole-3-acetic acid | 2.01 | 0.0049 - 6.1786 | 0.9999 |
| 15 | Cinnabarinic acid | 0.37 | 0.0014 - 1.8027 | 0.9997 |

重现性

精密度通过日内差和日间差结果来评价，采用L2, L4, L7标准溶液代表高、中、低三种浓度水平，日内差为每个浓度组分析5次的结果，日间差为连续检测三天的结果。

| Analytes | Intra_day (n=5, CV%) | | | Inter_day (n=5, CV%) | | |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|
| | C _H | C _M | C _L | C _H | C _M | C _L |
| 3-Hydroxyanthranilic acid | 1.7 | 0.8 | 4.7 | 1.4 | 1.2 | 2.3 |
| 3-Hydroxy-L-kynurenine | 0.7 | 0.6 | 1.3 | 1.5 | 1.4 | 3.5 |
| 5-Hydroxyindole acetic acid | 1.0 | 1.5 | 3.2 | 1.1 | 0.9 | 5.1 |
| 5-hydroxytryptophan | 0.9 | 1.2 | 3.2 | 1.3 | 1.2 | 5.3 |
| Cinnabarinic acid | 0.4 | 0.5 | 9.6 | 0.9 | 1.9 | 9.8 |
| indole | 0.9 | 1.0 | 14.1 | 0.6 | 1.0 | 10.2 |
| indole acetic acid | 1.2 | 1.6 | 6.7 | 1.3 | 2.2 | 6.1 |
| Indole-3-acetamide | 0.9 | 0.4 | 3.6 | 0.8 | 1.2 | 5.3 |
| Indole-3-carboxaldehyde | 0.1 | 0.8 | 4.9 | 1.2 | 0.9 | 5.8 |
| kynurenine | 0.7 | 0.9 | 3.3 | 0.8 | 1.2 | 4.7 |
| Serotonin | 0.9 | 1.7 | 1.9 | 1.5 | 2.0 | 6.3 |
| Tryptamine | 0.8 | 0.8 | 8.4 | 1.8 | 1.7 | 5.5 |
| tryptophan | 1.0 | 0.7 | 2.8 | 1.8 | 1.7 | 3.3 |
| Tryptophol | 1.5 | 1.7 | 7.7 | 1.5 | 1.9 | 8.1 |
| xanthurenic acid | 0.9 | 1.3 | 9.5 | 1.1 | 1.6 | 4.2 |

*"C_L"表示低浓度标准品，"C_M"表示中浓度标准品，"C_H"表示高浓度标准品。

总结:

本文建立了液相色谱串联质谱法测定色氨酸和其15种代谢物的方法。方法灵敏度高，色氨酸和15种化合物的LLOQ平均为：0.003 μM，线性范围跨越三个数量级，日内和日间重现性CV%<15%，符合方法学要求，为后期按蚊样品的测定提供了支持。

文献

1. Yuebiao Feng, Yeqing Peng, Xiumei Song, Han Wen, Yanpeng An, Huiru Tang and Jingwen Wang. Anopheline mosquitoes are protected against parasite infection by tryptophan catabolism in gut microbiota, Nature Microbiology, <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01099-8>.

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，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在和美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14917-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: SCIEX-China