

LC-MS/MS 检测癫痫患者神经递质类氨基酸 *

王雁飞¹ 陶蓓蓓² 张绪得² 黄春雷^{3△}

(1 北京大学医学部首都儿科研究所教学医院 北京 100020 2 北京艾米诺医学研究有限公司 北京 100088 ;

3 首都儿科研究所 北京 100020)

摘要 目的 建立液相色谱串联质谱同位素内标法检测神经递质类氨基酸并用于癫痫患者临床评价。方法 选用 AAA-C18 柱色谱柱,以乙腈水(含有 0.01%七氟丁酸、0.1%甲酸)为流动相,采用梯度洗脱进行分离,血浆样品用 iTRAQ-115 衍生化试剂处理后,加入 iTRAQ-114 衍生化的氨基酸内标并进样,选用 3200QTRAP 型质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行检测。疾病组与健康组的统计采用 t 检验和主成份分析。结果 疾病组和健康组氨基酸测定结果显示:Trp、GABA 两组间没有显著性差异($P>0.05$), Arg、Gly、Ser、Tau、Asp、Glu、EtN、两组间有显著性差异($P<0.05$),通过 PCA 分析显示,疾病组与健康组之间差异明显,Asp、Glu、Ser 等是引起差异的主要氨基酸。结论 试验方法灵敏、专属性强,并初步的用于癫痫患者体内氨基酸评价。

关键词 高效液相色谱-串联质谱 神经递质 氨基酸

中图分类号 R742.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)14-2705-04

Detection of Amino Acids Neurotransmitter in Epilepsy by LC-MS/MS*

WANG Yan-fei¹, TAO Bei-bei², ZHANG Xu-de², HUANG Chun-lei^{3△}

(1 Peking University Teaching Hospital-Capital Institute of Pediatrics, 100020, Beijing, China;

2 Beijing Amino Medical Research CO.,LTD, 100088, Beijing, China;

3 Hospital-Capital Institute of Pediatrics, 100020, Beijing, China)

ABSTRACT Objective: To develop a LC-MS/MS method with amino acids isotope as internal standard, to detect amino acids neurotransmitter in the Epileptic for clinical evaluation. **Methods:** After derivatized by iTRAQ-115, plasma samples were added internal standard which had been derivatized by iTRAQ-114. The separation was carried out on an AAA-C18 column using acetonitrile and water (both containing 0.01% heptafluorobutyric acid and 0.1% formic acid) as mobile phase by gradient elution. Detection was carried out by multiple reaction monitoring (MRM) on a 3200QTRAP LC-MS/MS system. T-test and PCA analysis used as the statistics methods. **Results:** There was no significant difference for Trp and GABA and significant difference for Arg, Gly, Ser, Tau, Asp, Glu, EtN between disease group and health group. There was significant difference between disease group and health group due to Asp, Glu, Ser by PCA analysis. **Conclusion:** The method is sensitive and selective and applied to detect amino acids neurotransmitter in the Epileptic for clinical evaluation.

Key words: LC-MS/MS; Neurotransmitter; Amino acid

Chinese Library Classification(CLC): R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2705-04

癫痫是一种以中枢神经系统功能失常为特征的常见慢性临床综合征,早在 1890 年 Jackson 就认为癫痫是由于神经元突然阵发性过度发电引起的^[1,2]。神经递质的变化在癫痫发作中占有非常重要的作用。神经系统中存在大量的游离氨基酸,和中枢神经代谢系统相关的氨基酸主要有 γ -氨基丁酸(GABA)^[3]、天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、牛磺酸(Tau)、甘氨酸(Gly)、色氨酸(Trp)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、乙醇胺(EtN)等,其中 GABA、Asp、Glu、Tau、Gly 是十分具有代表性的与兴奋及抑制有关的递质系统,有多篇文献报道这些氨基酸与癫痫之间的关系^[4-8]。

目前文献中报道的定量检测这些神经递质类氨基酸的方法主要有高效液相色谱法、氨基酸分析仪以及新生儿疾病筛查

中定量氨基酸所用的串联质谱法等。高效液相色谱法和氨基酸分析仪检测氨基酸需要好的色谱柱,繁琐的前处理,足够长的分析时间才能分离不同的氨基酸从而达到定量氨基酸的目的^[9-12]。一旦色谱柱无法将两种氨基酸分开就会影响甚至无法定量。新生儿疾病筛查中检测氨基酸所用的串联质谱法,定量氨基酸采用的是中性碎片丢失扫描模式,同分异构体没有采用色谱分离,无法真正意义上区分和定量^[14,15]。液相色谱串联质谱同位素内标法测定内源性生物小分子是国内外常用的体内生物小分子准确定量方法,其中质谱采用多反应监测(MRM)扫描模式,质谱扫描不同化合物有不同的特征离子对,而质谱扫描同分异构体具有相同离子对时可以利用液相将氨基酸分离,如此就大大提高了检测的准确度,相较中性碎片丢失扫描模式

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (20905051)

作者简介 王雁飞(1984),男,硕士,主要研究方向:营养代谢。电话:13439705002 E-mail: wangyanfei_2008by@126.com

△通讯作者 黄春雷, E-mail: huangchunlei_hcl11@126.com

(收稿日期 2011-04-08 接受日期 2011-04-30)

定量更精确^[16-19]。本研究拟采用本实验室已建立的液相色谱串联质谱同位素内标法检测神经递质类氨基酸,通过正常组与疾病组之间比较,来评价多种神经递质类氨基酸代谢差异。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

3200QTRAP 型液相色谱 - 串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源 (ES) 以及 Analyst 1.4.2 数据处理软件, 美国 Applied Biosystem 公司, UltiMate3000 标准型液相色谱仪, 包括双三元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 切换阀, 美国戴安公司 氮吹浓缩仪, 日本东京理化器械株式会社。

iTRAQTM 试剂盒 (200 人份), 批号 0709002, 美国 Applied Biosystem 公司, 包括 400 μmol/L 正异亮氨酸的 10% 磺基水杨酸溶液、标记缓冲液 (0.45 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 8.5 含有 20 μmol/L 正缬氨酸、115-iTRAQ 衍生化试剂 (15 人份 / 瓶, 每瓶用 70 μL 异丙醇稀释后使用)、1.2% 羟胺水溶液、i-TRAQ-114 同位素标记的氨基酸内标。

1.2 试验分组与样本采集

试验分疾病组 10 名, 临床已诊断为癫痫并近期有抽搐发生。健康组 10 名, 医生查体和生命体征检查正常。近 1 个月内血常规、血生化、尿常规、HBsAg、HCV-Ab、HIV-Ab、胸透检查、心电图检查均正常或异常无临床意义。

样本采集前禁食 12 h, 采血时注意空腹, 不能服用果汁、饮料、保健品、药品等。并填写健康问卷。血样采集使用肝素抗凝管, 采集全血样本大于 0.5 mL, 采血后立即颠倒混匀 5~6 次, 于 30 min 以内离心分离血浆, -20℃ 冰冻保存待测。同时填写调查问卷, 主要包括基本资料、健康状况、疾病状况等。

1.3 生物样本的前处理

移取 40 μL 样本血浆置于 1.5 mL EP 管中, 加入 10 μL 10% 磺基水杨酸 (含有 400 μmol/L 正异亮氨酸), 漩涡混匀 30 s, 10000 转离心 2 min 沉淀蛋白。移取 10 μL 上层液体置于另一 1.5 mL EP 管中, 加入 40 μL 标记缓冲液 (含有 20 μmol/L 正缬氨酸), 漩涡混匀, 瞬时离心。移取 10 μL 上层液体置于另一 1.5 mL EP 管中, 加入 5 μL 稀释的 iTRAQ-115 衍生化试剂, 漩涡混匀, 瞬时离心, 室温下孵化至少 30 min。加入 5 μL 1.2% 羟胺, 漩涡混匀, 瞬时离心, 终止衍生化反应。样品在氮吹仪上 45℃ 氮气吹干。加入 32 μL 含 iTRAQ-114 同位素标记的内标液, 漩涡混匀, 旋转离心。进样 2 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

1.4 色谱质谱检测条件

色谱柱: AAA-C18 柱, 5 μm 粒径, 150 mm × 4.6 mm I.D. AB SCIEX 公司 流动相: 冰 (含有 0.01% 七氟丁酸、0.1% 甲酸) - 乙腈 (含有 0.01% 七氟丁酸、0.1% 甲酸) 梯度洗脱 柱温: 50℃; 进样量 2 μL。

离子源: 离子喷雾离子化源 正离子化模式 离子喷射电压: 3000 V 温度: 580℃ 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力: 345 kPa; 气体 2 (GS2, N₂) 压力: 414 kPa; 气帘气体 (N₂) 压力: 138 kPa 扫描方式为多重反应监测 (MRM) 碰撞气 (N₂) 压力: Medium 解簇电压 (DP) 为 35 V 碰撞能量 (CE) 为 30 eV, 采用 MRM 扫描模式。

1.5 数据的统计分析方法

数据采用均值 ± 标准差表示, 健康组和疾病组数据分别采用 t 检验和主成份 (PCA) 分析 (SIMCA-P 软件) 进行统计处理及评价。

2 结果

2.1 氨基酸 LC-MS/MS 检测

样本处理后经 LC-MS/MS 平台上特定的采集方法运行, 得到总离子流图 (图 1), 9 种氨基酸及其同位素内标均有较好出峰, 且分离较好。

2.2 氨基酸定量结果

疾病组和健康组 9 种氨基酸测定结果见表 1。Trp、GABA 两组间没有显著性差异 (P>0.05), Arg、Gly、Ser、Tau、Asp、Glu、EtN、两组间有显著性差异 (P<0.05), 其中 Gly、Ser、Asp 两组间有显著性差异 (P<0.001)。

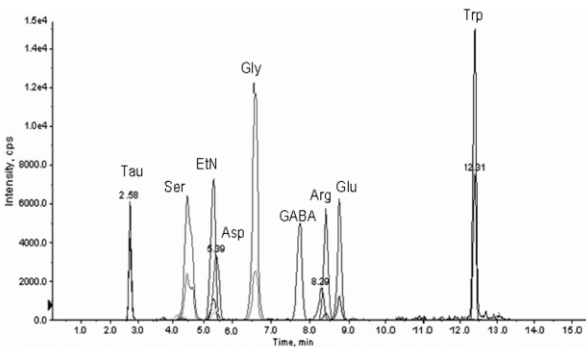


图 1 氨基酸总离子流图
Fig.1 TIC of amino acid

表 1 氨基酸测定结果及 t 检验
Tab.1 Results of amino acid and t-test

Amino acids		Arg	Trp	GABA	Gly	Ser	Tau	Asp	Glu	EtN
Control group	Mean	94.50	50.50	1.20	275.50	140.50	51.50	3.40	38.10	9.00
	μM	SDE	18.08	7.36	0.23	22.50	14.81	6.28	10.87	0.97
Case group	Mean	126.34	56.84	1.31	325.10	223.81	66.39	5.01	86.72	12.04
	μM	SDE	41.07	16.24	1.40	42.26	63.28	21.00	25.32	3.23
Case group/Control grouo		133.7%	112.6%	108.9%	118.0%	159.3%	128.9%	147.3%	227.6%	133.7%
P value		0.038	0.276	0.813	0.004	0.001	0.046	0.001	0.000	0.011

2.3 PCA 分析结果

疾病组和健康组 9 种氨基酸测定结果通过 PCA 分析结果见图 2 (图 2-A 得分图,即样品分布散点图 图 2-B 载荷图)。通过 PCA 分析显示,疾病组与健康组之间有明显的界限,且健

康组比较集中,氨基酸一致性较好,疾病组样本分散较多,差异较大。其中疾病组与健康组比较,Asp、Glu、Ser 等是引起差异的主要氨基酸。

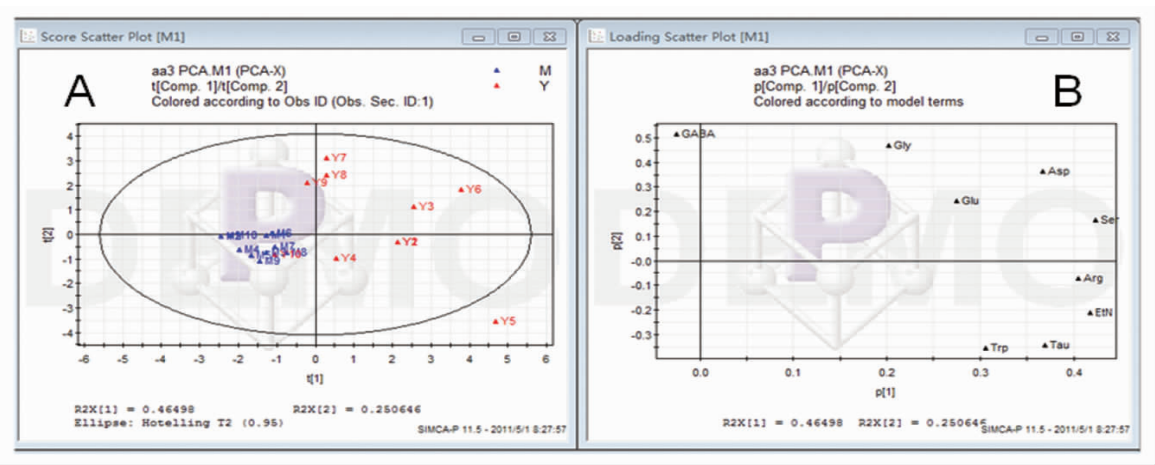


图 2 氨基酸 PCA 分析结果

Fig.2 PCA results of amino acid

3 讨论

串联质谱 MRM 技术是目前用于定量最好的质谱技术^[15,19]。与其他扫描方式相比,如新生儿筛查中所用的母离子扫描、中性丢失扫描等扫描技术,此技术根据氨基酸母离子质量数与碎片离子质量数,选择母离子-子离子对,允许符合要求的子离子进入碰撞室,碰撞结束后,只记录设定子离子信号,如此通过母离子与子离子的两次选择,就可以去除干扰离子,降低化学背景,提高灵敏度。其次我们在前处理过程中每一种需要检测的氨基酸都加入了已知浓度的它自己的同位素内标,色谱行为、质谱的离子化效率和基质效应均能完全一致,进一步确保了检测结果的准确性。相较其他的检测方法,具有检测效率高,分离效果好,结果准确等优点,更利于分析氨基酸与疾病间的关系。我们日常所吃的食物,所喝的饮料中都含有大量氨基酸,所以吃东西前与后人体血液中的氨基酸含量肯定会有很大的差异。所以在采集样本时我们有比较严格的要求。必须清晨空腹 12 h 以上采血,而且要求不能溶血,采完血后尽快,最好半小时以内离心取出血浆保存到 -40℃ 冰箱以备检测。

本实验结果表明与神经相关的氨基酸含量在癫痫病患者体内与正常人体内相比有比较明显的差异。其中兴奋性氨基酸 Tau、Asp、Glu 疾病组血浆中含量明显高于正常组 128.9%、147.3%、227.6%,差异有统计学意义 ($P<0.05$),抑制性氨基酸 GABA 含量疾病组与正常组之间无明显差异 ($P>0.05$)、而 Gly 疾病组血浆中含量约高于正常组 118.0%,差异有统计学意义 ($P<0.05$),而其他氨基酸如 Arg、Ser、EtN 等疾病组也明显高于正常组 133.7%、159.3%、133.7%,Trp 疾病组血浆中含量约高于正常组 112.6%,实验结果与文献基本一致^[10-12]。天门冬氨酸是一种非必需氨基酸,是谷氨酸利用维生素 B6 转化而来,涉及尿素和能量代谢循环,转运血氨,参与糖原合成,增强精力,脑梗

或者癫痫常造成该氨基酸偏高。谷氨酸作为机动性的神经递质,可以从大脑中清除过量的血氨,能帮助减轻头疼疲劳等症。丝氨酸可以与甘氨酸互相转换,参与神经递质、DNA、糖原、激素和酶的生成。色氨酸可转化生成人体大脑中的一种重要神经传递物质 5-羟色胺,而 5-羟色胺有中和肾上腺素与去甲肾上腺素的作用,并可改善睡眠的持续时间。通常与抑郁症、失眠症和精神分裂症有关。通过 PCA 分析显示,疾病组与健康组之间有明显的界限,Asp、Glu、Ser 等是引起差异的主要氨基酸。健康组比较集中,氨基酸一致性较好,疾病组样本分散较多,差异较大。分析原因 由于本研究过程中,健康组年龄范围较窄,身体基本状况通过查体有全面的控制,氨基酸水平也较为一致,而疾病组年龄及基本疾病状况均差异较大,且长期用药情况可能对氨基酸的水平也有较大影响,加之病例较少,文中反映的氨基酸差异有待大样本量进一步验证。

本研究首次将液相色谱串联质谱同位素内标法检测神经递质类氨基酸方法用于评价疾病组和健康组中氨基酸浓度,初步的评价了癫痫患者体内氨基酸差异。

参考文献 (References)

[1] 魏鄂,张晓琴. 癫痫与 NMDA 受体的研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2009, 17(3): 237-239
Wei Ying, Zhang Xiao-qin. The research progress of Epilepsy and NMDA receptors[J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2009, 17 (3): 237-239

[2] Sahin M, Miller I, Holmes GL, Sheth RD. Pediatric epileptology. Epilepsy Behav, 2011 ,4 ,27

[3] Alvestad S, Hammer J, Qu H, Häberg A, et al. Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. J Cereb Blood Flow Metab, 2011 ,4 ,27

[4] 张新定, 张永权. 兴奋性氨基酸与癫痫 [J]. 兰州医学院学报, 1997,

23(3): 68-84

- [5] 矫毓娟, 王维治. 症状性癫痫患者脑脊液中氨基酸类神经递质的初步研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2000, 7(1): 28-37
Qiao Yu-juan, Wang Wei-zhiGui. Symptoms of cerebrospinal fluid epilepsy of amino acids neurotransmitter preliminary research[J]. Chinese Journal of Neuroimmunology and Neurology, 2000, 7(1): 28-37
- [6] Tertiae, 2Adam S. Ptolemy, Yijun Li, Tamara Sanderson, et al. A9-Month-Old Boy with Seizures and Discrepant Urine Tryptophan Concentrations [J]. Clinical Chemistry, 2011,57: 545-548 009, 31(8): 675-678
- [7] 付海尔. 抗癫痫药物的作用机制研究进展[J]. 医学信息, 2009,1(12): 44-45
Fu Hai-er. Advances on Mechanism of Action of Antiepileptic Drugs [J]. Medical Information, 2009,1(12): 44-45
- [8] 陶成. 氨基酸类神经递质与惊厥和癫痫的关系[J]. 基础医学与临床, 1993, 13(5): 335-338
- [9] 桂莉, 田洪, 郑健, 等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中 4 种氨基酸类神经递质 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(8): 675-678
Gui Li, Tian Hong, Zheng Jian, et al. Simultaneously determining 4 amino acid neurotransmitters in mice brain by high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. Acta Academiae Medicinae Militariae Tertiae, 2009, 31(8): 675-678
- [10] 曾因明, 王均, 段世明, 等. OPA 柱前衍生反向高效液相色谱法测定脑组织中氨基酸类神经递质[J]. 江苏药学与临床研究, 2002, 10(1): 16-18
Zeng Yin-ming, Wang Jun, Duang Shi-ming, et al. The Method for the Determination of Amino Acid Neurotransmitters in Brain by Reverse Phase HPLC System with the Precolumn Phthali Aldehyde Derivatization [J]. Jiangsu Pharmaceutical and Clinical Research, 2009, 2002, 10(1): 16-18
- [11] 单萍, 陈国华, 罗利俊, 等. 脑出血后早发癫痫患者血清氨基酸类神经递质测定分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2009, 4(3): 181-184
Shan Ping, Chen Guo-hua, Luo Li-jun, et al. Analyst of Amino Acid Neurotransmitters of Blood in Patients with Early Developed Epilepsy after Intracerebral Haemorrhage [J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2009, 4(3): 181-184
- [12] 凌为明. 癫痫患者血浆氨基酸神经递质的含量测定及临床意义[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 452-454
- [13] Van Dycke A, Verstraete A, Pil K, et al .Quantitative analysis of adenosine using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (LC/APCI-MS/MS). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 6,1:878 (19): 1493-1498
- [14] 李慧, 林哲绚, 张源, 等. 高效液相色谱 - 质谱 - 质谱测定脑组织中氨基酸类神经递质[J]. 分析测试学报, 2005, 24(2): 89-91
Li Hui, Liu Zhe-xuan, Zhuang Yan, et al. Determination of Neurotransmitter Amino Acids in Rat Hippocampus with HPLC-MS-MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(2): 89-91
- [15] 高晓岚, 王瑜, 韩连书, 等. 串联质谱检测肝血滤纸片中氨基酸质控分析[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(14): 220-224
Gao Xi-lan, Wang yu, Han Lian-shu, et al. Analysis of Amino Acid in Dry Blood Filter Paper with Tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2007, 22(14): 220-224
- [16] 王一红, 冯家力, 潘振球等. 液相色谱 - 质谱 / 质谱联用技术分析 18 种游离氨基酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 161-165
Wang Yi-hong, Feng Jia-li, Pan Zhen-qiu, et al. The Analysis of 18 Free Amino Acids by Liquid Chromatography/mass Spectrometry/mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(2): 161-165
- [17] Dennis J. Dietzen, Annette L. Weindel, Mary O Carayannopoulos, et al. Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(22): 3481-3488
- [18] Liang X, Li Y, Barfield M, et al. Study of Dried Blood Spots technique for the Determination and its Metabolite Dectrorphan in Human Whole by LC-MS/MS[J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877: 799-806
- [19] Nakajima Y, Ito T, Maeda Y, et al . Evaluation of valproate effects on acylcarnitine in epileptic children by LC-MS/MS. Brain Dev, 2010, 11, 31