

## 三重四极杆质谱仪 LCMS™-8060NX 分析唾液中亲水性代谢产物的代谢组学研究



人口腔中大约生活着约 700 种、90 亿个细菌，这些细菌和肠道细菌一样，能产生短链脂肪酸。现在逐渐查明，口腔细菌产生的短链脂肪酸对牙周组织具有危害作用。例如，牙周病的主要病原体口腔厌氧革兰氏阴性细菌会产生大量的短链脂肪酸（尤其是丁酸）。

近年来，代谢组学技术因其能全面分析体内代谢产物而成为研究热点。代谢组学分析是指全面分析经细胞活动产生的氨基酸和有机酸等小分子代谢产物，明确多个试样群中差异的学术领域，与其他组学相比，对象组分较少，因而易于进行全面分析。

本报告介绍了一个案例，使用超高效液相色谱质谱仪（LC/MS/MS）进行唾液代谢组学分析。众所周知，唾液中含有口腔细菌产生的代谢产物，同时含有口腔细菌。因此，因口腔细菌的作用而在唾液中含有的代谢产物数量会受到分析之前的唾液保存状态的影响。因此，使用代谢组学分析调查了保存温度对唾液所含代谢产物的影响。

T. Hattori, Y. Yamada

### ■ 样品

唾液来自一名健康成年男性。采集后按 12000 rpm 进行 10 分钟离心分离，然后将其上清液分装到 4 个微型管中。各样品分别在 -80、4、25、40°C 下保存 3 天。

### ■ 预处理

在短链脂肪酸 / 有机酸分析的预处理中，为了增加目标物在 ODS 色谱柱上的保留，并提高 MS 检测的灵敏度，将样品用 3-硝基苯肼（3-NPH）衍生化。在唾液中添加 3-NPH（衍生化试剂）、吡啶（催化剂）、碳二亚胺（缩合剂）、2-乙基丁酸（内标物质），室温下反应 30 分钟。反应后，使用含有甲酸的甲醇溶液稀释 5 倍。

在用于同时分析亲水性代谢产物的预处理当中，用超纯水对唾液稀释 5 倍。稀释时，添加了 2-吗啉乙磺酸（MES），使得内标物质浓度为 1 μmol/L。

## ■ 分析条件

使用 LC/MS/MS 短链脂肪酸方法包和 LCMS-8060NX 进行短链脂肪酸 / 有机酸分析。本分析法可分析醋酸、丙酸、丁酸等 6 种短链脂肪酸以及有关中心代谢路径的 16 种有机酸。表 1 所示为 HPLC 及 MS 的分析条件。

表 1 分析条件 (短链脂肪酸、有机酸分析)

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
色谱柱	: 反相柱
流动相	: A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 乙腈
模式	: 梯度洗脱
流速	: 0.35 mL/min
进样量	: 3 µL
[MS 条件] (LCMS-8060NX)	
离子源	: ESI (正离子和负离子模式)
喷嘴位置	: +3 mm
模式	: MRM
雾化气流量	: 2.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C

亲水性代谢产物的同时分析利用 LC/MS/MS 初级代谢产物方法包 ver.2 中含有的液质采集方法, 采用 LCMS-8060NX 进行。本分析方法可实现对生命科学领域代谢组学分析中已知重要的氨基酸、有机酸、核苷、核苷酸等 97 种亲水性代谢产物同时进行分析。表 2 所示为 HPLC 及 MS 的分析条件。

表 2 分析条件 (亲水性代谢产物同时分析)

[HPLC 条件] (Nexera X3)	
色谱柱	: 反相柱
流动相	: A) 0.1 % 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸乙腈溶液
模式	: 梯度洗脱
流速	: 0.25 mL/min
进样量	: 3 µL
[MS 条件] (LCMS-8060NX)	
离子源	: ESI (正离子和负离子模式)
探针位置	: +3 mm
模式	: MRM
IonFocus 电压	: ±2 kV
雾化气流量	: 3.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C



## ■ 利用 IonFocus™ 设备提高灵敏度

分析活体、食品等基质较多的样品时, 通过离子源远离 MS 导入部, 可以降低基质的影响, 但导入 MS 的离子会减少, 造成灵敏度下降。LCMS-8060NX 的 IonFocus 设备 (图 1) 通过聚焦电极输送离子, 高效地将离子导入质谱仪, 去除多余的中性粒子。因此, 即使在离子源远离 MS 导入部的情况下, 灵敏度也不会下降, 兼顾分析灵敏度与仪器稳健性。针对从唾液中检测出的亲水性代谢产物, 确认 IonFocus 设备的效果后发现, 即使在离子源远离 MS 导入部的情况下, 灵敏度也不会下降, 灵敏度平均提高约 1.4 倍。图 2 所示为灵敏度提高示例。

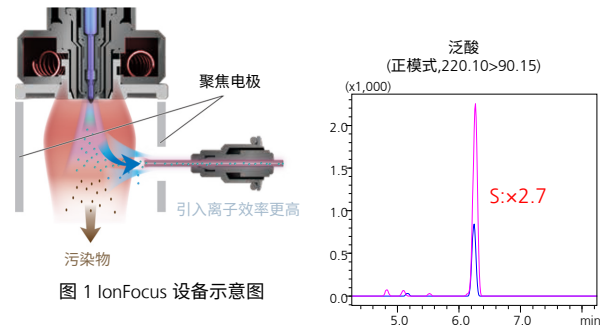


图 1 IonFocus 设备示意图

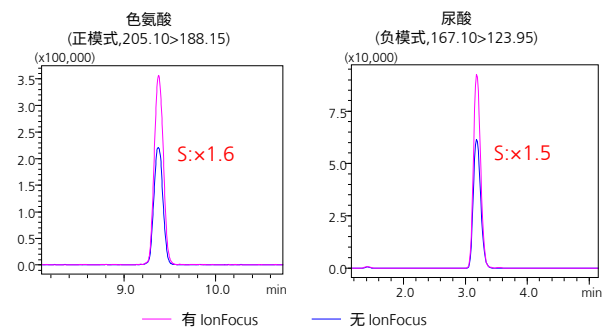


图 2 IonFocus 设备提高灵敏度

## ■ Peakintelligence™ 波形处理

利用 LabSolutions Insight™ 的选配软件 Peakintelligence 对检测出的色谱峰进行峰形处理。Peakintelligence 会使 AI 学习熟练操作者进行的峰形处理, 实现与熟练者同等水平的解析。如图 3 所示, 即使是附近有其他组分峰干扰的情况下, Peakintelligence 也可以正确地进行检测和峰形处理。由此可降低误检测及未检测色谱峰, 缩短确认和修改峰形处理结果所需的时间。

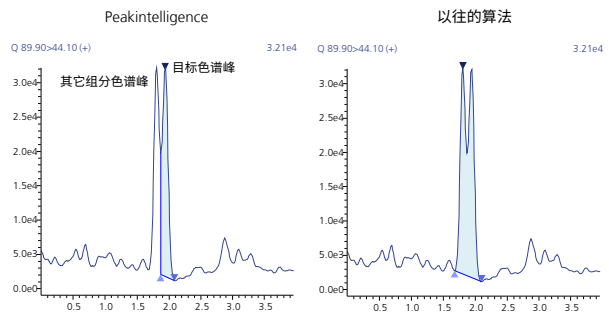


图 3 Peakintelligence 峰形处理



图6所示为因保存温度的差异而出现较大浓度变化的代谢产物峰面积比波动。从中可知，精氨酸、谷氨酸、组氨酸等的氨基酸以及乳酸、丙酮酸、琥珀酸等的有机酸会因保存温度的不同而出现较大的变化。出现这种变化的原因之一是唾液中存在口腔细菌在保存期间消耗或产生了这些组分。

## 总结

综上所述，通过使用 LC/MS/MS 进行唾液的代谢组学分析，可以全面分析口腔细菌产生的亲水性代谢产物。该分析方法在口腔细菌群研究的代谢组学分析中非常有效。

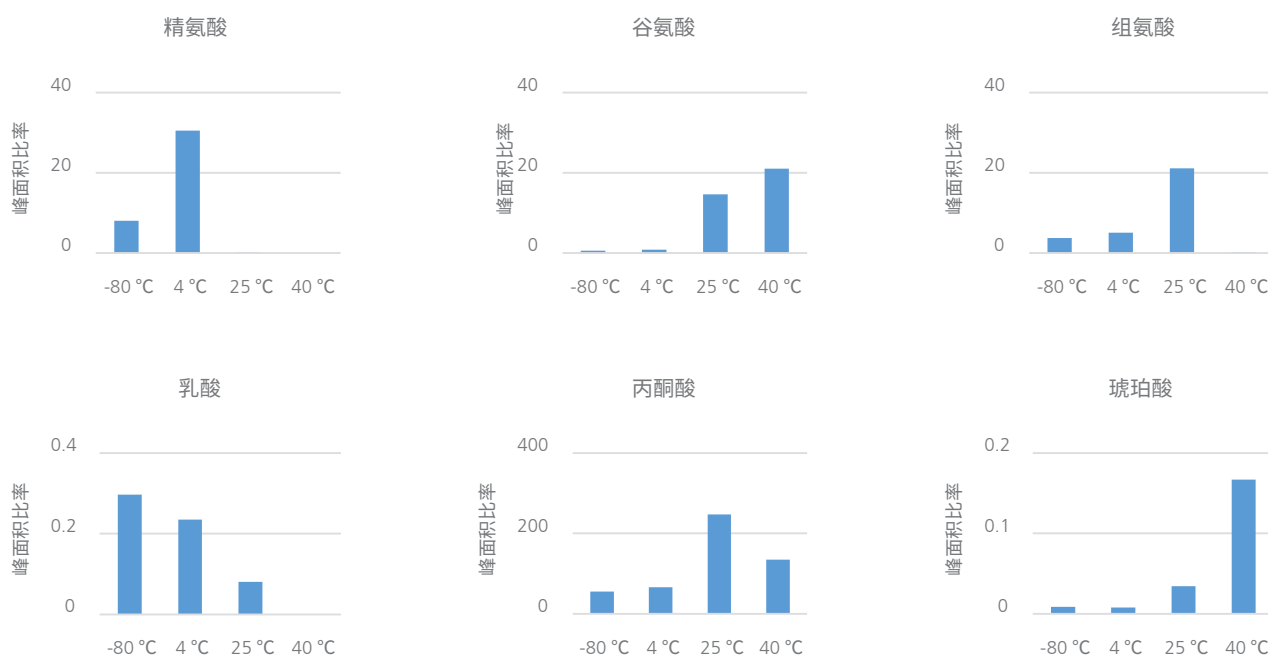


图6 唾液中短链脂肪酸、有机酸的变化趋势

本文件中记载的产品尚未作为医疗器械得到医药品医疗器械法的批准和认证。

无法用于治疗诊断目的，无法通过正常程序使用。

LCMS、Nexera、IonFocus、Peakintelligence 和 LabSolutions Insight 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标

SIMCA 是 Sartorius Stedim Data Analytics AB 的注册商标。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020年10月