

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2113-M-040-002-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：張耀仁

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：吳亭瑩

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 99年10月31日

長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發

The development and study of long detection window bio-specimen by mass spectrometry based metabolomics

計畫編號：NSC98-2113-M-040-002

執行期限：98年8月1日至99年7月31日

主持人：張耀仁 中山醫學大學分子醫學毒理學研究所

計畫參與人員：吳亭瑩

Key word: metabolomic, hair urine

摘要

相對於其他檢體，毛髮檢體具有採集快速、容易、不具侵入性、不易作假；體積小、無需冷藏冷凍，保存運送十分方便之天生優點，而更重要是：經長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性，遠勝於其他檢體。然而，近年來興起，對於生物醫學將扮演極重要角色之代謝體學，對於毛髮等長效型檢體之研究還甚少。本研究首先針對基本檢體--尿液，建立 GC/MS 代謝體分析方法，其結果發現使用 BSTFA 衍生化，可搜尋到最多之小分子代謝物。進而推展至長效型檢體--毛髮，利用已建立 GC/MS 代謝體分析方法進行分析，雖然與尿液之重疊性不高，但分析到之小分子代謝物亦有 64 個。而進一步使用 LC- Q/TOF 代謝體分析方法，並比較各類之真實毛髮檢體，如男性、女性、黑、白髮與吸食毒品者，發現了更多可能存在毛髮之小分子化合物。

關鍵字：代謝體、尿液、毛髮。

Abstract

In contrast to other specimens, which detects only for several days, the collection of hair is noninvasive and easily observed, minimizing the risk of sample switching or adulteration. It can be stored and transported without specific precautions for its native stability. The most important is the wider window detection of hair, which makes hair an attractive biological matrix for monitoring. However the research of medicine metabolomic is extremely scarce, therefore this project first established the urine metabolomic methods by GC/MS method. Afterwards, this project had developed and studied the metabolomic for the long detection window specimen---hair using GC/MS and LC/MS (Q-TOF) analysis method. This project establish higher sensitivity mass spectrum analysis for metabolomic, and carry on the hair analysis for male, female, white hair and abused hair, combination the other medicine information to seek new biological marker.

前言

代謝體學是近年在系統生物學概念領域中迅速發展起來的新興研究領域。由於生物體內特定的生命現象和許多代謝產物的表現有關，而代謝產物又可視為是基因表現之末端產物。因此，藉由生物體內特定時空內代謝產物表現量的分析，可以推測出該生物體的生理狀況，同時可進一步的瞭解其基因體序列中每一個基因所代表的功能，及其所參與之各種生理、生化途徑之調控機制。此相關的研究方法及領域，均可納入代謝體學之研究範疇中。因此，代謝體學可說是繼基因體與蛋白質體學後另一受矚目的研究領域。而相對於基因體上萬個基因，蛋白質體上百萬個蛋白的分析，代謝體只有數千個化合物的數量，因此相對的簡單，分析的儀器與花費也相對的低。由於代謝體 (metabolome) 基因體影響之最終端領域，因此探討代謝質體全貌對基因體學研究是非常有幫助的。

然而，代謝體中代謝物的數量因生物物種不同而差異較大，且其濃度分佈範圍有 7~9 個數量級之差異。實際上，在人體和動物中，由於還有共存的微生物代謝、食物及其代謝物本身的再降解，到目前為止，還不能確切得知到底有多少種代謝產物。因此對代謝體學的研究，無論從分析平臺、數據處理及其生物解釋等方面均面臨諸多挑戰。

而代謝體基本上仍就處於技術開發的階段，目前所知無一種方法可以涵蓋如此廣泛之範疇，目前代謝體研究分析方式可分代謝物指紋 (metabolic fingerprinting) 模式與代謝產物輪廓 (metabolite profiling) 兩類。代謝物指紋模式：通常不進行代謝物之鑑定，只要是希望利用高通量 (high-throughput) 分析模式，快速分析代謝物，區別不同樣品之間的生物狀態或來源。而代謝產物輪廓模式：利用樣品製備與儀器技術，將這些代謝產物與基質分離，並鑑定與定量與特定代謝路徑有關的預定代謝產物。

代謝體主要分析技術為質譜儀分析(mass spectrometry,MS)與核磁共振技術(nuclear magnetic resonance,NMR),再搭配上各類之具公信力的鑑定資料庫與多變數之統計分析軟體,進一步鑑別生物標幟的特徵和有助於說明生物學、生理學和病理學上的差異。核磁共振技術於化合物之鑑定有其獨到之優點,常用於代謝物指紋分析。不過LC-NMR偵測極限較高,常需要比較濃的樣本,因此通常在生物檢體中小於 $1\mu\text{M}$ (~200 ng/mL)之化合物即不易偵測。

相對NMR而言,質譜技術其靈敏度可近乎數ng/mL之能力,因此於代謝體研究上,更適宜進行各類檢體之分析。但由於內生性的代謝物極多,包含有機酸、胺基酸、胺類、醣類、類固醇、nucleic acid bases及細胞代謝的中間物。這些小分子代謝產物其物理化學特性呈現極大的差異,因此也需結合多種的分離技術與鑑定技術來解析這些代謝物。

質譜技術主要是氣相層析儀質譜儀(GC/MS)與液相層析質譜儀(LC/MS)兩類方法。質譜儀因其所具有的高靈敏度、高鑑別能力及樣品需求量少,早已成為現代分析化學中,不可或缺的工具。以質譜以為偵測器,發展質譜直接分析技術,相較於其他分析化學方法,如:IR、UV、螢光、電化學、NMR等,似乎具有較大的可行性。質譜儀主要是提供待測化合物的分子量或其碎片離子的分子量,因此,分析時首先就是要將化合物離子化。GC/MS目前已被證明具有高靈敏度、可得到分離之高解析度和再現性。並有現成可利用具公信力的GC/MS/EI的圖譜資料庫,來deconvolution和鑑別代謝物¹⁰。雖然GC/MS具極高之可靠性與低成本的硬體設備,然而,只有具揮發性的化合物可以直接經由GC/MS進行分析,其它極性的非揮發性化合物則需作衍生化,使得其應用受到極大之限制。

LC/MS由於它的高靈敏性和選擇性,為目前許多醫藥和臨床分析的首選方法。相較於GC/MS,LC/MS通常不需作衍生化,因此除了有較簡單的樣品製備過程,更包含較廣泛的分析範圍,可提供一種或多種的化合物之類別分析或同時分析。而高解析度的LC/MS,如Q-TOF,LTQ Orbital trap等,更可利用精確質量之測定和串聯質譜,對未知的代謝物的結構提供更多的分析與鑑定能力,補足GC/MS不足,在代謝體的研究有極大的潛力。由於近年來使用LC/MS來做為代謝體的分析平台的研究數目正在迅速增加。

長效期生物檢體:毛髮,是本研究的主要目標,也是目前人類代謝體所未呈現之資訊。毛髮由於可以不斷生長,只要不被剪下,可持續紀錄,因此只要採取適當的部位加以分析,即可呈現過去之代謝體,因此毛髮被視為目前最佳的長效性

生物檢體。毛髮是由毛囊細胞所生成的,在毛髮生長的過程中,毛囊細胞會吸收周圍微血管與皮脂腺中的養分,當作原料來編織新的毛髮,因此血液與皮脂腺中的化合物或其代謝物也就一起被編織在毛髮中;由於毛髮中沒有酵素存在,因此在毛髮中的化合物或其代謝物十分穩定,數十年也不會消失。由於可以不斷生長,只要不被剪下,可持續紀錄,因此毛髮檢驗可以進行分段分析,剖析其每個月的化合物或其代謝物歷程,了解其生體變化。初生的頭髮在頭皮底下靠近毛囊的位置,約五到七天才會冒出頭皮;隨著新的毛髮不斷合成,舊的毛髮不斷的往外推出。以頭髮為例,平均每個月以1-1.5公分的長度生長,因此依據頭髮與頭皮的距離,可以向前追查,完整重現。

結果與討論

代謝體學的分析流程包括了樣品的製備、代謝產物成分分析鑑定、及多變數統計分析。本研究首先針對尿液(基本檢體)與毛髮(長效型檢體)進行代謝體研究,發展GC/EI-MS代謝體之化合物分離與鑑定,同時建構GC/MS相關之資料庫搜尋方法與工具,並以統計方法建立分類之可信度。其次,針對毛髮(長效型檢體),發展LC-QFOF之代謝體化合物之分析方法,建構相關之資料庫搜尋方法與工具,並以統計方法加以分析。

GC/MS分析方式須先用urease酵素消化樣品,利用ethanol或methanol來將蛋白質做沉澱。之後將混合物做混合振盪、離心、收集上清液、吹乾最後以先以oximation試劑衍生,再用silylation試劑包含BSTFA和MSTFA,作第二次之衍生化。

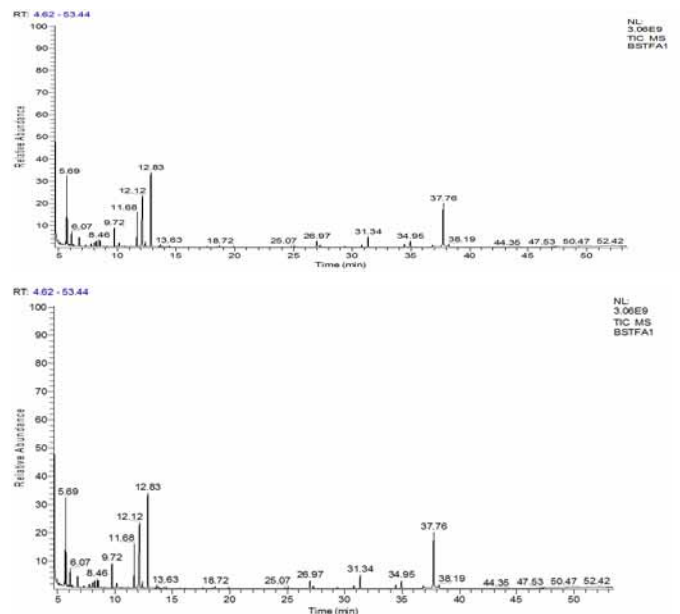


Fig 1. (上)BSTFA (下) MSTFA 衍生之尿液層析圖。

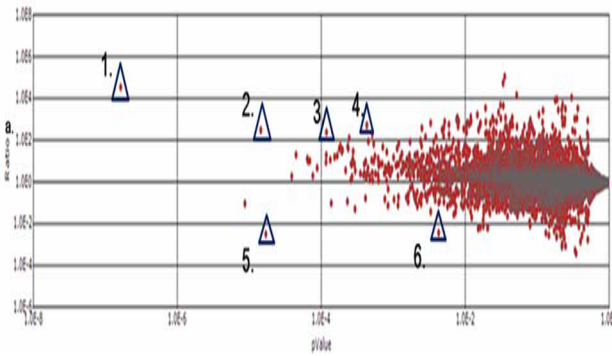


Fig 2. 統計軟體比較 BSTFA 與 MSTFA 差異性

我們發現以 GC/MS 可測得之尿液與毛髮化合物有極大之差異，而若以數量來看，毛髮可測得之化合物數目約為尿液的 1.5 倍。總之，GC/MS 其具有足夠的靈敏度與再現性可以進行代謝體分析，並且 IST 等具公信力的 EI 圖譜資料庫來鑑定代謝物¹⁰。除了，極高之可靠性與較低成本的硬體設備，GC/MS 同時具有高解析度分離結果，其時具有極大的價值。

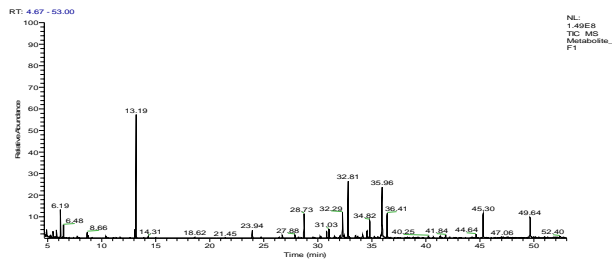
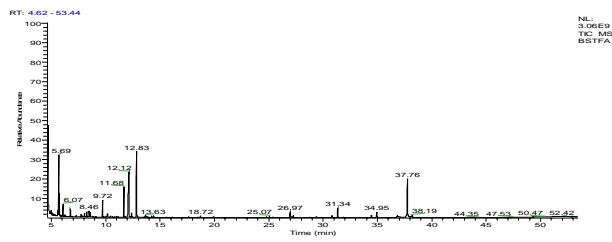


Fig 3. 經 BSTFA 衍生化之(上)尿液代謝體(下)毛髮代謝體 GC/MS 層析圖

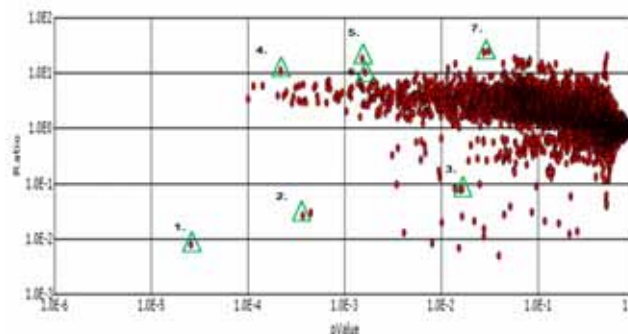


Fig4. 統計軟體比較尿液與毛髮小分子化合物差異性

LC/MS 由於它的高靈敏性和選擇性，為目前許

多醫藥和臨床分析的首選方法。相較於 GC/MS，LC/MS 通常不需作衍生化，因此除了有較簡單的樣品製備過程，更包含較廣泛的分析範圍，可提供多種的化合物之類別分析或同時分析。而高解析度的 LC/MS，如 Q-TOF，更可利用精確質量之測定和串聯質譜，對未知的代謝物的結構提供更多的分析與鑑定能力，補足 GC/MS 不足，在代謝體的研究有極大的潛力。因此本研究隨後嘗試以 LC-QTOF 進行長效型檢體--毛髮之分析。

由 Fig 5 可知，以 LC-QTOF 層析質譜方法，在相同之毛髮檢體進行三重覆分析，得到極高之相似性，證實目前使用之 LC-QTOF 層析質譜方法可用於毛髮上。

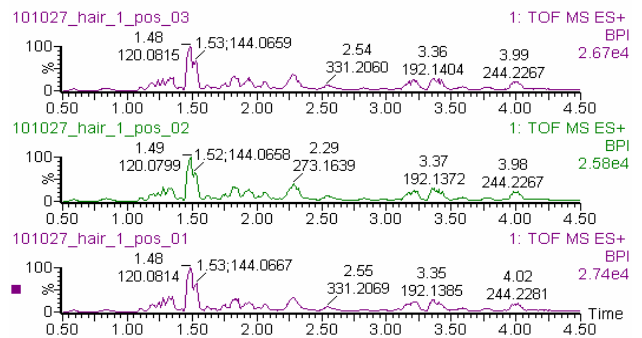


Fig 5. 毛髮之 LC-QTOF 三重覆分析。

隨後，我們進行不同性質頭髮之比對，我們分別選擇黑髮(男性)、白髮(男性，同一人)、女性(有染髮)與吸毒者(使用甲基安非他命、搖頭丸與 K 它命)等不同毛髮，進行 LC-QTOF 正負離子電灑法(ESI)分析，結果發現正離子有極大之圖譜特徵差異，而負離子之圖譜特徵差異不大。

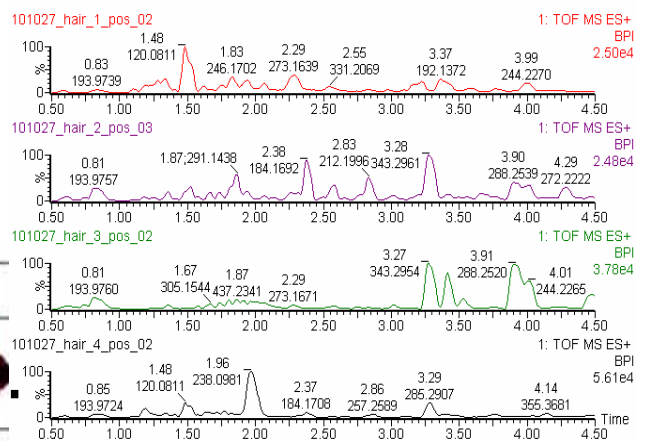


Fig 6. 不同毛髮之正離子 ESI LC-QTOF 分析。

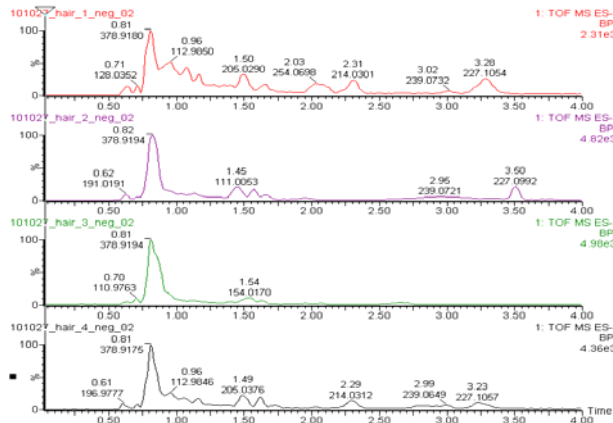


Fig 7. 不同毛髮之負離子ESI LC-QTOF分析。

圖 8 為吸毒者毛髮 LC-QTOF 分析，由上至下分別為之 K, NK, MDA, MDEA, MDMA, MA 與 AMP 之離子萃取圖。由於事先已使用本實驗室之多重藥物 GC/MS 毛髮分析方法進行分析，知其甲基安非他命、安非他命、K 它命與 NK 各為 4213、721、20181 與 1873 pg/mg，而於 LC-QTOF 分析亦呈現類似之強度，但偵測到微量之搖頭丸(MDMA 與其代謝物 MDA)。

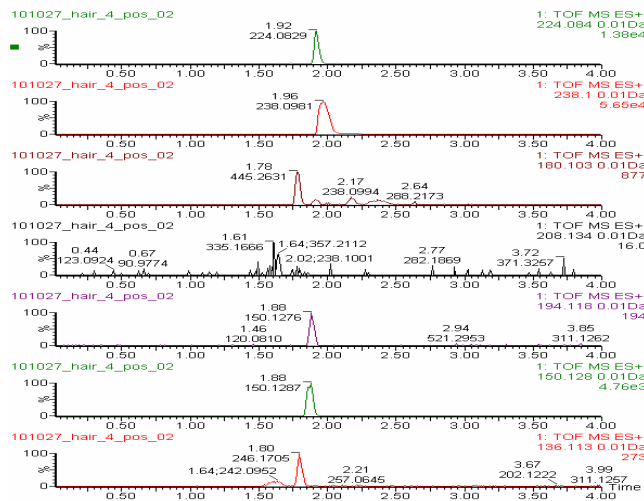


Fig 8. 多重藥物吸食者之毛髮 LC-QTOF 分析圖。

結論

生物體內特定的生命現象和許多代謝產物的表現有關，而代謝產物又可視為是基因表現之末端產物。因此，藉由生物體內特定時空內之代謝產物表現量的分析，可以推測出該生物體的生理狀況，同時可進一步的瞭解其基因體序列中每一個基因代表的功能，及其所參與之各種生理、生化途徑之調控機制。由於生體內代謝產物的表現遠較基因體及蛋白質體為單純，樣品前處理與所需之儀器，使得分析難度相對減少許多。

本研究目前已針對尿液與毛髮之前處理方法，如清洗、消化或溫浸、萃取及儀器分析等步驟之差異，進行先期之分析探討，並進行 GC/MS 之分析與鑑定，由滯留時間與 NIST 資料庫比對，GC/MS 之分析與鑑定，由滯留時間與 NIST 資料庫比對，我們發現尿液與毛髮可測得之化合物有極大之差異，而若以數量來看，毛髮可測得之化合物數目與尿液相當。而進一步使用 LC-Q/TOF 代謝體分析方法，並比較各類之真實毛髮檢體，如男性、女性、黑、白髮與吸食毒品者，發現了更多可能存在毛髮之小分子化合物。

參考文獻

1. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18: 1157.
2. Zerhouni, E. *Science* 2003, 302, 63-72.
3. Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* 2002, 48, 155-171.
4. Fernie, A. R.; Trethewey, R. N.; Krotzky, A. J.; Willmitzer, L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 763-769.
5. Bino, R. J.; Hall, R. D.; Fiehn, O.; Kopka, J.; Saito, K.; Draper, J.; Nikolau, B. J.; Mendes, P.; Roessner-Tunali, U.; Beale, M. H.; Trethewey, R. N.; Lange, B. M.; Wurtele, E. S.; Sumner, L. W. *Trends Plant Sci.* 2004, 9, 418-425.
6. Glassbrook N, Beecher C, Ryals J. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18: 1142.
7. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W. B.; Harrigan, G. G.; Kell, D. B. *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 245-252.
8. Hall, R. D. *New Phytol.* 2006, 169, 453-468.
9. Dunn, W. B.; Ellis, D. I. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 285-294.
10. Want EJ, Nordstrom A, Morita H, Siuzdak G. J. *Proteome Res.* 2007; 6: 459.
11. Fancy SA, Beckonert O, Darbon G, Yabsley W, Walley R, Baker D, Perkins GL, Pullen FS, Rumpel K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20: 2271.
12. Shoemaker JD, Elliott WH. *J. Chromatogr.* 1991; 562: 125.
13. Chen J, Zhao X, Fritsche J, Yin P, Schmitt-Kopplin P, Wang W, Lu X, Haring HU, Schleicher ED, Lehmann R, Xu G. *Anal. Chem.* 2008; 80: 1280.
14. Chen M, Zhao L, Jia W. *J. Proteome Res.* 2005; 4: 2391.
15. Zhang Q, Wang G, Du Y, Zhu L, A J. *J. Chromatogr. B* 2007; 854: 20.
16. Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, Jia W. *Anal. Chim. Acta* 2007; 583: 277.
17. Tolstikov, V. V.; Lommen, A.; Nakanishi, K.; Tanaka, N.; Fiehn, O. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6737-6740.
18. von Roepenack-Lahaye, E.; egenkolb, T.; Zerjeski, M.; Franz, M.; Roth, U.; Wessjohann, L.; Schmidt, J.; Scheel, D.; Clemens, S. *Plant Physiol.* 2004, 134, 548-559.
19. Bino, R. J.; Ric, de Vos, C. H.; Lieberman, M.; Hall,

- R. D.; Bovy, A.; Jonker, H. H.; Tikunov, Y.; Lommen, A.; Moco, S.; Levin, I. *New Phytol.* **2005**, *166*, 427-438.
20. Clemens, S.; Böttcher, C.; Franz, M.; Willscher, E.; von Roepenack-Lahaye, E.; Scheel, D. In *Plant Metabolomics*; Saito, K., Dixon, R.A., Willmitzer, L., Eds. Springer: Berlin, 2006; pp 65-79.
21. Tang, L.; Kebarle, P. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3654-3668.
22. Taylor, P. J. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 328-334.
23. Niessen, W. M. *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 179-197.
24. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3019-3030.
25. Schmidt, A.; Karas, M.; Dulcks, T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 492-500.
26. Annesley, T. M. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1041-1044.
27. Mallet, C. R.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 49-58.
28. Rogatsky, E.; Stein, D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1757-1759.
29. Yang J, Xu G, Hong Q, Liebich HM, Lutz K, Schmulling RM, Wahl HG. *J. Chromatogr. B* 2004; *813*: 53.
30. Ni Y, Su M, Qiu Y, Chen M, Liu Y, Zhao A, Jia W. *FEBS Lett.* 2007; *581*: 707.
- 31 Yu K, Sheng G, Sheng J, Chen Y, Xu W, Liu X, Cao H, Qu H, Cheng Y, Li L. *J. Proteome Res.* 2007; *6*: 2413.

無衍生研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：張耀仁		計畫編號：98-2113-M-040-002-				計畫名稱：長效型生物檢體 質譜代謝體之研究與開發	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%		
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	1%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	0%			
專任助理		0	0	0%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	0%			

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p style="text-align: center;">正在開發中</p>
---	--

科 教 處 計 畫 加 填 項 目	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

對於其他檢體，毛髮檢體具有採集快速、容易、不具侵入性、不易作假；體積小、無需冷藏冷凍，保存運送十分方便之天生優點，而更重要是：經長時間後仍可完整呈現出受檢者過去的生理歷程之獨特性，遠勝於其他檢體。然而，近年來興起，對於生物醫學極重要角色之代謝體學，對於毛髮等長效型檢體之研究還甚少。本研究首先針對基本檢體—尿液，建立 GC/MS 代謝體分析方法，其結果發現使用 BSTFA 衍生化，可搜尋到最多之小分子代謝物。進而推展至長效型檢體—毛髮，利用已建立 GC/MS 代謝體分析方法進行分析，雖然與尿液之重疊性不高，但分析到之相近數目之小分子代謝物。而進一步使用 LC-Q/TOF 代謝體分析方法，並比較各類之真實毛髮檢體，如男性、女性、黑、白髮與吸食毒品者，發現了更多可能存在毛髮之小分子化合物。