

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00216

微生物内氨基酸和小肽的分析方法及其应用进展

吴海棠, 陈啸飞, 王 慧, 曹颖瑛, 朱臻宇*

第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] 氨基酸和小肽是微生物内重要的活性组分和代谢产物。随着现代分析技术的日益革新, 微生物氨基酸和小肽的定性定量分析方法也在不断发展。本文首先从淬灭、提取、样品衍生化和浓缩几个方面对微生物样品前处理方法做了介绍; 进而分别从分离技术和检测方法两方面综述了氨基酸和小肽研究中所采用相关技术的特点及应用实例, 并系统分析了各种方法的优缺点, 同时展望了其发展趋势。

[关键词] 氨基酸类; 肽类; 微生物学技术

[中图分类号] Q 93-33

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)02-0216-04

Analysis methods of amino acids and small peptides from microorganism: recent advance

WU Hai-tang, CHEN Xiao-fei, WANG Hui, CAO Ying-ying, ZHU Zhen-yu*

Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Amino acids and small peptides are important active constituents and metabolites of microorganism. With the progression in modern analytical techniques, the qualitative and quantitative analysis methods of amino acids and small peptides from microorganism also keep improving. In this paper, the pretreatment methods were discussed from the quenching, extracting, derivatization and concentration steps. Furthermore, the properties and practical application of the commonly used separation and detection methods were discussed. Meanwhile, the prospects of the analysis methods for amino acids and small peptides from microorganism were also highlighted.

[Key words] amino acids; peptides; microbiological techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2): 216-219]

继基因组学和蛋白质组学之后, 代谢组学近年来发展迅速, 已成为系统生物学研究的重要组成部分, 已成功应用于微生物的基因突变或代偿机制引起的形态变化、耐药性等反馈的识别和机制研究^[1-2]。由于微生物代谢物质组(包含大量氨基酸和小肽类物质)的复杂性, 目前尚无一种分析技术可以同时分析体系中所有的代谢物。故在微生物代谢组学分析中, 应根据不同类型代谢产物的特性采用不同的分析方法, 才能获得相对全面的代谢物指纹谱。本文结合微生物样品前处理方法, 综述了目前氨基酸和小肽研究中所采用的各种分析测定技术的特点及应用实例, 系统分析了各种方法的优缺点, 同时展望了其发展趋势, 以为氨基酸和小肽分析技术的研究提供思路。

1 前处理技术

若需对微生物内氨基酸和小肽进行可靠的定性和定量分析, 首先要建立一套稳健的前处理方法, 基本步骤包括淬灭、提取、浓缩以及衍生化。需要注意的是, 因真核生物和原核生物细胞结构上存在差异, 其前处理方法也不尽相同^[3]。例如, 有文献报道对啤酒酵母菌采用 60% 甲醇溶液在 -40℃

下淬灭不会造成胞内代谢物的流失, 但同样的方法应用于细菌则会造成严重的流失^[4]。因此, 目前还没有一种方法具有普遍的适用性, 需要根据待测对象选择合适的前处理方法。

1.1 淬灭 为了使实验测得的数据尽可能真实反映微生物在某一特定时刻各代谢物的含量, 需在提取待测物之前将微生物内相关的代谢酶失活, 即将微生物进行淬灭。常用的淬灭方法有骤变温度法和有机溶剂法^[5]。骤变温度法指瞬间改变样品温度至 -40℃ 以下或 80℃ 以上, 致胞内代谢酶完全失活。有机溶剂法指使用有机溶剂使代谢酶变性降解而失活, 最常用的淬灭溶剂是 60% 的甲醇溶液, 但有文献报道, 甘油-氯化钠溶液比甲醇-水溶液更适合微生物的淬灭^[6], 实验证明该方法可有效淬灭多种微生物细胞, 同时将胞内代谢物的流失降到最少, 从而达到胞内胞外代谢物的有效分离。但该方法也存在其局限性, 对丝状微生物, 尤其是丝状真菌, 由于其密度较小, 不能通过离心方法与甘油-氯化钠溶液分离, 此时需在淬灭后采用相对较繁琐的真空过滤法^[7]。

1.2 提取 根据相似相溶原理, 代谢物的提取效率与提取溶剂的极性显著相关。Villas-Boas 等^[8]在对酵母代谢组学研究前处理方法考察时, 比较了 6 种不同方法提取胞内代谢

[收稿日期] 2011-10-08

[接受日期] 2011-11-22

[作者简介] 吴海棠, 硕士, E-mail: wht921@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871261-86, E-mail: zzyccy@yahoo.com.cn

物的能力, 结果见表1。在衡量一种提取方法好坏时, 除关注最终代谢产物的量以外, 还应确保提取过程中代谢物的稳定, 因此在提取时往往需加入缓冲液以增强代谢物的稳定

性, 如乙醇胺、磷酸盐、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、哌嗪乙磺酸 (PIPES) 等, 后者使用较为广泛^[9]。

表1 基于外标物回收率的不同提取方法能力比较^[8]

Tab 1 Comparison of efficiency of different extraction strategies based on the recoveries of external standards^[8]

	CMB	BE	PCA	KOH	MW	PM
Recovery of amino acids ^a	>80%	60%-80%	20%-40%	60%-80%	60%-80%	>80%
Recovery of peptide	40%-60%	20%-40%	40%-60%	40%-60%	20%-40%	40%-60%

CMB; Chloroform; BE; Boiling buffered ethanol; PCA; Perchloric acid; KOH; Potassium hydroxide; MW; Cold methanol solution 50% (V/V); PM; Pure cold methanol. ^aExternal standards: valine; glutamic acid; lysine; phenylalanine and tryptophan; glutathione

1.3 样品衍生化和浓缩 大部分的氨基酸和小肽极性较强, 检测前常需对样品进行衍生化处理, 使其适用于反相高效液相色谱、气相色谱等方法。Kaspar 等^[10]综述了氨基酸分析相关研究中常用的衍生化试剂以及相应的衍生化产物。此外, 由于氨基酸和小肽本身在微生物内的含量较低, 且在提取过程中又常被稀释, 因此在检测或衍生化之前应通过一定的方法进行浓缩。冻干是最常用的方法, 可以去除水溶性样品中的水分, 同时避免热不稳定物质的降解^[4]; 真空离心浓缩仪应用于非水溶液样品的浓缩较为普遍^[11]。

茚三酮 (ninhydrin) 作为一种常规的衍生化试剂, 通常用于阳离子交换色谱分析中的柱后衍生化。邻苯二甲酰 (OPA) 既可用于阳离子交换色谱柱后衍生化, 也可用于反相色谱分析柱前衍生化。异硫氰酸苯酯 (PITC) 常用于反相色谱分析柱前衍生化。氨基甲酸酯 (AQC) 用于柱前衍生化与氨基酸反应生成稳定的荧光衍生产物, 可用紫外、荧光、电化学和质谱检测器检测。N-甲基-N-(三甲基硅烷) 三氟乙酰胺 (MSTFA) 和氯甲酸烷基酯 (alkyl chloroformate) 常用于 GC-MS 检测前的衍生化。应用毛细管电泳分离氨基酸可不进行衍生化, 但若采用光学检测器检测, 亦可用异硫氰酸荧光素 (FITC) 衍生化以增加灵敏度^[10]。

2 分离技术

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 反相色谱法 (reverse phase liquid chromatography, RPLC) RPLC 是常用的色谱分离方法。反相色谱的分离原理是基于氨基酸和肽类物质与填充柱的疏水相互作用。Lu 等^[12]运用 RPLC-EI-TQ/MS 建立了一种对胞内 90 种含氮代谢物的定量检测方法, 并采用此方法对沙门菌的胞内提取物进行检测, 准确鉴别了 36 种代谢物, 其中包括 15 种常见的氨基酸。史春云等^[13]采用 Sinochrom ODS-BP 色谱柱, 以 2,4-二硝基氟苯 (FDNB) 柱前衍生化方法对嗜碱微生物 Lp3-3 发酵不同时间细胞内 17 种氨基酸分析, 得到嗜碱微生物细胞内氨基酸在发酵过程中的变化趋势, 并简要分析了相关代谢途径。

使用粒径为 3 μm 的 C₁₈ 反相色谱柱对小肽进行分离, 具有较好的精密度、准确性及回收率。孙艳亭等^[14]研究了在三氯氧磷辅助下 L-羟脯氨酸的成肽反应, 并建立了基于 RPLC-

ESI-MS/MS 的对 L-羟脯氨酸二肽、L-羟脯氨酸环二肽和 L-羟脯氨酸三肽定性鉴别方法。Petritis 等^[15]将离子对反相色谱法 (ion pair RPLC) 与电喷射质谱 (EMS) 联用, 在 30 min 内定性分析了 23 个小肽。

尽管传统的反相色谱应用广泛, 但由于强极性和亲水性的小分子中极性的功能基团易于和流动相形成偶极矩作用, 即被“溶剂化”, 而非极性的固定相缺乏这种作用, 导致强极性组分停留在流动相中而无法与固定相作用, 因此通常流出而无法得到分离。也有研究采用离子交换色谱或离子对色谱代替 RPLC 进行分离分析, 如在反相色谱 C₁₈ 柱上应用离子对色谱就可以分离没有衍生化的氨基酸。但这两种分离模式因与质谱检测器的兼容性较差, 导致其在氨基酸和小肽分析中应用受限^[16]。

2.1.2 亲水作用色谱 (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) HILIC 具有和正相色谱 (NPLC) 类似的保留行为, 能为强极性待测样品提供合适的保留, 又具有与反相色谱 (RPLC) 相似的流动相体系, 与多种检测器, 尤其是质谱, 有良好的兼容性。因此, HILIC-MS 方法极其适用于微生物极性代谢物分析, 包括核苷酸、羧酸类、氨基酸、小肽等^[17]。典型的 HILIC 流动相体系是在高比例的有机相 (如乙腈) 中加入少量的水相。根据不同需要还可以使用四氢呋喃、二烷以及醇类等有机相。Yoshida^[18]对使用 HILIC 柱分离肽类进行了详尽的综述。Bajad 等^[19]进行基于 LC-MS 方法的代谢组学研究, 并建立了一套简单的 HILIC-MS 方法, 在多反应监测 (MRM) 模式下对复杂样品中的数百种极性物质进行定量检测, 包括各种氨基酸、核苷酸以及羧酸。

2.1.3 多孔石墨碳 (porous graphite chromatography, PGC) 填充柱 PGC 填充色谱柱可应用于氨基酸和肽类物质的分离, 具有保留强极性物质的能力, 随着氨基酸和小肽极性的增加, 它的吸附作用增强, 在反相色谱柱上不能或只能弱保留的强极性氨基酸和小肽可以在 PGC 柱上有良好的保留行为, 有关文献^[20]对 PGC 柱的原理、性质和应用作了研究。PGC 材料在 pH 值 1~14、高温以及各种溶剂中均稳定。Nemeth-Kiss 等^[21]使用 PGC 柱分离出 9 种长度为 2~6 个氨基酸的小肽。Chaimbault 等^[22]应用 PGC 柱在加入离子对试剂的条件下实现了对 20 种未衍生化的蛋白质氨基酸的分离。目

前 PGC 柱尚未广泛应用于对复杂多肽混合物的分离。

2.2 气相色谱(gas chromatography, GC) GC 广泛应用于代谢物及代谢组学研究,其优势在于:(1)所得的数据可通过匹配 GC-FID-MS 专属数据库(如 NIST 等)进行分析;(2)对于挥发性物质,采用 GC-MS 可以用相对较少的花费进行高通量的分析^[23]。Spura 等^[24]应用 GC-MS 在 18 min 内定量分析了啤酒酵母中 13 种常见氨基酸。Smant 等^[7]采用 GC-MS 方法,对氯甲酸甲酯衍生化后的微生物胞内代谢物进行测定,并建立了一整套的操作规程,其中包括超过 100 种的氨基酸和非氨基酸类物质。由于氨基酸和小肽类物质通常极性较大且不易挥发,因此需先对其进行衍生化。并不是所有的衍生化产物都可以通过 GC 分析,如精氨酸会分解成鸟氨酸,谷氨酸会重排成焦谷氨酸^[25]。此外,衍生化试剂和产物对水都很敏感,操作过程中应严格避免水的引入。衍生化过程繁琐是 GC 分析的主要缺陷,并且提取和浓缩过程中造成的产物损失都会对测定结果的准确性产生影响。

2.3 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)和毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC) CE 已经被用于分离和检测氨基酸、肽类和蛋白质。这一方法所需的样品量极少,也因此需要高灵敏度的检测器。激光诱导荧光检测器是常用的检测器,衍生化的氨基酸检测限可以达到 10^{-20} mol。由于采用该检测技术前需要进行样品衍生化和浓缩,整个分析时间较长^[26]。

CEC 综合了毛细管电泳(高分辨率、快速、高效)和 HPLC(可使用不同流动相和填充物)的优点,所使用的流动相与质谱的兼容性更好。CEC 存在的一个问题是它容易在柱中产生气泡,这可以通过增大进口压力来解决。压力驱动毛细管电色谱(pCEC)的流动相驱动力是电渗流和压力之和,与单纯的毛细管电色谱相比可以快速洗脱,减少气泡的产生。中性的反相 C₁₈ 整体柱用于 CEC,既可分离中性物质,也可分离带电物质。其分离肽类的能力可达到理论塔板数 200 000^[27]。Harada 等^[28]利用 CE-MS 对未经衍生化处理的氨基酸进行了分析。

3 检测方法

常见的氨基酸和肽类检测方法包括 UV/Vis 法、核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱法(mass spectrometry, MS)等。

衍生化方法的不同直接导致 UV 检测波长的改变。氨基酸检测的一个经典的方法是锂缓冲盐溶液的阳离子交换色谱分离后,用茚三酮柱后衍生化,UV 检测波长为 440~570 nm。异硫氰酸苯酯与氨基酸柱后衍生化生成苯胺硫甲酰基,可在 254 nm 波长下检测。近几年出现的 AQC 柱前衍生化试剂可适用于 UV 和质谱检测器^[10]。

NMR 能快速对样品进行高通量的分析,具有良好的重现性,信号强度与代谢物的浓度呈线性相关,可以准确定量。此外, NMR 不需要复杂的样品前处理过程。但与质谱相比,其灵敏度不高,而微生物内氨基酸和小肽的量又往往很低,

对 NMR 的使用造成了一定限制。而现有的高照射频率的商用核磁共振仪可以达到 950 MHz,提高了仪器的灵敏度和分辨率^[29]。将 NMR 应用于生物样品的代谢组学检测的文献已有很多^[30]。然而由于重叠共振,1D¹H NMR 不适合定量分析^[2],二维 NMR 如 2D¹H-¹³C 异核单量子相干谱(HSQC)的应用则可提高测定的灵敏度,进行定量分析。Himmelreich 等^[31]根据 NMR 检测得到的氨基酸代谢组信息,应用模式识别的方法对来自 5 种酵母类型的 442 种真菌进行了分类。

MS 在结合色谱分离方法的同时,也可用直接进样法,这一技术通常使用大气压化学电离,如 ESI、APCI 离子源。直接进样是一种高通量的方法,可以在几分钟内处理一个样品。Castrillo 等^[32]应用 DIESI-MS 对啤酒酵母胞内代谢物进行检测,可以同时测定超过 25 种胞内代谢产物。利用特定方法将色谱分离技术与质谱技术相结合,具有快速、高通量、适用性强等优点,如 Dalluge 等^[33]建立了一种对微生物发酵液中 20 种未衍生化氨基酸快速分析的方法,采用液相色谱串联电喷雾质谱,以 5 种核素标记的氨基酸做内标,在 4 min 内实现对全部氨基酸的定量分析。同时,若增加仪器的分辨率则能获得更好的分析效果,如 TOF-MS、FT-ICR-MS、离子阱或使用串联质谱如 Q-TOF-MS 等,通过运用高分辨质谱可将相对分子质量几乎相同的物质进行明确鉴别,如谷氨酰胺和赖氨酸,它们的理论相对分子质量分别为 146.069 12 和 146.105 51,可通过 Q-TOF-MS 进行明确表征。尽管应用 MS 可以进行高通量的分析,但是它有自身的局限性,如不能识别对映异构体。此外,所有的样品成分同时进入 ESI 离子源,可能会产生离子抑制或促进^[34]。

4 展望

本文结合微生物样品前处理方法,综述了目前研究中所采用的各种分析测定氨基酸和小肽分析技术的特点及应用。HPLC 方法在分离氨基酸和小肽中起着重要作用,可根据待测物的特点选择适当的色谱柱,但尚未有一种色谱柱可以满足所有氨基酸和小肽的快速分离;GC 具有高通量分析的特点,灵敏度较高,但需要提取浓缩等前处理步骤,而且往往需要衍生化,操作过程比较繁琐,也容易引入误差;CE 和 CEC 作为相对较新的技术,也开始被应用于微生物代谢物的分离,具有高分辨率、快速、高效等优点,但也存在前处理繁琐、柱中易产生气泡等问题;NMR 为高通量方法,重现性好,前处理简单,但是灵敏度相对较低,使用二维 NMR 可在一定程度上提高灵敏度并更适于定量分析。

一直以来,微生物代谢组学是研究的热点,但以现有技术尚不足以对微生物全代谢物组进行分析。因此,研究者可根据具体研究对象,选择某一类或几类物质进行分析。针对氨基酸和小肽的分析,其发展应主要集中在优化前处理方法、减少分析时间、提高分辨率以及增强检测器的适用性上。众多分析方法中,液质联用技术,尤其是新型色谱柱结合高分辨串联质谱技术,近年来发展迅速,体现出快速、灵敏、方法简便、高通量、适用性强等优点,已解决了生物样品分析的

各种难题,也已应用于氨基酸、小肽的分离分析。因此,设计并完善一套成熟的液质联用方法,同时进行全面的的方法学考察,对于微生物中氨基酸小肽分析方法的发展具有重要意义,也是该领域亟待解决的问题。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] White A P, Weljie A M, Apel D, Zhang P, Shaykhtudinov R, Vogel H J, et al. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e11814.
- [2] Mo M L, Palsson B Ø, Herrgård M J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast[J]. *BMC Systems Biol*, 2009, 3: 37.
- [3] Winder C L, Dunn W B, Schuler S, Broadhurst D, Jarvis R, Stephens G M, et al. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures; an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites[J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 2939-2948.
- [4] Bolten C J, Wittmann C. Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts[J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1993-2000.
- [5] 董玲玲, 柴逸峰, 曹颖瑛, 朱臻宇. 微生物代谢组学的前处理及分析技术[J]. *微生物学通报*, 2009, 36: 1882-1887.
- [6] Villas-Bôas S G, Bruheim P. Cold glycerol-saline; the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells[J]. *Anal Biochem*, 2007, 370: 87-97.
- [7] Smart K F, Aggio R B, Houtte J R, Villas-Bôas S G. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography mass spectrometry[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1709-1729.
- [8] Villas-Boas S G, Hojer-Pedersen J, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast; evaluation of sample preparation methods[J]. *Yeast*, 2005, 22: 1155-1169.
- [9] Maharjan R P, Ferenci T. Global metabolite analysis the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*[J]. *Anal Biochem*, 2003, 313: 145-154.
- [10] Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner P J. Advances in amino acid analysis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 445-452.
- [11] Villas-Bôas S G, Højer-Pedersen J, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast; evaluation of sample preparation methods[J]. *Yeast*, 2005, 22: 1155-1169.
- [12] Lu W, Kimball E, Rabinowitz J D. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites[J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2006, 17: 37-50.
- [13] 史春云, 田晶, 高鹏, 许国旺. 嗜碱微生物细胞内氨基酸的高效液相色谱测定及代谢途径分析[J]. *分析化学*, 2007, 35: 1008-1010.
- [14] 孙艳亭, 卢奎, 马丽, 曹书霞, 赵玉芬. L-羟脯氨酸寡肽混合物的高效液相色谱分离与质谱分析[J]. *色谱*, 2007, 25: 524-527.
- [15] Petritis K, Brusaux S, Guenu S, Elfakire C, Dreux M. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 957: 173-185.
- [16] 王媛, 顾惠新, 路鑫, 许国旺. 以亲水作用色谱为核心的液相色谱联用技术及其应用研究[J]. *色谱*, 2008, 26: 649-657.
- [17] Ikegami T, Tomomatsu K, Takubo H, Horie K, Tanaka N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1184: 474-503.
- [18] Yoshida T. Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 60: 265-280.
- [19] Bajad S, Shulaev V. LC-MS-based metabolomics[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 708: 213-228.
- [20] Pereira L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications[J]. *J Liquid Chromatogr Related Technol*, 2008, 31: 1687-1731.
- [21] Nemeth-Kiss V, Forgacs E, Cserhati T. Anomalous retention behaviour of peptides on porous graphitized carbon column[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 776: 147-152.
- [22] Chaibault P, Petritis K, Elfakir C, Dreux M. Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 870: 245-254.
- [23] Villas-Bôas S G, Moxley J F, Kesson M A, Stephanopoulos G, Nielsen J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts[J]. *Biochem Soc*, 2005, 388: 669-677.
- [24] Spura J, Christian Reimer L, Wieloch P, Schreiber K, Buchinger S, Schomburg D. A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast[J]. *Anal Biochem*, 2009, 394: 192-201.
- [25] Halket J M, Waterman D, Przyborowska A M, Patel R K, Fraser P D, Bramley P M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 219-243.
- [26] Callejón R M, Troncoso A M, Morales M L. Determination of amino acids in grape-derived products; a review[J]. *Talanta*, 2010, 81: 1143-1152.
- [27] Issaq H J, Chan K C, Blonder J, Ye X, Veenstra T D. Separation, detection and quantitation of peptides by liquid chromatography and capillary electrochromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1825-1837.
- [28] Harada K, Fukusaki E, Bamba T, Sato F, Kobayashi A. *In vivo* ¹⁵N-enrichment of metabolites in suspension cultured cells and its application to metabolomics[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 1003-1011.
- [29] Lindon J C, Nicholson J K. Analytical technologies for metabolomics and metabolomics, and multi-omic information recovery[J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2008, 27: 194-204.
- [30] Beckonert O, Keun H C, Ebbels T M, Bundy J, Holmes E, Lindon J C, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2692-2703.
- [31] Himmelreich U, Somorjai R L, Dolenko B, Lee O C, Daniel H M, Murray R, et al. Rapid identification of *Candida* species by using nuclear magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy[J]. *Appl Environment Microbiol*, 2003, 69: 4566-4574.
- [32] Castrillo J I, Hayes A, Mohammed S, Gaskell S J, Oliver S G. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 929-937.
- [33] Dalluge J, Smith S, Sanchezriera F, McGuire C, Hobson R. Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1043: 3-7.
- [34] Annesley T M. Ion suppression in mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 1041-1044.