

## 利用MaxPeak高性能表面提高三羧酸循环相关分析物的分离效果和回收率

---

Kerri M. Smith, Paul D. Rainville

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

本应用纪要介绍一种能够兼容MS的混合模式液相色谱方法，用于分析TCA循环分析物以及其他相关化合物，无需进行样品衍生化或使用离子对试剂。

### 优势

- 在ACQUITY PREMIER CSH苯己基色谱柱内使用有机-无机杂化表面技术MaxPeak高性能表面(HPS)可减弱分析物与金属表面的相互作用
- 一种可重现的LC-MS方法，用于分析TCA循环分析物以及其他相关化合物，无需进行样品衍生化或使用离子对试剂
- 借助Progenesis Q1，使用包含一致碎片离子和保留时间的定制数据库进行数据处理

---

### 简介

三羧酸(TCA)循环又称为克雷布斯循环或柠檬酸循环，是新陈代谢的最终归宿，其中碳水化合物、蛋白质和脂肪分

---

解形成乙酰辅酶A或其他分子<sup>1</sup>。这些分子随后经酶氧化生成诸如三磷酸腺苷(ATP)等分子,为细胞生长和作用提供能量,并减少有助于其他代谢过程的重要辅因子<sup>1</sup>。此外,TCA循环会产生氨基酸、蛋白质、脂肪酸、胆固醇和核苷酸合成的前体,从而促进细胞生长和分裂<sup>2</sup>。

由于重要的代谢过程和途径涉及TCA循环,因此需要研究分析物上调和下调的变化以及它们如何使人们对疾病状态和细胞过程产生新的认识<sup>3</sup>。TCA循环的组分为小分子极性羧酸,因此在传统的反相液相色谱条件下难以保留。目前用于分析这些化合物的液相色谱方法包括:HILIC<sup>4</sup>、离子对<sup>5</sup>、阴离子交换<sup>6</sup>以及衍生化结合气相<sup>7</sup>或液相色谱<sup>8</sup>。虽然每种方法都具有相应的挑战,但金属表面还可能导致问题进一步复杂化。已知含有富电子基团的化合物(例如羧酸盐和磷酸盐)会与金属螯合,尤其是铁<sup>9</sup>。

本文介绍一种能够兼容MS的混合模式液相色谱方法,用于分析TCA循环分析物以及其他相关化合物,无需进行样品衍生化或使用离子对试剂。该方法结合采用有机-无机杂化表面技术(MaxPeak高性能表面(HPS))的色谱柱,以减轻分析物与金属表面的相互作用。本研究使用该方法分析健康受试者和乳腺癌受试者的尿样。使用统计软件工具进一步确定这些样品中存在的分析物及其上调和下调的任何差异。

---

## 实验

### 分析条件和样品前处理

将BioIVT (Westbury, NY)提供的四份女性人体对照样品和四份女性乳腺癌阳性尿样置于冰上解冻,随后用H<sub>2</sub>O稀释3倍。然后将样品在4°C和21,130 rcf下离心10 min。将上清液转移至硅烷化全回收样品瓶中进行分析,且每份乳腺癌阳性和对照尿样各取50 μL加入新的样品瓶中进行QC试验。为确保分析性能,配制两个系统适应性样品。第一个样品是用所有分析物制备的水溶液标准品,浓度为100 μM;第二个样品是将所有分析物加入尿样中制得的标准品,浓度为100 μM。在样品组开始时运行这些样品,并在结束时再次运行。使用ACQUITY PREMIER CSH苯己基色谱柱分离样品,流动相由水、乙腈和0.1%甲酸简单组成,每两天准确制备一次。甲酸盛于玻璃安瓿瓶中以确保获得可重现的浓度。LC连接至Xevo G2-XS飞行时间质谱仪,该质谱仪在负电离模式下运行。调谐Xevo G2-XS,使其适用于分析非常小的分子,方法为:设置四极杆的手动配置文件并更改碰撞室RF电压,从而尽量提高低m/z的离子传输效率。每份样品随机重复测定五次,然后使用MassLynx 4.2的MS<sup>e</sup>采集模式以连续形式进行采集,并使用Progenesis Q1进一步处理。

### LC条件

系统： ACQUITY UPLC I-Class  
PLUS

样品瓶： 沃特世全回收样品瓶  
， 已去活（部件号  
： 186000385DV）

色谱柱： ACQUITY PREMIER  
CSH苯己基柱, 1.7  $\mu\text{m}$ ,  
2.1 x 100 mm（部件号  
： 186009475）

柱温： 50 °C

样品温度： 10 °C

进样体积： 3  $\mu\text{L}$

流动相A： 0.1%甲酸水溶液

流动相B： 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度：

时间	流速	%A	%B	曲线
初始	0.4	100	0	
4.00	0.4	75	25	6
7.00	0.4	5	95	6
8.00	0.4	5	95	6
8.01	0.4	100	0	6
10.00	0.4	100	0	

## MS条件

系统：Xevo G2-XS QTof

电离模式：ESI-，分辨率模式

采集范围：40-950 *m/z*

毛细管电压：2 kV

电离源补偿：50

锥孔电压：10 V

碰撞能量（低）：6

碰撞能量（高）：40

脱溶剂气温度：500 °C

脱溶剂气流速： 1000 L/h

锥孔气流速： 10 L/h

离子源温度： 120 °C

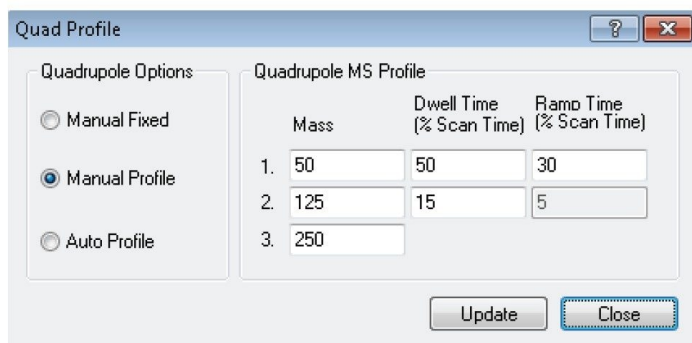
校准： 甲酸钠  
44.9977–928.8342 *m/z*

四极杆配置文件： 手动配置文件

实时校正标准液： 亮氨酸脑啡肽

碰撞室RF设置（MS模式）： 补偿 = 100，增益 = 4

碰撞室RF设置（MS/MS模式）： 初始 = 20，最终 = 80



---

## 结果与讨论

---

TCA循环的组分由于分子小、极性强而难以分析。传统反相色谱方法无法始终产生足够的保留性能或选择性以可靠地测量这些分析物。例如，柠檬酸和异柠檬酸为191  $m/z$ 的同分异构体，苹果酸降解后与富马酸具有相同的母离子质量，如参考文献5所述。这两组关键分析物对均需要获得良好的色谱分离度才可准确测定。在先前的技术简报<sup>10</sup>中，我们介绍了开发的混合模式分离方法，该方法采用串联质谱检测技术分析极性有机酸，包括TCA循环中的酸。本文将该方法扩展为使用飞行时间质谱分析尿液中的代谢物。利用经过改良的方法分析对照尿样和乳腺癌阳性尿样。对数据进行多变量分析（例如主成分分析(PCA)），以统计方式确定疾病和非疾病样品的重要相关性或唯一性。

标准品与合并尿样的代表性分离示例如图1所示，本研究中目标分析物的名称、保留时间以及结构见表1。关键分析物对实现分离（图2），异柠檬酸和柠檬酸的半峰全宽(FWHM)处分离度值为10.9，苹果酸和富马酸的分离度为32，有助于确保测量结果可靠。

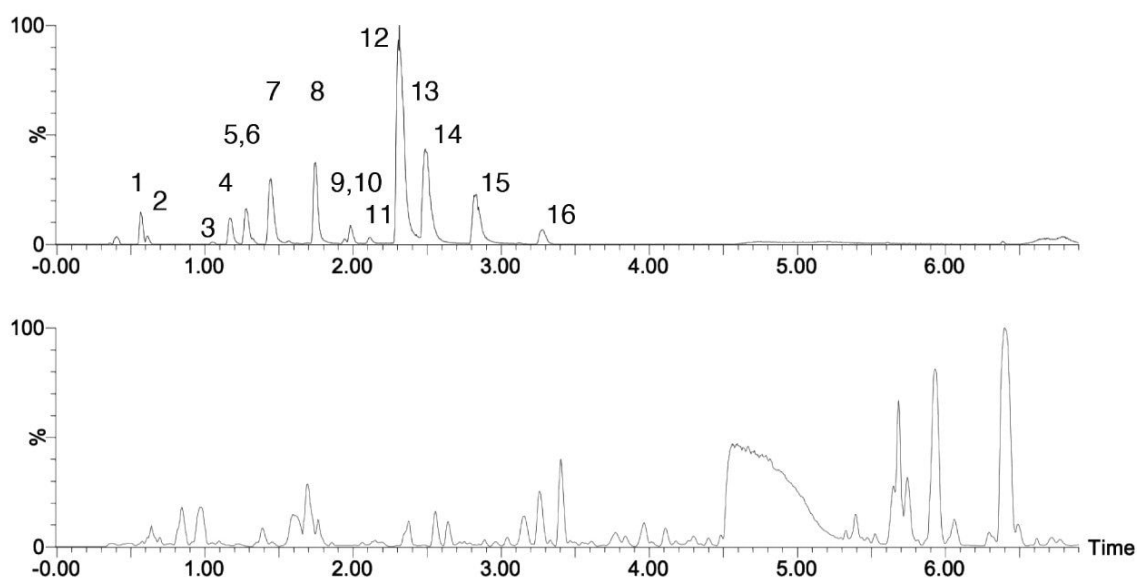


图1.使用ACQUITY PREMIER CSH苯己基色谱柱分离尿液中代谢物得到的结果：（上图）分析物的混标水溶液；（下图）合并尿样。峰编号标识符参见表1。

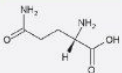
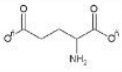
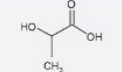
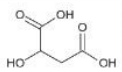
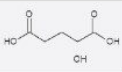
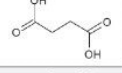
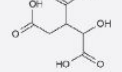
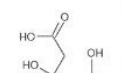
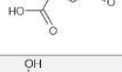
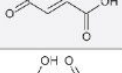
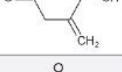
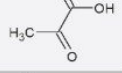

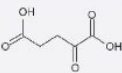
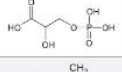
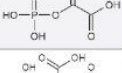
化合物名称 (峰编号)	峰编号	保留时间	结构
谷氨酰胺	1	0.62	
谷氨酸	2	0.67	
乳酸	3	1.10	
苹果酸	4	1.22	
2-羟基戊二酸	5	1.31	
琥珀酸	6	1.34	
异柠檬酸	7	1.47	
柠檬酸	8	1.77	
富马酸	9	1.96	
衣康酸	10	2.02	
丙酮酸	11	2.33	
6-磷酸葡萄糖酸	12	2.31	
$\alpha$ -酮戊二酸	13	2.56	
3-磷酸甘油酸	14	2.48	
磷酸烯醇丙酮酸	15	3.06	
顺式乌头酸	16	3.30	

表1.本研究中考察的化合物的名称、保留时间和结构

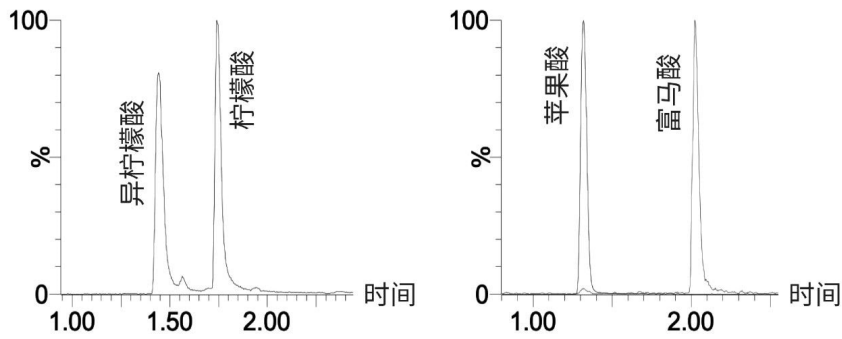


图2.关键分析物对（柠檬酸/异柠檬酸、苹果酸/富马酸）的分离结果

如前文所述，对于含有富电子基团的化合物（例如羧酸和磷酸）而言，分析物会在金属表面发生损失，因此测定以低浓度存在的化合物非常棘手。在PREMIER色谱柱系列中添加MaxPeak HPS，可提高此类化合物的峰面积回收率。图3展示了异柠檬酸和柠檬酸、苹果酸和3-磷酸甘油酸在标准CSH苯己基色谱柱和PREMIER CSH苯己基色谱柱上得到的峰面积回收率。在各种情况下，使用PREMIER色谱柱时化合物的峰面积均更大，这对糖酵解中间体3-磷酸甘油酸特别有利。

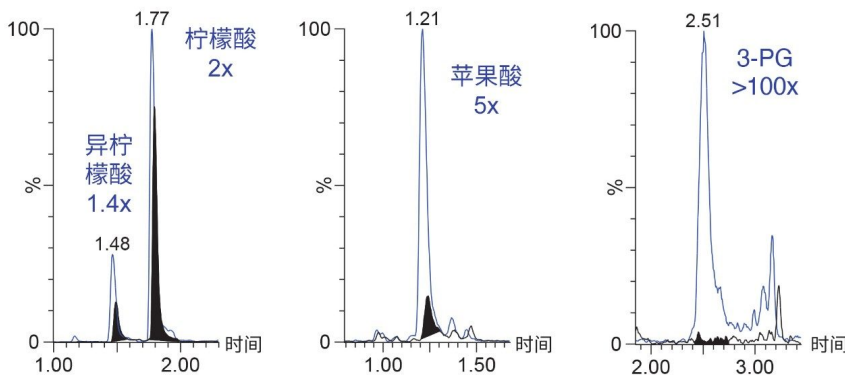


图3.使用ACQUITY PREMIER CSH苯己基色谱柱和标准CSH苯己基色谱柱（实心谱图）分析尿样中异柠檬酸和柠檬酸、苹果酸和3-磷酸甘油(3-PG)酸得到的峰回收率。数字说明了使用PREMIER色谱柱得到的峰面积提升。

随后将分析得到的数据导入Progenesis Q1进行处理。图4中的PCA得分图展示了五次重复进样得到的样品簇，可



可以看出变异很小，表明该色谱方法具有良好的分析重现性。此外，疾病与健康样品之间存在明显的区别。使用样品标准品在Progenesis Q1中创建碎片离子和保留时间内部数据库。有关如何创建和使用碎片离子数据库的详细信息可参见参考文献11。然后使用该数据鉴定目标组分，其质量精度误差小于8 ppm，保留时间误差小于0.15 min。最后，绘制了乳腺癌阳性样品、对照样品和QC尿样中异柠檬酸、柠檬酸、2-羟基戊二酸、3-磷酸甘油酸、琥珀酸和顺式乌头酸的组分丰度图（图5）。

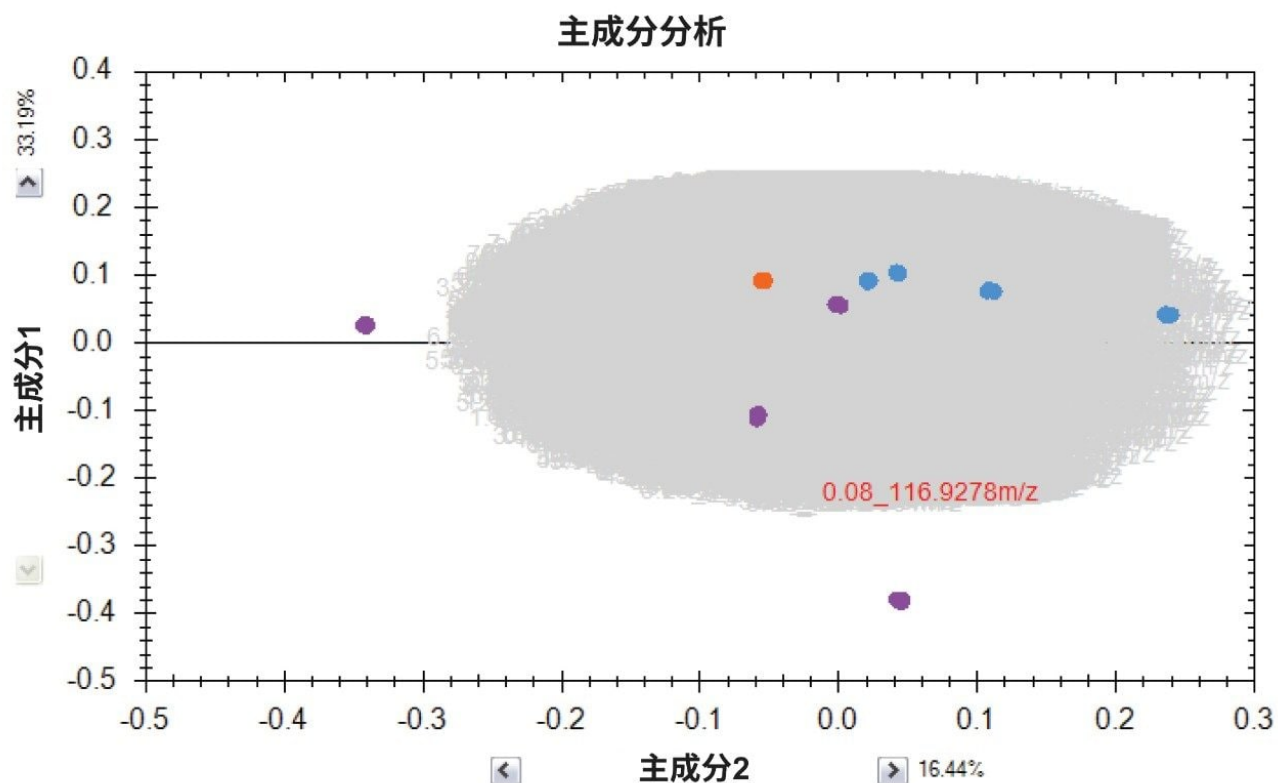


图4.本研究的PCA得分图。蓝色：对照样品；紫色：乳腺癌阳性样品；橙色：QC样品（合并）。

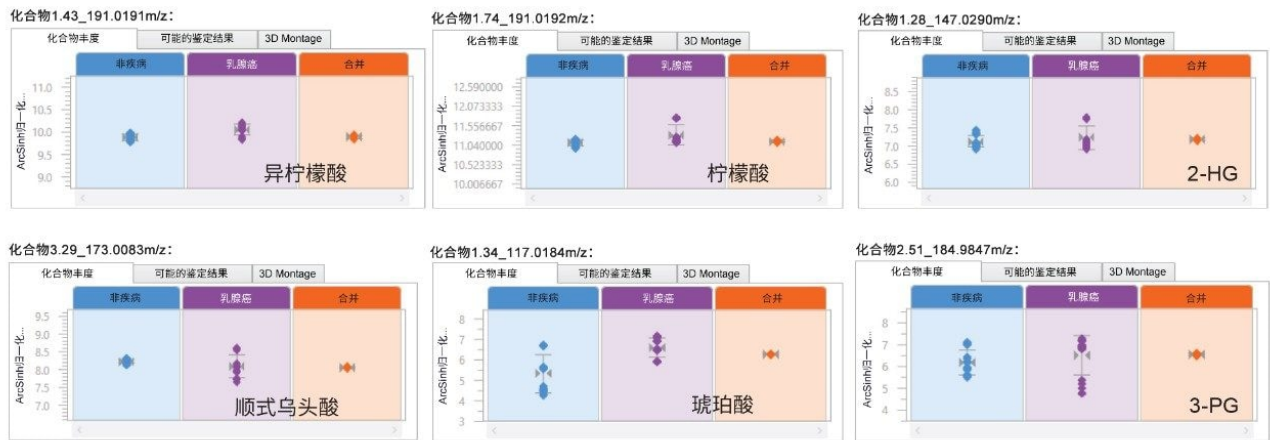


图5.各乳腺癌阳性样品以及对照和合并尿样(QC)进样中得到的异柠檬酸、柠檬酸、2-羟基戊二酸(2-HG)、顺式乌头酸、琥珀酸和3-磷酸甘油酸(3-PG)的丰度图

## 结论

本研究介绍了一种混合模式色谱方法，该方法成功应用于TCA分析物和其他相关分子的非靶向分析中，无需在流动相中使用离子对试剂。此外，在PREMIER分析柱中结合MaxPeak HPS提高了对金属相互作用敏感的分析物的回收率。PCA得分图中QC样品的峰簇分布紧密，表明实现了优异的分析重现性。然后利用该方法展示了乳腺癌阳性尿样和健康受试者尿样中有机酸代谢物的丰度。

## 参考文献

1. Murray, R. K.; Bender, D. A.; *et al.* Harper's Illustrated Biochemistry, 28th ed. New York: McGraw-Hill, 2009. Chapters 16–18; pages 131–156.
2. Vander Heiden, M. G. *et al.* Cell. 2017, 168, 657–669.
3. DeBerardinis, R. J.; *et al.* Cell Metab. 2008, 7(1), 11–20.

4. Yuan; et al. *Nature Protocols*. 2012, 7, 872-881.
5. Luo, B.; et al. *J. Chromatogr. A*. 2006, 1147, 153-164.
6. van Dam, J. C.; et al. *Anal. Chim. Acta*. 2002, 460, 209-218.
7. Patel, D. P.; et al. *PLoS One*. 2017, 12, 1-16.
8. Tan, B.; et al. *Anal. Biochem*. 2014, 465, 134-147.
9. Abrahamson, H.; et al. *J. Inorg. Chim. Acta*. 1994, 226, 117-127.
10. Smith, K. M.; et al. Separation and Detection of TCA Cycle Metabolites and Related Compounds in Human Urine by UPLC MS/MS for Clinical Research. Waters Technology Brief, 720006463EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135005827>> , 2019.
11. <http://www.nonlinear.com/progenesis/qi/v2.4/faq/fragment-databases.aspx#how-do-i-create-my-own-fragment-database> <<http://www.nonlinear.com/progenesis/qi/v2.4/faq/fragment-databases.aspx#how-do-i-create-my-own-fragment-database>> .

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

720006727ZH, 2020年10月修订



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)