

使用ACQUITY Premier系统搭配Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱分离磷酸戊糖途径、糖酵解和能量代谢物

Kerri M. Smith, Fadi L. Alkhateeb, Kathryn Brennan, Paul D. Rainville, Thomas H. Walter

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

使用常规液相色谱系统和色谱柱时，磷酸化代谢物会与金属表面相互作用，导致难以分析。在本应用纪要中，我们介绍了一种靶向UPLC-MS/MS方法分析血浆和组织提取物中的27种磷酸戊糖、糖酵解和能量代谢物。该方法采用的ACQUITY Premier系统和Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱搭载了MaxPeak高性能表面技术，可减少代谢物与金属表面之间的相互作用。色谱柱在高pH值流动相中的稳定性也极为关键，在流动相中使用pH值为9的碳酸氢铵缓冲液时，实现了理想的峰尖锐程度、峰对称性和灵敏度。结果表明，高柱效、耐UPLC高压的1.7 μm Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱可对这些棘手分析物发挥优异的分​​离效果。

优势

- 靶向UPLC-MS/MS方法可使27种棘手代谢物获得尖锐且对称的峰
- Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱在碱性条件下稳定，可使用pH值高达9的缓冲液
- 在UPLC系统和色谱柱中采用MaxPeak高性能表面技术可实现出色的峰尖锐程度、峰对称性和灵敏度

简介

中心碳代谢由多个酶介导途径组成，这些途径协同作用以提供能量、母离子，并减少辅因子，从而促进细胞生长形成体内平衡。中心碳代谢的两种重要途径是糖酵解和磷酸戊糖途径。糖酵解途径涉及一系列反应，包括在富氧条件下将葡萄糖转化为丙酮酸，以及在缺氧条件下进一步转化为乳酸。这些代谢物可参与三羧酸(TCA)循环。在这些反应中，ATP形成，NADH氧化为NAD⁺。除了糖酵解外，磷酸戊糖途径可最终将葡萄糖转化为5-磷酸核糖和NADPH。5-磷酸核糖随后进一步反应产生核糖，用于组成DNA和RNA¹。有人通过研究中心碳代谢物相对浓度的波动来探索疾病的基础机制²。

由于磷酸戊糖途径和糖酵解组分具有极性，并且大部分包含磷酸化基团以及许多异构体，因此分析起来十分棘手。代谢物中的磷酸基团可促使这些分析物吸附到分析系统的金属表面。金属吸附导致峰形变差，结果变异性增加，灵敏度降低，测量值不可靠。

在本研究中，我们介绍了一种采用两性离子HILIC色谱柱Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱的方法，适用于分析磷酸戊糖途径、糖酵解和能量代谢物。该色谱柱采用的亚乙基桥杂化(BEH)颗粒上含有磺基甜菜碱固定相³。在MaxPeak高性能表面(HPS)色谱柱硬件中填充这种材料的目的是减少金属敏感化合物与金属表面的相互作用⁴。将此色谱柱应用于ACQUITY Premier系统中，该系统也采用了MaxPeak HPS技术，并搭配Xevo TQ-S micro串联四级杆质谱仪。

实验

制备流动相

为确保制备的重现性，用重量法每3天制备一次高品质流动相。使用上皿天平称取2.96 g碳酸氢铵(Sigma 09830)，加水至240 g，制备150 mM碳酸氢铵pH 9.00储备液。加入28%氨水溶液(Sigma 338818)，将储备液的pH值调至9.00 (±0.02)，再用天平将溶液重量准确调整至250 g。取该浓缩缓冲液100 g加入两个LDPE流动相瓶中。称取900 g水加入其中一瓶缓冲液中，制备流动相A，称取707.6 g (900 mL)乙腈(ACN)加入另一瓶缓冲液中，制备流动相B。拧紧流动相瓶盖，超声处理20分钟以备使用。

用相同方式制备pH筛选流动相，测量流动相A和B的最终体积比例。简单来说，称取0.976 g醋酸铵(Sigma 431311)，加水至大约100 g。加入乙酸(Sigma 338826)或28%氨水调节pH，随后用天平将溶液重量准确调整至

125 g以制备100 mM溶液。取50 mL该溶液加入两个流动相瓶中。向其中一瓶溶液加入450 mL水制备流动相A，向另一瓶溶液加入450 mL乙腈制备流动相B，随后拧紧瓶盖，超声处理20分钟。

制备储备液

高纯度分析物标准品购自Sigma Aldrich。购入的甘油醛-3-磷酸为10.7 mg/mL水溶液形式，其他试剂均为固体。储备液分别用50%乙腈/50%水制成20 mM的游离酸溶液，随后混合为三份相同的1 mM混合溶液（溶于50%乙腈/50%水），得到工作储备液。稳定同位素标记的内标（Cambridge Isotope Laboratories和Sigma Aldrich）分别用50%乙腈/50%水制成1 mM的游离酸溶液。然后用50%乙腈/50%水制成100 μ M乳酸- ^{13}C 和葡萄糖-6-磷酸- ^{13}C 、AMP- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 、ADP- ^{15}N 、ATP- ^{13}C 、GMP- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 和GTP- ^{13}C 各10 μ M的5x浓缩工作内标混合物。所有储备液均储存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下。

使用50%乙腈/50%水连续稀释工作储备液，得到250、125、50、25、12.5、5、2.5、1.25、0.50、0.250、0.125和0.050 μ M的标准储备液，制备标准曲线标样。取5 μ L各标样以及5 μ L内标混合物加入用硅烷化样品瓶盛装的15 μ L 50%乙腈/50%水中。这些标样分别代表25 μ L体积下浓度为50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025和0.01 μ M的校准溶液。然后加入75 μ L 50%乙腈/50%水，使最终体积达到100 μ L。因此，标准曲线标样的最终浓度分别为12.5、6.25、2.5、1.25、0.625、0.25、0.125、0.0625、0.025、0.0125、0.00625和0.0025 μ M。

提取肝脏和脑组织

按照之前所述方法⁵进行样品前处理以及改性。雌性Sprague Dawley大鼠肝脏和雄性Sprague Dawley大鼠脑均购自BioIVT（纽约韦斯特伯里）。取25 mL肝脏/脑组织液加入2 mL Precellys组织均质管（部件号10409）中，随后加入750 μ L 80%甲醇/20%水（置于干冰上冷冻）。在Precellys Evolution上使用3 x 15 s循环程序，转速5800 rpm，循环之间暂停30秒，将样品研磨成匀浆。用移液器移取匀浆样品并加入新的1.5 mL微量离心管中，置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存60分钟。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将样品以18407 xg离心10分钟。将上清液转移至1.5 mL离心管中，使用TurboVap在室温下先后以1 L/min和2.5 L/min的条件干燥100分钟和30分钟。用50 μ L 50%乙腈/50%水复溶样品，短暂的涡旋混合，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置10分钟，随后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以18407 xg离心10分钟。用移液器将样品转移至全回收硅烷化样品瓶中立即分析。

提取血浆

Sprague Dawley K2EDTA混合性别血浆购自BioIVT（纽约韦斯特伯里）。将25 μ L血浆加入1.5 mL微量离心管中。然后加入125 μ L 80%甲醇/20%水（置于干冰上冷冻）。将样品涡旋混合1分钟，然后封盖并置于振荡器上以250 rpm在室温下振荡20分钟。随后将样品置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻柜中保存60分钟。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将样品以18407 xg离心

10分钟。将上清液转移至1.5 mL离心管中，使用TurboVap在室温下先后以1 L/min和2.5 L/min的条件干燥100分钟和30分钟。用50 μ L 50%乙腈/50%水复溶样品，短暂的涡旋混合，在4 $^{\circ}$ C下放置10分钟，随后在4 $^{\circ}$ C下以18407 xg离心10分钟。用移液器将样品转移至全回收硅烷化样品瓶中立即分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier BSM系统
样品瓶:	沃特世全回收样品瓶，已去活（部件号：186000385DV）
流动相溶剂瓶:	沃特世认证LDPE容器1 L（部件号：186009110）
色谱柱:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm（部件号：186009979）
柱温:	30 $^{\circ}$ C
样品温度:	8 $^{\circ}$ C
进样体积:	3 μ L
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	15 mM碳酸氢铵水溶液，pH 9.00
流动相B:	15 mM碳酸氢铵，溶于90%乙腈/10%水v/v，pH 9.00

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.5	10	90	
5.00	0.5	35	65	6
6.00	0.5	35	65	6
6.50	1.0	10	90	6
9.50	1.0	10	90	6
9.51	0.5	10	90	6

质谱条件

质谱系统:	Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪
电离模式:	正/负
毛细管电压:	1 kV/1 kV
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	50 L/h
离子源温度:	150 °C

结果与讨论

之前已有研究报告，使用pH值大约为9的醋酸铵或碳酸氢铵缓冲液的流动相分析磷酸化代谢物可实现理想的峰尖锐程度、峰对称性和灵敏度⁶⁻⁹。但除了采用有机聚合物或亚乙基桥杂化(BEH)颗粒的色谱柱外，常规HILIC色谱柱在该pH值下难以保持稳定。采用聚合物颗粒的色谱柱耐高压范围有限，且柱效与填充杂化颗粒的色谱柱相比相对较低。Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱兼具pH 10条件下的稳定性和高柱效³，是本文所述应用的理想之选。此外，这些色谱柱的硬件采用了MaxPeak高性能表面(HPS)，以减少分析物和金属表面的相互作用，从而改善金属敏感化合物的峰形、峰面积和峰面积重现性^{4,10,11}。

本研究评价了3种不同的缓冲液pH值，确定它们对峰形、对称性和灵敏度的影响：所有缓冲液均包含10 mM醋酸铵，pH值调节至5.0、6.8和9.0。4种分析物的结果见图1。3-磷酸甘油酸(3PG)、三磷酸鸟苷(GTP)和三磷酸腺苷(ATP)在pH 9.0的缓冲液中观察到理想结果，与此前使用其他色谱柱得到的结果一致⁶⁻⁹。与此相反，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)在三种缓冲液中均观察到对称的窄峰。为理解缓冲液类型和浓度对分析物峰形和保留性的影响，还研究了pH值为9.0的碳酸氢铵缓冲液。使用pH值为9.0的碳酸氢铵缓冲液时，尽管保留性降低，但大多数化合物的峰形均有改善（图2）。此外，使用pH值为9.0的碳酸氢铵缓冲液时，5-磷酸核糖(5P)与同分异构体5-磷酸核酮糖/5-磷酸木酮糖的分离明显改善，3PG的峰形尖锐程度也大幅增加。最后研究了缓冲液浓度对峰形和保留性的影响。使用浓度为5、10、15和20 mM的pH 9.0碳酸氢铵缓冲液制备流动相A和B，执行分离。图3以2PG和3PG为例展示了本研究的结果。我们可以看到，缓冲液浓度越高，分析物的保留时间就越长。实际上，本研究所有分析物均可见相同的现象。使用15 mM的pH 9.0碳酸氢铵缓冲液得到的3PG峰形最好，其他分析物也是如此，因此最终方法选用该浓度的缓冲液。

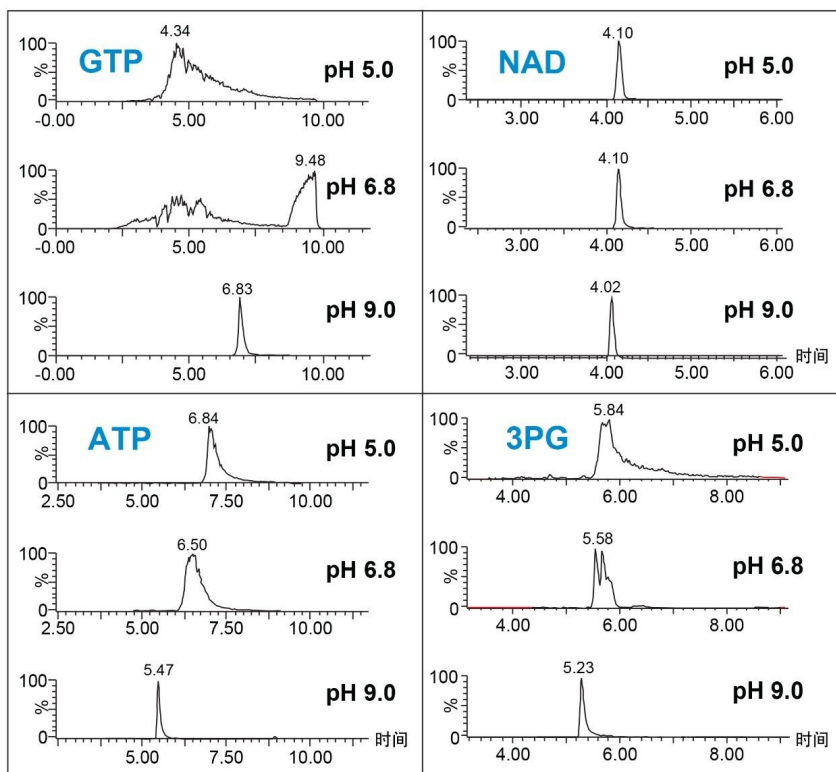


图1.流动相pH值对磷酸化分析物峰形的影响

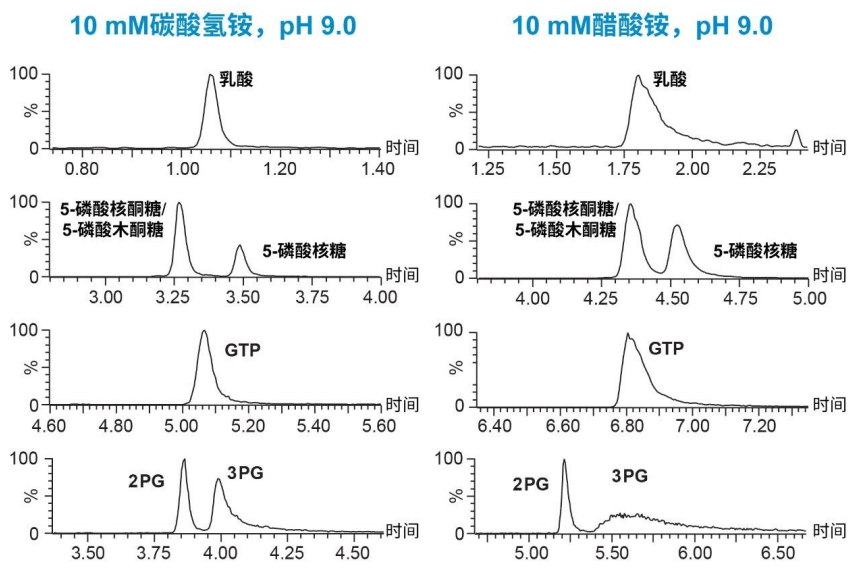
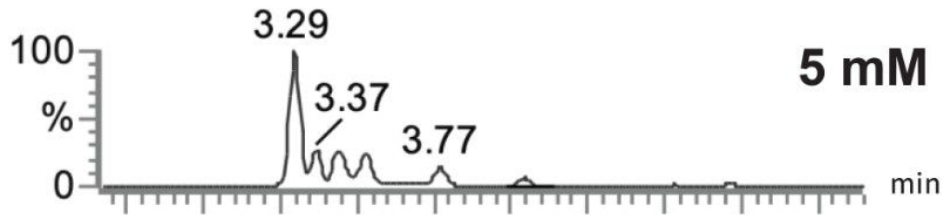


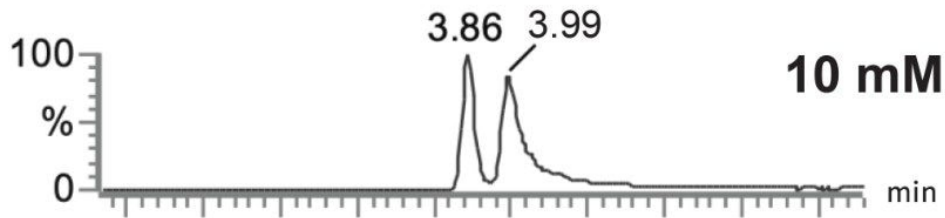
图2.流动相缓冲液对分析物峰形和分离度的影响

碳酸氢铵, pH 9.0

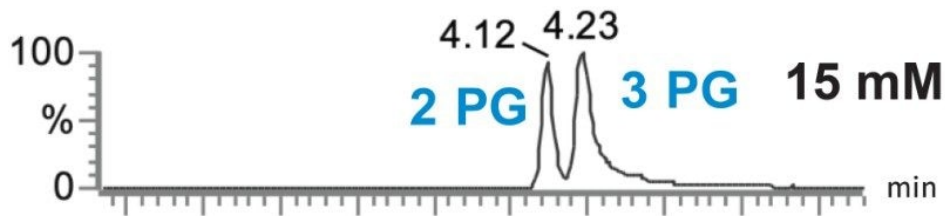
27G21_026



27G21_054



28G21_016



28G21_048

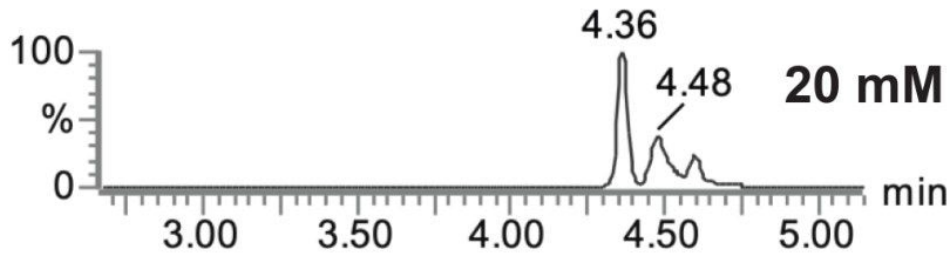


图3.流动相缓冲液浓度对2PG和3PG分离的影响

MS条件已通过向质谱仪中注入每种分析物完成了优化。优化参数见表1。溶于50:50乙腈/水的27种分析物的代表性分离结果如图4所示。使用2.1 x 100 mm, 1.7 μ m Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱，流速设置为0.5 mL/min。分别展示了正离子和负离子电喷雾(ES)电离模式下的色谱图。基本所有分析物都观察到尖锐且对称的峰。两对同分异构体5-磷酸核酮糖/5-磷酸核糖和2PG/3PG都实现了良好分离。根据分析物与稳定同位素标记内标的峰面积之比，对27种分析物制作了标准曲线。相关系数的范围为0.9904（甘油醛-3-磷酸）至0.9996（5-磷酸核酮糖/5-磷酸木酮糖和ADP）（见表2）。定量下限(LLOQ)范围为0.0063~1.25 μ M。

#	名称	模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
1	丙酮酸	ES-	87	43	15	7
2	乳酸	ES-	89	43	20	12
3	脱氧核糖-5-磷酸	ES-	213	97	15	10
4	磷酸二羟丙酮	ES-	169	97	20	10
5	5-磷酸核酮糖/ 5-磷酸木酮糖	ES-	229	97	10	14
6	5-磷酸核糖	ES-	229	97	10	14
7	甘油醛-3-磷酸	ES-	169	97	20	10
8	景天庚酮糖-7-磷酸	ES-	289	97	20	17
9	6-磷酸果糖	ES-	259	97	25	14
10	2-磷酸甘油酸	ES-	185	97	25	15
11	3-磷酸甘油酸	ES-	185	97	25	15
12	磷酸烯醇式丙酮酸	ES-	17	79	20	10
13	葡萄糖-6-磷酸	ES-	259	97	25	14
14	果糖-1,6-双磷酸	ES-	339	97	15	20
15	6-磷酸葡萄糖酸	ES-	275	97	20	12
16	FAD	ES+	786	348	25	25
17	乙酰辅酶A	ES+	810	303	25	32
18	NADH	ES+	666	649	15	15
19	AMP	ES+	348	136	25	16
20	NAD	ES+	664	524	25	15
21	ADP	ES+	428	136	30	20
22	GMP	ES+	364	152	25	15
23	ATP	ES+	508	136	25	26
24	NADPH	ES+	746	729	25	18
25	NADP	ES+	744	604	25	18
26	GDP	ES+	444	152	25	22
27	GTP	ES+	524	152	30	24
	赤藓糖-4-磷酸	ES-	199	97	25	10
	乳酸-C13	ES-	92	45	20	12
	AMP-C13N15	ES+	363	146	25	16
	AMP-C13N15负离子	ES-	361	144	25	32
	ADP-N15	ES+	433	141	30	20
	ADP-N15负离子	ES-	431	139	25	20
	GMP-C13N15	ES+	379	162	25	15
	GMP-C13N15负离子	ES-	377	79	25	45
	G6P-C13	ES-	265	97	15	9
	ATP-C13	ES+	518	141	25	26
	ATP-C13负离子	ES-	516	139	25	37
	GTP-C13	ES+	534	157	30	24
	GTP-C13负离子	ES-	532	79	25	37

表1.质谱参数

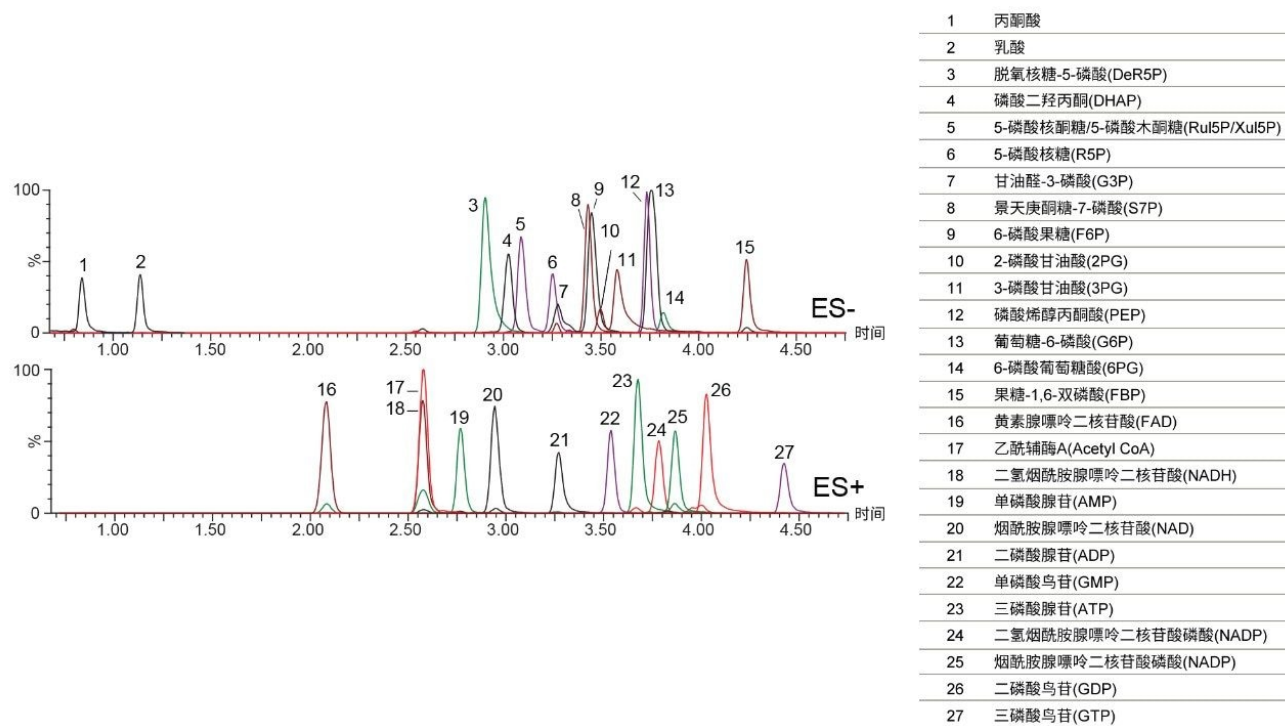


图4.溶于50/50乙腈/水的分析标样的代表性色谱图

#	名称	内标	保留时间 min	LLOQ, μM	ULOQ, μM	R ²
1	丙酮酸	乳酸-C13	0.9	0.625	6.25	0.9941
2	乳酸	乳酸-C13	1.2	1.25	12.5	0.9987
3	脱氧核糖-5-磷酸	ADP-N15负离子	2.8	0.0063	6.25	0.9993
4	磷酸二羟丙酮	ADP-N15	3.0	0.0625	6.25	0.9983
5	5-磷酸核酮糖/ 5-磷酸木酮糖	ADP-N15负离子	3.1	0.0125	12.5	0.9996
6	5-磷酸核糖	ADP-N15负离子	3.3	0.0125	2.5	0.9978
7	甘油醛-3-磷酸	ADP-N15负离子	3.3	1.25	12.5	0.9904
8	景天庚酮糖-7-磷酸	ADP-N15负离子	3.4	0.0063	6.25	0.9985
9	6-磷酸果糖	ADP-N15负离子	3.4	0.0625	6.25	0.9974
10	2-磷酸甘油酸	GMP-C13N15负离子	3.5	0.125	2.5	0.9990
11	3-磷酸甘油酸	G6P-C13	3.6	0.125	2.5	0.9965
12	磷酸烯醇式丙酮酸	ATP-C13负离子	3.7	0.025	2.5	0.9980
13	葡萄糖-6-磷酸	G6P-C13	3.7	0.0125	6.25	0.9997
14	果糖-1,6-双磷酸	GTP-C13负离子	4.3	0.025	6.25	0.9980
15	6-磷酸葡萄糖酸	ATP-C13负离子	3.9	0.025	6.25	0.9972
16	FAD	AMP-C13N15	2.1	0.25	12.5	0.9969
17	乙酰辅酶A	AMP-C13N15	2.6	0.0063	6.25	0.9985
18	NADH	AMP-C13N15	2.6	0.0063	2.5	0.9990
19	AMP	AMP-C13N15	2.8	0.0125	6.25	0.9990
20	NAD	ADP-N15	2.9	0.0625	12.5	0.9952
21	ADP	ADP-N15	3.3	0.0125	6.25	0.9996
22	GMP	GMP-C13N15	3.5	0.125	12.5	0.9976
23	ATP	ATP-C13	3.7	0.0125	6.25	0.9995
24	NADPH	ATP-C13	3.8	0.0625	12.5	0.9993
25	NADP	ATP-C13	3.9	0.0125	2.5	0.9960
26	GDP	ATP-C13	4.0	0.0125	12.5	0.9982
27	GTP	GTP-C13	4.4	0.025	2.5	0.9987

表2. 标准曲线结果

我们使用该方法靶向分析了大鼠血浆、大鼠肝脏和大鼠脑提取物中的27种分析物。代表性色谱图如图5所示。在这些组织提取物中也观察到与用溶剂制备的标样相同的尖锐对称峰。在血浆样品中检测到高浓度的磷酸烯醇丙酮酸(

PEP), 以及3PG、ADP、GMP、果糖-6-磷酸(F6P)和葡萄糖-6-磷酸(G6P)。后三种代谢物也出现在肝脏和脑组织样品中。此外, 还在肝脏提取物中检测到高浓度的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP), 在脑提取物中检测到高浓度的乙酰辅酶A (Acetyl CoA)。

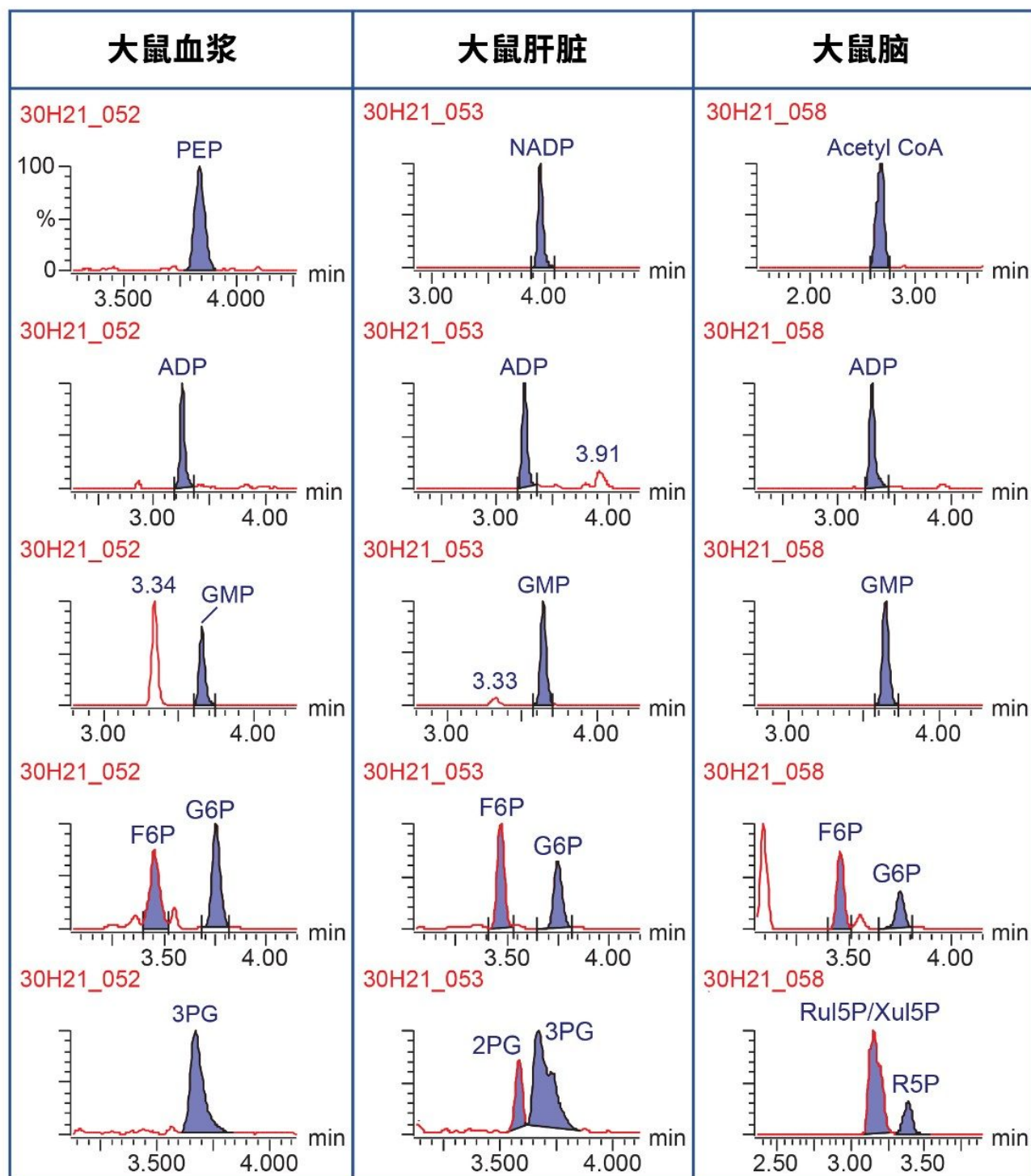


图5.大鼠血浆和组织提取物中的分析物代表性色谱图

结论

我们开发了一种灵敏的UPLC-MS/MS靶向分析法，用于分析血浆和组织提取物中的27种磷酸戊糖途径、糖酵解和能量代谢物。将ACQUITY Premier系统与Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱联用，使这些棘手分析物获得了尖锐且对称的峰。其中，BEH Z-HILIC色谱柱对碱性流动相的稳定性是该方法的关键之处，众多代谢物都在使用pH 9.0碳酸氢铵缓冲液时表现出理想的峰尖锐程度、峰对称性和灵敏度。本研究的结果表明，ACQUITY Premier系统联合Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱适用于极性代谢组学分析，尤其是针对可与金属表面相互作用的代谢物。

参考资料

1. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry, 28th ed. New York: McGraw-Hill, Chapters 16–18 and 21, Pages 131–156 and 174–183, 2009.
2. Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front in Endocrinol*, 11:365, 2020.
3. Walter TH, Berthelette KD, Patel A, Alden BA, McGlaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Atlantis BEH Z-HILIC简介：一种基于有机/无机杂化颗粒的两性离子固定相，沃特世应用纪要, [720007311ZH](#), 2021年7月.
4. Lauber M, Walter TH, Gilar M, DeLano M, Boissel C, Smith K, Birdsall R, Rainville P, Belanger J, Wyndham K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces, Waters White Paper [720006930EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>>, Oct 2020.
5. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. Global Metabolomic Profiling of Animal and Human Tissues via UPLC-MS. *8*, 17–32, 2013.
6. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and Quantitation of Water

Soluble Cellular Metabolites by Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr.A.*; 1125:76–88, 2010.

7. Teleki A, Sánchez-Kopper A, Takors R. Alkaline Conditions in Hydrophilic Interaction Chromatography for Intracellular Metabolite Quantification Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal.Biochem.*; 475:4–13, 2015.
8. Zhang T, Creek DJ, Barrett MP, Blackburn G, Watson DG. Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography With Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine. *Anal.Chem.*; 84:1994–2001, 2012.
9. Zhang R, Watson DG, Wang L, Westrop GD, Coombs GH, Zhang T. Evaluation of Mobile Phase Characteristics on Three Zwitterionic Columns in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mode for Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolite Profiling of Leishmania Parasites. *J. Chromatogr.A.*; 1362:168-179, 2014.
10. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham KD. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC. *Anal.Chem.*; 93(14): 5773–5781, 2021.
11. Walter TH, Trudeau M, Simeone J, Rainville P, Patel AV, Lauber MA, Kellett J, DeLano M, Brennan K, Boissel C, Birdsall R, Berthelette K. Low Adsorption UPLC Systems and Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces: The ACQUITY Premier Solution. Waters White Paper [720007128EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007128en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007128en.pdf>> , Feb 2021.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

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

Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/columns/atlantis-premier->

[columns.html?alias=Alias_AtlantisPremier&xcid=o-o_22753>](#)

720007411ZH, 2021年11月修订

© 2022 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