

## 使用ACQUITY Premier系统解决方案改善人血浆中三羧酸(TCA)循环分析物定量分析的灵敏度和色谱峰形

---

Kerri M. Smith, Paul D. Rainville

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

人血浆中TCA循环及相关代谢物的分析是一道难题，因为这些代谢物的分子量小、极性强、同分异构体多、在人血浆中的浓度范围广并且对金属敏感。为解决保留性和选择性问题的，分析方法采用混合模式阴离子交换色谱和简单的反相流动相。串联四极杆质谱技术有助于实现高灵敏度检测，同时MaxPeak高性能表面可减少分析物与UPLC系统和色谱柱的金属表面发生相互作用。上述技术结合得到一种简单灵敏的分析方法，适用于血浆中有机酸代谢物的定量分析。

### 优势

- 以快速、简单的方法定量分析人血浆中的TCA循环及其他代谢物，无需使用复杂的流动相
- ACQUITY Premier系统解决方案采用MaxPeak高性能表面技术避免金属与分析物相互作用，显著改善分析灵敏度和峰形

---

## 简介

三羧酸循环（TCA循环）是由碳水化合物、脂肪和蛋白质分解产生的一系列酶介导的底物化学反应<sup>1</sup>。TCA循环是一条受到严格调控的途径，同时用于细胞合成代谢和分解代谢过程<sup>1</sup>。此外，已有研究表明，反应产生的代谢物可促进线粒体的细胞信号转导作用<sup>2</sup>。TCA循环中代谢物的最终归宿对于维持细胞体内平衡发挥着至关重要的作用，因此，监测这些代谢物的成分和产物有助于深入了解各种疾病。

测定TCA循环中的化合物可能非常棘手。这些化合物除存在分子量低、基质提取物复杂以及稳定性问题以外，携带羧酸和磷酸基团的化合物还会与金属发生相互作用，导致分析灵敏度下降，峰形变差<sup>3-6</sup>。随之而来的测量不确定度（例如次级相互作用）可能对分析产生不利影响。目前的解决方法包括在流动相或样品稀释剂中添加螯合剂，但此类流动相改性剂可能导致离子抑制或色谱变化，在解决一个问题的同时引发另一个问题<sup>7-10</sup>。为解决金属相互作用，沃特世开发出MaxPeak高性能表面(HPS)技术<sup>11</sup>。将该技术与液相色谱组件以及色谱柱硬件结合使用，能够减少分析物与金属表面的相互作用，并且无需使用额外的流动相添加剂。

---

## 实验

### 配制储备液

分析物储备液分别制成50 mM的游离酸水溶液，随后混合为2.5 mM的水溶液，得到工作储备液。稳定同位素标记的内标(Cambridge Isotope Laboratories)使用50%乙腈/50%水分别制成1 mM的游离酸溶液。然后使用水制成38 μM顺式乌头酸-C13、2-羟基戊二酸-C13、富马酸-C13、苹果酸-C13、琥珀酸-C13与120 μM柠檬酸-C13的工作内标混合物。

### 提取血浆

从BioIVT (Westbury, NY)购得捐献的健康女性血浆样品和乳腺癌阳性样品各四份。置于冰上解冻，随后将每个血浆样品各取25 μL加入新的1.5 mL微量离心管中，然后加入5 μL工作内标混合物。加入75 μL冷甲醇，将样品涡旋混合1分钟。在离心力21,130 rcf、温度4 °C下离心样品10分钟。随后取75 μL上清液转移到新的微量离心管中，并在不加热的情况下使用离心蒸发器真空干燥1.5小时。之后立即将样品复溶于75 μL水中，并在20 °C下静置10分钟。然后按照上述方法对复溶的样品进行离心，并将样品转移到新的硅烷化样品瓶中进行分析。将血浆样品重复进样三次。

## 配制标准曲线标样

使用水连续稀释工作储备液以得到2.5 mM、1.25 mM、500  $\mu$ M、250  $\mu$ M、125  $\mu$ M、50  $\mu$ M、25  $\mu$ M、12.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、1.25  $\mu$ M和0.50  $\mu$ M的标准储备液，制得标准曲线标样。取5  $\mu$ L各标样以及5  $\mu$ L内标混合物加入用硅烷化样品瓶盛装的15  $\mu$ L水中。这些标样分别代表与血浆相同的初始体积(25  $\mu$ L)中浓度为500、250、100、50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.25和0.1  $\mu$ M的校准溶液。然后加入50  $\mu$ L水，使最终体积达到75  $\mu$ L，与血浆样品的样品制备和稀释程序匹配。因此，使用质谱仪测得标准曲线标样的实际浓度为167、83.3、33.3、16.7、8.33、3.33、1.67、0.833、0.333、0.167、0.083和0.033  $\mu$ M。将校准标样重复进样两次。

## 制备流动相

使用容量瓶制备流动相，每三天准确测量一次安瓿瓶中的甲酸含量，确保方法重现性。

## 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier
样品瓶：	沃特世全回收样品瓶，已去活（部件号186000385 DV)
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH苯己基柱, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 $\mu$ m（部件号186009475)
柱温：	50 $^{\circ}$ C
样品温度：	5 $^{\circ}$ C
进样体积：	3 $\mu$ 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	0.5	100	0	
0.50	0.5	100	0	6
3.50	0.5	75	25	6
3.60	0.5	0	100	6
5.00	0.5	0	100	6
5.10	0.5	100	0	6

## 质谱条件

质谱系统: Xevo TQ-S micro

电离模式: ESI-

毛细管电压: 0.5 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

化合物	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
乳酸	89	43	20	12
苹果酸	133	115	25	11
2-羟基戊二酸	147	129	15	15
琥珀酸	117	73	20	10
异柠檬酸	191	111	20	13
柠檬酸	191	111	20	13
富马酸	115	71	25	7
丙酮酸	87	43	20	8
3-磷酸甘油酸	185	97	20	15
$\alpha$ -酮戊二酸	145	101	10	8
磷酸烯醇丙酮酸	167	79	20	16
顺式乌头酸	173	129	20	10
苹果酸-C13	137	119	25	11
2-羟基戊二酸-C13	152	134	15	15
富马酸-C13	119	74	25	7
琥珀酸-C13	121	76	20	10
柠檬酸-C13	194	113	20	13
顺式乌头酸-C13	179	134	20	10

表1.MRM通道汇总。

## 数据管理

质谱软件：

MassLynx v4.2

## 结果与讨论

TCA及相关组分的测量可通过多种LC-MS或GC-MS方法完成。我们之前开发的LC-MS分析方法是利用标准CSH苯己基柱和液相色谱系统通过混合模式阴离子交换色谱法分离人尿液中的TCA组分<sup>12</sup>。本研究采用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier CSH苯己基柱对该方法进行了扩展。ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱均采用MaxPeak HPS技术来减少金属与分析物相互作用。

羧酸盐和磷酸盐等富电子基团可能充当金属螯合剂，与金属表面发生不必要的相互作用，从而导致检测器实际测得的分析物含量减少。本研究采用MaxPeak Premier技术显著增加了金属敏感化合物的峰面积并改善了峰形。图1所示为采用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱与采用标准UPLC系统和标准色谱柱相比，分析提取血浆样品中的异柠檬酸和柠檬酸、苹果酸和3-磷酸甘油酸得到的色谱图。可以看出，异柠檬酸和柠檬酸以及3-磷酸甘油酸的峰面积明显增加，苹果酸的峰形得到改善。异柠檬酸和柠檬酸的峰面积分别增加到原来的41倍和5倍，3-磷酸甘油酸的峰面积则增加到100倍以上。苹果酸在10%峰高处的峰拖尾减少58%。为确定MaxPeak Premier技术对系统和色谱柱适用性的影响，在每套系统上使用新色谱柱进样分析提取血浆。以柠檬酸为例，首次进样时血浆中的峰面积就高于2个数量级（图2），表明ACQUITY Premier UPLC系统和色谱柱具有优异的分析灵敏度，并且在分析前只需花少量时间进行样品基质平衡处理。

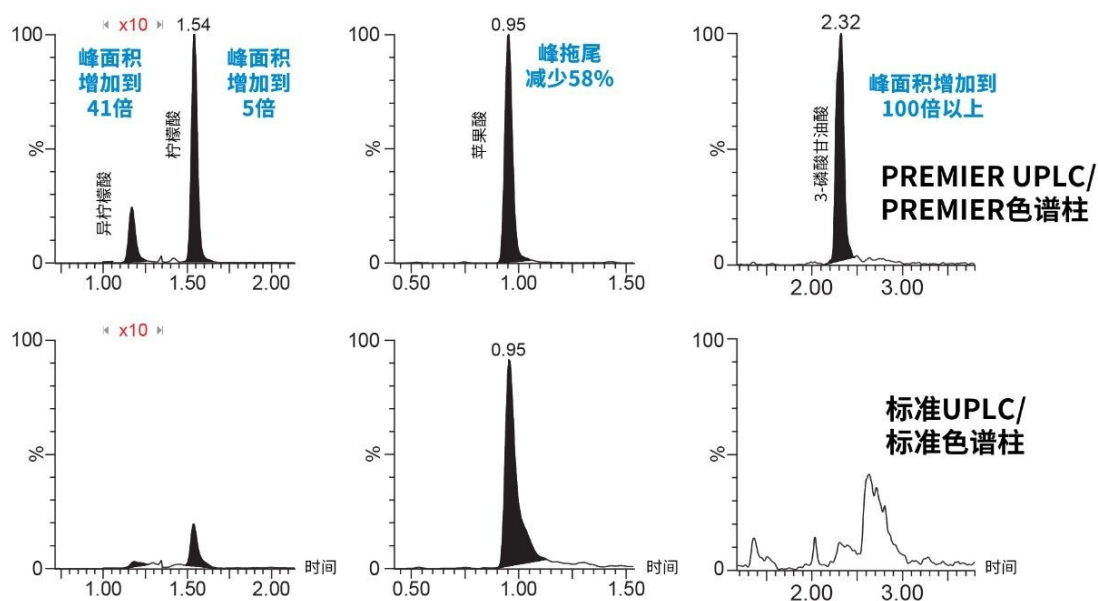


图1.从血浆中提取的代谢物分离结果比较：ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱（上图）；标准液相色谱系统和标准色谱柱（下图）。这些结果表明，异柠檬酸和柠檬酸以及3-磷酸甘油酸的峰面积增加。此外，苹果酸的峰拖尾减少。

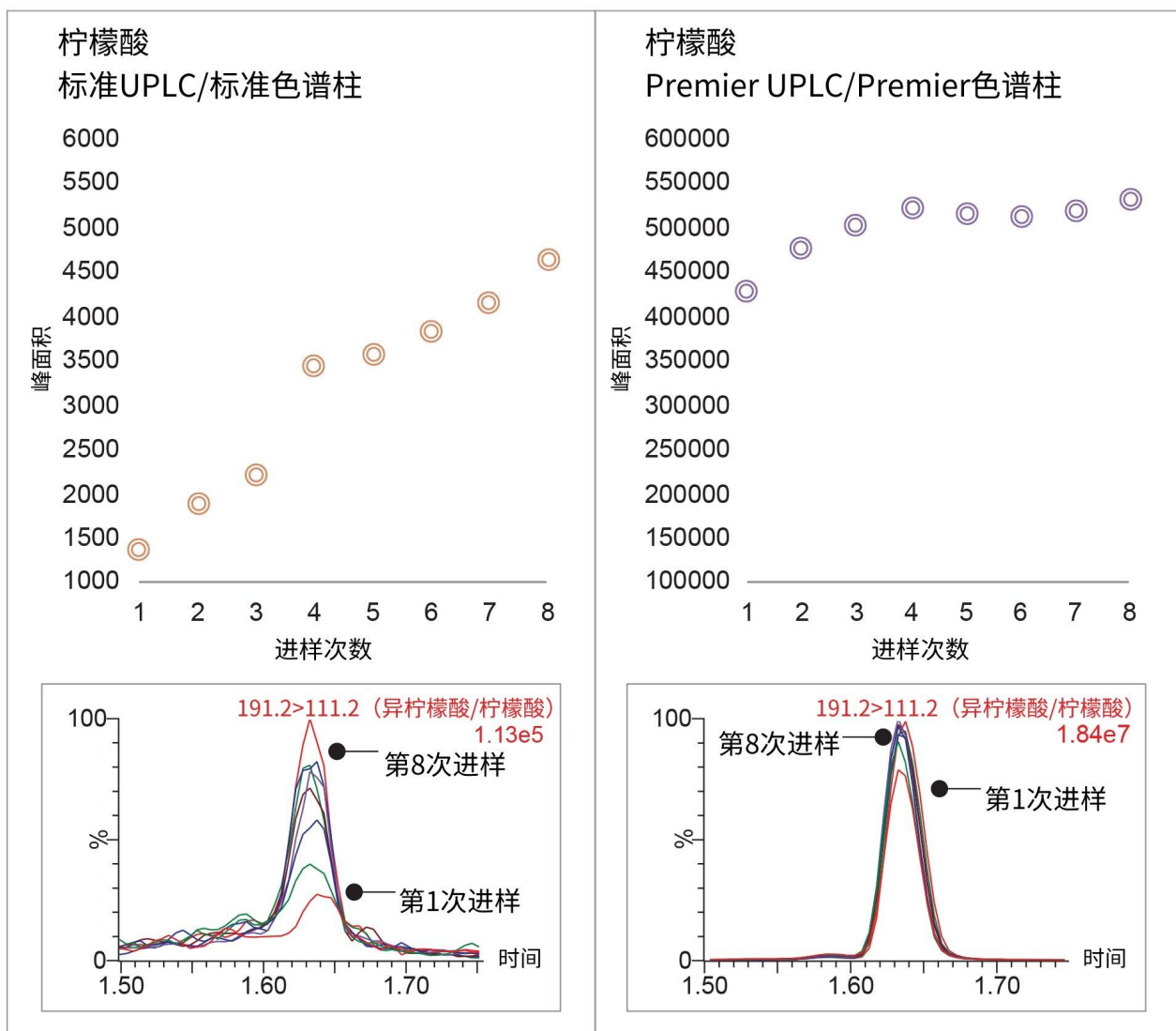


图2.在开箱直接使用的新色谱柱上第1~8次进样提取血浆得到的柠檬酸结果。

使用分析物水溶液绘制标准曲线，尽可能使用同位素标记的内标，采用 $1/x$ 权重进行线性回归。校准结果汇总见表2。使用溶剂标准品中的内标峰面积比反算从血浆中提取的分析物浓度（表3，图3）。柠檬酸的TargetLynx定量分析示例见图4。分析四份健康对照样以及乳腺癌阳性提取血浆样品得到的分析物叠加图展示了以良好的保留时间对齐检测到的浓度范围（图5）。

化合物	内标	保留时间 (min)	线性范围		
			最小值( $\mu\text{M}$ ) LLOQ	最大值 ( $\mu\text{M}$ )	R <sup>2</sup> (线性拟合)
苹果酸	苹果酸-C13	0.93	0.033	167	0.9991
2-羟基戊二酸	2-羟基戊二酸-C13	1.02	0.083	83.3	0.9969
琥珀酸	琥珀酸-C13	1.04	0.083	83.3	0.9995
异柠檬酸	柠檬酸-C13	1.15	0.083	83.3	0.9943
柠檬酸	柠檬酸-C13	1.52	0.033	167	0.9986
富马酸	富马酸-C13	1.74	0.083	167	0.9989
丙酮酸	富马酸-C13	2.04	1.67	83.3	0.9949
3-磷酸甘油酸	富马酸-C13	2.34	0.083	8.33	0.9975
$\alpha$ -酮戊二酸	富马酸-C13	2.36	0.333	33.3	0.9981
磷酸烯醇丙酮酸	乌头酸-C13	2.67	0.033	16.7	0.9966
顺式乌头酸	乌头酸-C13	3.08	0.167	83.3	0.9973

表2.方法和样品浓度汇总。

样品中的平均浓度, n = 3 ( $\mu\text{M}$ )								
化合物	健康 对照品1	健康 对照品2	健康 对照品3	健康 对照品4	乳腺癌 样品1	乳腺癌 样品2	乳腺癌 样品3	乳腺癌 样品4
苹果酸	12.2	10.9	3.93	3.67	5.43	28.3	30.7	13.6
2-羟基戊二酸	1.97	4.07	0.9	0.4	2.83	7.27	4.27	2.67
琥珀酸	14.9	27.1	3.23	3.2	6.43	54.6	29.5	41.1
异柠檬酸	3.3	2.77	1.67	1.13	2.5	3.87	4.23	4.6
柠檬酸	67.7	67.5	54.9	45.4	91.7	74.5	86.6	102.3
富马酸	2.03	1.57	0.400	n/d	n/d	5.77	5.37	3.10
丙酮酸	254	249	138	115	63.0	n/d	7.55	6.90
3-磷酸甘油酸	2.15	4.64	0.584	0.900	2.63	>25	19.2	13.0
$\alpha$ -酮戊二酸	33	90.9	14.5	4.73	78.9	n/d	n/d	n/d
磷酸烯醇丙酮酸	BLOQ	0.517	n/d	n/d	n/d	0.386	0.15	n/d
顺式乌头酸	2.07	2.03	1.27	0.9	1.93	3.17	3.53	3.93

表3.方法和样品浓度汇总。



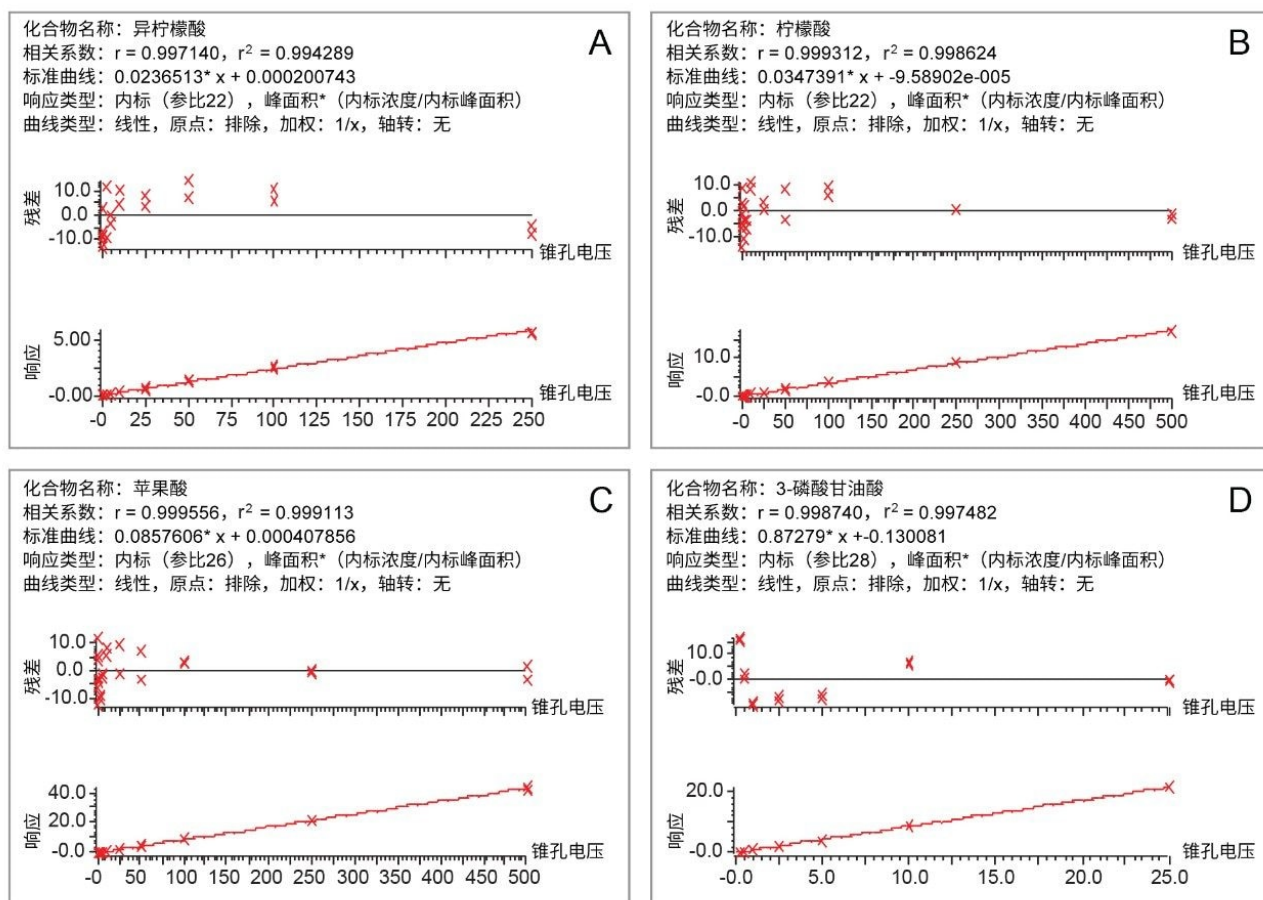


图3.溶液中异柠檬酸(A)、柠檬酸(B)、苹果酸(C)和3-磷酸甘油酸(D)的标准曲线。

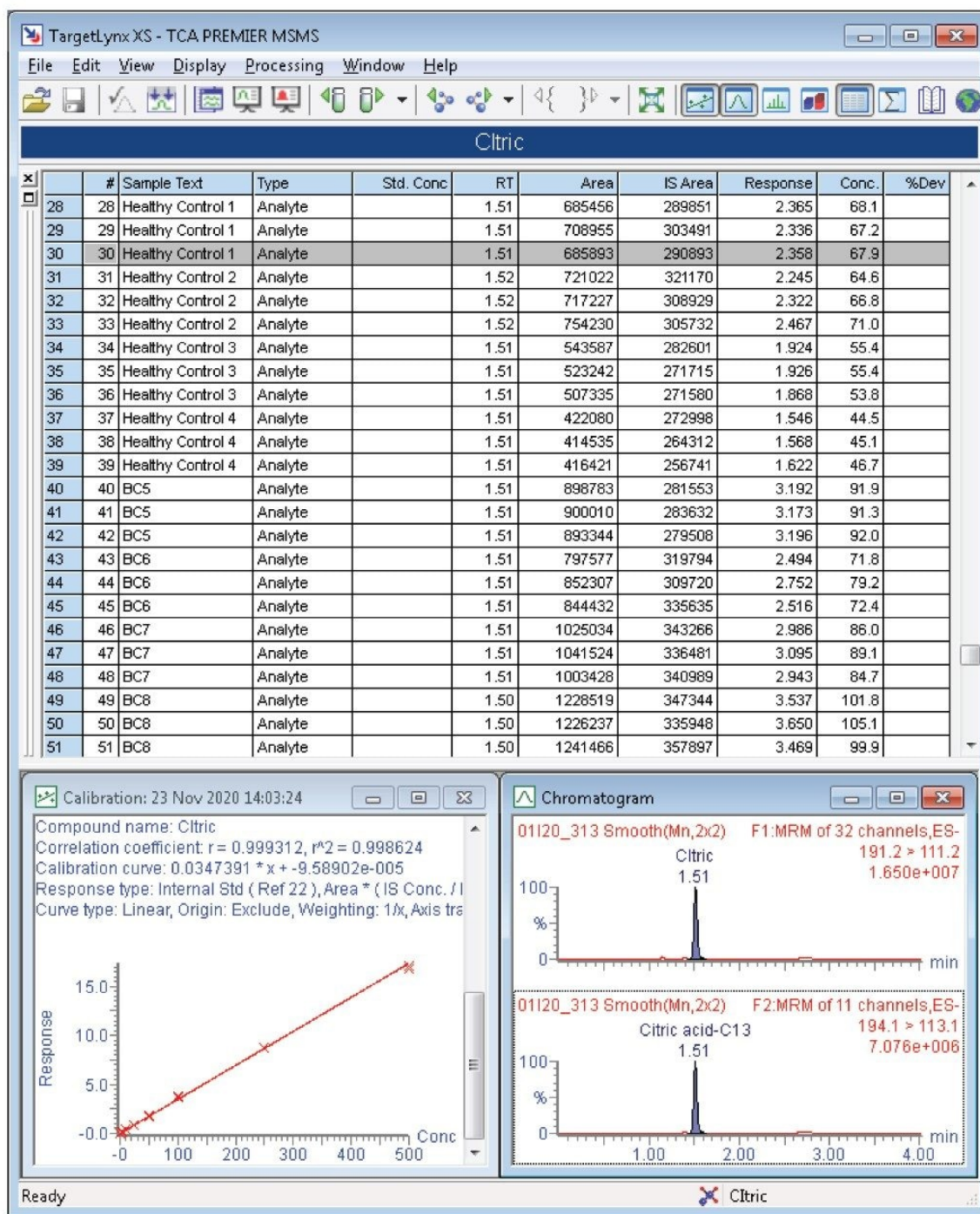


图4.利用TargetLynx定量分析健康人血浆样品以及乳腺癌阳性血浆样品中的柠檬酸得到的结果。

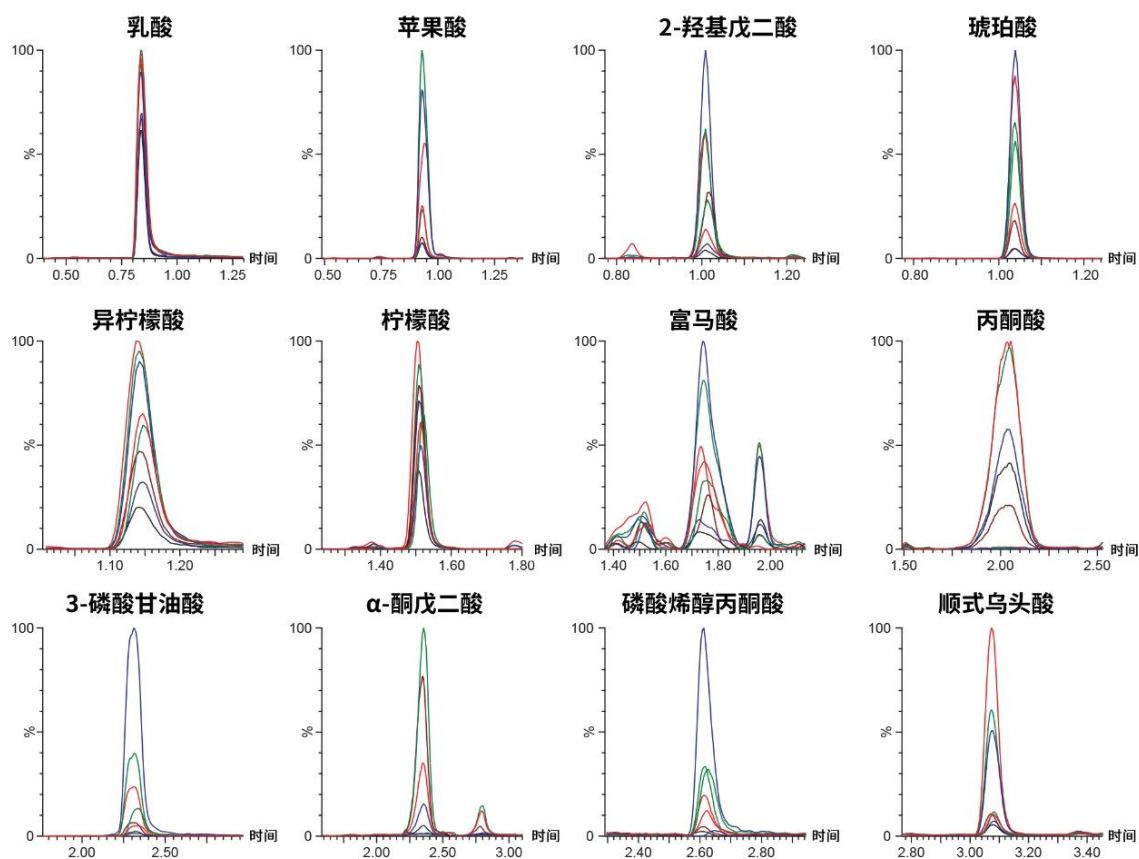


图5.血浆样品中分析物的叠加图。

## 结论

本研究证明，将MaxPeak HPS技术引入液相色谱系统和分析柱后，人血浆中TCA循环及相关代谢物的分析可以达到出色的灵敏度。ACQUITY Premier系统解决方案能够减少分析物与金属相互作用，从而改善峰形以及分析灵敏度，无需在流动相中添加强酸或螯合添加剂对整个系统进行钝化。使用ACQUITY Premier CSH苯己基柱进行简单的混合模式阴离子交换分离的操作非常简单快速。

---

## 参考资料

1. Murray RK, Bender DA, *et al.* Harper's Illustrated Biochemistry, 28th ed. New York: McGraw-Hill, 2009. Chapters 16–18. Pages 131–156.
2. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease. *Nat Commun* 2020, 11 (1).
3. Siegel D, Permentier H, Reijngoud D, Bischoff R. Chemical and Technical Challenges in the Analysis of Central Carbon Metabolites by Liquid-Chromatography Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2014, 966, 21–33.
4. Gil A, Siegel D, Permentier H, Reijngoud D, Dekker F, Bischoff R. Stability of Energy Metabolites—An Often Overlooked Issue in Metabolomics Studies: A review. *Electrophoresis* 2015, 36 (18), 2156–2169.
5. Abrahamson HB, Rezvani AB, Brushmiller JG. Photochemical and Spectroscopic Studies of Complexes, of Iron(III) with Citric Acid and Other Carboxylic Acids. *Inorg Chim Acta* 1994, 226 (1–2), 117–127.
6. Sakamaki H, Uchida T, Lim L W, Takeuchi T. Evaluation of Column Hardware on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Phosphorylated Compounds. *J Chromatogr A* 2015, 1381, 125–131.
7. Siegel D, Permentier H, Bischoff R. Controlling Detrimental Effects of Metal Cations in the Quantification of Energy Metabolites via Ultrahigh Pressure-Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry by Employing Acetylacetone as a Volatile Eluent Modifier. *J Chromatogr A* 2013, 1294, 87–97.
8. Roberts D, Ruane R, Wilson I. Picolinic Acid a Mobile Phase Additive for Improved Chromatography. *Journal of Chromatography* 1989, 471, 437–441.
9. Hsiao JJ, Potter OG, Chu TW, Yin H. Improved LC-MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal Chem* 2018, 90 (15), 9457–9464.
10. Myint K, Uehara T, Aoshima K, Oda Y. Polar Anionic Metabolome Analysis by Nano-LC-MS with Metal Chelating Agent. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 7766–7772.

11. Lauber M, Walter TH, Boissel C, Gilar M, Smith K, Birdsall R, Rainville P, Belanger J, Wyndham K. Low Adsorption UPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces; Waters White Paper 720006930EN <<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>> .2020.
12. Smith KM, Plumb R, Rainville PD. Separation and Detection of TCA Cycle Metabolites and Related Compounds in Human Urine by UPLC-MS/MS. Waters Technology Brief 720006463EN <<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135005827>> .2019.

---

## 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>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007107ZH, 2020年12月

© 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