

# 使用 Agilent Bravo 平台自动提取血浆中的代谢物

## 前言

在血浆代谢组学分析中，正确的样品前处理策略对于获得高质量且可重现的结果至关重要。该策略必须能够淬灭代谢反应并有效提取出代谢物供 LC/MS 分析。遗憾的是，针对包括血浆在内的生物样品前处理，尚且没有经过验证的标准化方法，也没有自动化方案。基础研究和转化研究要处理大量样品，可能需要难以企及的人力投入，还可能出现样品处理不一致的问题。另外，血浆中的代谢物本质上是代谢和分解两个过程的产物，而这些过程由细胞和血液中的酶催化完成。要准确测定代谢物的相对浓度，最根本的就是要在采样时最大程度减弱甚至消除所有这些酶的残余活性<sup>1</sup>。综上所述，这些障碍可能会影响下游定量分析的准确度，以及分析结果的日间和实验室间一致性。

为了克服这些障碍，我们为血浆代谢物分析开发了一套基于 Bravo 代谢组学样品前处理平台 (Bravo) 的自动化样品前处理方案。该方案在 LC/MS 分析之前通过沉淀血浆蛋白质淬灭酶活性，然后去除脂质并提取代谢物。通过对样品溶液进行改性，可阻止蛋白质内形成其维持分级超微结构所必需的分子内非共价键合，从而使蛋白质沉淀。添加破坏分子内静电相互作用的有机溶剂或其他试剂是两种常用的蛋白质沉淀策略。至于采样之后仍会持续进行并且可能改变代谢物浓度的分解和代谢过程，必须破坏蛋白质的超微结构，以便在沉淀蛋白质的同时抑制酶活性。最后，为了能够分析代谢物，蛋白质沉淀策略还必须保持代谢物溶解度，并与代谢物提取工作流程兼容。

我们测试了两种经典的蛋白质沉淀策略，考察其在模拟基础研究或转化研究的条件下（代谢物提取步骤可能会延迟），定量分析多种血浆代谢物的结果一致性。本技术概述提供了采用三氯乙酸 (TCA) 蛋白沉淀策略和甲醇:乙醇 (M:E) 蛋白沉淀策略得到的结果，以及这两种策略耐受后续提取步骤延迟的能力<sup>2</sup>。使用 Agilent Bravo 平台开发从血浆中提取代谢物的自动化方案，目的在于：

- 提高纵向重现性
- 简化培训
- 减小操作人员之间的差异

最后，使用混合人血浆标准品评估此工作流程配合 LC/MS 分析的日内及日间重现性，采用基于 MRM 的安捷伦 LC/MS/MS 平台对中心碳代谢物进行了 LC/MS 分析。

## 解决方案概述

本文所述的自动化解决方案适用于可立即处理的样品，以及在处理之前需要转移至分析实验室的样品。

根据我们的研究结果，最终的血浆前处理方案如下：首先用甲醇:乙醇 (M:E) 沉淀蛋白质，然后使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 板去除蛋白质和脂质。接下来，干燥洗脱物，并在 LC/MS 分析之前复溶。除样品干燥以外的所有步骤均可由 Bravo 平台自动完成。

## Bravo 仪器和附件

- Agilent Bravo 代谢组学样品前处理平台 (部件号 G5589AA)
- Agilent Captiva EMR-Lipid 板 (部件号 5190-1001)
- 安捷伦 250 µL 一次性枪头 (部件号 19477-002)
- Agilent DuoSeal 96 孔板密封垫 (部件号 A8961008)
- Agilent Captiva 收集板 (部件号 A69600100)
- Agilent Seahorse 储存板，2 mL 方形孔，金字塔形底部 (部件号 201240-100)
- 安捷伦聚丙烯 (PP) 圆底孔板，1 mL (部件号 203426-100)
- Thermo Scientific Matrix 1.0 mL 螺旋盖样品管和管架，2D V 型底 (赛默科技部件号 3741)

## 液质联用系统

配置 Agilent 6470 LC/TQ 系统，使用安捷伦代谢组学动态 MRM 数据库和方法 (安捷伦出版号 5991-6467EN) 进行靶向代谢组学分析。

## 方法

采集血浆样品的环境可能不尽相同。如果在接近 Bravo 的受控条件下采集血浆样品，则蛋白质沉淀步骤可作为自动化工作流程的一部分，在现场完成。然而，由于基础研究和转化研究往往是合作型研究，血浆样品通常由第三方在另外的地点采集，因而样品在送至分析实验室进行处理之前，会有一些的时间延迟。在这种情况下，应在非现场手动执行淬灭步骤，最大程度避免采样后血浆中残留的酶介导代谢物变化，进而对分析结果产生影响。

血浆样品中代谢物的分析包括三个步骤：

1. 沉淀血浆蛋白质（样品淬灭）
2. 去除蛋白质和脂质，提取代谢物
3. LC/MS 分析

我们使用 Bravo 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 板开发了一套既适用于现场样品采集，也适用于非现场样品采集的半自动化工作流程（图 1）。

采集样品后，应尽快将新鲜全血离心，同时尽可能确保操作一致性。对于现场采样，吸取至少 120  $\mu\text{L}$  血浆转移至 Thermo Scientific Matrix 1.0 mL 螺旋盖样品管中，置于 Thermo Scientific Matrix 管架上，然后将管架装载到 Bravo 台板上。对于非现场采样，尽快将 100  $\mu\text{L}$  血浆转移至含有 450  $\mu\text{L}$  M:E (1:1) 的 Thermo Scientific Matrix 1.0 mL 螺旋盖样品管中。如果预计样品前处理将延迟 6 小时以上，应将这些样品管冷冻保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下。



图 1. 从血浆中提取代谢物的自动化工作流程。绿色步骤由 Agilent Bravo 平台完成

选择 Captiva EMR-Lipid 系统用于高选择性、高效地去除脂质，同时从血浆中滤除沉淀的蛋白质。创新的 EMR-Lipid 技术结合体积排阻和疏水相互作用机制来去除脂质。有效去除脂质可最大程度减小离子抑制效应对目标代谢物的影响，并改善方法可靠性和稳定性。此工作流程最后可得到盛装有代谢物提取物的孔板，这些提取物经过干燥和复溶之后即可进行 LC/MS 分析。样品分析由 6470 LC/TQ 平台配合代谢组学动态 MRM 数据库和方法完成。代谢组学动态 dMRM 数据库和方法的详情参见之前的技术概要<sup>3</sup>。

## 结果与讨论

### M:E 可以有效沉淀蛋白质

血浆中的酶可能会在采样之后改变血浆的相对代谢物浓度，我们认为蛋白质沉淀是抑制这类酶活性的一个关键步骤。本研究旨在开发一种蛋白质沉淀（酶淬灭）策略，使其既能与下游代谢物提取步骤兼容，同时又能克服血浆采样与下游代谢物提取步骤之间可能出现的时间延迟所带来的实际限制。我们选择并研究了以下两种比较有潜力的策略：基于 TCA 的蛋白质沉淀策略和基于 M:E 的蛋白质沉淀策略。

初步筛选旨在确定单独使用这两种策略时，它们分别需要使用多少溶剂才能有效沉淀血浆蛋白质。为了回答这个初始问题，将 100  $\mu\text{L}$  标准混合血浆等分试样添加到 450  $\mu\text{L}$  M:E (1:1) 或 TCA 含量逐渐增加的溶液中（0.5%、1%、2%、4% 和

6%，w/v），以诱发沉淀。然后对样品进行涡旋混合和离心，通过 BCA 分析确定上清液中残留的蛋白质含量（图 2A）。实验表明，M:E 或浓度介于 2% 和 4% (w/v) 之间的 TCA 足以诱发血浆蛋白质发生沉淀。

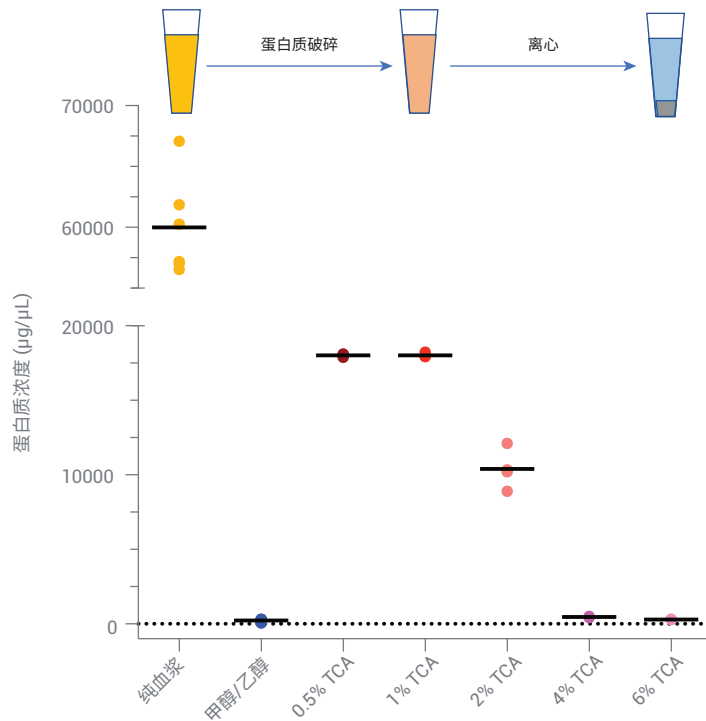


图 2A. 使用甲醇/乙醇或浓度高于 2% (w/v) 的 TCA 可有效沉淀蛋白质。虚线表示未检测到蛋白质

LC/MS 分析之前的代谢物提取步骤需要添加可混溶的有机溶剂，例如 M:E。此外，为了创建可实现自动化的工作流程，我们尝试使用 Captiva EMR-Lipid 板来筛选除沉淀的蛋白质并去除脂质，从而省去离心步骤。这些板要求有机溶剂含量达到至少 50% 才能获得最佳性能。首先用 M:E、2% TCA 或 4% TCA (w:v) 诱发血浆蛋白质发生沉淀，以评估 Captiva EMR-Lipid 板筛选蛋白质的能力。经 TCA 沉淀的样品中补充 40%、60% 或 80% 的 M:E (v:v)，然后与 M:E 沉淀的样品一起，以真空过滤的方式通过 Captiva EMR-Lipid 板。洗脱物中的蛋白质含量表明 (图 2B)，不离心，直接用 Captiva EMR-Lipid 板筛选沉淀蛋白质的方法对于 TCA 浓度较低或不添加 TCA 的样品最有效。另外，TCA 沉淀的血浆样品通过 Captiva EMR-Lipid 板的速率和顺畅程度的前后一致性不及 M:E 沉淀的对应样品。我们推测，M:E 沉淀的样品比 TCA 沉淀的样品一致性更好，可能是其 BCA 分析结果变异性更低的原因之一。

最后，我们重复了评估 Captiva EMR-Lipid 板筛选性能的实验，这次实验增加了离心步骤，只取上清液加载至 Captiva EMR-Lipid 板 (图 2C)。上样前的离心步骤对于使用 EMR-Lipid 板去除 TCA 沉淀样品中的蛋白质和提升分析性能是必要的，但是这个额外的步骤降低了通量，且有碍流程自动化。相比之下，基

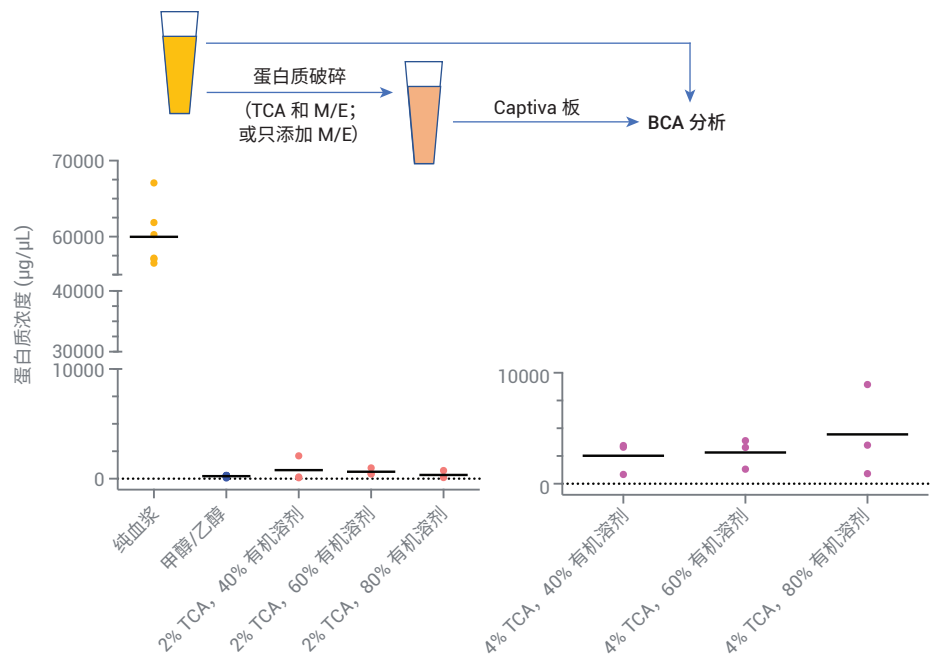


图 2B. 使用 Captiva EMR 板筛选沉淀蛋白质的方法对于 TCA 浓度较低或未添加 TCA 的样品有效。虚线表示未检测到蛋白质

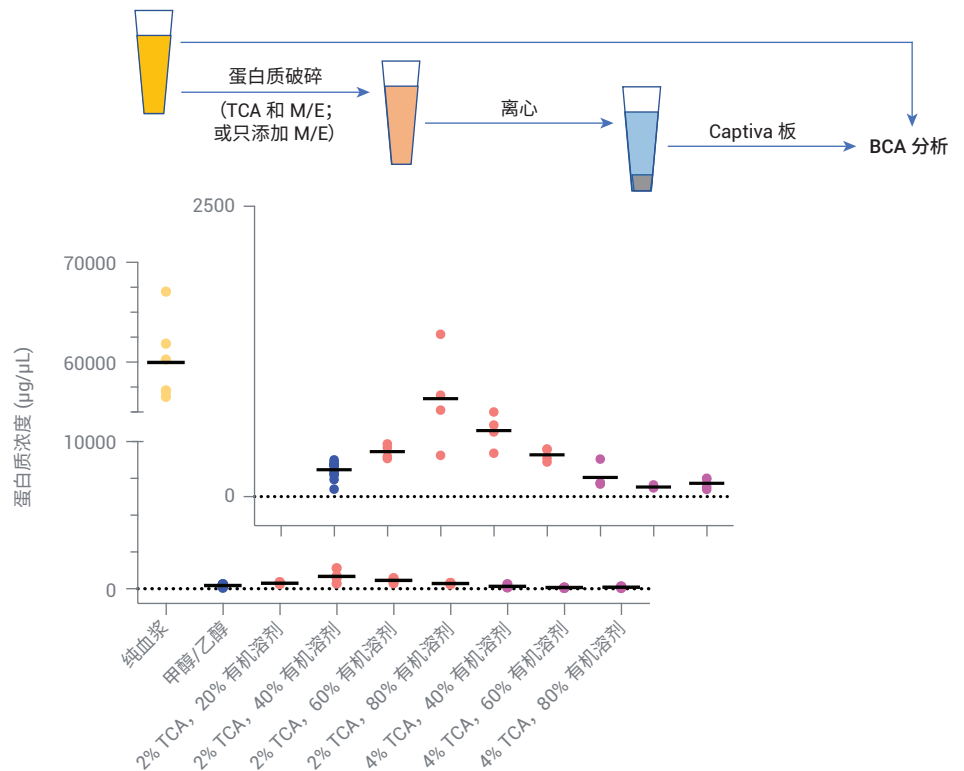


图 2C. TCA 介导的沉淀血浆蛋白质的样品必须经过离心，才能使 Captiva EMR 板获得最佳的沉淀蛋白质筛选效果。虚线表示未检测到蛋白质

于 M:E 的血浆蛋白质沉淀策略可兼容基于 Captiva EMR-Lipid 板的蛋白质去除方案且效果良好，而且重要的是，无需离心步骤。通过扩展，M:E 方案可实现工作流程精简化和自动化。实验结果表明，基于 M:E 的蛋白质沉淀方法更实用、更易实现工作流程自动化，并且所得结果优于 TCA 蛋白质沉淀方法。

### 脂质分析证明 Captiva 板能够高效去除脂质

脂质给准确且可重现的代谢物分析带来了很大的挑战。脂质不仅容易附着到固定相上，使得色谱柱寿命缩短，而且是离子抑制效应的一个重要来源，会导致灵敏度下降。脂质是血浆中含量高、种类多且非常多变的一种组分。不只是不同受试者的血浆脂质浓度有差异，同一受试者的血浆脂质浓度也可能因为饮食和热量摄入不同而有所差异。由于不同受试者的血浆脂质含量不同，离子抑制效应也会相应变化，进而影响 LC/MS 测定的准确度，增加实验变异性。出于这些原因，我们尝试将脂质去除也纳入该工作流程。Captiva EMR-Lipid 板除了能够筛除沉淀的蛋白质，还能在代谢物 LC/MS 分析之前去除样品中的脂质。为了确定 Captiva EMR-Lipid 板对脂质去除的相对贡献，我们使用 MS/MS 分析了混合血浆样品，即经 M:E 或 2% TCA 沉淀蛋白质并离心后的血浆样品，以及蛋白质沉淀后不离心，直接上样至 Captiva EMR-Lipid 板进行处理所得的血浆样品中的 12 种脂质（图 3）。如图 2B 所示，Captiva EMR-Lipid 板处理 TCA 浓度超过 2% 且未经离心的样品时的一致性不佳，因此在评估 Captiva 板的血浆脂质去除效率时，为何我们用 2% TCA 与 M:E 结合的沉淀策略。

我们计算了 12 种脂质中每种脂质的相对去除率，以被去除的脂质量占纯血浆中测得的脂质量的百分比来表示。结果表明，在测定的 12 种脂质中，除两种脂质外，其他脂质几乎被 Captiva EMR-Lipid 板彻

底去除。剩下两种脂质（二酰基神经酰胺和游离脂肪酸）的去除率也超过 75%。虽然游离脂肪酸在血浆中的含量相对较高，但它们不太可能对 LC/MS 分析产生离子抑制效应。

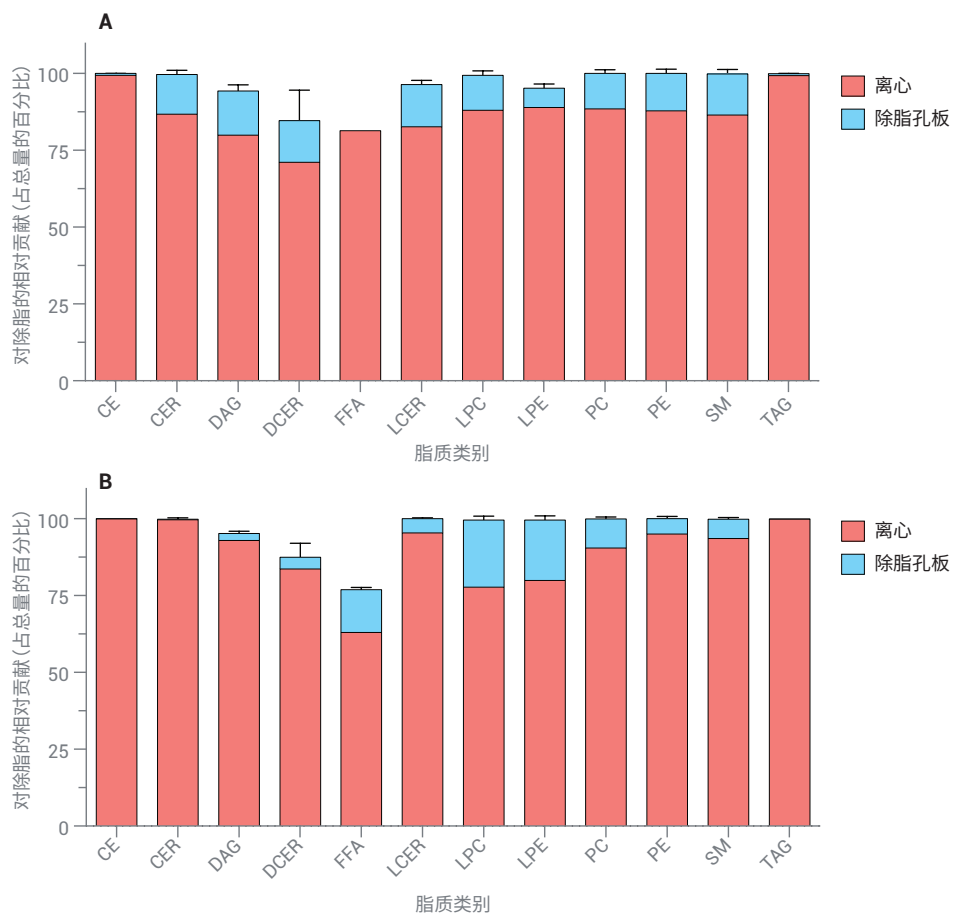
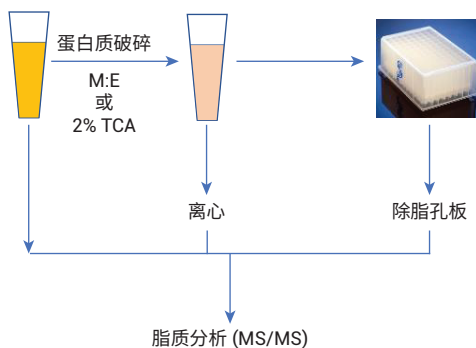


图 3. 使用 M:E (A) 和 TCA (B) 沉淀血浆蛋白质并进行 MS/MS 分析，所得结果表明，Captiva EMR-Lipid 板能够有效去除脂质

最重要的是，我们的结果表明，血浆样品中的强离子抑制剂磷脂被有效去除。

将该工作流程应用于混合血浆样品中代谢物 dMRM 定量分析的上游时，我们发现这套完整工作流程能够实现可重现且灵敏的代谢物分析。实验结果表明，尽管在前处理工作流程中引入 Captiva EMR-Lipid 板对大多数代谢物的分析结果没有影响，但总体而言，那些分析结果受脂质去除影响较为显著的代谢物表现出了信号增强（图 4）。

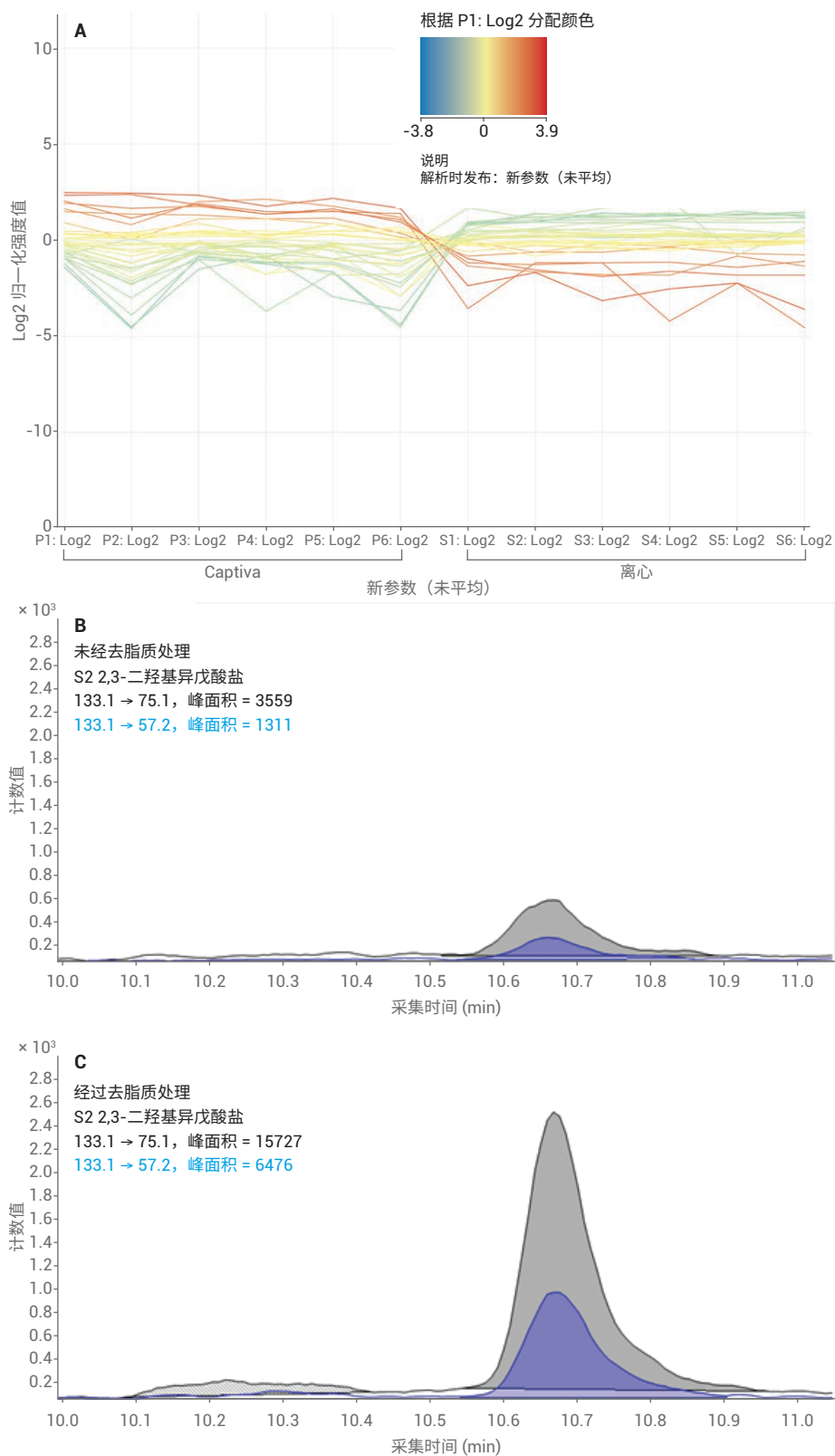


图 4. 如 A 所示，大多数代谢物不受脂质去除的影响。然而，对于某些代谢物，去除脂质之后其信号显著改善，例如 2,3-二羟基异戊酸盐（见图 B 和图 C）

### 基于 M:E 的血浆蛋白质沉淀方法能够稳定采样之后血浆中的代谢物浓度

我们尝试确定 M:E 介导的蛋白质沉淀能够在多大程度上稳定血浆中的代谢物浓度。为此，从四名志愿者身上采集了新鲜血浆。在第一组实验（第 1 组）中，立即对血浆等分试样进行后续 M:E 蛋白质沉淀和样品处理；或者将试样保存在冰上，分别延迟 2、4、6 和 24 小时后；或者在室温下保存 24 小时后进行沉淀和处理。在第二组平行实验（第 2 组）中，立即对等分试样进行 M:E 蛋白质沉淀，然后保存在冰上，分别延迟 2、4、6 和 24 小时后，或者在室温下保存 24 小时后进行处理（图 5）。第 1 组实验旨在确定

蛋白质沉淀和样品处理都被延迟的情况下，血浆代谢组可能发生何种程度的变化；而第 2 组实验旨在确定采样后立即进行 M:E 蛋白质沉淀，但延迟样品处理能否避免此类变化。

这些实验组的无监督主成分分析结果表明，各个受试者的数据相互分离。这一结果强有力地说明，在进行代谢物分析时，个体间的差异很可能会超过因样品处理或蛋白质沉淀延迟而产生的变异性（图 6）。

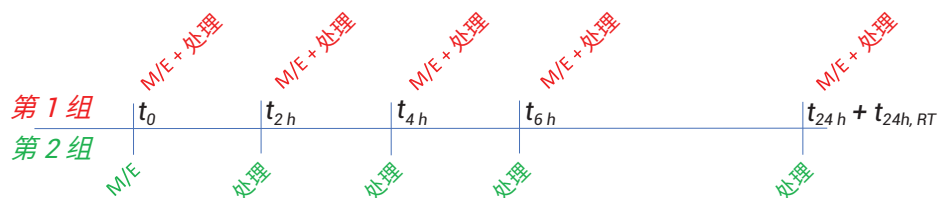
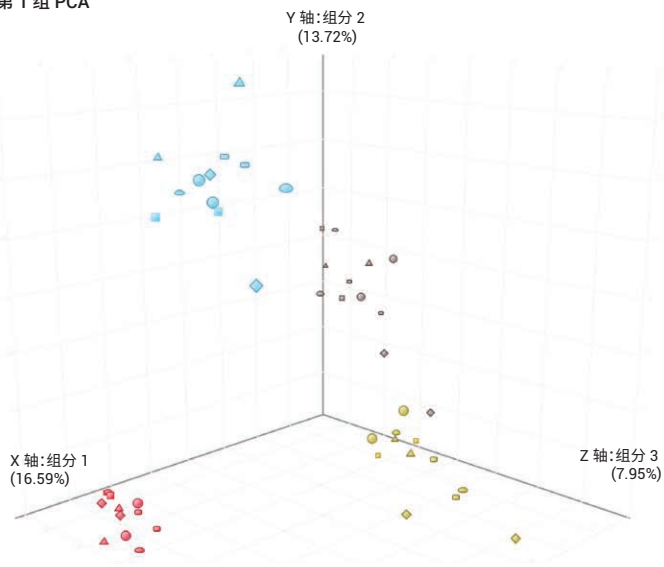


图 5. 在立即淬灭但延迟处理，或者同时延迟淬灭和处理的条件下，评估代谢物稳定性的实验设计

第 1 组 PCA



第 2 组 PCA

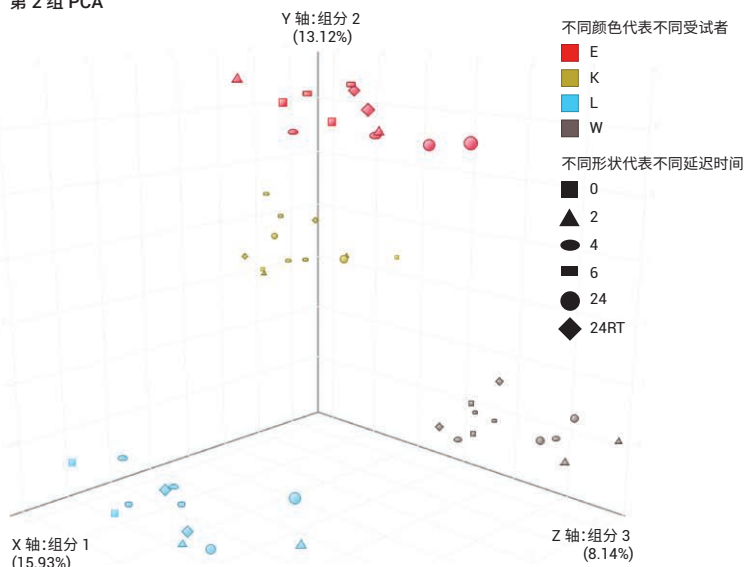


图 6. 若立即对血浆进行淬灭处理，延迟处理对代谢物含量的影响极小（第 2 组），但如果淬灭处理也被延迟（第 1 组），将会对代谢物含量产生负面影响，PCA 图中每名受试者的数据按时间点聚集这一现象证明了这个结论。代谢物特征因个体而异



然而，为了成功分析个体内的代谢物丰度，必须保留样品之间的生物学差异。我们以血浆来源（受试者）和时间（蛋白质沉淀延迟时间加上样品处理延迟时间，或者蛋白质沉淀延迟时间）为参数，进一步对所得数据进行了双向 ANOVA 分析。该分析显示，根据蛋白质沉淀和样品处理的延迟时间不同，第 1 组中共有 26 种代谢物的定量结果出现了显著差异。与此相比，若立即进行 M:E 蛋白质沉淀（第 2 组），结果出现显著差异的代谢物减少了 8 种（图 7）。

这些数据表明，经过蛋白质沉淀的血浆样品与未经蛋白质沉淀的血浆样品相比，24 小时期限内前者的血浆代谢物浓度的稳定性更好。与任何其他生物分析工作流程一样，进行血浆代谢物分析时，样品处理和样品分析越是接近即时分析，就越能准确反映样品的生物学指标。基于 Bravo 平台的现场工作流程就是专为这种理想情形而设计的。在无法立即进行样品处理和应用的实际应用中，非现场 M:E 血浆蛋白质沉淀为研究人员提供了一种能够最大程度减少采样后血浆代谢物含量波动的实用方法。在这种情况下，可以将 100  $\mu$ L 血浆等分试样加入 450  $\mu$ L M:E 中，并在代谢物提取和分析之前冷藏（或冷冻）保存，然后即可利用 Bravo 非现场工作流程处理此类样品。

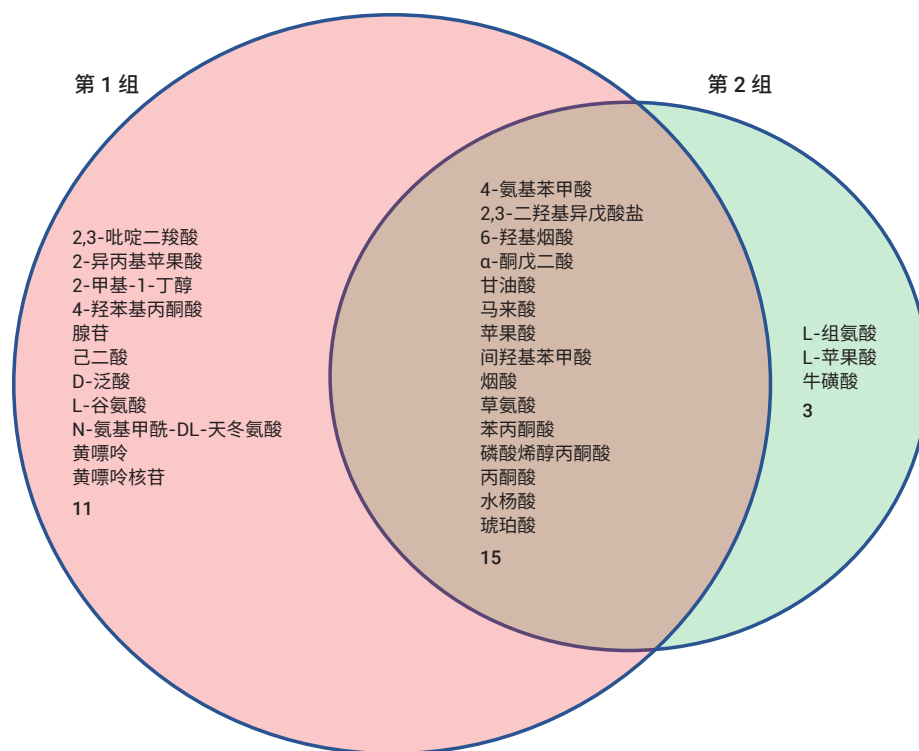


图 7. 采样后立即进行 M:E 沉淀（第 2 组），相对于血浆延迟淬灭（第 1 组），结果是较少代谢物其定量值随时间有显著差异

## 自动化工作流程可提高重现性

我们为血浆代谢物分析开发了一套可重现的工作流程，该流程通过有效淬灭酶活性来稳定代谢物浓度，而且可以实现自动化。除了提高通量这个明显优势以外，自动化还可以提高实验室之间、项目之间、分析人员之间以及随时间推移的重现性。我们还初步评估了该工作流程的重现性，具体操作如下：在 Bravo 上连续运行该流程间，或者隔两天运行该流程，将所得结果与我们技术最熟练的科学家通过手动样品前处理得到的结果进行比较。图 8

中的直方图显示了两天的实验中自动和手动前处理方案所共有的 50 种重现性最高的代谢物。Bravo 工作流程得到的所有

50 种代谢物的结果 CV 均低于 20%，而手动前处理得到的结果中，只有 37 种代谢物的结果 CV 低于截止限 (20%)。

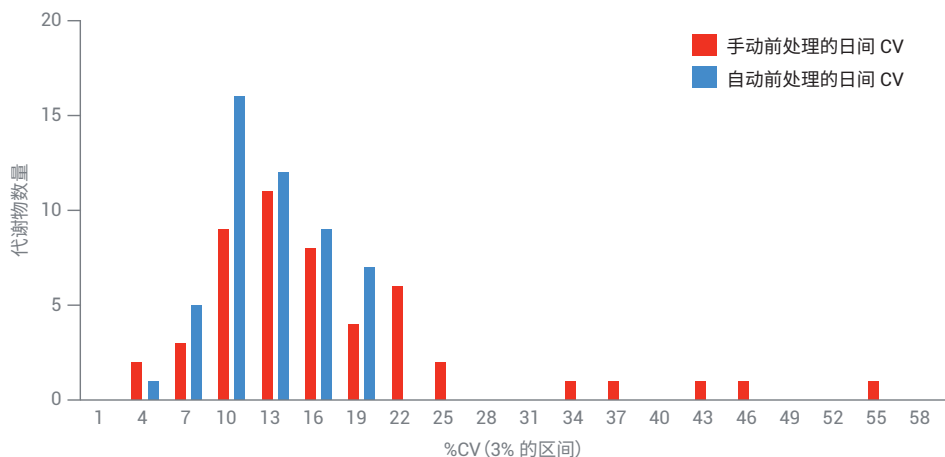


图 8. 自动化工作流程可提高重现性

表 1. 采用自动化工作流程或通过手动提取从混合的人血浆中提取代谢物 (下页续)

代谢物	手动样品前处理							自动化工作流程样品前处理						
	第 1 天 (峰面积)			第 2 天 (峰面积)			日间 %CV	第 1 天 (峰面积)			第 2 天 (峰面积)			日间 %CV
	平均值	标准偏差	%CV	平均值	标准偏差	%CV		平均值	标准偏差	%CV	平均值	标准偏差	%CV	
乳酸	538564	56314	10.46	533911	11689	2.19	6.32	564447	28684	5.08	560027	22601	4.04	4.56
3-吲哚乙酸	11785	1324	11.24	10706	1103	10.31	10.77	11523	776	6.73	13368	900	6.73	6.73
肌醇	2344610	159752	6.81	2991103	175289	5.86	6.34	2735068	219292	8.02	2936028	199752	6.80	7.41
牛黄胆酸	1115	51	4.61	1079	96	8.92	6.77	1144	79	6.87	1369	113	8.26	7.56
4-吡哆酸	9444	1417	15.00	10320	822	7.96	11.48	11189	958	8.56	12121	945	7.79	8.18
D-甘露糖	252158	21894	8.68	275690	25477	9.24	8.96	287252	25463	8.86	316711	24325	7.68	8.27
间羟基苯甲酸/水杨酸	149553	7050	4.71	153578	8532	5.56	5.13	130351	9432	7.24	186727	18494	9.90	8.57
L-山梨糖	278839	35112	12.59	354144	27556	7.78	10.19	336469	38195	11.35	370177	21507	5.81	8.58
D-泛酸	4083	1136	27.83	3886	400	10.29	19.06	4069	332	8.15	4881	445	9.12	8.64
L-苯丙氨酸	283128	77958	27.53	325659	32187	9.88	18.71	345905	36227	10.47	374417	27184	7.26	8.87
L-亮氨酸 L-异亮氨酸	3298	551	16.72	3396	320	9.43	13.08	3737	388	10.38	3449	256	7.43	8.90
马来酸	36110	9200	25.48	28250	1305	4.62	15.05	22717	2630	11.58	34292	2169	6.32	8.95
L-苏氨酸	7334	910	12.41	5119	683	13.35	12.88	6446	696	10.80	5816	416	7.15	8.97
2,3-二羟基异戊酸盐	1598	414	25.93	2043	182	8.92	17.42	2454	178	7.26	2722	331	12.15	9.70
L-色氨酸	78158	20582	26.33	48076	6398	13.31	19.82	73580	6687	9.09	64435	6718	10.43	9.76
N-乙酰-D-葡萄糖胺-6-磷酸盐	7286	2350	32.26	10190	891	8.74	20.50	9016	1081	11.99	10428	878	8.42	10.21
牛磺酸	10253	1227	11.97	7468	846	11.33	11.65	10069	1024	10.17	8506	898	10.56	10.37
甘油酸	15329	4373	28.53	13975	1814	12.98	20.75	15089	2027	13.43	16926	1514	8.95	11.19
肌酸酐	9498	1832	19.29	9553	899	9.41	14.35	10038	1014	10.10	11055	1405	12.71	11.40
2,3-吡啶二羧酸	14843	954	6.43	10869	1873	17.23	11.83	11972	1370	11.45	16479	1903	11.55	11.50

代谢物	手动样品前处理							自动化工作流程样品前处理						
	第1天 (峰面积)			第2天 (峰面积)			日间 %CV	第1天 (峰面积)			第2天 (峰面积)			日间 %CV
	平均值	标准偏差	%CV	平均值	标准偏差	%CV		平均值	标准偏差	%CV	平均值	标准偏差	%CV	
黄嘌呤核苷	1478	446	30.16	1058	214	20.22	25.19	1185	149	12.59	1508	158	10.47	11.53
L-甲硫氨酸	15409	1228	7.97	15583	2112	13.56	10.76	17351	2277	13.13	15068	1552	10.30	11.71
邻羟基马尿酸	6760	717	10.61	5168	537	10.40	10.51	6043	729	12.06	6842	812	11.87	11.97
L-阿拉伯糖	6209	784	12.62	7428	733	9.87	11.25	6481	799	12.33	7885	919	11.66	11.99
N-乙酰神经氨酸	3514	853	24.28	3967	632	15.93	20.11	4149	507	12.23	5166	612	11.85	12.04
D-木糖	4969	450	9.05	5154	734	14.25	11.65	5352	747	13.95	5513	614	11.13	12.54
苯丙酮酸	3544	298	8.39	5352	524	9.80	9.10	3508	473	13.49	6752	833	12.34	12.91
尿苷	45844	5392	11.76	40848	4211	10.31	11.03	47620	9537	20.03	45493	2866	6.30	13.16
L-瓜氨酸	2477	352	14.22	2159	335	15.50	14.86	2285	332	14.51	2383	306	12.85	13.68
奎宁酸	4925	2567	52.12	4480	799	17.84	34.98	4559	670	14.69	5374	701	13.05	13.87
L-酪氨酸	33702	4266	12.66	28831	4269	14.81	13.73	30842	6468	20.97	30901	2235	7.23	14.10
L-高丝氨酸	2381	411	17.28	1838	289	15.71	16.49	2189	295	13.48	1750	263	15.04	14.26
肌酸	1997	226	11.31	1711	270	15.78	13.55	1931	326	16.89	2008	243	12.13	14.51
蜜二糖	1146	200	17.47	1032	166	16.09	16.78	1399	175	12.53	1172	194	16.58	14.55
L-组氨酸	1374	308	22.41	1401	336	24.00	23.20	1298	205	15.76	1355	190	13.99	14.87
高柠檬酸盐	3600	343	9.51	3021	398	13.17	11.34	3220	498	15.47	3642	556	15.26	15.36
D-麦芽糖	1989	326	16.41	1334	190	14.25	15.33	2137	392	18.34	1610	202	12.55	15.45
L-丝氨酸	1401	202	14.43	1006	291	28.96	21.70	1249	241	19.28	1229	147	11.99	15.64
丙酮酸	4063	942	23.19	5897	670	11.35	17.27	5172	770	14.89	7716	1464	18.98	16.94
L-犬尿素	11609	3218	27.72	10583	1532	14.47	21.10	10858	1886	17.37	12949	2192	16.93	17.15
尿苷5-二磷酸葡萄糖	1603	91	5.65	1270	527	41.49	23.57	1469	281	19.14	1527	234	15.35	17.24
2-脱氧-D-葡萄糖-6-磷酸盐	285	195	68.33	430	74	17.29	42.81	577	91	15.83	601	116	19.26	17.55
次黄嘌呤	7204	898	12.47	6602	885	13.40	12.94	8481	2208	26.04	7072	708	10.01	18.02
DL-甘油醛-3-磷酸盐	1234	791	64.11	1326	162	12.23	38.17	1223	281	22.95	1284	168	13.12	18.04
2-甲基-1-丁醇	3509	767	21.86	5048	610	12.08	16.97	4389	695	15.84	6756	1521	22.51	19.17
D-葡萄糖-6-磷酸盐	1429	1059	74.08	1502	263	17.50	45.79	1551	343	22.09	1545	254	16.41	19.25
D-果糖-6-磷酸盐	1429	1059	74.08	1390	506	36.42	55.25	1551	343	22.09	1538	254	16.53	19.31
L-苹果酸	241628	75100	31.08	47815	5129	10.73	20.90	67521	13788	20.42	75067	13683	18.23	19.32
烟酸	568	189	33.20	461	325	70.46	51.83	772	148	19.22	941	183	19.45	19.34

## 结论

研究表明，基于 M:E 的蛋白质沉淀方法适合与 Captiva EMR-Lipid 配合用于去除蛋白质，并且能有效淬灭血浆中的酶。虽然 TCA 能有效沉淀蛋白质，但它在整个实验过程中会增大结果变异性，其原因可能是 TCA 会影响某些代谢物的电离或使其发生化学变化（数据未示出）。此外，TCA 介导的蛋白质沉淀法需要在 Captiva EMR-Lipid 板去除脂质的步骤之前额外增加离心步骤，才能确保样品通过 Captiva EMR-Lipid 板的一致性。

基于 M:E 的蛋白质沉淀法能够最大程度减小采样后代谢物浓度的变化。该策略与 Captiva EMR-Lipid 板相结合，为 LC/MS 分析之前的蛋白质去除、脂质去除和代谢物提取提供了一套有效的工作流程。最后，Bravo 的自动化样品处理工作流程既适用于新鲜血浆样品（现场工作流程），也适用于经过 M:E 沉淀的血浆样品（非现场工作流程）。Bravo 自动化平台提供了一套标准化方案，该方案在实验室之间、项目之间、分析人员之间以及随时间推移的重现性方面具有明显优势。这套自动化工作流程可大幅提高通量，对于大规模转化研究和纵向研究是一项明显优势。

## 参考文献

1. La Frano, M. R.; *et al.* Impact of post-collection freezing delay on the reliability of serum metabolomics in samples reflecting the California mid-term pregnancy biobank. *Metabolomics* **2018**, *14*, 151
2. Bruce, S. J.; *et al.* Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3285
3. 安捷伦代谢组学动态 MRM 数据库和方法。安捷伦科技公司技术简报，出版号 5991-6482，**2016**

[www.agilent.com/chem/bravometabolomics](http://www.agilent.com/chem/bravometabolomics)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019  
2019 年 2 月 21 日，中国出版  
5994-0685ZHCN