



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112255361 B

(45) 授权公告日 2023.01.06

(21) 申请号 202010988867.8

CN 106290617 A, 2017.01.04

(22) 申请日 2020.09.18

US 2015140593 A1, 2015.05.21

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2020182652 A1, 2020.09.17

申请公布号 CN 112255361 A

US 2003110000 A1, 2003.06.12

US 5958246 A, 1999.09.28

(43) 申请公布日 2021.01.22

李晶等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术分析人类唾液代谢组的性别依赖性.《上海交通大学学报(医学版)》.2017,第37卷(第8期),

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

Yu, Di et al..Strategy for Comprehensive Identification of Acylcarnitines Based on Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry.《ANALYTICAL CHEMISTRY》.2018,第90卷(第9期),

(72) 发明人 唐惠儒 芦勤玮

LEHOTAY, DC.CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES IN INBORN-ERRORS OF METABOLISM.《BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY》.1991,第5卷(第3期),

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

专利代理师 陆飞 陆尤

审查员 谢树语

(51) Int. Cl.

G01N 30/86 (2006.01)

G16C 20/64 (2019.01)

G16C 20/90 (2019.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图1页

(56) 对比文件

CN 106442787 A, 2017.02.22

CN 109870535 A, 2019.06.11

EP 1910959 A1, 2008.04.16

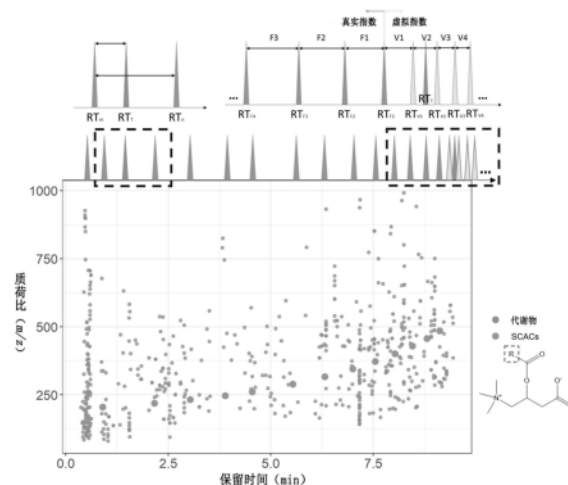
(54) 发明名称

领域。

基于SCAC-RI的液相色谱保留时间数据库校正方法

(57) 摘要

本发明属于生物分析技术领域,具体为一种基于SCAC-RI的液相色谱化合物保留时间数据库校准方法。本发明步骤包括:初始化合物保留时间数据库建立;化合物保留指数计算;以SCAC作为指标建立新方法下的校正保留时间数据库。本发明极大程度地改善了因色谱条件变化所引起的保留时间偏差而导致的数据库不可用的情况,使保留时间数据库在不同方法间进行迁移成为可能,并且还可以消除实验中其他液相系统不稳定因素对保留时间的不利影响,大大提高了化合物鉴定时与数据库的匹配度。该方法适用于非靶向代谢组学等需要建立通用、灵活的保留时间数据库对复杂多成分的样品进行定性的化学分析



CN 112255361 B

1. 一种基于SCAC-RI的液相色谱保留时间数据库校正方法,其特征在于,首先利用化合物标准品在液相色谱-四极杆飞行时间质谱上在某一相同色谱条件下建立初始保留时间数据库,随后以直链酰基肉碱SCACs为基准指标产生保留指数,最后借助保留指数产生更新色谱条件下的保留时间数据库,直接用于新色谱条件的化合物鉴定;所述直链酰基肉碱SCACs为一类含有不同链长C0~C30脂肪酸结构通过酯键连接到肉碱的一系列同系物,包括生物样品中的内源性直链酰基肉碱、外部添加的直链酰基肉碱标准品或直链酰基肉碱稳定同位素标准品;具体步骤为:

#### 步骤1、建立初始化合物保留时间数据库

具体流程如下:首先利用化合物纯物质配置合适浓度的单一标准品样品或混合标准品样本,需保证标准品样本浓度在质谱中响应良好,且同一混合标准品样本中不存在同分异构体干扰化合物指认;随后建立一个梯度洗脱色谱方法,色谱梯度覆盖各有机相比例;在该色谱条件下对各标准品样品进行分析,并记录下SCACs及其他各化合物的保留时间,建立初始数据库;

#### 步骤2、根据直链酰基肉碱计算化合物保留指数

将化合物保留时间数据库中SCACs系列同系物作为校正指标,人为规定脂酰肉碱碳链碳原子个数 $\times 100$ 作为保留指数,则其余各代谢物的保留指数按式(1)计算得到:

$$RI_T = RI_m + (RI_n - RI_m) \times (RT_T - RT_m) / (RT_n - RT_m) \quad (1)$$

其中, $RT_m$ 、 $RT_T$ 、 $RT_n$ 分别代表某个待测目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCACm和n的保留时间, $RT_m < RT_T < RT_n$ ;  $RI_m$ 、 $RI_T$ 、 $RI_n$ 分别代表对应待测目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCACm和n的保留指数;

#### 步骤3、以SCAC作为指标,建立校正保留时间数据库

当液相方法在仪器间移植或进行方法微调时,首先直接测定生物样本或SCAC混合标准品,根据各SCAC的精确相对分子质量及其特征二级离子碎片 $[C_4H_5O_2]^+$ 来准确识别SCACs,进而确定SCACs的保留时间;随后根据式(2)计算初始数据库中所有化合物的校正保留时间:

$$RT_T = RT_m + (RT_n - RT_m) \times (RI_T - RI_m) / (RI_n - RI_m) \quad (2)$$

其中, $RT_m$ 、 $RT_T$ 、 $RT_n$ 分别代表初始数据库中某个目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCACm和n的保留时间, $RT_m < RT_T < RT_n$ ,  $RI_m$ 、 $RI_T$ 、 $RI_n$ 分别代表对应目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCACm和n的保留指数;

步骤(2)中保留指数RI覆盖范围的上限由最长碳链SCAC决定,通过购买超长链SCAC标准品或通过合成手段获得更长碳链长度SCAC的保留时间信息,以建立更宽的RI覆盖范围的初始数据库;对于最长碳链SCAC也无法覆盖到的色谱保留时间范围,采用式(3)所示的方法延拓,该方法利用保留时间最靠后的k个SCACs的保留时间增量与保留指数进行线性拟合,其中 $RT_m$ 、 $RT_n$ 分别代表相邻前后两个SCACm和n的保留时间, $RT_m < RT_n$ ,  $RI_n$ 代表SCACn的保留指数,a与b分别代表方程的斜率和截距;最终末端虚拟指数的保留时间利用式(4)所示方法进行不断延长,直至SCAC保留时间增量 $\leq 0$ 时,RI延长终止;

$$RT_n - RT_m = a \times RI_n + b \quad (3)$$

$$RT_V = a \times RI_V + b + RT_{V-1} \quad (4)$$

虚拟指数预测结果极大程度上取决于k值选取的多少,在多次尝试后选择使用保留时间增量与保留指数线性拟合结果的校正 $R^2$ 值最高时所对应的k值作为最优拟合点数个数。

## 基于SCAC-RI的液相色谱保留时间数据库校正方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术领域,具体涉及一种基于直链酰基肉碱保留指数(SCAC-RI)的液相色谱化合物保留时间数据库的校准方法。该方法适用于非靶向代谢组学等需要建立通用、灵活的保留时间数据库对复杂多成分的样品进行定性的化学分析领域。

### 背景技术

[0002] 代谢组学根据研究策略不同可分为靶标代谢组学和非靶标代谢组学技术,其中基于高分辨质谱的非靶标代谢物检测技术可以在没有任何先验知识的情况下采集到生物样本高覆盖率的相对定量信息,因此在发现型的代谢组学研究过程中应用十分广泛。然而其高覆盖率也带来了众多化合物无法准确注释的问题。

[0003] 传统的代谢物注释过程主要依赖于网络或自建数据库中记录的代谢物质谱特征与色谱保留特征。其中质谱特征主要指代谢物离子的精确质荷比、理论同位素分布、二级质谱碎片及碎片丰度比信息,而色谱保留特征主要指代谢物在特定色谱柱与特定色谱方法条件下的保留时间信息。然而,液相色谱仪器构造与方法的高可变性造成了色谱保留时间(retention time,RT)在多次实验间不可避免地会有微小的漂移现象,通常在实验室间甚至在同实验室内部多台仪器间都很难进行移植,主要体现在人为有意的改变(如色谱柱种类、梯度、流速、柱温等)与无意的改变(色谱柱老化程度、流动相PH的微小变化、管路长度、梯度延迟、梯度分散等),因此代谢物保留时间只能通过标准品在实验室固定的仪器及分析方法下进行确定,否则很容易出现假阳性注释。

[0004] 保留指数(retention index,RI)目前广泛应用于气相色谱质谱分析中,使用正构烷烃建立的保留指数数据库已日渐完善。正构烷烃RI的计算表达式为(1),其中Z表示正构烷烃的碳数,X为某个待测目标化合物, $T_{RX}, T_{RZ}, T_{R(Z+1)}$ 分别代表了待测目标化合物X及其流出顺序前后碳数为Z和Z+1的正构烷烃的保留温度( $T_{R(Z+1)} > T_{RX} > T_{RZ}$ )。正构烷烃作为参考化合物,无论在任何温度或是任何固定相的条件下,保留指数固定为100Z。由于保留温度通常与保留时间具有很强的相关性,且保留时间的测定相对于保留温度更容易,因此应用时大多会使用保留时间代替上式中的保留温度来计算保留指数:

$$[0005] \quad I_X = 100Z + 100 \left( \frac{T_{RX} - T_{RZ}}{T_{R(Z+1)} - T_{RZ}} \right) \quad (1)$$

[0006] RI的概念目前已逐渐引入至液相色谱质谱分析中,但目前缺乏一套统一的同系物作为指标,导致重复性较差。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于针对液相色谱保留时间的高可变性问题所导致的数据库信息无法通用的不足,提供一种基于直链酰基肉碱保留指数法(Straightchain acylcarnitine-retention index,SCAC-RI)的液相色谱保留时间数据库校正方法,以提高非靶标代谢组学等化学分析领域中需要根据数据库进行化合物鉴定的保留时间准确度。该

方法解决了当需要进行方法移植或方法微调时原数据库保留时间偏移的问题,避免了需要重新建库的麻烦。

[0008] 直链酰基肉碱(SCACs)是一类含有不同链长(C0~C30)脂肪酸结构通过酯键连接到肉碱的一系列同系物。当采用反相色谱进行分析时,由于固定相多采用键合疏水性的直链烷基基团(如C18)的填料,SCACs会通过简单的疏水作用及范德华力而被C18碳链吸引并保留,并且可以随脂酰碳链长度的增长保留时间逐渐增加。SCACs作为保留时间校正指标具有以下优点:

[0009] (1) SCACs是许多生物样品(如血液、组织等)中自身广泛存在的内源性代谢物,在分析这类生物样本时,无需增加额外成本;

[0010] (2) 性质稳定,不易降解,在LC-MS系统中可以进行稳定分析;

[0011] (3) 在色谱的每个保留时间段都有均匀的分布;

[0012] (4) 不会由于方法的差异,发生校正指标间出峰顺序互换现象。

[0013] 所述直链酰基肉碱(SCACs)包括生物样品中的内源性直链酰基肉碱、外部添加的直链酰基肉碱标准品或直链酰基肉碱稳定同位素标准品。

[0014] 本发明提供的基于SCAC-RI的液相色谱保留时间数据库校正方法,首先利用化合物标准品在超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)上在某一相同色谱条件下建立初始保留时间数据库,随后以SCACs为基准指标产生保留指数,最后借助保留指数产生更新色谱条件下的保留时间数据库,直接用于新色谱条件的化合物鉴定。所述直链酰基肉碱(SCACs)包括生物样品中的内源性直链酰基肉碱、外部添加的直链酰基肉碱标准品或直链酰基肉碱稳定同位素标准品;具体步骤为:

[0015] 步骤1、建立初始化合物保留时间数据库

[0016] 所述初始化合物保留时间数据库建立流程如下:首先利用化合物纯物质配置合适浓度的单一标准品样品或混合标准品样本,需保证标准品样本浓度在质谱中响应良好,且同一混合标准品样本中不存在同分异构体干扰化合物指认。随后建立一个常规的梯度洗脱色谱方法,色谱梯度覆盖各有机相比比例。在该色谱条件下对各标准品样品进行分析,并记录下SCACs及其他各化合物的保留时间,建立初始数据库。

[0017] 步骤2、根据直链酰基肉碱计算化合物保留指数

[0018] 本发明中所定义的基于SCACs的液相色谱化合物RI是人为引入的理论值,对于每个化合物的RI值不随色谱方法变化而发生改变。参照气相色谱分析中正构烷烃的线性程序升温保留指数计算方式进行改造,本发明将化合物保留时间数据库中SCACs系列同系物作为校正指标,如表1所示,人为规定脂酰肉碱碳链碳原子个数 $\times 100$ 作为保留指数(如乙酰肉碱C2的保留指数为200,丙酰肉碱C3的保留指数为300),则其余各代谢物的保留指数按式(2)计算得到:

$$[0019] \quad RI_r = RI_m + (RI_n - RI_m) \times \frac{RT_r - RT_m}{RT_n - RT_m} \quad (2)$$

[0020] 其中, $RT_m$ 、 $RT_r$ 、 $RT_n$ 分别代表某个待测目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCAC<sub>m</sub>和<sub>n</sub>的保留时间( $RT_m < RT_r < RT_n$ ), $RI_m$ 、 $RI_r$ 、 $RI_n$ 分别代表对应待测目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCAC<sub>m</sub>和<sub>n</sub>的保留指数。

[0021] 理想情况下,SCACs需要覆盖整个色谱方法的保留时间范围,才能满足数据库中所

有化合物的保留指数计算需求,否则这部分超出SCAC-RI覆盖范围之外的代谢物就无法计算保留指数。由于SCAC C0本身在反相色谱中完全不保留,因此对于保留时间小于C0的代谢物来说也属于不保留化合物,这些代谢物将不进行保留指数的计算。RI覆盖范围的上限由最长碳链SCAC决定的,因此要想建立更宽的RI覆盖范围的初始数据库就需要购买超长链SCAC标准品或通过合成手段获得更长碳链长度SCAC的保留时间信息。另外,对于最长碳链SCAC也无法覆盖到的色谱保留时间范围,本发明还提出了一种预测性的虚拟指数对特定方法下可用的RI范围进行扩大,如式(3)所示,该算法利用保留时间最靠后的几个SCACs(记为k个)的保留时间增量与保留指数进行线性拟合,其中 $RT_m$ 、 $RT_n$ 分别代表相邻前后两个SCAC $m$ 和 $n$ 的保留时间( $RT_m < RT_n$ ), $RI_n$ 代表SCAC $n$ 的保留指数, $a$ 与 $b$ 分别代表方程的斜率和截距。最终末端虚拟指数的保留时间可以利用式(4)所示方法进行不断延长,直至SCAC保留时间增量 $\leq 0$ 时,RI延长终止。

$$[0022] \quad RT_n - RT_m = a \times RI_n + b \quad (3)$$

$$[0023] \quad RT_V = a \times RI_V + b + RT_{V-1} \quad (4)$$

[0024] 虚拟指数预测结果极大程度上取决于k值选取的多少,因此建议在多次尝试后选择使用保留时间增量与保留指数线性拟合结果的校正 $R^2$ 值最高时所对应的k值作为最优拟合点数个数。

[0025] 表1 SCAC及对应保留指数

No		Name	HMDB	Abbr.	RI	Formula	MW	[M+H] <sup>+</sup>
1	肉碱	Carnitine	HMDB0000062	C0	0	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	161.1052	162.1125
2	乙酰肉碱	Acetylcarnitine	HMDB0000201	C2	200	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	203.1158	204.123
3	丙酰肉碱	Propionylcarnitine	HMDB0000824	C3	300	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	217.1314	218.1387
4	丁酰肉碱	Butyrylcarnitine	HMDB0002013	C4	400	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	231.1471	232.1543
5	戊酰肉碱	Valeryl carnitine	HMDB0013128	C5	500	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	245.1627	246.17
6	己酰肉碱	Hexanoylcarnitine	HMDB0000705	C6	600	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	259.1784	260.1856
7	庚酰肉碱	Heptanoylcarnitine	HMDB0013238	C7	700	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	273.194	274.2013
8	辛酰肉碱	Octanoylcarnitine	HMDB0000791	C8	800	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	287.2097	288.2169
9	壬酰肉碱	Nonanoylcarnitine	HMDB0013288	C9	900	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	301.2253	302.2326
10	癸酰肉碱	Decanoylcarnitine	HMDB0000651	C10	1000	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>4</sub>	315.241	316.2482
11	十一酰肉碱	Undecanoylcarnitine	HMDB0013321	C11	1100	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub>	329.2566	330.2639
12	十二酰肉碱	Dodecanoylcarnitine	HMDB0002250	C12	1200	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>4</sub>	343.2723	344.2795
13	十三酰肉碱	Tridecanoylcarnitine	—	C13	1300	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>4</sub>	357.2879	358.2952
14	十四酰肉碱	Tetradecanoylcarnitine	HMDB0005066	C14	1400	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>	371.3036	372.3108
15	十五酰肉碱	Pentadecanoylcarnitine	HMDB0062517	C15	1500	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>4</sub>	385.3192	386.3265
16	十六酰肉碱	Palmitoylcarnitine	HMDB0000222	C16	1600	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>4</sub>	399.3349	400.3421
17	十七酰肉碱	Heptadecanoylcarnitine	HMDB0006210	C17	1700	C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>4</sub>	413.3505	414.3578
18	十八酰肉碱	Stearoylcarnitine	HMDB0000848	C18	1800	C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	427.3662	428.3734
19	十九酰肉碱	Nonadecanoylcarnitine	—	C19	1900	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>4</sub>	441.3818	442.3891
20	二十酰肉碱	Arachidylcarnitine	HMDB0006460	C20	2000	C <sub>27</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>4</sub>	455.3975	456.4047
21	二十一酰肉碱	Heneicosanoylcarnitine	—	C21	2100	C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>4</sub>	469.4131	470.4204
22	二十二酰肉碱	Docosanoylcarnitine	HMDB0062468	C22	2200	C <sub>29</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>4</sub>	483.4288	484.436
23	二十三酰肉碱	Tricosanoylcarnitine	—	C23	2300	C <sub>30</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>4</sub>	497.4444	498.4517
24	二十四酰肉碱	Lignocerylcarnitine	HMDB0240665	C24	2400	C <sub>31</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>4</sub>	511.4601	512.4673
25	二十五酰肉碱	—	—	C25	2500	C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> NO <sub>4</sub>	525.4757	526.483
26	二十六酰肉碱	Hexacosanoylcarnitine	HMDB0006347	C26	2600	C <sub>33</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>4</sub>	539.4914	540.4986
27	二十八酰肉碱	—	—	C28	2800	C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>4</sub>	553.507	554.5143
28	三十酰肉碱	—	—	C30	3000	C <sub>35</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>4</sub>	567.5227	568.5299

[0028] 步骤3、以SCAC作为指标,建立新方法下的校正保留时间数据库

[0029] 当液相方法在仪器间移植或进行方法微调时,首先在新方法下直接测定生物样本或SCAC混合标准品,根据各SCAC的精确相对分子质量及其特征二级离子碎片[C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>(85.0295)来准确识别SCACs,进而确定新方法下SCACs的保留时间。随后根据式(5)计算初始数据库中所有化合物的校正保留时间:

$$[0030] \quad RT_T = RT_m + (RT_n - RT_m) \times \frac{RI_T - RI_m}{RI_n - RI_m} \quad (5)$$

[0031] 其中,RT<sub>m</sub>、RT<sub>T</sub>、RT<sub>n</sub>分别代表初始数据库中某个目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCAC<sub>m</sub>和<sub>n</sub>的保留时间(RT<sub>m</sub><RT<sub>T</sub><RT<sub>n</sub>),RI<sub>m</sub>、RI<sub>T</sub>、RI<sub>n</sub>分别代表对应目标代谢物T及其流出顺序相邻前后两个SCAC<sub>m</sub>和<sub>n</sub>的保留指数。

[0032] 本发明方法极大程度地改善了因色谱条件变化所引起的保留时间偏差而导致的数据库不可用的情况,使保留时间数据库在不同方法间进行迁移成为可能,并且还可以消除实验中其他液相系统不稳定因素对保留时间的不利影响,大大提高了化合物鉴定时与数据库的匹配度。该方法适用于非靶向代谢组学等需要建立通用、灵活的保留时间数据库对复杂多成分样品进行定性的化学分析领域。

## 附图说明

[0033] 图1基于SCAC-RI的液相色谱化合物保留时间数据库校准算法及虚拟指数延长方法。

[0034] 图2利用保留时间增量与保留指数进行线性拟合预测虚拟指数示例。

## 具体实施方式

[0035] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0036] 实验仪器和材料

[0037] 1. 仪器

[0038] 使用Waters ACQUITYH-Class色谱系统(Waters, Milford, USA),包括WatersACQUITYBSM二元溶剂管理系统和WatersACQUITYSampleManagerFTN样品管理系统。使用Xevo G2-XS QTOF质谱系统(Waters, Milford, USA)。

[0039] 2. 试剂和药品

[0040] 质谱纯甲酸、甲醇和乙腈全部购买于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。样品处理与色谱流动相时所用的超纯水均取自于Milli-Q(德国Merck Millipore有限公司)超纯水系统(电阻率>18.2MΩ/cm)。分析纯标准品购买于Sigma-Aldrich试剂有限公司(中国)、百灵威科技有限公司(中国)或阿拉丁化学试剂有限公司(上海)。

[0041] 实施例1:基于代谢物混合标准品的保留时间数据库矫正

[0042] 1. 代谢物混合标准品配置

[0043] 本实施例挑选出75个在ESI正模式下可检测出的代谢物作为研究对象(含SCACs),所选代谢物极性范围较大,可较完整地覆盖反相色谱各个保留时间。使用50%甲醇水溶液配制各代谢物浓度在μM量级的混合标准品,-20℃冰箱保存备用。

[0044] 2. 色谱条件和质谱条件

[0045] 2.1 色谱条件

[0046] 本实施例中初始色谱条件为M0方法(表2),根据不同梯度、流速、柱温与色谱柱还组合出另外10种不同的色谱方法(M1~M10),用于验证本发明的保留时间校正效果。

[0047] 表2,不同色谱方法条件信息

[0048] (A) 梯度; (B) 流速; (C) 柱温; (D) 色谱柱及 (E) 依据以上不同色谱条件的11种方法组合

[0049] (A)

色谱梯度 (A,超纯水含 0.1% 甲酸; B, 乙腈含 0.1% 甲酸)									
G1		G2		G3		G4		G5	
时间 /min	B%	时间/min	B%	时间/min	B%	时间/min	B%	时间/min	B%
0	1	0	1	0	1	0	1	0	5
1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	5
3	15	5	15	3	15	2	15	3	5
6	50	7	50	5	50	7	50	6	5
9	95	9	95	9	95	9	95	9	5
12	95	12	95	12	95	12	95	12	5
12.1	1	12.1	1	12.1	1	12.1	1	12.1	5
15	1	15	1	15	1	15	1	15	5

[0052] (B)

流速 (mL/min)	
F1	0.4
F2	0.45
F3	0.5

[0054] (C)

色谱柱温(°C)	
T1	30
T2	35
T3	40
T4	45

[0056] (D)

色谱柱类型	
C1	Waters ACQUITY HSS T3 column(100 mm 2.1 mm i.d., 1.8 μm)
C2	Waters ACQUITY BEH C18 column(100 mm*2.1 mm i.d., 1.7 μm)
C3	Agilent Eclipse plus C18 column(100 mm*2.1 mm i.d, 1.8 μm)

[0058] (E)

色谱方法	
------	--

编号	色谱梯度	流速	色谱柱温	色谱柱类型
M0	G1	F3	T3	C1
M1	G2	F3	T3	C1
M2	G3	F3	T3	C1
M3	G4	F3	T3	C1
M4	G1	F1	T3	C1
M5	G1	F2	T3	C1
M6	G1	F3	T1	C1
M7	G1	F3	T2	C1
M8	G1	F3	T4	C1
M9	G5	F3	T4	C2
M10	G5	F3	T4	C3

[0061] 2.2质谱条件

[0062] 质谱采集模式为MS<sup>E</sup>Centroid Sensitivity,低能量为4eV,高能量为10-50eV。动态范围为Normal,质量范围为50-1000Da,扫描时间为0.1secs。使用Lockspray进行实时采集并校正,内参校准液使用亮氨酸-脑啡肽([M+H]<sup>+</sup>,m/z 556.2771),浓度200pg/μL,流速10 μL/min。源参数及事件参数见表3、表4。

[0063] 表3,质谱源参数信息

参数	值
----	---



喷针位置	7
毛细管电压 (KV)	2
样品锥孔电压	30
离子源补偿	80
源温度 (°C)	120
脱溶剂温度 (°C)	500
锥孔反吹气流量 (L/hr)	50
脱溶剂气流量 (L/hr)	800
自动增益控制AGC	On
Quad Profile	Auto
Lockspray实时校正液流速 (μL/min)	10

[0065] 表4, 质谱事件参数信息

时间/mins	事件	动作	系统
0	Flow State	LC	Sample
0	Reservoir	B	LockSpray
0	Refill	Auto-Refill	LockSpray
0	Infusion	Start	LockSpray
10.00	Flow State	Waste	Sample

[0067] 3. 数据预处理

[0068] 首先, 将基于M0方法的标准品样品原始数据导入Progenesis QI软件中进行峰提取, 通过将色谱峰离子的精确分子质量和二级碎片数据与HMDB、Metlin等数据库进行比对, 确定了每个代谢物的峰形、响应情况、离子化形式及保留时间区间。随后在Skyline (version 19.1) 中设置每个代谢物的提取离子流色谱 (EIC) 参数对所有方法 (M0-M10) 下的样品数据进行峰提取。最后将EIC峰提取结果逐一手动检查, 以保证不同色谱方法中对同一个代谢物识别的正确性。

[0069] 4. 数据库匹配准确度比较

[0070] 将M0方法下实测数据作为初始保留时间数据库, 利用SCACs计算数据库中所有代谢物的保留指数。随后再依据M1-M10各方法中实测SCACs保留时间作为基准, 根据代谢物保留指数建立校正保留时间数据库。为了验证初始和校正数据库分别与M1-M10各方法实测保留时间数据的匹配准确度, 本实施例将不同方法下的实测保留时间数据 (y) 与数据库数据保留时间 (x) 分别建立线性回归曲线。另外, 定义了参数 $D_i$ 作为保留时间偏差值来考察每一个代谢物在数据库校正前后的保留时间偏差差异。以下整理了各方法下的线性回归方程参数 (截距、斜率和 $R^2$ ) 及 $D_i$ 统计量数据 (见表5、表6)。与原始数据库相比, 发现校正后数据库的方程斜率和 $R^2$ 都更接近于1, 截距值及 $D_i$ 值都更接近于0, 证明了校正后的数据库与实测值匹配度有了显著性的提高。

$$[0071] \quad D_i = RT_{\text{experimental}} - RT_{\text{database (ori/new)}} \quad (5)$$

[0072] 表5, 代谢物实测保留时间与数据库保留时间的线性回归方程及参数

	方法	实测保留时间~校正数据库	实测保留时间~初始数据库
[0073]	M1	$y=0.9994x-0.0042 R^2=0.9998$	$y=1.2011x-0.0974 R^2=0.9803$
	M2	$y=0.9997x+0.0065 R^2=1$	$y=0.902x+0.1469 R^2=0.9956$
	M3	$y=0.9966x+0.0195 R^2=0.9994$	$y=1.0256x-0.2605 R^2=0.9688$
	M4	$y=0.9885x+0.0697 R^2=0.9996$	$y=1.0159x+0.2296 R^2=0.9981$
	M5	$y=0.9943x+0.0332 R^2=0.9999$	$y=1.0067x+0.1061 R^2=0.9996$
	M6	$y=0.9968x+0.0243 R^2=0.9995$	$y=1.0012x+0.0916 R^2=0.9987$
	M7	$y=0.996x+0.0375 R^2=0.9997$	$y=1.0001x+0.0433 R^2=0.9997$
[0074]	M8	$y=1.0007x-0.0047 R^2=0.9999$	$y=0.9963x-0.0452 R^2=0.9996$
	M9	$y=0.9964x-0.0716 R^2=0.9962$	$y=1.0203x-0.6199 R^2=0.9427$
	M10	$y=1.0075x-0.0599 R^2=0.9981$	$y=0.9793x-0.5906 R^2=0.9506$

[0075] 表6, 初始数据库与校正数据库代谢物Di统计量信息汇总

方法	校正数据库(min)			初始数据库(min)		
	均值±标准偏差	中位值	范围	均值±标准偏差	中位值	范围
M1	-0.01±0.03	0	-0.16 to 0.07	0.45±0.58	0.06	-0.01 to 1.74
M2	0.01±0.01	0	-0.02 to 0.05	-0.12±0.25	0	-0.88 to 0.01
M3	0.01±0.06	0	-0.13 to 0.17	-0.19±0.41	-0.01	-0.85 to 0.77
M4	0.04±0.05	0.02	-0.07 to 0.14	0.27±0.1	0.3	0.1 to 0.47
M5	0.02±0.02	0.01	-0.03 to 0.06	0.12±0.05	0.14	0.04 to 0.22
M6	0.02±0.05	0	-0.09 to 0.16	0.09±0.08	0.09	0 to 0.3
M7	0.03±0.04	0.01	-0.03 to 0.15	0.04±0.04	0.04	-0.02 to 0.16
M8	0±0.03	0	-0.08 to 0.08	-0.06±0.05	-0.05	-0.2 to 0
M9	-0.08±0.14	-0.02	-0.5 to 0.14	-0.56±0.56	-0.51	-1.61 to 0.16
M10	-0.04±0.1	-0.01	-0.41 to 0.11	-0.65±0.5	-0.44	-1.64 to -0.01

[0077] 液相梯度方法M1-M3与M0相比只在液相梯度方面发生了变化,当改变了色谱梯度后,给代谢物的保留时间带来较大变化,保留时间前移或后移有很大不确定性,最大保留时间漂移为1.74min。分别将方法M1-M3与M0代谢物保留时间建立回归。以M1为例,回归函数为 $y=1.2011x-0.0974 (R^2=0.9803)$ ,Di为 $0.45 \pm 0.58\text{min}$ 。由R<sup>2</sup>可知方法间为线性相关关系较差,且拟合方程截距绝对值较大,说明两方法保留时间有较大差距。而对M0保留时间针对M1方法进行保留指数校正后,拟合方程变为 $y=0.9994x-0.0042 (R^2=0.9998)$ ,Di变为 $-0.01 \pm 0.03\text{min}$ 。在M2和M3方法的应用中同样呈现出类似的结论,表明采用SCACs-RI校正后的数据库在改变不同梯度条件下依然能保持较高的重现性。

[0078] 液相流速方法M4、M5在M0的基础上将色谱流动相的流速降低为0.4mL/min和0.45mL/min,从保留时间变化分析中得知,当流速降低时,代谢物的保留时间发生了整体性的后移,最大保留时间漂移为0.47min。因此当M4、M5与M0建立保留时间回归时发现拟合方程的线性相关性较好,但存在截距绝对值较大的问题。以M4为例,原拟合方程为 $y=1.0159x+0.2296 (R^2=0.9981)$ ,Di为 $0.27 \pm 0.1\text{min}$ ,当对方法进行保留指数校正后,拟合方程为 $y=0.9885x+0.0697 (R^2=0.9996)$ ,Di变为 $0.04 \pm 0.05\text{min}$ ,方程的截距绝对值明显变小,M5方法的应用中同样呈现出类似的结论,表明保留指数校正后的数据库在改变流速后依然能保持较高的重现性。

[0079] 柱温为考察保留指数校正对柱温变化的重现性,在M0方法基础上将柱温从40℃修改为30℃(M6)、35℃(M7)和45℃(M8),从实验结果可知当柱温变化时并不会对保留时间产

生很明显的影 响,最大保留时间漂移为0.3min。建立M0与M6的保留时间线性回归,拟合方程为 $y=1.0012x+0.0916$  ( $R^2=0.9987$ ), $D_i$ 为 $0.02\pm 0.05$ min。方程线性相关性较好,截距绝对值也较小。通过保留指数校正后对某些保留时间偏移较大的代谢物做了微调,拟合方程为 $y=0.9968x+0.0243$  ( $R^2=0.9995$ ), $D_i$ 为 $0.09\pm 0.08$ min,与未校正前相比有了适当的改善。M7和M8方法的应用中同样呈现出类似的结论。

[0080] 色谱柱类型方法M9与M10将色谱柱从T3柱改 用为两种不同品牌的传统C18柱,T3柱由于采用了独特的键合与封端技术,可以兼容100%水相流动相,对于极性代谢物具有很好的保留效果,而C18柱虽然具有更强的PH和温度耐 受,但在极高水相条件下会发生柱流失现象,因此M9与M10采用的色谱方法起始流动相比 例调整为95%水相,为了使分析条件更稳定,将柱温适当升高为45℃。实验结果显示大部分亲水性的代谢物在更换为C18后色谱保留明显变差,接近死时间出峰的物质受溶剂效应等影响出现峰分叉甚至双峰的情况。建立M0与M9的保留时间线性回归,拟合方程为 $y=1.0203x-0.6199$  ( $R^2=0.9427$ ), $D_i$ 为 $-0.56\pm 0.56$ min。而通过保留指数校正后具有较大改善,拟合方程变为 $y=0.9964x-0.0716$  ( $R^2=0.9962$ ), $D_i$ 变为 $-0.08\pm 0.14$ min。

[0081] 实施例2:基于生物样本的保留时间数据库矫正

[0082] 1. 血清及组织样本前处理

[0083] 将人类血清混合QC样品从-80℃冰箱转移至4℃冰箱解冻30min,随后将样品置于冰上,操作过程手不触碰EP管样品区域。用移液枪精确吸取50μL血清样品置于1.5mL EP管,加入225μL预冷甲醇溶液(-20℃冰箱冷藏过夜)涡旋30sec,在4℃冰箱中孵育30min使蛋白充分沉淀,随后放至低温离心机(4℃),14000g离心10min。取225μL上清液加入750μL预冷MTBE溶液(-20℃冰箱冷藏过夜),涡旋30sec,补加188μL纯水,涡旋30sec。放置低温离心机(4℃),14000g离心5min。最后取250μL下层样品经0.22μmPTFE滤膜过滤后装进配有内衬管的色谱样品瓶中,以备非靶向代谢组学测定。

[0084] 称量约50mg家兔肝脏样本置于圆底2mL EP管中,并放入5mm不锈钢研磨珠。首先加入600μL预冷80%甲醇水溶液(-20℃冰箱冷藏过夜)。使用组织匀浆机将样本充分研磨均匀(20Hz,匀浆2次,每次90s,每次中间间隔90s冷却时间),随后进行冰浴超声(45KHz,1min超声,1min冷却,总共10个循环)。最后放置低温离心机(4℃),14000g离心10min后将上清液取出备用。将上述提取过程再重复一次,将两次所获得的上清提取液混合并在氮气下吹干,最后使用200μL MeOH:H<sub>2</sub>O溶液(1:1,v/v)复溶,经0.22μmPTFE滤膜过滤后装进配有内衬管的色谱样品瓶中,以备非靶向代谢组学测定。

[0085] 2. 色谱条件和质谱条件

[0086] 本实施例中所选初始色谱条件依然为实施例1中所述的M0方法,并且还选择了在实施例1中保留时间偏差发生较大变化的M3方法作为本实施例中变动的 新色谱条件。质谱条件与实施例1中参数保持一致。

[0087] 3. 数据预处理

[0088] 首先将基于M0方法的生物样品原始数据导入Progenesis Q1(Nonlinear Dynamics,Newcastle upon Tyne,United Kingdom)中进行峰提取,对提取到的所有feature的精确分子质量和二级碎片数据与HMDB、Metlin等数据库进行比对,只保留有数据库定性匹配结果的feature。另外,为了降低同分异构体在不同方法间会造成匹配假阳性的

结果,因此将EIC下存在多峰干扰的feature也排除在外。最终确定了每类生物样本中拟考察feature的峰形、响应情况、m/z及保留时间区间。随后在Skyline (version 19.1) 中设置每个feature的EIC参数对2种方法下的样品数据进行峰提取。最后将EIC峰提取结果逐一手动检查,以保证不同色谱方法中对同一个feature识别的正确性。

### [0089] 3. 数据库匹配准确度比较

[0090] 从使用M0方法检测的家兔肝脏样本中最终共选择出590个feature作为研究对象,记录了全部feature的保留时间,作为原始保留时间数据库。这些离子同时还被使用于M3方法下所检测家兔肝脏样本的峰提取,最后对两方法下同一个离子的色谱峰手动进行匹配。实验结果表明M3与M0方法相比,590个离子峰均出现了较明显的前移或后移现象。家兔肝脏样本可以测到的SCACs数目及种类见表8。借助虚拟指数,可以将M0的保留时间校正范围从9.12min扩展到10.17min,可以覆盖到590个离子的保留时间范围。通过本发明所述SCAC-RI液相色谱保留时间数据库校正方法获得了一个适合于M3方法的校正数据库。当使用原始数据库进行匹配时,M3方法Di绝对值中位数为0.52min,最大值为0.93min;而M3校正数据库Di绝对值中位数为0.04min,最大值为0.4min,有95.42%feature的Di绝对值在0.2min以内。

[0091] 从使用M0方法检测的人类血清样本中最终共选择出305个feature作为研究对象,记录了全部feature的保留时间,作为原始保留时间数据库。这些离子同时还被使用于M3方法下所检测人类血清样本的峰提取,最后对两方法下同一个离子的色谱峰手动进行匹配。实验结果表明M3与M0方法相比,305个离子峰均出现了较明显的前移或后移现象。人类血清样本可以测到的SCACs数目及种类见表7。借助虚拟指数,可以将M0的保留时间校正范围从8.77min扩展到9.29min,可以覆盖到305个离子的保留时间范围。通过本发明所述SCAC-RI液相色谱保留时间数据库校正方法获得了一个适合于M3方法的校正数据库。当使用原始数据库进行匹配时,M3方法Di绝对值中位数为0.55min,最大值为0.94min;而M3校正数据库Di绝对值中位数为0.06min,最大值为0.41min,有96.39%feature的Di绝对值在0.2min以内。

[0092] 表7,家兔肝脏及人类血清样本中测到的SCACs数目及种类

编	名称	英文名	简称	分子式	[M+H] <sup>+</sup>	肝脏	血清
号							
1	肉碱	Carnitine	C0	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	162.1124	√	√
2	乙酰肉碱	Acetylcarnitine	C2	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	204.123	√	√
3	丙酰肉碱	Propionylcarnitine	C3	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	218.1387	√	√
4	丁酰肉碱	Butyrylcarnitine	C4	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	232.1543	√	√
5	戊酰肉碱	Valerylcarnitine	C5	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	246.17	√	-
6	己酰肉碱	Hexanoylcarnitine	C6	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	260.1856	√	√
7	辛酰肉碱	Octanoylcarnitine	C8	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	288.2169	√	√
8	癸酰肉碱	Decanoylcarnitine	C10	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>4</sub>	316.2482	√	√
9	十二酰肉碱	Dodecanoylcarnitine	C12	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>4</sub>	344.2795	√	√
10	十四酰肉碱	Tetradecanoylcarnitine	C14	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>	372.3108	√	√
11	十六酰肉碱	Palmitoylcarnitine	C16	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>4</sub>	400.3421	√	√
12	十八酰肉碱	Stearoylcarnitine	C18	C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	428.3734	√	√
13	二十酰肉碱	Arachidylcarnitine	C20	C <sub>27</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>4</sub>	456.4047	√	-
14	二十二酰肉碱	Docosanoylcarnitine	C22	C <sub>29</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>4</sub>	484.436	√	-

[0095] 附表,混合标准品中包含的75个代谢物

[0096]

编号	代谢物	英文名	分子式	分子量	<i>m/z</i>	加和形式	HMDB	KEGG
M1	精胺	Spermine	C10H26N4	202.2157	203.223	M+H	HMDB0001256	C00750
M2	组胺	Histamine	C5H9N3	111.0796	112.0869	M+H	HMDB0000870	C00388
M3	L-赖氨酸	L-Lysine	C6H14N2O 2	146.1055	147.1128	M+H	HMDB0000182	C00047
M4	1-脱氧野尻霉素	1-Deoxynojirimycin	C6H13NO4	163.0845	186.0744	M+Na	HMDB0035359	C16843
M5	L-精氨酸	L-Arginine	C6H14N4O 2	174.1117	175.119	M+H	HMDB0000517	C00062
M6	鹅肌肽	Anserine	C10H16N4 O3	240.1222	263.1112	M+Na	HMDB0000194	C01262
M7	1-甲基组氨酸	1-Methylhistidine	C7H11N3O 2	169.0851	170.0924	M+H	HMDB0000001	C01152
M8	L-胱氨酸	L-Cystine	C6H12N2O 4S2	240.0238	241.0311	M+H	HMDB0000192	C00491
M9	氨基己二酸	Aminoadipic acid	C6H11NO4	161.0688	162.0761	M+H	HMDB0000510	C00956
M10	酵母氨酸	Saccharopine	C11H20N2 O6	276.1321	277.1394	M+H	HMDB0000279	C00449
M11	β-D-葡萄糖-6-磷酸	Beta-D-Glucose 6-phosphate	C6H13O9P	260.0297	283.0191	M+Na	HMDB0003498	C01172
M12	γ-氨基丁酸	Gamma-Aminobutyric acid	C4H9NO2	103.0633	104.0706	M+H	HMDB0000112	C00334
M13	L-肉碱	L-Carnitine	C7H15NO3	161.1052	162.1125	M+H	HMDB0000062	C00318
M14	氧化三甲胺	Trimethylamine	C3H9NO	75.06841	76.07569	M+H	HMDB0000925	C01104

[0097]

		N-oxide						
M15	肌酸	Creatine	C4H9N3O2	131.0695	132.0768	M+H	HMDB0000064	C00300
M16	L-脯氨酸	L-Proline	C5H9NO2	115.0633	116.0706	M+H	HMDB0000162	C00148
M17	高瓜氨酸	Homocitrulline	C7H15N3O3	189.1113	190.1186	M+H	HMDB0000679	C02427
M18	4-氨基苯酚	4-Aminophenol	C6H7NO	109.0528	110.06	M+H	HMDB0001169	C02372
M19	L-类胱氨酸	L-Homocysteine	C8H16N2O4S2	268.0551	269.0624	M+H	HMDB0000676	C01817
M20	L-乙酰肉碱	L-Acetylcarnitine	C9H17NO4	203.1158	204.123	M+H	HMDB0000201	C02571
M21	L-甲硫氨酸	L-Methionine	C5H11NO2S	149.051	150.0583	M+H	HMDB0000696	C00073
M22	γ-谷氨酰半胱氨酸	gamma-Glutamylcysteine	C8H14N2O5S	250.0623	251.0696	M+H	HMDB0001049	C00669
M23	L-多巴	L-Dopa	C9H11NO4	197.0688	198.0761	M+H	HMDB0000181	C00355
M24	2-苯基甘氨酸	2-Phenylglycine	C8H9NO2	151.0633	152.0706	M+H	HMDB0002210	
M25	焦谷氨酸	Pyroglutamic acid	C5H7NO3	129.0426	130.0499	M+H	HMDB0000267	C01879
M26	同型半胱氨酸	Homocysteine	C4H9NO2S	135.0354	136.0427	M+H	HMDB0000742	C00155
M27	3-氨基水杨酸	3-Aminosalicylic acid	C7H7NO3	153.0426	154.0499	M+H	HMDB0001972	
M28	羟基犬尿氨酸	Hydroxykynurenine	C10H12N2O4	224.0797	225.087	M+H	HMDB0000732	C02794
M29	L-异亮氨酸	L-Isoleucine	C6H13NO2	131.0946	132.1019	M+H	HMDB0000172	C00407
M30	L-酪氨酸	L-Tyrosine	C9H11NO3	181.0739	182.0812	M+H	HMDB0000158	C00082
M31	硫鸟嘌呤	Thioguanine	C5H5N5S	167.0266	168.0338	M+H	HMDB0014496	
M32	L-亮氨酸	L-Leucine	C6H13NO2	131.0946	132.1019	M+H	HMDB0000687	C00123
M33	氧化型谷胱甘肽	Oxidized glutathione	C20H32N6O12S2	612.152	613.1592	M+H	HMDB0003337	C00127
M34	S-腺苷高半胱氨酸	S-Adenosylhomocysteine	C14H20N6O5S	384.1216	385.1289	M+H	HMDB0000939	C00021
M35	间氨基苯甲酸	m-Aminobenzoic acid	C7H7NO2	137.0477	138.055	M+H	HMDB0001891	
M36	丙酰肉碱	Propionylcarnitine	C10H19NO4	217.1314	218.1387	M+H	HMDB0000824	C03017
M37	腺苷	Adenosine	C10H13N5O4	267.0968	268.104	M+H	HMDB0000050	C00212
M38	对氨基马	4-Aminohip	C9H10N2O	194.0691	195.0764	M+H	HMDB0001867	

[0098]

	尿酸	puric acid	3					
M39	吡哆酸	4-Pyridoxic acid	C8H9NO4	183.0532	184.0604	M+H	HMDB0000017	C00847
M40	鸟嘌呤	Guanine	C5H5N5O	151.0494	152.0567	M+H	HMDB0000132	C00242
M41	5-羟基色氨酸	5-Hydroxy-L-tryptophan	C11H12N2O3	220.0848	221.0921	M+H	HMDB0000472	C01017
M42	L-犬尿氨酸	L-Kynurenine	C10H12N2O3	208.0848	209.0921	M+H	HMDB0000684	C00328
M43	L-苯丙氨酸	L-phenylalanine	C9H11NO2	165.079	166.0863	M+H	HMDB0000159	C00079
M44	丙氨酰亮氨酸	Alanylleucine	C9H18N2O3	202.1317	203.139	M+H	HMDB0028691	
M45	对氨基苯甲酸	p-Aminobenzoic acid	C7H7NO2	137.0477	138.055	M+H	HMDB0001392	C00568
M46	3-羟基邻氨基苯甲酸	3-Hydroxyanthranilic acid	C7H7NO3	153.0426	154.0499	M+H	HMDB0001476	C00632
M47	异丁酰肉碱	Isobutyryl-L-carnitine	C11H21NO4	231.1471	232.1543	M+H	HMDB0000736	
M48	苯乙胺	Phenylethylamine	C8H11N	121.0891	122.0964	M+H	HMDB0012275	C05332
M49	丁酰肉碱	Butyrylcarnitine	C11H21NO4	231.1471	232.1543	M+H	HMDB0002013	C02862
M50	3-羟基马尿酸	3-Hydroxyhippuric acid	C9H9NO4	195.0532	196.0604	M+H	HMDB0006116	
M51	L-色氨酸	L-Tryptophan	C11H12N2O2	204.0899	205.0972	M+H	HMDB0000929	C00078
M52	普鲁卡因	Procaine	C13H20N2O2	236.1525	237.1598	M+H	HMDB0014859	C07375
M53	三丙胺	Tripropylamine	C9H21N	143.1674	144.1747	M+H	HMDB0032545	
M54	5-羟基吲哚乙酸	5-Hydroxyindoleacetic acid	C10H9NO3	191.0582	192.0655	M+H	HMDB0000763	C05635
M55	2-甲基丁酰肉碱	2-Methylbutyrylcarnitine	C12H23NO4	245.1627	246.17	M+H	HMDB0000378	
M56	丙氨酰色氨酸	Alanyltryptophan	C14H17N3O3	275.127	276.1343	M+H	HMDB0013209	C00806
M57	异戊酰肉碱	Isovalerylcarnitine	C12H23NO4	245.1627	246.17	M+H	HMDB0000688	
M58	戊酰肉碱	Valerylcarnitine	C12H23NO4	245.1627	246.17	M+H	HMDB0013128	
M59	己酰肉碱	L-Hexanoyl	C13H25NO	259.1784	260.1856	M+H	HMDB0000756	

[0099]

		camitine	4					
M60	N-乙酰基-N-甲酰基-5-甲氧基犬尿氨酸	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C13H16N2O4	264.111	265.1183	M+H	HMDB0004259	C05642
M61	吲哚乳酸	Indolelactic acid	C11H11NO3	205.0739	206.0812	M+H	HMDB0000671	C02043
M62	3-羟基戊二酸	3-Hydroxyglutaric acid	C5H8O5	148.0372	149.0445	M+H	HMDB0000428	
M63	抗坏血酸	Ascorbic acid	C6H8O6	176.0321	177.0394	M+H	HMDB0000044	C00072
M64	3-碘化甲状腺原氨酸	3-Iodothyronamine	C14H14INO2	355.0069	356.0142	M+H	HMDB0060524	
M65	辛酰肉碱	L-Octanoylcarnitine	C15H29NO4	287.2097	288.2169	M+H	HMDB0000791	C02838
M66	反三碘甲状腺氨酸	Reverse-triiodothyronine	C15H12I3NO4	650.79	651.7973	M+H	HMDB0060074	
M67	三碘甲状腺氨酸	Liothyronine	C15H12I3NO4	650.79	651.7973	M+H	HMDB0000265	C02465
M68	甲状腺素	Thyroxine	C15H11I4NO4	776.6867	777.694	M+H	HMDB0000248	C01829
M69	癸酰肉碱	Decanoylcarnitine	C17H33NO4	315.241	316.2482	M+H	HMDB0000651	
M70	十二酰肉碱	Dodecanoylcarnitine	C19H37NO4	343.2723	344.2795	M+H	HMDB0002250	
M71	棕榈羟酰基肉碱	3-Hydroxyhexadecanoylcarnitine	C23H45NO5	415.3298	416.3371	M+H	HMDB0013336	
M72	十四酰肉碱	Tetradecanoylcarnitine	C21H41NO4	371.3036	372.3108	M+H	HMDB0005066	
M73	亚油酰肉碱	Linoleylcarnitine	C25H45NO4	423.3349	424.3421	M+H	HMDB0006469	
M74	棕榈酰肉碱	L-Palmitoylcarnitine	C23H45NO4	399.3349	400.3421	M+H	HMDB0000222	C02990
M75	十八酰肉碱	Stearoylcarnitine	C25H49NO4	427.3662	428.3734	M+H	HMDB0000848	

o



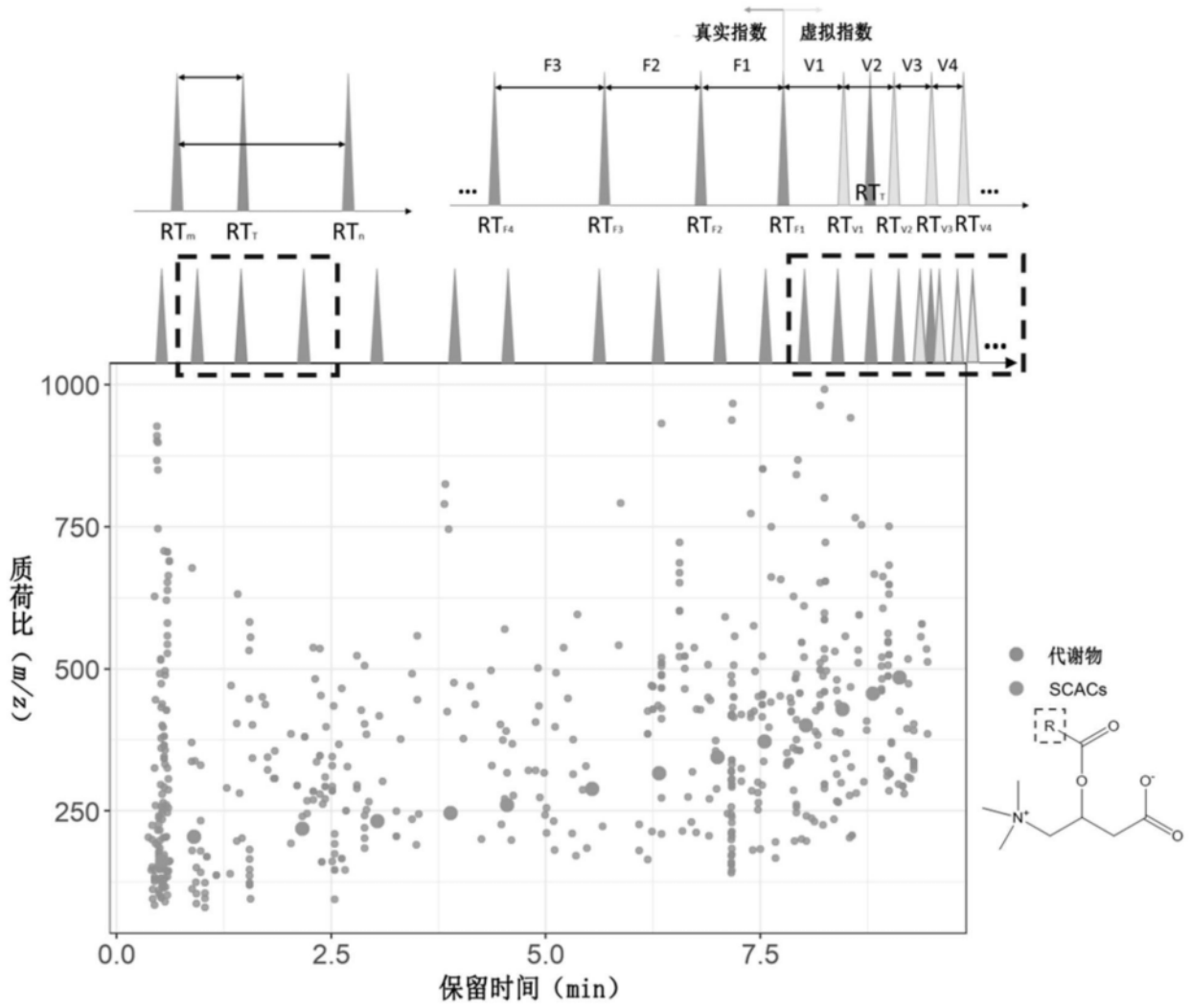


图1

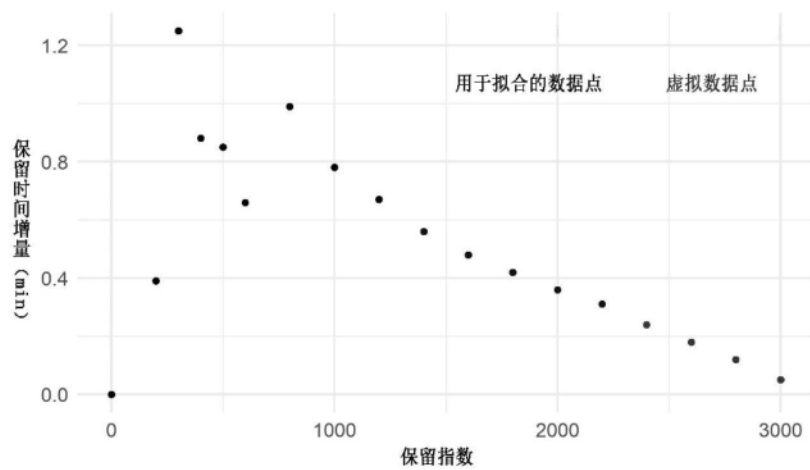


图2