

基于 GC/LC-MS 的代谢组学样品收集与制备方法论述

张伟平

摘要: 代谢组学属于系统生物学范畴, 目前已成为一种备受欢迎的研究方法, 在疾病检测、健康监测、代谢通路解析等领域得到了运用。代谢组学实验流程一般为: 样品收集与制备、数据采集和数据处理与分析, 其中样品的收集与制备是代谢组学实验的第一步, 关乎到后续实验的质量。本文主要对基于气相/液相色谱-质谱联用法的代谢组学的样品收集与制备流程进行论述, 并且对血液、尿液、粪便、动物细胞、动物组织以及微生物等样品进行重点关注, 关注点主要为淬灭与萃取步骤。

关键词: 代谢组学, 样品收集与制备, 淬灭, 萃取

代谢组学是研究生物样品中代谢物种类、含量及其动态变化的学科, 属于系统生物学范畴。其在近年来得到了日益增长的关注, 得益于现代仪器分析技术的飞速发展, 尤其是气相/液相色谱-质谱联用 (GC-MS/LC-MS) 技术和核磁共振 (NMR) 技术的广泛应用与计算机数据处理能力的提升。技术的发展, 同时也催生了其它组学的兴起, 如基因组学、转录组学、蛋白质组学等, 这四大组学根据“中心法则”组成了“组学级联” (omics cascade), 联系了生物体从分子水平到表型水平的生命活动^[1]。其中代谢组学与生物表型最为接近 (见图 1), 在疾病检测^[2-4]、健康监测^[5,6]、代谢通路解析^[7]等领域有广泛应用。

考虑到各种代谢物的理化性质, 从而不损失地达到代谢物提取的目的。因此, 针对不同种类的代谢组学样品以及不同的分析方式, 需要使用特定且合适的样品采集制备方法。

代谢组学研究的生物样品按照大致物态, 可以分为生物体液样品与固体/半固体样品两大类。生物体液样品包括血液 (血清和血浆)、尿液、脑脊液、唾液、汗液、胆汁等; 而固体/半固体样品又可包含粪便、动物组织、培养细胞、微生物、植物材料等种类。以下将阐述基于 GC-MS/LC-MS 技术的代谢组学样品采集与制备的方法, 以及过程中所需注意到的问题, 重点关注血液、尿液、粪便、动物细胞、动物组织以及微生物样品。

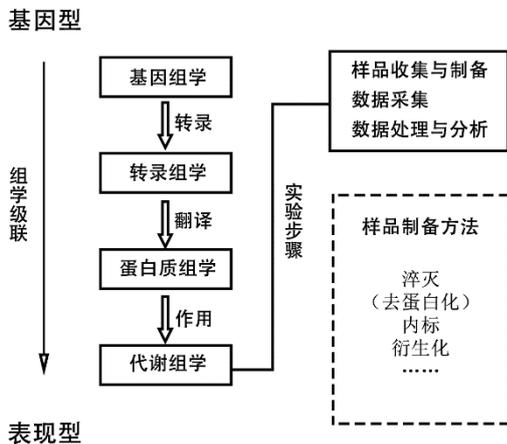


图 1 组学级联与代谢组学实验流程

代谢组学实验过程一般分为以下三大步骤, 分别是: 样品收集与制备, 数据采集和数据处理与分析。其中样品的采集与制备是代谢组学研究的第一步也是最重要的步骤之一, 决定了实验结果的一致与可重复性。通常, 代谢组学样品中的代谢物复杂, 且具有高动态浓度的特征。这导致样品处理时需要充分

1. 样品收集

代谢组学的研究运用了统计学的方法, 一次实验所要求的样本数目较大, 因此有必要采取恰当的方式标记样品。标记的方式可以是标签纸标记或者条形码标记。前者是手写标记, 因此需要注意所用纸笔的持久度, 以及油墨的耐低温性。为了防止样品管在储存时受低温或者水浸影响导致标签纸脱落, 应在样品管的多处进行标记, 如管帽与管身。不论是哪种标记方式, 都应该选用其它的方法记录样品的详细信息。如用计算机记录每个样品的类型、收集时间、收集方法等; 对于临床样本, 还可以记录 BMI, 年龄以及性别等信息。

2. 样品储存与转移

为了避免代谢物之间发生化学反应, 样品收集后应尽可能切断样品内的生命活动或生化反应, 一般采取改变温度或者使用有机溶剂的方法淬灭。因此样品收集之后通常置于 -80°C 或液氮中保存, 也常在

处理时干燥样品再低温储存。干燥样品的方式有风干、烘干与真空冷冻干燥（冻干）等方法，其中冻干法较为常用。Mediani 等人^[8]在研究以上三种不同干燥方式对大波斯菊抗氧化能力的影响中发现，冻干与风干处理的样品类黄酮和糖类含量比烘干处理的更高，且冻干处理的样品中氨基酸和脂肪酸的含量较另两种方法显著更多，突出了冻干法的优势。在样品的转移过程中，应保持样品为干粉状态或置于干冰中保存；在实验的过程中也应注意预冷试剂与容器至 4℃后再进行操作。

3. 样品淬灭

固体/半固体材料的分析目标往往是活细胞的胞内代谢物，由于胞内某些代谢物的含量低且半衰期极短，在数秒内（甚至更短）就会被降解或者转变为其它化合物（如 ATP, ADP 等）^[9,10]，因此对于固体/半固体材料，在处理时需要终止胞内的生化反应，该过程被称为淬灭。对于不同的样品（微生物、细胞、动物组织、植物材料等），所采用的淬灭方式不一，总的来说有：低温（比如<-40℃）或高温（比如>80℃）联合有机溶剂处理法、调节 pH 法等。具体淬灭方法将在下一节根据样品种类进行阐述。

4. 样品特点与样品特异的制备方法

4.1 生物体液样品

4.1.1 尿液

尿液有样品量大、出样频繁等优点。针对尿液收集时间，研究人员通常采用以下几种收集方式：随机收集，定时收集，24 小时后收集，或间隔更长时间收集（一般用于药代动力学研究）^[11,12]。针对不同的研究目的，可以选择不同的时间间隔收集样品。

尿液样品与其它生物体液样品相比较，组成较简单。尿液由约 95%的水、无机盐以及小分子有机物组成，除啮齿类动物的生理性尿蛋白以外几乎不含蛋白质^[13,14]，因此不需要去蛋白化（deproteinize）等处理。但是，由于尿液中富含尿素，在色谱分析中是主要的杂质峰，压制低强度的代谢物峰信号，因此尿液样品处理时常加入脲酶以降解尿素。考虑到尿液各成分的含量与 pH 值随生物体的生理状态、饮水量等因素变化较大，在代谢组学分析时需要进行归一化处理。最常用的归一化指标是尿液样品中肌酐的浓度、比重和渗透压^[11]。考虑到肌酐可以被细菌利用，即被细菌肌酐酶催化水解成肌酸，通过对尿液肌酐的分析还可以监测尿液样品质量，判断其是否被

细菌污染^[15]。

4.1.2 血液衍生物

与尿液类似，血液也是较易获得的生物体液样品，同时也可以灵敏地对外界刺激作出反应，因此血液可以较好地反应生物体的病理生理状态^[14,16]。血液中富含各种脂蛋白颗粒、蛋白质、小分子有机物、离子等，因此血液衍生物样品的处理比尿液更为复杂，需要进行去蛋白化等处理^[17]。常见的血液衍生物样品有血浆和血清。

①血浆：血浆是不含血细胞成分的血液，一般为亮琥珀色液体。血浆除了血细胞外，其它的蛋白质和代谢物成分与血液一致，是优良的代谢组学研究材料。一般制备血浆的方法是向全血中加入抗凝剂，经离心去除血细胞后收取上清液。由于血浆成分较为复杂，应以选择几乎不与代谢物发生反应的抗凝剂为佳，常用的抗凝剂为肝素^[18]。

②血清：血清是血液自然凝固后离心得到的淡黄色透明液体。一般血清的制备方法是将抽出的血液保存在含或不含促凝剂的血清管中静置 30-60min，离心后取上清液^[19]。由于血清制备时间较长，过程中代谢物可能被血液中的酶所降解，因此需要置于冰上操作^[20]。

③血液衍生物样品的选择：血清和血浆都是代谢组学研究中常见的血液衍生物样品，关于选择血清还是血浆作为样品的问题，需要针对具体的研究目的而论。Yu 等人^[21]对以磷脂为主的 122 种代谢物进行了分析，结果表明有 104 种的含量在血浆与血清间有显著差异。而 Liu 等人^[19]的研究指出，在他们所研究的八大类代谢物中，只有肉毒碱 C2:0，肉毒碱 C3:0 与甲硫氨酸三种化合物的含量在血清与血浆间有显著差异，而大多数的氨基酸、胆酸、部分中长链的酰基肉碱与一些脂肪酸的含量差异并不显著。

血浆与血清的萃取与去蛋白化往往同时进行。常用的去蛋白方法是有机溶剂沉淀法，即利用与水互溶的有机溶剂（如甲醇、乙醇、丙酮和乙腈等）降低蛋白质在水中的溶解度，从而使蛋白质沉淀^[22,23]。为了防止代谢物的降解或互变，去蛋白试剂通常预冷到 0℃，常用的试剂种类与体积比有：甲醇^[24]，甲醇/乙醇(1:1)^[25]，甲醇/乙腈(7:3)^[26]等。此外还有两相萃取法，将感兴趣的代谢物从体系萃取到另一相中，如液液萃取（LLE）^[27,28]，固相萃取（SPE）^[22]，甲基叔丁基醚萃取（MBTE）^[29]等方法，两相萃取法的代谢物覆盖率一般较有机溶剂沉淀法更低，这样对靶向代谢组学样品处理更优，如脂质组学，使用 MBTE 法

可以将非极性的脂质萃取到上层有机相，保留极性代谢物与水相中。

4.2 固体/半固体样品

4.2.1 粪便

粪便样品的代谢谱分析发展较慢，这可能是由粪便的复杂组成造成的。粪便样品中包含食物残渣、微生物、脱落的肠道上皮细胞、生物大分子（纤维、蛋白质、DNA 等）以及各种小分子物质^[30]。人粪质量中位数为 128g/天，其中约 75% 为水，含水量取决于粪便内可吸水纤维的含量，而干粪中含有大约 25%–54% 的细菌或细菌残骸^[30]。因此，粪便可以看作是微生物样品、细胞样品和体液样品等的混合物。

由于粪便的取样有无创、量大等特点，在临床检测健康和疾病状态领域吸引了一批代谢组学研究者；同时由于粪便含大量肠道微生物，粪便样品也是研究肠道微生物群的优良对象^[31]。临床上通过分析粪便内特定的代谢物含量或代谢指纹图谱来寻找疾病生物标志物，而在非临床领域，粪便样品常用来研究饮食与微生物组-代谢组之间的关系^[31]。

4.2.2 微生物

① 淬灭：由于微生物之间种间差异较大，因此淬灭方法较动物细胞更为复杂。微生物代谢组学样品处理的方法有两种：同步取样法和分布取样法，两者的区别在于后者将淬灭与萃取步骤分离，而前者将两步同时进行，二者的优缺点见表 1^[32]。

表 1 分布取样法与同步取样法的流程及优缺点

	优点	缺点
分布取样法流程		
冷甲醇或液氮淬灭	将生物物质与上清液分离（目标特异地）	淬灭中可能发生代谢物泄露
代谢物萃取	1. 样品基质更干净（含盐量更低） 2. 独立的萃取步骤（针对目标代谢物）	1. 对特异的代谢物需要多重萃取步骤 2. 费力
同步取样法流程		
同时淬灭并用碱、酸、沸腾的乙醇或水等萃取	1. 流程更容易实施 2. 不需要分离生物物质和上清液 3. 胞内胞外代谢	1. 难以解释数据 2. 样品基质复杂 3. 盐含量高 4. 代谢物太稀

物全定量 而导致检测和
4. 非特异的 定量不良

由于培养基的成分复杂且杂质含量高，分布取样法成为如今应用较广的微生物样品处理方法，下面将对法进行阐述。

最常用的分步取样法为冷甲醇法，将微生物培养液快速过滤后在-40℃下用 50% 甲醇清洗，紧接着萃取^[33]。随后冷甲醇法被 de Koning 和 van Dam 改进，即直接用-40℃的 60% 甲醇处理培养液^[34]，从而避免过滤步骤消耗时间以及可能的对细胞生理状态的影响。该改进将淬灭时间有效地控制在了“亚秒”级，且在酵母^[34, 35]培养液中得到了验证，因此成为了最广泛运用的微生物样品淬灭法，大大提高了淬灭速率。但有报告称该法会使某些酵母、细菌胞内代谢物大规模损失^[36]，因此 Canelas^[33]等人对冷甲醇法进行了进一步的改进，即用纯甲醇在-40℃条件下淬灭，测试了酿酒酵母（*S. cerevisiae*）样品，得到结论：只有用改进的方法（醇甲醇，-40℃）才能有效测定酿酒酵母代谢物水平。

酵母通用的冷甲醇法并不能在原核微生物（细菌）中得到良好的应用，主要体现在普遍发生的细菌细胞泄露，这可能是因为：1）细菌的细胞壁强度普遍低于酵母细胞壁，且二者的组成有所不同^[32]；2）部分温度敏感的菌种在低温时会发生“冷激现象”，导致胞内化合物的损失^[37]。因此，针对不同细菌（革兰氏阴性、革兰氏阳性等）的冷甲醇法得到了更多样的改进。Spura 等人^[38]认为在-20℃使用 40% 乙醇/0.8% 氯化钠混合液可以有效地使革兰氏阴性、革兰氏阳性与酵母的酶失活从而淬灭生化反应，并以大肠杆菌（*E. coli*），谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）与酿酒酵母（*S. cerevisiae*）做测试，得到了满意度结果。Faijes 等人^[39]认为在-40℃下使用 60% 甲醇/70mM 肝素钠（HEPES, pH5.5）或 60% 甲醇/0.85% 碳酸铵（pH5.5）才可以最大限度地减少淬灭时植物乳杆菌（*L. plantarum*）的细胞裂解（<10%），同时由于在后续的冻干过程中碳酸铵分解挥发，因此不会对代谢物分析造成杂质污染。近年来，针对特定细菌菌种改进的冷甲醇法，如冷甲醇/乙二醇法（大肠杆菌）^[40]、冷甲醇/氯化钠法（植物乳杆菌）^[41]、冷乙醇/氯化钠法（大肠杆菌）^[42]也相继被提出。因此，微生物样品淬灭，尤其是细菌样品淬灭，需要针对不同的菌种进行预实验以确定最佳淬灭条件。

除了冷甲醇法外，冷甘油-盐溶液法同样可以用于微生物样品淬灭。Vilals-Boas 和 Bruheim^[43]提出将纯甘油：氯化钠溶液（13.5g/L）以体积比 3:2 混合后在-20℃处理培养液可以淬灭细胞，并在荧光假单胞菌（*P. fluorescens*，革兰氏阴性）、天蓝色链霉菌（*S. coelicolor*，革兰氏阳性）与酿酒酵母进行实验，发现胞内化合物损失率低于传统的冷甲醇法。该方法利用了甘油的防冻能力，避免了低温导致的细胞裂解，又因为不使用甲醇作为淬灭剂，使得该方法在细菌淬灭时有显著优势。但是由于甘油粘性强，沸点高，不易从细胞表面清除，萃取后用 NMR 分析代谢物时会显著影响化学位移；因而冷甘油-盐溶液法一般只用于 LC-MS 或 GC-MS 分析中，因为液相/气相色谱可以方便地将杂质去除^[43]。

4.2.3 动物细胞

由于动物细胞胞外不含细胞壁，在低渗条件下细胞涨破裂解，比微生物细胞更脆弱易泄露，因此在淬灭时往往需要通过盐离子调节淬灭剂渗透压。细胞的生长状态有两种，分别是贴壁生长与悬浮生长。对于贴壁细胞，常规的细胞淬灭方法是先用胰蛋白酶处理细胞后用 PBS 冲净培养基，再用液氮^[44]或冷甲醇溶液法淬灭^[45]，如 60%甲醇/0.85%碳酸氢铵（-40℃，AMBIC）^[46]。但是常规方法有两个缺点：一是胰蛋白酶处理细胞破坏了胞外基质，可能会对细胞生理状态造成干扰；二是酶解和过滤过程时间长，半衰期短的分子可能发生降解或互变，产生误差。因此，Teng 等人^[45]提出了一种基于冷甲醇法的直接淬灭细胞法，即使用冰浴预冷的磷酸缓冲液（PBS）冲洗细胞培养基后直接用冰冷纯甲醇淬灭。

对于悬浮细胞，除了传统的液氮或冷甲醇淬灭外，还可以用冷生理盐水淬灭哺乳动物细胞。Dietmair 等人^[10]对比了三种淬灭剂（0.9%氯化钠（0.5℃），60%甲醇（-40℃）和 AMBIC）对 CHO 细胞的完整度的影响，发现只有 0.9%氯化钠（0.5℃）组可以保持 CHO 细胞的完整性（<10%破裂），并且可以有效地降低胞内 ATP 分解成 ADP、AMP 的速率。针对冷生理盐水的淬灭效果，后来有报告得到相反结论，研究发现冷生理盐水淬灭细胞内 AMP 含量比 AMBIC 组的更高，接近未淬灭组，因此认为冷生理盐水并不能有效地停止胞内生化反应^[47]。

4.2.4 动物组织

动物组织的淬灭与微生物或细胞不同，由于组织内各细胞与组织液构成微环境，使得细胞代谢物在一定时间内保持较为稳定的状态，因此动物组织

的淬灭通常不要求在离体后的“亚秒”单位时间内完成，但是也应遵循最短时间原则。常用的方法是在取出组织后将组织切块，用锡纸包裹封入密封袋内，放入液氮或-80℃保存^[48,49]。Haukaas 等人^[50]研究了从离体到液氮冷冻的时间间隔对肿瘤组织代谢谱的影响，结果发现：以 30min 为时间点，30min 以内各代谢物水平没有显著变化；但在 30min 之后，肿瘤组织内胆碱含量提高，而肌酐、抗坏血酸、谷胱甘肽含量降低。该实验给临床样品的收集提出了要求，即尽量在半小时内将离体组织用液氮保存，以保证代谢谱不发生变化。

对于带血的组织，如骨骼肌，在冷冻前通常用去离子水或 PBS 缓冲液冲洗样品，从而避免血液中代谢物对组织代谢谱的影响；有时也会将含盐重水（D₂O）或 PBS 缓冲液注入器官的主要动脉内以清洗血渍^[48,51]。

由于大多数的组织不是均一的，为了代谢谱的完整性与实验的可重复性，可以通过不同方法对样本进行均一化处理，一般使用机械手段破碎组织。最常用的破碎流程是将组织切块置于容器内，用陶瓷或金属珠（软组织均一化：1.8-2.4mm，硬组织均一化：2.8-6.8mm）研磨；同时可以将容器置于轨道震荡器，加入萃取剂以萃取代谢物；也可以先干磨组织后再加入萃取液^[52]。

5. 样品萃取

样品萃取的主要目的是将代谢物纯化富集，通常萃取与淬灭、去蛋白化等操作共同进行，因此最常用的萃取方法就是用冷有机溶剂（如甲醇、乙醇等）处理样品。这样处理的样品选择性比较高，适合非靶向代谢组学研究^[14]。而对于只研究部分代谢物的靶向代谢组学，SPE、LLE、MTBE 法更加适合^[53]。Sitnikov 等人^[24]比较了人血浆常用的几种萃取方法，并总结出表 2 的结论。其中“+”号代表等级，“+”号越多代表该萃取方法的某种特性越强。

表 2 人血浆常用的几种萃取方法

萃取方法	回收率	基质效应	可重复性	代谢组覆盖率
甲醇/乙醇	+++	++	+++	++++
甲醇	++++	++	++++	++++
甲醇/MTBE	+++	++	+++	+++
MTBE	++	++++	+	++
C18 (SPE)	+++	++++	+	++

PEP2 (SPE)	+++	++	++	++
IEX (SPE)	+	+++	++	+

6. 样品衍生化

衍生化是进行气相色谱 (GC) 分析的必要条件。GC 需要将样品加热至气态, 要求提取的代谢物具有易挥发与热稳定的特性^[17, 54], 而大部分天然存在的代谢物含有极性官能团, 不易挥发, 因此需要对样品进行衍生化处理^[54]。常见的衍生化方案是甲氧化与硅烷化联用。1) 首先进行甲氧化反应, 甲氧化可以保护代谢物醛/酮羰基不发生缩醛/缩酮反应, 并且使得硅烷化后只生成顺式或反式的肟 (>C=N-) 衍生物^[17, 54]; 甲氧化还可以保护 α 酮酸不发生脱羧反应, 防止发生酮式-烯醇式互变^[55], 从而使衍生物种类趋于单一化, 利于后续 NMR 或 MS 分析。一般使用盐酸甲氧胺 (MeOX) 作为甲基化试剂, 需要 65°C 孵育以完成反应^[54]。2) 接着是硅烷化反应。硅烷化试剂与代谢物反应, 用烷基硅基 (如-SiMe₃) 取代活泼氢^[17]。代谢物中的某些极性官能团的存在, 如羟基、羧基、氨基、巯基和磷酸基等, 都不利于代谢物的挥发, 在硅烷化减弱了这些官能团对偶极矩的贡献, 因此有利于样品挥发^[17]。常见的硅烷化试剂有: N-甲基-N-(三甲基甲硅烷基) 三氟乙酰胺 (MSTFA) 和 N,O-二(三甲基甲硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA), 可选 1% 的三甲基氯硅烷 (TMCS) 作催化剂^[54]。

7. 数据质量

数据质量是任何实验者在设计实验与实验操作中都应该考虑的一点, 这关系到实验结果的一致性与可重复性。数据质量的偏差可能来源于多个方面, 如: 1) 样品处理过程中产生的误差: 如不完全萃取与衍生化、基质污染等; 2) 实验人员的手法与实验仪器的状态: 不同实验人员对同一实验流程的操作方式可能不尽相同, 而实验仪器每日的运行状态不同也可能导致数据有误差。针对前者, 可以通过设置内标 (internal standard) 来弥补, 而对于后者, 则可以通过质量控制 (QC) 样品来控制误差。

7.1 内标

内标一般选择的是不存在于样品中、区别于待分析物的、但与待分析物化学性质相似的化合物, 通常在样品制备过程中 (衍生化前) 加入。内标物分为结构相关化合物与稳定同位素标记 (SIL, 如 ²H, ¹³C, ¹⁵N 或 ¹⁷O 标记) 化合物, 其中 SIL 更受欢迎^[56]。

7.2 QC 样品

对于实验仪器和实验人员所造成的系统误差, 仅内标不足以消除, 还需要设置 QC 样品。QC 样品独立于待分析样品, 一般至少每 5~10 个样品需要添加一个 QC 样品^[40, 57], 通过对各组 QC 样品的代谢组学分析来反应组间差异, 因此要求各组 QC 样品应该具有完全相同的组成。QC 样品可以通过分装池样品 (pooled sample) 来制备, 一般将所有储存的样品各取等量均匀混合成池样品, 再均匀分装池样品, 得到组分一致的各 QC 样品。如果待分析样品数过多 (如 >1000) 或样品分批次获取, 导致池样品不易制备, 可设置两类 QC 样品, 第一类 QC 样品是预制的、与待分析样品种类相同且代谢物类似的 QC 样品, 在各批次实验中都加入分析; 第二类 QC 样品是各批次内 QC 样品^[57]。这样可以通过第二类样品获得批次内的数据质量, 通过第一类样品来获得批次间的数据质量差别, 以实现批次间比较和标准化。

8. 总结

代谢组学样品的收集与制备是整个代谢组学实验流程中的第一步, 也是至关重要的一步, 它关系到后续数据采集、处理与分析的顺利进行。一个好的代谢组学样品, 从被收集到分析, 一般需要经历淬灭、去蛋白化、加内标、衍生化、萃取、冻干等步骤, 同时考虑到数据质量, 样品制备时需要增设质量控制样品。不同种类代谢组学样品的处理方式之间往往异同共存, 在设计实验时需要全面地考虑实验目的与样品性质, 以保证代谢谱的完整以及实验的一致性与可重复性。实验过程中也要考虑样品储存、转运的方式, 否则某些活泼的代谢物 (如 ATP、NADH 等) 容易降解, 造成不必要的误差。

参考文献

- [1] Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2007, 26(1): 51 - 78.
- [2] Xu X-H, Huang Y, Wang G, et al. Metabolomics: a novel approach to identify potential diagnostic biomarkers and pathogenesis in Alzheimer's disease[J]. Neuroscience Bulletin, 2012, 28(5): 641 - 648.
- [3] Rhee E P, Gerszten R E. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery[J]. Clinical chemistry, 2012, 58(1): 139 - 147.
- [4] Kovac J R, Pastuszak A W, Lamb D J. The use

- of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility[J]. *Fertility and sterility*, 2013, 99(4): 998 - 1007.
- [5] Miller I J, Peters S R, Overmyer K A, et al. Real-time health monitoring through urine metabolomics[J]. *NPJ digital medicine*, 2019, 2(1): 1 - 9.
- [6] Elpa D P, Chiu H-Y, Wu S-P, et al. Skin metabolomics[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2021, 32(2): 66 - 75.
- [7] Tian Z, Liu Y, Usa K, et al. Novel role of fumarate metabolism in dahl-salt sensitive hypertension[J]. *Hypertension*, 2009, 54(2): 255 - 260.
- [8] Mediani A, Abas F, Khatib A, et al. 1H-NMR-based metabolomics approach to understanding the drying effects on the phytochemicals in *Cosmos caudatus*[J]. *Food Research International*, 2012, 49(2): 763 - 770.
- [9] Lu W, Bennett B D, Rabinowitz J D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics[J]. *Journal of chromatography B*, 2008, 871(2): 236 - 242.
- [10] Dietmair S, Timmins N E, Gray P P, et al. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol[J]. *Analytical biochemistry*, 2010, 404(2): 155 - 164.
- [11] Khamis M M, Adamko D J, El - Anead A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery[J]. *Mass spectrometry reviews*, 2017, 36(2): 115 - 134.
- [12] Fernández-Peralbo M A, De Castro M D L. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 41: 75 - 85.
- [13] Zhang A, Sun H, Wu X, et al. Urine metabolomics[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2012, 414: 65 - 69.
- [14] Li F, Fang-rui C A O, Xin-min L I U, et al. Sample collection and preparation of untargeted metabolomics[J]. *Central South Pharmacy*, 2014, 12(12): 1217 - 1221.
- [15] Sykes B D. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage[J]. *Metabolomics*, 2007, 3(1): 19 - 27.
- [16] Li N, Song Y P, Tang H, et al. Recent developments in sample preparation and data pre-treatment in metabolomics research[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 589: 4 - 9.
- [17] Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics[G]//*Metabolic Profiling*. Springer: 191 - 204.
- [18] Hernandez V V, Barbas C, Dudzik D. A review of blood sample handling and pre - processing for metabolomics studies[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(18): 2232 - 2241.
- [19] Liu X, Hoene M, Wang X, et al. Serum or plasma, what is the difference? Investigations to facilitate the sample material selection decision making process for metabolomics studies and beyond[J]. *Analytica chimica acta*, 2018, 1037: 293 - 300.
- [20] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature protocols*, 2011, 6(7): 1060 - 1083.
- [21] Yu Z, Kastenmüller G, He Y, et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles[J]. *PloS one*, 2011, 6(7): e21230.
- [22] Michopoulos F, Lai L, Gika H, et al. UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(4): 2114 - 2121.
- [23] Burgess R R. Protein precipitation techniques[J]. *Methods in enzymology*, 2009, 463: 331 - 342.
- [24] Sitnikov D G, Monnin C S, Vuckovic D. Systematic assessment of seven solvent and solid-phase extraction methods for

- metabolomics analysis of human plasma by LC-MS[J]. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 1 - 11.
- [25] Yang Y, Cruickshank C, Armstrong M, et al. New sample preparation approach for mass spectrometry-based profiling of plasma results in improved coverage of metabolome[J]. *Journal of chromatography A*, 2013, 1300: 217 - 226.
- [26] Delgado-Povedano M del M, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, et al. Development of a method for enhancing metabolomics coverage of human sweat by gas chromatography - mass spectrometry in high resolution mode[J]. *Analytica chimica acta*, 2016, 905: 115 - 125.
- [27] Peng J, Li L. Liquid - liquid extraction combined with differential isotope dimethylaminophenacyl labeling for improved metabolomic profiling of organic acids[J]. *Analytica chimica acta*, 2013, 803: 97 - 105.
- [28] Zhang Q, Nong Y, Liu Z, et al. Proteinase K Combining Two-Step Liquid - Liquid Extraction for Plasma Untargeted Liquid Chromatography - Mass Spectrometry-Based Metabolomics To Discover the Potential Mechanism of Colorectal Adenoma[J]. *Analytical chemistry*, 2019, 91(22): 14458 - 14466.
- [29] Chen S, Hoene M, Li J, et al. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of chromatography A*, 2013, 1298: 9 - 16.
- [30] Rose C, Parker A, Jefferson B, et al. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology[J]. *Critical reviews in environmental science and technology*, 2015, 45(17): 1827 - 1879.
- [31] Karu N, Deng L, Slae M, et al. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database[J]. *Analytica chimica acta*, 2018, 1030: 1 - 24.
- [32] Mashego M R, Rumbold K, De Mey M, et al. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies[J]. *Biotechnology letters*, 2007, 29(1): 1 - 16.
- [33] Canelas A B, Ras C, Ten Pierick A, et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics[J]. *Metabolomics*, 2008, 4(3): 226 - 239.
- [34] De Koning W, Van Dam K. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH[J]. *Analytical biochemistry*, 1992, 204(1): 118 - 123.
- [35] Wu L, Mashego M R, Van Dam J C, et al. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards[J]. *Analytical biochemistry*, 2005, 336(2): 164 - 171.
- [36] Villas - Bôas S G, Højer - Pedersen J, Åkesson M, et al. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods[J]. *Yeast*, 2005, 22(14): 1155 - 1169.
- [37] Wittmann C, Krömer J O, Kiefer P, et al. Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria[J]. *Analytical biochemistry*, 2004, 327(1): 135 - 139.
- [38] Spura J, Reimer L C, Wieloch P, et al. A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast[J]. *Analytical biochemistry*, 2009, 394(2): 192 - 201.
- [39] Faijes M, Mars A E, Smid E J. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Microbial cell factories*, 2007, 6(1): 1 - 8.
- [40] Ye D, Li X, Wang C, et al. Improved Sample Preparation for Untargeted Metabolomics Profiling of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology spectrum*, 2021, 9(2): e00625-21.

- [41] Yang Q, Tao R, Yang B, et al. Optimization of the quenching and extraction procedures for a metabolomic analysis of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Analytical biochemistry*, 2018, 557: 62 - 68.
- [42] Miguez A M, McNerney M P, Styczynski M P. Metabolomics analysis of the toxic effects of the production of lycopene and its precursors[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 760.
- [43] Villas-Bôas S G, Bruheim P. Cold glycerol - saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells[J]. *Analytical biochemistry*, 2007, 370(1): 87 - 97.
- [44] Bi H, Krausz K W, Manna S K, et al. Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, 405(15): 5279 - 5289.
- [45] Teng Q, Huang W, Collette T W, et al. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics[J]. *Metabolomics*, 2009, 5(2): 199 - 208.
- [46] Sellick C A, Hansen R, Maqsood A R, et al. Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(1): 174 - 183.
- [47] Sellick C A, Hansen R, Stephens G M, et al. Metabolite extraction from suspension-cultured mammalian cells for global metabolite profiling[J]. *Nature protocols*, 2011, 6(8): 1241 - 1249.
- [48] Zukunft S, Prehn C, Röhring C, et al. High-throughput extraction and quantification method for targeted metabolomics in murine tissues[J]. *Metabolomics*, 2018, 14(1): 1 - 12.
- [49] Misra B B, Upadhayay R P, Cox L A, et al. Optimized GC-MS metabolomics for the analysis of kidney tissue metabolites[J]. *Metabolomics*, 2018, 14(6): 1 - 14.
- [50] Haukaas T H, Moestue S A, Vettukattil R, et al. Impact of freezing delay time on tissue samples for metabolomic studies[J]. *Frontiers in oncology*, 2016, 6: 17.
- [51] Smith L, Villaret-Cazadamont J, Claus S P, et al. Important considerations for sample collection in metabolomics studies with a special focus on applications to liver functions[J]. *Metabolites*, 2020, 10(3): 104.
- [52] Roca M, Alcoriza M I, Garcia-Cañaveras J C, et al. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1147: 38 - 55.
- [53] Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2015, 407(17): 4879 - 4892.
- [54] Moros G, Chatziioannou A C, Gika H G, et al. Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(1): 53 - 65.
- [55] Tam Y Y, Normanly J. Determination of indole-3-pyruvic acid levels in *Arabidopsis thaliana* by gas chromatography - selected ion monitoring-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 800(1): 101 - 108.
- [56] Khodadadi M, Pourfarzam M. A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography - mass spectrometry[J]. *Metabolomics*, 2020, 16: 1 - 14.
- [57] Begou O, Gika H G, Theodoridis G A, et al. Quality control and validation issues in LC-MS metabolomics[G]//Metabolic profiling. Springer: 15 - 26.