

α -酮戊二酸的分析检测及应用研究进展

孙冰洁, 陈宏睿, 张现康, 朱会宇*

1、河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046

2、河南中医药大学本草书院, 河南郑州 450046

【摘要】 α -酮戊二酸(α -KG)是细胞内连接碳-氮循环的关键节点,是TCA循环的关键中间产物之一。在近几年的研究中发现, α -KG参与生物代谢和体内多种生理和病理过程,在筛查和治疗恶性肿瘤、分析慢性心衰患者代谢方面,都展现出了极好的效果。此外,在食品、化工、医药等行业, α -KG也被广泛应用。所以,对 α -KG进行精确定量就尤为重要,本文就 α -KG分析检测方法及其应用等方面作一简要综述,希望能对 α -KG的进一步研究提供一些参考。

【关键词】 α -酮戊二酸;检测方法;综述

【中图分类号】O621.3 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2022.03.013

Research progress on analysis, detection and application of α -ketoglutaric acid

【Abstract】 α -Ketoglutarate (α -KG) is a key node connecting carbon-nitrogen cycle in cells and one of the key intermediates of TCA cycle. In recent years, studies have found that α -KG is involved in biological metabolism and various physiological and pathological processes in the body. It has shown excellent results in screening and treating malignant tumors and analyzing the metabolism of patients with chronic heart failure. In addition, α -KG is also widely used in food, chemical, pharmaceutical and other industries. Therefore, it is particularly important to accurately quantify α -KG. This paper briefly reviews the analysis and detection methods of α -KG and its application, hoping to provide some references for further research on α -KG.

【Key words】 α -ketoglutaric acid; detection method; review

α -KG在三羧酸循环(TCA)中由异柠檬酸氧化脱羧而来,又在 α -KG脱氢酶复合体的作用下第二次氧化脱羧生成琥珀酰辅酶A, α -KG可以由谷氨酰胺的转氨或脱氨作用转化来作为补充。 α -KG除了参与糖代谢、能量代谢,还与体内氮元素的转运也密切相关,参与生物体内氨基酸、维生素和有机酸的合成。在医药、食品、化妆品等领域也被广泛应用^[1-3]。

近年来的研究表明, α -KG可以作为一种代谢障碍的评价指标。例如, α -KG可以用来作为慢性肾小球肾炎病情的一个重要指标^[4],在该病的治疗过程中, α -KG可与低蛋白饮食搭配减缓肾炎发展,提高机体氧化能力,改善体内电解质紊乱从而保护肾功能^[5-7]。另外, α -KG在体内代谢的副产物丙酮酸以及丙酮酸盐可以增强心脏功能,保护心脏免受因缺血再灌注或氧自由基暴露而造成的可逆性损伤^[8],还可以用于改善血溶性休克,保护心脏、肾、脑等重要器官^[9]。最近的研究结果表明, α -KG能降低中性粒细胞百分比,且能提高淋巴细胞百分比,

同时也能增加红细胞血红蛋白质量浓度,提高机体免疫功能^[10],可作为潜在抗癌靶点用于临床治疗。由于 α -KG在机体内有着重要的作用,对其进行精确定量对于研究生物代谢过程有重要意义,而对于不同的样品,目前采用的分析化学方法也有较大差别。本文从 α -KG的分析检测、生理作用以及相关代谢中间产物的检测方法等方面进行了综述,对于如何针对不同样品选择合适的测定 α -KG的分析方法作一简要总结,以期对 α -KG的临床应用检测方法的优化提供借鉴。

1 α -KG的应用

1.1 α -KG在养殖业中的应用

近年来的研究表明, α -KG对于维护肠道健康有着非常好的效果^[11],这对于肠道疾病频发的养殖业具有重要的作用。有研究表明,在猪饲料中添加 α -KG能有效预防仔猪肠道上皮损伤,在哺乳期母猪的饲料中添加一定量的 α -KG后,母乳中乳糖和钙含量显著提升,因此 α -KG在畜牧业中被广泛应用于预防和治疗动物中肠道的功能性

* 通讯作者: 朱会宇(1989.10—),男,汉族,河南省郑州人,博士研究生,讲师,研究方向:分子生物学。

障碍以及哺乳期母猪的饲养^[12-13]。

热应激反应在家禽生产中是非常难以解决的问题，家禽的汗腺功能普遍非常弱，而羽毛又普遍较厚，因此极易形成热应激而影响家禽的饲养^[14]。在家禽饲料中添加 α -KG后，可以极大降低家禽的热应激性，减少死亡率，极大提高家禽存活率^[15-16]，这对于家禽饲养者来说有着巨大的经济价值。

1.2 α -KG 在慢性心衰患者中的应用

在研究慢性心衰患者血清中 α -KG的含量时发现，血清中的 α -KG浓度和慢性心衰患者的病情呈现极大的相关性，因此， α -KG可以作为心衰患者的诊断以及后期康复治疗时的一项重要指标^[17]，也已经被用于诊断和治疗慢性心衰患者的临床实践中。

2 α -KG 的检测方法

2.1 气相色谱-质谱联用分析法 (GC-MS)

该方法具有高分辨率、高灵敏度等优点，但由于酮戊二酸不具备挥发性，因此需要进行柱前衍生后才能进行检测，衍生后可以提高目标物的热稳定性和响应，进而降低目标物的检出限。衍生化试剂有2,4-二硝基苯肼、五氟苯肼、硅烷化试剂等。随着衍生化步骤的发展和简化，使用N-苯基-1,2-苯二胺(N-Phe-PDA)作为衍生化试剂能满足GC-MS的分离和检测条件。此外，采用气相色谱-质谱选择离子检测(SIM)模式对硅烷化的衍生物进行检测能优化衍生条件，可以在很大程度上使衍生物稳定性增加，检测灵敏度提高，并且在一定程度上避免复杂样品(人尿液、血浆、大鼠脑组织液)的基体干扰，能够实现样品中酮酸的定性定量分析^[18-19]。该方法的缺点是样品的前处理较复杂，需要一定的样品处理时间，可能会降低检测结果的精确性。

2.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)是最常用的分析方法。该方法能快速有效分离样品中的成分。通过不同的检测器可以对于药物、临床，甚至环境中的 α -KG都能进行精确测定，但目前限制HPLC测定 α -KG的主要是 α -KG的紫外吸收较弱，所以需要在HPLC分析条件上进行进一步优化，可以尝试在流动相中加入试剂或者使用分辨率更高的检测器来实现对其的测定，主要的检测器有以下几种。

2.2.1 示差折光检测

示差折光检测器(RID)是利用流动相与待测成分之间的折射率偏差来实现定量测定。有报道称，可以用示差折光检测器来检测发酵液中的 α -KG，发酵液中的尿素、蛋白质和维生素等培养基成分在有机酸检测波长范围内均有较强吸收，用紫外检测器来分析时易造成干扰，而培养基组分在示差折光检测器中的出峰不影响对目标物质的检测^[20]。

2.2.2 荧光检测器

荧光检测器(FD)用来检测能产生荧光或其衍生物能发出荧光的物质。荧光检测器的灵敏度非常高，常用来作为血浆、细胞类生物样品中 α -KG的分析检测器。

2.2.3 紫外检测器

使用紫外检测器对 α -KG进行测定时，一般需要先对样品中的 α -KG进行柱前衍生才能实现较高的分离度和较大的响应值。常用的衍生化试剂有2,4-DNPH、2-硝基苯肼(2-NPH)、OPD，还有一些新型衍生化试剂，例如用1,2-二氨基-1,2-二苯乙烷(1,2-diamino-1,2-diphenylethane SDA)等。

不经衍生化处理进行HPLC测定样品中的 α -KG时，需要在流动相中添加缓冲盐溶液或酸，选择合适的色谱柱柱温和流动相流速，从而实现待测成分的分离。有报道称，在流动相中加入离子对试剂四丁基氢氧化铵(TBAH)也可以对 α -KG实现定量测定。

2.2.4 质谱检测器

液质联用分析方法是近年来比较精确的定量分析测定手段。LC-MS测定生物样品时不需要衍生化处理，缩减了检测时间。运用电喷雾电离正负离子测定并采用同位素标记内标物可以消除生物基体效应影响，提高检测的灵敏度。

2.3 其他方法

除上述方法外， α -KG的检测方法还有电化学法、核磁共振、酶联、传感器等。核磁共振技术曾被用于啤酒中 α -KG的定量。酶联反应是通过对待测组分进行酶促反应转化成强紫外吸收的成分，从而实现精确定量。另外，近些年不断完善的传感器技术也可用于 α -KG的测定，传感器种类有酶传感器、比色传感器、无酶传感器等。其中酶传感器对待测成分的专属性强。无酶传感器可以在较宽浓度范围内和亚微摩尔水平上测定 α -KG，并可以在临床上对尿样和血样中 α -KG进行测定。

3 结论与展望

α -KG 作为生物代谢的关键成分, α -KG 能与氨基酸如丙酮酸、谷氨酸等相互转化, 与临床上的一些疾病密切相关, 通过检测尿液、血浆、组织液等生物成分中 α -KG 的含量, 可用于有些代谢疾病的诊断和治疗, 进一步了解详细的生物代谢过程。另外, α -KG 作为一些药物合成中间体, 治疗某些疾病时, 也可以作为药物质量控制的指标。

因此, 对 α -KG 的含量进行精确测定对于实验研究、临床实践都有重要意义。近些年随着 α -KG 相关临床研究的不断进展, 其检测方法也在不断完善中, 一些正在开发的新的 α -KG 的检测方法也逐渐被运用于实践并取得良好效果, 相信这些分析方法的发展会对未来的生物医药领域起到积极的推动作用。

参考文献:

- [1] 堵国成, 宋阳, 刘龙, 等. α -酮酸的合成方法及应用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(11): 1121-1127.
- [2] 付莹, 王红权, 赵玉蓉. α -酮戊二酸及其生理作用[J]. 湖南饲料, 2017, 5: 31-33.
- [3] Gao S S, Nathchar N, Cheng R, et al. Recent examples of α -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzymes in natural product biosyntheses[J]. Natural Product Reports, 2018, 35(8): 792-837.
- [4] 陈鹏, 涂杰, 周本宏. 石榴皮鞣质改善慢性肾小球肾炎大鼠的尿液代谢组学的通路分析[J]. 中国药师, 2017, 20(6): 969-973.
- [5] 沈洁, 赖剑锋. 对 1 例脑梗死合并肾功能不全患者的治疗方案分析和药学监护[J]. 中国临床药学杂志, 2014, 23(4): 249-252.
- [6] 梁劲松, 宋文林, 吴艳. α -酮酸联合低蛋白饮食治疗糖尿病肾病对机体氧化应激及电解质水平的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(16): 2717-2720.
- [7] Satirapoj B, Vongwattana P, Supasynhd O. Very low protein diet plus ketoacid analogs of essential amino acids supplement to retard chronic kidney disease progression[J]. Kidney Research and Clinical Practice, 2018, 37(4): 384-392.
- [8] Mallet R T, Olivencia-Yurvati A H, B ü nger R. Pyruvate enhancement of cardiac performance: Cellular mechanisms and clinical application[J]. Experimental Biology & Medicine, 2018, 243(2): 198-210.
- [9] 李琰光, 魏莹, 田社民, 等. 丙酮酸盐抗休克作用及相关机制的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志, 2017, 12(5): 370-373.
- [10] 岳东, 解培培, 卢静怡, 等. 固态发酵生产 α -KG 及其对小鼠生长、肠道结构和免疫机能的影响[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 1-9.
- [11] He L, Zhou X, Niu H, et al. Administration of alpha-ketoglutarate improves epithelial restitution under stress injury in early-weaning piglets[J]. Oncotarget, 2017, 8(54): 91965-91978.
- [12] Jiang Q, Adebawale T O, Tian J, et al. Effects of maternal alpha-ketoglutarate supplementation during lactation on the performance of lactating sows and suckling piglets[J]. Archives of animal nutrition, 2019, 73(6): 1-15.
- [13] 李硕, 邹田德, 王自蕊, 等. α -酮戊二酸的代谢机理, 营养生理功能及其在养殖生产中的应用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(5): 923-932.
- [14] 黄冠庆, 余亲平, 陈雁群, 等. α -酮戊二酸对黄羽肉鸡饲料代谢能和蛋白质代谢的影响[J]. 中国饲料, 2012(18): 22-24.
- [15] 杨书慧, 谭灵琳, 廖满, 等. α -KG 对热应激肉鸡生长性能和肌肉品质的影响[J]. 饲料工业, 2014, 35(22): 11-16.
- [16] 陈平安. 慢性心力衰竭患者血清 α -酮戊二酸水平的变化及其临床意义的研究[D]. 南方医科大学, 2014.
- [17] 高慧敏, 侯捷, 盛立彦, 等. 气相色谱-三重四级杆质谱法测定大肠杆菌中有机酸的含量[J]. 化学试剂, 2020, 42(4): 401-405.
- [18] Nguyen D T, Lee G, Paik M J. Keto acid profiling analysis as ethoxime/tert-butyl dimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life, 2013, 913(2): 48-54.
- [19] 付永前, 高振, 李霜, 等. 离子排斥色谱法分析米根霉富马酸发酵液中的代谢产物[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 131-134.
- [20] 杨阳, 焦淑玲, 朱美旗, 等. HPLC 法检测几种 α -酮酸化合物的柱前衍生化条件优化[J]. 当代化工, 2020, 49(8): 1820-1824.