

使用 LC/MS 和 GC/Q-TOF 技术强化 土坛树树皮代谢物分析

应用简报

代谢组学

作者

Chandranayak Siddaiah、Harischandra

Sripathi Prakash

迈索尔大学生物技术系

印度迈索尔

Saligrama Adavigowda Deepak、Syed

Salman Lateef 和 Upendra Simha

安捷伦科技公司（印度）

印度班加罗尔

摘要

传统草药被用作许多疾病的替代药物。土坛树就是这样一种传统药用植物。目前已有多项研究使用到这种植物的提取物，这也证明了其具有治疗价值。但是，极少有人尝试确定这种植物复杂的代谢物组成。在本应用简报中，我们用有机溶剂和水性溶剂对样品进行提取，对土坛树树皮上的代谢物进行分析和鉴定。通过 Agilent 1260 的分析型馏分收集系统对有机溶剂提取物和水提取物进行馏分收集。并利用 LC/MS 和 GC/Q-TOF 技术分析每种馏分。使用 HILIC 色谱和三个独立的正交反向色谱柱进行 LC/MS/MS 分析。使用 AJS 离子源在正离子和负离子模式下收集数据，然后在 METLIN 数据库或 MS/MS 谱库中进行搜索。那些未能获得数据库和谱库匹配的八角枫属化合物继而还可以使用安捷伦 MSC 软件在收录超过 3000 万个结构的 ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) 数据库中进行搜索。为了鉴定由 GC/Q-TOF 分析结果所产生的化合物，可以通过 Agilent-Fiehn GC/MS 代谢组学谱库和 Wiley/NIST 谱库对数据进行检索。借助多个 GC 谱库的搜索结果鉴定出 62 种化合物，匹配得分均大于 70。

使用两种技术共检测出 1016 种化合物，其中有 511 种化合物被成功鉴定。文献检索显示，511 种化合物中有 81 种对癌症、微生物感染等传统疾病具有治疗效果。我们的研究表明，使用馏分收集法进行代谢物富集、用双相溶剂提取以及正交色谱柱固定相进行代谢物分离，并采用互补的 LC/MS 和 GC/MS 检测，可以提高药用植物的代谢物检测范围。



Agilent Technologies

前言

土坛树是印度阿育吠陀医学和中医学里的一种药用植物。这种植物通常用于治疗癌症、麻风病、糖尿病、瘫痪、微生物感染等多种疾病。植物的每个部分都可口服或者外用，具体取决于所治疗的疾病类型。此前已有实验将这种药用植物与特定疾病或效能建立起关联^{1,2}。

非靶向代谢组学的综合评估是指使用 LC/MS、GC/MS 和 NMR 等互补的通用分析技术对所获样品中的生化中间体信息进行无偏见分析。影响代谢组综合评估的因素取决于：

- 样品采集/提取程序中所用的方法
- 分馏
- 色谱分离固定相
- 电离技术/模式
- 采集参数
- 数据处理/分析
- 数据库/谱库鉴定⁵

本研究使用正交 LC/MS 和 GC/Q-TOF 技术对这种植物茎皮的代谢物进行综合分析，包括使用最新的谱库和数据库鉴定代谢物。

实验部分

工作流程

表 1 概述了本研究所用的工作流程。

表 1. 工作流程概述：先进行双相溶剂提取，再使用 LC/MS 和 GC/MS 平台分析

水提取物	收集 → 瞬间冷冻 → 储存	有机溶剂提取物
馏分收集	馏分收集	馏分收集
LC/MS 和 LC/MS/MS Agilent Poroshell 120 HILIC Plus 和 Agilent ZORBAX RRHD SB-Aq 色谱柱	LC/MS 和 LC/MS/MS Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 和 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱	LC/MS/MS 分析 METLIN 数据库/谱库
GC/MS Agilent DB-5ms 色谱柱	GC/MS Agilent DB-5ms 色谱柱	GC/MS 分析 Fiehn/Wiley/NIST 谱库
GC/MS 分析 Fiehn/Wiley/NIST 谱库	GC/MS 分析 Fiehn/Wiley/NIST 谱库	GC/MS 分析 Fiehn/Wiley/NIST 谱库

试剂与材料

LC/MS 级的异丙醇、甲醇和乙腈购自 Fluka 公司（德国）。使用 Milli Q 水（Millipore Elix 10 型，美国）进行流动相配制。添加剂（氟化铵、乙酸、甲酸铵、甲酸和乙酸铵）购自 Fluka 公司（德国）。

植物材料采集和提取程序

从印度迈索尔附近的土坛树上采集土坛树树皮并将其立即转移至液氮中，储存在 -80 °C 的温度下备用。使用研钵和研杵将 2 g 树皮组织在液氮中研磨为粉末。加入 40 mL 氯仿:甲醇:水比例为 1:2.5:1 (v/v/v) 的脱气溶液，对树皮粉末进行提取。将未溶解的样品用研钵和研杵碾碎 5 min，随后将其转移至 1.5 mL Eppendorf 管中，在 4 °C 下涡旋混合 5 min。在 20800 rpm 的转速下将该管离心 2 min，将所有管中的上清液合并至一个玻璃样品瓶内。将 1 mL 上清液转移至 Eppendorf 管中，加入 400 μL 水。将该管涡旋混合 10 s，然后在 20800 rpm 的转速下离心 2 min。分离水层（上层）和有机层（下层），并分别置于 SpeedVac 浓缩器（Eppendorf 浓缩仪）中蒸干。

馏分收集

向蒸干后的水层和有机溶剂层中加入 200 μL 各自分馏法所使用的流动相 A 和 B（体积比分别为 50:50 和 30:70）（表 2）。对样品瓶进行超声处理使化合物重新悬浮。将装有各种提取物的多个样品瓶的重悬混合物注入到配备 1 mL 手动 FL 进样阀（部件号 5067-4191）的 Agilent 1260 Infinity 分析型纯化系统中进行 HPLC 分离，将馏分收集在 96 孔板的 45 个孔中，然后用 SpeedVac 浓缩器蒸干。

双重 AJS-ESI-Q-TOF MS 条件

将蒸干后的水馏分重新悬浮于 250 μL 50:50 甲醇:含 0.2% 乙酸的水溶液中，超声处理 10 s，将有机溶液馏分悬浮于 30:70 流动相 A:B（表 3 - 有机），然后在 3000 rpm 的转速下离心 10 min。然后，将 5 μL 重悬馏分注入与 Agilent 6540 精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统相连接的 Agilent 1260 Infinity LC 系统中。使用 API-TOF 参比质量溶液试剂盒（部件号 G1969-85001）制备参比溶液。将 10 μL HP921 和 5 μL 嘌呤溶解在 1 L 甲醇:乙腈:含 0.1% 乙酸的水 (750:200:50) 溶液中，并使用等度泵在 0.4 mL/min 的流速下进行雾化。质谱和色谱参数如表 3A 和 3B 所示。

表 2. 分馏法的色谱参数

参数	水提取物	有机溶剂提取物
流动相	A) 水 + 10 mM 乙酸铵 B) 100% 乙腈	A) 95:5 水:含 0.1% 甲酸和 5 mM 甲酸铵的甲醇溶液 B) 65:30:5 异丙醇:甲醇:含 0.1% 甲酸和 5 mM 甲酸铵的水溶液
流速	1.2 mL/min	1.2 mL/min
进样量	1 mL	0.3 mL
自动进样器温控	4 °C	4 °C
TCC 温度	25 °C	25 °C
DAD	210 和 254 nm	210 和 254 nm
峰宽	> 0.05 min	> 0.05 min
馏分收集模式	基于时间	基于时间
总耗时	13 min	13 min
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 9.4 × 50 mm, 5 µm (部件号 846975-202)	
时间段	每孔 0.292 min	每孔 0.292 min
梯度	时间 (min) % 溶剂 B 0.0 5 1.0 5 8.0 35 8.1 95 10.0 95 10.1 5 12.0 5	时间 (min) % 溶剂 B 0.0 60 1.0 60 8.0 100 11.0 100 11.1 60 12.0 60

表 3B. LC/MS 和 LC/MS/MS 分析使用的色谱参数

参数	使用 Agilent ZORBAX RRHD SB-Aq, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm 色谱柱 (部件号 857700-914) 分析水馏分		使用 Agilent Poroshell 120 HILIC Plus, 3.0 × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱 (部件号 699975-301) 分析水馏分	
	正离子模式 MS 和正离子模式 AutoMSMS	负离子模式 MS 和负离子模式 AutoMSMS	正离子模式 MS 和正离子模式 AutoMSMS	负离子模式 MS 和负离子模式 AutoMSMS
流动相	A) 含 0.2% 乙酸的水 B) 含 0.2% 乙酸的甲醇	A) 含 1 mM 氟化铵的水 B) 100% 乙腈	A) (90:10) 乙腈:含 50 mM 乙酸铵的水溶液 A) (50:40:10) 乙腈:100% 水:含 50 mM 乙酸铵的水溶液	
LC 梯度	时间 (min) % 流动相 B 1.00 5.0 10.0 35.0 11.0 95.0 13.0 95.0 13.1 5.0 15.0 5.0		时间 (min) % 流动相 B 3.00 0.0 10.00 100.0 13.00 100.0 13.10 0 17.00 0	
参数	使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 50 mm, 1.8 µm 色谱柱 (部件号 959757-302) 分析有机馏分		使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3.0 × 50 mm, 1.8 µm 色谱柱 (部件号 959757-312) 分析有机馏分	
	正离子模式 MS 和正离子模式 AutoMSMS	负离子模式 MS 和负离子模式 AutoMSMS	正离子模式 MS 和正离子模式 AutoMSMS	负离子模式 MS 和负离子模式 AutoMSMS
流动相	A) 95:5 水:含 0.1% 甲酸和 5 mM 甲酸铵的甲醇溶液 B) 65:30:5 异丙醇:甲醇:含 0.1% 甲酸和 5 mM 甲酸铵的水溶液			
LC 梯度		时间 (min) % 流动相 B 1.00 60.0 8.00 100.0 11.00 100.0 11.10 60.0 14.00 60.0		

表 3A. LC/MS 和 LC/MS/MS 分析中使用的 MS 离子源和色谱参数

LC/MS 参数	
进样量	5 µL
流速	0.4 mL/min
恒定柱温	40 °C
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	30 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	100 V

GC/Q-TOF 条件

水馏分和有机馏分的衍生化和实验参数如其他文献所述⁶。使用 Agilent 7200 GC/Q-TOF 在绝对保留时间下采集，用保留时间锁定 (RTL) 软件系统对 Agilent Fiehn GC/MS 代谢组学标准品套装（部件号 400505）的内标 d27 肉豆蔻酸的保留时间进行锁定即为绝对保留时间。GC/Q-TOF 使用条件如表 4 所示。

数据分析

使用 Agilent MassHunter 定性分析（版本 B.06.00 SP1）软件处理 MS 和 AutoMSMS 数据。使用分子特征查找工具处理精确质量数 MS 数据，将化合物导出至 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件。为了去除背景所产生的分子特征，以 MPP 中的空白数据作为背景从各个馏分获得的数据中扣除。使用 ID 浏览器在包含 64092 种化合物的 METLIN 数据库中进行搜索，以鉴定所推断的化合物。

使用 AutoMSMS 查找工具处理 LC/MS/MS 数据，将生成的谱图与包含 19714 种化合物的精确质量数 MS/MS 信息的 Metlin 代谢物谱库进行比对。八角枫属中发现的几种选定化合

表 4. GC/Q-TOF 使用的条件

气相色谱条件	
色谱柱	Agilent DB-5ms, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, 保护柱长度 10 m (部件号 122-5532G)
进样量	1 μL
分流模式和比例	分流比 10:1
分流/不分流进样口温度	250 °C
柱温箱升温程序	60 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 的速率升至 325 °C, 保持 10 min
载气	氦气, 1.2798 mL/min, 恒流
传输线温度	290 °C
Q-TOF 条件	
电离模式	EI
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
m/z 扫描	50-600 m/z
谱图采集速率	5 幅谱图/每秒, 2679 个瞬变信号/每幅谱图, 以棒状图和轮廓图两种模式采集

物可在 METLIN 数据库中检测到但未在 Metlin 谱库中检测到，使用分子结构相关软件 (MSC) 对这些化合物进行处理。使用 MSC 软件（版本 B.05.00 型号 19）对预测的结构或从数据库搜得的结构执行有规则指导的键断裂，并将其与观察到的碎片离子相比较，然后给出总体得分。界面提供了公式和总体得分 (MS 和 MS/MS 组合得分)，以及碎片离子元素组成式和 ppm m/z 误差。

使用 MassHunter 未知物分析软件（版本 B.06.00）处理 7200 GC/Q-TOF 的数据。该软件使用质谱解卷积，通过模型离子迹线自动找出共洗脱复合体的峰和解卷积质谱图。将谱图信息与带有 FAME 混标 (Agilent Fiehn GC/MS 代谢组学标准试剂盒，部件号 400505) 保留时间指数的 Agilent-Fiehn 谱库进行比对。还可使用 NIST 11 和 Wiley 9 质谱库搜索数据。仅对谱库匹配得分 > 70% 的化合物进行研究。按 LC/MS/MS 和 GC-QTOF 的结果进一步在文献中检索，以确定这些化合物的治疗价值。

结果与讨论

在本应用简报中，我们使用多分离方案/电离模式和多平台方法对土坛树树皮代谢物进行了综合分析。最初，我们注入 1 mL 提取物进行水和有机溶剂提取物的馏分收集，以初步分离和富集代谢物。将精确质量数 MS 结果与 METLIN 数据库比对，初步发现 954 种化合物，其数据库匹配得分 $> 90\%$ 。文献检索显示，954 种化合物中有 81 种具有治疗功效。这些治疗性化合物中大多数是次级代谢物，据报道这些次级代谢物具有抗癌和抗炎活性（图 1）。这些化合物属于各种植物次级代谢物，如萜类、黄酮类、皂苷类、生物碱类、糖苷类等。对所有馏分进行 AutoMSMS 分析，鉴定出 449 种化合物。

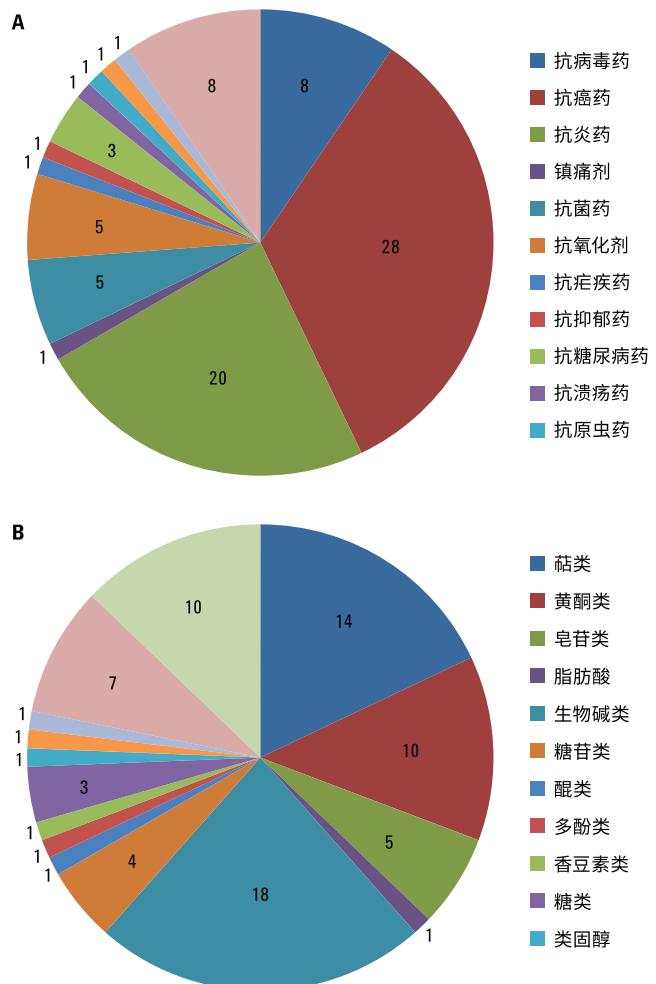


图 1. 土坛树中与 METLIN 数据库匹配的化合物和根据文献报道按照治疗用 (A) 和化合物类别 (B) 进行的分组

本研究中有五种常见的八角枫属化合物无法通过 LC/MS/MS 图谱匹配进行鉴定, 因为 METLIN MS/MS 谱库中没有这些化合物的图谱。使用 Agilent MassHunter MSC 软件通过图谱信息鉴定这五种化合物 (图 2)。除吐根酚碱的总体 MSC 得分为 80% 之外, 其他所

有化合物的总体 MSC 得分均 > 97%。使用吐根酚碱母离子和碎片离子的精确质量数信息和 METLIN 的精确质量数据库, 我们可以根据吐根酚碱的 MS/MS 谱图推断其结构 (图 3)。因此, 用 MSC 进行初步 ID 确认的方法可以成为筛选许多化合物的一种有效

工具, 利用实际标准品进行后续的确认。表 5 显示了通过 MSC 软件鉴定的八角枫属化合物的结果。

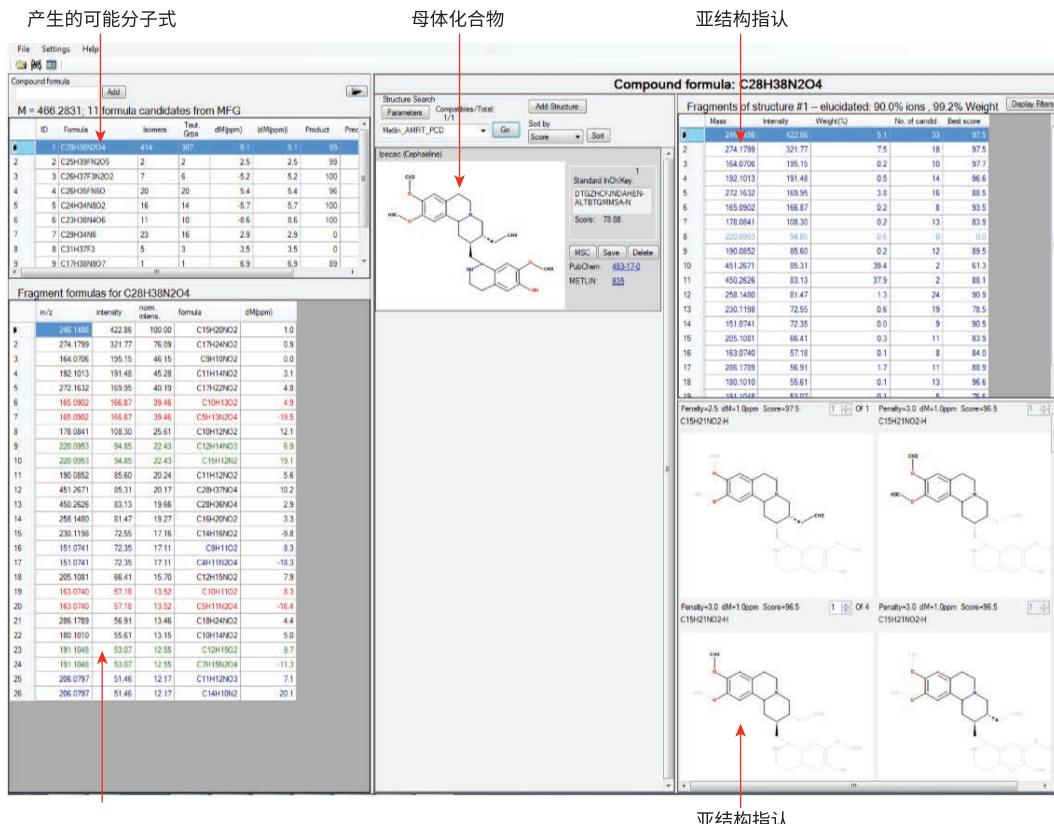


图 2. 使用 Agilent MSC 软件工具对 METLIN MS/MS 谱库中无匹配的化合物进行鉴定的结果

LC/MS/MS 的分离固定相分别使用 Poroshell HILIC Plus 和三个正交反相色谱柱 (ZORBAX Eclipse Plus C18、ZORBAX Eclipse Plus SB-Aq 和 ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl) 以分离亲水和疏水化合物。ZORBAX Eclipse Plus C18 鉴定出的化合物数量最多 (197)，其次是 ZORBAX Eclipse Plus SB-Aq (187)、Poroshell HILIC Plus (175) 和 ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱 (139) (图 4)。HILIC Plus/SB-AQ 和 Eclipse Plus C18/Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱之间有明显的化合物重叠：分别为 53 种和 59 种。只有 10 种化合物在所有色谱柱类型上均得到分离。三种不同的反相色谱柱 Eclipse Plus C18、Eclipse Plus SB-AQ 和 Eclipse Plus Phenyl Hexyl 分别分离出 79、73 和 28 种独特化合物。Poroshell HILIC Plus 则分离出 80 种独特化合物。之前使用 HILIC 和反相 Eclipse Plus C18 色谱柱在更大的代谢物检测范围内也观察到类似情形⁷。我们使用三种不同反相色谱柱 (用于非极性和中性极性化合物) 并单独使用 HILIC 柱 (用于极性化合物)，得到的结果清楚显示了高质量代谢组学研究对不同分离固定相的要求。

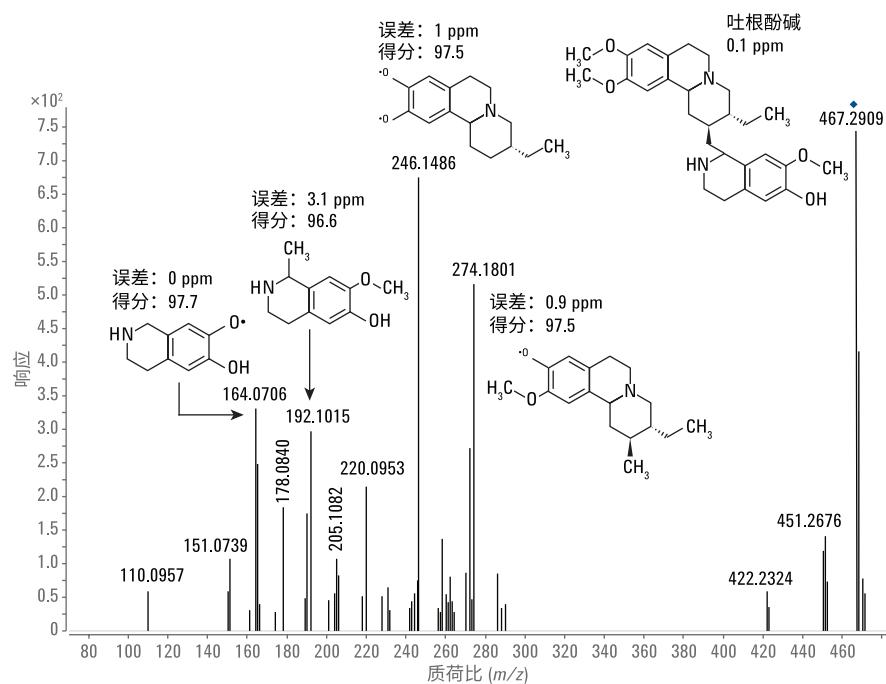


图 3. 根据 MSC 分析推断的吐根酚碱代谢物碎片结构

表 5. 使用安捷伦 MSC 软件鉴定八角枫属中发现的化合物

代谢物	CAS/KEGG	分子式	质量数误差 (ppm)	总体得分
安可任	13849-54-2	C ₁₉ H ₂₉ NO ₄	-2.56	99.94
脱氧土布洛生	C11817	C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₂	-0.69	98.97
吐根 (吐根酚碱)	483-17-0	C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₄	-0.28	80.06
裂叶榆枋 C 7-甲基醚	56362-72-2	C ₁₆ H ₂₀ O ₃	-1.84	98.95
土布洛生	2632-29-3	C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₃	2.86	97.31

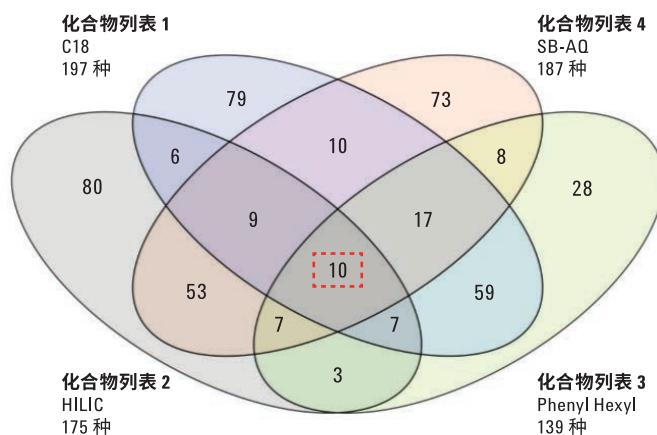


图 4. 基于不同色谱柱固定相能够在 METLIN 谱库中找到匹配的化合物分布。使用 MPP 软件作图

图 5 汇总了正负离子化模式下 MS/MS 分析得到的化合物。在本研究的两种电离模式下，使用的所有色谱柱固定相对分离出的化合物具有明显的差异。与正离子模式电离相比，负离子模式电离中检测到更多的糖类和酸性氨基酸。在正离子模式电离和负离子模式电离中，所有色谱柱类型检测到的相同化合物种类不足 9 种。这说明使用单一电离模式会显著缩小代谢物的检测范围。

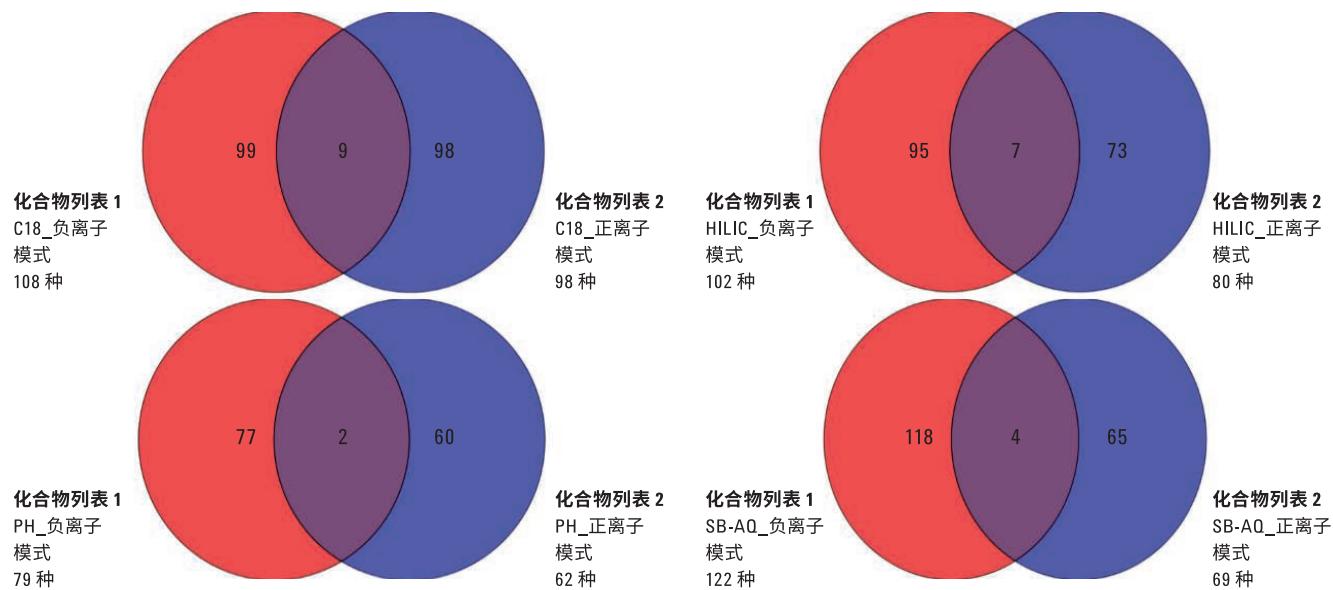


图 5. 基于不同电离模式能够在 METLIN 谱库中找到匹配的化合物分布

图 6 为 MassHunter 未知物分析软件的屏幕截图。该软件具有色谱对比功能、与数据库谱图相匹配的查询、分子结构以及组分相关的内容。其中，组分一栏包括每种化合物的详细信息。

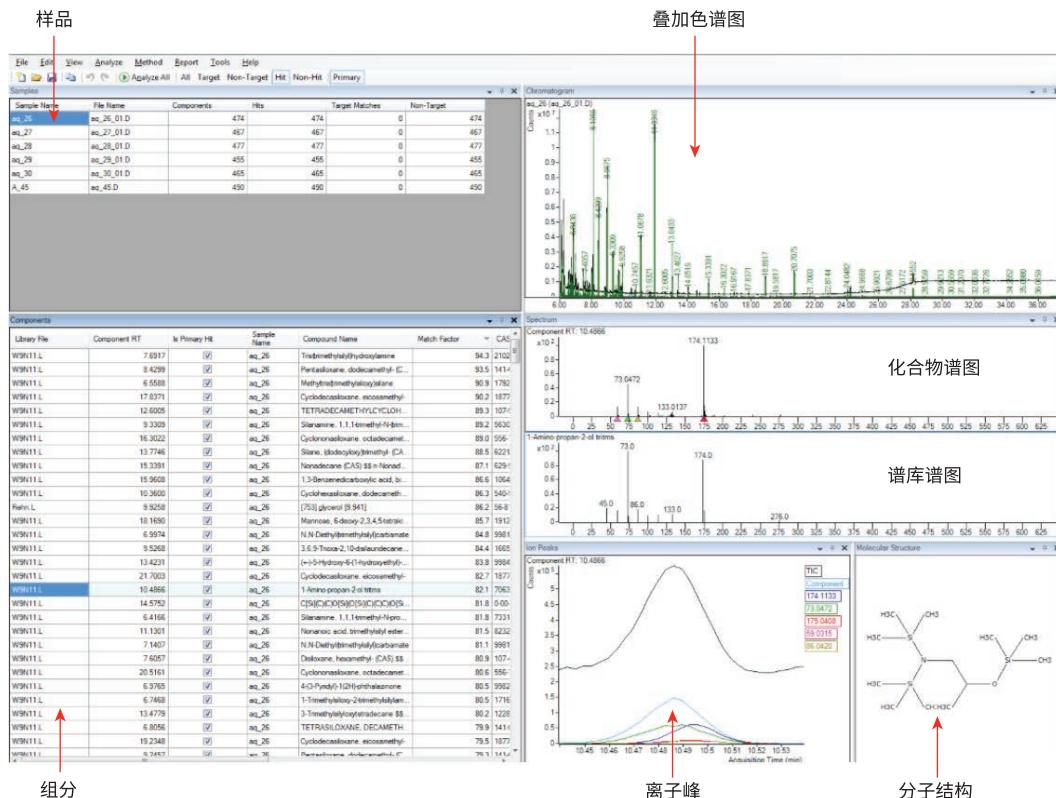


图 6. 使用 Agilent MassHunter 未知物分析软件进行 Fiehn/Wiley/NIST 谱库匹配分析所得结果

GC/Q-TOF 发现的化合物主要是黄酮类、脂肪酸、糖类、萜烯等。例如，图 7 所示为使用 MassHunter 未知物分析软件从水提取物的 GC/Q-TOF 分析结果中鉴定出的 D-来苏糖。图 7A 为采集到的 GC/Q-TOF 谱图，图 7B 为 Fiehn 谱库中的谱图。匹配得分为 89.6。此外，谱库中的保留时间 (RT) (14.74 min) 也与采集谱图的保留时间 (14.75 min) 相匹配。

经 LC/MS/MS 和 GC/Q-TOF 分析各鉴定出 449 种和 62 种化合物。LC/MS/MS 鉴定到的化合物数量较多，主要是由于使用了正交色谱柱。这可以充分证明，LC/MS 和 GC/Q-TOF 是综合代谢组学鉴定非挥发性和挥发性化合物的互补技术（图 8）。

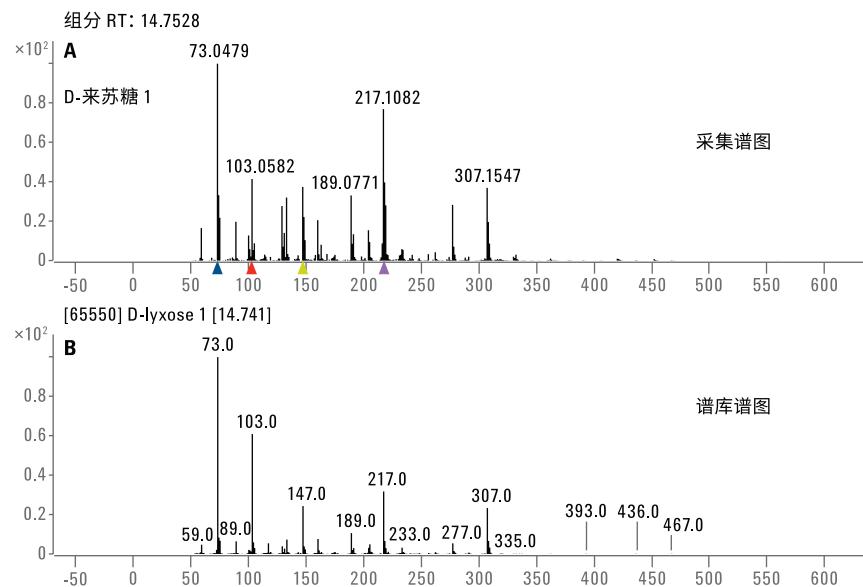


图 7. GC/Q-TOF 谱图检索结果

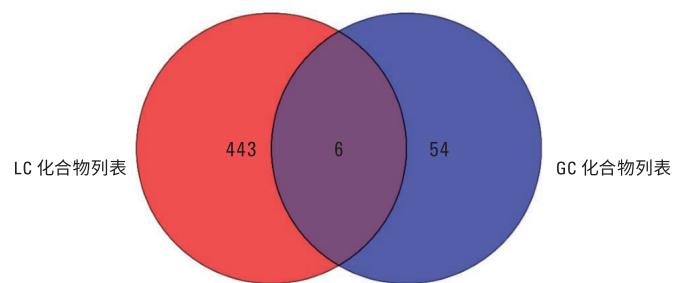


图 8. 经 LC/MS/MS 和 GC/Q-TOF 分析所鉴定的化合物

结论

本研究证明应用综合代谢物分离和检测策略有助于鉴定土坛树树皮中的代谢物。使用分馏法富集化合物。此外，使用多平台法检测具有不同极性的化合物。使用四种不同色谱柱固定相，结合两种电离模式，增加了鉴定代谢物的总数。对于未能在 METLIN 谱库中找到的化合物可用 MSC 软件进行鉴定。我们的研究结果表明，本研究中鉴定出的 81 种次级代谢物均有治疗价值。

参考文献

1. Hung, T.M., et al. Phenolic glycosides from *Alangium salvifolium* leaves with inhibitory activity on LPS-induced NO, PGE2, and TNF- α production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, pp 4389-4393
2. Anjum, A., et al. Antibacterial compounds from the flowers of *Alangium salvifolium*. *Fitoterapia* **2002**, 73, pp 526-528
3. Sharma, A.K., et al. Antidiabetic effect of bark of *Alangium salvifolium* in alloxan-induced diabetic rats. *J. of Global Pharma. Tech.* **2011**, 3(4), pp 26-32
4. Murugan, V., et al. Anti-fertility activity of the stem bark of *Alangium salvifolium* (Linn. f.) Wang in wistar female rats. *Indian J. Pharmacol.* **2000**, 32, pp 388-9
5. Commisso, M., et al. Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2013**, 4(5) e201301007
6. Palazoglu, M., and Fiehn, O. Metabolite Identification in Blood Plasma Using GC/MS and the Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (采用气质联用和 Agilent Fiehn 气质联用代谢组学 RTL 谱库对血浆中的代谢物进行鉴定)。安捷伦科技有限公司应用简报，出版号 5990-3638EN，2009
7. Aurand, C.R., et al. Metabolomic Profiling of *Neurospora crassa* Fungi Using HILIC and Reversed Phase LC/MS. *Reporter* **2014**, 56, pp 13-14

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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, 2014
2014年6月1日, 中国出版
5991-4663CHCN



Agilent Technologies