

GCMS-TQ8050 结合岛津代谢物数据库分析冬虫夏草代谢物

GCMSMS-137

摘要： 本文使用岛津公司三重四极杆气相色谱质谱联用仪 GCMS-TQ8050 结合代谢物数据库，无需标准品，建立了 467 种代谢物的 MRM 筛查方法，利用此方法筛查定性了冬虫夏草中代谢产物 143 种。

关键词： 三重四极杆气相色谱质谱联用仪 代谢物 冬虫夏草

虫草是指虫草属真菌寄生在昆虫、少数真菌和植物体上的子座和寄主尸体的复合体。虫草中药用价值最高的当属冬虫夏草，冬虫夏草是麦角科植物真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体。野生冬虫夏草仅产于海拔 3500 m 以上的高原地区，现已知的主要的代谢成分有腺苷、尿苷、鸟嘌呤、鸟苷、甘露醇、多糖、氨基酸等。中国药典规定以腺苷的含量为冬虫夏草的质量标准，但是单使用腺苷含量为标准容易受采集时间和人为添加等因素的影响，因此仅以腺苷含量作为评价标准具有一定的局限性。

代谢组学主要研究的是作为各种代谢路径的底物和

产物的小分子代谢物，从整体上探讨生命活动在代谢层面的特征和规律，研究手段有气相色谱质谱联用法、液相色谱质谱联用法及核磁共振技术等。岛津公司专门为代谢物分析开发了代谢物数据库，该数据库覆盖了 568 种 (Scan)、475 种 (MRM) 化合物的质谱图、保留指数、MRM 离子对等信息，可实现在无标准品的情况下快速筛查样品中代谢物。

本文使用 GCMS-TQ8050 结合岛津代谢物数据库，建立了 467 种代谢物 MRM 筛查方法，并使用此方法对产自西藏那曲地区的冬虫夏草进行了代谢物筛查定性。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8050 三重四极杆气质联用仪

1.2 分析条件

色谱柱：DB-5，30 m×0.25 mm×1.0 μm

柱温程序：100℃ (4 min)_4℃ /min_320℃ (8 min)

进样口温度：280℃

载气控制方式：恒线速度

线速度：39 cm/sec

进样方式：分流进样

分流比：10:1

离子源温度：200 °C

接口温度：280 °C

检测器电压：调谐电压 +0.5 kV

采集模式：MRM

1.3 样品前处理

样品提取： 冬虫夏草样品磨碎，称取样品 30 mg 放入 2 mL 离心管中，加入 1 mL 甲醇/纯水/氯仿混合溶剂 (2.5:1:1, v/v/v) 提取代谢物，同时加入 50 μL 核糖醇 (0.2 mg/mL, 无菌水配置) 作为替代物。混合物涡旋震荡 1 min，在 4℃，16000 rpm 转速下离心 3 min。移取 900 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中，向上清液中加入 400 μL 无菌水稀释，上清液涡旋并离心 3 min，将 400 μL 水相部分转移至 1.5 mL 具塞离心管中，最后加入 50 μL 2- 异丙基苹果酸 (0.2 mg/mL, 无菌水配置) 作为内标。提取液放置在低温干燥箱中，真空干燥 120 min，每个样品处理 2 份。

提取物衍生： 向干燥的提取物中加入 100 μL 甲氧基胺盐酸盐 (20 mg/mL, 吡啶配置)，在 30℃ 下保持 90 min。加入 50 μL MSTFA，在 37℃ 衍生 30 min。衍生产物在 4℃、8000 rpm 离心后，移取上清液至 1.5 mL 样品瓶中，待测。

结果与讨论

2.1 代谢物 MRM 方法建立过程

使用代谢物数据库方法包中的 OA_TMS_DB5_67min_V3_HC 方法测定正构烷烃 (C9-C33) 标液, 用于调整数据库中代谢物的保留时间。正构烷烃质量色谱图见图 1。

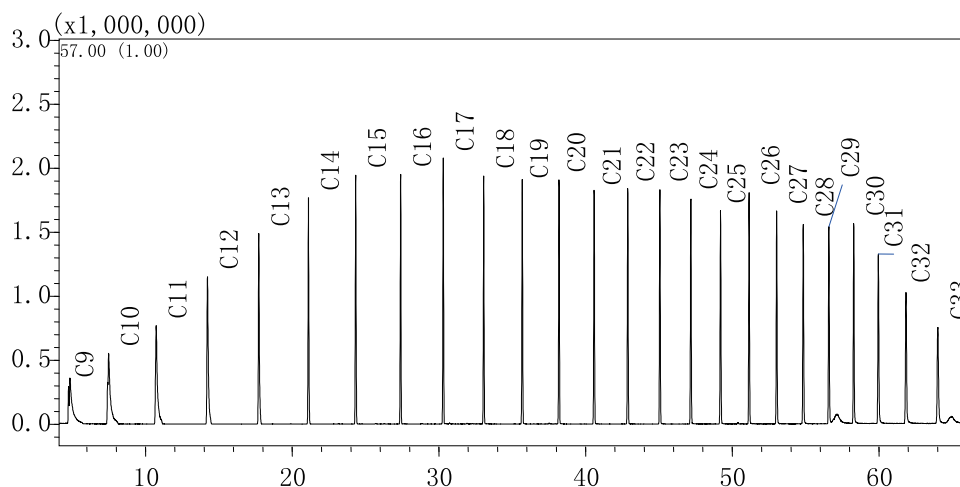


图1 正构烷烃 (C9-C33) 质量色谱图 (5 μg/mL)

然后利用正构烷烃数据及 Smart Metabolites Database 建立 467 种代谢物 MRM 方法文件。图 2 为 Smart Metabolites Database 数据库的创建方法界面。

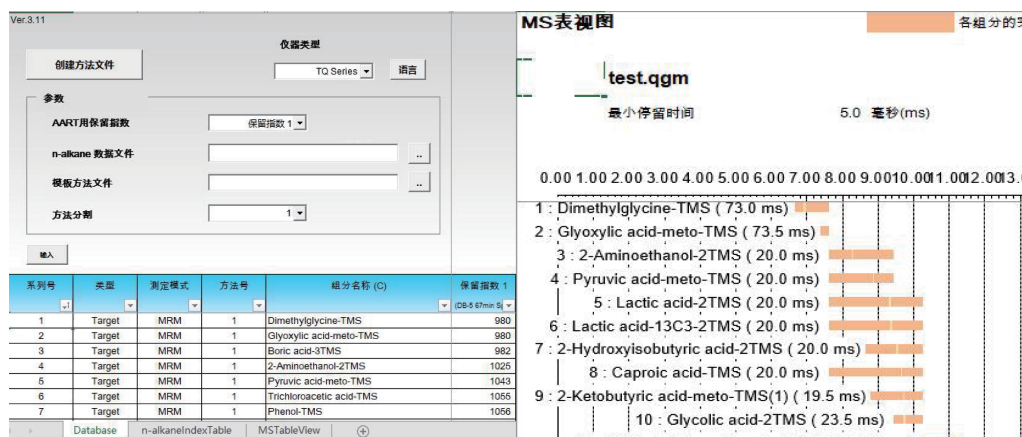


图2 Smart Metabolites Database创建MRM方法界面

2.2 冬虫夏草代谢物衍生产物 TIC 图

通过 GCMS-TQ8050 调用建立的 467 种代谢物衍生产物 MRM 方法, 并对按着 1.3 过程处理后的冬虫夏草样品进行筛查分析, 冬虫夏草代谢物衍生产物 TIC 图如图 3 所示。

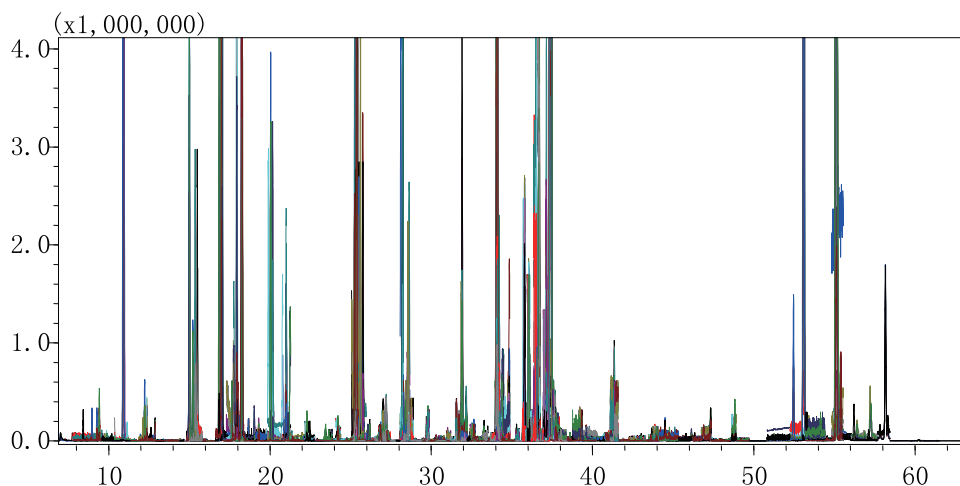


图3 冬虫夏草代谢物衍生产物TIC图

2.3 冬虫夏草代谢物衍生产物定性结果

表1 冬虫夏草代谢物定性结果

No.	英文名称	化合物	保留时间 (min)	CAS 号	目标峰面积/ 内标峰面积
1	Dimethylglycine-TMS	二甲基甘氨酸-TMS	7.028	1118-68-9	0.373
2	2-Aminoethanol-2TMS	2-氨基乙醇-2TMS	8.419	141-43-5	0.101
3	Pyruvic acid-meto-TMS	丙酮酸-meto-TMS	8.973	127-17-3	0.008
4	Lactic acid-2TMS	乳酸-2TMS	9.421	79-33-4	0.996
5	2-Hydroxyisobutyric acid-2TMS	2-羟基异丁酸-2TMS	9.619	594-61-6	0.007
6	Caproic acid-TMS	己酸-TMS	9.749	142-62-1	0.025
7	Glycolic acid-2TMS	乙醇酸-2TMS	9.870	79-14-1	0.204
8	Alanine-2TMS	丙氨酸-2TMS	10.943	302-72-7	2.928
9	Glycine-2TMS	甘氨酸-2TMS	11.420	56-40-6	0.105
10	Hydroxylamine-3TMS	羟胺-3TMS	11.582	7803-49-8	0.034
11	2-Hydroxybutyric acid-2TMS	2-羟基丁酸-2TMS	11.752	600-15-7	0.003
12	3-Hydroxypropionic acid-2TMS	3-羟基丙酸-2TMS	12.260	503-66-2	0.073
13	3-Hydroxybutyric acid-2TMS	3-羟基丁酸-2TMS	12.868	300-85-6	0.024
14	2-Aminobutyric acid-2TMS	2-氨基丁酸-2TMS	13.383	2835-81-6	0.020
15	Malonic acid-2TMS	丙二酸-2TMS	14.398	141-82-2	0.065
16	3-Aminoisobutyric acid-2TMS	3-氨基异丁酸-2TMS	14.663	10569-72-9	0.004
17	3-Hydroxyisovaleric acid-2TMS	3-羟基异戊酸-2TMS	14.667	10237-77-1	0.020
18	Valine-2TMS	缬氨酸-2TMS	14.951	72-18-4	2.512
19	Benzoic acid-TMS	苯甲酸 (安息香酸) -TMS	16.035	65-85-0	0.052
20	2-Aminoethanol-3TMS	2-氨基乙醇-3TMS	16.879	141-43-5	2.549
21	Leucine-2TMS	亮氨酸-2TMS	16.949	61-90-5	0.727

22	Glycerol-3TMS	甘油-3TMS	17.010	56-81-5	2.459
23	Acetylglycine-TMS	乙酰甘氨酸-TMS	17.074	543-24-8	0.015
24	Phosphoric acid-3TMS	磷酸-3TMS	16.966	7664-38-2	4.131
25	Nicotinic acid-TMS	烟酸-TMS	17.638	59-67-6	0.451
26	Isoleucine-2TMS	异亮氨酸-2TMS	17.744	73-32-5	1.683
27	Phenylacetic acid-TMS	苯乙酸-TMS	17.797	103-82-2	0.050
28	Proline-2TMS	脯氨酸-2TMS	17.890	147-85-3	2.807
29	Maleic acid-2TMS	马来酸-2TMS	17.955	110-16-7	0.020
30	Succinic acid-2TMS	丁二酸 (琥珀酸) -2TMS	18.207	110-15-6	0.631
31	Glycine-3TMS	甘氨酸-3TMS	18.296	56-40-6	2.620
32	Methylsuccinic acid-2TMS	甲基丁二酸 (甲基琥珀 酸) -2TMS	18.669	498-21-5	0.007
33	Glyceric acid-3TMS	甘油酸-3TMS	19.006	473-81-4	0.769
34	Fumaric acid-2TMS	富马酸-2TMS	19.291	110-17-8	0.471
35	Uracil-2TMS	尿嘧啶-2TMS	19.240	66-22-8	0.032
36	Nonanoic acid-TMS	壬酸-TMS	19.755	112-05-0	0.012
37	Serine-3TMS	丝氨酸-3TMS	20.053	56-45-1	2.390
38	Mevalonic lactone-TMS	甲瓦龙酸内酯-TMS	20.346	503-48-0	0.003
39	Threonine-3TMS	苏氨酸-3TMS	20.969	72-19-5	2.195
40	Mesaconic acid-2TMS	甲基富马酸 (中康酸) -2TMS	21.065	498-24-8	0.011
41	Glutaric acid-2TMS	戊二酸-2TMS	21.238	110-94-1	0.047
42	Thymine-2TMS	胸腺嘧啶-2TMS	21.407	65-71-4	0.002
43	3-Aminopropanoic acid-3TMS	3-氨基丙酸-3TMS	22.272	107-95-9	0.633
44	Homoserine-3TMS	高丝氨酸-3TMS	23.001	672-15-1	0.017
45	3-Aminoisobutyric acid-3TMS	3-氨基异丁酸 -3TMS	23.434	10569-72-9	0.297
46	Citramalic acid-3TMS	柠苹果酸-3TMS	23.863	6236/10/8	0.019
47	Niacinamide-TMS	烟酰胺-TMS	23.818	98-92-0	0.054
48	Malic acid-3TMS	苹果酸-3TMS	24.200	6915-15-7	0.546
49	Adipic acid-2TMS	己二酸-2TMS	24.545	124-04-9	0.023
50	Threitol-4TMS	苏糖醇-4TMS	24.745	2418-52-2	0.063
51	N-Acetyls erine-2TMS	N-乙酰丝氨酸-2TMS	24.757	16354-58-8	0.043
52	meso-Erythritol-4TMS	内赤藓醇-4TMS	25.019	149-32-6	0.026
53	Aspartic acid-3TMS	天冬氨酸-3TMS	25.220	56-84-8	2.212
54	Methionine-2TMS	蛋氨酸-2TMS	25.239	63-68-3	0.003
55	5-Oxoproline-2TMS	5-氧脯氨酸-2TMS	25.315	98-79-3	3.693
56	4-Hydroxyproline-3TMS	4-羟基脯氨酸-3TMS	25.502	51-35-4	0.910
57	4-Aminobutyric acid-3TMS	4-氨基丁酸-3TMS	25.555	56-12-2	2.644
58	Cysteine-3TMS	半胱氨酸-3TMS	26.405	52-90-4	0.066
59	Threonic acid-4TMS	苏糖酸-4TMS	26.639	3909-12-4	0.160
60	2-Ketoglutaric acid-meto-2TMS	2-氧代戊二酸 -meto-2TMS	26.816	328-50-7	0.008
61	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	2-羟基戊二酸-3TMS	26.838	13095-48-2	0.439

62	2-Isopropylmalic acid-3TMS (IS)	2-异丙基苹果酸-3TMS (内标)	27.184	3237-44-3	1.000
63	3-Phenyllactic acid-2TMS	3-苯乳酸-2TMS	27.315	828-01-3	0.011
64	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid-3TMS	3-羟基-3-甲基戊二酸-3TMS	27.755	503-49-1	0.011
65	Hypotaurine-3TMS	亚牛磺酸-3TMS	27.842	300-84-5	0.022
66	3-Aminoglutaric acid-3TMS	3-氨基戊二酸-3TMS	28.026	1948-48-7	0.008
67	Ornithine-3TMS	鸟氨酸-3TMS	28.096	70-26-8	0.204
68	Glutamic acid-3TMS	谷氨酸-3TMS	28.175	56-86-0	2.894
69	Triethanolamine-3TMS	三乙醇胺-3TMS	28.389	102-71-6	0.008
70	4-Hydroxybenzoic acid-2TMS	4-羟基苯甲酸-2TMS	28.425	99-96-7	0.048
71	5-Aminovaleric acid-3TMS	5-氨基戊酸-3TMS	28.543	660-88-8	0.450
72	Phenylalanine-2TMS	苯基丙氨酸-2TMS	28.575	150-30-1	2.552
73	4-Hydroxyphenylacetic acid-2TMS	4-羟基苯乙酸-2TMS	28.739	156-38-7	0.009
74	Lauric acid-TMS	月桂酸(十二酸)-TMS	28.927	143-07-7	0.006
75	Tartaric acid-4TMS	酒石酸-4TMS	28.993	87-69-4	0.071
76	Homocysteine-3TMS	高半胱氨酸-3TMS	29.608	454-29-5	0.008
77	Asparagine-3TMS	天冬酰胺-3TMS	29.782	70-47-3	0.822
78	Arabinose-meto-4TMS	阿拉伯糖-meto-4TMS	29.834	10323-20-3	0.056
79	3-Sulfinioalanine-3TMS	3-亚磺酰丙氨酸-3TMS	30.088	2381-08-0	0.002
80	Ribose-meto-4TMS	核糖-meto-4TMS	30.276	50-69-1	0.147
81	Xylulose-meto-4TMS	木酮糖-meto-4TMS	30.268	551-84-8	0.070
82	Lysine-3TMS	赖氨酸-3TMS	30.773	56-87-1	0.005
83	1,6-Anhydroglucose-3TMS	1,6-无水葡萄糖-3TMS	30.997	498-07-7	0.025
84	Xylitol-5TMS	木糖醇-5TMS	31.197	87-99-0	0.108
85	Glycerol 2-phosphate-4TMS	2-磷酸甘油-4TMS	31.514	17181-54-3	0.017
86	Arabitol-5TMS	阿拉伯糖醇-5TMS	31.534	488-82-4	1.008
87	2-Deoxy-glucose-4TMS(1)	2-脱氧葡萄糖-4TMS(1)	31.535	154-17-6	0.667
88	Ribitol-5TMS	核糖醇-5TMS	31.703	488-81-3	0.834
89	Aconitic acid-3TMS	乌头酸-3TMS	31.796	585-84-2	0.077
90	Putrescine-4TMS	腐胺(丁二胺)-4TMS	31.841	110-60-1	2.926
91	3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid-2TMS	3-甲氧基-4-羟基苯甲酸-2TMS	32.332	121-34-6	0.015
92	Glycerol 3-phosphate-4TMS	甘油-3-磷酸-4TMS	32.499	57-03-4	0.798
93	Glutamine-3TMS	谷氨酰胺-3TMS	32.670	56-85-9	2.694
94	Ribonic acid-5TMS	核糖酸-5TMS	32.853	17812-24-7	0.220
95	Azelaic acid-2TMS	壬二酸-2TMS	33.03	123-99-9	0.012
96	O-Phosphoethanolamine-4TMS	O-磷酸乙醇胺-4TMS	33.124	1071-23-4	0.031
97	2-Deoxy-glucose-4TMS(2)	2-脱氧葡萄糖-4TMS(2)	33.570	154-17-6	0.132
98	Shikimic acid-4TMS	莽草酸-4TMS	33.568	138-59-0	0.004
99	3-Phosphoglyceric acid-4TMS	3-磷酸甘油酸-4TMS	33.762	820-11-1	0.003

100	Protocatechuic acid-3TMS	原儿茶酸-3TMS	33.918	99-50-3	0.012
101	Ornithine-4TMS	鸟氨酸-4TMS	33.965	70-26-8	2.902
102	Citric acid-4TMS	柠檬酸-4TMS	34.025	77-92-9	3.293
103	4-Aminobenzoic acid-2TMS	4-氨基苯甲酸-2TMS	34.182	150-13-0	0.048
104	Tagatose-meto-5TMS(1)	塔格糖-5TMS(1)	35.139	87-81-0	0.041
105	Adenine-2TMS	腺嘌呤-2TMS	35.272	73-24-5	0.459
106	Fructose-meto-5TMS(1)	果糖-meto-5TMS(1)	35.790	57-48-7	2.469
107	Glucono-1,5-lactone-4TMS	古洛糖酸-1,5-内酯 -4TMS	35.937	90-80-2	0.158
108	Fructose-meto-5TMS(2)	果糖-meto-5TMS(2)	35.996	57-48-7	2.446
109	Mannose-meto-5TMS(1)	甘露糖-meto-5TMS(1)	36.155	3458-28-4	0.666
110	Galactose-meto-5TMS(1)	半乳糖-meto-5TMS(1)	36.328	59-23-4	1.038
111	Glucose-meto-5TMS(1)	葡萄糖-meto-5TMS(1)	36.429	50-99-7	3.146
112	Tyramine-3TMS	酪胺-3TMS	36.487	51-67-2	0.172
113	Lysine-4TMS	赖氨酸-4TMS	36.625	56-87-1	2.923
114	Histidine-3TMS	组氨酸-3TMS	36.635	71-00-1	3.177
115	Glucosamine-5TMS(1)	氨基葡萄糖-5TMS(1)	36.837	3416-24-8	0.054
116	N-Acetylglutamine-2TMS	N-乙酰谷氨酰胺 -2TMS	36.807	2490-97-3	0.066
117	N6-Acetyllysine-2TMS	N6-乙酰赖氨酸-2TMS	36.926	692-04-6	0.524
118	Glucose-meto-5TMS(2)	葡萄糖-meto-5TMS(2)	36.988	50-99-7	2.561
119	Tyrosine-3TMS	酪氨酸-3TMS	37.125	60-18-4	2.796
120	Mannitol-6TMS	甘露糖醇-6TMS	37.424	69-65-8	6.873
121	Urocanic acid-2TMS	犬尿酸-2TMS	38.462	104-98-3	0.043
122	Pantothenic acid-3TMS	泛酸 (维生素 B5) -3TMS	38.507	79-83-4	0.080
123	Gluconic acid-6TMS	葡萄糖酸-6TMS	39.195	526-95-4	0.052
124	Palmitic acid-TMS	棕榈酸 (十六烷酸) -TMS	39.307	57-10-3	0.939
125	Glucaric acid-6TMS	葡萄糖二酸-6TMS	39.584	25525-21-7	0.233
126	Dopamine-4TMS	多巴胺-4TMS	40.627	51-61-6	0.544
127	N-Acetylmannosamine-meto-4TMS(1)	N-乙酰甘露糖胺 -meto-4TMS(1)	40.965	3615-17-6	0.045
128	Inositol-6TMS(2)	肌醇-6TMS(2)	41.304	87-89-8	2.224
129	Ribose 5-phosphate-meto-5TMS(1)	5-磷酸核糖 -meto-5TMS(1)	41.583	3615-55-2	0.014
130	N-Acetyltyrosine-2TMS	N-乙酰酪氨酸-2TMS	41.609	537-55-3	0.013
131	Ribose 5-phosphate-meto-5TMS(2)	5-磷酸核糖 -meto-5TMS(2)	41.714	3615-55-2	0.003
132	Linoleic acid-TMS	亚油酸-TMS	43.235	60-33-3	0.010
133	Oleic acid-TMS	油酸-TMS	43.326	112-80-1	0.012
134	Stearic acid-TMS	硬脂酸-TMS	43.838	57-11-4	0.089
135	Oleamide-TMS	油酰胺-TMS	47.582	301-02-0	0.002
136	5-Methoxytryptamine-2TMS	5-甲氧基色胺-2TMS	48.430	608-07-1	0.032

137	5-Hydroxy-tryptophan-4TMS	5-羟基-色胺-4TMS	48.624	4350-09-8	0.011
138	Uridine-3TMS	尿苷-3TMS	48.808	58-96-8	1.584
139	Inosine-4TMS	肌苷-4TMS	51.234	58-63-9	0.047
140	Adenosine-4TMS	腺苷-4TMS	52.429	58-61-7	1.088
141	Sucrose-8TMS	蔗糖-8TMS	52.990	57-50-1	5.204
142	Maltose-meto-8TMS(1)	麦芽糖-meto-8TMS(1)	55.015	69-79-4	6.451
143	Adenosine monophosphate-5TMS	单磷酸腺苷-5TMS	60.197	61-19-8	0.001

2.4 冬虫夏草部分代谢物及替代物衍生产物 MRM 图

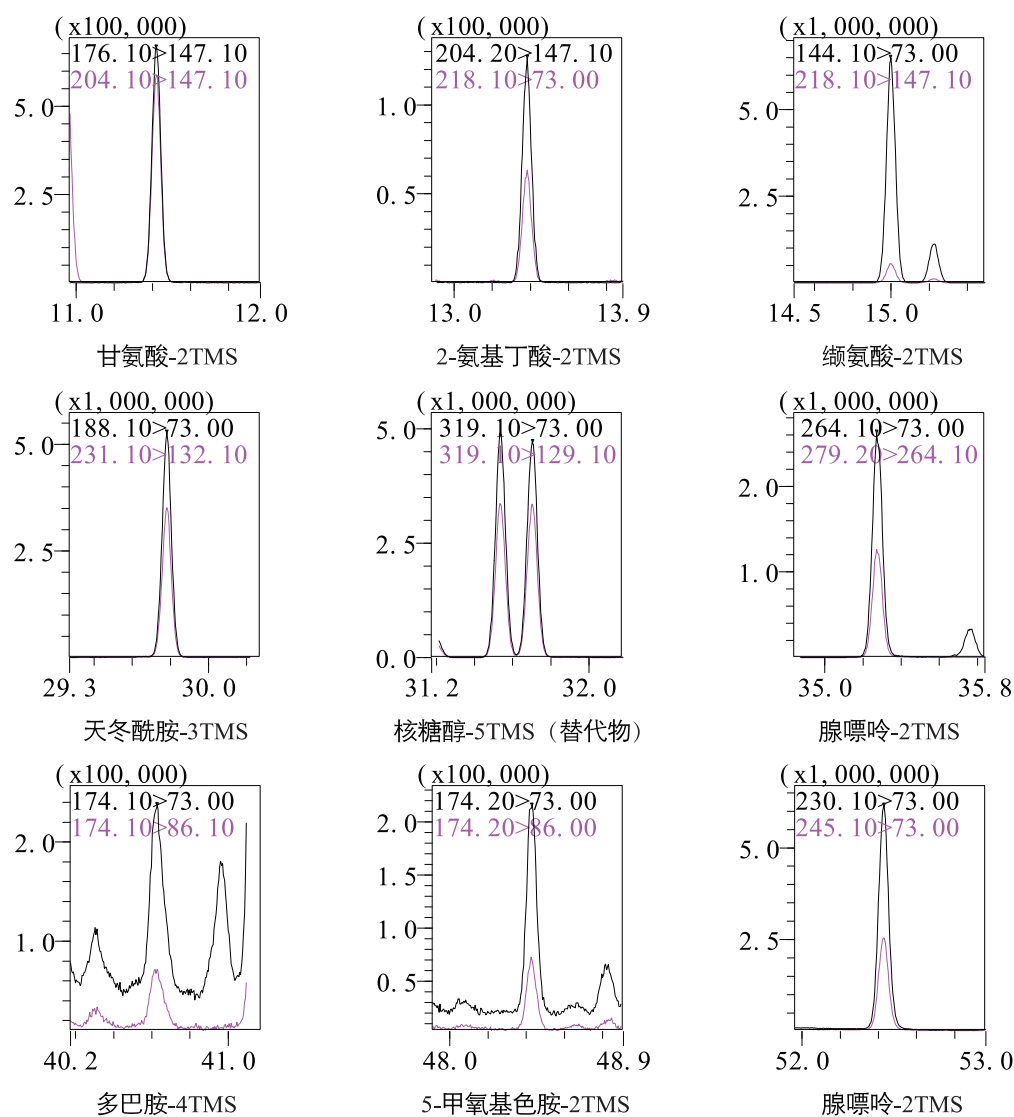


图4 冬虫夏草部分代谢物及替代物衍生产物MRM图

■ 结论

本文利用 GCMS-TQ8050 结合岛津代谢物数据库自动创建 467 种代谢物的 MRM 分析方法。通过建立的 MRM 方法对冬虫夏草中的多种代谢物进行筛查，使用核糖醇作为替代物，确认筛查结果的可靠性判断，以 2- 异丙基苹果酸作为内标，对筛查出的代谢物进行了半定量。在无测定目标组分标准品的情况下，鉴定出代谢物 143 种。结果显示，岛津 Smart Metabolites Database 为冬虫夏草中代谢物研究提供一种快捷、可靠的分析途径。