

全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用分析不同产地当归的活性成分

LCMS-QTOF-073

摘要：为探究不同产地当归活性成分的差异，采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用非靶向代谢组学测定方法，对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较。采集后数据经 MS-DIAL 软件进行峰提取和对齐后，采用 Metaboanalyst 进行统计学分析，经数据库比对、Labsolutions Insight Explore 鉴定差异活性成分。结果表明，全谱二维液相色谱（Polarity-Extended Liquid Chromatography- PELC）方法相对于一维液相色谱（One-Dimensional Liquid Chromatography -1D-LC）方法可提高当归成分的分析覆盖率；通过主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）发现不同产地的当归存在显著差异；经数据库比对、Labsolutions Insight Explore 软件预测共鉴定出 43 种差异性化合物，包括苯酞类、有机酸类等天然活性物质。

关键词：全谱二维液相色谱 甘肃当归 云南当归 非靶向代谢组学分析

技术特点：

- ❖ PELC 方法相对于 1D-LC 方法可提高当归成分的分析覆盖率。
- ❖ MSDIAL、MetaboAnalyst、Insight Explore 多软件联合使用，快速确定差异性标志物。

当归 *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels 为“妇科圣药”，具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效，主要含有苯酞类、单萜和倍半萜类、芳香类化合物、脂肪烃及其衍生物、多糖、有机酸及其他类化学成分，化合物从低极性到高极性均有涉及。当归应用范围广泛，在中药配方中有“十方九归”之说，历来以医家珍品著称。目前我国公认的当归道地产区为甘肃岷县等地，此外，我国云南、贵州、四川、湖北、陕西等地的当归产量也在逐年加大，并被称为“云归”“川

归”“窑归”等。前期研究表明当归是典型的生境主导型药材，其品质受产区生态环境影响显著。因此，研究不同产地当归品质差异对于当归规范化种植、保障药材质量以及临床疗效均具有重要意义。

本文采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用的非靶向代谢组学测定方法，对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较分析，从而阐明不同产地当归药材的质量特征，为当归的产地溯源识别及质量控制提供了科学依据。

实验部分

1.1 仪器

岛津全谱二维液相色谱与 LCMS-9050 联用仪，具体配置为：

输液泵：	LC-30AD×4	系统控制器：	CBM-20A
自动进样器：	SIL-30AC	在线脱气机：	DGU-20A ₅
柱温箱：	CTO-20AC (内置 FCV-32AH×2)	飞行时间质谱仪：	LCMS-9050
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 4.0		

1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色谱柱：第一维：SeQuart ZIC-HILIC (2.1 × 150 mm, 3 μm)
第二维：Phenomenex Kinetex C8 (2.1 × 150 mm, 2.6 μm)
- 流动相：第一维：A 相 - 5mM 的乙酸铵；B 相 - 乙腈
第二维：A 相 - 0.05% 甲酸 + 2mmol/L 的乙酸铵溶液；B 相 - 乙腈

分析流速：第一维：0.3 mL/min； 第二维：0.3 mL/min；
柱温：35°C 进样体积：3 μ L
洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1- 表 3

表 1 一维液相色谱的时间程序 (初始流动相 B 为 95%)

时间 (min)	单元	处理命令	值
3.00	泵	B.Conc	95
15.00	泵	B.Conc	70
18.00	泵	B.Conc	50
21.00	泵	B.Conc	50
21.10	泵	B.Conc	95
39.50	控制器	Stop	

表 2 二维液相的时间程序 (初始流动相 B 为 20%)

时间 (min)	单元	处理命令	值
19.00	泵	B.Conc3	22
31.00	泵	B.Conc3	100
36.00	泵	B.Conc3	100
36.10	泵	B.Conc3	20
39.50	控制器	Stop	

表 3 阀切换程序 (初始 CTO.RVL=1, CTO.RVR=1)

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.45	柱温箱	CTO.RVL	0
2.45	柱温箱	CTO.RVR	0
22.50	柱温箱	CTO.RVL	1
22.50	柱温箱	CTO.RVR	1
39.50	控制器	Stop	

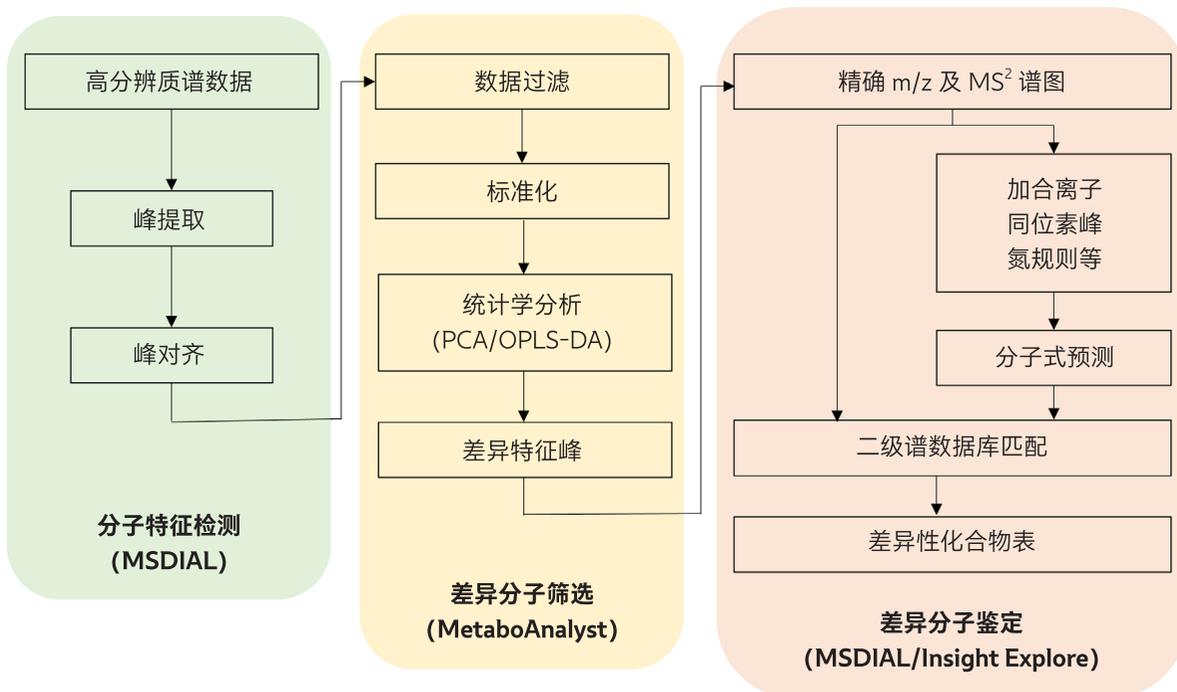
质谱条件

离子源：ESI 加热模块温度：400°C
雾化气流速：3.0 L/min DL 温度：250°C
加热气流速：10.0 L/min 接口温度：300°C
干燥气流速：10.0 L/min
扫描模式：MS Scan(m/z 50 -1200) (事件时间：0.1 s)
DDA MS/MS (m/z 50 -1200) (5 个依从事件，事件时间 0.1 s)

1.3 样品处理及采集

取本品粉末约 100 mg，精密称定，置于 15 mL 离心管中，加入 70% 甲醇 5 mL，放置过夜，超声 30 分钟，12000 r/min 高速离心 3 min，过 0.22 μ m 滤膜，供测定。

1.4 数据处理



■ 结果与讨论

2.1 两种方法的覆盖率对比

单一的 HILIC 方法和 RPLC 方法在死时间附近均有严重的共洗脱现象，样品中的化合物无法实现良好的分离，QC 样品的 TIC 色谱图见图 1，图 2。而 PELC 结合了 HILIC 和 RPLC 这两种分离色谱，通过 HILIC 保留极性成分，HILIC 不能保留的低极性成分则转移至第二维 RPLC 进行分离，从而避免了死时间附近的共洗脱严重的问题，QC 样品的 TIC 色谱图见图 3。去除死时间附近流出的化合物，采用 1D-LC 方法与 PELC 方法检测到的特征峰数见表 4，结果表明，相较于 1D-LC 方法，所建立的 PELC 方法可提高当归成分的分析覆盖率。

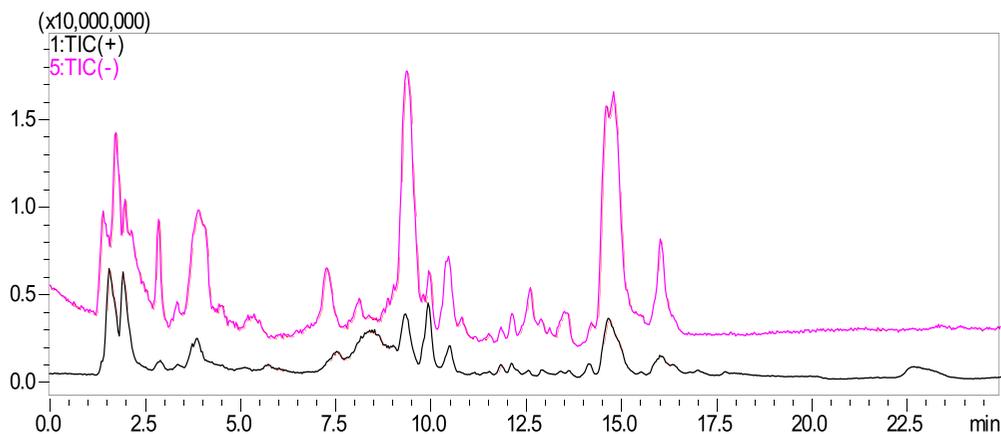


图 1 HILIC 方法分析 QC 样品色谱图

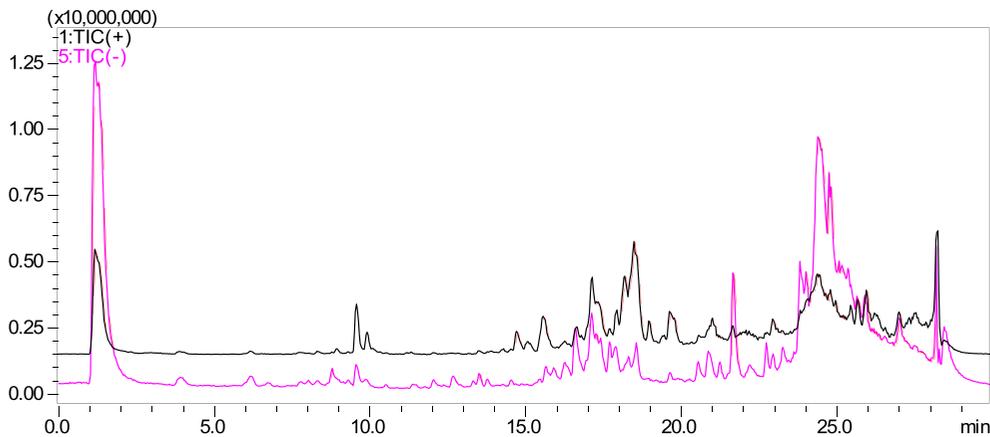


图2 RPLC方法分析QC样品色谱图

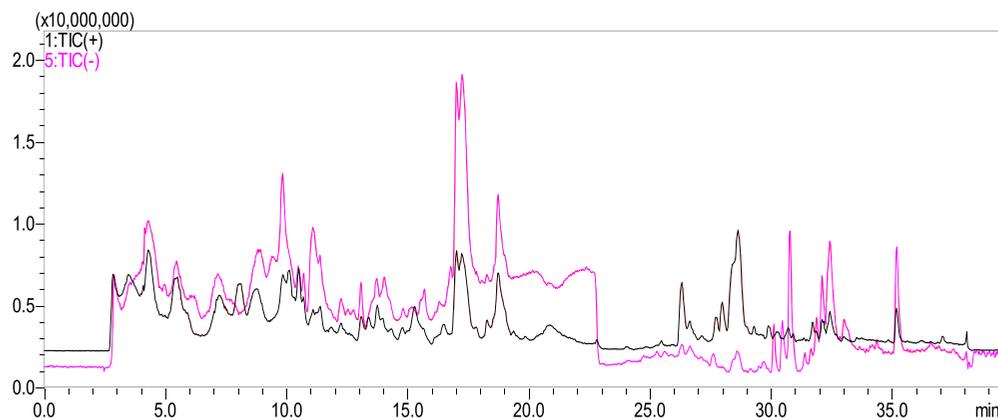


图3 PELC方法分析QC样品色谱图

表4 采用1D-LC方法与PELC方法检测到的特征峰数

前端分离模式	质谱采集模式	特征峰数
1D-LC (HILIC)		1619
1D-LC (RPLC)	ESI(+)	1529
PELC		2164
1D-LC (HILIC)		3965
1D-LC (RPLC)	ESI(-)	2222
PELC		4275

2.2 差异性化合物筛选

分析后数据经MSDIAL软件进行峰提取和对齐后，将峰对齐表导入MetaboAnalyst平台，设定缺失值处理、数据过滤及标准化等参数，进行统计学分析。

2.2.1 主成分分析 (PCA)

不同产地当归及质控样品QC的PCA得分图见图4，每个散点表示一个样本，样本全部处于95%置信区间；在正离子模式下，PC1的贡献率为50.30%，PC2的贡献率为19.40%；在负离子模式下，PC1的贡献率为38.30%，PC2的贡献率为32.70%；各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明甘肃当归与云南化合物差异显著；质控组中的平行样本聚集在一起，表明测定过程中未出现明显偏差，说明各产地当归代谢组数据的稳定性较好。

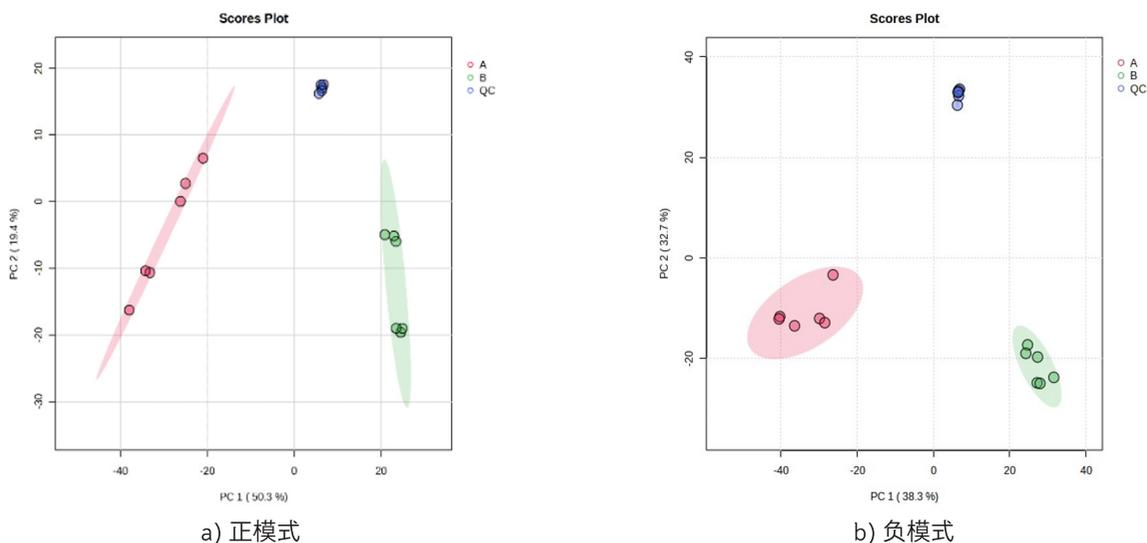


图4 PCA得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归, QC: 质控)

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

不同产地当归的 OPLS-DA 分析结果如图 5 所示, 模型中各组样品均位于 95% 置信区间内, 2 组样本点间完全分离, 无重叠区域, 区分效果较好, 表明甘肃当归与云南当归具有明显的差异性。此外, 模型验证结果见图 6, R2Y 和 Q2 分别代表所建模型的解释率和预测能力, 它们的值越接近于 1 表明模型的拟合度越好, 可信度越高, 正离子模式下 R2Y=0.982, Q2=0.956, 负模式下 R2Y=0.981, Q2=-0.955, 表明模型稳健可靠。对模型进行置换检验, 通过观察打乱前的原始模型在 100 次随机打乱样本的随机置换检验, 绘制置换检验图 (图 7)。结果表明, 正模式和负模式下 P 值均小于 0.01, 模型没有过拟合。

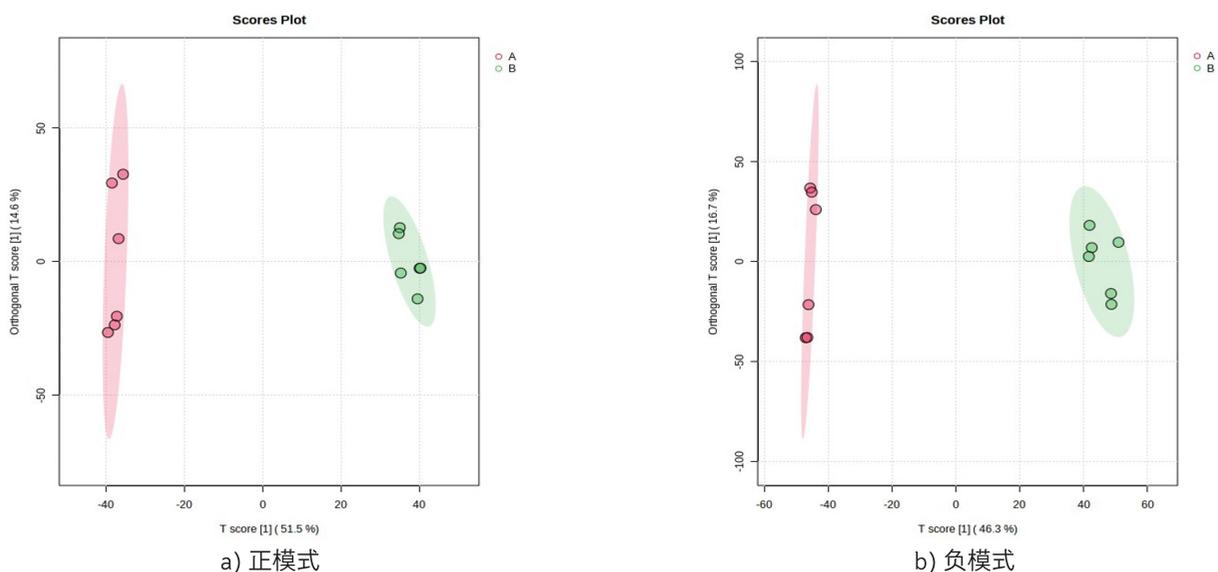


图5 OPLS-DA得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归)

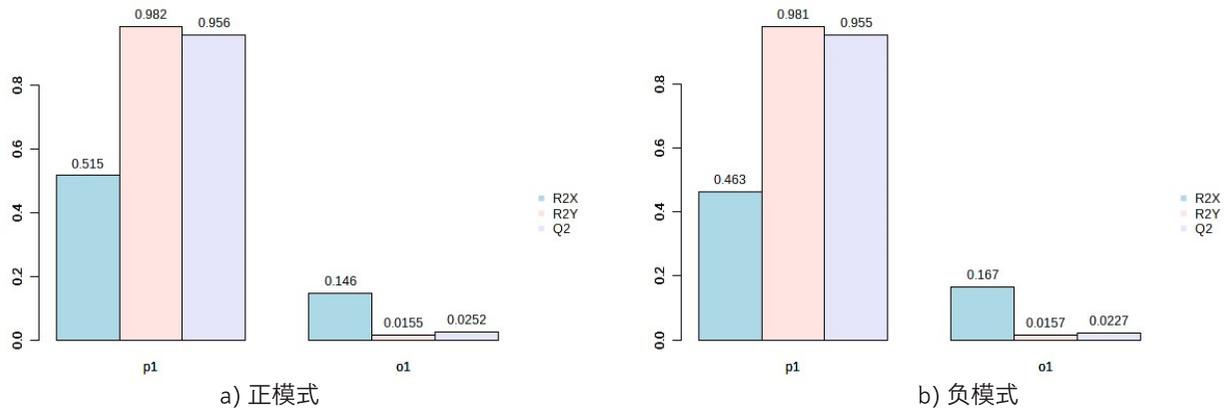


图 6 模型验证图

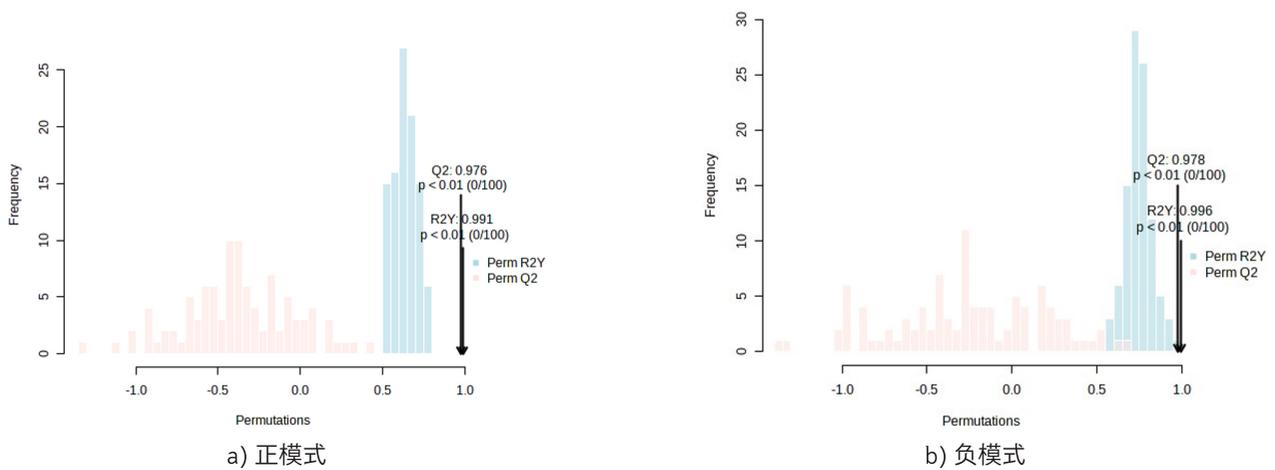


图 7 OPLS-DA 100 次置换检验结果

2.2.3 差异化合物火山图

利用 t 检验和变异系数法比较两组之间的活性成分差异，设立筛选条件，对正、负离子模式下检测到的所有活性成分进行差异分析，采用火山图进行可视化展示（图 8），甘肃当归和云南当归在正离子和负离子模式下共筛选出差异表达活性成分分别为 1458 和 1843 个，其中正离子活性成分上调（同一化合物：甘肃当归含量大于云南当归）823 个、下调（同一化合物：甘肃当归含量小于云南当归）635 个，负离子活性成分上调 1001 个、下调 842 个。

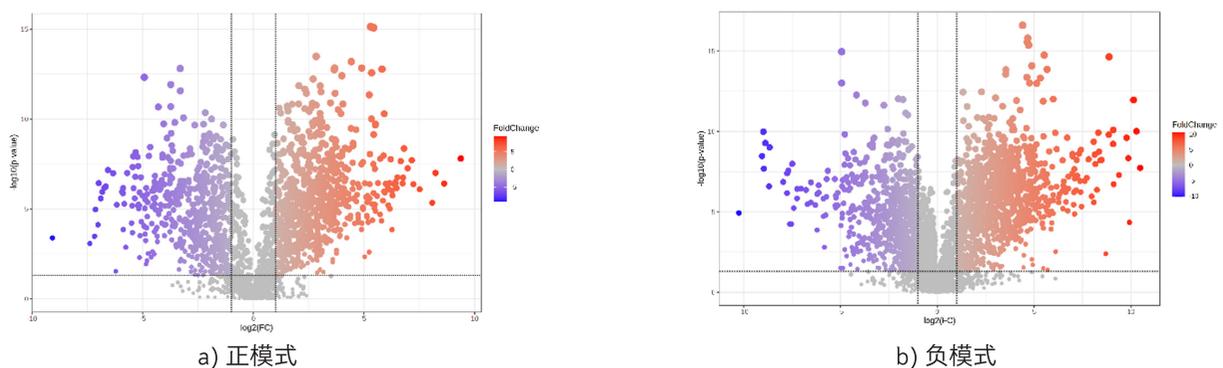


图 8 火山图结果

2.2.4 差异活性成分中显著成分的筛选结果

通过将单变量统计和多元统计分析相结合的方法，对活性成分进行挖掘。根据多元统计分析 OPLS-DA 结果的 VIP 值（表示对应活性成分的组间差异在各组样本分类判别中的影响强度），可以初步筛选出甘肃产当归和云南产当归的差异活性物质，进一步筛选则通过结合单变量统计火山图结果（P-value 与 Fold change）进行。本试验筛选标准为：活性成分在不同样本间的差异为 2 倍以上或 0.5 以下且 P-value 小于 0.05，即 Fold change ≤ 0.5 和 Fold change ≥ 2 ；P-value 小于 0.05；VIP ≥ 1 。最终正模式下筛选得到 1351 个差异物质，负模式下筛选得到 1716 个差异物质。

2.3 差异性化合物鉴定

通过 MSDIAL 软件，对化合物进行鉴定。所得结果进一步使用 Insight Explore 软件的分子式预测、在线数据库检索（ChemSpider/PubChem）和 Assign 功能（图 9）确认。共鉴定出 43 种差异性化合物，包括藁苯内酯类、有机酸类等天然活性物质，表 5 为部分差异性化合物鉴定结果表。

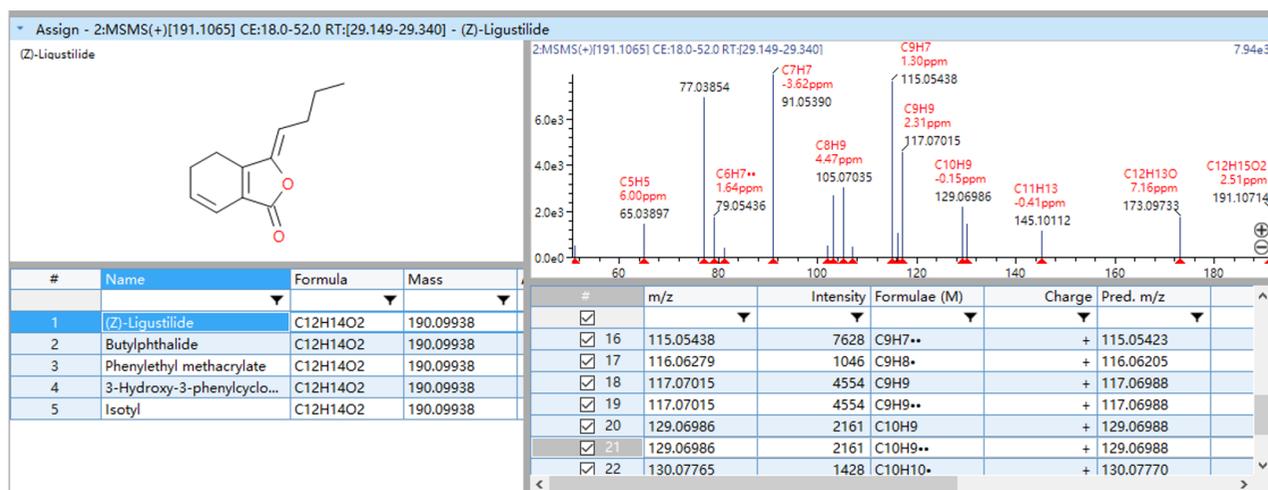


图 9 利用 MS-DIAL 鉴定差异活性物质

表 5 部分差异性化合物鉴定结果表

序号	Rt (min)	化合物名称	分子式	加合离子	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)
1	12.15	二咖啡酰奎尼酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.1181	515.1195	-2.72
2	13.21	3-O-阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.1030	367.1035	-1.36
3	22.87	胆碱	C ₅ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	104.1070	104.1070	0.00
4	25.64	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0493	193.0498	-2.59
5	25.84	洋川芎内酯 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	[M+H] ⁺	193.1224	193.1223	0.52
6	27.98	E-丁烯基苯酞	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	[M+H] ⁺	189.0910	189.0910	0.00
7	29.15	Z-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1065	191.1067	-1.05

■ 结论

采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用的非靶向测定方法，对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较。经 MSDIAL 软件进行峰提取和对齐后，通过 MetaboAnalyst 平台进行数据预处理、统计学分析得到差异活性成分，在与 MSDIAL 数据库比对、Labsolutions Insight Explore 软件预测共鉴定出 43 种差异性化合物，包括苯酞类、有机酸类等天然活性物质。

岛津应用云

