

GC-MS/MS 结合代谢物谱库分析芽胞杆菌代谢物

GCMSMS-069

摘要：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，本文使用岛津公司三重四极杆串级气质联用仪并结合代谢物谱库，成功分析了发酵的芽胞杆菌胞内代谢物。

关键词：GCMS-TQ8040 三重四极杆串级气质联用仪 代谢物谱库 芽胞杆菌胞内代谢物

自 1999 年英国教授 Nicholson 提出代谢组学一词后，代谢组学得到了快速的发展，并渗透到多项领域，比如疾病诊断、医药研制开发、环境学，植物学等与人类健康护理密切相关的领域。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，其样品主要是动植物的细胞和组织的提取液。气相色谱 - 质谱及三重四极杆串级气质技术作为代谢组学的研究手段也得到

了广泛的应用。岛津公司开发了代谢物谱库，该谱库覆盖了 568 种 (Scan)、475 种 (MRM) 化合物的质谱图、保留指数、MRM 定量定性离子对等信息，可实现在无标准品的情况下的快速筛查检测与确证。本文使用岛津代谢物谱库，有效定性了发酵芽胞杆菌胞内的代谢物。

实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8040 三重四极杆串级气质联用仪

柱流量：1.14 mL/min

1.2 分析条件

GCMS 分析条件：

色谱柱：BPX-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)

柱温程序：60°C (2 min)_15°C /min_330°C (3 min)

载气控制方式：恒线速度

进样方式：分流进样

分流比：5:1

离子源温度：200 °C

接口温度：280 °C

采集模式：SCAN/MRM

质量范围：45~600amu

1.3 样品前处理

取在发酵培养基中发酵的芽胞杆菌细胞，与等量的 0.25 mol/L 高氯酸混合后，在 -10°C 进行淬灭 10 min。以 10000 rpm、0°C 条件下离心 5 min，在 4°C 下用 0.9% NaCl 溶液洗涤细胞两次，再以 10000 rpm、0°C 离心 5 min，用 75% 乙醇 90°C 抽提细胞 10 min 后，转入 -40°C 抽提 5 min，离心，取上清则为其胞内代谢物。在冻干后的细胞抽提物中，加入 40 μL 20 mg/ml 的甲氧胺盐酸盐吡啶溶液，37°C 胍化 90 min，再加入 10 μL 内标溶液乙酸苯乙酯 / 吡啶 (5:1000)，50 μL BSTFA，37°C 衍生化 60 min 后稀释 10 倍，取 1 μL 进样。

结果讨论

2.1 发酵芽胞杆菌胞内代谢物衍生产物 TIC 图

发酵芽胞杆菌胞内代谢物衍生产物 TIC 图如下图 1 所示。

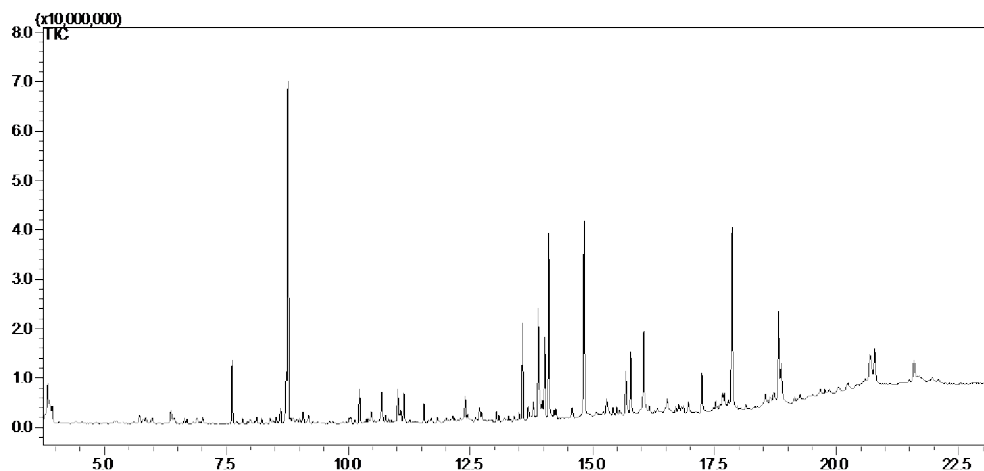


图1 发酵芽孢杆菌胞内代谢物衍生产物TIC图

2.2 发酵芽孢杆菌胞内代谢物衍生产物定性结果

表1 芽孢杆菌胞内代谢物定性结果

ID	化合物名字	保留时间(min)	保留指数	峰面积
1	Glycolic acid-2TMS	6.616	1075	207
2	Benzoic acid-TMS	8.605	1259	3112
3	Glyceric acid-3TMS	9.071	1306	15291
4	Catechol-2TMS	9.138	1313	139
5	Nonanoic acid-TMS	9.551	1357	5990
6	Hydroquinone-2TMS	9.926	1397	3046
7	Decanoic acid-TMS	10.488	1460	1976
8	meso-Erythritol-4TMS	10.729	1488	3115
9	Anthranilic acid-TMS	10.936	1512	473
10	Aspartic acid-d3-3TMS	10.937	1512	1449
11	Aspartic acid-3TMS	10.733	1488	1289
12	Ornithine-3TMS	11.786	1616	489
13	Triethanolamine-3TMS	11.673	1601	558
14	Lyxosemeto-4TMS(2)	11.938	1635	341
15	Lauric acid-TMS	12.046	1649	38515
16	Rhamnose-meto-4TMS(1)	12.258	1676	426
17	1,6-Anhydroglucose-3TMS	12.348	1687	45396
18	Fucose-meto-4TMS(1)	12.607	1721	1527
19	2-Deoxy-glucose-4TMS(1)	12.349	1687	47217
20	Fucose-meto-4TMS(2)	12.611	1722	1850
21	2-Deoxy-glucose-4TMS(2)	12.956	1769	38881
22	2-Aminopimelic acid-3TMS	13.287	1814	959
23	Citric acid-4TMS	13.197	1801	620
24	Psicose-meto-5TMS(1)	13.57	1854	10925
25	Psicose-meto-5TMS(2)	13.576	1855	33760

26	Tagatose-meto -5TMS(2)	13.574	1854	6193
27	Sorbose-meto -5TMS(1)	13.582	1855	6135
28	Fructose-meto -5TMS(1)	13.577	1855	41956
29	Sorbose-meto -5TMS(2)	13.582	1855	6135
30	Allose-meto -5TMS(1)	13.574	1854	25266
31	Myristic acid-TMS	13.504	1844	339752
32	Fructose-meto -5TMS(2)	13.576	1855	10403
33	Mannose-meto -5TMS(1)	13.574	1854	65461
34	Galactose-meto -5TMS(1)	13.576	1855	68164
35	Vanilmandelic acid-3TMS	13.687	1870	517
36	Glucono-1,5-lactone-4TMS	13.576	1855	59543
37	Glucose-meto -5TMS(1)	13.573	1854	88520
38	Hippuric acid-TMS	13.576	1855	1040328
39	Mannose-meto -5TMS(2)	13.575	1854	39757
40	Allose-meto -5TMS(2)	13.76	1881	41003
41	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(1)	13.772	1882	2824
42	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(2)	13.691	1871	16330
43	Galactose-meto -5TMS(2)	13.758	1880	36150
44	Glucose-meto -5TMS(2)	13.76	1881	41001
45	5-Dehydroquinic acid-5TMS	13.689	1870	6059
46	Glucosamine-5TMS(1)	13.892	1899	106512
47	Mannitol-6TMS	13.759	1880	26773
48	Sorbitol-6TMS	13.807	1887	7577
49	Galactitol-6TMS	13.896	1900	9828
50	Galacturonic acid-meto -5TMS(1)	13.891	1899	13803
51	Urocanic acid-TMS	14.077	1927	449
52	Gluconic acid-meto -5TMS(2)	13.891	1899	13787
53	Ureidosuccinic acid-3TMS	14.113	1932	2404
54	Galactosamine-5TMS(2)	14.151	1938	420
55	Ascorbic acid-4TMS	14.115	1932	23010
56	Galacturonic acid-meto -5TMS(2)	14.111	1932	26656
57	N-Acetyl-Ornithine-4TMS	14.112	1932	5028
58	Gluconic acid-6TMS	14.114	1932	44192
59	Palmitoleic acid-TMS	14.829	2040	11499
60	Palmitic acid-TMS	14.831	2041	7069962
61	Inositol-6TMS(2)	14.885	2049	2153
62	Dopa-4TMS	15.008	2068	369
63	Ribulose 5-phosphate-meto-5TMS(2)	14.951	2059	1285
64	Norepinephrine -5TMS	15.486	2145	143382

65	Octadecanol-TMS	15.499	2147	6697
66	Cystamine-nTMS	15.787	2194	63672
67	Oleic acid-TMS	15.917	2215	22612
68	Elaidic acid-TMS	15.913	2215	49035
69	Spermidine-5TMS	15.988	2227	373
70	Stearic acid-TMS	16.048	2237	2627925
71	Uridine-4TMS	17.244	2448	7857
72	5-Methoxytryptamine-3TMS	17.246	2449	58123
73	Uridine-3TMS	17.251	2450	5690
74	Docosahexaenoic acid-TMS	17.858	2564	8581
75	Sucrose-8TMS	17.85	2563	24968
76	Batyl alcohol-2TMS	18.35	2661	4632
77	Maltose-meto-8TMS(1)	18.448	2681	16046
78	Trehalose-8TMS	18.45	2681	35944
79	Lactitol-9TMS	18.499	2691	6680
80	Monostearin-2TMS	18.816	2757	1348748

2.3 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物 MRM 谱图

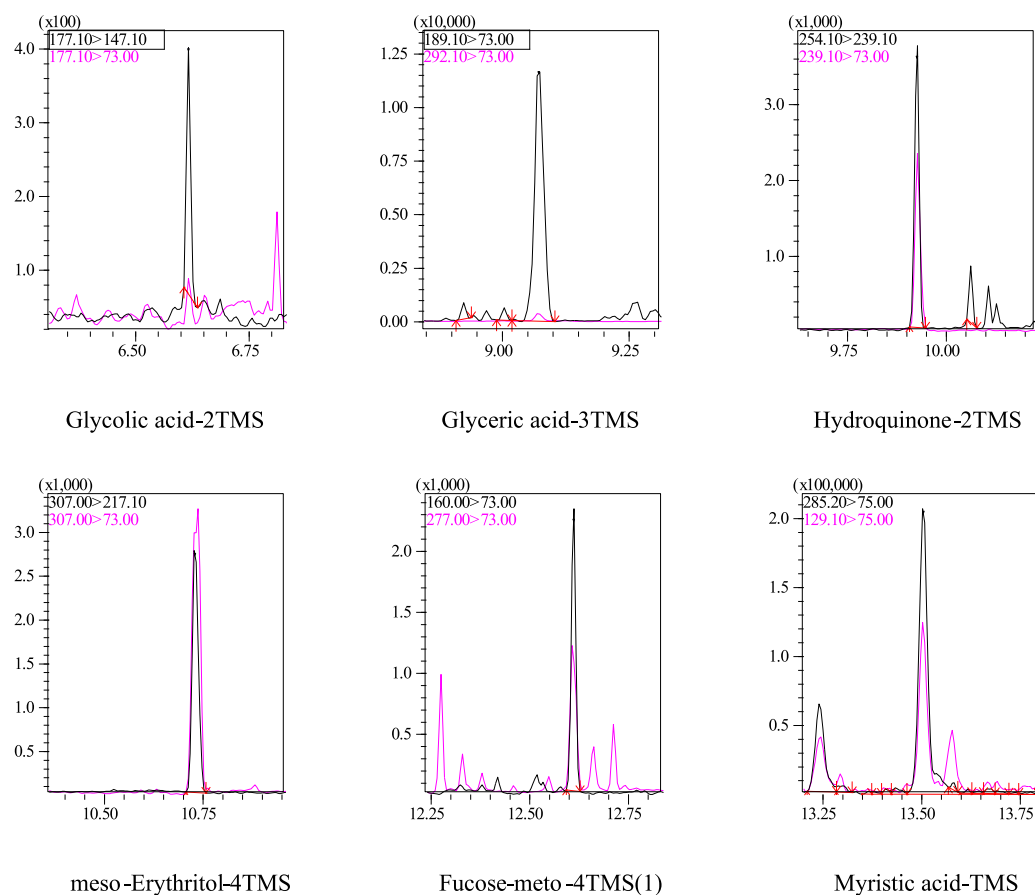


图2 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物MRM图

2.4 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物的检索结果

本方法采用 Scan/MRM 同时数据采集模式，在得到 MRM 数据的同时，利用 Scan 采集得到的质谱图和代谢物质谱库中标准质谱图进行相似度检索，进一步定性确证该代谢物。发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物的检索结果如下图 3 所示。

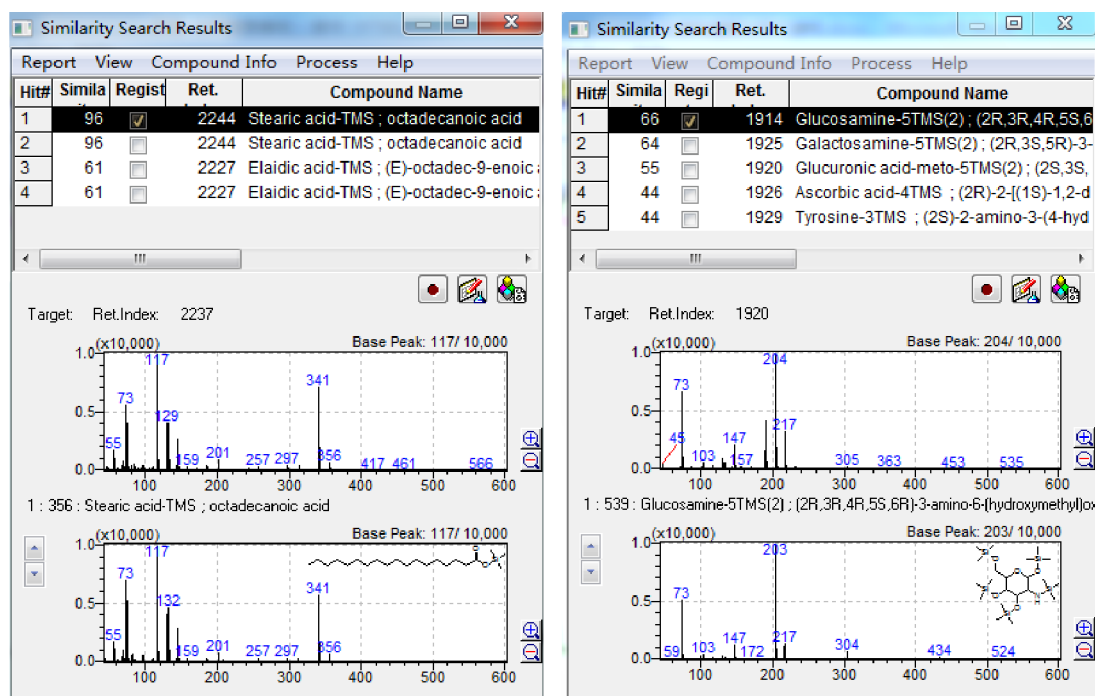


图3 部分化合物检索结果

结论

使用岛津三重四极杆气质联用仪 GCMS-TQ8040 及代谢物谱库对发酵芽孢杆菌胞内代谢物进行定性分析，可鉴定 80 余种代谢物，显示代谢物谱库强大的定性能力，可以有效定性测定多种代谢物。