

全谱二维液质联用系统 应用文集



前言

在生物医药、天然产物、食品安全、环境毒理等领域，通常需要分离、分析多种目标物质，当各目标物极性差异很大时，则难以用一个方法完成对所有物质的分析。高极性和低极性目标物，在常规的色谱分离方案中，正如同鱼和熊掌，不可兼得。目前普遍的应对方案，是采用两种色谱分离方法，如亲水作用色谱柱和反相色谱柱，分别对应进行高极性物质和中低极性物质的分析。这样的处理方式，往往需要耗费双倍的前处理时间、分离分析时间，不利于提高分析效率；且会产生双份数据、部分数据存在交叉冗余的不确定性，定性分析难度高。

作为全球知名的实验室分析测试服务供应商，岛津致力于提供技术领先的仪器设备及全面可靠的综合解决方案。为了解决上述无法使用常规方法同时分离高极性和低极性目标物的难题，岛津研发推出了全谱二维液质联用系统。该系统拥有极性分流、在线稀释和双重梯度三大专利技术，适合于复杂基质中多目标物或完全未知目标物的全组分定性定量分析，可作为宽极性多目标物数据库的通用分离平台，并适用于极端相差较大的两类关联物质的同时分析，而且该系统内含一个UHPLC子系统，方便日常常规检测。该系统为新一代多功能质谱前端平台，可与三重四极杆和飞行时间质谱联用，助力复杂基质中宽极性痕量物质的定性、定量、筛查和分析。

全谱二维液质联用系统推出以来，受到各行业专家、客户的认可，目前已经拥有多个合作客户和用户，利用全谱二维液质联用系统，从以下几个方向开展研究工作：全组分分析/非靶向代谢组学，数据库筛查/靶向代谢组学，相关物质的共同分析如天然产物活性成分分析/药物及其代谢物分析。为了满足客户需求和行业发展趋势，岛津推出了《全谱二维液质联用系统应用文集》。相信随着和专家、客户的深入交流合作，可以进一步发掘全谱二维液质系统的应用潜力，并拓展更多的研究方向，发表高影响力合作成果。

本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

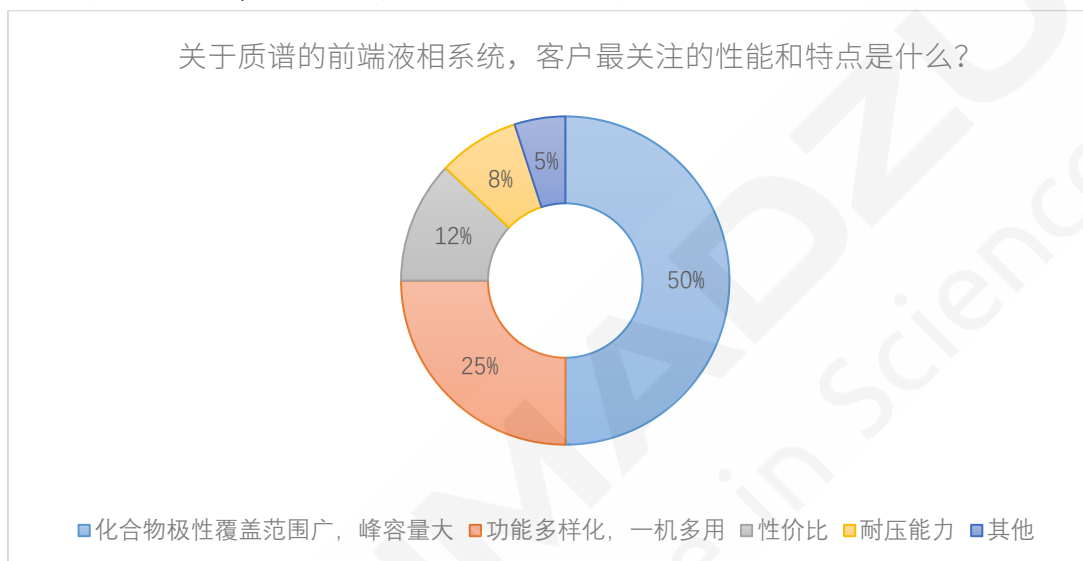
第 1 章 全谱二维液质联用系统介绍与验证	1
1.1 液质时代，该如何选择前端分离系统?	1
1.2 全谱二维液质系统的特点	2
1.3 全谱二维液质系统的应用方向	3
1.4 全谱二维液质系统原理与验证实验	5
第 2 章 全组分分析/非靶向代谢组学应用案例	19
全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于大鼠抑郁症的非靶向代谢组学研究	20
全谱二维液相-Q-TOF 联用系统定性分析黑米样品	26
全谱二维液相-Q-TOF 联用系统分析人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠初步代谢机理	30
全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于前列腺癌生物标志物筛选	35
全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析细菌发酵液中生物农药	40
全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析人胎盘脂多糖注射液	44
全谱二维液相-Q-TOF 联用对不同产地的暗纹东方鲀肌肉组织进行非靶向代谢组学分析 ..	47
第 4 章 数据库筛查/靶向代谢组学应用案例	52
全谱二维液相-LCMS-8060NX 联用用于膀胱癌靶向代谢组学研究	53
全谱二维液相-LCMS-8050 联用快速分析化妆品中 195 种禁用物质	58
第 5 章 相关物质的共同分析应用案例	63
全谱二维液相-Q-TOF 联用分析丹参活性成分	64
全谱二维液相-Q-TOF 联用分析不同产地当归的活性成分	70

第 1 章 全谱二维液质联用系统介绍与验证

1.1 液质时代，该如何选择前端分离系统？

为了提高客户体验、改善后续产品和方案，岛津通过问卷方式咨询了用户多个仪器相关问题，其中一个问题是，大家最关注质谱前端液相分离系统的哪些性能和特点？

我们的备选答案及其最终统计结果是：1) 化合物极性覆盖范围广，峰容量大=50%；2) 功能多样化，一机多用=25%；3) 性价比/价格=12%；4) 耐压能力=8%；5) 其他=5%。



这样的结果可能跟很多刚接触LC-MS的技术人员的认知有差异。让我们对这几个选项做一一分析。

■性价比。1984年John Bennett Fenn发明电喷雾（ESI）技术解决了液体离子化难题，基于这一技术，LC-MS的发展也日新月异，并广泛的应用于各领或。此后LC-MS产品围绕ESI离子源从硬件设计、辅助软件到应用范围都得到了翻天覆地的变化，前端液相产品也从高效液相色谱（HPLC），向超高压/效液相色谱（UHPLC）、微量液相色谱、纳升液相色谱等发展并持续升级换代。经过几十年的发展，目前液相色谱的细分类型、品牌、型号选择很多，加上分析测试领域的官方和民需投入力度持续加大，推广使用LC-MS标准/分析项目日益增多，产品的性价比/价格已经不是第一考虑因素，重要的是该产品能否完成客户计划、预期的分析课题。

■耐压能力。ESI的发明，对液相色谱提出了更快速度、更高灵敏度的要求：提高理论塔板数可以加快分析速度，降低流动相线速度可以提高ESI离子化效率。因此UHPLC的出现解决了这两个问题：它具有更大的系统压力/推力、更耐压的色谱柱、更细粒径的色谱柱填料颗粒，更小的流动相流速。因此可以显著提高色谱的理论塔板数，即可以在更短的时间内分离更多的目标物（色谱峰），从而显著提高分析速度；而更小的流动相流速，可以让更少的液体进入ESI离子源产生更少的喷雾，提高雾化效果并细化喷雾液滴，最终提高离子化效率和质谱灵敏度。然而耐压能力越大，仪器成本越高，应该根据实际项目选择合适的压力。因此耐压能力是LC-MS前端液相一个必备性能，且应该可以在合适范围内做选择，整体来说，对于ESI离子源，具备合适的耐压能力是及格线，真正加分的是以下两个要素。

■化合物极性覆盖范围宽，峰容量大。如前所述，LC-MS技术已经广泛应用于许多领域，包括生命科学、医药临床、环境监测、食品安全、公安司法等。这些学科领域通常需要分离、分析多种目标物质，当各目标

物极性差异很大时，就难以用一个色谱柱完成对所有物质的分析。高极性和低极性目标物，在常规的色谱分离方案中，如同鱼和熊掌，不可兼得：目前普遍的应对方案，是采用两种色谱分离方法，如亲水作用色谱柱和反相色谱柱，分别对应进行高极性物质和中低极性物质的分析。这样的处理方式，往往需要耗费双倍的前处理时间、分离分析时间，不利于提高分析效率；且会产生双份数据、交叉冗余数据，定性分析难度高。因此，如果前端液相系统能覆盖更宽极性、更多的目标物，将会非常有利于科学研究的开展，并发表创新、高质量文章。基于此考虑，该选项最受肯定，得到一半用户的认同。

■功能多样化，一机多用。正是因为LC-MS技术广泛应用于许多领域，每个领域有多种课题，不但需要不同的分析方法，很可能对前端分离液相也提出了不同的需求。比如客户购买的液相系统，除了满足特殊分析目的需要用到特殊配置，其他时间可能只需要用常规UHPLC来完成常规分析项目；或者即使某个前端分离系统有特殊的功能，但有很多前期预实验可能是要用普通UHPLC来完成的。因此，前端分离系统，如果既有特殊的差异化的硬件功能，还能在尽可能少改动或无改动的情况下就能满足常规分析项目，无疑将锦上添花。因此我们看到有1/4的用户选择了这个选项。

1.2 全谱二维液质系统的特点

完美主义的客户可能会问：有没有哪种前端液相，同时满足以上四个性能需求的？有！全谱二维液质联用系统满足您所有的期待。



全谱二维液相系统

全谱二维液质联用系统是岛津独家产品，拥有极性分流（专利号ZL202010477040.0）、在线稀释（专利号ZL201410187543.9），和双重梯度（专利号ZL202110407632.X）三大专利技术。具有以下几个优势：

■极性覆盖范围宽：可一针实现宽极性多目标物的同时分析，其极性覆盖LogP值可达-8.79~26.86，远大于常规亲水作用色谱柱（LogP范围约-8~1）和反相色谱柱（LogP范围约1~20）的总和范围；因此可以胜任绝大多数分析项目中宽极性、多组分分析的要求。该系统和岛津最新推出的LCMS-9050高分辨质谱正负离子同时采集功能结合，能得到4in1技术优势——相比普通LCMS系统，可以节省3/4的样品、分析时间，并减少3/4的质谱污染。

全谱二维液相=-8.79~26.86



全谱二维及传统色谱系统的极性分离范围

■一机多用：该系统内置一个UHPLC子系统，无需任何手动管路连接、硬件切换，即可直接用于常规项目的分析。另外，该系统可匹配岛津所有种类、型号质谱，包括单四极杆质谱、三重四极杆和高分辨质谱。

■耐压高，配置灵活：得益于岛津积木式设计的液相系统，全谱二维可以根据客户需求，选择岛津最新LC-40液相的不同型号，组成满足不同压力需求的配置，最高可达130Mpa耐压需求。

■性价比高：综上所述，全谱二维能用于宽极性多组分的一针分析，能满足常规项目分析，耐压高、配置灵活多样，而且因为该系统是岛津中国分析中心自主研发，无增收额外的研发附加费，无溢价，性价比超高。

综上四方面，在LC-MS如日中天的新时代，我们极力推荐全谱二维液相色谱作为质谱前端系统。全谱二维可与四极杆质谱和飞行时间质谱联用，助力复杂基质中宽极性痕量物质的定性、定量、筛查和分析，并具备一机多用、配置灵活多样等优势。相信这个理想四边形战士可以用更少的时间、经济成本，帮助科研分析人员完成更多、更好的数据成果。

1.3 全谱二维液质系统的应用方向

基于全谱二维液质系统的特点和原理，目前岛津与国内多个课题组合作，开发了四大应用方向。



全谱二维液质系统的应用方向

1.3.1 全组分分析以及非靶向代谢组学

全组分分析以及非靶向代谢组学，都是不对样品/基质中的未知目标物做任何预设的分析方法，包括目标物的数量、种类、极性范围。因此用一般的反相色谱或亲水相色谱，因其对化合物极性范围的分离局限性，无法涵盖大部分未知物。而使用全谱二维液质系统，可以将反相色谱和亲水相色谱结合起来，再加上双重梯度技术，可以极大的将分离的极性范围扩大到LogP值-8~26之间，非常适合于复杂基质中多未知物的一针分析。

1.3.2 数据库及靶向代谢组学

数据库的建立和靶向代谢组学的思路一致，即对较多数量的已知目标物进行定量或半定量分析。然而，常规的数据库或靶向代谢组学，受限于分离系统的极性范围而不得已只能选择反相色谱或亲水相色谱作为分离手段，或者分别用反相色谱和亲水相色谱多次进样分析，极大的限制了方法所涵盖目标物的数量和极性范围。全谱二维技术，允许将LogP值-8~26之间的化合物进行一针分离，让数据库和靶向代谢组学的目标物群体可以尽可能的加大数量，从而形成一个涵盖数量众多且极性范围极大的大型数据库或靶向代谢组学方法。

1.3.3 相关物质的共同分析

这里的相关物质，是极性差异较大、但化合物之间有较强相关性的物质。比如中药、天然产物里数量众多的活性物质，彼此之间可能存在相似的结构，但极性、活性、药效可能差异较大，但其整体分析对于天然产物的药效药理分析却十分重要。再比如，小分子药物或天然产物的某活性成分，进入体内之后会进行一系列的代谢途径，从而产生众多结构相关但极性差异较大的代谢物，然后进入器官靶点产生药效，最后排出体外。这些过程都将产生极性差异较大的相关物质，有必要在一次分析中进行共同分析。使用全谱二维就可以达到一针分析极性差异很大、数量众多的相关物质。

1.3.4 提高峰容量和分离度

因为全谱二维理论上是将反相色谱、亲水相色谱和双重梯度加以结合，拓宽了分离极性范围，也同时也

极大的提高了分离的峰容量，也能一定程度优化、改善分离度。比如对于一些具有两性基团的物质，如果只用反相或亲水相色谱，虽然能完成分离，但目标物数量一多，就很难得到完美的分离，峰容量可能也会不够。而使用全谱二维，则可以利用反相和亲水相的分离能力，将两性基团物质分流进入不同的色谱体系中，有效提高峰容量，并更容易进行分离度的改善。这个方向因为目前合作课题组的实验还在进行中，故本文集暂不收录。

总而言之，利用全谱二维可以在多个领域和应用方向上，完成复杂基质中多目标物的有效分离。随着应用课题的开展和与不同学科、领域专家的交流，未来可能会发掘更多的应用方向。

1.4 全谱二维液质系统原理与验证实验

液相色谱已广泛应用于各领域复杂组分的分离与分析，其中最普遍使用的是反相液相色谱，样品中组分依极性由强至弱依次被洗脱检测。然而强极性的物质在反相色谱柱上保留很弱甚至没有保留，直接在死时间流出，无法有效完成分离。解决这一问题的办法之一是使用亲水作用色谱（HILIC）柱代替反相色谱柱进行分离：HILIC模式的洗脱顺序与反相色谱相反，强极性物质有更强的保留。然而，与反相柱相反，弱极性物质在HILIC柱上保留不佳，同样不能保证所有物质得到有效分离。简而言之，目前没有一种色谱分离模式能同时保证高极性物质与低极性物质的有效分离。

基于以上问题，岛津开发了全谱二维液相系统。第一维为亲水作用色谱或其他相似作用的色谱，用于高极性物质的分离，第二维为反相色谱，用于低极性物质的分离。两个维度通过高压十通阀及定量环连接，通过阀的切换控制目标物进入相应维度进行分离。为了验证系统的适用性，选取39种高极性物质（34种氨基酸、2种核苷酸、3种糖）与21种低极性物质（脂质）对系统进行验证，结果表明，该系统能在40 min内完成所有物质的分离，线性与重复性良好，高浓度进样后无残留。大鼠血浆样品分析结果表明，该系统峰容量大于普通单柱系统。该系统可用于代谢组学、天然产物、环境、农兽残等目标物极性跨度较大领域的分析。

1.4.1 全谱二维液质系统配置

仪器装置由全谱二维液相系统与质谱联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱（第一维为 HILIC 亲水作用色谱柱，第二维为 C8 反相色谱柱）、一个定量环、一个高压十通阀构成流路图如图 1，具体配置如下述。

全谱二维液相的具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD × 4	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	SPD-M40
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.97	十通阀：	FCV-36AH

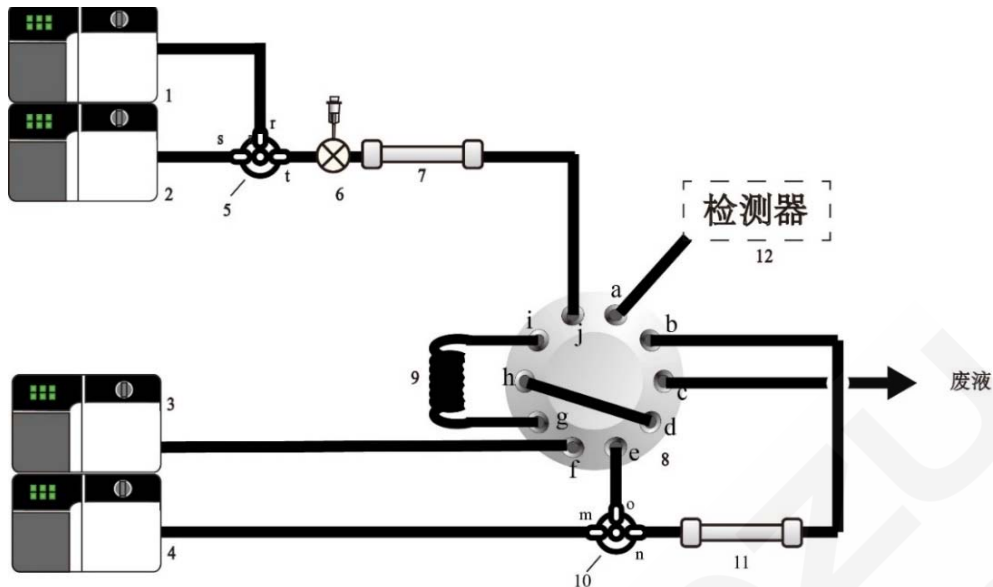


图 1. 全谱二维液质联用系统示意图 (1: 1D 泵 A ; 2: 1D 泵 B; 3: 2D 泵 A; 4: 2D 泵 B; 5: 三通混合器; 6: 自动进样器; 7: 亲水作用色谱柱; 8: 高压十通阀; 9: 500 μ L 样品环; 10: 三通混合器; 11: 反相色谱柱; 12: 检测器)

1.4.2 分析流程

整个分析流程可以分为三个阶段:

1) 极性分流: 1D 色谱泵组成的第一维液相系统输送高比例乙腈流动相经自动进样器携带样品进入 HILIC 柱, 此时样品中的中低极性物质在 HILIC 柱上不保留, 直接洗脱进入样品环, 剩余的高极性物质被 HILIC 柱保留, 将完成后续的分离; 2D 色谱泵输送高比例水相流动相, 平衡 C18 柱 (图 2);

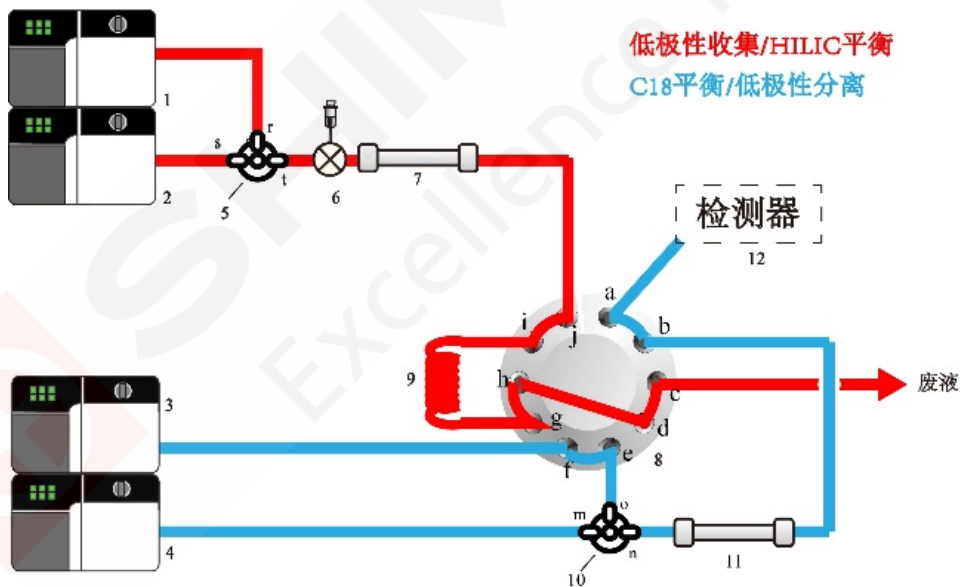


图 2. 极性分流状态

2) 高极性物质分离与低极性物质柱头聚焦: 待样品环中的中低极性物质收集完成, 切换十通阀, 1D 水相比例梯度提升, 样品中剩余物质按极性从低到高依次从 HILIC 色谱柱中洗脱进入检测器; 2D 泵 A 输送有机相流动相将储存于定量环中的中低极性样品推送进入三通混合器, 并与 2D 泵 B 输送的大流速水相流动相在线混合稀释, 进入并聚焦于 C8 柱头 (图 3)。

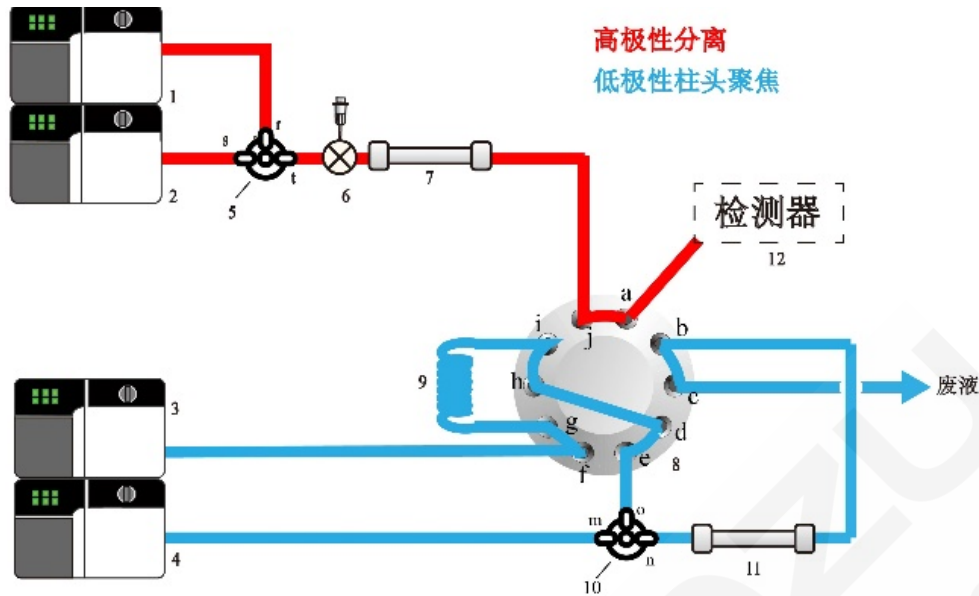


图 3. 高级性物质分离与低极性物质柱头聚焦

3) HILIC 平衡及低极性物质分离：待保留于 HILIC 柱上的高级性物质分析完成，切换十通阀，1D 泵回到高比例 ACN，平衡色谱柱；2D 泵梯度提升有机相比例，将聚焦于 C8 柱头的中低极性物质按极性从高到低渐次洗脱进入检测器完成分析（图 4）。

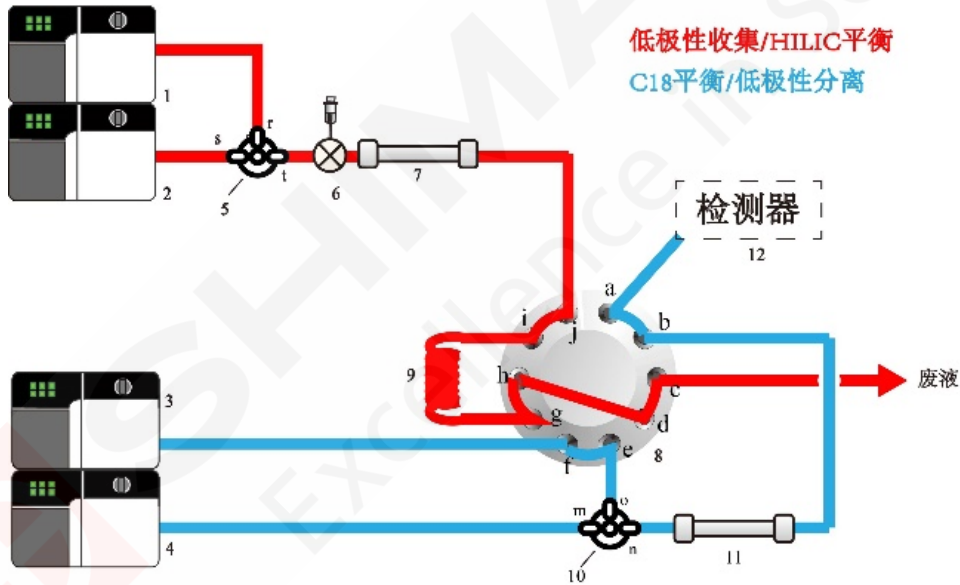


图 4. HILIC 平衡及低极性物质分离

另外，该系统内含一个 UHPLC 子系统（图 3 红色流路部分），可用于常规分析，提高系统的适用性。接下来我们开展了一系列验证和优化实验。

1.4.3 验证实验目标物信息

选取 LogP 范围介于-8.79~13.87 的 39 种高级性物质（34 种氨基酸、2 种核苷酸、3 种糖）与 21 种低极性物质（脂质）作为目标物质（表 2），配制成混标考察系统。

表 2. 目标物质基本信息

编号	物质	分子式	CAS#	类别	Log P
1	β-NAD	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂	53-84-9	核苷酸类	-8.79
2	Stachyose hydrate	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	54261-98-2	糖类	-6.82
3	uridine 5'-diphospho-	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂	528-04-1	核苷酸类	-5.18
4	D-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	69-65-8	糖类	-4.67
5	D- (+)-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	50-99-7	糖类	-3.17
6	taurine	C ₂ H ₇ NO ₃ S	107-35-7	氨基酸	-2.46
7	carnosine	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	305-84-0	氨基酸	-2.17
8	Hydroxyproline	C ₅ H ₉ NO ₃	51-35-4	氨基酸	-1.84
9	Hydroxylysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	13204-98-3	氨基酸	-1.79
10	Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	7200-25-1	氨基酸	-1.79
11	creatinine	C ₄ H ₇ N ₃ O	60-27-5	氨基酸	-1.68
12	Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	585-21-7	氨基酸	-1.67
13	serine	C ₃ H ₇ NO ₃	302-84-1	氨基酸	-1.58
14	citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	372-75-8	氨基酸	-1.53
15	Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	2058-58-4	氨基酸	-1.51
16	Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	617-65-2	氨基酸	-1.43
17	Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	4998-57-6	氨基酸	-1.26
18	Anserine	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	584-85-0	氨基酸	-1.24
19	Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	80-68-2	氨基酸	-1.23
20	Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	70-54-2	氨基酸	-1.04
21	Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	616-07-9	氨基酸	-0.96
22	β-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	107-95-9	氨基酸	-0.86
23	sarcosine	C ₃ H ₇ NO ₂	107-97-1	氨基酸	-0.79
24	Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	302-72-7	氨基酸	-0.68
25	aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	617-45-8	氨基酸	-0.67
26	Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	2517/4/6	氨基酸	-0.57
27	α-Aminoadipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	542-32-5	氨基酸	-0.54
28	Cystathionine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	535-34-2	氨基酸	-0.13
29	pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	535-75-1	氨基酸	0
30	Homocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ S	454-29-5	氨基酸	0.22

31	Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	59-51-8	氨基酸	0.37
32	Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	556-03-6	氨基酸	0.38
33	Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	443-79-8	氨基酸	0.73
34	Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	328-39-2	氨基酸	0.73
35	PGF2 α -EA	C ₂₂ H ₃₉ NO ₅	353787-70-9	脂肪酸类	0.9
36	Homocystine	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₂	462-10-2	氨基酸	1.03
37	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	1954/12/6	氨基酸	1.04
38	kynurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	343-65-7	氨基酸	1.09
39	Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	150-30-1	氨基酸	1.11
40	Cystine	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	923-32-0	氨基酸	1.23
41	8-iso-15-keto-PGF2 α	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	191919-01-4	脂肪酸类	1.84
42	PGD2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	41598-07-6	脂肪酸类	2.02
43	PGF2 α	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	551-11-1	脂肪酸类	2.14
44	PGD1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	17968-82-0	脂肪酸类	2.38
45	5-iPF2 α -VI	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	180469-63-0	脂肪酸类	2.49
46	LPC(16:0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	17364-16-8	甘油磷脂类	2.84
47	Lyso-PAF C-16	C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P	52691-62-0	脂肪酰	3.23
48	PGJ2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	60203-57-8	脂肪酸类	3.34
49	10S,17S-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	871826-47-0	脂肪酸类	3.81
50	13-HOTrE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	87984-82-5	脂肪酸类	4.88
51	LTA4	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	72059-45-1	脂肪酸类	5.05
52	9-HODE	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	98524-19-7	脂肪酸类	5.32
53	AEA	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	94421-68-8	脂肪酸类	5.66
54	OEA	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	111-58-0	脂肪酸类	6.36
55	DHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	6217-54-5	脂肪酸类	6.78
56	AA	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	506-32-1	脂肪酸类	6.91
57	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	301-02-0	脂肪酸类	7.07
58	PC(16:0/16:0)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	63-89-8	甘油磷脂类	10.88
59	PC(17:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	70897-27-7	甘油磷脂	11.94
60	ceramide(17:0)	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	67492-16-4	鞘脂类	13.87

1.4.4 样品前处理

取 50 μL 健康大鼠血浆，加入 200 μL 甲醇沉淀蛋白，再加入 50 μL 异丙醇，涡旋 60 s，在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14,000 rpm 的转速离心 10 min，取 250 μL 上清，真空冷冻干燥，50 μL 异丙醇:水 (50:50) 复溶，上机分析。

1.4.5 结果与讨论

◆ 与普通液相系统的目标物有效分离数量比较

图 5 所示为目标物混标溶液在二维系统上分析的色谱图，通过组合 HILIC 柱与反相柱 (图 6)，所有物质均得到了很好的分离。作为对比，仅使用单柱的普通液相系统，无论是 HILIC、C8、C18 还是宽极性的 T3 柱，均有部分物质没有保留 (图 7)。综合比较，二维液相系统能在 40 min 内完成对 60 种宽极性跨度物质的良好分离。

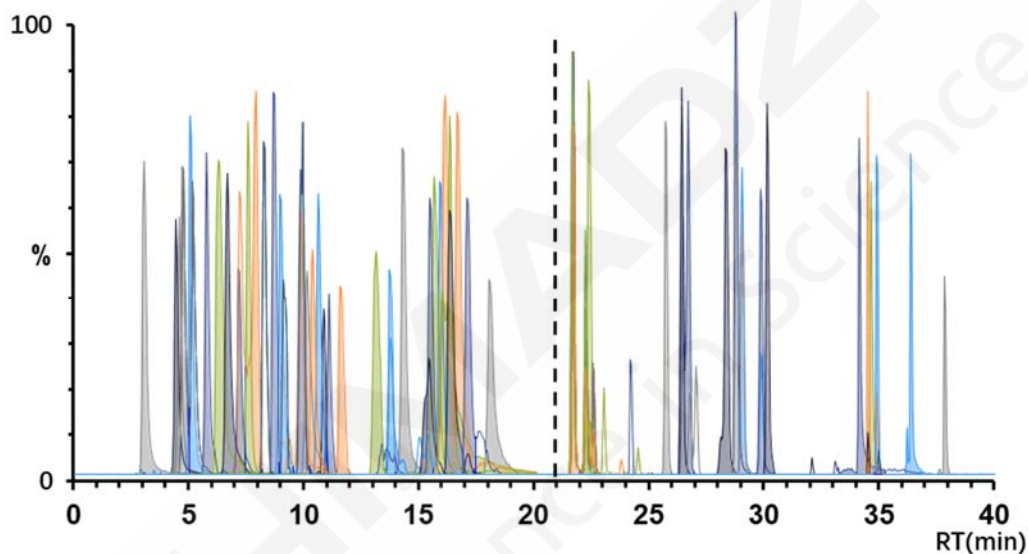


图 5. 全谱二维液质联用系统下的 60 种目标物的 XIC 图

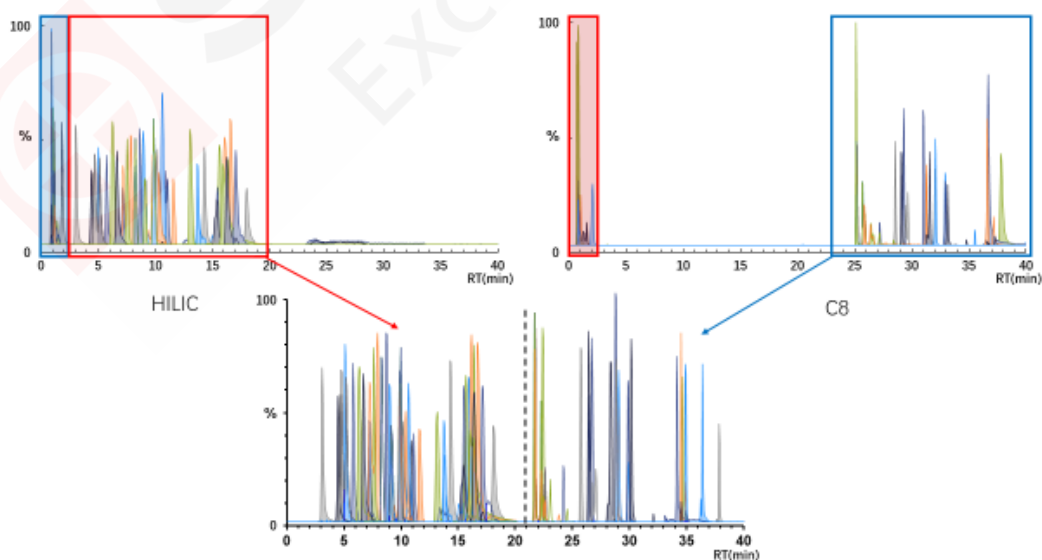


图 6. 全谱二维液质联用系统组合亲水柱与反相柱的优势

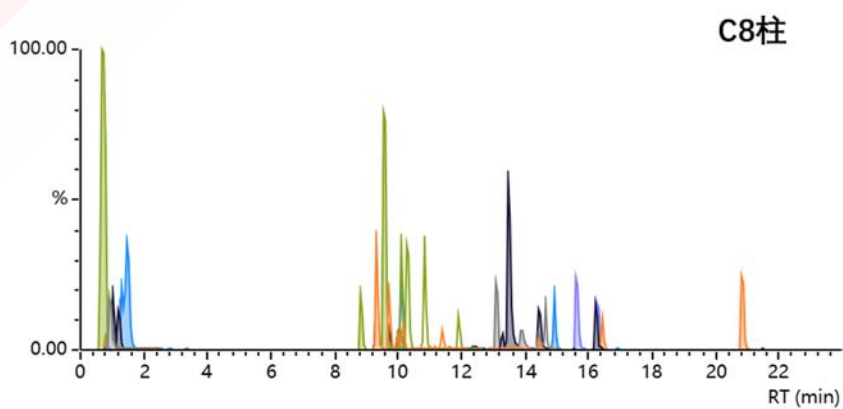
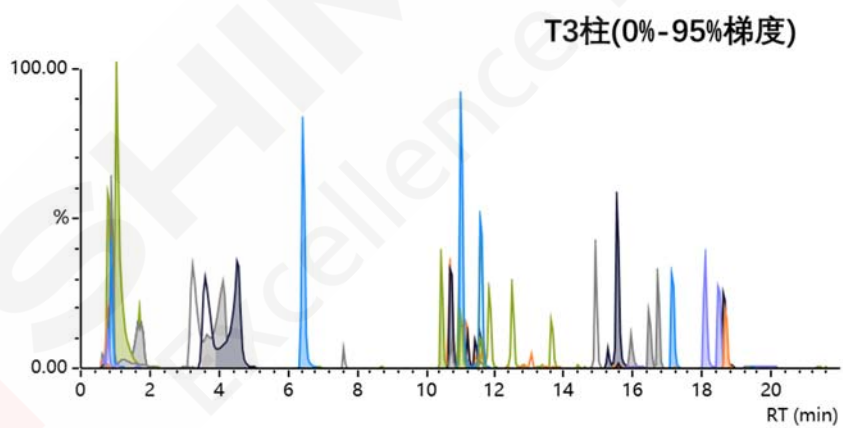
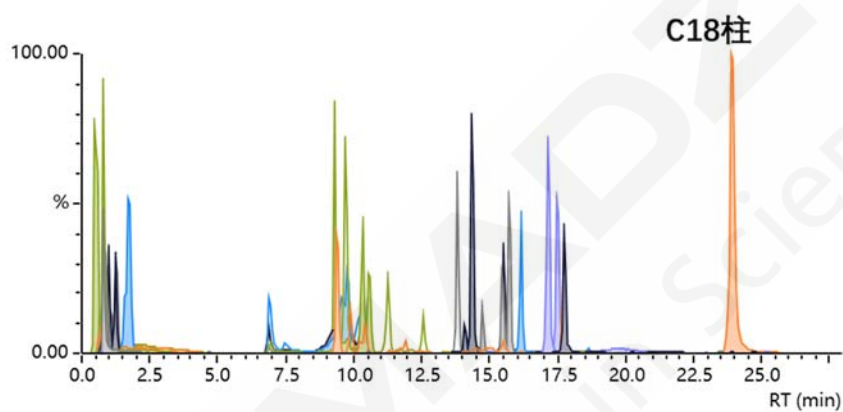
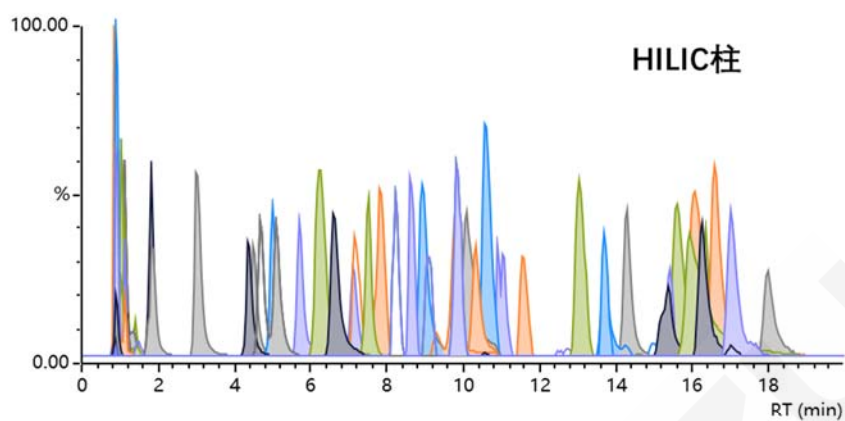


图 7. 不同单柱系统对 60 种目标物分离的 XIC 图

◆与普通液相系统的分离效果比较

在全谱二维系统的第二维分离中，目标物从第一维经定量环导入到第二维，并经历了较长时间的柱头稀释聚焦，因此有必要对分离效果进行评价。在第二维分离的 21 种脂质中有两组保留时间较近的同分异构体，分别为 1) PGD2 与 8-iso-15-keto-PGF2 α ; 2) 5-iPF2 α -VI、PGD1 与 PGF2 α ，在普通系统和全谱二维系统的分离图和分离度评价如图 8 和表 3：总体而言，两组化合物在普通反相系统和全谱二维系统上均满足分离度 >1.5 的要求，且分离效果几乎不变。以上两例表明，低极性物质在二维液相系统中虽然经历了定量环转移、柱头聚焦，但并没有因此而牺牲分离度。

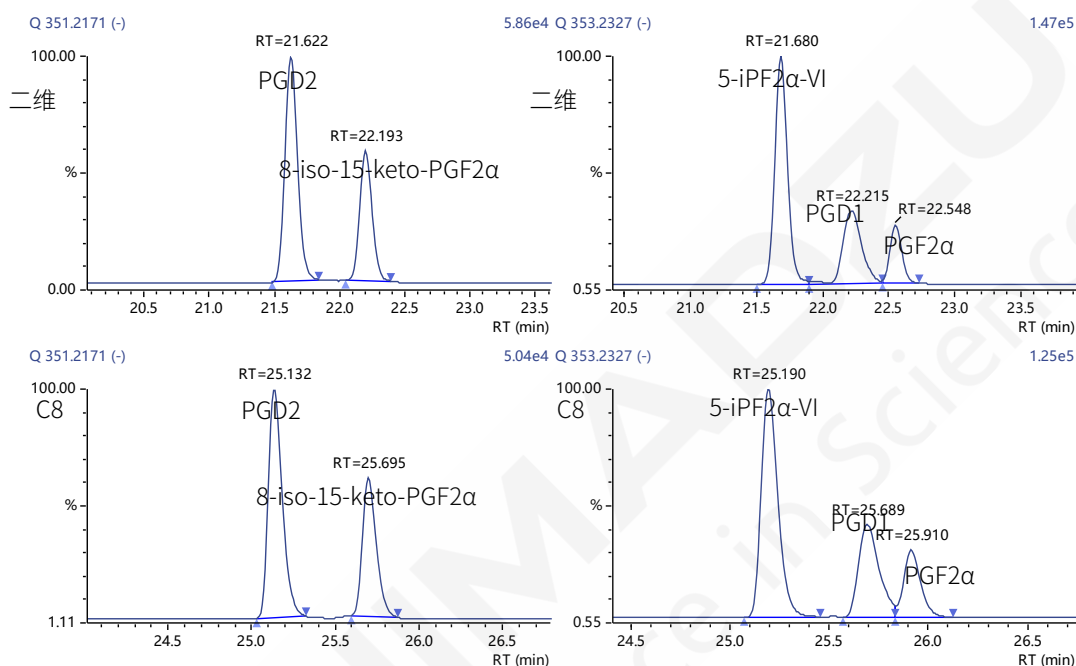


图 8. 两组同分异构体在二维液相系统(上)和普通反相液相 (C8) 的分离效果比较

表 3. 两组同分异构体在二维液相系统和普通 C8 反相液相的分离效果比较

物质	保留时间 (min)		分离度 (USP)	
	二维液相系统	反相液相	二维液相系统	反相液相
PGD2	21.622	25.132	—	—
8-iso-15-keto-PGF2 α	22.193	25.695	3.49	4.25
5-iPF2 α -VI	21.680	25.190	—	—
PGD1	22.215	25.689	2.65	3.269
PGF2 α	22.548	25.910	1.74	1.417

◆系统验证

60 种物质标准曲线线性良好 ($r^2 > 0.9908$)，准确度 80~119.3%。各物质详细标准曲线信息如表 4 所示，部分曲线如图 9 所示。

表 4. 目标物质标准曲线信息

编号	物质	线性方程	线性范围	相关系数 r^2	准确度 (%)
1	β -NAD	$Y = 27.3773X - 4540.27$	500-50000 $\mu\text{g/L}$	0.9994	93.5-108.3
2	Stachyose hydrate	$Y = 13.0699X + 18416.5$	1000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9961	88.6-109.4
3	uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine	$Y = 46.1893X - 16922.9$	1000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9967	88.6-109.0
4	D-Mannitol	$Y = 20.8037X + 4877.82$	500-20000 $\mu\text{g/L}$	0.9958	86.1-109.0
5	D- (+)-Glucose	$Y = 2.94615X - 4828.86$	2000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9985	96.3-107.6
6	taurine	$Y = 207.107X - 115.873$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	82.5-113.1
7	carnosine	$Y = 8710.80X + 626436$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9974	92.3-108.4
8	Hydroxyproline	$Y = 3938.83X - 3963.04$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9945	91.0-105.4
9	Hydroxylysine	$Y = 2016.78X + 23517.2$	10-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9949	82.0-111.2
10	Arginine	$Y = 5147.10X + 647805$	0.1-10 $\mu\text{mol/L}$	0.9988	92.0-107.3
11	creatinine	$Y = 29746.4X - 1577.74$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9934	80.3-114.4
12	Glutamine	$Y = 19489.2X + 6911.04$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9908	83.7-113.9
13	serine	$Y = 256.858X - 440.187$	2-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9977	96.1-109.6
14	citrulline	$Y = 816.776X - 99.0084$	1-20 $\mu\text{mol/L}$	0.9934	81.5-110.8
15	Asparagine	$Y = 7256.97X - 4481.96$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	94.7-104.3
16	Glutamic acid	$Y = 222.404X + 6799.61$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	80.4-111.6
17	Histidine	$Y = 17722.8X + 14027.3$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9942	83.4-107.7
18	Anserine	$Y = 63652.8X + 61248.1$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9927	80.1-110.8
19	Threonine	$Y = 10106.2X - 2292.85$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.999	95.5-104.5
20	Lysine	$Y = 973.668X + 25224.2$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9981	92.8-108.2
21	Ornithine	$Y = 633.757X + 38891.2$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9964	82.0-114.2
22	β -Alanine	$Y = 206.761X - 2047.21$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9968	82.8-110.7
23	sarcosine	$Y = 136.861X + 3557.43$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.997	84.4-111.0
24	Alanine	$Y = 328.451X - 1459.50$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9947	88.6-112.4
25	aspartic acid	$Y = 284.087X - 2314.85$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9925	83.2-115.0
26	Proline	$Y = 11690.3X - 4538.63$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9995	94.8-104.6
27	α -Aminoadipic acid	$Y = 3523.68X - 1480.10$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9985	88.4-112.0
28	Cystathionine	$Y = 2641.43X + 3220.09$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9944	80.0-118.5
29	pipecolic acid	$Y = 89671.1X - 13505.9$	0.4-20 $\mu\text{mol/L}$	0.9968	87.2-108.9

30	Homocysteine	$Y = 574.468X - 4944.69$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9914	85.0-117.3
31	Methionine	$Y = 8898.61X - 7423.06$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	89.6-114.5
32	Tyrosine	$Y = 4655.75X + 1078.29$	5-100 $\mu\text{mol/L}$	0.9979	91.7-104.8
33	Isoleucine	$Y = 5754.45X - 3406.97$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9997	92.4-104.8
34	Leucine	$Y = 8573.12X - 7335.90$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	90.2-111.9
35	PGF2 α -EA	$Y = 95.2196X - 548.681$	27.6-2761 $\mu\text{g/L}$	0.9998	93.5-106.4
36	Homocystine	$Y = 4856.97X - 16445.1$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9924	83.4-111.7
37	Tryptophan	$Y = 21175.9X - 14947.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9957	89.2-118.7
38	kynurenine	$Y = 24445.8X - 19599.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9954	87.7-119.3
39	Phenylalanine	$Y = 23357.4X - 16107.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9933	88.4-118.4
40	Cystine	$Y = 2617.43X - 38589.2$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	81.9-112.2
41	8-iso-15-keto-PGF2 α	$Y = 326.376X - 292.982$	13.01-1301 $\mu\text{g/L}$	0.9999	93.1-103.3
42	PGD2	$Y = 325.530X + 856.632$	23.4-2342 $\mu\text{g/L}$	0.9993	93.1-103.3
43	PGF2 α	$Y = 667.922X - 1874.48$	7.3-730 $\mu\text{g/L}$	0.9992	95.6-107.9
44	PGD1	$Y = 1881.10X + 474.898$	4-405 $\mu\text{g/L}$	0.9999	94.8-105.3
45	5-iPF2 α -VI	$Y = 4212.84X + 4195.03$	4-405 $\mu\text{g/L}$	0.9986	86.9-105.5
46	LPC(16:0)	$Y = 507.548X - 2969.19$	15-611 $\mu\text{g/L}$	0.9999	95.9-101.8
47	Lyso-PAF C-16	$Y = 1160.35X - 3546.84$	12-465 $\mu\text{g/L}$	0.9999	97.8-102.1
48	PGJ2	$Y = 394.399X + 1082.77$	8-813 $\mu\text{g/L}$	0.9938	81.0-114.1
49	10S,17S-DiHDoHE	$Y = 62.9644X - 3562.46$	53-1059 $\mu\text{g/L}$	0.9988	94.2-108.8
50	13-HOTrE	$Y = 470.932X - 1063.12$	7-268 $\mu\text{g/L}$	0.9915	87.4-103.7
51	LTA4	$Y = 191.633X + 488.279$	12-605 $\mu\text{g/L}$	0.9938	88.4-112.7
52	9-HODE	$Y = 198.250X - 1070.38$	22.5-900 $\mu\text{g/L}$	0.9993	95.9-105.5
53	AEA	$Y = 495.954X + 2652.58$	9-899 $\mu\text{g/L}$	0.9949	85.6-108.3
54	OEA	$Y = 463.389X - 1668.86$	21-2137 $\mu\text{g/L}$	0.999	85.7-114.8
55	DHA	$Y = 455.245X + 4470.52$	125.6-6281 $\mu\text{g/L}$	0.9977	93.5-106.1
56	AA	$Y = 651.026X - 3998.52$	35-3477 $\mu\text{g/L}$	0.999	92.8-110.2
57	Oleamide	$Y = 340.736X - 223.771$	2.5-100 $\mu\text{g/L}$	0.9985	85.4-108.6
58	PC(16:0/16:0)	$Y = 361.602X + 861.185$	10-418 $\mu\text{g/L}$	0.9998	93.8-104.7
59	PC(17:0)	$Y = 650.588X - 3731.03$	13-520 $\mu\text{g/L}$	0.9996	93.2-102.9
60	ceramide(17:0)	$Y = 127.295X - 1046.25$	66-2663 $\mu\text{g/L}$	0.9993	89.6-105.0

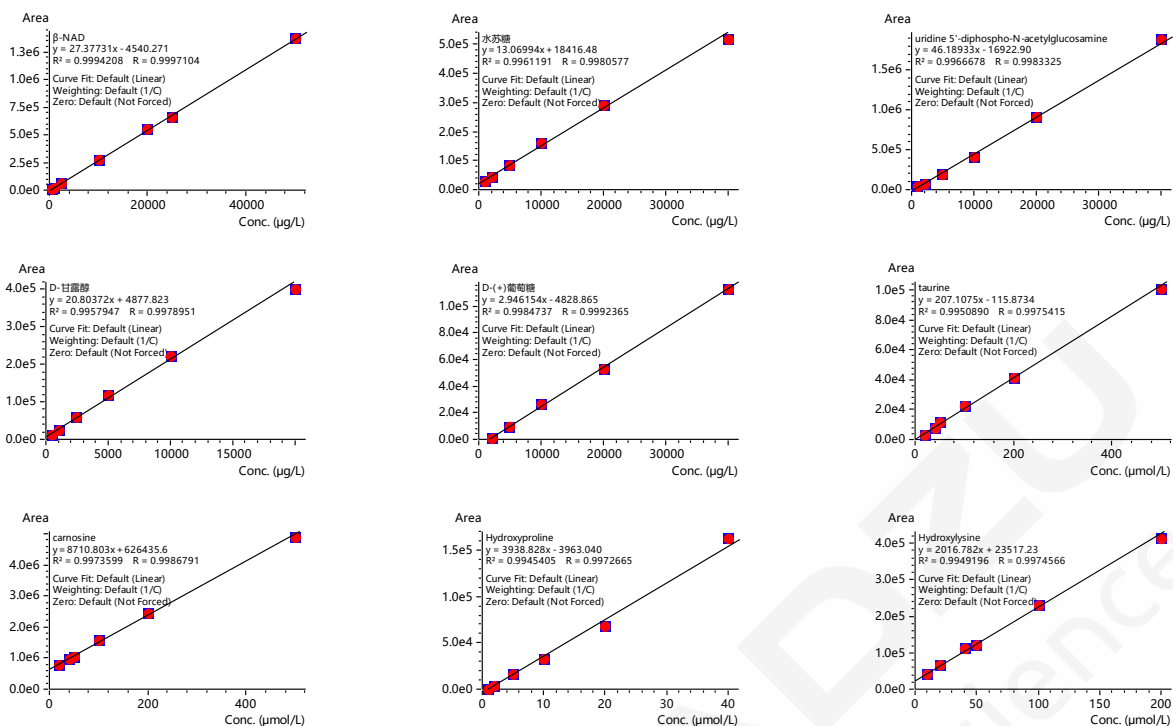


图 9. 部分目标物质标准曲线

◆重复性

取各物质线性范围最低点、中间浓度点及最高浓度点连续进样 6 针，峰面积 RSD < 5.9%，保留时间 RSD < 0.39% (表 5)。

表 5. 保留时间与峰面积重复性 (n=6)

编号	物质	保留时间 RSD (%)			峰面积 RSD (%)		
		low	medium	high	low	medium	high
1	β-NAD	0.06	0.04	0.11	1.7	3.4	3.5
2	Stachyose hydrate	0.09	0.09	0.11	1.2	2.5	3.4
3	uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine	0.09	0.08	0.1	2.2	0.8	2.6
4	D-Mannitol	0.22	0.19	0.15	2.0	1.9	5.1
5	D-(+)-Glucose	0.21	0.15	0.15	5.2	3.6	3.2
6	taurine	0.25	0.18	0.21	5.9	5.1	4.0
7	carnosine	0.05	0.04	0.09	1.3	1.6	2.8
8	Hydroxyproline	0.21	0.13	0.14	2.6	2.6	3.7
9	Hydroxylysine	0.09	0.04	0.07	4.3	3.4	5.3
10	Arginine	0.06	0.05	0.06	0.7	2.1	1.5
11	creatinine	0.34	0.19	0.18	3.4	3.0	1.2
12	Glutamine	0.14	0.08	0.15	2.5	5.3	3.0
13	serine	0.15	0.18	0.24	4.9	1.0	3.6
14	citrulline	0.19	0.09	0.3	4.6	3.8	2.7
15	Asparagine	0.17	0.1	0.15	3.9	4.8	3.4
16	Glutamic acid	0.09	0.06	0.16	2.0	2.0	4.0
17	Histidine	0.05	0.03	0.12	3.6	3.8	2.7

18	Anserine	0.08	0.04	0.09	1.7	0.8	1.4
19	Threonine	0.18	0.08	0.16	3.7	5.1	4.6
20	Lysine	0.09	0.08	0.11	1.4	3.7	1.5
21	Ornithine	0.11	0.06	0.11	1.4	2.5	4.8
22	β -Alanine	0.29	0.24	0.3	4.6	4.0	5.2
23	sarcosine	0.37	0.26	0.09	2.1	5.6	2.6
24	Alanine	0.33	0.2	0.3	2.8	5.5	3.9
25	aspartic acid	0.22	0.29	0.14	3.4	3.7	2.4
26	Proline	0.26	0.17	0.17	4.7	2.6	2.3
27	α -Aminoadipic acid	0.11	0.07	0.12	5.3	5.7	5.4
28	Cystathionine	0.07	0.04	0.14	1.9	4.1	1.5
29	pipecolic acid	0.25	0.17	0.18	1.7	3.7	2.6
30	Homocysteine	0.1	0.12	0.09	4.9	3.0	3.6
31	Methionine	0.33	0.21	0.2	2.9	2.2	5.1
32	Tyrosine	0.27	0.17	0.19	4.1	4.2	2.5
33	Isoleucine	0.34	0.2	0.26	4.1	4.1	3.5
34	Leucine	0.34	0.22	0.22	3.2	3.9	4.1
35	PGF2 α -EA	0.11	0.1	0.03	2.1	0.9	4.4
36	Homocystine	0.09	0.05	0.12	3.0	2.4	3.2
37	Tryptophan	0.33	0.21	0.28	2.7	5.4	5.6
38	kynurenine	0.39	0.22	0.27	3.1	5.1	4.5
39	Phenylalanine	0.37	0.23	0.27	2.6	4.6	4.3
40	Cystine	0.09	0.07	0.1	5.4	2.3	2.6
41	8-iso-15-keto-PGF2 α	0.13	0.12	0.05	2.6	0.6	2.7
42	PGD2	0.13	0.14	0.05	2.4	0.6	1.6
43	PGF2 α	0.12	0.11	0.05	1.4	1.1	2.2
44	PGD1	0.13	0.12	0.05	2.2	0.6	2.3
45	5-iPF2 α -VI	0.13	0.13	0.05	2.2	0.4	1.6
46	LPC(16:0)	0.1	0.07	0.01	4.0	1.1	0.8
47	Lyso-PAF C-16	0.04	0.06	0.01	3.8	1.3	0.7
48	PGJ2	0.07	0.06	0.04	1.8	2.2	4.0
49	10S,17S-DiHDoHE	0.11	0.05	0.06	5.5	0.8	1.9
50	13-HOTrE	0.11	0.06	0.05	3.8	0.5	1.0
51	LTA4	0.07	0.06	0.04	5.3	3.2	2.4
52	9-HODE	0.1	0.04	0.06	2.5	0.7	1.3
53	AEA	0.04	0.05	0.02	3.2	1.2	0.7
54	OEA	0.02	0.04	0.01	3.5	0.7	1.1
55	DHA	0.06	0.04	0.07	1.3	2.2	0.6
56	AA	0.05	0.03	0.07	1.9	1.2	0.8
57	Oleamide	0.04	0.05	0.02	4.2	1.7	1.9
58	PC(16:0/16:0)	0.01	0.02	0.01	2.3	0.6	1.9
59	PC(17:0)	0.01	0.02	0.01	4.4	1.0	4.4
60	ceramide(17:0)	0.09	0.08	0.1	2.2	0.8	2.6

◆ 残留考察

进样线性高点浓度样品后进样空白溶剂（水/甲醇 = 50/50, v/v）分析，所有目标物质均未出峰。

1.4.6 实际样品分析

◆ 基质效应

以基质后加标的方式考察基质效应，除 4 种氨基酸外，其余物质在二维系统上的基质效应均在 60-140% 之间，且二维系统与普通液相系统基质效应差别不大（图 10）。

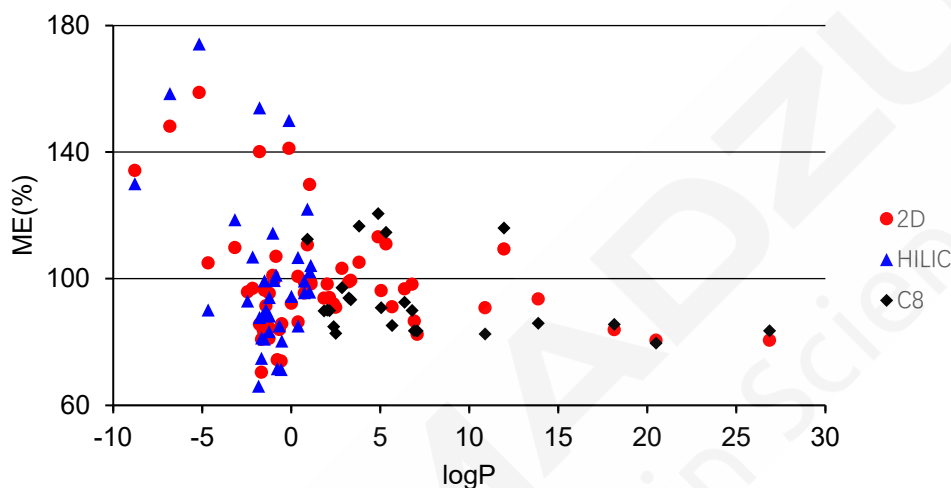


图 10. 目标物质在二维系统和普通液相上的基质效应

◆ 峰容量对比

大鼠血浆经前述方法前处理后上机分析，比较同一样品在全谱二维液质联用系统、C18 柱、HILIC 柱和 T3 柱上能分离得到的总色谱峰数。所得扫描数据经 Insight Explore 自动提取峰表，筛选条件：质谱强度 500，响应 Medium，同时排除死时间（HILIC < 2 min，C18、T3 < 24 min）流出的色谱峰，所得结果如表 6 及图 11、图 12 所示。无论是正模式还是负模式，全谱二维液质联用系统的峰容量均大于 HILIC、C8、C18 及 T3 单色谱柱系统。

表 6. 不同液相系统分析大鼠血浆样品所得色谱峰数

	二维液相	HILIC	C8	C18	T3
正模式	7208	956	5671	4908	4530
负模式	4314	794	3307	3014	3444
总计	11522	1750	8978	7922	7974

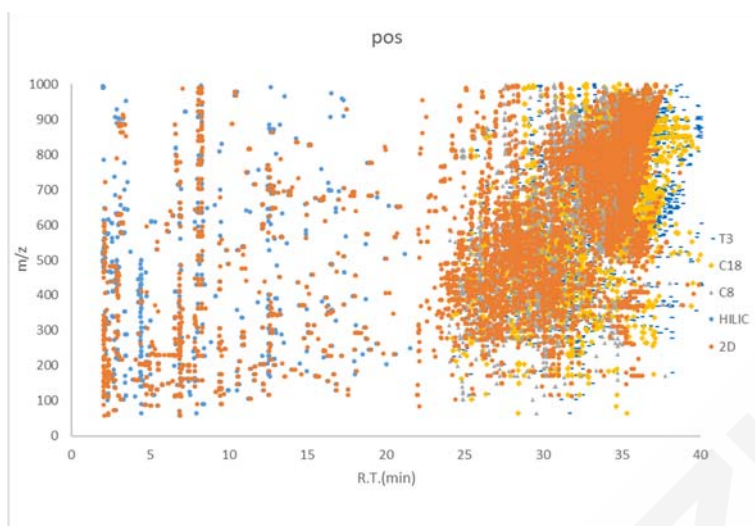


图 11. 正模式下不同系统分析大鼠血浆样品色谱峰二维图

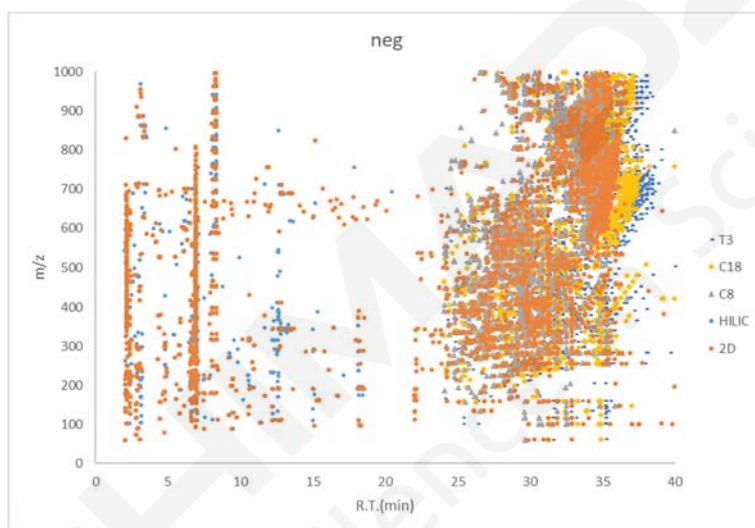


图 12. 负模式下不同系统分析大鼠血浆样品色谱峰二维图

1.4.4 结论

岛津开发了全新的全谱二维液相系统，通过将亲水作用色谱（HILIC）与反相色谱（C8）组合，可以实现一次进样同时分析高极性物质和中低极性物质。通过 LogP 范围介于-8.79~13.87 的 60 种目标物的系统验证实验以及血浆实际样品分析，证明该系统相较于普通的反相系统或亲水作用色谱系统，能在不明显增加分析时间、不影响分离度、简化样品前处理步骤的前提下，消除无效的死时间分离，显著提高峰容量，可同时分离高中低极性化合物，有望应用于代谢组学、天然产物、农兽残分析、药物代谢等宽极性范围、多目标化合物、复杂基质的各类分析项目。

该验证实验结果发表在 Analytical Chemistry 杂志上，具体信息参考以下参考文献。

1.4.5 参考文献

Jieqing Feng, Qisheng Zhong, Jiangmeng Kuang, Jiaqi Liu, Taohong Huang, and Ting Zhou. Simultaneous Analysis of the Metabolome and Lipidome Using Polarity Partition Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Anal. Chem. 2021, 93, 15192—15199

第 2 章 全组分分析/非靶向代谢组学应用案例

全组分分析，由于目标物未知或者未做任何预设，因此对色谱分离技术要求极高。非靶向代谢组学是全组分分析的一个典型案例——非靶向代谢组学样品分析对仪器、方法有极高的要求：色谱分离、质谱检测需要尽可能覆盖未知化合物，组学样品又存在样品珍贵、总分析时间长、样品基质复杂、对质谱负荷较重等问题；因此如何在最短的分析时间内，消耗最少的样品，覆盖尽可能多的未知物，对质谱端产生最小的污染负荷并维持数据稳定性，是非靶向代谢组学分析一直面临的挑战。

岛津通过全谱二维液质联用系统的宽极性分离+LCMS-9050 的正负极同时扫描功能，组成了 4in1 特色技术组合方案。相比常规液质分析方法，可以节省 3/4 的样品和总分析时间，减少质谱 3/4 的分析负担，并通过平行设计实现充分平衡和清洗，减少了交叉污染和记忆效应，提高了系统稳定性和重现性。

目前利用全谱二维液质联用系统与专家课题组合作，有以下几个应用案例供参考：

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于大鼠抑郁症的非靶向代谢组学研究

全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析黑米样品

全谱二维液相-Q-TOF 联用分析人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠初步代谢机理

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于前列腺癌生物标志物筛选

全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析细菌发酵液中生物农药

全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析人胎盘脂多糖注射液

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统对不同产地的暗纹东方鲀肌肉组织进行非靶向代谢组学分析

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于大鼠抑郁症的非靶向代谢组学研究

摘要: 本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对抑郁症大鼠血浆进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统,共找到 8083 个特征峰,其中第一维 2713 个,第二维 5370 个。正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)表明正常组与模型组有显著差异,共找到 247 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物,经数据库比对鉴定出 44 种,主要包括 39 种脂质、2 种氨基酸、3 种生物碱,主要影响的通路包括甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等。

关键词: 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 非靶向代谢组学 抑郁症

抑郁症(depression)是当前造成非致死健康损失的最主要因素,重度抑郁症是致残率最高的疾病之一。据统计,全球有3.22亿人口患有抑郁症,占总人口的4.4%,中国和印度是患者最为集中的地区。据调查,2010-2019 年中国老年人抑郁症患病率高达26%,2015-2019年中国产妇产后抑郁症检出率为15%。抑郁症对患者及其家庭影响巨大,患病率持续上升,引起了越来越多的社会关注。

目前抑郁症的病理机理并不明确,在研究方面有不少病因假说,较为公认的有细胞因子假说、单胺假说、神经可塑性假说。尽管关于抑郁症的病因存在不少假说,但是这些假说都有其局限性,不能完全解释清楚抑郁症的发生。因此,仍然需要开展更多的研究来揭示抑郁症。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水

平及其变化规律的独立学科,是疾病研究的重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大,难以用一种方法完成分析。本研究利用全谱二维液相系统,可以同时完成高极性和低极性的代谢物分析,大大节省了实验工作量和分析时间。该系统与岛津四极杆-飞行时间质谱LCMS-9030结合,可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学全组分研究。

本研究利用全谱二维液相-Q-TOF系统,以非靶向代谢组学的工作流程分析了健康大鼠和抑郁症大鼠的血浆样品,发现44种差异性代谢物,主要为脂质,此外还有氨基酸、生物碱等代谢产物,主要影响甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢。

1. 实验部分

1.1 抑郁症大鼠模型构建

采用慢性不可预知轻度应激(Chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立抑郁症大鼠模型,建模 28 天,每天随机给予 1-2 种压力源。通过大鼠体重、旷场实验行为学得分、糖水偏好率、高架十字迷宫开放臂滞留时间、强迫游泳实验挣扎行为得分等 5 个指标共同评价抑郁症大鼠模型构建是否成功。

1.2 样品采集及处理

模型建立并评价完成后,采用眼眦静脉采血方式收集大鼠血液于抗凝管,随后将血液离心(4000 rpm,

8 min), 小心吸取上层淡黄色血浆于已标记的离心管, 用冰盒带回, 储存在-80 °C 冰箱。

样品解冻后, 取 50 μ L 大鼠血浆, 加入 200 μ L 甲醇沉淀蛋白, 再加入 50 μ L 异丙醇, 涡旋 60 s, 在 10 °C 下以 14,000 rpm 的转速离心 10 min, 取 250 μ L 上清, 真空冷冻干燥, 50 μ L 异丙醇:水 (50:50) 复溶, 上机分析。正常组与模型组各取 12 份样品进行分析, 每份样品各取 10 μ L, 均匀混合, 制成质量控制 (QC) 样品。QC 样品在样品分析前连续进样 6 针, 之后每分析 6 个样品插入 2 针 QC, 通过 QC 样全程监测数据质量。

1.3 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用, 其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱 (第一维为 HILIC 亲水作用色谱柱, 第二维为 C8 反相色谱柱)、一个定量环、一个高压十通阀构成, 检测器为 LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪, 具体连接方式及操作流程、原理参考应用报告 (《全谱二维液相系统开发及性能验证》)。

全谱二维液相的具体配置为:

系统控制器:	CBM-20A	脱气机:	DGU-20A _{5R}
输液泵:	LC-30AD \times 4	自动进样器:	SIL-30AC
柱温箱:	CTO-20AC	检测器:	SPD-M40
色谱工作站:	LabSolutions Ver. 5.97	十通阀:	FCV-36AH

1.4 数据处理

采用 Signpost MS 软件对谱图数据处理 (离子提取、峰对齐、峰匹配、峰强度校正) 后, 将数据导入 SIMCA 软件进行统计分析, 找出差异性代谢物, 依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS DIAL 及 HMDB 等平台搜索确认代谢物种类, 然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱图与色谱峰

血浆样品典型色谱图如图 1 所示。

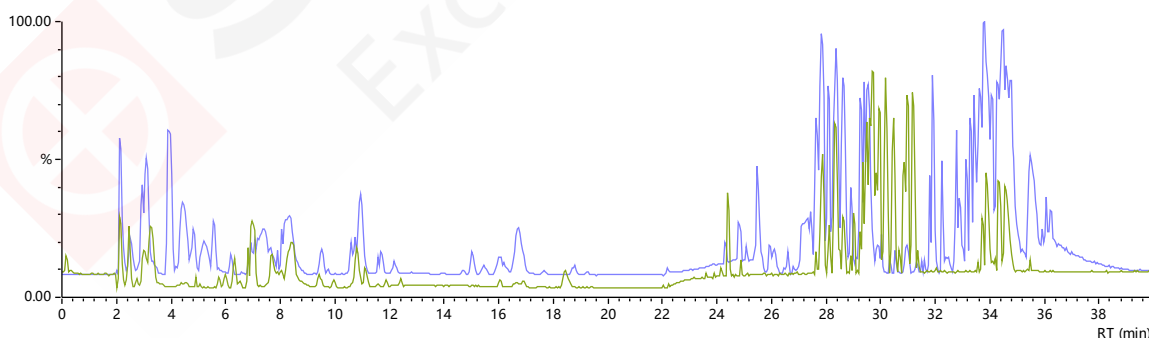


图 1. QC 样品 BPC 图 (蓝: 正模式; 绿: 负模式)

所有样品经过峰提取与峰对齐处理后, 共得到 8083 个特征峰; 经过 80% 规则 (在 80% 以上的样品中都有检出) 筛选后, 还剩 2875 个特征峰; 在这 2875 个特征峰中, 剔除在 QC 样品中峰面积 RSD > 30% 特征峰, 还剩 2752 个, 将这 2752 个特征峰导入 SIMCA 软件, 用于统计分析 (表 2)。

表 2. 血浆样品分析特征峰数

特征峰数	正模式		负模式	
	第一维	第二维	第一维	第二维
初始	1484	3184	1229	2186
80%规则筛选	568	984	420	923
QC 样 RSD < 30%	551	882	411	908
VIP > 1	45	101	32	69

2.2 差异性代谢物查找

正交偏最小二乘判断分析 (OPLS-DA) 结果显示, 正常组与模型组可以明显地区分, 表明抑郁症大鼠与正常大鼠血浆代谢产物有显著差异 (图 2)。

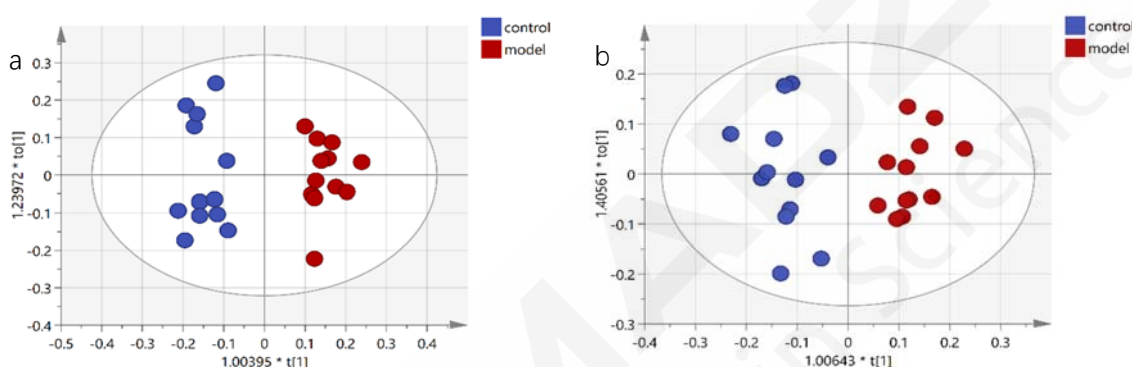


图 2. 正常组与模型组 OPLS-DA 得分图 (a: 正模式; b: 负模式)

以交叉验证的方式对上述 OPLS-DA 模型进行验证, 结果表明: 正模式下截距 $R^2=0.594$, $Q^2=-0.475$, 负模式下 $R^2=0.481$, $Q^2=-0.617$, 模型可靠, 没有过拟合 (图 3)。

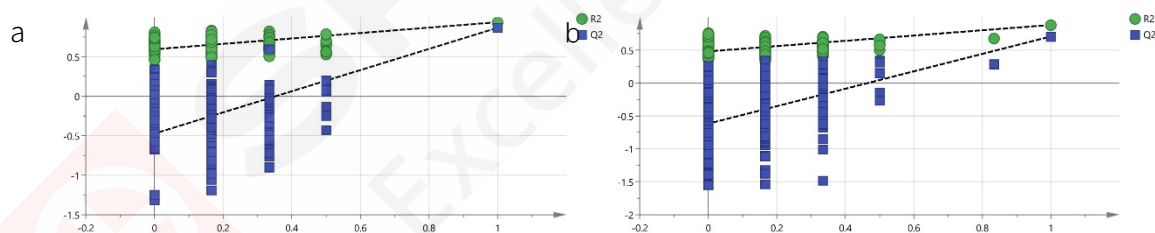


图 3. OPLS-DA 交叉验证结果 (a: 正模式; b: 负模式)

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物, 选取 $VIP > 1$ 的特征峰, 二维色谱正负模式下候选差异性代谢物共 247 个(表 2)。

2.3 差异性代谢物鉴定

将 247 个 $VIP > 1$ 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质谱图导入 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配进行鉴定 (图 4), 所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 44 种差异性代谢物, 包括 39 种脂质, 此外还有脯氨酸、谷氨酸、肉碱、甜菜碱和脯氨酸甜菜碱; 所有物质质量测定误差 < 3 ppm; 16 种物质浓度水平上调, 另外 28 个浓度下调; 29 个物质 t 检验 $p < 0.01$ (表 3)。

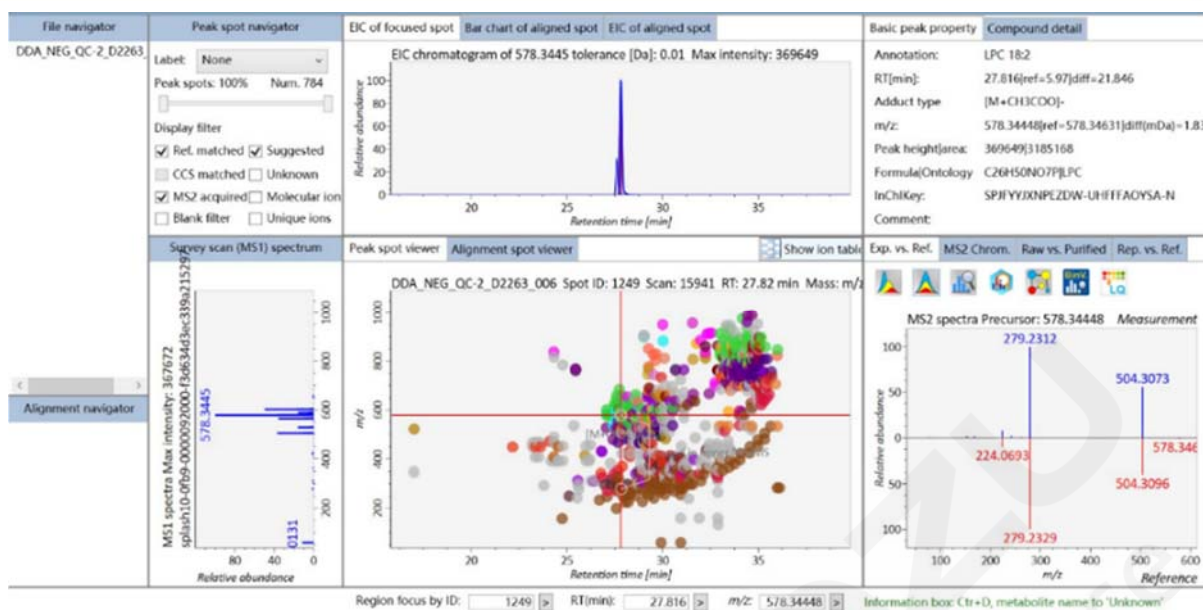


图 4. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 3. 差异性代谢物鉴定结果表

编号	物质	模式	R.T.(min)	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)	上/下调*
1	Proline betaine	+	4.96	144.1013	144.1019	0.59	↑+
2	Uric acid	-	7.14	167.0199	167.0210	1.10	↑++
3	Proline	+	7.17	116.0698	116.0706	0.78	↑+
4	Carnitine	+	7.71	162.1119	162.1125	0.53	↑++
5	Glutamic acid	+	12.56	148.0599	148.0600	0.09	↓++
6	LPC(20:5)	+	27.08	542.3233	542.3241	0.80	↑+
7	LPC(20:4)	-	27.77	602.3444	602.3463	1.89	↓+
8	LPC(18:2)	+	27.89	542.3207	542.3217	0.98	↑++
9	LPC(16:0)	+	28.34	518.3209	518.3217	0.80	↑++
10	LPC(18:1)	+	28.41	522.3544	522.3554	0.98	↑+
11	LPC(17:0)	+	28.90	510.3547	510.3554	0.67	↓++
12	LPC(20:2)	+	28.91	548.3701	548.3711	0.97	↓++
13	LPC(18:0)	-	29.23	568.3597	568.3620	2.32	↓+
14	LPC(20:1)	+	29.66	572.3679	572.3687	0.79	↓+
15	Oleic acid	-	30.38	281.2484	281.2486	0.19	↑+
16	Stearic acid	-	31.11	283.2654	283.2643	1.13	↑++
17	PC(38:7)	+	32.87	826.5347	826.5357	0.98	↑++
18	PC(42:10)	+	32.97	854.5682	854.5694	1.16	↓++
19	PC(40:8)	+	33.16	830.5688	830.5694	0.61	↓++
20	PC(37:6)	+	33.22	792.5534	792.5538	0.36	↓++
21	DG(44:10)	+	33.25	739.5247	739.5272	2.50	↑++
22	PC(35:4)	+	33.42	768.5529	768.5538	0.91	↓++
23	PC(40:7)	+	33.43	832.5840	832.5851	1.10	↓++
24	PC(38:6)	-	33.52	850.5577	850.5604	2.74	↑++
25	PE(34:2)	+	33.65	716.5216	716.5225	0.91	↑+

26	PC(42:8)	+	33.65	858.6005	858.6007	0.25	↓ ⁺⁺
27	PC(36:4)	-	33.72	826.5580	826.5604	2.44	↓ ⁺
28	PC(32:1)	+	33.79	732.5530	732.5538	0.73	↑ ⁺
29	DG(36:3)	+	34.02	641.5119	641.5115	0.43	↓ ⁺⁺
30	PE(38:4)	-	34.07	766.5372	766.5392	2.01	↓ ⁺⁺
31	PC(37:4)	+	34.07	796.5839	796.5851	1.22	↓ ⁺⁺
32	DG(34:1)	+	34.12	617.5133	617.5115	1.84	↓ ⁺⁺
33	DG(36:4)	+	34.13	634.5398	634.5405	0.74	↓ ⁺⁺
34	PC(42:7)	+	34.20	860.6149	860.6164	1.46	↓ ⁺⁺
35	PC(36:2)	-	34.59	830.5893	830.5917	2.38	↓ ⁺⁺
36	TG(60:12)	+	35.62	968.7688	968.7702	1.40	↓ ⁺⁺
37	TG(56:9)	+	35.66	918.7539	918.7545	0.61	↓ ⁺⁺
38	TG(58:10)	+	35.70	944.7702	944.7702	0.00	↓ ⁺⁺
39	TG(54:7)	+	35.72	894.7538	894.7545	0.74	↓ ⁺
40	TG(58:9)	+	35.78	946.7860	946.7858	0.12	↓ ⁺⁺
41	TG(56:7)	+	35.94	922.7846	922.7858	1.22	↓ ⁺
42	TG(58:8)	+	35.95	948.8001	948.8015	1.46	↓ ⁺⁺
43	TG(56:6)	+	36.10	924.8003	924.8015	1.22	↓ ⁺
44	TG(54:3)	+	36.41	902.8168	902.8171	0.25	↓ ⁺

*: ↑ 上调, ↓ 下调, + p < 0.05, ++ p < 0.01.

2.4 通路分析

将表 3 中鉴定出的 63 个物质导入 MetaboAnalyst 平台进行通路分析, 发现患抑郁症大鼠主要受影响的代谢通路有甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等 (图 5)。

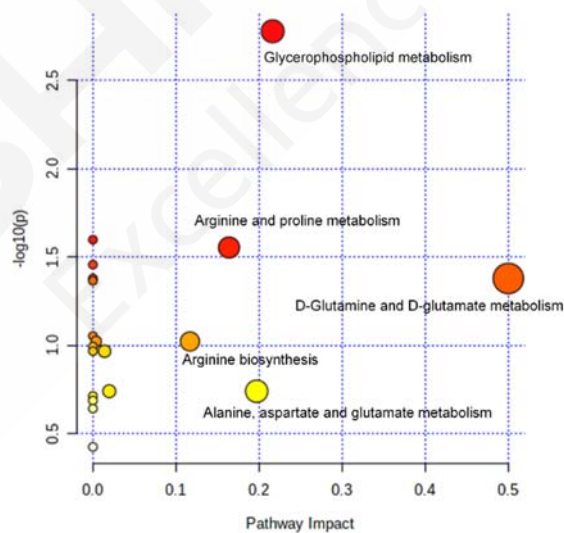


图 5. 抑郁大鼠受影响的主要代谢通路

3. 结论

本文利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用，对抑郁症大鼠血浆进行了非靶向代谢组学研究。全谱二维液相系统扩大了代谢物分析的极性范围，加上 Q-TOF 的高分辨定性能力，共找到 8083 个特征峰，其中 2713 种于第一维亲水相色谱流出，5170 种于第二维反相色谱流出。OPLS-DA 分析表明，正常组与模型组血浆成分有显著区别，利用 VIP 值>1 筛查到 247 种差异性代谢物，通过准确 m/z 及 MS² 库搜索鉴定出 44 种，包括 39 种脂质、2 种氨基酸、3 种生物碱。这些差异性代谢物主要影响甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等。本研究增进了对抑郁症的认识，同时表明全谱二维液相系统作为一种有力的工具可帮助研究者一次性分析极性跨度更大的代谢物。

4. 参考文献

Jieqing Feng, Qisheng Zhong, Jiangmeng Kuang, Jiaqi Liu, Taohong Huang, and Ting Zhou. Simultaneous Analysis of the Metabolome and Lipidome Using Polarity Partition Two-Dimensional Liquid Chromatography—Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2021, 93, 15192—15199



全谱二维液相-Q-TOF 联用系统定性分析黑米样品

摘要: 本文使用全谱二维液相系统与 LCMS-9050 联用对黑米样品进行定性分析。正负模式同时采集, 连续进样 26 h, TIC 图重复性良好, 正负模式下内标的 m/z 偏差在 1 ppm 以内。黑米样品正模式共提取 6934 个 m/z, 负模式共提取 3951 个 m/z, 并对部分峰面积大于 1% 的组分进行定性分析。该系统可实现宽极性组分正负模式同时采集, 达到 “4 in 1” 的效果, 大大提高采集效率。。

关键词: 全谱二维液相系统 Q-TOF 黑米

技术特点:

- ❖ 全谱二维与 LCMS-9050 联用 “4 in 1” 特点, 节省 3/4 样品和时间, 且数据稳定可靠。
- ❖ 结合 Insight Explore 软件、MS-DIAL 数据库对主要化合物实现定性分析。

黑米为我国稻米资源中的珍贵稻种, 在我国已有 1000 多年的种植历史, 黑米具有丰富的营养物质, 包括黄酮、生物碱、甾醇、强心甙、皂甙、维生素 C、叶绿素、花青素等, 此外, 黑米中氨基酸含量也非常丰富。《本草纲目》中记载, 黑米具有 “暖肝强脾、补肾滋阴、活血养目、强身健体” 等药用和保健功能。

岛津全谱二维液相系统, 拥有在线稀释专利技术和极性分流、双重梯度特色技术, 可以同时完成高极

性和低极性的代谢物分析, 岛津 LCMS-9050 正负极切换时间短, 可实现正负模式同时采集, 采用全谱二维液相系统同 LCMS-9050 联用, 强强联合, 1 针分析即可达到传统 4 针分析效果 (4 in 1), 大大节省了实验工作量和分析时间。

本研究利用全谱二维液相-Q-TOF 系统, 对黑米中不同极性的主要化合物进行定性分析, 为相关研究提供参考。

1. 实验部分

仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用, 具体配置为:

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A5R×2
输液泵	: LC-30AD×4	自动进样器	: SIL-30ACMP
定量环	: 500 μL	柱温箱	: CTO-20AC
六通阀	: FCV-12AH×2	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 3.7		

2. 结果与讨论

2.1 黑米样品 TIC 图

黑米样品进行处理后进样分析, 正负模式同时采集, TIC 图如下。从 TIC 图中可以看出, 黑米样品经过全谱二维液相分离后, 高极性和低极性化合物实现有效分离。

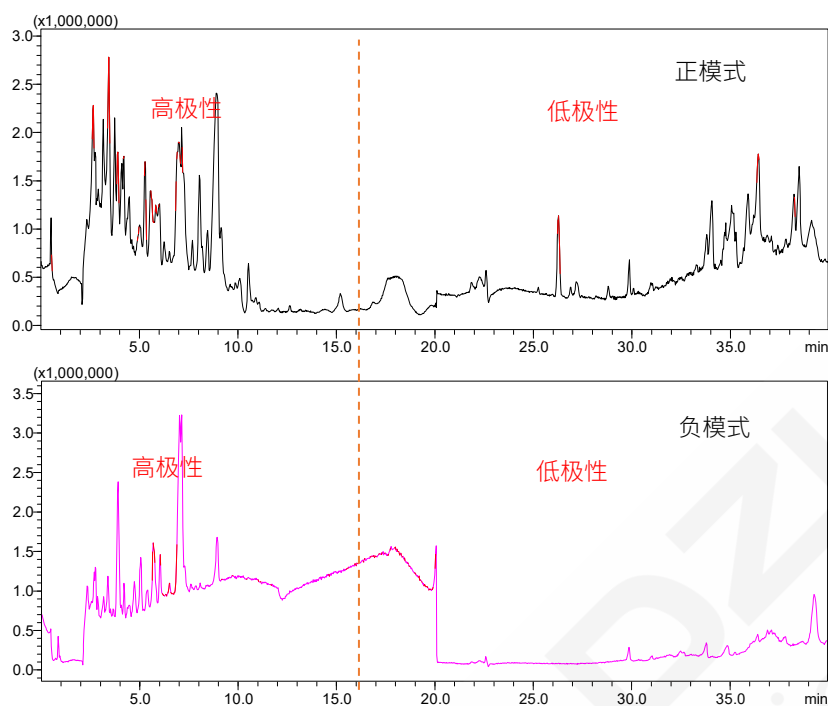


图 1. 黑米样品 TIC 图

2.2 仪器稳定性考察

LCMS-9050 进行正负模式同时采集，连续运行 26 h，黑米样品正模式和负模式 TIC 图重复性非常好，加入的两个内标 m/z 偏差基本在 1 ppm 以内，说明正负模式同时采集仪器非常稳定，具体结果见图 2、3。

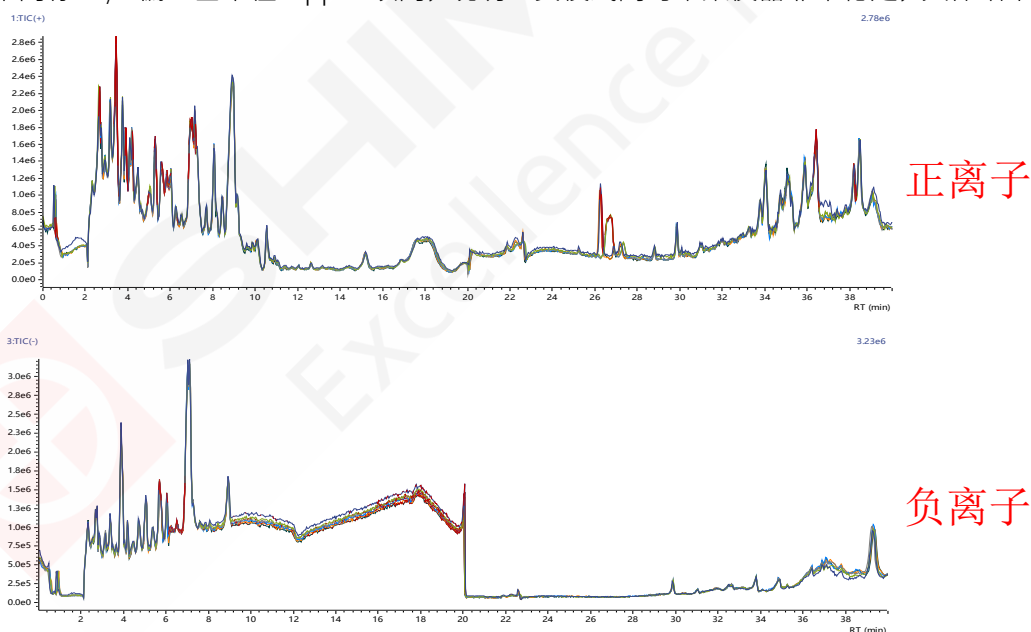


图 2. 黑米样品样品正负模式 TIC 重叠图 (n=9)

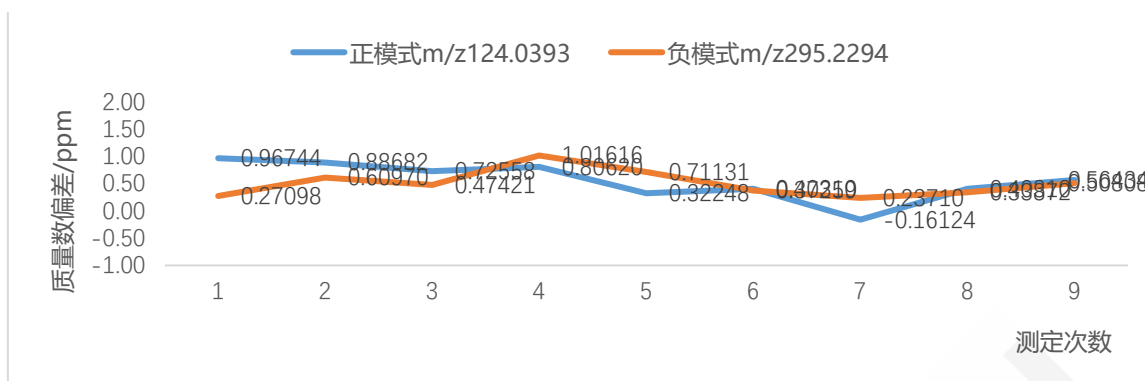


图 3. 正负模式质量数偏差

2.3 黑米样品定性分析

使用 MS-DIAL 对 DDA 采集的数据进行提取, 正模式共提取 6934 个 m/z, 负模式共提取 3951 个 m/z, 其散点图和提取色谱图如下。

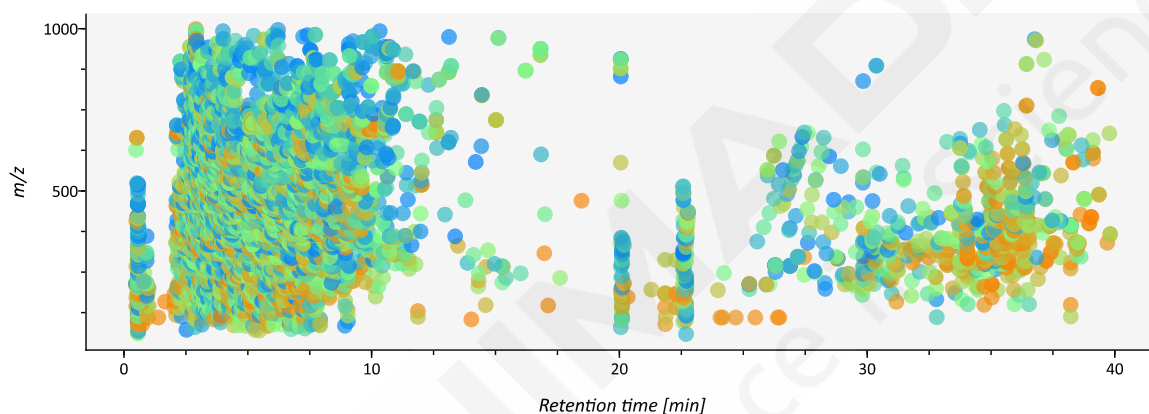


图 4. MS-DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI+)

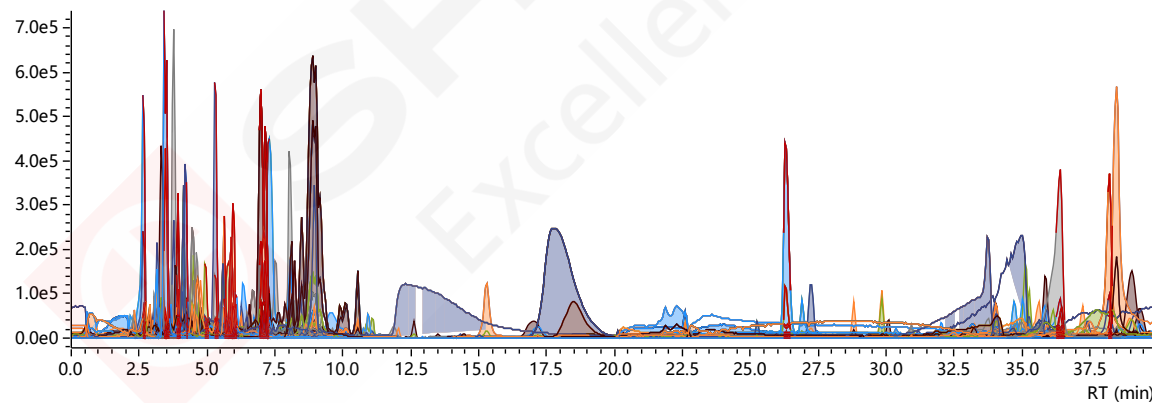


图 5. 部分 m/z 提取离子流图 (ESI+)

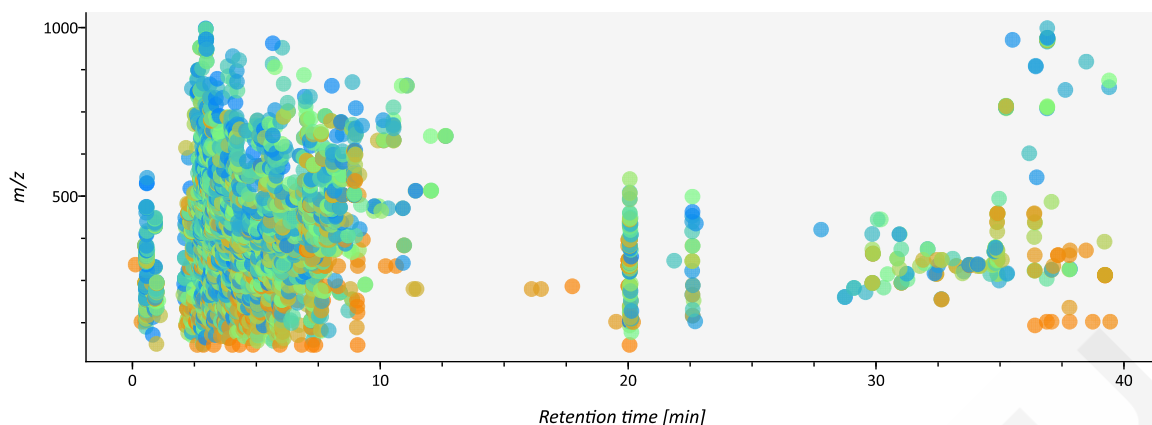


图 6. MS-DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI-)

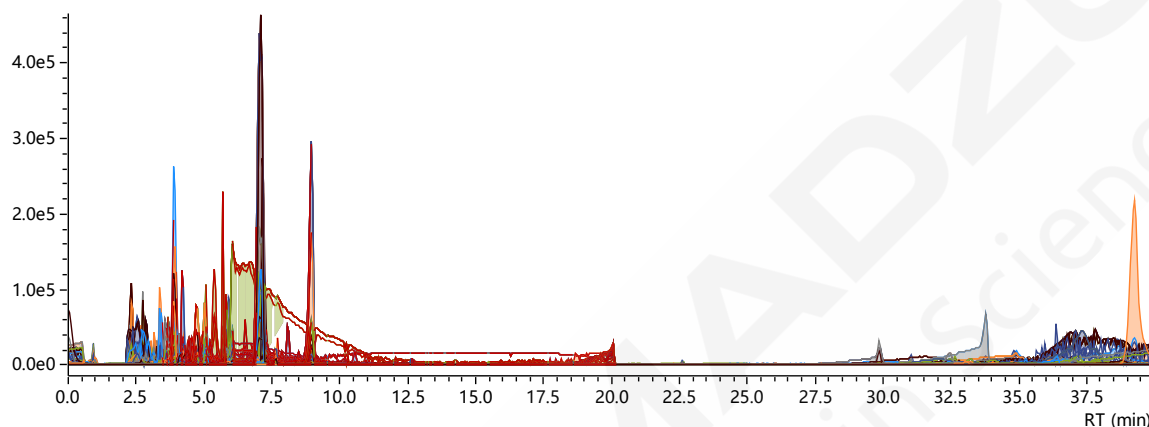


图 7. 部分 m/z 提取离子流图 (ESI-)

3. 结论

使用全谱二维+LCMS-9050 对黑米样品进行定性分析。正负模式同时采集，26h 内仪器稳定性良好，加入的内标 m/z 偏差在 1ppm 以内；结合 MSDIAL、Insight Explore 软件，对黑米样品中峰面积大于 1% 的组分进行定性分析。综上所述，全谱二维+LCMS-9050 可实现宽极性组分正负模式同时采集，达到“4 in 1”的效果，将大大提高样品分析效率。

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统分析人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠初步代谢机理

摘要：本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对人参二醇皂苷组分不同剂量给药后的阿尔茨海默症小鼠血浆样本进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统，正模式下共得到 4679 个特征峰。偏小二乘判断分析（PLS-DA）表明模型组与给药组有显著差异，共找到 457 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物，经数据库比对鉴定出 5 种差异性代谢物，主要影响的通路包括精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成等。

关键词：全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 人参二醇皂苷 阿尔茨海默症

技术特点：

- ❖ 采用全谱二维液相结合 Q-TOF，实现宽极性目标物的非靶向代谢组学分析。
- ❖ 结合 Signpost MS、SIMCA、MS-DIAL 等多种数据处理软件进行差异代谢物筛查与鉴定。

阿尔茨海默病 (AD)，是一种发展较为缓慢的神经系统退行性疾病，临床上主要表现为记忆力逐步衰减、不同程度的认知障碍等症状。其病程较长且难以彻底治愈。目前尚缺乏治疗AD的有效药物，西药的治疗效果一般，且易产生耐药性。

传统中草药具有多成分、多靶点的优势，特别是人参皂苷治疗AD成为了近年来的研究热点。人参皂苷有很好的神经保护作用，对抗AD有明显作用。前期研究发现，一种人参二醇皂苷组分（包括Rb1、Rb3和Rd）对3-硝基丙酸所致的神经退化动物模型的治疗效果明显优于人参总皂苷或单体皂苷，而人参三醇皂苷提取物则对上述模型没有显示治疗作用。人参二醇皂苷包括Rb1、Rb2等Rb组分，具有镇静作用；相反，三醇类皂苷包括Re、Rf等，具有兴奋性作用。目前国际上大多数对人参皂苷研究仅限于人参总皂苷或某几种单体皂苷的中枢神经系统保护作用。

因此，本文希望进一步探究不同剂量下的人参二醇皂苷组分对AD小鼠的初步代谢机理。

由于代谢物极性跨度大，难以用一种方法完成分析。目前普遍采用两种色谱分离方法，如亲水色谱柱和反相色谱柱。但此方式往往需要耗费双倍的前处理和分析时间，且会产生双份数据，定性分析难度高。本研究利用全谱二维液相系统，可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学的全组分研究，将分析时间缩短1/2。

本研究利用全谱二维液相-Q-TOF系统，以非靶向代谢组学的研究方法分析了人参二醇皂苷组分不同剂量给药后的阿尔茨海默症小鼠血浆样本，共发现5种差异性代谢物，主要为氨基酸、核苷和脂肪酸类，主要影响精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成。

1. 实验部分

1.1 仪器

本文使用全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，具体配置为：

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40B XR × 2; LC-40B X3 × 2	自动进样器	: SIL-40C X3
定量环	: 500 μL	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114

1.2 数据处理

首先采用 Signpost MS 软件和 MetaboAnalyst 平台对原始数据进行峰的提取、对齐、匹配、峰强度校正和归一化处理，再将数据导入 SIMCA 软件进行统计分析，找出差异性代谢物，依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS-DIAL 软件及 HMDB 平台搜索确认代谢物种类，然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析（如图 1 所示）。



图 1. 代谢组学数据处理流程图

2. 结果与讨论

2.1 色谱图与特征色谱峰

小鼠血清 QC 样品的基峰（BPC）色谱图如图 2 所示。将各组数据文件导入 Signpost MS 软件，根据强度阈值提取峰表并对齐色谱峰后，共得到 4679 个特征峰。随后对数据进行归一化处理，利用“80%规则”（去除任何一组中出现频率都小于 80%的离子）筛选特征峰，且剔除在 QC 样品中峰面积 RSD > 30%的特征峰，共找到 1078 个特征峰，将其导入 SIMCA 软件用于统计分析，用于进一步统计分析。

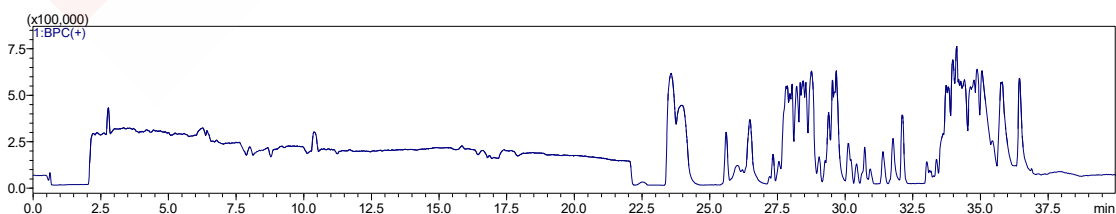


图 2. QC 样品 BPC 图（正模式）

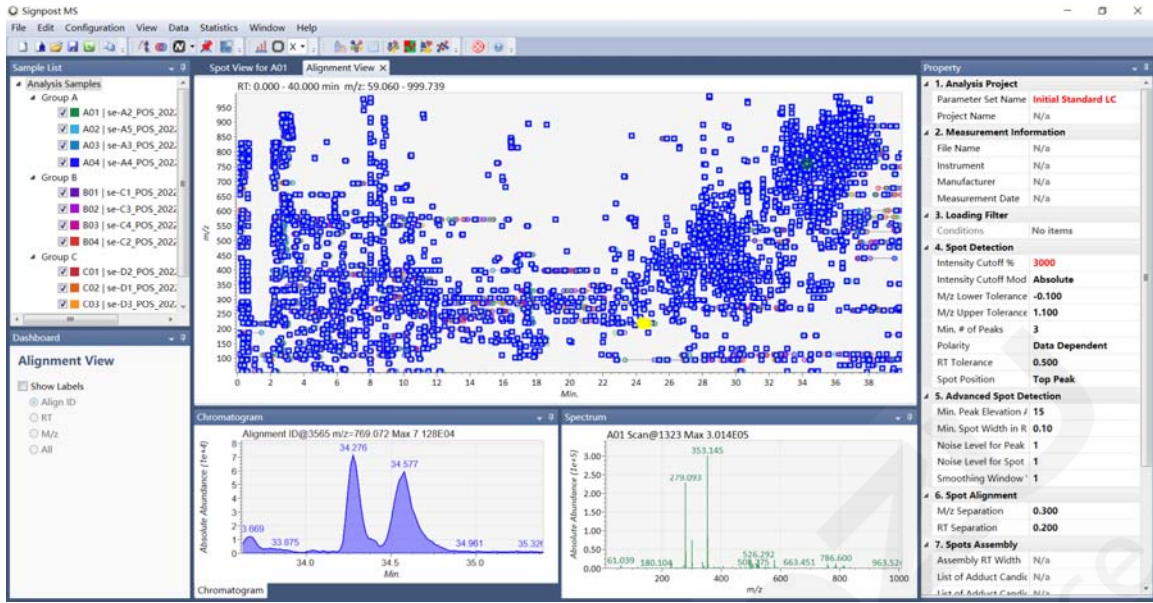


图 3. Signpost MS 峰提取与峰对齐

2.2 差异性代谢物查找

将模型组、给药组与质控组数据导入 SIMCA 软件进行偏最小二乘判断分析 (PLS-DA)，结果显示，质控组 (QC) 数据聚集性良好，表明仪器状态稳定。模型组与 2 种不同剂量给药组之间区分明显，且给药组-高剂量与模型组的区分更为显著 (图 4)。

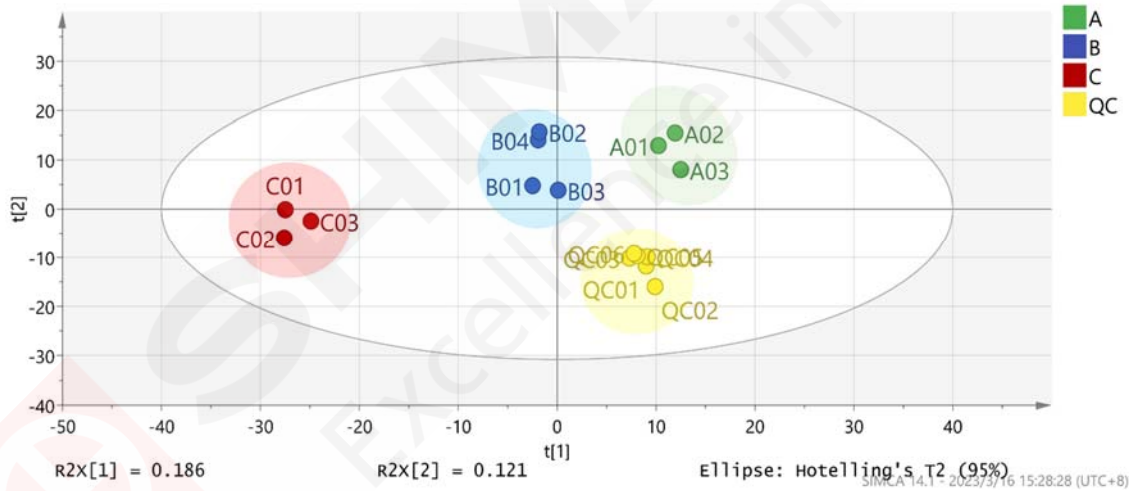


图 4. 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图

(A: 模型组; B: 给药组-低剂量; C: 给药组-高剂量; QC: 质控组)

以交叉验证的方式对上述 PLS-DA 模型进行验证，结果表明：截距 $R^2=0.414$ ， $Q^2=-0.217$ ，模型可靠，没有过拟合 (图 5)。

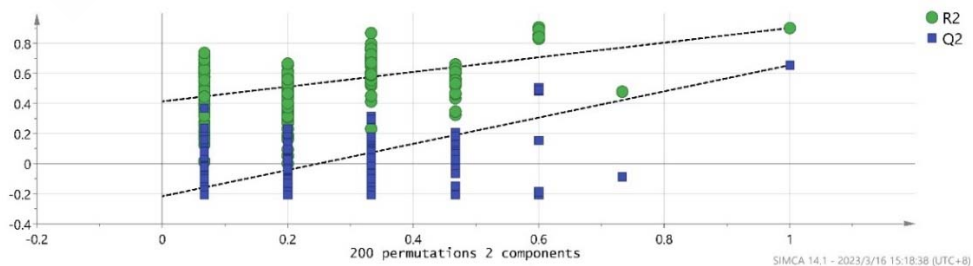


图 5. PLS-DA 200 次交叉验证结果

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 VIP > 1 的特征峰, 认为对组间差异贡献较大, 是潜在的差异性代谢物。正模式下候选差异性代谢物共 457 个 (图 6)。将所有 VIP > 1 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质取交集, 共得到 92 个特征峰, 即认为是本实验中模型组与给药组的差异性代谢物。

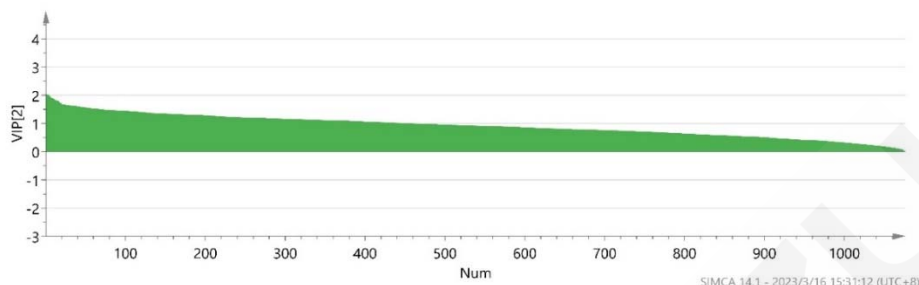


图 6. PLS-DA 各物质 VIP 值计算

2.3 差异性代谢物鉴定

使用 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配对得到的 92 个特征峰离子进行鉴定 (图 7)。剔除 HMDB 平台中无搜索结果物质, 以及植物源性物质等不可能存在于小鼠血浆中的物质, 得到表 2, 主要包括氨基酸、核苷和脂肪酸类物质。相对于模型组, 给药组的 4 种物质浓度水平上调, 另外 1 个浓度下调。将所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 5 种差异性代谢物 (因未发表, 略); 所有物质质量测定误差 < 2 ppm。

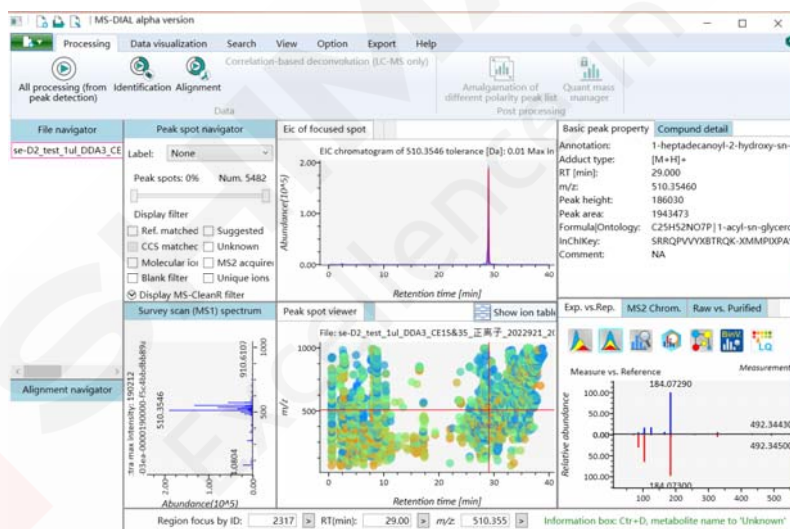


图 7. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

2.4 通路分析

使用 KEGG 数据库, 将表 2 中鉴定得到的 5 个差异代谢物在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析, 综合统计学 P 值和路径影响结果, 发现阿尔茨海默症小鼠受人参二醇皂苷组分影响的代谢通路主要有精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等 (图 8)。

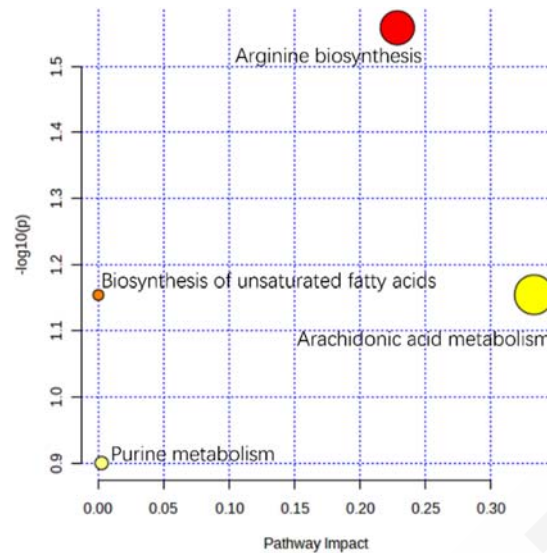


图 8. 人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠的通路分析

3. 结论

本文通过代谢组学研究方法，利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用仪，非靶向分析人参二醇皂苷组分给药后的阿尔兹海默症小鼠血清样品的内源代谢物变化。全谱二维液相扩大了代谢物分析的极性范围，加上 Q-TOF 的高分辨定性能力，共检测到正离子代谢特征峰 4679 个。统计结果表明，质控组数据聚集性强，表明仪器状态稳定；模型组与给药组血浆成分有显著区别。通过准确 m/z 及 MS2 库搜索鉴定出 5 种内源代谢物，包括氨基酸、核苷和脂肪酸类等。这些差异性代谢物主要影响精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等。本研究表明全谱二维液相系统是宽极性、多组分数据库“通用型”分离平台，配合 LCMS-9030 可节省 1/2 的样品分析时间，可以帮助研究者一次分析极性跨度更大的代谢物。

全谱二维液相-Q-TOF 联用系统用于前列腺癌生物标志物筛选

摘要：本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对前列腺癌患者和正常人的尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统，正和负模式下共得到 6840 个特征峰。偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 表明正常组与模型组有显著差异，共找到 451 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物，经数据库比对鉴定出 12 种差异性代谢物，主要影响的通路包括鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。

关键词：全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 外泌体

技术特点：

- ❖ 采用全谱二维液相结合 Q-TOF，可进行宽极性目标物的非靶向代谢组学分析。
- ❖ 结合 Signpost MS 等多种数据处理软件进行差异性代谢物筛查与鉴定。

前列腺癌(prostatecancer, PCa)是一种较普遍的泌尿系统肿瘤，其发病率在世界范围内不断增加。PCa的早期筛查主要依赖直肠指诊和血清前列腺特异性抗原 (PSA) 检测，然而直肠指诊只能初步评估前列腺的基本情况，如大小、质地等，缺乏准确性。PSA也受良性前列腺增生及尿路感染等影响，对PCa诊断的特异性较差。因此，PCa的诊断和治疗急需准确、特异且无创的生物标志物。

外泌体是细胞自发分泌的一种胞外囊泡，广泛存在于各类细胞，如尿液、血液、腹水及精液等，具有良好的稳定性及低毒性等特点，在肿瘤的发生、发展及血管生成和免疫调控中发挥着重要作用。因其具有独特囊泡结构及双层脂质膜，使其囊泡内核酸和肿瘤相关蛋白免遭外部酶的降解，故不少学者认为外泌体有可能成为PCa的非侵入性生物标志物。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水平及其变化规律的独立学科，是疾病研究的重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大，难以用一种方法完成分析。本研究利用全谱二维液相系统，可以同时完成高极性和低极性的代谢物分析，大大节省了实验工作量和分析时间。该系统与岛津四极杆-飞行时间质谱LCMS-9030结合，可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学全组分研究。

本研究利用全谱二维液相-Q-TOF系统，以非靶向代谢组学的工作流程分析了前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体样本，发现12种差异性代谢物，主要为脂质，此外还有有机酸、核苷酸等代谢产物，主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶A的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成。

1. 实验部分

1.1 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱、一个定量环、一个高压十通阀构成，检测器为 LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪。具体配置为：

系统控制器 : SCL-40

脱气机 : DGU-405

输 液 泵 : LC-40BXR × 2; LC-40BX3 × 2 自动进样器 : SIL-40C X3
定 量 环 : 500 μL 柱 温 箱 : CTO-40C
十 通 阀 : FCV-36AH 质 谱 仪 : LCMS-9030
色 谱 工 作 站 : LabSolutions Ver. 5.97

1.2 数据处理

采用 Signpost MS 软件对谱图数据处理如离子提取、峰对齐等后,将数据导入 MetaboAnalyst 和 SIMCA 软件进行统计分析,找出差异性代谢物,依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS DIAL 及 HMDB 等平台搜索确认代谢物种类,然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱图与特征色谱峰

人尿液外泌体 QC 样品的基峰 (BPC) 色谱图如图 1 所示。与普通一维方法相比较,全谱二维在 MS Dial 软件中检出亲水性小分子代谢物和亲脂性物质的数量有显著提升 (如图 3 所示),也证实了全谱二维具有同时分离宽极性、多目标物的特点。

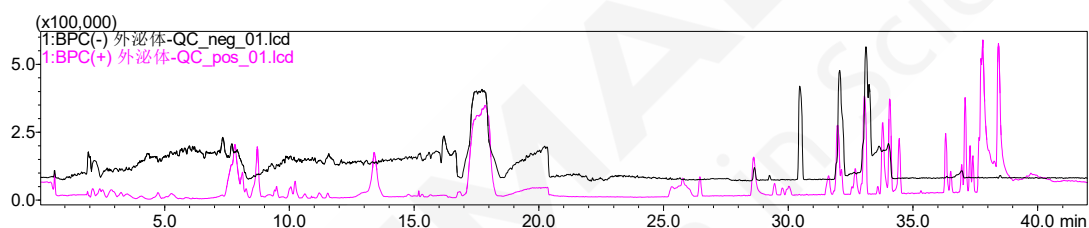


图 1. QC 样品 BPC 图 (红色: 正模式; 黑色: 负模式)

在正和负模式下,将全谱二维采集的各数据导入 Signpost MS 软件,提取峰表并对齐色谱峰后,共得到 6840 个特征峰。随后对缺失值进行过滤,利用“80%规则”(去除任何一组中出现频率都小于 80%的离子)筛选特征峰,且剔除在 QC 样品中峰面积 $RSD > 30\%$ 的特征峰,最后,将剩余特征峰导入 SIMCA 软件用于下一步统计分析 (如图 3 所示)。

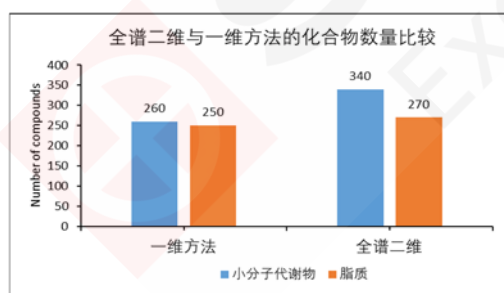


图 2. 全谱二维与一维方法化合物数量比较

将原始数据导入 Signpost MS 进行峰提取和峰对齐

经过“80%规则”筛选

剔除在 QC 样品中峰面积 $RSD > 30\%$ 的特征峰

将特征峰导入 SIMCA 软件用于统计分析

图 3. 数据预处理流程

2.2 差异性代谢物查找

将正常组、模型组与质控组数据导入 SIMCA 软件进行偏最小二乘判断分析 (PLS-DA),结果显示,质控组 (QC) 数据聚集性良好,表明仪器状态稳定,正常组与模型组可以明显地区分,表明前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体代谢产物有显著差异 (图 4)。

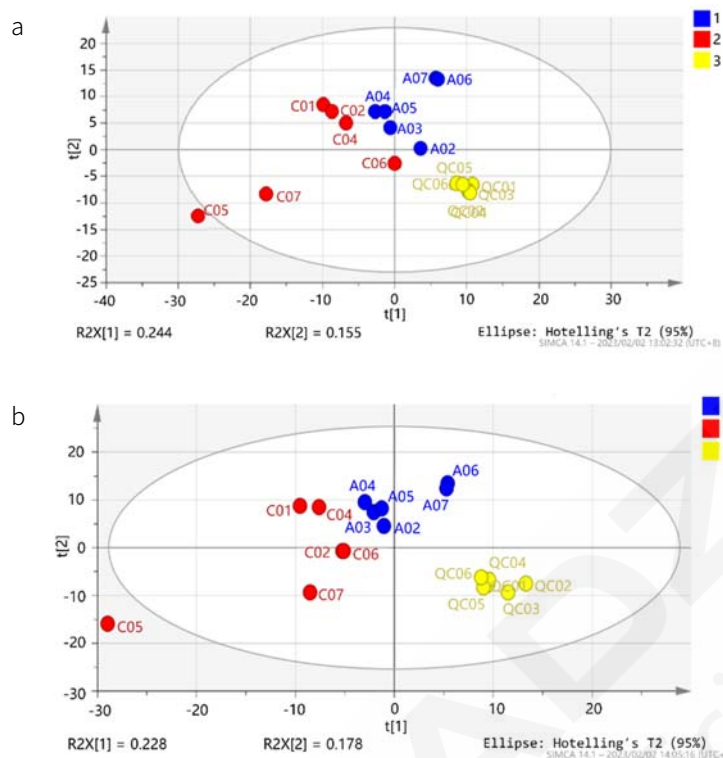


图 4. 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图
(图 a: 正模式; 图 b: 负模式; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 质控组)

以交叉验证的方式对上述 PLS-DA 模型进行验证, 结果表明: 正模式下截距 $R^2=0.816$, $Q^2=-0.366$, 负模式下截距 $R^2=0.369$, $Q^2=-0.264$, 模型可靠, 没有过拟合 (图 5)。

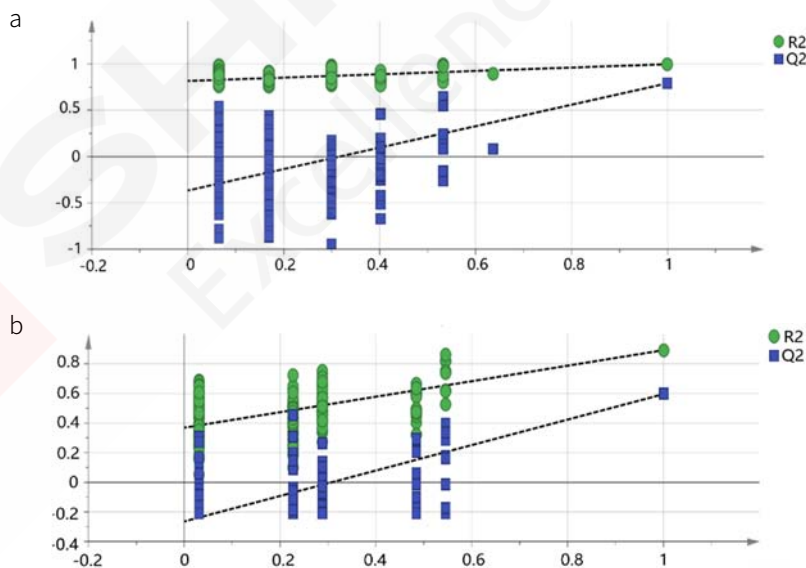


图 5. PLS-DA 200 次交叉验证结果 (图 a: 正模式; 图 b: 负模式)

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 $VIP > 1$ 的特征峰, 认为对组间差异贡献较大, 是潜在的差异性代谢物。二维色谱正模式下候选差异性代谢物共 220 个, 负模式下候选差异性代谢物共 231 个 (图 6)。

a

b

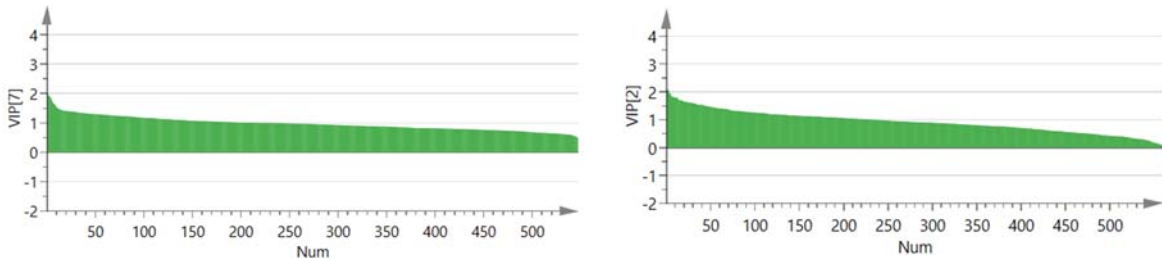


图 6. PLS-DA 各物质 VIP 值计算 (图 a: 正模式; 图 b: 负模式)

2.3 差异性代谢物鉴定

将所有 VIP > 1 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质谱图导入 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配进行鉴定 (图 7)。将所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 12 种差异性代谢物 (因未发表, 略); 所有物质质量测定误差 < 4 ppm; 11 种物质浓度水平上调, 另外 1 个浓度下调。

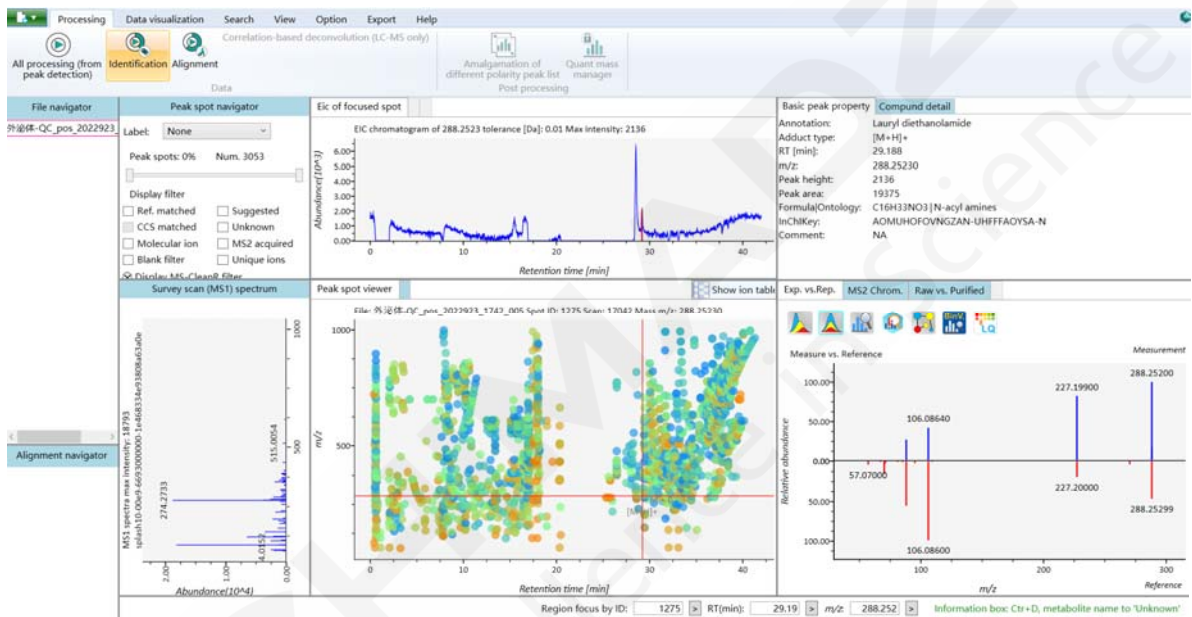


图 7. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

2.4 通路分析

将表 2 中鉴定出的 12 个物质导入 MetaboAnalyst 平台进行通路分析, 发现前列腺癌患者尿液外泌体主要受影响的代谢通路有鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等 (图 8)。

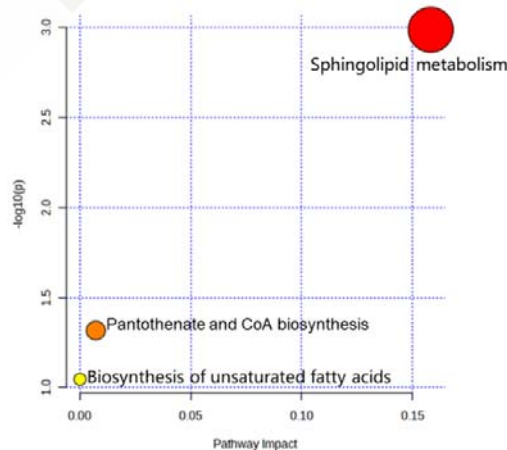


图 8. 前列腺癌患者尿液外泌体受影响的主要代谢通路

3. 结论

本文利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用，对前列腺癌患者和正常人尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学研究。全谱二维液相系统扩大了代谢物分析的极性范围，加上 Q-TOF 的高分辨定性能力，正和负模式共得到 6840 个特征峰。PLS-DA 分析表明，正常组与模型组尿液外泌体成分有显著区别，利用 VIP 值>1 筛查到 451 种差异性代谢物，通过准确 m/z 及 MS² 库搜索鉴定出 12 种差异性代谢物。这些差异性代谢物主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。本研究增进了对前列腺癌生物标志物筛选的认识，同时表明全谱二维液相系统作为一种有力的工具可帮助研究者一次性分析极性跨度更大的代谢物。



SHIMADZU
Excellence in Science

全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析细菌发酵液中生物农药

摘要：使用全谱二维液相系统与 LCMS-9050 联用对细菌发酵液中生物农药进行定性分析。对全谱二维分离效果进行考察，显示全谱二维系统能实现有效聚焦和分离；对仪器稳定性进行考察：正负模式同时采集，连续进样 9 次，TIC 图重复性良好，正负模式下 m/z 偏差在 1 ppm 以内。细菌培养液样品正模式共提取 1110 个 m/z，负模式共提取 910 个 m/z，并对其峰面积大于 1%的组分进行定性分析，结果显示样品中含有多种多肽化合物。该系统可实现宽极性组分正负模式同时采集，达到“4 in 1”的效果，大大提高采集效率。

关键词：全谱二维液相系统 Q-TOF 细菌发酵液

技术特点：

- ❖ 全谱二维与 LCMS-9050 联用“4 in 1”特点，节省 3/4 样品和时间，且数据稳定可靠。
- ❖ 结合 Insight Explore 软件、MSDIAL 数据库对主要化合物实现定性分析。

生物农药是指利用生物活体或其代谢产物对害虫、病菌、杂草、线虫、鼠类等有害生物进行防治的一类农药制剂，生物农药按生物源的不同分为微生物源农药、植物源农药与生物化学农药。其克服化学农药对生态环境的污染和减少在农副产品中的农药残留量方法具有较大优势，是目前农药领域的重点发展方向之一。

微生物农药是将工业化大量繁殖的有害生物病的病原微生物活体加以利用的农药，一般具有较高的

特异性，只对靶标生物具有致病性，对人畜低毒，也不能渗透到植物体内。但其作用方式和成分较为复杂，在一定程度上制约其使用，因此对生物农药定性分析具有一定的现实意义。

利用全谱二维液相-Q-TOF联用系统定性分析细菌发酵液中生物农药，可有效实现高极性和低极性化合物分离和定性分析，同时搭配LCMS-9050正负模式同时扫描，实现4 in 1效果，大大提高分析效率，扩展该系统在生物农药领域的应用。

1. 仪器

岛津全谱二维液相与 LCMS-9050 联用系统，具体配置为：

输 液 泵	: LC-40B X3	系 统 控 制 器	: SCL-40
输 液 泵	: LC-40B XR	在 线 脱 气 机	: DGU-405
自 动 进 样 器	: SIL-40C X3	飞 行 时 间 质 谱 仪	: LCMS-9050
柱 温 箱	: CTO-40C (内置 FCV-36AH)		

色谱工作站 :LabSolutions Ver. 5.114; LabSolutions Insight Ver. 3.7

2. 结果与讨论

2.1 细菌发酵液 TIC 图

细菌发酵液进行处理后进样分析。正负模式同时采集，TIC 图如下。从 TIC 图中可以看出，细菌发酵液经过全谱二维液相分离后，高极性和低极性化合物实现有效分离。

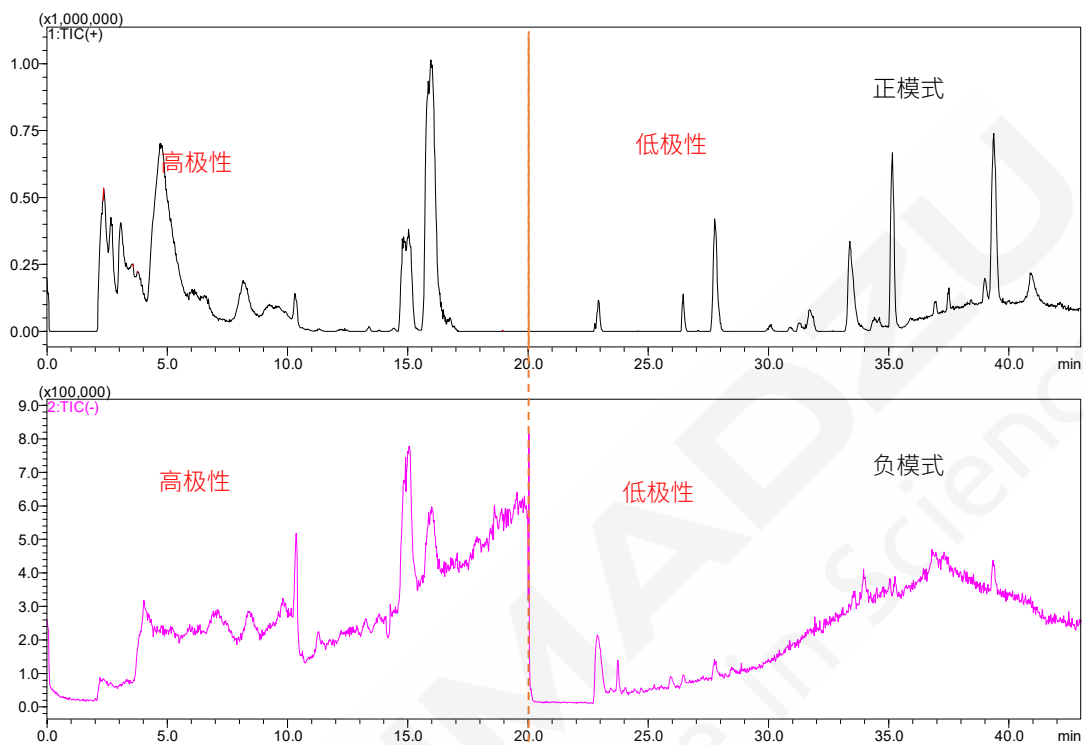


图 1. 细菌培养液 TIC 图

2.2 仪器稳定性考察

LCMS-9050 进行正负模式同时采集，连续进样 9 次，正模式和负模式 TIC 图重复性非常好，正负模式考察的 m/z 偏差均在 1 ppm 以内，说明正负模式同时采集仪器非常稳定。

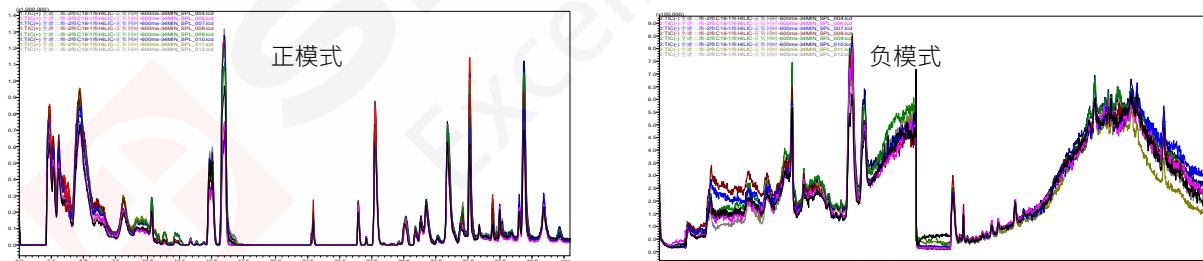


图 2. 细菌培养液样品正负模式 TIC 重叠图 (n=9)

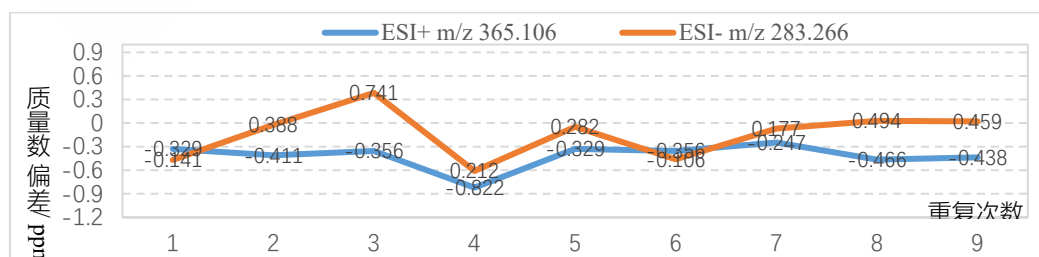


图 3. 正负模式质量数偏差

2.3 全谱二维分离效果考察

该样品使用常规一维系统（HILIC 柱）分析中，有较多物质在 0-2 min 出峰，无法实现较好分离；若使用全谱二维系统（HILIC 柱+C18 柱）分析，则可将一维 HILIC 柱 0-2 min 出峰物质切到二维 C18 色谱柱进行分离，下面对比图可知，原一维分离较差的组分，在二维系统上峰形和分离度良好，表明全谱二维系统能实现有效聚焦和分离。

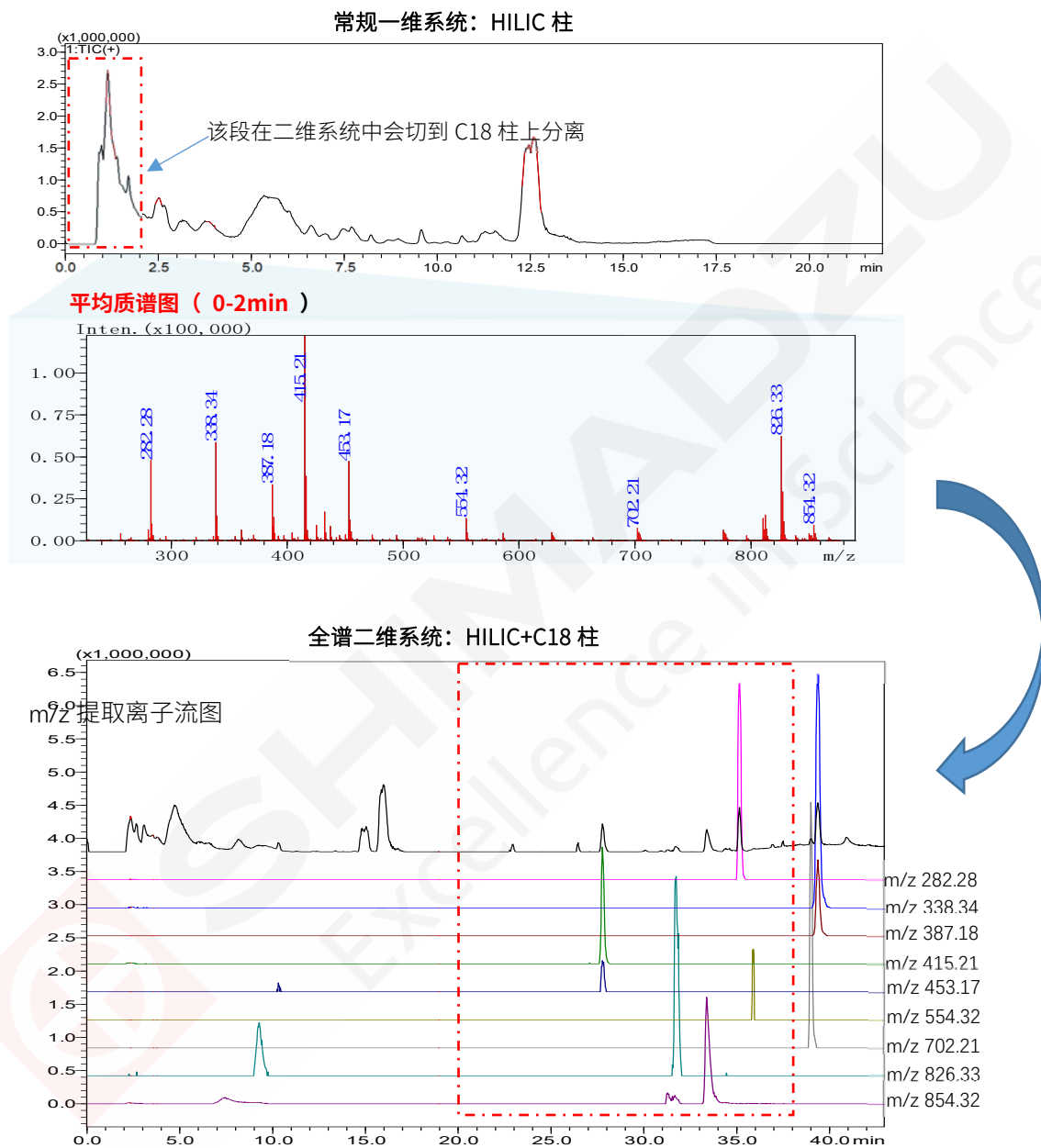


图 4. 全谱二维分离效果考察图

2.4 细菌发酵液定性分析

使用 MSDIAL 对 DDA 采集的数据进行提取，再结合 Insight Explore 软件对峰面积大于 1%的组分进行定性分析。

正模式共提取 1110 个 m/z，负模式共提取 910 个 m/z，其散点图和提取色谱图如下。

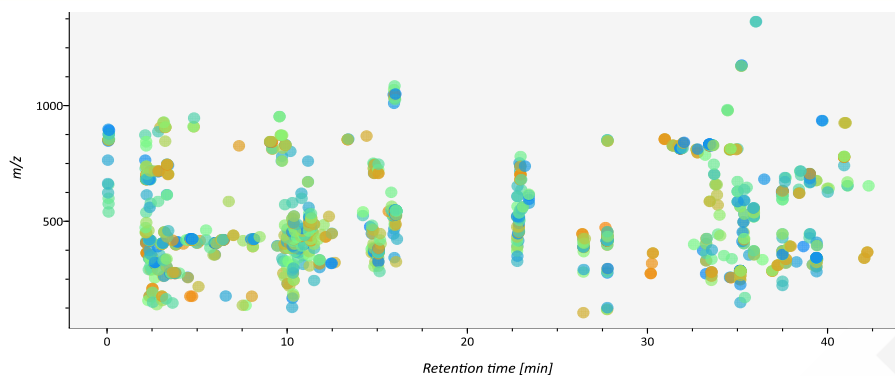


图 5. MS DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI+)

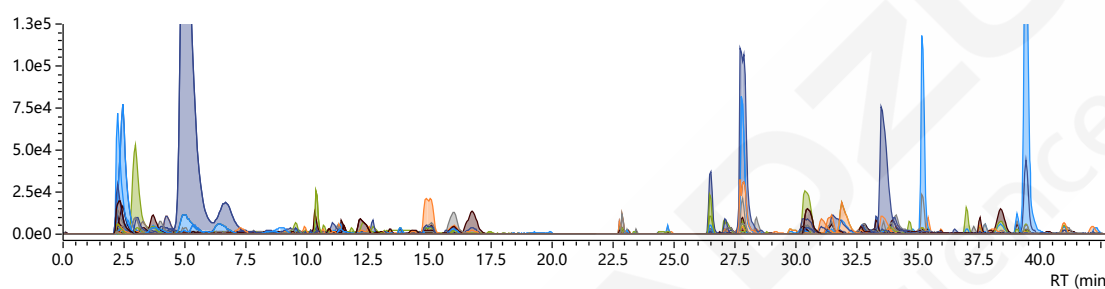


图 6. 提取离子流图 (ESI+)

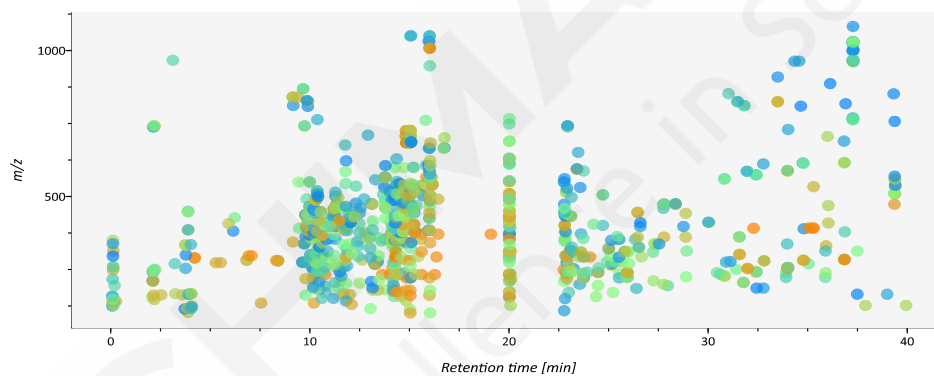


图 7. MS DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI-)

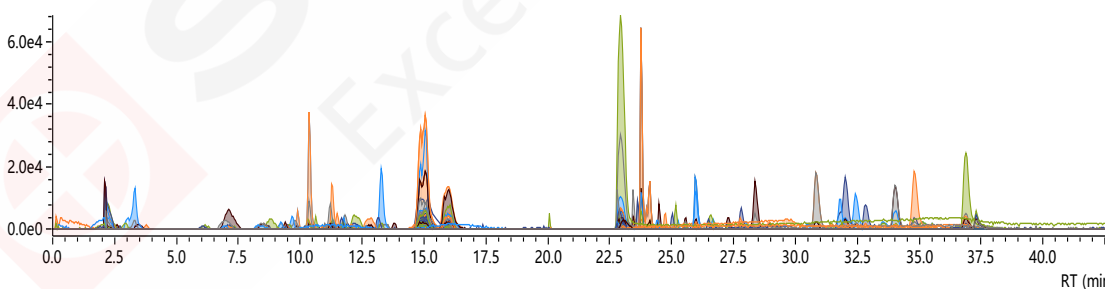


图 8. 提取离子流图 (ESI-)

3. 结论

使用全谱二维+LCMS-9050 对细菌培养液生物农药进行定性分析。正负模式同时采集, 仪器稳定性良好, m/z 偏差在 1ppm 以内; 同时对全谱二维分离效果进行考察, 结果表明该系统可对一维保留较差的组分实现有效聚焦和分离; 结合 MSDIAL、Insight Explore 软件, 对细菌培养液样品中峰面积大于 1%的组分进行定性分析。综上所述, 全谱二维+LCMS-9050 可实现宽极性组分正负模式同时采集, 达到“4 in 1”的效果, 将大大提高样品分析效率。

全谱二维液相-Q-TOF 联用定性分析人胎盘脂多糖注射液

摘要: 本文利用全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用对人胎盘脂多糖注射液进行定性分析。样品经稀释后上机分析, 全谱二维液相系统可有效分离人胎盘脂多糖注射液中核苷酸、脂多糖、甘油酯等不同极性化合物, 同时使用一级和二级质谱信息, 结合峰提取、代谢物公共数据库检索, 正模式总共提取 1505 个 m/z , 其中定性出 756 个化合物; 负模式共提取 616 个 m/z , 其中定性出 180 个化合物, 重点关注化合物 m/z 偏差均在 3 ppm 以内。该应用可为人胎盘脂多糖注射液等类似样品定性分析提供参考。

关键词: 全谱二维液相 Q-TOF 人胎盘脂多糖注射液

技术特点:

- ❖ 采用全谱二维液相系统, 可对宽极性样品进行有效分离, 实现核苷酸、甘油酯等化合物同时检测。
- ❖ 重点关注化合物 m/z 偏差均在 3 ppm 以内。

人胎盘脂多糖注射液是人胎盘组织经酶水解后而提取出的活性物质加辅料配制而成, 其主要活性成分为脂多糖、核苷酸、甘油酯等。据宣传, 人胎盘脂多糖是一种非特异免疫制剂, 具有增强机体对多种细菌和病毒的非特异免疫力的作用。

人胎盘脂多糖注射液成分复杂, 不同成分极性分布范围宽, 普通液相无法完全覆盖, 分成反相和

亲水体系两次进样将大大降低分析效率, 造成数据无规则重叠, 增加数据处理难度,

本研究利用全谱二维液相系统, 可以同时完成高极性和低极性化合物的分析, 大大节省了实验工作量和分析时间, 实现人胎盘脂多糖注射液不同极性化合物的分离和定性分析, 供相关检测人员参考。

1. 仪器

岛津全谱二维液相系统与 LCMS-9030 联用, 具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40B XR; LC-40B X3	自动进样器	: SIL-40C X3
定量环	: 500 μ L	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	质谱仪	: LCMS-9030
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114		

2. 结果与讨论

2.1 人胎盘脂多糖注射液 TIC 图

人胎盘脂多糖注射液用正模式和负模式采集后 TIC 图如下。从 TIC 图中可以看出, 人胎盘脂多糖注射液经过全谱二维液相分离后, 高极性和低极性化合物实现有效分离。

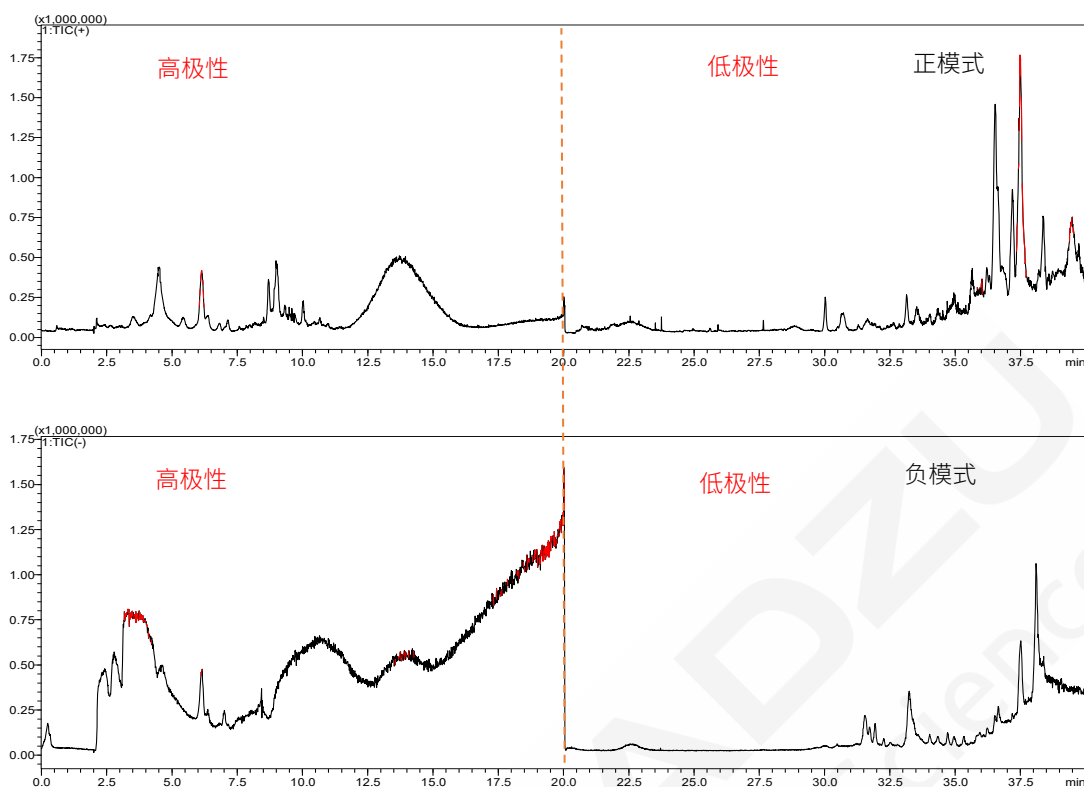


图 1. 人胎盘脂多糖注射液 TIC 图

2.2 人胎盘脂多糖注射液成分定性分析

使用 MS-DIAL 平台对 DDA 采集的数据进行匹配,得到可能的化合物,部分重点关注化合物再结合 Insight Explore 软件对 MS-DIAL 中的到的数据进行确证。

使用 MS-DIAL 平台对采集数据进行定性筛查, 结果显示: 正模式总共提取 1505 个 m/z, 其中定性出 756 个化合物; 负模式共提取 616 个 m/z, 其中定性出 180 个化合物, 主要成分包括核苷酸单元、片段等极性及其甘油酯等小极性化合物。具体筛查散点图如下。

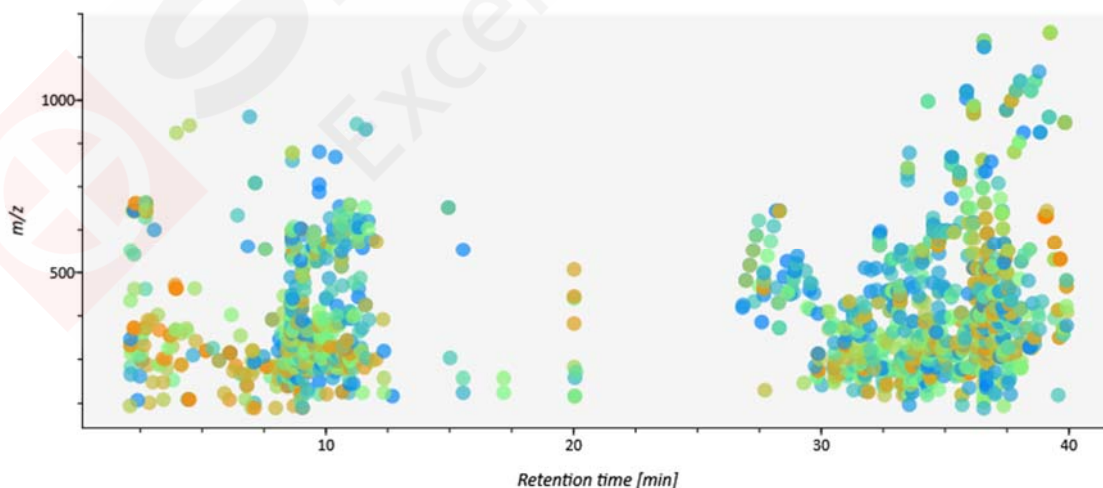


图 2. MS-DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI+)

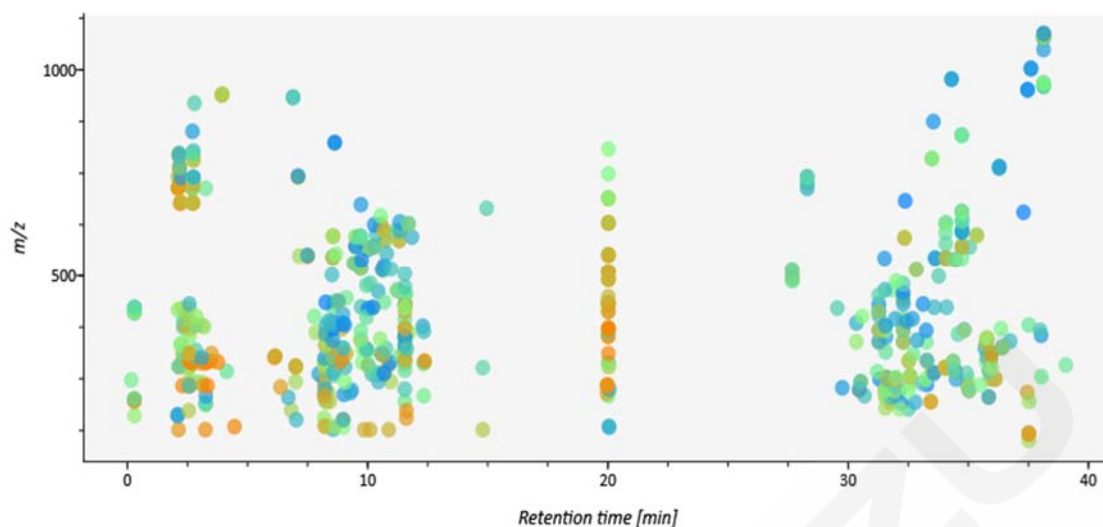


图 3. MS-DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI)

采用 Insight Explore 软件，对重点关注的 8 个目标峰进行进一步定性，定性结果见下表。定性的 8 个组分 Log P 范围为-3.19-7.31，说明全谱二维可以有效分离宽极性样品。

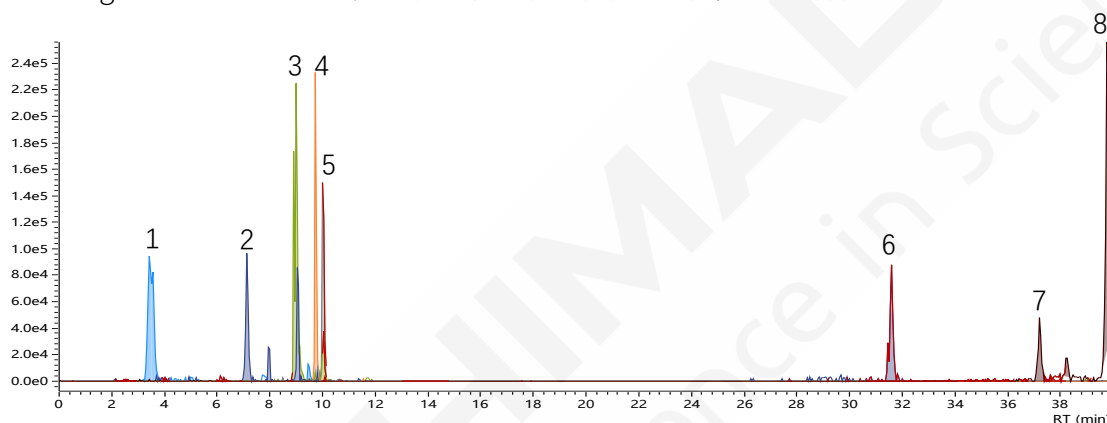


图 4. 目标组分提取色谱图 (峰号见下表)

3. 结论

本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对人胎盘脂多糖注射液进行定性分析，正模式总共提取 1505 个 m/z，其中定性出 756 个化合物；负模式共提取 616 个 m/z，其中定性出 180 个化合物，包括核苷酸单元、片段等极性及其甘油酯等小极性化合物。并采用 Insight 对其中 9 个组分进一步定性确认，定性的 9 个组分 Log P 范围为-3.19-7.31，表明全谱二维可有效对宽极性样品分析，同时上述化合物 m/z 偏差均在 3 ppm 以内。岛津全谱二维液相系统拥有在线稀释专利技术和极性分流、双重梯度特色技术，特别适合宽极性样品的分析。

全谱二维液相-Q-TOF 联用对不同产地的暗纹东方鲀肌肉组织进行非靶向代谢组学分析

摘要: 使用岛津特色产品全谱二维液相+LCMS-9050, 实现宽极性、正负离子同时扫描模式检测了不同产地的暗纹东方鲀肌肉样品; 通过数据质量控制评价和 PCA 分析, 证明仪器稳定性良好; OPLS-DA 分析组间区分明显, 验证模型稳健, 组学分析结果可靠; 宽极性+正负离子同时扫描模式, 共检测到正离子代谢特征峰 12013 个, 负离子代谢特征峰 14183 个; $VIP \geq 1$ 且 P 值 < 0.05 取交集筛选差异物并鉴定到 19 种, 包含氨基酸、核苷酸、脂类等多种内源物质。该研究为岛津 4in1 组学技术的应用提供相应案例参考。

关键词: 4 in 1 组学技术 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 暗纹东方鲀

技术特点:

- ❖ 体现 4 in 1 组学技术特色, 节省 1/4 样品和时间, 数据稳定可靠, 适合非靶向代谢组学分析。
- ❖ 结合 MS DIAL 等多种数据处理软件筛查与鉴定差异性代谢物。

暗纹东方鲀俗称河豚, 因其经济价值高, 口感好, 被认为是中国最具成本效益的鱼类之一, 主要分布在中国东海沿岸水域。其无毒肌肉部分具有独特的美味, 因此该物种也被描述为亚洲最著名的食物之一。

科学食用河豚产品, 不仅是一种美味的享受, 更对人体健康大有裨益。河豚具有特殊的滋味, 氨基酸和核苷酸等相关物质被鉴定为滋味活性组分, 如甘氨酸、赖氨酸和肌苷5'-单磷酸, 它们是河豚鱼肉中主要的滋味化合物。通过对暗纹东方鲀营养和感官品质等的进一步研究, 也将对暗纹东方鲀的品质分级提供理论基础。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水平及其变化规律的独立学科, 是寻找差异性物质重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大, 难以用一种方法完成分析。岛津全谱二维液相系统, 可同时完成高极性和低极性的代谢物分析, LCMS-9050 正负极切换时间短, 可实现正负模式同时采集。采用全谱二维液相系统和 LCMS-9050 联用, 强强联合, 1 针分析即可达到传统 4 针分析效果 (4 in 1), 大大节省了实验工作量和分析时间。

本研究利用全谱二维液相-Q-TOF 联用系统, 以非靶向代谢组学的工作流程鉴定不同产地的暗纹东方鲀肌肉样品, 可为相关研究提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用, 其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱、一个定量环、两个高压六通阀构成, 检测器为 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱仪。具体配置为:

系统控制器 : CBM-20A

脱气机 : DGU-20A5R×2

输液泵：LC-30AD×4

自动进样器：SIL-30ACMP

定量环：500 μL

柱温箱：CTO-20AC

六通阀：FCV-12AH×2

质谱仪：LCMS-9050

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.120

1.2 数据处理

① 采用 MS DIAL 软件对 Q-TOF 9050 采集的.lcd 原始数据进行峰提取、峰对齐、内标校正、归一化处理、缺失值过滤等处理；② 将转置数据导入 SIMCA-P 和 EXCEL 软件进行统计分析，找出差异性代谢物；③ 依据精确保留时间 (RT)、质荷比 (m/z) 及二级谱图碎片 (MS^2) 在 MS DIAL 代谢物鉴定平台上搜索确认代谢物种类；④ 根据 R 语言程序包对鉴定的差异性代谢物进行聚类分析。

2. 结果与讨论

2.1 数据质量控制和仪器稳定性评价

暗纹东方鲀 QC 样品的基峰 (BPC) 色谱图如图 1 所示。在 QC 样品中添加了两种内标 (正离子 $m/z=237.1598$, R.T.= 5.96 min 和负离子 $m/z=307.0976$, R.T.= 28.87 min), 分别计算两个内标的质量数偏差在连续 20 小时的分析测试时间内的波动 <4.3 ppm (如图 2 所示)。经验证, 全谱二维液相+LCMS-9050 液质联用系统在质量轴稳定性方面表现优异, 并能有效分离宽极性的多目标物。

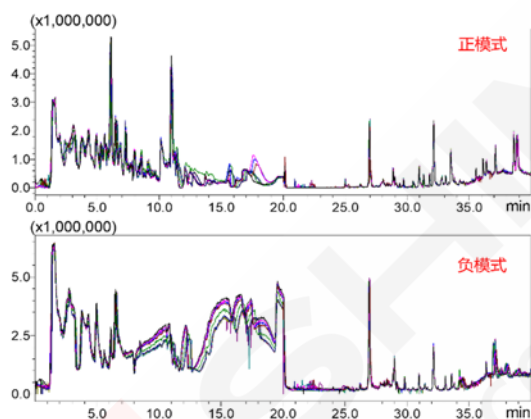


图 1. 10 针 QC TIC 重叠图 (n=10)

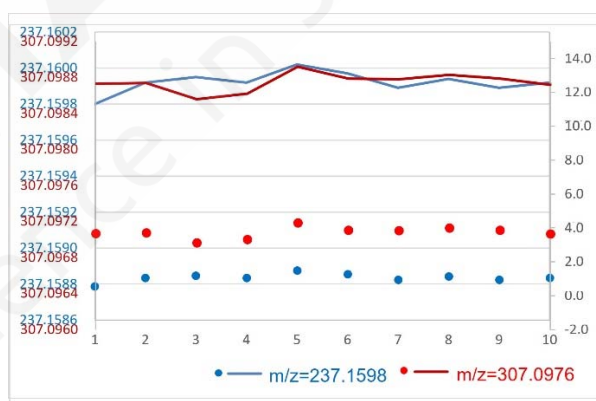


图 2. 内标正负质量数偏差情况 (蓝: 正模式, 红: 负模式)

将数据导入 MS DIAL 软件, 峰提取和峰对齐后检测到代谢特征峰正模式 12013 个, 负模式 14183 个 (图 3)。随后对缺失值进行过滤, 利用“80%规则” (去除任何一组中出现频率都小于 80% 的离子) 筛选特征峰, 且剔除在 QC 样品中峰面积 RSD $>30\%$ 的特征峰。筛选后的数据, 计算每组中每个代谢特征峰的峰面积平均值, 通过两组之间比较的方式计算出变化倍数 (fold change), 以确定两组之间的相对上下调表达关系。最后, 将剩余特征峰导入 SIMCA 软件用于下一步统计分析。

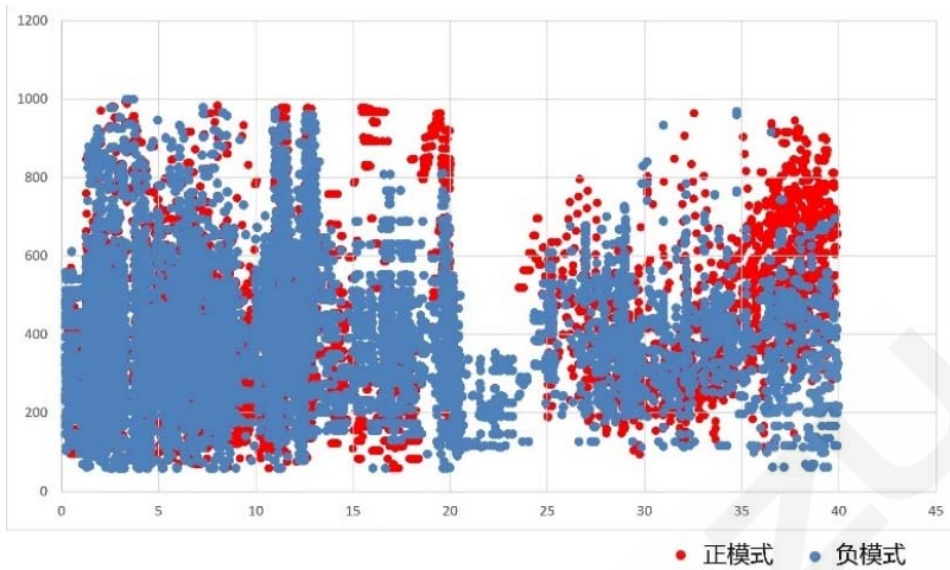


图 3. 前体离子的 m/z 散点分布图

2.2 差异性代谢物筛选

将所有样品设置为 sample 组，与 QC 组导入 SIMCA 软件进行主成分分析 (PCA)，结果显示，QC 组数据聚集性良好，表明仪器状态稳定 (图 4)。将 sample 组重新分组为 A 组和 B 组，在 SIMCA 软件进行正交偏最小二乘方判别分析 (OPLS-DA)。结果显示，A 和 B 组之间可明显区分，表明不同产地的暗纹东方鲀之间存在显著差异 (图 5)。随后，进一步对 A 和 B 组 OPLS-DA 分析的数据进行交叉验证，结果表明：模型可靠，没有过拟合 (图 6)。

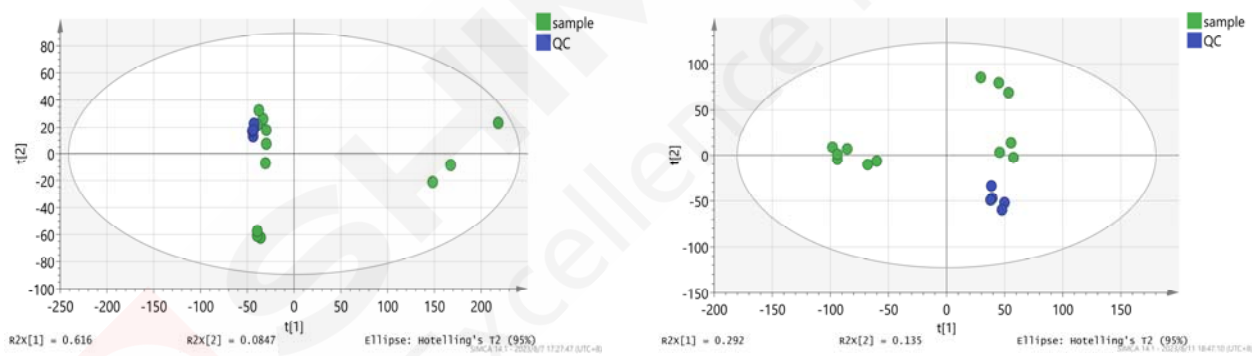


图 4. 主成分分析 (PCA) 得分图 (左: 正模式; 右: 负模式)

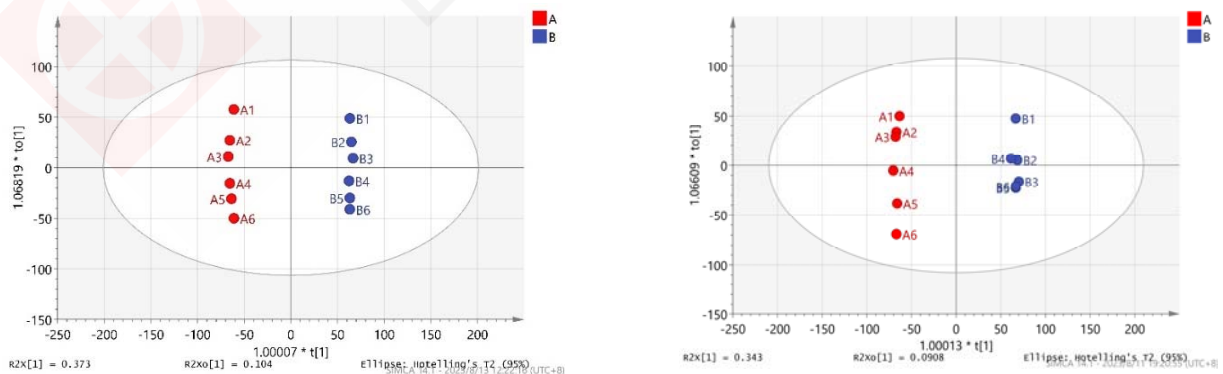


图 5. 正交偏最小二乘判断分析 (OPLS-DA) 得分图 (左: 正模式; 右: 负模式)

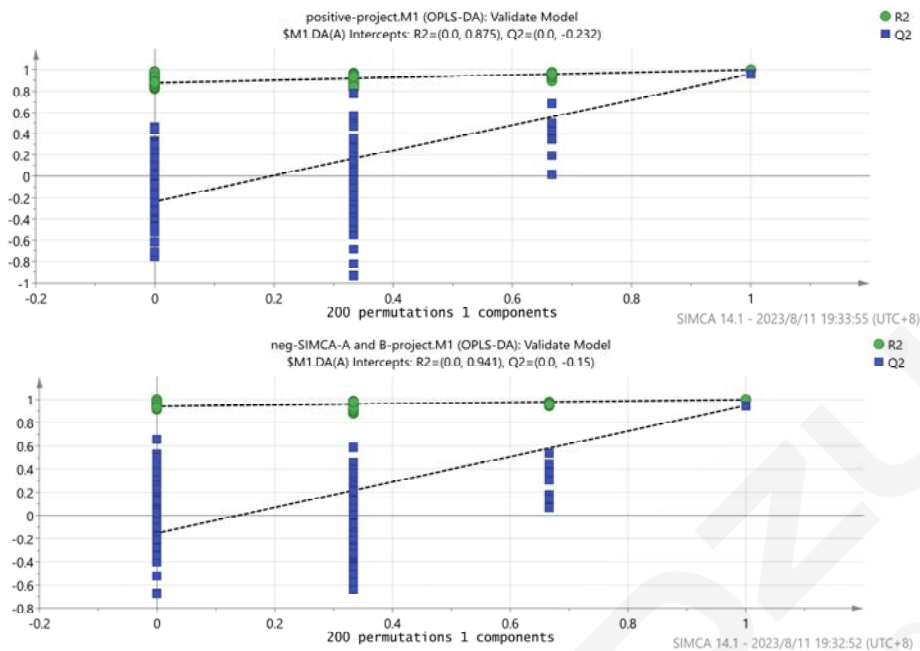


图 6. OPLS-DA 200 次交叉验证结果（上：正模式；下：负模式）

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 $VIP \geq 1$ 的特征峰，认为对组间差异贡献较大，是潜在的差异性代谢物。并且增加两个筛选条件 $\text{fold change} \geq 2$ 或 ≤ 0.5 以及统计分析 p 值 < 0.05 ，最终结果以火山图形式呈现。如图 7 所示， $\text{fold change} \geq 2$ 且 p 值 < 0.05 的点标注为红色或蓝色，代表有明显差异的代谢物。其中红色代表该差异离子在 B 组中相对于 A 组上调，蓝色代表该差异离子在 B 组中相对于 A 组下调；灰色的点代表无明显差异的代谢物。

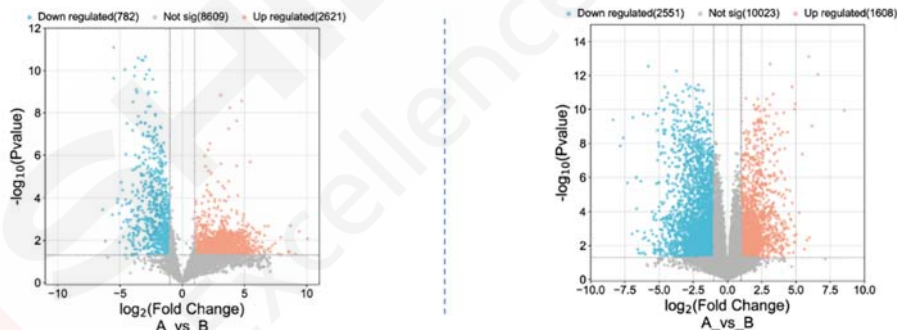


图 7. A 和 B 组的火山图（左：正模式；右：负模式）

2.3 差异性代谢物鉴定

将所有 $VIP \geq 1$ 的候选差异性代谢物进行 t 检验，将 $p < 0.05$ 的物质谱图导入 MS-DIAL 软件，通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配进行鉴定。将所得结果与 MS DIAL 代谢物数据库比对，从正和负离子模式中鉴定出 19 种差异代谢物，种类主要属于氨基酸、核苷酸、脂类等。

2.4 差异性代谢物聚类分析

热图结果显示，鉴定出的差异物质在 A 组和 B 组中的颜色差异较大，变化强度明显，说明这些差异代谢物可以清楚地在这两组间进行区分。

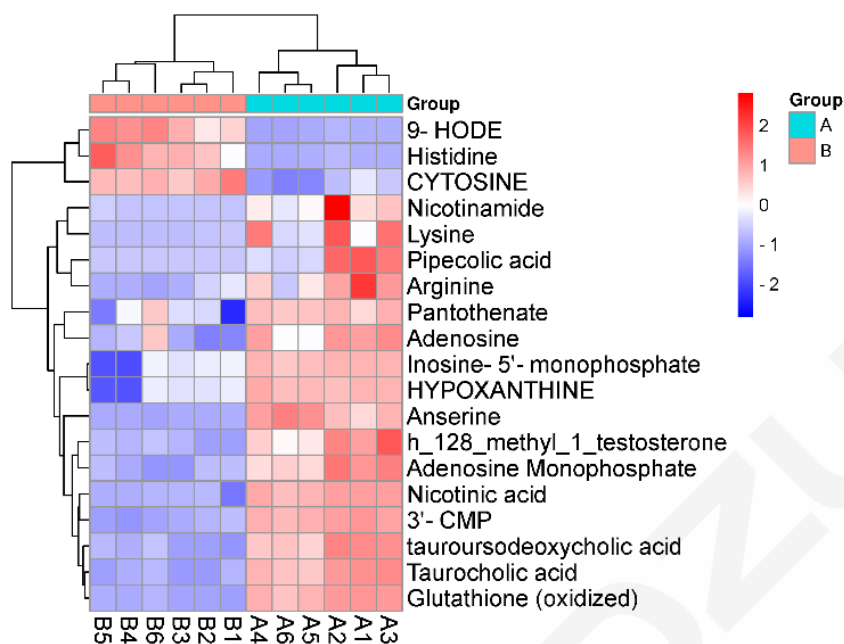


图 8. A 组和 B 组的热图

3. 结论

本文使用岛津特色产品全谱二维液相+LCMS-9050，实现宽极性、正负离子同时扫描模式检测了不同产地的暗纹东方鲀样品。在连续 20 h 的分析过程中，仪器稳定性良好，数据质量良好，组学分析结果可靠。利用岛津全谱二维液相+LCMS-9050 宽极性检测平台，共检测到正离子代谢特征峰 12013 个，负离子代谢特征峰 14183 个，VIP \geq 1 且 P 值 $<$ 0.05 取交集筛选差异物并鉴定到 19 种，包含氨基酸、核苷酸、脂类等多种内源物质。相比常规仪器和方法，本研究只使用了 1/4 的样品和分析时间，即完成非靶向代谢组学分析，体现了 4in1 组学技术特色，可供相关研究人员参考。

第 4 章 数据库筛查/靶向代谢组学应用案例

数据库的建立和靶向代谢组学的思路一致，即对较多数量的已知目标物进行定量或半定量分析。然而，常规的数据库或靶向代谢组学，受限于分离系统的极性范围而不得已只能选择反相色谱或亲水相色谱作为分离手段，或者分别用反相色谱和亲水相色谱多次进样分析，极大的限制了方法所涵盖目标物的数量和极性范围。全谱二维技术，允许将 LogP 值-8~26 之间的化合物进行一针分离，让数据库和靶向代谢组学的目标物群体可以尽可能的加大数量，从而形成一个涵盖数量众多且极性范围极大的大型数据库或靶向代谢组学方法。

岛津通过全谱二维液质联用系统的宽极性分离+三重四极杆质谱仪 LCMS-80XX 系列产品，可以实现宽极性、多目标化合物数据库的统一建立，并通过平行设计实现充分平衡和清洗，减少了交叉污染和记忆效应，提高了系统稳定性和重现性。

目前利用全谱二维液质联用系统与专家客户合作建立了如下两个多目标物数据库：

全谱二维液相系统与 LCMS-8060NX 联用于膀胱癌靶向代谢组学研究

全谱二维液相色谱-质谱联用快速分析化妆品中 195 种禁用物质

全谱二维液相-LCMS-8060NX 联用用于膀胱癌靶向代谢组学研究

摘要: 基于全谱二维液相系统与 LCMS-8060NX 联用, 建立了可用于同时分析各种生物样品中的亲水性和疏水性代谢物的分析方法。该方法同时测量 417 种 LogP 值介于-10.3~21.9 的生物代谢物; 各化合物均具有良好的日内、日间重复性以及良好的线性关系。用不同的生物样品(如血浆、血清、尿液、粪便、精浆和肝脏)进行了适用性测试, 发现在所有生物样品中均检测到了 208 种(417 种中的一部分)相同的代谢物。将该方法应用于膀胱癌的病例/对照代谢组学研究中, 鉴定出了 30 种差异代谢物, 这些代谢物参与了碳水化合物和氨基酸代谢。

关键词: 全谱二维液相 三重四极杆质谱 膀胱癌病例对照研究

技术特点:

- ❖ 基于全谱二维液相+三重四极杆质谱, 建立了一种同时分析亲水性和疏水性代谢物的方法。
- ❖ 将方法应用于临床不同生物样本分析, 方法适用性广。

目前, 液相色谱-质谱联用(LC-MS)是代谢组分析中的主流分析技术。在基于LC-MS的代谢组研究中, 分别使用高分辨质谱(HRMS)和三重四极杆质谱(TQMS)进行非靶向和靶向分析。非靶向HRMS采集和靶向TQMS分析的结合, 提供了对特定途径的深入洞察和对生物代谢网络的全面理解。由于生物样品中同时含有亲水性和疏水性代谢物, 在使用传统的一维LC-MS系统进行单次分析中获取这两类代谢物的信息是非常困难的。因此, 在目前代谢组学的研究中, 二维液相色谱(2D-LC)的使用是非常广泛的。

为了实现广泛的极性范围和高覆盖度的定向代谢组学分析, 本文采用全谱二维液相系统(Polarity-Extended Liquid Chromatography, PELC)作为前端分离手段。该系统能够在单次分析中检测到417种重要的代谢物(logP值-10.3~21.9)。该方法表现出良好的日内和日间重复性, 以及良好的线性关系和宽线性范围; 本文还验证了该方法在多种生物样品(如血浆、血清、尿液、粪便、精浆和组织)中的可靠性, 并成功地应用于鉴定膀胱癌(BC)患者尿液中的异常代谢物。

1. 实验部分

1.1 标准品信息

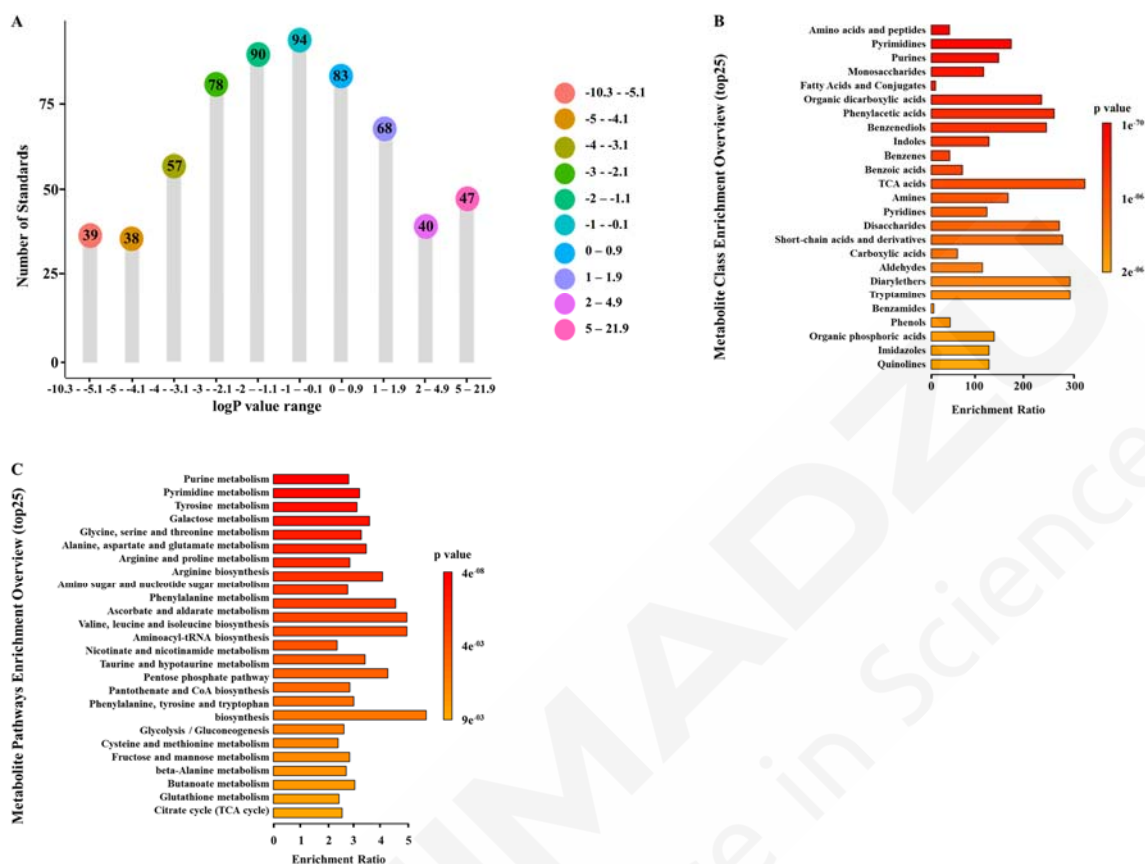


图 1. 标准品信息 (A: 标准品 logP 值范围; B: 标准品类别富集; C: 标准品通路富集)

本实验所使用代谢物标准品共计 634 个。其中图 1A 展示了标准品的 logP 值范围 (依据 PubChem 数据库统计, 最新更新日期 2021 年 5 月 7 日), 图 1B 和图 1C 分别显示了这些标准品的 KEGG 类别富集和通路富集的结果。经筛选和方法优化后, 最终保留 417 种代谢物建立方法。

1.2 仪器

本实验采用全谱二维液相系统与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060NX 联用系统, 具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40BXR × 2; LC-40B X3 × 2	自动进样器	: SIL-40C X3
定量环	: 500 μL	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.99.2

2. 结果与讨论

2.1 第一维 HILIC 柱筛选结果

如图 2 所示, 对一维色谱柱进行筛查, 其中 ZIC-cHILIC 性能最佳。优化后的色谱条件: 流动相 A-5 mM 乙酸铵溶液、流动相 B-乙腈; B 相初始浓度 5%。

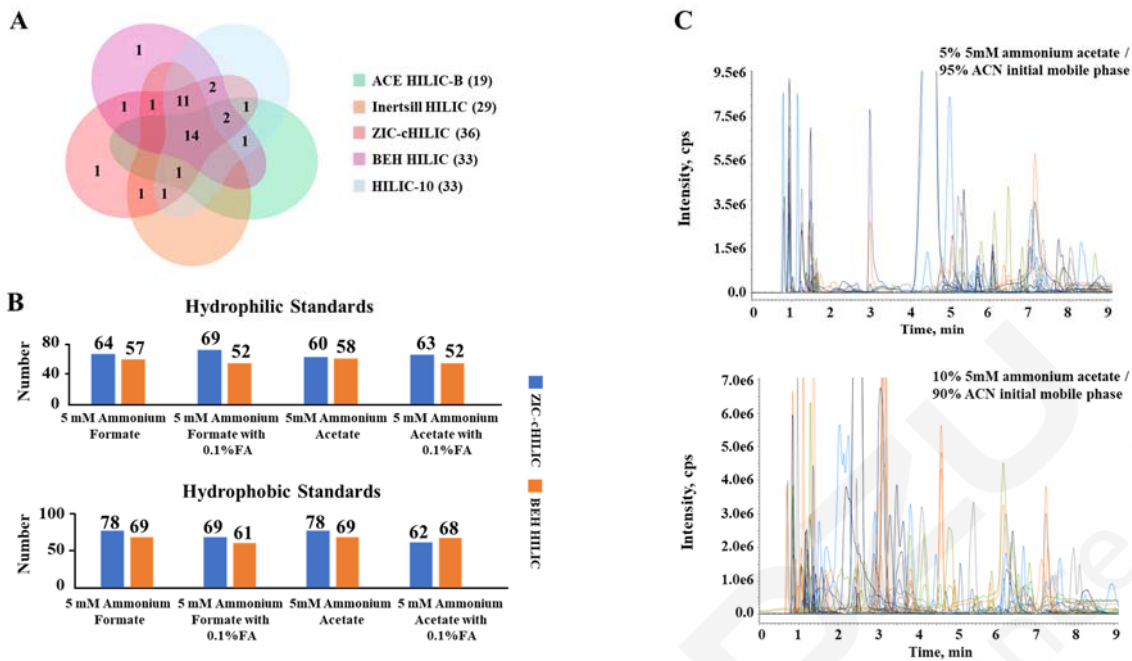


图 2. 第一维 HILIC 柱筛选结果

2.2 第二维 RPLC 及样品环冲洗倍数筛选结果

如图 3 所示, 对二维色谱柱进行筛查, 其中 Acclaim C8 性能最佳。优化后的色谱条件: 流动相 A-0.1%FA 溶液、流动相 B-乙腈; B 相初始浓度 5%。样品环冲洗倍数为 2.25 倍。

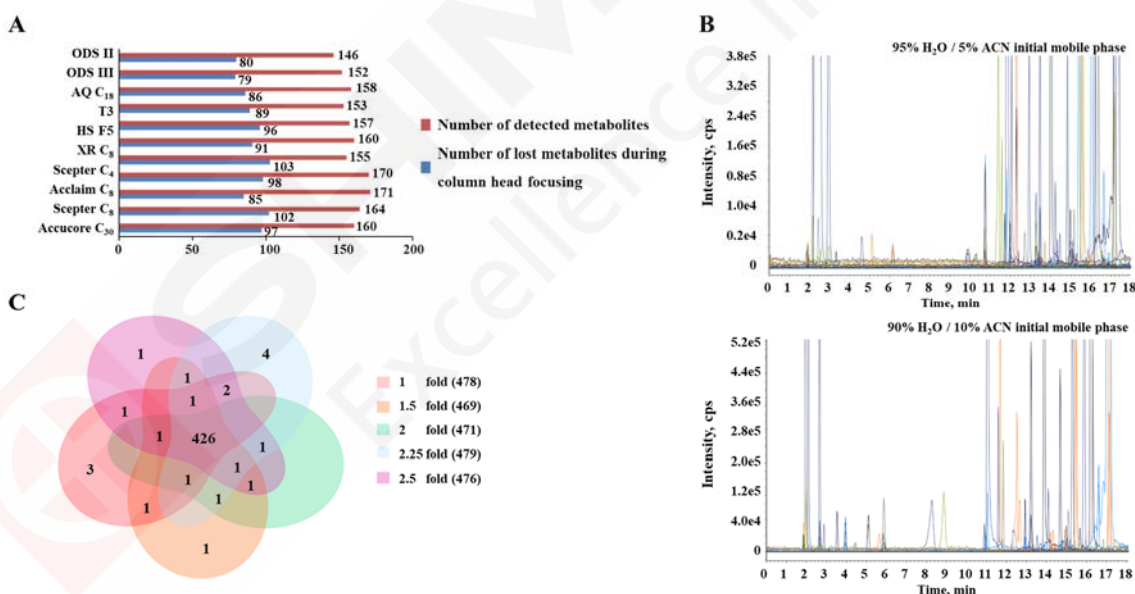


图 3. 第二维 RPLC 及样品环冲洗倍数筛选结果

2.3 重现性评价以及与一维宽极性覆盖范围色谱对比

亲水性代谢物和疏水性代谢物在不同的保留时间范围内洗脱, 分别为 RT 2-20 min 和 RT 20-38 min。如图 4A 所示, 考察日内重现性, 超过 92%的代谢物的保留时间 RSD 值小于 2%, 超过 95%的代谢物的峰面积 RSD 值小于 30%; 考察日间重现性, 超过 92%的代谢物的保留时间 RSD 值小于 2%, 超过 85%的代谢物的峰面积 RSD 值小于 30%, 重现性良好。

全谱二维液相+LCMS-8060NX 代谢组学方法在 2-20 分钟内采用 ZIC-cHILIC 梯度洗脱 (用于亲水性代谢

物分离)，之后在 20 分钟后采用 Acclaim C8 梯度洗脱（用于疏水性代谢物分离）。图 4B 所示，在亲水分离过程中（RT 0-20 分钟），T3 和 ADME 柱对 295 种亲水代谢物的保留能力较弱，导致大部分亲水代谢物在前 8 分钟内被洗脱。相比之下，二维液相色谱系统中的一维 HILIC 色谱柱能够分离这些中高极性代谢物。在疏水分离时间（RT 20-38 分钟）内，二维液相色谱系统中 Acclaim C8 柱对 122 种疏水代谢物的色谱分离效果优于 T3 和 ADME 柱。

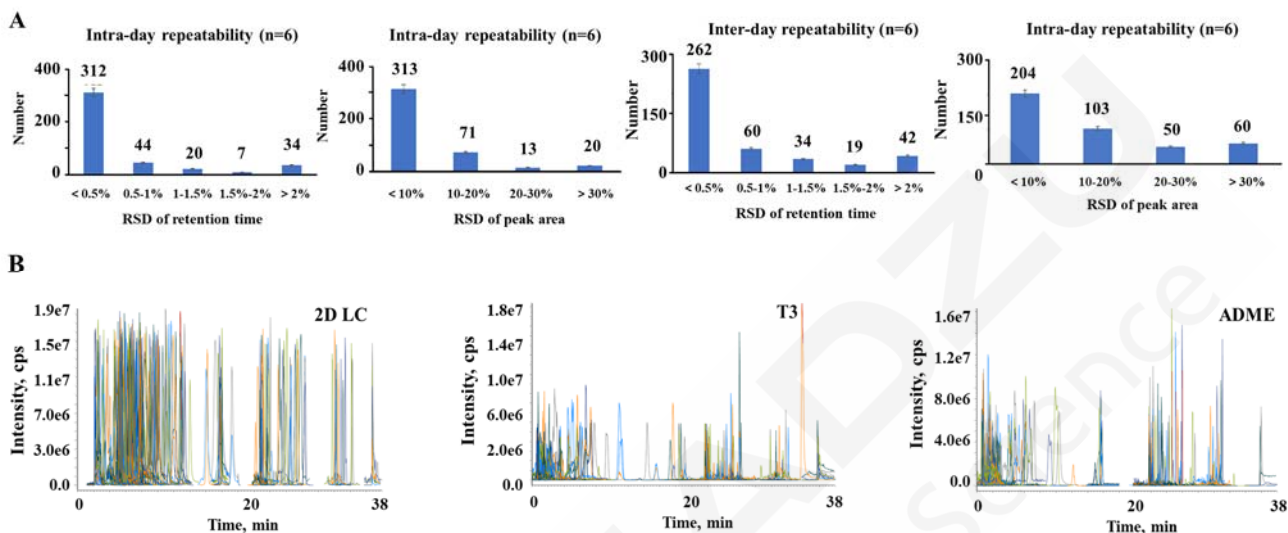


图 4. 重现性评价以及与一维宽极性覆盖范围色谱对比

2.4 全谱二维液相+LCMS-8060NX 代谢组学方法对不同生物样本的分析性能

如图 5 所示，代谢物在生物样本中的分布差异很大。在所有基质中都能检测到的代谢物为 208 种，占 49.8%。这些代谢物主要包括氨基酸和肽、单糖、嘌呤和其他类型的代谢物。肝脏中检测到了最多的代谢物（344 个），其次是尿液（312 个）、血浆（312 个）和精浆（309 个）。这表明该方法能够全面检测各种生物样本中的代谢物。

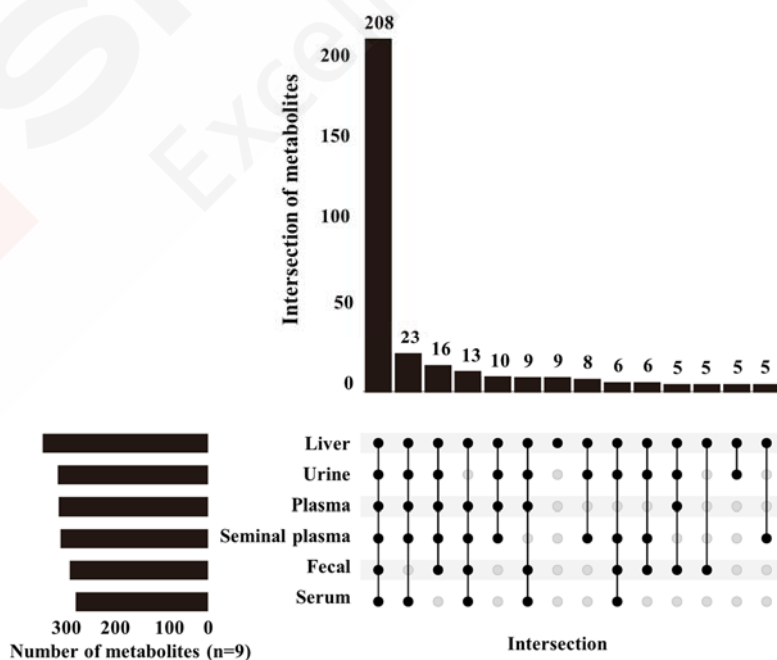


图 5. 2D LC 广泛靶向代谢组学对不同生物样本的分析性能

2.5 临床应用-膀胱癌尿液病例对照研究

在临床应用中，共筛选出了 30 种差异代谢物。筛选条件：1、VIP 值 > 1；2、峰面积变化倍数 > 2 或 < 0.5；3、p 值 < 0.05。

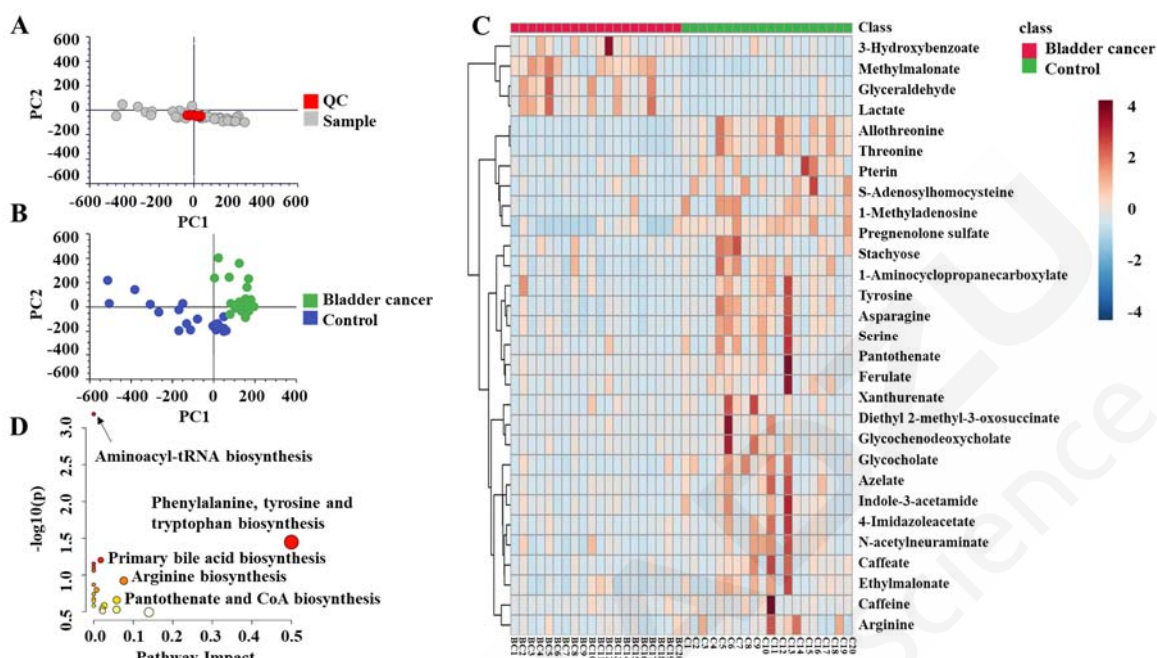


图 6. 临床应用-膀胱癌尿液病例对照研究

3. 结论

本文建立了一种基于全谱二维液相+LCMS-8060NX 的代谢组学分析方法，具有广泛的极性覆盖范围，良好的日内和日间重复性，良好的线性关系和较宽的线性范围。并在多种生物基质和一项膀胱癌尿液病例对照研究中进行了方法适用性验证。

4. 参考文献

Rui Guo, Qisheng Zhong, Jiaqi Liu, Peiming Bai, Zongpeng Wang, Jieling Kou, Peijie Chen, Jie Zhang, Bo Zhang. Polarity-extended liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for simultaneous hydrophilic and hydrophobic metabolite analysis. *Analytica Chimica Acta* 1277 (2023) 341655

全谱二维液相-LCMS-8050 联用快速分析化妆品中 195 种禁用物质

摘要: 本文利用岛津全谱二维液相与三重四极杆质谱联用系统建立了快速分析化妆品中 195 种禁用物质的方法。通过将亲水性色谱 (HILIC) 与反相色谱 (C18) 组合, 可以实现一次进样覆盖适用两种分离模式的化合物快速分析。利用该系统同时分析 195 种化妆品风险物质, 其目标物线性良好, 相关系数 $R \geq 0.994$ 。不同浓度水平的样品连续 6 针重复进样, 保留时间 RSD $<0.6\%$, 峰面积 RSD $<6\%$ 。相较于普通一维液相方法, 该方法可显著改善死时间附近的共洗脱现象及峰形问题, 不在显著增加分析时间和不损失灵敏度的情况下扩大分析覆盖范围。

关键词: 化妆品 禁用物质 全谱二维液相 三重四极杆质谱

技术特点:

- ❖ 全谱二维液相可将亲水色谱与反相色谱组合, 实现极性、弱极性化合物的同时分析
- ❖ 与质谱联用解决了化妆品中不同极性物质同时分析的难点, 满足快速筛查需求。
- ❖ 与普通液相系统相比, 解决了部分物质共洗脱或峰型不好的问题

随着化妆品质量安全问题频繁发生, 监管部门加大了化妆品中禁用物质的监控力度, 但是化妆品中禁用物质种类繁多, 缺少多物质同时快速筛查的方法。目前, 化妆品中禁用物质快速检测多是使用液相色谱-质谱法, 然而传统一维液相色谱无法为复杂的化妆品样品分析提供足够的分离度和峰容量, 故现有的化妆品禁用物质检测方法大多仅针对 1-2 类化合物, 检测种类受限。全谱二维液相色谱是将不同分离模式如亲水作用色谱模式 (HILIC) 和反相液相色谱模式 (C18) 的组合起来, 提高分离效果和峰容量, 可以实现一针进样同时分析高、中、低极性物质; 因此, 该系统的应用可扩大化妆品禁用物质的筛查种类, 具有实际意义。

本文采用岛津全谱二维液相与三重四极杆质谱联用成功建立了快速分析 195 种化妆品中禁用物质方法。该方法解决不同极性物质同时分析的问题, 而且还改善了部分物质的共洗脱或峰型不好的现象, 经过方法学验证可以满足化妆品禁用物质快速筛查的需求, 供相关人员参考。

1. 仪器

岛津全谱二维液相系统+LCMS-8050。具体配置为

输 液 泵	: LC-30AD×4	在 线 脱 气 机	: DGU-20A _{5R}
自 动 进 样 器	: SIL-30ACMP	柱 温 箱	: CTO-20AC
系 统 控 制 器	: CBM-20A	切 换 阀	: FCV-36AH
质 谱 仪	: LCMS-8050	色 谱 工 作 站	: LabSolutions Ver. 5.99

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液的色谱图

全谱二维液相系统通过组合 Amide 柱（一维）与 C18 柱（二维），在 26 min 内完成对 195 种化妆品禁用物质的好分离，色谱图见图 1，具体化合物信息参考附表。对比单独使用传统一维液相 Amide 柱法，全谱二维液相法可显著改善共洗脱现象；单独使用传统一维液相 C18 柱法，全谱二维液相法可改善由于固定相或样品溶剂不匹配导致的弱保留、峰形差的问题(图 2)。

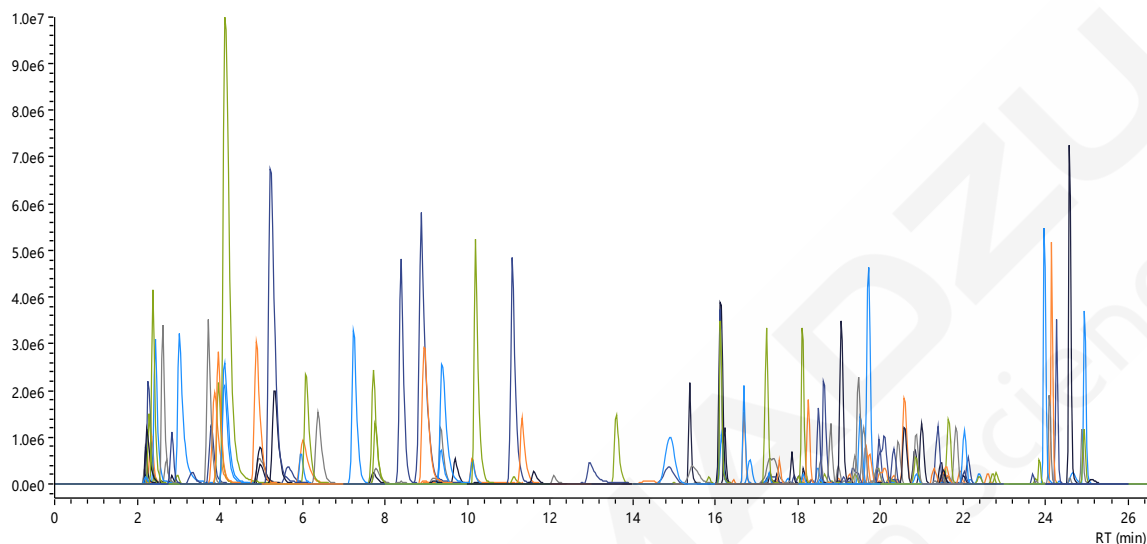


图 1. 全谱二维液相系统的标准溶液 MRM 色谱图

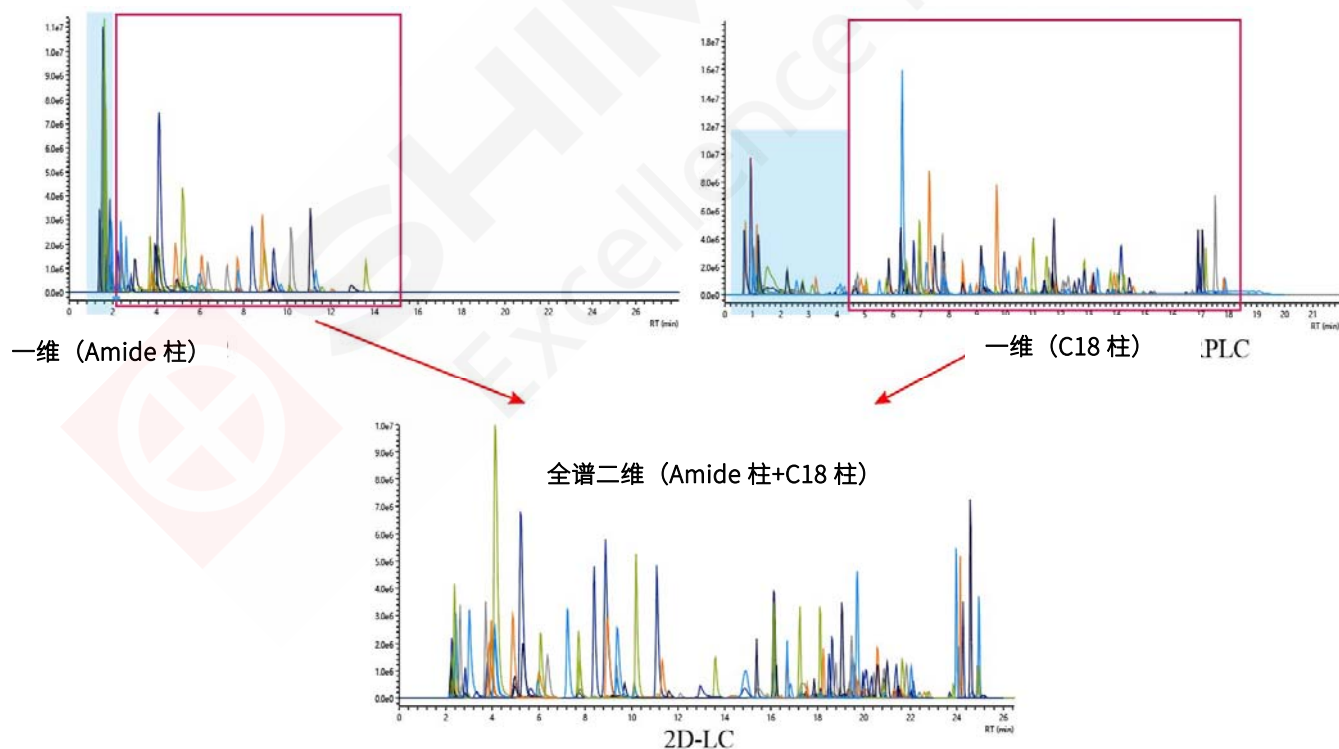


图 2. 三种色谱系统的分离效果

将全谱二维液相系统（Amide 柱+C18 柱）与传统的一维系统（C18 柱）进行对比；在部分化合物分离上优势突出。在 195 种化合物中，约有 30 种化合物由于 C18 柱保留差或溶剂效应等原因导致在死时间附近流出或峰形异常（双峰、裂峰、肩峰）的问题；但是在全谱二维液相系统上得到了改善，具体结果如图 3 所示。

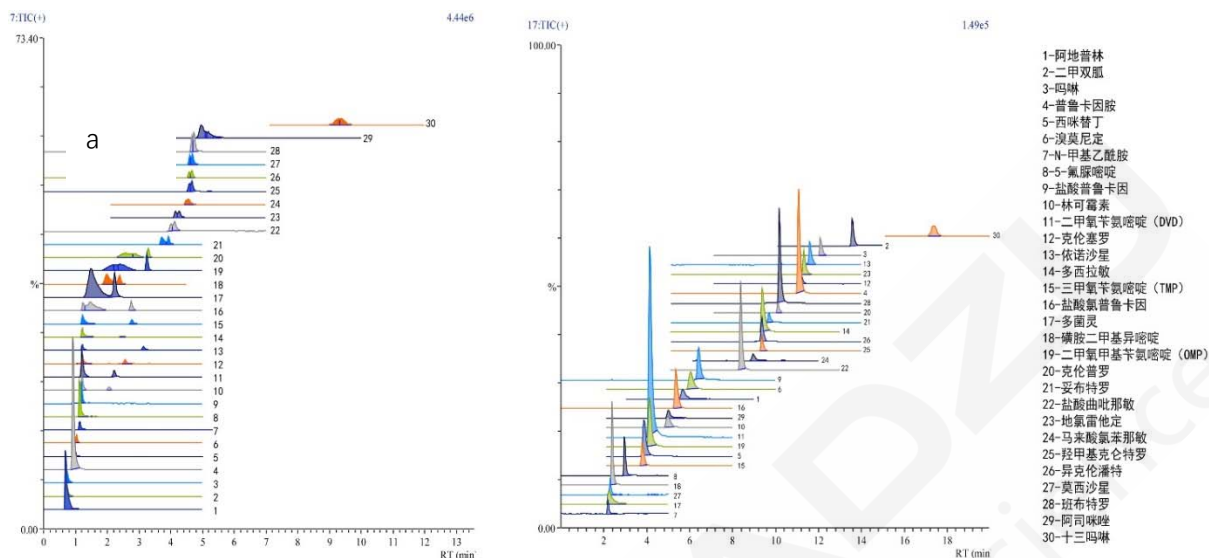


图 3. 30 种化合物在传统一维液相（左）和全谱二维液相系统（右）的峰型对比图

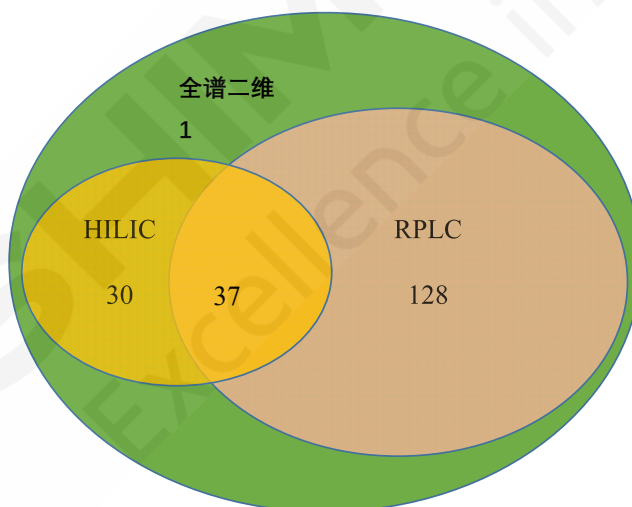


图 4. 对比传统一维液相与全谱二维液相系统覆盖的化合物数目

2.3 线性考察

配制不同浓度的标准溶液建立校准曲线，使用外标法定量，195 种化合物校准曲线的线性相关系数 $R \geq 0.994$ ，准确度在 80%~120%。可用于定量与定性分析。

2.4 重复性

选取高、中、低浓度点三个浓度水平进行重复性考察；连续进样 6 针，保留时间 $RSD < 0.6\%$ ，峰面积 $RSD < 6\%$ ；具体数据见下图 5

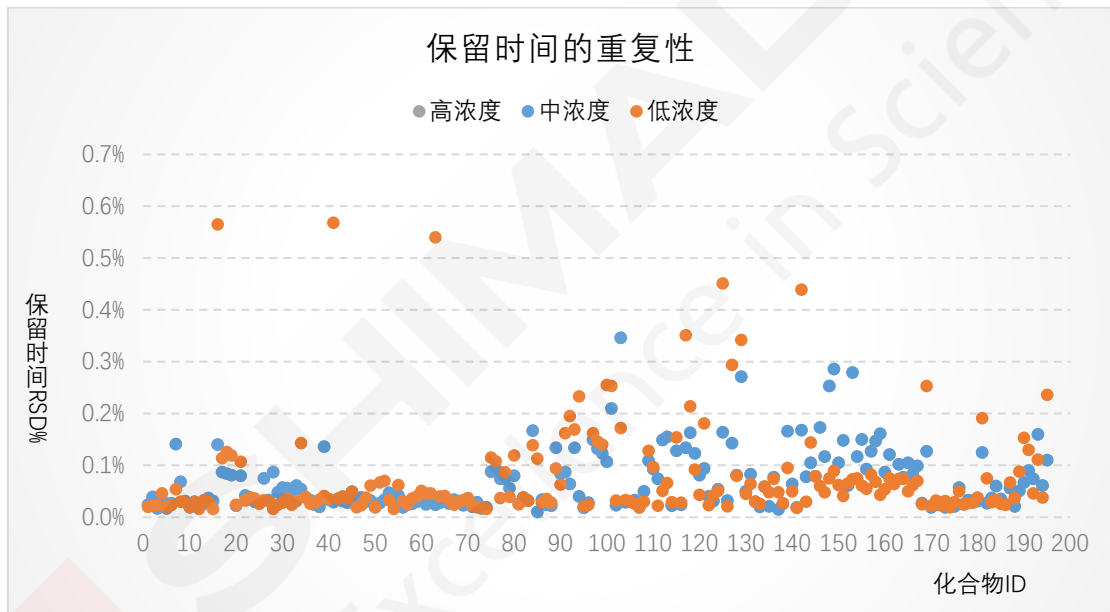
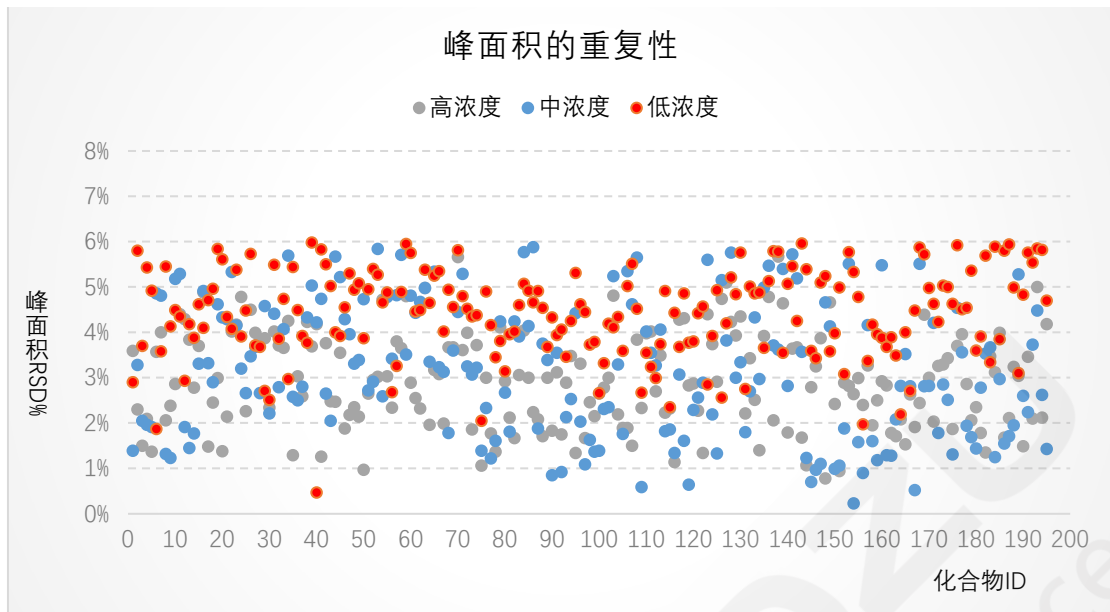


图 5. 峰面积和保留时间的重复性结果

2.5 基质效应考察

考察水液 (solution)、乳液 (lotion)、粉末 (powder) 三种基质化妆品中 195 种化合物的基质效应。水液及粉末产品中基质效应较低，乳液产品中目标物基质干扰较强；水液、乳液、粉末的基质效应因子在 80%-120% 的分别占 76.8%，72.0% 和 56.2%。具体见图 6 所示。

2.6 回收率

在两种空白基质样品中添加高、低浓度标准品，平行测定三次，回收率在 86.2%-109.9%。回收率的分布如图 7 所示。

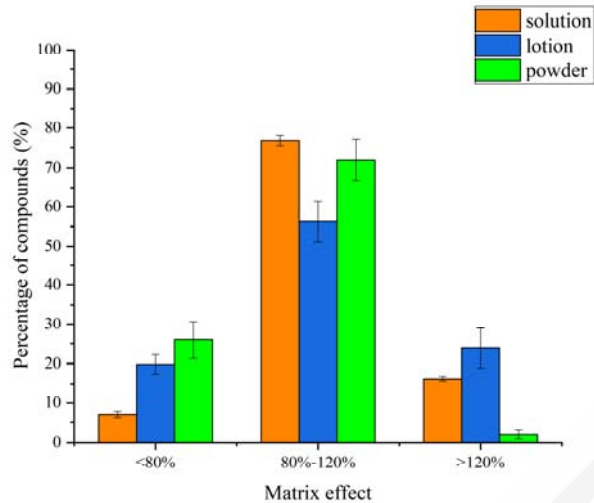


图 6 195 种化合物在不同基质中的基质效应因子

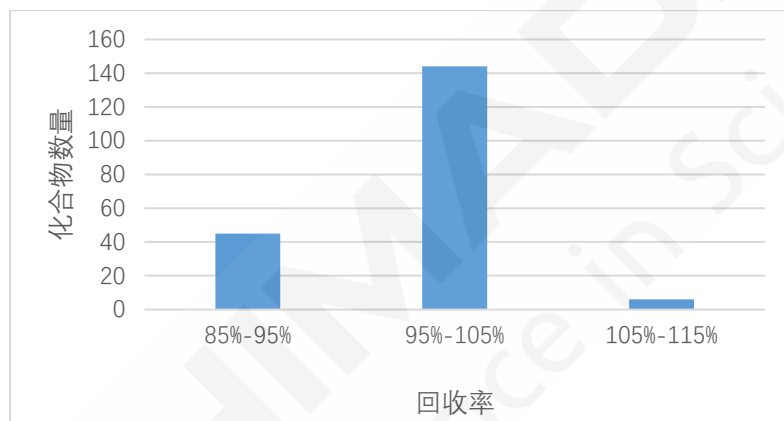


图 7 195 种化合物的回收率结果分布

3. 结论

本文建立了全谱二维液相与 LCMS-8050 联用系统测定化妆品中禁用物质组。该方法组合了 Amide 柱及反相色谱柱，实现一针进样同时分离适用于不同分离模式的化合物，在 26 min 以内完成 195 种目标物的检测（包括 74 种激素、64 种抗感染药物、22 种农残、18 种抗组胺药、5 种麻醉药、6 种拟交感胺以及 6 种其它禁用物质）。各物质线性良好良好，相关系数 $R \geq 0.994$ 。不同浓度水平的重复性考察，其保留时间 $RSD < 0.6\%$ ，峰面积 $RSD < 6\%$ ；基质样品的加标回收率在 86.2%-109.9% 之间。全谱二维液相与质谱联用，在不显著增加分析时间的情况下，实现了不同极性化合物的一针分析，可满足化妆品风险物质的快速筛查的需要。

4. 参考文献

Liping Zhang, Lingling Shen, Qisheng Zhong, Ting Zhou. Diluting modulation-based two dimensional-liquid chromatography coupled with mass spectrometry for simultaneously determining multiclass prohibited substances in cosmetics. *Journal of Chromatography A* 1695 (2023) 463954

第 5 章 相关物质的共同分析应用案例

这里的相关物质，是极性差异较大、但化合物之间有较强相关性的物质。比如中药、天然产物里数量众多的活性物质，彼此之间可能存在相似的结构，但极性、活性、药效可能差异较大，但其整体分析对于天然产物的药效药理分析却十分重要。再比如，小分子药物或天然产物的某活性成分，进入体内之后会进行一系列的代谢途径，从而产生众多结构相关但极性差异较大的代谢物，然后进入器官靶点产生药效，最后排出体外。这些过程都将产生极性差异较大的相关物质，有必要在一次分析中进行共同分析。使用全谱二维就可以达到一针分析极性差异很大、数量众多的相关物质。

岛津通过全谱二维液质联用系统的宽极性分离+三重四极杆质谱仪 LCMS-80XX 系列或 LCMS-90X0 高分辨质谱等产品，可以实现宽极性、多目标化合物数据库的统一建立，并通过平行设计实现充分平衡和清洗，减少了交叉污染和记忆效应，提高了系统稳定性和重现性。

目前利用全谱二维液质联用系统，自建或与专家课题组合作建立了如下应用案例供参考：

全谱二维液相色谱-Q-TOF 联用分析丹参活性成分

全谱二维液相-Q-TOF 联用分析不同产地当归的活性成分

全谱二维液相-Q-TOF 联用分析丹参活性成分

摘要: 本文利用岛津全谱二维液相色谱和四极杆飞行时间质谱联用分析丹参中未知活性成分。先利用已知的 16 种成分考察了方法的稳定性, 日内和日间精度的 RSD% 分别在 1.4%-5.7% 和 3.1%-9.6% 之间, 仪器精密度良好; 有 87.5% 的分析物基质效应在 80%-120%, 并测定了不同来源的丹参药材中 16 种丹参活性成分。然后, 采用 PELC+LCMS-9030 定性分析丹参中的 150 个活性成分, 包括酚酸类、二萜类、糖类、氨基酸类及其它类别成分, 其中未在丹参中报道过的活性化合物有 33 个。建立的 PELC-MS 方法结合了 HILIC 和 RPLC 的特点, 提高了分析覆盖范围和分离性能, 可对丹参中的多类活性成分定性分析。

关键词: 全谱二维液相色谱 LCMS-Q-TOF 丹参 亲脂性与亲水性活性成分

技术特点:

- ❖ 全谱二维液相色谱拓展了可检测化合物的极性范围
- ❖ 该法可同时分析丹参中亲脂性、亲水性活性成分

丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 是我国常用的一种中药, 其药用价值高、使用广泛, 其质量控制对丹参的临床应用有效性、安全性具有重要意义。丹参的活性成分包括疏水性的二萜类化合物和亲水性的丹参酚酸类化合物, 而在《中国药典》(2020版) 中二萜类和酚酸类成分的含量测定需用不同的液相分析方法。因此开发同时适用于酚酸类亲水性成分分析的 HILIC 方法和二萜类亲脂性成分分析的 RPLC 方法, 则有利于丹参中多组分的同时分析。

基于此, 本文建立了全谱二维液相色谱与质谱

联用系统 (Polarity Extended Liquid Chromatography Mass Spectrometry System, PELC-MS) 定性分析丹参中未知活性物质的方法。首先采用了酚酸、二萜、多糖类共 16 个标准品优化液相和质谱条件, 确定第一维使用 HILIC 柱, 第二维使用 C₈ 柱, 构建了 PELC 与 LCMS 联用定性与定量分析丹参药材中活性成分的方法, 实现了不同极性的活性成分的同时测定, 定性出丹参中多类活性成分, 用于丹参的表征。

1. 仪器

岛津全谱二维液相色谱与 LCMS-9030 联用仪, 具体配置为:

输液泵 : LC-40B X3	系统控制器 : SCL-40
输液泵 : LC-40B XR	在线脱气机 : DGU-405
自动进样器 : SIL-40C X3	飞行时间质谱仪 : LCMS-9030
柱温箱 : CTO-40C (内置 FCV-36AH)	
色谱工作站 : LabSolutions Ver. 5.114; LabSolutions Insight Ver. 3.7	

2. 结果与讨论

采用了酚酸、二萜、多糖类共 16 个标准品优化液相和质谱条件，确定第一维使用 HILIC 柱，第二维使用 C8 柱，构建了 PELC 与 LCMS 联用定性与定量分析丹参药材中活性成分的方法；利用宽极性的优势定性分析丹参样品中的活性成分。

2.1 重复性

基于低、中、高浓度下标准品的 6 次重复进样，其方法准确度在 89.8%-111.5% 的范围内。日内和日间精密度的 RSD% 分别在 1.4%-5.7% 和 3.1%-9.6% 之间（图 1）。

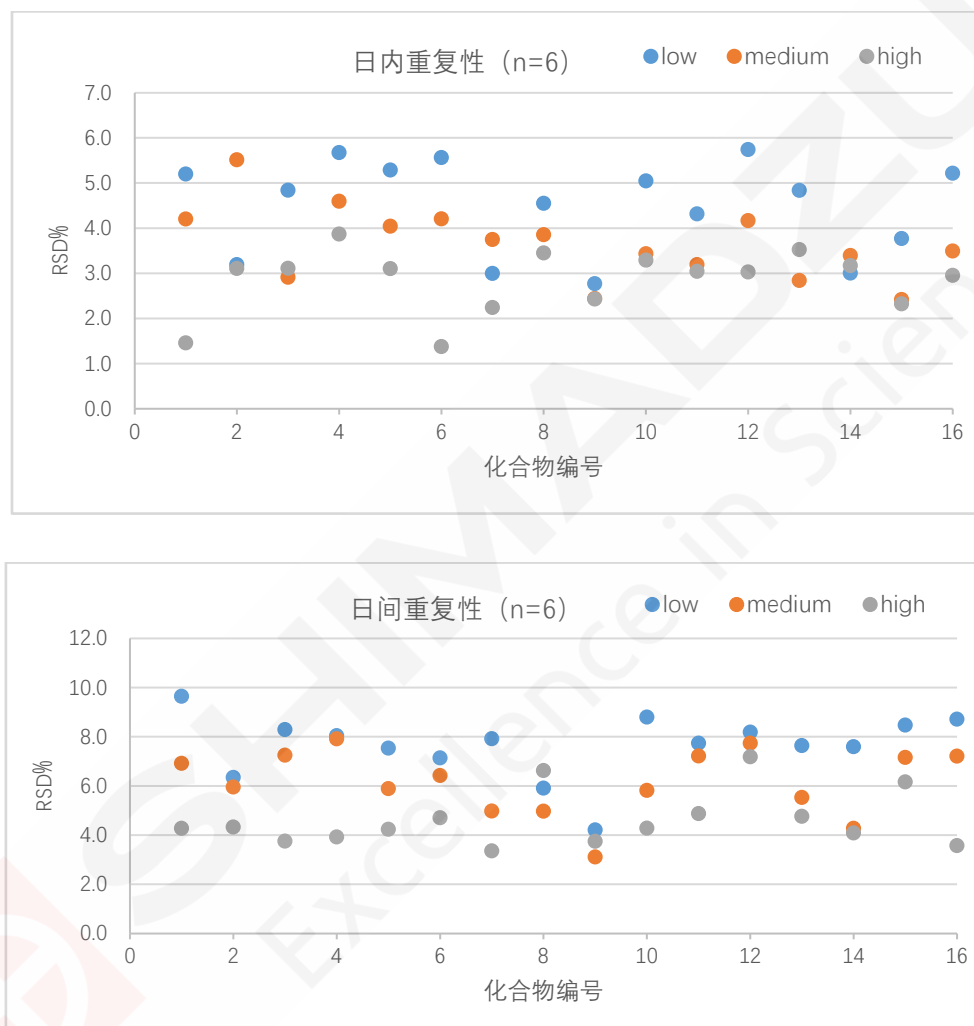


图 1. 16 种成分的日内与日间重复性（化合物编号对应表 4 中的化合物序号，下同）

2.2 基质效应

基质效应 (ME) 采用低、中、高浓度下 3 次重复进样的加标样品和纯溶剂中标准品进行考察。图 2 可看出不同浓度下分析物受基质影响的大小不同，低浓度下基质效应较强，而高浓度下基质效应较弱，其中 87.5% 的分析物基质效应在 80%-120%，表明多数化合物在高浓度下基质干扰较低。极性多糖基质效应较强，可能原因是在 HILIC 色谱柱洗脱后期阶段，样品中共洗脱的高极性成分多，导致低浓度下较明显的离子抑制作用，而目标物中多糖成分在丹参中含量高，受基质干扰较小。

2.3 丹参样品的测试结果

测定 5 种不同来源的丹参药材的活性成分含量，16 种成分的典型色谱图见图 3。实验结果表明，不同产地的丹参药材中活性成分含量有差异。《中国药典》2020 年版规定丹参酮 I、丹参酮 II A 及隐丹参酮的总含量不得低于 0.25%，5 个样品均符合要求；丹酚酸 B 含量不低于 3.0%，产自中国安徽的丹参药材（样品 4）及对照药材（样品 5）符合该要求。其中样品 4 检测到的目标物数量最多，用作后续定性分析样品。

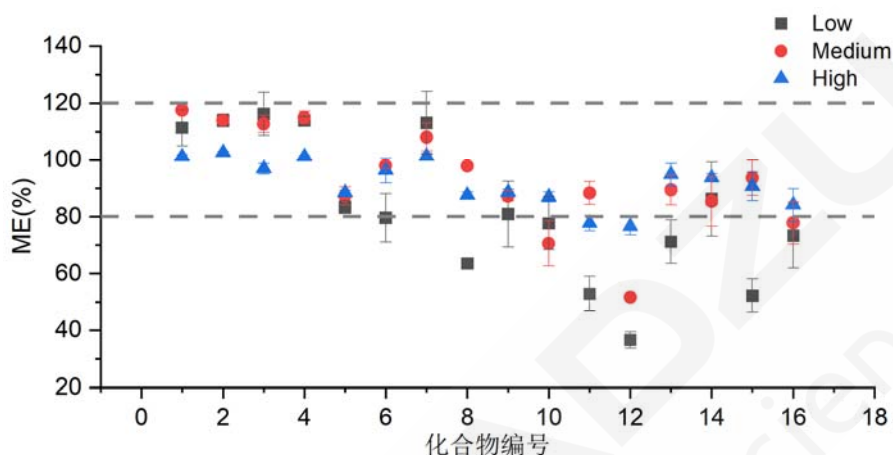


图 2. 16 种成分的基质效应

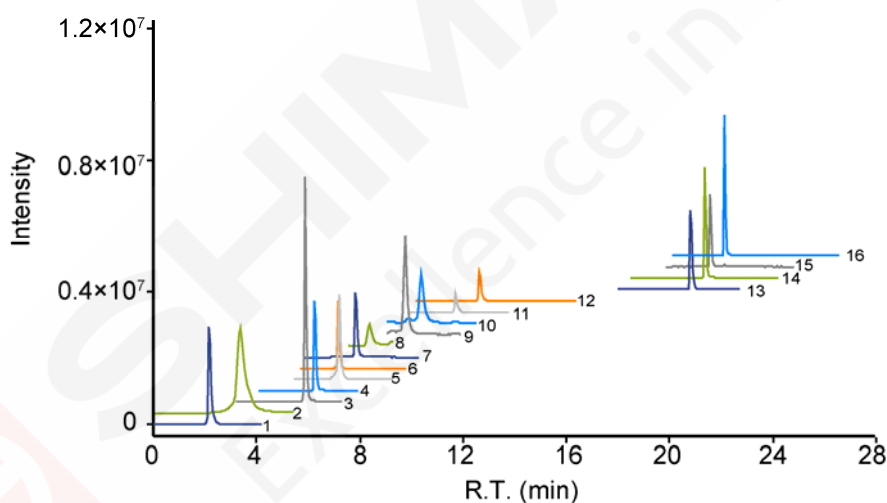


图 3. 16 种成分的色谱图

2.4 丹参中活性成分的鉴定

对丹参药材提取液中的成分进行了定性分析，正离子及负离子模式下的总离子流色谱图 5。通过 PubChem 数据库和文献数据的比较，结合 MS-DIAL 软件搜索 MoNA 数据库进行补充鉴定，最终分离鉴定出酚酸类、二萜类、糖类、氨基酸类等 150 个亲脂性和亲水性活性物质（因未发表，略），其提取离子流色谱图见图 4。氨基酸及其衍生物，还有糖类、酚酸类等亲水性成分在 HILIC 柱上进行分离，而亲脂性的二萜类化合物大多通过第二维 C_8 柱进行分离。PELC 方法具有优越的分离能力，首次从丹参中定性出未报道过的 33 个新化合物（因未发表，略），其中包括 6 个二萜类化合物和 1 个酚酸类化合物。

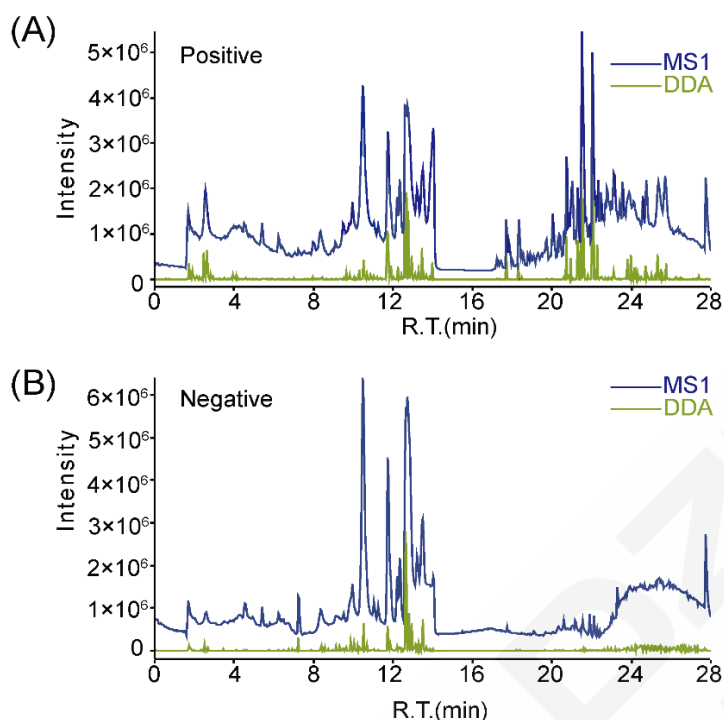


图 4. 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下 PELC-MS 获得的丹参样品的总离子流色谱图

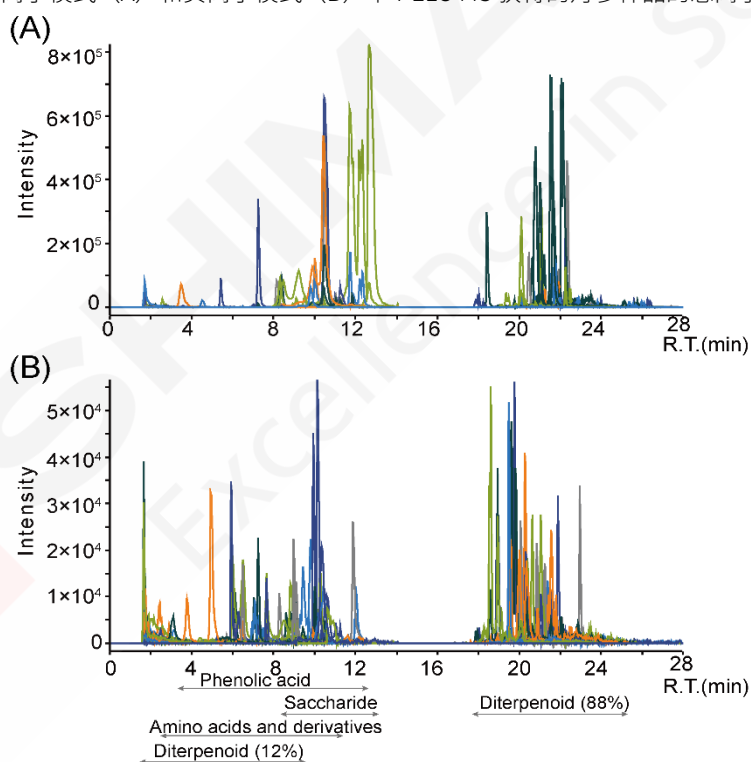


图 5. 鉴定的 150 个活性成分中高丰度 (A) 和低丰度 (B) 成分的提取离子流色谱图

2.5 两个方法的覆盖率对比

HILIC 方法和 RPLC 方法在死时间附近 (0.5-1.5 min) 有严重的共洗脱现象, 无法实现良好的分离。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。去除死时间附近流出的化合物, HILIC 方法和 RPLC 方法获得的特征数分别为 2330 和 2444, 而 PELC 方法检测到特征数为 3877, 优于

1D-LC 方法。图 6 比较了 PELC 方法与 1D-LC 方法获得的特征峰分布，由图可知，PELC 方法实现了对两种一维色谱分离的高度覆盖。结果表明，相较于 1D-LC 方法，所建立的 PELC 方法可提高丹参成分的分析覆盖率。

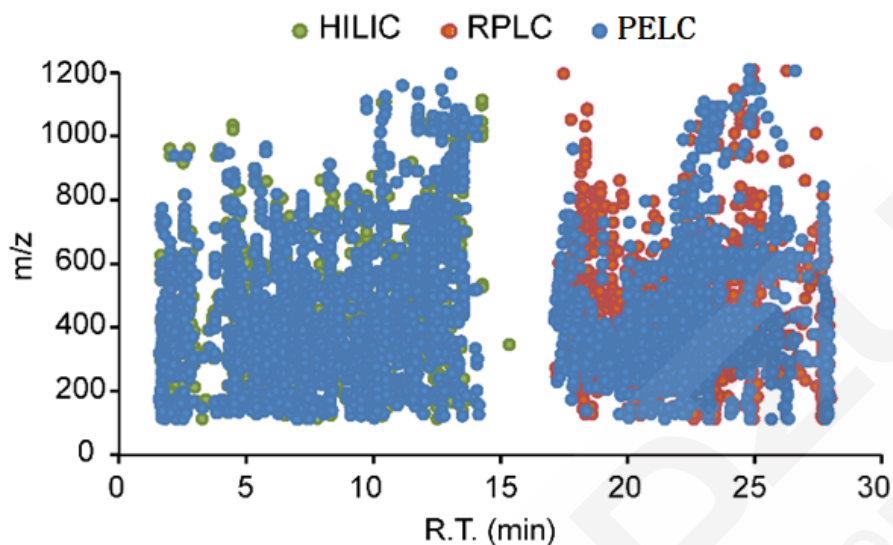


图 6. PELC 与常规亲水和反相方法中通过 DDA 检测到的特征峰分布

2.6 两个方法分离效果对比

HILIC 法与 RPLC 法的梯度条件同 PELC 法中的第一维和第二维一致。HILIC 与 RPLC 对目标物的保留具有互补性，由图 7 可知：

- 1) 4 个二萜类成分（化合物 13#-16#）极性较弱，在 RPLC 法分离良好。
- 2) 两个极性多糖（化合物 11#、12#）为极性较强，在 HILIC 法中分离较好。
- 3) 原儿茶醛（2#）、原儿茶酸（4#）、丹参素（5#）和咖啡酸（3#）在 RPLC 中弱保留，但在 HILIC 方法中保留较强且响应更高。
- 4) 丹酚酸 A（8#）和紫草酸（9#）为同分异构体，在 RPLC 方法中呈现双头峰，无法分离，而在 HILIC 方法中这两个化合物实现了完全分离。

因此，PELC 方法则结合了 HILIC 及 RPLC 的优势，亲水性的酚酸及糖类化合物通过第一维 HILIC 进行分离，亲脂性的二萜类化合物通过第二维 RPLC 进行分离。在《中国药典》第一部中，丹参质量指标物质丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹酚酸 B 分别采用了两个不同的液相分离及检测方法，在本研究中，这些质量指标物质可以在一次分离中实现同时测定。结果表明相比于传统 1D-LC 方法，该 PELC 方法更适用于丹参中极性范围广的复杂成分的分离。

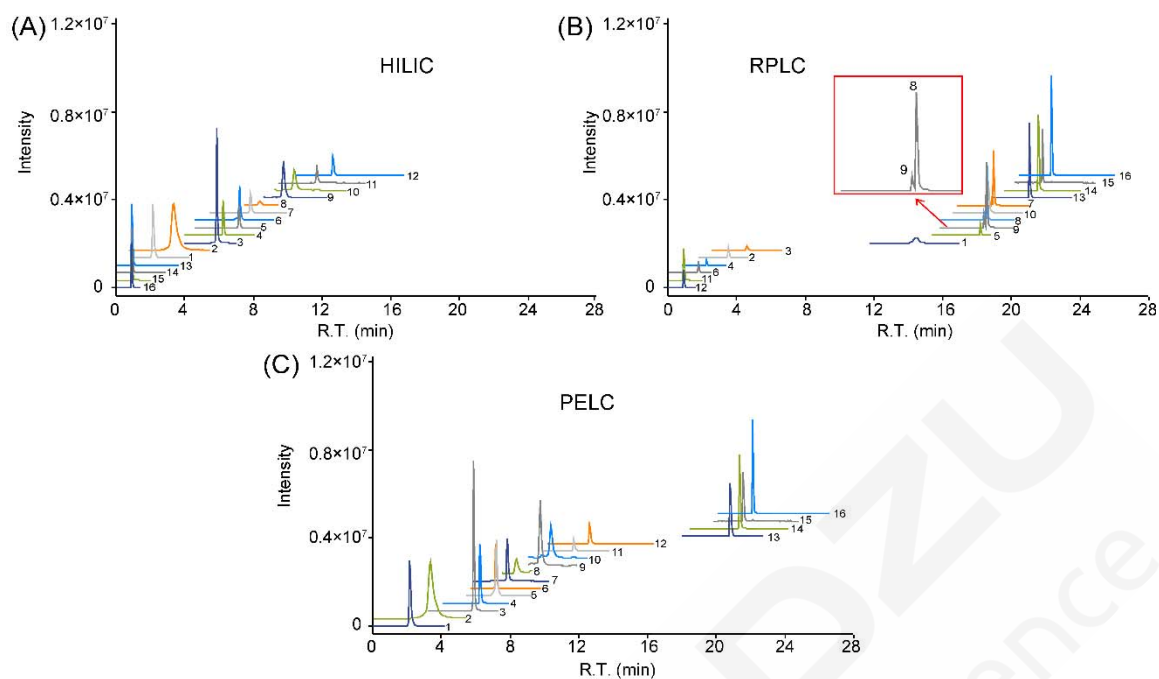


图 7. 由 HILIC 法(A)、RPLC 法(B)和 PELC 法(C)获得的 16 个标准品的 MRM 色谱图

3. 结论

利用全谱二维液相色谱和四极杆飞行时间质谱联用表征丹参中多类活性成分,定性出 150 个活性成分,其中 33 个为新发现成分。全谱二维液相色谱法兼具 HILIC 和 RPLC 的优点,与高分辨质谱联用实现了亲脂性及亲水性活性成分的同时分析,可用于丹参活性成分的宽覆盖范围定性分析。

全谱二维液相-Q-TOF 联用分析不同产地当归的活性成分

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, 包括苯酚类、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, 主要含有苯酚类、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级性均有涉及。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。

1. 实验部分

1.1 仪器

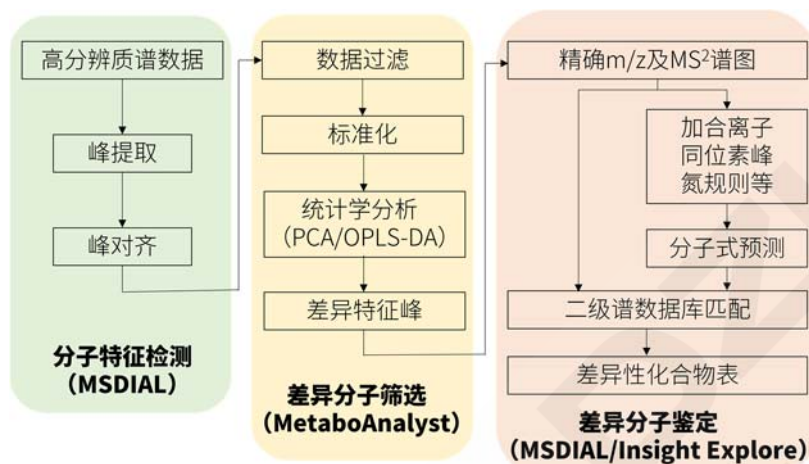
岛津全谱二维液相色谱与 LCMS-9050 联用仪, 具体配置为:

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-20A5
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 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 μm 滤膜，供测定。

1.3 数据处理



2. 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。

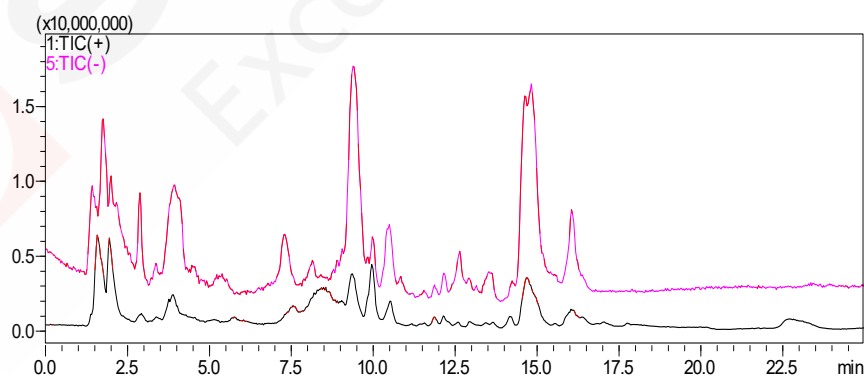


图 1. HILIC 方法分析 QC 样品色谱图

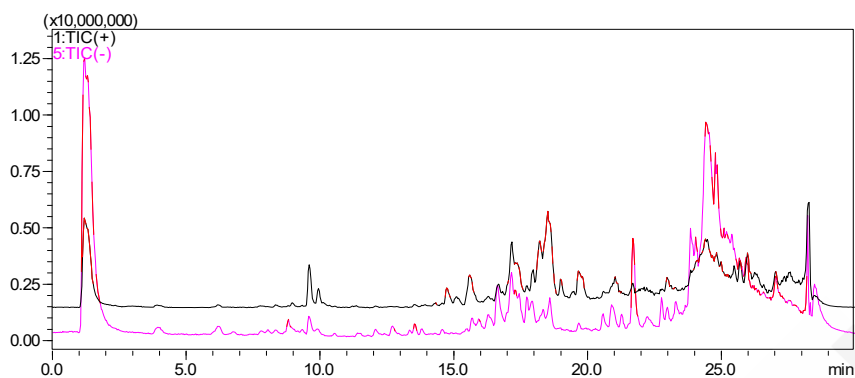


图 2. RPLC 方法分析 QC 样品色谱图

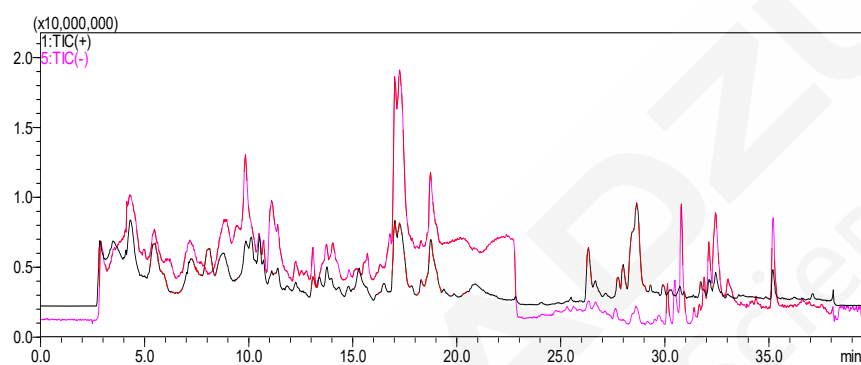


图 3. PELC 方法分析 QC 样品色谱图

表 4. 采用 1D-LC 方法与 PELC 方法检测到的特征峰数

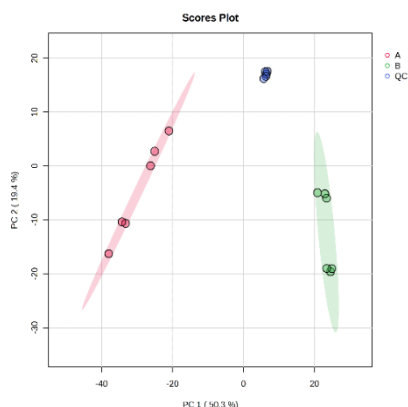
前端分离模式	质谱采集模式	特征峰数
1D-LC (HILIC)		1619
1D-LC (RPLC)	ESI(+)	1529
PELC		2164
<hr/>		
1D-LC (HILIC)		3965
1D-LC (RPLC)	ESI(-)	2222
PELC		4275

2.2 差异性化合物筛选

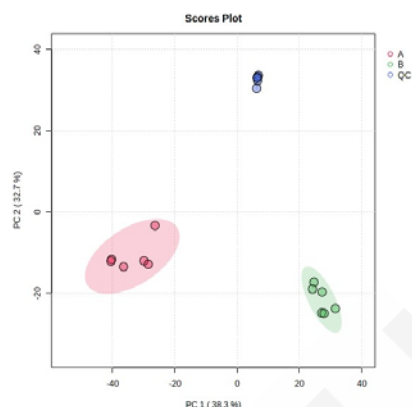
分析后数据经 MS-DIAL 软件进行峰提取和对齐后，将峰对齐表导入 MetaboAnalyst 平台，设定缺失值处理、数据过滤及标准化等参数，进行统计学分析。

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。



a) 正模式

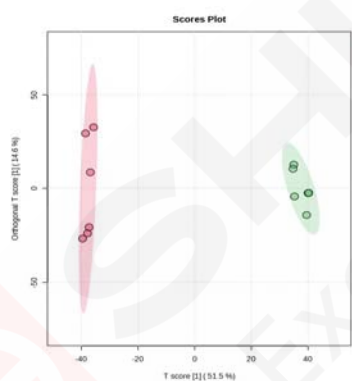


b) 负模式

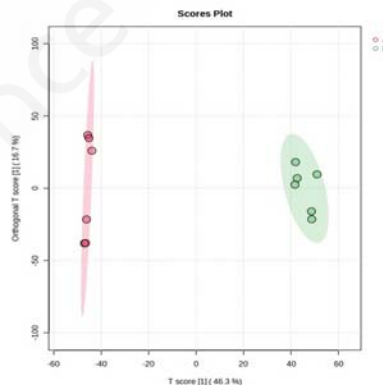
图 4. PCA 得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归, QC: 质控)

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。

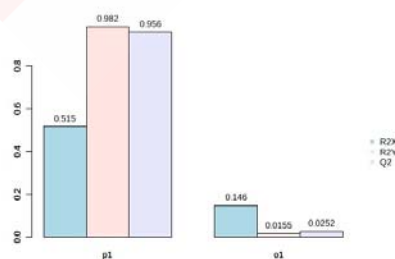


a) 正模式

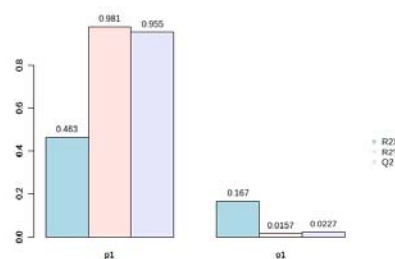


b) 负模式

图 5. OPLS-DA 得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归)



a) 正模式



b) 负模式

图 6. 模型验证图

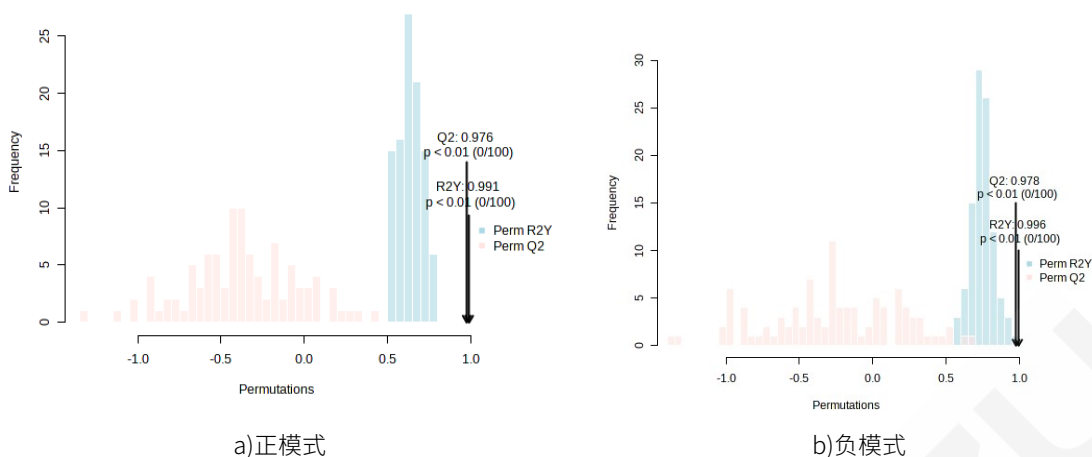


图 7. OPLS-DA 100 次置换检验结果

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 $Fold\ change \leq 0.5$ 和 $Fold\ change \geq 2$; P-value 小于 0.05; $VIP \geq 1$ 。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 (因未发表, 略)，包括藁苯内酯类、有机酸类等天然活性物质。

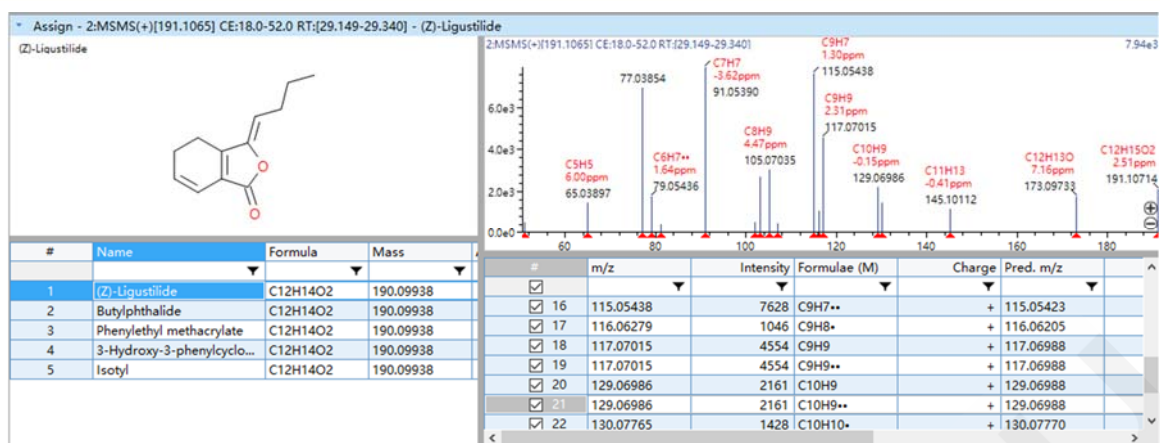


图 9. 利用 MS-DIAL 鉴定差异活性物质

3. 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，包括苯酐类、有机酸类等天然活性物质。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司/岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
B座12层
邮政编码: 610063
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座
邮政编码: 400010
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知