

全谱二维液相-QTOF 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

LCMS-QTOF-056

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

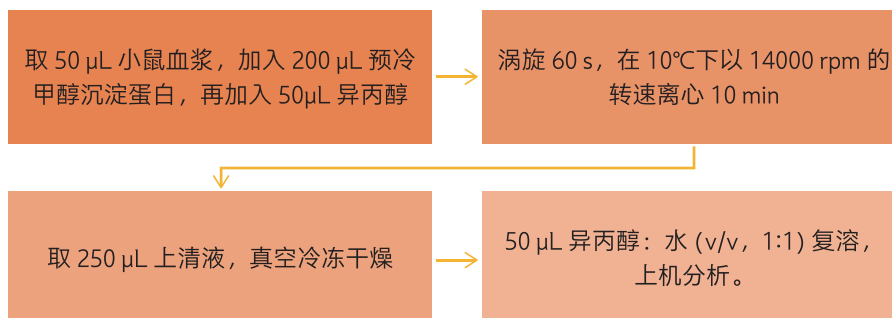
作用。因此，本文希望进一步探究不同剂量下的人参二醇皂苷组分对 AD 小鼠的初步代谢机理。

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-QTOF 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。

■ 实验部分

1.1 样品采集及处理



模型组与 2 种给药组各取 3~4 份样品进行分析，每份样品各取 5 μL ，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。

1.2 仪器

岛津全谱二维液质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，是岛津独家产品，适合于代谢组学中全组分分析，可作为宽极性多目标物数据库的通用分离平台，并适用于极性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。



图 1 岛津全谱二维液质系统

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 \times 2；LC-40B X3 \times 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

1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	第一维：Hillic 色谱柱，150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μm ； 第二维：C8 色谱柱，150 mm \times 2.1 mm I.D., 2.6 μm
流动相：	第一维：A 相 -0.1% 甲酸 + 5mM 乙酸铵 / 水：乙腈 (v/v, 95: 5) ； B 相 -0.1% 甲酸 + 5mM 乙酸铵 / 水：乙腈 (v/v, 5: 95) 第二维：A 相 - 水；B 相 - 5mM 乙酸铵 / 乙腈：异丙醇 (v/v, 6:4)

进样体积：	2 μ L	流速：	0.4 mL/min
柱温：	45°C	洗脱方式：	梯度洗脱（表 1）
质谱条件			
离子源：	ESI	接口温度：	300°C
接口电压：	+4.5 kV	D L 温度：	250°C
雾化气：	氮气 3.0 L/min	加热块温度：	400°C
干燥气：	氮气 10.0 L/min	扫描模式：	MS1 SCAN (m/z 50-1000)
加热气：	空气 10.0 L/min		MS2 DDA (m/z 50-1000)

表 1 液相梯度时间程序

时间 (min)	单元	命令	值
0.00	泵	B.Conc	90
0.00	泵	B.Conc3	20
0.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
1.50	泵	B.Conc	90
2.00	柱温箱	Oven Valve 2	1
18.00	泵	B.Conc3	20
20.00	泵	B.Conc	60
22.00	泵	B.Conc	60
22.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
22.10	泵	B.Conc	90
35.00	泵	B.Conc3	100
39.50	泵	B.Conc3	100
39.60	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc	90
40.00	控制器	Stop	

1.4 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 MS² 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 2 所示）。

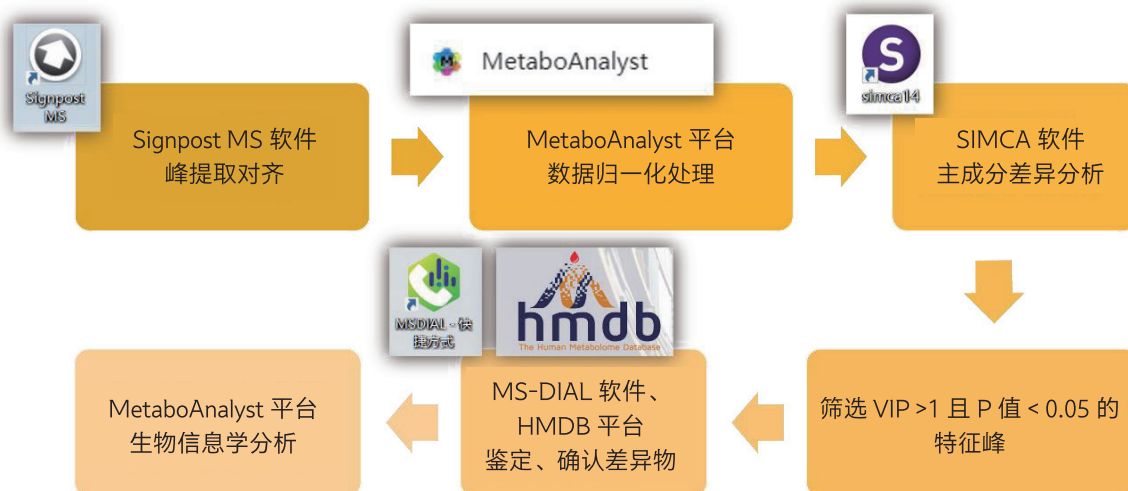


图 2 代谢组学数据处理流程图

■ 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 3 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。

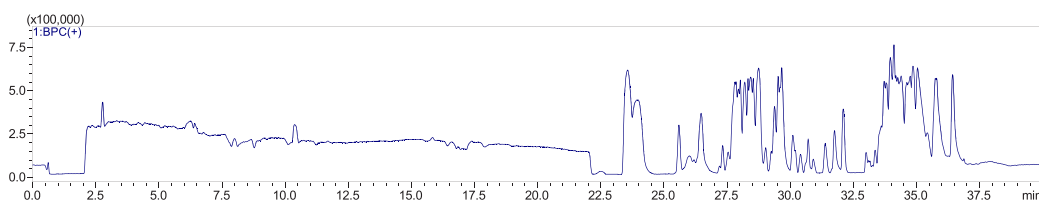


图 3 QC 样品 BPC 图 (正模式)

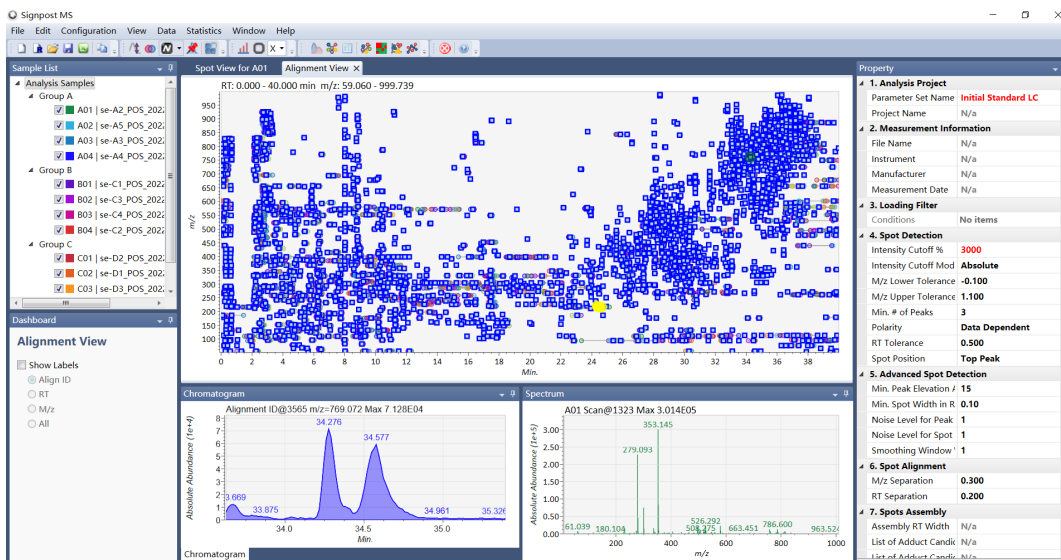


图 4 Signpost MS 峰提取与峰对齐

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 5)。

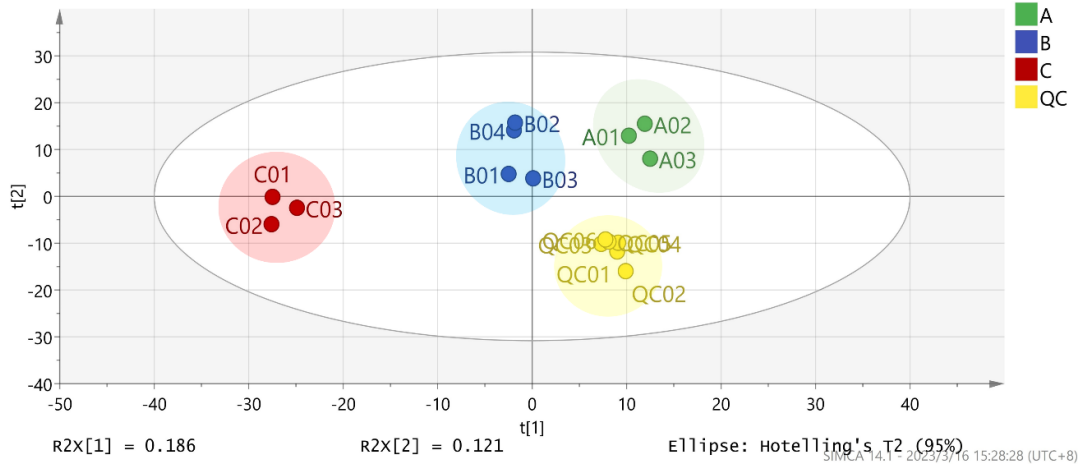


图 5 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图
(A: 模型组; B: 给药组 - 低剂量; C: 给药组 - 高剂量; QC: 质控组)

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 6)。

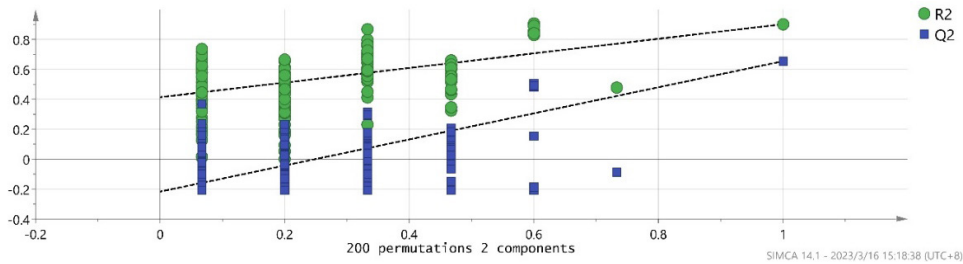


图 6 PLS-DA 200 次交叉验证结果

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 7)。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。

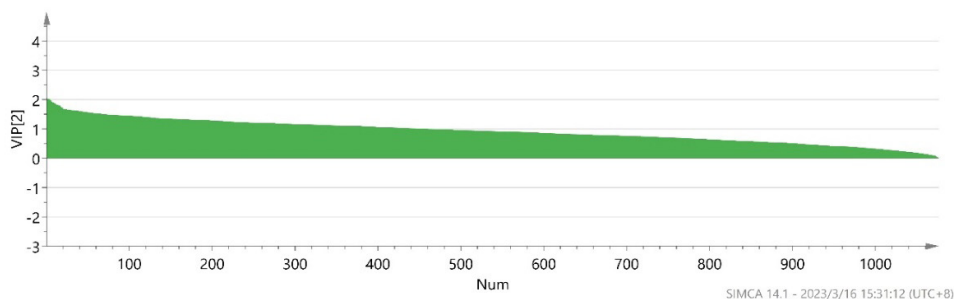


图 7 PLS-DA 各物质 VIP 值计算

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 8）。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；所有物质质量测定误差 < 2 ppm（表 2）。



图 8 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 2 差异性代谢物鉴定结果表 (VIP>1, p<0.05)

No.	化合物名称	RT (min)	加合离子	理论 m/z	实测 m/z	质量数偏差 (ppm)	上 / 下调
1	L-Carnitine	6.46	$[M+H]^+$	162.1125	162.1123	1.2337	↑
2	Citrulline	11.23	$[M+Na]^+$	198.0849	198.0847	1.0097	↑
3	Inosine	3.92	$[M+Na]^+$	291.0700	291.0699	0.3436	↑
4	Gamma-Glutamylglutamine	14.21	$[M+H]^+$	276.1190	276.1187	1.0865	↑
5	Arachidonic acid	27.16	$[M+Na]^+$	327.2295	327.2300	1.5280	↓

*: ↑ 上调, ↓ 下调

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 9）。

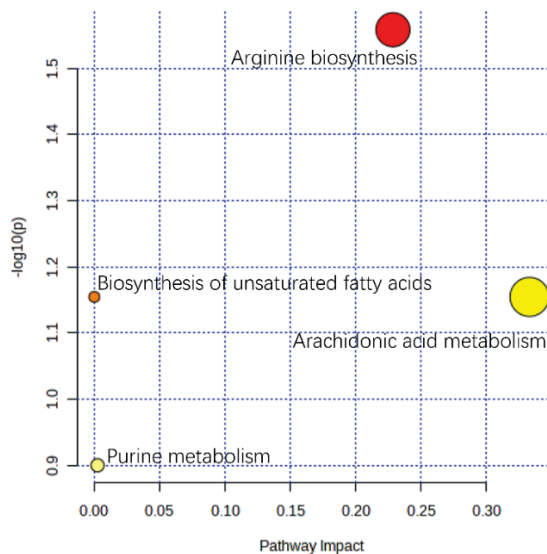


图9 人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠的通路分析

■ 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 MS^2 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。

岛津应用云

