

高效液相色谱-串联质谱法分析 大肠杆菌代谢组中样品提取方法的比较

梅 辉^{1,2} 戴 军^{* 1} 刘文卫³ 凌 霞³ 朱鹏飞³ 赵志军¹

¹(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

²(江南大学食品学院, 无锡 214122) ³(无锡市疾病预防控制中心, 无锡 214002)

摘 要 比较了基于液相色谱和串联质谱联用技术(LC-MS/MS)的 *E. coli* 代谢组分析的 5 种不同样品提取方法。在对样品进行淬灭和洗涤后, 分别使用冷甲醇法、热乙醇法、甲醇/氯仿法、热甲醇法和高氯酸法对样品平行提取 3 次, 每个样品重复进样 3 次。结果显示, 冷甲醇法所得到的相对提取率最高, 且重复性好(RSD<5%)。从相对提取率、重复性等方面综合考察 5 种提取方法, 从优到劣依次为: 冷甲醇法> 甲醇/氯仿法> 高氯酸法> 热乙醇法> 热甲醇法。此外, 以冷甲醇法的提取溶剂配制系列不同浓度的代谢物标样测定的结果表明, 本方法的代谢物检测线性较好, 线性范围较宽, 提取溶剂的基体效应对代谢物的定量分析影响较小。本方法的检出限为 0.05~0.36 mmol/L。

关键词 代谢组分析; 液-质联用; 提取方法; 大肠杆菌

1 引 言

饲料工业的发展及在医药工业上应用的不断扩大使色氨酸的需求量越来越大, 目前我国色氨酸主要依赖进口。采用微生物直接发酵法生产色氨酸, 其合成代谢途径较长, 代谢流弱, 调控机制复杂, 很难实现工业化。代谢组学技术已应用于微生物表型分类、突变体筛选、代谢途径及微生物代谢工程等方面, 但有关色氨酸生产的代谢组学及其分析策略的研究尚未见报道。

微生物代谢组学定义为对胞内所有低分子量代谢物的定性和定量分析^[1]。微生物样品前处理是对代谢物进行准确定性和定量的关键步骤, 一般包括微生物培养、淬灭、洗涤和代谢产物的提取等步骤^[2]。本实验所研究的 *Escherichia coli* (*E. coli*) 全部代谢物仅占细胞干重的 3%~5%, 但其化学成分复杂性和生物活性的多样性远超过一般化学合成和组合化学体系^[3]。应用现代分析技术对大部分中心代谢途径的磷酸化代谢产物以及三羧酸循环中间代谢物的提取方法已有报道^[4~6], 多采用气-质联用(GC-MS)^[7]检测目标代谢物。但气-质联用法往往需要衍生化, 且高温条件下易导致热敏性化合物的变性分解。本研究对生产色氨酸的 *E. coli* 发酵液进行淬灭、洗涤处理后, 分别运用冷甲醇法、热乙醇法、甲醇/氯仿法、热甲醇法和高氯酸法提取胞内代谢物, 在 LC-MS/MS 的多反应检测模式(MRM)对目标代谢物进行检测, 由于胞内代谢物数量巨大, 而在代谢流研究磷酸化糖和磷酸化有机酸、有机酸和氨基酸起到关键作用。因此分别选择以上 3 类物质中有代表性的 8 种代谢物(共计 24 种)作为考察对象, 比较 5 种提取方法的提取率及重复性。结果表明, 冷甲醇法的相对提取率及其重复性均优于其它方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪(Agilent 公司); 3200 Q TRAP 质谱仪(Applied Biosystems 公司), 配有电喷雾离子源; 3 L 发酵罐(NBS); 高速冷冻离心机(Termo 公司), 超低温冰箱(NBS 公司); 真空冷冻干燥机(Labconco 公司); JY-2006 电子分析天平(Mettler Toledo 公司); YDS-6 液氮罐(乐山东亚公司)。

苹果酸、富马酸、琥珀酸、柠檬酸、草酰乙酸、2-酮戊二酸、邻氨基苯甲酸的标准品均购自 BBI 公司, 其它

2010-07-20 收稿; 2010-10-29 接受

本文系江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题基金(No. SKLFTS-200803)资助项目

* E-mail: dj998lc@yahoo.com.cn

标准品购自 Sigma 公司; 甲醇和乙腈(色谱纯, Tedia 公司); 超纯水由 Millipore 公司超纯水器制备。

2.2 菌株与培养基

E. coli BW25113 (DE(trp R, tna A, phe A)) , 实验室改造后的菌株。

培养基组成: 3. 0 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 5. 0 g/L (NH₄)₂SO₄, 15 g/L Glucose, 2 g/L Yeast, 4 g/L Peptone, 1 g/L NaCl, 3 g/L KH₂PO₄, 0. 1 g/L C₆H₅Na₃O₇, 0. 0129 g/L CaCl₂, 0. 075 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 12. 54 g/L CaCO₃, 3 mg/L Al₂(SO₄)₃ · 18H₂O, 1. 125 mg/L CoSO₄, 3. 75 mg/L CuSO₄ · 5 H₂O, 0. 75 mg/L H₃BO₃, 36 mg/L MnSO₄, 4. 5 mg/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 3. 75 mg/L NiSO₄ · 6H₂O, 22. 5 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0. 075 g/L Thiamine。

2.3 液相色谱与质谱条件

色谱条件: Waters Atlantis HILIC Silica 色谱柱(150 mm×2. 1 mm , 3 mm, Ireland); 柱温: 35 ℃; 进样体积: 5 nL; 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液, 流动相 B 为乙腈。梯度洗脱: 0~ 3 min, 10% A; 3~ 15 min, 10%~ 50% A; 15~ 25 min, 50% A; 25~ 27 min 50%~ 10% A; 27~ 35 min, 10% A。

质谱条件: 电喷雾离子(ESI) 源; 负离子扫描; 喷雾电压- 4. 2 kV; 离子源温度 500 ℃; 气帘气压 172. 37 kPa; 喷雾气压 310. 28 kPa; 加热辅助气压 275. 80 kPa。多反应监测扫描模式(MRM): 入口电压- 5 V, 出口电压- 3 V。24 种代谢物的质谱检测具体参数见表 1。

表 1 24 种代谢物的质谱检测参数
Table 1 MS parameters of 24 metabolites

代谢物 Metabolite	保留时间 Retention time (min)	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	去簇电压 Dedustering potential (V)	子离子(碰撞能) Daughter ion (<i>m/z</i>) (Collision energy/eV)
磷酸化糖和磷酸化有机酸 Phosphorated sugar and organic acid				
葡萄糖 6 磷酸 Glucose 6 phosphate, G6P	14. 00	259. 0	- 23	97. 0(- 27)* , 78. 9(- 57)
果糖 6 磷酸 D-Fructose 6 phosphate, F6P	14. 28	259. 0	- 20	97. 0(- 22)* , 78. 9(- 27)
果糖 1, 6 二磷酸 FBP D-fructose 1, 6 bisphosphate	15. 86	339. 0	- 24	97. 0(- 32)*
赤藓糖 4 磷酸 D-Erythrose 4 phosphate, E4P	11. 80	199. 0	- 15	97. 0(- 16)* , 78. 9(- 12)
甘油醛 3 磷酸 D-Glyceraldehyde 3 Phosphate, GAP	14. 48	168. 8	- 14	78. 9(- 42)* , 96. 9(- 14)
2/3 磷酸甘油 2/3 Phospho D-glycerate, 2/3PG	12. 71	185. 0	- 22	79. 0(- 47)* , 96. 9(- 21)
磷酸二羟丙酮 DHAP(Dihydroxyacetone phosphate, DHAP	1. 99	169. 0	- 18	97. 0(- 15)*
磷酸烯醇式丙酮酸 Phosphoenolpyruvate, PEP	13. 86	167. 0	- 15	79. 0(- 20)*
有机酸 Organic acid				
草酰乙酸 Oxaloacetic acid, OXA	13. 15	131. 0	- 16	87. 0(- 13)*
2 酮戊二酸 2-Oxoglutarate, AKG	13. 60	145. 0	- 24	101. 0(- 13)*
琥珀酸 Succinate, SUC	3. 88	117. 0	- 23	73. 0(- 18)* , 98. 9(- 16)
富马酸 Fumarate, FUM	12. 60	115. 0	- 20	71. 0(- 13)*
苹果酸 Malate, MAL	2. 11	133. 0	- 22	115. 0(- 15)* , 88. 0(- 17)
柠檬酸 Citrate, CIT	15. 65	191. 0	- 20	87. 0(- 25)* , 111. 0(- 22)
邻氨基苯甲酸 Anthranilate, ANTH	1. 94	136. 0	- 31	92. 0(- 19)*
莽草酸 Shikimate, SHIK	3. 57	173. 0	- 37	137. 0(- 19)* , 111. 0(- 15)
氨基酸 Amino acid				
丝氨酸 Serine, SER	15. 03	104. 1	- 20	74. 0(- 16)*
谷氨酰胺 Glutamine, GLN	15. 44	145. 1	- 32	127. 0(- 15)* , 108. 9(- 18)
天门冬氨酸 Aspartic acid, ASP	14. 83	132. 0	- 22	115. 0(- 16)* , 88. 0(- 18)
酪氨酸 Tyrosine, TYR	12. 48	179. 8	- 42	119. 0(- 21)* , 163. 0(- 21)
天门冬酰胺 Asparagine, ASN	15. 51	131. 0	- 26	113. 0(- 15)* , 95. 0(- 16)
苯丙氨酸 Phenylalanine, PHEN	10. 51	164. 0	- 32	146. 9(- 19)* , 102. 9(- 23)
色氨酸 Tryptophan, TRP	11. 62	203. 0	- 38	116. 0(- 25)* , 158. 7(- 19)
谷氨酸 Glutamic acid, GLU	25. 81	146. 0	- 24	128. 0(- 17)* , 101. 9(- 20)

* : 定量离子(Quantitative ion)。

2.4 样品处理

2.4.1 样品的淬灭与洗涤 为了使胞内反应停止,代谢物轮廓“冻结”,菌体与培养基相分离,在取样后必须迅速对样品进行淬灭和洗涤处理。取指数生长后期发酵液 5 mL,迅速与- 40 ℃下预冷的 20 mL 甘油 0. 9% NaCl(60

: 40, V/V)溶液混合。在- 19 ℃, 以 12000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 用 4 ℃预冷的 5 mL 0.9% NaCl 溶液洗涤菌体, 再于 4 ℃以 12000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 收集新鲜干净的菌体于离心管中, 供提取使用^[8]。

2.4.2 提取方法 (1)冷甲醇提取法 在含有菌体的离心管中加入 5 mL 50% 甲醇溶液, 漩涡混匀后, 放入液氮罐 3 min, 取出, 冰上解冻 5 min, 漩涡混合, 再重复上述液氮冻融过程二次, 在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。(2)热乙醇提取法 参照文献[9], 在含有菌体的离心管中加入 5 mL 完全沸腾的乙醇, 在 90 ℃下保持 10 min, 在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。(3)甲醇/氯仿提取法 在含有菌体的离心管中加入 5 mL 新配制的甲醇/氯仿溶液(2: 1, V/V), 经过液氮冻融 3 次后, 加入 0.5 mL 0.5 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 甘氨酸缓冲液, 充分混合, 静置分层, 取上层甲醇溶液至另一个离心管并放置在冰上, 在氯仿层中再加入 0.5 mL 0.5 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 甘氨酸缓冲液, 混合后静置分层, 取上层溶液与前面的上层溶液混合, 在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。(4)热甲醇提取法 参考文献[10], 并适当改进。在含有菌体的离心管中加入 5 mL 甲醇/水溶液(2: 1, V/V), 快速混合, 离心管在 70 ℃水浴中放置 30 min 后, 在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。(5)高氯酸提取法 在含有菌体的离心管中加入 5 mL 高氯酸(0.5 mol/L, 4 ℃), 快速混合后在冰上放置 10 min, 在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液立即用 1 mol/L KOH 中和至 pH 7.4 左右, 放置冰上 15 min, 使 KClO₄ 沉淀, 再在 4 ℃以 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。

2.5 不同提取方法的相对提取率及其重复性

高氯酸提取法是酶联免疫法和高效液相色谱法定量测定代谢物常用的提取方法^[4], 本实验选取高氯酸提取法作为“对照”, 其它提取方法得到的代谢物的峰面积与高氯酸提取法得到的代谢物的峰面积之比作为相对提取率, 以比较不同方法的提取效果。为验证方法的重复性, 每个样品进样 3 次, 每个提取方法做 3 个平行样, 分别计算重复进样和平行样的相对标准偏差(RSD)。

2.6 冷甲醇法提取条件下的检测线性及其检出限

为了评估提取溶剂的基体效应对所要分析的代谢物离子化效率的影响, 在冷甲醇法提取溶剂中加入一系列已知浓度的代谢物标样, 按照 2.3 节所述的色谱与质谱条件进行检测, 以测得的各代谢物的峰面积对相应浓度作回归曲线, 并得到各代谢物的线性方程、相关系数及线性范围; 以定量离子对 3 倍信噪比(S/N) 的响应值对应的样品浓度作为检出限(LOD)。

3 结果与讨论

3.1 色谱/质谱条件的优化

混合标准溶液检测结果表明, 在负离子模式下, 以乙腈-水作为流动相时, 加入乙酸铵有利于代谢物的去质子化。对于质谱条件, 去簇电压(DP)和碰撞能(CE)是影响代谢物离子化和母离子、子离子质谱响应的主要因素, 故首先利用质谱仪的自动优化功能对每种代谢物的去簇电压和碰撞能分别进行优化, 再进一步优化帘气和碰撞气流量、离子源温度等参数, 从而使各离子对的响应及信噪比达到较佳值。图 1 为部分比较有代表性且在代谢组分析研究中具有重要作用的代谢物的色谱图。

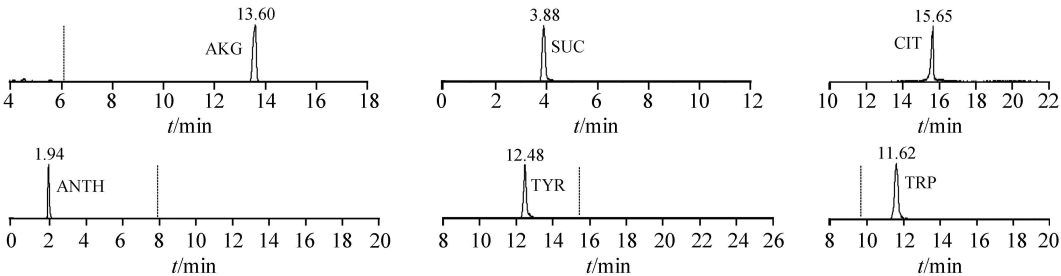


图 1 部分代谢物的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of some metabolites

3.2 不同方法提取效果的比较

比较了 5 种提取方法的提取效果, 除 PEP 与高氯酸法所得到的相对提取率相差较小外, 对于磷酸化糖和磷酸化有机酸, 冷甲醇法所得到的相对提取率最高, 这与文献[11] 提取酵母胞内代谢产物的 6 种方法的结果相符。高氯酸法提取率低的原因是某些化合物在强酸条件下的分解, 以及为中和高氯酸所产生的 $KClO_4$ 对胞内代谢产物的吸附所致。对于有机酸, 所有提取方法得到的相对提取率均高于高氯酸法。除 CIT 外, 冷甲醇法对其它有机酸的提取效果均优于另外 4 种方法。

对于氨基酸类代谢物, 除 SER 外, 冷甲醇法所得到的相对提取率明显高于其它方法。甲醇/ 氯仿法与其它 3 种方法相比, 相对提取率略低, 这与氯仿极性较弱, 而 GLN, ASP 和 ASN 属于极性氨基酸, 其在氯仿中的溶解度较小有关。

3.3 进样和提取方法的重复性

3 次重复进样的数据显示, 对于磷酸化糖和磷酸化有机酸, 热甲醇法的重复性是最差的; 对于有机酸, 冷甲醇法重复性最好。对于氨基酸, 重复进样的平均 RSD 从大到小依次为热乙醇法> 热甲醇法> 高氯酸法> 甲醇/ 氯仿法> 冷甲醇法。考虑到所有类型的代谢产物, 可以得到具有最低 RSD 的提取方法是冷甲醇法和甲醇/ 氯仿法(平均 RSD 均小于 5%), 平均 RSD 最高的提取方法是热甲醇法(9. 75%)。

其次, 按照 2. 5 节考察提取方法的重复性。结果显示, 对于磷酸化糖和磷酸化有机酸, 平均 RSD 从大到小排列依次为: 高氯酸法> 甲醇/ 氯仿法> 热乙醇法> 热甲醇法> 冷甲醇法。对有机酸和氨基酸, 同样是冷甲醇法的重复性最好, 分别为 3. 54% 和 2. 67%; 重复性最差的为甲醇/ 氯仿法, 其对有机酸和氨基酸的平均 RSD 分别为 19. 68% 和 12. 98% 。

3.4 冷甲醇法的基体效应及质谱响应线性

按 2. 6 节的方法进行实验, 得出的 24 种胞内代谢物的标准曲线方程、相关系数、线性范围和检出限如表 2 所示。结果表明, 24 种代谢物的峰面积(y) 与进样浓度(x , nmol/L) 之间线性关系较好, 线性范围

表 2 24 种代谢物的线性方程、相关系数、线性范围及检出限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients (r), linear ranges and LODs of 24 metabolites

代谢物 Metabolites	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (nmol/L)	检出限 LOD (nmol/L)
葡萄糖 6 磷 G6P	$y = 6694.9x - 925.6$	0.9988	0.52~ 104	0.36
果糖 6 磷酸 F6P	$y = 6336.2x - 842.6$	0.9942	0.40~ 80	0.28
果糖 1, 6 二 FBP	$y = 6303.6x + 423.3$	0.9914	0.44~ 88	0.30
赤藓糖 4 磷酸 E4P	$y = 3262.3x + 139.2$	0.9997	0.50~ 100	0.32
甘油醛 3 磷 GAP	$y = 1020.5x - 363.2$	0.9986	0.50~ 100	0.34
2/3 磷酸甘 2/3PG	$y = 2483.1x + 397.1$	0.9956	0.40~ 80	0.32
磷酸二羟丙酮 DHAP	$y = 635.7x + 331.5$	0.9943	0.50~ 100	0.25
磷酸烯醇式丙酮酸 PEP	$y = 1590.9x + 478.3$	0.9975	0.40~ 80	0.20
草酰乙酸 OXA	$y = 18134.2x + 4786.2$	0.9949	0.40~ 50	0.20
2 酮戊二酸 AKG	$y = 12839.2x + 3761.5$	0.9967	0.20~ 50	0.10
琥珀酸 SUC	$y = 215801.8x + 7124.6$	0.9945	0.20~ 100	0.10
富马酸 FU M	$y = 98815.8x + 102.3$	0.9928	0.20~ 80	0.10
苹果酸 MAL	$y = 13847.0x + 3904.9$	0.9982	0.50~ 800	0.30
柠檬酸 CIT	$y = 10337.3x + 2061.1$	0.9963	0.50~ 100	0.25
邻氨基苯甲酸 ANTH	$y = 175427.1x + 38046.3$	0.9998	0.10~ 80	0.05
莽草酸 SHIK	$y = 47780.4x + 16167.8$	0.9986	0.30~ 100	0.14
丝氨酸 SER	$y = 10598.28x + 4139.5$	0.9995	0.20~ 100	0.10
谷氨酰胺 GLN	$y = 3015.5x + 2475.4$	0.9925	0.50~ 80	0.24
天门冬氨酸 ASP	$y = 5802.8x - 485.8$	0.9946	0.20~ 100	0.10
酪氨酸 TYR	$y = 38054.8x + 5354.6$	0.9962	0.20~ 80	0.10
天门冬酰胺 ASN	$y = 9919.8x + 1322.3$	0.9934	0.50~ 100	0.22
苯丙氨酸 PHEN	$y = 141641.3x + 5294.5$	0.9969	0.10~ 80	0.05
色氨酸 TRP	$y = 85239.4x - 2574.5$	0.9993	0.10~ 80	0.06
谷氨酸 GLU	$y = 11737.9x - 796.5$	0.9929	0.50~ 40	0.30

较宽,同时也说明了冷甲醇提取法在提取过程中所使用的提取溶剂基体效应并不明显,基本上不影响代谢物的定量检测。本方法的检出限为 0.05~ 0.36 mmol/L。

3.5 实际样品的分析

在同样的条件下,分别对 tnaA 和 pheA 基因敲除前后的 *E. coli* BW25113 进行发酵培养(tnaA 指导色氨酸分解所需要的酶的合成, pheA 基因指导苯丙氨酸合成所需要的酶的合成),按照 2.4.1 和 2.4.2 节的发酵液的淬灭、洗涤方法和冷甲醇提取法进行样品处理,在 2.3 节的色谱-质谱条件下进行检测,每个样品做 3 个平行样,以外标法测得 24 种胞内代谢物的浓度如表 3 所示。从表 4 中色氨酸 (TRP) 的浓度可以看出,tnaA 基因的敲除减少了胞内合成的色氨酸的分解,所以相对于样品 1,样品 2 中的色氨酸浓度明显升高(从 34.60 mmol/L 上升至 47.71 mmol/L),同样, pheA 基因的敲除,减少了副产物苯丙氨酸(PHEN)和酪氨酸(TYR)的合成,从而有利于目标终产物色氨酸(TRP)的积累,对比样品 3 与样品 1 中的 PHEN 和 TYR 的浓度可见,二者均明显降低,而 TRP 的浓度相应得到提高。如果将得到的尽可能多的胞内代谢物的浓度等数据与本实验所研究的大肠杆菌代谢网络结合起来,便可以进行大肠杆菌的胞内代谢流分析(Metabolic flux analysis, MFA),为产色氨酸大肠杆菌进一步的基因改造指明方向,同时可以验证基因改造后的其胞内代谢通量是否发生改变,使胞内物质代谢尽可能的流向合成目标代谢终产物 TRP 的方向,这将为最终提高 TRP 的产量提供较大的引导作用。

表 3 实际样品中代谢物的分析结果

Table 3 Analysis results of metabolites in real samples

代谢物 Metabolites	代谢物平均浓度 Average concentration of metabolites (nmol/L, n= 3)			代谢物 Metabolites	代谢物平均浓度 Average concentration of metabolites (nmol/L, n= 3)		
	1	2	3		1	2	3
葡萄糖-6 磷 G6P	5.66	6.54	6.33	苹果酸 MAL	3.98	4.21	4.66
果糖-6 磷酸 F6P	4.87	5.35	5.78	柠檬酸 CIT	5.68	6.42	5.97
果糖-1,6 二 FBP	4.57	6.01	5.54	邻氨基苯甲酸 ANTH	18.29	14.71	24.81
赤藓糖-4 磷酸 E4P	2.21	2.76	2.45	莽草酸 SHIK	31.93	29.27	33.96
甘油醛-3 磷 GAP	8.56	8.96	8.67	丝氨酸 SER	7.35	8.34	7.53
2/3 磷酸甘 2/3PG	5.68	6.45	7.46	谷氨酰胺 GLN	1.20	1.27	1.42
磷酸二羟丙酮 DHAP	4.56	4.88	4.97	天门冬氨酸 ASP	1.47	1.76	1.54
磷酸烯醇式丙酮酸 PEP	4.77	4.93	5.45	酪氨酸 TYR	31.42	34.15	23.28
草酰乙酸 OXA	3.56	4.10	4.17	天门冬酰胺 ASN	2.32	2.45	2.54
2-酮戊二酸 AKG	4.11	3.99	4.37	苯丙氨酸 PHEN	24.42	26.70	18.73
琥珀酸 SUC	3.18	3.84	5.23	色氨酸 TRP	34.60	47.71	43.17
富马酸 FUM	3.82	4.69	5.25	谷氨酸 GLU	1.96	1.98	1.27

4 结 论

与热乙醇法、甲醇/氯仿法、热甲醇法和高氯酸法相比,冷甲醇法相对提取率高、重复性好(重复进样和提取方法平均 RSD 均低于 5%),适用于 *E. coli* 代谢产物的提取和进一步的 LG-MS/MS 分析。以冷甲醇法的提取溶剂配制系列不同浓度的代谢物标样测定的结果表明,本方法的代谢物检测线性较好,线性范围较宽,提取溶剂的基体效应对代谢物的定量分析影响较小。本方法的检出限为 0.05~ 0.36 mmol/L。

References

1 Linton J C, Nicholson J K, Elaine H. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Oxford: Elsevier, **2007**: 150~ 151

2 Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1147(2): 153~ 164

3 Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. *Mass Spectrom. Rev.*, **2007**, 26(1): 51~ 78

4 Maharjan R P, Ferenci T. *Anal. Biochem.*, **2003**, 313(1): 145~ 154

5 Faijes M, Mars A E, Smid E J. *Microbial Cell Factories*, **2007**, 6(27): 1~ 23

- 6 Lange H C, Eman M, van Zuijlen G, Visser D, van Dam J C, Frank J, Teixeira de Mat tos M J, Heijnen J. *J. Bio-technol. Bioeng.*, **2001**, 75(4): 406~ 415
- 7 Winder C L, Dunn W B, Schuler S, Broadhurst D, Jarvis R, Stephens G M, Goodacre R. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(1): 2939~ 2948
- 8 Villas Boas S G, Bruheim P. *Anal. Biochem.*, **2007**, 370(1): 87~ 97
- 9 Tweeddale H, Notley McRobb L, Ferenci T. *J. Bacteriol.*, **1998**, 180(19): 5109~ 5116
- 10 Shryock J C, Rubio R, Berne R M. *Anal. Biochem.*, **1986**, 159(1): 73~ 81
- 11 Villas Boas S G, Hojer Pederson J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. *Yeast*, **2005**, 22(14): 1155~ 1169
- 12 Chen S C, Brown P R, Rosie D M. *J. Chromatogr. A*, **1977**, 15(6): 218~ 221

Comparison of Extraction Methods for *E. coli* Metabolome Analysis Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

MEI Hui^{1,2}, DAI Jun^{* 1}, LIU Weir Wei³, LING Xia³, ZHU Peng Fei³, ZHAO Zhi Jun¹

¹(Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

²(Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

³(Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214002)

Abstract Five extraction method for *E. coli* metabolome analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were compared. After being quenched and washed, three replications of the same sample were extracted using the following solvent system: cold methanol, hot ethanol, methanol/chloroform, perchloric acid, and hot methanol, each sample injection repeated 3 times. The results showed that the cold methanol extraction method obtained the highest rate of relative recovery with the best reproducibility (RSD< 5%). Considering relative yield and reproducibility, the five extraction starting from favorably to poor were: cold methanol> ethanol/chloroform> perchloric acid> hot ethanol> hot methanol. In addition, targeted metabolites series of different concentrations were added to the cold methanol solvent, and the results indicated that the linearity of 24 metabolites was good with the linear ranges wide, and the extraction media have little matrix effect on the quantification of metabolites. The limit of detection (LOD) was 0.05– 0.36 nmol/L.

Keywords Metabolome analysis; Liquid chromatography tandem mass spectrometry; Extraction methods; *Escherichia coli*

(Received 20 July 2010; accepted 29 October 2010)

《中药红外光谱分析与鉴定》

中药是成分复杂的混合物,其分析研究与质量控制一直是科研和实践领域的重大难题。该书阐述了“中药红外光谱宏观指纹分析法”的理论基础与应用实例,提出了将红外光谱用于中药分析与质量控制的方法与特点优势。全书共 9 章,前两章提出了红外光谱法用于混合物分析的基本理论和方法,以及将红外光谱法用于中药质量控制的方法优势,并对混合物红外光谱解析所需的一些化学计量学方法做了简单介绍。第 3 章至第 9 章,用具体的研究实例说明红外光谱法在中药材、中药饮片和中药制剂等领域的研究应用,包括中药成分分析、炮制机理分析,以及中药提取物、中药配方颗粒和中药制剂的分析。

该书重在实践,可供化学和药学等相关专业的师生、中医药领域的科研人员及中药生产企业的管理和检验人员参考。

该书由孙素琴、周群、陈建波著,化学工业出版社于 2010 年 6 月出版,定价 78.00 元。