

应用TripleTOF® 5600高分辨质谱系统准确鉴定民族药虎杖中化学成分

The Application of TripleTOF® 5600 System for Identification of Chemical Components in Polygonum Cuspidatum

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

SCIEX 亚太应用支持中心, 中国

Key word: Polygonum Cuspidatum, TripleTOF® 5600, Traditional Chinese Medicine, Flavonoids, Polyphenols, MasterView™

引言

虎杖药材为蓼科蓼属多年生草本植物虎杖 (Polygonum cuspidatum Sieb.) 的根茎, 主要产于中国陕西、甘肃、四川等地, 在华中、华南和华东地区也广泛分布。虎杖是一种常用中药, 中医认为其根茎有活血、散瘀、通经、镇咳等功效^[1]。虎杖的药理作用主要是由于其含有大量酚类化合物, 包括黄酮类、蒽醌类及二苯乙烯类^[2]。

由于中药天然产物成分复杂、种类繁多, 因此鉴定和分析其有效成分将面临着巨大的挑战, 而民族药作为中药的一个重要分支与其具有共同特点。如何快速准确的鉴定出中药中众多复杂的化学成分也是目前中药分析的一大难点。

本方案采用SCIEX TripleTOF® 5600高分辨系统进行数据采集, 一次数据采集同时获得成分一级和二级离子信息。数据采用MasterView™ 软件进行处理: 结合中药MS/MS高分辨质谱数据库 (TCM MS/MS Library) 和在线ChemSpider数据库大大提高数据处理效率, 该方案特点如下:

1. 由于TripleTOF® 5600超快的扫描速度, 结合SCIEX专利的实时动态背景扣除 (DBS) 功能, 能够实现一针进样, 同时采集复杂样品中有效的高分辨一级和高分辨二级信息, 无需二次进样, 为实验人员节省时间, 降低成本, 提高效率。
2. MasterView™软件结合高分辨中药二级标准谱库, 可快速进行谱库的匹配保证鉴定的结果快速、准确。中药MS/MS高分辨质谱数据库是基于《中国药典》中药材的有效成分建立, 其中包含1300种化合物的标准二级谱图信息。
3. MasterView™软件自动链接到在线ChemSpider数据库进行结构

检索, 并应用软件中Fragment Panes功能完成二级碎片解析, 确认结构; 进一步推测出同类型化合物的结构信息, 为新化合物的发现提供助力, 同时简化了实验人员结构解析的流程。

实验思路:

1. 采用最简便的前处理方法: 虎杖药材超声提取后离心并稀释进样, 该操作简便易实现。
2. 采用最全面的数据采集模式: TOF MS-IDA-TOF MS/MS模式进行数据采集, 可在一针进样同时获得高分辨的一级和二级质谱图, 为成分鉴定提供良好的数据基础。
3. 采用最准确、快速的处理流程: MasterView™结合中药MS/MS高分辨质谱数据库进行靶向多目标筛查流程; MasterView™ 链接在线ChemSpider数据库进行非靶向完全未知成分鉴定; 两种处理模式相互结合, 保证鉴定到中药提取液中的最全面的化学成分。

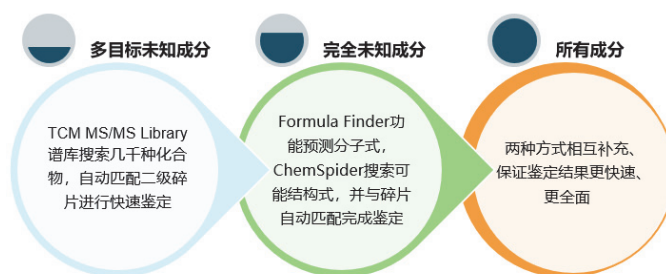


图1 中药提取液中多目标未知成分及完全未知成分鉴定思路

样品收集及前处理

样品来源: 北京国医堂中医院

前处理方法:

- ### 液相条件

梯度:

Time(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
5	95	5
25	5	95
27	5	95
27.1	95	5
30	95	5

质谱条件

CE能量: 40 ± 15 V/ -40 ± 15 V

采集的数据离子流图

BPC from POS-MEDH-1.will (sample 1) - POS-MEDH-1, Experiment 1, -TOF MS (100 - 1300)

正离子模式 BPC图

TOF MS/MS

Spectrum from POS-MEDH-1.will (sample 1) - PO...ent 2, -TOF MS² (50 - 1300) from 13.567 min
Precursor: 409.1 Da, CE: 40.0

BPC from NEG-MEDH-1.will (sample 1) - NEG-MEDH-1, Experiment 1, -TOF MS (100 - 1300)

负离子模式 BPC图

TOF MS/MS

Spectrum from NEG-MEDH-1.will (sample 1) - NE...ent 2, -TOF MS² (50 - 1300) from 9.903 min
Precursor: 435.1 Da

图2. TOF MS-IDA-TOF MS MS方式采集得到的正离子模式和负离子模式数据。

中药成分鉴定流程及鉴定结果

1.多目标未知物鉴定流程

1.1 中药MS/MS高分辨质谱数据库导入

1.2 文献搜索到的可能列表导入

可直接将查询到的化合物名称及分子式导入到MasterView™ 中进行峰提取，同时可在中药MS/MS高分辨质谱数据库匹配时选择模糊的二级匹配模式(二级匹配时不考虑母离子匹配，只看碎片匹配情况)，目的是找到与二级谱库中结构类似的化合物。如下图

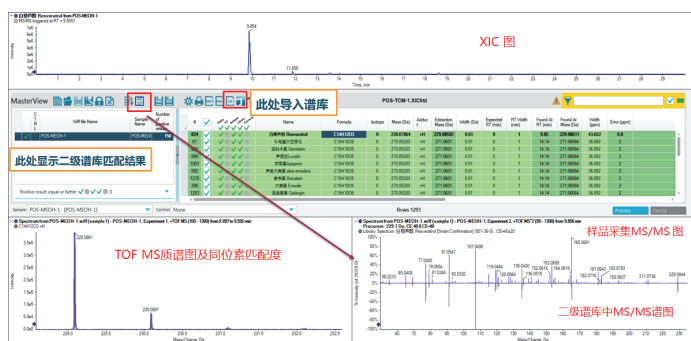


图3. MasterView™进行中药二级谱库搜索结果展示。

1中的m/z 731.1616, 二级谱库匹配到原花青素B2 (Procyanidin B2) m/z 579.1140, 根据二级匹配情况及两者的质量偏差152推测m/z 731.1616为原花青素B2没食子酸酯, 与文献报道一致。图2中的m/z 453.1649, 二级谱库匹配到表儿茶素 (Epicatechin) m/z 291.0856, 根据二级谱图匹配情况以及162的中性丢失推测为表儿茶素葡萄糖苷(Epicatechin 5-O-beta-D-glucopyranoside), 与文献报道一致。

1.3多目标未知物鉴定结果：

采用与中药MS/MS高分辨质谱数据库比对的方式在虎杖提取

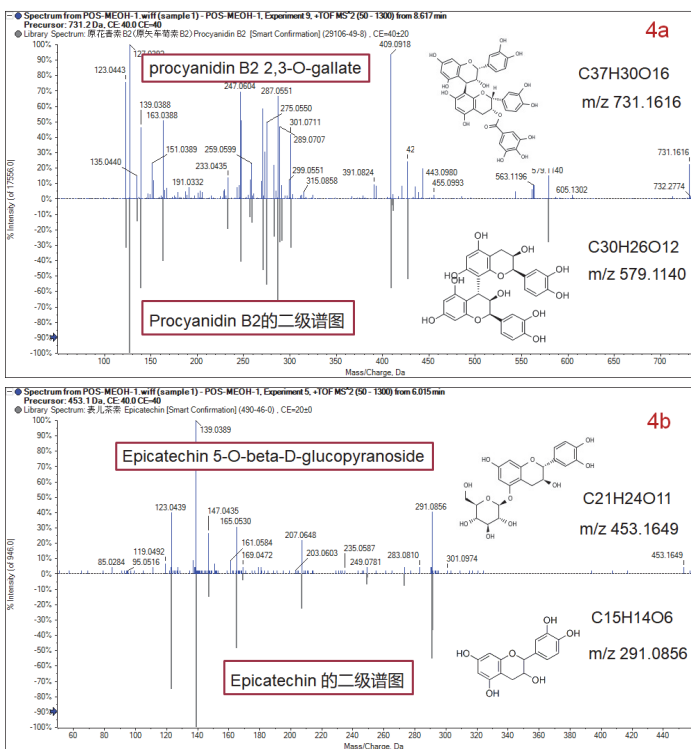


图4a&4b. 参考中药二级谱库进行同类化合物鉴定举例。

液中快速准确的鉴定到140种化合物, 其中有大量的多酚类化合物 (83种), 包括黄酮类, 蒽醌类, 二苯乙烯类以及黄酮苷类与文献报道一致。同时也有多种有机酸类, 生物碱类, 氨基酸以及联苯环辛烯类化合物。部分鉴定到的化合物信息如下表1:

2. 完全未知成分鉴定

完全未知成分的鉴定通过MasterView™软件内置的峰提取和Formula Finder功能进行分子式预测, 并结合在线ChemSpider数据库检索其可能结构。应用Fragment Panes功能完成结构解析和快速鉴定工作。该方式也可以结合二级谱库的模糊匹配方式(二级匹配时不考虑母离子匹配, 只看碎片匹配情况)进行快速分类再鉴定。

如下图5a中MasterView™软件自动进行峰提取并预测分子式, 同时根据采集的二级碎片信息与中药二级谱库的模糊匹配情况给出该化合物相似的结构供参考如下图中阿魏酸类似的结构。图5b中软件自动链接到在线ChemSpider数据库进行化合物结构搜索, 同时给出二级碎片的裂解匹配度。两者结合实现完全未知化合物的快速准确鉴定。

通过非靶向未知成分鉴定方式从虎杖提取液中鉴定到118种化学组分, 其中包含大量黄酮及其苷类例如儿茶素、大黄素、白藜芦醇及决明酮的结构类似物, 由于篇幅有限不再展示鉴定列表。

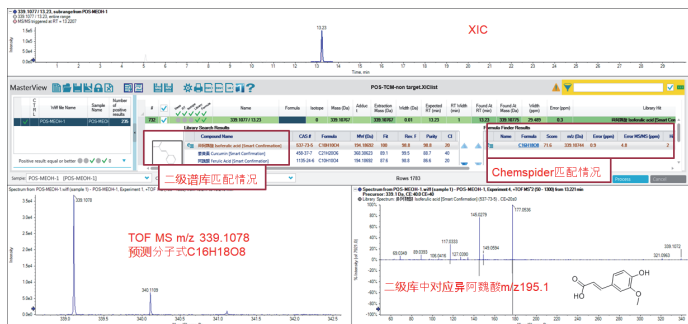


图5a. 完全未知成分鉴定结果列表展示。

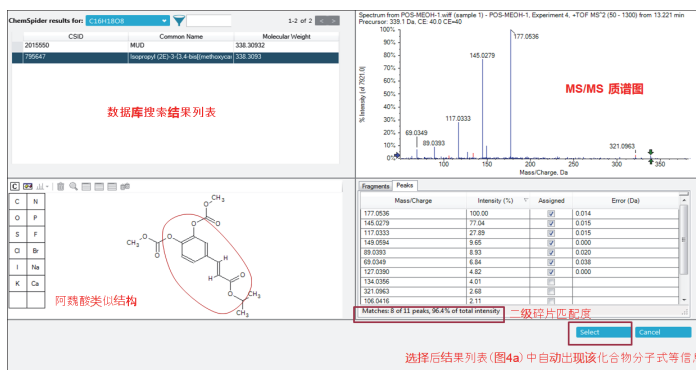


图5b. 完全未知成分连接ChemSpider给出鉴定化合物结构式。

表1. 虎杖提取液中鉴定到的部分成分列表。

Name	RT (min)	Formula	Adduct	Found At Mass (Da)	Mass Error (ppm)	Intensity
Resveratrol	9.85	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	+H	229.0861	0.8	7055761
6-Hydroxydaidzein	14.14	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+H	271.0606	2.0	5363137
aloe-emodin	14.34	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+H	271.0606	2.0	5363137
Decursinol	13.58	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	+H	247.0967	0.9	5033196
Emodin-8-glucoside	14.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-H	431.0984	0.0	4773886
Piceid 1	9.90	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	-H	389.1240	1.0	4518336
Torachryson-8-O-β-D-glucopyranoside	11.45	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	+H	409.1494	0.3	3366206
Torachryson-8-O-β-D-glucopyranoside 1	13.58	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	+H	409.1494	0.3	3366042
catechin gallate	9.86	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	-H	441.0824	-0.7	2946265
Polydatin	9.86	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	+H	391.1390	0.6	2339602
Emodin 1	12.36	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+H	271.0604	1.1	2187663
Catechin isomer	7.44	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-H	289.0720	0.8	1735436
Epicatechin gallate	9.80	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	+H	443.0977	1.0	1251321
apigenin-5-O-methyl ether	16.22	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+H	285.0760	0.7	1215615
Catechin	8.49	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	+H	291.0865	0.6	1061951
Apigenin 7-sulfate	16.18	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	-H	349.0026	2.3	1034619
Polydatin (isomer 1)	9.02	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	+H	391.1391	0.9	847703
Liquiritin	10.75	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	+H	419.1335	-0.4	768788
Luteoloside1	10.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-H	447.0937	0.9	638927
Hydroxygenkwanin	11.36	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	+H	301.0708	0.4	165432
Emodin 2	13.48	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+H	271.0602	0.3	141517
Emodin 4	15.89	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+H	271.0602	0.4	124372
Emodin Dianthrone	21.15	C ₃₀ H ₂₂ O ₈	-H	509.1249	1.4	446610
Catechin Glucoside	6.71	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	-H	451.1239	-1.5	223729
Procyanidin B1	6.77	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	-H	577.1352	1.0	615873
Procyanidin B2	6.73	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	+H	579.1495	-0.5	593487
Glycetein 2	15.10	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+H	285.0760	0.8	563424
Physcion	16.25	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-H	283.0616	1.4	548004
Glycetein 5	16.00	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-H	283.0616	1.4	548004
Resveratrol	11.86	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	+H	229.0857	-1.0	535605
(+)-Arginine	0.85	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	+H	175.1190	0.0	609372
L-Tryptophan	5.87	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-H	203.0828	0.8	59120
Phenprobamate	3.62	C ₉ H ₁₁ NO ₂	+H	166.0863	0.0	15398
Schisandrin C	22.72	C ₂₂ H ₂₄ O ₆	+H	385.1648	0.7	23838
Schisandrin B	22.43	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	+H	401.1959	0.1	221306
Schisandrin A	21.82	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	+H	417.2269	-0.5	65888
Gomisin N	22.43	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	+H	401.1959	0.1	221306
Linoleic acid	24.58	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-H	279.2334	1.6	482476
protocatechuic acid	5.50	C ₇ H ₆ O ₄	-H	153.0196	1.7	31351

总结

本实验应用SCIEX TripleTOF® 5600高分辨液质联用系统进行数据采集,采用MasterView™软件结合中药二级谱库和ChemSpider在线数据库进行数据处理,共从虎杖提取液中鉴定到258种化合物,其中包含黄酮类106种,糖苷类90种,有机酸类21种以及环烯醚萜类10种,以及其他化合物31种,详细化合物信息请联系SCIEX公司。本实验展现了SCIEX高分辨系统在中药成分鉴定领域的优势,一次进样获得大量高分辨的TOF MS和TOF MS/MS数据,通过多目标未知成分及完全未知成分两种方式快速、全面鉴定到虎杖提取液中主要成分。结果表明SCIEX高分辨液质联用系统能够为用户的中药成分鉴定研究提供强有力的数据支持,同时SCIEX公司能够为客户提供高效、快捷、一体化的中药鉴定解决方案。

参考文献

- [1]. 中国药典. 一部. 2000.167
- [2]. Peng, W.; Qin, R.; Li, X.; Zhou, H. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: A review. J. Ethnopharmacol. 2013, 148, 729-745.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9759-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808 1388
传真: 010-5808 1390
全国免费垂询电话: 800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址: 上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333
网址: www.sciex.com.cn

广州分公司
地址: 广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835
微博: @SCIEX