

应用TripleTOF[®] 5600高分辨质谱系统鉴定藏药红景天中化学成分

Application of TripleTOF[®] 5600 System in the Identification of Components of Tibetan Drug *Rhodiola rosea* L.

陈金梅 (Chen Jinmei), 司丹丹 (Si Dandan), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)
SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国
SCIEX, APAC Support Center, China

Key word: TripleTOF[®] 5600, Tibetan Drug, Ethnic Medicine, *Rhodiola rosea* L., Identification of Components

前言

我国民族众多, 在数千年的文明发展中, 各民族医药也随之发展, 除了汉民族的中医药外, 其他如苗、蒙、藏族等少数民族也发展出灿烂的医药文化。藏药是在广泛吸收、融合了中医学, 印度医药学和大食医药学等理论的基础上, 通过长期实践所形成的独特的医药体系, 迄今已有上千年的历史, 是我国较为完整、较有影响的民族药之一^[1]。

红景天为藏族名贵药材, 又名“扫罗玛尔布”, 以景天科植物全瓣红景天的根或根状茎入药。多生长于海拔2000~5600米高山草甸的沟谷边、河滩草丛中, 红景天药用历史悠久, 素有“黄金人参”, “神仙草”之称, 因红景天生长环境非常特殊, 在自然选择长期作用下, 遗传方面使其形成独特的生命活动机制与生物活性成分。红景天具有抗缺氧、抗疲劳、抗衰老、抗抑郁症、

调节神经系统、提高免疫功能、抗微波辐射等作用^[2]。近年来, 我国的药学工作者对红景天进行了深入的研究, 指出红景天具有类似人参“扶正固本”的“适应原样”作用, 而且某些方面还优于人参, 无人参兴奋作用过强的不足, 具有很高的临床应用价值。

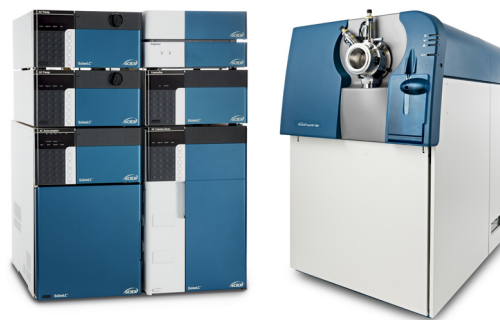
化学成分是药材发挥药效作用的基础, 目前红景天属植物的化学成分主要有苷类、黄酮类、挥发油等, 红景天不仅化学成分颇丰, 并且具有多种药理学活性, 毒理学研究也证明长期服用无不良反应^[3]。为进一步研究和开发利用此药材, 本文提供了快速发现并准确鉴定红景天化学成分的工作流程, 为民族药的质量评价和药效物质基础研究提供思路。

样品前处理

将中医院购买得到的红景天药材粉碎, 精确称量约0.5 g, 加入20 mL甲醇: 水 (75:25) 超声提取30 min, 10000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液进样分析。

仪器设备

SCIEX ExionLC[™]液相系统 + TripleTOF[®] 5600质谱系统



液相方法

色谱柱: ACQUITY UPLC[®] HSS T3(100×2.1 mm, 1.8 μm)

流动相: A相: 水 (0.1%甲酸)

B相: 甲醇: 乙腈 (1:1)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 °C

进样量: 2 μL

表1. 液相梯度。

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
18.00	95	5
20.00	5	95
22.00	5	95
22.10	95	5
25.00	95	5

质谱方法

离子源：DuoSpray™电喷雾离子源（ESI+/-）

扫描模式：TOF MS-IDA-TOF MS/MS

扫描范围：m/z 100-1200

CDS自动校正

动态背景扣除（DBS）开启

离子源参数：

ISVF电压：±4500 V

气帘气 CUR：25 psi

雾化气 GS1：50 psi

雾化气 GS2：55 psi

源温度：500 °C

DP电压：±80 V

碰撞能量：35 ± 15 V

实验思路：

本实验采用DBS触发的IDA数据采集模式，在排除高背景信号的同时保证获得最全面、有效的高分辨一级和二级质谱信息；数据处理应用MasterView™软件结合SCIEX中药高分辨数据库，分别采用靶向和非靶向流程完成成分分析，化学成分鉴定实验流程图如图1所示。

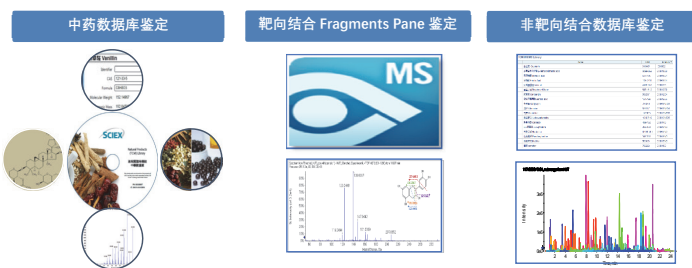


图1. 红景天化学成分鉴定实验流程图。

数据采集

采用上述色谱和质谱条件进行数据采集，通过PeakView®软件浏览数据，正、负离子两种模式的基峰离子流色谱图（BPC）如图2所示。

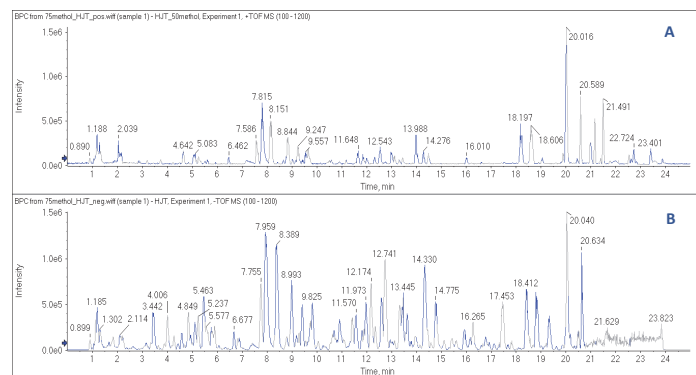


图2. 正、负离子模式下基峰离子流色谱图（BPC）。

A. 正离子模式下的BPC；B. 负离子模式下的BPC

数据处理

中药数据库鉴定流程

SCIEX中药MS/MS高分辨质谱数据库是基于中国药典一部中提到的中药材，包含近1300种中药有效成分的MS/MS图谱（皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、生物碱、三萜类、苯乙醇苷、有机酸、氨基酸等），在MasterView™软件中导入中药MS/MS高分辨质谱数据库化合物列表进行峰提取和数据库匹配，通过质量准确度，保留时间，同位素丰度和二级谱库匹配四个维度给出可靠的鉴定结果，可根据不同需求对结果进行筛选，从而大大节省对分析结果的验证时间，提高数据处理效率。图3以红景天苷为例，展示靶向结合数据库的处理流程，可快速准确的给出鉴定结果。

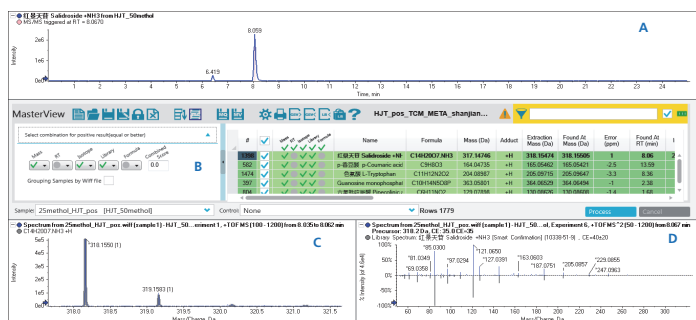


图3. 以红景天苷为例展示中药数据库鉴定流程。

A. 化合物的提取离子流色谱图；B. 快速筛选结果的功能选项；C. 一级质谱图；D. 实测化合物二级谱图与数据库中谱图的镜像对比图

靶向结合Fragments Pane功能数据处理

将天然产物一级库、文献检索^[4,5]和根据结构特点总结的化合物列表导入MasterView™软件中,提取色谱峰,通过质量准确度,同位素丰度初步筛选可能化合物,进一步应用Fragments Pane功能将结构与二级图谱相互关联,完成结构鉴定,从而判断是否为目标化合物,该处理流程能够简便、快速的提取目标List,针对性强,可以缩小鉴定范围。图4和图5以表儿茶素为例展示应用此流程鉴定化合物的过程。

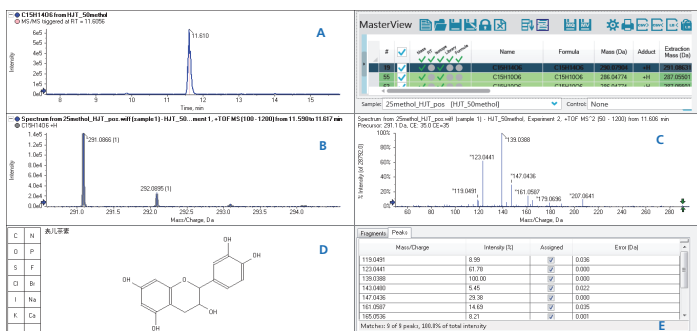


图4. 以表儿茶素为例展示靶向List结合Fragments Pane功能的鉴定流程。A. 化合物的提取离子流色谱图; B. 一级质量数和同位素丰度图; C. 二级质谱图; D. 化合物结构式; E. 理论二级和实测二级的匹配得分列表

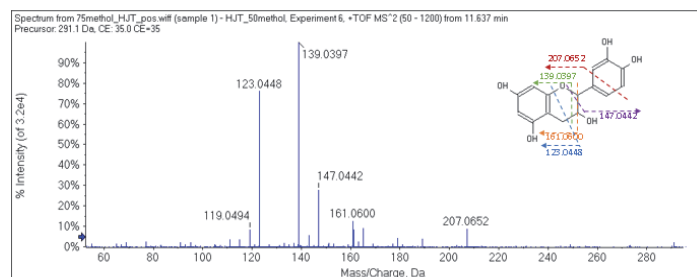


图5. 表儿茶素二级碎片结构解析图谱。

非靶向结合数据库数据处理

使用非靶向方法应用软件自动提取色谱峰,结合中药MS/MS高分辨质谱数据库,快速筛选出与数据库中化合物具有相同或相似碎片离子的化合物,可以更全面对数据进行挖掘,特别是对某一类活性成分进行研究,更具针对性。图6为使用非靶向结合数据库数据处理的参数设置图。

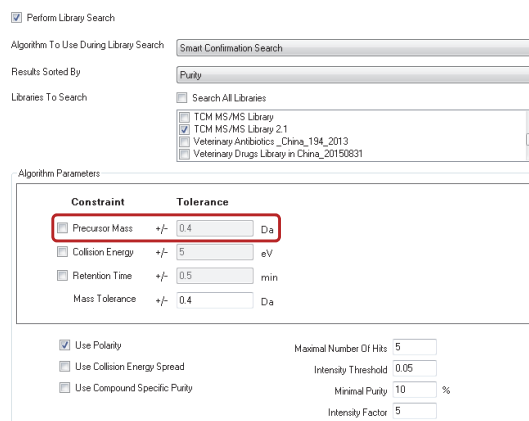


图6. 非靶向结合数据库数据处理参数设置界面。

图7以 m/z 为195.0304, R_t 为10.84的化合物为例,展示利用非靶向结合数据库数据鉴定和确证化合物的过程,可以全面筛查结构类似物或同一类别化合物。图7显示 m/z 为195.0304, R_t 为10.84的化合物数据库中匹配结果是丁香醛,丁香醛的分子式为 $C_9H_{10}O_4$, $[M-H]^-$ 为181.0501, m/z 195.0304比 m/z 181.0501多14,分析未知化合物实测二级碎片和数据库中丁香醛的二级碎片信息,二者二级碎片有很大的相似度,推测该化合物比丁香醛多个甲基,最后确证该化合物为3,4,5-三甲氧基苯甲醛,丁香醛和3,4,5-三甲氧基苯甲醛的结构式如图8所示。

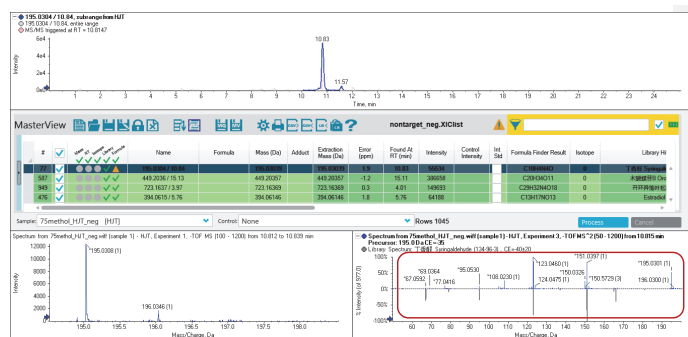


图7. 3,4,5-三甲氧基苯甲醛鉴定图。

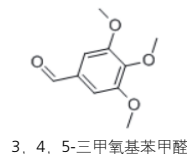
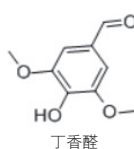


图8. 丁香醛和3,4,5-三甲氧基苯甲醛结构式。

鉴定结果

采用以上三种数据处理流程鉴定藏药红景天的化学成分，正负离子两种模式下共鉴定出253个化合物，其中包括苷类77个，黄酮及其苷类64个，有机酸类15个，氨基酸及其衍生物11个，酚

酸类8个，核苷类7个，糖类6个，其他类65个。鉴定部分结果见表2。

表2. 红景天化学成分部分列表。

No.	Name	m/z	Error(ppm)	Rt(min)	Intensity	Classes
1	Salidroside	345.1194	0.7	8.39	3671566	Glycosides
2	Rhodonin	447.0935	0.5	18.82	2078386	Glycosides
3	6-O-galloyl-salidroside	451.1249	0.8	12.60	1862692	Glycosides
4	Salidroide	318.1550	0.8	8.15	1715847	Glycosides
5	Isomer of Rhodiolside B	493.2294	0.6	20.06	1241412	Glycosides
6	isocitric acid-glucoside	191.0206	-1.2	2.13	581084	Glycosides
7	Afzelin	433.1132	0.7	19.89	491278	Glycosides
8	Gallic Acid-Glucoside	331.0679	-0.8	6.83	442013	Glycosides
9	Epicatechin	289.0721	1.1	11.97	1760861	Flavonoids
10	Rutin	611.1601	-0.9	18.20	1545221	Flavonoid glycosides
14	Catechin	291.0866	1.0	11.65	557350	Flavonoids
15	Naringenin	273.0756	-0.5	13.99	370422	Flavonoids
16	Quercetin	303.0502	0.7	19.05	297140	Flavonoids
17	Aempferol-3-O-rutinoside	595.1660	0.4	19.03	208058	Flavonoid glycosides
18	Citric acid	191.0201	1.8	3.44	1394926	Organic acid
19	Caffeic Acid	341.0884	-1.4	8.55	116116	Organic acid
20	Betaine	118.0862	-0.2	1.17	88204	Organic acid
21	Isomer of L-Tryptophan	205.0968	-1.9	8.43	74099	Amino acid
22	Pyroglutamic acid	130.0500	1.0	3.03	67369	Amino acid
23	GABA	104.0707	0.8	1.34	33038	Amino acid derivatives
24	Adenine	136.0617	-0.7	2.70	30888	Amino acid
25	Pipecolinic acid	130.0862	-0.4	2.17	28967	Amino acid derivatives
26	Epicatechin Gallate	443.0974	0.3	13.99	1094863	Nucleosides
27	Adenosine	268.1043	0.9	4.23	130324	Nucleosides
28	Uridine	243.0624	0.7	3.85	121672	Nucleosides
29	Adenosine monophosphate	346.0553	0.2	3.10	55550	Nucleosides
30	Guanosine	282.0843	-0.2	5.05	21266	Nucleosides
31	Melibiose	341.1090	-0.2	1.30	762136	Carbohydrates
32	Methyl -O-maltotriose	549.1674	-0.7	1.31	141326	Carbohydrates
33	D-(+)-Glucose	179.0562	0.7	1.30	137045	Carbohydrates
34	Mannitol	181.0717	-0.6	1.13	95465	Carbohydrates
35	4-O-(beta-D-glucopyranosyl)-gallic acid	333.0818	0.6	12.54	331258	Phenolic acids
36	Isoferulic acid	193.0507	0.2	14.44	125384	Phenolic acids
37	3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	171.0286	-1.1	12.83	14518	Phenolic acids
38	(-)-Catechin Gallate	441.0831	0.9	14.33	2996762	Other
39	Rhodiolside B	493.2295	0.9	20.07	2026221	Other
40	Litvinolin	449.1082	0.7	18.61	1600078	Other
41	Rhodiolinin	481.1129	0.0	20.98	906257	Other

结论

本实验采用TripleTOF® 5600高分辨质谱系统对藏药红景天化学成分进行鉴定,应用PeakView®和MasterView™软件并结合SCIEX中药MS/MS高分辨质谱数据库快速、准确的鉴定出257个化学成分,为中药成分分析提供了很好的解决方案。

TripleTOF® 5600高分辨质谱系统快速的扫描速度能够保证在有限的时间内采集到全面的有效信息,一针进样同时获得高分辨一级和二级质谱图,强大的动态背景扣除功能保证采集到有效的二级数据,大大提高了我们鉴定结果的准确性。

SCIEX中药MS/MS高分辨质谱数据库包含有近1300种个中药有效成分的MS/MS(皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、生物碱、三萜类、苯乙醇苷、有机酸、氨基酸等),软件自动匹配数据库给出结果,大大缩短了中药成分鉴定的时间,为我们快速发现研究民族药活性成分,民族药的质量评价和药效物质基础研究提供一种有效手段。

参考文献

- [1] Hao DC, Xiao PG, Liu C. Traditional Tibetan medicinal plants: a highlighted resource for novel therapeutic compounds[J]. Future medicinal chemistry. 2018 Nov 30;10(21):2537-55.
- [2] 吕伟彤. 近十年红景天植物化学成分研究概况. 化工设计通讯[J]. 2018;44(3):249-249.
- [3] 杨文婷, 张伟, 杨一丁, 李德爱, 刘峙. 红景天化学成分研究. 首都食品与医药[J]. 2015(22):90-1.
- [4] Han F, Li Y, Ma L, Liu T, Wu Y, Xu R, Song A, Yin R. A rapid and sensitive UHPLC-FT-ICR MS/MS method for identification of chemical constituents in *Rhodiola crenulata* extract, rat plasma and rat brain after oral administration[J]. Talanta. 2016 Nov 1;160:183-93.
- [5] Panossian A, Wikman G, Sarris J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy[J]. Phytomedicine. 2010 Jun 1;17(7):481-93.

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-02-9794-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: 广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室

电话: 020-8510 0200

传真: 020-3876 0835

微博: @SCIEX