[应用纪要]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

分析传统草药的智能化工作流程：超高效液相色谱/(UPLC)结合飞行时间质谱(TOF MS)鉴定化合物

Kate Yu, Jose Castro-Perez, and John Shockcor
沃特世公司，米尔福德，马萨诸塞州，美国

前言

药用植物，包括传统草药(THM)或传统中药，已经被使用了几千年。最近，中草药开始在西方国家流行，并且正在改变人们以前对它的看法。人们开始认识到中草药可作为治疗药物的替代或互补。因此，对中草药满足并保持严格的国际植物学，化学和临床质量标准的要求日益增加。

制药公司非常希望可以鉴定从传统草药中提取的单一生物活性化合物。然而，传统草药的多组分协同作用的特性意味着有必要对复杂提取物进行整体分析。对于每一种草药/中草药生成一张指纹图谱，或轮廓图，从而有助于区分相似的植物，鉴定杂质，或者比较由于收获时间不同等因素而造成的差异。

传统草药样品通常含有几百种甚至上千种化学物质，其含量横跨很宽的浓度范围–所以对它们的分析也是一个极富挑战性的任务。本文中我们介绍了一种智能化工作流程(图1)。这个工作流程使用的是沃特世(Waters®) ACQUITY UPLC® 超高效液相色谱/ SYNAPT™ HDMS™飞行时间(TOF)质谱系统。

UPLC® 是一个集高分辨率，高灵敏度和高速度于一身的现代分离技术。从 SYNAPT HDMS 质谱系统 MS^E 实验产生的数据为预测化学物质的元素组成提供精确质量数信息，而碎片离子数据在没有标样的情况下为结构确认提供信息。这种 UPLC/SYNAPT HDMS 质谱系统的设计使得这类复杂样品的分析更加容易。

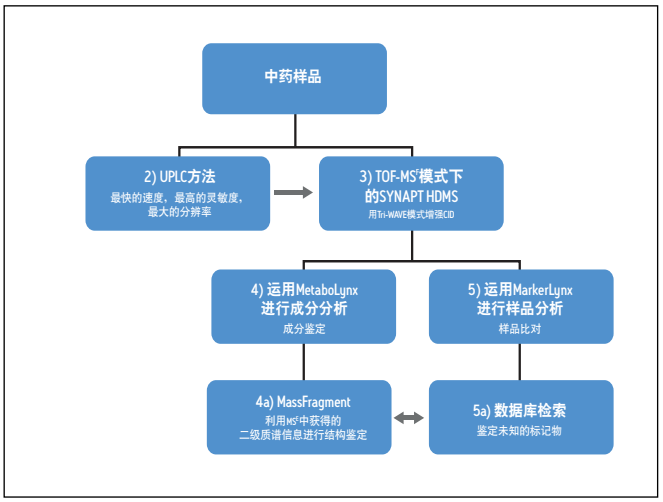

图 1. 分析传统草药工作流程:使用 UPLC 超高效液相色谱和 HDMS 质谱系统(TOF 飞行时间-MS^E)技术。

实验方法

五微升人参精口服液用以上描述的流程进行分析。样品经0.45微米 PTFE 膜过滤且无稀释进样。

液相条件

LC 液相系统:	沃特世 ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC 超高效液相色谱 HSS T3 色谱柱 2.1 x 100 mm, 1.7 µm, 65 °C
流速:	600 µL/min
流动相 A:	水 + 0.1% 甲酸
流动相 B:	甲醇

梯度:

时间	组成	曲线
0 分钟	95% A	
10 分钟	30% A	曲线 6
17 分钟	0% A	曲线 6
20 分钟	95% A	曲线 1

质谱条件

质谱系统:	沃特世 SYNAPT HDMS 质谱系统
离子化模式:	电喷雾负离子
毛细管电压:	3000 伏特
锥孔电压:	35 伏特
除溶剂温度:	450 °C
除溶剂气体:	800 升/小时
离子源温度:	120 °C
采集范围:	50 至 1500 质荷比
碰撞气体:	氩气

数据处理

化合物筛选和鉴定: MetaboLynx™ 应用软件

结构解析: MassFragment™ 软件

结果与讨论

TOF MS^E 实验是通过设定两个扫描功能(低碰撞能扫描和高碰撞能扫描)来实现的。这两个扫描功能是通过一次色谱进样分析完成的。在这一次色谱分析过程中, TOF MS 在两个扫描功能之间实现快速切换从而同时完成两个扫描功能的数据采集。

图 2 出示基峰离子色谱图(BPI)。这两个 BPI 是一次进样同时获得的。下图显示的数据来自低碰撞能量(CE)扫描(下图)上图显示的数据来自高碰撞能量扫描(上图)。

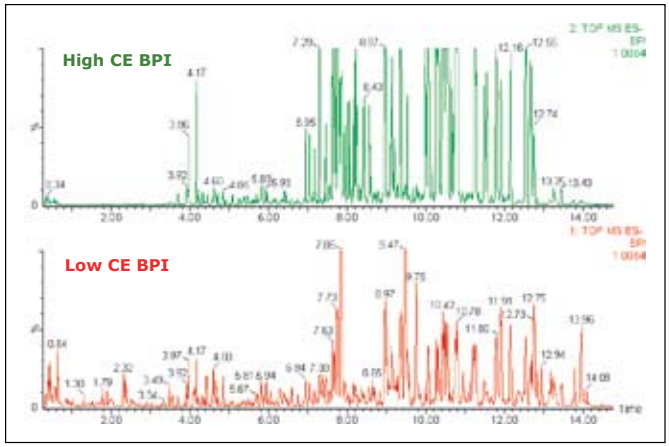

图 2. 人参精口服液的基-峰离子(BPI色谱), 来自一次 UPLC 超高效液相色谱/HDMS 质谱飞行时间TOF-MS^E 模式分析, 高和低碰撞能量(CE)扫描。

低碰撞能量扫描数据提供分子离子信息, 即 $[M+H]^+$ 离子(图 3, 下图), 而高碰撞能量扫描提供碎片离子信息(图 3, 上图)。高低碰撞能量扫描数据的归属分析由软件自动完成。

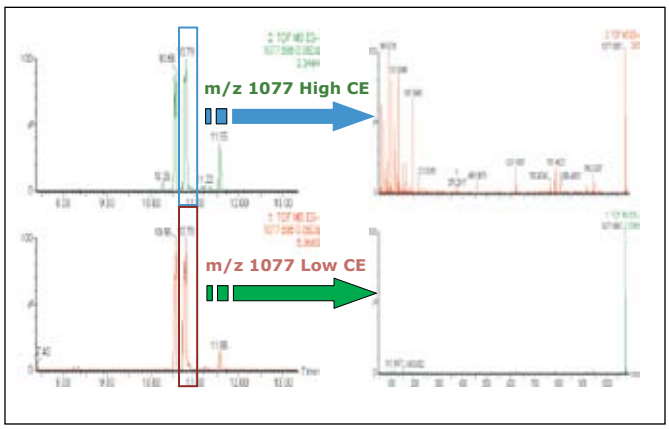

图 3. UPLC 超高效液相色谱/飞行时间 TOF-MS^E 模式实验结果举例。

处理小分子 MS^E 数据的最佳工具是 MetaboLynx , 它是 MassLynx™ 软件的一个应用单元。MetaboLynx 使用 MS^E 低碰撞能量扫描实验结果进行化合物筛选(已知和未知组分)。[3-4]

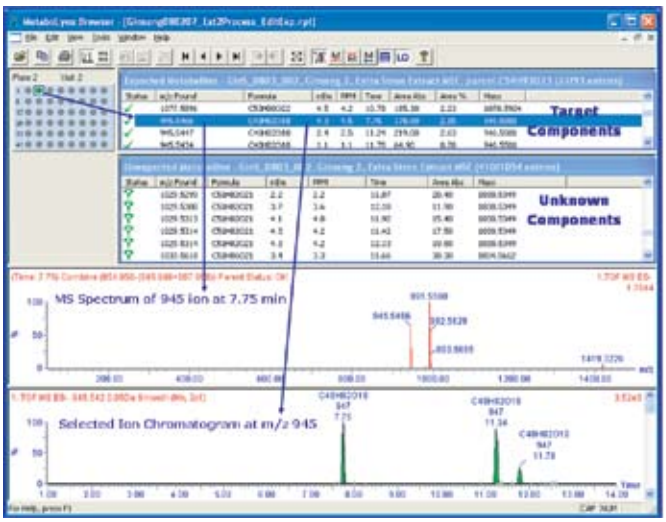

图 4. UPLC 超高效液相色谱/HDMS 质谱系统分析人参精口服液的 MetaboLynx报告。

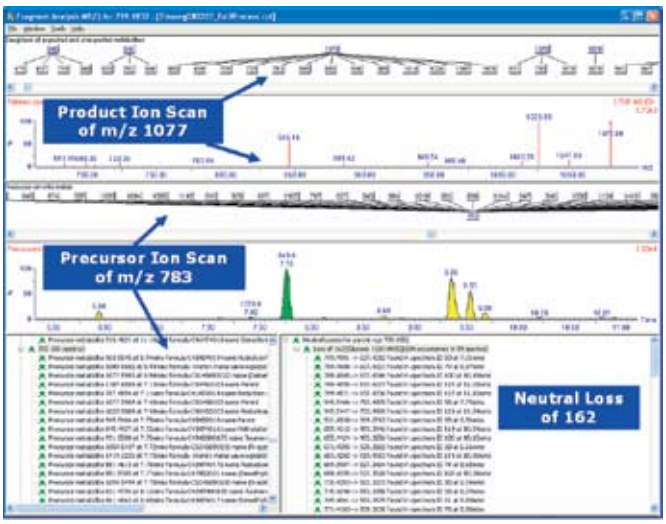

图 5. MassLynx 碎片分析窗口用于 MS^E 数据检查和输入至 MassFragment。

图 4 列出 MetaboLynx 浏览器中捕获的某一界面，显示样品位置，报告鉴定出的预测组分和检测到的未知组分列表。

在分析人参精口服液时检测到四百多种未知的组分。结果中报告了未知组分相应的保留时间，检测到的质荷比，推测的元素组成，以及精确质量误差和积分峰面积。

对已知组分要求结构解析以确认鉴定结果。为此目的，详细检查碎片离子信息是必须的。

MetaboLynx 自动对低碰撞能量和高碰撞能量数据采集过程中的时间偏差进行校正，因此，碎片离子，类似母离子和类似中性丢失离子信息可以从一次进样的数据中提取。该信息在 MetaboLynx 浏览器的 MassFragment 分析窗口展示(图 5)。MassFragment 是一种具有化学智能的结构解析工具软件。

图 5 中的上面两个窗口报告的是子离子信息。本例中，质荷比 783 是人参皂苷质荷比 1077 的碎片离子之一。图 5 中下面的窗口显示母离子结果和中性丢信息。图 5 显示产生质荷比为 783 的母离子信息。产生质荷比为 783 的母离子之一是质荷比为 1077 的离子。图 5 的右下方显示中性丢失 162 。对于配糖类，各种糖环的中性丢失意味着存在同分异构体的鉴定。

在碎片离子扫描窗口显示的碎片离子信息可自动输出至 MassFragment。母分子结构要以 MOL 文件格式(图 6)输入。MassFragment 根据输入的母分子结构对仪器检测到的子离子碎片进行结构解析。

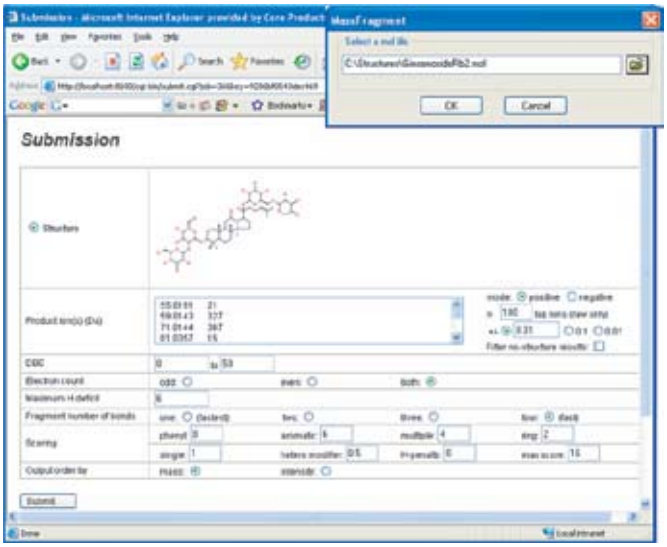

图 6. MassFragment 结构解析提交页面。

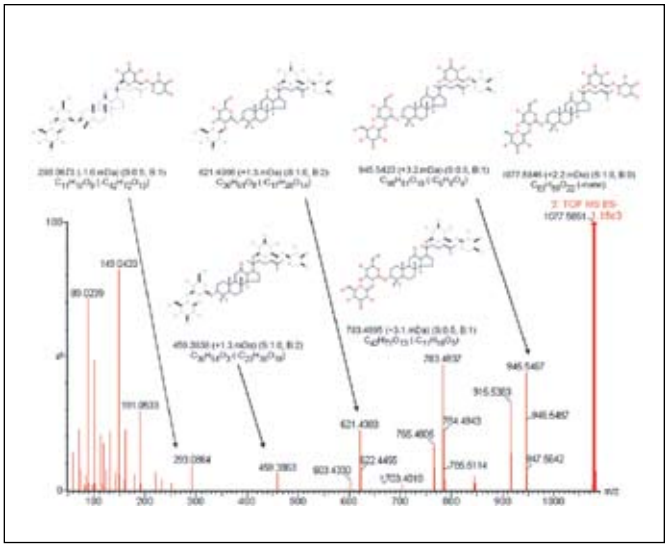

图 7. 使用 MassFragment 进行人参皂甙 Rb2 的结构解析。

MassFragment 对每一个推导出的结构(有时推导出不止一个结构)赋予一个分值。这个分值是根据化学键断裂的难易程度而决定的。低分值表示该结构形成可能性大。根据赋予的分值，加氢或减氢数量以及精确质量误差，分析人员选择最合理的碎片结构。

选择的碎片结果可以产生报告并以 Adobe Acrobat PDF 方式存档。图 7 显示利用 MassFragment 工具对人参皂苷 Rb2(分子量 1078)进行的结构解析。

结论

本文描述了一种快速强大分析人参样品的方法。ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统提供更高的色谱分辨率，使这种非常复杂的样品可以得到更好的分离。将 UPLC 超高效液相色谱和 SYNAPT HDMS 质谱系统相连使得快速精确的样品分析成为可能。TOF MS^E 模式的应用使一次进样所获得的信息最大化，大多数情况下，可确认被推导的结构。一种化学智能型软件工具，MassFragment 是高效解析过程的关键。

本工作流程可以随意应用到任何传统草药(THM)或传统中药(TCM)样品的分析，使得分析工作在比传统方法更快的时间框架下完成，从而更进一步优化整体生产力。

参考文献

1. Traditional herbal medicine structural elucidation using SYNAPT HDMS with Time-Aligned Parallel Fragmentation.Yu K, Castro-Perez J, Shockcor J. Waters Application Note. 2008; 720002542EN.
2. MS^E with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. Bateman KP, Castro-Perez J, Wrona M, Shockcor JP, Yu K, Oballa R, Nicoll-Griffith DA. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21 (9): 1485-96.
3. Accelerated throughput metabolic route screening in early drug discovery using high-resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated data analysis. Mortishire-Smith RJ, O'Connor D, Castro-Perez JM, Kirby J. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19 (18): 2659-70.
4. Automated high throughput UPLC/MS/MS metabolite ID using MetaboLynx. Yu K, Castro-Perez J, Plumb R. Waters Application Note. 2006; 720001869EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, 和 UPLC 是沃特世的注册商标。SYNAPT, HDMS, MassFragment, MassLynx, MetaboLynx, 和 The Science of What's Possible 是沃特世的商标。所有其它商标属于各自的所有者。

©2008 沃特世公司 中国印刷

2008 年 6 月 720002486 ZH

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 8586 8899
上海：021 - 6879 5888
广州：020 - 8626 6678
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com www.waterschina.com