[应用纪要]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

将 SYNAPT HDMS离子淌度分析中的时间排列平行碰撞(TAP)法应用于传统草药的分析

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

传统草药（THM）或传统中药（TCM）样品分析的挑战在于介质复杂性和样品间的多样性。我们已经报道了一种通用的工作流程。这个工作流程采用超高效液相色谱(UPLC®)并结合 SYNAPT HDMS™ TOF MS 模式，同时应用各种先进的软件工具(代谢物软件 MetaboLynx™，代谢组学软件 MarkerLynx™)，可以在获得最大信息量的同时快速分析样品。

在本应用文集中，我们演示了一种能够提供有效确认已知化合物和解析未知化合物结构的研究路线。

离子淌度质谱（IMS）使得离子化的分子在电场的作用下穿过气载的同时被分离。离子漂移的速度依赖于离子的质量，离子的负荷价态以及离子的平均横截面积。在离子淌度质谱中，具有相同质量数的离子，如果其电荷价态不同或平均横截面积不同，也可能得到分离。

本文报告的研究路线利用沃特世（Waters®）ACQUITY UPLC®-SYNAPT™ HDMS IMS 质谱系统的 IMS 全扫描模式做初期样品筛选。当某种化合物或某类化合物被鉴定出来，目标组分以分析量级被收集，而所收集的组分可以在纳升级流速进行流动相进样做质谱分析，可用于对目标化合物做结构解析。纳升级流速的进样可以在延长的时间段进行，使得多级 MS/MS 实验成为可能，包括时间排列平行碎片(TAP)分析。

TAP 分析是碰撞诱导解离－离子淌度分离－碰撞诱导解离(CID-IMS-CID)，让用户充分利用 SYNAPT HDMS 质谱系统结构中 Triwave™(Figure 1)的优势。这种设计使得离子淌度分离 IMS 之前的 T-Wave™ 和离子淌度分离 IMS 之后的 T-Wave 以两个分开的碰撞室运行。

在 Trap T-Wave(离子淌度分离之前)产生的碎片离子可以基于它们的电荷价态和大小在穿过离子淌度室时被分离。经漂移时间分离的离子可以进一步在 Transfer T-Wave(离子淌度分离之后)中碎裂。结果是，在 Transfer T-Wave 产生的碎片离子和它们各自的母离子以漂移时间排列，形成时间排列平行(TAP)碎片离子。当这些碎片结果与诸如 MassFragment™ 的软件工具联合使用，小分子的结构解析就变得简单了。

本文使用 ACQUITY UPLC 超高效液相色谱/SYNAPT HDMS 质谱系统的离子淌度模式分析人参精口服液。组分收集使用TriVersa NanoMate （Advion公司）。收集的组分直接进样至 SYNAPT HDMS 质谱分析，为目标化合物提供更多深度的信息。本应用文集中讨论的样品范例是人参皂苷 Rb1。

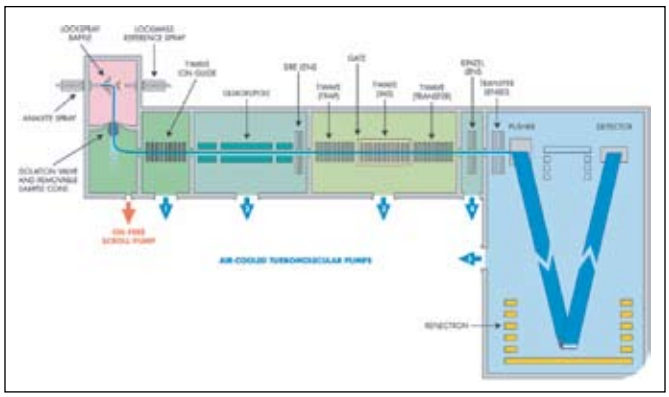

图 1. SYNAPT HDMS 质谱系统的Triwave设计简图。

实验方法

本文工作使用的是人参精口服液。样品在进样前经过过滤。液质连用接口使用的是 Advion 公司的芯片纳升级电喷雾装置。

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

组分收集(FC)条件

FC 系统:	Advion公司 TriVersa NanoMate
分流:	300 纳升/分钟流入质谱，其余当触发时进入废液或触发时进入收集板
收集板:	96-孔板
收集时间:	每孔7 秒钟
触发方式:	时间

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
离子淌度载气:	氦气
氦气流速:	80 L/min

结果

对于传统草药的研究，人们总是期待将感兴趣的化合物从原始提取物中分离出来，这样可以详细研究其结构且必要时用做标准。目前，采用制备级色谱是传统草药组分收集的通用手段，但实际上更有效益的做法是在以制备规模极力分离一个纯化合物之前，先测定组分的结构。

本工作中，我们将 TriVersa NanoMate[3-4] 和 ACQUITY UPLC/SYNAPT HDMS 连接起来，则组分收集可以在分析级规模进行。同样的分析中，我们设定 NanoMate 收集质荷比为 1107 的峰，它是人参皂苷 Rb1 的色谱峰。

NanoMate 使用芯片形式的纳升电喷雾作为 LC/MS 液相/质谱的界面[3]。样品的分析在纳升/分钟流速范围内。因而，收集的组分可以直接进样分析。低流速允许小体积的样品以相当长的时间(大约 30 到 40 分钟)进样，低浓度水平的化合物可以使用多种全扫描质谱和 MS/MS 采集模式包括 TAP 方式分析(图 2)。

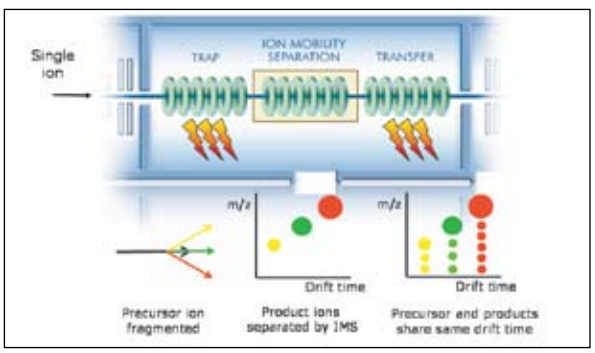

图 2. 收集 10.02 分钟时的色谱峰，直接进样后，分析质荷比 1077 的时间排列平行碎片 TAP。

人参皂甙 Rb1 的化学结构和可能的碎片离子如图 3 所示。碎裂过程以从左到右顺序描述。随着人参皂苷依次丢失糖单元，它所产生的碎片离子相应的质荷比为 945，783 和 621。质荷比 459 是该化合物的皂苷元。

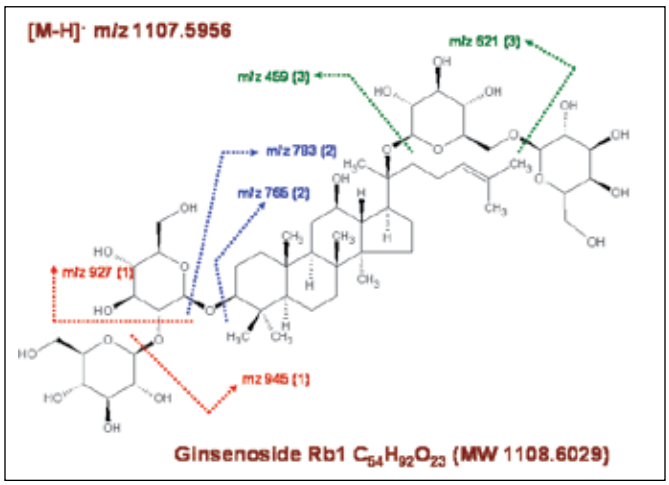

图 3. 人参皂苷Rb1的化学结构。

图 4 利用 DriftScope™ 制图显示两个试验的比较，以说明 TAP 的行为。在图 4a 中，碎裂只是在 T-Wave 的捕获区域进行。含有不同个数糖单元的碎片离子以不同的速度穿过漂移管。

漂移时间 1 在图 4a 中主要代表 $[M-H]^-$ 和 m/z 为 945 的碎片离子，即丢掉一个糖单元。漂移时间 2 的主要离子是 m/z 945 和 m/z 783(丢掉两个糖单元)。漂移时间 3 主要包括碎片离子来自糖和皂苷元。

图 4b 显示 TAP 数据。在每一个漂移时间区域，母离子或第一代离子进一步碎裂，产生第二代碎片离子。这些离子和第一代离子按漂移时间排列，并平行得到。这就形成了碎片树，使得用户在推导的结构范围内匹配第二代碎片的来源。本试验真正的优势在于所有第二代碎片离子在飞行过程中产生，即与第一代子离子的产生平行。

典型的单一离子淌度每十毫秒操作一次。对于纳升级流速规模的进样，可以将实验过程中的许多谱图平均，得到好的信噪比。进一步说，这种方式使用户能对含量很低的目标化合物进行多级碎裂分析。

图 5 出示了对应图 4b 三个区域的 TAP 的合并谱图。图 6 显示每个区域(1，2 和 3)单独的质谱图，并分别标出推导的结构。这为研究碎裂机理提供了有价值的信息。例如，应该看到质荷比为 323 的碎片离子含有两个糖单元，在漂移时间 1 和 2 中被检测到，而在 3 中没有。这意味着在区域 3 的母离子没有双糖侧链。

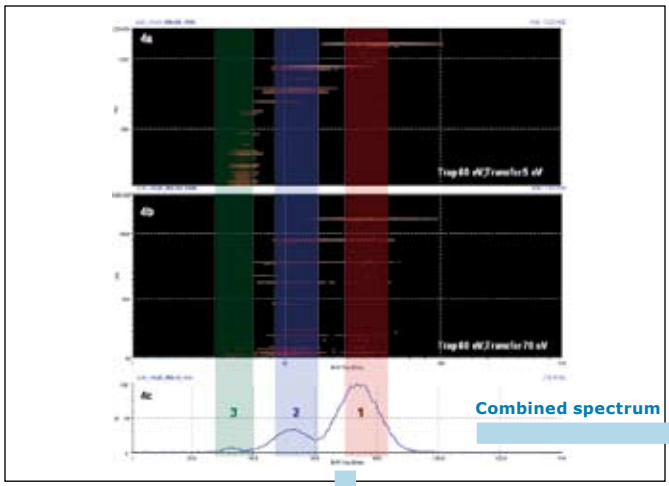

图 4. 使用不同碎裂方法获得的人参皂苷 Rb1的碎裂结果。

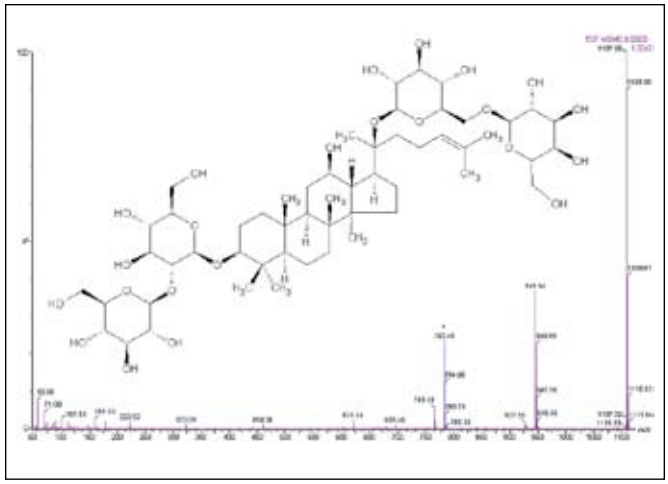

图 5. 人参皂苷 Rb1的质谱图，从图 4c 中合并三个漂移谱。

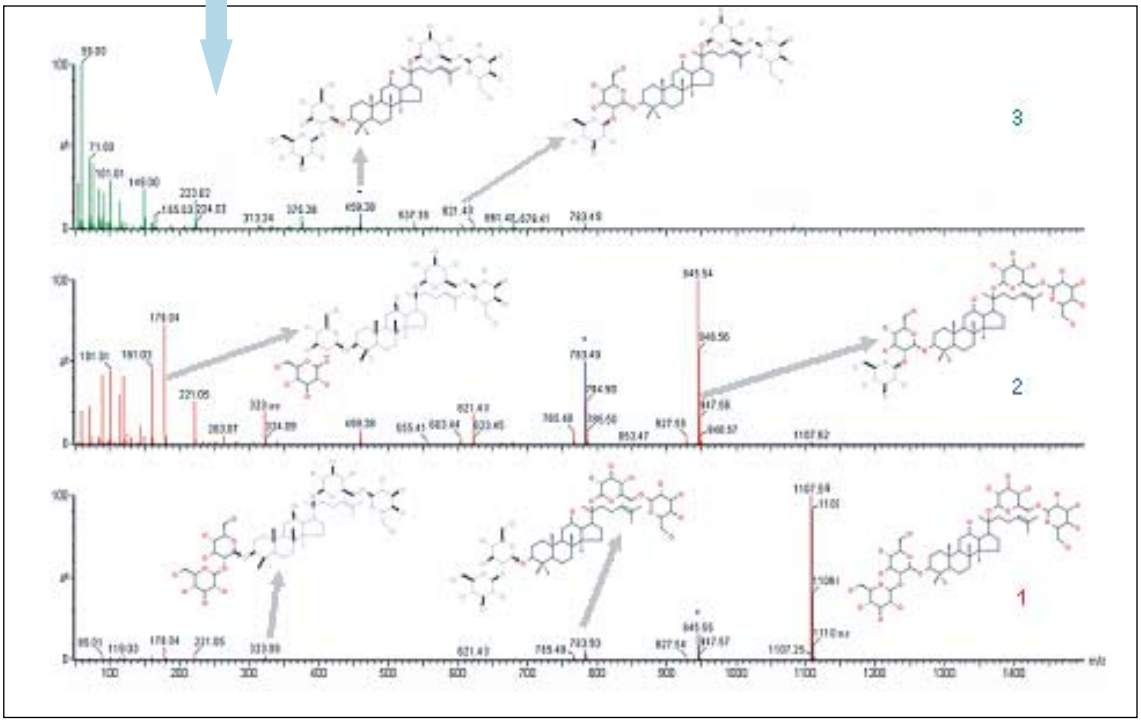

图 6. 每一区域单独的质谱相对应漂移谱峰 1, 2 和 3。

结论

UPLC/HDMS 结合分析级规模的组分收集器结合时间排列平行碎片（TAP）碎裂方式是 UPLC/TOF MS 超高效液相色谱/飞行时间质谱工作流程的补充。结果是，传统草药(THM)样品可以用高分辨，高灵敏度和快速切换时间来分析。

这项技术提高了用户对来自复杂介质的个别组分结构解析的能力。时间排列平行碎片 TAP 碎裂方式，和 MassFragment 结构解析软件工具配套使用，提供了解决复杂结构分析问题的快速而精确的方法。

1. K. Yu, J. Castro-Perez, and John Shockcor, Waters Application Note, 2008.
2. K. Yu, J. Castro-Perez, and John Shockcor, Waters Application Note, 2008.
3. T. Corso, R. Almeida et al., ASMS 2007 Poster
4. S. Prosser, D. Eilel et al., ASMS 2007 Poster

参考文献

1. An Intelligent Workflow for Traditional Herbal Medicine Compound Identification by UPLC/TOF-MS. Yu K, Castro-Perez J, Shockor J. Waters Application Note. 2008; 720002486EN.
2. A Multivariate Statistical Approach using UPLC/TOF-MS for Traditional Herbal Medicine Analysis to Compare Different Sample Classes. Yu K, Castro-Perez J, Shockor J. Waters Application Note. 2008; 720002541EN.
3. Automated Nanofluidic System for Real-Time Monitoring of Enzymatic Assay. Corso R, Almeida R, et al., ASMS 2007 Poster.
4. Optimized Trap and Elute Strategies Using nano-LC-MS/MS for the Identification of Sypro Ruby Stained Proteins Separated by 2-Dimensional Gel Electrophoresis. Prosser S, Eilel D, et al. ASMS 2007 Poster.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

50 YEAR LEGACY
VISION ■ CONTRIBUTION ■ ADVANCEMENT

Waters, ACQUITY UPLC, 和 UPLC 是沃特世的注册商标。SYNAPT, HDMS, MarkerLynx, MetaboLynx, MassFragment, DriftScope, T-Wave, Triwave, 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 720002542 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