[應用報告]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

應用 UNIFI Natural Products Application Solution 鑑別綠茶萃取物的化學成分

喬立瑞[1]、Rob Lewis[2]、Alex Hooper[2]、James Morphet[2]、譚曉杰[1]、Kate Yu[3]
1. 沃特世科技 (上海) 有限公司，上海，中國
2. Waters MS Technology Center, Manchester, UK
3. Waters Corporation, Milford, MA, USA

應用優勢

本應用文獻介紹了使用極致效能液相層析 (UPLC®)，四極桿飛行時間質譜 (QTof MS) 以及中藥資料庫為基礎的 UNIFI® 天然產物解決方案分析綠茶中化學成分的方法。該解決方案將實驗的收集數據、數據資料處理與中藥資料庫結合成整體的解決方案，使得複雜中藥化學成分的定性工作變得簡單、有效率，而且鑑定結果更有可信度，大大提高了工作效率，降低了對研究人員技術背景的要求。

WATERS 解決方案

UNIFI Natural Products Application Solution
ACQUITY UPLC® I-Class 系統
Xevo® G2-S QTof MS
UNIFI Scientific Information System
Waters 分析標準品與試劑

關鍵字

UNIFI中藥資料庫，天然產物成分分析，UPLC/QTof MS^E，天然產物分析工作流程，鑑別化學成分，綠茶成分分析

簡介

以天然產物製作健康食品及醫療藥品在全球許多國家皆為行之有年的做法。流傳千年的歷史及現代臨床醫學皆已證實傳統藥物的功效。不過，相關領域的研究和研發仍然面臨許多挑戰，例如該如何解開其物質基礎和功效機制。所有難題的核心皆在於如何瞭解傳統藥物的所有成分。

所有天然產物的研究都要起源於成分分析。然而成分分析的研究工作長久以來一直面臨多重挑戰。比如傳統的成分分析方法複雜，耗時且低效率。歸總起來，這類方法不外乎採用以下幾個途徑：

1. 購買相關標準品，與樣品中的成分進行對比，這一途經的缺點是成本很高而且不一定能找到所有相關的標準品；
2. 採用各種分離製備的方法對成分進行分離純化，這其中缺點是具有極大的盲目性，耗時太長，同時還不可避免的涉及到大量的重覆性工作；
3. 通過查文獻來尋找答案，但過去的文獻報導採用的資料往往來自低解析度儀器，存在不少偽陽性結果。以上無論哪種途徑均對研究人員的技術背景要求較高。

以上所有做法都有一個共同的條件：分析人員必須熟知化學及天然產物方面的知識。

物質基礎研究功效不彰，這一點向來是導致傳統藥物無法順利現代化的瓶頸。近年來，由於液相層析結合質譜分離技術 (LC/MS) 的做法越來越普及，情況因此已有好轉；然而，目前為止仍無法出現重大突破。

實驗

準備樣本

綠茶萃取粉 (Waters，No. 186006962) 33 mg 溶解於 2 mL 的 MeOH/H_2O 1/3 溶液，再稀釋至兩倍 (最終濃度為 8.25 mg/mL) 備用。以甲醇將兒茶素標準混合物 (Cerriliant No. G-016) 稀釋至兩倍 (最終濃度為 50 µg/mL)。注射量為 1 µL。

LC 條件

LC 系統：	配備有 FTN 樣品管理器的 ACQUITY UPLC I-Class
管柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 100 mm，1.8 µm
管柱溫度：	40 °C
樣本溫度：	15 °C
移動相：	A：水 (0.1% 的甲酸)；B：乙腈

梯度：

時間	流速 (mL/min)	A 溶劑 (%)	B 溶劑 (%)	曲線
0	0.6	99	1	開始
0.5	0.6	99	1	6
16	0.6	65	35	6
18	0.6	0	100	1
20	0.6	99	1	1

MS 條件

MS 系統：	Xevo G2-S QTof MS
擷取範圍：	100-1500 Da
掃描時間：	0.1 秒
擷取模式：	ESI+、ESI-；解析度模式；MS^E
鎖定質量：	亮氨酸腦啡肽 (LE) 1 ppm (掃描 0.3 秒，間隔：15 秒)
毛細管電壓：	3 KV (ESI+)/2.5 KV (ESI-)
樣品錐電壓：	100 V
碰撞能量：	低 CE：6 eV；高 CE：15-40 eV
離子源溫度：	120 °C
溶媒揮發溫度：	500 °C
樣品錐氣體流速：	30 L/h
溶媒揮發氣體流速：	1000 L/h
擷取時間：	20 分鐘

目前，最常見的 LC/MS 解決方案仍然包括以人工方式逐一觀察層析峰、利用各種網際網路資料庫搜尋可能的結構資訊，以及透過文獻尋找出相符的片段資料與合理化碎裂路徑，從而鑑定目標成分的化學結構。此種做法仍然無法免除下列缺點：耗時、功效不彰、操作人員必須具備高度專業技能。

本應用報告以綠茶萃取物分析為範例，介紹 Waters 最近推出的 UNIFI Natural Products Application Solution。此解決方案結合了 ACQUITY UPLC I-Class 系統、Xevo G2-S QTof MS，以及 UNIFI Scientific Information System 內建的 Traditional Medicine Library (中藥資料庫)。此解決方案以應用程式為主，利用簡潔且整合了 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 的工作流程結合資料擷取與處理等功能，能夠鑑別複雜天然產物樣本中的化學成分，處理程序既簡便又有效率，因此不但能夠大幅提升生產力，還能降低對於操作人員專業技能的要求。圖 1 概列使用 UNIFI Natural Product Application Solution 分析成分的工作流程。

綠茶是廣受喜愛的天然茶飲。由於綠茶未經發酵，因此不會破壞新鮮葉片中的許多成分，例如多酚、兒茶素、兒茶酚、咖啡因、胺基酸、維他命等。就化學成分分析而言，這是非常好的起步，因為，我們能夠以綠茶為例，說明如何運用 UNIFI Natural Product Application Solution 使用現有的標準物質驗證分析結果。從注射樣本到產生報告的整個分析過程，只要兩個小時就能完成。

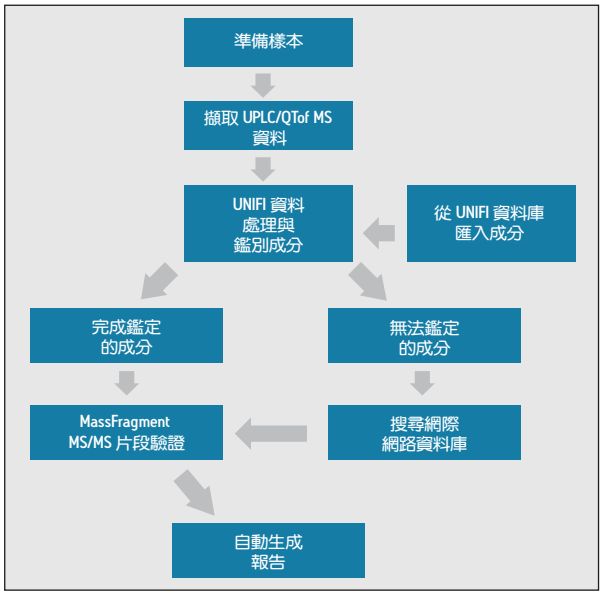


圖 1. 使用 UNIFI Natural Product Application Solution 分析成分的工作流程。

結果與討論

使用 UPLC 和 配備 MS^E 的 QTof MS 分析綠茶萃取物所含的成分。 以內建 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 的 UNIFI Natural Products Application Solution 處理資料。一開始鑑別出 28 種成分，以 MassFragment™ 驗證後確認其中 16 種。從注射樣本到產生報告為止，完整分析過程歷經兩小時。

UNIFI Natural Product Application Solution 包括 ACQUITY UPLC I-Class、Xevo G2-S QTof MS，以及內建 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 的 UNIFI Scientific Information System，以及 Waters 綠茶萃取物和兒茶素標準品混合物。此一整合解決方案也包括 14 種預設成分和二元分析工作流程範本，以及三種報告範本，從資料擷取和處理乃至於資料庫搜尋與結構驗證到產生報告，構成一個完全自動化的程序。

圖 2 顯示綠茶萃取物的 UPLC/QTof MS 基本峰離子 (BPI) 層析圖。這裡充分展示了使用 UPLC 分析複雜樣本的優點。此種方式不僅能夠縮短運作時間 (有效分離時間 15 分鐘)，還能提升分離效率和峰容量。同時，QTof MS 亦提供通過準確質量量測的 MS 資訊。此外，由於採用 MS^E 資料擷取策略，化學家可以取得化合物的分子量資訊 (透過低碰撞能量 MS 掃描)，還能利用單一注射取得各自的碎裂離子資訊 (透過高碰撞能量 MS 掃描)。所有功能都有利於日後進行深度的成分分析與結構鑑別。

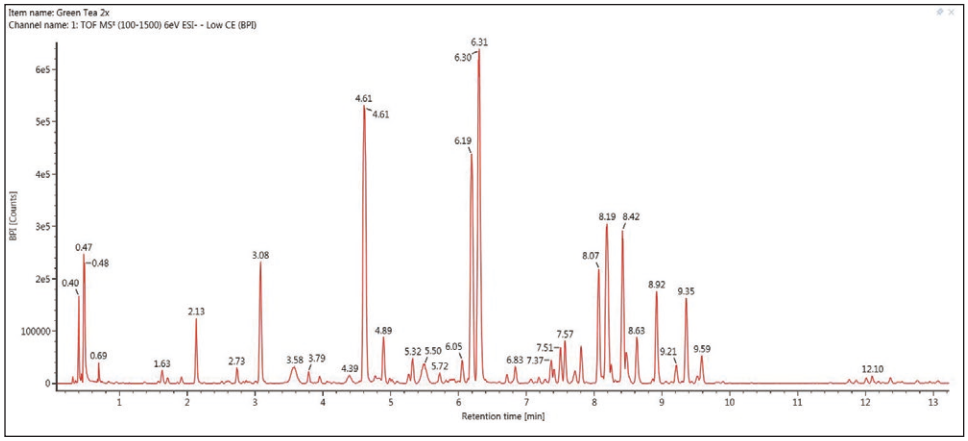


圖 2. 綠茶萃取物的 UPLC/QTof MS 基本峰離子 (BPI) 層析圖。

天然產物研究還有另一處瓶頸：雖然可以透過網際網路找到為數不少的文件和資料庫，市面上卻沒有任何資料庫能與儀器分析充分整合，因此不利於天然產物成分分析研究。

Waters 的 UNIFI Natural Product Application Solution 是第一套可以彌補這個缺憾的產品。全新的 Traditional Medicine library (中藥資料庫) 以 2010 年版中國藥典為準，羅列藥典中蒐羅的所有草藥。圖 3 說明此資料庫的基礎架構及其中所含資料。其中包括化合物名稱 (中英文並列)、化學結構、分子式、以準確質量表示的每種化合物的平均分子量和單一同位素分子量，以及植物起源。該藥物庫會詳列每一種草藥的植物名稱 (包括中文、漢語拼音及拉丁文)，以及文獻中記載的主要化合物。此外，藥物庫中所列的每一種化合物皆按化學分類標示，為進一步片段分析奠定基礎。

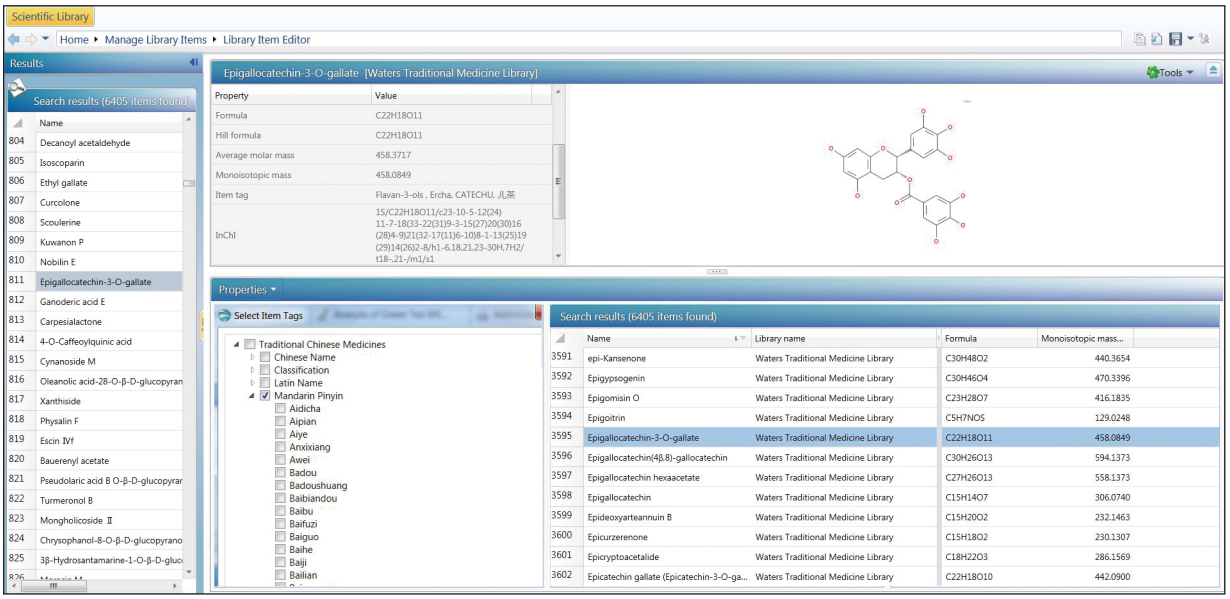


圖 3. Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 的基礎結構。

UNIFI Natural Products Application Solution 可以自動將 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 併入成分及二元分析工作流程中。圖 4 舉例說明運用 UNIFI 成分分析工作流程進行的樣本分析。

圖 4A 說明這 14 種預設分析工作流程範本的完整清單。只要按下此清單中的任一項目，對應結果就會出現在圖 4 右側的視窗 (4B、4C 和 4D) 中。例如，若按下 Component – Good Match (成分 – 相符)，即會顯示所有鑑別成分中回應值高於 2000 計數值且準確質量偏差低於 5 mDa 者的資訊。

圖 4B 的成分表列出可在 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 中找到相符項目的所有成分，這些成分均符合前述標準。所列出的每一種化學成分均包括下列資訊：化合物名稱、分子式、準確質量單一同位素分子量、回應強度、保留時間、準確質量偏差 (以 mDa 為單位)、離子化模式、加合離子，以及鑑別狀態。圖 4C 是與表中所選擇成分對應的層析圖 (此範例中所選擇成分為咖啡因)。圖 4D 是圖 4C 所示成分的 MS^E 質譜，包括低能量完整掃描譜圖及高能量片段譜圖。

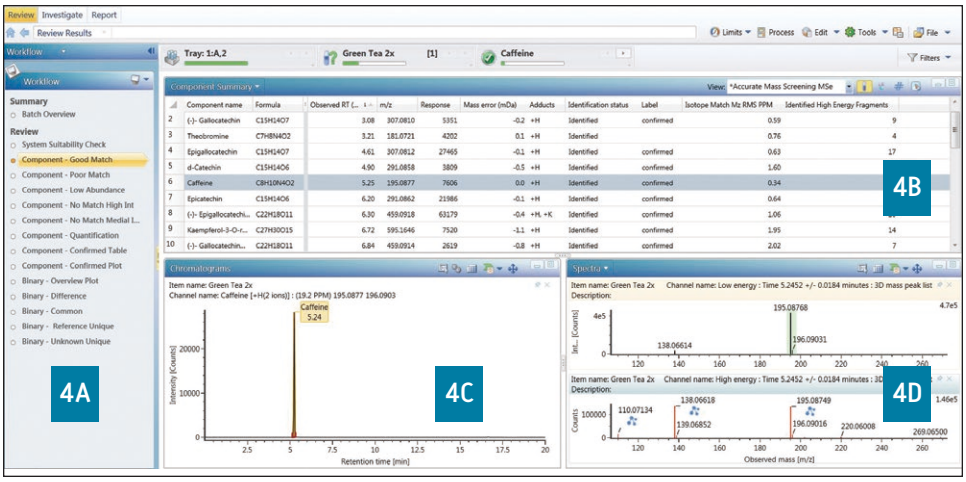


圖 4. 經 UNIFI 處理後鑑別出之綠茶成分的清單。

在未研發出 UNIFI 軟體之前，無論使用何種成分分析解決方案，研究人員都須手動擷取各個層析峰、檢查其對應質譜，以及根據準確質量推論可能的分子式。接著，研究人員必須根據分子式搜尋線上資料庫、根據碎片離子推論碎裂路徑，最後才能斷定目標成分的化學結構。有了 UNIFI Natural Products Application Solution 之後，只要從 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 匯入所有相關成分，即可同時完成資料處理和資料庫搜尋兩件工作。鑑別結果會直接顯示出來 (圖 5)，並會透過 MassFragment 自動根據碎片離子檢查結構合理性。

如圖 4D 所示，只要點擊藍色圖符 ，即可檢查每一個與化合物母離子對應的碎片離子。研究人員只需判斷檢查所得的碎片結構是否合理即可。如果合理，即可斷定軟體提議的化合物結構正確無誤，並可將此化合物定義為已確認。若懷疑有假陽性的可能，可利用 UNIFI Structural Elucidation Tool (結構說明工具) 搜尋更多線上資料庫進行更深入的鑑別與結構說明，並再次運用 MassFragment 進行進一步推斷。這種方法可以依循相同的模式研究所有未鑑別之成分。點擊 Component – Confirmed Table (成分 – 確認表) 可透過表格方式顯示所有已確認成分的最終結果 (圖 4A)；點擊 Component – Confirmed Plot (成分 – 確認圖) 則可透過繪圖方式顯示 (圖 5)；亦可利用報告範本產生清單 (圖 6)。

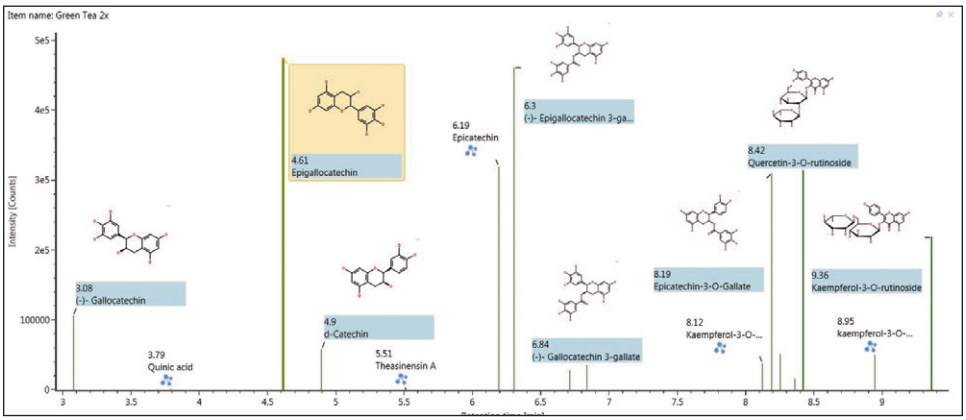
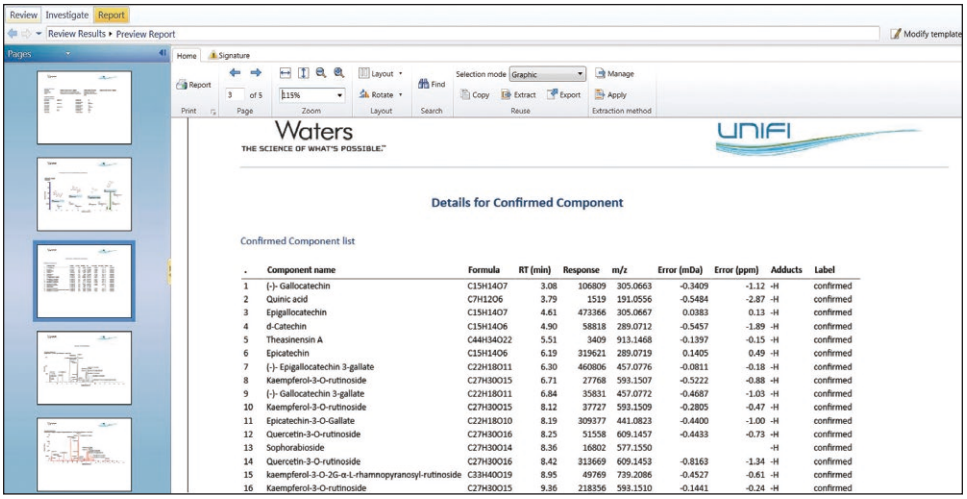


圖 5. 經 UNIFI 處理後鑑別出之綠茶萃取物成分的摘要圖。

UNIFI Natural Products Application Solution 包含三種報告範本。與成分分析相關的報告範本包括：NP Component Summary Template (NP 成分摘要範本) 與 NP Component Details Template (NP 詳細成分範本)。例如，只要匯入 NP Component Summary Template (NP 成分摘要範本)，很容易就能取得成分鑑別狀態的摘要報告 (圖 6)。此報告包含樣本資訊、資料擷取及處理方法，以及相關的資料資訊。



.	Component name	Formula	RT (min)	Response	m/z	Error (mDa)	Error (ppm)	Adducts	Label
1	(-)- Gallocatechin	C15H14O7	3.08	106809	305.0663	-0.3409	-1.12	-H	confirmed
2	Quinic acid	C7H12O6	3.79	1519	191.0556	-0.5484	-2.87	-H	confirmed
3	Epigallocatechin	C15H14O7	4.61	473366	305.0667	0.0383	0.13	-H	confirmed
4	d-Catechin	C15H14O6	4.90	58818	289.0712	-0.5457	-1.89	-H	confirmed
5	Theasinensin A	C44H34O22	5.51	3409	913.1468	-0.1397	-0.15	-H	confirmed
6	Epicatechin	C15H14O6	6.19	319621	289.0719	0.1405	0.49	-H	confirmed
7	(-)- Epigallocatechin 3-gallate	C22H18O11	6.30	460806	457.0776	-0.0811	-0.18	-H	confirmed
8	Kaempferol-3-O-rutinoside	C27H30O15	6.71	27768	593.1507	-0.5222	-0.88	-H	confirmed
9	(-)- Gallocatechin 3-gallate	C22H18O11	6.84	35831	457.0772	-0.4687	-1.03	-H	confirmed
10	Kaempferol-3-O-rutinoside	C27H30O15	8.12	37727	593.1509	-0.2805	-0.47	-H	confirmed
11	Epicatechin-3-O-Gallate	C22H18O10	8.19	309377	441.0823	-0.4400	-1.00	-H	confirmed
12	Quercetin-3-O-rutinoside	C27H30O16	8.25	51558	609.1457	-0.4433	-0.73	-H	confirmed
13	Sophorabioside	C27H30O14	8.36	16802	577.1550			-H	confirmed
14	Quercetin-3-O-rutinoside	C27H30O16	8.42	313669	609.1453	-0.8163	-1.34	-H	confirmed
15	kaempferol-3-O-2G-α-L-rhamnopyranosyl-rutinoside	C33H40O19	8.95	49769	739.2086	-0.4527	-0.61	-H	confirmed
16	Kaempferol-3-O-rutinoside	C27H30O15	9.36	218356	593.1510	-0.1441	-0.24	-H	confirmed

圖 6. 成分鑑別狀態摘要報告，匯入 NP Component Summary Template (NP 成分摘要範本)即可獲得此報告。

結論

本文謹以綠茶成分分析為範例介紹 UNIFI Natural Products Application Solution。UPLC 克服了傳統 HPLC 分離的缺點，例如分離時間長、解析度有限，以及峰容量不足等。QTof MS 以準確質量提供分子量和碎片資訊，以及充足的動態範圍，因此為天然產物成分鑑別與量化奠定了穩固的基礎。

內建 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 的 UNIFI Natural Products Application Solution 能夠自動鑑別成分結構，是適合對複雜天然產物樣本進行成分分析的全新解決方案。從注射樣本到資料處理，乃至於列印報告，整個程序皆可同時在 UNIFI 資訊學平台上完成。只要兩個小時，就能順利完成整套綠茶成分分析。此解決方案亦包含預設的工作流程範本，以及多樣化的報告範本，因此可以節省重新編輯方法的時間。

事實上，我們提供的化學成分鑑別方法既簡便又有效率，非常適合用於鑑別複雜的天然產物樣本。此程序能夠大幅提高生產力，而且可以降低對於操作人員技術專業技能的要求，因此可以增加進行此類分析的頻率，而且，經驗豐富的操作人員現在也可以將他們的知識運用在更高等的實驗室研究上了。因此，我們所提供的軟體對突破天然產物研究的瓶頸做出了極大的貢獻。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、UltraPerformance LC、UPLC、ACQUITY UPLC 及 Xevo 是 Waters Corporation 的註冊商標。MassFragment 是 Waters Corporation 的商標。所有其他商標皆為其個別擁有者的財產。

©2013 Waters Corporation。美國印製　2013 年 11 月 720004837ZF LM-PDF

美商沃特斯國際股份有限公司
台灣分公司
104 台北市中山區建國北路
一段 90 號 11F 之 2
電話：886-2-2508-5500
傳真：886-2-2501-9228
www.waters.com