以 UNIFI Natural Products Application Solution 鑑別未知傳統藥錠中的化學成分與推論可能使用的中藥成分

喬立瑞¹、Rob Lewis²、Alex Hooper²、James Morphet²、譚曉杰¹、Kate Yu³

- 1沃特世科技(上海)有限公司,上海,中國
- ²Waters MS Technology Center, Manchester, UK
- ³Waters Corporation, Milford, MA, USA

應用優勢

運用極致效能液相層析 (ACQUITY UPLC® I-Class)、四極桿飛行時間質譜 (Xevo® G2-S QTof) 及 UNIFI® 天然產物解決方案鑑定未知中藥錠中的化學成分並推測其所含藥材。UNIFI 對未知物成分鑑定和推測可能含有藥材的工作流程更簡單,並大幅提升未知中藥成分定性的準確性及效率。

WATERS 解決方案

UNIFI Natural Products Application Solution

ACQUITY UPLC® I-Class 系統

Xevo® G2-S OTof 質譜儀

UNIFI Scientific Information System

Waters 分析標準品與試劑

關鍵字

中藥資料庫,未知天然產物成分分析,傳統藥物製品,UPLC/QTof MS^E, 天然產物分析工作流程,中藥材料鑑別,丹蔘 (DanShen),丹蔘 (Salvia Miltiorrhiza),三七 (SanQi),田七 (Panax Notoginseng)

簡介

眾所皆知,傳統藥物是由非常複雜的成分組成的,其中可能包含多種植物、萃取物、礦物質,以及動物的身體部位。傳統藥物的主要功效源自於原始中藥所含的化學成分。在另一份相關的應用報告中,我們說明了如何運用 UNIFI Natural Products Application Solution 及其Traditional Medicine Library (中藥資料庫),有效鑑別已知植物樣本的化學成分。進行此類分析時,分析人員只需從Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 匯入與已知植物相關的化合物,再以這些化合物為搜尋目標,與擷取資料進行比較即可。結果會出現一份鑑別成分清單,可用於深入檢查。此工作流程簡潔流暢,而且只要幾個簡單的步驟就能完成分析程序。

不過,現實中的研究人員往往需要以完全未知的傳統藥物製品為分析目標,除了鑑別其化學成分之外,還要推論其中可能使用的中藥成分。此類工作非常困難;甚至,研究人員經常不知該從何著手。由於可用的樣本背景資訊非常貧乏,即便能夠運用 LC/MS 等常見方法獲得大量資料,研究人員仍然面臨縮小範圍並在最短的時間內獲得有用資訊的挑戰。

剖析未知傳統藥物製品的典型工作流程如下:以人工方式——擷取每個層析峰、根據完整質子化/去質子化離子的準確質量提出可能的分子式,並運用結果搜尋線上資料庫,尋找可能相符的結果。之後再根據 MS/MS 碎片離子推論碎裂路徑,始能確認目標成分的化學結構提議。就此程序而言,研究人員不僅幾乎全程事必躬親,更需要非常專業的技能(必須熟知天然產物及化學相關技術),因為他們必須能夠在如海洋般浩瀚無盡的資訊當中找到答案。

實驗

準備樣本

兩片用於分析的 TCM 製品。去除藥錠外層後磨成粉。將 500 mg 的粉末溶於 50 mL MeOH/H₂O (3:1)中,再以超音波處理溶液 5分鐘。注射之前先以 45 µm 薄膜過濾超音波處理完畢的溶液。

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 , $1.8~\mu m$

管柱溫度: 40°C

樣本溫度: 15℃

移動相: A:水(0.1%的甲酸);

B:乙腈

梯度:

時間	流速	A 溶劑	B 溶劑	曲線	
	(mL/min)	(%)	(%)		
0	0.6	90	10	開始	
1	0.6	90	10	6	
12	0.6	5	95	6	
14	0.6	0	100	1	
17	0.6	90	10	1	

MS 條件

MS 系統: Xevo G2-S QTof

擷取範圍: 100-1500 Da

掃描時間: 0.1 秒

擷取模式: MS^E、ESI-及ESI+

(解析模式)

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 (eV): 低 CE: 6/高 CE: 20-50

離子源溫度: 120℃

溶媒揮發溫度: 500℃

樣品錐氣體流速: 30 L/h

溶媒揮發氣流速: 1000 L/h

擷取時間: 17分鐘

資料擷取、處理和報告

內建 Traditional Medicine Library (中藥資料庫)

的 UNIFI Scientific Information System

UNIFI Natural Products Application Solution 針對此類問題提供了最新、最完善的應對策略。此解決方案運用 ACQUITY UPLC I-Class 系統和 Xevo G2-S QTof MS 擷取不受資料影響的 MS^E 資料。之後再於內建的 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 中搜尋擷取到的資料。找到相符的成分後,透過 MassFragment™ 運用對應的碎片離子驗證其結構。最後,系統會以預設的工作流程範本在 UNIFI 中自動顯示鑑別成分的詳細資訊。

本應用報告以傳統藥物 (TCM) 藥錠製品為例,說明如何運用 UNIFI Natural Products Application Solution 鑑別未知樣本的化學成分,以及推論其中可能使用的中藥。

結果與討論

以未知 TCM 藥錠樣本為分析對象,運用 UPLC 和 QTof MS 分離成分並擷取 MS 資料。同時運用內建 Traditional Medicine Library (中藥資料庫)的 UNIFI Natural Products Application Solution 進行資料處理,結果利用該藥物庫鑑別出 288 種成分。初步驗證了其中 37 種高濃度成分,並根據 MassFragment 的片段分析將其標示為 Confirmed (確認)。

關聯確認成分與可能的植物後,經過推理分析,推論出該藥錠可能含有丹蔘 (Salvia miltiorrhiza) 和三七 (田七, Panax notoginseng)。透過網際網路找到包含這兩種中藥的已知 TCM 配方後,即可利用相符配方所含相關中藥的化學成分 (以中藥資料庫所列為準) 與透過實驗資料找到成分進行比較。最終在此範例的藥錠中驗證出 59 種主要化學成分,全數源自於丹蔘和三七。因此,最終的結論是該 TCM 製品的中藥成分是丹蔘和三七,我們也據以認定此製品可能是三七丹蔘錠或丹蔘複合錠。

之前已經詳細說明過運用 UNIFI Natural Products Application Solution 分析已知植物化學成分的工作流程¹。分析完全未知的樣本時,則必須另外推論可能的中藥成分、上網搜尋可能包含這些中藥的已知 TCM 配方,以及在 UNIFI Traditional Medicine Scientific Library 中重新匯入與相符配方所列可能中藥相關的對應化合物,驗證是否包含這些中藥。圖 1 說明完整的未知樣本化學及中藥成分鑑別工作流程。

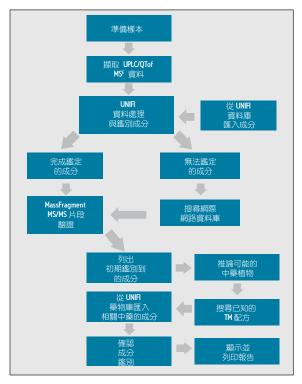


圖 1. 完整的未知物中藥複方成分鑑別工作流程。

圖 2A 顯示未知 TCM 藥錠的 UPLC/QTof MS 基本峰離子 (BPI) 層析圖。使用 UNIFI Scientific Information System 時,相同的結果也可以運用 3D 格式顯示,如圖 2B 所示。相較於 2D 繪圖 (圖 2A),3D 繪圖所顯示的資訊能更真實呈現樣本所含成分。 3D 繪圖能夠提供更為直觀的剖析圖,更易於觀察樣本的整個化學成分分布。例如,研究人員能夠利用圖 2B 快速推論出此樣本化學成分的分子量範圍主要介於 400 和 1000 Da 之間。此外,化學家們還能透過 3D 繪圖快速觀察化合物在整個運作過程中的共析狀態。

圖 2B 所示的繪圖是在 Apex 3D 影像掃描模式下產生的,只能在 UNIFI 中使用。除了提供直觀效果外,3D 繪圖還有助於提升後續分析的鑑定和定量準確性,而其最大的優點則在於鑑別及排除背景峰。

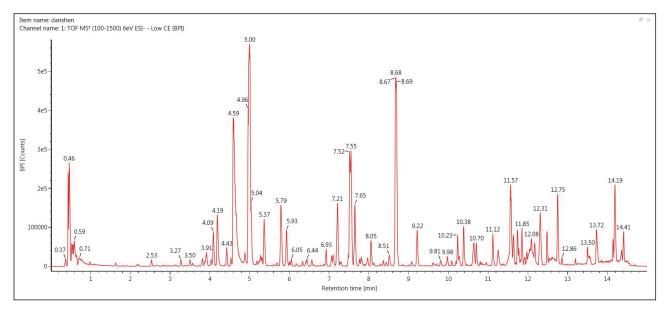


圖 2A. 未知 TCM 藥錠的 UPLC/QTof MS 基本峰離子 (BPI) 層析圖。

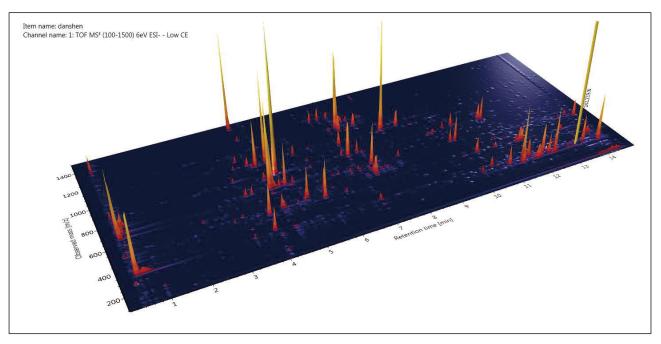


圖 2B. 未知 TCM 藥錠的 3D LC/MS 繪圖。

使用 UNIFI Natural Products Application Solution 時:

- 1. 所有步驟皆可自動完成,操作人員不需動手處理。這些步驟包括擷取層析峰、測定元素成分、搜尋 Traditional Medicine Library (中藥資料庫)、解析碎片離子的結構,以及鑑別成分。
- 2. 研究人員只需要驗證 MassFragment 自動提供的碎片離子結構解析是否合理即可。
- 3. 若懷疑有假陽性的可能,或其中有任何成分在 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 中找不到相符結果,研究人員再運用人工處理方式進一步鑑別即可。

相較於傳統研究方案, UNIFI Natural Products Application Solution 能夠將在無窮資訊中尋找明確目標的人工處理程序轉變成自動化的工作流程。此舉能夠大幅減少研究工作的盲點, 從而提高生產力。同時也無需再嚴格要求研究人員一定要具備專業的技能背景。

圖 3 說明未知 TCM 藥錠經 UNIFI 資料處理後的化學成分鑑別結果。圖 3B 所示的成分表列出了透過藥物庫比對初步鑑別出的成分。在同一段保留時間內,可能會出現多個同分異構物對應同一個層峰的情形。此時,研究人員就必須查看加合離子以及碎片離子(藍色圖符 ♣)的結構說明,確認相符結果是否合理。

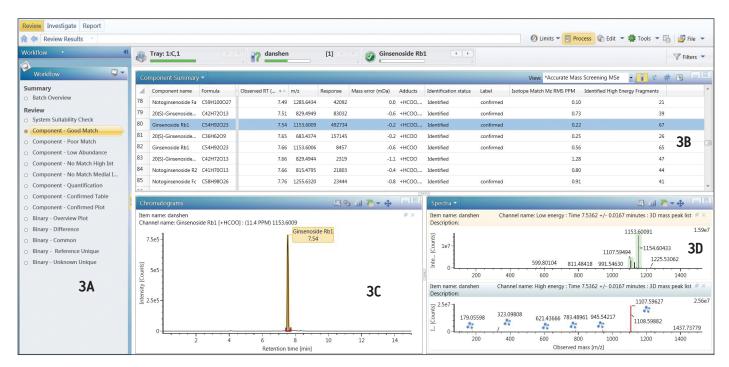


圖 3. 在 UNIF 中鑑別未知 TCM 藥錠化學成分的結果。3A 所示為範本工作流程;3B 是成分鑑別表;3C 是 3B 中所選成分的對應離子層析圖; 3D 則是 3C 的單獨質譜。

例如,UNIFI 將第 7.54 分鐘的層析峰自動鑑別為人參皂苷 Rb1 或 Yesanchinoside E。按一下圖 3D 呈現的視窗會出現放大圖 (圖 4)。由於 MassFragment 已經自動說明所有碎片離子,研究人員很容易就能夠驗證碎裂路徑是否合理。在此範例中,化合物的裂解從糖苷鍵開時,在形成原人参二醇糖苷配基碎片後結束,這表示合理的結構應該是人參皂苷 Rb1,隨之即可標示為Confirmed (確認)。

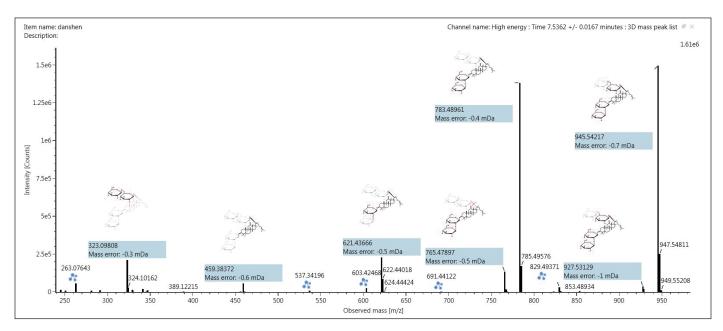


圖 4. MassFragment 對於人參皂苷 Rb1 碎片離子的結構說明。

按照上述方式驗證及確認成分之後,可觀察到此未知藥錠含有人參皂苷、鼠尾草酚、丹參酮、三七皂苷之類的化學物質。這些成分與丹蔘和三七的中藥材料具有非常明確的關聯性。上網搜尋後進一步發現三七丹蔘錠及丹蔘複合錠可能是包含這兩種中藥成分的已知 TCM配方。當然,在網路上也找到了其他配方,例如含花旗蔘 (Panax quinquefolius) 或山楂 (Crataegi fructus) 之類的配方。

現在,這項研究專案已經從初期階段的非目標物篩檢進展到目標物篩檢,也就是鑑別已知植物的化學成分。此部分的工作流程已有完整的定義1,那就是將 Traditional Medicine Library (中藥資料庫中) 該已知中藥材料 (salvia miltiorrhiza panax notoginseng panax quinquefolius 及 crataegi fructus) 的化學成分匯入到 UNIFI 分析方法的目標清單,再與實驗資料進行比對。

結果發現沒有成分與列出的花旗蔘和山楂的成分 (例如這兩種中藥特有的花旗蔘皂素、絞股藍皂苷、山楂皂苷等) 相符。據此,研究人員可以進一步確認初步結論,也就是此藥錠不含花旗蔘及山楂。同時,透過樣本取得的所有主要層析峰皆與丹蔘和三七的主要成分 (表 1) 相符 (確認了 59 種主要成分)。

因此,我們所做的結論是此藥錠主要由丹蔘 (salvia miltiorrhiza) 和三七 (panax notoginseng) 構成。 其市售商品可能是三七丹蔘藥錠或丹蔘複合錠。

	Component name	Formula	RT (min)	Response	m/z	Error (mDa)	Error (ppm)	Adducts	Label
L	Salvianic acid A	C9H10O5	0.99	7002	197.0451	-0.4148	-2.10	-н	confirmed
2	Protocatechuic aldehyde	C7H6O3	1.63	4283	137.0242	-0.1934	-1.41	-н	confirmed
3	Lithospermic acid	C27H22O12	3.50	19188	537.1027	-1.1279	-2.10	-н	confirmed
1	Salvianolic acid D	C20H18O10	3.57	7772	417.0820	-0.6713	-1.61	-Н	confirme
5	20-O-Glucopyranosyl ginsenoside Rf	C48H82O19	4.04	24616	1007.5421	-1.1674	-1.16	+HCOO, -H	confirme
5	Rosmarinic acid	C18H16O8	4.09	60848	359.0770	-0.2202	-0.61	-Н	confirme
7	Salvianolic acid A	C26H22O10	4.19	129863	493.1138	-0.1842	-0.37	-н	confirme
3	20-O-Glucopyranosyl ginsenoside Rf	C48H82O19	4.43	62970	1007.5423	-0.9179	-0.91	+HCOO, -H	confirme
)	Notoginsenoside Fc	C58H98O26	4.51	1010	1255.6329	0.0889	0.07	+HCOO	confirme
10	Lithospermic acid B	C36H30O16	4.60	724974	717.1453	-0.8088	-1.13	-н	confirme
11	Notoginsenoside R1	C47H80O18	4.64	204023	977.5314	-1.2607	-1.29	+HCOO, -H	confirme
12	Baicalin	C21H18O11	4.69	5640	445.0780	0.3632	0.82		confirme
3	Ginsenoside Rd	C48H82O18	4.97	368264	991.5475	-0.8503		+HCOO, -H	confirme
4	Ginsenoside Rg1	C42H72O14	4.99	1102946	845.4903	-0.0922		+HCOO, -H	confirme
15	Ginsenoside Rg1	C42H72O14	5.25	12929		-0.2179		+HCOO	confirme
16	Monomethyl lithospermate	C28H24O12	5.37	114604	551.1197	0.2131	0.39		confirme
17	Salvianolic acid A	C26H22O10	5.60	1545	493.1141	0.2131	0.18		confirme
18	Salvianolic acid C	C26H20O10	5.79	175372	491.0990	0.6454	1.31		confirme
19	Dimethyl lithospermate	C29H26O12	5.81	10725	565.1354	0.2655	0.47		confirme
20	Dimethyl lithospermate	C29H26O12	5.93	92868	565.1357	0.2033	1.02		confirme
21		C48H82O19	6.33		1007.5433	0.0201		+HCOO, -H	confirme
2	20-O-Glucopyranosyl ginsenoside Rf Notoginsenoside T	C64H108O31	6.62		1417.6854	-0.0201		+HCOO, -H	confirme
3		C59H100O27	6.93	7553	1285.6447	1.2916		+HCOO, -H	confirme
	Notoginsenoside Fa								
4	Ginsenoside Rg1	C42H72O14	7.06	34689	845.4906	0.2163		+HCOO	confirme
25	Cryptoacetalide	C18H22O3	7.10	9539	285.1497	0.0427	0.15		confirme
26	Notoginsenoside T	C64H108O31	7.16		1417.6854	-0.2771		+HCOO, -H	confirme
27	Notoginsenoside Fa	C59H100O27	7.20		1285.6443	0.8786		+HCOO, -H	confirme
28	Notoginsenoside R2	C41H70O13	7.21	219884	815.4801	0.3041		+HCOO, -H	confirme
29	Ginsenoside Rb3	C53H90O22	7.28		1137.6065	0.3184		+CH3COO	confirme
30	Notoginsenoside S	C63H106O30	7.43		1387.6732	-1.9177		+HCOO, -H	confirme
31	Notoginsenoside Fa	C59H100O27	7.49		1285.6434	-0.0362		+HCOO, -H	confirme
32	20(S)-Ginsenoside Rg3 (Ginsenoside Rg3)		7.51		829.4949	-0.5657		+HCOO, -H	confirme
33	Ginsenoside Rb1	C54H92O23	7.54		1153.6009	-0.2281		+HCOO, -H	confirme
34	20(S)-Ginsenoside Rh1 (Ginsenoside Rh1)	C36H62O9	7.65	157145	683.4374	-0.2032	-0.30	+HCOO	confirme
35	Ginsenoside Rb1	C54H92O23	7.66	8457	1153.6006	-0.5535	-0.48	+HCOO	confirme
36	Notoginsenoside Fc	C58H98O26	7.76	23444	1255.6320	-0.8412	-0.67	+HCOO, -H	confirme
37	Ginsenoside Rb2	C53H90O22	8.06	97093	1123.5891	-1.4610	-1.30	+HCOO, -H	confirme
88	20(S)-Ginsenoside Rh1 (Ginsenoside Rh1)	C36H62O9	8.52	37225	683.4371	-0.5177	-0.76	+HCOO	confirme
39	Notoginsenoside Fe	C47H80O17	8.54	15952	975.5528	-0.6039	-0.62	+CH3COO	confirme
10	Ginsenoside Rd	C48H82O18	8.68	880119	991.5489	0.5661	0.57	+HCOO, -H	confirme
11	Ginsenoside Rb3	C53H90O22	9.11	1715	1123.5896	-0.9565	-0.85	+HCOO	confirme
12	Ginsenoside Rd	C48H82O18	9.21	105207	991.5476	-0.7623	-0.77	+HCOO, -H	confirme
13	20-O-Glucopyranosyl ginsenoside Rf	C48H82O19	9.39	3311	961.5371	-0.6979	-0.73	-н	confirme
14	Ginsenoside Rh4	C36H60O8	10.23	65829	665.4266	-0.4154	-0.62	+HCOO	confirme
15	Danshenxinkun A	C18H16O4	10.27	22334	295.0972	-0.4093	-1.39	-Н	confirme
16	Ginsenoside Rh4	C36H60O8	10.39	97784	665.4261	-0.9420	-1.42	+HCOO	confirme
17	20(S)-Ginsenoside Rg3 (Ginsenoside Rg3)	C42H72O13	10.70	68724	829.4949	-0.6142	-0.74	+HCOO, -H	confirme
18	Ginsenoside F2	C42H72O13	10.79	8835	829.4944	-1.1291		+HCOO	confirme
19	Methylenedihydrotan-shinquinone	C18H16O3	11.12	54015	279.1022	-0.5008	-1.79	-H, +CH3COO	confirme
0	Salviolone	C18H20O2	11.25	28599	313.1442	-0.3307		+HCOO	confirme
1	Dihydrotanshinone I	C18H14O3	11.57	171319	277.0868	-0.2240	-0.81		confirme
2	Sugiol	C20H28O2	11.85	53468	299.2016	-0.0323	-0.11		confirme
3	Tanshinone II B	C19H20O3	12.31	95703	295.1340	0.0329	0.11		confirme
4	Miltirone	C19H20O3	12.31	47717	281.1547	-0.0260	-0.09		confirme
55	Salvianen	C21H21NO2	12.46	3930		-0.0260		+CH3COO	confirme
66	Miltiodiol	C21H21NO2 C19H22O3	13.37	5256	297.1492	-0.7997	-1.40		confirme
57	Ursolic acid	C19H22O3 C30H48O3	13.57	53957	455.3529	-0.4174	-0.42		confirme
57 58	Linolic acid		13.52	80398	279 2330	0.1933	-0.42		confirme
	LIDOUG ACIO	C18H32O2	13.73	80398	279.2330	0.0428	0.15	-n	confirme

表 1. 未知藥錠鑑別所得成分摘要表。在 UNIFI 中匯入 Component Summary Reporting Template (成分摘要報告範本) 就可自動獲得此表。

結論

本應用報告說明了運用 UNIFI Natural Products Application Solution 識別與推論未知樣本化學及中藥成分的完整工作流程。此工作流程從初步的非目標物篩檢進展到目標物篩檢程序。

以 UPLC/QTof MS 分析樣本時,僅需 14 分鐘即可完成。初步的非目標物篩檢鑑別出 37 種主要化學成分,明確顯示出分析樣本與丹蔘 (salvia miltiorrhiza) 和三七 (panax notoginseng) 的關聯性。透過在網際網路上搜尋已知 TCM配方,可以再次將實驗資料中所得的成分與相關中藥 (salvia miltiorrhiza、panax notoginseng、Panax quinquefolius 及 Crataegi fructus) 的有關成分進行比對。最後,透過 Traditional Medicine Library (中藥資料庫) 中具有的 103 種 salvia miltiorrhiza和 panax notoginseng相關的化學成分,鑑別及確認出樣本中的 59 種成分。與另外兩種可能藥草 Panax quinquefolius及 Crataegi fructus 相關的主要化學成分則找不到任何相符結果。因此,我們最終的結論是,該項未知製品可能是三七丹蔘或丹蔘複合錠。

UNIFI Natural Products Application Solution 以 UPLC/QTof MS^E 資料 擷取為基礎,結合內建自動鑑別程序的 Traditional Medicine Scientific Library (傳統藥物科學資料庫)。就完全未知樣本的 成分分析而言,此解決方案可說是一項創舉。其功能在 於能夠減少此類研究的盲點,並且大幅提高生產力。

參考資料

1. 應用 UNIFI Natural Products Application Solution 鑑別綠茶萃取物的化學 成分。Waters 應用報告,2013 年 11 月;720004837ZF。

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 720004840ZF AG-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