

SCIEX TripleTOF™系统数据处理软件快速鉴定中药复方入血后的II相代谢产物

Quickly identification of phase II metabolites in plasma after oral Compound Traditional Chinese Medicine by SCIEX TripleTOF™ system software

雷敏, 龙志敏, 郭立海
Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

Key Words : SCIEX TripleTOF™ System, Compound Traditional Chinese Medicine, Phase II Metabolites identification, Neutral loss search and Identification

引言

黄芪, 葛根和陈皮组成的中药复方, 具有养胃健脾、益气生肌、解酒毒的功效, 可用于胃黏膜损伤、脾胃虚弱等疾病的预防治疗以及酒前酒后的保健作用^[1,2]。

文献报道^[2,3,4], 黄酮及黄酮苷类成分为葛根和陈皮的主要有效成分。这些有效成分在入血后的代谢物一般以II相代谢, 即结合葡萄糖醛酸或硫酸为主。一系列黄酮苷元的II相代谢产物, 在质谱中裂解后会产生以基本母核黄酮苷元为子离子的特征碎片, 以及存在葡萄糖醛酸或硫酸的中性丢失。结合此特点, 在SCIEX TripleTOF™系统独有的数据依赖性采集结合动态背景扣除功能(IDA+DBS)采集方式下获得大部分化合物二级数据的基础上, 再使用SCIEX TripleTOF™系统数据分析软件(Peakview™软件或SCIEX OS软件)中半靶向特征中性丢失过滤功能, 可快速提取出具有相同中性丢失的一系列代谢物, 是一种高效的提取和鉴定方法。过滤功能界面见下图1。

本文实验方法特点

本文展示了四极杆串联时间飞行质谱系统(TripleTOF™系统)快速提取中药复方入血后的II相代谢物的工作流程, 即使用SCIEX TripleTOF™系统数据分析软件(Peakview™软件或SCIEX OS软件)进行半靶向过滤, 快速提取及鉴定中药复方入血后含葡萄糖醛酸中性

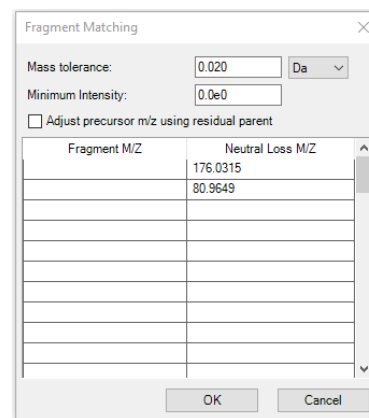


图1. SCIEX 数据分析软件中特征的碎片离子和中性丢失过滤功能

丢失(176.0315Da)和硫酸中性丢失(80.9649 Da)的代谢物, 方法具有以下特点:

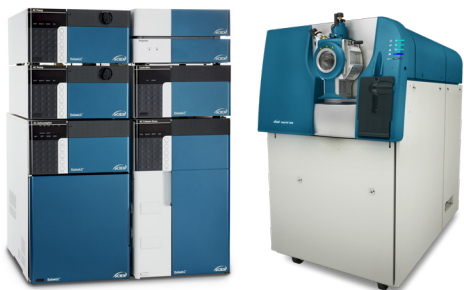
以SCIEX TripleTOF™系统的数据依赖性采集结合动态背景扣除功能(IDA+DBS)采集方式, 保证获得尽可能多化合物的二级数据的采集为前提。

利用特征中性丢失过滤的方式(Fragment Matching)提取中药复方入血样品, 可有效快速的提取出大量有快速提取及鉴定含葡萄糖醛酸中性丢失(176.0315Da)和硫酸中性丢失(80.9649 Da)的II相代谢产物。

该方法为SCIEX TripleTOF™系统采集的数据提供一种快速的, 有效的半靶向数据分析的思路, 并且能快速全面的提取和鉴定II相代谢产物。

仪器设备

SCIEX ExionLC™系统 + TripleTOF™系统



液相方法

色谱柱: HSS T3 (100 × 2.1mm, 1.7 μm)

流动相: A相: 水 (含5 mmol/L醋酸铵+0.1%甲酸)
B相: 甲醇

流速: 0.4 ml/min

柱温: 40°C

Time(min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
0.5	90	10
5	80	20
20	65	35
35	15	85
40	5	95
40.1	90	10
45	90	10

表1. 黄芪, 葛根和陈皮的复方中药中鉴定到的代谢物列表

序号	化合物名称	分子式	加和离子/带电数目	保留时间 (min)	母离子质荷比(Da)	质量偏差(ppm)	碎片离子质荷比(Da)
1	葛根素+GlcUA	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	[M-H]-	7.32	591.136	0.8	415.1053
2	大豆苷元+GlcUA+SO ₃	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀ SO ₃	[M-H]-	7.63	509.0401	1.1	333.0067,253.0505
3	大豆苷+SO ₃	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ SO ₃	[M-H]-	8.84	495.0607	0.9	415.1039,252.0434
4	染料木素+GlcUA+SO ₃	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ SO ₃	[M-H]-	10.32	525.0347	0.5	269.053
5	染料木素+Glc+SO ₃	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ SO ₃	[M-H]-	11.7	511.0559	1.3	431.1016,268.0371,269.0448
6	单羟基六甲氧基黄酮+SO ₃	C ₂₁ H ₂₂ O ₉ SO ₃	[M-H]-	11.84	497.076	0.1	417.1196,321.0434,241.0857

质谱方法

离子源: 电喷雾离子源ESI源, 负离子模式

采集方式: TOF MS (飞行时间质谱一级扫描) -12 MS/MS (飞行时间质谱二级扫描)

飞行时间质谱一级扫描TOF MS: 质荷比范围(Da)100-1500

飞行时间质谱二级扫描TOF MS/MS: 质荷比范围(Da)50-1500

自动校正系统(CDS)开启

动态背景扣除(DBS)开启

离子源参数:

电喷雾电压: -4500 V 气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GAS1: 55 psi 雾化气 GAS2: 55 psi

源温度 TEM: 450 °C 去簇电压 DP: -80 V

碰撞能量 CE ± CES: -40 ± 20 V

鉴定结果

该中药复方入血后的II相代谢产物主要以黄酮苷元类化合物结合葡萄糖醛酸或硫酸化为主, 因此在负离子模式下, 使用葡萄糖醛酸中性丢失(176.0315 Da)和硫酸中性丢失(80.9649 Da)进行半靶向过滤, 结合二级谱图, 总共鉴定到115个代谢物, 以下列表中列出其中的57个II相代谢产物及其碎片信息。鉴定详细结果见表1。

表1. 黄芪, 葛根和陈皮的复方中药中鉴定到的代谢物列表 (续)

序号	化合物名称	分子式	加和离子/带电数目	保留时间 (min)	母离子质荷比(Da)	质量偏差(ppm)	碎片离子质荷比(Da)
7	大豆苷元+GlcUA	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	[M-H]-	12.36	429.0826	-0.3	253.0501
8	毛蕊异黄酮+GlcUA+Glc	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₆	[M-H]-	12.7	621.1468	1.1	459.0896,283.0620,268.0468,113.0249
9	毛蕊异黄酮+GlcUA-1	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]-	13.76	459.0937	0.9	283.0582,268.0368
10	柚皮素+GlcUA	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]-	14.36	447.0938	1	271.06
11	柚皮素+SO3	C ₁₅ H ₁₂ O ₅ SO ₃	[M-H]-	14.54	351.0182	0.6	271.0611,149.0244
12	二氢大豆苷元+GlcUA	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H]-	15.01	431.0987	0.9	431.0978,351.0578,255.0667,149.0254
13	二氢大豆苷元+SO3	C ₁₅ H ₁₂ O ₄ SO ₃	[M-H]-	15.06	335.0234	0.9	255.0671,149.0247
14	染料木素+GlcUA	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H]-	16.58	445.0781	0.9	269.0459
15	大豆苷元+SO3	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ SO ₃	[M-H]-	17.96	333.0074	-0.1	253.0503,223.0400,209.0610,133.0287
16	毛蕊异黄酮+GlcUA-2	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]-	18.93	459.0937	1	283.0613,268.0368
17	毛蕊异黄酮+SO3-1	C ₁₆ H ₁₂ O ₅ SO ₃	[M-H]-	19.29	363.0181	0.3	283.0619,268.0383
18	5,7-二羟基-3,6-二甲氧基黄酮+SO3	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ SO ₃	[M-H]-	20.56	393.0293	1.9	313.0695,283.0281
19	毛蕊异黄酮+SO3-2	C ₁₆ H ₁₂ O ₅ SO ₃	[M-H]-	21.26	363.0183	0.9	283.0610,268.0379
20	橙皮素 Hesperetin+GlcUA	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M-H]-	21.96	477.1045	1.5	301.0718
21	三羟基四甲氧基黄酮+GlcUA-1	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅	[M-H]-	21.99	565.1206	1.3	389.0917,316.0223
22	染料木素+SO3	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ SO ₃	[M-H]-	22.12	349.0026	0.7	269.0464
23	二羟基三甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	[M-H]-	22.51	519.1148	0.7	343.0806,328.0536,313.0366,298.0102
24	5,7-二羟基-3,6-二甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	[M-H]-	22.62	489.1039	0.1	313.0692,298.0455,283.0277,255.0332
25	二羟基四甲氧基黄酮+GlcUA+SO3	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₄ SO ₃	[M-H]-	22.82	629.0824	0.9	453.0552,373.0928
26	毛蕊异黄酮+GlcUA-3	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]-	22.91	459.0931	-0.4	283.0602,268.0365,239.0349,224.0480,211.0402,113.0237,85.0292,59.0133
27	根皮素+SO3	C ₁₅ H ₁₄ O ₅ SO ₃	[M-H]-	22.97	353.0337	0.2	273.0764,165.0555,163.0395,135.0445,109.0291
28	芒柄花素+GlcUA	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	[M-H]-	23.31	443.098	-0.7	267.0659,252.0433,113.0240,85.0293
29	5,7,4'-三羟基-6,8,3'-三甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₄	[M-H]-	23.4	535.1096	0.6	359.0784,344.0562,329.0312
30	木犀草素+GlcUA	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H]-	23.59	461.0733	1.6	285.0392
31	三甲氧基柚皮素+Glc+GlcUA	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H]-	23.78	639.1933	0.5	463.1609,301.1079,286.0852,135.0449,113.0239
32	毛蕊异黄酮+SO3-3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅ SO ₃	[M-H]-	23.79	363.0181	0.1	283.0611,268.0371,239.0354,224.0470
33	三羟基四甲氧基黄酮+GlcUA-2	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅	[M-H]-	23.94	565.1204	1	389.0854,374.0640,331.0467,316.0227
34	甲氧基芒柄花素+SO3	C ₁₇ H ₁₄ O ₅ SO ₃	[M-H]-	24.17	377.0337	0.1	297.0751,281.0477,267.0304,253.0501,239.0348

表1. 黄芪, 葛根和陈皮的复方中药中鉴定到的代谢物列表 (续)

序号	化合物名称	分子式	加和离子/带电数目	保留时间 (min)	母离子质荷比(Da)	质量偏差(ppm)	碎片离子质荷比(Da)
35	根皮素+GlcUA	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]-	24.36	449.1086	-0.8	273.0779,271.0592,151.0392,135.0432
36	8-羟基-5,7,4'-三甲氧基黄酮 +SO3	C ₁₈ H ₁₆ O ₆ SO ₃	[M-H]-	24.46	407.0445	0.6	327.0856,297.0385
37	5,7,4'-三甲氧基黄酮+SO3-2	C ₁₈ H ₁₆ O ₅ SO ₃	[M-H]-	24.7	391.0491	-0.4	311.0907,267.1031,252.0788
38	5,7,4'-三甲氧基黄酮+GlcUA-3	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	[M-H]-	24.77	487.1248	0.4	311.0909,267.1030,252.0770
39	橙皮素+SO3	C ₁₆ H ₁₄ O ₆ SO ₃	[M-H]-	25.03	381.0291	1.4	301.1064
40	甲氧基芒柄花素+GlcUA	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]-	25.12	473.109	0.2	297.0763,282.0536,267.0293,239.0365
41	香叶木素+GlcUA	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M-H]-	25.23	475.0887	1	299.0568,284.0322
42	香叶木素+SO3	C ₁₆ H ₁₂ O ₆ SO ₃	[M-H]-	25.54	379.014	2.7	299.0546
43	芒柄花素+SO3	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ SO ₃	[M-H]-	25.63	347.0228	-0.8	267.0651,252.0423,223.0397,195.0450,135.0080
44	二羟基三甲氧基黄酮+SO3-3	C ₁₈ H ₁₆ O ₇ SO ₃	[M-H]-	25.72	423.0396	1.1	343.0830,328.0579,313.0356,285.0401
45	5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	[M-H]-	25.91	533.1296	-1	357.1002,342.0742,327.0514,113.0238
46	二羟基四甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₄	[M-H]-	25.94	549.1253	0.5	373.0931,358.0699,343.0461,328.0206,285.0063
47	二羟基五甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H]-	26.14	579.1359	0.7	403.1049,388.0804,373.0571,358.0336,345.0601,330.0401,315.0142,299.9920,175.0248
48	单羟基六甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H]-	26.31	593.1516	0.7	417.1222,402.0911,387.0733,372.0512
49	四羟基三甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₅	[M-H]-	26.73	551.1043	0.1	375.0732,360.0504,345.0248
50	二羟基四甲氧基黄酮+SO3	C ₁₉ H ₁₈ O ₈ SO ₃	[M-H]-	26.87	453.0497	-0.1	373.0923,358.0691,343.0457,300.0274,285.0040,257.0088,133.0284
51	5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮+SO3	C ₁₉ H ₁₈ O ₇ SO ₃	[M-H]-	26.98	437.0549	0.1	357.0985,327.0517
52	三羟基二甲氧基黄酮+SO3-1	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ SO ₃	[M-H]-	27.05	409.0236	0.4	329.0658,314.0441,299.0219
53	3'-羟基-5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮+GlcUA	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H]-	27.14	563.1401	-1	387.1092,372.0873,357.0629,342.0388,327.0116
54	3'-羟基-5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮+SO3	C ₂₀ H ₂₀ O ₈ SO ₃	[M-H]-	27.19	467.065	-0.7	387.1087,372.0850,357.0611,342.0361,327.0144,299.0201
55	三羟基二甲氧基黄酮+SO3-2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ SO ₃	[M-H]-	27.31	409.0239	0.9	329.0701,314.0427,299.0185
56	四羟基三甲氧基黄酮+SO3	C ₁₈ H ₁₆ O ₉ SO ₃	[M-H]-	27.6	455.0294	0.9	345.0252
57	5,7,4'-三羟基-6,8,3'-三甲氧基黄酮+SO3	C ₁₈ H ₁₆ O ₈ SO ₃	[M-H]-	28.01	439.0337	-0.9	359.0781,344.0540,329.0300,314.0073

备注: GlcUA为葡萄糖醛酸; SO3为硫酸; Glc为葡萄糖基; HCOOH为甲酸。

典型图谱

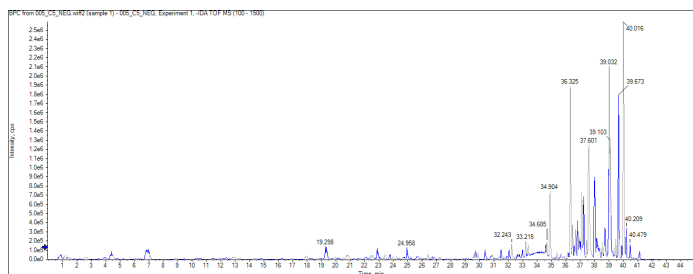


图2. 血浆负离子模式采集的BPC图谱

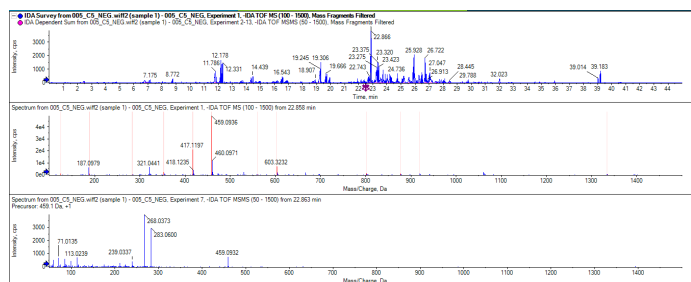


图3. 三张图谱从上到下依次为使用葡萄糖醛酸(176.0315 Da)和硫酸(80.9649 Da)作为特征中性丢失过滤后的图谱, 22.863 min对应的一级谱图, 以及其中一张有葡萄糖醛酸中性丢失的二级谱图

结构解析

以其中一张毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化代谢产物的二级谱图为例(见图4), 进行二级碎片结构归属, 推测其断裂位置见图3。

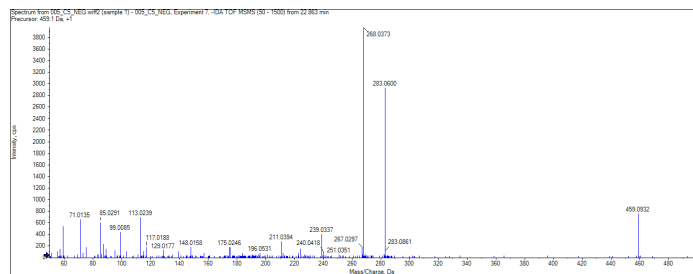


图4. 毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化代谢物的二级谱图

使用软件中的标注功能, 标注某一个质荷比的离子后, 软件自动计算该离子与其他离子之间的质荷比差, 便于推测中性丢失部分归属的类型, 见图5。根据该二级图谱推测毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化代谢物裂解过程, 见图6。

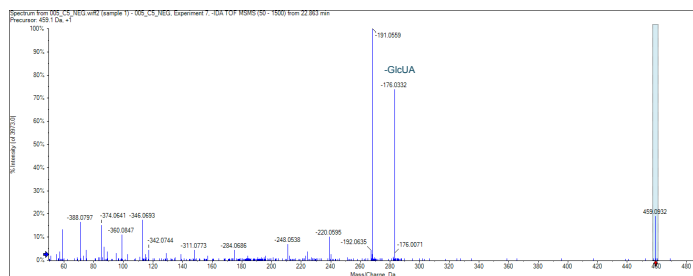


图5. 软件标注母离子质荷比后的二级质谱图, GlcUA为葡萄糖醛酸基

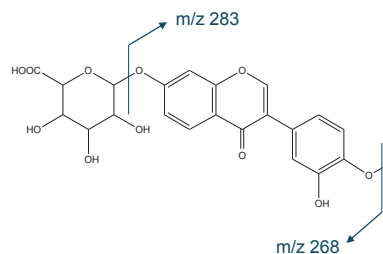


图6. 推测毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化代谢物可能裂解的位置, GlcUA为葡萄糖醛酸基

总结

本文使用了SCIEX TripleTOF™系统数据分析软件中特征中性丢失过滤的半靶向过滤功能, 可以快速的提取出大量的有相同特征结构的代谢产物, 是一种快速简单的鉴定流程。该文中半靶向过滤功能为过滤和鉴定中药复方入血后的II相代谢产物提供了很好的参考和思路。

参考文献

- [1] 来慧丽, 林静瑜, 桂雪虹, 等. 正交试验优选黄芪葛根汤保护胃黏膜的水煎工艺[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26 (1) :117-120.
- [2] 柯雪红, 罗燕, 李东晓, 等. 芪葛颗粒HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5):668-672
- [2] 田军, 吴凤镔, 丘明华, 等. 匙叶翼首草的化学成分[J]. 天然药物研究与开发, 1999, 12 (1) :35-37.
- [3] Guo-Dong Zheng, Ping Zhou, Hua yang, etc, Rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in Citri Reticulatae Pericarpium[J], Food Chemistry 136(2013):604-611.
- [4] 周永刚, 吴思, 毛飞, 等. 葛根中黄酮类化学成分的UHPLC-Q-TOFMS 分析[J]. 2013(31):116-119.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11969-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
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
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)