

TripleTOF® 5600系统结合中药MS/MS高分辨质谱数据库快速鉴定补骨脂成分

TripleTOF® 5600 system combined with Natrual Products Library (TCM) quickly identify Psoraleae components

谢亚平, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Xie Yaping, Si Dandan, Long Zhimin, Guo Lihai
SCIEX应用技术中心

Key word: TripleTOF® 5600 system, Natrual Products Library (TCM), Psoraleae, Targeted analysis

前言

民族药发源于少数民族地区, 具有鲜明的地域性和民族传统, 各民族在与疾病抗争、维系民族生存繁衍的过程中, 以各自的生活环境、自然资源、民族文化、宗教信仰等为根基, 创立了具有本民族特色的医药体系, 据不完全统计, 全国55个少数民族, 近80%的民族有自己的药物, 其中有独立的民族医药体系的约占1/3, 据有关资料报道, 目前我国民族药已达3700多种, 其中主要以藏、蒙、维、傣、壮五个民族药为典型代表。随着中国传统医药体系的发展和现代化, 民族药也逐渐成为中国传统医药体系研究的热点, 在中国传统医药体系和民族药的发展过程中, 研究工作者们也面临越来越多的机遇和挑战。

民族药是具有独立医药体系的中药资源, 它的成分分析是十分复杂和困难的一项工作, 复杂的成分是其发挥药效的物质基础, 也是促进中药体系发展的关键。由于中药的成分复杂, 如何快速的发现有效成分并且快速进行成分的鉴定是中药研究急需解决的问题。近些年来, 随着质谱技术的发展, 为中药的成分分析提供了更为快捷有力的技术手段, 但是目前的主要手段还是依赖于获得的质量数、碎片离子、文献及网络检索进行成分的鉴定分析, 想要更全面的进行中药的成分鉴定和分析, 这种方法相对比较耗时费力。

SCIEX TripleTOF®高分辨质谱仪采用强大的信息依赖性采集工作流程 (IDA), 可以实现一针进样同时获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS信息, 结合SCIEX公司的中药MS/MS高分辨质谱数据库, 软件自动计算理论分子量、同位素分布, 并将获得的TOF MS/MS图谱直接与中药MS/MS高分辨质谱数据库的MS/MS谱图进行匹配, 自动给出综合得分, 简便、快捷、准确地给出鉴定结果, 完成中药的成分鉴定。

试验方法

1. 样品的配制

样品溶于甲醇: 水 (50:50 v/v) 超声15 min, 12000 r·min⁻¹离心10 min, 上清液进样分析。

2. 液相条件

液相: ExionLC™ 30AD系统

色谱柱: XSelect HSS T3 (2.1 × 100 mm, 2.6 μm)

流动相: A为水 (含0.02%甲酸);

B为甲醇:乙腈:甲酸 (50:50:0.02 v/v/v)

流速: 0.3mL/min

柱温: 40°C

进样量: 2μL

梯度洗脱, 洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
1	95	5
23	5	95
27	5	95
27.1	95	5
30	95	5

3. 质谱条件

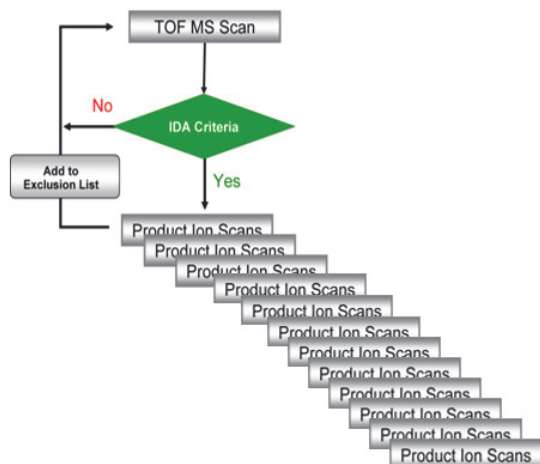
SCIEX TripleTOF® 5600

数据采集方法: TOF MS-IDA-12 MS/MS

动态背景扣除 (DBS) 开启

Accumulation time: TOF MS 150 ms

TOF MS/MS: 50ms



质量范围: TOF MS 100-1250 Da

TOF MS/MS 50-1250 Da

正负模式分别检测, 质谱参数如表2:

表2. 质谱参数

源参数	正模式	负模式
GS1 (psi)	60	60
GS2 (psi)	60	60
CUR (psi)	35	35
TEM (°C)	600	600
IS (V)	5500	-4500
DP (V)	60	60
CE	40 ± 20	-40 ± 20

数据处理

1. 靶向数据库匹配化合物鉴定流程

SCIEX中药MS/MS高分辨质谱数据库基于《中国药典》一部中的中药品种的有效成分为基础, 包含有皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、三萜类、苯乙醇苷、有机酸等近1300种化合物。在Master View软件中导入中药MS/MS高分辨质谱数据库中化合物列表进行峰提取和数据库匹配, 根据化合物的质量准确度、同位素分布和

MS/MS的匹配度, 综合评判得分。图1以补骨脂中二氢黄酮甲醚 (Bavachinin A) 为例, 展示了数据库鉴定和确证流程, 快速、准确鉴定到76个化合物。

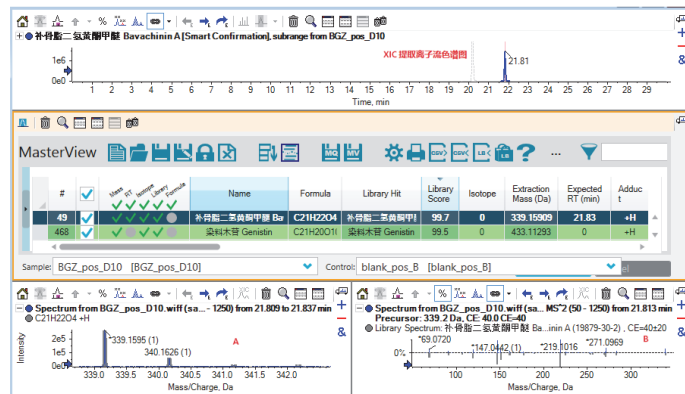


图1. 补骨脂二氢黄酮甲醚鉴定结果。

A图蓝色为测得的精确质量数和同位素分布, 灰色为待测物理论的精确质量数和同位素分布, 匹配度很好; B图为MS/MS匹配的结果展示, 蓝色代表实际采集到的补骨脂二氢黄酮甲醚的MS/MS, 灰色为数据库中的谱图, 镜像匹配直观。在结果列表中, 软件自动给出质量偏差、谱库匹配度、综合得分等信息, 为得到准确鉴定结果提供多重保障。

2. 靶向化合物列表鉴定流程

对于中药MS/MS高分辨质谱数据库中不存在的成分, 无法通过谱库匹配完成鉴定, 我们可以通过Master View导入已知的化合物列表 (包括化合物名称和分子式), 或通过软件进行分子式预测获得化合物列表, 进行峰的提取, 通过Fragments Pane功能将结构式与二级图谱匹配, 自动计算匹配得分, 从而完成结构鉴定。图2以brosimacutin E为例展示鉴定流程。

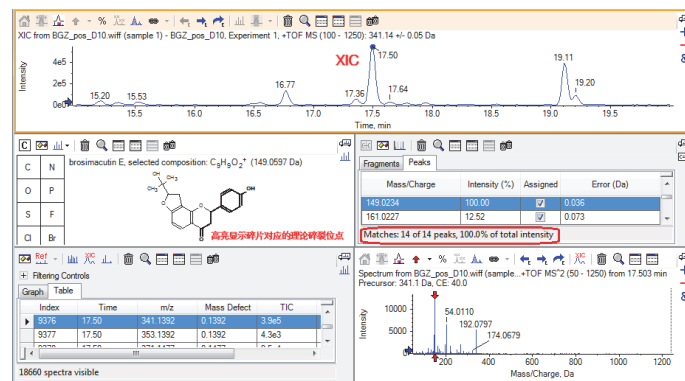


图2. Fragments pane自动完成brosimacutin E的结构匹配。

在正离子模式下鉴定得到93个化合物，提取离子流色谱图见图3。

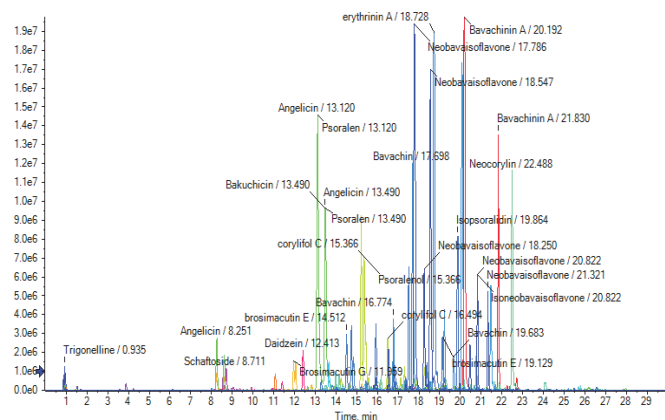


图3. 正离子模式下鉴定到的化合物的提取离子流色谱图。

在负离子模式下鉴定得到38个化合物，提取离子流色谱图见图4。

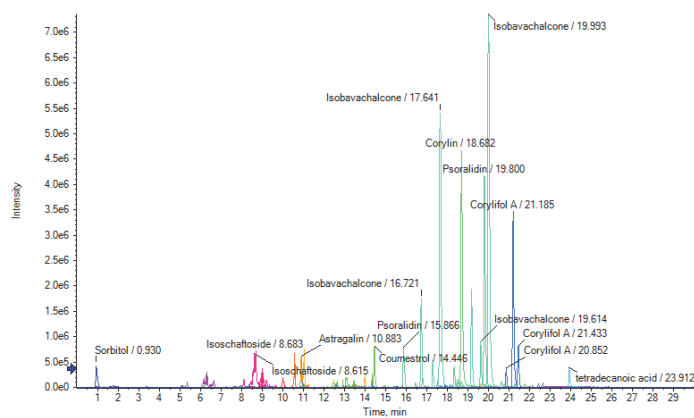


图4. 负离子模式下鉴定到的化合物的提取离子流色谱图。

结果

采用靶向结合中药MS/MS高分辨质谱数据库处理流程，对补骨脂进行成分分析，共鉴定出131个化合物，包括黄酮类、香豆素类、酚类、苯并呋喃类、核苷类、萜类、生物碱类、氨基酸类成分，部分鉴定结果见表3。所有化合物的质量偏差均在5 ppm以内，MS/MS结果均经过中药MS/MS高分辨质谱数据库匹配和理论碎片与实测MS/MS匹配，鉴定结果准确可靠。

表3. 部分鉴定结果列表

NO	Name	Formular	m/z	Error (ppm)	RT (min)	intensity	Adduct
黄酮类							
1	Schaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.1549	-0.4	8.71	1147662	+H
2	Bakuchicin	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.0389	-0.3	13.12	14071729	+H
3	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0549	-0.3	10.93	144484	+H
4	6-prenylnaringenin	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341.1383	-0.2	16.77	104120	+H
5	Genistin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1129	-0.1	9.93	166461	+H
6	Bakuchiol	C ₁₈ H ₂₄ O	257.1900	-0.1	22.71	634424	+H
7	Daidzin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.1181	0.3	8.56	742794	+H
8	Neocorylin	C ₂₅ H ₂₄ O ₄	389.1750	0.6	22.49	10304925	+H
9	Angelicin	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.0391	0.6	13.47	2518760	+H
10	Psoralen	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.0391	0.7	13.10	4479526	+H
11	corylifol C	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339.1230	0.8	15.20	846267	+H
12	Neobavaisoflavone	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	323.1281	0.9	17.77	5070045	+H
13	Astragalin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0937	1.0	10.88	505320	-H
14	erythrinin A	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	321.1125	1.1	18.71	5440705	+H

参考文献

- Li C C, Wang T L, Zhang Z Q, et al. Phytochemical and Pharmacological Studies on the Genus Psoralea : A Mini Review[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016(2):1-17.
- Yin F Z, Li L, Lu T L, et al. Quality Assessment of Psoralea fructus by HPLC Fingerprint Coupled with Multi-components Analysis[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 77(6):715-722.

表3. 部分鉴定结果列表。(续)

NO	Name	Formular	m/z	Error (ppm)	RT (min)	intensity	Adduct
香豆素类							
15	Bavacoumestan B	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	353.1020	0.1	15.95	557842	+H
16	isopsoralidin	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	337.1073	0.6	15.91	320843	+H
17	Sophoracoumestan A	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	335.0916	0.6	20.46	2039797	+H
18	corylidin	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	369.0972	0.9	13.66	1263656	+H
19	coumestrol	C ₁₅ H ₈ O ₅	267.0302	1.1	14.45	720219	-H
酚类							
20	Cyclobakuchiols A	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	273.1847	-0.8	20.13	158546	+H
21	Bisbakuchiols B	C ₃₆ H ₄₆ O ₄	543.3467	-0.4	26.20	132813	+H
22	Cyclobakuchiol C	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	275.2006	0	20.79	86182	+H
23	12-Hydroxyisobakuchiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	273.1850	0.2	19.55	82241	+H
24	Psoracorylifols C	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	289.1799	0.3	20.11	160458	+H
苯并呋喃类							
25	psoralenoside	C ₁₇ H ₁₈ O ₉	367.1021	-0.6	8.26	79805	+H
26	isopsoralenoside	C ₁₇ H ₁₈ O ₉	367.1025	0.2	8.62	69675	+H
核苷类							
27	Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	136.0617	-0.3	1.52	223635	+H
28	6-Hydroxypurine	C ₅ H ₄ N ₄ O	137.0456	-1.2	1.70	48108	+H
29	Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1041	0.3	3.88	378808	+H
氨基酸							
30	(+)-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.1189	-0.3	0.87	803851	+H
31	Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1019	-0.4	1.82	36065	+H
萜类							
32	Pulegone	C ₁₀ H ₁₆ O	153.1272	-1.3	10.98	122978	+H
33	β-Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	221.1899	-0.3	21.88	365390	+H
生物碱							
34	Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.0863	0	0.92	595263	+H
35	Cordycepin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	252.1089	-0.9	4.23	111711	+H
其他							
36	Raffinose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	505.1760	-0.6	0.96	37794	+H
37	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0244	-0.1	6.28	262885	-H
38	Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.2321	0.8	21.45	469371	+H
39	Vitamin B6	C ₈ H ₁₁ NO ₃	170.0810	-0.8	1.78	11332	+H

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9758-ZH-A

**SCIEX中国公司**

北京分公司
地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：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

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX