

使用UNIFI天然产物整体解决方案 鉴定未知中药片剂中的化学成分及推测其所含药材

乔立瑞¹、Rob Lewis²、Alex Hooper²、James Morphet²、谭晓杰¹、Kate Yu³

1. 沃特世科技（上海）有限公司，上海，中国
2. 沃特世公司质谱技术中心，曼彻斯特，英国
3. 沃特世公司，马塞诸塞州米尔福德市，美国

运用超高效液相色谱（ACQUITY UPLC® I-Class）、四级杆飞行时间质谱（Xevo® G2-S QTof）及UNIFI®天然产物整体解决方案鉴定未知中药片剂中的化学成分并推测其所含药材。这一UNIFI解决方案对未知物组分鉴定和可能药材推测的整体工作流程大大提高了未知中药体系组分定性工作的准确性及效率。

关键词

未知中药产品成分分析，未知中药产品药材推测与确证，UNIFI天然产物整体解决方案，UNIFI中药数据库，UPLC/QToF MS，MS^E，UNIFI天然产物工作流程，丹参，三七

背景介绍

中药是一个极其复杂的物质体系，其发挥作用的物质基础主要是药材中的化学成分。在应用纪要“使用UNIFI整体解决方案分析绿茶中的化学组分（部件编号720004837ZH）”中，我们已经阐述了如何应用UNIFI整体解决方案结合中药数据库来快速鉴定已知药材样品中的化学成分。对此类样品只需从UNIFI中药数据库导入相关的药材成分，并以它们为搜索目标对所得数据进行比对从而得出匹配成分列表并加以确证。此工作流程思路明确，步骤相对简单。

然而，人们在实际工作中往往需要对一些完全未知的样品进行化学成分分析，并要推测其中可能含有的中药材，这类工作的难度就很大，有时甚至不知从何入手。由于已知背景信息近乎于零，运用目前最常见的液质联用仪的分析即使得到大量数据，如何从庞大信息中缩小目标范围快速找到有用信息仍是所有科研人员共同面对的最大挑战。

对于未知中药产品的组分研究，传统的工作流程是：研究人员手工提取每个色谱峰，通过精确分子量来推导可能的分子式。然后根据分子式检索在线数据库，并且需要通过相关的二级碎片推导其可能的裂解途径，进而确定结构。该研究思路由点到面，这一系列环节中，不仅很多步骤需要研究人员的直接介入，同时对研究人员的化学背景要求很高，需要不断从信息的海洋中寻找答案。

UNIFI天然产物整体解决方案提出了一套新的全方位解决问题的思路。它以超高效液相色谱（ACQUITY UPLC I-Class）与四级杆飞行时间质谱（Xevo G2-S QTof）为基础，对样品进行非数据依赖的MS^E数据采集，将所得数据与UNIFI中药数据库进行比对，所匹配成分结构以其相应碎片经MassFragment™确证，最终通过预设的工作流程模版自动显示出所鉴定样品组分的详细信息。

本应用纪要便以未知物中药片剂为例阐述了如何采用UNIFI天然产物整体解决方案鉴定未知样品中的化学成分并推测其中可能的药材。

实验条件

样品处理

将未知中药片剂两片，去包衣，研成粉末状，取500 mg溶解于50 mL MeOH:H₂O (3:1)，超声溶解5 min，并以0.45 μm薄膜过滤，备用。

液相色谱条件

仪器：ACQUITY UPLC I-Class with FTN Sample Manager
 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3，2.1 × 100 mm，1.8 μm，40 °C
 样品室温度：15 °C
 流动相A：水 (0.1% 甲酸)
 流动相B：乙腈
 梯度：

时间	流速 (mL/min)	溶剂A (%)	溶剂B (%)	曲线
0	0.6	90	10	开始
1	0.6	90	10	6
12	0.6	5	95	6
14	0.6	0	100	1
17	0.6	90	10	1

质谱条件

仪器：Xevo G2-S QToF MS
 采集质量范围：100-1500 Da
 扫描时间：0.1 S
 采集模式：ESI+和ESI-分辨率模式，MS^E
 Lock mass：亮氨酸脑啡肽 (LE) 1 ppm (0.3 S扫描，间隔：15 S)
 毛细管电压：3 KV (ESI+) / 2.5 KV (ESI-)
 锥孔电压：100V
 碰撞能量 (eV)：low CE: 6 / High CE: 20-50
 电离源温度：120 °C
 脱溶剂温度：500 °C
 锥孔气流速：30 L/h
 脱溶剂气流速：1000 L/h
 数据采集时间：17 min

结果

采用超高效液相色谱 (UPLC I-Class) 与四级杆飞行时间质谱 (Xevo G2-S QToF) 对未知物中药片剂的相关化学成分进行分离以及质谱数据的采集。利用UNIFI天然产物整体工作流程结合整个中药数据库进行数据处理，软件自动鉴定288个组分，经MassFragment初步确证了其中含量较高的37个主要成分。通过已被确定化学成分与药材的关联分析，推测未知片剂中可能含有药材丹参及三七。通过网络搜索含此二味药材的已知中药成方将可能相关的药材在中药数据库中所列成分与实验数据再次比对，确证了该未知中药片剂中的59个主要成分皆来自丹参与三七。最终结论：该片剂主要只含有丹参和三七两种药材，很可能是三七丹参片或复方丹参片。

讨论

UNIFI天然产物整体解决方案包括ACQUITY UPLC I-Class超高效液相色谱、Xevo G2-S QToF四级杆飞行时间质谱以及含中药数据库的UNIFI软件信息平台。对于已知中药材成分分析的工作流程已经在应用纪要“应用UNIFI整体解决方案鉴定绿茶提取物化学成分” (部件编号720004837ZH) 中进行了详细阐述。对完全未知的样品，则需在采用该工作流程的基础上加入药材推断，在线检索可能的中药成方，以及从UNIFI中药数据库再次导入相关药材信息并进行再确证的步骤。图1显示了完整的未知物组分鉴定的工作流程。

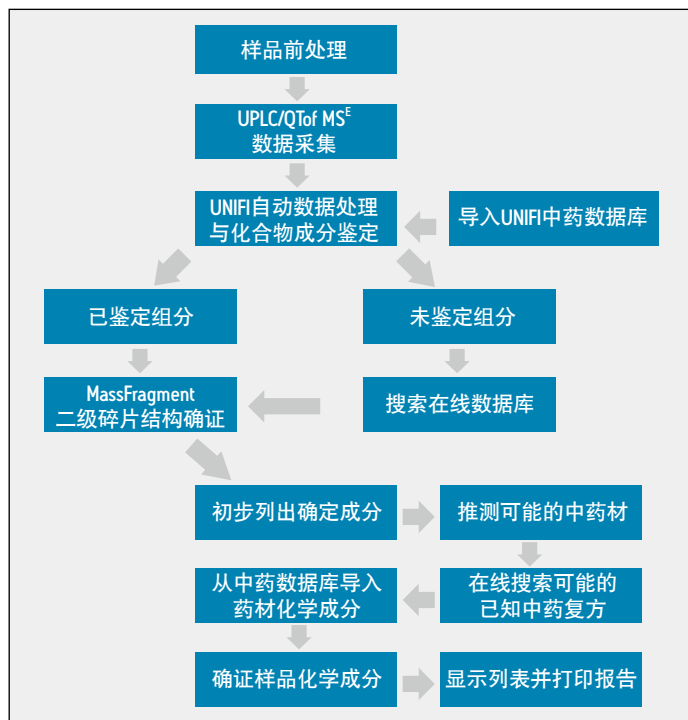


图1. 未知物中药复方组分鉴定的工作流程。

图2a是以二维图象显示的该未知中药片剂的UPLC/QToF MS基峰离子图（BPI），UNIFI平台亦可将同样的结果以三维图象显示（图2b）。与图2a所示的二维图谱相比，三维图象信息更丰富真实，可以更直观的了解整个样品的组分分布轮廓。比如从图中我们可以很快断定该样品化学组分的分子量分布范围主要集中在400-1000 Da。除此以外，也可以初步观察整个样品内化合物的共流出状况。

这一三维图谱是通过UNIFI独有的Apex 3D图象扫描的方式产生，除直观效果以外，更有助于提高后期定量定性工作的准确性，并且对噪音的识别与排除有较强的优势。

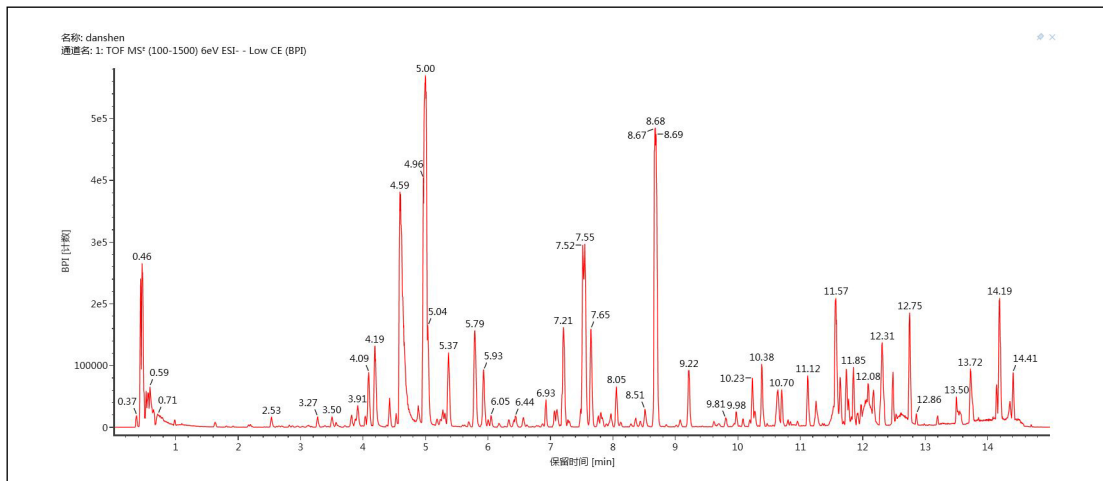


图2a. 未知物中药片剂的UPLC/QToF MS基峰离子图（BPI）。

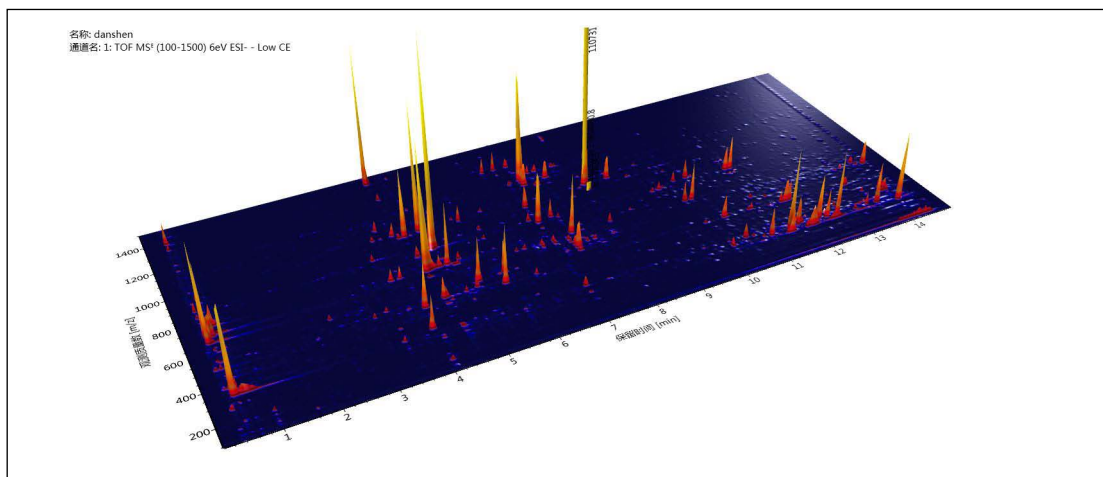


图2b. 未知物中药片剂的3D质谱图。

UNIFI天然产物整体解决方案工作流程有如下特点：

1. 从色谱峰的提取、分子式的确定、中药数据库的搜索、二级碎片的匹配到组分的初步鉴定全部由软件自动完成。
2. 研究人员仅仅需要对MassFragment已自动给出的碎片信息，初步的判断其合理性。
3. 如果怀疑假阳性或有组分未被匹配，研究人员再进行手动鉴定。

与传统的研究模式相比较，UNIFI天然产物整体解决方案将大量的数据筛选工作，即从信息的海洋中寻找有用目标这个一直靠研究者手动操作的 颈变成了软件的自动化流程，大大降低了研究人员的工作量，同时极大减少了这项工作的盲目性，从而使效率大大提高。

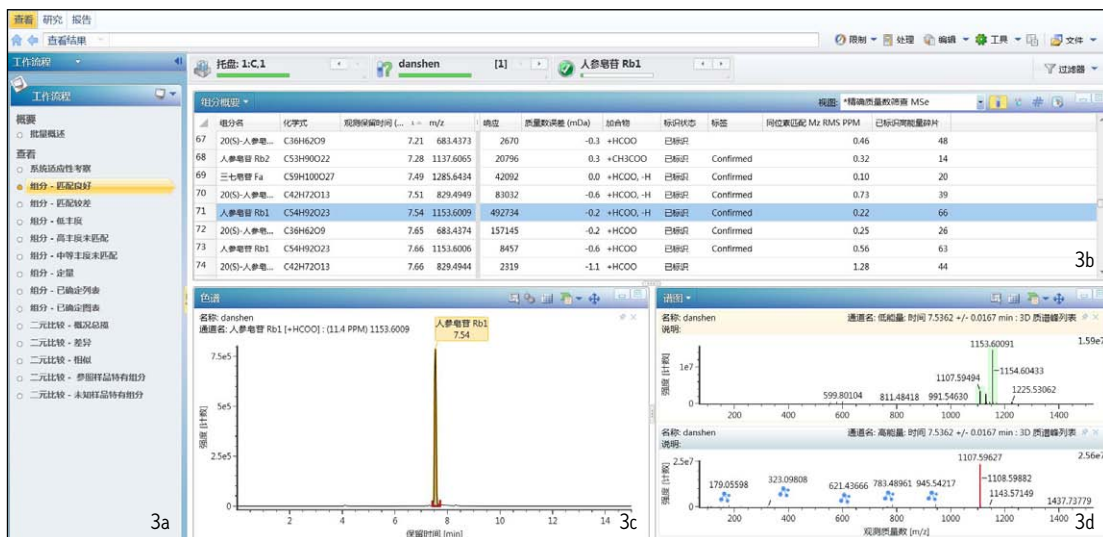


图3. 显示了未知中药片剂成分鉴定的结果界面（图3）。3a UNIFI天然产物的整体工作流程模版；3b 组分鉴定列表；3c与3b相对应的单个组分选择离子色谱图；3d与3c相对应的质谱图

图3显示了UNIFI软件处理后未知中药片剂成分鉴定的结果界面。在最初得到的成分列表中（3a），同一个保留时间的色谱峰可能含有多个同分异构体。此时需要通过化合物的加合离子，以及其相应的二级碎片信息（蓝色的图标）进一步排查推断所鉴定化合物的合理性。例如软件所自动鉴定的保留时间为7.54分钟的色谱峰为人参皂苷Rb1或Yesanchinoside E，此时点击图3d便可看到其相应的放大图（图4）。因MassFragment已经对该化合物的二级碎片结构进行自动匹配，研究人员可以很直观快速的观察碎片断裂的合理性。该化合物的裂解自糖苷键的断裂到最终原人参二醇苷元碎片的生成，都表明人参皂苷Rb1的结构更为合理。故可将人参皂苷Rb1定义为Confirmed。

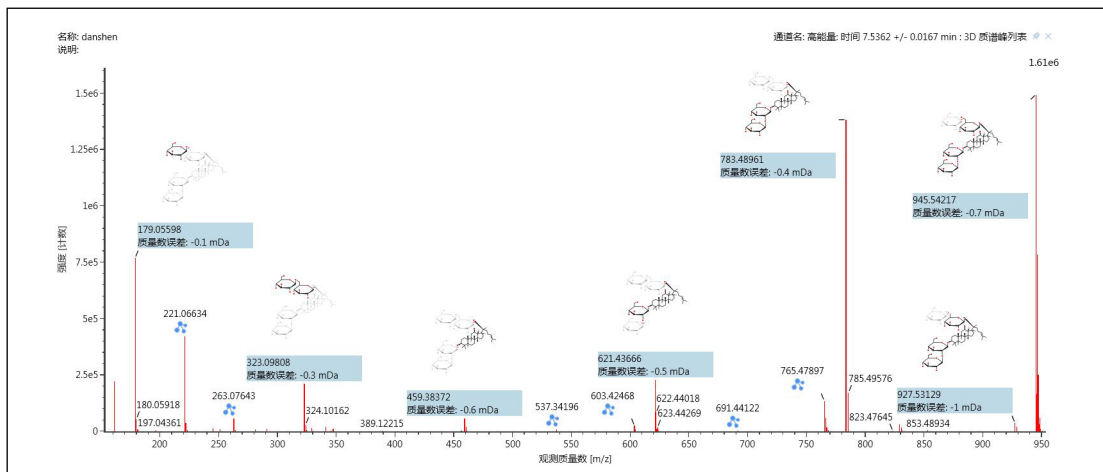


图4. 组分人参皂苷Rb1的二级碎片离子的MassFragment的匹配结果。

经过以上组分确证后，可以看到该未知物片剂中，含有人参皂苷，丹参酚，丹参酮，三七皂苷等化合物类型，经组分与药材的关联显示，该未知物片剂中可能含有原料药材丹参及三七。通过在线网络搜索，发现可能含有这两种药材的中药成方有三七丹参片，复方丹参片。当然还发现了含这两种药材外的其他配伍方剂，比如它们与西洋参或山楂等配伍的方剂。

再下一步的工作便已经由开始的无目标筛查，转变为对已知药材进行组分分析。其流程步骤与应用纪要“应用UNIFI整体解决方案鉴定绿茶提取物化学成分”（部件编号720004837ZH）完全相同。即将目标药材（丹参、三七、西洋参、山楂）从中药数据库导入与实验数据再次比对，结果没有发现与西洋参和山楂的特征组分相匹配的色谱峰（如西洋参皂苷、绞股蓝皂苷、山楂皂苷等特征组分），由此进一步确认该片剂中不含西洋参和山楂。同时所得样品主要色谱峰均能与丹参和三七的主要成分匹配（确证了59个主要组分），见表1。最终得出结论：该片剂中含丹参和三七药材，很有可能是三七丹参片或复方丹参片。

表1. 通过导入天然产物组份信息总览模板自动得到的未知物片剂中组分鉴定概况报告

组分名	化学式	RT (min)	响应	m/z	Error (mDa)	Error (ppm)	加合物	标签
1 丹参素	C9H10O5	0.99	7002	197.0451	-0.4148	-2.10	-H	Confirmed
2 原儿茶醛	C7H6O3	1.63	4283	137.0242	-0.1934	-1.41	-H	Confirmed
3 紫草酸	C27H22O12	3.50	19188	537.1027	-1.1279	-2.10	-H	Confirmed
4 丹酚酸 D	C20H18O10	3.57	7772	417.0820	-0.6713	-1.61	-H	Confirmed
5 20-O-葡萄糖基人参皂苷 Rf	C48H82O19	4.04	24616	1007.5421	-1.1674	-1.16	+HCOO, -H	Confirmed
6 迷迭香酸	C18H16O8	4.09	60848	359.0770	-0.2202	-0.61	-H	Confirmed
7 丹酚酸 A	C26H22O10	4.19	129863	493.1138	-0.1842	-0.37	-H	Confirmed
8 20-O-葡萄糖基人参皂苷 Rf	C48H82O19	4.43	62970	1007.5423	-0.9179	-0.91	+HCOO, -H	Confirmed
9 三七皂苷 Fc	C58H98O26	4.51	1010	1255.6329	0.0889	0.07	+HCOO	Confirmed
10 紫草酸 B	C36H30O16	4.60	724974	717.1453	-0.8088	-1.13	-H	Confirmed
11 三七皂苷 R1	C47H80O18	4.64	204023	977.5314	-1.2607	-1.29	+HCOO, -H	Confirmed
12 黄芩苷	C21H18O11	4.69	5640	445.0780	0.3632	0.82	-H	Confirmed
13 人参皂苷 Rd	C48H82O18	4.97	368264	991.5475	-0.8503	-0.86	+HCOO, -H	Confirmed
14 人参皂苷 Rg1	C42H72O14	4.99	1102946	845.4903	-0.0922	-0.11	+HCOO, -H	Confirmed
15 人参皂苷 Rg1	C42H72O14	5.25	12929	845.4902	-0.2179	-0.26	+HCOO	Confirmed
16 紫草酸单甲酯	C28H24O12	5.37	114604	551.1197	0.2131	0.39	-H	Confirmed
17 丹酚酸 A	C26H22O10	5.60	1545	493.1141	0.0894	0.18	-H	Confirmed
18 丹酚酸 C	C26H20O10	5.79	175372	491.0990	0.6454	1.31	-H	Confirmed
19 紫草酸二甲酯	C29H26O12	5.81	10725	565.1354	0.2655	0.47	-H	Confirmed
20 紫草酸二甲酯	C29H26O12	5.93	92868	565.1357	0.5784	1.02	-H	Confirmed
21 20-O-葡萄糖基人参皂苷 Rf	C48H82O19	6.33	19364	1007.5433	0.0201	0.02	+HCOO, -H	Confirmed
22 三七皂苷 T	C64H108O31	6.62	8889	1417.6854	-0.2913	-0.21	+HCOO, -H	Confirmed
23 三七皂苷 Fa	C59H100O27	6.93	44213	1285.6447	1.2916	1.00	+HCOO, -H	Confirmed
24 人参皂苷 Rg1	C42H72O14	7.06	34689	845.4906	0.2163	0.26	+HCOO	Confirmed
25 丹参隐螺内酯	C18H22O3	7.10	9539	285.1497	0.0427	0.15	-H	Confirmed
26 三七皂苷 T	C64H108O31	7.16	7914	1417.6854	-0.2771	-0.20	+HCOO, -H	Confirmed
27 三七皂苷 Fa	C59H100O27	7.20	83126	1285.6443	0.8786	0.68	+HCOO, -H	Confirmed
28 三七皂苷 R2	C41H70O13	7.21	219884	815.4801	0.3041	0.37	+HCOO, -H	Confirmed
29 人参皂苷 Rb2	C53H90O22	7.28	20796	1137.6065	0.3184	0.28	+CH3COO	Confirmed
30 三七皂苷 S	C63H106O30	7.43	871	1387.6732	-1.9177	-1.38	+HCOO, -H	Confirmed
31 三七皂苷 Fa	C59H100O27	7.49	42092	1285.6434	-0.0362	-0.03	+HCOO, -H	Confirmed
32 20(S)-人参皂苷 Rg3 (人参皂苷 Rg3)	C42H72O13	7.51	83032	829.4949	-0.5657	-0.68	+HCOO, -H	Confirmed
33 人参皂苷 Rb1	C54H92O23	7.54	492734	1153.6009	-0.2281	-0.20	+HCOO, -H	Confirmed
34 20(S)-人参皂苷 Rh1 (人参皂苷 Rh1)	C36H62O9	7.65	157145	683.4374	-0.2032	-0.30	+HCOO	Confirmed
35 人参皂苷 Rb1	C54H92O23	7.66	8457	1153.6006	-0.5535	-0.48	+HCOO	Confirmed
36 三七皂苷 Fc	C58H98O26	7.76	23444	1255.6320	-0.8412	-0.67	+HCOO, -H	Confirmed
37 人参皂苷 Rb2	C53H90O22	8.06	97093	1123.5891	-1.4610	-1.30	+HCOO, -H	Confirmed
38 20(S)-人参皂苷 Rh1 (人参皂苷 Rh1)	C36H62O9	8.52	37225	683.4371	-0.5177	-0.76	+HCOO	Confirmed
39 三七皂苷 Fe	C47H80O17	8.54	15952	975.5528	-0.6039	-0.62	+CH3COO	Confirmed
40 人参皂苷 Rd	C48H82O18	8.68	880119	991.5489	0.5661	0.57	+HCOO, -H	Confirmed
41 人参皂苷 Rb2	C53H90O22	9.11	1715	1123.5896	-0.9565	-0.85	+HCOO	Confirmed
42 人参皂苷 Rd	C48H82O18	9.21	105207	991.5476	-0.7623	-0.77	+HCOO, -H	Confirmed
43 20-O-葡萄糖基人参皂苷 Rf	C48H82O19	9.39	3311	961.5371	-0.6979	-0.73	-H	Confirmed
44 人参皂苷 Rh4	C36H60O8	10.23	65829	665.4266	-0.4154	-0.62	+HCOO	Confirmed
45 丹参新甾甲	C18H16O4	10.27	22334	295.0972	-0.4093	-1.39	-H	Confirmed
46 人参皂苷 Rh4	C36H60O8	10.39	97784	665.4261	-0.9420	-1.42	+HCOO	Confirmed
47 20(S)-人参皂苷 Rg3 (人参皂苷 Rg3)	C42H72O13	10.70	68724	829.4949	-0.6142	-0.74	+HCOO, -H	Confirmed
48 人参皂苷 F2	C42H72O13	10.79	8835	829.4944	-1.1291	-1.36	+HCOO	Confirmed
49 次甲二氢丹参酮	C18H16O3	11.12	54015	279.1022	-0.5008	-1.79	-H, +CH3COO	Confirmed
50 鼠尾草酚酮	C18H20O2	11.25	28599	313.1442	-0.3307	-1.06	+HCOO	Confirmed
51 15,16-二氢丹参酮 I	C18H14O3	11.57	171319	277.0868	-0.2240	-0.81	-H	Confirmed
52 柳杉醇	C20H28O2	11.85	53468	299.2016	-0.0323	-0.11	-H	Confirmed
53 异隐丹参酮	C19H20O3	12.31	95703	295.1340	0.0329	0.11	-H	Confirmed
54 丹参新甾	C19H22O2	12.48	47717	281.1547	-0.0260	-0.09	-H	Confirmed
55 Neosalvianen	C21H21NO2	12.66	3930	378.1703	-0.7997	-2.11	+CH3COO	Confirmed
56 丹参酮二酚	C19H22O3	13.37	5256	297.1492	-0.4174	-1.40	-H	Confirmed
57 熊果酸(乌苏酸)	C30H48O3	13.52	53957	455.3529	-0.1933	-0.42	-H	Confirmed
58 鞣酸	C18H32O2	13.73	80398	279.2330	0.0428	0.15	-H	Confirmed
59 十六(烷)酸	C16H32O2	14.19	145228	255.2332	0.2836	1.11	-H	Confirmed

结论

该应用纪要阐述了UNIFI天然产物整体解决方案应用于对未知物组分鉴定和可能药材推测的整体工作流程，该工作流程是一个从开始的无目标筛查逐步转化为有目标分析的过程。

UPLC/QToF MS 样品分析时间只需17分钟。前期无目标筛查初步鉴定主要化学成分37种，推断相关药材为三七与丹参。经网络搜索已知中药成方，将可能相关药材（丹参，三七，西洋参，山楂）再以有目标筛查方式与实验数据再次比对。结果，中药数据库中所列丹参和三七化学成分共103种，其中有59种主要成分与所得数据匹配并得到确认，而其余两味药材所含主要成分找不到合理匹配。最终结论：所检测未知中药片剂极可能是三七丹参片或复方丹参片。

UNIFI天然产物整体解决方案辅以中药数据库并结合组分结构的自动鉴定功能是崭新的中药复杂组分分析的解决方案。为复杂中药复方制剂，尤其是完全未知的样品的组分定性工作提供了新的思路，最终减少该类研究的盲目性，大大提高效率。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、UltraPerformance LC、UPLC、ACQUITY UPLC和Xevo是沃特世公司注册商标。MassFragment是沃特世公司商标。其它商标属于各自所有者。

©2013 年沃特世公司。于中国印制
2013年11月 720004840ZH LM-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5209 3866
上海：021-6156 2666
广州：020-2829 6555
成都：028-6554 5999
香港：852-2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

