

使用UNIFI天然产物整体解决方案 比较不同厂家双黄连口服液化学成分的同异

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

应用纪要描述了如何使用沃特世（Waters®）UNIFI®天然产物整体解决方案中二元比较的工作流程快速准确的检定来自两个不同厂家的双黄连口服液化学组分的异同点，从而了解同一产品不同厂家的成分差异，也有助于同一厂家监控不同批次间产品的质量稳定性。为所有类似的不同样品二元比较的工作提出了简单、有效的解决方案。

背景介绍

中国的传统医药既复杂又神奇，发展已有几千年的历史。但长期以来，如何判断中药质量的真、伪、优、劣缺乏系统、科学的分析方法。比如对不同产地中药材有效成份的控制，对不同栽培方式、不同采摘季节或不同加工炮制工艺后中药材的质量评价等一直没有统一有效的方法。近几年来，药学工作者在中药质量标准研究方面做了不少工作，积累了不少宝贵的经验和方法。但总体来说，中药二元比较工作耗时、成本高，甚至有的方法缺少一定的科学依据，不够充分、客观。该应用纪要采用先进的分离检测技术结合全新的UNIFI天然产物整体解决方案对此类应用提出了有效解决问题的思路。

不同产地药材化学成分的同异、不同厂家同一产品的差异、同一厂家不同批次间产品的质量稳定性等都需要对类似样品进行比较，观其成分异同，进而找出差异，为后期的研究提供明确的指导方向。随着分析仪器技术的不断进化，高分辨液质联用仪器（比如UPLC/QToF MS）的使用在逐步推广。高分辨液质联用仪器可使样品的分析时间缩短、分离效率提高，同时还有适应性、专属性高、检测限低、进样量少、溶剂消耗少、自动化程度高、定性能力高等特点，在中药质量标准控制的地位也会越来越高。

本应用纪要以两个不同厂家的双黄连口服液产品对比作为应用实例向大家阐述最新的沃特世UNIFI天然产物整体解决方案。该解决方案以超高效液相色谱（ACQUITY UPLC® I-Class），四级杆飞行时间质谱（Xevo® G2-S QToF MS）以及UNIFI中药数据库为基础，采用UNIFI二元比较工作流程对类似的样品进行比较，迅速找出差异，为后期的质量监控和制定相关的质量标准提供依据，从而大大提高了工作效率，并降低了对操作人员技术背景的要求。

关键词

中药产品二元比较，UNIFI中药数据库，UPLC®/QToF MS，UNIFI天然产物解决方案，UNIFI天然产物工作流程，双黄连口服液，中药质量监控，产品批次比对

实验条件

样品处理

取双黄连口服液200 μL 溶解于2 mL H_2O 中（相当于稀释十倍），备用。进样体积为1 μL 。

液相色谱条件

仪器：ACQUITY UPLC I-Class with FTN Sample Manger
 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 \times 100 mm 1.8 μm , 40 $^\circ\text{C}$
 样品室温度：15 $^\circ\text{C}$
 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	0.5	95	5	开始
1	0.5	90	10	6
8	0.5	55	45	6
12	0.5	45	55	6
13	0.5	5	95	6
15	0.5	95	5	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：100 V
 碰撞能量 (eV)：low CE: 6 / High CE: 20-45
 电离源温度：120 $^\circ\text{C}$
 脱溶剂温度：500 $^\circ\text{C}$
 锥孔气流速：60 L/h
 脱溶剂气流速：1000 L/h
 数据采集时间：15 min

双黄连口服液的主要药材来源为金银花、黄芩及连翘，具有疏风解表，清热解毒的功效。对于上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、病毒性肺炎等细菌和病毒感染性疾病有一定疗效。其中黄芩苷、连翘苷、汉黄芩素是其主要活性成分。中国有很多厂家都生产该口服液产品。故我们借此极有代表性的实例来阐述UNIFI天然产物整体解决方案中二元比较的工作流程（图1）。

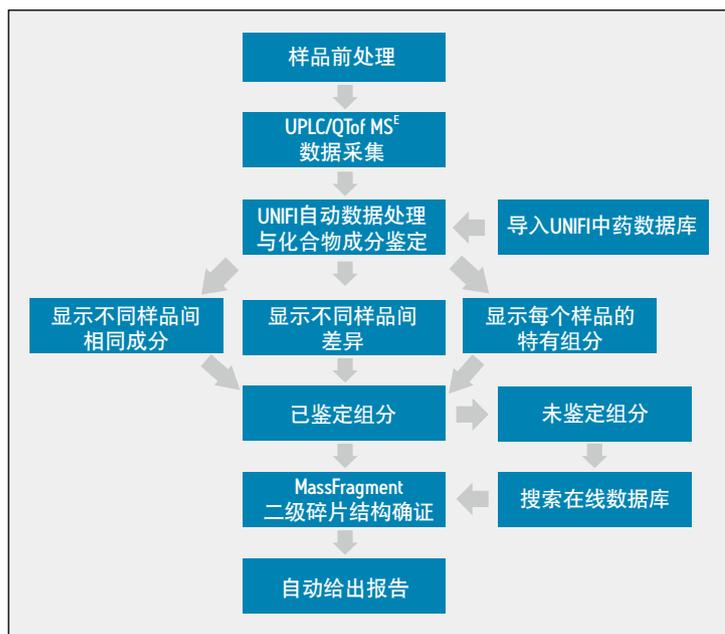


图1. UNIFI天然产物整体解决方案中二元比较的工作流程。

结果

采用超高效液相色谱与四级杆飞行时间质谱对两个不同厂家双黄连口服液的相关化学成分进行数据采集。采用UNIFI天然产物整体解决方案中二元比较工作流程并结合UNIFI中药数据库进行数据处理，结果明确显示了两个样品中相同组分图，差异组分图以及每个样品的特有组分列表。两个厂家样品二元比较的结果显示厂家一的口服液中连翘酯苷A、连翘酯苷B、右旋羟基连翘酯苷A、牛蒡苷、芦丁等的含量远高于厂家二的口服液，而厂家二口服液中黄芩苷含量则较高。

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软件平台。该解决方案中包含了五个预设的二元比较工作流程模板及一个结果报告模版，使数据的采集与处理、数据库检索、结构确认以及打印报告全部自动化。

图2是不同厂家双黄连口服液的UPLC/QToF MS基峰离子色谱对比图（BPI）。此图显示了采用超高效液相色谱分析复杂中药体系的优势，运行时间短（有效分离时间为12 min），且分离效率与峰容量皆高。同时，四级杆飞行时间质谱又提供了含精确质量信息的质谱数据。除此之外，从图2中可初步看出不仅这两个生产厂家的化学成分复杂，而且口服液成分大多类似，如果不借助有效软件的帮助从成分如此复杂的两个样品中快速准确找出其共性与差异几乎是不可能的。

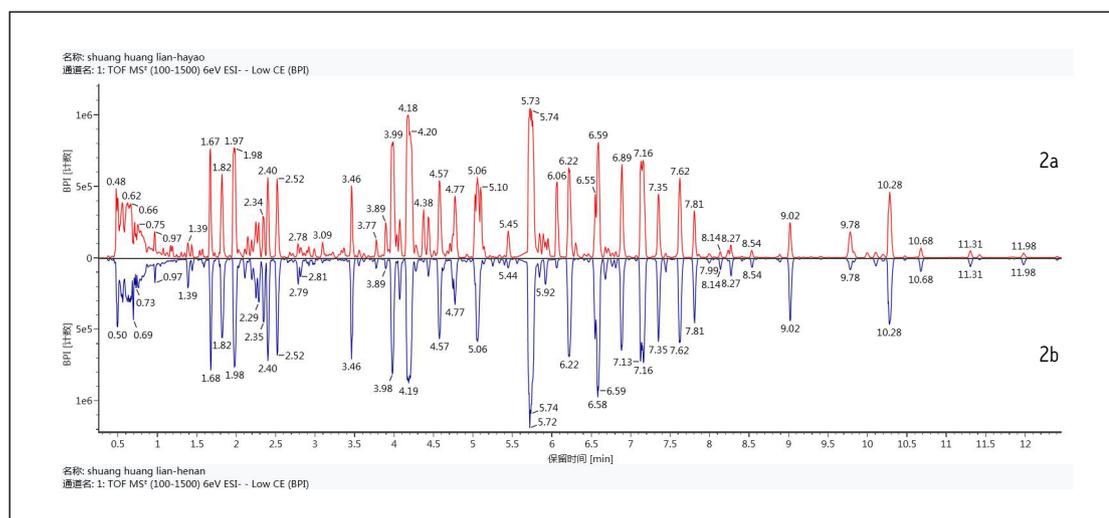


图2. 双黄连口服液的UPLC/QToF MS基峰BPI离子色谱二元比较图（2a：厂家一的产品；2b：厂家二的产品）。

天然产物研究无论是单一样品组分定性还是不同样品的组分比较，明确组分的详细信息是进一步进行其他研究的基础。对已知药材样品成分分析的工作流程已在应用纪要“采用UNIFI天然产物整体解决方案鉴定绿茶提取物中的化学成分（部件编号：720004837ZH）”有详细阐述。我们依此工作流程，从UNIFI中药数据库中导入与金银花、黄芩、连翘中药材有关的所有化学成分，然后进行数据处理，并对样品中的组分信息进行鉴定。点击任何一个预设的二元比较模板，便可得到与之相关的结果信息。比如，图3便显示了点击二元比较概况总览模板（Binary-Overview Plot）所得到的结果信息。

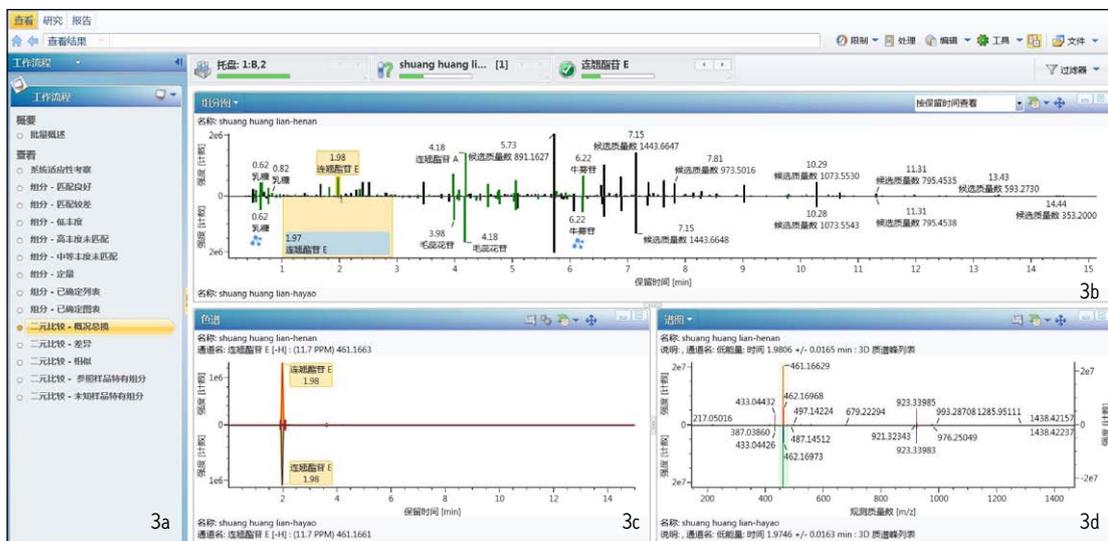


图3. UNIFI软件处理不同厂家双黄连口服液的二元比较结果。

图3a显示了UNIFI中预设的十四个工作流程模板。图3b是两个厂家样品的UPLC/QToF组分二元比较图。该图中的绿色棒状图为与中药数据库所列成分所匹配且软件自动鉴定的成分，黑色棒状图为没有找到匹配因而无法自动鉴定的成分。图3c是与图3b相对应的单一选择离子色谱图（XIC）比较（该图显示了保留时间4.03分钟的连翘酯苷B的XIC的比较）。图3d则是对应于3c所示成分的低能量通道质谱图比较。

若想进一步了解两个样品间的异同，可分别通过点击预设的Binary-Common工作模板或Binary-Difference工作模板直接看到两个样品间的相同成分与不同成分。比如，图4显示了点击Binary-Common工作模板所得的结果。图4a列出了两个样品中的相同组分（初步结果是1978个）。图4b显示了相应于图4a的每个组分在两个样品中的质谱响应值，反应了该成分在每个样品中的相对含量（该图显示的是汉黄芩素）。



图4. 点击Binary-Common工作模板所得的结果。

通过使用Binary-Common工作模板与Binary-Difference工作模板得到的两个样品间成分异同也可以用棒状图的方式更加直观显示。比如，在点击Binary-Difference工作模板后得到两个样品中成分差异的结果，可通过点击组分概要列表中的组分图直接看到图谱（图5）。此图使工作人员可以清晰直观的观察两个样品间的差异。

这两个口服液的差异结果显示，厂家一的样品黄芩苷含量明显高于厂家二，而连翘中很多组分例如连翘酯苷A、连翘酯苷B、右旋羟基连翘酯苷A等成分在厂家二的含量远高于厂家一。从图5中还直接可以看到样品中有些组分并没有与中药数据库中成分相匹配，因而没有得到相关的鉴定结果。此时如有需要，可进一步进行手动鉴定。

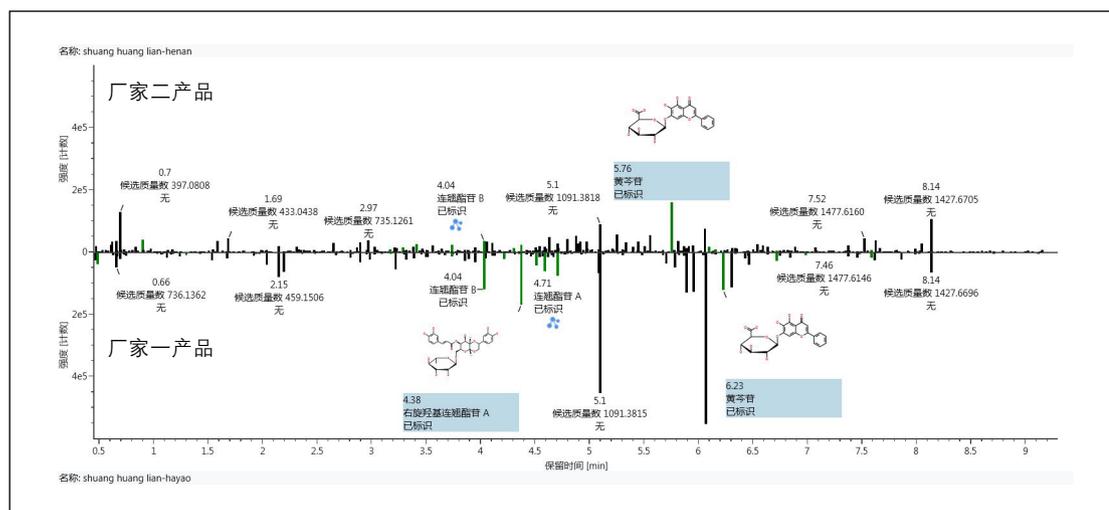


图5. 两个口服液产品经二元比较以后所得成分差异图。

两个样品的成分差异的详细信息可进一步通过应用Binary-Reference Unique及Binary-unknown Unique这两个工作模板了解，从而可以得到每个样品中的特有组分列表。UNIFI二元比较需要将其中一个样品列为参照样品（色谱或质谱峰在上），而将另一个样品列为未知样品（色谱或质谱峰在下）。在我们的样品中，我们随意将厂家二的样品定为参照样品，厂家一的样品定为未知样品。若想进一步观察厂家一样品中特有的成分直接点击Binary-Unknown Unique模板即可，见图6。结果提示厂家一特有组分193个。

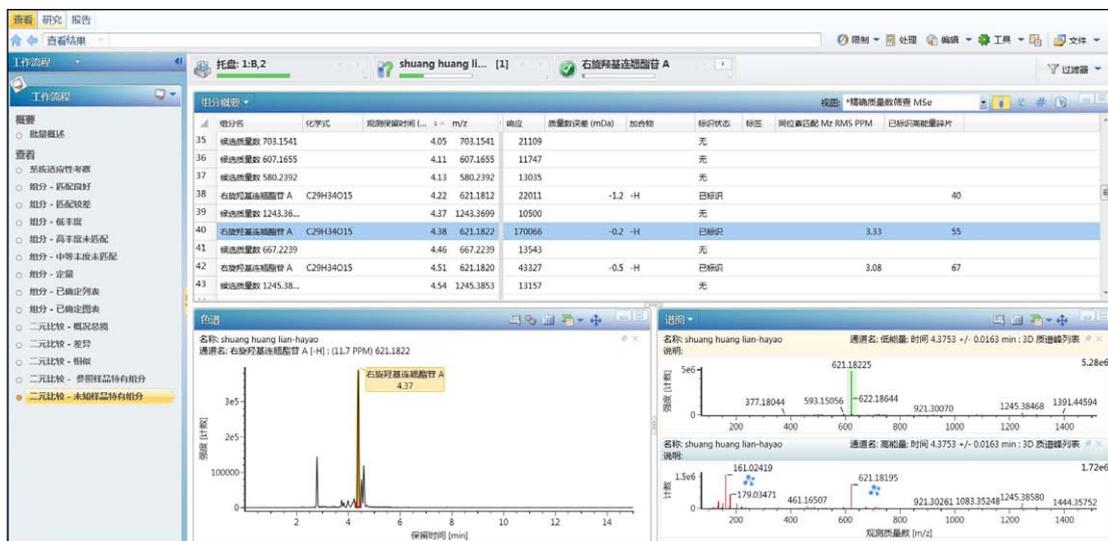


图6. 点击Binary-Unknown Unique模板所获得的厂家一的样品中特有的成分。

在对结果确证满意之后，可直接利用预设的二元比较报告模板打印报告。该报告包括了样品的信息，样品的采集和后处理方法，以及相同组分和不同组分信息的详细列表。图7为该报告中的一部分，显示了两个厂家的二元比较图谱，同时色谱峰都自动标有化合物的名称，结果一目了然。

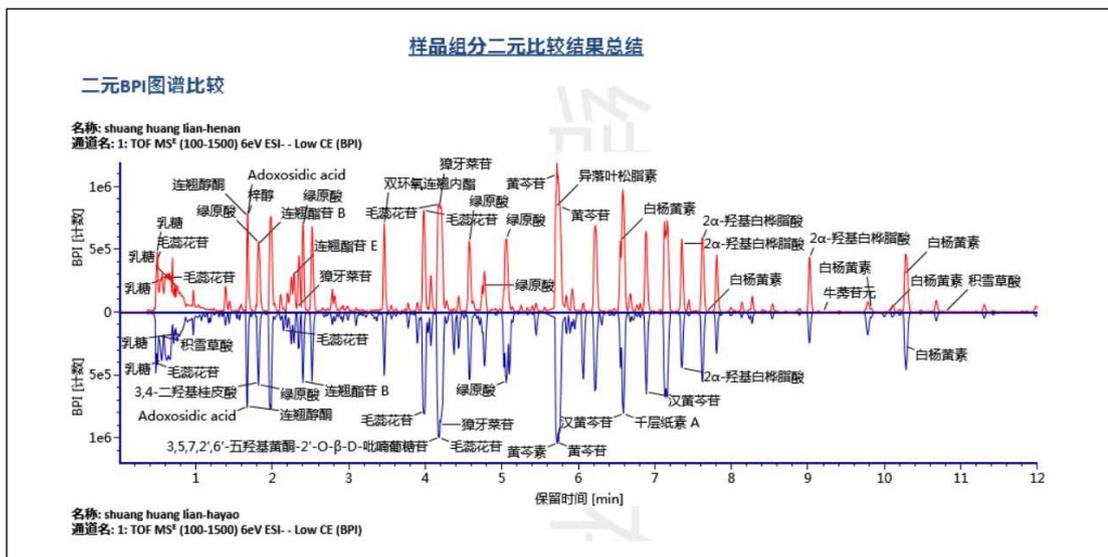


图7. 通过导入天然产物组分信息总揽二元比较报告模自动得到的报告。

结论

本应用纪要系统的介绍了如何使用UNIFI天然产物整体解决方案中二元比较工作流程比较两个不同厂家双黄连口服液的成分异同。该工作流程以UPLC/QToF MS数据采集为基础，辅以中药数据库并结合UNIFI中的结构自动鉴定功能，是崭新的解决方案。此方案适用于解决一系列问题，比如对比不同产地的药材或同一药材的不同采摘时间及炮制过程，同一产品不同厂家的比较、同一厂家不同批次间产品的质量稳定性等等。该解决方案中含有预设的五个二元比较工作流程模板及一个与其相关的报告模板，使研究人员可以迅速的对比不同的样品，看其成分的异同，为后期研究提供明确的思路。最终大大提高了中药科研与质量监控的有效性及其工作效率。

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 720004842ZH 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

