

## 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

乔立瑞<sup>1</sup>、Rob Lewis<sup>2</sup>、Alex Hooper<sup>2</sup>、James Morphet<sup>2</sup>、谭晓杰<sup>1</sup>、Kate Yu<sup>3</sup>

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

本应用纪要介绍了使用超高效液相色谱（UPLC®），四极杆飞行时间质谱（QToF MS）以及中药数据库为基础的UNIFI®天然产物解决方案分析绿茶中化学成分的方法。该解决方案将实验采集、数据处理与中药数据库的导入有机结合起来，使得复杂中药体系中化学组分的定性工作变得简单、有效，而且程序化，从而大大提高了工作效率，降低了对操作人员技术背景的要求。

### 背景介绍

中药的功效已为几千年的历史和现代临床验证所肯定。但中药的作用本质、物质基础、作用机理的研究尚且面临诸多挑战，其核心就是了解中药中所含的化学成分。

所有天然产物的研究都要起源于成分分析。然而成分分析的研究工作长久以来一直面临多重挑战。比如传统的成分分析方法复杂，耗时且低效等。归总起来，这类方法不外乎采用以下几个途径：

1. 购买相关标准品，与样品中的组分进行对比，这一途径的缺点是成本很高而且不一定能找到所有相关的标准物。
2. 采用各种分离制备手段对组分进行分离纯化，这其中缺点是具有极大的盲目性，耗时太长，同时还不可避免的涉及到大量的重复性工作。
3. 通过查文献来寻找答案，但过去的文献报道采用的数据往往采自低分辨率仪器，存在不少假阳性结果。以上无论哪种途径均对研究人员的技术背景要求较高。

中药物质基础研究效率低下一直是制约中药现代化的瓶颈。近年来，液质联用技术的兴起对解决这一挑战有所帮助，但未显示出关键性突破。目前最常见的液质联用解决方案依然是对每个色谱峰逐一鉴定，通过检索数据库寻找可能的结构信息，然后再查文献进一步匹配二级碎片的数据与裂解途径，最终确定化合物的结构。这类研究模式最大的局限性仍是耗时长、效率低，同时对操作人员的中药及化学背景要求很高。

### 关键词

中药成分分析，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，绿茶成分分析

## 实验条件

### 样品处理

取绿茶提取物 (Waters, No. 186006962) 33 mg 溶解于2 mL MeOH:H<sub>2</sub>O 1:3, 然后稀释至两倍浓度, 备用。

将儿茶素混合物标品 (Green Tea Catechin Mix) 用甲醇稀释至50 µg/mL, 进样量为1 µL。

### 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	99	1	开始
0.5	0.6	99	1	6
16	0.6	65	35	6
18	0.6	0	100	1
20	0.6	99	1	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<sup>E</sup>  
 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: 15-40  
 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: 20 min

本应用纪要以绿茶为应用实例向大家介绍最新的沃特世 (Waters®) 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)、四极杆飞行时间质谱 (Xevo® G2-S QTof MS) 以及UNIFI中药数据库为基础, 将实验采集、数据处理与中药数据库的导入有机的结合起来, 使得复杂中药体系中化学成分分析的工作变得简单、有效, 而且程序化, 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。图1概括了UNIFI天然产物整体解决方案成分分析的工作流程。

绿茶作为天然饮品深受大众的喜爱, 由于其没有经过发酵过程故较多的保留了鲜叶中天然物质, 含有茶多酚、儿茶素、儿茶酚、咖啡碱、氨基酸、维生素等化学成分。这些都为绿茶中化学成分的研究提供了良好的基础, 从而使我们借此实例来阐述UNIFI天然产物整体解决方案, 并用可得的标准品进行验证。整个工作流程从进样分析到报告的生成只需约两个小时。

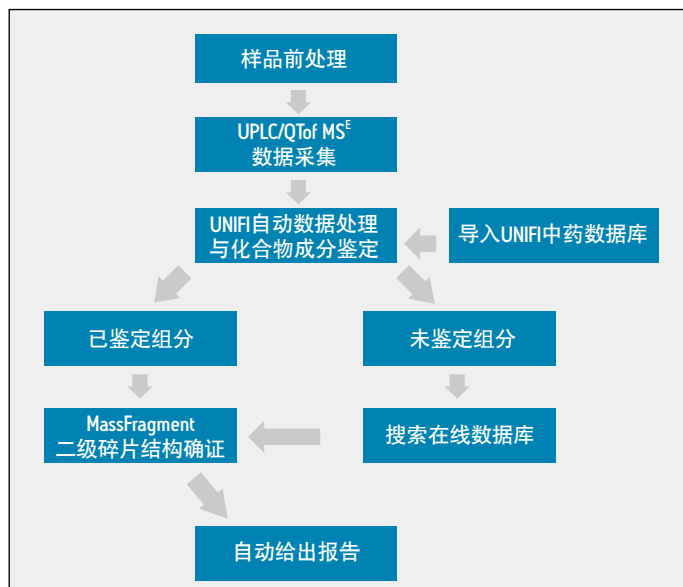


图1. UNIFI天然产物整体解决方案成分分析的工作流程。

## 结果

使用超高效液相色谱 (ACQUITY UPLC I-Class) 与四极杆飞行时间质谱 (Xevo G2-S QTof) 对绿茶提取物中的相关化学成分进行分离。采用 UNIFI 天然产物整体工作流程结合天然产物数据库进行数据处理, 软件初步鉴定28个组分, 经MassFragment™确证16个成分。整个工作流程从进样分析到报告的生成只需约两个小时。

## 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四极杆飞行时间质谱、含有UNIFI中药数据库的UNIFI软件平台。该整体解决方案提供了十四个预设的样品分析工作模板和三个结果报告模版，从而使数据采集、处理、数据库检索、结构确认以及结果报告全部自动化。

图2是绿茶提取物的UPLC/QToF MS基峰离子色谱图（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，不仅运行时间短（有效分离时间为15 min），且分离效率与峰容量都很高；同时四极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，采用MS<sup>E</sup>的数据采集模式使我们能在一次进样的情况下可以同时获得化合物分子量（低碰撞能量）以及与之对应的二级碎片离子信息（高碰撞能量）。这一切都为下一步的成分分析及结构认定奠定了良好的基础。

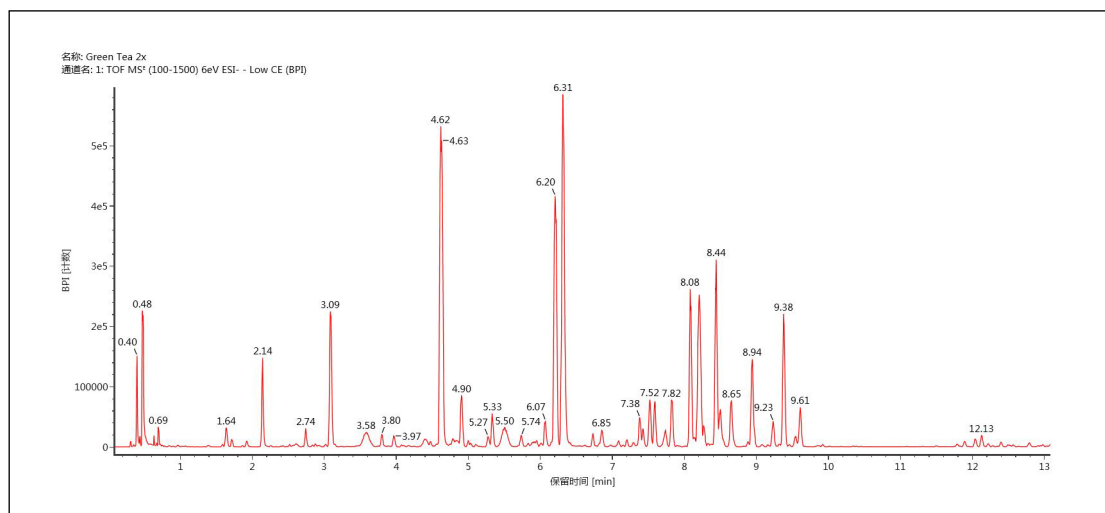


图2. 是绿茶提取物的UPLC/QToF MS基峰离子色谱图（BPI）。

天然产物研究瓶颈的另一个关键问题所在是尽管有大量的在线数据库，但至今没有任何与仪器分析有机结合专适用于中药成分研究的商业数据库。UNIFI天然产物解决方案首次填补了这一空白。我们首次提出的UNIFI中药数据库紧贴2010版中国药典，列入了所有此版药典收录的药材。图3显示了该数据库的基本结构及其包含的信息，包括：化合物的名称（中文与英文），化学结构、分子式、精确质量以及其药材产地。该数据库还针对每个所列药材提供了其名称（中文、拼音，及拉丁名），文献已报道的主要化合物等。除此以外，该数据库还将每个所列化合物进行了化学分类，为下一步碎片分析垫定了基础。

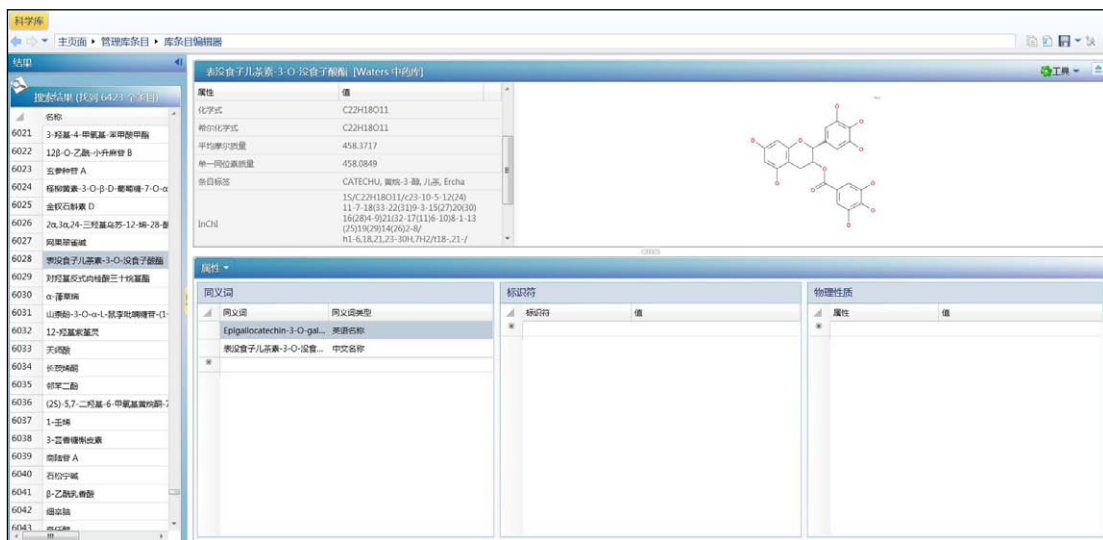


图3. UNIFI中药数据库的基本结构及其包含的信息。

UNIFI天然产物解决方案将该数据库的导入有机地融合进UNIFI成分分析的工作流程之中。图4是融合了UNIFI数据库整体工作流程后运行数据得到的结果。

图4a罗列了十四个预设的样品分析工作模板。点击该表单的任意一项便可在右边的4b、4c及4d中看到相应的结果。比如点击Component – Good Match便可以看到响应值高于2000 counts且分子量偏差小于3 ppm的被鉴定出的组分信息。其中，图4b是已鉴定的与数据库成分匹配的组分表。此表所列的每个化学成分均包含以下重要信息：化合物名称、分子式、分子量、响应强度、保留时间、质量偏差、离子的检测模式、加合离子以及鉴定状态。图4c是4b所显示组分对应的色谱图（此处显示的是咖啡碱）；图4d对应于4c所示成分的MS<sup>E</sup>质谱图（含母离子谱图和二级碎片谱图）。

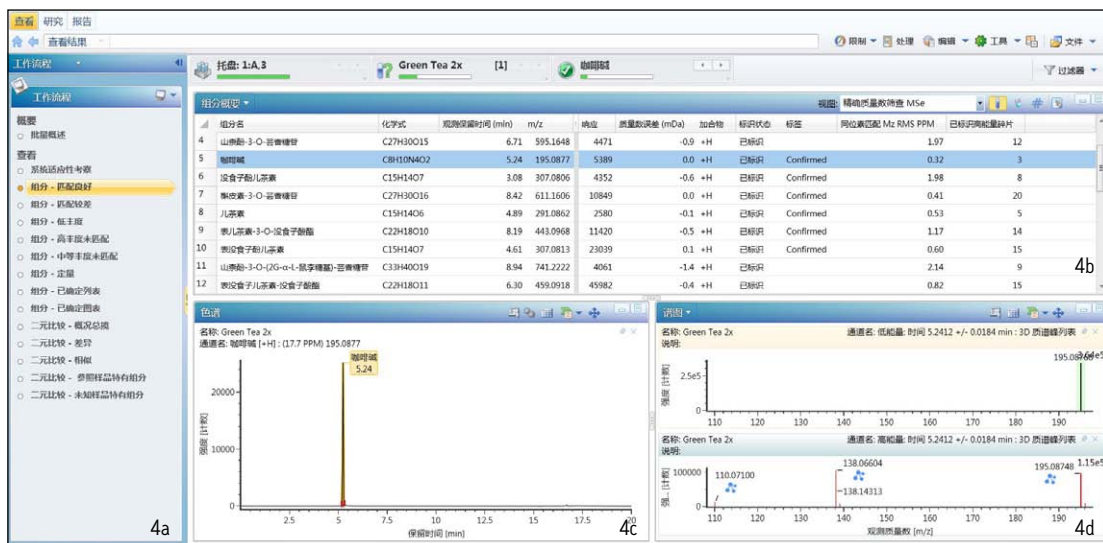



图4. UNIFI软件处理后绿茶提取物鉴定成分列表。4a: UNIFI天然产物的整体工作流程模板；4b: 成分分析结果，组分鉴定表；4c: 每个组分对应的谱图（此处显示的是咖啡碱）；4d: 对应于4c所示成分的MS<sup>E</sup>质谱图（含母离子谱图和二级碎片谱图）。



在之前UNIFI的成分分析解决方案中，研究人员需要提取每个色谱峰，查看其质谱图，基于得到的精确分子量，推导可能的分子式。然后再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可能的裂解途径，进而确定结构。现在，采用UNIFI天然产物整体解决方案，通过导入中药数据库后，数据处理及数据库检索可自动运行，且鉴定结果可以自动直接显示（图5）并且结构是否合理也已通过MassFragment被自动确证。

图4d中与化合物母离子相对应的每个二级碎片均可以通过点击蓝色的图标  直接看到。此时操作人员需要做的工作只是判断具体裂解碎片结构是否正确。如果其裂解合理，便可初步判定结构正确，从而将该化合物定义为已确认（Confirmed）。如果怀疑是假阳性，可进一步利用手动鉴定功能，搜索在线数据库并应用MassFragment来进一步推断。当然，对没有与UNIFI数据库匹配的组分也可如此操作而定性。最后确认的结果可以在Component – Confirmed Table中直接显示（图4b），同时也可以采用鉴定成分图（图5）或列表的方式显示并生成报告（图6）。

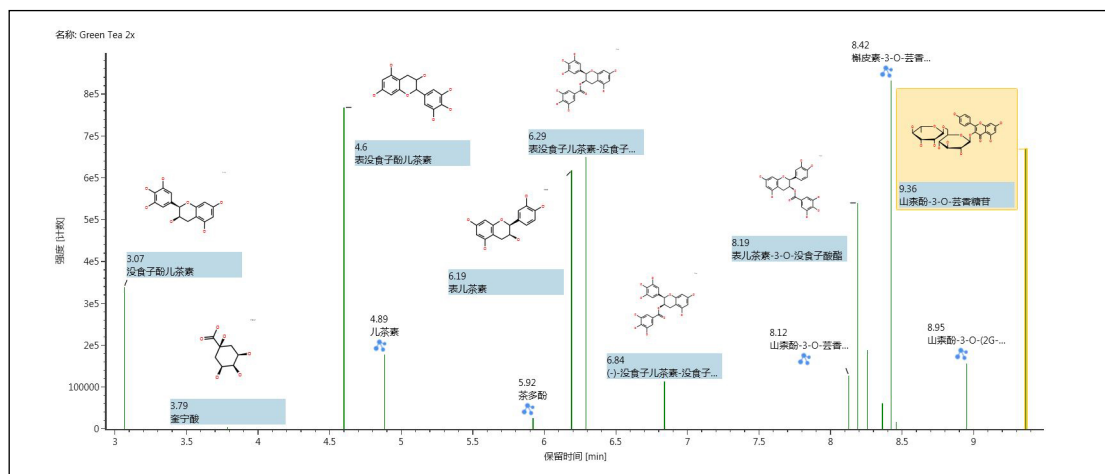


图5. UNIFI软件处理后绿茶提取物鉴定成分图。

UNIFI天然产物整体解决方案中包含三个预设的报告模板，以方便研究人员直接打印相关的报告。与成分分析相关的报告模板有：天然产物组分信息总览模板，天然产物详细组分信息模板。被测物中组分鉴定概况的报告只需导入天然产物组分信息总揽模板便可轻易获得（图6）。该报告包括了样品的信息、样品的采集和后处理方法，以及相关的各种数据信息。

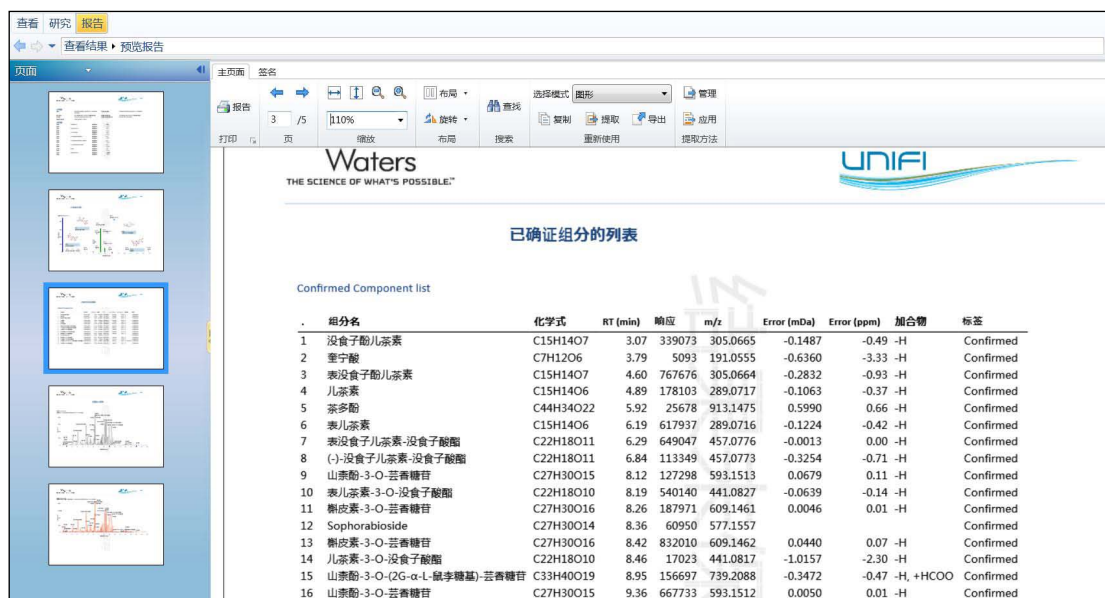


图6. 通过导入天然产物组分信息总览模板自动得到的被测物中组分鉴定概况的报告

## 结论

该应用纪要以绿茶成分分析为应用实例，系统的介绍了UNIFI天然产物整体解决方案成分分析的工作流程。UPLC超高效液相色谱分离克服了传统HPLC分离所固有的分离时间长、分离度有限、峰容量不高的各种缺陷。四极杆飞行时间质谱提供了精确定性信息和足够的动态范围，为中药组分的定性和定量奠定了扎实的基础。

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。UNIFI软件平台从采样到数据处理，到最后打印报告可一次性完成。绿茶成分分析整个流程仅需两个小时。该方案还含有预设的工作流程模板及各种报告模板，省去研究人员再编辑的漫长过程。

所有成分分析定性工作由软件自动进行，这一切皆使得复杂中药体系中化学组分的定性工作变得简单、有效、而且程序化，从而大大提高了工作效率，降低了对操作人员技术背景的要求。所有一切都为解决中药物质基础研究所面临的挑战，为中医药发展做出突破性贡献。

# 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 720004837ZH 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

