

基于Exploris 120的高分辨质谱平台结合Compound Discoverer软件鉴定复方中药中含硫化化合物

吴珊瑚 徐牛生

赛默飞世尔科技（中国）有限公司，上海 201206

关键词

中药，硫，Exploris 120，Compound Discoverer

1. 前言

中药产业是中华民族文化产业的重要组成部分，凝结了我国无数先辈的智慧结晶。一直以来，国家对中药产业的投入持续加强，聚焦于中药的安全性和有效性上研究也越来越多。另一方面，天然产物中结构的独特性和多样性对新药开发具有重大指导意义。天然含硫化合物作为中药的次级代谢物，普遍存在于动植物界中，且具有多种生理活性，如抗癌^[1-2]、抗高血压^[3]、抗病毒^[4]，因此天然含硫化合物有很大的潜力和发展空间成为先导药物。

复方中药中的含硫化合物含量很低，液相色谱-高分辨质谱联用方法作为常用高灵敏度的检测手段，可用于复方中药中检测鉴定低含量的含硫化合物。此次实验以复方中药为实验对象，基于Vanquish-Exploris 120高分辨液质联用平台结合Compound Discoverer 3.2软件开发出全面鉴定含硫化合物的方法，正离子模式下鉴定出12个含硫化合物，负离子模式下鉴定出37个含硫化合物，可被广泛用于中药复方中筛查鉴定含硫化合物，从而为先导化合物的开发利用提供更多的可能性。

2. 实验方法

2.1 样品信息

某复方中药粉末，称取适量以80%甲醇超声提取30min，以0.22μm微孔滤膜过滤后，离心，取上清10μL进样分析。

2.2 色谱方法

超高液相Vanquish flex系统，色谱柱为Xbridge (4.6×150 mm, 5μm)，柱温为35℃，流动相水相为0.1%甲酸水，有机相为乙腈，以三通分流方式进质谱，梯度洗脱条件如下：

Time(min)	Flow Rate (ml/min)	A	B
0.0	1.0	95	5
25.0	1.0	0	100
35.0	1.0	0	100
35.1	1.0	95	5
40.0	1.0	95	5

2.3 Exploris120质谱方法

采用DDA模式获得样本的一级和二级信息。离子源参数如下：喷雾电压 (+/-) : 3500V/2800V; 离子传输管温度: 300℃; 鞘气压力 50 arb; 辅助气压力 10arb; S-lens: 60。离子源温度: 350℃。质谱扫描参数：扫描范围 (DA) : 100-1000; Full Mass分辨率: 120000, MS/MS分辨率: 15000; 二级归一化碰撞能设置为 15、30和60, 以TOP4的模式采集二级数据。

3. 实验结果与讨论

3.1 数据处理流程

采集的数据均导入Compound Discoverer 3.2软件（简称CD）进行数据处理，将空白溶剂样本类型设置为blank（空白）组，中药复方采集样本设置为sample（样品）组，软件会自动将样本中的化合物响应与空白样本的对应化合物响应进行比较，默认将响应值比值在5倍以内的化合物标记为空白离子，在结果表格中自动隐藏。选择CD软件天然产物应用方向的默认工作流程（Natural Product Unknown ID w Stats Online and Local Database Searches）进行一些node的增删后进行含硫化合物的鉴定。

如图1所示，根据实验目的在默认工作流程模板上增加了“Create Pattern trace”、“Pattern Scoring”和“Search neutral losses”。

“Pattern Scoring”这个node功能是对所有提峰出来的化合物进行特征同位素模式的匹配，匹配成功的化合物在最终的化合物表格中会进行“pattern matches”的标记。图2列出了“Pattern Scoring”设置的参数，设置了两个特征同位素组成，其中一个特征元素组成设定为C17S，另一个特征元素组成设定为C23S，选择A0和两个A2同位素（³⁴S和²¹³C）构建特征同位素分布模式去进行匹配搜索，只要满足A0和两个A2同位素峰的测定的质量精度偏差在5ppm以内，同时，两个A2峰的丰度比在设定的丰度比偏差阈值以内，即认为该化合物符合设定的特征同位素分布模式。增加了两个“Create Pattern trace”以对应两个不同的特征同位素组成，用于提取匹配特征同位素模式成功的化合物的离子流图。

“Search neutral losses”的功能是搜索特定的中性丢失，在二级谱图中观察到含硫化合物在碎裂时容易丢失SO₃这个中性碎片分子，因此将SO₃写入中性丢失碎片库中，并在“Search neutral losses”这个node的参数界面中选中SO₃这个中性碎片分子（如图3所示）和质量精度偏差范围，这样设置后只要在二级谱图中匹配到了SO₃的中性丢失，就会对化合物进行“neutral losses”的标记。

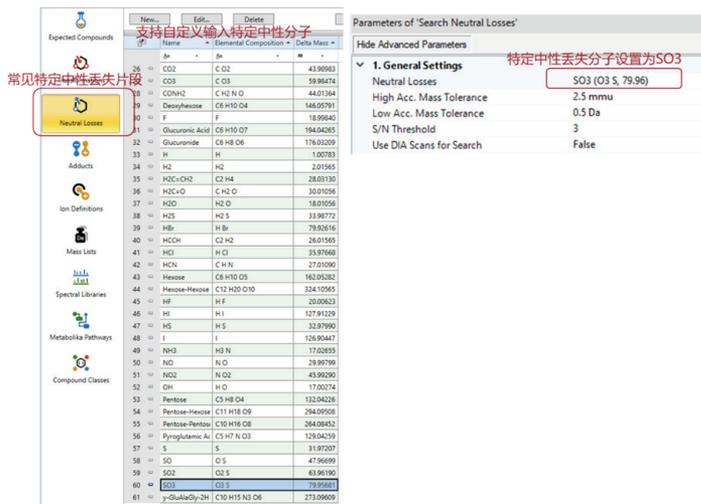


图3 中性丢失碎片导入以及搜索设置

3.2 含硫化合物鉴定示例

在结果表格中对特征同位素匹配成功的以及中性丢失匹配成功的化合物分别进行了标记，两者相互结合可以快速全面地查找含硫化合物。

含硫化合物的鉴定以m/z 380.99194为例，具体鉴定流程如图4所示，图4a为色谱图，图4b为一级质谱图，图4c显示的化合物结构框中画出推测的化合物结构，并用Fish scoring功能根据给定的母离子结构结合碎裂机理和碎片离子库预测母离子的碎片离子，图4d为二级碎片离子结构标注图，标注的碎片结构为母离子结构的进一步确证提供了参考依据。图4b中对化合物离子的加合形式进行了标注，除了[M-H]⁻外还有[2M-H]⁻的加合离子形式，同时放大[M-H]⁻的A2同位素，可以看到两个A2同位素峰均落在了绿色的阈值框里，说明匹配上了设定的特征含硫同位素的分布模式。由图4d可以看到，主要的碎片离子均进行了结构标注，说明拟定的化合物结构可信度高，同时从碎片离子谱图上，有特征的SO₃的中性丢失，说明含有磺酸基团。

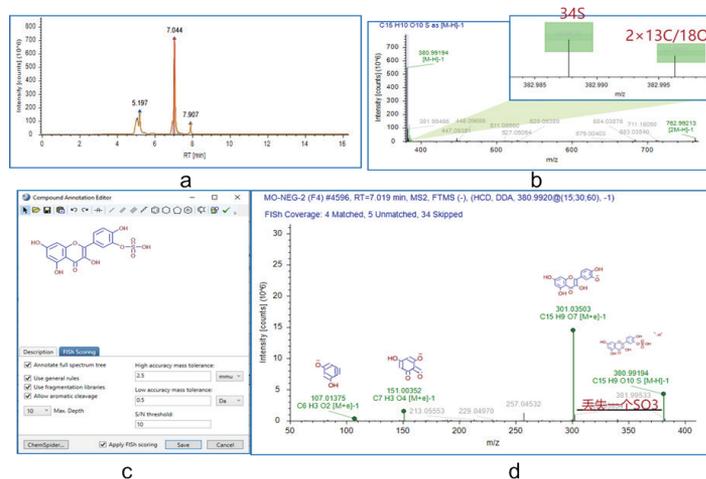


图4 m/z 380.99194代谢物鉴定流程

3.3 精准测定含硫化合物的同位素分布

本次实验中，为了达到精准测定含硫化合物的同位素分布，将一级分辨率设定为12万。对如图5所示，我们可以看到对于分子量在500以上的含硫化合物，分辨率需要达到12万，两个A2同位素峰才

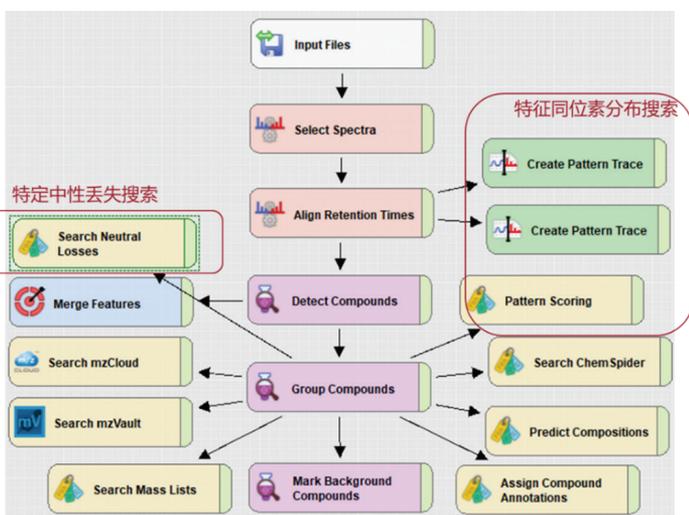


图1 Compound Discoverer 3.2软件用于含硫化合物鉴定的workflow

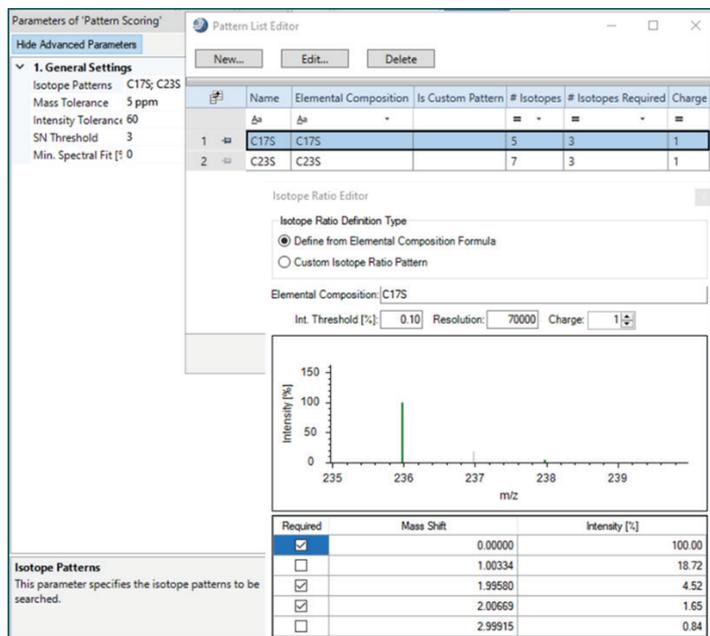


图2 用于搜索含硫化合物的“Pattern Scoring”设置界面

能达到分离的效果。另外，12万分辨率下实测的A2同位素的分离图，相比于理论12万分辨率下模拟的A2同位素分离图来说，由于受到基质的干扰和灵敏度的影响，A2同位素峰的分离效果通常要差于理论模拟的同位素分离情况。而在6万分辨率条件下，我们可以看到分子量大于500的化合物模拟的A2同位素分布中，两个A2同位素峰是没有分开的，说明对于分子量超过500的化合物，一级如果设定为6万分辨率，是不足以满足准确测定含硫化合物的同位素分布的。从上我们可以得出结论，分辨率是特征同位素模式精准测定的基础。

4. 总结

此次复方中药含硫化合物筛查的部分结果如图6所示。以Vanquish-Exploris120采集的分辨率高达12万的高质量数据达到精准测定含硫同位素分布模式的目的，搭载Compound Discoverer3.2的特征同位素模式搜索和中性丢失功能，快速全面地锁定复方中药中的含硫化合物，并结合碎裂机理和碎片离子库进行进一步的结构鉴定，为含硫化合物高效全面的筛查鉴定提供标准化流程，同时也可以延伸拓展到其他含有特征同位素或特征中性丢失的化合物的快速筛查鉴定上，为先导化合物的开发利用提供便捷性。

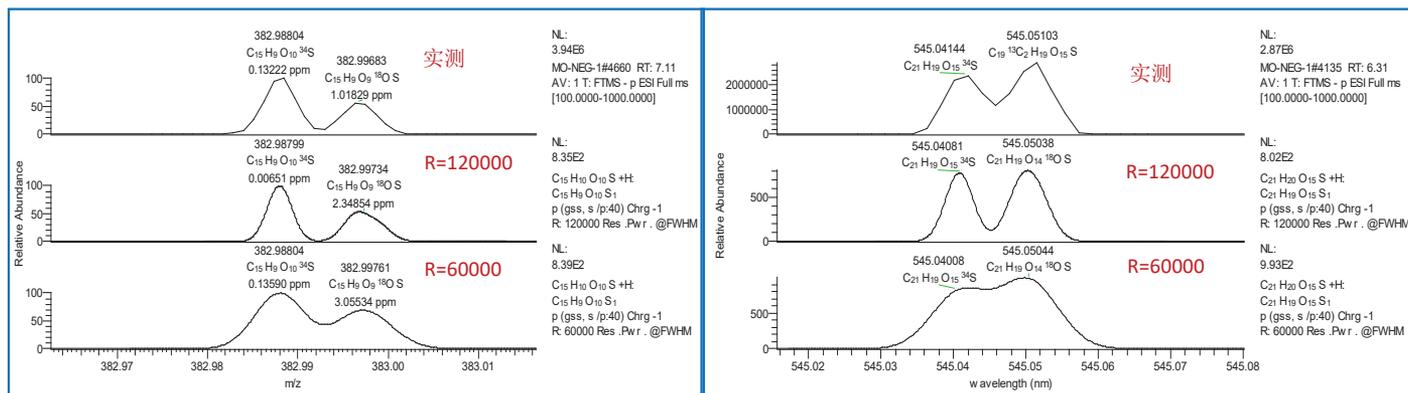


图5 分辨率对于含硫化合物同位素分布的精准测定影响

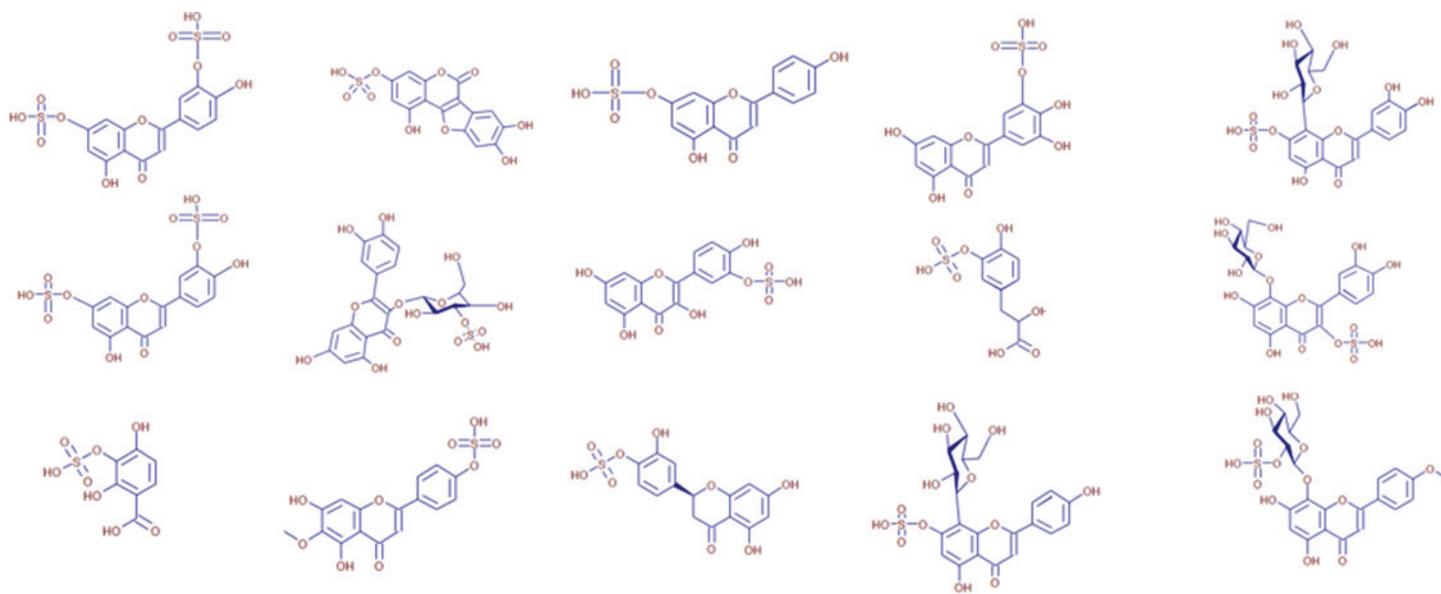


图6 含硫化合物鉴定的部分结果

参考文献

- [1] Li, Yanyan, and Tao Zhang. "Targeting cancer stem cells with sulforaphane, a dietary component from broccoli and broccoli sprouts." *Future oncology* 9.8 (2013): 1097-1103.
- [2] Pinto, John T., and Richard S. Rivlin. "Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic." *The Journal of nutrition* 131.3 (2001): 1058S-1060S.
- [3] Iksen, Iksen, Ginda Haro, and Masfria Masfria. "PENETAPAN KADAR KALIUM, KALSIMUM, DAN NATRIUM PADA DAUN KUCAI (Allium schoenoprasum L.) SEGAR DAN DIREBUS SECARA SPEKTROFOTOMETRI SERAPAN ATOM." *Journal of Pharmaceutical And Sciences* 2.2 (2019): 24-28.
- [4] 叶青, 曹卫国. 硫酸酯类化合物的合成与应用研究进展^[4]. *有机化学*, 2001, 21(10):697-707.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC