

应用纪要

## 通过精确质量数筛查和发现分析植物碱

---

Jeff Goshawk, Michelle Wood

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

---

## 摘要

本研究采用UNIFI法医毒物筛查应用解决方案筛查了一系列植物碱，由此清楚地展示了科学数据库条目可以便捷地进行创建和更新。我们使用UNIFI科学信息系统v1.8处理MS<sup>F</sup>数据，检测到了这些植物碱的多种加合物。碎片离子匹配功能还能够为高能离子分配子结构。此外，研究还证明这款新的发现工具对解析未知组分很有帮助。

## 优势

使用UNIFI法医毒物筛查应用解决方案<sup>1</sup>分析植物碱，证明谱库创建和扩展的简便性。本应用纪要还展示了UNIFI科学信息系统v1.8中新增的一系列新发现工具的强大功能。

---

## 简介

过去十年来，飞行时间质谱(Tof-MS)在多残留分析中的应用越来越广泛。精确质量数有助于提高物质鉴定的专属性，结合同位素数据还有望给出可能的元素组成。在进行复杂的多阶段化学结构表征时，提出元素化学式通常是这整个过程的起点。

就筛查而言，精确质量数仪器相较于标准质量仪器具有显著且关键的优势，这类仪器不需要参比物质就可以运行筛查方法。在这个特定的工作流程中，理论（预期）精确质量数可以根据元素化学式凭经验确定。这为毒理学应用提供了一种有价值的方法，让分析人员可以“前瞻性”地分析新型精神活性药物或者尚无参比物质可用的新型物质和代谢物。

沃特世一直在持续扩展UNIFI毒理学科学数据库，因此该数据库可用于一系列植物碱的分析。植物碱是来源于植物和植物材料的含氮化合物，它们具有药理活性，被用作药物和娱乐性物质已有数百年之久。因此，这类物质的分析在法医学领域具有重要意义。UNIFI科学信息系统中的目标物质分配和结构表征工具可通过分析这些物质来评估。

## ACQUITY UPLC条件

系统： ACQUITY UPLC I-Class (FTN)

色谱柱： ACQUITY HSS C<sub>18</sub>, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm

运行时间:	15 min
样品瓶:	沃特世最大回收样品瓶
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	5 mM甲酸铵水溶液, pH调节至3.0
流动相B:	含0.1%甲酸的乙腈

### 梯度:

时间	%A	%B
0.00	87	13
0.50	87	13
10.00	50	50
10.75	5	95
12.25	5	95
12.50	87	13
15.00	87	13

## 质谱条件

质谱系统:	Xevo G2-S QToF
电离模式:	ESI+
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气流速:	800 L/h
参比质量数:	亮氨酸脑啡肽[M+H] <sup>+</sup> = $m/z$ 556.2766
采集范围:	$m/z$ 50~1000
扫描时间:	0.1 s
毛细管电压:	0.8 kV
锥孔电压:	25 V
碰撞能量:	功能通道1: 6 eV 从10 eV升至40 eV
数据管理	UNIFI v1.8法医毒物筛查应用解决方案

---

## 实验

## 材料

---

以下植物碱以固体材料形式购自Sigma-Aldrich（英国普尔）：苦杏仁苷、盐酸小檗碱、蟾毒灵、香豆素、洋地黄毒苷、羟基洋地黄毒苷、毛花苷C、黄夹次苷乙和 $\alpha$ -茄碱。

## 样品前处理

首先通过甲醇稀释分别制备各植物碱的10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液；将这些溶液储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以备后续使用。在Tof-MS分析之前，用流动相A进一步稀释储备液，得到浓度为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品用于进样。

## 结果与讨论

在分析之前，专门为植物碱创建一个新的UNIFI科学数据库（只需输入9种生物碱的名称即可创建）。我们为谱库中的每个条目都添加了描述每种物质结构的MOL文件（图1）。分别进样各植物碱溶液，使用UNIFI法医毒物筛查应用解决方案提供的标准筛查条件采集数据<sup>1</sup>。随后，使用UNIFI科学信息系统处理这些数据，并比对新建的植物碱数据库进行筛查。

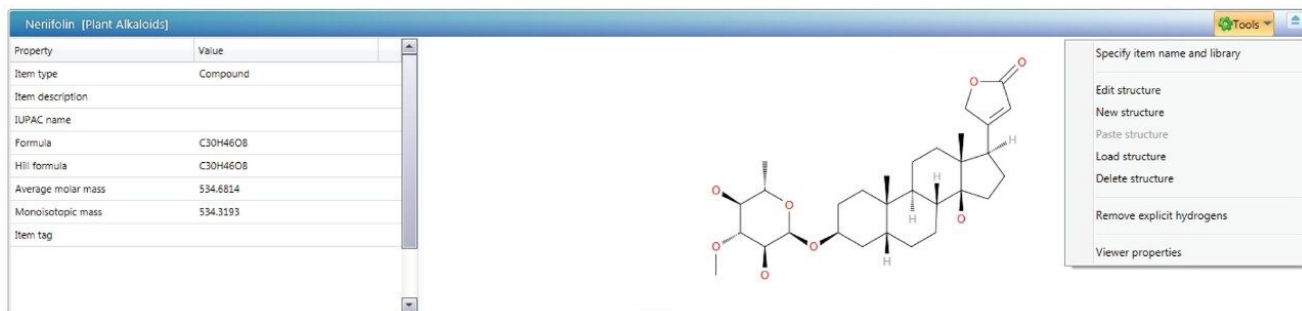


图1.为黄夹次苷乙创建库条目可以添加现有MOL文件结构（“加载结构”），也可以先使用标准化学绘图包创建，然后添加（“新结构”）。

## 应用计算机模拟碎裂技术进行鉴定

测定质子化母离子的质量精度，并将每种物质结构自动生成的理论碎片离子与高能谱图中的离子匹配，将这两者相结合来确认是否存在每种植物碱。

图2显示了UNIFI给出的 $\alpha$ -茄碱鉴定结果。“组分概要”表列出了与鉴定这种生物碱有关的信息，包括：实测 $m/z$ 值及其与预期 $m/z$ 值的偏差、实测同位素模式与理论同位素模式在 $m/z$ 和强度分布方面的差异、实测保留时间、检测到的理论碎片离子数量，以及检测器计数（代表与检测到的化合物相关的所有低能量离子的丰度）。

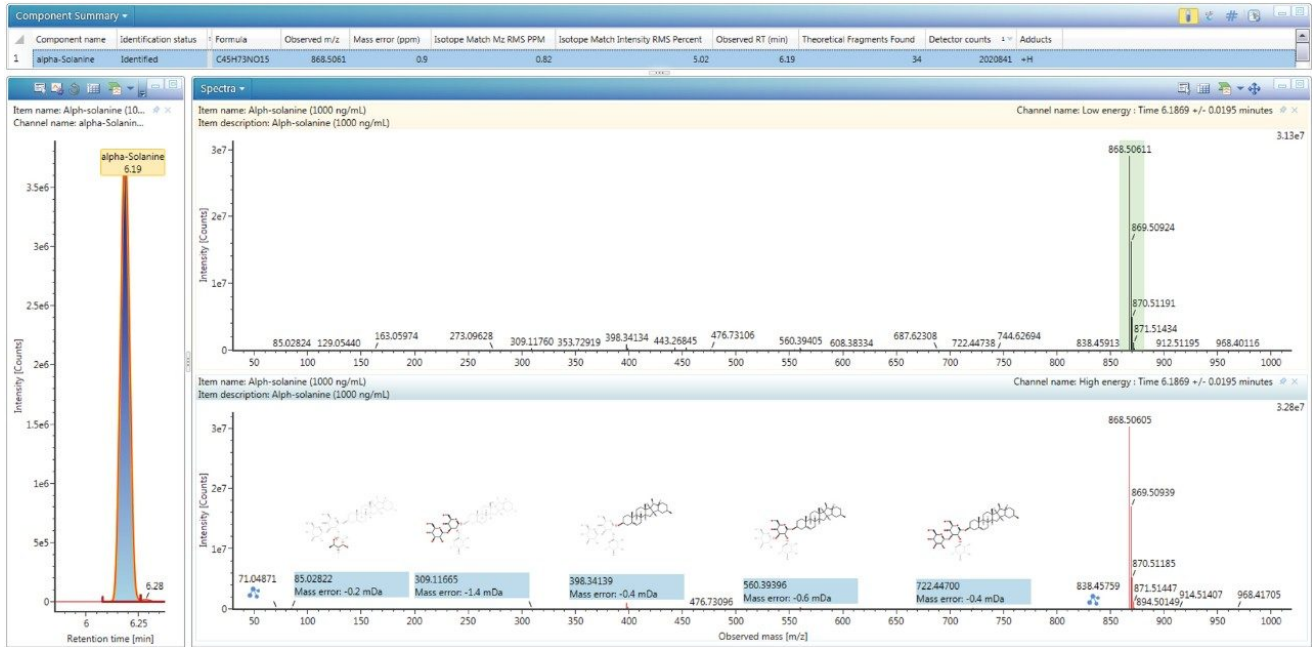


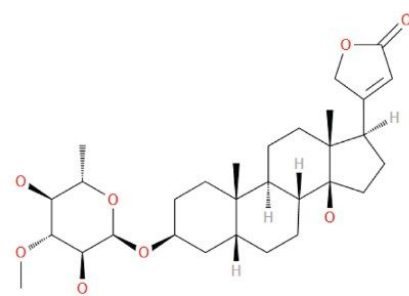
图2.UNIFI科学信息系统给出的 $\alpha$ -茄碱鉴定结果

## 更新库条目

根据母离子质量精度和处理过程中生成的理论碎片离子，成功鉴定出了所有生物碱。完成鉴定后，每种物质都关联了保留时间。UNIFI可以根据分析结果直接更新库条目，在条目中包含每个分配的加合物和碎片离子的预期保留时间以及预期 $m/z$ 值。更新后，一个典型库条目的信息与图3中黄夹次苷乙的信息相似。这些附加信息可在后续分析中用于靶定分析物。

Nenifolin [Plant Alkaloids] Tools

Property	Value
Item type	Compound
Item description	
IUPAC name	
Formula	C30H46O8
Hill formula	C30H46O8
Average molar mass	534.6614
Monoisotopic mass	534.3193
Item tag	



Detection results

Priority	Intensity	Formula	Neutral Mass (Da)	Adduct	Charge	Fragmentation type	Expected m/z	Expected RT (min)	Ionization technique	Detail type
1	5769486		534.3193	+H	1	None	535.3265	9.300	ESI+	MSe
5	1166637	C23H31O2			1	CID	339.2319	9.300	ESI+	MSe
6	864505	C23H35O4			1	CID	375.2530	9.300	ESI+	MSe
7	676380	C23H33O3			1	CID	357.2424	9.300	ESI-	MSe
8	308892	C4H5O2			1	CID	85.0284	9.300	ESI+	MSe
9	131214	C30H45O7			1	CID	517.3160	9.300	ESI+	MSe
10	117844	C5H7O2			1	CID	99.0441	9.300	ESI+	MSe
11	108359	C30H43O6			1	CID	499.3054	9.300	ESI+	MSe
12	91115	C15H19O2			1	CID	231.1380	9.300	ESI+	MSe
13	82439	C6H9O3			1	CID	129.0546	9.300	ESI+	MSe
14	52590	C6H7O2			1	CID	111.0441	9.300	ESI-	MSe
15	49419	C4H7O2			1	CID	87.0441	9.300	ESI-	MSe
16	45814	C9H13			1	CID	121.1012	9.300	ESI-	MSe
17	45446	C22H31O			1	CID	311.2369	9.300	ESI+	MSe

图3.黄夹次苷乙的库条目组合界面的下半部分现在已经填充了母离子和碎片离子的预期保留时间以及预期 $m/z$ 值。

## 多种加合物

本研究考察的另一种生物碱——羟基洋地黄毒苷的数据如图4所示。分配给该物质的低能量离子在谱图中以绿色突出显示，对应于质子化同位素簇。实验测得的羟基洋地黄毒苷质子化同位素簇的检测器计数为568。高能量谱图中标注了羟基洋地黄毒苷的子结构，这些子结构由UNIFI自动确定，并以碎片离子的形式与高能量谱图中的峰相关联。

。



图4.UNIFI科学信息系统给出的羟基地黄毒苷鉴定结果。

进一步分析羟基地黄毒苷的低能量谱图后发现，其中一些离子可能对应于该物质的其他加合物。因此，我们重新处理了数据，除质子化离子外，还将 $[NH_4]^+$ 、 $[Na]^+$ 和 $[K]^+$ 加合物作为目标。图5详细展示了重新处理后，低能量数据中分配给每种加合物的同位素簇。额外分配给羟基地黄毒苷的加合物体现在检测器计数的变化上，根据质子化加合物的同位素簇确定的检测器计数为568，现在已经增加到118680。在此次分析中，其他物质也获得了类似的结果。



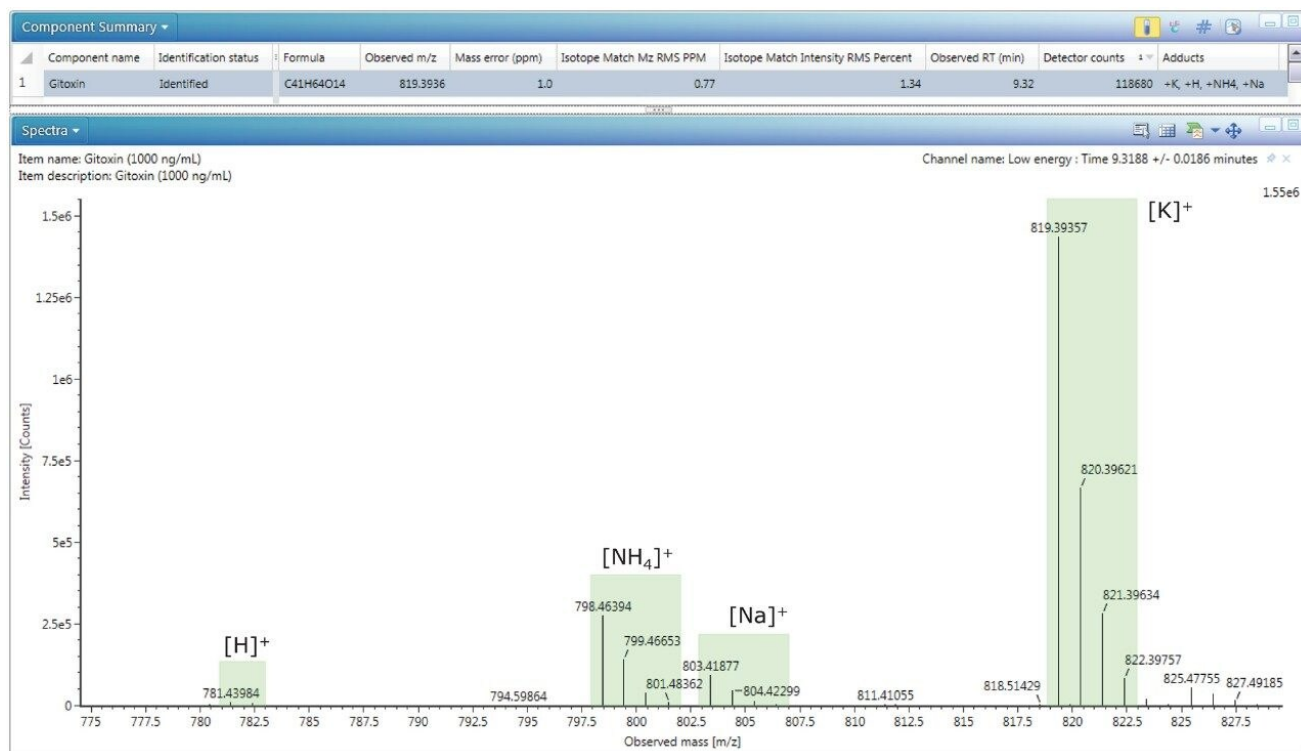


图5.分配给羟基洋地黄毒苷的多种加合物

## 发现工具

UNIFI科学信息系统v1.8的另一项新功能是发现工具，该工具将元素组成、谱库搜索和碎片离子匹配功能整合到了单步骤流程中，方便用户更轻松地获得样品中非预期物质的鉴定结果。运行发现工具的参数详见图6A-D。

第一组参数（图6A）控制每个组分返回的元素组成的数量上限，以及每种元素组成返回的谱库匹配条目数量。用户选定的每种组分的实测m/z值将被提交至元素组成应用程序，其参数如图6B所示。随后，元素组成应用程序返回的每一个科学分子式会自动提交到选定谱库列表中。这些谱库可以来自UNIFI科学数据库，也可以来自ChemSpider（如果已连接到互联网）。图6C显示了选择ChemSpider谱库时的对话框。

然后，谱库搜索返回的每个科学分子式的每个匹配结果都将自动提交至碎片离子匹配应用程序（前提是该谱库匹配结果具有MOL文件形式的关联结构）。

碎片离子匹配应用程序将应用用户通过图6D所示对话框选择的参数，对每个结构执行系统性断键，然后将理论子结构的m/z值与实测的高能量碎片离子进行匹配。程序会确定匹配的碎片离子数量以及这些离子在高能量质谱图中所占的强度百分比。

A

Discovery ▾

Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Elemental Composition

ChemSpider  Scientific Library

Minimum i-FIT Confidence:  % Minimum citations:

Number of compositions:  Number of hits:

B

Discovery ▾

Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Composition

Automatic elements selection

Selected elements:

Adducts

Automatic adducts selection

Selected adduct:

Total adducts charge:

m/z Tolerance:  mDa  Use Senior rule

Electron state:   Use Carbon/Hydrogen ratio filter

Minimum DBE:   Use Carbon/Hetero-atom ratio filter

Maximum DBE:   Use multi-atom filter

Number of isotopes before selected peak:

Number of isotopes to use:

C

Discovery ▾

Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Available libraries:

- A&J Pharmtech
- A1 BioChem Labs
- A2Z Chemical
- Abacipharm
- Abblis Chemicals
- Abcam
- ABI Chemicals
- Abmole Bioscience

Selected libraries:

- FDA UNII - NLM

D

Discovery ▾

Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Use smartsScores Multiple:  Alpha:  DBE minimum:  Mode:

Phenyl:  Other:  Hydrogen difference:  DBE maximum:

Aromatic:  Bonds:  Allow scores below:  Neutral:   Filter peaks by intensity

Ring:  Hetero:  Delta (mDa):  H Penalty:  Number of peaks:

图6.UNIFI中的发现工具。A)通用发现工具参数。B)元素组成参数。C) ChemSpider参数。D)碎片离子匹配参数。

为便于说明，我们将靶向分析中鉴定为苦杏仁苷的候选组分提交至发现工具。图7展示了使用图6A-D中所示的参数运行应用程序得到的结果。

提交至发现工具的组分为候选质量数 $m/z$  458.1649的物质。结果显示，应用程序为 $m/z$  458.1649这种物质确定了一种元素组成，即 $C_{20}H_{27}NO_{11}$ ，其i-FIT置信度为89%。该元素组成被自动提交至ChemSpider的FDA UNII - NLM数据库，然后返回了苦杏仁苷匹配结果以及同义词列表、结构和引用次数。系统自动将该结构与碎片离子匹配结果相结合，为候选质量数 $m/z$  458.1649关联的高能量谱图分配了适当的子结构，如图7所示。谱库匹配结果中显示了子结构匹配的高能量碎片离子数量，以及这些匹配的碎片离子在高能量谱图中所占的强度百分比。

获取一系列组分、元素组成和谱库匹配结果的这些信息，有助于分析人员在鉴定样品中的非预期物质时做出明智的决定。

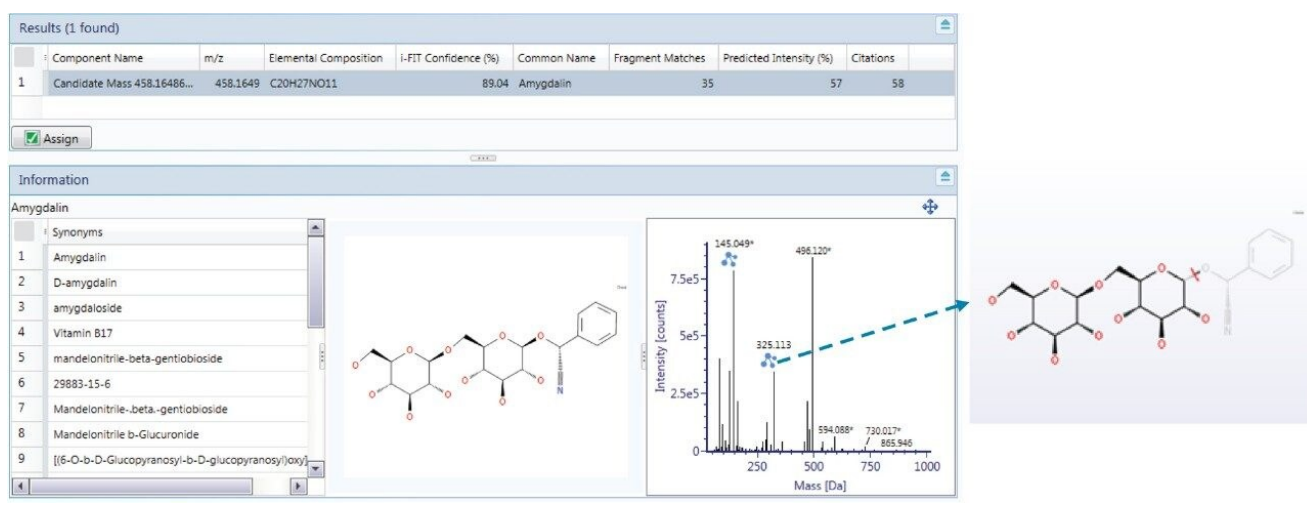


图7.发现工具的典型结果

## 结论

本研究采用UNIFI法医毒物筛查应用解决方案<sup>1</sup>筛查了一系列植物碱，由此清楚地展示了科学数据库条目可以便捷地进行创建和更新。我们使用UNIFI科学信息系统v1.8处理 $MS^E$ 数据，检测到了这些植物碱的多种加合物。碎片离子匹配功能还能够为高能离子分配子结构。此外，研究还证明这款新的发现工具对解析未知组分很有帮助。

---

## 参考资料

1. 法医毒物筛查应用解决方案.沃特世产品手册(P/N 720004830ZH).

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

UNIFI法医毒理学筛查应用解决方案 <<https://www.waters.com/134779723>>

## 可在线购买

ACQUITY UPLC HSS C18色谱柱, 100Å, 1.8 μm, 2.1 mm × 150 mm, 1/pkg <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003534>>

720005461ZH, 2015年7月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)  
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号