VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ CHUYỂN GIAO CÔNG NGHỆ
Địa chỉ: 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
www.cretech.vn www.natpro.com.vn *e-mail:* contact@natpro.com.vn

DEREPLICATION STUDY OF CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Glinus Oppositifolius* BY UHPLC-QTOF-MS/MS

Tran Chieu An, Pham Hong Ngoc, Tran Phan Huynh Nhu,
Ung Nguyen Hoang Kiem, Le Ngoc Hung, and Phung Van Trung*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Có chất gì?

Có phải là Sâm Ngọc Linh không?

Dược liệu giả, kém chất lượng?

Có chất mới, chất có hoạt tính không?

=> Thành phần hóa học!

Sự đa dạng trong thành phần hóa học

- Nhiều nhóm chất trong cùng loài: Alcaloid, Saponin, Polyphenol…
- Số lượng chất: nhiều
- Hàm lượng: thấp

⇒ Để nghiên cứu hoàn chỉnh: Hàng trăm hợp chất (hàng trăm công bố, hàng chục đề tài nghiên cứu…)

⇒ ***Khó có thể thực hiện theo cách làm truyền thống: Phân lập, xác định cấu trúc… đòi hỏi nhiều thời gian, công sức, chi phí!***

Giải pháp

- Thiết bị
- Quy trình
- Cơ sở dữ liệu
- Chuyên môn

Vì sao HRMS:

- Xác định chính xác KLPT của ion mẹ và phân mãnh (<5ppm) : => CTPT

  N2: 28.0061 Da

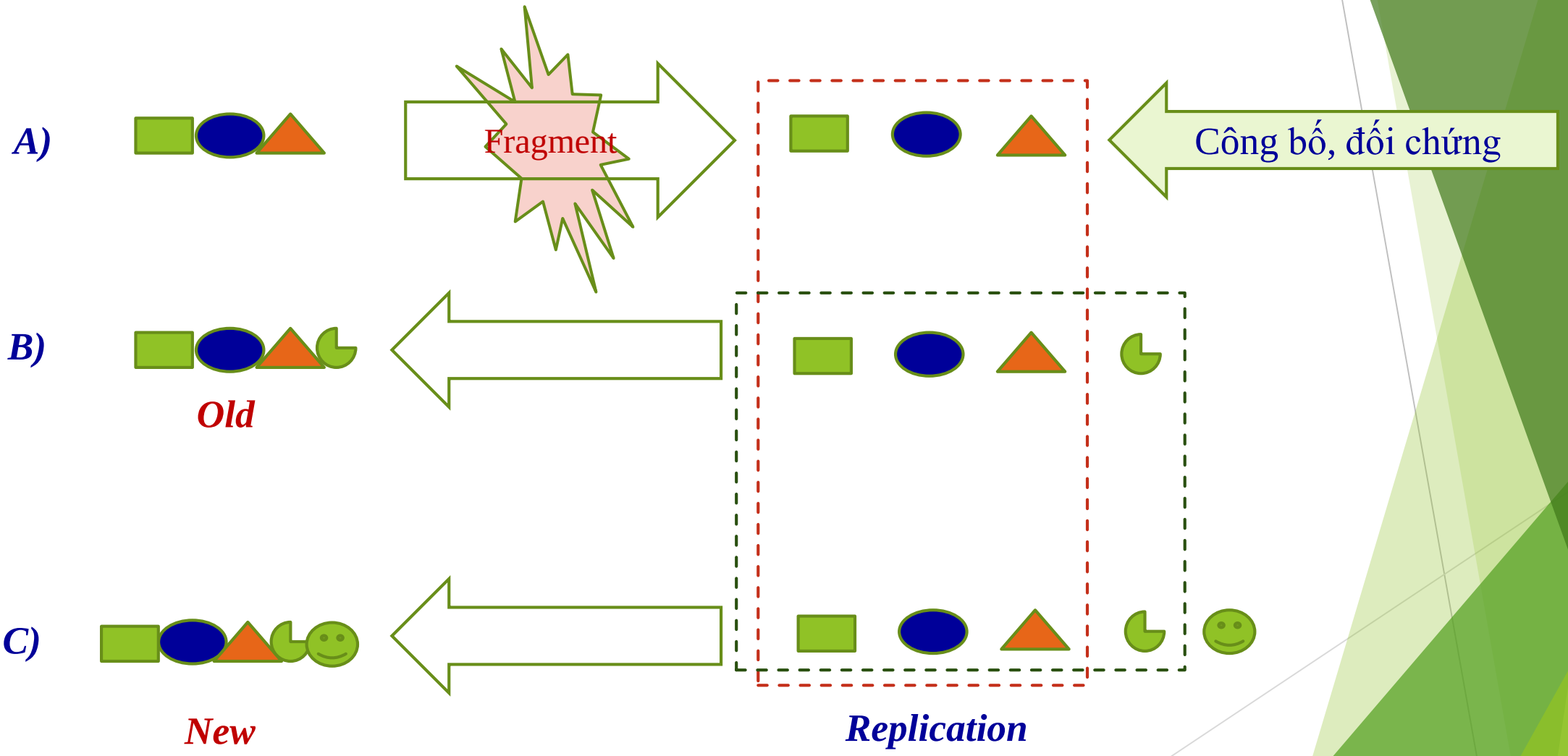
  C2H4: 28.0313 Da

- Phân mãnh: => Cấu tạo phân tử

Điều kiện phân mãnh như nhau sẽ tạo ra các mãnh giống nhau từ cùng một phân tử!

Phân tử có một phần cấu trúc giống nhau sẽ tạo ra một số mãnh giống nhau

Dereplication



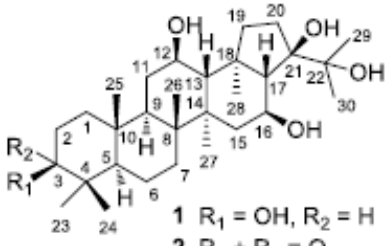
Kết quả:

Nghiên cứu TPHH của cây Rau đắng đất *Glinus oppositifolius*

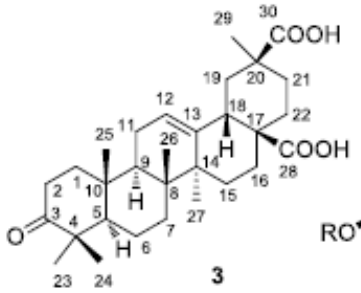
Quy trình nghiên cứu TPHH của cây Rau đắng đất

- Lập danh sách TPHH đã công bố: Tên, CTPT, KLPT (isotope), ion mẹ và ion công thêm có thể có cho cả 2 mode (NEG/POS).
- Đo HRMS (thu dữ liệu cả ion mẹ lẫn phân mãnh)
- Nhúng dữ liệu đo HRMS vào bảng TPHH theo mode đo phù hợp
- Lập danh sách các chất có ion mẹ trùng với chất đã công bố (<5ppm)
- Phân tích các mãnh phổ để xác nhận cấu trúc phù hợp với chất đã công bố (Dereplication)
- => Danh sách các chất có trong cây RĐĐ đã được công bố (Targeted)
- => Danh sách các chất chưa được công bố có trong cây RĐĐ (none-Targeted): chưa phát hiện trong cây RĐĐ hoặc chưa phát hiện trong bất kỳ cây nào (new)

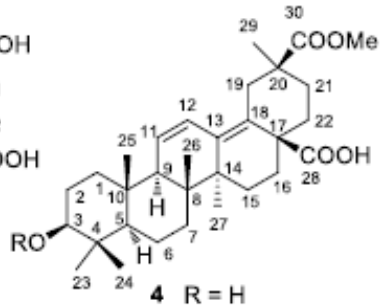
Thành phần hóa học của Rau đắng đất



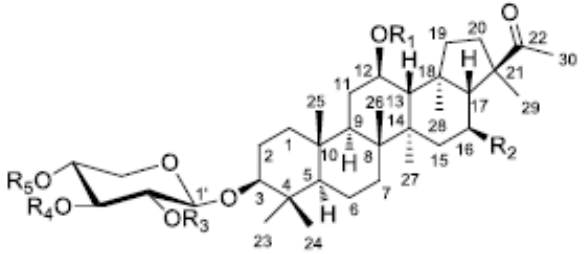
1 R_1 = OH, R_2 = H
2 R_1 + R_2 = O



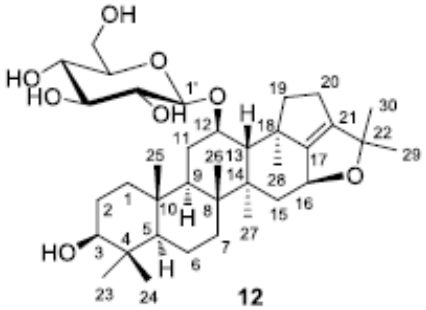
3



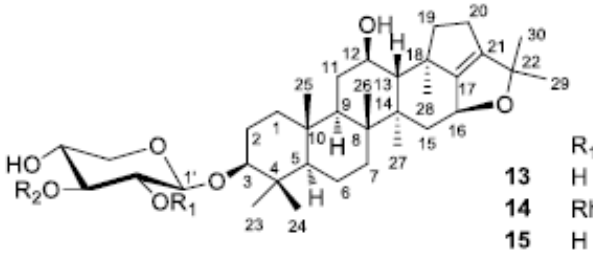
4 R = H
20 R = Rha-(1→3)-6-O-Me-GlcA



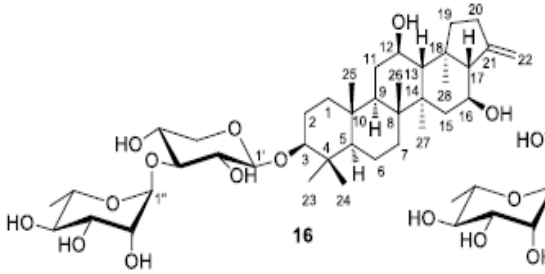
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
5	H	H	H	H	H
6	H	H	Rha	H	H
7	H	H	H	Rha	H
8	H	OH	H	Rha	acetyl
9	H	OH	H	Rha	crotonyl
10	acetyl	OH	H	Rha	crotonyl
11	H	OH	H	Xyl	crotonyl



12

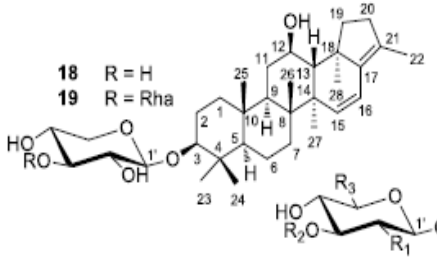


	R_1	R_2
13	H	H
14	Rha	H
15	H	Rha

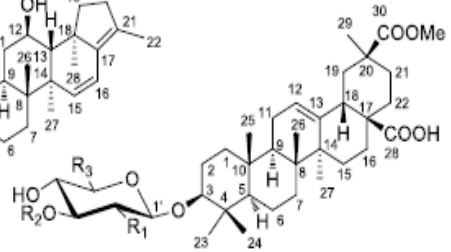


16

17



18 R = H
19 R = Rha



	R_1	R_2	R_3
21	AcNH	H	CH_2OH
22	OH	Rha	COOMe
23	OH	Rha	COOEt
24	OH	H	H
25	OH	Rha	H
26	OH	H	COOMe

Molecules **2019**, *24*, 2206

Danh sách các chất đã công bố

C84 | C47H80O17

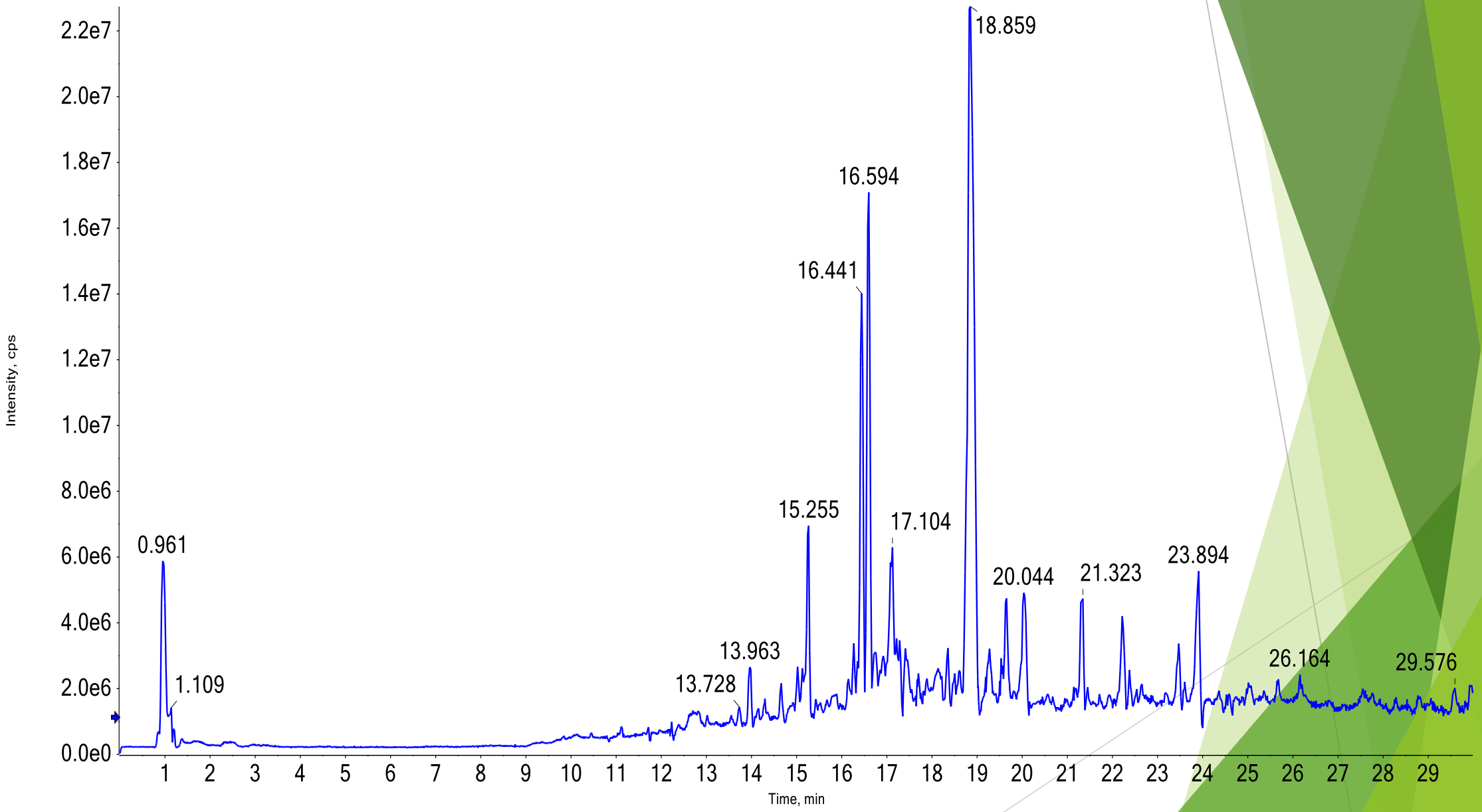
	A	B	C	D	E	F	G
2		NAME	CTPT	MW	[M-H]	[M+FA]	[M+H]
84	82	3,16,22-Hopanetriol; (3β,5β,16β,21α*H*)-form, 3-*O*-β-L-Arabinopyranoside, 22-*O*-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside]	$C_{47}H_{80}O_{17}$	916.5396	915.5313	961.5372	917.5474
85	83	Oleanolic acid 3-glycosides; Triglycosides, 3-*O*-[β-D-Galactopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside]	$C_{50}H_{81}NO_{18}$	983.5454	982.5371	1028.5430	984.5532
86	84	3,6,16,22-Hopanetetrol; (3β,6α,16β,21β*H*)-form, 3-*O*-[α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranoside], 6,16-di-*O*-β-D-xylopyranoside	$C_{51}H_{86}O_{20}$	1018.5713	1017.5630	1063.5689	1019.5791
87	85	3-Hydroxy-12-oleanene-28,30-dioic acid; 3β-form, 30-Me ester, 3-*O*-[β-D-galactopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside]	$C_{51}H_{81}NO_{20}$	1027.5352	1026.5269	1072.5329	1028.5430
88	86	3,6,16,22-Hopanetetrol; (3β,6α,16β,21β*H*)-form, 3-*O*-[α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranoside], 6-*O*-β-D-xylopyranoside, 22-*O*-α-L-rhamnopyranoside	$C_{52}H_{88}O_{20}$	1032.5869	1031.5787	1077.5846	1033.5947
89	87	3,6,16,22-Hopanetetrol; (3β,6α,16β,21α*H*)-form, 3-*O*-[β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside], 6-*O*-β-D-xylopyranoside, 22-*O*-β-D-glucopyranoside	$C_{52}H_{88}O_{21}$	1048.5818	1047.5736	1093.5795	1049.5896
90							
91							

RAW DATA | TQ | SHORT DATA | SORT M-H | SORT M+FA | SUGGESTED

Thực nghiệm

- HRMS: ExionLC™ UHPLC system ghép nối X500R QTOF (AB SCIEX, USA)
- Cột: Hypersil GOLD C18 column (150 x 2.1 mm, 3µ) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chương trình dung môi: Dung mội A: 0.1% formic acid (FA); dung môi B: Acetonitrile 0.1% FA
- Gradient: 0–1 min, 2% B; 1-30 min, 2-98% B; 30-36 min, 98% B.
- Tốc độ dòng: 0.4mL/min
- Thể tích tiêm: 2.0 µL.
- Điều kiên khối phổ: the ion source temperature, 500°C; curtain gas, 30 psi; nebulizer gas (GS 1), 45 psi; heater gas (GS 2), 45 psi. Ionspray voltage was −4.5 kV. For the TOF MS scan, the mass range was set at m/z 70–2000. The declustering potential (DP) was −80 V, the collision energy (CE) was set at −20 eV, and the collision energy spread (CES) was 10 eV. For the TOF MS/MS scan, the mass range was programmed at m/z 50–1500. DP was set at −50 V, CE was performed at −30 eV, and CES was 10 eV.

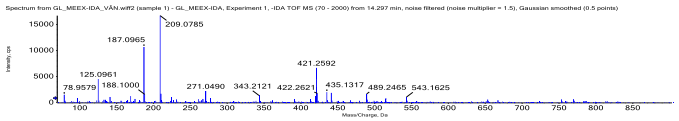
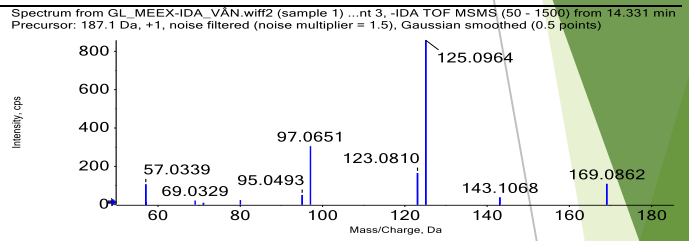
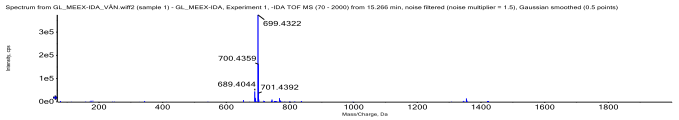
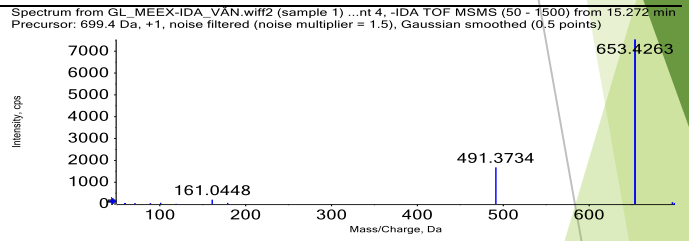
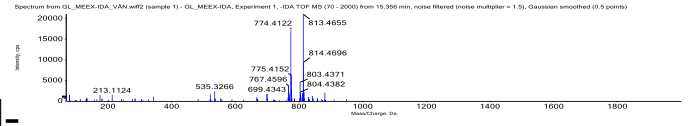
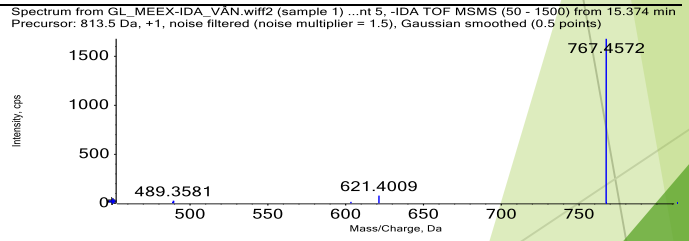
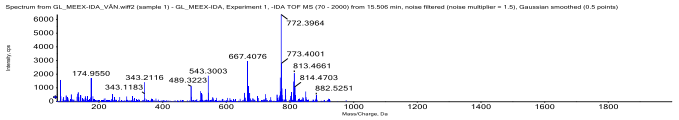
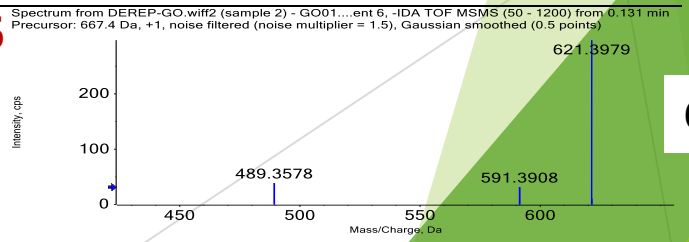
TIC from GL_MEEX-IDA_VÂN.wiff2 (sample 1) - GL_MEEX-IDA, Experiment 1, -IDA TOF MS (70 - 2000)



	A	B	C	D	E	F	G
1	Index	Sample Name	Component Name	Expected RT	Precursor Mass		
573	572	GL_MEEX-IDA	1026.5319 / 16.27	16.27	1026.5319		
574	573	GL_MEEX-IDA	1062.5089 / 16.27	16.27	1062.5089		
575	574	GL_MEEX-IDA	1064.5090 / 18.46	18.46	1064.5090		
576	575	GL_MEEX-IDA	1072.5359 / 18.29	18.29	1072.5359		
577	576	GL_MEEX-IDA	1072.5368 / 16.27	16.27	1072.5368		
578	577	GL_MEEX-IDA	1140.5250 / 16.27	16.27	1140.5250		
579	578	GL_MEEX-IDA	1297.7244 / 18.76	18.76	1297.7244		
580	579	GL_MEEX-IDA	1371.7392 / 18.85	18.85	1371.7392		
581	580	GL_MEEX-IDA	1549.9490 / 16.60	16.6	1549.9490		
582	581	GL_MEEX-IDA	1729.9694 / 18.76	18.76	1729.9694		
583							
584							
585							

RAW DATA | TQ | SHORT DATA | SORT M-H | SORT M+FA | SUGGESTED

Kết quả đo HRMS

No.	RT	m/z	MS CHR	MS/MS	MS/MS CHR
1	14.30	187.0964		57, 97, 125, 143, 169	
2	15.27	699.4325		491, 653	
3	15.36	813.4652 [M+FA]-		489, 621, 767	
4	15.51	667.4074 [M+FA]-		489, 621	

- 146 Rha

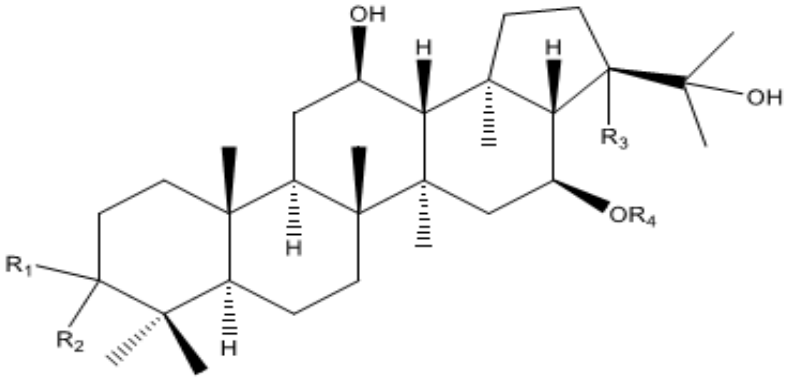
- 132 Xyl/Ara

3,16,20,22-Tetrahydroxy-6-hopanone; (3β,16β,20α,21αH)-form, 3-O-[α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranoside]

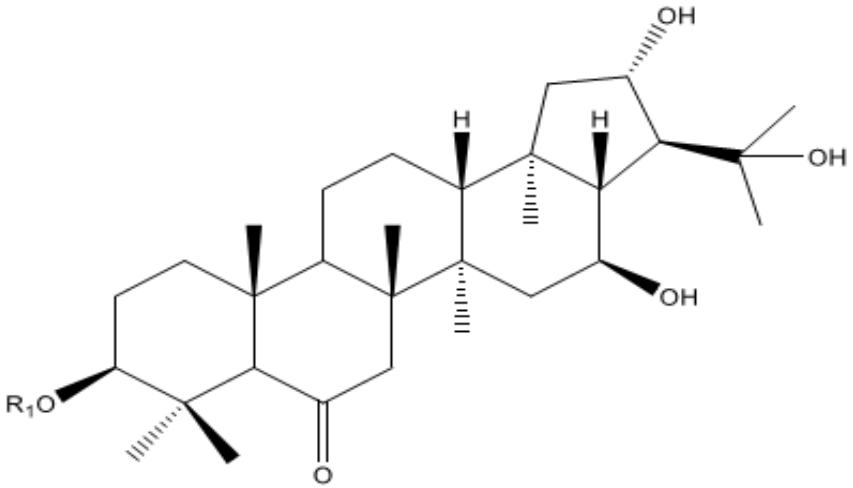
Glinosides A

No.	RT	m/z	Chemical name	Formula	Ion	MW	Thereotical m/z	mass error	MS/MS
1	14.30	187.0964	Azelaic acid	$C_9H_{16}O_4$	$[C_9H_{15}O_4]$-	188.1049	187.0970	-3.4	57.0339 97.0651 125.0964 143.1068 169.0862
2	15.27	699.4325	Glinoside C	$C_{36}H_{62}O_{10}$	$[C_{36}H_{62}O_{10}+HCOO]$-	654.4343	699.4320	0.8	491.3735 653.4256
3	15.36	813.4652	3,16,20,22-Tetrahydroxy-6-hopanone; (3β,16β,20α,21αH)-form, 3-O-[α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranoside]	$C_{41}H_{68}O_{13}$	$[C_{42}H_{68}O_{13}+HCOO]$-	768.4660	813.4637	1.9	489.3579 621.4009 767.4572
4	15.51	667.4074	Glinoside A	$C_{35}H_{58}O_9$	$[C_{36}H_{58}O_9+HCOO]$-	622.4081	667.4057	2.5	489.3586 621.3988
5	15.67	201.1120	Sebacic acid	$C_{10}H_{18}O_4$	$[C_{10}H_{17}O_4]$-	202.1205	201.1127	-3.4	57.0337 111.0800 139.1117 183.1018
6	15.87	503.3373	Madecassic acid	$C_{30}H_{48}O_6$	$[C_{30}H_{47}O_6]$-	504.3451	503.3373	0.1	357.2454 389.3096
7	16.60	751.4652	Spergulacin A	$C_{41}H_{68}O_{12}$	$[C_{41}H_{67}O_{12}]$-	752.4711	751.4633	2.6	473.3641 605.4074
8	17.12	753.4449	Spergulin B	$C_{39}H_{64}O_{11}$	$[C_{39}H_{64}O_{11}+HCOO]$-	708.4449	753.4425	3.2	429.3448 561.3789 707.4353
9	17.41	793.4753	Spergulagenin A 3-glycosides; Diglycosides, 3-O-[4-acetyl-β-D-rhamnoyranosyl-(1→2)-α-D-xylopyranoside]	$C_{43}H_{70}O_{13}$	$[C_{43}H_{69}O_{13}]$-	794.4816	793.4738	1.9	473.3623 605.4049 751.4628
10	19.92	281.0813	2'-Hydroxy-6'-methyl-3,4-methylenedioxychalcone	$C_{17}H_{14}O_4$	$[C_{17}H_{13}O_4]$-	282.0892	281.0814	-0.3	93.0340 119.0501 145.0289 159.0467 207.0806 235.0745 251.0701
11	20.55	267.0660	7-Hydroxy-2'-methoxyflavone	$C_{16}H_{12}O_4$	$[C_{16}H_{11}O_4]$-	268.0736	267.0657	1.0	91.0357 117.0350 133.0298 167.0858 181.0644 223.0754
12	21.66	281.0815	5, 7-Dihydroxy-6, 8-dimethylflavone	$C_{17}H_{14}O_4$	$[C_{17}H_{13}O_4]$-	282.0892	281.0814	0.4	79.0181 119.0497 135.0443 145.0288 181.0651 209.0963 237.0911 253.0858

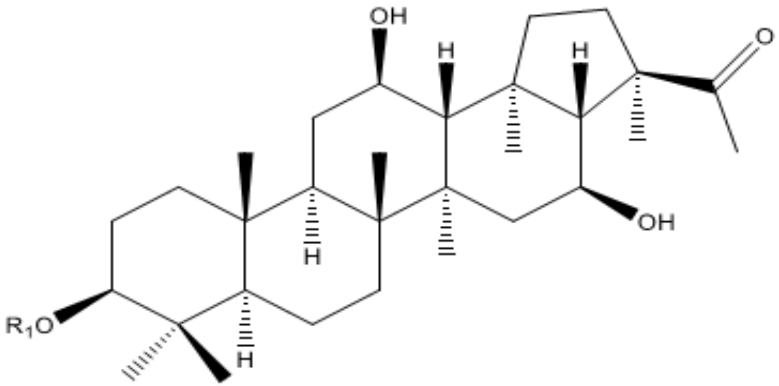
Kết quả nghiên cứu TPHH của cây Rau đắng đất: 13 chất đã công bố, 1 đề xuất chất mới



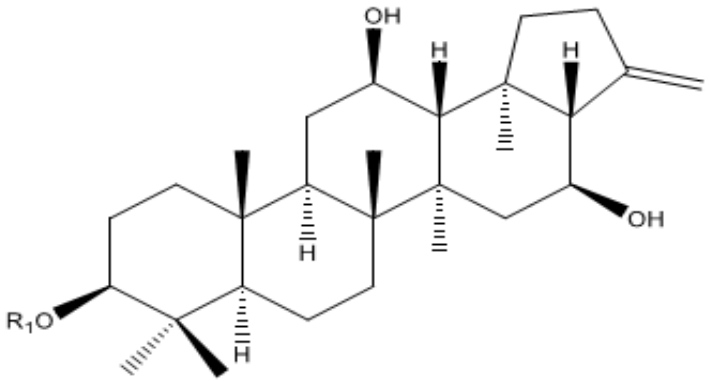
No.2: R_1=OH, R_2 = H, R_3=OH, R_4=Glc
No.4: R_1+R_2=O, R_3=OH, R_4=Ara



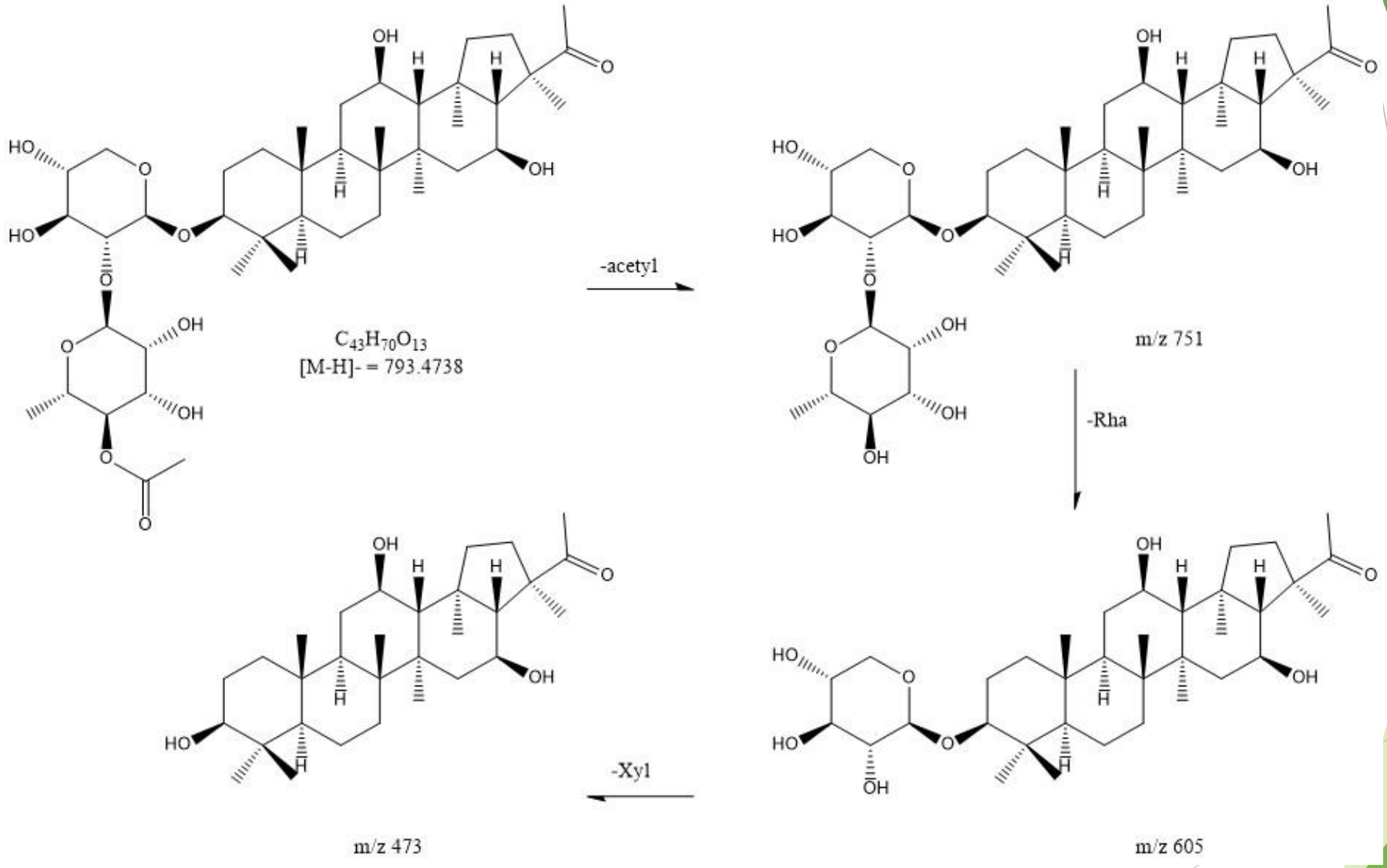
No.3: R_1=Rha-(1→2)-Xyl



No.7: R_1= Rha-(1→2)-Ara
No.9: R_1=4-Acetyl-Rha-(1→2)-Xyl



No.8: R_1=Rha-(1→2)-Ara


-acetyl
$C_{43}H_{70}O_{13}$
[M-H]- = 793.4738
m/z 751
-Rha
m/z 605
-Xyl
m/z 473

Kết luận

- Sử dụng UHPLC ghép nối HRMS có thể phân tích TPHH của mẫu. Phương pháp này giúp dự đoán cấu trúc các hợp chất mà không cần phân lập. Đặc biệt, có thể xác định và hướng việc phân lập vào các chất mới, bỏ qua các chất củ, giúp cho việc tìm kiếm hợp chất mới được nhanh chóng và tiết kiệm hơn.

- Cấu trúc dự đoán được bằng HRMS là những cấu trúc đề nghị, thiếu nhiều yếu tố để xác định cấu trúc hoàn chỉnh đặc biệt là lập thể và đồng phân. Vì vậy, để xác định chính xác cấu trúc các chất mới, cần phải phân lập tinh khiết và sử dụng thêm các phương pháp khác như NMR

TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM HÓA DƯỢC

1B đường TL29, p. Thạnh Lộc, q.12, Tp. HCM

Sắc ký, khối phổ: HRMS, LCMS, GCMS

Sắc ký điều chế, MPLC

CRETECH
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU

Thank You