

寻求科学的答案，探索生命的奥秘。



SCIEX 公司

中医药研究解决方案专辑



我们的历史 – 超过四十年的创新



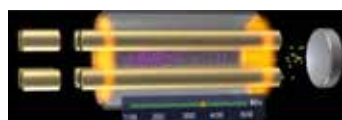
在多伦多大学由Barry博士和其他人共同创立



发布了API III，第一款商业化的、专用的液质联用系统，成为行业金标准



发布了当时最为先进、灵敏的5500系列



发布了QTRAP®液质联用系统，第一次把三重四极杆和线性离子阱结合起来

1973

1981

1989

2001

2002

2005

2008

研制出第一款商用的三重四极杆仪器

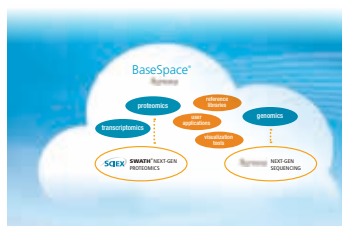


发布了API 4000™液质联用系统，成为了生物分析的标准手段



开发了API 5000™系统，在当年是业界最为灵敏的系统





和illumina合作，开发了第一个跨组学云端计算平台



推出“X系列”最新款X500B QTOF系统



在一年内发布了超过10款新品，成为历史上单年度内发售新品最多的年份，包括4500和6500系列，以及TripleTOF®高分辨质谱系列



针对临床诊断的Triple Quad™ 4500MD液相色谱串联质谱检测系统

2010

2012

2013

2014

2015

2017

2018

成为丹纳赫集团的一员，同年收购Eksigent公司

DANAHER

eksigent



Capillary Electrophoresis

宣布了首款医疗仪器 and 体外诊断的解决方案；整合了贝克曼的毛细管电泳业务

发布多款解决方案如Lipidyzer™，BioBA和公司历史上最大研发项目X500R QTOF系统



发布高灵敏度的定量解决方案，Optiflow™ Turbo V离子源和M5 Micro LC



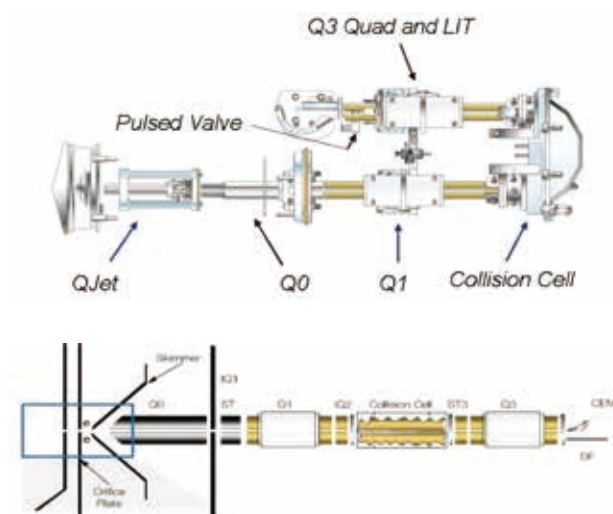
目 录

SCEIX 公司三重 四级杆技术	1
SCIEX 独有的QTRAP 复合质谱技术	3
SCIEX 公司高分辨质谱技术	5
SCIEX 公司中医药研究中相关软件的特色	7
上篇：SCIEX质谱技术在中药有效成分分析和鉴定溯源	8
1. QTRAP® 5500复合型质谱系统检测中成药中马兜铃酸含量	8
2. 应用高分辨质谱结合中药数据库进行成分分析	11
3. TripleTOF®系统结合中药成分MS/MS数据库快速进行参芪扶正注射液成分分析	16
4. X500R QTOF 在人参皂苷成分鉴定中的应用	20
5. 高分辨质谱X500R 研究志远根不同产地之间的成分差异	25
6. SCIEX高分辨质谱在不同产地土茯苓差异分析中的应用	31
下篇：SCIEX质谱技术在中药药代动力学、代谢物鉴定及其代谢组学、 中药打假和筛查农药残留及霉菌毒素方面的研究	36
1. 液质联用技术在中药药代动力学中的应用-综述	36
2. QTRAP 4500 复合型质谱系统分析丹红注射液活性成分及其代谢产物	41
3. SCIEX高分辨质谱仪鉴定大鼠尿液牛蒡子苷元的代谢物	44
4. 复合质谱QTRAP在68种中国常见保健品检测药物的整体解决方案	48
5. X500R QTOF系统SWATH® 技术在保健品非法添加领域中的应用	55
6. SCIEX QTRAP复合质谱检测中药材农药残留的整体解决方案	60

SCIEX公司三重四极杆技术

高灵敏度、高重现性、高稳定性及耐用于一体

SCIEX 公司三重四极杆技术



QTRAP® 6500+



Triple Quad™ 5500



Triple Quad™ 4500



API 3200™

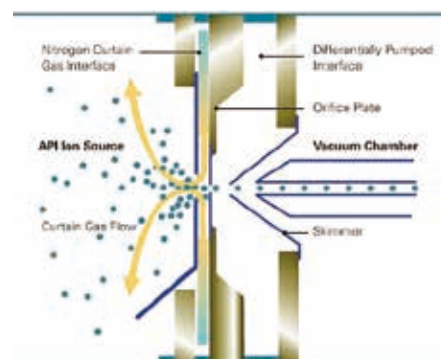


TurboV™离子源特点：

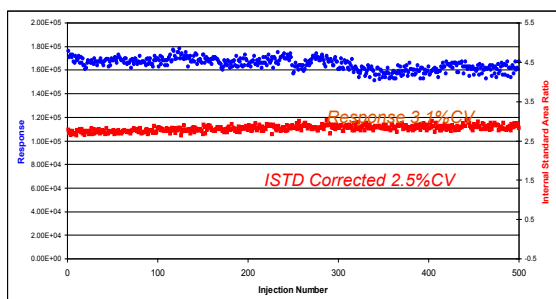
- 新型陶瓷加热技术、双涡流气化技术，使样品的离子化效率最大化。
- ESI流速为2~2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；APCI流速可达~3000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
- 新型离子取样界面设计更符合离子运动动力学，保证了更高灵敏度。
- APCI离子源自清洁探头设计允许HPLC的流量更高，分析通量更高；“即插即用型”ESI和APCI接口切换设计使用更方便。

SCIEX 气帘气接口

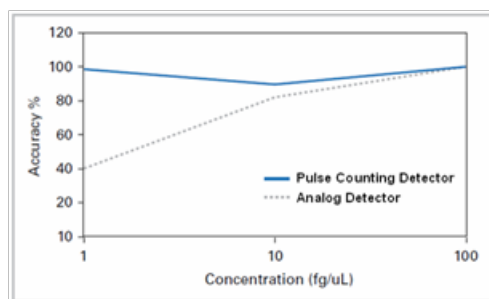
- 气帘接口是目前世界上性能超群的接口，它采用小流量反向氮气流吹扫的方法，增加溶剂的雾化，大大提高灵敏度。
- 可十分有效地防止接口的污染，反向氮气流有效保护取样孔免受污染。
- 适合于液相色谱非挥发性缓冲剂及各种流动相条件。



SCIEX 质谱仪具有超强的稳定性和耐用性



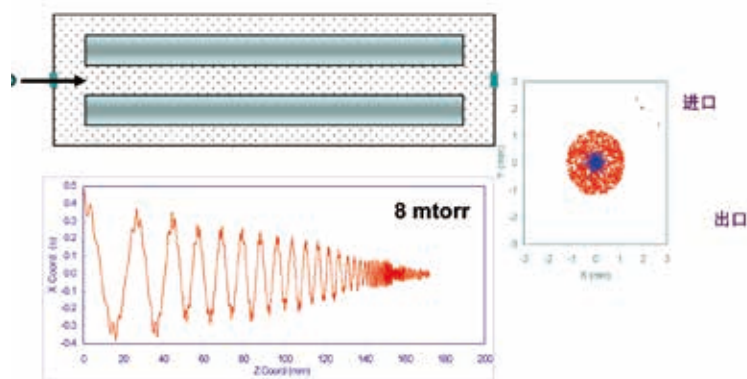
血浆样本中500次重复进样测定阿普唑仑，证明SCIEX质谱系统重现性，稳定性和可靠性



数字脉冲检测器能够保证即使在低浓度时，得到的数据依然有着出色的重复性、准确度。

高压聚焦的Q0技术

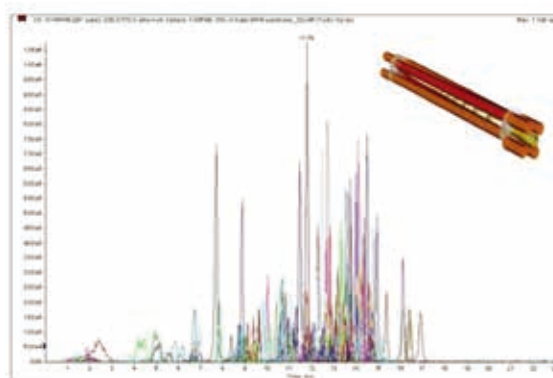
提高聚焦能力，减少离子损失，保证离子的最大传输率，提高灵敏度



阻尼轨迹（碰撞聚焦）

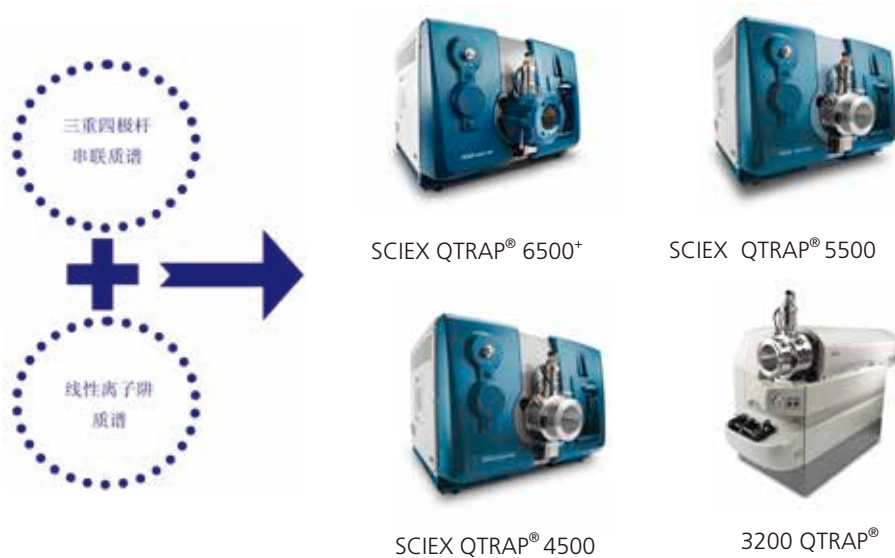
LINAC®高压碰撞室独特的技术特点

- 专利LINAC®设计使离子连续加速，快速通过碰撞池，到达Q3，可有效地消除假阳性和交叉污染。
- 同时进行多组分分析，提高分析速度。
- 减少离子驻留时间，并且没有灵敏度损失；利于离子传输



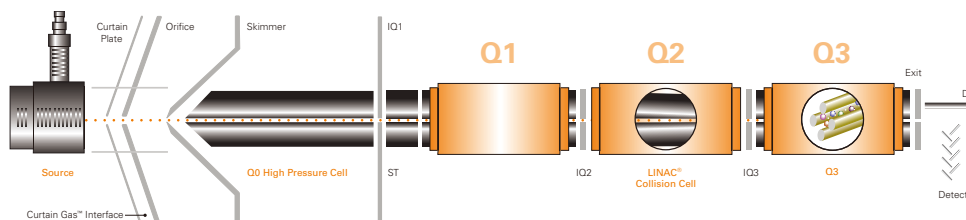
SCIEX公司独有的QTRAP[®]复合质谱技术 同时定量定性分析模式

QTRAP[®]技术：串联四极杆-线性离子阱复合质谱技术



QTRAP[®]技术：解决了同时定量和定性的问题，且具有强大的功能

灵敏度、稳定性、重现性与三重四极杆完全一致，同时具有高灵敏度、高扫描速度和多级扫描的定性功能，还具有独特的扫描功能，即杆-阱相互关联的扫描。因此，一款QTRAP[®]系列质谱仪功能大于单纯的一台三重四极杆和线性离子阱，真正意义上实现了“1+1 > 2”。



三重四极杆串联质谱

- 多反应离子监测 MRM
- 子离子扫描
- 母离子扫描
- 中性丢失扫描
- 全扫描
- SIM

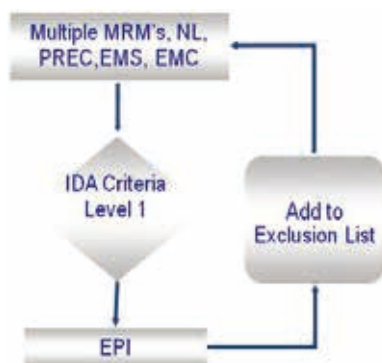
QTRAP[®]

- MRM-EPI (子离子扫描)
- MRM-MS³
- 母离子扫描-EPI
- 中性丢失扫描-EPI
- EMS-EPI
-

线性离子阱质谱

- 增强子离子扫描 (EPI)
- MS³
- 增强全扫描 (EMS)
- 增强多电荷扫描 (EMC)
- 增强高分辨扫描
- 时间延迟碎裂扫描 (TDF)

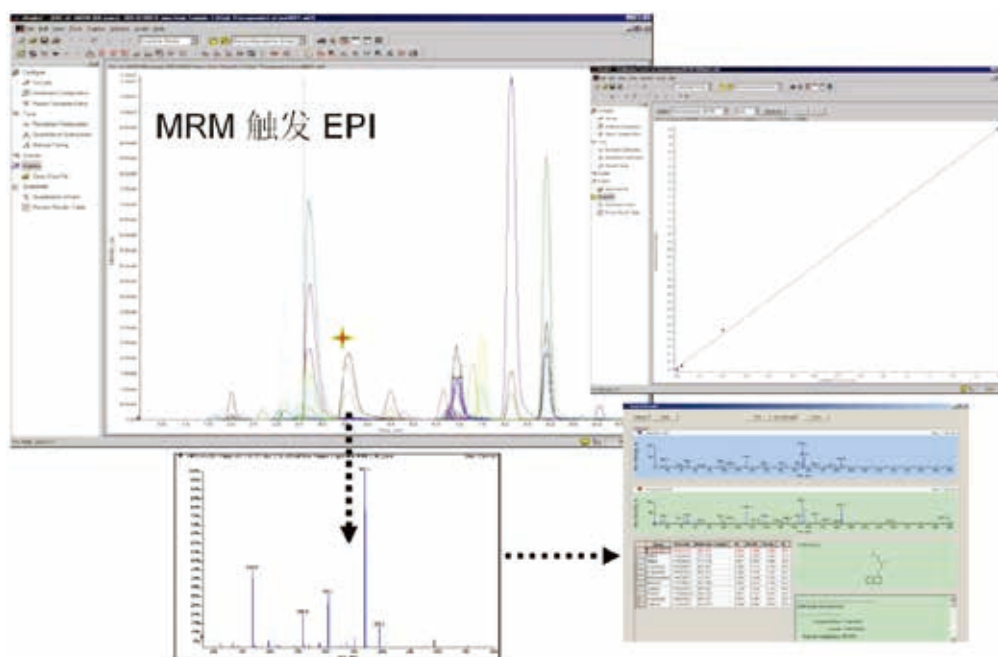
定量和定性，发现和确证一次完成…（IDA的工作流程）



- MRM , PREC, EMS, NL, EMC扫描可作为 IDA预扫描:
- PREC, NL扫描可以发现特征性的离子，然后触发EPI扫描，在线采集 MS/MS图谱用于确证
- 利用MRM的高选择性和高灵敏度，可发现低浓度的预测性的化合物或代谢物，然后触发EPI扫描，在线采集 MS/MS图谱用于确证
- MRM 数据仍能用于定量
- EMS，EMC可以发现非目标性的化合物，然后在线采集MS/MS图谱用于确证

IDA（Information Dependent Acquisition，信息相关采集）

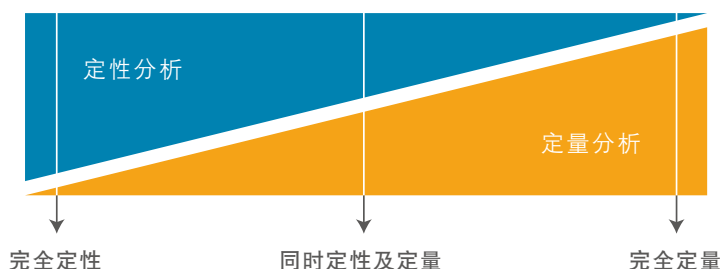
MRM-IDA-EPI扫描方式同时定量定性分析



SCIEX公司高分辨质谱技术

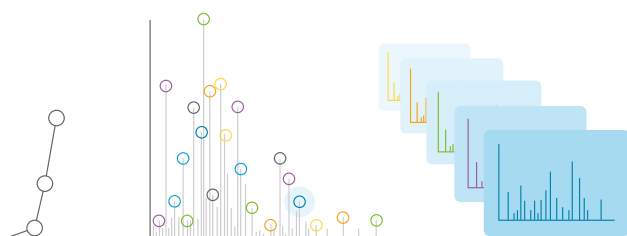
高分辨的同时定量定性分析模式

SCIEX 高分辨质谱系统：一个平台，灵活的工作流程



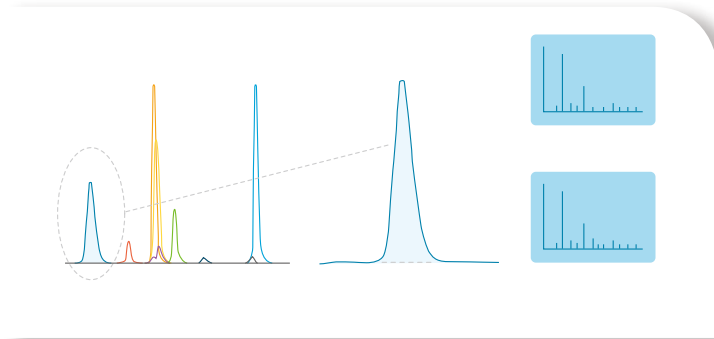
完全定性

深入细致定性研究复杂样品：使用强大的信息关联数据采集模式（IDA）和高分辨、高准确质量数一级扫描和二级扫描模式，获得相应的高分辨准确质量数一级质谱图和二级质谱图。



快速高分辨扫描获得准确鉴定结果

- 连接快速液相，选择每秒50个母离子，获得高分辨准确质量数二级质谱图
- 用高分辨准确质量数一级质谱和二级质谱数据可靠地进行母离子的鉴定
- 用智能IDA（信息关联数据采集）工作流程进行分析
 - > 多重质量亏损扫描（Multiple mass defect scanning）
 - > 中性丢失扫描（neutral loss scanning）
 - > 排除/包含列表/同位素分布匹配
- 用强大、智能化多碰撞能量工作流程鉴定未知物

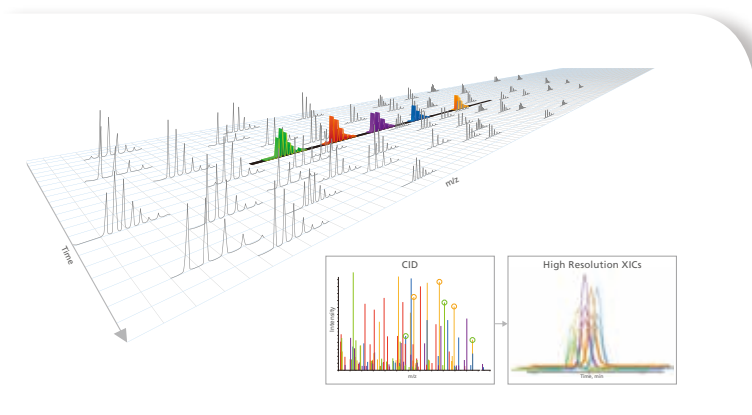


同时定量及定性

同时定量定性分析样品：实际上，一次进样，用高分辨一级质谱、快速液相定量分析样品中的所有化合物，用高分辨准确质量数二级质谱定性确证化合物，最后根据您的需要还可进一步发现更多的样品信息。

快速高分辨扫描获得准确鉴定结果

- 高分辨一级质谱定量分析和高分辨二级质谱定性确证
- 即使与快速液相联用分析，也能定量分析所有化合物
- 为了进行更深入研究，还可重新处理数据



SWATH® 2.0技术

SWATH® 2.0技术利用SCIEX TripleTOF® 和X500系列高分辨质谱超快的图谱采集速度（最高可达100Hz），完全不依赖于一级质谱，直接对整个扫描范围的离子进行二级数据采集，SWATH®技术是分不同的多个窗口采集，可设定固定窗口或者可变窗口。连续依次选择、碎裂、扫描，获得扫描范围内所有离子的TOF MS和TOF MS/MS数据。通过SWATH®数据采集可全面的覆盖大、小分子的代谢物的信息。

用高分辨MRM（MRM^{HR}）进行相对和绝对定量分析

- 用高分辨准确质量离子数据进行定量分析，使系统具有最高的特异性
- 用串联四极杆MRM的数据采集速度分析多个目标物，同时收集每个相应母离子的二级全扫描高分辨质谱图，并不需要额外的循环时间
- 保持快速数据采集循环时间，能完全与快速液相色谱峰相匹配
- 定量线性动态范围达到4个以上数量级

SCIEX公司中医药物研究中相关软件的特色



数据采集软件，控制仪器

Analyst®软件

软件合规性：

- 数据分析和报告功能。并且符合21CFR Part 11法规要求
- 可设置不同的账户，设定不同的权限
- 具有数据追踪（Audit Trail）和电子签名等功能



定量功能强大且易用的

MultiQuant™软件

- 可同时进行多个样品和多个化合物的定量分析
- 具有数据追踪和电子签名功能，并且符合21CFR Part 11法规要求
- 支持大、小分子的数据定量分析



用于药物代谢物鉴定的

MetabolitePilot™软件

- 支持TripleTOF®系列高分辨质谱数据
- 先进的峰查找算法，快速、准确发现代谢物，并进行结构阐明
- 可进行批处理，提高通量，同时还实现了种属间代谢差异和/或不同时间点代谢变化



寻找代谢物的终极工具

Lightsight®软件

- 简单几步就可创建高效优化的数据采集方法
- 与数百名药物专家共同开发
- 包含上百种代谢途径
- 自动进行数据处理，发现代谢物



中药MS/MS质谱数据库

- 涵盖了2万2千多个天然产物的一级质谱数据
- 包含2015版中药药典一部所涉及的化合物在内的，共计近千种化合物的二级质谱数据
- 数据库MS/MS采集采用了高、中、低三个能量综合的一张图谱，碎片信息丰富

QTRAP® 5500复合型质谱系统检测中成药中马兜铃酸含量

Quantitation the Aristolochic acid of Chinese Traditional Patent Medicine by QTRAP® 5500 Mass Spectrometry System

司丹丹，郭立海，靳文海

SCIEX，亚太应用支持中心（北京），中国

前言

近日，美国权威医学期刊发布研究成果称，含有马兜铃酸成分中药材是导致亚洲肝癌的重要原因。在文章中，研究者通过对亚洲各地共 1400 例肝癌样本进行基因检测，结果发现 47% 的中国大陆样本、78% 的中国台湾样本还有 56% 的东南亚样本都显示，肝癌与马兜铃酸诱导的细胞突变相关。早在 2002 年，世界卫生组织国际癌症研究机构将马兜铃酸列为潜在致癌物质，2012 年将其列入 I 类致癌物质。近期研究结果让含马兜铃酸的中药再次被推上舆论的风口浪尖。

文献记载，马兜铃酸是一种植物次生代谢物，存在于几乎所有的马兜铃属植物中。但因其具有清肺降气、止咳平喘、祛风除湿、消炎止痛等功能，广泛应用于多种中成药。据统计有 24 种马兜铃科药材可能还有马兜铃酸，含马兜铃属药材的已上市中成药有 47 种。文献检索发现目前 LC-MS/MS 方法灵敏度较低，多数停留在微克、纳克级别，且缺少定性手段。因此建立一种能够高灵敏检测并确证马兜铃酸的方法迫在眉睫。

本实验应用 SCIEX QTRAP® 5500 四极杆-线性离子阱复合质谱系统，建立高灵敏、高选择性、高特异性检测马兜铃酸 A 和马兜铃酸 B 的定量、定性方法，并将此方法用于检测多种中成药中马兜铃酸的含量。

QTRAP® 5500 质谱系统保持了三重四极杆质谱的全部优势：高灵敏度、耐用性、重现性和抗污染能力；快速的四极杆和线性离子阱模式切换使其具有特定的 IDA 工作流程：即多种三重四极杆和线性离子阱的预扫描方式（Survey Scan）相结合触发增强子离子扫描（EPI），智能化的 DBS 功能保证了低浓度化合物也能够获得高质量的二级图谱，从而能够简便、快速的完成不同样品中马兜铃酸的结构确证，以降低假阳性率。实验中主要采用了 MRM-IDA-EPI 的扫描方式，此方法可最高灵敏度的完成马兜铃酸定量和结构确证工作。



并结合 MultiQuant™ 软件能够简便、快速的建立马兜铃酸定量方法，应用此定量方法完成多种中成药中马兜铃酸 A 和马兜铃酸 B 的含量测定。

样品信息

1. 标准品

准确称取马兜铃酸 A 和 B 标准品约 5 mg，溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 储备溶液；用乙腈/水（50:50）稀释配制标准系列溶液，浓度范围 5 pg/mL-50 ng/mL。

2. 样品

中成药样品：市面药店购买含马兜铃属药材的中成药 10 种，编号分别为 NO.1-NO.10；

样品前处理：将样品粉碎，准确称量约 0.5 g，加入 25 mL 乙腈:水（50:50）超声提取 30 min，高速离心 10 min，取上清液稀释 100 倍进样分析。

液相条件

色谱柱： Kinetex C18 100 × 2.1 mm, 2.6 μm
Phenomenex Analytical Column,

流动相： A 相：水 + 5mM 甲酸铵 + 0.1 % 甲酸；

B 相：甲醇；

流速： 0.4mL/min；

洗脱方式： 梯度洗脱 7 min

柱温： 40 ℃；

进样体积： 20 μ L

质谱方法

扫描方式：**MRM-IDA-EPI 同时定量、定性分析方法**；

MRM: Q1 Q3 DP CE

马兜铃酸 A: 359.2 298.2 90 22

马兜铃酸 B: 329.2 268.0 80 15

动态背景扣除：**DBS**开启

ESI 离子源参数：

Curtain Gas: 20 psi; Collision Gas: High;

IS: 5500 V; TEM: 600 ℃;

GAS1: 60 psi; GAS2: 60 psi

(LLOQ) 为 5 pg/mL，在 LLOQ 浓度下连续进样 3 针，计算 3 针峰面积 CV% 值，马兜铃酸 A 和 B 峰面积 CV% 值分别为 2.95% 和 3.22%，由此证明此方法在具有很高灵敏度的同时也能够保证很好的重复性，图谱见图 1 和图 2。

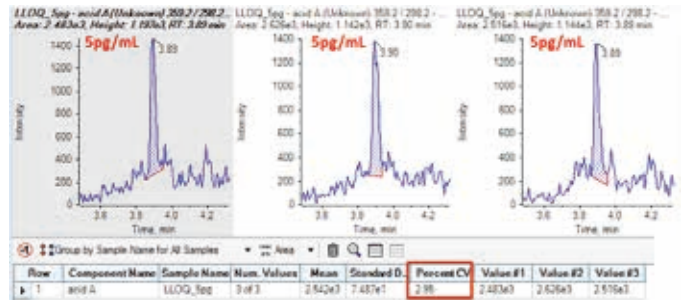


图1. 马兜铃酸A最低定量限 (LLOQ) 色谱图。

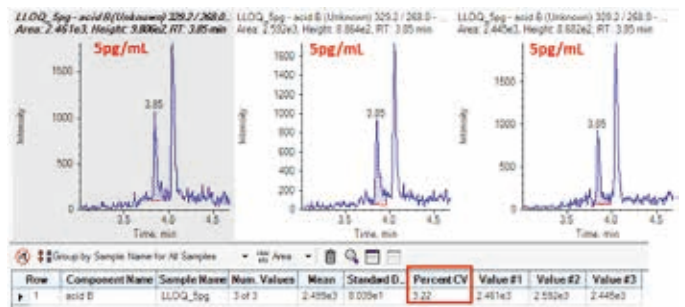


图2. 马兜铃酸B最低定量限 (LLOQ) 色谱图。

线性结果：马兜铃酸A和B在 5 pg/mL-50 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，r 值均大于 0.997，准确度均符合要求，线性方程和准确度结果详见图 3 和图 4。



图3. 马兜铃酸A线性方程和准确度结果。

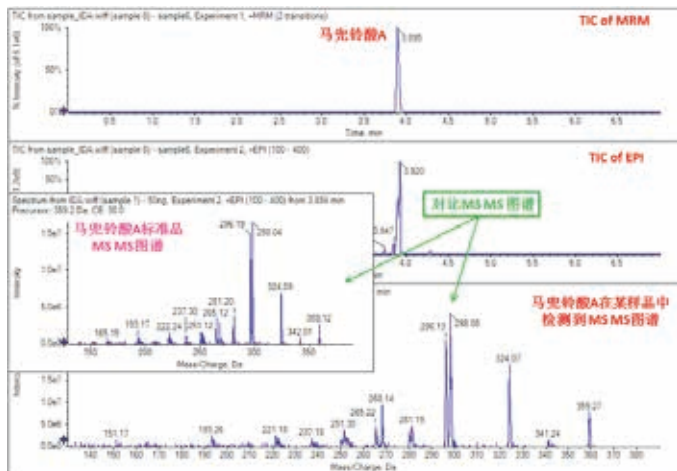


图1. MRM-IDA-EPI方法降低结果假阳性率。

实验结果

灵敏度和重现性结果：马兜铃酸A和B最低定量下线

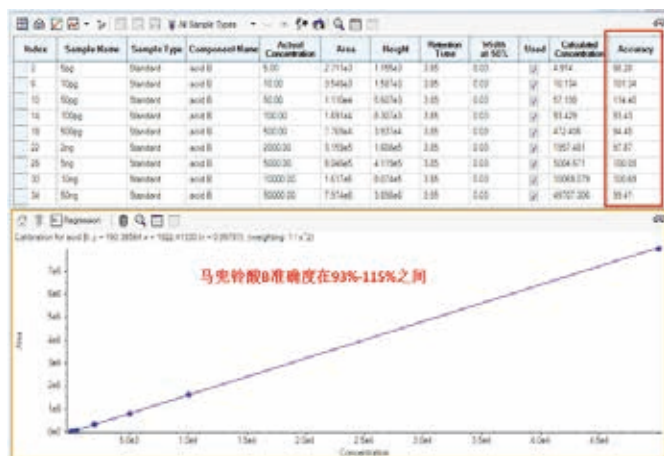


图4. 马兜铃酸B线性方程和准确度结果。

样品测定结果：应用上述前处理方法将10种市面购买的中成药进行提取，提取后将样品稀释进样分析，最终将浓度进行折算成单位为 $\mu\text{g/g}$ 浓度，测定结果显示：10个样品中全部检测出马兜铃酸A，浓度差异较大在0.015-32 $\mu\text{g/g}$ 之间；10个样品中有8个检测出马兜铃酸B，2个样品未检测出，含量与马兜铃酸A相比偏低且浓度差异较小，浓度范围在0.03-0.2 $\mu\text{g/g}$ 之间；通过比较不同样品之间马兜铃酸含量差异，发现10个样品中具有消炎止痛、止咳化痰功效的浓度偏高，其它功效样品中浓度偏低；样品中马兜铃酸含量测定结果详见表1和表2：

表1. 样品中马兜铃酸A含量测定结果（ $\mu\text{g/g}$ ）。

NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5
2.253	2.265	0.002	0.103	1.134
NO.6	NO.7	NO.8	NO.9	NO.10
31.058	0.016	2.125	7.243	0.748

表2. 样品中马兜铃酸B含量测定结果（ $\mu\text{g/g}$ ）。

NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5
0.603	0.074	NA	0.102	0.038
NO.6	NO.7	NO.8	NO.9	NO.10
0.082	NA	0.202	0.174	0.109

总结

1. 本实验采用QTRAP® 5500三重四极杆-线性离子阱复合型质谱仪，建立了一种高效、灵敏检测毒性中药成分马兜铃酸A和马兜铃酸B的检测方法，此方法经过验证具有很高的灵敏度、重现性和良好的线性，并将此方法用于测定10种中成药中马兜铃酸的含量，可将此方法推广至其他中成药和中药材中马兜铃酸的检测，提示用药的安全性。
2. 应用QTRAP® 5500先进的IDA工作流程，并结合智能化的动态背景扣除（DBS）功能，采用MRM-IDA-EPI扫描方式，发现和确证马兜铃酸一针完成，同时完成定量和定性分析，保证了结果的真实性，降低假阳性，提高结果正确率。
3. 马兜铃酸A和B的LLOQ可达5 $\mu\text{g/mL}$ ，可见此方法具有很高的灵敏度，LLOQ浓度下峰面积的CV%值均小于5%，可见此方法具有很好的重复性；马兜铃酸A和B在5 $\mu\text{g/mL}$ - 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好，r值和准确度结果均符合要求。
4. 中成药含量测定结果显示：马兜铃酸A全部检出且含量较高，不同样品之间含量差异较大；马兜铃酸B有8个样品检出含量与马兜铃酸A相比较低，且差异较小；通过数据比较发现：具有消炎止痛、止咳化痰功效的中成药马兜铃酸含量偏高，应用此类药品的人群需谨慎用药。

TripleTOF® 系统结合高分辨MS/MS 数据库让中药成分鉴定工作简单、快速、准确

张克荣², 扬州¹

1. 上海诗丹德生物技术公司; 2. SCIEX应用技术中心

背景

我国是世界上中药最丰富和最早利用中药的国家之一，具有5000多年的悠久历史，随着中国传统医药体系的现代化和国际化，现代化学和医学工作者面临越来越多的机遇和挑战。

中药成分分析是复杂和困难的一项工作，其化学成分是中药发挥药效作用的物质基础，是实现中药现代化的关键所在。中药有效成分的结构鉴定是中药成分分析的瓶颈问题。如何快速发现有效成分，并快速鉴定结构，是亟待解决的问题。

中药标准品很难全面买到，且价格昂贵，目前没有中药成分的MS/MS数据库，SCIEX公司和上海诗丹德生物技术公司合作完成了近900种中药成分高分辨MS/MS数据库的建立。结合LC/MS的高通量，高灵敏度，强大的定性、定量能力，为中药成分分析提供了简单、快速、准确的解决方案。

SCIEX TripleTOF®高分辨质谱仪，强大的信息依赖采集（IDA）功能，一次进样，获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS，结合近千种中药有效成分高分辨MS/MS数据库，能快速、准确地鉴定中药成分并归属中药种属。



图1. 应用TripleTOF®系列质谱，结合MS/MS 数据库，鉴定中药成分工作流程。



本文阐述了应用TripleTOF® 5600+，一次进样，结合MasterView™数据处理软件和中药高分辨MS/MS 数据库，进行中药成分分析工作流程（图1）。中药成分高分辨MS/MS 数据库基于《中国药典》一部中的中药品种的有效成分为基础，包含有皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、三萜类、苯乙醇苷、有机酸等近900 种化合物。

中药成分分析关键点

- 快速高分辨数据采集：一次进样，获得高分辨的TOF MS和MS/MS；
- 简单、易用：简单的四步，通过MasterView™ 软件完成中药成分的分析鉴定；
- 中药成分高分辨MS/MS 数据库，是基于《中国药典》一部中药材的有效成分建立起来的，包含有药典中药材提到的成分以及各药材中的主要有效成分，共计近900 种化合物；
- 化合物鉴定基于精确质量数、同位素分布以及MS/MS 匹配度，结果具有高的准确性和可信度；
- 简化中药成分分析时间，能快速鉴定出中药中的有效成分，也可快速鉴定出中药粉末中的成分，并归属其药材来源。

试验方法和材料

标准溶液配制:

分别称取补骨脂素、木犀草素、毛蕊异黄酮、异鼠李素、染料木苷、大豆苷、黄豆黄素、二氢大豆苷元、异补骨脂素适量，用甲醇溶解，制备成1 mg/mL储备液，然后各取适量配置混合标准品溶液，分别加到不含这些化合物的混合样品中，制成1 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL浓度。

液相条件:

Shimadzu 30A 系统:

色谱柱: C18, 2.1x100 mm, 2.6 μ m

流动相: A: 水-乙腈 95:5 (含有0.1%甲酸和 2 mM 甲酸铵溶液)

B: 水-乙腈 5:95 (含有0.1%甲酸和2 mM甲酸铵溶液)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

进样量: 5 μ L

梯度洗脱, 梯度条件见表1。

表1. 液相梯度条件

时间	A%	B%
0.1	95	5
14	40	60
16	5	95
20	5	95
20.1	95	5
25	95	5

质谱条件:

SCIEX TripleTOF[®] 5600+

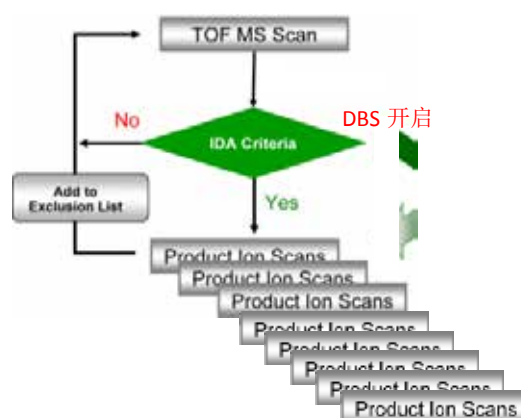
数据采集方法: 信息依赖采集 (IDA) 每个循环选择8最强的离子进行MS/MS, 即TOF MS-IDA-8 MS/MS。

动态背景扣除 (DBS) 开启。

Accumulation time: TOF MS 200ms

TOF MS/MS 80ms

Cycle time: 0.84s



质量范围: TOF MS 100-1600;

TOF MS/MS 50-1600

正、负离子模式检测。

质谱参数设置见表2。

表2. TripleTOF[®] 5600+ 质谱参数表

正离子模式		负离子模式	
源参数		源参数	
GS 1	60	GS 1	60
GS 2	60	GS 2	60
CUR	25	CUR	25
TEM	550 $^{\circ}$ C	TEM	550 $^{\circ}$ C
IS	5500	IS	-4500
化合物相关参数		化合物相关参数	
DP	100	DP	100
CE	40	CE	-40
CES	20	CES	20

应用MasterView™ 软件进行中药靶向成分分析

结合中药高分辨MS/MS 数据库，应用MasterView™ 软件，简单四步即可完成中药成分的鉴定。

- 1 导入要分析的数据
- 2 数据库化合物列表导入到MasterView
- 3 参数设置
- 4 处理、查看数据结果

中药标准添加鉴定实例

1. 导入数据

采集到的高分辨数据导入PeakView™ 软件中，打开MasterView™，图2。



图2. 数据依赖采集高分辨的MS 和MS/MS 用于中药成分鉴定

A 图展示的是总离子流色谱图TIC，蓝色是TOF MS 全扫描图，粉色是IDA 触发MS/MS 的色谱图。

2. 导入数据库中化合物列表

导入数据库中近千种的化合物列表，或拷贝已知药材中的列表到MasterView 中，图3。



图3. 化合物列表的导入

3. 参数设置

在软件设置提取化合物的强度或信噪比（S/N）阈值，根据用户设定的阈值，产生化合物的提取离子流色谱图（XICs），MS 和MS/MS 信息自动评估XIC 信号是否超出用户定义的强度或信噪比（S/N）阈值。

同时可设定进行置信度的设置（图4）。

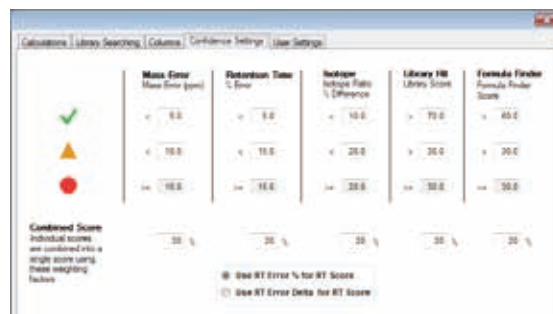


图4. MasterView™中置信度的设置。

置信区间用于成分鉴定和确证中通过、再核对以及没通过。根据设置会计算各自得分，结果列表会根据各标准的权重给出综合得分。

4. 数据处理，查看数据结果

点击处理，软件会根据理论质量数、同位素分布、保留时间、谱库中MS/MS 质谱图匹配，给出结果列表，通过“信号指示灯”能直观的浏览数据与谱库匹配的情况（图5）。结果直观、明了。

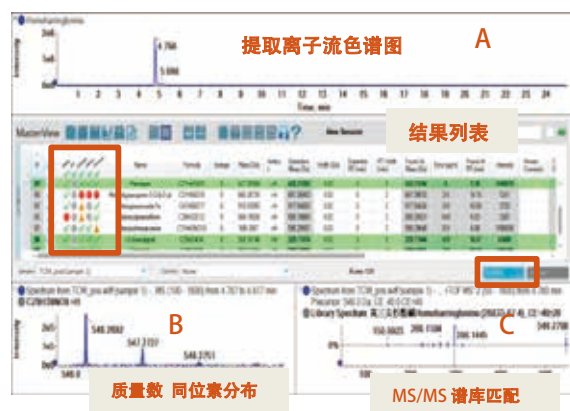


图5. 数据筛查结果

A 图展示的是提取离子流色谱图，可通过保留时间，进行匹配，如果没有保留时间信息，可忽略。B 图展示的测得质量数和同位素分布，与谱库中化合物理论值进行比对结果，C 图中是测定的MS/MS 与谱库中的碎片离子进行镜像对比图。

标准添加样品鉴定结果

在含有100多种中药成分的混合溶液中分别添加已知浓度的标准品（浓度范围1 ng/mL~500 ng/mL），筛查和鉴定数据采集结果，验证仪器灵敏度、鉴定工作流程以及数据库的有效性。

通过上述工作流程，筛查和鉴定混合溶液中的中药成分，一次进样，在正离子模式下鉴定到101个化合物，负离子模式下鉴定到67个化合物，鉴定到的各化合物质量准确度均小于2ppm，数据库匹配度均大于70，结果列表见3。代表性图谱见图6~8。

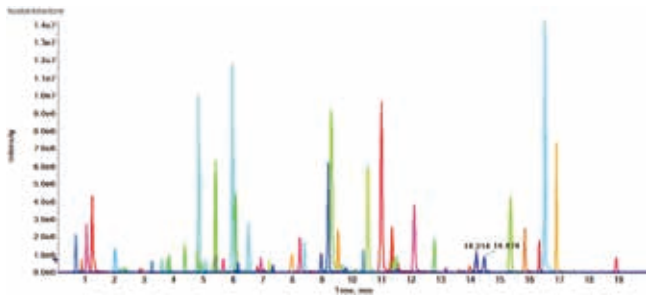


图6. 正离子模式下鉴定到的化合物提取离子流色谱图

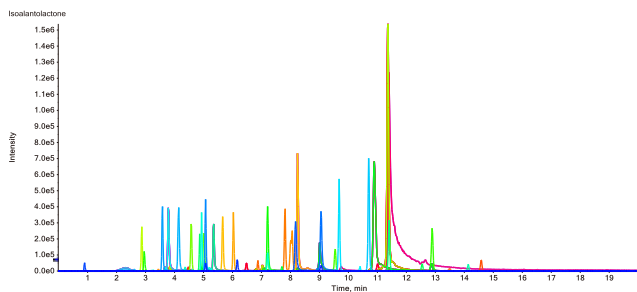


图7. 正离子模式下鉴定到的化合物提取离子流色谱图

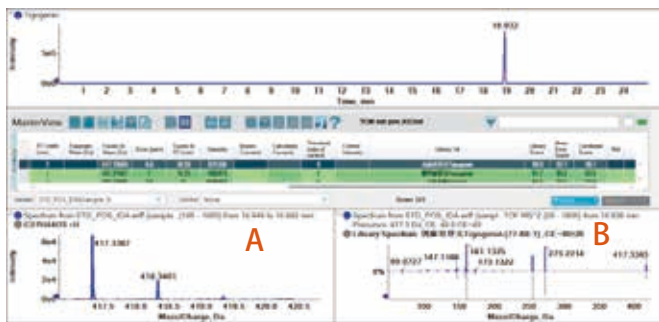


图8. 数据库检索代表性图谱

A 图蓝色为测得的精确质量数和同位素分布，灰色为理论值，两者匹配很好；B 图蓝色为剑麻皂苷元采集所得MS/MS，灰色为数据库的MS/MS，镜像显示，一目了然，数据库匹配良好。

样品中添加9个已知浓度的标准品，结果显示，在1ppb的浓度下，均能检测到化合物，见图9，质量准确度均小于2ppm，同时也采集到很好的MS/MS，谱库匹配度均大于70。

获得的数据可同时定性和定量，MasterView™ 软件筛查结果可保存成MultiQuant™（定量软件）方法，进行定量，见图10。

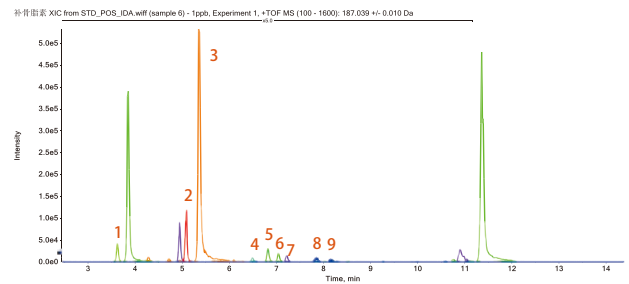


图9. 检测到的添加1ppb的各化合物提取离子流色谱图。
1~9 分别为大豆苷、异鼠李素、染料木苷、二氢大豆苷元、黄豆黄素、毛蕊异黄酮、木犀草素、补骨脂素、异补骨脂素

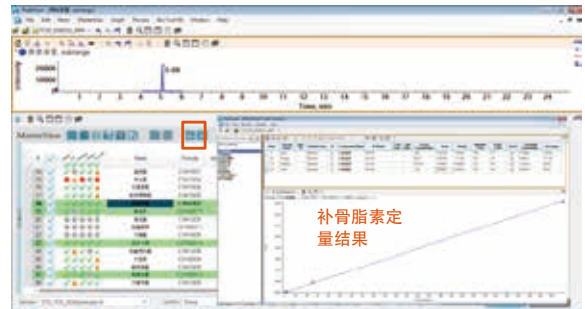


图10. 直接保存成定量方法，用MultiQuant 软件进行定量。
自动产生定量曲线，不需要手动建立定量方法。

结论

应用高分辨质谱TripleTOF®系列，一次进样获得高分辨的MS和MS/MS，运用MasterView™ 软件，结合中药高分辨MS/MS数据库，软件自动产生谱库匹配度得分，根据得分可简单、快速、准确的鉴定中药成分。同时数据结果可直接关联到MultiQuant™软件中，进行定量分析。实现了同时定性和定量。

通过已知浓度化合物标准添加，1ppb的浓度条件下，在多组分、高浓度化合物存在下，均能很好的测定和鉴定，体现了TripleTOF®的高灵敏度，在快速扫描下，也能保证MS/MS数据质量。

表3. 正、负模式下，鉴定到的化合物列表

Index	化合物名称	分子式	谱库匹配度		Index	化合物名称	分子式	谱库匹配度	
			Neg	Pos				Neg	Pos
1	辛夷脂素	C ₂₁ H ₂₂ O ₆		83.9	58	商陆皂苷甲	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₆		95.7
2	千金藤素	C ₃₇ H ₃₈ N ₂ O ₆		98.9	59	重楼皂苷VI	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₃		98.4
3	广防风苷A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	90.2	93	60	灵芝酸A	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	71.5	86.3
4	紫杉醇	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	89.8	88.1	61	白术内酯III	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	96.1	
5	青阳参苷元	C ₂₈ H ₃₆ O ₈	99.7		62	脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	91.6	
6	柳穿鱼叶苷	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	100	100	63	车前子苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	98.1	97.7
7	甜菊苷	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	100		64	异夏佛塔苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	99.4	99.1
8	水飞蓟宾	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	92.2		65	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	100	100
9	柚皮苷二氢查尔酮	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄	97.7	97.2	66	高三尖杉酯碱	C ₂₉ H ₃₉ NO ₉		94.4
10	吴茱萸次碱	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	100	93.3	67	七叶胆苷XVII	C ₄₈ H ₆₂ O ₁₈	99.6	98.2
11	龙胆苦苷	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	83.6	99.6	68	拟人参皂苷RT5	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀	97	96.7
12	羟喜树碱	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	98.1	97.8	69	异钩藤碱	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄		95.2
13	射干苷元	C ₁₆ H ₁₂ O ₆		88.8	70	欧当归内酯A	C ₂₄ H ₂₈ O ₄		99.3
14	剑麻皂苷元	C ₂₇ H ₄₄ O ₃		98.9	71	石杉碱甲	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O		98.6
15	海柯皂苷元	C ₂₇ H ₄₂ O ₄		91.7	72	马兜铃酸D	C ₁₇ H ₁₁ NO ₆	95.3	98.7
16	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈		93.6	73	马兜铃酸C	C ₁₆ H ₉ NO ₇	94.8	96
17	氧化槐果碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂		88.8	74	苦玄参苷IA	C ₄₁ H ₆₂ O ₁₃		99.8
18	鹰嘴豆芽素A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	94	99	75	芍药内酯苷	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁		99.8
19	甘松新酮	C ₁₅ H ₂₂ O ₃		73.4	76	胡芦巴碱	C ₇ H ₇ NO ₂		99.4
20	银杏内酯C	C ₂₀ H ₃₄ O ₁₁	99.7		77	紫草甙苷	C ₁₄ H ₁₉ NO ₆	98.3	94.4
21	土木香内酯	C ₁₅ H ₂₀ O ₂		99.3	78	蟾毒它灵	C ₂₆ H ₃₆ O ₆	70.3	98
22	广藿香酮	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	98.9	98.9	79	草乌甲素	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉		97
23	乙酰化白藜芦醇	C ₂₀ H ₁₈ O ₆		99.1	80	甲基橙皮苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	97.6	99
24	氧化白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	99.5	96.5	81	野马追内酯A	C ₂₄ H ₃₀ O ₉		99.8
25	香紫苏内酯	C ₁₆ H ₂₆ O ₂		99	82	朝藿定C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉		99.4
26	虫草素	C ₁₀ H ₁₃ N ₆ O ₃		99.7	83	马兜铃酸B	C ₁₆ H ₉ NO ₆		88.7
27	牛蒡子苷元	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	99.8	99.1	84	异土木香内酯	C ₁₅ H ₂₀ O ₂		99.4
28	6-甲基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₂		99.5	85	高良姜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		88.4
29	远志皂苷元	C ₃₀ H ₄₅ ClO ₆	98.2		86	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	98.4	
30	五味子丙素	C ₂₂ H ₂₄ O ₆		89.7	87	白杨素	C ₁₅ H ₁₀ O ₄		
31	相思子碱	C ₁₂ H ₁₄ O ₂ N ₂	98	99.9	88	槐角苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	98.1	98.9
32	椴树苷	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	96.4	99.5	89	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	95.8	98.5
33	野马追内酯B	C ₂₄ H ₃₀ O ₉		99.8	90	异荜素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	96.5	90.9
34	3-羟基巴戟醛	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	99.5	98.2	91	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆		97
35	蟾毒灵	C ₂₄ H ₃₄ O ₄		92.8	92	野黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	97.5	100
36	甲基莲心碱	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆	97.5	100	93	补骨脂素	C ₁₇ H ₆ O ₃		99.8
37	异虎耳草素	C ₁₃ H ₁₀ O ₅		89.3	94	杨梅苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	98.5	95.6
38	车叶草苷	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	99.4	100	95	乔松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄		99
39	通关藤苷H	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₄	93.8	94.6	96	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	99.1	93.3
40	莱菔迪苷A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	100	98.7	97	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	78.5	97.7
41	白术内酯I	C ₁₅ H ₁₈ O ₂		98.8	98	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	77.5	100
42	地榆皂苷II	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	100		99	芫花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅		93.3
43	芸香柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	97.7	99.3	100	田基黄苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	95.8	
44	东莨菪苷	C ₁₆ H ₁₈ O ₉		99.8	101	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	99	
45	宝藿苷I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	99.9	100	102	染料木苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	99.8	99.5
46	大波斯菊苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	99.8	99.7	103	羟基芫花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	98.6	98.9
47	贝母辛	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃		72.3	104	大豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₉		100
48	三七皂苷Fe	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	99.5		105	黄豆黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	98.5	98.2
49	苯甲酰新乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀		96.8	106	异槲皮素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	99	100
50	安五脂素	C ₂₀ H ₂₄ O ₄		97	107	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	89.6	94.4
51	雷公藤内酯酮	C ₂₀ H ₂₂ O ₆		95.2	108	二氢大豆苷元	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	98.1	99
52	雷公藤内酯甲	C ₃₀ H ₄₆ O ₃		86.7	109	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	99.5	99.4
53	蝙蝠葛苏林碱	C ₃₇ H ₄₂ N ₂ O ₆	90.6	99.7	110	木犀草素-7-β-D-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	99.7	100
54	三尖杉宁碱	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄		96.2	111	金合欢素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	85.5	88.9
55	黄豆黄苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	97.8	99.6	112	异补骨脂素	C ₁₇ H ₆ O ₃		95.6
56	山柰酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	99.7	99.4	113	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	98.5	
57	荭草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	98.3	99	114	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	99.6	100

致谢:

感谢上海诗丹德生物技术有限公司提供添加用的标准品和混合标样，以及在数据库建立中给予的大力支持和帮助。

TripleTOF®系统结合中药成分MS/MS数据库快速进行参芪扶正注射液成分分析

张克荣², 白杨¹

1. 中山大学药学院; 2. SCIEX应用技术中心

背景

近年来, 鱼腥草事件、刺五加事件、茵栀黄事件、双黄连事件等, 都是中药注射剂引发的事故, 已成为社会关注的一大焦点。而中药注射剂最突出的问题集中在其药效物质基础不明和现行的质量标准偏低, 成为制约中药注射剂发展的一大瓶颈, 亟待改进。参芪扶正注射液是由传统补气中药党参、黄芪经提取后配制而成的大输液, 为中药二类新药, 主要用于肿瘤的辅助治疗、冠心病、心绞痛等病症。自上市以来取得了良好的社会效益。全面的进行参芪扶正注射液的化学成分、了解其物质基础是非常必要的。

中药成分分析是复杂和困难的一项工作, 近些年来, 质谱技术的发展, 提供了很好的技术手段, 但是目前的鉴定还是根据测定的质量数、碎片离子、对照品以及网络检索等进行分析和鉴定, 耗时、耗力, 结果准确性不高。

SCIEX TripleTOF®快速高分辨质谱仪, 一次进样, 获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS, 结合中药有效成分高分辨MS/MS数据库, 软件自动计算理论分子量、同位素分布, 并同时和谱库中的MS/MS进行匹配, 自动给出综合得分, 直观、快速、准确的给出鉴定结果。

试验方法和材料

药品:

参芪扶正注射液和毛蕊异黄酮苷标准品由中山大学药学院提供。

样品的配制:

参芪扶正注射液样品直接旋转蒸发至最终浓度0.5 mg/mL (以原材料重量计算)。13000转/分离心10 min, 取上清液进行LC-MS/MS分析。



液相条件:

Shimadzu 30A系统:

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C18, 3.0 × 150mm, 3.5 μm

流动相: A: 含有0.1%甲酸水溶液

B: 甲醇

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40 °C

进样量: 5 μL

梯度洗脱, 梯度条件见表1。

表1. 液相梯度条件

时间	A%	B%
0.5	95	5
6	80	20
13	65	35
18	50	50
24	35	65
30	5	90
40	5	90
40.1	95	5
45	95	5

质谱条件:

SCIEX TripleTOF® 5600

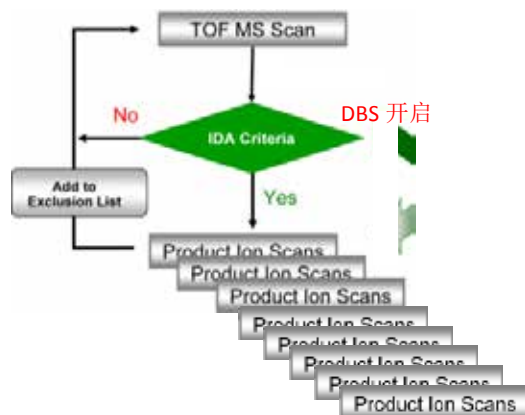
数据采集方法: 信息依赖采集 (IDA) 每个循环选择8个最强的离子进行MS/MS, 即TOF MS-IDA-8 MS/MS。

动态背景扣除 (DBS) 开启。

Accumulation time: TOF MS 150 ms

TOF MS/MS 80 ms

Cycle time: 0.84 s



质量范围: TOF MS 100-1100;

TOF MS/MS 50-1100

正、负离子模式检测。

质谱参数:

GS1: 60 GS2: 60 CUR: 25

TEM: 550°C IS: 5500/-4500

DP: 100 CE: +/- 40 ± 20

数据处理:

应用MasterView软件, 结合中药成分MS/MS数据库分别进行靶向和非靶向成分分析, 数据处理流程见图1。

结果

根据上述数据处理流程, 采用靶向分析方法, 对参芪扶正注射液进行成分分析, 共鉴定出包括有机酸、氨基

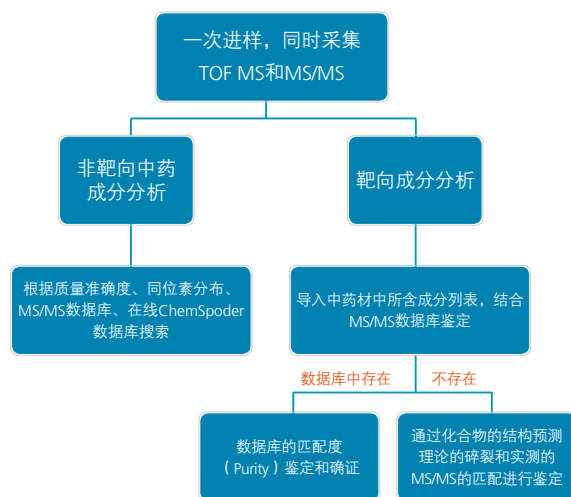


图1. 靶向和非靶向数据处理工作流程。

酸、寡核苷酸、生物碱、核酸、黄酮、异黄酮以及皂苷类成分共89个化合物, 鉴定结果见表2。所有化合物的质量误差均在2ppm以内, 结果均经过数据库匹配和理论碎裂与实测MS/MS匹配进行鉴定, 鉴定结果准确可靠。

靶向数据库匹配化合物鉴定

在MasterView软件中导入MS/MS数据库中1000多个化合物列表进行峰提取和数据库匹配, 根据化合物的分子组成、同位素分布以及MS/MS的匹配度, 给出综合评判得分, 所鉴定到的各化合物数据库匹配度大于80, 图2以黄芪异黄烷苷为例, 展示了利用数据库鉴定和确证化合物的过程, 通过数据库搜索, 快速准确地鉴定到46个化合物。

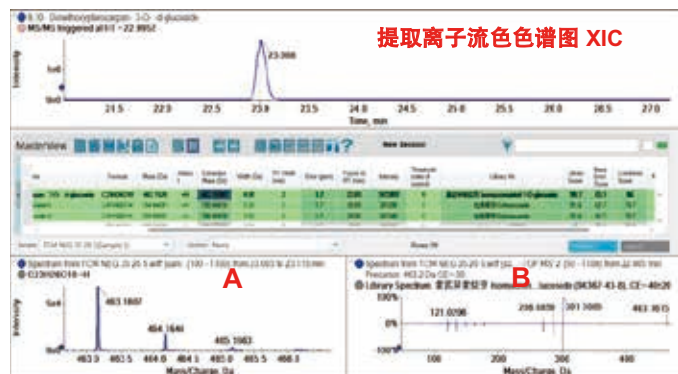


图2. 黄芪异黄烷苷鉴定结果。

A 图蓝色为测得的精确质量数和同位素分布, 灰色为理论值, 两者匹配很好; B 图蓝色为黄芪异黄烷苷采集所得MS/MS, 灰色为数据库的MS/MS, 镜像显示, 一目了然, 数据库匹配良好。在提取获得结果列表中, 软件自动给出匹配度、质量误差得分以及综合得分, 根据得分快速鉴定出结果, 结果准确度高。

靶向成分分析

在MasterView 软件中导入文献中报道以及中药数据库列表中黄芪和党参中的成分列表，进行峰提取和数据库匹配，对于数据库中没有的数据，软件可根据采集到的MS/MS，计算碎片分子组成，同时根据靶向成分的结构式软件可自动给出理论碎裂进行对比匹配，确证结果。见图3~4。

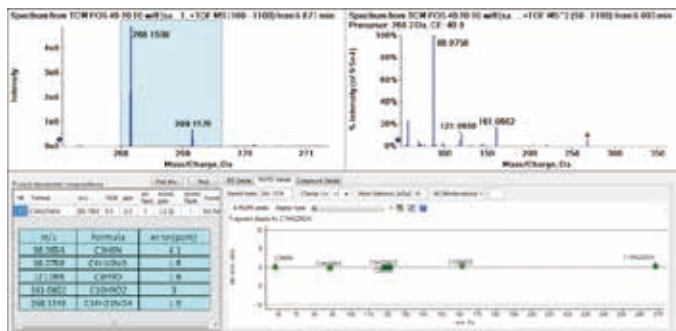


图3. Formula Finder 可根据TOF MS/MS 精确质量数计算中药成分二级碎片的元素组成（党参碱）。

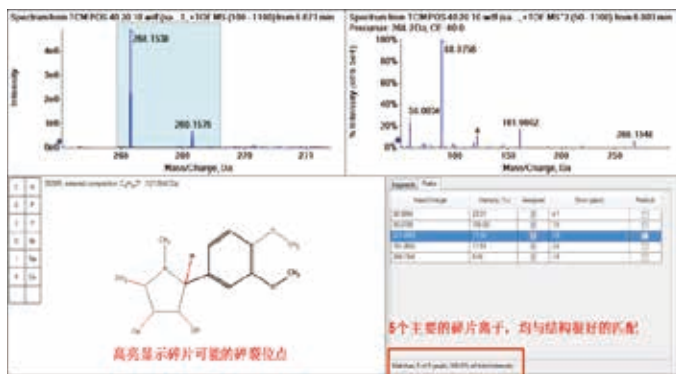


图4. Fragments Pane 自动进行党参碱结构解析。

根据结构，软件自动给出理论碎裂与实测结果匹配度，选择列表中的碎片离子，自动会在结构中显示出相应的碎裂位点，进行结构确证。

在负离子模式下鉴定出62 个化合物，提取离子流色谱图见图5。

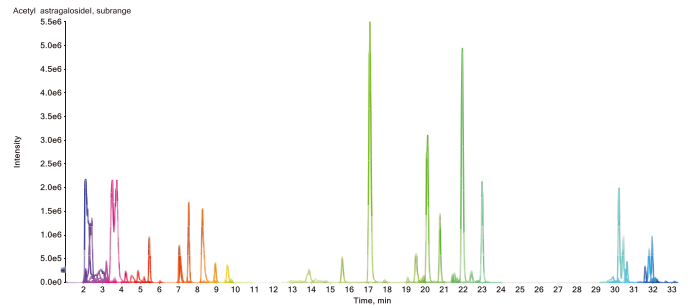


图5. 负离子模式下鉴定到化合物的提取离子流色谱图。

在正离子模式下鉴定出75 个化合物，提取离子流色谱图见图6。

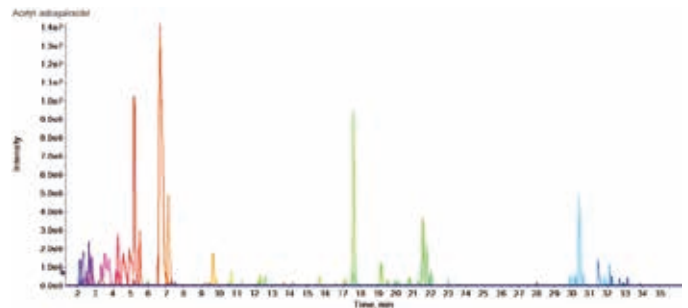


图6. 正离子模式下鉴定到化合物的提取离子流色谱图。

结论：

应用高分辨质谱TripleTOF®系列，一次进样获得高分辨的MS 和MS/MS，运用MasterView™ 软件，结合中药高分辨MS/MS 数据库，软件自动产生谱库匹配度得分，同时软件可根据化合物结构自动匹配理论碎裂和采集的MS/MS 匹配，鉴定结构，可简单、快速、准确的鉴定中药成分。

表2. 鉴定到的化合物列表

Index	化合物名称	分子式	保留时间 (min)	[M+H] ⁺ (Mass error, ppm)	[M-H] ⁻ (error, ppm)	Index	化合物名称	分子式	保留时间 (min)	[M+H] ⁺ (Mass error, ppm)	[M-H] ⁻ (error, ppm)
1	Lysine	C6H14N2O2	1.875	147.1127 (+1.01)	145.0870 (-1.08)	46	Syringic acid	C9H10O5	9.871	199.0600(-0.33)	197.0455(-0.14)
2	Arginine	C6H14N4O2	2.053	175.1189 (-0.43)	173.1043 (-0.32)	47	RhRAnocitrin 3,4 - diglucoside	C28H32O16	10.704	625.1770(+1.04)	623.1620(+0.43)
3	Fructose/glucose	C6H12O6	2.071		179.0563 (+0.79)	48	Ferulic acid	C10H10O4	11.491	195.0652(-0.16)	193.0508(+1.27)
4	Choline	C5H13NO	2.077	104.1069 (-0.94)		49	Rutin	C27H30O16	11.56	611.1590(-2.75)	609.1459(-0.40)
5	Asparagine	C4H8N2O3	2.108	133.0605 (-2.00)	131.0461 (-0.93)	50	Tangshenosidell	C17H24O9	12.359	373.1491(-0.53)	371.1345(-0.78)
6	Threonine	C4H9NO3	2.12		118.0507 (-1.88)	51	Emodin-di- Glucoside	C27H30O15	13.301	595.1651(-1.07)	593.1512(-1.10)
7	γ -aminobutyric acid	C4H9NO2	2.134	104.1065 (+0.75)		52	Geniposide	C17H24O10	13.865		387.1288(-2.29)
8	Trigonelline	C7H7NO2	2.212	138.0547 (-1.87)	136.0404 (-0.21)	53	Pratensein-7-O- glucoside	C22H22O11	15.7	463.1236(+0.05)	461.1085(-0.87)
9	Proline	C5H9NO2	2.296	116.07061(-1.9)		54	Syringaldehyde	C9H10O4	15.778	183.0650(-0.19)	
10	Sucrose	C12H22 O11	2.401		341.1089 (-0.08)	55	Isoferulic acid	C10H10O4	15.9		193.05063 (-0.7)
11	Raffinose	C18H32 O16	2.536		503.1615 (-0.45)	56	p-Coumaric acid glucoside	C15H18O8	17.164	327.1074(-0.04)	325.0928(-0.41)
12	Cytidine	C9H13N3O5	2.64	244.0928(-0.7)		57	calycosin-7-o-glucoside	C22H22O10	17.606	447.1285(-0.16)	445.1140(+0.01)
13	Adenine	C5H5N5	2.732	136.0617 (-0.70)	134.0470 (-1.68)	58	Tangshenosidel	C29H42O18	17.897		677.2278(-3.04)
14	Stachyose	C24H42O21	2.77		665.2149 (+0.42)	59	Cosmosiin	C21H20O10	18.203	433.1130(+0.14)	431.0975(-2.00)
15	L-Valine	C5H11NO2	2.77	118.0862(-1.4)		60	Isomucronulatol- 2,5 - di-O- glucoside	C29H38O16	19.01	643.2212(-3.18)	641.2085(-0.28)
16	Pipecolic acid	C6H11NO2	2.78	130.08626(1.6)		61	Perlolyrine	C16H12N2O2	19.19	265.0974(+0.94)	263.0826(+1.10)
17	Betaine	C5H11NO2	2.799	118.0861 (-1.03)		62	Lobetyolinin	C26H38O13	19.977	559.2384(-0.12)	557.2236(+0.72)
18	Glu-Gln	C10H17N3O6	3.085	276.1191 (+0.29)		63	Hexyl- β -D- glucopyranosyl- β -D- glucopyranoside	C18H34O11	20.133	427.2175(+0.25)	425.2029(+0.06)
19	Methionine	C5H11NO2S	3.211	150.0583 (-0.36)		64	Hexenyl- β -D- glucopyranoside	C12H22O6	20.81	263.1487(-1.00)	
20	Verbascose	C30H52O26	3.274		827.2670 (-0.48)	65	Ononin	C22H22O9	21.561	431.1335(-0.33)	
21	Nicotinic acid	C6H5NO2	3.339	124.0392(-0.97)		66	Lobetyolin	C20H28O8	21.698	397.1855(-0.42)	395.1712(-1.16)
22	n-Butyl allophanate	C6H12N2O3	3.489	161.0918(-1.36)		67	9,10- Dimethoxypterocarpan- 3-O- -d-glucoside	C23H26O10	21.798	463.1599(-0.05)	
23	6-Hydroxypurine	C5H4N4O	3.59	137.04579(-2.0)		68	Azelaic acid	C9H16O4	21.978	189.1121(-0.25)	187.0979(+1.45)
24	Inulin	C36H62O31	3.671		989.3209(+0.63)	69	n-Hexyl- β -D- glucopyranoside	C12H24O6	22.045	265.1641(-1.70)	263.1500(+2.86)
25	L-Pyrogutamic acid	C5H7NO3	3.728	130.0499(+0.15)	128.0354(+0.49)	70	Isomucronulatol- 7,2 - di-O-glucoside	C29H38O15	22.476	627.2282(-0.20)	625.2140(+0.34)
26	Uridine	C9H12N2O6	4.14		243.06226(1.3)	71	2,4-Nonadienal	C9H14O	22.726	139.118(+0.77)	
27	Uracil	C4H4N2O2	4.199	113.0344(-0.98)		72	Isomucronulatol-7- O- glucoside	C23H28O10	23.04	465.1757(+0.34)	463.1611(+0.21)
28	p-Coumaric acid	C9H8O3	4.307	165.0547(+0.08)	163.0399(-0.73)	73	Calycosin	C16H12O5	23.61	285.0757(-0.04)	283.0613(+0.47)
29	Tyrosine	C9H11NO3	4.31	182.0812(+0.10)	180.0664(-1.09)	74	6'-O-Acetyl ononin	C24H24O10	25.334	473.1446(+0.82)	
30	Amber Acid	C4H6O4	4.36		117.01933(0.2)	75	Attractylenolide III	C15H20O3	30.088	249.1487(+0.67)	
31	Ethyl- α -D-fructoside	C8H16O6	4.365	209.1018(-0.70)	207.0874(-0.02)	76	Astragaloside V/VI/VII	C47H78O19	30.21	947.5199(-1.11)	945.5076(+1.23)
32	Isoleucine	C6H13NO2	4.67	132.1021(+0.19)	130.0875(+0.75)	77	Astragaloside V/VI/VII	C47H78O19	30.432	947.5195(-1.51)	945.5078(+2.44)
33	Leucine	C6H13NO2	5.019	132.1023(+0.39)	130.0875(+0.75)	78	Cyclocanthoside E	C41H70O14	30.52	787.4836(-0.26)	785.4697(+0.52)
34	Adenine nucleoside	C10H13N5O4	5.245	268.1039(-0.34)	266.0894(-0.43)	79	Astragaloside III	C41H68O14	30.65	785.4676(+0.78)	783.4536(-0.03)
35	Guanosine	C10H13N5O5	5.545	284.0988(-0.61)	282.0844(0.7)	80	Astragaloside V/VI/VII	C47H78O19	31.774	947.5185(-2.51)	945.5060(+0.64)
36	Ala-Pro	C8H12O2N2	6.591	169.0972(+0.27)	167.0828(+0.96)	81	AstragalosideIV	C41H68O14	32.164	785.4676(+0.78)	783.4536(-0.03)
37	Codonopsine	C14H21NO4	6.785	268.1542(-0.49)		82	AstragalosideII	C43H70O15	32.242	827.4778(-0.95)	
38	5-Hydroxymethyl- furaldehyde	C6H6O3	7.093	127.0391(+0.13)		83	AstragalosideVIII	C47H76O17	32.423	913.5145(-1.13)	911.5011(-0.17)
39	Phenylalanine	C9H11NO2	7.217	166.0862(-0.18)	164.0717(1.2)	84	SoyasaponinI	C48H78O18	32.71	943.5245(+1.72)	941.5115(1.06)
40	MarkhRAiosideF	C18H26O12	7.639		433.1351(-0.05)	85	IsoastragalosideII	C43H70O15	32.676	827.4786(-0.23)	
41	Protocatechuic acid	C7H6O4	7.742	155.0335(-2.25)	153.0193(+0.01)	86	CyclocephalosideII	C43H70O15	33.14	827.4782(-0.55)	
42	Vanillic acid	C8H8O4	8.449	169.0493(-1.59)	167.0354(+2.38)	87	AstragalosideI	C45H72O16	33.275	869.4875(+2.10)	
43	Chlorogenicacid	C16H18O9	8.987		353.0878(-0.11)	88	IsoastragalosideI	C45H72O16	33.841	869.4884(-0.91)	
44	Glu-His	C11H16N4O5	9.496	285.1191(-0.79)	283.1038(-3.61)	89	Acetyl astragalosideI	C47H74O17	34.096	911.5015(+1.75)	909.4855(+0.24)
45	Tryptophan	C11H12N2O2	9.704	205.0968(-1.85)	203.0823(-1.68)						

X500R QTOF 在人参皂苷成分鉴定中的应用

X500R on The Application Of The Identification Of Ginsenosides

王莎, 程海燕, 刘婷, 李立军, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

背景

人参是珍贵药材之一, 具有“大补元气、宁神益智、益气生津、补虚扶正”等功效, 现代医学研究证明, 人参在预防肿瘤、抗衰老、抗心律失常、降糖降脂、提高免疫力等方面都有功效, 其主要药效成分为人参皂苷。

人参皂苷属于三萜类化合物, 根据糖苷基结构, 可分为四环三萜类的达玛烷型和五环三萜类的齐墩果烷型, 达玛烷型又可分为人参二醇型和人参三醇型。由于人参中皂苷类成分较多, 不同种类、不同来源人参中皂苷类的成分组成存在差异^[1], 目前想要全面反映人参中皂苷类的组成, 并对其结构进行准确解析, 可能需要查找大量相关文献及资料。同时, 得到的分析结果很难找到有力的数据进行二次确证, 这对研究人参的质量评价及物质基础具有很大的挑战。

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱仪, 一针进样, 强大的信息依赖 (IDA) 采集功能, 获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS图, 结合SCIEX公司丰富的中药有效成分高分辨MS/MS数据库, 软件自动计算理论分子量、同位素分布、并同时和谱库中的MS/MS进行匹配, 通过综合得分, 能直观、快速、准确地得到人参皂苷类的成分鉴定结果。

SCIEX中药成分高分辨二级数据库基于《中国药典》一部中的中药品种的有效成分为基础, 包含有皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、三萜类、苯乙醇苷、有机酸等近千种化合物。

本文阐述了SCIEX X500R QTOF高分辨质谱结合超高效的SCIEX OS数据处理软件及中药高分辨MS/MS数据库对中药中人参皂苷成分的分析工作流程。软件界面简单易学, 工作流程清晰明了, 数据结果高质高效。

实验思路:

1. 通过TOF-IDA-10 MS/MS模式, 一针进样, 实现同时获得一级母离子和二级子离子信息, 大大节省了工作时

间, 提高工作效率。

2. 导入已知人参皂苷的成分列表, 根据精确质量数、同位素分布及中药数据匹配结果, 对化合物进行鉴定, 并以Ginsenoside Rg2为例演示数据库匹配结果的准确性。
3. 根据精确分子量、二级特征碎片离子及相对保留时间对人参皂苷中存在的同分异构体进行进一步鉴定。
4. 列出已鉴定出的51种常见人参皂苷的成分列表。

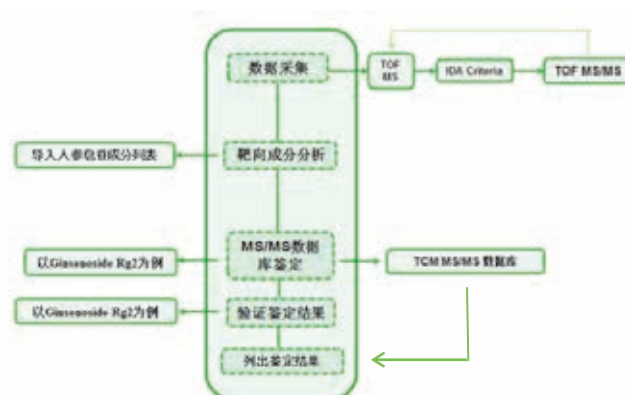


图1. 应用SCIEX X500R QTOF高分辨质谱, 结合MS/MS中药数据库, 鉴定人参皂苷成分的工作流程。

前处理方法

- a、准确称取5.0g人参粉末于50mL离心管中;
- b、加入25mL 90%的甲醇水, 振荡5min;
- c、放入冰箱浸泡过夜;
- d、超声30min, 在4℃, 10000r/min下离心12min;
- e、取上清液过0.22μm滤膜, 待测;

液相条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18, 2.1 × 100mm, 2.6μm;

流动相：采用梯度洗脱

负离子：A为H₂O（含0.05%甲酸）；B为乙腈；

流速：0.25mL/min；

柱温：40℃；

进样量：3 μL；

表1. 液相梯度条件。

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
0.5	90	10
5.0	50	50
35.0	10	90
40.0	0	100
40.1	90	10
45.0	90	10

质谱方法：

扫描方式：TOF -IDA-10 MS/MS定性；

ESI离子源参数：

气帘气CUR: 35psi；

IS电压：-4500V；

源温度：550℃；

锥孔电压：-80V；

雾化气GAS1: 55psi；

辅助气GAS2: 55psi；



应用OS软件进行人参皂苷成分鉴定实例

SCIEX OS软件系统平台，同时提供质谱仪控制、方法编辑、数据分析、结果报告。

1. 数据采集

按照编辑完成的液相、质谱方法对已处理好的样本进行数据采集，由Explorer数据处理选项打开已采集到的高分辨数据，如图2所示。

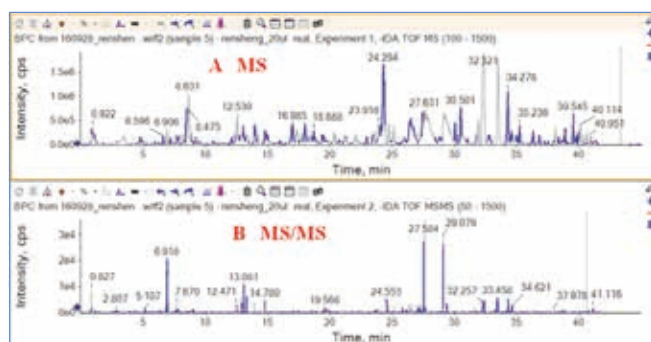


图2. 采集高分辨的TOF MS-IDA-TOF MS/MS数据。

A图展示的是TOF MS全扫描图，B图为一针进样IDA触发TOF MS/MS的色谱图。

2. 数据处理方法编辑

采用靶向成分分析方法，导入数据库已有或拷贝已知人参皂苷列表到Components选项中，包括名称和分子组成，如图3所示。

Row	Name	Chemical Formula	Adduct/Charge	Precursor Mass (Da)
43	Ginsenoside Rg1	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
44	Ginsenoside Rg2	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
45	Ginsenoside Rg3	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
46	Ginsenoside Rg4	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
47	Ginsenoside Rg5	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
48	Ginsenoside Rg6	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
49	Ginsenoside Rg7	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
50	Ginsenoside Rg8	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
51	Ginsenoside Rg9	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
52	Ginsenoside Rg10	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
53	Ginsenoside Rg11	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
54	Ginsenoside Rg12	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
55	Ginsenoside Rg13	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
56	Ginsenoside Rg14	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
57	Ginsenoside Rg15	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
58	Ginsenoside Rg16	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
59	Ginsenoside Rg17	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
60	Ginsenoside Rg18	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
61	Ginsenoside Rg19	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717
62	Ginsenoside Rg20	C42H72O13	[M+H] ⁺	823.0717

图3. 导入化合物列表。

同时，选择需要搜索的数据库（本实验中使用的数据库为TCM MS/MS Library）及对置信度进行设置，如图4。

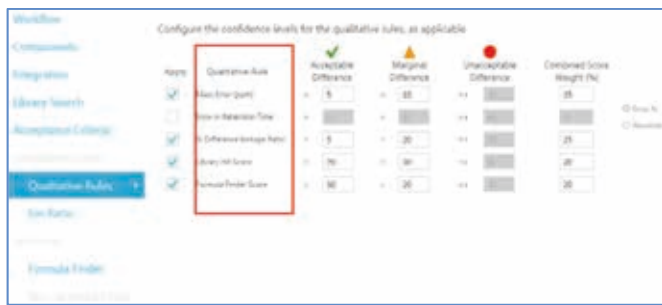


图4. SCIEX OS软件中置信度的设置。

置信区间主要用于成分鉴定和确证，包括理论质量数、同位素分布、保留时间（如没有该信息，可忽略）、谱库中MS/MS质谱图匹配，根据设置会计算各自得分，结果列表中会根据四个参数的权重给出综合得分。

3. 数据处理，查看数据处理结果

用已建好的数据处理方法单独打开需要处理的数据，点击处理，软件会根据已设定好的四个置信度快速给出结果列表，通过“信号指示灯”能直观获取数据的处理结果，包括与二级谱图的匹配情况，结果一目了然。鉴定结果以人生皂苷Rg2（Ginsenoside Rg2）为例，结果如图5所示。

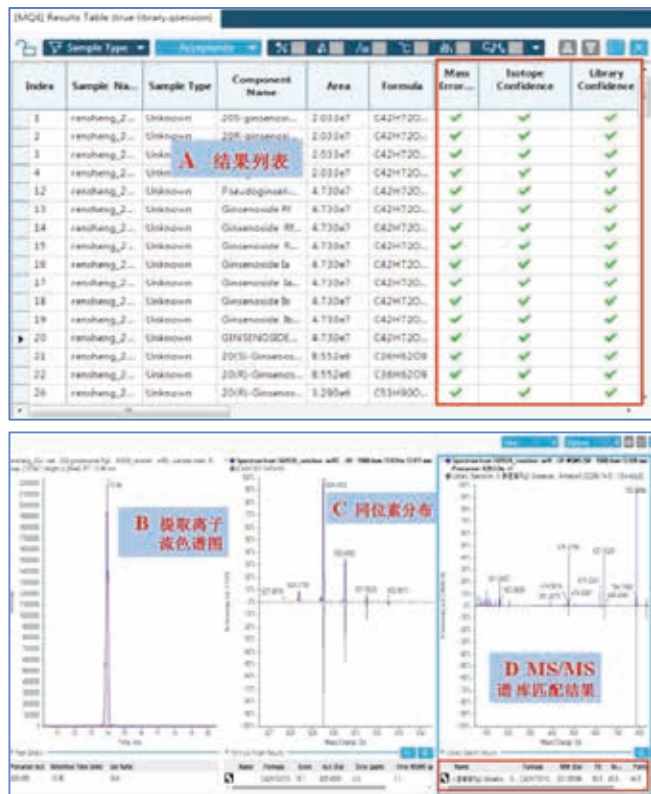


图5. 数据筛查结果展示。

A图展示的为数据处理后的结果列表；B图展示的为提取离子流色谱图，保留时间对化合物的确证有作用；C图展示的为所测到的质量数与同位素分布图，上面部分为实际测得值，下面灰色部分为理论值，结果显示，两者匹配较好。D图展示的是MS/MS谱库匹配结果的镜像图，上面蓝色部分为人参皂苷采集所得到的MS/MS图，下面灰色部分为数据库的MS/MS图，结果对比清晰，同时右下角显示搜库结果，综合得分在90分以上，库匹配结果较好。

鉴定结果确证

人参皂苷在ESI负离子模式下一级质谱图中，准分子离子峰主要以 $[M-H]^-$ 和 $[M+HCOOH-H]^-$ 存在，皂苷类化合物的结构说明，在其二级特征性碎片信息中很容易得到丢失HCOOH和各种糖的子离子，如：-46 -162（Loss HCOOH&Glu）；-46-146（Loss HCOOH&Rhamnose）或-46-132（Loss HCOOH&arabinose），并且容易形成碎片161。对人参皂苷Rg2的二级碎片进行结构解析，如图6所示。

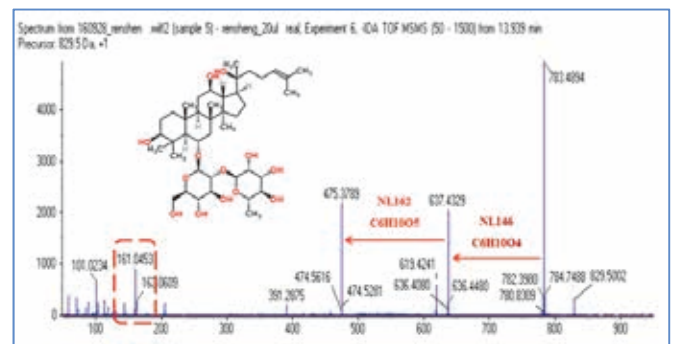


图6. 人参皂苷Rg2的二级结构解析图。

由MS/MS信息推测结构，NL丢失162和146，且有达玛烷三醇的特征碎片 m/z 475，可以说明该结构为达玛烷三醇+葡萄糖+鼠李糖，接近与人生皂苷Rg2的结构组成，和搜库结果匹配。

人参皂苷是由不同的苷元和糖组成，在苷元的位置会加上不同的糖类，如葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖等。同时，苷元和糖具有不同的构型，因此会形成不同的空间异构化合物。因此在数据库搜索的基础上，异构体同时要结合化合物的二级特征碎片离子信息、保留时间及相关文献^[2]对所检测到的人参皂苷进行进一步的的确证，二级碎片在中药成分的结构鉴定中尤为重要。

表2. 鉴定到的人参皂苷列表

Index	化合物名称	分子式	[M+HCOOH-H]-	Mass Error (ppm)	保留时间 (min)	MS/MS
1	20R-ginsenoside Rg2	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	2.30	13.93	m/z783, 637, 475,391,161
2	20S-ginsenoside Rg2	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	1.78	14.01	m/z783, 637, 475,391,161
3	20S-ginsenoside F2	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	1.50	21.05	m/z783, 621, 459,161
4	20R-ginsenoside F2	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	1.10	20.10	m/z783, 621, 459,161
5	20S-ginsenoside Rg3	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	-0.80	26.09	m/z783, 621,459,375,161
6	20R-ginsenoside Rg3	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4944	-0.80	26.54	m/z783, 621,459,375,161
7	Ginsenoside Rg4	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4838	-1.20	7.79	m/z765,619,457,161
8	Ginsenoside F4	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4838	-1.70	12.22	m/z765,619,457,161
9	Ginsenoside Ic	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4838	-0.90	28.58	m/z765,619,457,161
10	Ginsenoside Rk1	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4838	-1.20	29.04	m/z765,603,441,161
11	Ginsenoside Rk1 (isomer)	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4838	1.40	41.33	m/z765,603,441,161
12	Pseudoginsenoside F11	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4893	-1.60	12.52	m/z799,637,475,161
13	Ginsenoside Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4893	-1.90	8.63	m/z799,637,475,161
14	Ginsenoside Rf (isomer)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4893	-1.60	8.35	m/z799,637,475,161
15	Ginsenoside Rg7	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4893	-2.00	7.64	m/z799,637,475,161
16	Ginsenoside Rg1(Ginsenoside A2)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4893	-1.60	7.40	m/z799,637,475,161
17	Ginsenoside F1	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.4365	0.90	15.85	m/z637,475,391,161
18	20(S)-Ginsenoside Rh1	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.4365	0.70	14.23	m/z637,475,391,161
19	20(R)-Ginsenoside Rh1	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.4365	0.90	14.10	m/z637,475,391,161
20	Ginsenoside Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5472	-0.84	8.47	m/z945, 799,637,475
21	Ginsenoside Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5472	-0.70	21.22	m/z945,783,621,459,375,161
22	Ginsenoside Rd (isomer)	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5472	-0.70	22.83	m/z945,783,621,459,161
23	pseudo-Ginsenoside RT2	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	831.4737	-1.50	7.41	m/z785,653,491,391
24	Ginsenoside Rb2	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5895	-1.90	18.45	m/z1077,945,783,621,459
25	20(S)-Ginsenoside Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5895	-2.10	19.44	m/z1077,945,783,621,459
26	20(R)-Ginsenoside Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5895	-1.90	19.76	m/z1077,945,783,621,459
27	Ginsenoside Rb1	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1153.6001	-1.00	17.99	m/z1107, 945,783,621,459
28	20(S)-Ginsenoside-Rh2	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	667.4416	-0.50	29.52	m/z621,459,375
29	20(R)-Ginsenoside-Rh2	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	667.4416	-0.50	30.50	m/z621,459,375
30	Ginsenoside Rd+Acetylation	C ₅₀ H ₈₄ O ₁₉	1033.5578	-1.40	20.26	m/z987, 945, 928, 783, 621,459
31	Ginsenoside Re+Acetylation	C ₅₀ H ₈₄ O ₁₉	1033.5578	-1.52	20.74	m/z987, 945, 928, 783, 621,459
32	Pseudoginsenoside RT5	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀	699.4314	-1.10	7.75	m/z699,653,491,329,161
33	Ginsenoside Ra1	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1255.6317	-0.63	17.23	m/z1209,1077,945,783,621,459
34	Ginsenoside Ra2	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1255.6317	-0.70	18.40	m/z1209,1077,945,783,621,459
35	Chikusetsusaponin III	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	961.5367	-1.00	23.65	m/z915,783,621,459,375
36	Ginsenoside Rs2	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1165.6001	1.60	20.17	m/z1119,1077,1059,945,783,621,459
37	Ginsenoside Rs2 (isomer)	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1165.6001	1.84	19.57	m/z1119,1077,1059,945,783,621,459
38	Ginsenoside Rs1	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1165.6001	1.00	18.67	m/z1119,1077,1059,945,783,621,459
39	Ginsenoside Rs1 (isomer)	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	1165.6001	1.00	17.73	m/z1119,1077,1059,945,783,621,459
40	Ginsenoside R1	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	977.5316	-1.20	7.87	m/z 931, 799, 637, 475, 161
41	Ginsenoside F3	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	815.4788	-1.40	13.04	m/z 161, 391, 475, 637, 769
42	Ginsenoside F3 (isomer)	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	815.4788	-1.44	11.22	m/z 161, 391, 475, 637, 769
43	Pseudo-ginsenoside RT1	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	971.4846	0.40	9.64	m/z 161, 763
44	Ginsenoside Rs3	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₄	871.5050	0.40	25.25	m/z 161, 459, 621,783
45	Ginsenoside R2	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	815.4788	-1.40	10.52	m/z 161, 391, 475, 637, 769
46	Ginsenoside Ra3	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1285.6423	-2.09	15.97	m/z 1239, 1077, 945, 783, 621
47	Ginsenoside Ra3 (isomer)	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1285.6423	-2.10	17.52	m/z 1239, 1077, 945, 783, 621
48	Ginsenoside Rb3	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5895	-1.00	18.45	m/z 1077, m/z 1123
49	Ginsenoside Rb3 (isomer)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5895	-1.13	19.44	m/z 1077, m/z 1123
50	Ginsenoside Rk3	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	665.4259	-1.30	20.68	m/z 161, 619
51	Protopanaxatriol	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	521.3837	-1.00	21.26	m/z521,475,391
52	Protopanaxatriol (isomer)	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	521.3837	-1.03	22.05	m/z521,475,391
53	Ginsenoside Ro	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	1001.4952	2.40	25.07	m/z 955,793,631,455

结论:

本实验采用高分辨质谱SCIEX X500R QTOF系统完成了人参皂苷成分的鉴定工作,应用SCIEX OS软件并结合TCM中药MS/MS数据库快速、准确的鉴定出53种人参皂苷成分,为中药成分分析提供了很好的解决方案,体现了SCIEX高分辨数据库的优势。高分辨的MS/MS中药TCM数据库包含近千种中药有效成分的MS/MS谱图,通过自动获取数据库匹配信息,大大缩短了中药成分的鉴定时间,并能够实现简单、准确的中药成分鉴定。

全新的高分辨质谱SCIEX X500R QTOF系列在完成中药成分鉴定工作方面具有很好的灵敏度和分辨率,通过IDA工作流程保证了一次采集的完整性,即能够获得所有成分的TOF MS 和MS/MS数据;X500R前端继承了三重四极杆的全部优势,大大的提高了仪器的定量能力,保持很好的灵敏度、稳定性和线性范围。

全新的SCIEX OS系统软件将仪器控制、方法编辑、数据采集、数据分析和报告结合为一体;能够同时完成定性和定量分析工作,实现了软件之间的无缝链接,简化了分析流程。

参考文献:

- [1] 申丹, 唐仕欢, 卢朋, 等. 含人参中成药用药规律分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12), 2027-2032.
- [2] 张晓旭, 王洪平, 杨阳, 等. 超高效液相色谱 – 串联四极杆飞行时间质谱法快速鉴别生晒参中的皂苷类成分[J]. 中国医药导报, 2015, 12(9), 130-136.

高分辨质谱 X500R 研究远志根不同产地之间的成分差异

High resolution mass spectrometry X500R research the different composition of Polygala from different regions

李志远，程海燕，刘婷，李立军，靳文海
SCIEX，亚太应用支持中心（北京），中国

引言

道地药材来源于特定产地且传统公认的名优正品药材，是优质中药材的代名词，也是历代中医评价中药材品质的一个综合而物质化标准。道地药材在辨别药材真伪、控制中药质量中发挥着独特而重要的作用，中药材道地性已成为优质药材的重要保证。

远志是我国重要的大宗药材之一，同时也是我国85种传统出口药材之一和国家42种重点保护的三级野生品种之一^[1]。2010版《中国药典》收录的远志药材分别来自远志科植物细叶远志与卵叶远志的干燥根，具有安神益智，交通心肾，祛痰，消肿。用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸等^[2]。远志的主流商品基源为远志，分布于我过沙漠以南和长江以北，主产于山西、陕西、河南和河北，传统认为“山西量大，陕西质优”^[3]。

目前，关于中药成分的鉴定与分析面临着巨大的挑战，而其化学成分是中药发挥药效作用的物质基础，是实现中药现代化的关键所在。如何快速发现有效成分，快速鉴定结构，并找出道地药材与非道地药材有效成分之间的差异，是亟待解决的问题。

本实验通过SCIEX最新的高分辨质谱X500R进行数据采集和分析，配合组学分析软件MarkerView™对其差异成分进行分析统计。本实验针对中药材（例如，远志），其作为一种多产地、多组分中药，该方法使其成分鉴定更有效，更快速，更能够反映出待测样品的整体性和特征性，更全面地揭示了所选不同产地之间远志药材的成分差异，为现有中药材质量评价提供一种全新的探索思路。

高分辨质谱X500R全新的硬件设计，包括N-型离子路径技术、飞行时间管恒温设计以及稳定耐用的Turbo V™离子源等，保证了X500R长时间在常规检测实验室环境下检测的样品拥有更高的质量稳定性和可靠性。X500R高灵



SCIEX ExionLC™ 液相系统
SCIEX X500R QTOF 质谱系统
SCIEX OS 工作站

敏度的高分辨分析和准确质荷比定性分析，结合智能化的TOF MS-IDA-MS/MS采集模式，可真正实现一针进样即可采集到高质量的一级与二级质谱数据，快速高效的提供最准确地定性筛查结果。

实验设计：

- 1、获取不同产地的远志药材，编为不同组别，每一组别6份样品。
- 2、通过TOF-IDA-MS/MS模式采集数据，可以实现一针进样，同时采集不同组分化合物的一级母离子和二级子离子。
- 3、通过MarkerView™软件分析差异成分，找出有统计学意义的差异组分，进行标记。
- 4、通过SCIEX OS软件得到高质量的一级母离子和二级子离子质谱数据后，与SCIEX中药成分高分辨MS/MS数据库或ChemSpider在线数据库进行匹配，对差异成分进行定性。

实验设计流程:



材料与方法

本试验共收集了陕西澄城、陕西商洛、山西、河北四个不同产地的远志根药材, 晾干, 将样品切成小段, 置烘箱内, 于40℃烘干18 h, 取出后, 粉碎机粉碎, 过20目筛, 至于干燥器中, 备用。

前处理方法

精密称取已恒重的远志药材粉末约1.0 g, 加入70%甲醇-水溶液50 mL, 超声30 min后, 13000 rpm离心10 min, 取上清液进样。

色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm;

流动相: A为超纯水; B为乙腈;

采用梯度洗脱, 如下所示

Time (min)	A%	B%
0.0	95	5
5.0	90	10
15.0	85	15
20.0	80	20
25.0	75	25
30.0	70	30
35.0	65	35
40.0	10	90
45.0	10	90
45.1	90	5
50.0	90	5

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40℃;

进样量: 5 μL

质谱方法:

扫描方式: TOF -IDA-MS/MS 定性筛查;

离子源: ESI源

质谱参数设置四步完成:



色谱图:

四组不同产地远志根典型离子流图基峰色谱图(BPC), 如下图1所示:

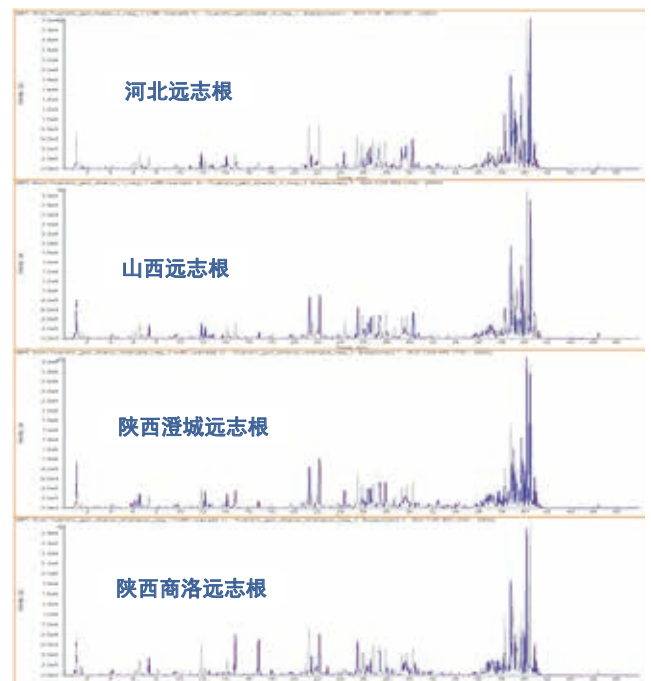


图1. 四种不同产地远志根典型的样品BPC图。

比较四种不同产地远志根样品，其色谱峰保留重现性良好。BPC 图上获得较多的基线分析分离峰，证明色谱分离良好。

MarkerView™数据处理：

采用 MarkerView™ 软件进行色谱峰原始数据提取。对保留时间 0 - 50 min 内的色谱峰进行识别和积分，将所采集的三维数据转化为二维数据矩阵，包括变量 (m/z 、RT)、观察量 (24 个样本) 和积分面积。本实验共获得 994 个变量 (m/z 、RT)。

PCA-DA处理及Library Search数据库检索

对所有样本，进行监督性地PCA分析，得到其Score和Loading图如图2所示：

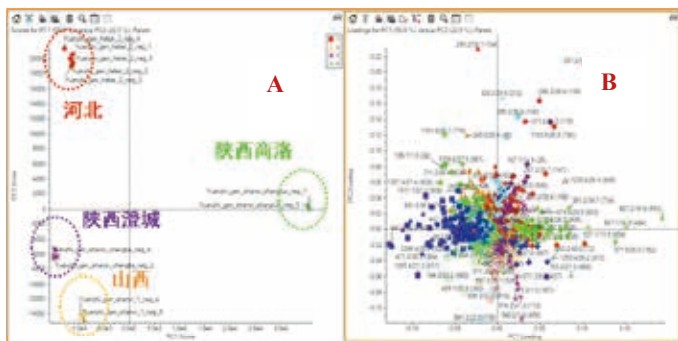


图2 A. 不用产地远志根样品PCA的Score Plot;
B. 不用产地远志根样品PCA>Loading Plot。

从图2的Score图中可以看出，四个不同产地的远志根样品组得到了较好的分离，表明其组别间有较大差异。

以不同产地的远志根标志物 m/z 667.2 ($R_t=16.9$ min) 为例，下图为 m/z 667.2 在不同产地样品中的含量差异图，从折线图中可以看出陕西商洛远志根中 Tenuifolside B2 的含量约为其它三个产地的 5 倍左右，如图 3 所示：

远志根特征标记物 m/z 667.2，保留时间在 16.9 min，经 SCIEX OS 鉴定该标志物为：Tenuifolside B2， $C_{30}H_{36}O_{17}$ ， m/z (MS) = 667.1875， m/z (MS/MS) = 461.1288, 367.1035, 239.0557, 205.0498, 190.0265。通过 Library search 数据库检索，鉴定结果如下图 4-1 所示，其二级碎片匹配良好，其主要碎片结构解析如图 4-2 所示：

T-检验数据处理

对所有样本，进行 T-检验数据处理，结果见图 5，图 A 为火山图，其显示 log 倍数变化与 p 值作图，越贴近 X 轴，

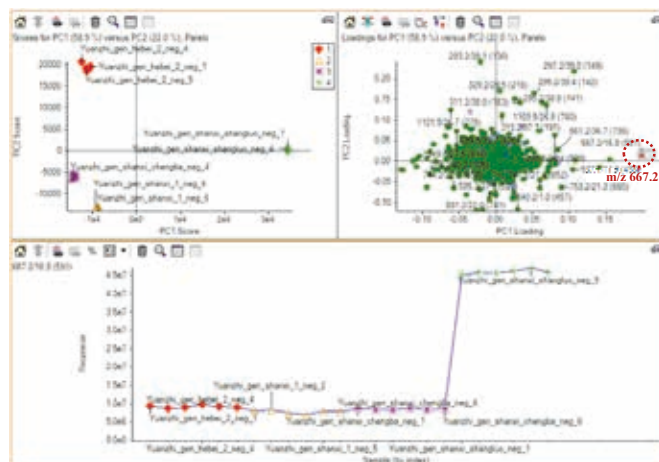


图3. 远志根Marker: m/z (667.2), R_t (16.9 min)。

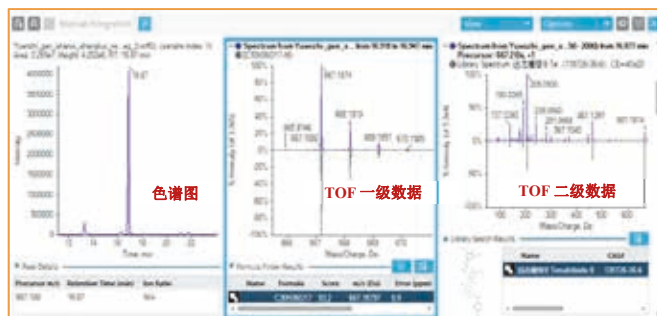


图 4-1. 远志根 Marker m/z 667.2 通过 SCIEX OS 结构归属结果。

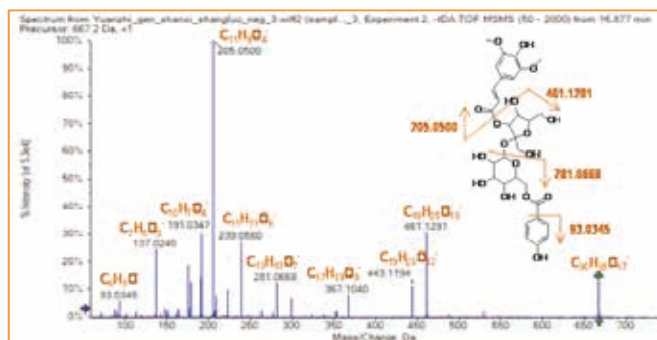


图 4-2. 远志根 Marker m/z 667.2 的二级碎片归属及主要碎片结构解析。

越在 X 轴两端的离子，表明其是差异越大的离子；图 B 为折线图、图 C 为箱形图，表明样本之间的含量关系。

通过 T-检验 ($p < 0.05$) 寻找差异离子，从折线图 B 和箱形图 C 可知，化合物 m/z 567.1 (R_t 14.8 min) 在陕西商洛远志根中的含量有明显差异，鉴定其为标志物，通过 SCIEX OS 软件中的 ChemSpider 对标志物进行在线结构鉴定。结果见图 6：

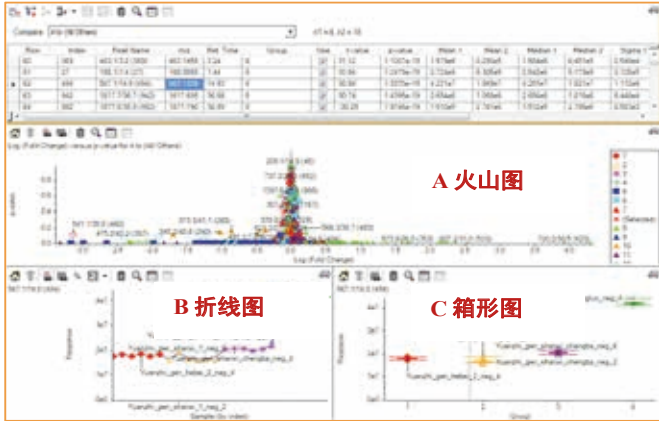


图 5. Log(Fold Change) versus p-value 数据结果。

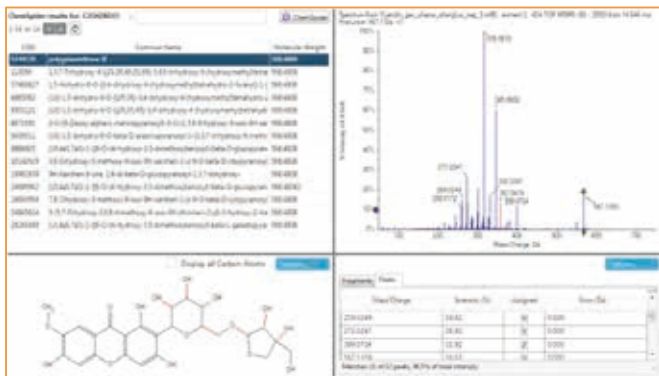


图 6-1. 远志根 Marker: m/z (567.1), R_t (14.8 min)。

经鉴定该标志物为: Polygalaxanthone III, $C_{25}H_{28}O_{15}$, m/z (MS)= 567.1359, m/z (MS/MS) = 345.0608, 315.0510, 399.0724, 271.0247, 其二级碎片在线匹配良好。

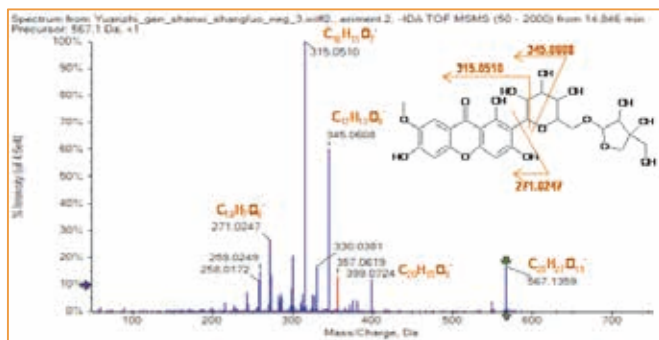


图 6-2. 远志根 Marker m/z (567.1) 的二级碎片归属及主要碎片结构解析。

SCIEX OS 化合物结构鉴定过程

依靠SCIEX OS的Formula Finder功能, 根据该离子的

一级质谱精确质量数, 配合同位素丰度比, 计算得出可能的分子式。同时, 依据一定的质谱裂解规律, 用该离子的二级质谱精确质量数验证该分子式。

以不同产地的差异组分远志根标志物 m/z 1379.4083 (R_t 30.22 min) 为例, 通过Formula Finder功能, 依据精确质量数和同位素分布计算化合物分子式为 $C_{62}H_{76}O_{35}$, 其TOF MS质量偏差为-0.8 ppm, TOF MS/MS的17个碎片平均质量偏差为0.9 ppm。结果如图7所示:

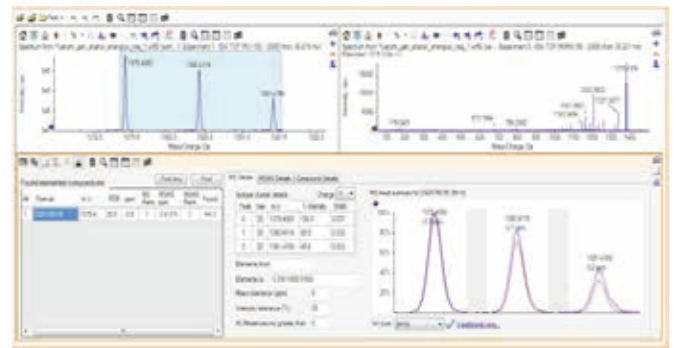


图 7. 远志根 Marker m/z (1379.4083) 通过 Formula Finder 计算分子式。

获得MS/MS碎片分子式计算结果, 绿色圆点表示, 与质谱裂解规律一致的碎片分子式, 结果见图8。

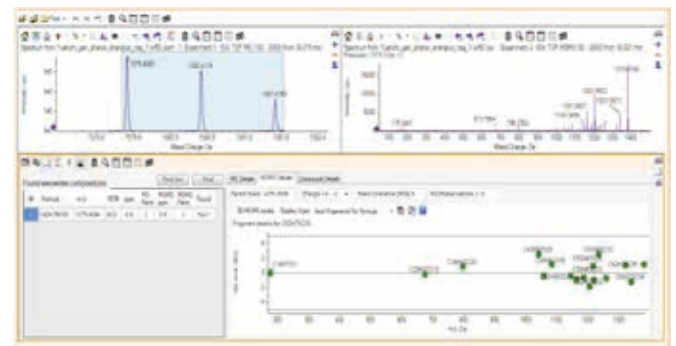


图 8. 远志根 Marker m/z (1379.4083) 二级质谱元素组成拟合。

通过ChemSpider在线鉴定化合物结构, 进一步确认化合物结构信息, 经鉴定该标志物为: Tenuifoliose A2, $C_{62}H_{76}O_{35}$, m/z (MS)= 1379.4083, m/z (MS/MS) = 1203.3603, 1337.3977, 1161.3507, 1143.3406, 795.2362, 175.0401, 结果如图9所示。



图 9-1. 远志根 Marker m/z (1379.4083)。

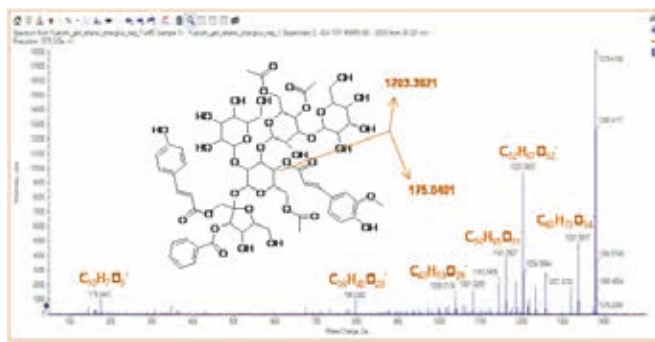


图 9-2. 远志根 Marker m/z (1379.4083) 的二级碎片归属及主要碎片结构解析。

数据处理结果

结合Loading结果和T-检验结果寻找差异离子，可能的生物标志物的精确质量数和保留时间如表1所示。

本实验共鉴定出不同产地的远志根中11种特征标记物，其中NO.1 ~ 2为蔗糖酯，NO.3 ~ 8种为低聚糖脂，NO.9 ~ 10为三萜皂苷，NO.11为吡酮。总结如下表1-1所示；11种特征标记物的含量差异情况见表1-2。

表 1-1. 4 种不同产地远志根样品鉴定的特征离子总表。

No.	m/z (MS)	RT (min)	Ion	Formula	Mass error (ppm)	Tentative identification	Major fragment ion (MS/MS)
1	667.1874	16.9	[M-H] ⁻	C30H36O17	-0.8	Tenuifolioside B2	461.1291, 367.1040, 239.0560, 205.0500, 190.0265, 137.0240
2	753.2243	17.24	[M-H] ⁻	C34H42O19	-0.7	3, 6'-Disinapoyl sucros	547.1647, 529.1542, 367.1024, 223.0602, 205.0507, 190.0263
3	1223.3681	24.7	[M-H] ⁻	C55H68O31	0.8	Tenuifolioside S	1077.3292, 1059.3173, 955.2944, 931.2927, 753.2247
4	1233.3725	34.8	[M-H] ⁻	C53H70O33	-0.1	Tenuifolioside V	1057.3263, 1015.3101, 839.2826, 465.2248
5	1265.3776	27.3	[M-H] ⁻	C57H70O32	-0.1	Tenuifolioside K	1119.3386, 1101.3335, 1077.3305, 997.3054, 145.0299
6	1379.4083	30.22	[M-H] ⁻	C62H76O35	-0.8	Tenuifolioside A2	1203.3603, 1337.3977, 1161.3507, 1143.3406, 795.2362, 175.0401
7	1495.4586	25.79	[M-H] ⁻	C67H84O38	0.6	Tenuifolioside L	1349.3947, 1307.3890, 1203.3589, 1161.3475, 1143.3385, 795.2381
8	1525.4692	25.84	[M-H] ⁻	C68H86O39	0.5	Tenuifolioside F	1379.4050, 1337.4001, 1203.3599, 1185.3515, 1161.3516, 795.2363
9	1571.6874	36.87	[M-H] ⁻	C75H112O35	-0.5	Onjisaponin B	1566.3539, 1542.6812, 1347.6365, 567.1939, 425.3044
10	1469.6571	37.06	[M-H] ⁻	C71H106O32	-0.8	Onjisaponin Z	1439.6490, 1245.6042, 455.3163, 405.1402, 237.0766
11	567.1359	14.85	[M-H] ⁻	C25H28O15	-0.7	Polygalaxanthone III	399.0724, 345.0608, 315.0510, 271.0247

实验结论

本实验采用X500R高分辨率液质联用系统共分析了24个远志根样本，并通过组学的研究发现造成样本差异的11个特征标志物。其中包括2种蔗糖酯，6种低聚糖脂，2种三萜皂苷和1种吡酮。

表 1-2. 11 种特征标记物含量差异表。

No.	化合物名称	Response 倍数关系			
		陕西澄城	陕西商洛	山西	河北
1	Tenuifolioside B2	1	5	1	1
2	3, 6'-Disinapoyl sucros	1	5	1	1
3	Tenuifolioside S	4	1	4	4
4	Tenuifolioside V	4	1	4	4
5	Tenuifolioside K	10	1	10	10
6	Tenuifolioside A2	1	6	1	1
7	Tenuifolioside L	4	1	4	4
8	Tenuifolioside F	8	1	8	8
9	Onjisaponin B	1	4	1	1
10	Onjisaponin Z	10	1	10	10
11	Polygalaxanthone III	1	3	1	1

注：表格中数字仅表示同一化合物的倍数关系（例：陕西商洛 Tenuifolioside B2 含量约为陕西澄城、山西、河北含量的 5 倍）

差异分析表明，这11种特征标记物在陕西商洛远志根中的含量明显区别于其他产地，通过主成分分析软件 MarkerView™，有效地帮助我们区分远志根的不同组别，该11种特征标记物可作为区分陕西商洛远志根与其他四产地远志根的特征标记物。

小结

本实验展示了X500R高分辨率液质联用系统在中药成分鉴定领域的优势，获得高分辨率的质谱数据（TOF-MS和TOF-MS/MS），能够提供高效快捷一体化的解决方案，为客户的中药成分鉴定研究提供强有力数据支持。该方法的主要技术特点如下：

1. SCIEX OS是集合数据采集和数据分析的综合性软件，可以实现数据采集和处理的简单化的操作，避免了多种数据处理软件间数据切换的繁琐。

2. SCIEX OS软件集合了更简便的数据分析功能，自动计算出标识物的分子式后，可以与SCIEX中药成分高分辨MS/MS数据库进行匹配分析，还可以连接ChemSpider进行结构推断，并进行二级碎片解析，大大缩减实验人员结构解析耗费的时间和精力。

3. MarkerView™软件能够快速进行数据的导入和PCA分析, T 检验等统计分析, 帮助实验人员快速找到不同组分的差异离子, 为实验人员解决了海量数据处理的困难, 是X500R QTOF进行中药产地溯源和组学分析的利器。

参考文献

1. Li SQ. Chinese Herbal Medicine Procurement Technical Manual (中药采购技术手册) [M]. Xi' an: Shaanxi Science and Technology Press, 1998: 411-412.
2. 中国药典[S]. 一部. 2010.
3. 胡世林. 中国道地药材[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社.1989

SCIEX X500R QTOF 系统在不同产地土茯苓成分差异分析中的应用

Research on the Different Composition of Smilax Glabra from Different Regions By High Resolution Mass Spectrometry SCIEX X500R QTOF System

于洁, 程海燕, 刘婷, 李立军, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(上海), 中国

引言

我国中药文化和中药种类丰富, 土茯苓为中药最为常用的一味药物。土茯苓中含有多种化学成分, 包括挥发性成分、甾醇类、脂肪酸类、酚苷类和黄酮类成分等。土茯苓在抗癌、抗动脉硬化和治疗冠心病、心绞痛等方面效果良好。土茯苓主要生长在长江流域及南部各省, 不同产地的土茯苓由于自然环境和气候等的影响, 所产土茯苓的品质也良莠不齐, 药效也因此差异明显。鉴别不同产地土茯苓的差异, 对于土茯苓保障药物疗效具有重要意义。

X500R QTOF 系统是 SCIEX 革命性的全新高分辨质谱平台, 是第一台专为常规检测实验室打造的稳定可靠、高性能的高分辨质谱系统。全新优异硬件设计带来的快速扫描速度结合强大的信息依赖采集 (IDA) 可以一次进样获得 TOFMS 精确质量数、TOF-MS/MS 二级碎片谱图。SCIEX 独有的 MarkerView™ 软件对不同产地土茯苓进行差异统计分析, 并自动关联 TOFMS 和 TOF-MS/MS 二级碎片谱图。中药成分复杂, 目前中药成分鉴定主要依据质量数、碎片离子、对照片和网络搜索完成, 这些方法耗时、耗力且结果准确性不高, SCIEX 具备近 900 种中药成分高分辨 MS/MS 数据库, 结合一级精确质量数、同位素分布可以快速确证鉴定结果。

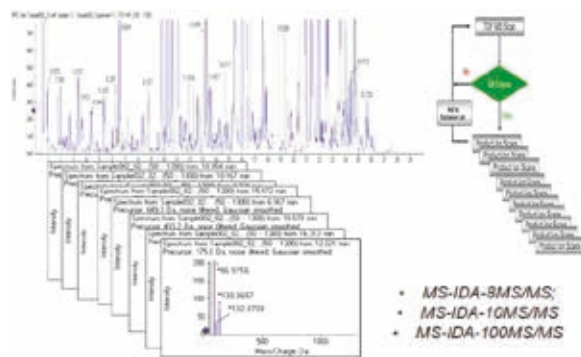
本文阐述了应用 SCIEX X500R QTOF 系统, 通过全新 SCIEX OS 软件提供质谱仪控制、数据采集和数据分析, 一次进样, 结合差异分析 MarkerView™ 软件和中药高分辨 MS/MS 数据库, 进行中药成分差异分析的流程。

实验思路:

1. 分别收集广东江门、广东河源、广西贺州和湖南四个不同产地的土茯苓各三种, 干燥, 粉碎。

2. X500R 高分辨质谱的 TOFMS-IDA-MS/MS 模式, 一针进样, 同时获得 TOFMS 和 TOF-MS/MS 谱图。
3. MarkerView™ 软件进行聚类分析, 发现有统计学意义的差异组分, 标记。
4. 差异组分一级精确质量数、二级碎片和中药高分辨 MS/MS 数据库比对, 对差异组分进行谱库检索和结构确证。

X500R QTOF 系统高分辨质谱和 workflows:



前处理方法:

不同产地土茯苓共四组, 称取土茯苓药材粉末约 1.0 g, 每组三份平行样品, 加入 90% 甲醇 - 水溶液 10 mL, 涡旋 10min, 涡旋后室温超声 30 min, 取上清液 13000 rap 离心 10 min, 取离心上清液进样。

色谱条件:

色谱柱: PhenomenexKinetex C18, 100×4.6 mm, 2.6 μ m;

流动相: A: 0.01% 甲酸水

B: 乙腈

采用梯度洗脱, 如下所示:

Time (min)	A%	B%
0	95	5
5.0	55	45
15.0	20	80
20.0	5	95
25.0	5	95
25.1	95	5
30	95	5

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 10 μ L;

质谱方法:

扫描方式: TOFMS -IDA-MS/MS;

离子源: ESI 源双喷雾技术;

扫描范围: m/z 50-2000;

CDS 自动校正

质谱参数设置:

ESI 离子源参数:

气帘气 CUR: 35psi;

碰撞气 CAD: 7;

IS 电压: 5500V/-4500V;

源温度: 550°C;

雾化气 GAS1: 55psi;

辅助气 GAS2: 55psi

DP 电压: $\pm$ 60 V

碰撞能量: 40 $\pm$ 20V

Dynamic Background Subtraction



MarkerView™ 数据处理:

MarkerView™ 先进的处理算法发现峰, 数据对齐可补偿保留时间和质量数的微小变化, 可对样品与样品之间进行差异归一化, 在数据处理前, 可以方便的排除已知背景离子干扰或剔除样品中非共性离子。

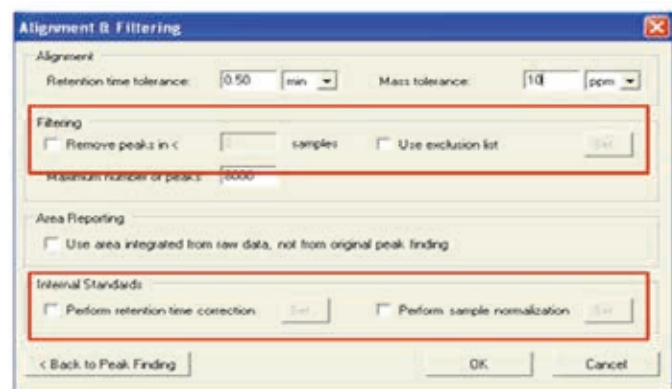


图 1. MarkerView™ 先进的处理算法发现特征峰。

所有样本数据进行监督性的 PCA 分析, 得到 PCA Score 和载荷图。载荷图反应组别差异的变量, 高载荷值通常表明对分离有显著作用:

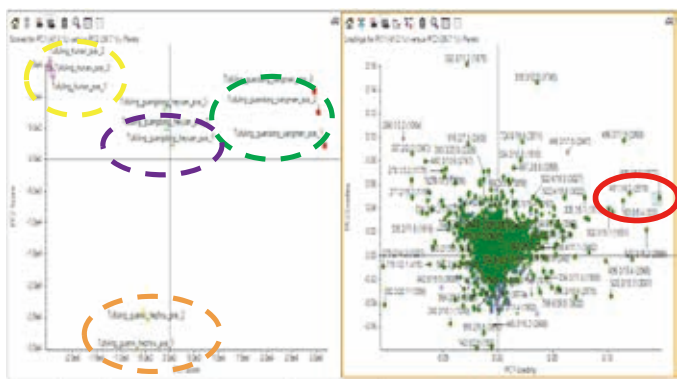


图 2. 不同产地土茯苓样品 PCA Score 和载荷图。

从 PCA Score 和载荷图中可以看出，四组不同产地的土茯苓样品 PC1 维度上有很好的分离，表明四组样品间有较大差异。以 m/z 305.0649, RT5.97 min 为例，可以看出，该组分载荷值较大，该组分在广东江门产地的土茯苓中含明显高于广东河源、广西贺州和湖南三种产地的土茯苓。

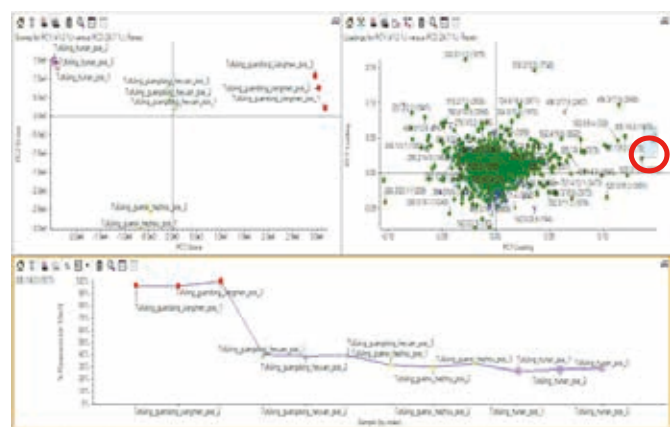


图 3. m/z 305.0649, RT5.97min 在不同组中含量的变化。

MarkerView™ 软件可以直观显示差异组分在不同样品中的一级精确质量数、同位素比和 TOF-MS/MS 二级谱图，方便确证。

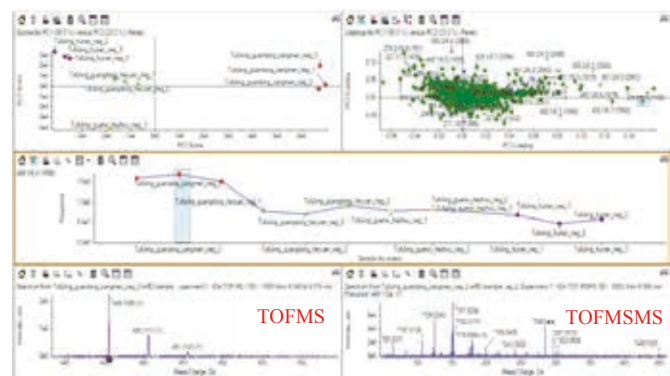


图 4. MarkerView™ 软件自动关联原始数据。

中药数据库鉴定化合物：

SCIEX 中药高分辨数据库基于《中国药典》中的中药成分为基础，包含有皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、三萜类、苯乙醇苷和有机酸等近 900 种化合物。在 SCIEX OS 软件中导入 MS/MS 数据库的化合物列表，进行峰提取和数据库匹配，SCIEX OS 软件独有的置信参数设置，置信区间用于成分确定和验证，一级准确质量数、保留时间、同位素比、谱库得分和分子式得分根据设置自动计算得分，然后结果列表给出综合得分，通过“信号指示灯”，判断结果简单、明了和直观。



图 5. 组分 m/z 305.0649, RT5.97 min 数据确证结果。

A 图是化合物的提取离子流图，可确证化合物的保留时间。B 图显示的是测得的一级质量数和同位素比，与谱库中化合物的理论值进行镜像比对。C 图显示的是 MS/MS 谱图与谱库中的二级谱图进行进行镜像比对。

数据鉴定结果总结：

通过 MarkerView™ 数据分析，MS/MS 二级谱库匹配结果确证，确证不同产地的土茯苓中以下化合物有差异：

Mass	Abbr	Formula	Compound	Origin
449.1085	M-H	C ₁₂ H ₁₂ O ₁₁	Anthr	
527.374	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	Pachnic acid	Surface layer, Scleritum
493.3376	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	Bendic acid	
525.3188	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	Dehydroquanic acid	Surface layer, Scleritum
511.3432	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	Acetyl-11-keto-β-hydroxy acid	
493.3134	M-H	C ₁₂ H ₁₂ O ₁₁	Engelein	
283.0609	M-H	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Calyculin	
525.3181	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₄ ·HCOOH	Ephraimide + HCOOH	
471.3483	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	Echinocystic acid	
365.0649	M-H	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	Dihydroquericin	
493.3376	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	Dehydroquanic acid	Surface layer, Scleritum
525.3188	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	3-epi-dehydroquanic acid	Scleritum

Mass	Abbr	Formula	Compound	Origin
283.0748	M-H	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Biochanin A	
493.313	M-H	C ₁₂ H ₁₂ O ₁₁	Isosengelein	
511.3432	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	Paric acid AM	Surface layer
449.1085	M-H	C ₁₂ H ₁₂ O ₁₁	Smilbin	
525.3188	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	Paric acid AE	
465.3135	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	Transonic Acid	Surface layer
527.374	M-H	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	3-O-Acetylquanic acid	
449.1085	M-H	C ₁₂ H ₁₂ O ₁₁	Neovibin	
493.3376	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	βeta-Hydroxy-11-keto-β-hydroxy-21-ic acid	Scleritum
511.3432	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	3-O-acetyl-16-hydroxydehydroquanic acid	Scleritum
493.3376	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	Paric acid A	Surface layer, scleritum
493.3331	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	Urolic Acid	
511.3432	M-H	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	β-Hydroxy-16-acetyl-11-keto-β-hydroxy-21-ic acid	Scleritum

SCIEX 二级高分辨 MSMS 数据库帮助快速确证差异组分，使差异组分快速准确确证。

MarkerView™ 软件 Welch T- 检验功能：

MarkerView™ 1.3 的 Welch T- 检验具有组对齐功能，使结果更准确。新的箱形图可以自动出现，检验组内样品之间的平行性。



图 9. 箱形图检验样品之间的平行性。

MarkerView™ 软件基于 T-test 的数据处理方法：

MarkerView™ 软件还可以通过 T-test 数据分析寻找差异组分。MarkerView™ 软件中的火山图显示 Log 倍数变化与 p 值作图，p-value 值越小，Log 值位于 X 轴两端的 m/z 表明有显著性差异。



图 6. Log 倍数变化与 p 值作图。



图 7. 组分 m/z 283.0609, RT9.28 min 数据确证结果。

在线 ChemSpider 数据库检索和快速验证：

SCIEX OS 软件自动关联 ChemSpider 数据库，强大数据库更帮助快速确证化合物名称。Fragment Pane 碎片解析功能，快速帮助进行确证化合物的二级碎片解析。

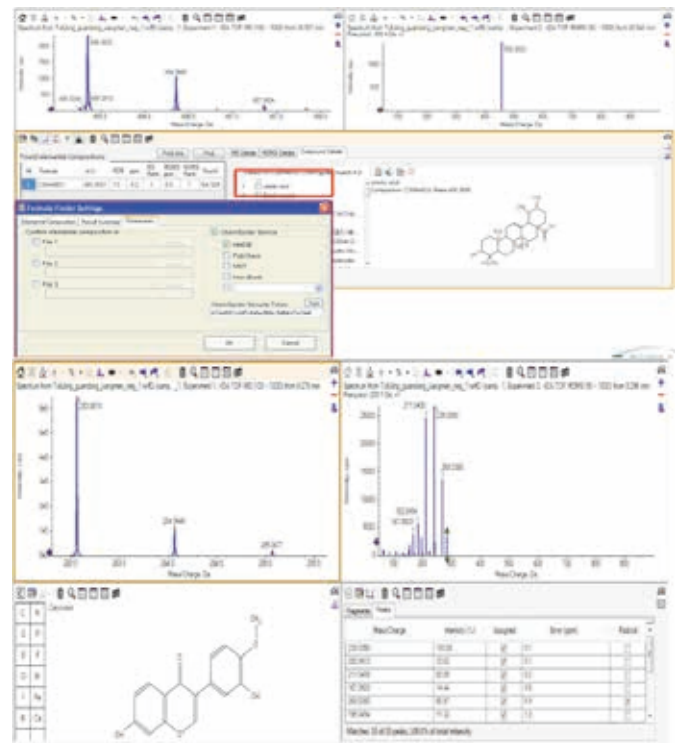


图 10. ChemSpider 在线数据库快速进行确证并帮助碎片解析。

结论:

SCIEX X500R 高分辨系统快速的扫描速度和动态背景扣除 (DBS) 功能可以帮助我们实现简单样品前处理情况下,有效排除背景干扰并一针进样同时获得一级和二级谱图信息,适合中药差异分析的高通量分析。SCIEX OS 软件快速实现数据采集、分析和谱库搜索一键式管理,简单、快速和方便。

MarkerView™ 差异分析软件,通过 PCA 和 T-test 检验分析,非常直观快速的找到差异组分,并自动关联原始数据,提供帮助分析确证的 TOFMS 和 TOF-MS/MS。新增加的 Welch T- 检验功能,使结果视图更加清晰和易用。

本实验展示了 SCIEX X500R 高分辨液质联用系统在中药差异分析鉴定的应用方案,强大的 SCIEX OS 软件与差异分析软件 MarkerView™ 完美结合,一级精确质量数、二级完整碎片谱图和同位素比快速确定化合物,二级高分辨谱库结合在线 ChemSpider 数据库自动匹配,快速验证差异化合物,使结果具有高的准确性和可信度。SCIEX 能够提供高效快捷一体化的中药鉴定解决方案,为中药分析和中药组学研究提供整体解决方案。

参考文献

1. Chemical Constituents and Pharmacological Properties of *Poria cocos*.
2. Mycology,cultivation,traditional uses,phytochemistry and pharmacology of *Wolfiporia cocos*(Schwein) Ryvarden et Gilb.:A review.
3. Comparative study of lanostane-type triterpene acids in different parts of *Poria cocos*(Schw.) Wolf by UHPLC-Fourier transform MS and UHPLC-triple quadruple MS.

液质联用技术在中药药代动力学中的应用

刘婷

SCIEX 亚太应用支持中心 (上海), 中国

中药药物代谢动力学, 是基于动力学原理, 研究中草药活性成分、组分、中药单方和复方体内吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 的动态变化规律及其体内时量-时效关系。其借助中药药理学与药物代谢动力学, 具有不同于普通药代动力学的特点, 尤其是多组分药代动力学研究, 由于其药效是所含众多化学成分的综合作用, 组分复杂、作用靶点多, 使得经典药代动力学基于“单靶点、高亲和力、高选择性”进行的单一组分或生物效应的研究方法不再适用, 衍生出对新方法新技术的需求。目前, 中药的体内研究主要是利用中药有效成分进行药代动力学研究, 其方法包括: 药物浓度法, 生物等效法, 药代动力学和药效动力学 (PK-PD) 结合法等近几年的研究文献: 研究者们结合药物浓度法、生物效应法和药动/药效学模型等经典药代动力学研究方法的基础上提出了中药整合药代动力学、药代标志物指征药代动力学和中药复方谱动力学研究方法等中药药代动力学研究新方法、新思路, 大大推进了中药药代动力学研究的发展。

由于中药成分复杂, 含量差异大, 痕量成分分析, 使中药药代动力学对分析仪器也提出了高灵敏度, 高通量, 宽线性范围的要求。液质联用技术因具有多组分分离, 高灵敏度, 高通量, 宽线性范围, 高检测效率等优势, 在药代动力学和中药药代动力学分析中被广泛使用。

笔者在多年的质谱使用中, 发现液质联用在分析中药药代动力学中, 常常遇到如下的分析挑战; 希望下面的一些建议, 能帮忙您解决相关问题。

1. 残留问题: 部分中药化合物 (如: 生物碱类化合物), 由于良好的离子化效率, 能获得超优的灵敏度, 但同时也容易造成 Carryover, 无法通过方法学验证。对于这个问题, 无论在化合物参数的调谐, 还是方法优化和开发中, 从低浓度试起, 是有避免的手段。如: 在优化小檗碱的过程中, 先使用低浓度的标准品进行参数调谐, 如果不能达到调谐强度, 再提高浓度进行调谐; 同时, 在方法优

化完成后, 避免使用高浓度的标品或样品添加优化方法, 尝试从低浓度做起。在不得不使用高浓度的情况下, 也一针高浓度, 后面接一针空白, 监控残留问题; 一旦发现此浓度有较大残留, 尽快清洗, 避免再使用该浓度样品。

2. 加和峰问题: 部分中药化合物 (如: 人参皂苷, 雷公藤毒素等), 其母离子容易形成加和峰, 对于这一类化合物, 在参数优化时, 需要注意母离子的选择。如无常见的 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 强度, 也可以选择强度高的 $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOOH-H]^-$, $[M+CH_3COOH-H]^-$ 作为母离子, 但需要注意的是: 选择加和峰, 作为母离子, 需要在流动相中加入一定量的缓冲盐作为加和峰形成的供体, 如: 母离子为 $[M+NH_4]^+$, 需要在流动相中加入一定量的 NH_4FA 或 NH_4AC 作为 NH_4^+ 的供体, 更容易形成 $[M+NH_4]^+$; 另一种影响灵敏度的情况是: 在正离子模式下极易形成 $[M+Na]^+$, 但由于钠盐大多数为非挥发盐且大多碎裂不佳, 所以很少使用作为母离子, 一个有效的方法是: 控制流动相中 Na^+ 的含量 (可使用 LC-MS 级的流动相), 或通过加入其它缓冲盐从而抑制 $[M+Na]^+$ 的形成。

3. 峰性问题: 部分中药结构 (特别是包含碱性和酸性基团的两性化合物) 常常会出现拖尾峰或前沿峰, 导致在 LLOQ 和 LQC 无法获得良好的定量准确性或重现性; 改善这种问题的有效方式是: 使用缓冲盐调节流动相的 pH 值, 或者使用合适的色谱柱 (这需要根据化合物结构特点, 根据不同填料的保留特性选择色谱柱)。

液质联用技术在中药药代动力学研究领域, 发表了大量的文献, 涉及到中药主要结构成分。这些文献, 在方法开发上, 对于初学者, 具有重要的参考意义。现将使用 SCIEX 仪器完成的中药药代动力学的研究文献列出, 希望对您有一定的参考价值。

SCIEX MS在中药药代动力学领域发表的部分文献:

文章题目	中文翻译	杂志名称	引用
Khat (<i>Catha edulis</i>)-induced apoptosis is inhibited by antagonists of caspase-1 and -8 in human leukaemia cells	caspase-1和caspase-8的拮抗剂可抑制人白血病细胞中阿拉伯茶引起的细胞凋亡	British Journal of Cancer 2004	doi:10.1038/sj.bjc.6602197
HJC, a New Arylnaphthalene Lignan Isolated From <i>Justicia procumbens</i> , Causes Apoptosis and Caspase Activation in K562 Leukemia Cells	HJC是一种新的芳基萘木质素（来自六角英），可引起K 562白血病细胞凋亡和Caspase活化	J Pharmacol Sci 2014	doi: 10.1254/jphs.13211FP
Simultaneous Quantification of 14 Bioactive Constituents in <i>Forsythia Suspensa</i> by Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation–Mass Spectrometry	液相色谱-电喷雾离子化-质谱法同时定量连翘中14种生物活性成分	Phytochem. Anal. 2010	DOI 10.1002/pca.1194
Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 28 components in <i>Isodon rubescens</i> by HPLC-ESI-MS/MS	同时定性、定量分析冬凌草中的28种成分	J. Sep. Sci. 2010	DOI 10.1002/jssc.200900704
A novel analysis method for diterpenoids in rat plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry	液相色谱-电喷雾电离质谱法测定大鼠血浆中二萜类化合物的新方法	Anal. Biochem 2010	doi:10.1016/j.ab.2010.07.009
Rapid Method for Simultaneous Determination of 20 Components in <i>Isodon nervosa</i> by High-performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry	冬凌草中20中成分的同时测定	Phytochem. Anal. 2010	DOI 10.1002/pca.1212
A sensitive analysis method for 7 diterpenoids in rat plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study of <i>Isodon serra</i> extract	LC-MS/MS法同时测定了大鼠血浆中7中二萜类成分，并进行了冬凌草提取液药代动力学研究	J. Chromatogr. A 2011	doi:10.1016/j.chroma.2011.08.033
Tentative identification of new metabolites of epimedin C by liquid chromatography– mass spectrometry	用液相色谱-质谱法初步鉴定淫羊藿苷C的新代谢产物	J. Sep. Sci. 2011	DOI 10.1002/jssc.201100581
Rapid Analysis of 27 Components of <i>Isodon serra</i> by LC-ESI-MS-MS	LC-ESI-MS/MS快速同时定量测定了冬凌草中的27种成分	Chromatographia 2010	DOI: 10.1365/s10337-010-1642-60009-5893/10/08

文章题目	中文翻译	杂志名称	引用
Pharmacokinetic properties of paeoniflorin, albiflorin and oxypaeoniflorin after oral gavage of extracts of Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba in rats	赤芍和白芍提取物大鼠灌胃给药后芍药苷、氧化芍药苷和芍药内酯苷的药动学研究	Journal of Ethnopharmacology 2010	doi:10.1016/j.jep.2010.05.028
Quantitative analysis of nine coumarins in rat urine and bile after oral administration of Radix Glehniae extract by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry	高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定大鼠口服葛根提取物后尿、胆汁中9种香豆素的含量	Biomed. Chromatogr. 2011	DOI 10.1002/bmc.1517
Quality Evaluation of a Herbal Prescription Through Quantification of 40 Components by HPLC–ESI–MS/MS	LC-MS/MS法同时测定40种成分对中药复方质量标准进行评价	Phytochem. Anal. 2011	DOI 10.1002/pca.1366
Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in Herba Scutellariae barbatae and its confused plants by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	LC-MS/MS法同时测定半枝莲及其混淆品中的7种黄酮和4种酚酸类成分，进行中药质量标准的控制	Food Chemistry 2011	doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.064
Simultaneous determination of five flavonoids from Scutellaria Barbata extract in rat plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetic study	LC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中半枝莲提取物中的5种黄酮类成分及其药动学研究	J. Chromatogr. B 2011	doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.058
Simultaneous and sensitive determination of xanthotoxin, psoralen, isoisimpinellin and bergapten in rat plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry	LC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中花椒毒素、补骨脂素、异茴芹内酯和佛手柑内酯	J. Chromatogr. B 2010	doi:10.1016/j.jchromb.2009.12.035
Simultaneous determination of 15 components in Radix Glehniae by high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry	LC-MS/MS法同时测定北沙参提取物中的15种化学成分	Food Chemistry 2010	doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.063
Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix Angelicae Dahuricae by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry	LC-MS/MS法同时定性和定量测定白芷中11种香豆素类成分	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010	doi:10.1016/j.jpba.2009.09.030

文章题目	中文翻译	杂志名称	引用
An Economical Method for Preparative Purification of Five Alkaloids from <i>Coptis Chinensis</i> Franch by High-Speed Counter-Current Chromatography Using Singled Prepared Solvent System by GC	气相色谱快速逆流色谱分离纯化黄连中五种生物碱的经济方法	American Journal of Analytical Chemistry, 2011	doi:10.4236/ajac.2011.24050
Efficient Protocol for Large-Scale Purification of Naringin with High Recovery from <i>Fructus aurantii</i> by Macroporous Resin Column Chromatography and HSCCC	大孔树脂柱色谱和HSCCC大规模纯化高回收率柚皮苷的高效工艺	Chromatographia 2008	DOI: 10.1365/s10337-008-0704-50009-5893/08/09
An Economical Method for Isolation of Dioscin from <i>Dioscorea nipponica</i> Makino by HSCCC Coupled with ELSD, and a Computer-Aided UNIFAC Mathematical Model	HSCCC与eLSD联用分离薯蓣中薯蓣皂苷元的经济方法及计算机辅助UNIFAC数学模型	chromatographia 2010	DOI: 10.1365/s10337-009-1407-20009-5893/10/01
Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways	薯蓣皂甙通过死亡受体和线粒体途径对人胃癌细胞的杀伤作用	J. Appl. Toxicol. 2012	DOI 10.1002/jat.2715
Development and validation of a sensitive and rapid non-aqueous LC–ESI-MS/MS method for measurement of diosgenin in the plasma of normal and hyperlipidemic rats: A comparative study	测定正常和高脂血症大鼠血浆中薯蓣皂甙元的一种灵敏、快速的非水LC-ESI-MS/MS方法的建立和验证：一种比较研究	Journal of Chromatography B 2009	doi:10.1016/j.jchromb.2009.03.039
Efficient protocol for purification of diosgenin and two fatty acids from <i>Rhizoma dioscoreae</i> by SFE coupled with high-speed counter-current chromatography and evaporative light scattering detection	快速逆流色谱与蒸发光散射检测联用纯化薯蓣皂甙元和两种脂肪酸的高效方法	J. Sep. Sci. 2008	DOI 10.1002/jssc.200800295
A simple and efficient protocol for largescale preparation of three flavonoids from the flower of <i>Daphne genkwa</i> by combination of macroporous resin and counter-current chromatography	大孔树脂与逆流色谱相结合大规模制备金银花中三种黄酮类化合物的简便有效方法	J. Sep. Sci. 2010	DOI 10.1002/jssc.201000054
Comparisons of the pharmacokinetic and tissue distribution profiles of withanolide B after intragastric administration of the effective part of <i>Datura metel</i> L. in normal and psoriasis guinea pigs	正常豚鼠和银屑病豚鼠口服曼陀罗有效部位后体内药动力学和组织分布的比较	Journal of Chromatography B 2018	doi:10.1016/j.jchromb.2018.02.022

文章题目	中文翻译	杂志名称	引用
Simultaneous determination of anemoside B4, phellodendrine, berberine, palmatine, obakunone, esculin, esculetin in rat plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and ulcerative colitis rats	UPLC-ESI-MS/MS同时测定大鼠血浆中茴香苷B4、黄柏碱、小檗碱、巴马汀、巴库农、淫羊藿苷和山茱萸碱的含量及其在正常和溃疡性结肠炎大鼠药代动力学研究中的应用	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2017	http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.021
Pharmacokinetic comparison of seven major bioactive components in normal and depression model rats after oral administration of Baihe Zhimu decoction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	高效液相色谱-串联质谱法比较正常和抑郁模型大鼠口服百合知母汤后七种主要生物活性成分的药代动力学	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2018	https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.031
A rapid method for simultaneous determination of triterpenoid saponins in <i>Pulsatilla turczaninowii</i> using microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	微波萃取和高效液相色谱串联质谱法快速测定细叶白头翁中的三萜皂苷	Food Chemistry 2012	http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.081
Anticancer Activities of Thelephantin O and Vialinin A Isolated from <i>Thelephora aurantiotincta</i>	从金银花中分离到的对苯二酚O和Vialinin A的抗癌活性	J Agric. Food Chem 2011	http://dx.doi.org/10.1021/jf200461j
Characterization of Glucocerebrosides and the Active Metabolite 4,8-Sphingadienine from <i>Arisaema amurense</i> and <i>Pinellia ternata</i> by NMR and CD Spectroscopy and ESI-MS/CID-MS	天南星和半夏中葡萄糖脑苷脂和活性代谢物 4,8-Sphingadienine 在核磁共振、CD光谱和ESI质谱/CID质谱中的特征	J Agric. Food Chem 2012	http://dx.doi.org/10.1021/jf302085u

参考文献

1. 张丽杰, 孟鑫, 陈忠新, 杨连荣. 基于液质联用技术的重要药代动力学研究进展[J], 黑龙江畜牧兽医, 2015(7): 91-93
2. 余健, 辛艳飞, 宣尧仙. 中药药代动力学研究进展[J], 中华中医药学刊, 2014,32(6): 1337-1340

QTRAP 4500 复合型质谱系统分析丹红注射液活性成分及其代谢产物

Identification the major constituents and metabolites of DanHong Injection by QTRAP 6500 Mass Spectrometry System

司丹丹, 徐晓燕, 郭立海, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

前言

在中药丹红注射液研究中, 临床数据显示可增加血流量、降低心血管疾病引发的多种综合症。鉴定并确证其活性成分及其代谢产物结构对于揭示丹红注射液药理学和作用机制在临床研究中非常重要的。快速完成中药成分及其体内代谢产物的鉴定工作具有相当的挑战性。 本研究的目的是在三重四极杆和线性离子阱复合型质谱上建立一种快速、灵敏的鉴定丹红注射液主要活性成分和相关代谢产物实验方法。本实验采用特有的信息相关采集模式(IDA), 鉴定并确认了 45 个化合物的结构, 包括 32 个主要活性成分和 13 个相关代谢产物。

本实验应用 SCIEX QTRAP® 4500 四级杆 - 线性离子阱复合质谱系统, 采用多种 IDA 的数据采集模式相互补充, 智能化的 DBS 功能触发 EPI 图谱采集的方式保证了低浓度化合物也能够获得高质量的二级图谱, 从而能够简便、快速的完成样品中不同浓度化合物的结构鉴定工作。并结合 LightSight 软件能够自动建立多种 IDA 采集方法, 并结合母药信息简便、快速的完成代谢产物的查找和鉴定工作, 实验设计流程如图 1:

实验设计

本实验同时在 ESI+/- 离子化模式下采集数据, 由于丹红注射液中主要是极性较大的水溶性组分, 因此负离子条件下响应较好, 主要采用 ESI- 检测。

丹红注射液中主要活性成分的实验中选择 2 种 IDA 数据采集模式, 1.EMS-IDA-EPI 方式发现并确认注射液中含量较高的活性成分; 2.Pre-IDA-EPI 方式筛查具有类似结构的有效成分和体内样品中的成分。

体内代谢产物鉴定实验中主要应用 2 种 IDA 数据采集

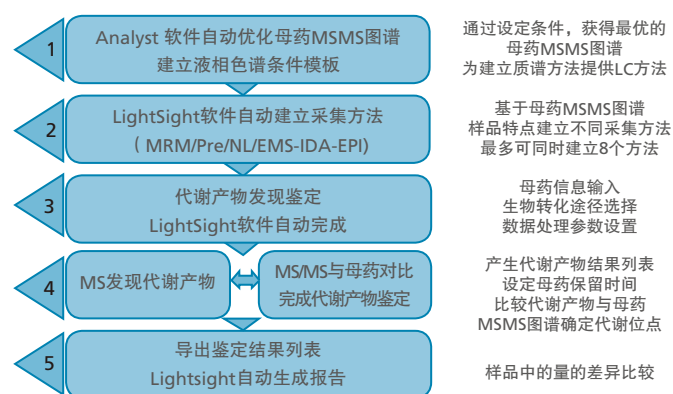


图1. QTRAP 4500结合LightSight软件代谢物鉴定流程。

模式, 1.MRM-IDA-EPI 方式能够最高灵敏度的发现可预测的体内高、低含量的代谢产物, 并结合 EPI 模式将二级图谱与母药对比确定代谢位点。2. Pre-IDA-EPI 方式发现与主要活性成分有类似结构特征的代谢产物。两种方法相互补充保证最全面的检测体内代谢产物。

样品信息

1. 丹红注射液
2. 样品: 空白基质, 4个不同时间点收集样品(时间点信息: 10min, 30min, 60min和6h血浆样品)
3. 标准品: 丹参素, 原儿茶醛, 丹酚酸B, 羟基红花黄色素A等主要活性成分

液相条件

色谱柱: Kinetex C18 100 X 3.0 mm, 2.6 μ m
Phenomenex Analytical Column

进样体积: 5 μ L

NO.	Name	Formula	MW	RT(min)	m/z	EPI
1	Glucose	C6H12O6	180.1	1.16	179.1	161,131
2	Danshenou	C9H10O5	195.1	4.91	197.1	135,123
3	Vanillic acid	C8H8O4	168.0	5.12	167.0	137,108,93
4	Pyrocatechol	C6H6O2	110.0	5.21	109.0	109
5	Protocatechuic acid	C7H6O4	154.0	5.22	153.0	109,108,91
6	Neochlorogenic acid	C16H18O9	354.1	6.07	353.1	191,179,135
7	Protocatechuic Aldehyde	C7H6O3	138.0	6.65	137.0	108,92,81
8	Chlorogenic acid	C16H18O9	354.1	7.19	353.1	191,173
9	Cryptochlorogenic acid	C16H18O9	354.1	7.42	353.1	191
10	Salvianic acid C	C18H18O9	378.1	7.74	377.1	221,179
11	Hydroxysafflor Yellow A1	C27H32O16	612.2	7.93	611.2	491,521
12	Salvianic acid C2	C18H18O9	378.1	8.1	377.1	197,161,179
13	Hydroxysafflor Yellow A2	C27H32O16	612.2	8.29	611.2	491,521
14	Lithospermic acid 1	C27H32O16	538.1	9.2	537.1	493,295,185,109
15	Lithospermic acid 2	C27H32O16	538.1	9.48	537.1	493,295,185,101
16	Nicotiflorin-2Glu ₁	C27H30O16	610.2	9.64	609.2	284,255,301
17	Nicotiflorin-2Glu ₂	C27H30O16	610.2	10.08	609.2	300,301,277,255
18	Salvianolic acid D	C20H18O10	418.1	10.14	417.1	373,197,179,175
19	Salvianolic acid A1	C26H22O10	494.1	10.53	493.1	295,185
20	Salvianolic acid G	C18H18O7	340.1	10.58	339.1	280,252,295
21	Rosmarinic acid	C18H16O8	340.1	10.67	339.1	197,179,161
22	Salvianolic acid B	C36H30O16	718.2	10.88	717.2	519,321
23	Nicotiflorin	C27H30O15	594.2	10.92	593.2	285,255
24	Salvianolic acid E	C36H30O16	718.2	11.71	717.1	519,339,321
25	Salvianolic acid A2	C26H22O10	494.1	11.97	493.1	295,185
26	Salvianolic acid C	C26H20O10	492.1	12.45	491.1	311,293
27	Salvianolic acid C2	C26H20O10	492.1	12.81	491.1	311,293
28	NCT ₁ O	C19H22O5	336.2	13.06	329.2	285,241
29	NCT ₁ H2O	C19H24O5	332.2	13.24	331.2	287,243
30	Tanshinone V	C19H22O4	314.2	13.43	313.2	239
31	NCT ₁ H2	C19H24O4	316.2	13.81	315.2	271,227
32	Neocryptotanshinone	C19H22O4	314.2	14.27	313.2	213,269,226

42

完成代谢产物鉴定工作的软件，软件涵盖了国内外权威文献的代谢物转化类型，包含近百种体内 / 体外生物转化列表；可根据母药相关信息，同时建立多种 IDA 采集方法，各种方法相互补充以采集到最全面的代谢产物图谱信息；软件可通过样品与空白比对，针对不对采集方法设定数据处理参数和选择生物转化类型，简便快速的完成数据处理工作。代谢物鉴定列表见表 2：

表2. 丹红注射液主要活性成分代谢产物列表。

NO.	Name	Formula	MW	RT(min)	m/z	EPI
1	Danhenzou(DSS)	C9H10O5	198.1	4.91	197.1	135,123
2	DSS_CH2	C10H12O5	212.1	7.2	211.1	193,150,134
3	DSS_SO3	C9H10O8S	278.0	4.2	277.0	197,179,135,123
4	DSS_CH2SO3	C10H12O8S	292.0	5.6, 6.0	291.0	211,193,134,108
5	Protocatechuic acid(DBA)	C7H6O4	154.0	5.15	153.0	109,108,91
6	DBA_CH2	C8H8O4	168.0	7.8	167.0	152,168
7	DBA_SO3	C7H6O7S	234.0	3.4	233.0	153,109,108,91
8	DBA_C6H8O6	C13H14O10	330.1	4.2	329.1	153
9	DBA_CH2SO3	C8H8O7S	248.0	5.4	247.0	167,152,108
10	Protocatechuic aldehyde(PA)	C7H6O3	138.0	6.65	137.0	108,92,81
11	PA_SO3	C7H6O6S	218.0	5.4	217.0	108,92,81
12	PA_C6H8O6	C13H14O9	314.1	4.79, 5.6	313.1	137
13	PA_CH2SO3	C8H8O6S	232.0	6.6	231.0	151,136,92
14	Koumaric acid(RA)	C18H16O8	360.1	10.67	359.1	197,179,161
15	RA_C2H4	C20H20O8	388.1	12.7	387.1	211,193,175
16	RA_CH2SO3	C19H18O11S	454.1	11.13	453.1	373,211,161
17	RA_C2H4SO3	C20H20O11S	468.1	11.14	467.1	387,211,193,175

代谢产物结果显示：鉴定了丹红注射液中主要活性成分丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛和迷迭香酸在大鼠体内的代谢产物。由于原型成分为极性偏大的酚酸类成分，极性较大，发生 I 相代谢反应的几率与途径就会相应减少，会直接发生 II 相代谢反应，因此鉴定到代谢产物均为发生二相结合产物，主要包括甲基化、乙基化、磺酸化和葡萄糖醛酸化使原药极性增加，比较不同时间点样品中代谢产物含量的变化，含量变化曲线见图 4：

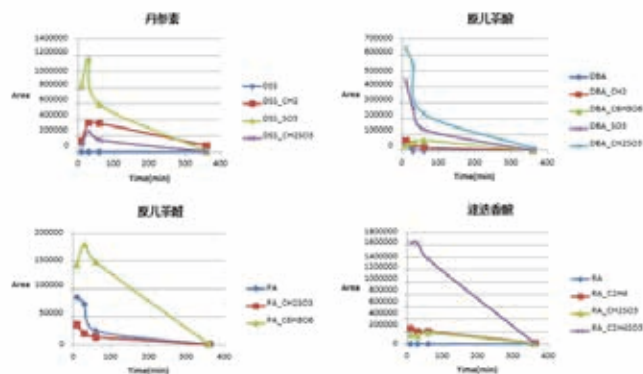


图4. 大鼠血浆样品中鉴定到主要代谢产物峰面积随时间变化曲线。

代谢产物含量随时间变化曲线显示：二相结合产物含量随时间逐渐降低，且变化趋势一致，30min 样品含量最高，结果符合代谢产物极性偏大，排泄速度快的原则。通过对比代谢产物和原型药物的二级图谱，可快速完成代谢

产物结构鉴定和代谢位点的判断，此过程可见图 5：

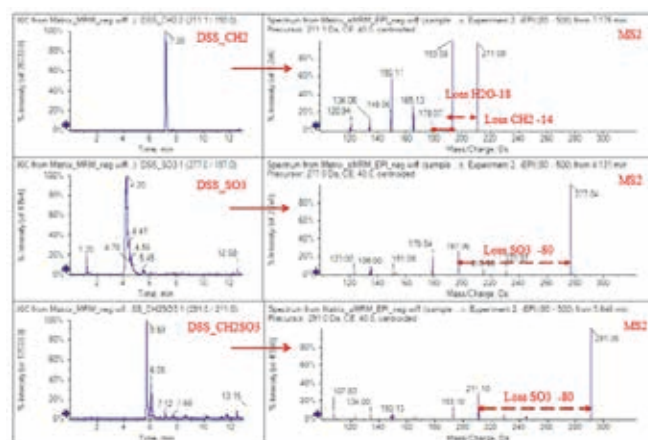


图5. 丹参素代谢物提取离子流图及二级质谱图。

总结

QTRAP 4500 三重四极杆 - 线性离子阱复合型质谱具有快速的杆 - 阱切换速度，并结合智能化的动态背景扣除 (DBS) 功能，应用 IDA 工作流程，采用多种预扫描模式相结合的方式完成了丹红注射液活性成分及其主要代谢产物鉴定工作。共鉴定到 45 个成分，其中活性成分 32 个，代谢产物 13 个。

丹红注射液活性成分鉴定实验中采用 EMS-IDA-EPI 和 Pre-IDA-EPI 两种流程相结合的采集模式，EMS 作为预扫描模式可快速鉴定出丹红注射液中含有较高的活性成分；Pre 作为预扫描模式可通过特征碎片离子的选择半靶向性的筛选出含有共同碎片离子的一类活性成分；高质量 EPI 图谱的获得能够确保鉴定结果的准确性。

代谢产物鉴定实验采用 MRM-IDA-EPI 采集模式，最高灵敏度的检测可预测的代谢产物；Pre-IDA-EPI 采集模式发现与原型具有共同特征碎片离子的代谢产物。结合 LightSight 软件可自动建立多个采集方法，通过选择生物转化途径，参数设置，对比样品与空白能够快速的发现代谢产物，比较代谢产物与原型二级图谱差异，完成结构解析，确定代谢通路和位点，推测其可能结构；使得代谢产物鉴定工作从方法建立到数据处理简便易行。

本研究完成了丹红注射液成分及其代谢产物鉴定工作由于活性成分极性偏大，因此未检测到 I 相代谢产物，II 相代谢产物中检测到烷基化、磺酸化和葡萄糖醛酸化途径。此方法能够简便、快速的检测并鉴定出不同含量的活性成分及其代谢产物，在中药检测工作中可谓是一种推荐的工作流程。

SCIEX高分辨质谱仪鉴定大鼠尿液牛蒡子苷元的代谢物

Identification the major constituents and metabolites of DanHong Injection by QTRAP 6500 Mass Spectrometry System

徐晓燕, 刘婷, 龙志敏, 吴庆海

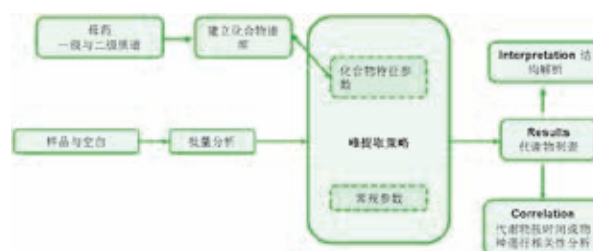
SCIEX 上海

牛蒡子苷元 (ARG) 为中药牛蒡子的主要活性物质, 通过药理药效研究发现, ARG有抗炎、增强免疫力、抵御病毒、抗白血病、抑制肿瘤细胞活性和调节血糖等作用。尿液排泄为牛蒡子苷元的主要排泄途径, 为研究其尿液代谢物的转化途径与结构, 本文研究的是给大鼠灌胃牛蒡子苷元收集尿液进行代谢物分析。

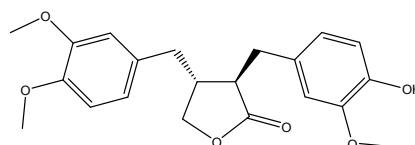
TripleTOF® 5600+ LC-MS/MS质谱仪具有高分辨率、高扫描速度、高质量精度和高灵敏度的特点, 并且具有智能信息关联采集 (IDA) 的采集方法, 实时动态背景扣除 (DBS) 以及多重质量亏损 (MMDF) 触发TOF MS/MS, 一次进样, 即可保证在复杂基质样品中能获得低浓度代谢物的高质量的MS/MS, 用于代谢物的鉴定。

如果手动处理这些数据, 数据分析就变得相当复杂和耗时。代谢物鉴定MetabolitePilot软件能同时处理目标和非目标代谢物, 拥有多种强大的算法, 如根据经典代谢途径预测代谢物, 对比样品与空白进行峰查找, 多重质量亏损过滤, 同位素模式匹配, 子离子及中性丢失代谢物查找模式, 多种算法能同时用于代谢物鉴定。MetabolitePilot软件能根据原药结构, 自动设计最合适该化合物的特征处

理参数, 预测潜在裂解物, 同时计算原药与裂解物的I相代谢物、II相代谢物。在本篇文章里, 我们使用TripleTOF® 5600+系统和MetabolitePilot™软件, 对牛蒡子苷元大鼠尿液代谢物进行分析。



MetabolitePilot™代谢物鉴定流程



牛蒡子苷元结构



代谢物鉴定流程

实验条件

样品制备：大鼠灌胃牛蒡子苷元，收集大鼠的尿，取尿液200 μ L+50%乙腈水(1:1)200 μ L，涡旋，离心，取上清进行HPLC-ESI(+/-)-TripleTOF分析。

色谱条件：液相采用ExionLCTM AD系统，色谱柱为Kinetex C18，2.1 $\times$ 50 mm，2.6 μ m，流动相A：H₂O (含2 mM NH₄FA+0.05%FA)，流动相B：乙腈:甲醇(1:1, v/v)，流速：0.4 mL/min，进样体积10 μ L。

质谱条件：质谱采用SCIEX TripleTOF® 5600+，DuoSpray™电喷雾离子源(ESI+/-)，TOF MS扫描范围m/z100-1000，10个TOF MS/MS扫描范围50-1000，数据依赖性扫描（IDA），动态背景扣除及多重质量亏损（MMDF）开启。

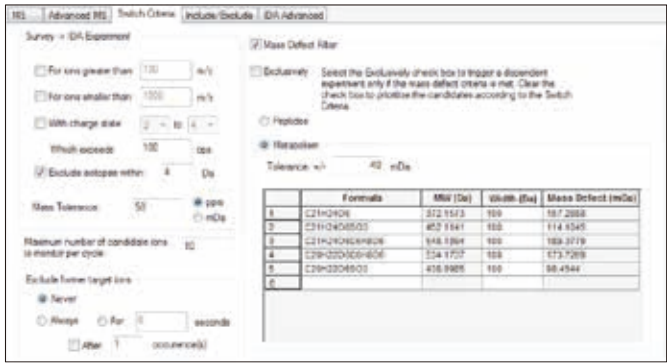


图1. MMDF-IDA实时采集方法的设置。

数据分析

MetabolitePilot™软件用于牛蒡子苷元代谢物分析，结合保留时间，代谢转化途径，一级二级精确质量推测代谢物，数据分析流程简洁明了，界面友好直观，能快速获取更加确信的代谢物鉴定结果，见图。整合的结构解析功能使原药和代谢物的碎裂规律清晰可见，代谢柔点的分析

更为简便快捷，见图2。MetabolitePilot™软件可根据元素组成，推测代谢物结构，同时将推测结构MS²与母药作比对，给出代谢物推测结构得分，备选结构分值越高，推测结构越准确，见图3。

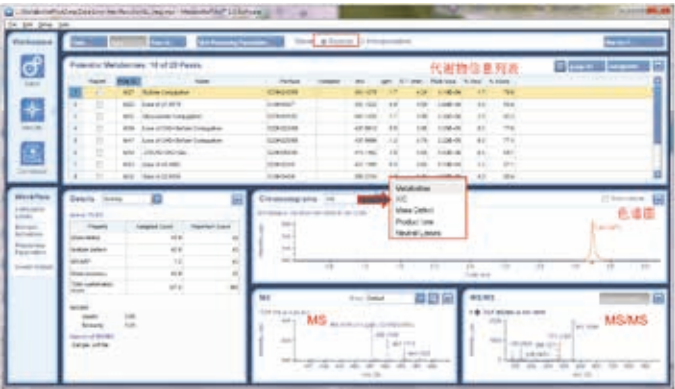


图2. MetabolitePilot™软件牛蒡子苷元代谢物分析结果（所有数据均在一张工作表里展示，如元素组成，质量准确度，峰面积%，提取离子流图，TOF MS及MS/MS，代谢物结构，得分信息等）。



图3. 牛蒡子苷元硫酸化代谢物结构解析。

综合母药结构及代谢物一级二级质谱信息，牛蒡子苷元代谢物列表见下

Index	Name	Formula	m/z	Error(ppm)	Adducts	RT/min	Intensity
Met1	Glu1	C ₈ H ₁₄ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	349.1140	0.26	-H	2.32	250305
Met2	Glu2	C ₈ H ₁₆ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	335.1348	0.34	-H	2.36	86713
Met3	Glu3	C ₇ H ₈ OC ₆ H ₈ O ₆	283.0823	0.62	-H	2.37	427798
Met4	Glu4	C ₈ H ₁₆ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	335.1348	0.42	-H	2.42	140849
Met5	Glu5	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	429.0827	0.72	-H	2.63	205310

Index	Name	Formula	m/z	Error(ppm)	Adducts	RT/min	Intensity
Met6	Glu6	C ₁₆ H ₁₂ O ₅ C ₆ H ₈ O ₆	459.0933	0.94	-H	2.77	62291
Met7	Glu7	C ₁₅ H ₁₂ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	431.0984	0.89	-H	2.94	31710
Met8	Glu8	C ₁₄ H ₁₄ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	405.1191	0.87	-H	3.05	5014
Met9	Glu9	C ₈ H ₁₀ OC ₆ H ₈ O ₆	297.0980	-0.46	-H	3.21	1709765
Met10	Glu10	C ₁₀ H ₁₈ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	361.1504	0.68	-H	3.29	45169
Met11	Glu11	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	417.1191	0.43	-H	3.34	601053
Met12	Glu12	C ₁₀ H ₁₈ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	377.1453	-0.48	-H	3.43	46369
Met13	Glu13	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	447.1297	0.39	-H	3.43	11370
Met14	ARG-CH ₂ +O+SO ₃	C ₂₀ H ₂₂ O ₇ SO ₃	453.0861	1.60	-H	3.51	690
Met15	Glu14	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	447.1297	0.16	-H	3.52	18952
Met16	ARG-CH ₂ +C ₆ H ₈ O ₆ iso1	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ C ₆ H ₈ O ₆	533.1665	1.53	-H	3.52	3592
Met17	Glu15	C ₁₅ H ₁₆ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	419.1348	0.18	-H	3.53	39548
Met18	ARG-CH ₂ +C ₆ H ₈ O ₆ iso2	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ C ₆ H ₈ O ₆	533.1665	1.89	-H	3.54	3592
Met19	Glu16	C ₁₂ H ₁₈ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	385.1504	-0.62	-H	3.57	76622
Met20	Glu17	C ₁₂ H ₂₀ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	387.1661	0.10	-H	3.59	32143
Met21	Glu18	C ₁₅ H ₁₆ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	419.1348	-0.89	-H	3.63	17913
Met22	Glu19	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	417.1191	0.33	-H	3.64	92312
Met23	ARG-2OCH ₂ -CH ₂ +Glu	C ₁₈ H ₁₈ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	473.1453	1.18	-H	3.65	508289
Met24	ARG-CH ₂ +C ₆ H ₈ O ₆ iso3	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ C ₆ H ₈ O ₆	533.1665	-1.03	-H	3.65	2127
Met25	ARG-2OCH ₂ -CH ₂ +SO ₃	C ₁₈ H ₁₈ O ₄ SO ₃	377.0700	1.50	-H	3.66	572
Met26	ARG-CH ₂ +SO ₃ iso1	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ SO ₃	437.0912	-0.09	-H	3.67	3470
Met27	Glu20	C ₁₅ H ₁₆ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	419.1348	0.73	-H	3.74	35058
Met28	ARG-CH ₂ +SO ₃ iso2	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ SO ₃	437.0912	-0.09	-H	3.78	18088
Met29	Glu21	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	439.1610	-0.24	-H	3.78	43395
Met30	SO ₃ _1	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ SO ₃	321.0438	0.65	-H	3.78	190398
Met31	Glu22	C ₁₇ H ₁₈ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	461.1453	-0.09	-H	3.78	14478
Met32	Glu23	C ₁₇ H ₂₀ O ₃ C ₆ H ₈ O ₆	447.1661	0.86	-H	3.83	14976
Met33	ARG-CH ₂ +C ₆ H ₈ O ₆	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ C ₆ H ₈ O ₆	533.1665	-0.58	-H	3.85	2234
Met34	ARG-CH ₂ +SO ₃ iso3	C ₂₀ H ₂₂ O ₆ SO ₃	437.0912	-0.04	-H	3.90	18401
Met35	Glu24	C ₁₅ H ₁₄ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	433.1140	0.59	-H	3.92	46028
Met36	ARG+Glu	C ₂₁ H ₂₄ O ₆ C ₆ H ₈ O ₆	547.1821	0.68	-H	3.98	158179
Met37	Glu25	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ C ₆ H ₈ O ₆	439.1610	-0.27	-H	3.99	10248
Met38	Glu26	C ₁₅ H ₁₆ O ₂ C ₆ H ₈ O ₆	403.1398	-0.21	-H	4.11	9811
Met39	SO ₃ _2	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ SO ₃	343.0857	0.81	-H	4.24	377037
Met40	ARG+SO ₃	C ₂₁ H ₂₄ O ₆ SO ₃	451.1068	0.83	-H	4.24	92869
Met41	ARG+O	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	387.1449	-0.51	-H	4.92	2848
Met42	ARG	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	371.1500	0.80	-H	4.93	35347

检测到的主要代谢路径为：氧化、去甲基化、葡萄糖醛酸化，硫酸化等主要路径，代谢转化关系见下图。

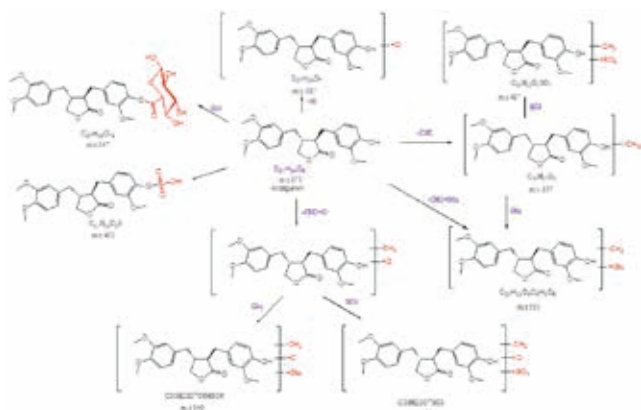


图4. 牛蒡子苷元代谢物转化过程。

结论

TripleTOF® 5600系统一针进样，结合实时DBS-IDA及MMDF可以同时采集高分辨一级及二级质谱数据，即使低浓度的牛蒡子苷元代谢物也可以被采集到TOF MS及MS/MS数据。准确的高分辨数据可以减少假阳性结果的产生同时提高结构鉴定准确性。MetabolitePilot™软件有效的解决了代谢物鉴定从峰的检测到结构解析数据分析的瓶颈问题，利用强大的算法，结合代谢转化途径，母药与代谢物结构相关性，可以快速准确地推测代谢物结构。牛蒡子苷元尿液的主要代谢路径为：氧化、去甲基化、葡萄糖醛酸化，硫酸化等。

参考文献

1. “Rapid Metabolite Identification using MetabolitePilot™ Software and TripleTOF™ 5600 System”, AB SCIEX应用文章2490211-02
2. “Breakthrough Productivity for ADME Studies Using the AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System”, AB SCIEX应用文章 0480110-01
3. “Simultaneous Pharmacokinetic Profiling and Automated Metabolite Identification using the AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System and MetabolitePilot™ Software”, AB SCIEX应用文章 1270210-01
4. “Solving Bottlenecks in Metabolite ID Data Analysis With MetabolitePilot™ Software”, AB SCIEX应用文章 3610211-01
5. 下载MetabolitePilot™软件试用版请访问: : <http://www.absciex.com/Products/Software/MetabolitePilot-Software>

复合质谱 QTRAP® 在 68 种中国常见保健品检测药物的整体解决方案

Total Solution of QTRAP® on Drug Screening of Health products

于洁，程海燕，李立军，靳文海

SCIEX，亚太应用支持中心（上海），中国

引言

随着生活水平提高，保健品市场日趋庞大，销量也高速增长。激烈的市场竞争，生产厂家为了让购买者快速体验保健品的效果，会在保健品中添加各种药物来快速达到效果，例如减肥类药物很多都添加西布曲明和酚酞，形成吃保健品等同于在吃药的现象。在保健品中添加药物，会让服用者快速体验到效果，但同时也会造成服用者产生副作用，如药物依赖、肝功能损害和心跳加速等问题，严重者甚至造成死亡。国家食品安全监督抽检实施细则（2017年版）明确规定了各类不同功效保健品的检测项目，此细则共涉及 6 类不同功效保健品中的 68 种药物的检测。

传统质谱分析的 MRM 工作模式，在实际工作中，由于基质的复杂性，往往很容易产生基质效应，导致保留时间和离子比率有偏差，或出现“假峰”，产生“假阳性”，干扰判断。为了克服传统质谱分析 MRM 模式的弊端，SCIEX 复合质谱 QTRAP® 系统独有的复合扫描模式 MRM-IDA-EPI，可以在一针进样的同时获得 MRM 色谱峰和增强型二级碎片。MRM 离子通道色谱峰定量，EPI 不同能量复合二级谱图形成“指纹”图谱，实现搜库和确证，有效的克服了传统质谱分析的弊端，增加检测分析工作者确证的准确度。

本方法及时建立了国家食品安全监督抽检实施细则（2017 年版）规定的 68 种保健品药物基于 QTRAP® 质谱平台的 MRM-IDA-EPI 解决方案，并同时建立了二级谱库，可以直接帮助用户搜库和确证，大大提高了检测分析工作者的工作效率。该检测方案具有以下便捷性：

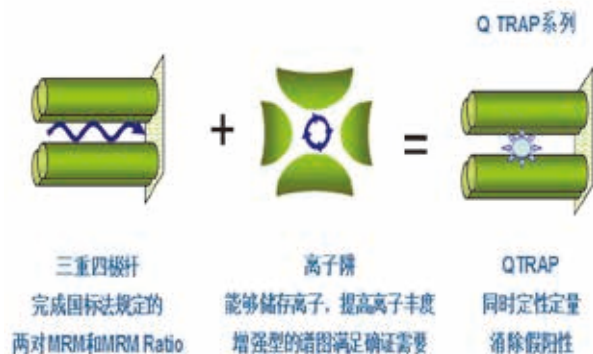
1. 覆盖药物种类全，此方法将 2017 版国家食品安全监督抽检实施细则规定的保健品检测药物全部包括在内。

2. 一针进样，正负模式同时扫描，快速方便。
3. 本方法包括样品前处理、MRM 离子对参数、仪器方法和二级检索数据库。QTRAP® 整体解决方案，体现了 QTRAP® 一针进样同时定量定性确证的优势。
4. QTRAP® 整体解决方案，满足多种客户的需求，客户拿来即用，提高工作效率，节省时间。
5. 二级检索数据库具有高、中、低及复合能量四种碎片谱图，碎片信息丰富，能有效地消除假阳性。

实验思路：

1. 复合型质谱 QTRAP® 可以实现一针进样，同时定性和定量。在获得“非法添加物”的“指纹图谱”外，还可以确定其含量，定量和定性确证信息一次获得，为检测分析工作者提供了一种全新的工作思路。

复合型质谱 QTRAP 能够实现一针进样，同时定量和定性



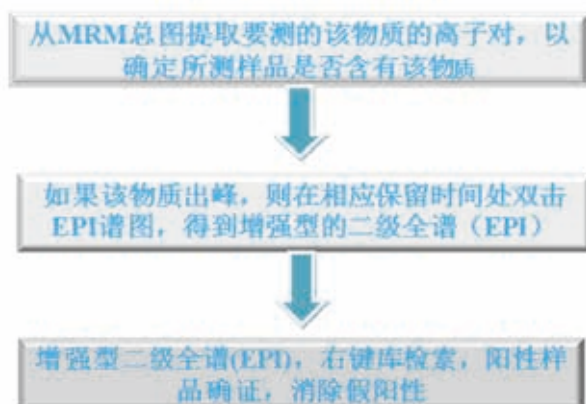
2. QTRAP® 独有的 MRM-IDA-EPI 工作流程，是实现药物确证的必备解决方案。

MRM触发IDA工作原理



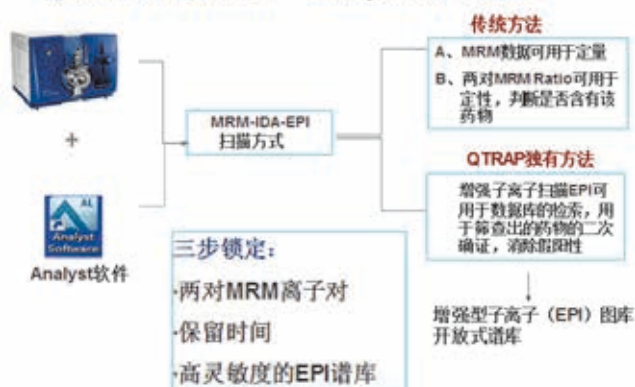
3. 库检索, 经过正匹配和反匹配, 得出综合匹配度, 有效的消除了假阳性。

库检索流程示意图:



复合型质谱QTRAP筛查的整体工作流程如下:

QTRAP 筛查流程图---Analyst软件+数据库



液相条件:

色谱柱: phenomenex Kinetex C18, 2.6u, 50 × 2.1mm

流动相: A: 乙腈; B: 5 mmol/L 乙酸铵水溶液

梯度洗脱, 如下所示

Time (min)	A%	B%
0	90	10
10.0	10	90
12.0	10	90
12.1	90	10
15.0	90	10

流速: 250 μL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

质谱方法:

SCIEX QTRAP® 4500 三重四级杆复合离子阱质谱

扫描方式: MRM 全扫描模式

正、负 Scheduled MRM 模式同时扫描

离子源: TurvoV ESI 源

质谱参数设置:

ESI 离子源参数:

气帘气 CUR: 30 psi; 碰撞气 CAD: High

IS 电压: 5500V/-4500V 离子源温度: 550°C

雾化气 GAS1: 55 psi 辅助气 GAS2: 55 psi

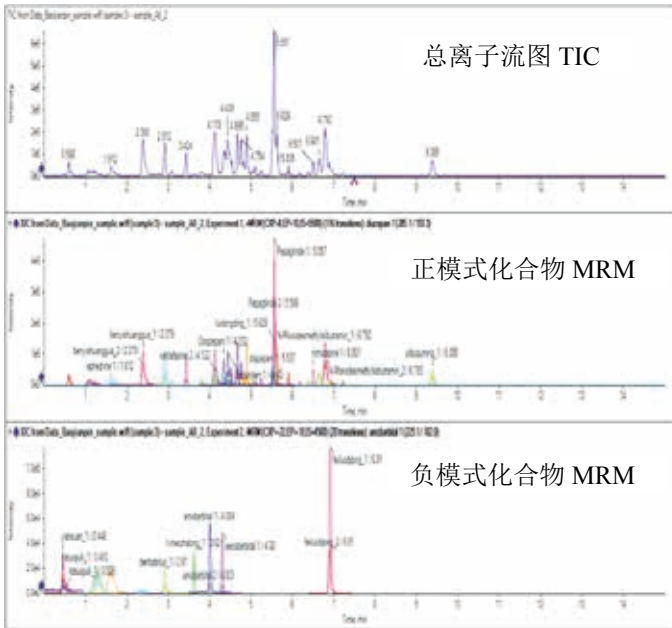
碰撞能量: 35 ± 15 V

MRM detection window: 60 sec

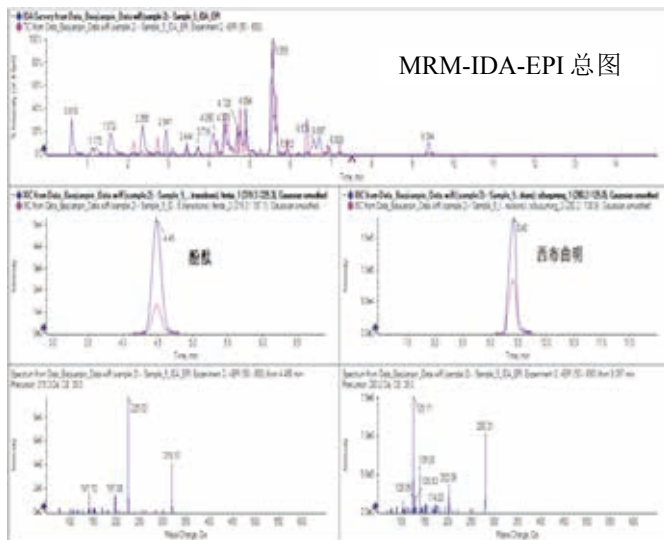
Target Scan Time: 0.25 sec

实验结果:

10 ppb 药物混标一针进样, 正、负同时扫描。提取离子色谱图如下所示:



典型化合物 MRM 提取离子流图和 EPI 图谱如下：

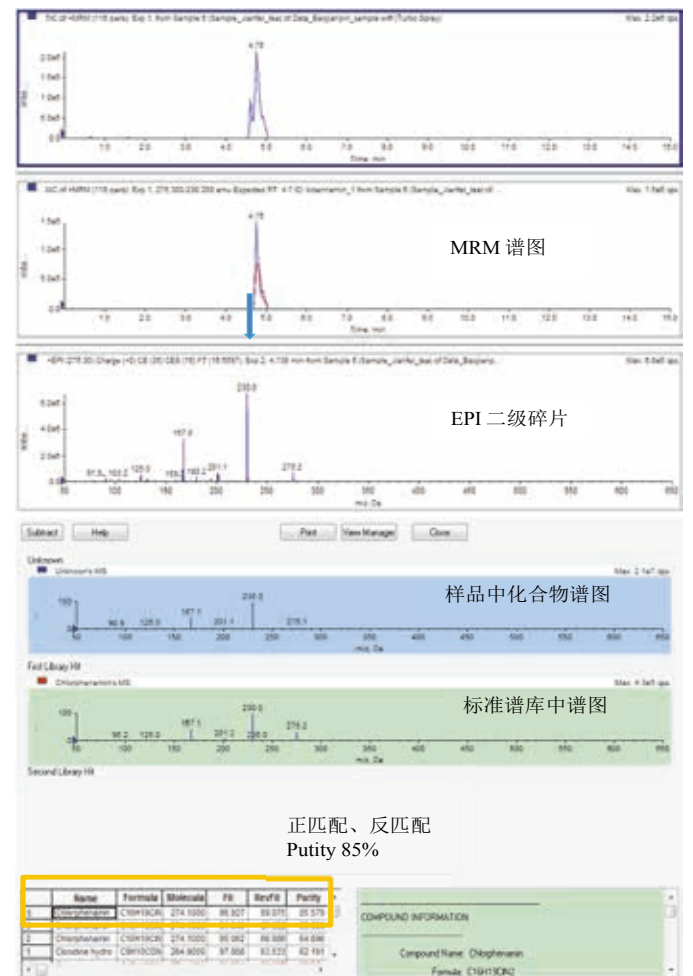


Compound Name	Formula	Molecular Weight (Da)	CAS Number	Num of Spec.
1. Non-acetaminati	C24H32N2	452.2000	949091-30-7	4
2. Glesepide	C24H34N2	466.2000	93479-97-1	5
3. Venlafaxine	C17H27N2	277.2000	93413-69-5	5
4. Amitriptyline	C26H31Cl	366.1000	88190-42-9	4
5. Fexofenadine	C18H19Cl	303.0000	96109-69-7	4
6. Thioacetamide	C22H30N2	456.1000	956190-47-1	4
7. Lorazepam	C15H10Cl2	326.0000	846-48-1	5
8. Phenformin hydrochloride	C10H16Cl2	241.1000	834-28-6	5
9. Acetaminophen	C9H9Cl2	466.2000	831217-01-7	4
10. Chlorzoxazone	C11H12Cl2	273.0000	80-77-3	4
11. Simvastatin	C25H38O2	416.2000	79902-63-9	5
12. Phenolphthalein	C20H14O3	318.0000	77-09-4	4
13. Secobarbital	C12H16N2	236.1000	76-73-3	4
14. Levamisole	C4H6Cl2	404.2000	75330-75-5	5
15. Metaxalone	C13H16N2	232.1000	73-31-4	5
16. Nimodipine	C21H26N2	416.1000	66005-59-4	5
17. Homo Sildenafil	C23H32N2	468.2000	642626-07-2	4

Total: 68 records in: [default]

在某减肥茶样品中，检测出氯苯那敏，右键搜索谱库，根据正匹配和反匹配结果，确证为氯苯那敏。氯苯那敏是一种药物，主要功效用于快速缓解过敏。

在某减肥茶样品中，检测出氯苯那敏，图谱如下：



增强型二级碎片（EPI）数据库：

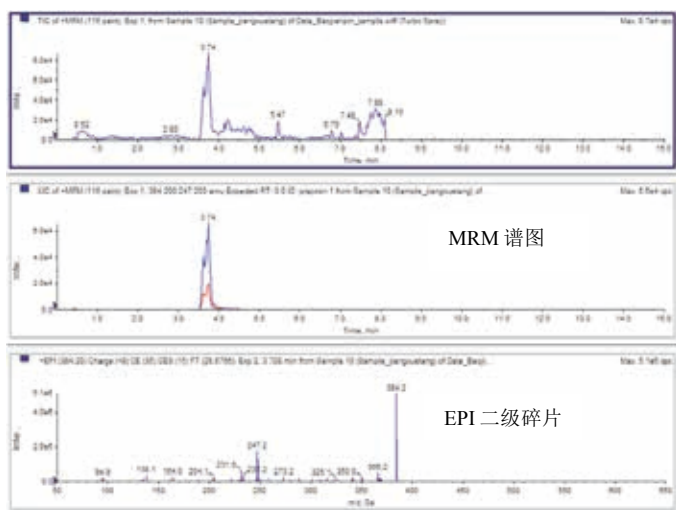
本实验方案同时建立了此 68 种药物的增强型二级碎片（EPI）数据库。此数据库包含了低、中、高和复合能量至少 4 张谱图，碎片信息丰富，全面确证。

实际样品筛查结果：

前处理：减肥茶样品浸泡后直接上样。

胶囊类和片剂型药物：取胶囊内容物（片剂型药物研细，取粉末）10mg，甲醇 10mL 超声溶解，离心，取上清液直接进样。

在某降糖胶囊中，检测出哌唑嗪，图谱如下：



右键搜索谱库，根据正匹配和反匹配结果，确证为哌唑嗪。哌唑嗪是一种处方药，主要用于治疗高血压，可引起昏厥，眩晕和头痛等不良反应。



结论：

SCIEX 复合型质谱 QTRAP® 系统将三重四级杆的定量功能和线性离子阱的定性功能完美结合，一针进样，定性确证和定量同时实现。

EPI 二级谱图的灵敏度比传统 MRM 扫描灵敏度至少提高 500 倍。低、中、高和三个能量复合的高灵敏图谱，碎片更丰富；而且弥补了传统离子阱的质量缺失效应，使低质量端碎片的丰度明显。EPI 增强型高灵敏度的二级图谱有效的帮助确证复杂基质中低浓度点检测容易出现假阳性的问题，使检测结果更加准确和可靠。三重四级杆复合离子阱质谱 QTRAP® 独特的 MRM-IDA-EPI 扫描方式，已成为解决“假阳性”和药物确证分析中的一种有效手段和整体解决方案。

本方案基于 SCIEX QTRAP® 质谱平台，建立了基于 2017 国家食品安全监督抽检实施细则规定的 68 种保健食品药物的检测整体解决方案。本方案包括样品前处理、液相 - 质谱方法和二级确证谱库，客户拿来即用，方便快捷。

正离子化合物 MRM 参数：

No.	Q1	Q3	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
1	285.1	193.3	5.55	Diazepam 1	80	10	45	8
	285.1	154.1	5.55	Diazepam 2	80	10	45	8
2	287.2	241.2	4.33	Oxazepam 1	50	10	31	8
	287.2	269.3	4.33	Oxazepam 2	50	10	31	8
3	321.1	275.1	4.48	Lorazepam 1	60	10	30	8
	321.1	303.1	4.48	Lorazepam 2	60	10	30	8
4	295.2	267.3	4.45	Estazolam 1	70	10	34	8
	295.2	205.2	4.45	Estazolam 2	70	10	34	8

No.	Q1	Q3	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
5	309.1	281.1	4.66	Alprazolam 1	80	10	33	8
	309.1	274.2	4.66	Alprazolam 2	80	10	33	8
6	343.2	308.2	4.76	Triazolam 1	80	10	36	8
	343.2	315.2	4.76	Triazolam 2	80	10	36	8
7	316.2	270.2	4.54	Clonazepam 1	75	10	36	8
	316.2	214.1	4.54	Clonazepam 2	75	10	49	8
8	267.2	145.2	1.04	Atenolol 1	60	10	38	8
	267.2	190.3	1.04	Atenolol 2	60	10	26	8
9	278.3	58.1	4.04	Venlafaxine 1	40	10	40	8
	278.3	259.9	4.04	Venlafaxine 2	40	10	17	8
10	347.3	315.2	5.25	Nifedipine 1	60	10	12	8
	347.3	271.4	5.25	Nifedipine 2	60	10	16	8
11	361.3	315.1	6.17	Nitrendipine 1	80	10	13	8
	361.3	329.2	6.17	Nitrendipine 2	80	10	20	8
12	419	343.1	6.51	Nimodipine 1	60	10	13	8
	419	359.1	6.51	Nimodipine 2	60	10	22	8
13	232.2	159.3	4.33	Fenflutamine 1	20	10	32	8
	232.2	187.3	4.33	Fenflutamine 2	20	10	20	8
14	446.2	321.2	3.43	Glipizide 1	85	10	20	8
	446.2	103	3.43	Glipizide 2	85	10	62	8
15	453.3	230.2	5.56	Repaglinde 1	100	10	38	8
	453.3	162	5.56	Repaglinde 2	100	10	27	8
16	367.1	170.2	4.39	Glibornuride 1	82	10	24	8
	367.1	152.2	4.39	Glibornuride 2	82	10	27	8
17	206	60.2	2.36	Phenformin hydrochloride 1	80	10	31	8
	206	105	2.36	Phenformin hydrochloride 2	80	10	36	8
18	357.4	193	5.66	Pioglitazone hydrochloride 1	108	10	38	8
	357.4	165	5.66	Pioglitazone hydrochloride 2	108	10	34	8
19	266	125	6.7	N-monodesmethylsibutramin 1	62	10	32	8
	266	138.9	6.7	N-monodesmethylsibutramin 2	62	10	20	8
20	158.1	60.2	1.18	Butyl-biguanide hydrochloride 1	75	10	23	8
	158.1	116.1	1.18	Butyl-biguanide hydrochloride 2	75	10	23	8
21	130.3	60.2	0.58	Metformin hydrochloride 1	45	10	20	8
	130.3	71.2	0.58	Metformin hydrochloride 2	45	10	30	8
22	489.2	312.3	5.56	Vardenafil 1	130	10	53	8
	489.2	151	5.56	Vardenafil 2	130	10	53	8
23	489.2	72.3	5.93	Homo sildenafil 1	130	10	90	8
	489.2	113.3	5.93	Homo sildenafil 2	130	10	41	8
24	467.4	111.1	4.75	Acetildenafil 1	130	10	42	8
	467.4	127.1	4.75	Acetildenafil 2	130	10	42	8
25	505.3	113.3	7.2	Thioildenafil 1	115	10	44	8
	505.3	327.1	7.2	Thioildenafil 2	115	10	41	8
26	609.4	195.1	6.93	Reserpine 1	170	10	52	8
	609.4	397.2	6.93	Reserpine 2	170	10	38	8

No.	Q1	Q3	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
27	355.9	192	5.64	Tetrahydropalmatine 1	115	10	39	8
	355.9	165	5.64	Tetrahydropalmatine 2	115	10	36	8
28	358.4	135.1	4.88	Rosiglitazone maleate 1	90	10	36	8
	358.4	107.1	4.88	Rosiglitazone maleate 2	90	10	51	8
29	275.3	230.2	4.68	Chlorphenamin 1	60	10	24	8
	275.3	167	4.68	Chlorphenamin 2	60	10	51	8
30	453.2	113.3	4.74	Noracetildenafil 1	130	10	44	8
	453.2	297.3	4.74	Noracetildenafil 2	130	10	53	8
31	460.3	283.1	6.9	Norneosildenafil 1	105	10	48	8
	460.3	299.3	6.9	Norneosildenafil 2	105	10	47	8
32	505.3	99.2	4.83	Hydroxyhomosildenafil 1	108	10	61	8
	505.3	299.2	4.83	Hydroxyhomosildenafil 2	108	10	56	8
33	330.2	181.1	2.72	Sinomenine 1	106	10	46	8
	330.2	239	2.72	Sinomenine 2	106	10	34	8
34	252.2	125	6.55	N,N-didesmethylsibutramin 1	50	10	30	8
	252.2	139	6.55	N,N-didesmethylsibutramin 2	50	10	16	8
35	460.3	283.3	6.39	Pseudovardenafil 1	105	10	49	8
	460.3	299.3	6.39	Pseudovardenafil 2	105	10	52	8
36	280.2	125	9.4	Sibutramine 1	50	10	33	8
	280.2	138.9	9.4	Sibutramine 2	50	10	22	8
37	475.2	100	5.47	Sildenafil 1	130	10	42	8
	475.2	283.1	5.47	Sildenafil 2	130	10	53	8
38	389.3	245	4.1	Zopiclone 1	62	10	23	8
	389.3	217	4.1	Zopiclone 2	62	10	44	8
39	390.1	268.2	4.72	Tadalafil 1	100	10	20	8
	390.1	169.2	4.72	Tadalafil 2	100	10	52	8
40	409.3	238	5.41	Amlodipine 1	116	10	16	8
	409.3	294.2	5.41	Amlodipine 2	116	10	15	8
41	319.3	225.3	4.46	Phenolphthalein 1	90	10	29	8
	319.3	197.1	4.46	Phenolphthalein 2	90	10	41	8
42	528.6	403.2	5.76	Gliquidone 1	98	10	19	8
	528.6	386.3	5.76	Gliquidone 2	98	10	31	8
43	324	110	3.72	Gliclazide 1	95	10	28	8
	324	127.1	3.72	Gliclazide 2	95	10	30	8
44	419.5	199.2	7.78	Simvastatin 1	90	10	18	8
	419.5	243.2	7.78	Simvastatin 2	90	10	19	8
45	306.2	236.2	4.15	Zaleplon 1	96	10	36	8
	306.2	264.2	4.15	Zaleplon 2	96	10	30	8
46	496.5	371.2	4.85	Glibenclamide 1	77	10	22	8
	496.5	171.2	4.85	Glibenclamide 2	77	10	38	8
47	405.5	199.3	7.32	Lovastatin 1	79	10	19	8
	405.5	285.3	7.32	Lovastatin 2	79	10	15	8
48	389.5	240	6.72	Nisoldipine 1	73	10	35	8
	389.5	194.9	6.72	Nisoldipine 2	73	10	30	8

No.	Q1	Q3	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
49	230	160	2.1	Clonidine hydrochloride 1	80	10	47	8
	230	145	2.1	Clonidine hydrochloride 2	80	10	51	8
50	233.3	174.1	2.92	Melatonin 1	68	10	18	8
	233.3	158.9	2.92	Melatonin 2	68	10	34	8
51	271.3	155.2	3.07	Tolbutamide 1	71	10	25	8
	271.3	74.1	3.07	Tolbutamide 2	71	10	24	8
52	391.2	169	4.25	Amino tadalafil 1	104	10	45	8
	391.2	268.9	4.25	Amino tadalafil 2	104	10	21	8
53	166.1	148.1	1.55	Ephedrine 1	40	10	18	8
	166.1	133.1	1.55	Ephedrine 2	40	10	26	8
54	491.3	125.9	5.08	Glimepiride 1	50	10	35	8
	491.3	352.1	5.08	Glimepiride 2	50	10	35	8
55	300	283.1	4.6	Chlordiazepoxide 1	80	10	25	8
	300	227.1	4.6	Chlordiazepoxide 2	80	10	25	8
56	326.2	291.4	5.52	Midazolam maleate 1	65	10	37	8
	326.2	244.2	5.52	Midazolam maleate 2	65	10	35	8
57	282.2	236.2	4.38	Nitrazepam 1	70	10	32	8
	282.2	180.2	4.38	Nitrazepam 2	70	10	52	8
58	384.2	247.2	3.74	Prazosin 1	60	10	39	8
	384.2	138.2	3.74	Prazosin 2	60	10	43	8

负离子化合物参数:

No.	Q1	Q3	RT	ID	DP	EP	CE	CXP
59	183.1	140	1.48	Barbital 1	-50	-10	-16	-22
	183.1	95.9	1.48	Barbital 2	-50	-10	-20	-22
60	122.2	77.8	0.43	Nicotinic acid 1	-45	-10	-16	-22
	122.2	122.2	0.43	Nicotinic acid 2	-45	-10	-10	-22
61	230.9	144.2	2.88	Phenobarbital 1	-57	-10	-22	-22
	230.9	85	2.88	Phenobarbital 2	-57	-10	-16	-22
62	225.1	182	4	Amobarbital 1	-30	-10	-17	-22
	225.1	85	4	Amobarbital 2	-30	-10	-19	-22
63	237.1	194	4.29	Secobarbital 1	-40	-10	-17	-22
	237.1	85	4.29	Secobarbital 2	-40	-10	-17	-22
64	295.9	268.9	1.16	Hydrochlorothiazide 1	-101	-10	-26	-22
	295.9	204.9	1.16	Hydrochlorothiazide 2	-101	-10	-32	-22
65	329	204.9	2.38	Furosemide 1	-109	-10	-26	-22
	329	284.9	2.38	Furosemide 2	-109	-10	-21	-22
66	382.1	144.8	6.92	Felodipine 1	-69	-10	-14	-22
	382.1	236	6.92	Felodipine 2	-69	-10	-20	-22
67	216	182	0.44	Captopril 1	-58	-10	-17	-22
	216	113.8	0.44	Captopril 2	-58	-10	-16	-22
68	271.9	179.8	3.62	Chlormezanone 1	-51	-10	-21	-22
	271.9	208	3.62	Chlormezanone 2	-51	-10	-16	-22

X500R QTOF系统SWATH® 技术在保健品非法添加领域中的应用

SWATH® research of High Resolution Mass Spectrometry SCIEX X500R QTOF system on illegal confirmation of Health Products

于洁，程海燕，李立军，靳文海

SCIEX，亚太应用支持中心（上海），中国

引言

近年来，随着保健品市场的扩大，为了使保健品的效果更加快速明显，不法商贩通过在保健品中添加药物来达到立竿见影的效果。长期食用具有非法添加药物的保健品会对身体产生副作用。随着质谱技术的发展，国家相关监管部门每年都会采用质谱技术抽查监管保健品的非法添加。

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱系统特有的SWATH®（Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra）技术将母离子的质量范围分成多个质量可变窗口，每个窗口内的所有离子一起碰撞碎裂，从而确保得到最全面的离子的碎片信息。SWATH®技术所测得的二级碎片保证了所有离子碎片的连续性，其独有的可变窗口，能够根据离子的多少智能分配质量窗口的大小，从而保证采集到最高质量的二级谱图。此外，SCIEX软件专利技术的去卷积功能，使得即使在复杂基质样本中仍可对二级碎片离子进行很好的归属。SWATH®技术使得二级碎片灵敏度更高、数据追溯性更强，其二级碎片的连续性，使得一针进样分析即可同时定性和定量，因此不仅在保健品非法添加筛查和确证领域具有显著优势，更可同时提供高准确度、高灵敏度和高线性范围的定量结果。

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱系统SWATH®技术能够在高扫描速度下同时保持高分辨率、高准确度、高灵敏度和高线性范围，结合全新的SCIEX OS软件，实现了仪器控制、数据采集、数据处理集于一体的流程分析。本实验应用SWATH®技术，建立了国家食品药品监督管理局（2017年版）规定的68种保健品非法添加药物的定性和定量方法。

样品前处理：

减肥茶：茶包浸泡后直接上样。

胶囊类和片剂型药物：取胶囊内容物（片剂型药物研细，取粉末）10 mg，甲醇10 mL超声溶解，离心，取上清液直接进样。

色谱方法：

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18, 50×2.1 mm, 2.6 μm；

流动相：A：5mM乙酸铵水溶液

B：乙腈

梯度洗脱如下：

流速：0.25 mL/min；柱温：40℃；

进样量：10 μL

Time (min)	A%	B%
0	90	10
10.0	10	90
12.0	10	90
12.1	90	10
15.0	90	10

质谱方法：

扫描方式：SWATH®采集方式

离子源：ESI源

CDS自动校正

IS电压：5500V 气帘气CUR: 30psi

雾化气GS1: 55 psi 辅助气GS2: 55 psi

源温度TEM: 550℃ 碰撞气CAD: 8

碰撞能量CE ± CES: 35 ± 15V

数据采集和SWATH®设置流程

SWATH®技术是将所有离子分配到连续的窗口内，结合X500R 超快的扫描速度，可记录所有离子的二级碎片谱，再通过软件强大的去卷积功能将碎片归属到对应母离子，该种扫描方式可确保低含量的目标物的二级信息不被遗漏，得到更准确的非法添加药物的筛查结果。

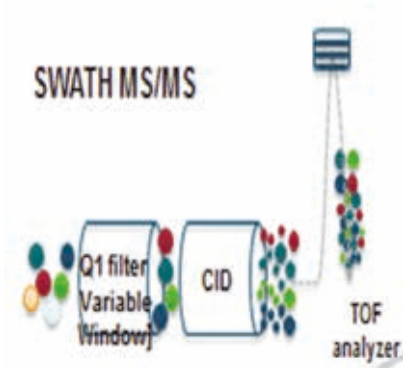


图1. SWATH®示意图。

通过 Variable Window Calculator 可变窗口计算器，可以根据 TOFMS 的一级母离子自动计算出 SWATH®的智能可变窗口，复制粘贴到Mass Table即可建立方法，方法建立简便快捷，易于操作。



图2. TOFMS 的一级母离子。

Controls		
Number of Windows:	12	
Lower m/z limit:	100	
Upper m/z limit:	800	
Round bin edges to x figures:	0	
Window overlap (Da)	0.5	
CES	15	

99.5	449.5	15
448.5	484.5	15
483.5	516.5	15
515.5	546.5	15
545.5	573.5	15
572.5	599.5	15
598.5	625.5	15
624.5	653.5	15
652.5	685.5	15
684.5	720.5	15
719.5	755.5	15
754.5	800.5	15

图3. SWATH 可变窗口计算。

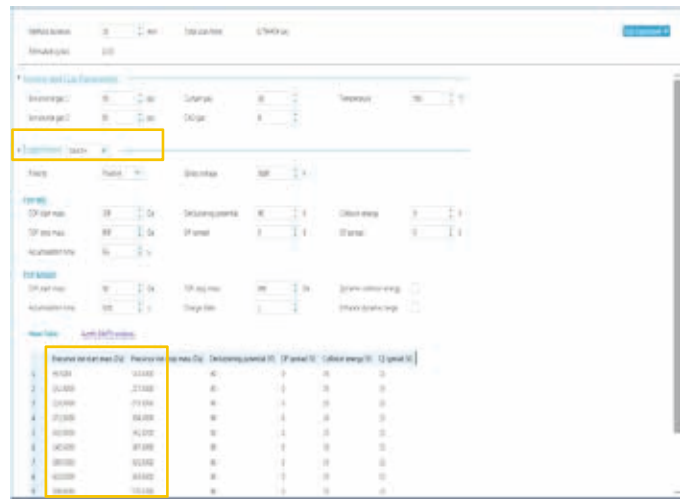


图4. SWATH 采集方法编辑。

在X500R高分辨质谱上使用SWATH®方法采集标准品和样品的数据。

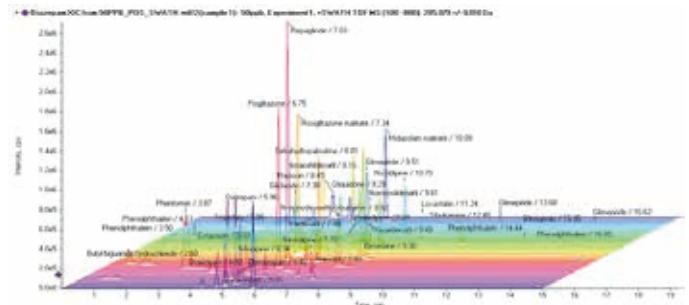


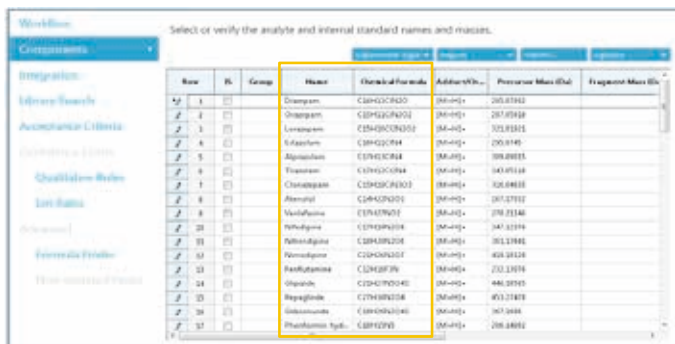
图5. SWATH®采集68种非法添加药物标准品色谱图。

数据分析

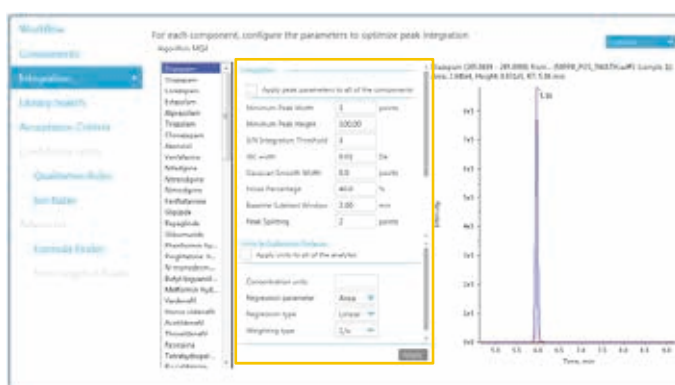
一、筛查确认

采集四份保健品样品的SWATH®数据，使用X500R SCIEX OS软件进行数据处理，通过准确质量数、保留时间、同位素分布和二级库匹配四大置信条件，对4个样本进行筛查，软件界面简单易用，只需四步即可得到筛查结果。

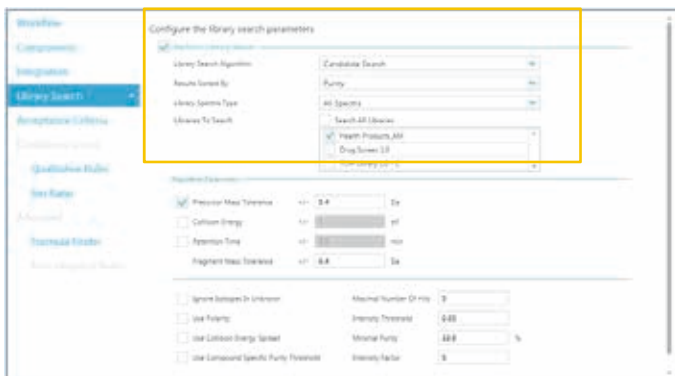
1、导入筛查药物列表。



2、 设置色谱积分参数。



3、设置库搜索条件，本次实验同时建立了此68种药物的高分辨二级碎片数据库，每个药物具有低、中、高和复合能量四张谱图，方便基质样品的筛查和确证。



4、导入所有标准品和样品的SWATH® 数据进行筛查

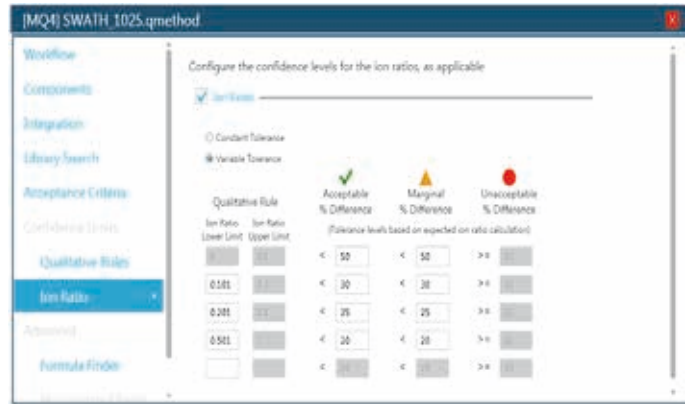
Screenshot of the 'Library' tab in the 'Library' application																
Index	Network	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy	Formula	Previous Mean	Mean Error	RT (min)	Isotope (min)	Library (min)	Found At	Mean Error	Library ID	Library Score	Ion Ratio
191	5.05	0.11	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	205.079	▲	✓	▲	205.0794	-0.8	No Match	N/A	0.0	21.0
192	4.95	0.14	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	205.058	▲	✓	▲	207.0514	-0.8	No Match	N/A	0.0	21.0
193	5.04	0.14	0	N/A	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	223.029	■	■	■	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0	21.0
194	4.65	0.21	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	205.075	▲	✓	▲	205.0811	-0.5	No Match	N/A	0.0	21.0
195	4.82	0.20	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	200.088	■	✓	■	200.0828	-0.7	No Match	N/A	0.0	21.0
196	5.04	N/A	0	N/A	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	143.052	■	■	■	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0	21.0
197	4.71	0.24	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	220.040	■	✓	■	220.1401	0.044	No Match	N/A	0.0	21.0
198	5.20	0.14	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	207.078	■	✓	■	207.0719	-0.5	No Match	N/A	0.0	21.0
199	4.57	0.41	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	270.252	■	✓	■	270.2170	-0.2	No Match	N/A	0.0	21.0
200	5.03	0.08	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	147.024	■	✓	■	147.0222	-0.4	No Match	N/A	0.0	21.0
201	6.28	0.20	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	303.019	▲	✓	▲	303.1077	0.218	No Match	N/A	0.0	21.0
202	5.03	N/A	0	N/A	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	430.102	■	■	■	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0	21.0
203	4.69	0.45	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	110.102	▲	✓	▲	110.1219	0.4	No Match	N/A	0.0	21.0
204	5.04	0.21	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	440.080	■	✓	■	440.0788	-0.5	No Match	N/A	0.0	21.0
205	5.08	0.20	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	451.295	■	✓	■	451.2560	-0.7	No Match	N/A	0.0	21.0
206	5.20	0.18	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	307.249	■	✓	■	307.2025	-0.218	No Match	N/A	0.0	21.0
207	5.04	N/A	0	N/A	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	206.240	■	■	■	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0	21.0
208	5.51	0.01	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	251.027	▲	✓	▲	252.0128	-0.2	No Match	N/A	0.0	21.0
209	5.20	0.43	0	<1 points	N/A	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	206.207	■	✓	■	206.2133	0.015	No Match	N/A	0.0	21.0

5、通过Mass error、RT、Isotope、Library匹配确证，筛选出全部绿灯的结果。



SWATH®数据采集在复杂基质中，二级碎片归属性更好，而且灵敏度也更高，能够更加准确的匹配和确证。本实验在4份保健样品中分别筛查确证出硝西洋、西地那非和哌唑嗪药物，且一级质量精度均在1ppm以内，二级数据库匹配95分以上，X500R高分辨质谱优异的稳定性结合SWATH®采集方法优异的二级碎片，使化合物确证更加准确和具有专属性。

量结果。以硝西洋为例，硝西洋定量线性范围可从0.1ng/mL-100 ng/mL，线性方程回归系数 $r=0.99710$ ，各浓度点准确度在94.8%-114.41%之间。硝西洋标准曲线各浓度点离子比率范围在0.37-0.42之间，确证样品中硝西洋40.9ng/mL，离子比率为0.40，与标准品浓度点离子比率相比，添加样品离子比率在允许误差范围内，更加保障确证结果。



1、在SCIEX OS软件中，勾选离子比率可变误差设置，SCIEX OS软件自动设置好离子比率的误差置信范围。

Index	Sample Name	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Retention Time Dev.	Yield	Formula	Precursor Mass	Mass Error	RT Conf.	Isotope Conf.	Library Conf.	Library Score
15	Sample_1	Proton	4.27	717544	4.22	0.05	0	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	244.07	0.05	0.99	0.99	0.99	99.9
228	Sample_1	Proton	4.27	717544	4.22	0.05	0	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	244.07	0.05	0.99	0.99	0.99	99.9
277	Sample_1	Proton	4.27	717544	4.22	0.05	0	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	244.07	0.05	0.99	0.99	0.99	99.9
278	Sample_1	Proton	4.27	717544	4.22	0.05	0	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	244.07	0.05	0.99	0.99	0.99	99.9



二、SWATH®二级定量

SWATH®采集获得连续的二级碎片谱，可一针进样同时应用二级碎片进行定量分析，该扫描模式提供更高的二级灵敏度和更宽的定量线性范围，同时SCIEX OS软件还可进行离子丰度比的自动计算，提供更高专属性的定

2、SCIEX OS软件一目了然呈现定量准确度、线性范围、离子比率、色谱图、一级准确质量数、同位素比和二级谱库确证结果。

对4份保健品中筛查出的非法添加药物进行定量，定量结果如下表所示：

确证非法添加药物（单位：ng/mL）			
	减肥茶	胶囊1	胶囊2
硝西泮	40.9		
西地那非			23.9
哌唑嗪		15.7	

总结

本实验应用X500R QTOF高分辨质谱系统以及专利的SWATH®技术，建立了基于2017版国家食品安全监督抽检实施细则规定的68种保健品非法添加药物的筛查和定量方法。SWATH®技术是一种非依赖性数据采集，通过智能化可变窗口和专利去卷积技术，保证在基质复杂的情况下，也能一针进样同时获得高质量的一级和二级之谱图。结合高分辨二级数据库使保健品非法添加确证更简单和准确。

SWATH®数据可获得更高灵敏度的二级谱图，其不仅可用于非法添加药物的筛查和确证，还可同时应用二级数据进行定量分析，当基质样品有干扰时，SWATH®二级定量能够有效的降低背景噪音，排除干扰离子。优异的二级碎片还可自动计算离子丰度比，使定量的结果更加准确可靠。

SCIEX OS软件系统将采集和数据处理方法参数内置，更加简单易用。集成式的软件平台设计，简单明了的模块化设置可同时完成方法建立、数据采集以及定性和定量的数据处理。强大的SWATH®数据采集方式结合方便使用的SCIEX OS软件平台使保健品非法添加确证更加方便和准确，可大大提高工作效率。

参考文献

欧盟SANTE/11945/2015法规.

SCIEX, European Union Reference Laboratory (EURL-FV) Almeria, Spain and the EMEA team, Analysis of Regulated Pesticides in Baby Food Using SCIEX X500R QTOF.

SCIEX QTRAP复合质谱检测中药材农药残留的整体解决方案

龙志敏， 郭立海

SCIEX， 亚太应用支持中心（上海）， 中国

引言

中药作为中华民族的宝贵财富，其独特的治疗理念正逐渐被国内外所接受。由于需求量大，野生中药资源匮乏，人工种植中药材成为一种必然趋势。农药作为防治农林牧业生产的有害生物和调节植物生长的化学药品，其在中药材生长种植和规范化管理等方面发挥着重要作用。然而农药的过量使用会残留于中药材中，对人类的健康带来巨大隐患。

因此，国家药典 2015 版规定了中药材中农残检测项目，其中包括液相三重四极杆质谱联用仪的 MRM 模式检测 155 种农药残留。但由于中药材化学成分的复杂性，传统质谱分析的 MRM 工作模式往往会因为中药材中的化学成分干扰，导致离子比率偏差，或出现“假峰”，产生“假阳性”，干扰判断。为了克服传统质谱分析 MRM 模式的弊端，SCIEX 三重四极杆复合线性离子阱质谱 QTRAP® 系统独有的复合扫描模式 MRM-IDA-EPI（图 1），可以在一针进样的同时获得 MRM 色谱峰和 EPI 增强型二级质谱图。MRM 两对离子通道色谱峰可用于农药的定量分析，EPI 二级谱图可通过与 SCIEX 农残数据库检索确证（图 2），有效的克服了传统质谱分析的弊端，增加检测分析工作者确证的准确度。

MRM触发IDA工作原理



图1b. Qtrap: MRM触发IDA工作原理。

基于国家药典2015版中规定的155种农药残离子对信息，建立了基于QTRAP®质谱平台的MRM-IDA-EPI中药农残解决方案，一针进样分析，同时获得农药残留的MRM定量信息和对应的二级谱图，在没有标准品的情况下，仍然可以对中药材农残快速筛查。

复合型质谱QTRAP能够实现一针进样，同时定量和定性

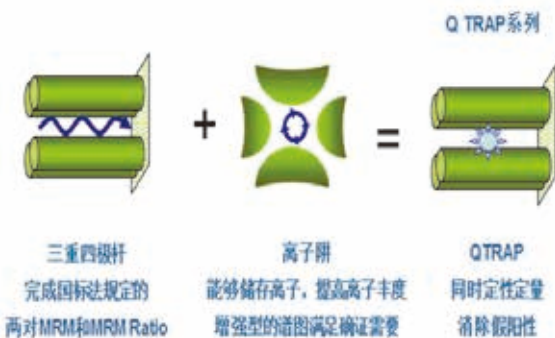


图1a. Qtrap: 三重四极杆复合线性离子阱质谱。

库检索流程示意图：

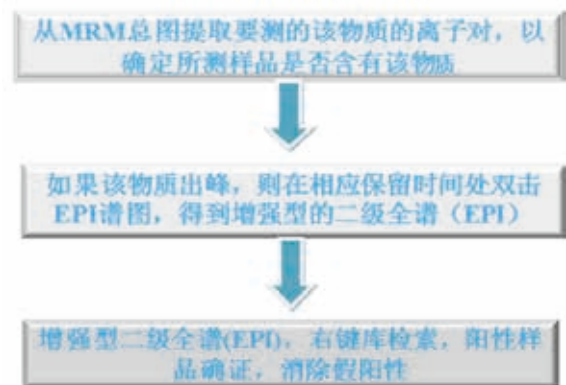
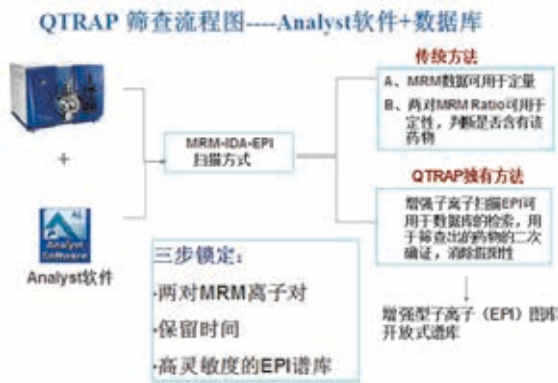


图2. 谱库检索流程示意图。

复合型质谱 QTRAP 筛查的整体工作流程如下：



样品前处理：

取市售的红参粉末0.2g，用2mL乙腈含0.1%甲酸，超声提取两次，每次30 min，合并2次提取液，吹干，用0.5mL 50%甲醇超声复溶，离心，取上清。

液相条件：

液相：SCIEX ExionLC AD
色谱柱：phenomenex Kinetex C18, 2.6 μ m, 50 $\times$ 2.1mm
流动相：A: 乙腈含 2 mM 甲酸铵
B: 水含 2 mM 甲酸铵
柱温：40℃
进样量：10 μ L
梯度洗脱，如下所示

Time (min)	A%	B%
0	85	15
2	85	15
15	5	95
18	5	95
18.1	85	15
22	85	15

质谱方法:

SCIEX QTRAP® 4500三重四极杆复合离子阱质谱

ESI离子源参数：
气帘气CUR：30psi；
IS电压：5500V；离子源温度：550℃
雾化气GAS1：55psi；辅助气GAS2：55psi
MRM扫描模式：
离子对信息参考国家药典2015版
Trap扫描参数：
EPI 扫描范围：50-600 m/z
碰撞气CAD：High；碰撞能量：35 $\pm$ 15V

结果与讨论:

采用MRM-IDA-EPI的方式，对红参的乙腈提取物进行155种农残筛查，共筛查出Azoxystrobin、Propiconazole、Phoxim、Difenoconazole 4种农药残留，如图3所示：4种农药的定性和定量离子通道在相同保留时间出峰（图3a），在MRM通道出峰的同时，触发了线性离子阱的功能，获得了该4个农药残留的EPI图（图3b），右键搜索谱库，根据正匹配和反匹配结果，进一步确证4种农药残留。

在无标准品对照的情况下，EPI图是帮助我们鉴定农残，排除假阳性结果的利器，如在Phoxim的离子通道中，由于中药红参基质干扰，在保留时间13.84和15.31min两个时间都出峰，在没有标准品对照的情况下，无法确认哪个峰是Phoxim。而采用MRM-IDA-EPI方式采集到13.84和15.31min两个峰的二级质谱图，右键一点，即可进行谱库中匹配，轻松判断13.84 min为Phoxim。如图4所示，13.84min的EPI图与谱库的匹配结果比15.31min的结果更好。

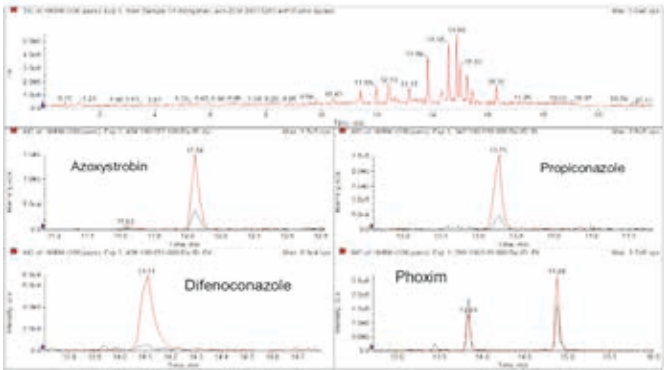


图3a. 红参提取物的MRM色谱图。

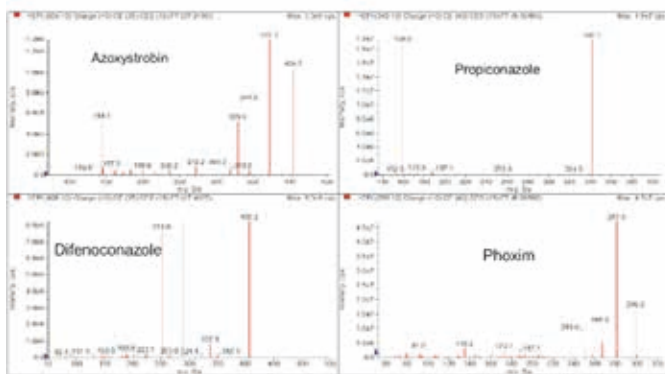


图3b. 4种农药残留的EPI图。

结论：

SCIEX复合型质谱QTRAP®系统将三重四极杆的定量功能和线性离子阱的定性功能完美结合，一针进样，定性确证和定量同时实现。

EPI二级谱图的灵敏度比传统MRM扫描灵敏度有明显提高。EPI增强型高灵敏度的二级图谱有效的帮助确证复杂基质中低浓度点检测容易出现假阳性的问题，使检测结果更加准确和可靠。三重四极杆复合离子阱质谱QTRAP®独特的MRM-IDA-EPI扫描方式，已成为解决“假阳性”和药物确证分析中的一种有效手段和整体解决方案。

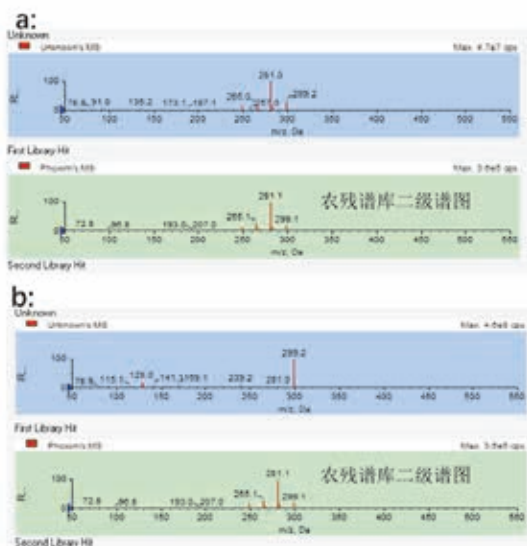


图4. 13.84min和15.31min 的二级质谱图与农残谱库中Phoxim 的二级谱图对比。

SCIEX公司简介

SCIEX 公司是 30 多年来专注从事高端质谱研发、生产、销售和技术服务的高科技公司。现隶属于美国 Danaher 集团 (NYSE: DHR) 旗下，是全球知名质谱仪器生产厂家。SCIEX 公司致力于生命科学技术、药物开发、食品安全、环境保护等重要相关领域的研究和分析技术的创新，愿与广大的中国科学家一起不断努力，让质谱改变每个人的生活。

目前，SCIEX 为食品安全、环境保护、法医检测、临床检测等应用领域客户提供先进的质谱产品、技术和解决方案；为蛋白质和药物等分析提供创新的技术和分析诊断工具；为生命科学研究的客户提供包括仪器、试剂、软件和技术服务在内的一体化科学解决方案。SCIEX 公司是世界上有机质谱仪、生物质谱领域的主要供应商。



LC-MS/MS技术在全球知名的
SCIEX 公司



SCIEX 公司的生产基地

您的成功就是我们工作的动力 我们视为己任。

作为SCIEX的客户，您将得到世界一流的售后支持，无论在哪里，我们都将是您最为可靠的伙伴，为您解决难题，提供方案以及最大化提高工作效率。

我们的售后工程师提供全线LC/MS系统支持。无论您的离子源，自动进样器或者实际样品分析需要帮助，您都将得到及时反馈。我们将最大努力保证仪器的正常使用，帮助您完成科研工作。

我们的应用科学家提供可靠的工作流程，帮助您简化样品制备，减少人工操作步骤。帮助您开发方法以提高分析通量。通过提供简单易用的iMethod™方法，帮助您快速开展工作。我们也可以通过电话实现远程支持。

我们的资深专家为您量身订做适合您实验室的培训课程，提高工作效率。您可以到我们的Demo Lab参加LC/MS技术培训及应用课程，也可以通过网络 e-learning工具进行学习。

我们的售后支持团队随时为您提供最新产品信息，软件更新，分析方法及仪器维护，确保您在竞争中独占鳌头。

我们将竭尽所能为您提供高效优质的服务。

更多信息，请访问：www.sciex.com.cn
www.sciex.com



For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-03-8501-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488，400 821 3897 网址：www.sciex.com.cn

微博：@SCIEX