



Orbitrap 静电场轨道阱高分辨质谱专辑

中药及天然产物研究与检测解决方案

A Roadmap for the Puzzle of Traditional Chinese Medicine and Natural Products

禹重科技® ÜZONGLAB

成分分析仪器|表面测试仪器|样品前处理仪器

Thermo
SCIENTIFIC

服务科学 · 世界领先

赛默飞世尔科技



关于赛默飞世尔科技

赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：TMO）是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额 170 亿美元，在 50 个国家拥有约 50,000 名员工。我们的使命是帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。我们的产品和服务帮助客户加速生命科学领域的研究、解决在分析领域所遇到的复杂问题与挑战，促进医疗诊断发展、提高实验室生产力。借助于首要品牌 Thermo Scientific、Applied Biosystems、Invitrogen、Fisher Scientific 和 Unity Lab Services，我们将创新技术、便捷采购方案和实验室运营管理的整体解决方案相结合，为客户、股东和员工创造价值。欲了解更多信息，请浏览公司网站：www.thermofisher.com

赛默飞世尔科技中国

赛默飞世尔科技进入中国发展已有 30 多年，在中国的总部设于上海，并在北京、广州、香港、台湾、成都、沈阳、西安、南京、武汉、昆明等地设立了分公司，员工人数约 3700 名。我们的产品主要包括分析仪器、实验室设备、试剂、耗材和软件等，提供实验室综合解决方案，为各行各业的客户服务。为了满足中国市场的需求，现有 8 家工厂分别在上海、北京和苏州运营。我们在全中国共设立了 6 个应用开发中心，将世界级的前沿技术和产品带给国内客户，并提供应用开发与培训等多项服务；位于上海的中国创新中心结合国内市场需求和国外先进技术，研发适合中国的技术和产品；我们拥有遍布全国的维修服务网点和特别成立的中国技术培训团队，在全国有超过 2000 名专业人员直接为客户提供服务。我们致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。欲了解更多信息，请登录网站：www.thermofisher.com

Thermo Scientific™ 品牌下生命科学质谱（Life Science Mass Spectrometry）

前身为著名的质谱先驱 – 美国菲尼根（Finnigan）质谱仪制造商。从 1967 年成立至今的五十年里，Finnigan 质谱一直以无与伦比的研究成果保持着质谱技术的世界领先地位，拥有最全的质谱产品线。Thermo Scientific™ 专利独有的 3 大质量分析器技术：可以产生完美理论电场的共轭双曲面四极杆、可以用于定量定性的线性离子阱（LTQ）以及超高分辨的静电场轨道阱（Orbitrap）。Thermo Scientific™ 色谱与质谱产品进入中国二十多年来，与改革开放中的中国一起成长壮大。在北京、上海、广州等多个地区设有分支机构，发展并建立了以客户需要为中心的组织架构，业务内容覆盖中国大陆及香港地区，并拥有广大用户的积极认可与支持。在环保、农业、公安、商检、石油、化工、地质、检疫、制药、卫生、核科学等领域与中国研究单位开展积极的科研合作。

赛默飞生命科学质谱悠久的历史传统历史

- 1967 Finnigan 成立于美国加利福尼亚的 Palo Alto
- 1968 世界上第一台四极杆型 GC/MS (Model 1015) 用于斯坦福大学
- 1971 世界上第一台智能 GC/MS/DS 用于美国环境保护局 (EPA)
- 1976 历史上最成功的质谱仪, 推出 4000 系列 GC/MS 和 INCOS™ MS 数据系统
- 1977 推出世界上第一台商品化 LC/MS
- 1978 发展了具有专利权的脉冲正负离子化学电离源; 推出世界上第一台配备冷柱头进样器的定量毛细管 GC
- 1980 推出世界上第一台三重四极杆 MS/MS (TSQ®) 质谱仪
- 1981 MAT 公司是世界上著名的有机磁质谱仪和气体同位素质谱仪的生产厂商, Finnigan 与之合并并重新命名为 Finnigan MAT 公司。生产高灵敏度、高准确度和高精度的气体同位素比质谱仪 (Model 251/261)
- 1982 推出低价位、结构紧凑的 Delta 系列同位素比 MS
- 1983 推出获得专利权的离子阱 Detector™ (ITD™) 和热喷雾 LC/MS 接口
- 1986 推出全数字化三重四极杆质谱仪 (TSQ® 70) 和磁式质谱仪 (MAT 90)
- 1989 LDC/Milton Roy 被 Thermo Electron 收购; ESI 源作为 LC/MS 的接口用于 TSQ® 70 质谱仪
- 1990 Finnigan MAT 被 Thermo Electron 收购
- 1991 推出世界上第一台 MALDI/TOF (LASERMAT™)
- 1993 Spectra-Physics Analytical 被 Thermo Electron 收购
- 1995 Finnigan 推出 GCQ™ 和 LCQ™ 台式离子阱质谱仪; 并推出 ELEMENT, 高分辨的磁式 ICP/MS
- 1997 推出 Trace™ GC 和 GC/MS 多进样器 / 多检测器毛细管系统、AQA™ 台式四极杆 LC/MS; 推出全面兼容 MSn 数据系统的 Xcalibur™ 质谱控制及数据处理软件
- 1999 推出 LCQ™ DUO 和 LCQ™ DECA 离子阱质谱仪; TRITON TI 同位素比 MS
- 2000 推出 TEMPUS™ 超快速 GC/TOF-MS; NEPTUNE 多接收器高分辨 ICP-MS 用于 LC/MSⁿ 的 Surveyor™ HPLC; Polaris Q™ EI/CI GC/MS/MS
- 2001 推出世界上第一台高分辨、超小型的台式三重四极杆质谱仪 TSQ Quantum
- 2001 推出第三代离子阱质谱仪 LCQ™ Advantage 和 LCQ™ DECA XP
- 2002 推出世界上最小的液质联用仪 Surveyor-MSQ、更高灵敏度的 LCQ™ DECA XP plus、最领先的第五代气质联用仪 Trace DSQ™、超快速气相色谱 FastGC、Focus GC 和高通量蛋白质组学研究平台 ProteomeX
- 2003 推出线性离子阱 - 高分辨傅立叶回旋共振质谱 LTQ FT™ MS, 可精测质量的高分辨三重四极杆质谱 TSQ Quantum Ultra AM 和线性离子阱质谱 LTQ™
- 2004 推出单通道气质联用仪 Focus DSQ、第二代 Proteome X LTQ、TSQ Quantum Discovery MAX 和 vMALDI 源; 推出 MSQ Plus 单级四极杆质谱系统; 推出 LCQ™ Advantage MAX 和 LCQ™ DECA XP MAX
- 2005 推出结合了精确质量数测定和多级质谱功能的新一代仪器 LTQ Orbitrap, 适合于超高要求的蛋白质组学和药物研究; 推出 LXQ 线性离子阱, 推出 Focus PolarisQ 和新型高分辨磁质谱 DFS
- 2006 推出灵敏度更高的 Trace DSQ™ II 和更高性价比的 TSQ Quantum Access
- 2007 推出 LCQ Fleet, 结合 ETD 电子转移解离裂解源这一创新技术的 LTQ XL™
- 2008 推出结合电子转移解离 (ETD) 和基质辅助激光解析电离 (MALDI) 能力的 LTQ Orbitrap™ 系列高分辨组合质谱
- 2011 推出世界首款商业化混合型四极杆静电场轨道阱质谱 Q Exactive
- 2013 推出世界首款商业化三合一 Fusion™ Tribrid™ 质谱仪以及全新一代高性能三重四极杆液相质谱仪 TSQ Endura 和 TSQ Quantiva
- 2014 推出专为常规分析应用而设计的 Q Exactive™ Focus 四极杆 Orbitrap 组合型质谱仪, 确保系统的稳定运行和超高的分析性能; 推出 TSQ 8000™ Evo 三重四极杆 GC-MS/MS, 提供高质量分析结果
- 2015 推出 Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS 高分辨气质联用系统, 以及全新一代 Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ 三合一质谱仪

赛默飞生命科学质谱

源于质谱先驱 – 美国菲尼根 (Finnigan) 质谱, 拥有业内最为完整的质谱产品线。我们非常愿意与您分享长达 50 年的科学质谱仪器的制造和使用经验, 可以为您提供临床检验和研究分析的完整解决方案。

质谱技术的创新者与领导者

• 客户服务热线: 800 810 5118, 400 650 5118

UltiMate® 3000 高效液相色谱系统的所有模块均具有超高效液相兼容性, 让所有使用者获得最佳性能。UltiMate® 3000 系列提供各类型输液泵, 流速涵盖 20 nL/min 到 10 mL/min 范围。可根据需要选择自动进样和检测器模块, 为您的化学分析提供全方位解决方案。



LTQ Orbitrap 系列超高分辨液质联用系统使用赛默飞专利的线性离子阱及高分辨质谱技术 Orbitrap, 实现多级质谱, 超高质量精确度, 分辨率, 动态范围和灵敏度。



Q Exactive 系列超高分辨液质联用系统将共轭双曲面的四极杆质量分析器与具有超高分辨率和质量精度的 Orbitrap 检测技术相结合, 提供正负切换扫描功能, 优异性和超高分辨定量能力。



Orbitrap Fusion™ Tribrid™ 质谱仪集赛默飞独有的共轭双曲面四极杆质量分析器、线性离子阱质量分析器和超高分辨率的 Orbitrap 于一体, 具备了创新性的三合一质量分析器结构, 能够对复杂生物样品进行前所未有的深度分析。

灵活多样的中药分析应用软件

Compound Discoverer 软件

Compound Discoverer 软件是智能的小分子化合物发现和鉴定软件。研究人员使用该软件，可以方便的实现以下功能：

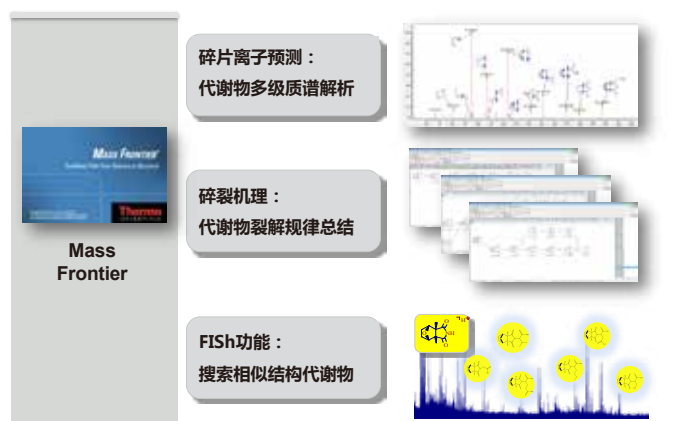
- 可根据预设的分类对不同条件下的样品进行分组和批量处理；
- 根据研究需要设定自定义的数据处理流程；
- 利用多种先进的处理技术：多重质量亏损过滤（M MDF）、同位素过滤（IPF）、碎片离子检索（FISh Scoring）等功能对预期和未知的有关物质进行提取分析；
- 在结果浏览中直观的获得不同条件下样品差异比对结果。



Mass Frontier 软件

Mass Frontier 是专业的结构解析软件。其含有小分子碎裂机理的 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库，该谱图库几乎涵盖了所有已发表的文獻。

- 谱图注解功能：利用 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库，加上软件所带的预测碎裂工具以及自动谱图注解功能，可对不同碎片离子及其所对应的结构进行自动归属，从而帮助简化中药成分质谱谱图数据的结构说明。
- 碎裂机理功能：利用 Fragments and Mechanisms 功能，可以方便地得到各碎片的裂解途径，从而可对中药同类化合物的质谱裂解规律进行研究。
- FISh 功能：Fragment Ion Search (FISh) 功能可以在成分复杂的中药样品中寻找具有相似结构的成分，从而有助于在已知化合物的基础上，鉴定出更多结构相似的未知化合物。



TraceFinder 软件

TraceFinder 是一款高通量的筛查定量软件，并集仪器控制、方法编辑、数据采集、自动数据处理和报告于一体。

- 灵活选择保留时间、一级精确质量数、碎片离子信息、同位素分布、数据库谱图比对等多重指标，进行目标成分的高通量筛查。
- 建立管理数据库，通过数据对成分进行检索鉴定。
- 目标成分的高通量定量分析。



目录

中药及制剂中的化学成分表征

1. 中药及制剂中化学成分表征工作流程	8
2. 动物类中药斑蝥中斑蝥素类成分鉴定	9
3. 人参皂苷提取物中的化学成分鉴定	14
4. 葛根中含硫成分的快速发现鉴定	18
5. 葛根中丙二酰基葡萄糖苷不稳定结合物鉴定	21
6. 中药复方防己黄芪汤口服液中活性成分鉴定	26

天然产物代谢

1. 天然产物代谢工作流程	30
2. 人尿样中乌头碱及其代谢产物鉴定	33

中药组学

1. 中药组学工作流程	35
2. 绿茶和红茶提取物的代谢组学分析	36
3. 中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究策略：基于特征类群苯乙醇苷类成分的肉苁蓉品种区分	39

中药及保健品中非法添加筛查

1. 中药及保健品中非法添加筛查工作流程	47
2. 中药及保健品中非法添加的 5 型磷酸二酯酶抑制剂进行快速筛查、确证及定量分析	49
3. 中药及保健品中非法添加的降糖药进行同时鉴定、确证及定量分析	54

中药及天然产物定量

1. 中药及天然产物定量工作流程	59
2. 中药活性成分汉黄芩苷高分辨质谱定量	60

中药及天然产物分析部分发表文章列表	63
-------------------------	----

附录	67
----------	----

中药及制剂化学成分表征工作流程

数据采集



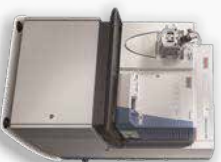
Ultimate 3000
UHPLC



Q Exactive系列



Orbitrap Fusion
系列



LTQ Orbitrap
系列

成分寻找



TraceFinder

- 已知成分快速搜寻



Compound Discoverer

- FISh功能
以母核结构特征碎片
搜索相似结构未知成分

成分鉴定



Compound
Discoverer



Mass Frontier

- 谱图解析功能解析确证结构



mzCloud



Chempidder



中药成分数据库
(8100种成分)

- 数据库搜索鉴定

动物类中药斑蝥中斑蝥素类成分鉴定

李晨 刘国强 赛默飞世尔科技(中国)有限公司
张毅 杨大坚 重庆市中药研究院

关键词

Q Exactive, Mass Frontier, 斑蝥, 中药, Orbitrap

引言

中药是一个高度复杂的化学物质体系,其化学成分结构复杂,结构相似的化合物多,一些低含量成分难以检测,为分析工作带来诸多挑战。液相色谱质谱联用技术结合了液相色谱对复杂样品的高分离能力,以及质谱高灵敏度、高选择性等优点,近年来已被广泛用于中药成分分析。由于中药成分复杂,因此要求质谱系统具有足够高的分辨率以区分质量数接近的成分,从而提高中药成分的鉴定率;足够高且稳定的质量精度,以保证成分鉴定结果的准确性;足够高的灵敏度和足够宽的动态范围,以满足各种浓度水平中药成分的检测。基于Orbitrap 静电场轨道阱技术的 Q Exactive 高分辨质谱系统,具有分辨率高、质量精度高、灵敏度高、质量轴稳定性好、可快速正负切换扫描等优点,可有效应对中药成分的复杂性问题。

动物类中药是中药的重要组成部分,但长久以来由于其缺乏特异的次级代谢产物或专属性强的化学成分,为其研究工作带来很多困难。斑蝥作为常用的动物类中药,具有攻毒蚀疽、破血散结等作用,但目前其化学成分研究较少,仅分离得到 5 个斑蝥素类化合物。本文结合 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱及 Mass Frontier 结构鉴定软件,建立了中药成分的高效快速鉴定流程,并应用该流程从斑蝥中鉴定出 21 个斑蝥素类成分,其中 16 个成分为从斑蝥中新发现的成分,并首次从斑蝥中发现了 3 个斑蝥素上酸酐的氧被二肽取代的化合物。

实验目的

建立基于 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱及 Mass Frontier 软件的中药成分分析流程,用以在中药复杂成分样品中快速准确的寻找并鉴定具有相似结构的成分,从而有助于发现新的天然产物。本文以中药斑蝥为例,应用所建立流程对斑蝥中斑蝥素类成分进行高分辨质谱分析。

实验方法

液相色谱方法

色谱系统: Thermo Scientific™ Dionex UltiMate 3000 液相色谱仪
色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil Gold (150×2.1mm, 3μm)
流动相: A 为水相: 0.1% 甲酸水, B 为有机相: 乙腈
梯度条件:

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	5
20	85	35
24	40	45
27	10	70
47	10	90
48	90	100

流速: 0.3 mL/min, 进样量: 1μL, 柱温: 35°C

质谱条件

质谱系统：Thermo Scientific™ Q Exactive 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱

参数设置：

离子源参数		扫描参数	
离子化方式	HESI	MS 分辨率	70,000 FWHM
喷雾电压	3 kV	MS ² 分辨率	17,500 FWHM
鞘气	40 arb	扫描范围	<i>m/z</i> 115-1000
辅助气	10 arb	裂解方式	HCD
离子源温度	350°C	碰撞能量	35%
离子传输管温度	300°C	扫描模式	Full scan+ dd-MS ²

数据分析

Q Exactive 采集的数据文件由专业的结构鉴定软件 Mass Frontier 进行处理。Mass Frontier 含有小分子碎裂机理的 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库，该谱图库几乎涵盖了所有已发表的文献。利用 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库，加上软件所带的预测碎裂工具以及自动谱图注解功能，可对不同碎片离子及其所对应的结构进行自动归属，从而帮助简化中药成分质谱谱图数据的结构说明。利用 Mass Frontier 的 Fragments and Mechanisms 功能，可以方便地得到各碎片的裂解途径，从而可对中药同类化合物的质谱裂解规律进行研究。并且，Mass Frontier 的 Fragment Ion Search (FISh) 功能可以在成分复杂的中药样品中寻找具有相似结构的成分，从而有助于在已知化合物的基础上，鉴定出更多结构相似的未知化合物。

实验结果

由 Q Exactive 高分辨质谱与 Mass Frontier 结构鉴定软件所构成的中药成分高效快速鉴定流程如图 1 所示。利用 Q Exactive 质谱系统进行数据采集，通过 MS 全扫描和 MS² 数据关联扫描，一次进样同时得到中药样品中各成分的 MS 和 MS² 的高分辨数据。然后采用 Mass Frontier 软件进行成分结构的解析，并在已知成分的基础上，利用 FISh 功能以同类成分的母核结构特征碎片寻找具有相似结构的成分。

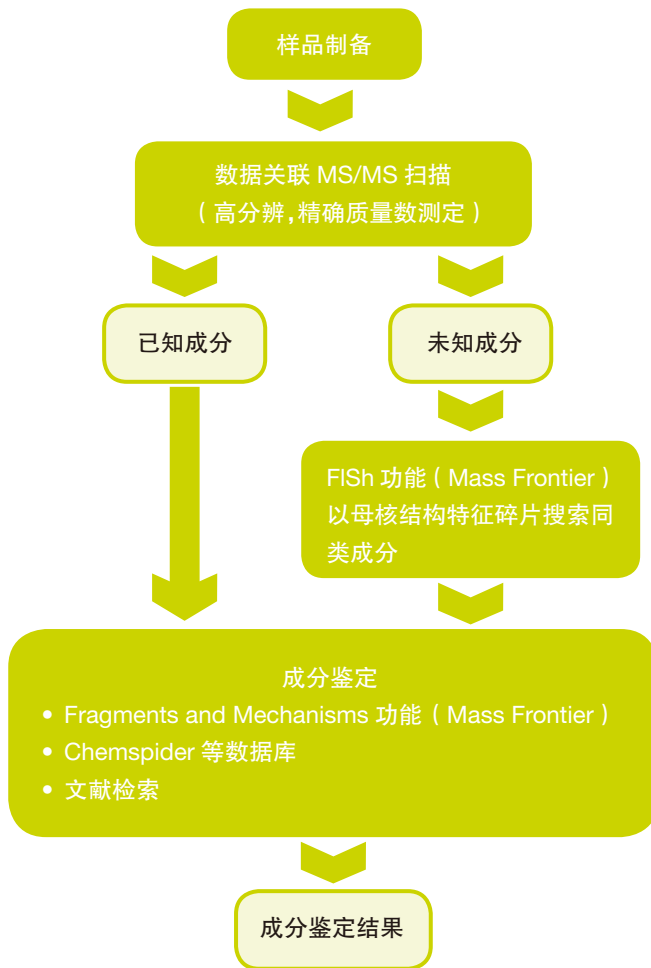


图 1. 基于 Q Exactive 高分辨质谱及 Mass Frontier 软件的中药成分鉴定流程

图 2 为利用 Mass Frontier 软件对斑蝥素二级质谱碎片自动归属的结果。从图中可看出，利用软件所带的预测碎裂工具以及自动谱图注解功能，可以方便地解释斑蝥素质谱中各碎片离子所对应的结构。同时利用 Mass Frontier 的 Fragments and Mechanisms 功能，可以方便地得到各碎片的裂解途径，从而可对化合物的质谱裂解规律进行总结（如图 3、4 所示）。

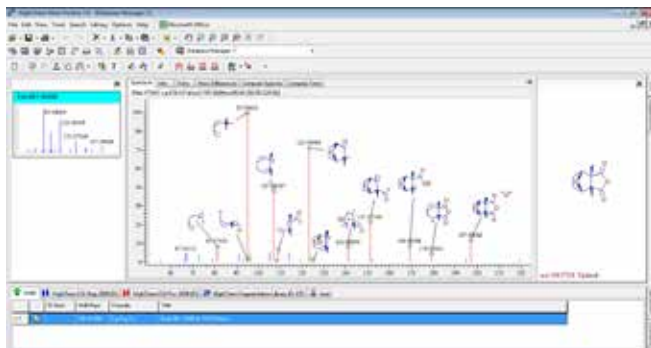


图 2. Mass Frontier 自动归属斑蝥素质谱碎片所对应结构的界面

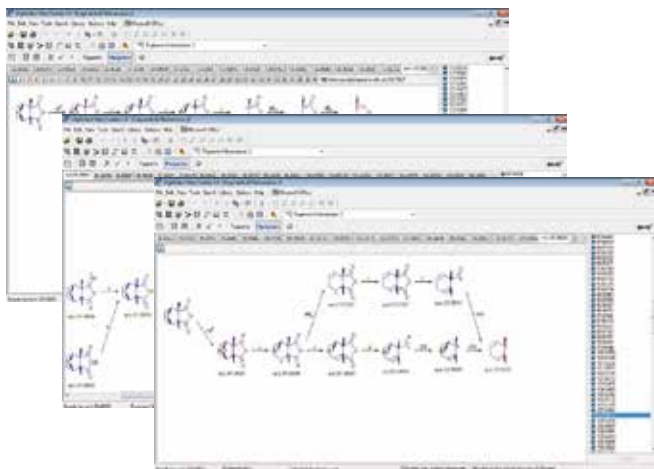


图 3. Mass Frontier 界面中斑蝥素各碎片离子所对应的裂解途径

表 1 为利用所建立流程从中药斑蝥中鉴定出的斑蝥素类成分结果，共鉴定出 21 个成分，其中 16 个成分为从斑蝥中新发现的成分（化合物 5-12，14-21）。在鉴定的成分中，首次从斑蝥中发现了 3 个斑蝥素上酸酐的氧被二肽取代的化合物

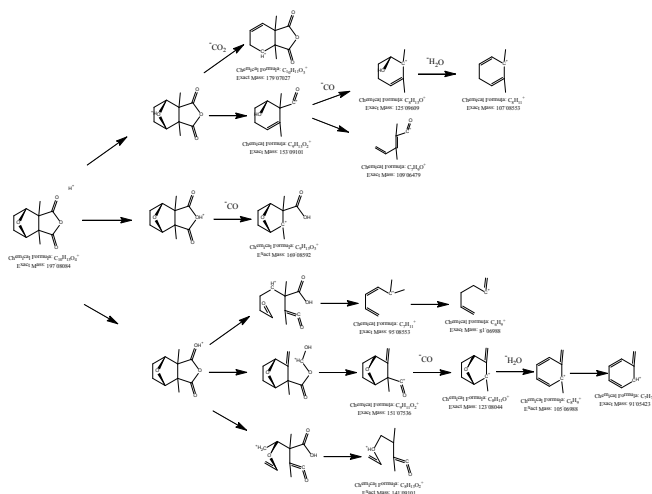


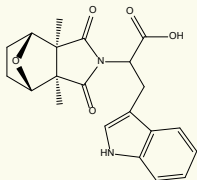
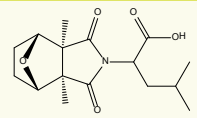
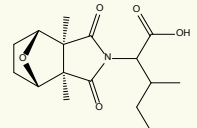
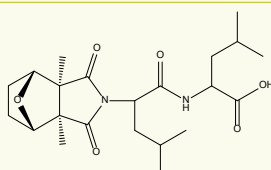
图 4. 通过 Mass Frontier 软件总结出的斑蝥素质谱裂解途径

（化合物 14、17、21）。所有成分质量精度均在 1 ppm 以内，因此可以计算得到唯一的分子式，从而减小中药成分鉴定的工作量，提高成分鉴定的准确率。

表 1. 中药斑蝥中斑蝥素类成分鉴定结果

编号	RT (min)	分子式	理论精确质量数	实测精确质量数	质量偏差 (ppm)	结构
1	4.50	C ₁₅ H ₂₂ O ₅ N ₂	311.16015	311.15994	-0.67	
2	4.56	C ₁₀ H ₁₃ O ₃ N	196.09682	196.09680	-0.10	
3	5.40	C ₁₆ H ₂₄ O ₅ N ₂	325.17580	325.17551	-0.89	
4	6.00	C ₁₆ H ₂₄ O ₅ N ₄	353.18195	353.18179	-0.45	
5	7.21	C ₁₃ H ₁₇ NO ₆	284.11286	284.11282	-0.15	
6	7.43	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	311.12376	311.12366	-0.33	

7	7.78	$C_{14}H_{17}NO_7$	312.10778	312.10770	-0.25	
8	7.81	$C_{15}H_{20}N_2O_6$	325.13941	325.13937	-0.13	
9	8.62	$C_{12}H_{15}NO_5$	254.10230	254.10219	-0.43	
10	9.18	$C_{14}H_{19}NO_6$	298.12851	298.12845	-0.21	
11	9.24	$C_{15}H_{19}NO_7$	326.12343	326.12347	0.13	
12	9.67	$C_{13}H_{17}NO_5$	268.11795	268.11792	-0.11	
13	10.03	$C_{10}H_{12}O_4$	197.08084	197.08084	0.03	
14	14.05	$C_{22}H_{35}O_6N_3$	438.25986	438.25983	-0.07	
15	17.23	$C_{15}H_{21}NO_5S$	328.12132	328.12128	-0.12	
16	17.63	$C_{15}H_{21}NO_5$	296.14925	296.14902	-0.77	
17	18.39	$C_{21}H_{30}O_8N_2$	439.20749	439.20743	-0.14	

18	19.94	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅	383.16015	383.16003	-0.31	
19	20.66	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310.16490	310.16467	-0.74	
20	21.34	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	310.16490	310.16479	-0.35	
21	26.20	C ₂₂ H ₃₄ O ₆ N ₂	423.24896	423.24863	-0.78	

注：阴影标识的化合物为从斑蝥中新发现的成分

结论

结合 Q Exactive 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱及 Mass Frontier 结构鉴定软件，建立了中药成分的高效快速鉴定流程，简化了中药成分结构鉴定的工作，大大提高了中药成分的发现和鉴定效率。通过一级全扫描、二级数据关联扫描以及正负切换扫描，一次进样即可全面获得中药样品中各成分的高分辨一级和二级质谱数据，并且采用高能碰撞诱导解离 (HCD) 方式获得的二级质谱碎片信息更加丰富，有助于得到中药成分更多的结构信息。Q Exactive 的超高分辨率 and 高质量精度，提高了中药成分的鉴定率，保证了鉴定结果的准确性。Mass Frontier 结构鉴定软件大大简化了中药成分质谱数据的解析工作，其 FISh 功能可以在成分复杂的中药样

品中快速搜索到更多与已知化合物结构相似的未知化合物。对斑蝥中斑蝥素类化合物进行鉴定，共鉴定出 21 个斑蝥素类成分，其中 16 个成分为从斑蝥中新发现的成分，并首次从斑蝥中发现了 3 个斑蝥素上酸酐的氧被二肽取代的化合物。本文所建立的流程结合了 Q Exactive 硬件及 Mass Frontier 软件的优势，有助于从中药中高效准确的发现并鉴定新成分。

参考文献

1. 江励华等，斑蝥的研究进展. 医药导报, 2004, 23(6): 385-386.
2. Nakatani T, et al. Three novel cantharidin-related compounds from the Chinese blister beetle, *Mylabris phalerata* Pall. Chemical & pharmaceutical bulletin, 2004, 52(7): 807-809.

人参皂苷提取物化学成分鉴定

侯朋艺 明红

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

人参皂苷; 中药; Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱

摘要

建立了同时鉴定人参提取物中多种皂苷类化合物的反相超高效液相色谱 - 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-MS) 的分析方法。通过 Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱所提供的超高质量精度的一级和二级质谱图, 并结合运用数据处理软件 Mass Frontier™ 对数据进行辅助解析, 从人参提取物中共鉴定 24 种达玛烷型人参皂苷。

引言

人参为五加科植物人参 (Panax ginseng C. A. Mey.) 的干燥根, 是珍贵的中药材, 在我国药用历史悠久, 主要产于我国吉林的长白山等地区。具有滋补、强壮、抗疲劳、抗肿瘤等多方面的生理和药理活性。人参中含有非常丰富的化学成分, 包括皂苷类、糖类、挥发性成分、有机酸及其酯、蛋白质、甾醇及其苷、木质素、黄酮类等成分。其中主要有效成分为人参皂苷。因此, 对人参皂苷进行全面的分析对建立皂苷的指纹图谱和评价人参质量具有重要的意义。

本文采用超高效液相 - 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱联用技术对人参皂苷乙醇提取物的化学成分进行了全面的分析。本实验在优化的液质条件下, 采用一级全扫描 + 数据依赖自动触发二级质谱扫描 (Full scan+ddms2) 模式, 根据仪器所采集的精确分子量, 在 1 ppm 的质量偏差范围内拟合出唯一可能的元素组成, 再结合高质量精度的二级质谱碎片和结构解析辅助软件 Mass Frontier™ 对各个化合物进行了碎片结构归属, 确保了实验结果的准确性。运用此方法, 从人参提取物中共鉴定了 24 个皂苷成分。

1. 实验方法

1.1 试剂与样品制备

甲醇、乙醇、乙腈、二甲基亚砜 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific)、乙酸铵 (色谱纯, Merck); 取人参乙醇提取物适量, 用甲醇溶解后, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 直接进样分析。

1.2 液相色谱条件

仪器: Thermo Scientific™ Dionex UltiMate 3000 液相色谱仪
色谱柱: Thermo Scientific™ Synchronis C18 (150 × 2.1 mm, 3 μm)
流动相: A 为水相 5 mM 乙酸铵 - 水溶液, B 为有机相乙腈

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
2	80	20
40	50	50
60	5	95
60.1	80	20
65	80	20

流速: 0.3 mL/min, 进样量: 10 μL, 柱温为 35°C

1.3 质谱条件

仪器: Thermo Scientific™ Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱仪

质谱参数: HESI Spray voltage: +3.5 kV/-3.2 kV; Sheath Gas Pressure: 35 arb; Aux Gas Pressure: 10 arb; Capillary Temp: 320 °C; Heater Temp: 350 °C; Scan mode: Full MS (Resolution 70,000) and dd-MS² (Resolution 17,500, NCE 30 ~ 80); Scan range: *m/z* 120 ~ 1800。

Thermo
SCIENTIFIC

2. 实验结果

图 1 为样品在正负切换扫描模式下的总离子流色谱图 (TIC)。

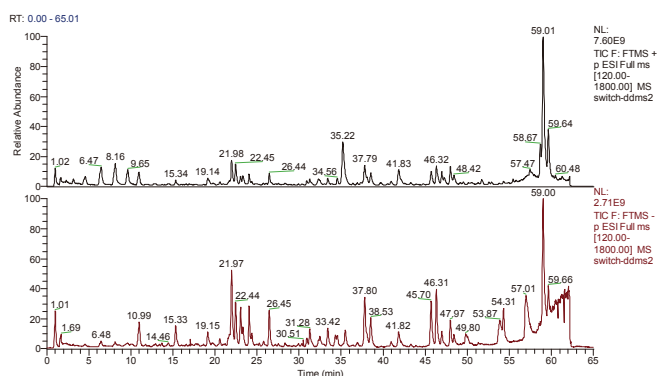


图 1. 正负切换扫描模式下的总离子流色谱图

化合物 1 和 14 的一级质谱图如图 2 所示。化合物 1 在 $t_R = 11.07$ min 处, 负离子模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 945.54230 和 $[M-H+CH_3COOH]^-$ m/z 1005.56366。准分子离子峰 $[M-H]^-$ 实测值与理论值 $[C_{48}H_{82}O_{18}-H]^-$ m/z 945.54283 的偏差为 -0.572 ppm; 准分子离子峰 $[M-H+CH_3COOH]^-$ 实测值与理论值 $[C_{48}H_{82}O_{18}-H+CH_3COOH]^-$ m/z 1005.56397 的偏差为 -0.307 ppm, 可知其分子式为 $C_{48}H_{82}O_{18}$ 。化合物 14 在 $t_R = 26.51$ min 处, 负离子模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 945.54242 和 $[M-H+CH_3COOH]^-$ m/z 1005.56348。准分子离子峰 $[M-H]^-$ 实测值与理论值 $[C_{48}H_{82}O_{18}-H]^-$ m/z 945.54284 的偏差为 -0.443 ppm; 准分子离子峰 $[M-H+CH_3COOH]^-$ 实测值与理论值 $[C_{48}H_{82}O_{18}-H+CH_3COOH]^-$ m/z 1005.56397 的偏差为 -0.489 ppm 可知其分子式为 $C_{48}H_{82}O_{18}$ 。由上述结果可知, 化合物 1 和 14 具有相同的分子式, 互为同分异构体。

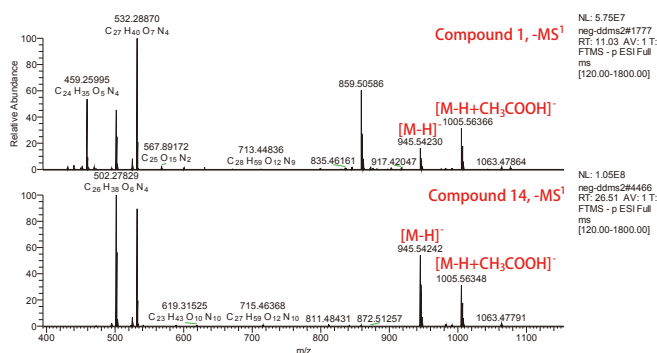


图 2. 化合物 1 和 14 负离子模式一级质谱图

如图 3a 所示, 负离子模式下, 化合物 1 $[M-H]^-$ m/z 945.54230 的二级质谱图可见其主要的碎片离子为丢失一分子葡萄糖所得的 m/z 783.49243, 进一步丢失一分子鼠李糖所得的 m/z 637.43384, 进一步丢失一分子葡萄糖所得的 m/z 475.38110, 以及一分子葡萄糖的碎片 m/z 161.04439。由

二级质谱裂解特征结合文献查阅结果, 推测化合物 1 为人参皂苷 Re。如图 3b 所示, 化合物 4 负离子模式下, $[M-H]^-$ m/z 945.54242 的二级质谱图可见其主要的碎片离子为丢失一分子葡萄糖所得的 m/z 783.49084, 进一步丢失一分子葡萄糖所得的 m/z 621.43738, 进一步丢失苷元上的侧链所得的 m/z 537.34253, 丢失三分子葡萄糖所得的碎片 m/z 459.38452, 以及一分子葡萄糖的碎片 m/z 161.04448。由二级质谱裂解特征结合文献查阅结果, 推测化合物 6 为人参皂苷 Rd。化合物 14 与化合物 1 互为同分异构体, 区别在于化合物 1 为原人参三醇型皂苷, 结构上连接两分子葡萄糖和一分子鼠李糖; 而化合物 14 为原人参二醇型皂苷, 结构上连接三分子葡萄糖, 故可根据丢失鼠李糖的碎片将二者区分开来。

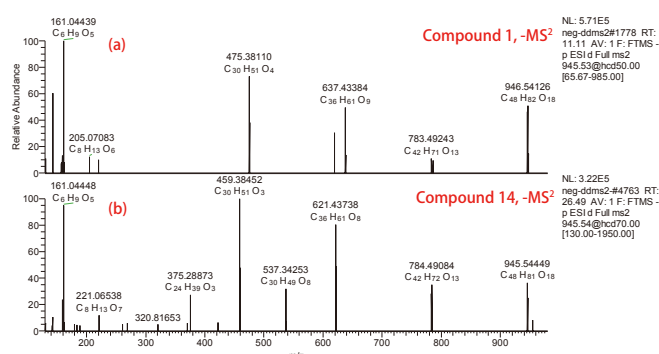


图 3. 化合物 1 和 14 的二级质谱图

Q Exactive 系列四极杆-静电场轨道阱串联高分辨质谱在获得超高质量精度的一级质谱图的同时, 亦能同时获得超高质量的二级谱图, 由二级碎片的精确质量数可以准确拟合其碎片的化学式。Mass Frontier™ 软件含有小分子碎裂机理的 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库, 该谱图库几乎涵盖了所有已发表的文献。利用 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库, 加上软件所带的预测碎裂工具以及自动谱图注解功能, 可对不同碎片离子及其所对应的结构进行自动归属, 从而帮助进行化合物结构解析。其自动归属化合物碎片的拷屏见图 4。

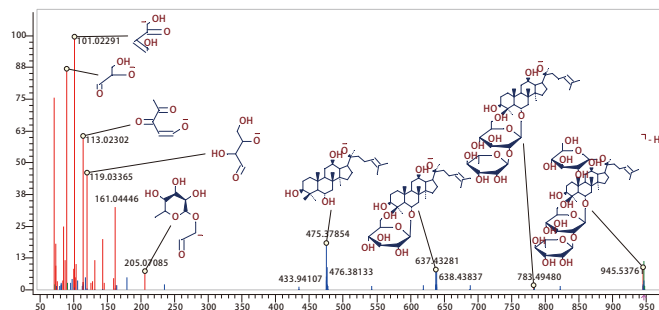


图 4 运用 Mass Frontier 软件对化合物 1 的二级碎片进行归属图

利用 Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱对样品中各个色谱峰进行了精确分子量测定, 并在 1 ppm 的质量偏差范围内拟合出唯一可能的元素组成, 再结合二级质

谱的碎片裂解规律和数据库的筛查, 在人参提取物样品中共鉴定出 24 个主要皂苷成分, 其结构和主要的碎片离子分别如图 5 和表 1 所示。

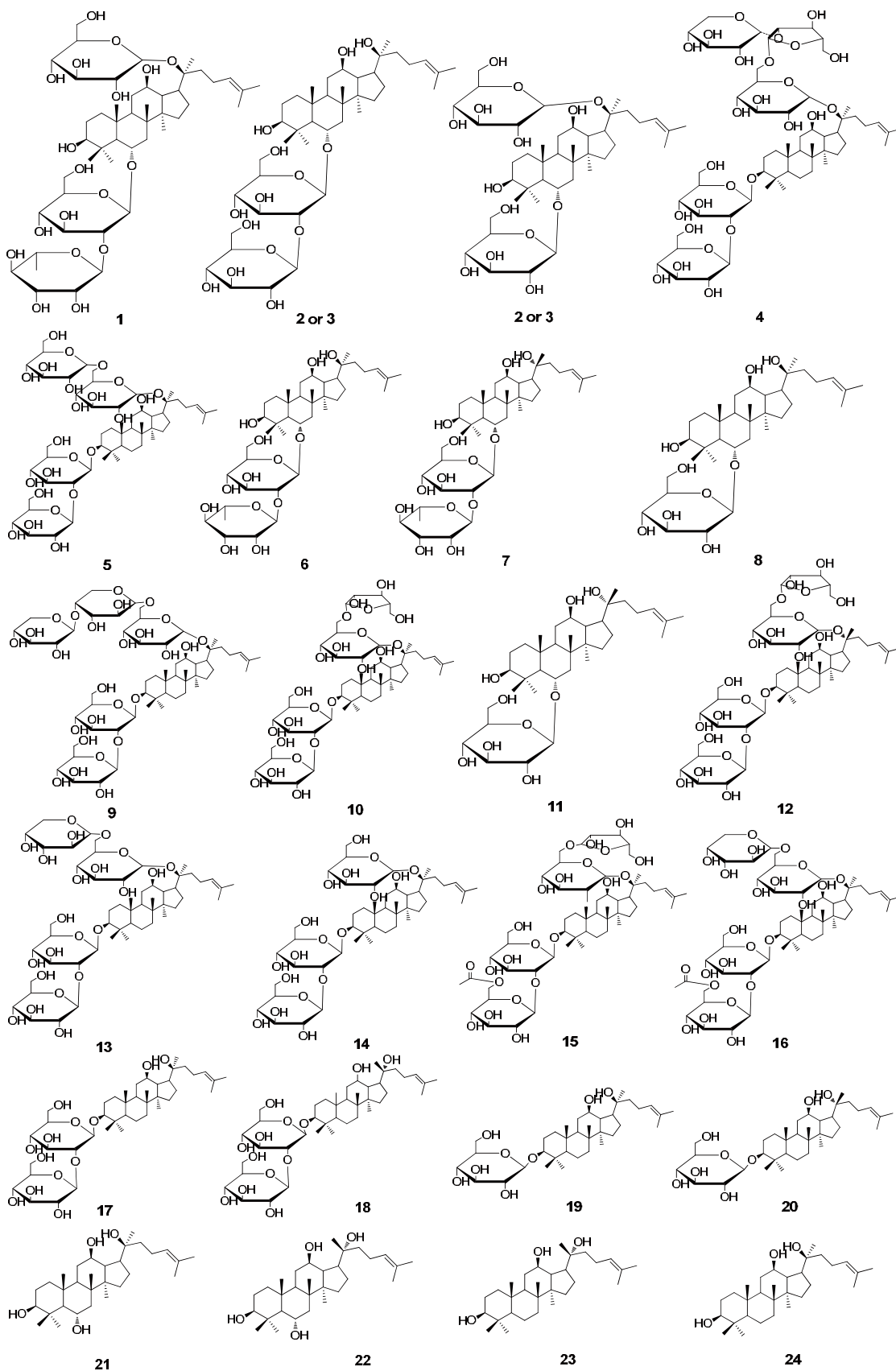


图 5. 化合物 1 ~ 24 结构图

表 1. 人参提取物样品中鉴定出的 24 个化合物

Peak No.	t _R (min)	[M - H] ⁻ m/z	Formula	Delta (ppm)	Proposed Constituent
1	11.07	945.5423	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	-0.57	人参皂苷 Re
2	19.20	799.4847	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	-0.29	人参皂苷 Rg1
3	19.76	799.4853	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	0.46	人参皂苷 Rf
4	21.59	1209.6265	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	-0.71	人参皂苷 Ra2
5	22.03	1107.5957	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	0.03	人参皂苷 Rb1
6	22.05	783.4894	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-0.79	20 (S)- 人参皂苷 Rg2
7	22.53	783.4893	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-0.91	20 (R)- 人参皂苷 Rg2
8	22.53	637.4321	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	-0.01	20 (S)- 人参皂苷 Rh1
9	23.03	1209.6270	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	-0.29	人参皂苷 Ra1
10	23.12	1077.5847	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	-0.37	人参皂苷 20 (S)-Rc
11	23.39	637.4321	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	-0.01	20 (R)- 人参皂苷 Rh1
12	24.13	1077.5848	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	-0.28	人参皂苷 20 (R)-Rc
13	24.47	1077.5852	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	0.10	人参皂苷 Rb2
14	26.51	945.5424	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	-0.46	人参皂苷 Rd
15	26.62	1119.5957	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	0.03	人参皂苷 Rs2
16	27.60	1119.5967	C ₅₅ H ₉₂ O ₂₃	0.93	人参皂苷 Rs1
17	37.89	783.4893	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-0.91	20 (S)- 人参皂苷 Rg3
18	38.60	783.4897	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-0.40	20 (R)- 人参皂苷 Rg3
19	47.02	621.4370	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	-0.31	20 (S)- 人参皂苷 Rh2
20	48.04	621.4367	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	-0.79	20 (R)- 人参皂苷 Rh2
21	48.61	475.3793	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	0.04	20 (S)- 原人参三醇
22	49.21	475.3794	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	0.25	20 (R)- 原人参三醇
23	59.04	459.3845	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	0.29	20 (S)- 原人参二醇
24	59.68	459.3848	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	0.94	20 (R)- 原人参二醇

3 结论

3.1 Thermo Scientific Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱将高性能四极杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 (HR/AM) Orbitrap 检测技术相结合, 提供优异性能和出色多功能性。其具有快速扫描和多重检测能力, 是一种可提供快速色谱分离技术的优秀检测器。静电场轨道阱高分辨质谱能够实现只进样一针, 即可同时获得正负离子模式下的色谱图, 且能保证良好的质量精度, 质量偏差小于 1 ppm, 能准确的预测元素组成, 其 MS/MS 数据的超凡品质提供更加可靠的化合物定性和定量检测。

3.2 Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱在二级质谱图中依然能保证良好的质量精度, 运用二级质谱获得的碎片信息, 结合结构解析软件 Mass Frontier™ 帮助解析化合物结构, 提高工作效率, 可得到更可靠的结果。

3.3 通过 Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱, 在人参提取物中共鉴定出 24 个皂苷成分。

葛根中含硫成分的快速发现鉴定

周哲 赛默飞世尔科技（中国）有限公司

杨敏 中国科学院上海药物研究所

概述

目标：示范如何使用精细同位素模式筛选法和超高分辨质谱数据来准确筛查传统中草药中的硫化物

方法：使用Thermo Scientific™ LTQ Orbitrap 高分辨质谱仪进行数据采集。MS 数据处理使用 Thermo Scientific™ Compound Discoverer™ 软件进行。

结论：本文成功地利用Orbitrap质谱超高分辨率分离精细同位素模式的筛查方法，根据 ^{34}S 与 $^{13}\text{C}_2+^{18}\text{O}$ 同位素之间低至 0.00981 amu 的精细质量之差实现分析了葛根类物质中的十二种主要含硫衍生物。对其中十一种衍生物根据其 HRMSⁿ 数据进行了初步鉴定，同时对影响筛查结果准确性的因素进行了评估。

实验方法

样品制备

将粉末样品（40目，0.2g野葛（YG, *Pueraria lobata* (Wild) 根部）Ohwi），0.1g葛根苓连片剂和愈风宁心片剂，0.8g粉葛（FG, *Pueraria thomsonii* Benth 根部）分别用30 mL 30%乙醇超声提取30分钟，过滤。

液相色谱

色谱分离使用 Thermo Scientific™ UltiMate 3000 二元 RSLC 系统进行，该系统配有二元溶剂泵、自动进样器、和二极阵列检测器（DAD）。分离使用的色谱柱是 Zorbax Eclipse Plus C18柱（100×2.1 mm, 1.8 μm），柱温设定为 35 °C，流速为 0.5 mL/min。流动相分别为含 0.1% 甲酸的水相（A）和含 0.1% 甲酸的乙腈。

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	91	9
9.5	91	9
25.5	83.5	16.5
33	77	23
44	46	54
45	0	100
50	0	100
50.1	91	9
60	91	9

质谱分析

样品分析使用 LTQ Orbitrap 质谱仪（图 1），借助 HESI-II 喷头在负离子模式下进行。离子源参数：加热温度，300 °C；毛细管温度，350 °C；喷雾电压，3.2 kV；鞘气流速，45 单位；辅气流速，5 单位。分辨率设置为：全扫模式下 100,000 FWHM，数据依赖 MSⁿ（DDA）模式下 30,000 FWHM。扫描范围为 150 至 1400 amu，DDA 采集的隔离窗口宽度为 2 amu，碰撞能 40%。



图 1. LTQ Orbitrap 质谱仪

数据分析

数据分析和含硫衍生物相关谱峰的检测使用 Thermo Scientific™ Compound Discoverer™ 软件进行, 选用芍药苷亚硫酸酯 (paeoniflorin sulfonate), 分子式为 $C_{25}H_{28}O_{13}S$ (图 2), 作为参考标品。整个工作流程中设置了多个节点, 以便分别优化会影响筛查结果精确性的各个因子。

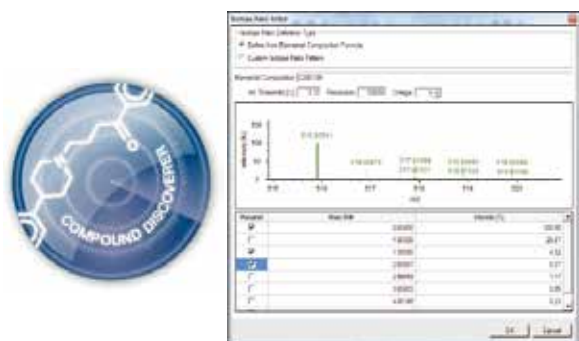


图 2. Compound Discoverer 软件的同位素模式筛查界面

分析结果

在高分辨率下分离不同同位素分布模式

由于含氯、含溴化合物的同位素分布模式极具特异性, 同位素分布模式筛查方法经常用于这些化合物的分析。而含硫化合物的 ^{34}S 离子会受到 $^{13}C_2+^{18}O$ 同位素离子的影响, 故很少会被作为同位素分布模式筛查方法的分析对象, 因为分辨率通常达不到分析要求, 会产生大量假阳性结果。幸而随着质谱技术的发展, 质谱仪的分辨能力也在不断提高, 现在已经能够分离分子量非常接近的等分子量化合物, 也能够解析小分子化合物的精细同位素分布模式。以 $C_{25}H_{24}O_{15}S$ 为例, 图 3 展示了随着分辨率从 30K 提高到 100K 时 A_2 是如何从单一的宽峰变成了清晰可见的两个相邻谱峰。分辨率的提高绝对增强了该算法的谱峰识别能力, 使得直接提取 ^{34}S 信息成为可能。

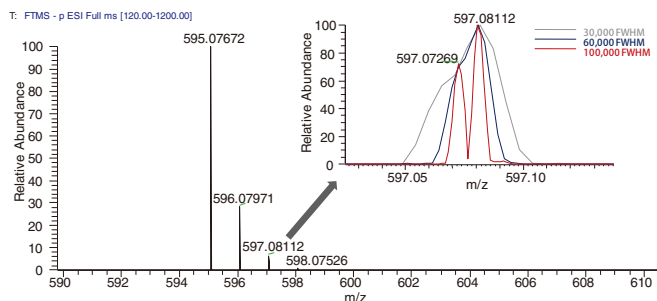


图3. 不同分辨率下 A_2 的变化情况

含硫衍生物搜索

传统的化合物鉴定工作流程中并没有非常有效的含硫衍生物筛查方法。通常需要费时费力地人工从复杂的质谱信号中将它们挑拣出来, 有时结果可能还非常令人困惑: 即便质量精度已经高达 1 ppm, 还是会有无数可能的分子式。不过, 现在在 Orbitrap 技术能够提供的超高分辨率质谱数据基础上, 精细同位素分布模式 (FIP) 筛查法已经可以用于筛选含硫化合物对应的谱峰并规定偏差范围 (若看重精确度, 可将质量偏差范围设为 5 ppm, 若希望得到最全面的结果, 可将峰高偏差范围设为 60%)。经 FIP 筛选过的数据中可以得到相当可靠的含硫化合物谱峰。甚至可以通过精细的同位素峰比值计算出含硫原子的个数, 排除掉绝大部分假阳性结果, 得到更准确的分析结果。以 595.07672 m/z 为例, ^{34}S 的峰高比例为 4.6% 而 $^{13}C_2+^{18}O$ 为 6.2%, 因此唯一可能的元素组成应为: $C_{25}H_{23}O_{15}S$ 。

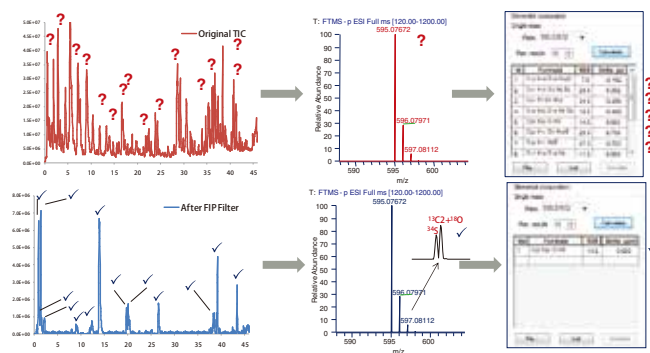


图 4. 传统工作流程与 FIP 筛查工作流程

含硫衍生物的结构表征

根据 HRMSⁿ 谱图, $C_{25}H_{23}O_{15}S$ 应该具有大豆苷的母核结构 (图 4), m/z 253.0505 的谱峰显示应该有 O-糖苷结构存在。此外, 它还含有琥珀酰基, 应该很容易脱羧产生 CO_2 。 m/z 551.0867 谱峰产生了两个不同的子离子, m/z 253.0505 ($C_{15}H_9O_4$) 和 297.0283 ($C_9H_{13}O_9S$)。前者为醌体而后者应为糖苷基团。磺酰基显然是与糖苷相连。因此 $C_{25}H_{23}O_{15}S$ 应该是 O-磺酰基-琥珀酰基-大豆苷。

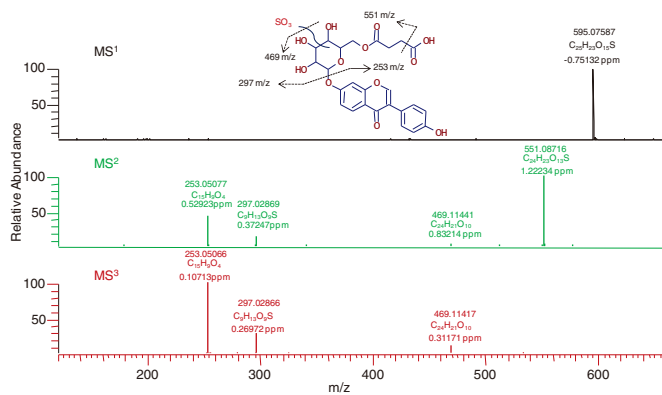


图5. $C_{25}H_{23}O_{15}S$ 的HRMSⁿ 谱图

本研究进一步根据 HRMSⁿ 数据对其中十一种含硫衍生物进行了初步鉴定 (图 5), 通过检测这十一种衍生物的成分, 我们可以对葛根和粉葛产品中的硫化物进行了评估。

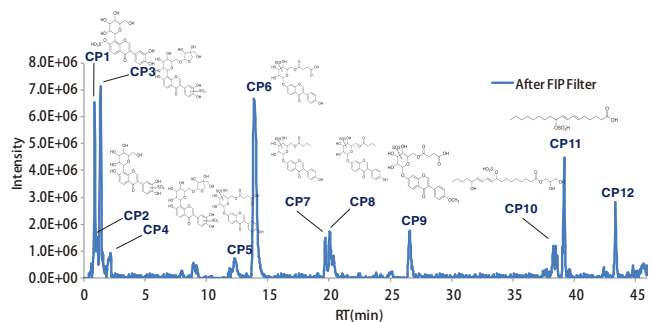


图 6. 检测出的含硫衍生物的可能结构

影响因素

无论是进行 MS 数据采集, 还是初步筛查中, 分辨能力都对最终结果的质量准确度至关重要。我们在两种分析中都评估了分辨率和质量准确度的重要性。

图 6A 显示了在通常普遍使用的 30K 分辨率下的分析情况, 可见大量的假阳性结果。将分辨率提高到 60K 虽然显著减少了假阳性结果的数量, 但是仍无法精确检测到含硫化合物对应的谱峰 (图 6B)。而在分辨率达到 100K 后, $A_2\ ^{34}S$ 与 $A_2\ ^{13}C_2 + ^{18}O$ 的谱峰终于实现了彻底分离, 得到了完美的筛查结果 (图 6C), 这就意味着 ^{34}S FIP 筛查在分辨率达不到 60K 以上时只能形同摆设。

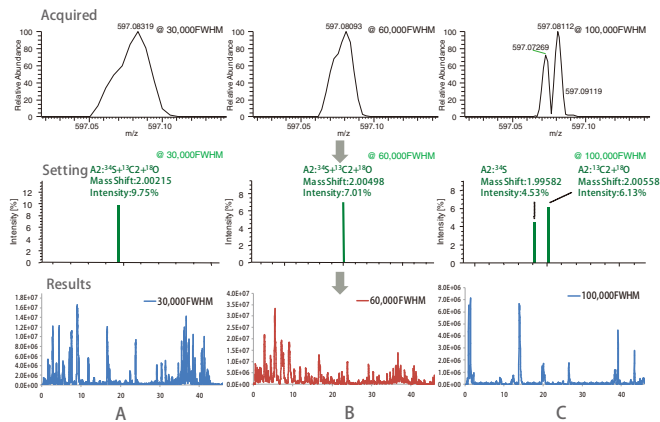


图 7. 不同质量分辨率下 FIP 筛查结果比较

随着质量偏差窗口设置从 15 缩窄至 5 ppm, 假阳性结果也显著减少。这意味着准确的筛查结果需要在质量偏差小于 5 ppm 时才能得到。不然真正的含硫化合物谱峰就会淹没在浩如烟海的干扰峰之中。

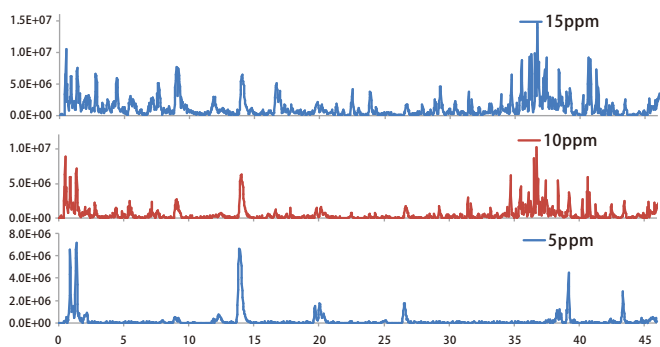


图 8. 不同质量偏差下 FIP 筛查结果比较

结论

随着质谱分析技术的不断发展, 质谱仪分析能力不断提高, 质量分辨能力也在一路突飞猛进。如今, 质谱仪已经能够进行精细地同位素分布模式测定。本文建立了一个能够区分 ^{34}S 、 $^{13}C_2 + ^{18}O$ 的同位素分布模式的创新型分析方法, 并成功地应用于葛根硫化物的鉴定。比较分析的结果显示, 超高分辨率、高质量准确度、和新颖的 FIP 算法是本方法的三大关键因素。

此外, 本创新型 FIP 方法不仅仅适用于含硫化合物的鉴定, 同样也适用于其他元素, 如 ^{15}N 及 ^{18}O 的分析并适用于多种应用场景, 如:

- 从传统中草药中发现、鉴定出含有特定元素的天然产物
- 在复杂生物基质中筛查药物代谢产物
- 在复杂的从头分析中进行确定性地元素分析

葛根中丙二酰基葡萄糖苷不稳定结合物鉴定

杨敏¹, 周哲²

¹ 中国科学院上海药物研究所, 上海中药现代化研究中心

² 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

Ion mapping; 丙二酸酯; 静电场轨道阱; 高分辨质谱; 葛根

1. 引言

丙二酸酯是一种在人参和大豆中常见的酰化物, 在丙二酰辅酶 A 的催化作用下, 由丙二酸衍生而成。除了生理学作用外, 丙二酰基类人参皂苷和异黄酮糖苷还常被用来评估人参和大豆不同种类和形态的组分。

葛根作为一种传统中药, 有解肌退热, 透疹, 生津止渴, 升阳止泻之功。被广泛用于表证发热, 项背强痛, 麻疹不透, 热病口渴, 阴虚消渴, 热泻热痢, 脾虚泄泻。作为一种富含异黄酮的豆科中药, 除了 O-糖苷, 其主要成分还有丰富的 C-糖苷。而其丙二酰结合物往往含量低, 且在 ESI 负离子模式下不稳定, 故目前仅有关于丙二酰大豆苷及染料木素的文献报道。

为了更好的分析和表征葛根中的丙二酰基结合物, 本研究采用了一种基于线性离子阱-静电场轨道阱高分辨串联质谱的扫描方式: Ion mapping 中性丢失扫描, 结合带有动态排除的母离子列表数据依赖多级质谱扫描, 可以有效的检测到葛根中微量的丙二酸酯类衍生物。

2. 实验条件

2.1 液相色谱条件:

仪器: Thermo Scientific™ UltiMate 3000 超高效液相色谱仪
色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 2.1mm, 1.8 μm)
流动相: A 为水相 0.1% 甲酸水, B 为有机相乙腈
梯度条件:

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	91	9
9.5	91	9
25.5	83.5	16.5
33	77	23
44	46	54
45	0	100
55	0	100

流速 0.5 mL/min, 进样量: 10 μL, 柱温为 35°C

2.2 质谱条件

仪器: Thermo Scientific™ LTQ Orbitrap 线性离子阱-静电场轨道阱组合式多级高分辨质谱。

1) 母离子列表数据依赖触发多级: LC-MS

质谱扫描参数: 全扫描范围 110-1200 *m/z*, 分辨率 60,000 FWHM; 正离子 CID 碰撞能量 25% (MS2)、35% (MS3、MS4), 负离子 CID 碰撞能量 40%; 动态排除参数: repeat count 2, repeat duration 10 s, exclusion list size 50, exclusion duration 10 s。

HESI 离子源参数: Spray Voltage +3.5 KV、-3.2 KV; Sheath Gas Pressure: 45 arb; Aux Gas Pressure: 5 arb; Capillary Temp: 320 °C; Heater Temp: 350 °C。

2) Ion mapping: Infusion-MS

扫描范围 400-700 *m/z*; 直接进样 3 μL/min; 母离子步进值: 1.0 Da; 隔离宽度: 2.0 Da, 正离子模式, CID 碰撞能量 25%, 中性丢失 86、218 和 248 Da (图 1)

HESI 离子源参数: Spray Voltage +3.5 KV; Sheath Gas Pressure: 6 arb; Aux Gas Pressure: 1 arb; Capillary Temp: 320°C; Heater Temp: 60°C。

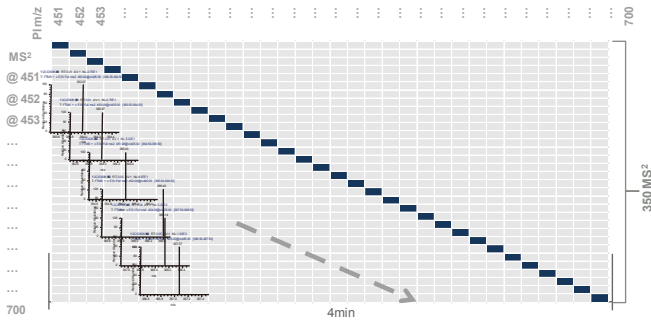


图 1. Ion mapping 扫描原理

2.3 样品制备

取样品粉末（40 目，0.8 g），加 10 mL 甲醇超声提取 20 分钟，离心后取上清液蒸发至干，取 1 mL 甲醇复溶后过滤进样。

3. 结果

3.1 Ion mapping 扫描具有特定中性丢失母离子

选择 86、218（86+132）、248（86+162）作为目标中性丢失，获取丙二酰基，木糖/芹菜糖基，葡萄糖基相关信息。由图 2 三维图中可知不同的母离子及相应子离子和响应强度信息，通过输入中性丢失值，可以获得对应母离子质谱图，因为葛根素 m/z 为 417，且大于 700 未见明显母离子，故扫描范围从 450 至 700 m/z 。由 Ion mapping 扫描可知能够产生上述三个中性丢失的离子为： m/z 503、513、517、519、525、531、533、541、543、547、579、615 和 665。

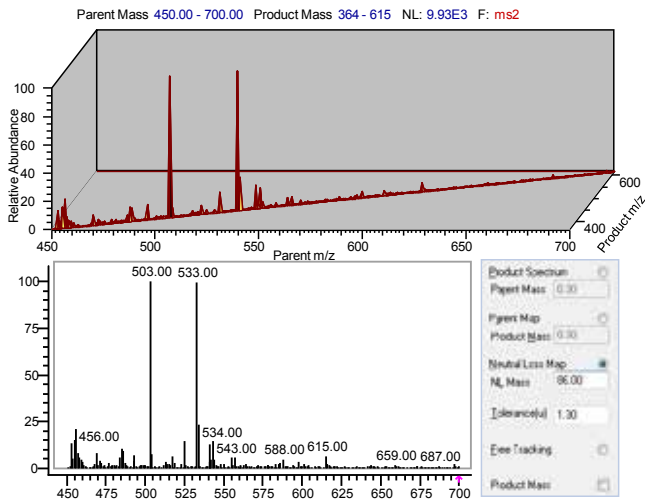


图 2. Ion mapping 获得特定中性丢失谱图

3.2 带有动态排除（DE）的母离子列表（PL）数据依赖（DDA）多级质谱扫描

数据依赖可在一针进样内从全扫描数据中选择符合要求的离子进行多级碎裂，通过导入由 Ion mapping 获得的特定母离子，结合动态排除，可以有效的提高特征谱图采集率。

图 3 为两种葛根样品中性丢失 86 提取离子流图，由红框部分可见，采用母离子列表（PL）和动态排除（DE）可采集到传统方法可能会丢失的组分。传统方法仅能鉴定 20 个相关组分，而采用本研究方法可以采集到 66 个相关组分的多级质谱信息（表 1），有效谱图采集率比传统方法显著提升。

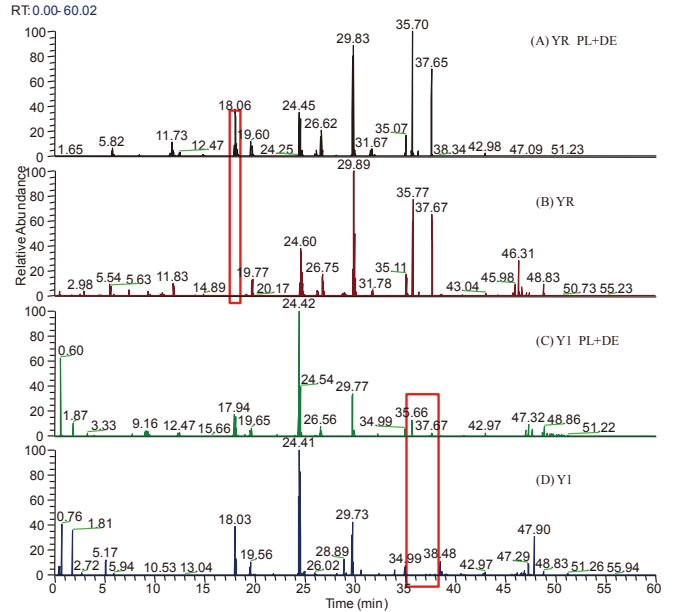


图 3. 采用 (B, D) 与不采用 (A, C) PL+DE 扫描获得的中性丢失提取离子流图对比

在上述方式采集到的数据中，用高分辨母离子数据 m/z 503.1190、517.1348、519.1138、531.1122、533.1296、547.1448 和 665.1697 进行提取离子流分析（图 4），共获得 66 个组分，大部分丙二酸酯由葛根中的糖苷衍生而成。

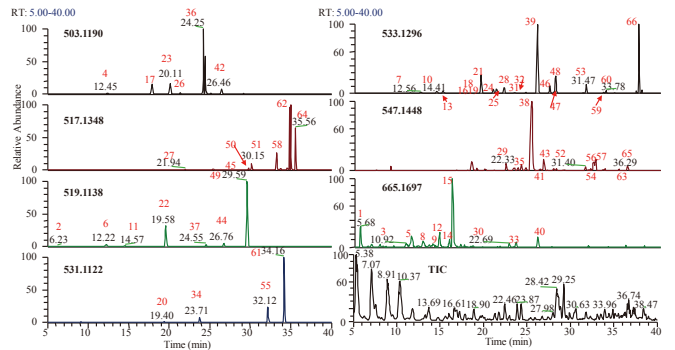


图 4. m/z 503.1190、517.1348、519.1138、531.1122、533.1296、547.1448 及 665.1697 提取离子流图和总离子流图

表 1. 传统方法与本方法结果比较

No.	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	YG1		YR		No.	<i>m/z</i>	<i>t_R</i>	YG1		YR	
			N	PL+DE	N	PL+DE				N	PL+DE	N	PL+DE
4*	503.1190	12.45		✓		✓	28*	533.1296	22.10		✓		✓
17*		17.90	✓	✓		✓	31		22.91		✓		
23*		20.11	✓	✓	✓	✓	32		23.26		✓		✓
26*		21.37		✓		✓	39*		25.94	✓	✓	✓	✓
36*		24.25	✓	✓	✓	✓	46*		27.36		✓		✓
42*		26.45		✓	✓	✓	47*		27.78		✓		✓
27	517.1348	21.94		✓		✓	48*		28.03		✓		✓
45		27.21		✓		✓	53*		31.47		✓		✓
50*		29.78		✓		✓	59*		33.52				✓
51		30.15				✓	60*		33.78				✓
58*		33.27		✓	✓	✓	66*		37.55	✓	✓	✓	✓
62*		34.97	✓	✓	✓	✓	29	547.1448	22.33		✓		✓
64*		35.56		✓	✓	✓	35		24.11		✓		✓
2*	519.1138	6.23		✓		✓	38		25.29	✓	✓	✓	✓
6*		12.22		✓		✓	41		26.25		✓	✓	✓
11*		14.57				✓	43		26.61		✓		
22*		19.58		✓	✓	✓	52*		31.40		✓		✓
37*		24.55		✓		✓	54*		32.04		✓		✓
44*		26.76		✓		✓	56		32.39		✓		✓
49*		29.59	✓	✓	✓	✓	57		32.59		✓		✓
20	531.1122	19.40		✓			63*		35.28		✓		✓
34		23.71		✓		✓	65*		36.29		✓	✓	✓
55		32.12		✓		✓	1*	665.1697	5.68		✓		✓
61*		34.16		✓		✓	3*		10.92		✓		
7	533.1296	12.56		✓		✓	5*		11.51		✓	✓	✓
10		14.41	✓	✓		✓	8		12.86		✓		
13*		15.12		✓		✓	9*		13.96		✓		
16		17.59		✓		✓	12*		14.74		✓	✓	✓
18		17.98				✓	14*		15.86		✓		✓
19		18.37		✓		✓	15*		16.20		✓		✓
21*		19.49	✓	✓	✓	✓	30*		22.69		✓		✓
24		20.83	✓	✓		✓	33*		23.49		✓		✓
25		21.22	✓	✓		✓	40*		25.96		✓		✓

YG1: Gegen sample 1; YR: Reference drug of Gegen; N:

Normal method; PL+DE: Combined use of PL and DE;

✓ : MS/MS spectra were triggered;

* Malonyl conjugates.

3.3 结构解析

葛根中大部分异黄酮由 7,4'-dihydroxyisoflavone (大豆苷)、5,7,4'-trihydroxyisoflavone (染料木素) 及 7,3',4'-trihydroxyisoflavone 衍生而成, 在正离子模式下, O-糖苷会持续丢失 CO, 7,3',4'-trihydroxyisoflavone 的失水峰比 5,7,4'-trihydroxyisoflavone 高。另外逆狄尔斯-阿尔德耳反应使 7,3',4'-trihydroxyisoflavone 产生 m/z 137.0233 的主要碎片, 使 5,7,4'-trihydroxyisoflavone 产生 m/z 153.0182 的主要碎片, 据此可区分不同的环 A 和环 B 取代。而 C-糖苷会在葡萄糖基丢失双份 H_2O 和 CH_2O , 低丰度的 m/z 297.0757, 313.0707 和 327.0863 分别为 puerarin、3'-hydroxypuerarin 和 3'-methoxypuerarin 的母核结构。

以 m/z 517.1348 为例, 说明结构解析过程。具有相同母离子 m/z 517.1348 的化合物有 7 个, 根据上述裂解特点, 可以推测出化合物 58、62 为丙二酰基 O-糖苷, 50 为丙二酰基 C-糖苷, 但其他化合物显示与葛根素相似但与化合物 50 有所区别的质谱图, 表明该类化合物有葛根素母核但不含有丙二酰基官能团, 结合中性丢失, 推测酰基为 3-carboxypropanoyl。因此化合物 27 为 O-(3-carboxypropanoyl)-puerarin、45 和 51 为 O-(3-carboxypropanoyl)-daidzin。化合物 64 二级质谱图中的碎片 m/z 269.0815 和化合物 58 及 62 相同, 但该碎片离子的裂解规律与 formononetin 不同 (图 5), 化合物 64 的碎片离子 m/z 269.0815 会丢失一系列 CO, 表明 O 与 C 直接相连, 碎片离子 m/z 151.0392 和 163.0390 表明羰基与异黄酮环 A 相连, 所以化合物 64 为 6'-O-malonyl-C-methyl-daidzin。

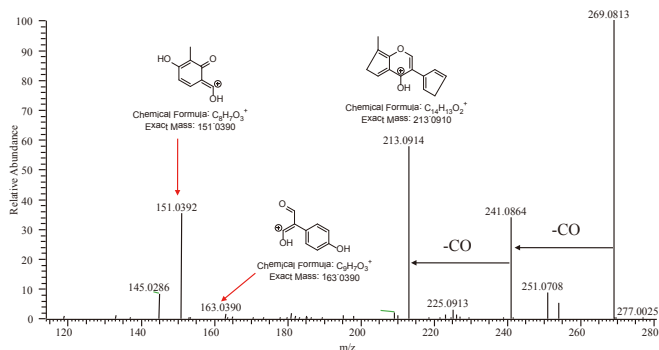


图 5. 化合物 64 的 MS3 谱图

通过相同方式, 对另外的母离子 m/z 503.1190、519.1138、531.1122、533.1296、547.1448 和 665.1697 进行了结构推测, 共鉴定 66 个化合物 (图 6), 其中 43 个为丙二酰基异黄酮糖苷。

4. 小结

丙二酰基异黄酮糖苷是普遍存在于豆科中药中的成分, 在代谢和生物合成中起到重要作用。其在葛根中的含量很低, 使用常规检测方法往往被高含量的组分所干扰, 难以获得满意的检测结果。为了更好的筛查和鉴定葛根中微量的丙二酰基异黄酮糖苷, 本研究开发了一种独特的采集方式: Ion mapping 扫描获得具有特定中性丢失的母离子, 继而采用母离子列表数据依赖扫描采集相关化合物多级质谱数据。通过本方法对两份样品的扫描, 共检测到 66 个化合物, 其中 43 个为丙二酰基异黄酮糖苷, 而传统方法仅能鉴定 20 个相关化合物, 表明本方法对更深入的认识葛根成分十分有益。本研究不仅提供了一种用以高专属性筛查丙二酰基结合物的方法, 也为中药中含有其他特征官能团的低含量组分研究提供了一条有价值的思路。

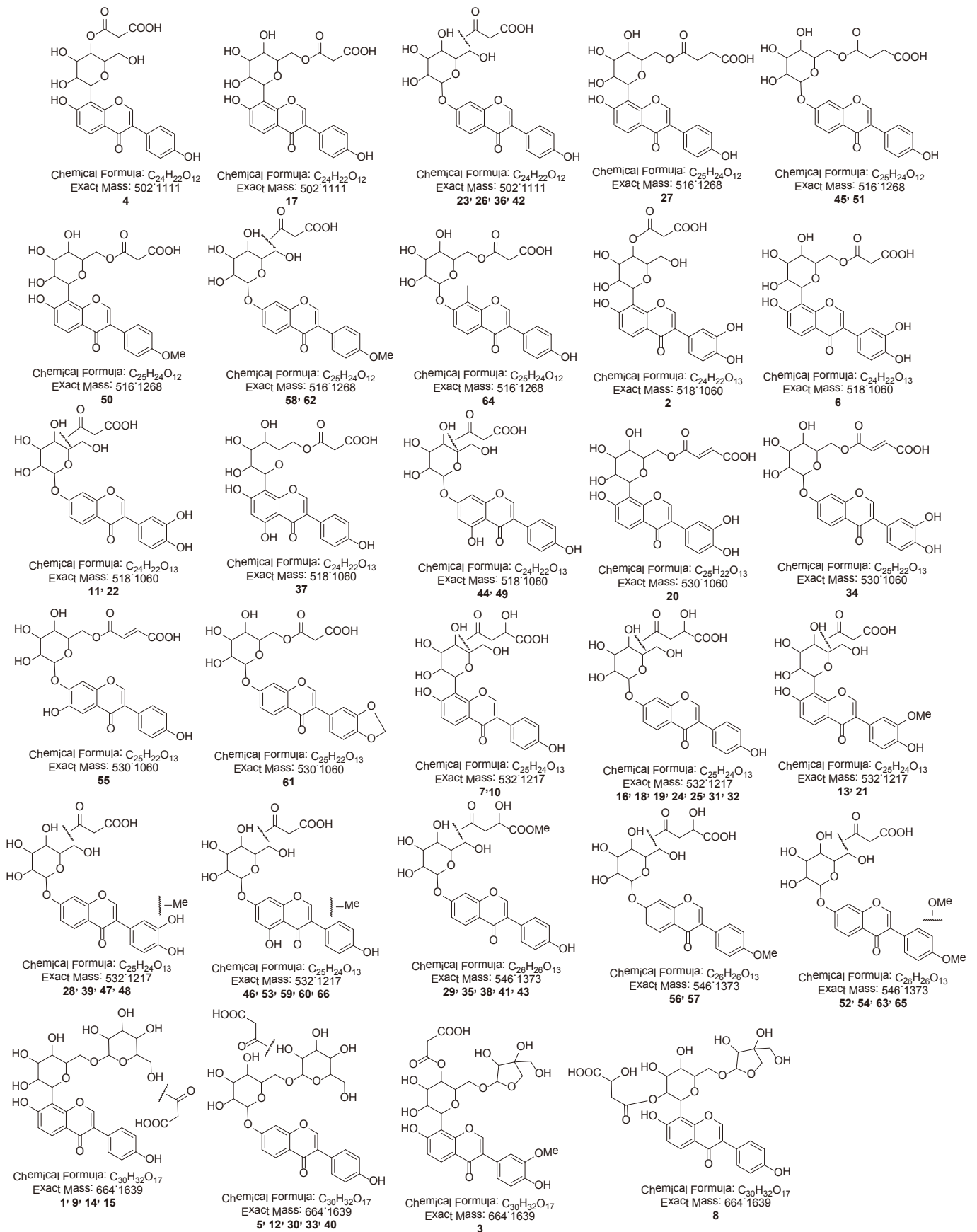


图 6. 推测的化合物结构

中药复方防己黄芪汤口服液中活性成分鉴定

侯朋艺 明红

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

中药复方; 防己黄芪汤; 成分鉴定; Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱

摘要

建立了同时鉴定复方中药口服液防己黄芪汤中多种活性化合物的反相超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱的分析方法。通过 Q Exactive 系列高分辨质谱所提供的超高质量精度的一级和二级质谱图, 并结合运用数据处理软件 Mass Frontier™ 和在线数据库 mzCloud 对数据进行辅助解析, 从口服液中共鉴定 48 种活性成分。

引言

国内外对中药复方的研究多集中在药理、药效方面, 包括生物整体、离体器官、受体或作用靶点等层次的研究。其中, 药物的作用靶点是当今药学研究的热点。而对于复方化学成分的研究较少。但是复方化学成分的研究更能本质地阐明复方药理作用的物质基础, 解释中医方剂配伍的科学内涵, 探索复方制剂过程中化学成分的变化规律, 从而优化处方, 制定科学的制剂工艺, 提高制剂质量。因此, 中药复方化学成分研究在中药复方研究中占有非常重要的地位。

本文采用超高效液相 - 四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱联用技术对中药复方口服液防己黄芪汤的化学成分进行了全面的分析。本实验在优化的液质条件下, 采用一级全扫描 + 数据依赖自动触发二级质谱扫描 (Full scan+ddms²) 模式, 根据仪器所采集的精确分子量, 在小于 ± 1 ppm 的质量偏差范围内拟合出唯一可能的元素组成, 再结合超高质量精度的二级质谱碎片、结构解析辅助软件 Mass Frontier™ 和网络在线数据库 mzCloud 对各个化合物进行了碎片结构归属, 确保了实验结果的准确性。运用此方法, 从该口服液样品中共鉴定了 48 个活性成分。

3. 实验方法

3.1 试剂与样品制备

甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher chemical); 精密吸取口服液样品 500 μ L, 用等体积的甲醇溶液稀释, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 离心后, 直接进样分析。

3.2 液相色谱条件

仪器: Thermo Scientific™ Dionex UltiMate 3000 液相色谱仪
色谱柱: Thermo Scientific™ Synchronis C18 (150 \times 2.1 mm, 3 μ m)
流动相: A 为水相; B 为有机相甲醇

时间 (min)	A	B
0	95	5
2	95	5
20	70	30
50	5	95
55	5	95
55.1	95	5
60	95	5

流速: 0.3 mL/min, 进样量: 5 μ L, 柱温为 35°C

Thermo
SCIENTIFIC

3.3 质谱条件

仪器: Thermo Scientific™Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱仪

质谱参数: HESI Spray voltage: +3.5/-3.2 kV; Sheath Gas Pressure: 35 arb; Aux Gas Pressure: 10 arb; Capillary Temp: 320 °C; Heater Temp: 350 °C; Scan mode: Full MS (Resolution 70,000) and dd-MS² (Resolution 17,500, NCE 20 ~ 60); Scan range: m/z 100 ~ 1500.

4. 实验结果

图 1 为样品在正负切换扫描模式下的总离子流色谱图 (TIC)。

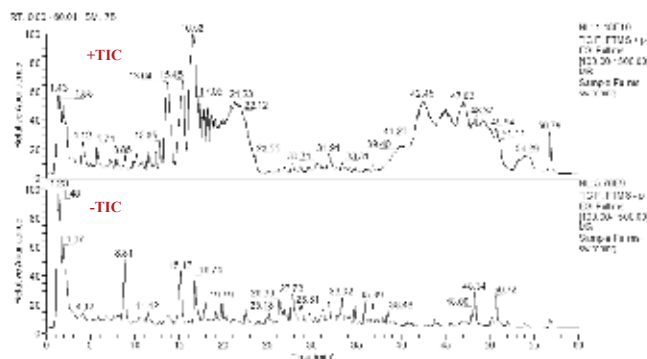


图 1. 正负切换扫描模式下的总离子流色谱图

以化合物 6 为例对结构解析过程进行展示。化合物 6 的一级质谱图如图 2 所示。化合物 6 在 $t_R=4.10$ min 处, 正离子模式下可见 $[M+H]^+$ m/z 166.08632。准分子离子峰 $[M+H]^+$ 实测值与理论值 $[C_9H_{11}O_2N + H]^+$ m/z 166.08626 的偏差为 0.38 ppm。

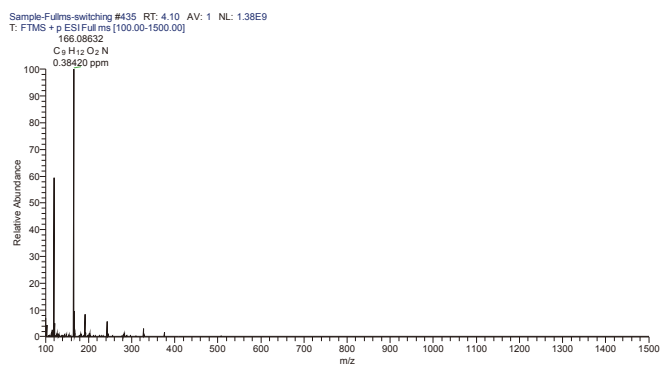


图 2. 化合物 6 正离子模式一级质谱图

Q Exactive 系列高分辨质谱具有超高质量精度的同时, 具有高稳定性, 其每个质谱扫描点所对应的质谱图均为高质量和可信赖的谱图。图 3 为化合物 6 在整个色谱峰出峰过程中每个扫描点的质量精度。由图可知, 化合物 1 每个扫描点的质量精度均小于 1 ppm。

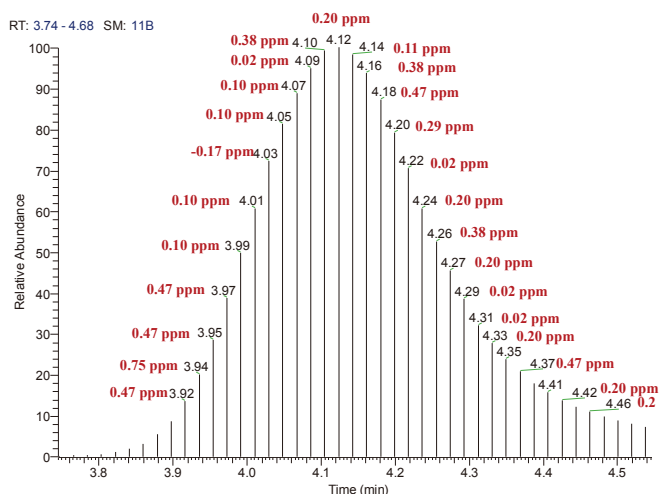


图 3. 化合物 6 每个扫描点的质量精度图

Q Exactive 系列高分辨质谱仪采用外标校正法, 其校正过程简单、快速。该系列仪器只需进样一针, 即可同时获得正负离子两种扫描模式的一级和二级质谱图。一级质谱图具有超高质量精度, 其质量偏差小于 ± 1 ppm, 与此同时, 在所获得的二级质谱图中, 各个碎片亦具有超高质量精度, 根据实测质量数, 可以准确地拟合出各碎片离子的化学式, 为进一步的结构解析工作奠定了坚实的基础。化合物 6 的二级质谱图如图 4 所示。

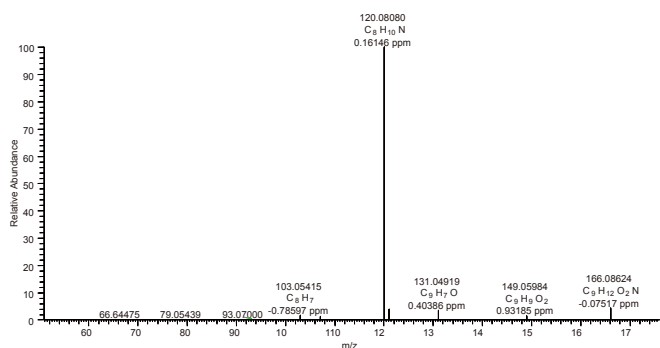


图 4. 化合物 6 的二级质谱图

如图 4 所示, 正离子模式下, 化合物 6 $[M+H]^+$ m/z 166.08632 的二级质谱图可见其主要的碎片离子为丢失 NH_3 所得的 m/z 149.05984, 进一步丢失一分子 H_2O 所得的 m/z 131.04919, 丢失 $HCOOH$ 所得的 m/z 120.08080, 以及进一步丢失 NH_3 的碎片 m/z 103.05415。由二级质谱裂解特征结合文献查阅结果, 推测化合物 6 为 L-苯丙氨酸。

Mass Frontier™ 软件含有小分子碎裂机理的 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库, 该谱图库几乎涵盖了所有已发表的文献。利用 Fragmentation Library™ 碎裂谱图库, 加上软件所带的预测碎裂工具以及自动谱图注解功能, 可对不同碎片离子及其所对应的结构进行自动归属, 从而帮助进行化合物结构解析。其自动归属化合物碎片的拷屏见图 5。

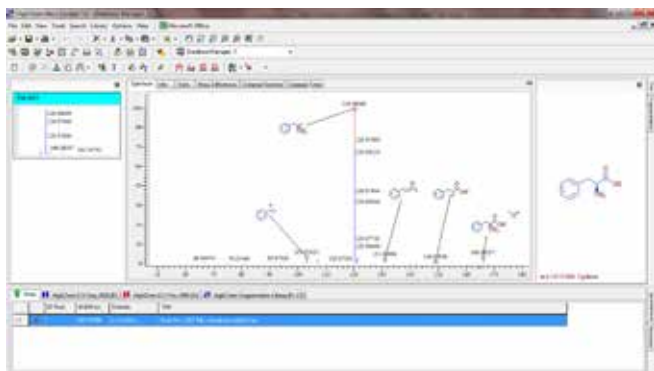


图 5. 运用 MassFrontier 软件对化合物 6 的碎片进行归属结果图

mzCloud 数据库是由赛默飞世尔科技开发, 用于代谢组学、环境、药物和食品安全等方面研究的高分辨率高质量精度质谱数据库。识别未知物是代谢组学、毒理学、药物、食品安全和环境应用研究的瓶颈之一。很多研究者在鉴定化合物结构时需要参考碎片数据库, 数据库的高质量 and 多样性是非常必要的。基于此方面的需求, 赛默飞将静电场轨道阱 (Orbitrap) 质谱的完美谱图质量及化合物方面的资源与 HighChem 的化学结构知识相结合, 创建了帮助研究人员鉴定未知化合物的碎片数据库。研究人员可以利用实测质谱图进行谱库搜索, 从而对未知化合物进行结构鉴定。对化合物 6 的数据库搜索结果拷贝屏见图 6。

利用 Q Exactive 系列质谱仪对样品中各个色谱峰进行了精确分子量测定, 并在 1 ppm 的质量偏差范围内拟合出唯一可能的元素组成, 再结合二级质谱的碎片裂解规律和数据库的筛查, 在复方中药防己黄芪汤样品中共鉴定出 48 个活性成分, 其结构和主要的碎片离子信息如表 1 所示。

3 结论

3.1 Thermo Scientific Q Exactive 系列质谱仪将高性能四极杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 (HR/AM) Orbitrap 检测技术相结合, 提供优异性能和出色多功能性。Q Exactive 系列质谱仪具有快速扫描和多重检测能力, 是一种可提供快速色谱分离技术的优秀检测器。静电场轨道阱高分辨质谱能够实现只进样一针, 即可同时获得正负离子模式下的色谱图, 且能保证良好的质量精度, 质量偏差小于 ± 1 ppm, 能准确的预测元素组成, 其 MS/MS 数据的超凡品质提供更加可靠的化合物定性和定量检测。

3.2 Q Exactive 系列质谱仪在二级质谱图中依然能保证良好的质量精度, 运用二级质谱获得的碎片信息, 结合使用赛默飞世尔科技开发的在线数据库 mzCloud 和结构解析软件 Mass Frontier™ 帮助解析化合物结构, 提高工作效率, 可得到更可靠的结果。

3.3 通过 Q Exactive 系列质谱仪, 在复方中药防己黄芪汤样品中共鉴定出 48 个活性成分。

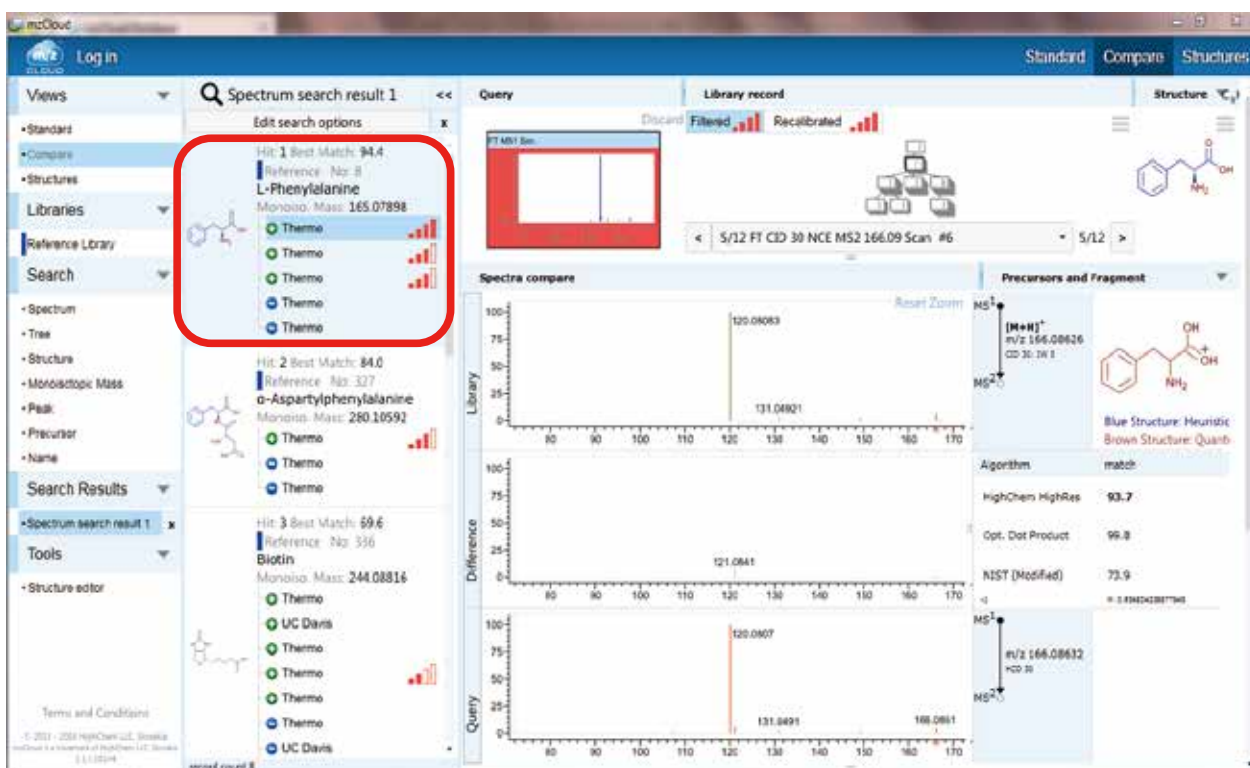


图 6. 化合物 6 的 mzCloud 数据库搜索结果图

表 1. 复方中药防己黄芪汤口服液样品中鉴定出的 48 个化合物

No.	t_R (min)	m/z	Adduct ion	Delta (ppm)	Formula	Identification
1	1.29	179.05624	[M-H] ⁻	0.72	C ₆ H ₁₂ O ₆	葡萄糖
2	1.4	133.01434	[M-H] ⁻	0.7	C ₄ H ₆ O ₅	苹果酸
3	1.5	116.07065	[M+H] ⁺	0.39	C ₅ H ₉ O ₂ N	脯氨酸
4	2.11	182.08122	[M+H] ⁺	0.28	C ₉ H ₁₃ O ₃ N	酪氨酸
5	2.33	132.10197	[M+H] ⁺	0.49	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	亮氨酸
6	4.12	166.08629	[M+H] ⁺	0.21	C ₉ H ₁₂ O ₂ N	L- 苯丙氨酸
7	11.75	342.1698	[M] ⁺	-0.54	C ₂₀ H ₂₄ O ₄ N	木兰花碱
8	12.85	314.17496	[M] ⁺	-0.35	C ₁₉ H ₂₄ O ₃ N	莲心季胺碱
9	13.67	342.16977	[M] ⁺	-0.63	C ₂₀ H ₂₄ O ₄ N	黄柏碱
10	15.19	417.11917	[M-H] ⁻	0.16	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草苷
11	15.39	609.29535	[M+H] ⁺	-0.93	C ₃₇ H ₄₀ O ₆ N ₂	防己诺林碱
12	16.41	356.1853	[M+H] ⁺	-0.94	C ₂₁ H ₂₅ O ₄ N	延胡索乙素
13	16.45	623.31128	[M+H] ⁺	-0.46	C ₃₈ H ₄₂ O ₆ N ₂	汉防己碱
14	16.76	121.02956	[M-H] ⁻	0.47	C ₇ H ₆ O ₂	对羟基苯甲醛
15	20.08	296.16431	[M+H] ⁺	-0.66	C ₁₉ H ₂₁ O ₂ N	荷叶碱
16	21.43	255.06653	[M-H] ⁻	0.97	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	甘草素
17	26.96	807.4178	[M-H] ⁻	0.69	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	甘草皂苷 B2
18	27.17	255.06645	[M-H] ⁻	0.66	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	异甘草素
19	27.81	821.39708	[M-H] ⁻	0.7	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	甘草酸
20	28.6	871.4701	[M-H] ⁻	0.49	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₇	(3β, 5β)-Spirostan-3-yl- β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[β-D-xylopyranosyl-(1->3)]- β-D-glucopyranoside
21	28.71	807.41797	[M-H] ⁻	0.9	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	甘草皂苷 B2 同分异构体
22	28.83	821.39701	[M-H] ⁻	0.61	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	乌拉尔甘草皂苷乙
23	29.52	313.19095	[M+H] ⁺	-0.33	C ₁₉ H ₂₄ O ₂ N ₂	吡嗪酮
24	29.66	871.46995	[M-H] ⁻	0.32	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₇	(3β, 5β)-Spirostan-3-yl- β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[β-D-xylopyranosyl-(1->3)]- β-D-glucopyranoside 同分异构体
25	30.36	871.47001	[M-H] ⁻	0.39	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₇	(3β, 5β)-Spirostan-3-yl- β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[β-D-xylopyranosyl-(1->3)]- β-D-glucopyranoside 同分异构体
26	30.55	805.40093	[M-H] ⁻	-0.83	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	2β-30-Hydroxy-30-oxooleana-11,13(18)-dien-3-yl-2-O- β-D-glucopyranuronosyl- α-D-glucopyranosiduronic acid
27	30.9	805.40103	[M-H] ⁻	-0.7	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	2β-30-Hydroxy-30-oxooleana-11,13(18)-dien-3-yl-2-O- β-D-glucopyranuronosyl- α-D-glucopyranosiduronic acid 同分异构体
28	31.04	807.41801	[M-H] ⁻	0.95	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	甘草皂苷 B2 同分异构体
29	31.21	367.1188	[M-H] ⁻	0.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	甘草香豆素
30	32.62	805.40231	[M-H] ⁻	0.89	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	3β-30-Hydroxy-30-oxooleana-11,13(18)-dien-3-yl-2-O- β-D-glucopyranuronosyl- α-D-glucopyranosiduronic acid 同分异构体
31	33	805.40219	[M-H] ⁻	0.74	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	3β-30-Hydroxy-30-oxooleana-11,13(18)-dien-3-yl-2-O- β-D-glucopyranuronosyl- α-D-glucopyranosiduronic acid 同分异构体
32	33.06	353.10324	[M-H] ⁻	0.51	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	甘草异黄酮甲
33	33.34	337.14471	[M-H] ⁻	0.53	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	甘草查尔酮 A
34	34.02	365.10312	[M-H] ⁻	0.16	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	新甘草酚
35	34.74	323.12897	[M-H] ⁻	0.27	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	光甘草定
36	34.79	335.09265	[M-H] ⁻	0.46	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	光果甘草酮
37	35.29	323.12909	[M-H] ⁻	0.64	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	光甘草定同分异构体
38	36.8	391.19177	[M-H] ⁻	0.74	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	光甘草酚
39	37.39	407.18671	[M-H] ⁻	0.77	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	台湾山豆根黄酮 A16
40	37.95	423.1817	[M-H] ⁻	0.92	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	S-3',4',5,7-Tetrahydroxy-5',8-diprenylflavanone
41	38.5	407.18665	[M-H] ⁻	0.62	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	山豆根黄酮 A
42	38.91	423.18172	[M-H] ⁻	0.97	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	R-3',4',5,7-Tetrahydroxy-5',8-diprenylflavanone
43	43.78	419.15039	[M-H] ⁻	0.9	C ₂₅ H ₂₄ O ₆	Tonkinensisol
44	48.02	279.23312	[M-H] ⁻	0.6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	9E, 12E- 十八碳二烯酸
45	48.19	459.25446	[M-H] ⁻	0.82	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	广豆根素
46	48.36	279.23306	[M-H] ⁻	0.38	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸
47	50.23	255.23318	[M-H] ⁻	0.89	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸
48	50.74	281.24866	[M-H] ⁻	0.2	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸

天然产物代谢工作流程

数据采集



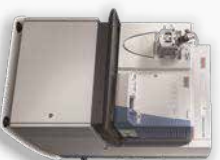
Ultimate 3000
UHPLC

Q Exactive系列



Orbitrap Fusion
系列

LTQ Orbitrap
系列



代谢物寻找



Compound Discoverer

- 质量亏损过滤
- I相、II相代谢通路搜索代谢产物
- 同位素分布搜索
- 二级谱图相关性

代谢物鉴定



Compound Discoverer



Mass Frontier

- 谱图解析功能解析确证结构

人尿样中乌头碱及其代谢产物鉴定

江峥, 叶芳挺

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

Q Exactive, MetWorks, 乌头碱, 代谢物鉴定

引言

体内代谢物研究主要针对各类生物基质样本, 如全血、血浆、血清、尿样、胆汁或组织等, 对其中痕量的代谢物进行分离、结构鉴定或定量分析。液相色谱质谱联用技术(LC-MS)以其分离效率高、检测速度快、定性和定量能力强等优势, 被广泛应用于体内代谢物研究, 而其中高分辨质谱的使用更是趋于普及。以高分辨静电场轨道阱 Orbitrap 为核心的串联质谱平台 Q Exactive, 具有分辨率高、质量精度高、灵敏度高、质量轴稳定性好、可快速正负切换扫描等优点, 可有效提高代谢物研究的分析通量和分析效果, 尤其对于复杂基质中的痕量代谢组分的识别效率高、同时定性和定量能力强。配合相应的代谢物研究软件, Q Exactive 为生物基质样品中目标或非目标代谢物的定性鉴别和定量分析提供了完整高效的高分辨质谱分析流程。

乌头属(Aconitum)类植物中的生物碱类成分具有镇痛、抗炎、抗癫痫、抗肿瘤、提高免疫力等生理活性, 用以治疗跌打损伤等病症。但其中所含的乌头碱(Aconitine)等双酯二萜生物碱安全系数小, 治疗剂量与中毒剂量接近, 加之对毒物耐受性的个体差异、误服或投毒等原因, 常引起乌头碱中毒。乌头碱中毒无特异性临床表现, 至今没有准确的法医鉴定及临床诊断方法。此外, 乌头碱在体内浓度低、代谢速度快, 因此研究乌头碱在人体内的代谢过程, 通过代谢产物表针其中毒情况和中毒程度, 对于刑侦断案以及临床施救都有着实际应用价值。乌头碱体内代谢物研究主要面临以下几个难点: 一是乌头碱代谢迅速, 尿样中的原药及代谢物浓度低; 二是生物样品复杂, 内源性干扰严重; 三是代谢途径多样, 代谢物众多。因而, 对于高分辨质谱系统要求其全质量轴的扫描灵敏度高、特异性强、质量精度高、动态范围宽且可采用多种扫描方式用以最完整和可靠的代谢物鉴定。

实验目的

建立以 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱为核心的代谢物鉴定高效流程, 用于准确、快速地筛选和定性目标及非目标代谢产物, 提高代谢物鉴定的覆盖率, 尤其是含量较低的代谢产物的检出效率。以人体内乌头碱代谢物鉴定为例, 对 24、48、72 小时所采集尿样中的代谢产物进行高分辨质谱分析。

实验条件

液相色谱条件

- 色谱系统: Thermo Scientific™ Accela 600 快速液相色谱系统
- 色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil Gold C18 (50 × 2.1 mm, 1.9 μm)
- 进样量: 10 μL

流动相 A:	10 mM 醋酸铵水溶液		
流动相 B:	乙腈		
流速:	300 μL/min		
梯度:	时间 (min)	A%	B%
	0.00	95	5
	1.00	95	5
	14.00	50	50
	14.01	5	95
	17.00	5	95
	17.01	95	5
	20.00	95	5

质谱条件

• 质谱系统: Thermo Scientific™ Q Exactive 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱

• 参数设置:

离子源参数		扫描参数	
离子化方式	HESI (+)	MS 分辨率	70,000 FWHM
喷雾电压	3000 V	MS2 分辨率	17,500 FWHM
鞘气	35 arb	扫描范围	m/z 200-1200
辅助气	10 arb	裂解方式	HCD
离子传输管温度	350°C	碰撞能量	35%

数据分析

Q Exactive 采集的数据文件由专业的代谢物鉴定软件 MetWorks 进行处理, 自动筛选并定性可能的代谢产物。MetWorks 支持高分辨质谱数据, 软件中集成了 I 相、II 相和 III 相代谢通路, 仅需提供母体药物的分子式或者结构就能够依据精确质量数自动检索数据文件中已知代谢方式的目标产物。除次之外, MetWorks 也能够通过 MMDF (多重质量亏损过滤) 排除总离子流色谱图中的干扰信号, 放大低浓度代谢物的响应。对于非目标代谢产物, 软件可以通过二级谱图相关性、空白及样品中组分对比分析、同位素匹配、色谱峰检索等多个角度进行代谢物的筛查, 以确保最为完整的代谢物鉴定覆盖率。

结果

代谢物鉴定通常以体内或体外生物基质样品为研究对象, 代谢产物结构迥异且浓度高低不一, 因此对于质谱系统要求具备足够高的分辨率以区别与目标分析物质量数接近的干扰组分, 足够准确和稳定的精确质量数测定能力以在整个分析周期内获得有效的样品数据, 同时也需要足够高的灵敏度和足够宽的动态范围以满足各种浓度水平代谢物的检测。基于 Orbitrap 静电场轨道阱高分辨质谱技术的 Q Exactive LC-MS/MS 系统不仅具有分辨率高、质量精度高、灵敏度高的特点, 还能够提供正负切换扫描、数据关联 MS/MS 扫描、中性丢失扫描等多种高分辨数据采集模式, 以便获得最为全面的代谢物筛选和鉴定所需的数据。所采集的高分辨数据文件可直接导入 MetWorks 代谢物鉴定软件, 仅需在软件中输入母药的分子式或结构式, 即能自动根据内置的代谢通路、MS/MS 谱图相关性、同位素特征等信息对目标及非目标代谢产物进行多角度的定性分析, 最终生成报告。Q Exactive 高分辨质谱与 MetWorks 代谢物鉴定软件, 构成了一套完整、高效、快速的代谢物鉴定流程, 无论是目标还是非目标、高浓度还是低浓度的代谢物, 都能够获得最佳的鉴定效果 (图 1 为代谢物鉴定流程)。

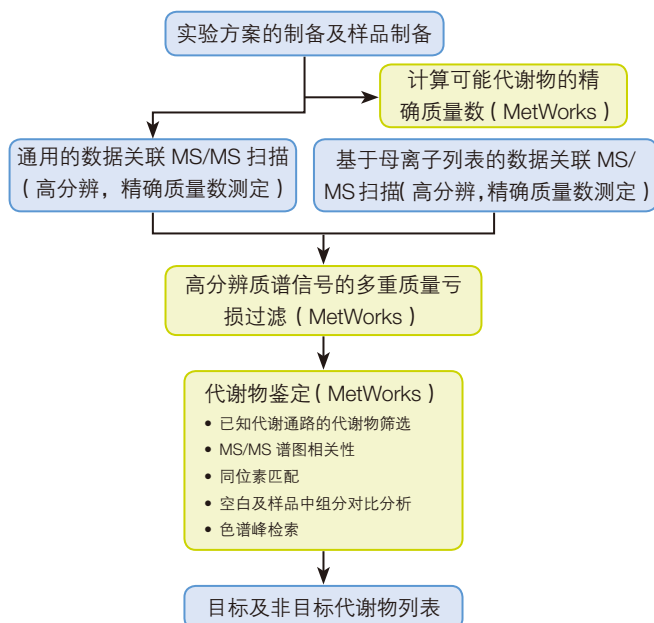


图 1. 基于 Q Exactive 高分辨质谱及 MetWorks 软件的代谢物鉴定流程

根据上述代谢物鉴定流程, 对 24hr、48hr、72hr 采集的尿样中乌头碱的代谢物进行筛查, 分别鉴定出 49、40、14 种代谢产物。图 2 为 24hr 采集尿样中所鉴定出的部分代谢产物, 以精确质量数对目标组分信号进行提取, 提取窗口为 5 ppm。表 1 中列出了主要代谢产物的代谢修饰方式、保留时间及实测精确质量数等信息, 大部分化合物的质量精度均在 1 ppm 以内。

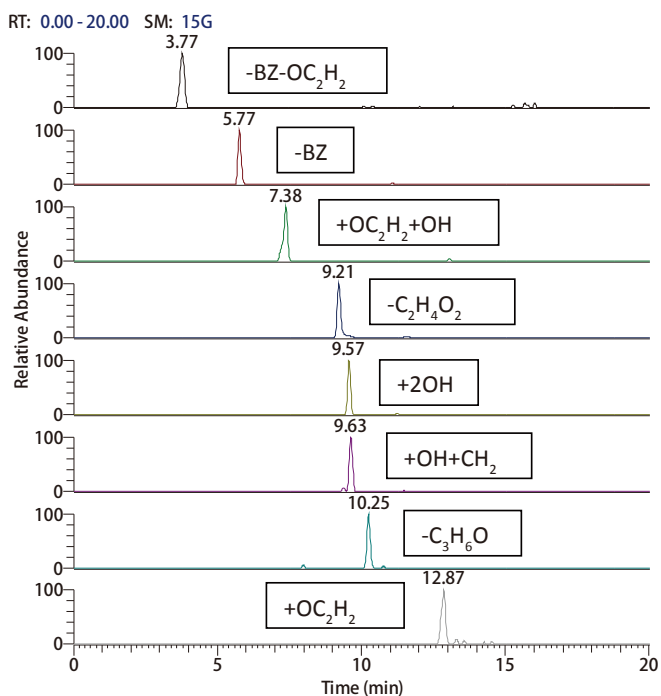


图 2. 24 hr 尿样中部分代谢产物的提取离子流色谱图 (质量提取窗口 5 ppm)

表 1. 所鉴定出的主要代谢产物及精确质量数测定结果

No.	Modification	RT (min)	Formula	Theoretical Mass	Measured Mass	Precision (ppm)
M1	+O-C ₂ H ₂ O	7.53	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₁	620.30654	620.30719	1.0479
M2	-C ₃ H ₆	8.33	C ₃₁ H ₄₁ NO ₁₁	604.27524	604.2757	0.7612
M3	-C ₃ H ₆	9.51	C ₃₁ H ₄₁ NO ₁₁	604.27524	604.27502	-0.3641
M4	+O-C ₂ H ₄	9.28	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₂	634.2858	634.28644	1.0090
M5	+O-C ₂ H ₄	9.58	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₂	634.2858	634.28644	1.0090
M6	-C ₂ H ₄	9.49	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₁	618.29089	618.2915	0.9866
M7	-C ₂ H ₄	9.89	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₁	618.29089	618.29108	0.3073
M8	-H ₂ -C ₂ H ₂ O	10.75	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₀	602.29597	602.29633	0.5977
M9	-CH ₂	9.84	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	632.30654	632.30707	0.8382
M10	-CH ₂	11.44	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	632.30654	632.30652	-0.0316
M11	-H ₂ -CH ₂	9.35	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₁	630.29089	630.2912	0.4918
M12	-H ₂ -CH ₂	11.87	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₁	630.29089	630.29132	0.6822
M13	-H ₂ -CH ₂	12.26	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₁	630.29089	630.29108	0.3014
M14	-C ₄ H ₈	6.70	C ₃₀ H ₃₉ NO ₁₁	590.25959	590.25897	-1.0504
M15	-CH ₂ -OC ₂ H ₂	7.99	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590.29597	590.29645	0.8132
M16	+O-CH ₂	8.99	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₂	648.30145	648.30164	0.2931
M17	+O-CH ₂	10.17	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₂	648.30145	648.3017	0.3856
M18	+O-H ₂	10.00	C ₃₄ H ₄₅ NO ₁₂	660.30145	660.30188	0.6512
M19	-H ₂	10.45	C ₃₄ H ₄₅ NO ₁₁	644.30654	644.30701	0.7295
M20	+H ₂ O	10.86	C ₃₄ H ₄₉ NO ₁₂	664.33275	664.33252	-0.3462
M21	+O	9.10	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂	662.3171	662.31757	0.7096
M22	+O	11.98	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂	662.3171	662.31769	0.8908
M23	+CH ₂	12.59	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₁	660.33784	660.33838	0.8178
M24	+CH ₂	15.24	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₁	660.33784	660.33844	0.9086
M25	-BZ-OC ₂ H ₂	3.77	C ₂₅ H ₄₁ NO ₉	500.28541	500.28534	-0.1399
M26	-BZ	5.77	C ₂₇ H ₄₃ NO ₁₀	542.29597	542.29626	0.5348
M27	+OC ₂ H ₂ +O	7.38	C ₃₆ H ₄₉ NO ₁₃	704.32767	704.32782	0.2130
M28	-C ₂ H ₄ O ₂	9.21	C ₃₂ H ₄₃ NO ₉	586.30106	586.30157	0.8699
M29	+2O	9.57	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₃	678.31202	678.31165	-0.5455
M30	+O+CH ₂	9.63	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₂	676.33275	676.33276	0.0148
M31	-C ₃ H ₆ O	10.25	C ₃₁ H ₄₁ NO ₁₀	588.28032	588.28101	1.1729
M32	+OC ₂ H ₂	12.87	C ₃₆ H ₄₉ NO ₁₂	688.33275	688.3327	-0.0726
M33	-C ₂ H ₂ O	8.50	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	604.31162	604.31177	0.2482
M34	-CH ₂ O	10.17	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	616.31162	616.31219	0.9249
M35	-CH ₂ +H ₂	10.19	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₁	634.32219	634.32257	0.5991
M36	-O	12.15	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	630.32727	630.32758	0.4918

对于通过一级全扫描鉴定出的代谢产物，Q Exactive 可通过母离子列表形式，有针对性的采集目标代谢物的二级高分辨质谱数据，用于进一步的结构确证。以脱乙酰基的代谢产物 M33 为例，图 3 中显示了 M33 的二级高分辨质谱对比图。M33 碎裂后可产生与乌头碱类似的碎片离子，提示其主要结构与乌头碱类似，为其脱侧链乙酰胺基后的产物。Q Exactive 的 HCD 高能碰撞碎裂模式可获得 M33 丰富的碎片离子用于结构确证（图 3），且基本所有 MS/MS 二级离子的精确质量数均在 1 ppm 以内，可通过软件确定碎片离子的元素组成，对其碎裂途径进行合理归属，用于该代谢物的结构确证。

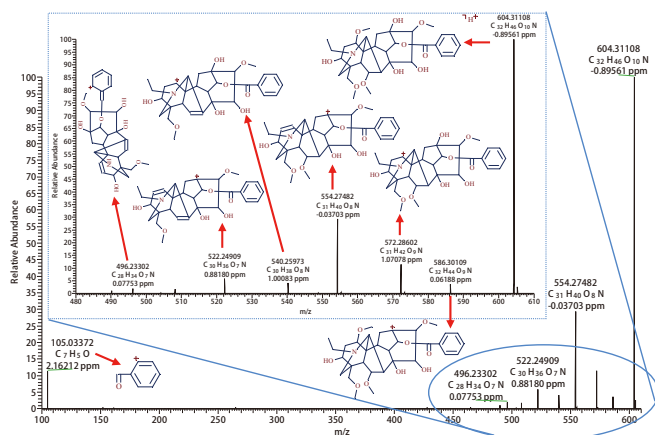


图 3. 脱乙酰基代谢产物 M33 的二级高分辨质谱图及质量精度和碎片结构

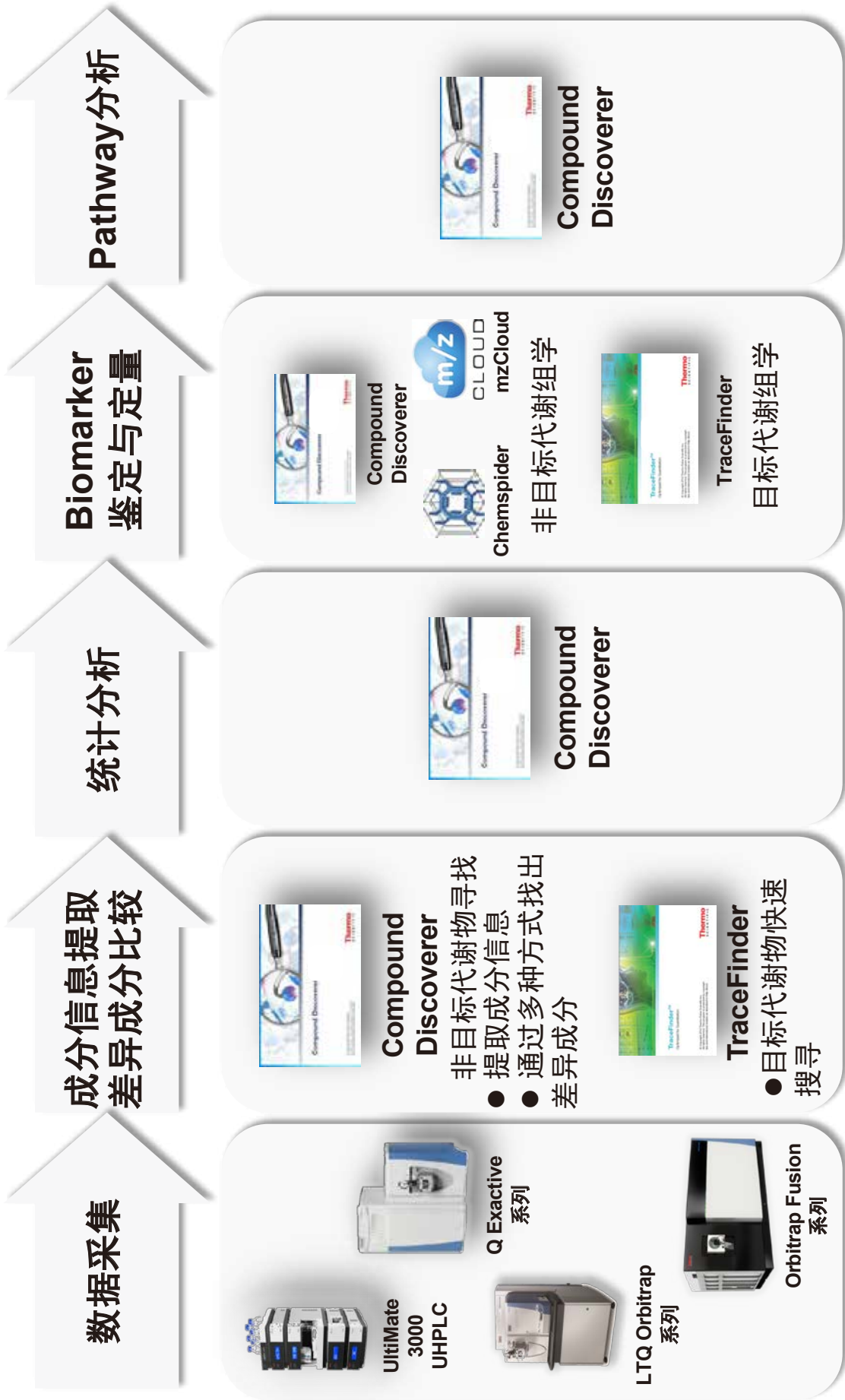
结论

通过应用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱串联高分辨质谱系统，大大提高了体内代谢物的鉴定和结构确证的效率，简化了仪器操作和数据解析的流程。通过精准的一级高分辨全扫描、数据关联 MS/MS 扫描以及正负切换扫描，全面采集可能代谢产物的高分辨质谱数据，分别采用 MS 和 MS/MS 精确质量数对代谢物进行定性筛查和结构确证。Q Exactive 的超高分辨率和精确的质量数测定功能，大幅减少了假阳性结果，提升整体的数据结果质量。MetWorks 代谢物鉴定软件中的 MMDF 功能有效滤除基质中的信号干扰，从多维角度对痕量代谢组分进行自动筛查。对 24hr、48hr、72hr 采集的人体尿样中的乌头碱及其代谢物进行鉴定，共鉴定出近 50 种代谢产物，即使在服药 3 天后依然能检出 14 种代谢物。所采用 MS 和 MS/MS 数据关联扫描，使得一次进样同时获得高分辨一级和二级质谱数据，用于代谢产物研究。Q Exactive 的特异性和灵敏度也使其成为兼具优异的同时定性和定量功能，成为最佳的体内或体外代谢物研究的全能高分辨质谱平台。

参考文献

- [1] 王朝虹等. 液相色谱质谱联用测定乌头碱在大鼠体内代谢物. 中国法医学杂志. 2006, 21(2): 88-90
- [2] 张宏桂等. 兔血液中乌头碱代谢物的研究. 吉林大学学报. 2006, 44(2): 284-286

中药组学工作流程



数据采集



UltiMate
3000
UHPLC



Q Exactive
系列



LTQ Orbitrap
系列



Orbitrap Fusion
系列

成分信息提取
差异成分比较



Compound
Discoverer

- 非目标代谢物寻找
- 提取成分信息
- 通过多种方式找出差异成分



TraceFinder

- 目标代谢物快速搜寻

Biomarker
鉴定与定量



Compound
Discoverer



Chemspider



mzCloud

非目标代谢组学



TraceFinder

目标代谢组学

统计分析



Compound
Discoverer

Pathway 分析



Compound
Discoverer

绿茶和红茶提取物的代谢组学分析

Donna L. Wilson, Charles Yang
赛默飞世尔科技, San Jose, CA, USA

关键词

SIEVE™ 软件; 高能碰撞解离 (HCD); Mass Frontier™ 软件;
天然产物分析

概述

目的: 展示完整的分析代谢组学工作流程, 包括 (1) 采用高分辨率准确质量数质谱仪配备高能碰撞解离 (HCD) 池, 与高压 LC 联用技术进行数据采集 (图 1), (2) 代谢物差异分析, 和 (3) 利用准确质量数和 HCD 碎片信息鉴定相关代谢物的结构, 以区分绿茶和红茶成分的差别。

方法: 采用带 HCD 池的 LTQ Orbitrap XL™ 分析绿茶和红茶提取物。色谱柱为 Hypersil GOLD™ 柱 (内径 2.1 mm, 粒径 1.9 μm)。Data Dependent™ 分析是在 LTQ Orbitrap XL 上进行, 采集分辨率为 30000 的全扫描数据和随后 HCD 裂解后分辨率为 7500 的 MSⁿ 数据。

结果: 本研究采用差异分析软件对绿茶和红茶进行了对比分析以鉴定这两种茶样品的成分差异。采用 UHPLC 和小粒径的色谱柱能实现快速分析并保持非常高的色谱分辨率。高质量数准确度的数据 (使用外标法校准时优于 3 ppm) 用于测定元素组成, 和通过数据库搜索对各化合物进行试验性的鉴定。HCD 碎裂有利于结构鉴定和验证。这些可以通过表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 的例子进行阐述。

前言

代谢组学是对生物样品中很宽范围的代谢物进行全面和定量的分析, 并标记潜力无穷的新研究领域。这些样品中的大量分析物具有不同的化学性质和极性。另外, 某一特定的样品中的代谢物的浓度范围也很宽。因此, LC-MS/MS 可以帮助解决全面的代谢组学调查中产生的诸多分析难题。茶叶中含有各种不同的成分, 包括维生素、氨基酸和多酚。其中的很多成分具有相似的结构, 可能只在侧链的类型和位置上稍有区别。采用高分辨率质谱仪对这些复杂混合物进行分离极其重要。此外, 在全扫描和 MSⁿ 两种模式下采集准确质量数数据能实现完整的结构分析。

本文中介绍了通过代谢物 ID 采集数据进行的非目标物代谢组学工作流程。研究包括对多酚类儿茶素 (黄烷 3 醇) 衍生物和绿茶和红茶中的茶黄素组分进行差异和结构分析。

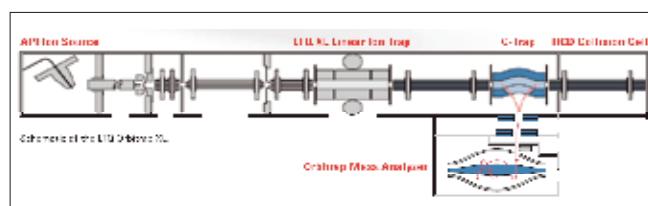


图 1. 带 HCD 碰撞池的 LTQ Orbitrap XL 质谱仪示意图。LTQ Orbitrap XL 带 HCD 碰撞池能为复杂混合物中低浓度成分提供额外的灵活性。离子在线性离子阱中被选出, 并在离子阱 (CID) 或 HCD 碰撞池中进行裂解。如果是 HCD, 离子通过 C-trap 后进入充气的碰撞池, 提供高灵敏度和高信噪比的碎片。

方法

样品

测试采用未经过任何前处理的绿茶和红茶水提取物。每个样品平行测定四次。

色谱条件

LC 条件如下：

色谱柱：Hypersil GOLD, 100 × 2.1 mm, 1.9 μm 粒径（赛默飞世尔科技, Bellefonte, PA）

流动相：（A）含 0.1% 甲酸的水溶液

（B）含 0.1% 甲酸的乙腈

流速：500 μL/min

进样体积：10 μL

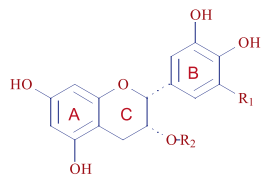
梯度：A 相在 20 分钟内由 100% 线性变成 1%。

质谱条件

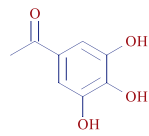
质谱分析采用 LTQ Orbitrap XL 质谱仪（赛默飞世尔科技, San Jose, CA）。MS 条件如下：

正离子电喷雾离子源电压：5.0 kV

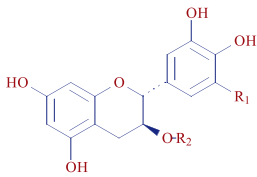
所有方法：质量数分辨率为 30000 的 Orbitrap 全扫描 MS。采用 Orbitrap 的 Data Dependent MS/MS 对全扫描中强度最高的三个离子在质量数分辨率 7500 下进行分析。



Epicatechin (EC) Structures

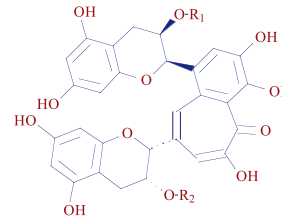


Galloyl (gal) Unit



Catechin (C) Structures

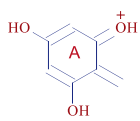
R₁ = H or OH
R₂ = H or gal



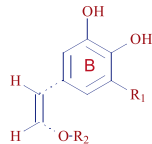
Theaflavin Structures

	EC or C	EGC or GC	ECG or CG	EGCG or GCG
R ₁	H	OH	H	OH
R ₂	H	H	gal	gal
MW (amu)	290	306	442	458

	Theaflavin	Theaflavin 3-monogallate	Theaflavin 3'-monogallate	Theaflavin 3,3'-digallate
R ₁	H	H	gal	gal
R ₂	H	gal	H	gal
MW (amu)	564	716	716	868



m/z 139, "A-ring" ion



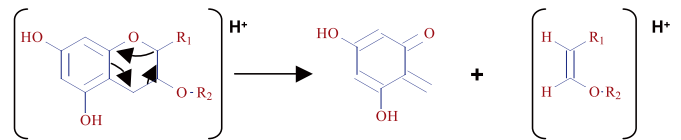
"B-ring" ion

C, EC; R₁=R₂=H; m/z 152

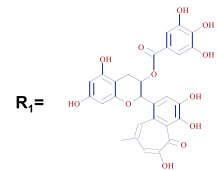
GC, EGC; R₁=OH, R₂=H; m/z 168

ECG; R₁=H, R₂=gal; m/z 304

EGCG; R₁=OH, R₂=gal; m/z 320



For theaflavin derivatives the proton is retained by the benzotropolone part (or "B-ring" part) presenting the larger aromaticity than the "A-ring part".



R₁=

A and B-ring ions formed by retro-Diels-Alder (RDA) mechanism in catechin polyphenols.

RDA fragmentation mechanism for theaflavin polyphenols.

图 2. Camellia sinensis 叶子加工成的三种类型茶叶：绿茶（不发酵）、乌龙茶（半发酵）和红茶（全发酵）。儿茶素属于一类叫黄烷 3 醇的黄酮类化合物的多酚类抗氧化剂植物代谢物，广泛存在于茶树中。发酵能引起黄烷 3 醇的酶催化氧化，形成红茶样品中的两个主要色素成分，茶黄素（TFs）和茶红素（TRs）。儿茶素在绿茶中含量更高，而茶黄素主要存在于红茶中。图中列出的这些化合物的推荐裂解路径是按照 Retro-Diels-Alder 重排来进行的。

结果

茶叶潜在的健康功效引起了越来越多的关注，特别是其中一些多酚类儿茶素和茶黄素（图 2）的抗氧化性和其他性能。本文的重点集中在对绿茶和红茶样品中的低分子量化合物进行检测、相对定量和鉴定。

茶叶样品的 HPLC 分离显示了优异的峰分离效果和低噪声，大多数成分在 10 分钟以内洗脱出来。高分辨率全扫描质谱的质量数准确度优于 3 ppm。

数据采集完成后，采用 SIEVE 软件对绿茶和红茶样品的代谢物成分进行统计上的显著性差异分析（图 3）。通过比较色

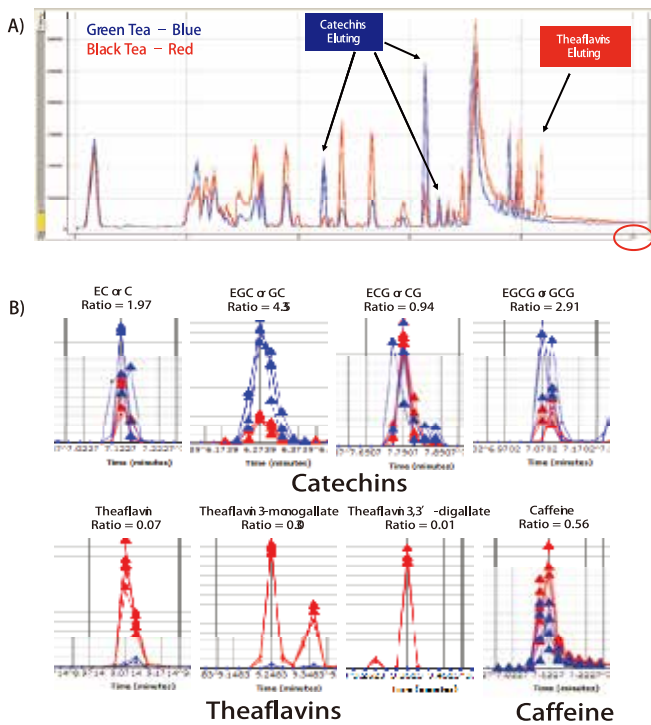


图 3. SIEVE 软件的差异代谢物相对含量分析。A) SIEVE 流程的第一步，不同样品的色谱分离。图中可看出绿茶样品（蓝色）和红茶样品（红色）的区别。UHPLC 提供高分离度的色谱分离和高信噪比。B) 色谱分离后，比较绿茶样品（蓝色）和红茶样品（红色）对应的峰强度。几种目标化合物的相对含量比值显示在图中。这些代谢物是通过 Mass Frontier 软件的准确质量数数据库搜索和 MSⁿ 质谱解释相结合来进行鉴定的。

谱图上的峰强度能测定出两个茶叶样品中代谢物浓度的差异。

测定目标的差异代谢物后，准确质量数和 MSⁿ 数据用于结构鉴定。元素组成是通过准确质量数数据测定的，而质量数数值本身被用于代谢物数据库搜索。EGCG 的代谢物就是采用这些工具相结合进行试验性鉴定的。

更进一步的代谢物分析是在 MSⁿ 质谱和 Mass Frontier 软件上完成的。Mass Frontier 通过其全面的质谱数据库和预测裂解算法实现可靠的代谢物鉴定和结构分析（图 4）。图 3 中的化合物是通过此工作流程进行鉴定的。

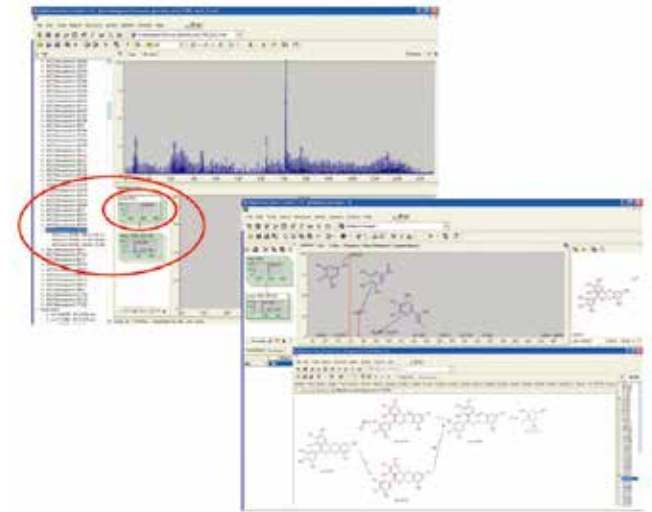


图 4. 从图 3 中选出一个目标代谢物进行进一步分析。此离子的浓度是红茶中的 ~3 倍，鉴定为可能的抗氧化剂，EGCG。准确质量数用于数据库搜索鉴定代谢物，而 Mass Frontier 软件通过使用母离子的碎片图谱被用于验证 EGCG 的鉴定结果。

结论

本文介绍的分析代谢组工作流程包括数据采集、差异代谢物的发现和代谢物鉴定。LTQ Orbitrap XL 与 UHPLC 联用系统提供了快速的分析，并保持了高色谱分离度。准确质量数的测定增加了元素组成分析和最终代谢物鉴定的可靠性。SIEVE 差异分析软件能实现大量复杂的 LC-MS 数据的大规模评估和比较绿茶和红茶样品的代谢物组成。Mass Frontier 软件的图谱数据库和碎裂算法能利用 MSⁿ 碎裂图谱帮助目标代谢物的结构鉴定。

参考文献

Menet, MC., Sang, S. Yang, C.S., Ho, CT, and Rosen, R.T., Analysis of Theaavins and Thearubigins from Black Tea Extract by MALDITOF Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 2455- 2461.

中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究策略：基于特征类群苯乙醇苷类成分的肉苁蓉品种区分

李晨 赛默飞世尔科技（中国）有限公司

张加余 北京中医药大学

关键词

LITQ Orbitrap；中药组学；肉苁蓉；目标类群；苯乙醇苷

引言

中药存在多基源问题，很多中药品种来源于不止一种植物、动物或矿物。不同基源的药材通常化学成分有一定差异，从而导致药理活性存在差异，直接影响到中药的有效性与安全性。因此中药基源是关系中药质量与疗效非常重要的因素。

肉苁蓉是我国传统的名贵中药材，素有“沙漠人参”之美誉，具有极高的药用价值。其可用于治疗精血不足之阳痿、遗精、白浊、尿频余沥、腰痛脚弱、耳鸣目花、月经行期、宫寒不孕、肠燥便秘等症。在历史上就被西域各国作为上贡朝廷的珍品，也是历代补肾壮阳类处方中使用频度最高的补益药物之一。肉苁蓉作为多基源中药，有多个品种均被作为肉苁蓉药材使用，其中肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C. Ma (CD)、管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schrenk) Wig (CT) 和沙苁蓉 *C. sinensis* (C. A. Mey.) G. Beck (CS) 为常用的三个品种。2010 版《中国药典》规定肉苁蓉为肉苁蓉 (CD) 或管花肉苁蓉 (CT) 的干燥带鳞叶的肉质茎。因此，揭示不同品种肉苁蓉化学成分的差异，并且区分不同的品种，对于保证肉苁蓉的质量与临床疗效至关重要。

肉苁蓉中含有多种成分，其中苯乙醇苷类成分为肉苁蓉的主要特征成分。本文结合 LITQ Orbitrap 线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱及相关软件，建立了中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究策略，并应用该流程从 2 种正品和 1 种混淆品肉苁蓉中鉴定出 69 个苯乙醇苷类成分，并找到 8 个可清晰区分三种肉苁蓉的生物标志物。

实验目的

建立基于 LITQ Orbitrap 线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱及相关软件的中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究流程，用以快速发现并鉴定中药的目标类群成分，并对中药品种进行区分。本文以中药肉苁蓉为例，应用所建立流程对肉苁蓉中苯乙醇苷类成分进行发现与鉴定，并利用苯乙醇苷类成分实现了 3 个不同品种肉苁蓉的清晰区分。

实验条件

液相色谱条件

色谱柱：Agilent Zorbax Extended C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)

流动相：A 为水相，0.1% 甲酸水；B 为有机相，乙腈

梯度条件：

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
20	65	35
32	65	35
55	58	42
75	52	48

流速：1.0 mL/min。

质谱条件

质谱系统：Thermo Scientific™ LITQ Orbitrap 线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱

参数设置：

离子源参数		扫描参数	
离子化方式	HESI	MS分辨率	30,000 FWHM
喷雾电压	4 kV	MS2分辨率	15,000 FWHM
鞘气	30 arb	扫描范围	<i>m/z</i> 100-1000
辅助气	5 arb	裂解方式	CID
离子源温度	350°C	碰撞能量	40%
离子传输管温度	350°C	扫描模式	Full scan+ dd-MS2

Thermo
SCIENTIFIC

实验结果

中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究流程



图 1. 基于 LTQ Orbitrap 高分辨质谱与相关软件的中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究流程

由 LTQ Orbitrap 高分辨质谱与相关软件所构建的中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学研究流程如图 1 所示。利用 LTQ Orbitrap 质谱系统进行一级和多级数据的同时采集。

在目标类群成分发现和鉴定部分，对于已知的目标类群成分，将文献报道的一级精确质量数等信息录入 TraceFinder 软件实现已知成分的搜索。对于未知的目标类群成分利用 Compound Discoverer 软件自带的代谢通路以及 FISH 功能，分别从一级和多级进行同类型结构的搜索。在发现目标类群成分之后，采用 Mass Frontier 软件进行成分结构的解析。

在中药组学研究部分，首先用 TraceFinder 软件提取成分的峰面积信息，然后通过主成分分析 (PCA) 和载荷分析 (Loading Analysis) 筛选生物标志物，最后通过 OPLS-DA 分析对生物标志物进行验证。

肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的鉴定

采用 LTQ Orbitrap 质谱同时采集 MS1 ~ MS3 的多级数据，并用 Mass Frontier 软件进行解析。利用 Mass Frontier 软件可自动生成离子树，将多级数据相关联，并可以用该软件的谱图注解功能进行多级谱图的解析。以异毛蕊花糖苷为例，对多级谱图解析结果如下。

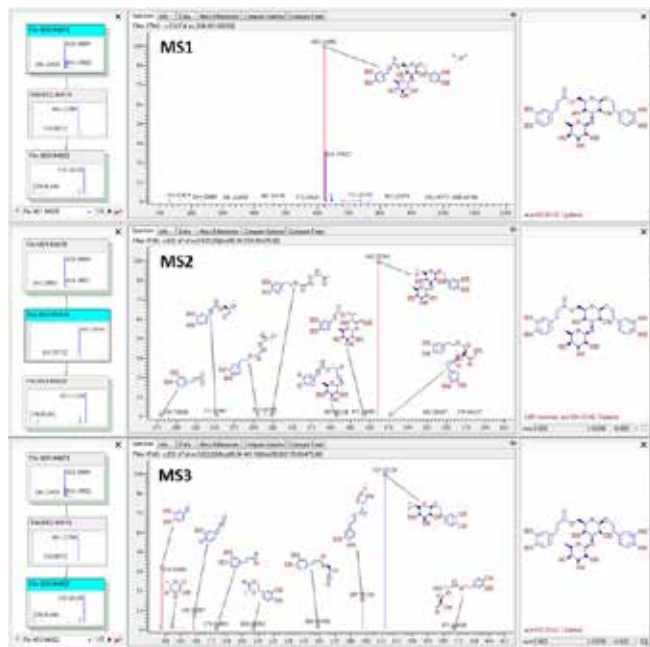


图 2. Mass Frontier 软件自动注解异毛蕊花糖苷多级质谱离子树

鉴定出的苯乙醇苷类成分结果如表 1 所示。

表 1. 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分鉴定结果

Peak	t_R /min	Formula	Theoretical Mass/ m/z	Experimental Mass/ m/z	Mass error / ppm	ESI-MS2 (m/z)	ESI-MS3 (m/z)	Structural identification
1	12.16	$C_{26}H_{39}O_{17}$	623.2182	623.2173	-1.44	477(100), 461(77.4), 459(22.0)	315(100), 221(12.6)	Kankanoside F
2	12.45	$C_{20}H_{29}O_{12}$	461.1654	461.1657	0.65	315(100), 297(10.9), 161(11.8)	135(100), 113(3.6)	Decaffeoylacteoside isomer
3	13.79	$C_{14}H_{19}O_7$	299.1125	299.1130	1.67	119(100), 137(91.2)	-	Salidroside
4	14.81	$C_{20}H_{29}O_{12}$	461.1653	461.1664	2.39	315(100), 135(74.9), 161(28.8)	135(100)	Decaffeoylacteoside
5	15.71	$C_{20}H_{29}O_{11}$	445.1704	445.1710	1.35	299(100), 161(27.7)	179(100), 143(97.0), 113(81.0), 161(41.1), 119(80.7)	Cistanoside G isomer
6	16.74	$C_{20}H_{29}O_{11}$	445.1704	445.1711	1.57	299(100), 161(22.2), 205(19.1)	179(100), 161(66.2), 143(33.5)	Cistanoside G
7	17.25	$C_{21}H_{31}O_{12}$	475.1810	475.1815	1.05	329(100), 161(32.6), 143(10.5)	161(100), 179(86.2), 149(77.1)	Cistanoside E isomer
8	18.76	$C_{28}H_{41}O_{18}$	665.2287	665.2285	-0.30	623(100), 605(8.6), 461(1.9)	477(100), 461(96.0), 459(18.1), 315(13.1), 179(1.0)	Decaffeoyltubuloside A
9	19.57	$C_{21}H_{31}O_{12}$	475.1810	475.1821	2.31	329(100), 311(22.9), 161(34.3)	161(100), 179(85.4), 149(78.3)	Cistanoside E
10	19.91	$C_{22}H_{31}O_{13}$	503.1759	503.1768	1.79	461(100), 443(3.5)	315(100), 135(35.0), 297(12.0)	Cistanoside H isomer
11	20.13	$C_{16}H_{21}O_8$	341.1231	341.1235	1.17	281(100), 179(24.7), 161(14.0), 119(12.1)	-	6' - acetylsalidroside
12	21.06	$C_{35}H_{45}O_{21}$	801.2448	801.2442	-0.75	783(100), 621(29.0), 639(11.3)	621(100)	Cistantubuloside C1/C2
13	22.17	$C_{22}H_{31}O_{13}$	503.1759	503.1768	1.79	443(100), 461(69.0)	261(100), 297(77.5), 215(25.0), 177(25.0)	Cistanoside H
14	23.24	$C_{29}H_{33}O_{15}$	621.1814	621.1822	1.29	475(100), 295(6.0)	295(100), 269(76.9), 267(55.3)	Crenatoside
15	23.85	$C_{36}H_{47}O_{21}$	815.2604	815.2587	-2.09	653(100), 797(27.6), 635(10.3)	491(100), 507(34.6), 329(10.3)	Kankanosides K1/K2
16	24.38	$C_{35}H_{45}O_{20}$	785.2499	785.2489	-1.27	623(100), 477(1.0)	477(100), 461(87.9), 459(22.1)	Echinacoside

Peak	t _R /min	Formula	Theoretical Mass/m/z	Experimental Mass/m/z	Mass error / ppm	ESI-MS2 (m/z)	ESI-MS3 (m/z)	Structural identification
17	25.25	C ₁₆ H ₂₁ O ₈	341.1231	341.1233	0.59	281(100), 119(11.5), 179(9.7),	164(100)	4' - acetylsalidroside
18	28.06	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉	769.2550	769.2543	-0.91	607(100), 461(13.9), 445(11.2)	445(100), 461(81.1), 443(31.2)	Cistantubuloside A
19	29.25	C ₃₆ H ₄₇ O ₂₀	799.2655	799.2647	-1.00	637(100), 623(18.9), 491(10.2)	491(100), 475(48.3), 473(34.7)	Cistanoside A
20	29.43	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉	769.2550	769.2543	-0.91	623(100), 605(6.8)	477(100), 461(92.2), 459(20.9)	Cistantubuloside B1/ B2
21	32.02	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉	755.2393	755.2384	-1.19	593(100), 623(2.3)	447(100), 461(98.4), 429(23.3)	Arenarioside
22	32.22	C ₃₇ H ₄₇ O ₂₁	827.2604	827.2592	-1.45	665(100), 623(63.2), 785(8.2)	623(100), 605(69.4), 519(10.7), 503(7.8)	Tubuloside A
23	32.88	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅	623.1970	623.1960	-1.60	461(100), 315(41.9), 443(10.6), 477(8.9)	315(100), 297(26.1), 135(17.0)	Acteoside
24	33.97	C ₄₃ H ₅₃ O ₂₃	937.2972	937.2973	0.11	811(100), 607(43.1)	-	Tubuloside D
25	34.32	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅	623.1970	623.1969	-0.16	461(100), 443(12.6), 477(6.9)	315(100), 135(77.0), 205(36.7)	Cisacteoside
26	35.06	C ₄₃ H ₅₃ O ₂₃	937.2972	937.2968	-0.43	811(100), 607(77.9)	-	Cistubuloside D
27	36.32	C ₃₆ H ₄₇ O ₂₀	799.2655	799.2651	-0.50	637(100), 653(16.0), 623(4.9)	461(100)	Wiedemanninoside C
28	37.67	C ₃₇ H ₄₉ O ₂₀	813.2811	813.2802	-1.11	619(100), 473(19.1), 491(13.7)	473(100), 457(38.8), 443(16.8)	Cistanoside B
29	41.04	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₆	653.2076	653.2073	-0.46	491(100), 476(4.1)	476(100), 345(38.9), 150(10.0)	Campneoside I
30	40.81	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉	769.2550	769.2543	-0.91	607(100), 623(3.4)	461(100), 443(14.5)	Poliumoside
31	40.41	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₅	621.1813	621.1822	1.45	459(100), 179(19.2), 487(15.7)	151(100), 277(39.8)	Crenatoside isomer
32	40.69	C ₃₈ H ₄₉ O ₂₁	841.2761	841.2757	-0.48	665(100), 623(33.5), 799(34.5)	623(100), 605(8.4)	Cistanoside N isomer
33	41.93	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₆	653.2076	653.2075	-0.15	491(100), 638(9.3), 507(6.1)	476(100), 345(38.9)	Isocampneoside I
34	41.97	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	607.2021	607.2017	-0.66	445(100), 461(11.2), 427(11.2)	299(100), 161(15.0), 179(11.2)	Kankanoside G
35	42.87	C ₃₇ H ₄₇ O ₂₀	811.2655	811.2654	-0.12	665(100), 649(27.1), 769(12.6)	623(100), 605(7.8)	Kankanoside H1/H2

Peak	t _R /min	Formula	Theoretical Mass/m/z	Experimental Mass/m/z	Mass error / ppm	ESI-MS2 (m/z)	ESI-MS3 (m/z)	Structural identification
36	42.62	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	623.1970	623.1968	-0.32	461(100), 315(11.3) , 477(7.4)	315(100), 297(42.6), 135(16.4)	Isoacteoside
37	43.76	C ₃₈ H ₄₉ O ₂₁	841.2761	841.2757	-0.48	799(100), 637(49.8), 619(19.0)	-	Cistanoside N isomer
38	43.86	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2127	637.2117	-1.57	475 (100), 461(45.9), 491(14.8), 457(12.2)	329(100), 161(30.2), 315(12.5)	Cistanoside C
39	44.06	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	607.2021	607.2017	-0.66	461(100), 443(1.4), 445(100) , 461(11.2), 427(11.2)	315(100), 297(17.0)	Cis-Kankanoside G
40	47.04	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	665.2076	665.2072	-0.60	461(100), 503(38.9), 443(5.7)	315(100), 297(19.6)	2' -O-acetylacteoside
41	47.58	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₈	753.2600	753.2593	-0.93	591(100), 607(11.3)	445(100), 427(34.2)	Kankanoside I
42	49.45	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2127	637.2129	0.31	475(100), 461(31.1), 457(15.7)	329(100), 161(35.3)	Jionoside D
43	50.36	C ₃₈ H ₄₉ O ₂₁	841.2761	841.2754	-0.83	695(100), 653(39.9), 799(23.8)	-	Cistanoside N
44	52.34	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	607.2021	607.2017	-0.66	461(100), 445(49.1)	315(100), 135(59.2), 161(18.9)	Isosyringalide-3' - α-L rhamnose
45	52.78	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₈	753.2593	753.2606	1.73	607(100), 589(4.5)	461(100), 443(15.2)	Ciskankanoside I
46	53.77	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	665.2076	665.2078	0.30	503(100), 605(48.6), 443(39.1), 623(34.0), 461(23.0), 519(4.0)	443(100), 461(70.2), 357(36.7)	Cistubuloside B
47	53.52	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	591.2072	591.2068	-0.68	445(100), 427(28.6)	299(100), 145(24.7), 163(23.5), 161(22.9)	Osmanthuside B
48	53.75	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2127	637.2117	-1.57	461(100), 491(36.9), 475(17.3)	315(100), 135(67.6), 297(17.6)	Isocistanoside C
49	53.83	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₄	621.2178	621.218	0.32	445(100), 427(44.7), 175(40.7)	-	Cistanoside M ismor
50	54.18	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	607.2021	607.2025	0.66	461(100), 443(2.39)	315(100), 135(46.5), 161(16.0)	Syringalide A-3' - α-L- rhamnose
51	56.04	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₇	695.2182	695.2174	-1.15	491(100), 653(34.3), 533.2(23.4)	345(100)	Kankanosides J1/J2
52	55.35	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₄	621.2178	621.218	0.32	475(100), 457(42.8), 443(11.6)	329(100), 161(45.3)	Cistanoside M

Peak	t _R /min	Formula	Theoretical Mass/m/z	Experimental Mass/m/z	Mass error / ppm	ESI-MS2 (m/z)	ESI-MS3 (m/z)	Structural identification
53	55.55	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₅	651.2283	651.2282	-0.15	475(100), 193(24.3), 457(22.7)	329(100), 161(62.6), 311(17.6)	Cistanoside D
54	56.14	C ₃₇ H ₄₇ O ₂₀	811.2655	811.2655	0	607(100), 649(66.4), 769(22.8)	461(100), 443(18.5)	2' -O-acetylpoliumoside
55	58.99	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2232	679.2227	-0.74	637(100), 475(16.6), 461(8.3)	461(100), 491(11.6), 475(6.3)	Isocistansinenside A
56	58.71	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2126	637.2129	0.47	475(100), 461(88.3), 491(74.7)	329(100), 161(37.2)	Plantainoside C
57	58.61	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₅	649.2127	649.2131	0.62	607(100), 503(39.4), 461(356.6)	461(100), 443(2.6)	Salsaside D
58	58.73	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	665.2076	665.2072	-0.60	461(100), 503(53.9), 623(47.2)	315(100), 135(46.1), 297(19.3), 161(14.3)	Tubuloside B
59	60.80	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₅	651.2283	651.2289	0.92	475(100), 457(49.6), 505(31.3)	329(100), 161(45.3), 311(10.3)	Epimeridinoside A
60	62.81	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2232	679.2239	1.03	637(100), 475(25.7)	475(100), 461(58.3), 491(36.6)	Salsaside E
61	66.07	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₅	651.2283	651.2282	-0.15	505(100), 475(52.4), 487(27.8)	161(100), 193(48.1), 297(37.3)	Isomartynoside
62	66.38	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	591.2072	591.2068	-0.68	445(100), 427(13.9)	145(100), 299(47.8), 163(42.4), 265(30.6)	Osmanthuside B6 (Z/E)
63	68.55	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₆	693.2389	693.2384	-0.72	651(100), 633(21.8), 505(14.7)	505(100), 475(46.5), 487(27.1)	Cistanoside J
64	69.12	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₅	649.2126	649.2131	0.77	607(100), 461(36.4), 503(34.5)	461(100), 443(2.7)	Salsaside F
65	69.16	C ₃₆ H ₄₉ O ₂₀	825.2811	825.2817	0.73	783(100), 621(56.2), 603(27.0), 663(22.6)	637(100)	Cistansinenside B
66	70.28	C ₃₂ H ₄₁ O ₁₆	679.2232	679.2227	-0.74	637(100), 503(14.5), 461(11.0)	461(100), 491(8.4)	Isocistanoside K
67	71.71	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₆	693.2389	693.2396	1.01	651(100), 633(21.1)	475(100), 505(94.3), 193(29.5)	Isocistanoside J
68	71.26	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2232	679.2227	-0.74	637(100), 461(9.6), 619(8.7)	461(100), 491(39.9), 475(11.2)	Cistanoside K
69	73.65	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₆	679.2232	679.2239	1.03	637(100), 475(8.3), 619(8.3), 461(4.7)	461(100), 491(51.0), 475(46.8)	Ciscistanoside K

肉苁蓉品种区分生物标志物筛选

用 TraceFinder 软件提取鉴定出的 69 个苯乙醇苷类成分的峰面积信息，然后进行主成分分析 (PCA) 和载荷分析 (Loading Analysis)，进行生物标志物的筛选。主成分分析图 (图 3A) 和载荷分析图 (图 3B) 如图 3 所示。

如图 3A 所示，三种肉苁蓉可以清晰的按照品种区分为三组，说明三种肉苁蓉所含成分有一定差异。结合载荷分析图 (图 3B)，选取化合物 echinacoside (C16)、cistanoside A (C19)、tubuloside A (C22)、poliumoside (C30)、isosyringalide-3'- α -L-rhamnose (C34)、cistanoside C (C38)、2'-O-acetylacteoside (C40) 和 2'-O-acetylpoliumoside (C54) 为品种区分的生物标志物。

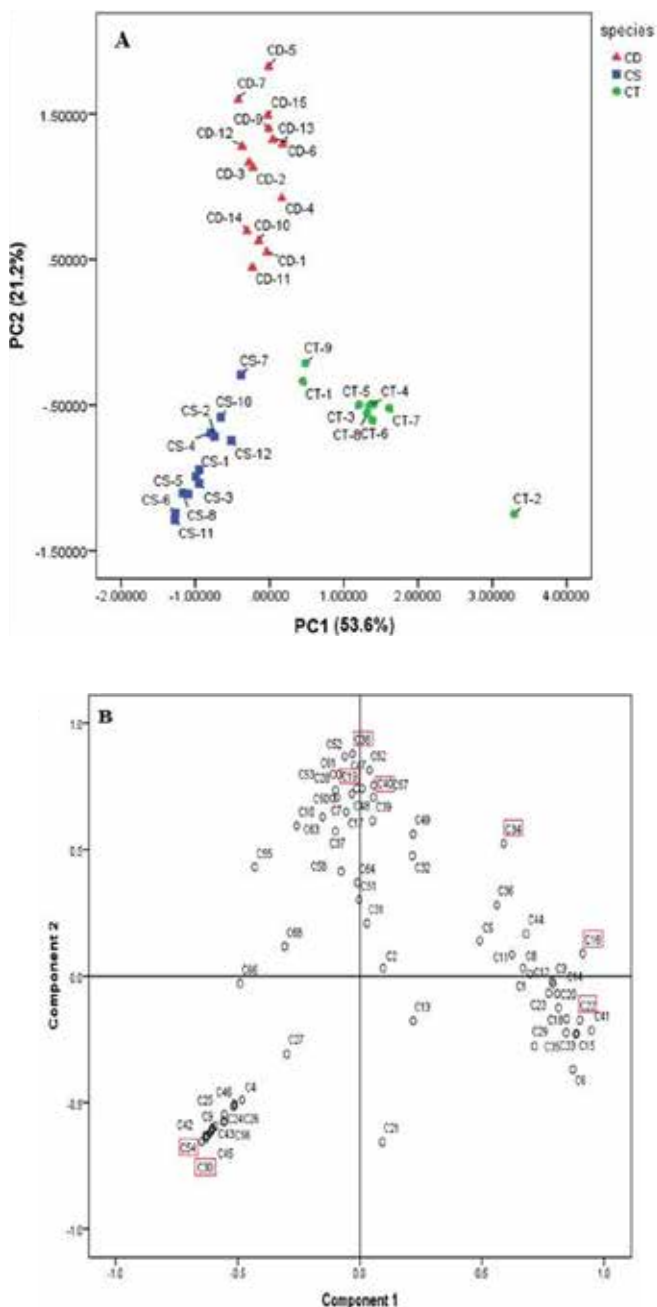


图 3. 三种肉苁蓉品种区分主成分分析图 (A) 和载荷分析图 (B)

选取的 8 个生物标志物在三种肉苁蓉 (CD、CS、CT) 中的相对含量如图 4 所示。从图中可看出，8 个生物标志物在三种肉苁蓉中的相对含量差异明显。

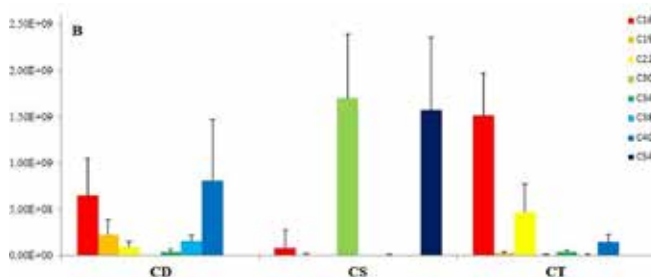


图 4. 8 个生物标志物在三种肉苁蓉 (CD、CS、CT) 中的相对含量

肉苁蓉品种区分生物标志物验证

将 36 批肉苁蓉样品随机分为 2 组：建模组和验证组。其中样品 CD-6、CD-10、CD-14、CT-1、CT-9、CS-8、CS-12 为验证组，其余样品为建模组。以选取的 8 个生物标志物为指标，用建模组样品建立 OPLS-DA 模型 (图 5)，并用验证组样品进行判别分析，判别结果如表 2 所示。从表 2 中可看出，7 份样品品种判别结果均正确。

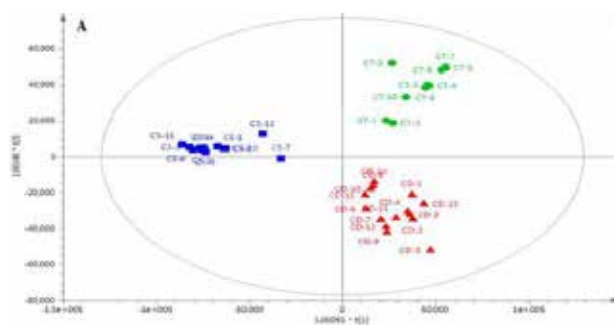


图 5. 三种肉苁蓉 (CD、CS、CT) 的 OPLS-DA 分析图

表 2. 验证组样品判别结果

Samples	Recognition value	Recognition value	Recognition value
	CD	CT	CS
CD-6	1.0089	-0.1005	0.0916
CD-10	0.7158	-0.8682	0.1974
CD-14	1.0351	-0.0373	0.0023
CT-1	0.1160	0.7510	0.0427
CT-9	0.2059	0.7513	0.1330
CS-8	-0.0009	-0.0029	1.0038
CS-12	-0.0849	0.0185	1.0663

结论

本文结合LTQ Orbitrap线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱及相关软件，建立了中药目标类群成分发现、鉴定和中药组学的研究流程。并将此流程应用于肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的发现与鉴定，以及肉苁蓉的品种区分。

利用LTQ Orbitrap的多级质谱功能，一次进样同时获得MS1~MS3的丰富质谱数据，有助于成分结构的解析。结合TraceFinder、Compound Discoverer软件的相应功能，从肉苁蓉中发现并鉴定出69个苯乙醇苷类成分。结合统计学软件，实现了3个不同品种肉苁蓉的清晰区分，并找到可用于肉苁蓉品种区分的8个生物标志物。

本文建立策略可用于快速发现并鉴定中药的目标类群成分，并对中药品种、产地等进行区分。

参考文献

1. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010.
2. L. Lei, Z.H. Song, P.F. Tu. Advances in research of chemical constituents in plants of Cistanche Hoffing. et Link, Chin. Trad. Herb. Drugs 34 (2003) 473-476.
3. Y.P. He, Z.Z. Yin, P.F. Tu, Z.C. Lou, Identification and survey of commercial crude drug of Herba Cistanches, J. Chin. Med. Mater. 20 (1997) 117-122.

中药及保健品中非法添加筛查工作流程



筛查数据采集



Ultimate 3000
UHPLC



Q Exactive系列

筛查数据库

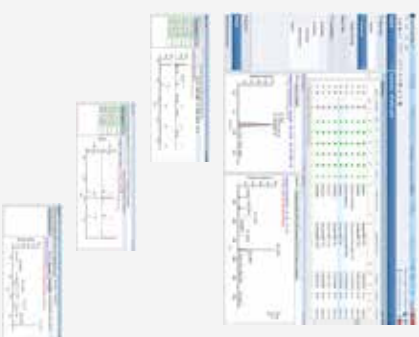


谱图数据库

Category	Sub-category	Compound Name
10 Major Categories of Illegal Additives	Antibiotics	Amoxicillin
	Antibiotics	Clarithromycin
	Antibiotics	Chloramphenicol
	Antibiotics	Clindamycin
	Antibiotics	Streptomycin
	Antibiotics	Sulfamonomethoxazole
	Antibiotics	Sulfathiazole
	Antibiotics	Sulfisoxazole
	Antibiotics	Sulfonamide
	Antibiotics	Sulfonamide

筛查信息数据库
10大类非法添加成分

筛查数据分析



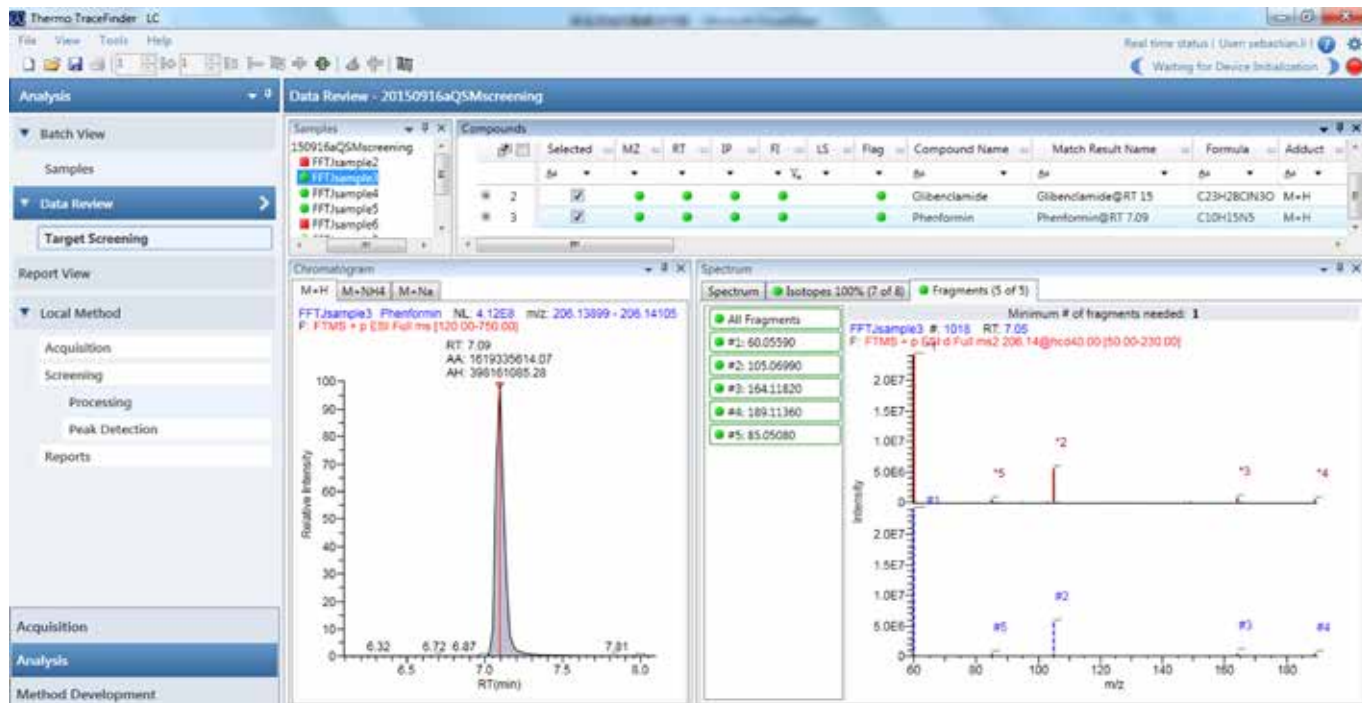
TraceFinder

多重筛查指标筛查
目标成分

中药及保健品中非法添加筛查方法包及高分辨质谱数据库

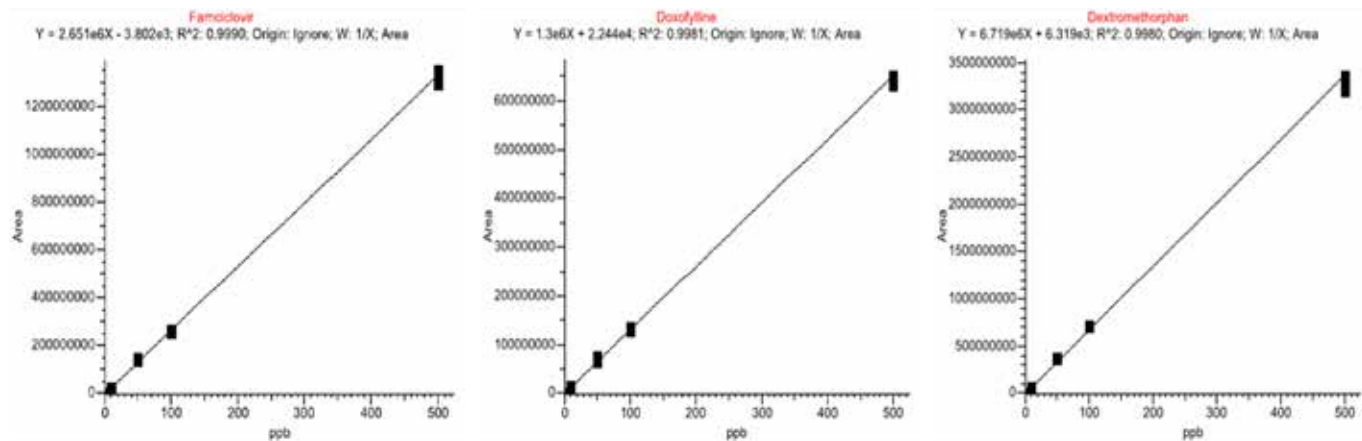
保健品非法添加筛查方法包中包含完整的筛查仪器方法、数据处理方法、非法添加成分高分辨质谱数据库以及使用指南。非法添加高分辨数据库囊括了 10 大类（安神、激素、减肥、降糖、降压、降脂、抗病毒、止咳、止痛、壮阳）市面上常见的 139 种非法添加成分，并包含分子式、保留时间、碎片离子等信息。按照使用指南中的步骤，调用相应的仪器方法和数据处

理方法，分别进行数据采集和数据分析，在 TraceFinder 软件中可直接查看筛查结果。如下图所示，通过对宣称有降糖作用的某保健品进行筛查，发现其中含有降糖药格列本脲和苯乙双胍。通过保留时间、一级精确质量数、碎片离子信息、同位素分布等信息，从多角度确证了样品中两种降糖药的存在。



该方法包还可以用于保健品非法添加成分的定量。利用 Q Exactive 高分辨质谱系统的卓越性能，可以在一个方法中同时实现定性与定量。下图为部分非法添加成分基质加标的标准曲线，线性范围可以达到 4 个数量级以上，并且可以达到 ppt 级的灵敏度。

该非法添加筛查方法包简单易用，可以帮助用户省却方法开发的环节，即使在缺乏部分标样的情况下也可开展非法添加筛查工作，同时也可以满足广大检测机构保健品中非法添加成分检测的需求。



中药及保健品中非法添加的 5 型磷酸二酯酶抑制剂进行快速筛查、确证及定量分析

石峰^a, 郭常川^a, 巩丽萍^a, 李军^a, 董蓬^a, 张金岭^b, 崔平^c, 姜树银^a, 赵艳霞^a, 曾苏^d
(a. 山东省食品药品检验研究院; b. 临沂市人民医院; c. 赛默飞世尔科技; d. 浙江大学)

1. 简介

近年来, 中药和保健品在世界范围内的流行度大大提高, 因为人们普遍相信其比合成类药物更为安全和健康, 且无甚副作用。然而, 有些不法份子却通过向中药和保健品中非法添加未说明的合成化合物成份来达到其产品标识中声称的作用, 给用户带来严重的健康隐患, 并给全球的分析监管带来挑战。5 型磷酸二酯酶 (PDE-5) 抑制剂是一类用于治疗勃起障碍 (ED) 的药物。在过去几年中, 在声称具有“壮阳”作用的“纯天然”中药和保健品、假药和其他未经批准的产品中, 都频繁检出西地那非、他达拉非、Thiohomosildenafil、那红地那非、piperidenafil、乙酰伐地那非等合成 PDE-5 抑制剂。而这些中药和保健品均未在包装上注明非法添加的药物, 以便生产商向监管部门和消费者隐瞒其不法添加的行为。中药和保健品以及未经批准的药物剂型中出现 PDE-5 抑制剂有可能给公众健康带来极大隐患。因为 PDE-5 抑制剂会带来一系列的不适副作用, 包括头痛、脸红、消化不良、视觉干扰、肌肉疼痛等等, 甚至严重的情况下会造成失眠或失聪, 因此在不知情的情况下从中药或保健品中摄入 PDE-5 抑制剂是非常危险的。此外, 正在服用硝酸酯类药物的患者是不能服用 PDE-5 抑制剂的, 因为这两类药物同服有可能会造成危及生命的高血压。因此, 开发高灵敏度、高选择性的分析方法来筛查中药和保健品中的 PDE-5 抑制剂刻不容缓。

在本研究中, 我们使用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱建立了一套能够对中药和保健品中非法添加的 PDE-5 抑制剂进行迅速筛查、确认和定量分析的方法。

2. 实验方法

2.1 液相色谱方法

色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil GOLD aQ C18
(100*2.1 mm, 1.9 μm)

柱温: 35 °C, 进样器: 20°C

进样体积: 5 μL

流动相: A 水相 (w) 0.1% 甲酸水溶液 B 有机相 (M) 0.1% 甲酸乙腈溶液

梯度洗脱:

时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 μL/min
0	65	35	200
0.5	65	35	200
7.5	15	85	200
8.5	15	85	200
8.51	65	35	200
10	65	35	200

2.2 质谱方法

质谱仪: Thermo Scientific™ Q Exactive 台式高分辨质谱仪。

质谱分析采用电喷雾正离子模式。在 70,000 和 17,500 分辨率 (FWHM@ m/z 200) 下分别采集高分辨全扫描一级质谱数据和数据依赖 TopN 二级质谱数据。

离子源条件：

离子源 HESI	HESI
鞘气流速	35arb
辅助气流速	10arb
喷雾电压 (KV)	3.0
毛细管柱温度 (°C)	350
加热器温度 (°C)	250
S-lens RF	50V

Q Exactive 参数设置：

质谱扫描参数	设定值
扫描模式	Full MS-ddMS ²
Full MS scan range	350-550 m/z
Resolution	Full MS:70,000FWHM AGC 1.0e ⁶ IT 100 ms MS/MS:17,500FWHM AGC 2.0e ⁵ IT 50 ms
Isolation width	0.8 m/z
Underfill ratio	1.0%
intensity threshold	4e ⁴
Dynamic exclusion	10s

2.3 样品配制

准确称取适量标准试剂，分别用乙腈溶解配成 100 µg/mL 的标准储备液。

准确称取口服单剂量固体样品 (丸状药品需提前研磨成粉末状，胶囊需除去药壳 0.2 g 或量取口服液 10 mL 转移到 50 mL 离心管，加入 20mL ACN-H₂O(1:1, v/v)，涡旋混合 1 min，超声 15 min，然后在 5000 rpm/r 离心 15 min。将上层清液用 0.22 µm 滤膜进行过滤，滤液待进行 UHPLC-MS 分析。

3. 结果与讨论

3.1 UHPLC-HRMS 优化

要得到比较好的色谱行为以及合适的离子化，色谱条件尤其是流动相组成以及梯度是很重要的影响因素。本实验比较了水相中添加甲酸、乙酸，有机相为甲醇、乙腈的不同流动相组合，发现 0.1% 甲酸水溶液 + 乙腈组合能够更好地分离目标化合物并能提供良好的色谱峰型及有效强度。

质谱条件的优化通过手动调谐来完成。

3.2 方法验证

3.2.1. 选择性

选择性是指分析方法在含有其他多种成分的基质中鉴定出被分析物并准确定量的能力。图 1A 和 B 分别展示了 PDE-5

抑制剂在空白基质和加标基质中的提取离子流图。Q- 轨道 HRMS 的分辨能力足以将基质样品中的被分析物与共流出干扰物区分开来。对基质中所有的被分析物，无一在保留时间处出现干扰峰。表 1 为十一种 PDE-5 抑制剂的分子式、保留时间和精确质量数。

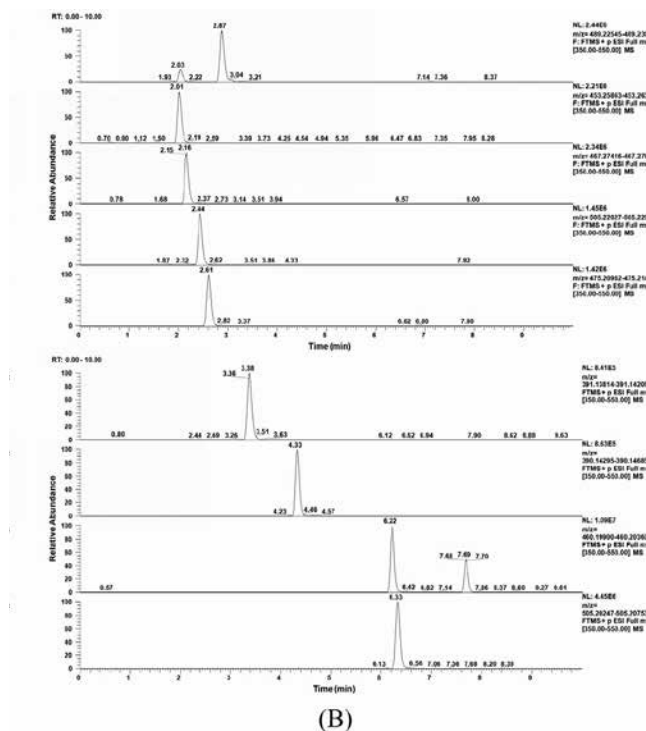
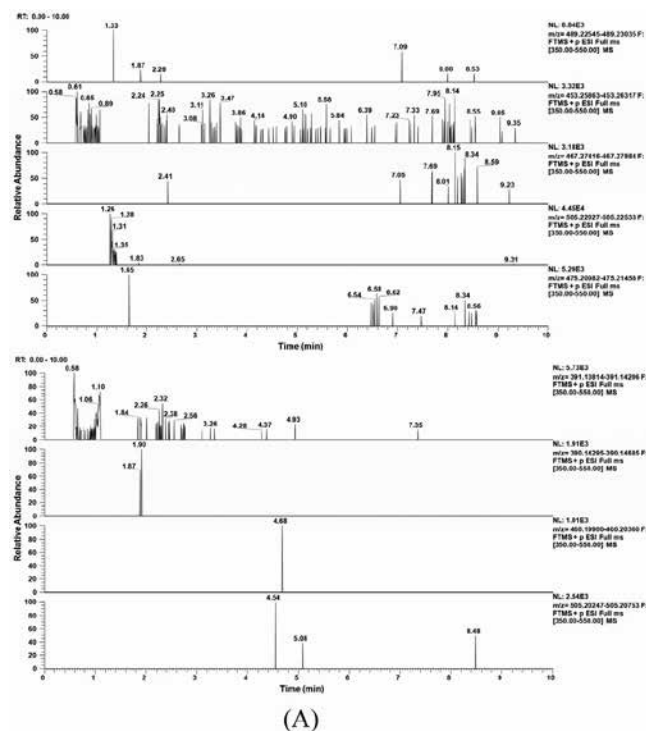


图 1. PDE-5 抑制剂的提取离子流图
(A) 空白基质 (B) 基质添加 5.0 ng/g PDE-5 抑制剂

表 1. 11 种 PDE-5 抑制剂的分子式、保留时间及精确质量数

Analyte	Molecular formula	Retention time (min)	Protonated ion mass [M+H] ⁺		Mass error (ppm)
			Theoretical	Experimental	
Vardenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	2.03	489.22785	489.22821	0.73
Homosildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	2.87	489.22785	489.22793	0.16
Noracetildenafil	C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃	2.01	453.26087	453.26158	1.58
Acetildenafil	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	2.16	467.27652	467.27682	0.65
Hydroxyhomosildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	2.44	505.22277	505.22328	1.02
Sildenafil	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	2.61	475.21220	475.21238	0.38
Aminotadalafil	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₄	3.38	391.14008	391.14079	1.81
Tadalafil	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	4.33	390.14483	390.14507	0.61
Pseudovardenafil	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	6.22	460.20130	460.20108	-0.48
Norneosildenafil	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	7.69	460.20130	460.20092	-0.83
Thioildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	6.33	505.20501	505.20475	-0.51

3.2.2. 灵敏度与线性

十一种 PDE-5 抑制剂的 LOD 值都在 1.0–10 ng/g 范围内, 而 LLOQ 在 5.0–100 ng/g 范围内, 线性相关系数 (r^2) 均高于 0.9996。本文所报道的 UHPLC–Q- 轨道阱方法的灵敏度远远高于其它已报道的能够同时检测多种 PDE-5 抑制剂的方法 [23, 28, 30]。

3.2.3. 准确度和精密度

本方法的准确度以质控 (QC) 样品的相对误差 (RE) 表示。RE 由标称浓度 (C_{nom}) 和检测浓度 (C_{det}) 的平均值计算,

公式为: $RE\% = [(C_{det} - C_{nom}) / C_{nom}] \times 100$ 。精度以相对标准偏差 (RSD) 表示, 计算公式为 $RSD\% = [\text{标准偏差 (SD)} / C_{det}] \times 100$ 。我们在三个浓度水平 (低、中、高) 下评估了方法的日间和日内准确度与精密度, 结果参见表 2。日内准确度均值的范围在 -6.6 至 6.5% 之间, 日间准确度范围在 -5.8 至 10.1% 之间。日内和日间的精密度范围分别为 0.01–13.2% 和 0.48–13.0%。方法的准确度和精密度结果都符合要求, 证明本方法在对中药和保健品进行这十一种 PDE-5 抑制剂的定量分析时能够提供可靠、可重复、并且准确的结果。

表 2. 11 种 PDE-5 抑制剂检测的日间、日内准确度及精确度

Analyte	QC concentration (μg/g)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (RE, %)	Precision (RSD, %)	Accuracy (RE, %)	Precision (RSD, %)
Vardenafil	0.05	2.0	10.7	-3.2	5.7
	0.50	2.2	3.1	-4.8	7.2
	8.0	0.11	0.32	-2.6	4.5
Homosildenafil	0.12	0.85	9.0	5.1	4.0
	1.0	-3.5	0.61	-2.4	2.45
	16	0.42	0.0039	-2.5	4.2
Noracetildenafil	0.006	-0.99	13.2	10.1	13.0
	0.10	-2.4	3.5	1.6	4.5
	4.0	-0.33	0.24	-1.2	2.3
Acetildenafil	0.012	6.5	8.4	4.3	12.8
	0.50	-3.8	0.76	-2.7	4.7
	8.0	-2.6	1.6	5.6	6.3
Hydroxyhomosildenafil	0.12	0.87	1.0	-3.2	5.7
	1.0	1.2	3.5	5.4	8.6
	16	0.6	0.039	1.8	3.0
Sildenafil	0.06	4.5	4.8	-5.8	7.4
	0.50	-1.7	0.58	2.7	0.85
	8.0	0.48	0.062	0.23	3.6
Aminotadalafil	0.12	-0.67	0.51	8.0	10.9
	1.0	-3.5	3.9	2.8	4.4
	16	0.3	0.037	3.2	3.0
Tadalafil	0.07	-0.3	0.38	1.7	3.9
	1.0	-4.1	3.9	3.3	5.4
	8.0	0.31	0.044	-1.6	2.5
Pseudovardenafil	0.12	-6.6	1.0	5.4	5.5
	1.0	-1.6	1.7	-4.1	3.2
	16	0.15	0.046	0.51	0.89
Norneosildenafil	0.06	-0.31	0.007	0.028	0.48
	0.50	-3.7	3.8	7.6	1.2
	8.0	0.28	0.1	0.94	2.3
Thioildenafil	0.12	-2.9	0.57	-3.7	1.1
	1.0	2.6	0.31	-3.3	6.0
	16	0.44	0.087	1.1	0.68

3.2.4 回收率、基质效应及稳定性

如表 3 所示, 三种不同浓度的基质添加回收率均在 85.4%–96.7%; 十一种 PDE-5 抑制剂的绝对基质效应均在可接受的范围之内: 86.3–118.6%, 且标准偏差低于 12.5%; 相对基质效应则在 1.7%–8.8% 之间。可见该方法的溶剂及相对基质效应比较低, 对于基质分析能够提供可靠的分析结果。另外, 由表 3 还可以看到基质中目标分析物的稳定性在 96.4%–104.2%, 表明所有的十一种 PDE-5 抑制剂在 20°C 的自动进样器中相当稳定, 说明该法非常适合用来进行大规模的样品筛查分析。

3.3. 应用本方法在真实样品中筛查非法添加的 PDE-5 抑制剂

我们将本研究建立的 UHPLC–Q–Orbitrap HRMS 方法应用于十一种 PDE-5 抑制剂的常规筛查, 对 68 个批次的中药和 20 个批次的保健品 (包含 83 个胶囊, 3 份丸剂和 2 份液体制剂) 进行了分析。表 4 给出了阳性样品中得到的结果, 可

见检测的中药样品均为阴性, 而 9 份保健品为阳性。图 2 展示的是 (A) 样品 G11382 中的西地那非 (m/z 475.2124) 和 (B) 样品 BW983 中的那红地那非 (m/z 453.2616) 的代表性提取离子色谱图。保留时间、准确质量、和 MS² 碎片离子数据都证明了阳性样品中西地那非和那红地那非的存在。此外, 我们还必须强调本方法能够在低浓度下实现目标化合物的可靠检测。值得注意的是大部分阳性样品违法添加西地那非的浓度都相当高 (>75 mg/g 或 0.434 mg/mL), 而那红地那非仅在一份样品中检出, 浓度为 20.5 mg/g, 不过并未检测到其他 PDE-5 抑制剂。另一个重要发现就是所有阳性样品都属于保健品, 而所有检测的中药样品均为阴性。这个现象非常值得地方政府食品药品监督管理局注意。对真实样品的分析结果显示, 基于 UHPLC–Q–静电场轨道阱 HRMS 的方法完全能够胜任市售中多种 PDE-5 抑制剂的同时定性和定量分析。

表 3. 11 种 PDE-5 抑制剂的基质效应、回收率及稳定性列表

Analyte	QC concentration ($\mu\text{g/g}$)	Absolute matrix effect (mean \pm SD, %)	Relative matrix effect (RSD, %)	Recovery (mean \pm SD, %)	Stability (mean \pm SD, %)
Vardenafil	0.05	93.6 \pm 8.8	7.4	92.7 \pm 4.9	103.1 \pm 4.7
	0.50	95.7 \pm 6.2	5.3	94.5 \pm 3.6	98.6 \pm 4.2
	8.0	106.1 \pm 4.3	6.8	96.2 \pm 5.8	99.4 \pm 5.7
Homosildenafil	0.12	112.4 \pm 9.7	4.0	88.6 \pm 7.8	96.8 \pm 4.3
	1.0	118.6 \pm 9.3	5.8	93.6 \pm 3.0	98.7 \pm 3.8
	16	103.0 \pm 4.5	2.4	91.7 \pm 6.5	99.2 \pm 2.4
Noracetildenafil	0.006	94.8 \pm 5.0	6.7	90.6 \pm 8.6	97.4 \pm 5.0
	0.10	97.9 \pm 8.3	3.9	95.1 \pm 9.4	103.5 \pm 6.6
	4.0	108.2 \pm 7.1	4.8	92.7 \pm 6.0	101.2 \pm 3.8
Acetildenafil	0.012	116.0 \pm 11.4	5.7	91.4 \pm 3.8	98.4 \pm 4.0
	0.50	92.4 \pm 6.8	4.4	95.2 \pm 7.1	101.3 \pm 3.7
	8.0	105.1 \pm 3.7	1.8	92.6 \pm 5.6	100.4 \pm 6.5
Hydroxyhomosildenafil	0.12	108.4 \pm 6.9	6.5	95.4 \pm 4.2	99.5 \pm 4.6
	1.0	113.0 \pm 10.8	3.7	94.6 \pm 5.5	100.8 \pm 7.6
	16	96.4 \pm 7.6	4.1	95.7 \pm 3.1	100.4 \pm 2.8
Sildenafil	0.06	106.0 \pm 7.3	8.8	87.0 \pm 6.7	96.5 \pm 4.4
	0.50	105.4 \pm 4.8	5.2	93.9 \pm 6.4	98.7 \pm 3.1
	8.0	95.1 \pm 6.6	6.4	92.4 \pm 5.8	99.5 \pm 2.6
Aminotadalafil	0.12	87.2 \pm 11.0	6.2	86.5 \pm 6.4	104.2 \pm 3.5
	1.0	91.5 \pm 8.7	5.4	94.0 \pm 5.1	98.6 \pm 2.6
	16	101.6 \pm 5.4	1.7	95.7 \pm 8.6	100.4 \pm 1.9
Tadalafil	0.07	117.4 \pm 8.0	4.5	91.7 \pm 4.4	100.6 \pm 3.6
	1.0	95.1 \pm 8.3	8.1	92.5 \pm 8.6	99.1 \pm 5.1
	8.0	104.1 \pm 6.0	5.6	94.6 \pm 7.2	100.4 \pm 0.8
Pseudovardenafil	0.12	107.2 \pm 5.8	6.8	96.7 \pm 9.4	99.6 \pm 6.5
	1.0	115.4 \pm 10.6	7.4	95.7 \pm 7.3	97.2 \pm 2.4
	16	94.6 \pm 4.1	2.5	93.7 \pm 4.7	102.6 \pm 4.7
Norneosildenafil	0.06	86.3 \pm 6.1	5.4	85.4 \pm 5.4	96.4 \pm 3.7
	0.50	94.2 \pm 8.5	8.7	89.6 \pm 6.9	98.1 \pm 6.0
	8.0	93.0 \pm 7.4	5.9	92.6 \pm 5.0	101.5 \pm 2.0
Thioaildenafil	0.12	95.7 \pm 3.8	8.2	93.7 \pm 7.5	103.6 \pm 5.7
	1.0	106.2 \pm 12.5	5.1	91.8 \pm 8.4	96.5 \pm 1.8
	16	97.4 \pm 6.2	5.4	94.6 \pm 2.8	100.8 \pm 3.1

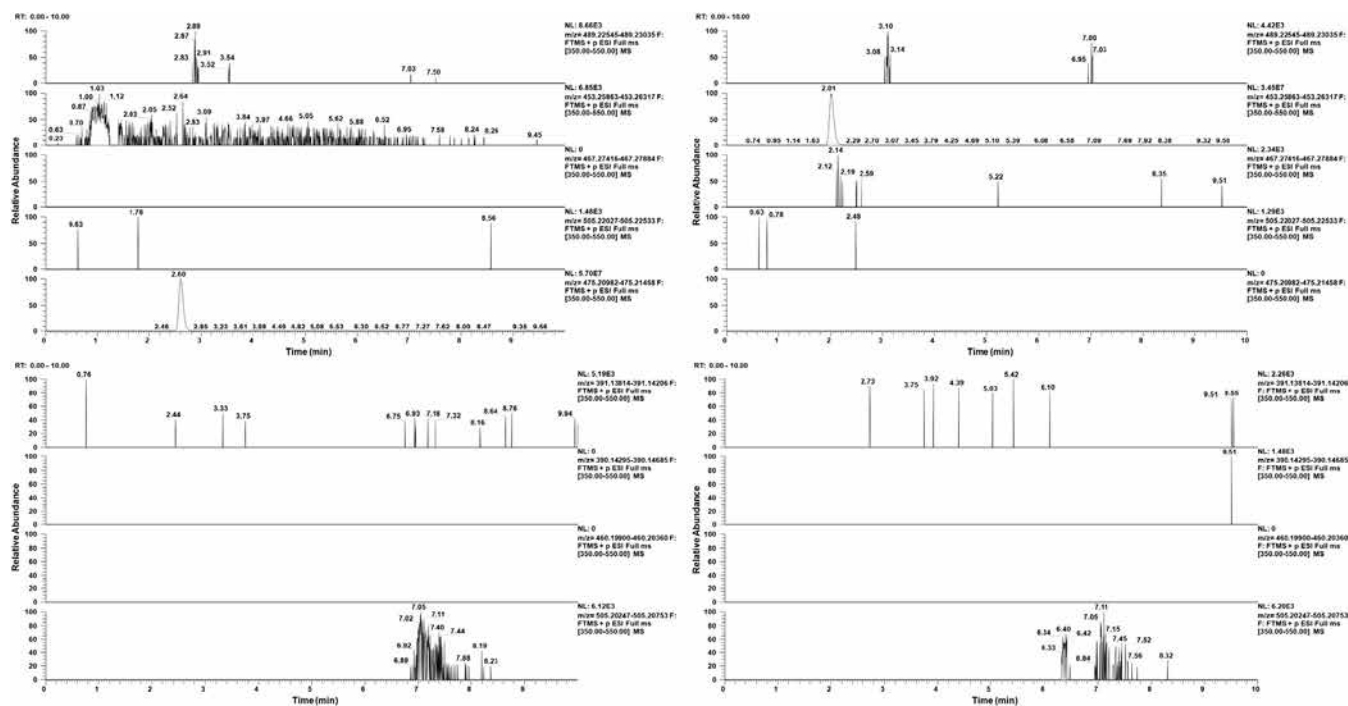


图 2. 两个代表性阳性样品的提取离子流图

表 4. 中草药及保健品等实际样品中 11 种 PDE-5 抑制剂的检测结果

Inspection no.	Place of production	Illegally adulterated aphrodisiac	Dosage form	Content
BW921	Tokyo, Japan	Sildenafil	Oral liquid	0.434 mg/mL
BW983	Tainan, Taiwan, China	Noracetildenafil	Capsule	20.5 mg/g
G1113374	Hong Kong, China	Sildenafil	Capsule	81.2 mg/g
G1113375	Hong Kong, China	Sildenafil	Capsule	75.8 mg/g
G1113376	Hong Kong, China	Sildenafil	Capsule	104.7 mg/g
G1113377	Lhasa, China	Sildenafil	Capsule	115.7 mg/g
G1113379	Lhasa, China	Sildenafil	Capsule	96.6 mg/g
G1113381	Lhasa, China	Sildenafil	Capsule	82.0 mg/g
G1113382	Lhasa, China	Sildenafil	Capsule	76.7 mg/g

4. 结论

本文建立了一套快速、高灵敏度、高选择性的 Q-Orbitrap HRMS 方法，并应用此方法对中药和保健品中非法添加的 PDE-5 抑制剂进行了筛查、确认和定量分析。Q-Orbitrap 串联质谱的全扫描精确质量和 MS² 谱图采集足以支持多种被分析物的同时鉴定、确证和定量分析，信号响应在很大浓度范围内 (e.g., 西地那非为 0.05–10 μg/g) 与被分析物的浓度呈线性，所有校准曲线的相关系数 (r^2) 均 > 0.9996。不同被分析物的检测限不尽相同，但均在 1.0–5.0 ng/g 范围内。回收率为 85.4% 至 96.7%，日内和日间准确率范围为 -6.6 至 10.1%，日内和日间精密密度范围为 0.0039% 至 13.2%。在筛查的 68 个批次的中药样品和 20 个批次的保健品样品 (包含 83 个胶囊, 3 份丸剂和 2 份液体剂) 中, 有 8 份保健品样品中均

检出西地那非, 另有一份保健品样品检出那红地那非。本研究证明, 新型 Q-Orbitrap 质谱仪在对中药和保健品中的非法添加物进行常规分析、保证食品安全和公众健康方面是功能强大、潜力巨大的工具。

文章出处:

Shi F, Guo C, Gong L, et al. Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1344: 91-98

中药及保健品中非法添加的降糖药进行同时鉴定、确证及定量分析

郭常川^a, 石峰^a, 姜树银^a, 巩丽萍^a, 赵艳霞^a, 张金岭^b, 曾苏^c

(a. 山东省食品药品检验研究院; b. 临沂市人民医院; c. 浙江大学)

1. 简介

近年来, 中药和保健品的使用范围和流行度蓬勃增长。然而许多此类产品的质量都难以保证, 给消费者带来多重风险, 并引起国内外多家健康机构的担忧。世界卫生组织 (WHO) 和欧盟 (EU) 发布了多份关于安全合理使用中药和保健品的指令和法案。然而, 近年来向标识为“纯天然”的中药和保健品中非法添加未说明的合成化合物成份这一现象越来越普遍, 给用户带来严重的健康隐患, 并给全球的分析监管带来挑战。国际上有些不法生产商向他们的产品中违法添加合成化合物以欺瞒消费者, 让消费者误以为他们体验到的是其产品的神奇健康疗效。在过去几年中, 在标识为“纯天然”的中药或保健品中频繁检出未在成份中标明的二甲双胍、格列本脲 (glibenclamide) 和罗格列酮 (rosiglitazone) 等合成型降糖药。大量服用这类产品的糖尿病患者有可能会产生由这些合成类药物引起的低血糖、消化道不适、肝肾损伤等不良反应。违法添加这一行为不但会危及消费者的健康, 而且还会助长违法犯罪行为。因此, 开发快速筛查、确证和定量分析方法来筛查中药和保健品中非法添加的降糖药刻不容缓。

Orbitrap 是高分辨质量分析器中最新的成员。它的新颖设计结合了高的扫描速度和极佳的定量能力, 在很多分析应用中极具前景。其分辨率能够实现超过 1 000 000 的分辨能力, 而相对质量精度可达到 < 0.1 至 1 ppm 水平。作为最新的串联质谱技术, Q Exactive™ (四极杆 - 轨道阱, Q-Orbitrap) 质谱仪结合了高效的四极杆初级离子选择性与高分辨率和准确质量分析 (HR/AM), 使得单次分析即可实现可靠的鉴定、确证和定量分析。这一创新型的功能被称为“quanfirmation (确证定量)”。本研究的目标是使用先进的 Q-Orbitrap 建立一套迅速的鉴定、确证和定量分析方法, 实现对违法添加了合成降糖药的中药和保健品的筛查分析。

2. 实验方法

2.1 液相色谱方法

色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil GOLD aQ C18 (100*2.1 mm, 1.9 μm)

柱温: 35 °C, 进样器: 20 °C

进样体积: 5 μL

流动相: A 水相 0.1% 甲酸水溶液; B 有机相 0.1% 甲酸乙腈溶液

梯度洗脱:

时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 μL/min
0	96	4	300
1	96	4	300
3.5	50	50	300
7.5	30	70	300
9.5	30	70	300
9.51	96	4	300
12	96	4	300

2.2 质谱方法

质谱仪: Thermo Scientific™ Q Exactive 台式高分辨质谱仪。

质谱分析采用电喷雾正离子模式。

Q Exactive 参数设置:

质谱扫描参数	设定值
扫描模式	Full MS-ddMS ²
Full MS scan range	100-550 m/z
Resolution	Full MS:70,000FWHM AGC 1.0e ⁶ IT 100 ms MS/MS:35,000FWHM AGC 2.0e ⁵ IT 50 ms
Isolation width	1.0 m/z
Underfill ratio	1.0%
intensity threshold	4e ⁴
Dynamic exclusion	10s

2.3 样品配制

准确称取适量标准试剂，分别用乙腈溶解配成 100 µg/mL 的标准储备液。所有标液均于 -20°C 下避光保存。

准确称取 0.5 g 样品于 10 mL 容量瓶，加入 7 mL ACN-H₂O (6:4, v/v)，涡旋混合 0.5 min，20°C 超声 15 min，然后用 ACN-H₂O (6:4, v/v) 稀释至刻度，静置 10 min，将上层清液用 0.22 µm 滤膜进行过滤，空白样品按上述方法制备。

3. 结果与讨论

3.1 UHPLC-HRMS 方法优化

质谱条件的优化通过手动调谐来完成，优化结果如下表所示：

离子源	HESI	HESI
鞘气流速		35arb
辅助气流速		10arb
喷雾电压 (KV)		3.0
毛细管柱温度 (°C)		350
加热器温度 (°C)		250
S-lens RF		50V

3.2 方法验证

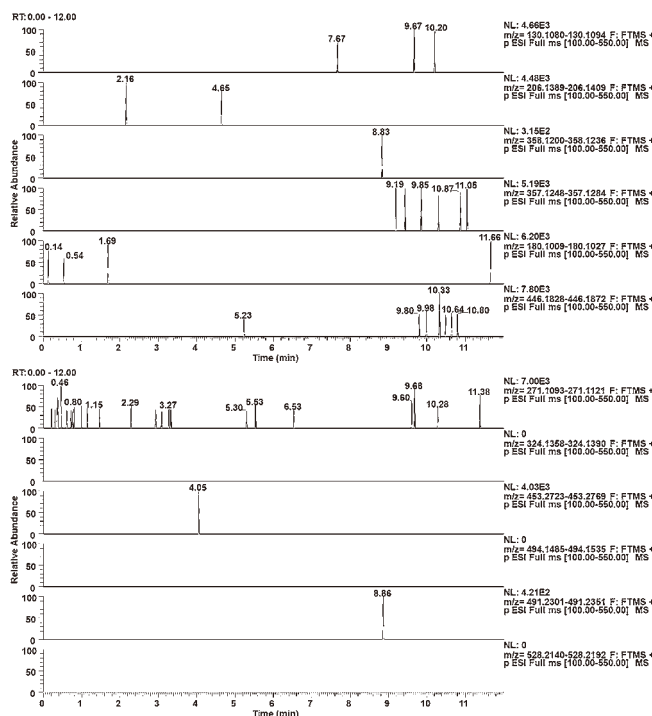
3.2.1. 选择性

空白基质 (图 1A) 和降糖药基质加标 (图 1B) 的典型提取离子色谱图参见图 2。由谱图可见 Q-Orbitrap HRMS 有足够分辨率区分被分析物与共流出基质干扰。对于所有被分析物，无一在空白基质的保留时间处出现干扰峰。

3.2.2. 标准曲线

由表 1 可见，所有 LOD 值均在 0.05–0.5 ng/g 范围内，而 LLOQ 则在 0.2–2 ng/g 范围内。而校准曲线线性良好，所有被分析物的相关系数 (r^2) 均高于 0.9991。

(A)



(B)

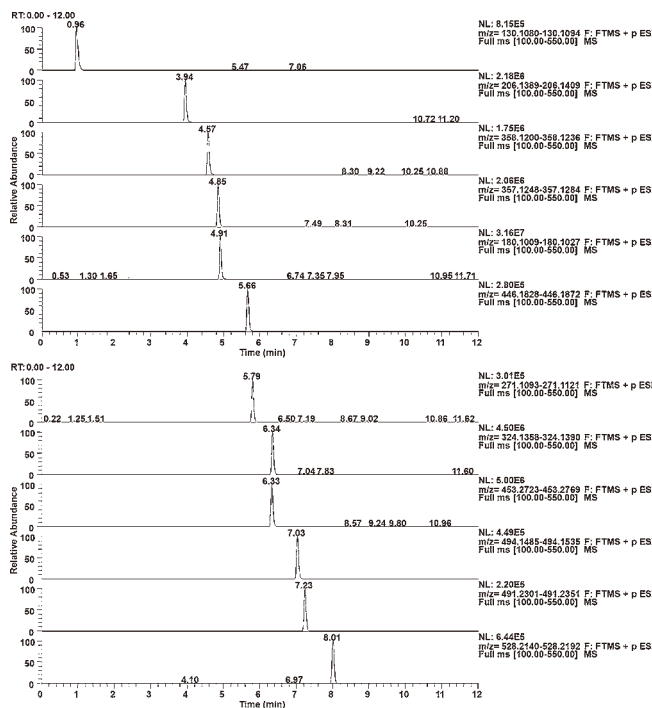


图 1. 降糖药的提取离子流图 (A)
空白基质 (B) 2 ng/g 基质添加

表 1. 降糖药物的回归方程、相关系数、线性范围以及 LLOQ、LOD

Analyte	Regression equation	Correlation coefficient (r^2)	Linear range ($\mu\text{g/g}$)	LLOQ (ng/g)	LOD (ng/g)
Metformin	$y = 0.0224 + 1.7549x$	0.9994	0.0004–1	0.4	0.1
Phenformin	$y = 0.0332 + 2.2288x$	0.9991	0.0004–1	0.4	0.1
Rosiglitazone	$y = 0.0139 + 1.2662x$	0.9998	0.0005–1	0.5	0.1
Pioglitazone	$y = 0.0134 + 1.1737x$	0.9996	0.0005–1	0.5	0.1
Glipizide	$y = 0.0023 + 0.4089x$	0.9999	0.002–1	2	0.5
Tolbutamide	$y = 0.0034 + 0.7318x$	0.9998	0.002–1	2	0.5
Gliclazide	$y = 0.0153 + 1.5748x$	0.9992	0.0002–1	0.2	0.05
Repaglinide	$y = 0.0235 + 2.6194x$	0.9995	0.0002–1	0.2	0.05
Glibenclamide	$y = 0.0060 + 0.3831x$	0.9996	0.002–1	2	0.5
Glimepiride	$y = 0.0022 + 0.4588x$	0.9999	0.002–1	2	0.5
Gliquidone	$y = 0.0018 + 0.3527x$	0.9999	0.002–1	2	0.5

3.2.3. 准确度和精密度

分析方法的准确度是指方法对被分析物测量结果的平均值与真实值（浓度）的接近程度。除了在 LLOQ 处，准确度的平均值应该在真实值的 15% 范围内，而 LLOQ 处的准确度也不应超过 20%。分析方法的精密度则是指在对单一均质生物基质分装出的多份样品用同一方法进行反复测量时，单次测量值之间的接近程度。除了在 LLOQ 浓度处，每个浓度下测得的精度值都不应超过 15% 相对标准偏差（RSD），而 LLOQ 处的精度则不应超过 20% RSD。表 2 给出了在（低、中、高）三个加标浓度下测得的准确度以及日内和日间精度值。准确度

范围为 -6.75 至 3.85%。日内和日间精度值则分别在 0.048–8.0 和 0.85–11.5% 范围内。为避免低估了精密度，日内和日间精度是使用日期作为分组变量、通过单因素 ANOVA、从持续 5 天、每天 5 次重复实验构成的数据组中计算得到的，F 值和 P 值都参见表 2。由表可见绝大部分 P 值都小于 0.05，即日内和日间精度并无显著差异。以上结果都在准确度和精度的可接受范围内，证明此方法在对基质中的 11 种降糖药进行定量分析时是可靠、可重复的。

表 2. 降糖药物检测的日间、日内准确度及精确度（n=5）

Analyte	QC concentration (ng/g)	Accuracy	Precision			
			Intra-day (RSD, %)	Inter-day (RSD, %)	ANOVA	
					F	P
Metformin	0.5	-0.40	7.6	6.5	3.57	0.161
	20	3.10	3.1	7.2	6.57	0.080
	800	-0.77	0.32	2.5	8.41	0.059
Phenformin	0.5	3.15	5.0	6.7	6.54	0.081
	20	3.35	0.61	3.5	5.80	0.093
	800	-1.80	0.048	2.2	14.39	0.029
Rosiglitazone	0.5	3.15	4.8	7.4	6.40	0.083
	20	-0.20	3.5	4.5	5.79	0.093
	800	0.86	0.24	3.2	22.65	0.015
Pioglitazone	0.5	3.85	8.0	11.5	6.64	0.079
	20	-2.75	0.66	4.7	11.59	0.039
	800	0.50	1.6	3.4	8.90	0.055
Glipizide	2	-4.95	1.0	7.2	36.19	0.008
	40	3.30	3.5	6.8	8.19	0.061
	800	0.94	0.096	1.4	6.48	0.082
Tolbutamide	2	-6.75	4.8	4.1	3.19	0.181
	40	3.20	0.58	1.2	3.13	0.184
	800	-0.16	0.062	0.88	6.59	0.080
Gliclazide	0.2	2.15	5.3	10.9	8.27	0.060
	10	2.95	3.4	4.4	3.20	0.181
	800	0.05	0.047	3.5	27.45	0.012
Repaglinide	0.2	0.35	0.38	1.8	7.22	0.071
	10	3.25	3.9	4.6	3.37	0.171
	800	-0.15	0.54	0.94	4.12	0.138
Glibenclamide	2	1.40	6.0	3.4	1.44	0.365
	40	-2.85	1.7	5.8	12.95	0.033
	800	0.60	0.076	1.9	7.19	0.072
Glimepiride	2	-1.20	2.7	4.8	8.10	0.062
	40	1.25	3.8	2.1	1.62	0.333
	800	-0.43	0.40	1.3	4.56	0.123
Gliquidone	2	-2.19	3.5	6.7	5.47	0.100
	40	0.85	1.3	2.1	5.58	0.097
	800	-0.55	0.075	0.85	3.42	0.168

3.2.4 回收率、基质效应及稳定性

如表 3 所示，所有被分析化合物三种不同浓度的基质添加回收率均在 74.3% 以上；绝对基质效应均在 -17.6-6.5%，且准偏差低于 5.3%；相对基质效应则在 2.5%-8.6% 之间。可见该方法的溶剂及相对基质效应比较低，对于基质分析能够提

供可靠的分析结果。另外，由表 3 还可以看到基质中目标分析物的稳定性在 96.8%-103.6%，表明所有的目标分析化合物在 20℃ 的自动进样器中相当稳定（24 h），说明该法非常适合用来进行大规模的样品筛查分析。

表 3. 降糖药物的基质效应、回收率及稳定性 (n=5)

Analyte	QC concentration (µg/g)	Absolute matrix effect (mean ± SD, %)	Relative matrix effect (RSD, %)	Recovery (mean ± SD, %)	Stability (mean ± SD, %)
Metformin	0.5	-16.4 ± 3.8	8.0	78.7 ± 4.9	102.4 ± 3.4
	20	-14.3 ± 3.2	6.3	74.5 ± 3.6	97.6 ± 4.2
	800	-11.9 ± 1.3	6.8	80.2 ± 5.8	100.3 ± 3.7
Phenformin	0.5	-7.6 ± 1.7	7.1	77.6 ± 7.8	96.8 ± 4.3
	20	-11.4 ± 3.3	5.8	79.0 ± 3.0	98.4 ± 2.8
	800	-6.5 ± 1.9	3.2	75.7 ± 2.7	99.2 ± 1.4
Rosiglitazone	0.5	-15.2 ± 4.1	7.6	74.6 ± 8.6	98.4 ± 4.2
	20	-12.6 ± 3.3	4.5	77.3 ± 7.6	103.6 ± 2.6
	800	-13.0 ± 2.4	4.8	78.7 ± 6.0	100.2 ± 2.1
Pioglitazone	0.5	-14.8 ± 4.6	5.7	81.4 ± 3.8	98.9 ± 3.4
	20	-17.6 ± 5.3	4.4	75.0 ± 7.1	103.3 ± 1.8
	800	-14.5 ± 3.7	3.8	78.6 ± 3.6	100.7 ± 0.86
Glipizide	2	-11.6 ± 3.5	6.5	75.4 ± 4.2	99.4 ± 4.6
	40	-16.4 ± 4.8	7.3	74.9 ± 5.5	97.9 ± 3.5
	800	-14.0 ± 1.6	4.1	79.7 ± 3.1	100.6 ± 1.1
Tolbutamide	2	-15.3 ± 4.3	8.6	77.0 ± 6.7	97.5 ± 3.8
	40	-14.6 ± 4.6	4.8	79.3 ± 6.4	97.8 ± 3.6
	800	-8.8 ± 1.2	6.4	76.6 ± 5.8	99.2 ± 1.5
Gliclazide	0.2	-16.5 ± 4.1	6.9	76.5 ± 6.4	103.2 ± 4.9
	10	-12.4 ± 3.3	5.4	74.3 ± 5.1	98.8 ± 2.7
	800	-18.4 ± 4.5	3.7	75.7 ± 4.2	101.4 ± 2.4
Repaglinide	0.2	-12.6 ± 4.0	6.5	81.7 ± 4.4	100.1 ± 3.6
	10	-14.9 ± 5.1	8.1	82.5 ± 8.6	99.5 ± 5.1
	800	-8.9 ± 2.7	3.6	94.6 ± 3.8	100.6 ± 0.85
Glibenclamide	2	-12.8 ± 3.8	6.8	86.0 ± 8.4	99.6 ± 4.2
	40	-13.2 ± 3.6	8.4	89.2 ± 7.3	98.3 ± 2.4
	800	-16.2 ± 4.1	2.8	90.7 ± 4.7	102.4 ± 3.7
Glimepiride	2	-13.8 ± 4.4	5.4	85.4 ± 5.4	97.8 ± 3.6
	40	-10.4 ± 3.8	7.8	84.6 ± 6.9	98.1 ± 4.4
	800	-6.7 ± 1.4	4.9	82.6 ± 5.0	101.0 ± 2.1
Gliquidone	2	-14.7 ± 3.8	8.2	78.7 ± 7.5	102.6 ± 5.2
	40	-14.3 ± 2.9	5.6	81.5 ± 5.4	98.4 ± 1.9
	800	-12.1 ± 2.5	2.5	84.6 ± 2.8	100.5 ± 3.0

3.3 实际样品中筛查确证非法添加降糖药

我们将本研究建立的分析方法应用于非法添加的降糖药的筛查，对 63 个批次的中药和 34 个批次的保健品进行了分析，并借助基质匹配的校准曲线计算出非法添加的降糖药的浓度。阳性样品中得到的结果参见表 4，可见检测的中药样品均为阴性，而 7 份保健品为阳性。

表 4. 中药和保健品中非法添加的 11 种降糖药物的检测

Inspection No.	Contents of illegally adulterated antidiabetics (mg/g)		
	Metformin	Phenformin	Glibenclamide
BC201300598	234.48	-	32.99
BC201300599	151.92	-	25.14
BC201300600	35.13	-	15.46
BC201300601	69.30	-	-
BC201300615	5.52	-	7.84
BC201300629	-	26.94	13.77
BC201300630	-	63.41	17.23

图 2 显示的是有代表性的阳性样品 BC201300615 的提取离子色谱图。违法添加的药物包括二甲双胍，苯乙双胍和 格列本脲，浓度在 mg/g 水平。值得注意的是，违法添加的药物浓度都相当高 (>10 mg/g)，对公众健康可能造成极大影响。以上结果也证明，这套 UHPLC-Q-Orbitrap HR MS 方法能够胜任在市售中药和保健品中进行降糖药的同时鉴定、确证和定量分析。

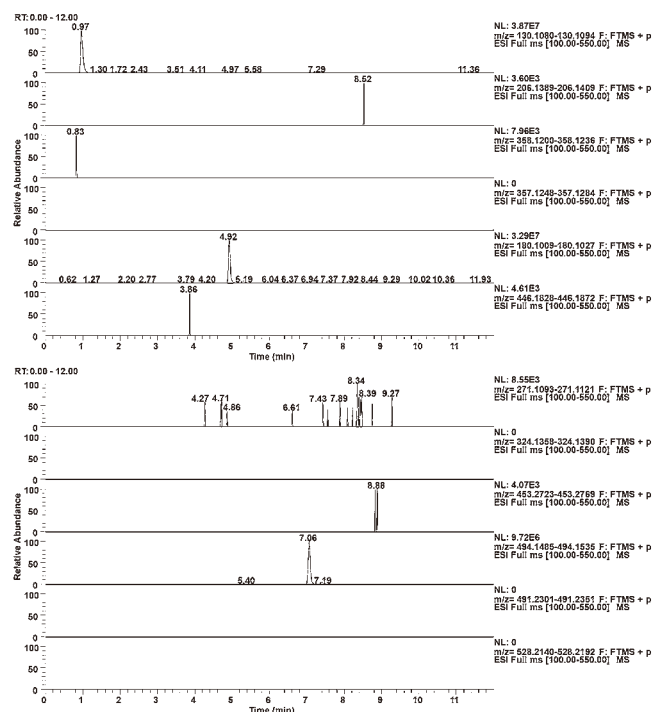


图 2. 100 稀释的阳性样品 BC201300615 (二甲双胍 5.52 mg/g、格林苯脲 7.84 mg/g) 提取离子流图

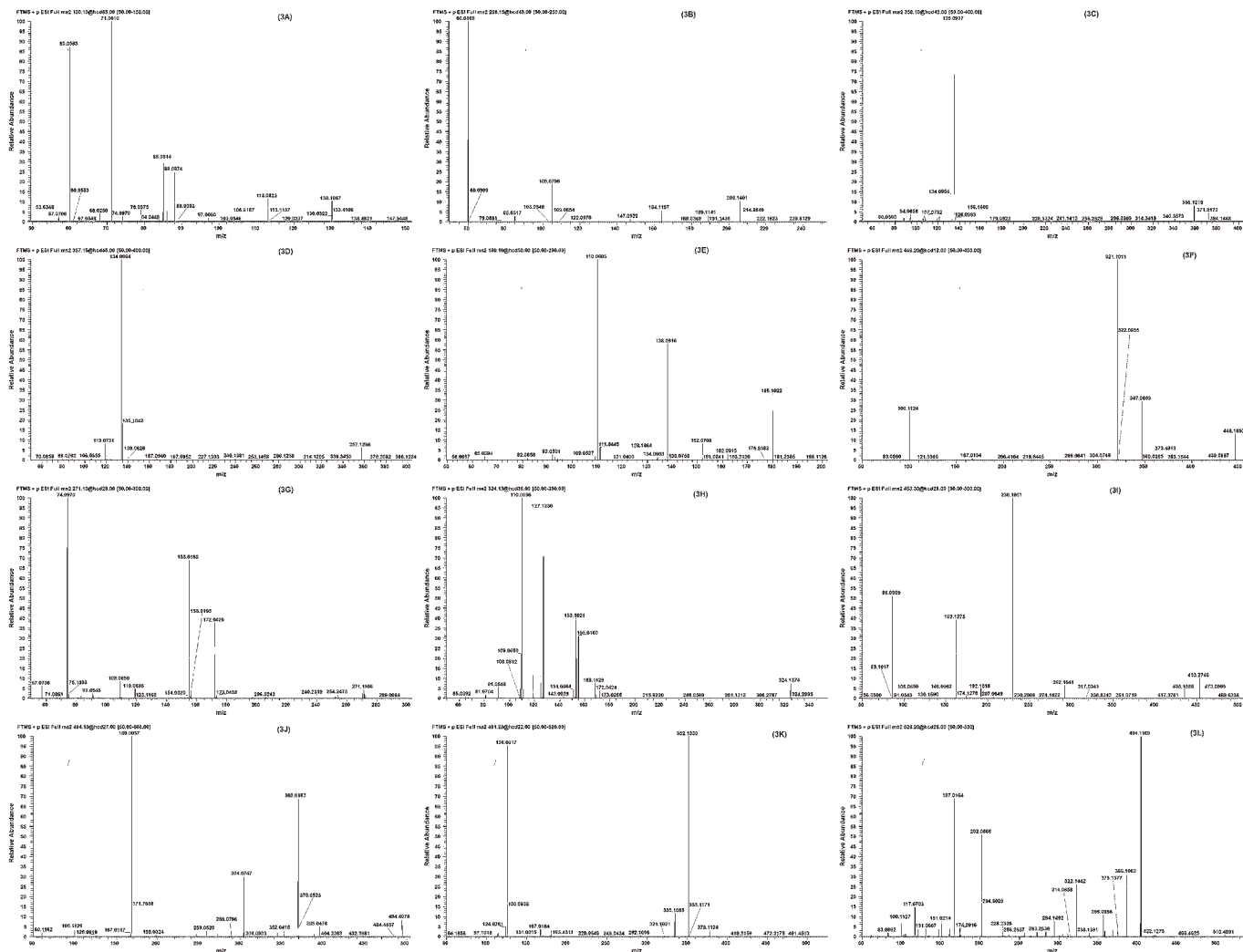


图 3. 降糖药物的 MS² 碎片离子谱图: (A) 二甲双胍 (B) 苯乙双胍 (C) 罗格列酮 (D) 吡格列酮 (E) 非那西汀 (F) 格列吡嗪 (G) 甲糖宁 (H) 格列齐特 (I) 瑞格列奈 (J) 格列本脲 (K) 格列美脲 (L) 格列喏酮

4. 结论

本文证明 UHPLC-Q-Orbitrap HR MS 方法是进行中药和保健品中违法添加的降糖药筛查的重要且有力的工具。本方法使用了 FullMS/dd-MS² 模式, 其中全扫描一级精确质量数能够保证无与伦比的定量准确度、精密度和灵敏度, 而 dd-MS² 则提供了有精确质量信息的产物离子谱图以确保结果的准确性 (图 3)。据我们所知, 这是 Orbitrap HRMS 技术第一次被应用于中药或保健品中非法添加的降糖药的鉴定、确证和定量分析。我们也评估了本方法在鉴定市售商品中的降糖药的分析效果。在筛查的 63 个批次的中药样品和 34 个批次的保健品样品中, 有 7 份保健品样品中均检出非法添加的降糖药, 而中药样品结果皆为阴性。本研究证明, 本研究开发的方法能够以高灵敏度、高选择性实现未标注降糖药的鉴定、确证和定量分析。为与中药和保健品中违法添加行为的斗争再贡献一个有力的工具。

文章出处:

Guo C, Shi F, Jiang S, et al. Simultaneous identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary supplements using high-resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 967: 174-182.

中药及天然产物定量工作流程

多模式定量数据采集

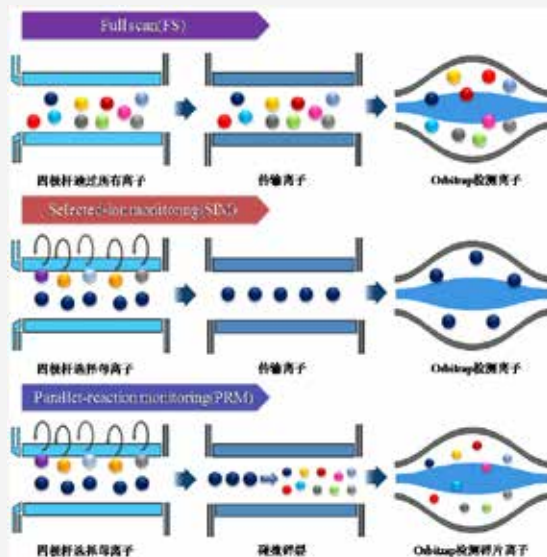
定量数据分析



UltiMate 3000
UHPLC



Q Exactive系列



TraceFinder

Q Exactive 系列仪器将高性能四极杆与高分辨 Orbitrap 技术相结合，具有超高分辨率和长期稳定的高质量精度，媲美高端三重四极杆的灵敏度和宽线性范围可轻松定量中药中的微量组分。其可提供不同的高分辨定量模式，满足不同性质化合物的定量需要。

a) 全扫描 (FullScan) 高分辨定量：所有扫描范围内的化合物离子通过四极杆，送入 Orbitrap 后得到检测，再通过精确质量数从 Fullscan 数据中提取 EIC 图谱进行定量，因为 Q Exactive 系列具有良好的质量精度，因此可以将提取窗口缩小至 5 ppm 甚至更低，充分保证了方法极高的选择性，该种定量方式无需预知化合物信息，可以记录所有已知和未知的化合物质谱信号，方便数据的回溯分析。

b) 选择离子检测 (SIM) 高分辨定量：通过四极杆对目标化合物进行选择性通过，然后将目标化合物送入 Orbitrap 进行高分辨扫描，然后通过一级精确质量数提取 XIC 图谱进行定量。该种定量方式通过高性能四极杆的筛选和过滤，可去除大量的干扰离子，使目标化合物更多的进入检测器，提升了检测的灵敏度。

c) 平行反应检测 (PRM) 高分辨定量：通过四极杆对目标化合物进行选择性通过，离子在通过后进入碰撞池发生高能碰撞碎裂，所产生的碎片将被同时送入 Orbitrap 进行高分辨扫描，然后选择高分辨的二级子离子进行定量。该定量方式通过四极杆过滤掉大量干扰离子提高了灵敏度的同时，二级高分辨质谱进一步提高了定量的专属性。

中药活性成分汉黄芩苷高分辨质谱定量

侯朋艺 明红

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

汉黄芩苷；活性成分；高分辨定量；Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱

摘要

建立了高分辨定量分析中药活性化合物汉黄芩苷的反相超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱的分析方法。通过 Q Exactive 系列质谱所提供的高灵敏度和高稳定性结果，对仪器灵敏度、稳定性以及汉黄芩苷的线性关系进行展示，以证明该型号仪器采用高分辨率定量的可行性。

引言

中药成分繁多，含量相对较低，而其发挥药效是建立在多种复杂化学成分综合作用基础上的，因此中药中有效成分的含量控制具有重要的意义，尤其是多种成分的同时定量为中药复方及相关制剂的质量控制提供了有力的保障。近年来，随着质谱技术在药物研究领域中的广泛普及，液相色谱串联三重四极杆质谱技术往往应用于解决中药成分定量问题。但是，中药成分十分复杂，采用低分辨质谱对中药成分进行分析时，往往会遇到基质干扰等问题，给方法开发带来了巨大的困难，这时就急需一种同时具有高分辨率和高灵敏度的仪器来解决这一难题。

本文采用超高效液相 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱联用技术对中药活性成分汉黄芩苷进行了定量能力分析。本实验在优化的液质条件下，采用一级全扫描（Full ms）模式，根据仪器所采集的精确分子量，在小于 ± 3 ppm 的质量偏差范围内对目标离子进行峰提取，进行灵敏度和线性关系考察，从而展示采用 Q Exactive 系列高分辨质谱进行中药活性成分定量研究的可行性。

1. 实验方法

1.1 试剂与样品制备

甲醇和乙腈（色谱纯，美国 Fisher Scientific）；精密称取汉黄芩苷对照品适量，用甲醇溶解后，稀释成浓度为 10 pg/mL~100 ng/mL 系列样品溶液，直接进样分析。

1.2 液相色谱条件

仪器：Thermo Scientific™ Dionex UltiMate 3000 液相色谱仪
色谱柱：Thermo Scientific™ Hypersil GOLD C18 (50 × 2.1 mm, 1.9 μm)

流动相：A 为水相：0.1% 甲酸 - 水；B 为有机相：乙腈

表 1. 流动相梯度条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
1	90	10
4	5	95
4.5	5	95
4.6	90	10
6	90	10

流速：0.3 mL/min，进样量：10 μL，柱温为 35 °C。

1.3 质谱条件

仪器：Thermo Scientific™Q Exactive 系列四极杆 - 静电场轨道阱串联高分辨质谱仪

质谱参数：HESI Spray voltage: +3.5/-3.2 kV; Sheath Gas Pressure: 35 arb; Aux Gas Pressure: 10 arb; Capillary Temp: 320°C; Heater Temp: 350°C; Scan mode: Full MS (Resolution 70,000); Scan range: m/z 400 ~ 500。

2. 实验结果

图 1 为样品在正负切换扫描模式下的总离子流 (TIC) 和提取离子流 (EIC) 色谱图。

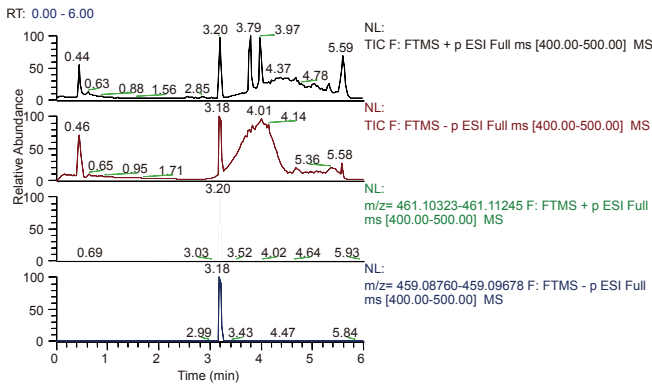


图 1. 正负切换扫描模式下的总离子流和提取离子流色谱图

Q Exactive 系列高分辨质谱具有 3 个可调节的分辨率档位：70000、35000 和 17500 FWHM。仪器在具有高分辨率的同时，具有高灵敏度。图 3 为同一浓度样品在不同分辨率条件下的提取离子流色谱图，从图中可以看出，随着分辨率的不断升高，所测目标化合物的峰面积不发生明显变化。这表明 Q Exactive 系列仪器能够保证在高分辨率条件下，同时不损失灵敏度。这一优势可以真正实现复杂基质中高分辨率定量。

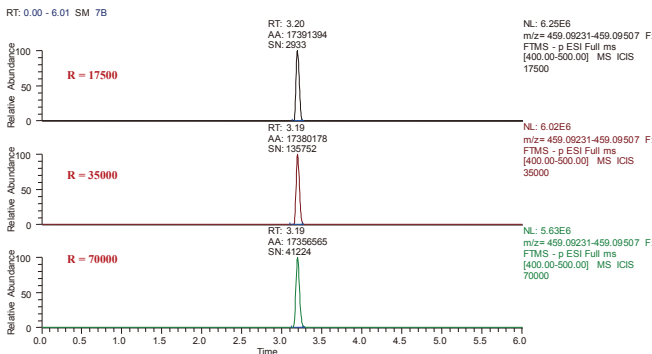


图 3. 汉黄芩苷同一浓度不同分辨率下提取离子流色谱图

Q Exactive 系列高分辨质谱仪采用外标校正法，其校正过程简单、快速。该系列仪器只需进样一针，即可同时获得正负离子两种扫描模式的一级和二级质谱图。一级质谱图具有超高质量精度，其质量偏差小于 ± 1 ppm。汉黄芩苷的一级质谱图如图 2 所示。在 $t_R = 3.20$ min 处，正离子模式下可见 $[M+H]^+$ m/z 461.10852。准分子离子峰 $[M+H]^+$ 实测值与理论值 $[C_{22}H_{20}O_{11} + H]^+$ m/z 461.10784 的偏差为 -0.90 ppm；负离子模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 459.09369。准分子离子峰 $[M-H]^-$ 实测值与理论值 $[C_{22}H_{20}O_{11}-H]^-$ m/z 459.09328 的偏差为 0.88 ppm。

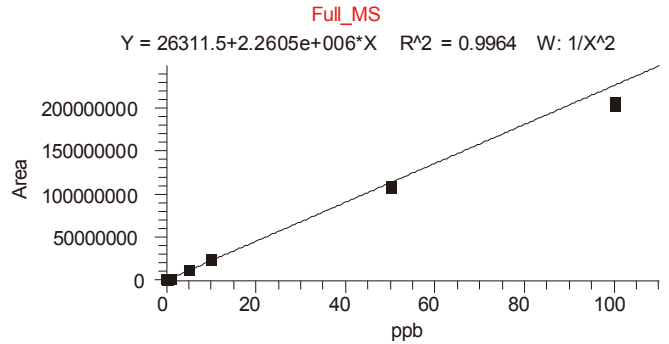


图 4. 汉黄芩苷标准曲线

将浓度为 10 pg/mL~100 ng/mL 的系列样品溶液在全扫描模式下分别进样分析，所得标准曲线如图 4 所示。由结果可知，汉黄芩苷在 4 个数量级范围内，线性关系良好， $R^2 = 0.9964$ ，定量下限为 10 pg/mL，该结果可以满足该化合物在体内和体外各类型实验的检测需求。

其每个浓度点重复进样 3 次，所得峰面积的 RSD% 见表 2。从结果可以看出，在整个标准曲线范围内，各浓度点的 RSD% 均小于 3%，表明此方法可以完美用于该线性范围内的准确定量。

表 2. 全扫描模式下各浓度点 RSD% 值

Concentration (pg/mL)	Area (average)	RSD (%)
10	51300	2.0
50	131617	2.7
100	245678	2.6
500	1135410	0.54
1000	2283255	1.5
5000	12112650	0.28
10000	24039849	0.9
50000	107661983	1.8
100000	205833019	1.3

选取标准曲线上中等浓度 100 pg/mL 和 10 ng/mL 的两个溶液，分别连续进样 6 针，计算 RSD%，以考察仪器稳定性，结果见图 5 和图 6。由结果可知，其 RSD% 分别为 1.1% 和 1.0%，表明仪器具有高稳定性。

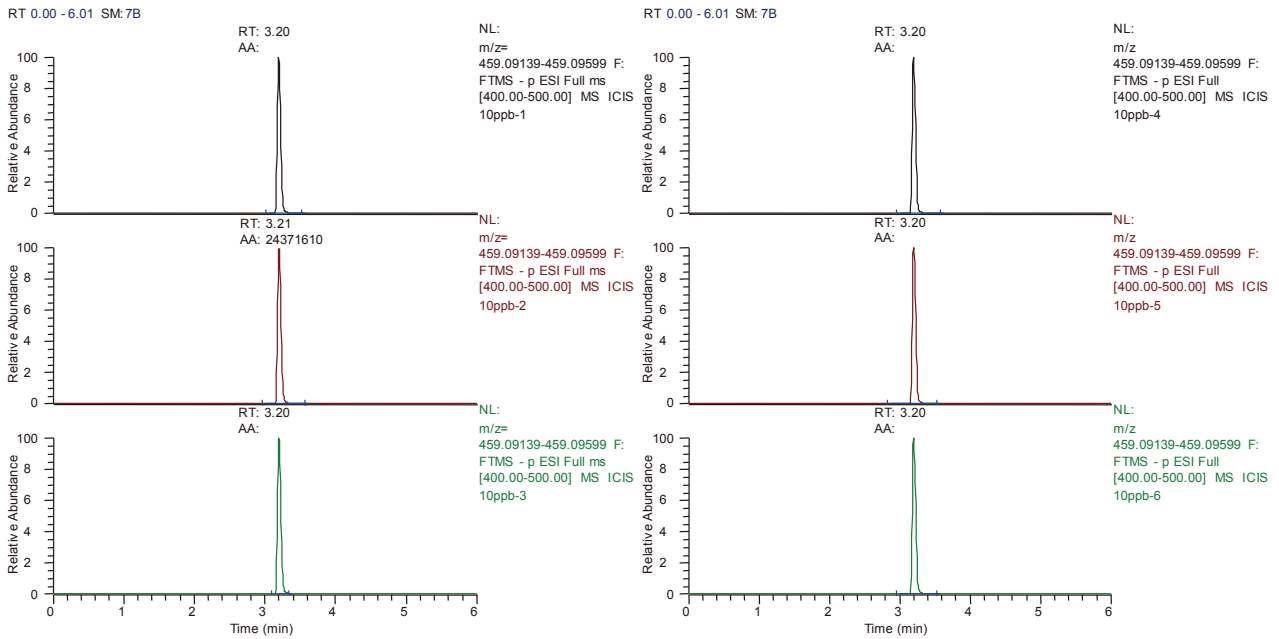


图 5. 浓度为 100 pg/mL 的汉黄芩苷连续进样 6 针提取离子流色谱图

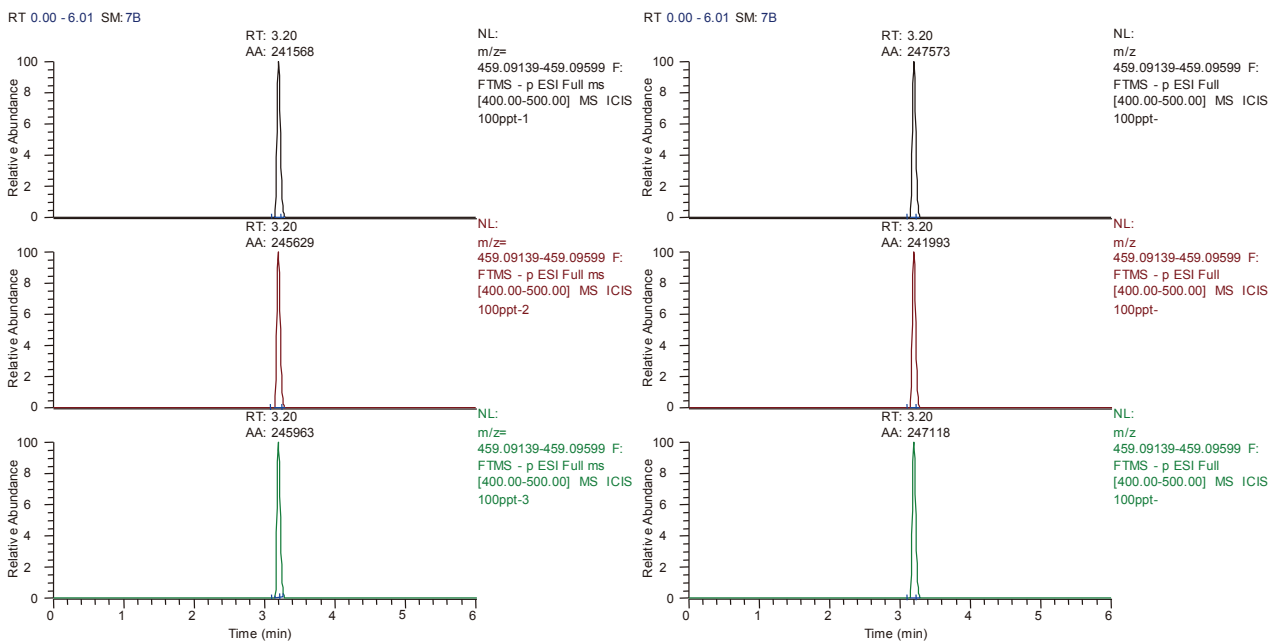


图 6. 浓度为 10 ng/mL 的汉黄芩苷连续进样 6 针提取离子流色谱图

3 结论

3.1 Thermo Scientific Q Exactive 系列质谱仪将高性能四极杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 (HR/AM) Orbitrap 检测技术相结合, 提供优异性能和出色多功能性。Q Exactive 系列质谱仪具有快速扫描和多重检测能力, 是一种可提供快速色谱分离技术的优秀检测器。静电场轨道阱高分辨质谱能够实现只进样一针, 即可同时获得正负离子模式下的色谱图, 且能保证良好的质量精度, 质量偏差小于 ± 1 ppm, 能准确的预测元素组成。

3.2 Q Exactive 系列质谱仪在具有高分辨率的同时, 具有高灵敏度, 可以完美用于微量的中药成分定量研究。由本次实验结果可以看出, 汉黄芩苷在 10 pg/mL~100 ng/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系, 线性范围为 4 个数级, 可以该化合物不同实验类型的检测需求; 同时, 仪器在各浓度点的 RSD% 均小于 3%, 表明该方法重现性良好; 仪器稳定性试验表明, 该型号仪器具有高稳定性。

中药及天然产物分析部分发表文章列表

● 中药及制剂中的化学成分表征

Title	Authors	Publication	Publication Year
A strategy for fast screening and identification of sulfur derivatives in medicinal Pueraria species based on the fine isotopic pattern filtering method using ultra-high-resolution mass spectrometry.	Yang M, Zhou Z, Guo D.	Analytica chimica acta	2015
Characterization and profiling of phenolic amides from Cortex Lycii by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry.	Zhang J, Guan S, Sun J, et al.	Analytical and bioanalytical chemistry	2015
Discriminatory Components Retracing Strategy for Monitoring the Preparation Procedure of Chinese Patent Medicines by Fingerprint and Chemometric Analysis.	Yao S, Zhang J, Wang D, et al.	PloS one	2015
Identification and Quantitative Characterization of PSORI-CM01, a Chinese Medicine Formula for Psoriasis Therapy, by Liquid Chromatography Coupled with an LTQ Orbitrap Mass Spectrometer.	Chen S D, Lu C J, Zhao R Z.	Molecules	2015
Metabolic profiling of Vitex agnus castus leaves, fruits and sprouts: Analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn.	Mari A, Montoro P, D' Urso G, et al.	Journal of pharmaceutical and biomedical analysis	2015
Rapid identification and comparative analysis of chemical constituents in herbal medicine Fufang decoction by ultra – high – pressure liquid chromatography coupled with a hybrid linear ion trap–high – resolution mass spectrometry.	Cao G, Chen X, Wu X, et al.	Biomedical Chromatography	2015
Investigation of the Chemical Changes from Crude and Processed Paeoniae Radix Alba-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma Herbal Pair Extracts by Using Q Exactive High-Performance Benchtop Quadrupole-Orbitrap LC-MS/MS.	Cao G, Li Q, Cai H, et al.	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	2014
Rapid screening and identification of target constituents using full scan-parent ions list-dynamic exclusion acquisition coupled to diagnostic product ions analysis on a hybrid LTQ-Orbitrap mass spectromete.	Zhang J Y, Wang Z J, Zhang Q, et al.	Talanta	2014
Chemical profiling and quantification of Chinese medicinal formula Huang-Lian-Jie-Du decoction, a systematic quality control strategy using ultra high performance liquid chromatography combined with hybrid quadrupole-orbitrap and triple quadrupole mass spectrometers.	Yang Y, Wang H J, Yang J, et al.	Journal of Chromatography A	2013
Identification of new dianthrone glycosides from Polygonum multiflorum Thunb. using high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry detection: a strategy for the rapid detection of new low abundant metabolites from traditional Chinese medicines.	Xu W, Zhang J, Huang Z, et al.	Analytical Methods	2012
Neutral fragment filtering for rapid identification of new diester-diterpenoid alkaloids in roots of Aconitum carmichaeli by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry.	Zhang J, Huang Z H, Qiu X H, et al.	PloS one	2012
Chemical profiling of bioactive constituents in Sarcandra glabra and its preparations using ultra – high – pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry.	Li X, Zhang Y, Zeng X, et al.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	2011

● 天然产物代谢

Title	Authors	Publication	Publication Year
Identification of the metabolites of Ixerin Z from <i>Ixeris sonchifolia</i> Hance in rats by HPLC–LTQ–Orbitrap mass spectrometry.	Cai W, Zhang J Y, Dong L Y, et al.	Journal of pharmaceutical and biomedical analysis	2015
Profiling and identification of the metabolites of baicalin and study on their tissue distribution in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap–Orbitrap mass spectrometer.	Zhang J, Cai W, Zhou Y, et al.	Journal of Chromatography B	2015
Metabolic profiling analysis of berberine, palmatine, jatrorrhizine, coptisine and epiberberine in zebrafish by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometer.	Li Y, Wang H, Si N, et al.	Xenobiotica	2014
Rapid separation and identification of Strychnos alkaloids metabolites in rats by ultra high performance liquid chromatography with linear ion trap Orbitrap mass spectrometry.	Liu X, Zheng S, Jiang Z, et al.	Journal of separation science	2014
Chemical fingerprint and metabolic profile analysis of <i>Citrus reticulata</i> ‘Chachi’ decoction by HPLC–PDA–IT–MS n and HPLC–Quadrupole–Orbitrap–MS method	Ye X, Cao D, Zhao X, et al.	Journal of Chromatography B	2014
Species–related difference between limonin and obacunone among five liver microsomes and zebrafish using ultra–high–performance liquid chromatography coupled with a LTQ–Orbitrap mass spectrometer.	Ren W, Li Y, Zuo R, et al.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	2014
Identification and pharmacokinetics of multiple constituents in rat plasma after oral administration of Yinchenzhufu decoction.	Wang Q, Jiang P, Ye F Y, et al.	Journal of ethnopharmacology	2014
A Systems Biology–Based Approach to Uncovering the Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Dragon's Blood Tablet in Colitis, Involving the Integration of Chemical Analysis, ADME Prediction, and Network Pharmacology.	Xu H, Zhang Y, Lei Y, et al.	PloS one	2014
A new strategy for the discovery of epimedium metabolites using high-performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry.	Jin Y, Wu C S, Zhang J L, et al.	Analytica chimica acta	2013
In vitro and in vivo metabolism of verproside in rats.	Kim M G, Hwang D K, Jeong H U, et al.	Molecules	2012
Metabolite identification of artemether by data–dependent accurate mass spectrometric analysis using an LTQ–Orbitrap hybrid mass spectrometer in combination with the online hydrogen/deuterium exchange technique.	Liu T, Du F, Zhu F, et al.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	2011
Rapid identification of phase I and II metabolites of artemisinin antimalarials using LTQ–Orbitrap hybrid mass spectrometer in combination with online hydrogen/deuterium exchange technique.	Liu T, Du F, Wan Y, et al.	Journal of Mass Spectrometry	2011
Metabolite identification of triptolide by data–dependent accurate mass spectrometric analysis in combination with online hydrogen/deuterium exchange and multiple data–mining techniques.	Du F, Liu T, Liu T, et al.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	2011

● 中药组学

Title	Authors	Publication	Publication Year
UHPLC-LTQ-Orbitrap MS combined with spike-in method for plasma metabolomics analysis of acute myocardial ischemia rats and pretreatment effect of Danqi Tongmai tablet.	Yan B, Deng Y, Hou J, et al.	Molecular BioSystems	2015
A Study of the Geo-Herbalism of Evodiae Fructus Based on a Flow-Injection Mass Spectrometric Fingerprinting Method Combined with Chemometrics.	Zhao Y, Zhou X, Zhao Y L, et al.	Molecules	2015
A metabolomics approach to studying the effects of Jinxin oral liquid on RSV-infected mice using UPLC/LTQ-Orbitrap mass spectrometry.	Du L, Xie T, Xu J, et al.	Journal of ethnopharmacology	2015
A novel strategy for the discrimination of gelatinous Chinese medicines based on enzymatic digestion followed by nano-flow liquid chromatography in tandem with orbitrap mass spectrum detection.	Yang H, Shen Y, Xu Y, et al.	International journal of nanomedicine	2015
Use of flow injection mass spectrometric fingerprinting and chemometrics for differentiation of three black cohosh species.	Huang H, Sun J, McCoy J A, et al.	Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy	2015
Lu C, Deng J, Li L, et al. Application of metabolomics on diagnosis and treatment of patients with psoriasis in traditional Chinese medicine.	Lu C, Deng J, Li L, et al.	Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics	2014
Quantitative analysis of Cistanches Herba using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods.	Lu D, Zhang J, Yang Z, et al.	Journal of separation science	2013
A Systems Biology-Based Approach to Uncovering the Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Dragon's Blood Tablet in Colitis, Involving the Integration of Chemical Analysis, ADME Prediction, and Network Pharmacology.	Xu H, Zhang Y, Lei Y, et al.	PloS one	2014

● 中药及保健品中非法添加筛查

Title	Authors	Publication	Publication Year
The development of an ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry method for the rapid detection and confirmation of illegal adulterated sedative-hypnotics in dietary supplements.	Jiang S, Tan H, Guo C, et al.	Food Additives & Contaminants: Part A	2015
Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography Orbitrap-mass spectrometry.	Martínez-Domínguez G, Romero-González R, Frenich A G.	Microchemical Journal	2015
Simultaneous identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary supplements using high-resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry.	Guo C, Shi F, Jiang S, et al.	Journal of Chromatography B	2014
Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry.	Vaclavik L, Krynitsky A J, Rader J I.	Analytica chimica acta	2014
Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements.	Shi F, Guo C, Gong L, et al.	Journal of Chromatography A	2014

● 中药及天然产物定量

Title	Authors	Publication	Publication Year
Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses.	Shan-Shan W E I, Min Y, Xin C, et al.	Chinese journal of natural medicines	2015
An investigation of the auto-induction of and gender-related variability in the pharmacokinetics of dihydroartemisinin in the rat.	Zhu F, Du F, Li X, et al.	Malar Journal	2012
Qualitative and quantitative characterization of chemical constituents in Xin-Ke-Shu preparations by liquid chromatography coupled with a LTQ Orbitrap mass spectrometer.	Peng J B, Jia H M, Liu Y T, et al.	Journal of pharmaceutical and biomedical analysis	2011

附录：

1. 什么是质谱？离子源？质量分析器

质谱是一种测量离子质荷比 (m/z) 的分析仪器，质谱仪器一般由样品导入系统、离子源、离子传输组件、质量分析器、检测器、数据处理系统等部分组成，如图 1 所示。

离子源是使待测物质转化为带电离子的部件，根据离子化原理不同，分为大气压电离电喷雾离子源 (ESI)、大气压电离化学电离离子源 (APCI) 等等。

质量分析器是质谱的核心部件，可以产生不同形状的电场，利用这些不同形状的电场将离子源中生成的样品离子按 m/z 的大小分开。

质量分析器分为常规分辨率的质量分析器和高分辨率的质量分析器。常规分辨率的质量分析器包括四极杆、离子阱。

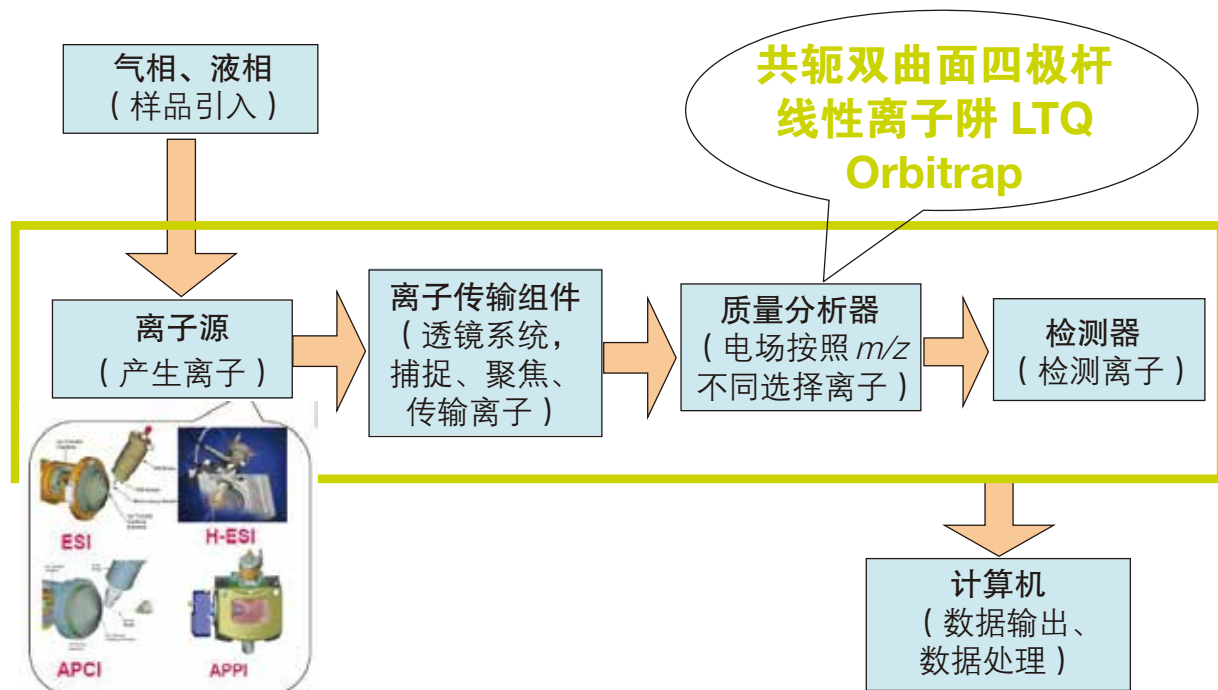


图 1. 质谱示意图

2. 离子阱质谱原理

离子阱是时间串联的质谱技术，化合物离子的捕获，隔离，激发和抛射都在阱中完成，正因如此，离子阱重复此扫描过程即可完成多级碎裂 (MS^n)。

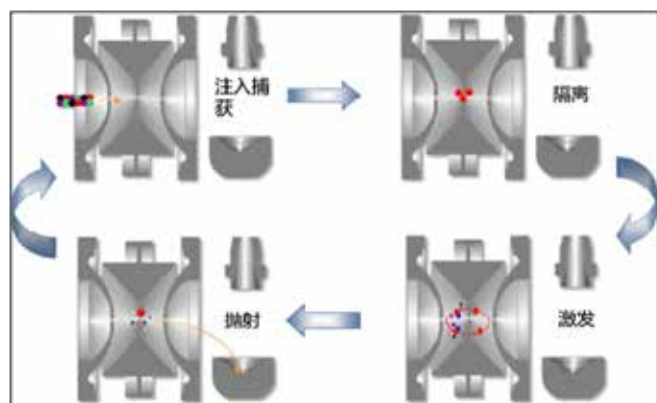


图 2. 离子阱时间串联扫描

离子阱中的稳定区域可以通过马绍方程计算出来，化合物离子在特定的射频电压下按照特定频率移动，增加 RF 电压，离子的频率 (q 值) 将会增加，逐渐提高射频，使离子从低 m/z 到高 m/z 逐渐依次离开，完成扫描。

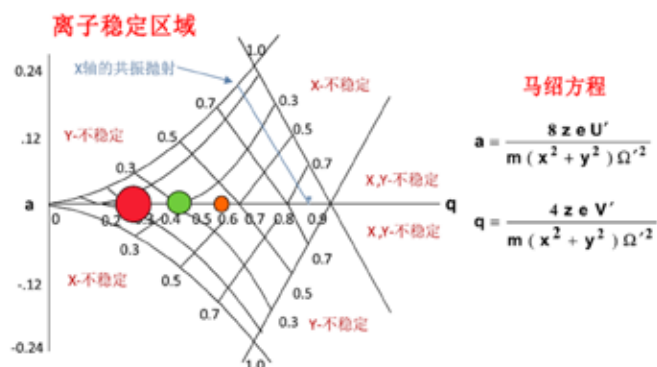


图 3. 离子阱扫描原理

3. Thermo 专利的线性离子阱质谱

作为离子阱质谱的领导者，Thermo 专利的线性离子阱提供最快的速度同时保证优异的灵敏度。

- 离子沿着中心线方向聚集，同时也减少了空间电荷效应，极大提高离子容量；
- 双径向检测器设计同时检测离子，离子检测速度更快，响应强度更高，信号更加稳定；
- 离子捕获效率更高，获得更高的灵敏度，进行更多级数的碎裂；

4. Orbitrap 静电场轨道阱质谱原理

静电场轨道阱质谱是近年来新兴的一种高分辨质谱质量分析器，它是由俄国科学家 Makarov 发明的一种新型的质谱仪，其质量分析器形状如同纺锤体，由纺锤形中心内电极和左右 2 个外纺锤半电极组成。仪器工作时，在中心电极逐渐加上直流高压，在 Orbitrap 内产生特殊几何结构的静电场。当离子进入到 Orbitrap 室内后，受到中心电场的引力，即开始围绕中心电极作圆周轨道运动，同时离子受到垂直方向的离心力和水平方向的推力，而沿中心内电极作水平和垂直方向的震荡。外电极除限制离子的运行轨道范围，同时检测由离子振荡产生的感应电势，其中水平震荡的频率和分子离子的质荷比 (m/z) 的关系可由图片中数学公式来描述。从 Orbitrap 的每个外电极输出的信号经过微分放大器放大后由快速傅叶转换变成频谱，频谱再进而转换为质谱

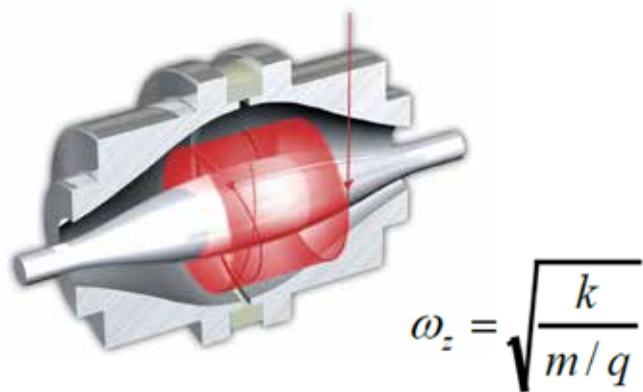


图 4. 高分辨质谱 Orbitrap (静电场轨道阱) 结构示意图

5. 什么是共轭双曲面的四极杆质量分析器?

1950 年代，德国物理学家 Wolfgang Paul 申请的专利 944, 900 (1956) 指出四个共轭双曲面围成的电场可以筛选离子。四极杆质量分析器分为圆柱形四极杆、共轭双曲面四极杆，如图 2 所示。共轭双曲面的四极杆，对于精密铸造工艺要求非常高，需要使用精密的三坐标磨床，对于铸造四极杆的合金材料也有很高的要求，所以，材料和加工成本比圆柱形四极杆要高很多。但是，只有共轭双曲面的四极杆才能产生教科书般的完美理论电场，而圆柱形的四极杆产生电场与理论电场存在 1-2% 偏差。共轭双曲面四极杆是可变分辨率的四极杆质量分析器，但圆柱形四极杆分辨率不可变。

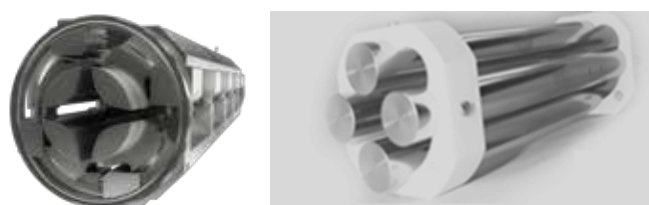


图 5. 共轭双曲面四极杆 (Hyperquad) 与常规圆柱形四极杆 (Round rods)

禹重科技® ÜZONGLAB

成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

上海市闵行区春申路2525号芭洛商务大楼

电话：021-8039 4499 传真：021-5433 0867

上海|北京|沈阳|太原|长沙|广州|成都|青岛|香港

全国销售和售后服务电话：400-808-4598

邮编：201104, China

邮箱：shanghai@uzong.cn

更多信息请访问：www.uzong.cn



了解我们



微信公众号