



AB SCIEX公司 中医药研究解决方案专辑

AB SCIEX公司简介

AB SCIEX公司是近30年来专注从事高端质谱研发、生产、销售和技术服务的高科技公司。现隶属于美国Danaher集团旗下，是全球最大质谱仪器生产厂家。AB SCIEX公司致力于生命科学技术、药物开发、食品安全，环境保护等重要相关领域的研究和分析技术的创新，愿与广大的中国科学工作者一起不断努力，为人类创造更好的未来。目前，AB SCIEX公司为食品安全、环境保护、法医检测、临床检查等应用市场客户提供先进的质谱产品、技术和解决方案；为蛋白质和药物等分析提供创新的技术和分析诊断工具；为生命科学研究的客户提供包括仪器、试剂、软件和技术服务在内的一体化科学解决方案。AB SCIEX公司是世界上有机质谱仪、生物质谱仪最主要的供应商，在全球市场占有率与用户满意度排行榜上高居榜首。



LC/MS/MS技术在全球领先的
AB SCIEX 公司



AB SCIEX 公司的生产基地

目 录

AB SCIEX公司 — 世界领先的质谱技术	2
中医药研究现状、挑战及解决方案	3
专为AB SCIEX质谱设计的超高效液相色谱系统	4
AB SCIEX公司三重四极杆技术	5
AB SCIEX公司独有的QTRAP®复合质谱技术	7
AB SCIEX公司独有的TripleTOF™高分辨质谱技术	9
AB SCIEX公司中医药研发中相关软件特点	11
AB SCIEX公司TripleTOF™专用名词解释	13
AB SCIEX LC-MS/MS系统在中药研究的主要应用和技术平台	16
中药有效成分分析	17
应用实例 I：应用QTRAP®系列串联质谱仪分析和鉴定肉苁蓉中的有效成分	17
应用实例 II：应用高分辨串联质谱仪分析和鉴定中药中的有效成分	20
中药多组分定量和定性分析	26
应用实例 I：LC-MS/MS串联质谱仪应用于中药多组分成分同时定性和定量分析	26
中药多组分药代动力学	29
应用实例 I：LC-MS/MS串联质谱用于延胡索体内药代动力学研究	29
中药多组分体、内外代谢物鉴定	32
应用实例 I：QTRAP®系列串联质谱仪用于朝藿定C代谢物鉴定的研究	32
应用实例 II：QTRAP®系列串联质谱仪用于人参代谢物鉴定的研究	36
应用实例 III：AB SCIEX高分辨质谱仪鉴定大鼠血浆和肠样品中人参提取液的代谢物	41
中药代谢组学研究	47
应用实例 I：AB SCIEX串联质谱在代谢组学研究中的解决方案	47
中药打假	52
应用实例 I：QTRAP®系列复合型质谱仪在中药打假中的应用	52
筛查中药中的农药残留和霉菌毒素	59
应用实例 I：应用QTRAP®类型串联质谱仪筛查中药中的农药残留和霉菌毒素	59
应用实例 II：应用高分辨串联质谱筛查中药中的农药残留和霉菌毒素	63
致谢	67

AB SCIEX公司 — 世界领先的质谱技术

1910年	世界上第一台质谱仪雏形在英国卡文迪许（Cavendish）实验室研制
1953年	Wolfgang Paul提出了四极杆质谱仪的概念
1980年	世界上第一台串联质谱仪MS/MS出现
1982年	AB SCIEX 公司高级科学家J. Henion, T. Covey发明APCI/MS/MS
1983年	AB SCIEX 公司（原PerSeptive Biosystems）推出了第一台热喷雾接口MS
1985-1988年	J. Fenn等发明Electrospray电喷雾技术
1987年	AB SCIEX 公司高级科学家A. Bruins, T. Covey等发明了大气压离子化技术IonSpray，在常温、常压下实现了离子化过程
1987年	AB SCIEX 公司科学家I.V. Chernushevich等发明LC-QqTOF™并申请专利
1989年	AB SCIEX 公司推出世界上第一台商业化API III™ LC/MS/MS串联四极杆质谱仪
1990年	AB SCIEX 公司推出了世界上第一台性能卓越的MALDI-TOF MS
1995年	AB SCIEX 公司推出了世界上第一台台式串联质谱API 300™ LC/MS/MS
1995年	AB SCIEX 公司首家发明了DE™专利技术，极大地提高MALDI-TOF MS的分辨率
1997年	AB SCIEX 公司成功地把ESI与TOF技术完美地结合在一起，推出了LC-API/TOF系统
1999年	AB SCIEX 公司的API 3000™ LC/MS/MS被LC/MS/MS行业设定为黄金标准（Gold Standard）
1999年	AB SCIEX 公司推出了液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱QSTAR® QqTOF质谱仪
2000年	AB SCIEX 公司首次采用Q2离子储存技术，克服了传统QqTOF检测小分子离子效率低的问题
2000年	AB SCIEX 公司首次成功地把MALDI离子源应用于QSTAR Pulsar® i Qq-TOF，并能与API离子源切换
2001年	AB SCIEX 公司推出大气压光化学电离源（APPI），用于弱极性化合物的分析
2001年	AB SCIEX 公司成功地推出了世界上唯一真正的串联飞行时间质谱4700 TOF-TOF™
2001年	AB SCIEX 公司和华盛顿大学合作，独家推出ICAT®试剂和软件，用于蛋白质差异表达的质谱定性和定量测定
2002年	AB SCIEX 公司在世界上首次实现四极杆技术与线性离子阱技术的结合，成功地推出了新一代串联四极杆质谱QTRAP® LC/MS/MS
2003年	AB SCIEX 公司成功推出Celera Discovery System数据库
2004年	AB SCIEX 公司首次推出组织成像技术（Tissue Imaging），成功地实现组织切片直接质谱分析药物的分布
2004年	AB SCIEX 公司推出另一种用于差异蛋白质定性定量分析的iTRAQ®试剂和软件，实现了蛋白质的绝对定量
2005年	AB SCIEX 公司推出最新设计的API 3200™及3200 QTRAP®串联四极杆质谱系统
2006年	AB SCIEX 公司推出基于食品安全，环境分析，毒物筛查，医学检测的LC/MS/MS方法平台 — “可立快”方法软件包
2008年	AB SCIEX 公司推出全新设计的TripleQuad™ 5500及QTRAP® 5500系统
2009年	AB SCIEX 公司推出灵敏度更高的MALDI-TOF-TOF 5800系统
2010年	AB SCIEX 公司推出了新型的TripleTOF™ 5600高分辨质谱系统
2012年	AB SCIEX 公司新型设计的TripleQuad™ 4500和QTRAP® 4500 LC-MS/MS系统
2012年	AB SCIEX 公司推出新型设计的TripleQuad™ 6500和QTRAP® 6500 LC-MS/MS系统
2012年	AB SCIEX 公司推出了新型的TripleTOF™ 4600和TripleTOF™ 5600+高分辨质谱系统

中医药研究现状、挑战及解决方案

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

中药成分繁多，含量高低不等，在发挥其疗效时又往往需要通过多组分的协同行动。因此，建立中药多组分测定方法将有助于阐明中药整体作用，并达到全面控制中药质量的目的。传统的中药鉴定有原植物鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定，这四种方法历史悠久，普及面广，能系统的反映不同中药间的差别，被誉为中药鉴定的“四大法宝”。近年来，随着科技的突飞猛进和自然科学技术的发展，许多新科学理论和实验技术不断渗透到中药鉴定领域，现代仪器分析的方法在中药质量的科学控制和管理中，是实现其现代化、国际化必不可少的条件。

近年来有关中药的临床药理学、药物动力学，中药代谢（特别是对中药活性成分、有效成分以及中药复方的药物代谢）的研究呈日益上升的趋势。由于中药在成分和药理上的复杂性，其成分确定和代谢研究也需要分离能力和结构鉴定能力兼具的分析工具，常规方法阐明中药的活性成分，需对其进行大量的提取分离，得到一定量的纯化合物，再进行NMR、MS等光谱测定，最终确定其化学结构，整个过程需耗时，繁琐，而且目的性差。快速筛选中药及植物药化学成分是必然的趋势。中药代谢的研究，包括药物及其在各种复杂的样品基质（全血、血浆、尿、胆汁及生物组织）中代谢物的分离、结构鉴定以及痕量分析测定，也需要现代技术。

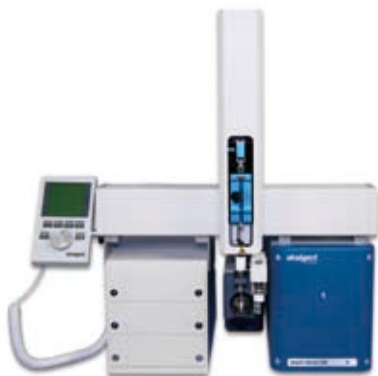
液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）的成熟与发展成为解决这些问题的强有力的工具，不仅可以避免复杂、繁琐、耗时的分离纯化样品的工作，而且能分离鉴定以往难于辨识的痕量药物及代谢物，从而快速、简便地解决问题。液质联用技术将液相色谱（LC）的高分离效能与质谱（MS）的强大结构鉴定功能结合起来，已逐渐成为中药现代研究的强有力手段。

AB SCIEX公司是质谱仪器的全球领导者，拥有近30年辉煌的技术创新历史，也是全球第一台商业化的液质联用仪创造者。作为液质联用的技术领军者，我们致力于协助解决复杂的生命科学问题，为生命科学众多领域提供仪器、软件、技术等服务，为中药成分分析和结构鉴定，中药代谢物鉴定，多组分定量和中药药代动力学，中药材产地溯源、中药代谢组学及中药中农药残留分析和质量控制提供了独特的技术平台：

- 专为AB SCIEX质谱设计的超高效液相色谱系统，Eksigent ekspert™ UHPLC系列
- 高灵敏度、高重现性、高稳定性及耐用性于一体的三重四极杆API 3200™，API 4000™，API 5000™，Triple Quad™ 4500、Triple Quad™ 5500和Triple Quad™ 6500
- 独有的QTRAP®技术同时定量定性分析模式3200 QTRAP®，4000 QTRAP®，QTRAP®4500、QTRAP® 5500和QTRAP® 6500
- 全新的TripleTOF™技术——高分辨的同时定量定性分析模式，TripleTOF™ 5600、TripleTOF™ 4600和TripleTOF™ 5600+

专为AB SCIEX质谱设计的超高效液相色谱系统 Eksigent ekspert™ UHPLC系列

Eksigent微升级超快速液相色谱



Eksigent™ microLC 200



ExpressLC®-Ultra

Eksigent微升级超快速液相色谱依靠新的泵技术和微流控制泵系统，采用液相色谱微柱进行分离，取得了常规高效液相无法比拟的分离效率。分析过程中，保证分析结果质量的同时，实现了从每个样品中节省大量的时间与金钱。该系统具有超快速分析、高效分离的特点，大大提高了质谱的利用率，节省了由于样品分离而浪费的大量时间，可以在最短时间分析最多样品，使工作效率更高。

Eksigent常规超快速液相色谱



ekspert™ ultraLC



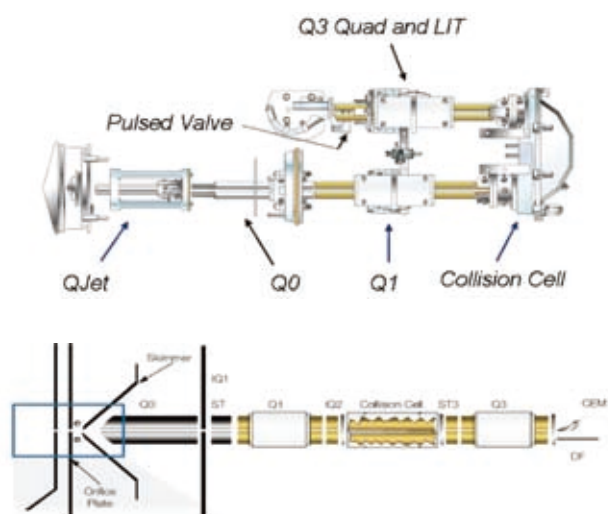
ekspert™ ultraLC 100-XL

ekspert™超高效液相色谱泵保证可在最高耐压下（最大耐压为18,000 psi，即便流速高达5.0 mL/min时）进行梯度洗脱，专利的自动进样器能够更为高效地吸取样品，在保证系统完整性的同时延长了色谱柱的使用寿命，整套系统为LC/MS/MS的使用提供了卓越的价值。

AB SCIEX公司三重四极杆技术

高灵敏度、高重现性、高稳定性及耐用于一体

AB SCIEX 公司三重四极杆技术



Triple Quad™ 4500



Triple Quad™ 5500



API 4000™



API 5000™



Triple Quad™ 6500



API 4000+™



API 3200™

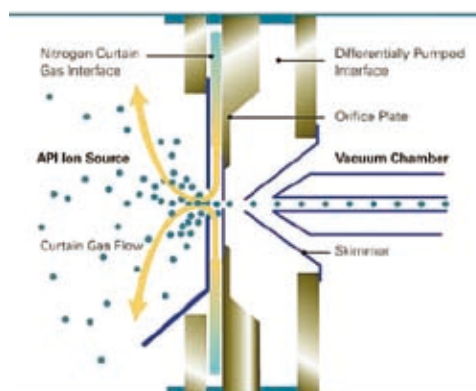


TurboV™离子源特点：

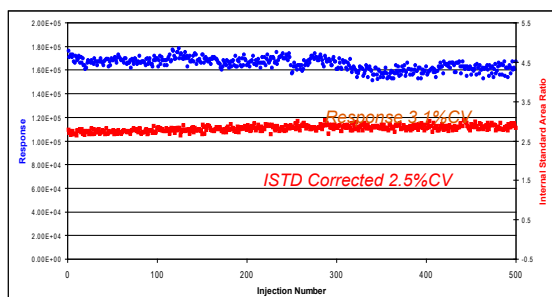
- 新型陶瓷加热技术、双涡流气化技术，使样品的离子化效率最大化。
- ESI流速为2~2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；APCI流速可达~3000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
- 新型离子取样界面设计更符合离子运动动力学，保证了更高灵敏度。
- APCI离子源自清洁探头设计允许HPLC的流量更高，分析通量更高；“即插即用型”ESI和APCI接口切换设计使用更方便。

AB SCIEX 气帘气接口

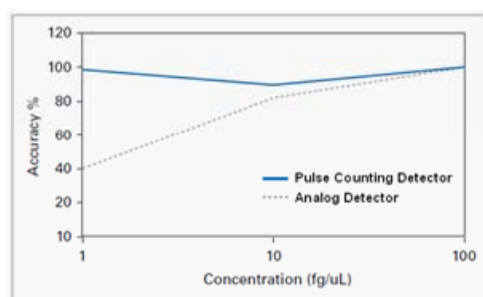
- 气帘接口是目前世界上性能超群的接口，它采用小流量反向氮气流吹扫的方法，增加溶剂的雾化，大大提高灵敏度。
- 可十分有效地防止接口的污染，反向氮气流有效保护取样孔免受污染。
- 适合于液相色谱非挥发性缓冲剂及各种流动相条件。



AB SCIEX 质谱仪具有超强的稳定性和耐用性



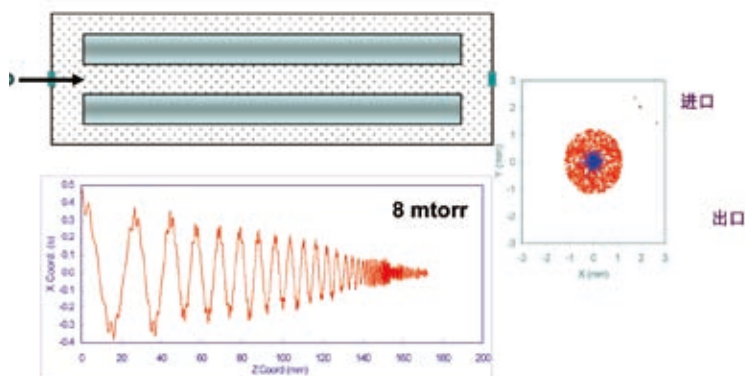
血浆样本中500次重复进样测定阿普唑仑，证明AB SCIEX质谱系统重现性，稳定性和可靠性



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

高压聚焦的Q0技术

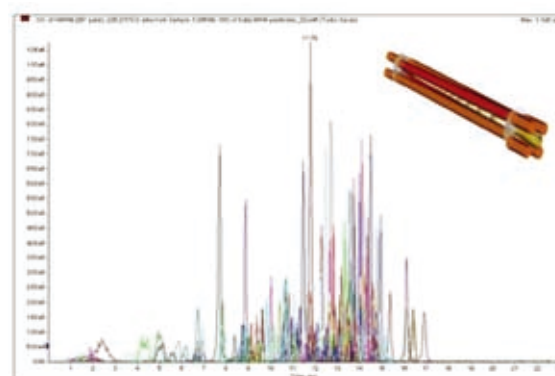
提高聚焦能力，减少离子损失，保证离子的最大传输率，提高灵敏度



阻尼轨迹（碰撞聚焦）

LINAC®高压碰撞室专利技术特点

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



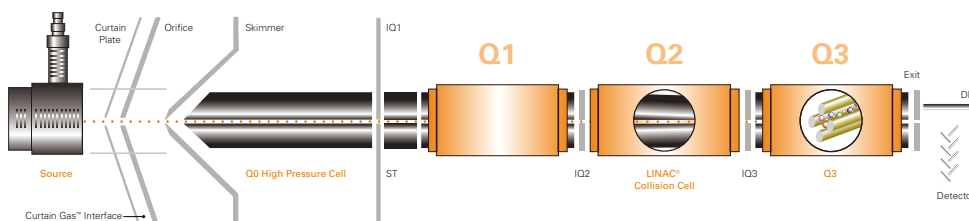
AB SCIEX公司独有的QTRAP®复合质谱技术 同时定量定性分析模式

QTRAP®技术：串联四极杆-线性离子阱复合质谱技术



QTRAP®技术：解决了同时定量和定性的问题，且具有强大的功能

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



三重四极杆串联质谱

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

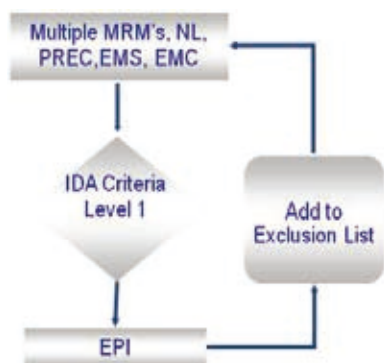
QTRAP®

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

线性离子阱质谱

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

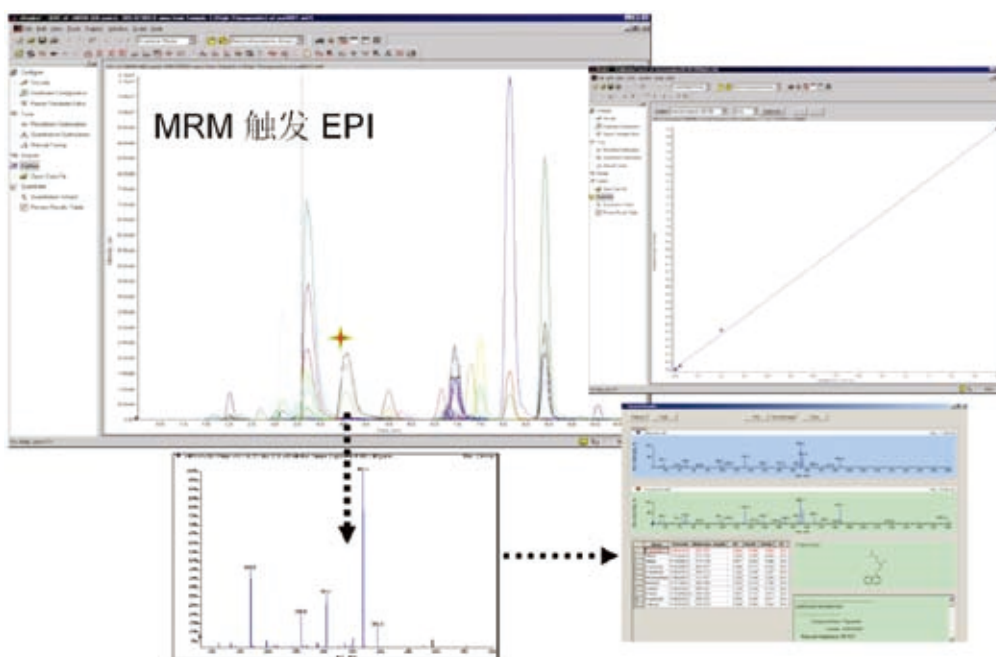
定量和定性，发现和确证一次完成…（IDA的工作流程）



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

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

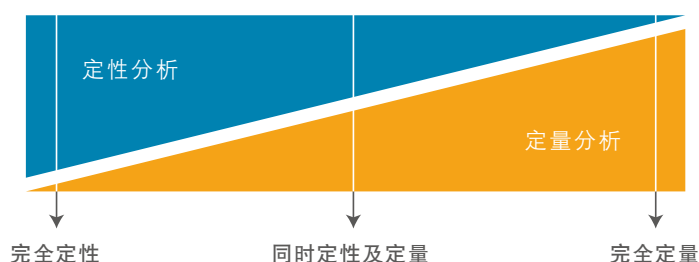
MRM-IDA-EPI扫描方式同时定量定性分析



AB SCIEX公司独有的TripleTOF™高分辨质谱技术

高分辨的同时定量定性分析模式

AB SCIEX TripleTOF™系统：一个平台，灵活的工作流程



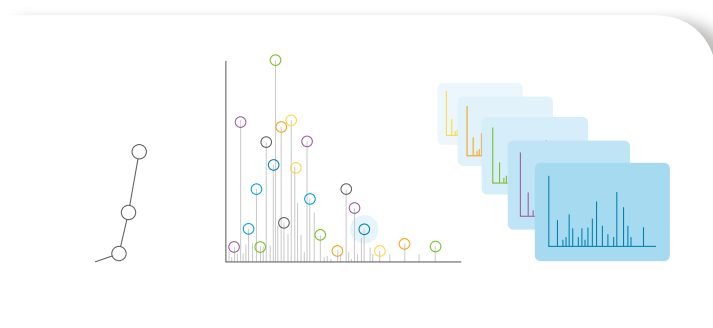
TripleTOF™ 4600



TripleTOF™ 5600



TripleTOF™ 5600+

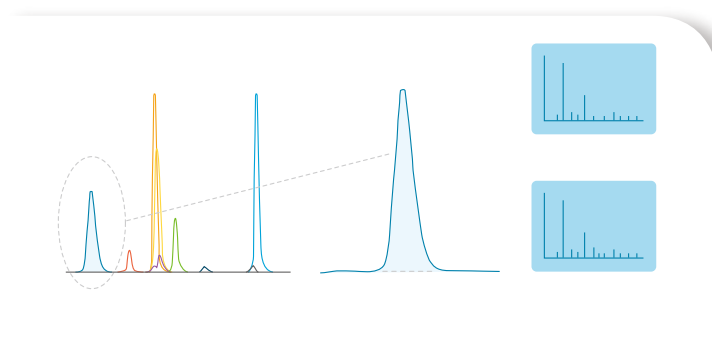


完全定性

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

快速高分辨扫描获得准确鉴定结果

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

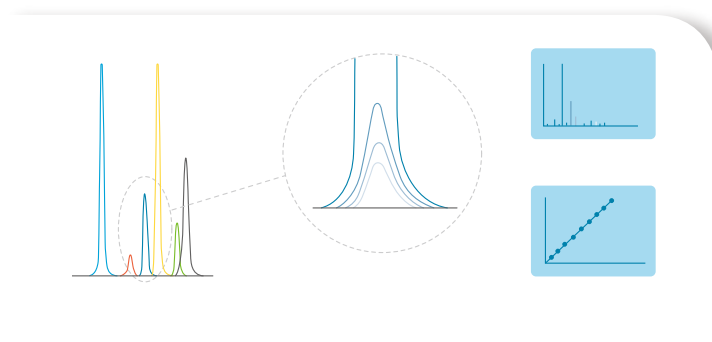


同时定量及定性

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

快速高分辨扫描获得准确鉴定结果

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



定量分析

高分辨MRM定量分析具有选择性高，数据可靠的特点：同一张质谱图中全质量范围都具有高分辨、高质量准确度，可以用高分辨质谱数据进行定量分析，其定量灵敏度LOQ和定量线性动态范围达到了高端串联四极杆MRM的水平。定量方法并不要求进行详细的优化，您也可以从二级质谱图中选择多个高分辨准确质量数离子进行定量分析。

用高分辨MRM (MRM^{HR}) 进行相对和绝对定量分析

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

AB SCIEX公司中医药研发中相关软件特点

LightSight®软件特点

代谢物发现的终极工具。通过简单的几步，即可以前所未有的效率在QTRAP®系列质谱仪上创建优化的采集方法来检测代谢物并进行数据分析和代谢物鉴定，使鉴定代谢物的工作更有效。其特点：



- 界面直观，动画帮助，易学易用
- 自动创建预测的MRM（即pMRM）触发IDA的方法，并将其直接导入QTRAP®系列质谱仪进行快速分析
- 可把三重四极杆模式下的高灵敏度扫描，比如中性丢失或母离子扫描，同高灵敏度的全扫描MS/MS数据结合起来用于结构表征
- 可同时分析非质谱采集的模拟数据（如紫外或放射性检测器的色谱图），使您可把基于质谱的结构信息和定量的模拟数据关联起来

MultiQuant™ 软件

MultiQuant™软件是一款功能强大且易用的定量软件包，可以处理用于定量的MRM数据以及高分辨TOF MS和MRM^{HR}的数据。这款软件可使您同时处理多个分析物和样品。其特点：



- 提供全面的用户界面，可进行高级的数据可视化浏览
- 全新的SignalFinder™积分算法在减少用户干预的条件下帮您更可靠地积分，同时提供动态范围扩展功能
- 先进的数据追踪功能使数据的审核比以往更容易
- 能够处理由大量MRM通道和大批量数据
- 支持多肽的相对和绝对定量，用于生物标志物验证/多肽量化的工作流程

MarkerView™软件

代谢组学和蛋白组学分析软件。拥有这款软件，科学家能够快速且方便地浏览AB SCIEX质谱上获得的数据，测定复杂样本中内源性化合物的上调和下调变化。其特点：



- 监督和非监督PCA分析，T 检验等
- 交互的可视化工具，能够帮助您在分析前，排除诸如外源化合物代谢物的样本和可变因素
- 主成分变量分组（Principal Component Variable Grouping, PCVG）
- 自动产生报告
- 支持ESI, APCI 和MALDI 数据
- 可以和Peakview®软件中XIC Manager插件关联，对列表中的目标峰进行包括或排除

Peakview®软件

Peakview®是一款独立的软件，用于数据查看。该软件用一种特殊的工具挖掘和解析质谱谱图数据，用于处理精确的质谱数据、结构解析和批量分析。其特点：



- 在一个窗口中，可以同时查看多个样本的谱图，比如通过重叠的色谱图或热流图（heat maps）进行快速简单的定性数据查看和比较
- 数据处理参数可用于大样本组，在数据处理和查看时节省时间
- XIC管理器可以快速生成提取离子流色谱图，几秒钟内就可以给出几千个化合物的谱图，可用于筛查和确证
- 分子式发现器（Formula Finder）和结构解析等独特的工具可以在分子水平上详细研究和表征化合物
- 利用注射进样的MS/MS^{ALL}数据（所有产物的母离子），可对单张谱图独特的扫描类型产生的全部的碎片进行可视化，有助于快速理解常见的碎裂和中性丢失

MetabolitePilot™软件

直观地支持TripleTOF™ 5600 LC/MS/MS中精确质量的代谢物鉴定流程。简单、清晰的数据查看功能，能更快速的得出结果，用于高置信度的代谢物检测。其特点：



- MetabolitePilot™软件引入强大的寻找峰算法来发现代谢物
- 软件将会自动根据所选化合物给出最合适的处理参数
- 多个样品集可在一个批次中进行批处理
- 结果区域，简单、清晰的数据浏览，能够查看确认的分数（confirmation score），以便您轻松地判定某个色谱峰是否是代谢物
- 集成MS/MS碎片解析
- 集成多个样品之间代谢物的相关性
- 种属之间的相关性
- 快速发现在多种属样品中代谢物的比例
- 非常方便的绘制出多个代谢物不同时间点的轮廓图

AB SCEIX TripleTOF™专用名词解释

信息关联采集 (Information Dependent Acquisition, IDA)：是一个软件工具，在LC分析中，实时帮助选择最好的离子触发MS/MS数据采集。主要目的是每次进样，能尽可能多的获得有用离子的信息。一次进样，对相关的离子能同时执行MS和MS/MS试验，见图1。

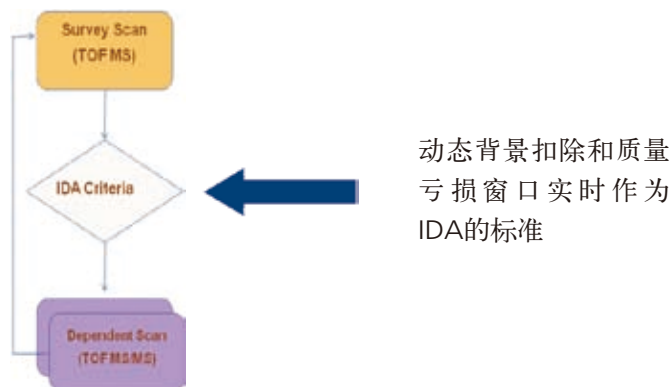


图1. IDA工作流程

动态背景扣除 (DBS)：在LC-MS/MS分析中，任何一个时间点均有大量的候选离子选择进行MS/MS分析，其中有许多离子是与LC洗脱液相关的背景离子，动态背景扣除就是帮助我们避免收集一些背景离子的MS/MS信息，而去采集能产生色谱峰的离子的MS/MS，见图2，即选择某一时间点这些离子强度变化速率最快的离子去进行MS/MS分析，从而一次进样，可获得尽可能多的有效离子的更多信息，提高数据质量。

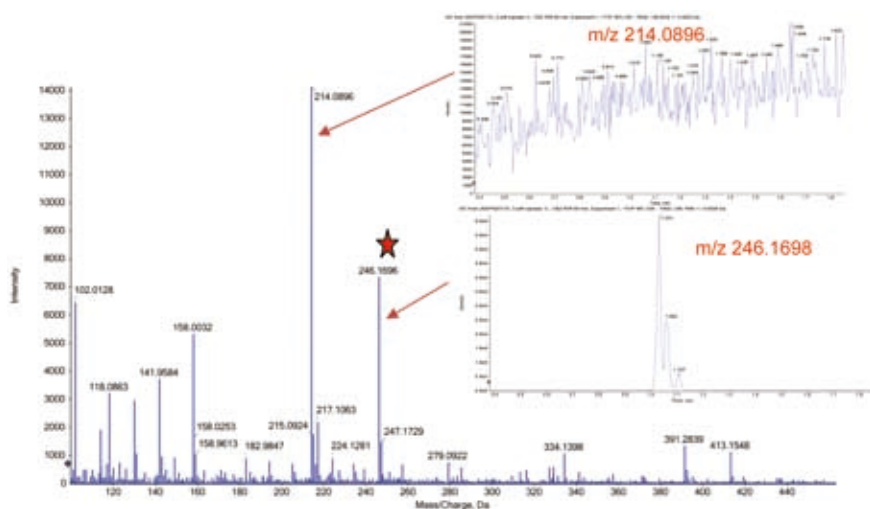


图2. 在1.06min m/z 246.1698有峰出现，即强度的上升速率快，因此选择m/z 246.1698离子去进行MS/MS，而不选择m/z 214.0896

实时多重质量亏损 (Multiple Mass Defect Filter, MMDF) :

质量亏损是指化合物的精确质量数与最接近的整数质量之间的差值。

实时多重质量亏损是指在IDA试验中, 优先选择符合质量亏损窗口的离子去采集MS/MS, 不需要进行数据后处理再进行进样分析, 能保证在复杂基质中, 能获得低含量相关化合物的高质量的MS/MS, 见图3, 从而进一步推断代谢物的结构。

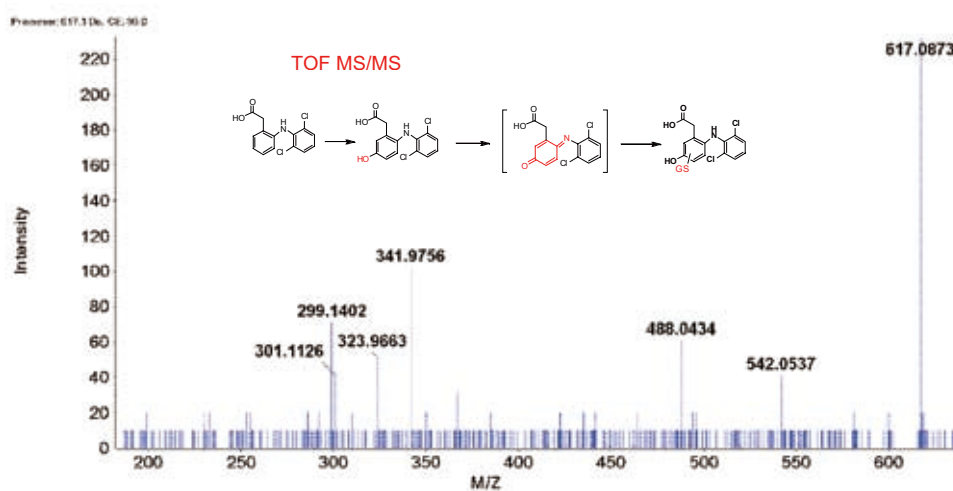
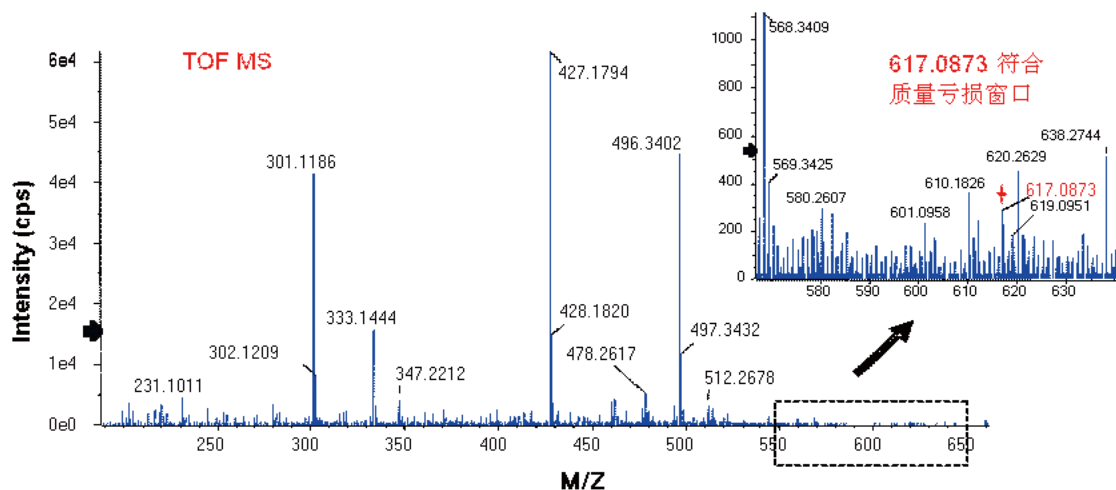


图3. 优先选择符合质量亏损窗口的离子进行MS/MS, 不需要重新进样

中草药中的结构类似化合物都具有相似的母核结构, 其结构特点是母核与特征取代基 (如: 羟基、甲酰基、甲基、甲氧基、糖基) 结合; 这样结构类似化合物的质量亏损与母核的质量亏损变化很小, 也可通过设定质量亏损窗口, 保证一些低含量的化合物也能在一次进样分析中, 获得高分辨的MS/MS。

在代谢物鉴定过程中，由于药物代谢物的质量亏损与原药相比，通常落在比较小的范围内（ $\pm 50\text{mDa}$ ）。可以通过同时限定 I 相和 II 相潜在代谢物的整数质量数和质量亏损部分的狭小范围，见图4，来优先采集符合此条件的潜在代谢物的高分辨一级和二级的数据，保证了在复杂基质中低含量的代谢物一次进行也能获得高质量的MS/MS。

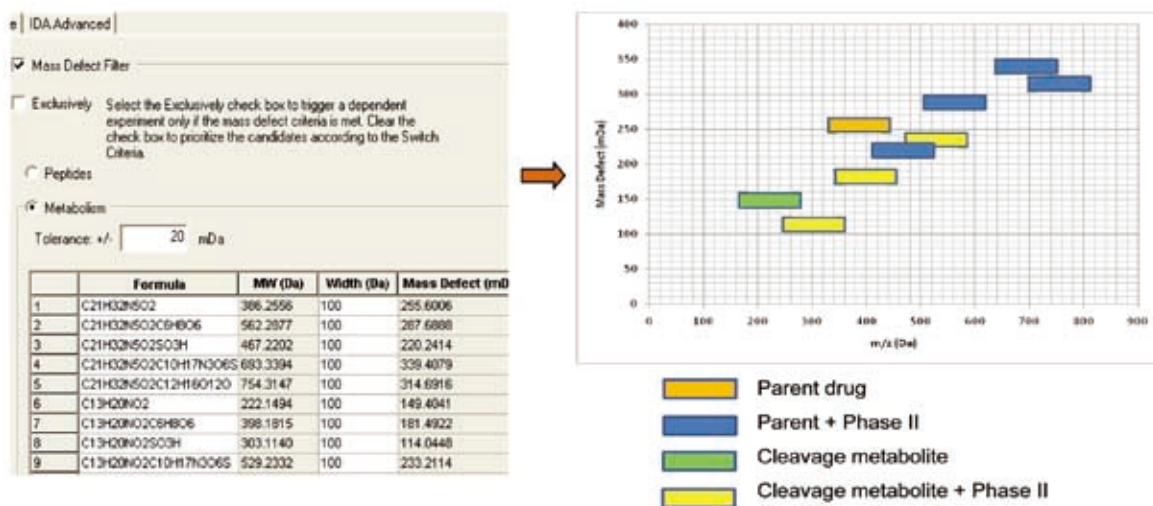


图4. 代谢物鉴定中实时质量亏损的设定



AB SCEIX TripleTOF™ 5600

AB SCIEX LC-MS/MS系统在中药研究的主要应用和技术平台

中药有效成分分析	AB SCIEX QTRAP®独有的杆-阱相互关联扫描技术，MRM, PREC, NL-IDA-EPI多种扫描实时触发增强子离子扫描，能快速有效的实现中药有效成分分析和鉴定
	AB SCIEX TripleTOF™ 5600快速高分辨扫描，结合实时动态背景扣除（DBS），实时多重质量亏损扫描（MMDF）和中性丢失扫描（NL），使其在中药成分分析和鉴定上展现独有的功能
中药多组分同时定性定量	AB SCIEX QTRAP®独有的杆-阱相互关联扫描技术MRM-IDA-EPI，为中药有效成分提供同时定性定量的强大功能
中药多组分药代动力学	AB SCIEX API系列，特别是QTRAP®集合了三重四极杆强大的定量功能和线性离子阱出色的定性能力，能够针对中药多组分进行快速、灵敏、专一、稳定的定量分析
中药多组分体内外代谢物鉴定	AB SCIEX QTRAP®EMS-IDA-EPI和pMRM-IDA-EPI等独特功能，可运用实时正负切换数据采集，同时结合智能的代谢物鉴定软件LightSight®，具有快速鉴定复杂中药代谢物的独特功能
	AB SCIEX TripleTOF™ 5600智能信息关联采集（IDA）的采集方法，实时动态背景扣（DBS）以及多重质量亏损（MMDF）触发TOF MS/MS，结合强大的MetabolitePilot™代谢物鉴定软件，能快速获取更加确信的中药代谢物鉴定结果
中药代谢组学	AB SCIEX TripleTOF™ 5600智能信息关联采集（IDA）的采集方法，实时动态背景扣（DBS），一次进样，可获得高质量的高分辨的TOF MS和TOF MS/MS，结合代谢组学分析软件MarkerView™和质谱数据处理软件Peakview®进行统计分析，是研究中药代谢组学的强大的工具
中药打假	AB SCIEX QTRAP® EMS-IDA-EPI, Q3-IDA-EPI, MRM-IDA-EPI等独特功能，是进行违禁药物筛查和中药打假的最佳工具
筛查中药中的农药残留	AB SCIEX QTRAP®通过MRM或Scheduled MRM™扫描来发现中药中的农药和毒素残留，同时获得丰富的MS/MS定性数据进行标准EPI谱库检索比对，使得QTRAP®串联质谱仪成为中药中农药和毒素残留成分筛查中强有力的工具
	AB SCIEX TripleTOF™ 5600一次进样，用高分辨一级质谱，快速定量分析样品中的所有化合物，并基于IDA功能同时获得高分辨准确质量数二级质谱定性确证化合物，配合Peakview®软件中高性能的筛查工具XIC manager可在很短的时间内对样品中的农药残留等进行快速筛查并进行谱库检索验证

中药有效成分分析

背景

中草药成分分析是复杂和困难的一项工作，其化学成分是中药发挥药效作用的物质基础，是实现中药现代化的关键所在。中药有效成分的结构鉴定是中药成分分析的瓶颈问题。如何快速发现有效成分，并对其鉴定结构？LC/MS的高通量，高灵敏度，强大的定性、定量能力，都使其渐渐成为中药分析的主流仪器。不同类型的LC/MS有其特定的工作流程。

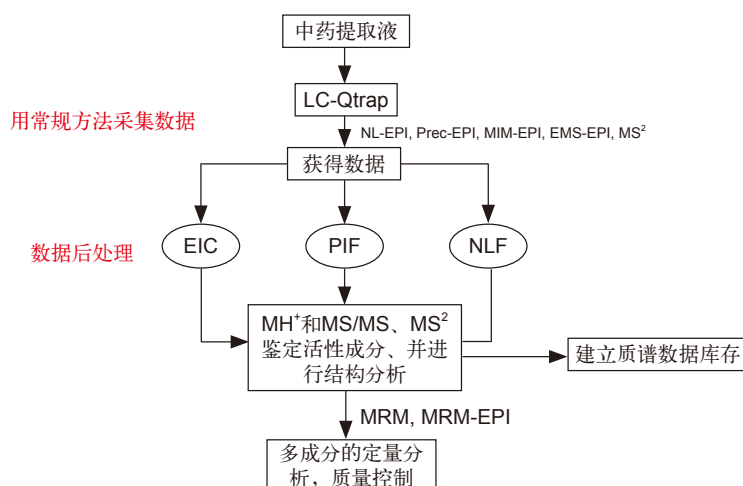
应用实例 I：应用QTRAP®系列串联质谱仪分析和鉴定肉苁蓉中的有效成分

肉苁蓉（Cistanche）素有“沙漠人参”之美誉，具有极高的药用价值，是我国传统的名贵中药材，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。肉苁蓉中具有药效的主要化学成分为苯乙醇苷化合物。传统的中药成分分析通常先通过全扫描，由于其成分复杂，需要花很长的时间去分析数据发现有效成分，工具量巨大。QTRAP®系列质谱仪十分适合于中草药成分分析，其数据采集与分析简单，且灵敏度高，特异性强，大大节约时间。本文应用3200 QTRAP® LC-MS/MS分析和鉴定了肉苁蓉中的9种有效成分。



解决方案

QTRAP® LC-MS/MS系列质谱仪是新一代液质联用串联质谱技术，其独特之处在于同时具备了完整的三重四极杆的质谱特点，以及线性离子阱的功能，在离子阱模式下，QTRAP®的MS/MS谱的灵敏度比常规的三重四极杆型高出二个数量级以上，同时还将两者的扫描功能巧妙的结合起来，实现“串联四极杆-线性离子阱”的迅速切换。本文采用QTRAP®型质谱仪独特的扫描模式---高的灵敏度和特异性PREC-EPI和NL-EPI，让“大海捞针”得以实现，快速发现中药有效成分组^[1]，得到更丰富的MS/MS定性数据。



实验与结果

1. 仪器

试验在AB SCIEX 3200QTRAP® LC-MS/MS上完成，液相为岛津公司LC-20A。

2. 3200 QTRAP®试验方法:

根据苯乙醇苷化合物结构特点和质谱裂解规律, 见图1, 在AB SCIEX 3200QTRAP®建立PREC和NL特征离子扫描并触发MS/MS, 见图2。完成快速有效分析。

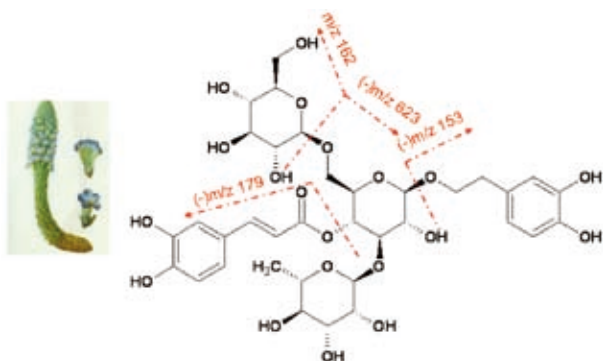


图1. 松果菊苷 (Echinacoside) 结构及在负离子模式下裂解特征

- 苯乙醇苷化合物结构特点是3部分组成, 即咖啡酸、苯乙醇苷元、糖, 普通串联质谱难以从复杂中草药体系中发现这类化合物, 更难于同时获得它们的MS/MS图谱做结构鉴定。
- 苯乙醇苷类化合物在负离子模式下, 具有一些独特的碎裂方式和碎片, 比如: m/z 461, m/z 161特征碎片离子; 中性丢失糖 m/z 162。 m/z 161的碎片是 m/z 179脱水得到, m/z 135.0为 m/z 153脱水所得, m/z 477.2、 m/z 461.2分别为 m/z 623.3进一步丢失脱氧六碳糖基 (146 amu) 和一个咖啡酰基 (162 amu) 所得。

PREC-EPI (母离子扫描切换至增强子离子扫描) :
通过母离子扫描 m/z 461, m/z 161, 如果发现特征的离子, 仪器自动切换到增强子离子扫描, 即线性离子阱的高灵敏度子离子扫描, 快速得到所有发现离子的高品质MS/MS质谱图, 进行结构鉴定。

NL-EPI (中性丢失扫描切换至增强子离子扫描) :
通过中性丢失NL 162扫描, 如果发现特征性的离子, 仪器自动切换到增强子离子扫描, 快速得到高品质的MS/MS质谱图, 进行结构鉴定。

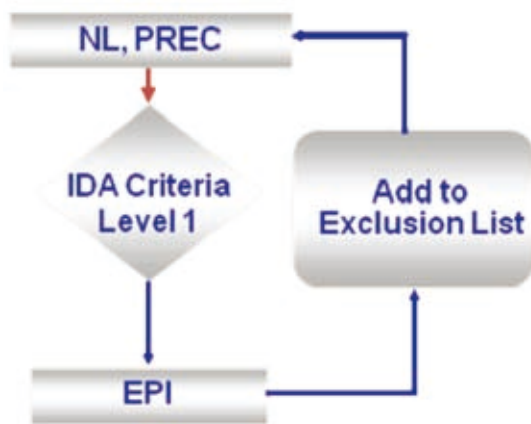


图2. IDA 工作流程

3. 结果和讨论

使用QTRAP®特有的扫描技术, 根据特征性扫描方式PREC和NL去发现苯乙醇苷类化合物, 并实时获得它们的MS/MS质谱图, 结合具有相似结构的标准品毛蕊花糖苷 (Acteoside) 和松果菊苷 (Echinacoside) 的MS/MS质谱图, 进行结构比较和推测, 共鉴定出9种主要的苯乙醇苷类成分, 代表性的图谱见图3。所鉴定的各种成分的分子量及MS/MS碎片信息见表1。

表1. 肉苁蓉提取物3200 QTRAP® LC-MS/MS分析结果

编号	RT (min)	m/z	MS/MS主要的碎片离子	推测可能的化合物名称
1	6.34	461.2	135.0, 315.2	Decaffeoylacteoside
2	10.52	487.2	135.0, 161.0, 179.0	Cistanoside F
3	18.27	785.4	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.2, 477.2, 623.3	Echinacoside
4	21.65	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Acteoside
5	22.01	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Cisacteoside
6	23.01	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Isoacteoside
7	23.73	607.3	135.0, 161.0, 445.3	Kankanoside G
8	25.43	665.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3, 623.3	2-acetylacteoside
9	29.64	591.3	135.0, 161.0	Osmanthuside

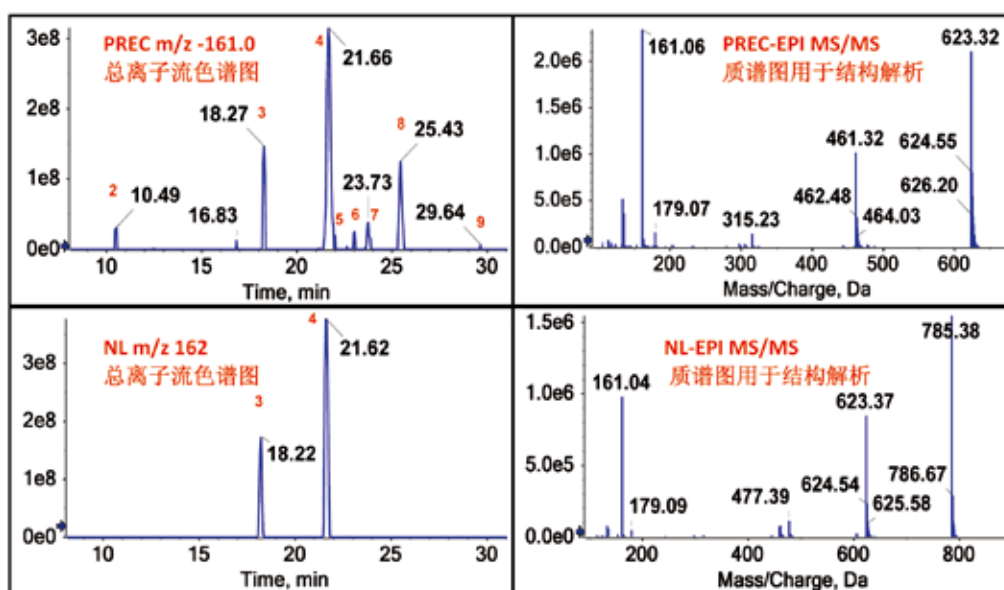


图3. 一次进行分析，所得的PREC-EPI（左上），NL-EPI（左下）色谱图
 （通过PREC，NL扫描可以获得化合物分子量信息，EPI扫描得到所测得的化合物的二级碎片，进行结构鉴定）

参考文献：

1. A practical strategy for the characterization of coumarins in Radix Glehniae by liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4587-4600.

应用实例 II：应用高分辨串联质谱仪分析和鉴定中药中的有效成分

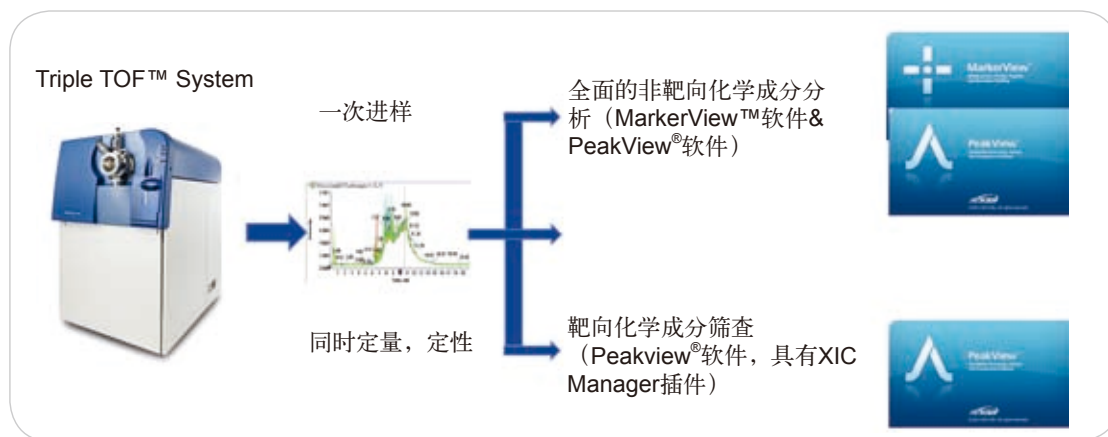
背景

麦冬 (*Ophiopogon japonicus*) 是我国临床使用的常见中药，主要治疗心肌梗死等疾病，其提取物的主要药理成分为麦冬皂苷和麦冬黄酮化合物，随着高分辨质谱性能的逐渐提高，高分辨质谱在中草药成分分析和鉴定中的使用也越来越广。本文应用Triple TOF 5600™质谱采集高分辨数据，应用MDF（质量亏损）功能快速从多种复杂峰中发现麦冬皂苷（*ophiopogonins*）和麦冬黄酮类（*ophiopogonones*）化合物，实现了数据分析的快速化和简单化。



解决方案

TripleTOF™质谱仪是具有高分辨定性和三重四极杆定量能力的新一代高分辨串联质谱仪。运用特有的动态背景扣除（DBS）、质量亏损（MDF）、中性丢失（NL）数据采集功能，一次进样，同时获得高质量的TOF MS和TOF MS/MS，从而完成化学成分的分析 and 确证。结合Peakview®软件中简单快捷的XIC Manager进行目标化合物的筛查和确证，软件中的Formula finder根据测得的化合物分子量，同位素分布以及遵循化学逻辑来测定化合物的元素组成，并结合软件中直观的化合物结构解析功能，以及特征碎片和质量亏损等提取功能，进行未知物的分析与鉴定，提高数据分析速度和数据结果的准确度，在中药成分分析和鉴定上成为得心应手的工具之一。



实验与结果

1. 仪器和试剂

甲醇、乙腈均为色谱纯，其它有机试剂为分析醇；麦冬皂苷D（*Ophiopogonin D*（纯度>99%））标准品；麦冬75%乙醇提取，旋干后水溶液，经SPE处理后获得麦冬提取液；AB SCIEX TripleTOF 5600™质谱系统，液相为岛津公司LC-20A。

2. 采集方法与试验条件

2.1 质谱采集方法：TripleTOF™ 5600，TOF MS-IDA-MS/MS

- 负离子测定
- TOF MS – m/z 100-1200, 200 ms
- TOF MS/MS – 10 MS/MS, m/z 50-1200, 80 ms, IDA
- 动态背景扣除 (DBS) 开启

2.2 质谱参数:

喷雾电压 (IS) : -4500V; 去簇电压 (DP) : -70V; 辅助加热气温度 (TEM) : 400℃; 雾化气 (Gas 1) : 50psi; 辅助加热气 (Gas 2) : 50psi; 气帘气 (Curtain gas) : 30psi。

2.3 液相条件:

流速: 0.2 mL/min; 流动相: A相: 0.02% 醋酸水溶液; B相: 0.02% 醋酸乙腈溶液 (色谱柱: Phenomenex Luna 5um, 2.1 × 150mm), 梯度洗脱。

3. 试验工作流程

该研究通过智能DBS-IDA和MMDF-IDA采集方法, 一次进行获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS, 高分辨的TOF MS 通过目标化合物提取或质量亏损发现可能的中药成分, 通过Formula Finder计算其分子组成, 然后结合高分辨的TOF MS/MS进一步做结构分析, 确定化合物。工作流程见图1所示。

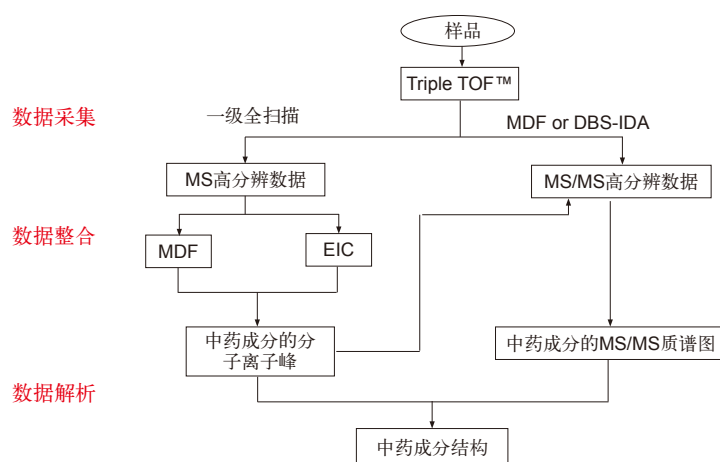


图1. TripleTOF™ 5600成分分析工作流程

4. 数据分析与结果

4.1 目标化合物的筛查与鉴定

使用Peakview®软件对麦冬黄酮目标化合物筛查, 麦冬黄酮结构分为A、B、C三型, 见下图2。

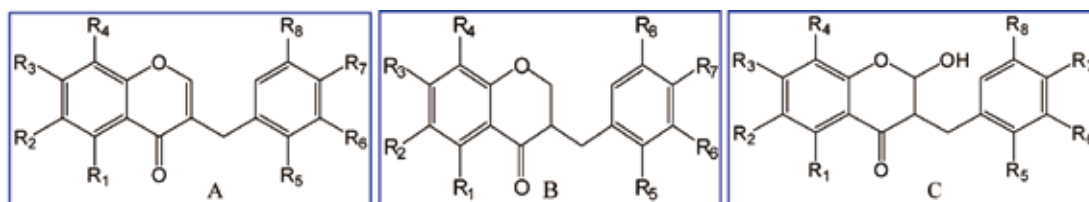


图2. 麦冬黄酮结构的三种类型

将麦冬黄酮目标化合物序号或名称和分子式信息导入到Peakview®软件，即可筛查目标化合物。可根据4大标准（保留时间、质量精度、同位素比例、谱库）判断筛查到的色谱峰是否为目标化合物，麦冬黄酮目标化合物的筛查流程图见图3。

No	Types	Formual	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
15	A	C18H14O7	-OH	-CH3	-OH	-H	-OH	-O-CH2-O-		-H
17	A	C18H14O7	-OH	-H	-OH	-CH3	-OH	-O-CH2-O-		-H
22	A	C19H16O7	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-OH	-O-CH2-O-		-H
23	A	C19H18O6	-OH	-CH3	-OCH3	-H	-H	-OH	-OCH3	-H
25	A	C18H14O6	-OH	-H	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
28	A	C19H16O6	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
24	B	C20H22O6	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-OCH3	-OH	-OCH3	-H
26	B	C18H16O6	-OH	-H	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
27	B	C18H18O5	-OH	-CH3	-OH	-H	-H	-OH	-OCH3	-H
30	B	C19H18O6	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
31	B	C19H20O5	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-OH	-OCH3	-H
13	B	C20H22O7	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-OCH3	-OH	-OCH3
14	B	C18H18O5	-OH	-CH3	-OH	-H	-H	-H	-OCH3	-H
16	B	C19H20O6	-OH	-CH3	-OCH3	-H	-OCH3	-H	-OH	-H
19	C	C19H18O7	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
20	B	C19H20O6	-OH	-CH3	-OH	-CH3	-H	-H	-OH	-OCH3
21	B	C19H20O6	-OH	-H	-OCH3	-CH3	-H	-H	-OH	-OCH3
32	A	C19H14O7	-OH	-CHO	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
33	B	C19H16O7	-OH	-CHO	-OH	-CH3	-H	-O-CH2-O-		-H
34	A	C19H16O6	-OH	-CHO	-OH	-CH3	-H	-H	-OCH3	-H



图3. 麦冬黄酮目标化合物的筛查流程

4.2 Peakview®软件的化合物结构解析功能

Peakview®软件根据一级质谱的质量精度、同位素比例、不饱和度等信息推测化合物分子式，根据质量精度、同位素比例结果给出相应的MS和MS/MS图谱的排序；Peakview®软件中，导入化合物结构式，可对二级碎片结构进行预测，见图4。

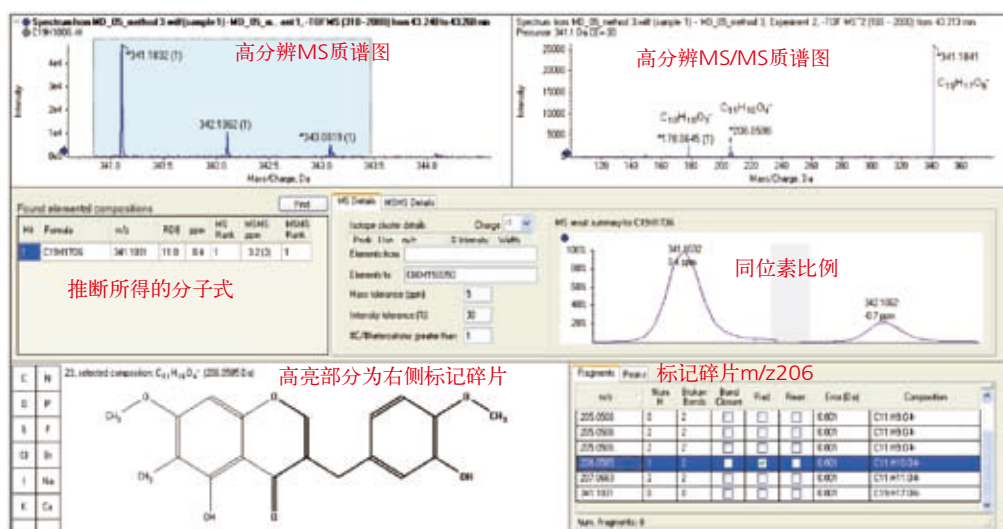


图4. Peakview®软件化合物确定分子组成以及结构解析功能

4.3 质量亏损过滤方法（MDF）查找结构相关化合物

中草药中的结构类似化合物都具有相似的母核结构，其结构特点是母核与特征取代基（如：羟基、甲酰基、甲基、甲氧基、糖基）结合；这样结构类似化合物的MD（质量亏损）与母核的MD变化很小，所以为MDF（质量亏损过滤）查找相似结构的一类化合物提供了理论基础。

应用MDF方法对麦冬提取液的一级高分辨质谱图处理后，能有效地发现淹没在本底噪音中的麦冬黄酮和麦冬皂苷化合物，且每一时间点满足质量亏损窗口的离子会高亮显示，不符合质量亏损窗口的离子以灰色显示，一目了然，非常简单直观，见图5。

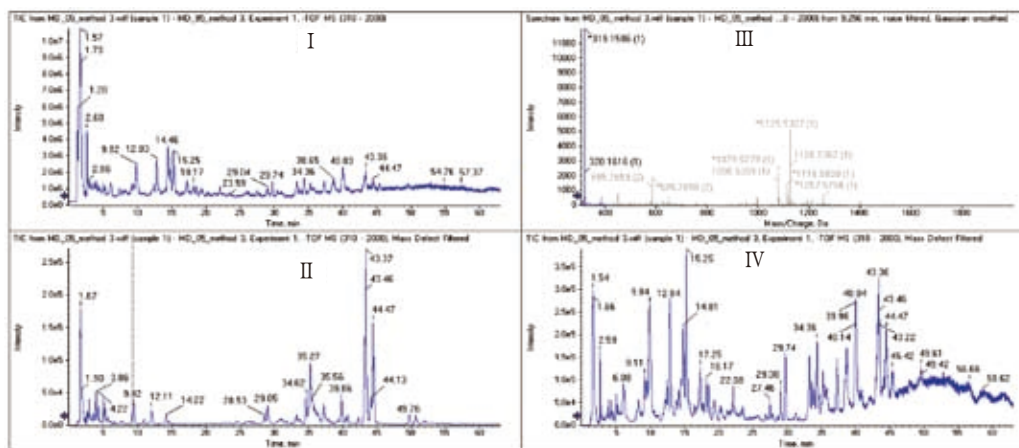


图5. 未过滤的TIC图见（I）；麦冬黄酮MDF处理后的色谱图（II）；
RT 9.256 min质谱图（III）；麦冬皂苷MDF处理后的色谱图（IV）。

数据经MDF处理后，共发现麦冬黄酮类化合物34个，麦冬皂苷类化合物62个。为了验证MDF功能的准确性，对色谱峰进行“目标化合物”和“非目标化合物”查找，使用MS/MS高分辨数据判断是否与麦冬黄酮和麦冬皂苷有结构相关性。结果发现：MDF处理后发现的麦冬黄酮和麦冬皂苷的准确度分别为85.29%和96.77%^[1]。

通过MDF处理后，检测到62个麦冬皂苷类化合物，其主要以[M-H]⁻和[M+HCOOH-H]⁻峰存在，见表1；和34个麦冬黄酮类化合物，见表2；其大部分化合物的质量精度<2ppm。

表1. MDF处理后，发现的麦冬皂苷类化合物

No.	Rt (min)	Measurement ^b	Deviation (ppm)	Predicted formula	No.	Rt (min)	Measurement ^b	Deviation (ppm)	Predicted formula
35	6.1	1095.5190	-0.9	C51H83O25	51	17.4	959.4863	0.6	C47H75O20
		1141.5222	-0.5	C52H85O27			1005.4913	0.1	C48H77O22
36	8.7	1211.5650	-0.4	C56H91O28	52	17.7	1033.5226	0.1	C50H81O22
		1257.5680	-0.3	C57H93O30			1079.5286	0.6	C51H83O2
37	9	1211.5650	-0.1	C56H91O28	53	18.5	901.4804	0.2	C45H73O18
		1257.5680	-0.3	C57H93O30			947.4860	0.3	C46H75O20
38	9.8	1079.5287	0.7	C51H83O24	54	19.2	923.4646	-1.6	C47H71O18
		1125.5341	0.6	C52H85O26			969.4691	-1.0	C48H73O20
39	10	933.4697	-0.4	C45H73O20	55	19.6	1031.5063	-0.5	C50H79O22
		979.4760	0.5	C46H75O22			1077.5116	-0.7	C51H81O24
40	11.8	1049.5168	-0.6	C50H81O23	56	20	899.4638	-0.9	C45H71O18
		1095.5223	-0.5	C51H83O25			945.4697	-0.4	C46H73O20
41	12.4	1049.5176	0.2	C50H81O23	57	20.4	1075.5320	-1.0	C52H83O23
		1095.5235	0.6	C51H83O25			1121.5380	-0.5	C53H85O25
42	12.8	917.4753	0.2	C45H73O19	58	21.2	1177.5638	-0.8	C56H89O26
		963.4814	0.8	C46H75O21			1223.5696	-0.5	C57H91O28
43	12.2	917.4753	-0.6	C45H73O19	59	22.1	1045.5225	0.6	C51H81O22
		963.4809	0.3	C46H75O21			1091.5282	0.2	C52H83O24
44	14.1	1195.5741	-1.0	C56H91O27	60	22.7	1117.5416	-1.8	C54H85O24
		1241.5798	-0.8	C57H93O29			1163.5487	-0.4	C55H87O26
45	14.5	1195.5754	0.1	C56H91O27	61	23.5	1117.5428	-0.7	C54H85O24
		1241.5774	-0.2	C57H93O29			1163.5488	-0.3	C55H87O26
46	14.8	1063.5321	-0.9	C51H83O23	62	26.8	901.4430	-0.9	C44H69O19
		1109.5385	0.0	C52H85O25			947.4492	-0.1	C45H71O21
47	15.3	1063.5328	-0.2	C51H83O23	63	22.3	967.4158	3.9	C47H67O21
		1109.5386	0.1	C52H85O25					
48	15.7	959.4827	-0.9	C47H75O20	64	27.5	769.4016	-1.2	C39H61O15
		1005.4909	-0.3	C48H77O22			815.4069	-0.2	C40H63O17
49	16.4	1061.5184	0.9	C51H81O23	65	27.9	753.4057	-1.3	C39H61O14
		1107.5236	0.6	C52H83O25			799.4116	-0.7	C40H63O16
50	17.3	1237.5867	0.7	C58H93O28	66	29	885.4480	-1.1	C44H69O18
		1283.5922	0.6	C59H95O30			931.4538	-0.7	C45H71O20
67	29.7	753.4064	-0.4	C39H61O14	82	39	911.4643	-0.3	C46H71O18
		799.4125	-0.4	C40H63O16			957.4691	-1.0	C47H73O20
68	25.8	981.4359	2.3	C44H70O24	83	40	853.4577	-1.7	C44H69O16
							899.4642	-0.4	C45H71O18
69	31.3	927.4578	-1.8	C46H71O19	84	40.2	779.4210	-1.7	C41H63O14
		973.4645	-0.5	C47H73O21			825.4268	-1.2	C42H65O16
70	33	927.4580	-1.6	C46H71O19	85	40.2	953.4734	-1.8	C48H73O19
		973.4644	-0.6	C47H73O21			999.4798	-0.8	C49H75O21
71	33.3	869.4531	-1.1	C44H69O17	86	40.9	853.4585	-0.7	C44H69O16
		915.4594	-0.1	C45H71O19			899.4643	-0.3	C45H71O18
72	33.7	795.4168	-0.6	C41H63O15	87	42	721.4153	-2.2	C39H61O12
		841.4230	0.3	C42H65O17			767.4223	-1.2	C40H63O14
73	34.4	737.4106	-1.6	C39H61O13	88	43.1	721.4163	-0.8	C39H61O12
		783.4169	-0.4	C40H63O15			767.4208	-2.0	C40H63O14
74	35	737.4109	-1.2	C39H61O13	89	43.1	895.4696	-0.1	C46H71O17
		783.4172	-1.1	C40H63O15			941.4747	-0.5	C47H73O19
75	35.2	795.4160	-1.6	C41H63O15	90	44.5	953.4739	-1.3	C48H73O19
		841.4224	-0.4	C42H65O17			999.4802	-0.4	C49H75O21
76	35.5	969.4683	-1.8	C48H73O20	91	44.8	895.4690	-0.8	C46H71O17
		1015.4747	-0.8	C49H75O22			941.4750	-0.2	C47H73O19
77	35.8	911.4633	-1.4	C46H71O18	92	45.4	895.4688	-1.0	C46H71O17
		957.4688	-1.3	C47H73O20			941.4744	-0.8	C47H73O19
78	37	839.4427	-0.9	C43H67O16	93	47.3	937.4812	1.0	C48H73O18
		885.4483	-0.7	C44H69O18			983.4851	-0.6	C49H75O20
79	37.3	911.4631	-1.6	C46H71O18	94	48.1	763.4261	-1.7	C41H63O13
		957.4694	-0.7	C47H73O20			809.4326	-0.4	C42H65O15
80	38.7	779.4207	-2.1	C41H63O14	95	49.6	937.4797	-0.6	C48H73O18
		825.4276	-0.3	C42H65O16			983.4854	-0.3	C49H75O20
81	39	851.4421	-1.6	C44H67O16	96	49.7	937.4785	-1.9	C48H73O18
		897.4481	-0.9	C45H69O18			983.4850	-0.7	C49H75O20

^b 麦冬皂苷在负离子能检测到[M-H]⁻和[M+HCOOH-H]⁻峰

表2. MDF处理后, 发现的麦冬黄酮类化合物

No.	Rt (min)	Measurement	Deviation (ppm)	Predicted formula	No.	Rt (min)	Measurement	Deviation (ppm)	Predicted formula
1	3.9	337.0929	0.0	C16H17O8	18	35.3	359.1139	0.8	C19H19O7
2	5.1	337.0931	0.6	C16H17O8	19	35.6	357.0975	-1.3	C19H17O7
3	11.0	345.0975	-1.4	C18H17O7	20	36.4	343.1180	-2.1	C19H19O6
4	12.1	312.1245	1.2	C18H18NO4	21	37.2	343.1190	0.8	C19H19O6
5	14.2	312.1245	1.2	C18H18NO4	22	37.6	355.0827	1.1	C19H15O7
6	26.8	345.0984	1.2	C18H17O7	23	37.9	341.1036	1.6	C19H17O6
7	28.5	327.0880	2.1	C18H15O6	24	39.7	357.1343	-0.2	C20H21O6
8	29.0	373.1294	0.3	C20H21O7	25	39.8	325.0719	0.4	C18H13O6
9	29.2	359.1137	0.2	C19H19O7	26	39.9	327.0880	1.8	C18H15O6
10	31.2	339.0875	0.3	C19H15O6	27	40.8	313.1091	3.0	C18H17O5
11	31.9	325.1076	-1.7	C19H17O5	28	42.3	339.0877	0.8	C19H15O6
12	28.5	329.1033	0.7	C18H17O6	29	43.3	325.1081	-0.1	C19H17O5
13	33.3	373.1294	0.3	C20H21O7	30	43.4	341.1037	1.9	C19H17O6
14	33.6	313.1084	0.8	C18H17O5	31	44.5	327.1241	0.9	C19H19O5
15	34.0	341.0665	-0.5	C18H13O7	32	49.8	353.0669	0.6	C19H13O7
16	34.6	343.1190	0.8	C19H19O6	33	50.7	355.0824	0.2	C19H15O7
17	34.7	341.0664	-0.8	C18H13O7	34	50.9	339.0876	-0.6	C19H15O6

4.4 结论

对中药成分分析和鉴定而言, 高分辨质谱具有简单的数据采集流程, 但如何在高分辨数据中, 快速地发现 and 鉴定目标结构的化合物, 已成为中药成分研究的限速挑战。MDF的优势在于: 能快速地从中多种复杂峰中查找特定母核结构的一类化合物; 能有效排除本底噪音的干扰, 快速发现被掩盖在强背景噪音下的目标化合物。

本文采用MDF处理TripleTOF™ 5600采集数据, 发现MDF能快速查找目标结构化合物, 且准确率>86%, 是数据快速分析的有利功能; 另一方面, MDF功能处理的数据要求具有较高质量精度, 本文发现的大部分麦冬黄酮和麦冬皂苷类化合物的质量精度<2 ppm。实验结果表明: TripleTOF™ 5600获得高质量精度数据, 采用MDF处理功能, 能快速地、有效地排除噪音, 找到目标结构化合物, 特异性强。

参考文献:

1. Rapid identification of ophiopogonins and ophiopogonones in *Ophiopogon japonicus* extract with a practical technique of mass defect filtering based on high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1227 (2012) 234-244.

中药多组分定量和定性分析

背景

中药成分繁多，含量低，在发挥其疗效时又往往需要通过多组分的协同行动。因此，建立中药多组分测定方法将有助于阐明中药整体作用，并达到全面控制中药质量的目的。

应用实例 I：LC-MS/MS串联质谱仪应用于中药多组分成分同时定性和定量分析

冬凌草为唇形科香茶菜属植物，研究表明其对多种移植性肿瘤有抗肿瘤作用，并有抗菌、消炎等作用。冬凌草中含有多个种类的化合物，其中在抗肿瘤、抗微生物、消炎以及抗氧化中起主要作用的组分是二萜类化合物，酚酸类化合物以及黄酮类化合物三种。由于冬凌草成分复杂，部分活性组分含量低，而主要活性组分二萜类化合物UV吸收较弱，用传统的HPLC-UV法测定非常困难，采用串联质谱法测定虽然能够大大提高灵敏度，但由于同系列化合物之间在色谱，质谱行为上非常相似，仅仅通过MRM法往往难以区分。本文通过QTRAP®质谱仪的独有的采集方法，对冬凌草中主要有效成分进行定量的同时，进行了进一步的定性和确证^[1]。



解决方案

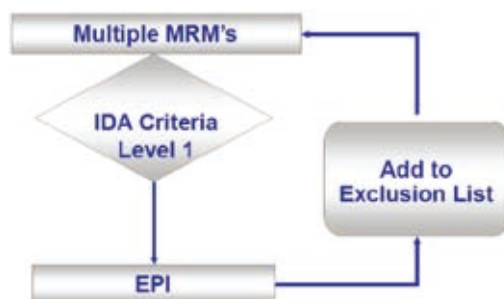
AB SCIEX公司的QTRAP® LC-MS/MS系列质谱仪创新性的将三重四极杆质谱和线性离子阱结合起来，集中二者定量和定性方面强大的功能，在中药多组分定性和定量测定中得到广泛的应用。利用QTRAP®质谱仪的MRM-IDA-EPI的方法，在ESI正、负检测模式下同时进行串联质谱MRM定量工作和离子阱质谱EPI定性工作以达到对冬凌草多组分同时进行定性和定量测定。

实验与结果

1. 仪器和方法

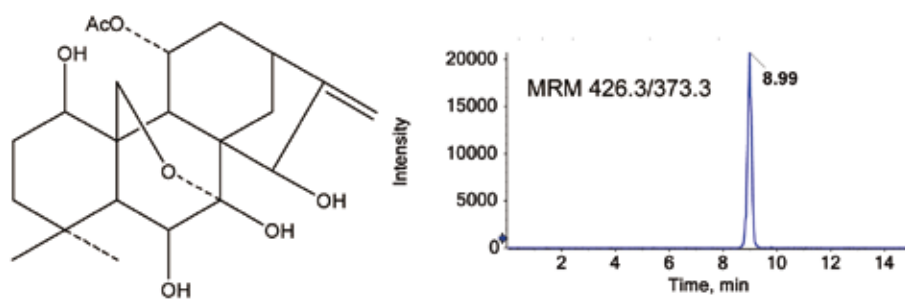
该试验在AB SCIEX 3200QTRAP®LC-MS/MS，液相为安捷伦1200完成。

MRM-IDA-EPI模式首先通过MRM方法检测不同的组分，当MRM信号强度到达设定的阈值之后自动触发出线性离子阱的增强型离子扫描模式，得到高质量的MS/MS质谱图，进行定性工作。

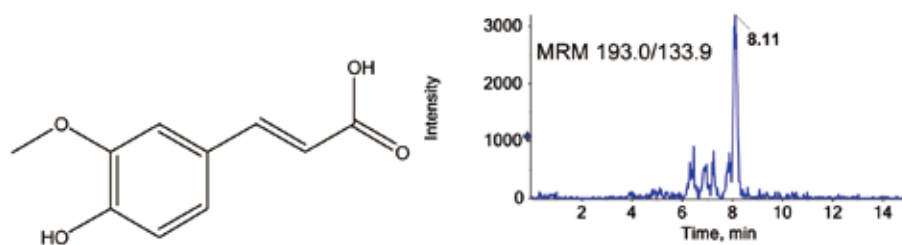


2. 实验结果

实验中测定了冬凌草中19种二萜类成分, 6种酚酸类成分和3种黄酮类成分见表1, 得到的三类组分代表性化学结构和色谱图如下图所示。



二萜类组分Sodoponin结构式及图谱



酚酸类组分Ferulic Acid结构式及图谱



黄酮类组分Isorhamnetin结构式及图谱

表1. 冬凌草中28种活性组分部分方法学实验结果

No.	Compounds	MS ¹ (m/z)	MS ² (m/z)	Linear range (μg/mL)	LOQ (ng)	Intra-day RSD%	Inter-day RSD%
1	Effusanin A	349.3*	331.3*, 313.3, 301.3	0.0137-0.412	0.112	3.90	2.52
2	Enmein	363.3*	327.3, 281.2*, 253.3	0.0543-1.63	0.109	1.62	1.76
3	Lasiodonin	365.3*	347.3*, 329.3, 311.3	0.347-10.4	0.614	3.64	0.95
4	Oridonin	365.3*	347.3*, 329.4, 301.3	0.970-29.1	0.335	1.52	1.32
5	Epinodosinol	382.3*	347.3*, 364.3, 329.2	0.375-11.26	0.0312	2.41	3.25
6	Nervosanin B	384.4*	349.3, 331.3*, 283.4	0.0103-0.310	0.0714	1.21	2.56
7	Serrin B	394.4*	377.3, 359.3*, 327.3	0.00847-0.254	0.0322	1.35	2.15
8	Isodonoiol	407.4*	389.3*, 331.4, 313.3	0.0417-1.25	0.0337	2.11	2.76
9	Sodoponin	426.3*	373.3, 349.3, 331.2*	0.0607-1.82	0.207	1.93	2.44
10	Shikokianidin	491.2*	389.3, 371.5, 329.2*	0.0390-1.17	0.0284	1.62	1.50
11	Rabdosite	535.4*	433.3, 373.4, 295.3*	0.0103-0.310	0.0672	3.24	3.57
12	Epinodosin	361.2*	331.3, 287.1*, 243.2	0.400-12.01	0.181	1.87	1.67
13	Nodosin	361.1*	287.2, 269.1, 257.1*	0.00417-0.125	0.0433	2.52	2.36
14	Ponicidin	361.2*	343.0, 299.1*, 255.1	0.710-21.3	0.0744	3.83	4.14
15	Rabdoternin A	363.2*	327.1, 283.1*, 255.1	0.0484-1.452	0.0302	2.04	1.93
16	Enmenol	365.2*	347.2*, 299.1, 267.2	0.0271-0.812	0.0420	1.76	1.61
17	Hebeirubescensin K	365.2*	317.2*, 299.2, 255.1	0.104-3.12	0.588	1.61	1.32
18	Lasiokaurin	405.2*	387.3, 327.0, 58.9*	0.0743-2.23	0.0587	1.98	1.82
19	Lasiokaurinol	407.2*	389.1, 329.1*, 58.9	0.0229-0.687	0.0610	2.27	2.93
20	Protocatechuic aldehyde	136.9*	107.9*, 91.9, 80.9	0.0407-1.22	0.0312	2.42	3.17
21	Salicylic acid	136.9*	108.1, 92.9*, 64.9	0.0340-1.02	0.0715	2.16	2.85
22	Ferulic acid	193.0*	178.0, 133.9*, 117.0	0.0291-0.872	0.154	2.47	2.12
23	Caffeic acid	179.0*	135.0*	0.0587-1.76	0.0337	1.85	2.48
24	Chlorogenic acid	353.1*	191.0*	0.0577-1.73	0.326	2.47	2.23
25	Rosmarinic acid	359.0*	197.0, 179.0, 160.9*	2.08-62.5	0.427	1.56	1.47
26	Quercetin	301.0*	178.9, 151.0*, 120.9	0.00700-0.210	0.0143	1.61	1.03
27	Isorhamnetin	315.1*	300.0*, 163.8, 150.9	0.00103-0.031	0.00431	1.33	1.57
28	Rutin	609.3*	300.1*, 271.0, 255.0	0.121-3.62	0.0440	0.84	1.45

*为用于MRM定量的离子对

其中化合物1-11为ESI正离子检测，12-28为ESI负离子检测。

3. 结论

AB SCIEX QTRAP®液质联用仪集合了三重四极杆强大的定量功能和线性离子阱出色的定性能力，能够针对中药多组分进行快速、灵敏、专一、稳定的鉴定，为现代中药质量控制提供了定性定量一体化、自动化的解决方案。

参考文献：

1. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 28 components in Isodon rubescens by HPLC-ESI-MS/MS. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 545-557

中药多组分药代动力学

背景

中药多组分药代动力学是以中医药基本理论为指导，用药物动力学的方法来研究中药在人和动物体内的吸收、分布、代谢和消除过程。其理论和技术在阐明中医药防病治病机制、优化中医临床给药方案、指导中药新药和新剂型研制、评价中药制剂和中成药的内在质量等方面发挥着重要的作用。

应用实例 I：LC-MS/MS串联质谱用于延胡索体内药代动力学研究

延胡索主要功能是具有活血，利气，止痛，其主要化学成分是生物碱类化合物，其中四氢巴马汀、脱氢紫堇碱、小檗碱和巴马汀等四种生物碱是其主要成分。由于中药成分的复杂性，许多可检测的化学成分在复方中含量低，其血、尿和组织中的浓度更低，要求检测方法有足够的灵敏度；另外与被检测物在化学结构相似的类似物多样，多种药味的配伍影响，生物样品中的内源性杂质，降解产物，被吸收入血的其他成分等，均可能干扰被测成分的分离。LC-MS/MS串联质谱在这方面应用有很大优势，能够同时检测来源于同一母离子或子离子的结构相似，色谱行为相近的共洗脱物质，使复杂体系能够同时分离分析。



解决方案

AB SCIEX 4000 QTRAP® LC-MS/MS独有的LINAC®高压碰撞室专利技术使得LC-MS/MS目前可以不分时间段，同步测定300个MRM离子对。采用高专属性和高灵敏度的MRM方式检测目标物时，检测限低，线性范围宽，从而完成中药多组分的药代动力学研究。AB SCIEX QTRAP®液质联用仪集合了三重四极杆强大的定量功能和线性离子阱出色的定性能力，能够针对中药多组分进行快速、灵敏、专一、稳定的鉴定，为现代中药质量控制提供了定性定量一体化、自动化的解决方案。

实验与结果

1. 仪器和试验方法

试验在AB SCIEX 4000QTRAP®LC-MS/MS上完成，液相为Agilent 1200。

制备心肌缺血模型，动物经十二指肠给入元胡总生物碱，分别在给药0.083、0.167、0.333、0.667、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00和8.00h后采血，离心，加入适量甲酸溶液和抗坏血酸溶液冻存。血样经丙酮提取，离心，氮气吹干后复溶，再次高速离心后上清液进行LC-MS/MS分析。

色谱条件：色谱柱为Luna C18柱（50 mm × 4.6 mm），流动相为乙腈-含0.1%甲酸的水溶液，梯度洗脱，流速为0.60 mL/min，进样10 μL。

质谱条件：IS：5500V；雾化气（Gas 1）：60psi；辅助加热气（Gas 2）：50psi；气帘气：10psi；辅助加热气温度（TEM）：600℃。正离子检测，多反应监测（MRM）方式，用于定量分析的离子对（m/z）：延胡

索乙素 (tetrahydropalmatine, THP) 366.2/350.2, 脱氢紫堇碱 (Dehydrocorydaline, DHC) 356.2/191.2, 小檗碱 (Berberine, Ber) 336.2/320.2和巴马汀 (Palmatine, Pal) 352.2/336.2。

2. 实验结果

犬血浆中四种成分的保留时间分别为3.98min (THP)、5.19min (DHC)、4.85min (Ber)、和4.84 min (Pal)，代表性色谱图见图1。

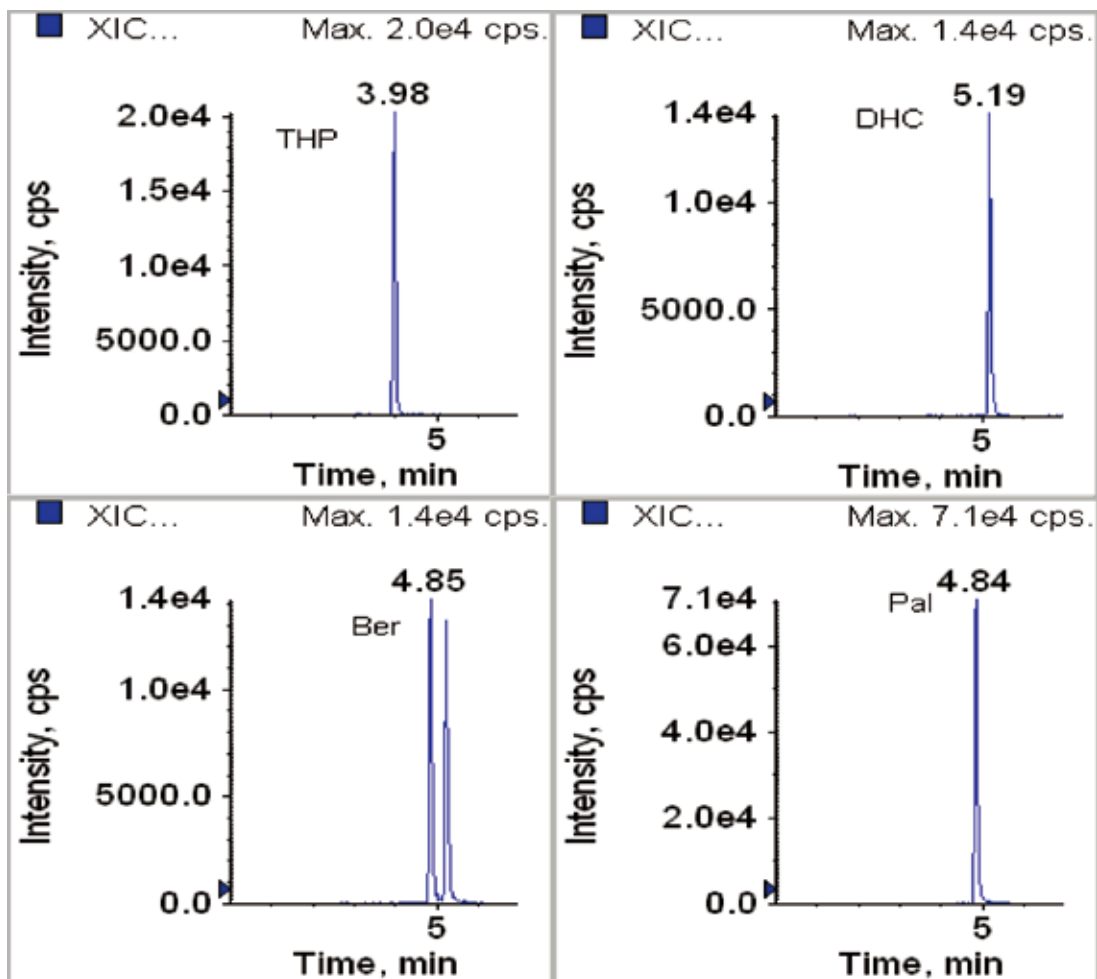


图1. 四种生物碱成分血浆中的MRM色谱图

按血浆样品处理操作，应用Beagle犬空白血浆，配制低、中、高三个浓度的样品，并根据随行标准曲线计算样品浓度，与配制浓度对照，求得测定方法的准确度与精密度。各浓度准确度数值均在90%-115%之间。精密度测定结果如表1所示。

表1. 犬血浆中四种延胡索生物碱类成分的精密度实验结果

	ng·mL ⁻¹	1	2	3	4	5	Mean	RSD
Ber	0.0977	0.0941	0.1040	0.0916	0.0926	0.1120	0.0989	8.96
	3.13	3.28	3.36	3.61	3.27	2.97	3.30	6.94
	12.5	12.30	12.60	12.40	12.40	11.70	12.28	2.79
THP	0.0977	0.0953	0.1140	0.1070	0.1070	0.0900	0.1027	9.50
	3.13	3.19	3.21	3.46	3.18	3.26	3.26	3.56
	12.5	12.70	13.70	13.70	11.60	11.50	12.64	8.51
Pal	0.0977	0.1090	0.0992	0.0973	0.1060	0.1100	0.1043	5.52
	3.13	3.41	3.43	3.58	3.45	3.52	3.48	2.03
	12.5	13.30	13.30	13.20	13.30	12.50	13.12	2.66
DHC	0.0977	0.1030	0.0984	0.1120	0.1050	0.1080	0.1053	4.87
	3.13	3.00	3.19	3.51	3.27	3.41	3.28	6.03
	12.5	12.7	12.7	12.5	12.6	11.5	12.40	4.11

实验表明：血浆内源性杂质不干扰样品的测定，并且低，中，高三个浓度精密度和稳定性符合相关要求。

药代动力学测定结果

以元胡生物碱类成分为研究对象，探讨了给药后四种成分在模型Beagle犬体内的药代动力学特征，各成分的药时曲线见图2。

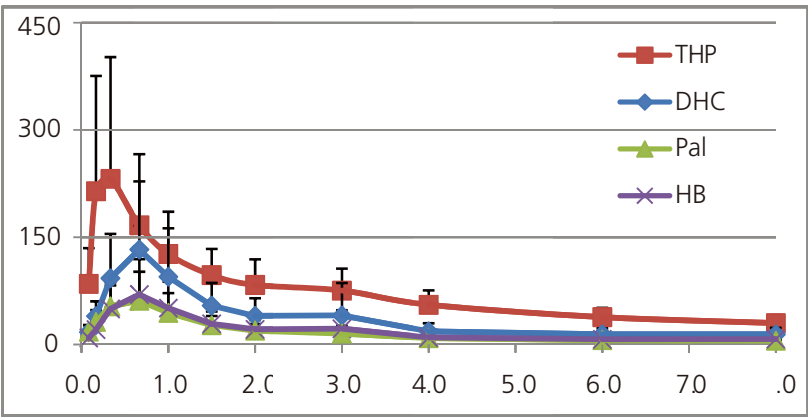


图2. 四种生物碱类成分在模型犬的药时曲线图（纵坐标为浓度单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，横坐标为时间单位h）

中药多组分体、内外代谢物鉴定

背景

药物代谢是指药物在体内吸收、分布、生物转化、排泄等一系列过程。目前中药代谢的研究主要包括肝脏代谢和肠内菌群代谢。掌握了中药的药物代谢特征，才能更加合理的指导临床用药和新药开发。随着现代分析技术的发展，串联液质技术在检测复杂生物样品中中药成分及鉴定低浓度代谢物的特异性和灵敏度方面，体现出传统检测手段所无可比拟的优势。

应用实例 I：QTRAP® 系列串联质谱仪用于朝藿定C代谢物鉴定的研究

淫羊藿是一类被广泛应用的中药，其传统的主治功效为补肾壮阳。但近来，淫羊藿还被广泛应用于治疗其他疾病，如心血管疾病、高血压、骨质疏松、妇女更年期综合症等。黄酮类化合物被认为是淫羊藿的主要生物活性成分，而朝藿定C作为淫羊藿的主要黄酮类活性成分之一，研究其药物代谢规律可以帮助我们解释和预测此类中草药的疗效和毒性。



解决方案

QTRAP® LC-MS/MS系列质谱仪是新一代液质联用串联质谱技术，其独特之处在于同时具备了完整的三重四极杆的质谱特点，以及线性离子阱的功能，在离子阱模式下，QTRAP®的MS/MS谱的灵敏度比常规的三重四极杆型高出二个数量级以上，同时还还将两者的扫描功能巧妙的结合起来，实现“串联四极杆-线性离子阱”的迅速切换。通过检测预测代谢物的可能的离子对触发二级扫描模式来发现并鉴定代谢物（pMRM-IDA-EPI），不仅具有比其他模式更高的灵敏度来发现体内低浓度的代谢物，且可快速的促发离子阱扫描模式得到更丰富的MS/MS定性数据对代谢产物进行鉴定，使得QTRAP®系列串联质谱仪在代谢物鉴定分析方面发挥巨大作用。

本文展示了三重四极杆线性离子阱质谱AB SCIEX 3200 QTRAP®运用预测多反应监测触发增强二级扫描模式（pMRM-IDA-EPI）来分析并鉴定朝藿定C的代谢产物。

实验与结果

1. 实验样品及仪器

雄性Sprague-Dawley大鼠（250-300g），静脉及灌胃给药前后（20mg/kg），分别采取尿样、胆汁、胃内容物及小肠组织。尿样和胆汁样品用固相萃取法提取，胃内容物及小肠组织用蛋白沉淀法提取。

试验在AB SCIEX 3200QTRAP®LC-MS/MS上完成，液相为安捷伦公司1200，色谱柱为Waters Symmetry C18 column（4.6mm×250mm, 5μm），所有试剂均为色谱纯。

2. 试验方法

朝藿定C（结构式见图1）在正离子 $[M+H]^+$ 模式下可获得更丰富的子离子碎片，因此本文运用正离子ESI模式进行试验。

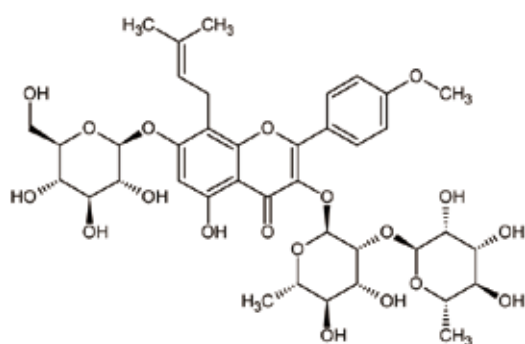


图1. 朝藿定C的结构式

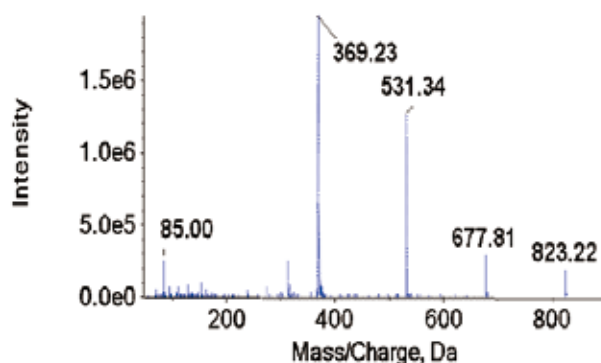


图2. 朝藿定C的二级扫描图

通过子离子扫描得到母药朝藿定C的二级扫描谱图（见图2），选择子离子 m/z 369或者 m/z 313，结合朝藿定C母离子的裂解规律，通过潜在的生物转化类型作全面的代谢物离子对预测，在Analyst 1.4.2软件上生成预测代谢物的MRM。

利用QTRAP®独特扫描方式IDA功能（见图3），通过扫描预测代谢物的MRM离子对，如果发现特征的离子，仪器自动切换到增强子离子扫描（EPI），即线性离子阱的高灵敏度子离子扫描，快速得到所有发现离子的高质量MS/MS质谱图，进行结构鉴定。

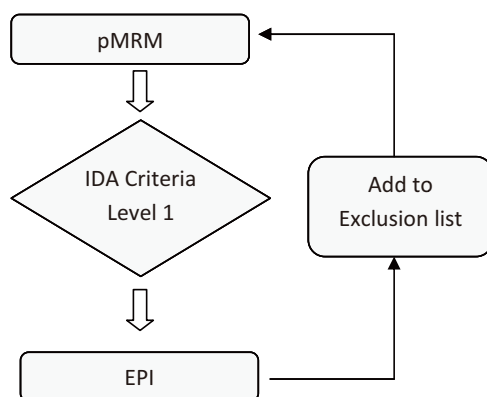


图3. IDA 工作流程

3. 结果和结论

3.1 结果

根据特征性及灵敏度极高的扫描方式MRM去发现样品中可能的代谢物，并使用QTRAP®特有的扫描技术，根据IDA设定的条件实时触发增强子离子扫描（EPI），获得代谢物的子离子信息（如图4所示）。通过比较代谢物与母药的二级质谱图，结合朝藿定C的结构和代谢规律，成功鉴定出18种主要代谢产物（见表1）。

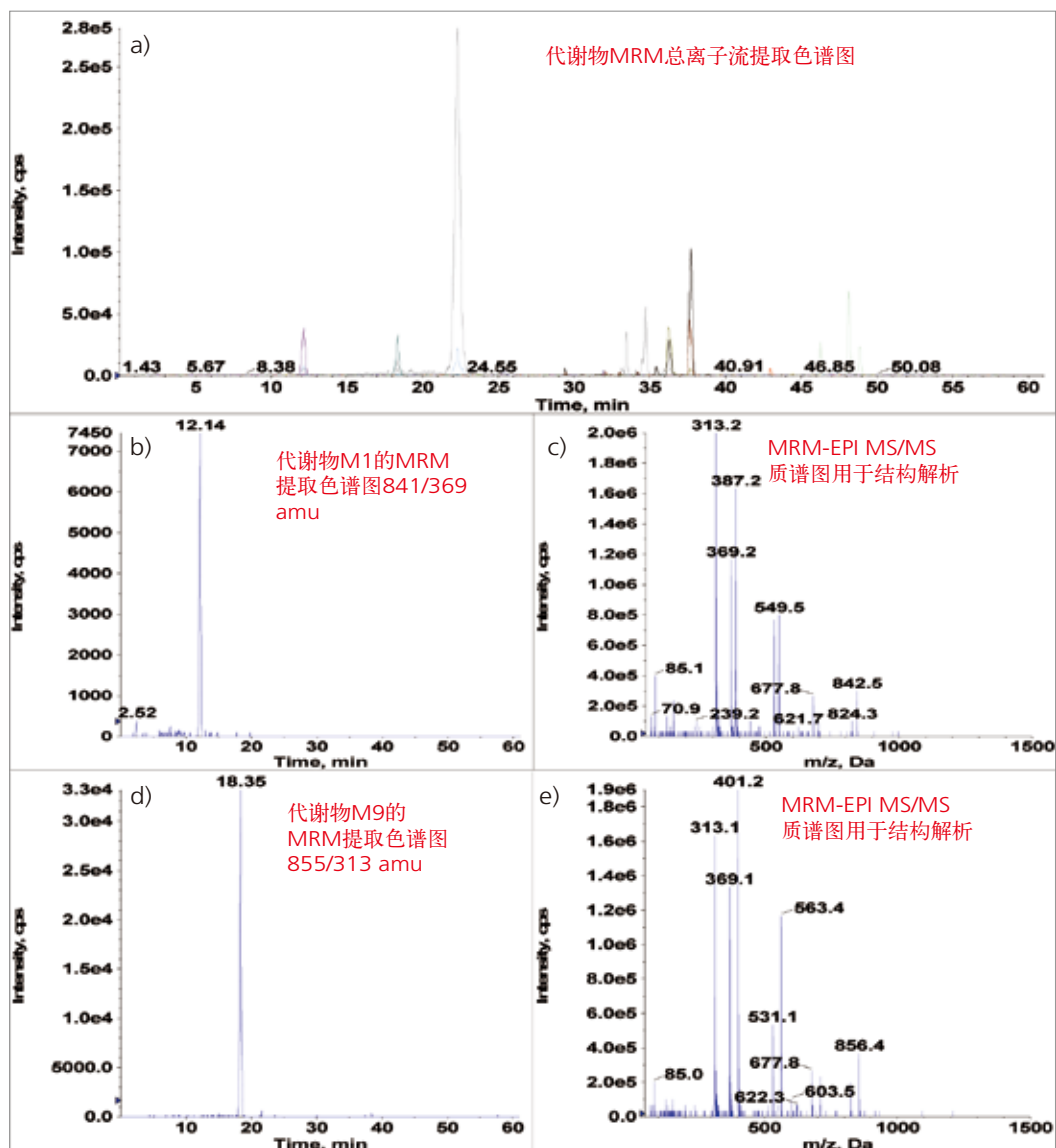


图4. a) 胃内容物样品的MRM总离子流提取色谱图；b) 代谢物M1的MRM提取色谱图；
c) 代谢物M1的EPI扫描图；d) 代谢物M9的MRM提取色谱图；e) 代谢物M9的EPI扫描图

在静脉注射和口服给药的大鼠尿液样品中检出15个代谢产物（M2或M8, M3, M4, M5, M6, M7, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18），在静脉注射给药的大鼠胆汁样品中检出9个代谢产物（M2, M8, M3, M4, M5, M12, M13, M16, M18），而在口服给药的大鼠胆汁样品只检出4种代谢产物（M3, M13, M16, M18）。另外有7种代谢产物（M1, M9, M12, M15, M16, M17, M18）及3种代谢产物（M16, M17, M18）分别在口服给药的大鼠胃内容物和小肠组织内被检出。

实验结果显示，在静脉注射给药方式下，朝藿定C和其代谢物在大鼠体内主要通过尿液和胆汁清除，而在口服给药的方式下则主要通过粪便和尿液清除，其代谢途径包括水解、羟基化、脱氢、去甲基化、葡萄糖醛酸及其它的糖结合。

表1. 检出的代谢产物的列表

编号	RT(min)	预测代谢物的名称	母离子 [M+H] ⁺ (m/z)	主要的碎片离子(m/z)
M1	12.14	13-OH-Epimedin C	841.3	823.3, 695.4, 677.5, 549.5, 531.2, 387.2, 369.2, 313.2, 153.1, 85.1, 70.9
M2	12.40	trans-Dehydrogenated-epimedin C or cis-dehydrogenated-epimedin C	821.3	659.4, 513.1, 367.2, 264.2, 214.1
M3	13.28	Demethylated-epimedin C	809.3	663.2, 517.1, 355.1, 85.0, 70.9
M4	14.48	2'-OH-Epimedin C	839.3	693.4, 547.3, 385.3, 313.3, 153.2, 85.0
M5	14.90	3'-OH-Epimedin C	839.3	693.9, 547.6, 385.2, 313.3, 153.2, 85.0
M6	14.90	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnoside-7-O-glucoside- glucoside	985.0	693.3, 531.2, 369.4, 313.1, 85.0
M7	16.01	3',5'-OH-12,13-Epoxy-epimedin C	871.3	579.5, 417.1, 385.1, 313.2, 176.0
M8	17.81	trans-Dehydrogenated-epimedin C or cis-dehydrogenated-epimedin C	821.3	486.2, 367.2, 377.4, 166.5
M9	18.35	Anhydroicaritin-30,50-OH-3-O- rhamnosiderhamnoside-7-O- glucoside	855.3	823.4, 709.6, 677.6, 563.6, 531.5, 401.2, 369.2, 313.1, 153.1, 111.1, 85.0, 70.9
M10	21.12	12,13-Epoxy-epimedin C	839.3	694.0, 547.3, 385.3, 329.4, 85.0
M11	21.27	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnosideglucoside-7-O-glucoside	985.0	677.4, 531.5, 369.2, 313.2, 85.0
M12	21.63	Epimedin B	809.3	677.4, 531.2, 369.2, 313.1, 85.0
M13	22.91	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnoside-7-Oglucuronic acid	837.3	691.4, 545.4, 369.1, 313.1, 153.1, 85.0
M14	23.26	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnoside-7-O-glucoside- glucuronic acid	999.3	708.3, 531.7, 369.1, 313.0
M15	36.06	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnoside-7-O-rhamnoside	807.3	515.2, 423.6, 369.2, 355.1, 184.2, 85.0
M16	36.10	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside- rhamnoside	661.5	515.2, 423.1, 369.2, 355.1 313.2, 153.1, 85.1, 70.9
M17	36.21	Icariside II	515.3	369.4, 355.3, 313.3, 85.0
M18	37.00	Anhydroicaritin	369.2	313.1, 243.1, 85.0, 79.0

3.2 结论

体内代谢物鉴定实验通常面临样品量少，代谢物浓度低等问题。通过预测的代谢产物的MRM离子对触发二级子离子扫描模式（pMRM-IDA-EPI）对代谢样品进行检测是最灵敏最特异的方式，不仅可以通过灵敏度最高的多反应监测（MRM）发现样品中浓度较低的代谢物，且可在四极杆模式和离子阱之间快速切换，得到代谢产物的增强二级子离子扫描图，从而帮助进行结构解析，特别适合体内药物代谢的研究。

参考文献

1. Tentative identification of new metabolites of epimedin C by liquid chromatography - mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 1-8

应用实例 II：QTRAP®系列串联质谱仪用于人参代谢物鉴定的研究

人参皂苷在临床上已经显现出其对人类健康有益的药理学活性，由于此类化合物可以影响到人体内很多代谢途径，其药效作用非常复杂且难以研究。数百万服用此类草本药物的患者都面临其可能带来潜在副作用的风险，所以现在人们对于研究这类化合物的兴趣正在逐渐增大。皂苷（Saponins）是一类复杂的糖苷，其广泛的分布于植物及一些海洋动物中。多篇研究表明，很多皂苷具有广泛的生物活性，如抗菌，除草和消炎等活性作用，其草药制品在世界范围内广受欢迎，其中人参是最使用最普遍的一类草药品。人参中的皂苷类活性成分是人参皂苷，已经被鉴定出的人参皂苷类化合物超过30种。本文展示了三重四极杆线性离子阱质谱AB SCIEX QTRAP® 5500运用正负切换模式结合代谢物鉴定专用软件快速鉴定人参皂苷类代谢物的研究能力。



解决方案

QTRAP® LC-MS/MS系列质谱仪是新一代液质联用串联质谱技术，其独特之处在于同时具备了完整的三重四极杆的质谱特点，以及线性离子阱的功能，在离子阱模式下，QTRAP®的MS/MS谱的灵敏度比常规的三重四极杆型高出二个数量级以上，同时还将两者的扫描功能巧妙的结合起来，实现“串联四极杆-线性离子阱”的迅速切换，通过选择母离子扫描等来发现代谢物，同时触发离子阱扫描模式得到更丰富的MS/MS定性数据。因此，QTRAP®系列质谱仪兼有定性和定量分析的功能，且具有很多特有的“杆-阱”的新型扫描方式，使得QTRAP®串联质谱仪在代谢物鉴定分析方面发挥巨大作用。

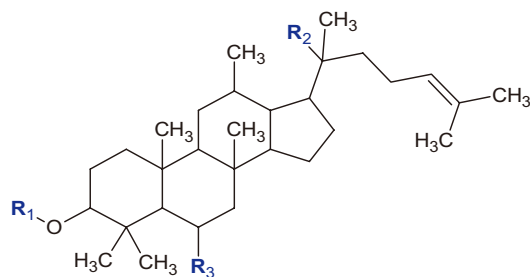
实验与结果

1. 实验样品

成年的Zucker大鼠，用北美安大略种植的人参提取物灌胃42天，处死后采取血浆样品，用于分析人参皂苷类化合物及其代谢物。

2. 试验方法

采用QTRAP® 5500系统独有的 Information Dependent Acquisition (IDA) 的工作模式，一次进样可同时得到待测物的MS和MS/MS信息，以最少的样品量获得大量的信息。使用代谢物鉴定软件LightSight® Software version 2.2.1根据一级质谱扫描（MS）自动生成二级碎片（MS/MS）的采集方法，然后把一级质谱与二级质谱相联系进行数据处理。使用ACD/Processor version 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc, Toronto, ON, Canada) 通过一级及二级质谱扫描结果对代谢物进行结构解析。人参皂苷类化合物的结构见图1所示。



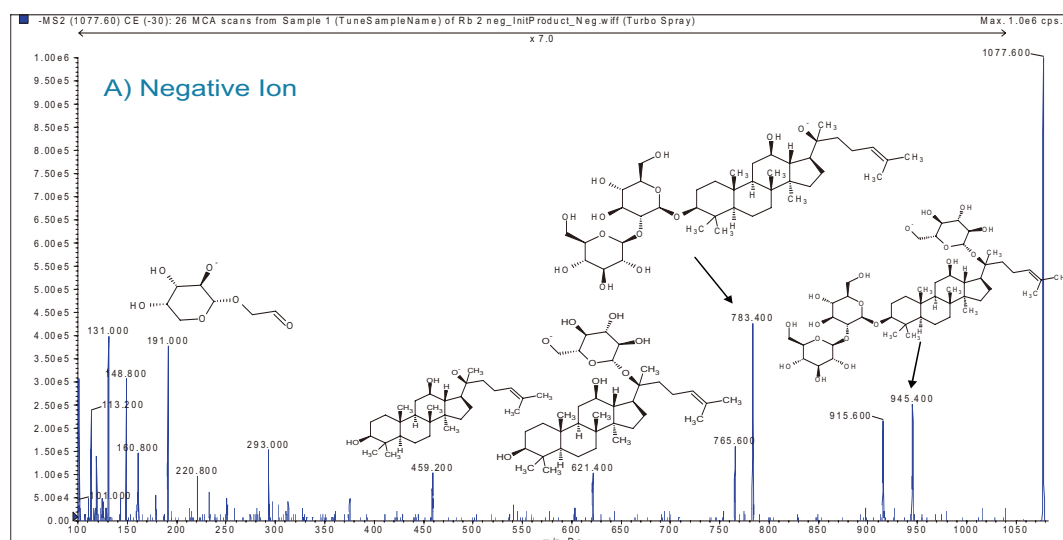
Ginsenoside	R ₁	R ₂	R ₃	M.W.
Rb1	-Glc-Glc	H	-Glc-Glc	1108
Rb2	-Glc-Glc	H	-Glc-Arap	1078
Rc	-Glc-Glc	H	-Glc-Araf	1078
Rd	-Glc-Glc	H	-Glc	946
Rf	H	-Glc-Glc	H	800
Rg1	H	-Glc	-Glc	800

图1. 一些人参皂苷类化合物的结构，其中-Glc为葡萄糖，-Arap为-L-arabinopyransoyl，-Araf 为-D-arabinofuranosyl

3. 结果和结论

3.1 结果

人参皂苷类化合物在正离子和负离子模式下都能离子化，然而一些此类化合物在正离子模式下响应更好。由于钠离子广泛的存在于使用的玻璃器皿及生物体内，当使用正离子模式时，人参皂苷类化合物及其代谢产物通常以加合钠离子的形式离子化，而此类母离子产生的碎片离子不能提供很好的结构信息，使结构解析变得复杂。图2为Rb2在不同的加合离子状态下得到的二级碎片离子（MS/MS）图。



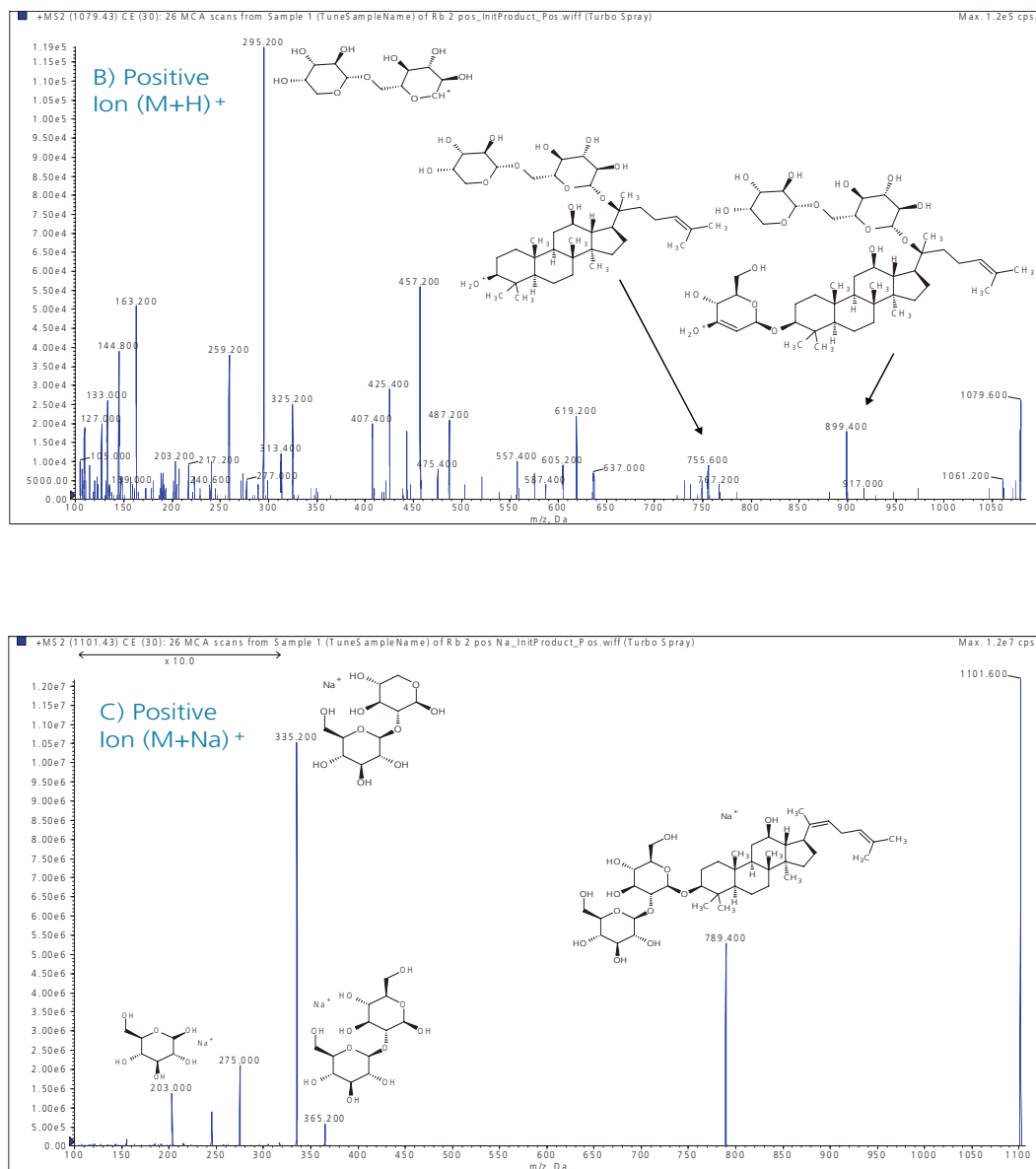


图2. Rb2的MS/MS谱图, A) 负离子[M-H]⁻; B) 正离子[M+H]⁺; C) 正离子[M+Na]⁺

Q3扫描正负切换模式分析血浆样品, 一次进样可以同时得到正离子和负离子的扫描谱图, 既保证了更多的代谢物可以被检测到, 同时也可以得到更丰富的结构信息。

由于人参皂苷类化合物种类大概有30种, 人工处理采集得到的数据, 即使是我们只关注6种人参皂苷类化合物的代谢也是非常费时间的, 而使用代谢物自动鉴定的软件LightSight®软件可以有效地减少数据处理的时间, 见图3。

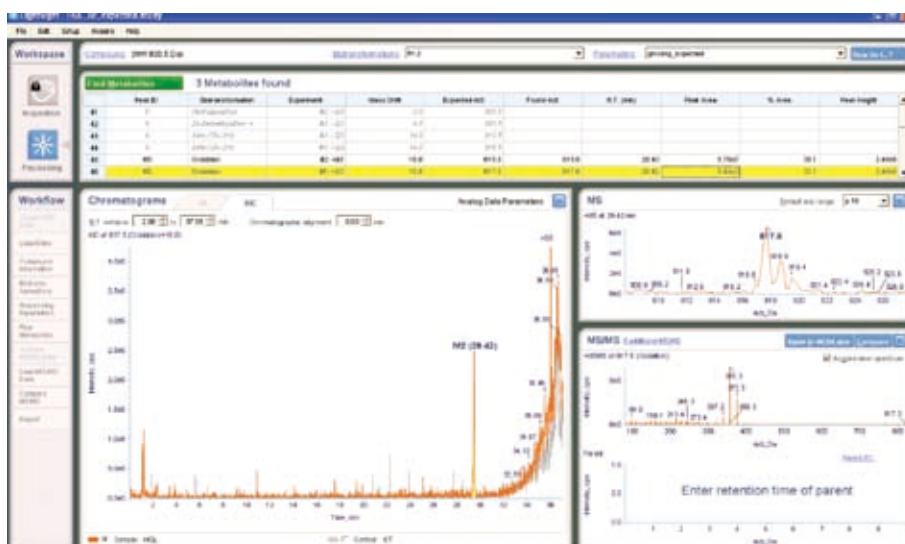


图3. 使用LightSight®软件进行代谢物鉴定。软件可以在一个工作站内，对正负两种模式下的一级谱图和二级谱图进行相关，进行快速的数据处理。

已经有研究表明，人参皂苷类化合物的代谢可以发生在肝内，同时也可以被胃酸和肠道内的细菌所降解。图4为在血浆中检测到的部分人参皂苷代谢物可能的结构。在检测到的人参皂苷代谢物中，有一些只能在正离子模式下被检测，而其它一些只能在负离子模式下检测，还有一部分用正负离子模式下均可检测。

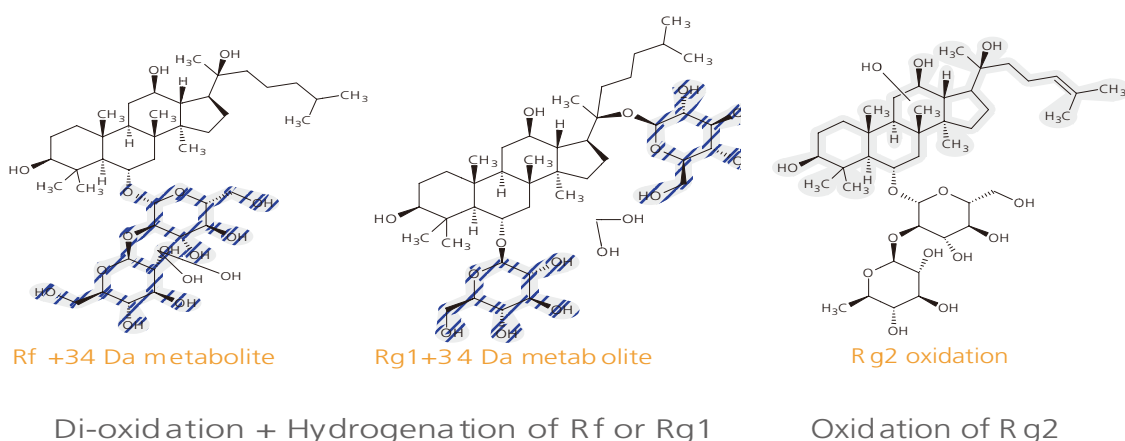


图4. 在血浆中检测出的一些人参皂苷类代谢物可能的结构

正负极性切换进行数据采集并触发MS/MS扫描，可以得到更为全面的MS/MS谱图，可更有效地进行结构解析。图5为图4中Rg2氧化代谢物的正负两种模式下同时采集到的MS/MS谱图。

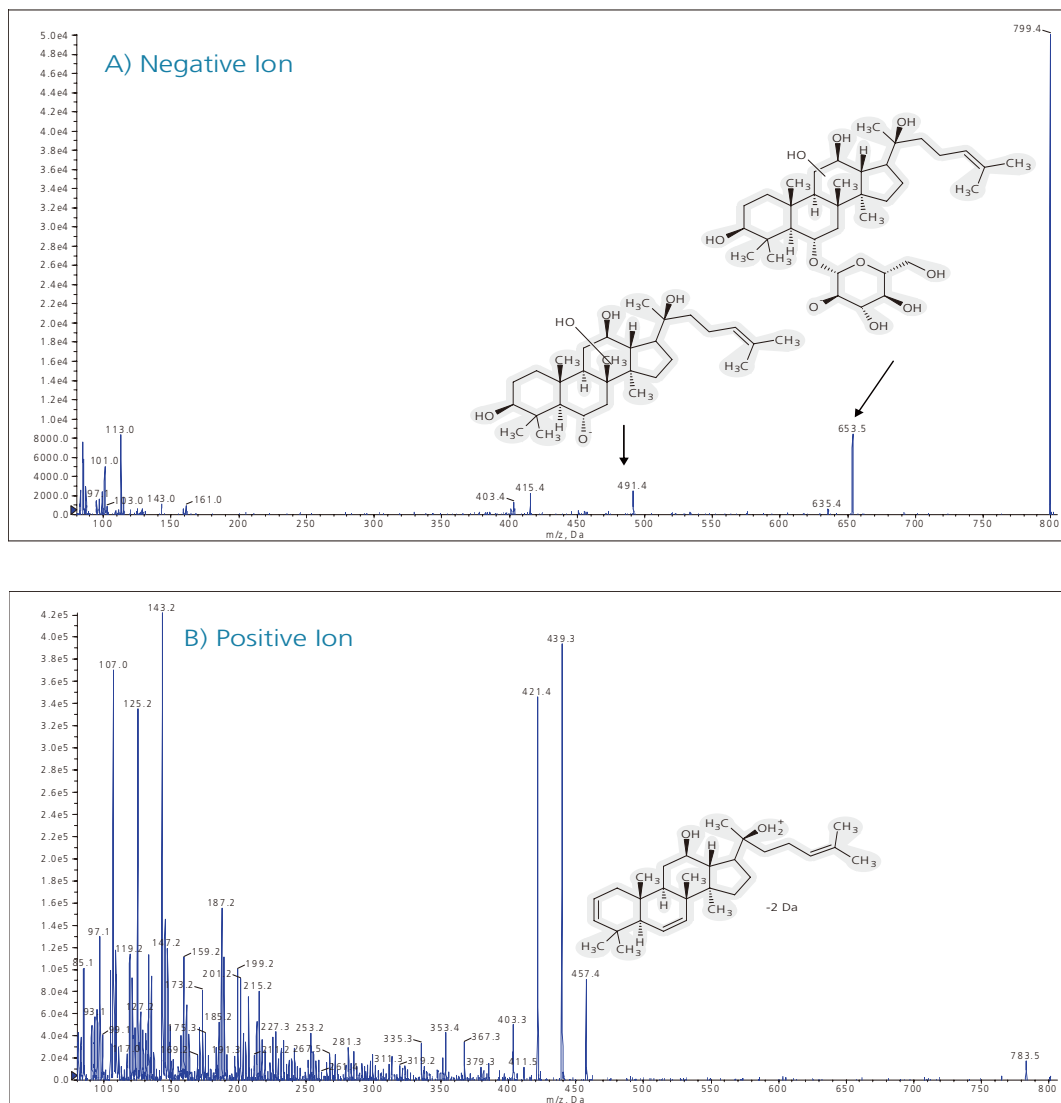


图5. A) 负离子模式得到的Rg2 氧化代谢物的 MS/MS谱图；B) 正离子模式下得到的Rg2氧化代谢物的MSMS谱图

3.2 结论

正负极性切换结合Q3扫描模式触发MS/MS扫描用于代谢物鉴定，一次进样可同时在正离子和负离子两种模式下进行代谢物的数据采集并获得完整的MS/MS谱图，可为代谢物结构解析提供更详细的信息。另外，代谢物鉴定专用软件LightSight[®] 软件使数据处理变得简单、高效，大大提高了代谢产物鉴定的速度和效率。

应用实例 III:

AB SCIEX 高分辨质谱仪鉴定大鼠血浆和肠样品中人参提取液的代谢物

人参视为延年益寿的圣品，当今时代，风靡市场的一些健身抗老、延年益寿药物，如人参蜂王浆、天然营养口池液---王中王、首乌延寿丹、洞天长寿膏、十全大补膏、参茸药酒等，都离不开人参。近期研究发现，人参皂苷在肠内细菌作用下产生的代谢物，有的能抗突变、抗癌转移。本文研究的是给大鼠灌胃人参提取液后血浆和肠样品中的人参皂苷的代谢物。



解决方案

TripleTOF™ 5600 LC-MS/MS 质谱仪具有高分辨率、高扫描速度、高质量精度和高灵敏度的特点，并且具有智能信息关联采集 (IDA) 的采集方法，实时动态背景扣除 (DBS) 以及多重质量亏损 (MMDF) 触发 TOF MS/MS，一次进样，即可保证在复杂基质样品中能获得低浓度代谢物的高质量的 MS/MS，用于代谢物的鉴定。结合 Peakview® 软件或强大专业的 MetabolitePilot™ 代谢物鉴定软件，能快速获取更加确信的代谢物鉴定结果。

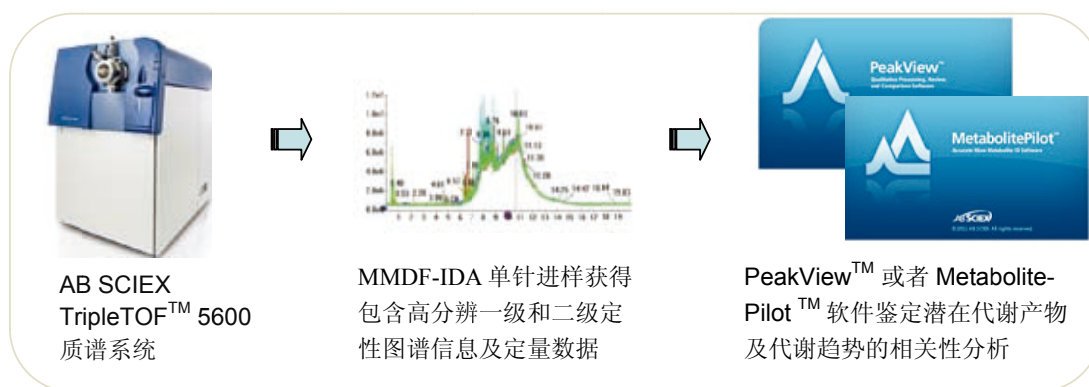


图1. TripleTOF™ 5600结合Peakview®或MetabolitePilot™软件用于代谢物鉴定和代谢趋势 (PK) 研究的工作流程

实验与结果

1. 实验方法

样品制备：成年雄性Zucker大鼠被每天灌胃人参提取液，持续4~5周后采集血样和结肠样本，用正丁醇3:1的比例振荡提取，10,000 g 高速离心，200 μ L上清液吹干后以50 μ L 乙腈:水 (2:8) 复溶，5 μ L进样分析。

LC/MS分析条件：质谱采用AB SCIEX TripleTOF™ 5600, DuoSpray™电喷雾离子源 (ESI+)，液相采用ACQUITY UPLC系统，色谱柱为Waters BEH C18, 2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m，流动相A: 0.1%甲酸-水，流动相B: 0.1%甲酸-乙腈。流速: 0.6 mL/min。

2. 数据采集

采用MMDF-IDA高效采集方法。预扫描: TOF MS (+)，m/z 100-2000；依赖性扫描: 10个TOF MS/MS (+)，m/z 50-2000；针对主要人参皂苷代谢物的MMDF-IDA实时采集方法的设置，见图2，保证在一针进样中最有效获得相关代谢物的二级谱图、尤其是高背景掩盖下的低含量代谢物的二级谱图。TOF MS的扫描数据用于定量，而通过信息关联采集 (IDA) 得到的TOF MS/MS数据则用于潜在代谢物的结构解析。

Survey -> IDA Experiment

- ☐ For ions greater than: 100 m/z
- ☐ For ions smaller than: 0 m/z
- ☐ With charge state: 2 to 4
- Which exceeds: 250 cps
- ☒ Exclude isotopes within: 4 Da
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Maximum number of candidate ions to monitor per cycle: 10
- Exclude former target ions:
 - ☐ Never
 - ☐ Always
 - ☒ For 1 seconds
 - ☒ Alter 3 occurrence(s)

Mass Defect Filter

- ☒ Exclusively: Select the Exclusively check box to trigger a dependent experiment only if the mass defect criteria is met. Clear the check box to prioritize the candidates according to the Switch Criteria.
- ☐ Peptides
- ☒ Metabolism
 - Tolerance: +/- 25 mDa

	Formula	MW (Da)	Width (Da)	Mass Defect (mD)
8	C30H66O4	490.4961	100	496.1112
9	C42H73O13	785.5051	100	505.1182
10	C38H63O8Na	646.4421	100	442.0843
11	NaC42H73O13	806.4949	100	494.8879
12	NaC30H53O3	484.3892	100	389.2407
13	NaC30H66O4	513.4859	100	485.8809
14	NaC54H93O23	1132.6005	100	600.5351
15	NaC48H83O18	970.5477	100	547.7115
16	NaC42H73O14	824.4898	100	489.8026
17				

图2. MMDF-IDA实时采集方法的设置

3. 数据分析

a) Peakview®软件进行代谢物鉴定

Peakview®软件中的插件FormulaFinder是根据一级质谱的质量精度、同位素比例、不饱和度等信息，并遵循化学逻辑来推测化合物分子式，同时根据所得化合物的分子式推断碎片MS/MS的分子组成，见图3和图4。Peakview®软件中的Fragment Pane可进行结构解析，进一步验证代谢物，见图5。

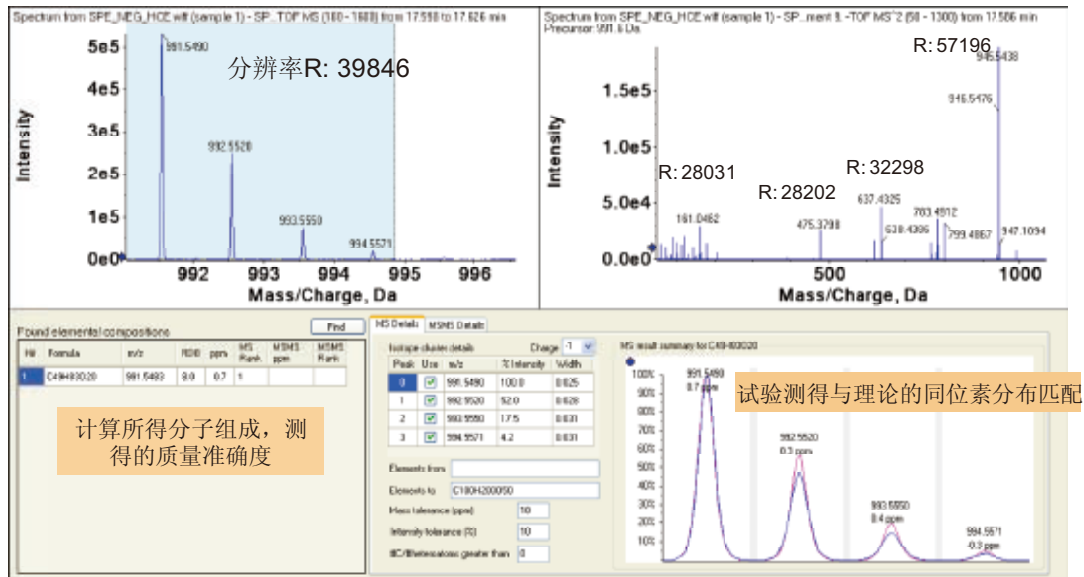


图3. Peakview®软件通过FormulaFinder计算代谢物991.5的一级元素组成，一级和二级均有很好的分辨率

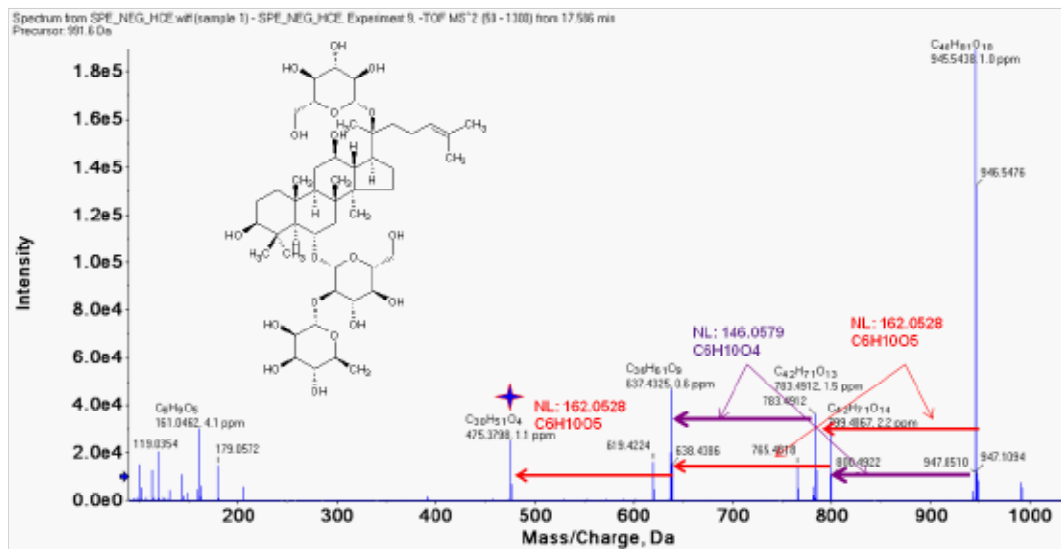


图4. FormulaFinder计算高分辨的MS/MS碎片元素组成，各碎片均有很好的质量准确度，根据人参皂苷的结构特点，从而推断代谢物的结构

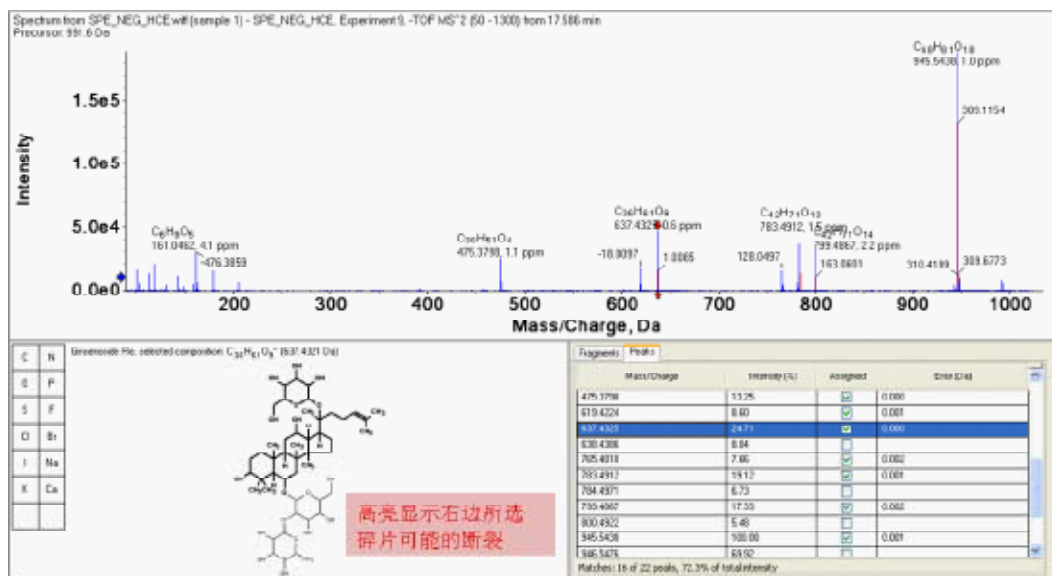


图5. Peakview®软件通过Fragment Pane智能归属碎片与结构的关系，便于代谢物结构解析

b) MetabolitePilot™软件直观的数据分析

MetabolitePilot™软件是一个强大的代谢物鉴定软件，数据分析流程简单明了，界面友好直观，能快速获取更加确信的代谢物鉴定结果，见图6。整合的结构解析功能使原药和代谢物的碎裂规律清晰可见，代谢点的分析更为简便快捷，见图7。原药及代谢物的代谢趋势变化也一目了然，如图8所示。

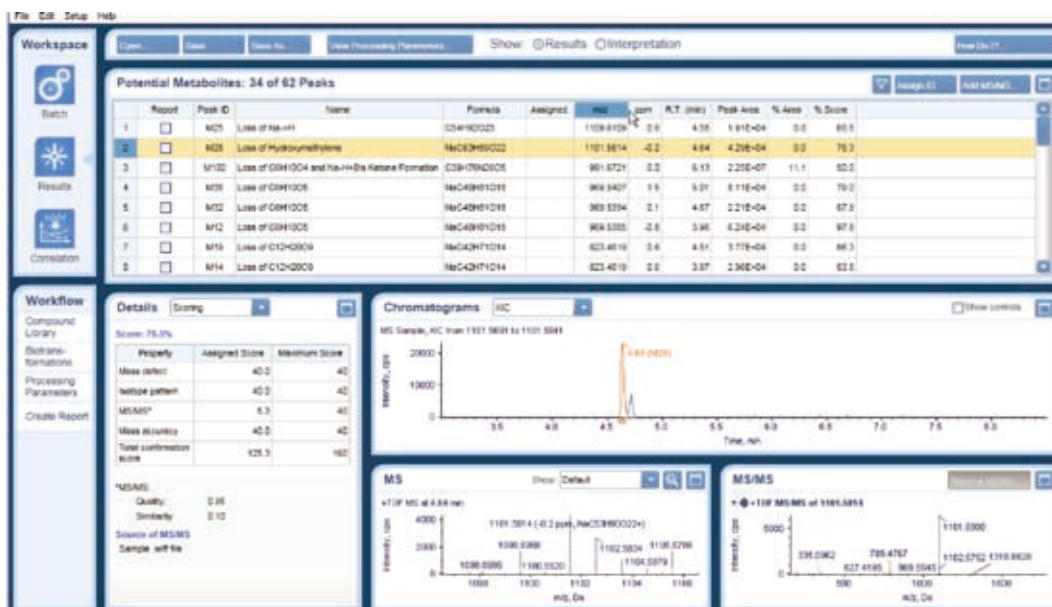


图6. MetabolitePilot™1.5软件分析血样中Rb1的主要代谢产物的结果界面。内置的FormulaFinder自动计算潜在代谢物的元素组成，并提供质量准确度、相对峰面积含量、代谢物提取离子流色谱图及其对应的高分辨一级、二级谱图（不同颜色的二级碎片表示与原药碎裂规律的相关性归属，可得出碎片离子789.47是与原药相同的碎片离子，碎片离子335.09与原药具有相同的中性丢失）

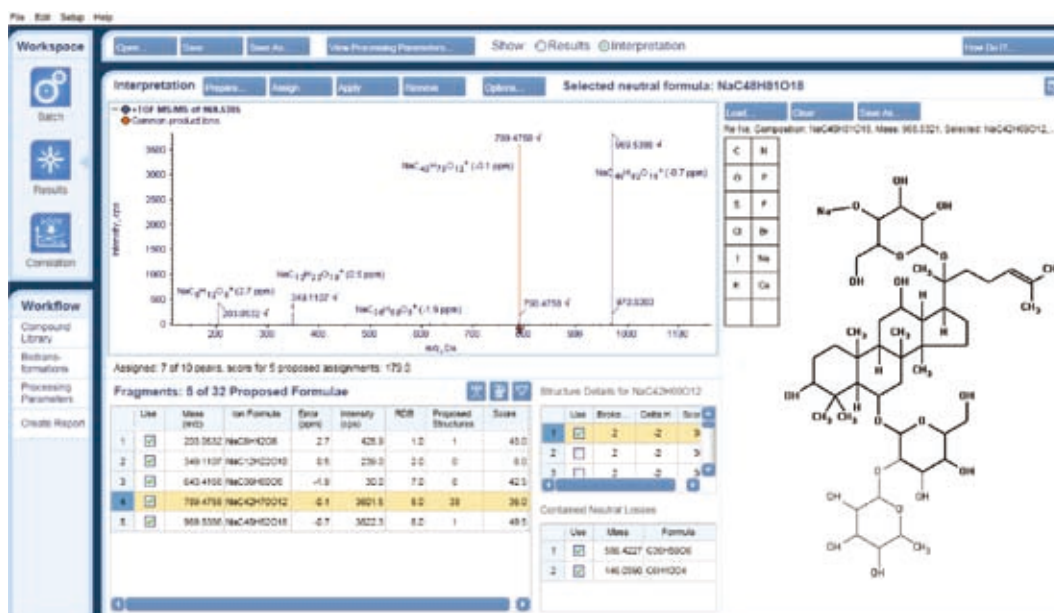


图7. MetabolitePilot™1.5软件自动计算Re二级碎片的元素组成，并与结构进行合理智能匹配。箭头指示的碎片789.47为结构式中高亮显示的部分（提示为脱糖、脱水后形成）

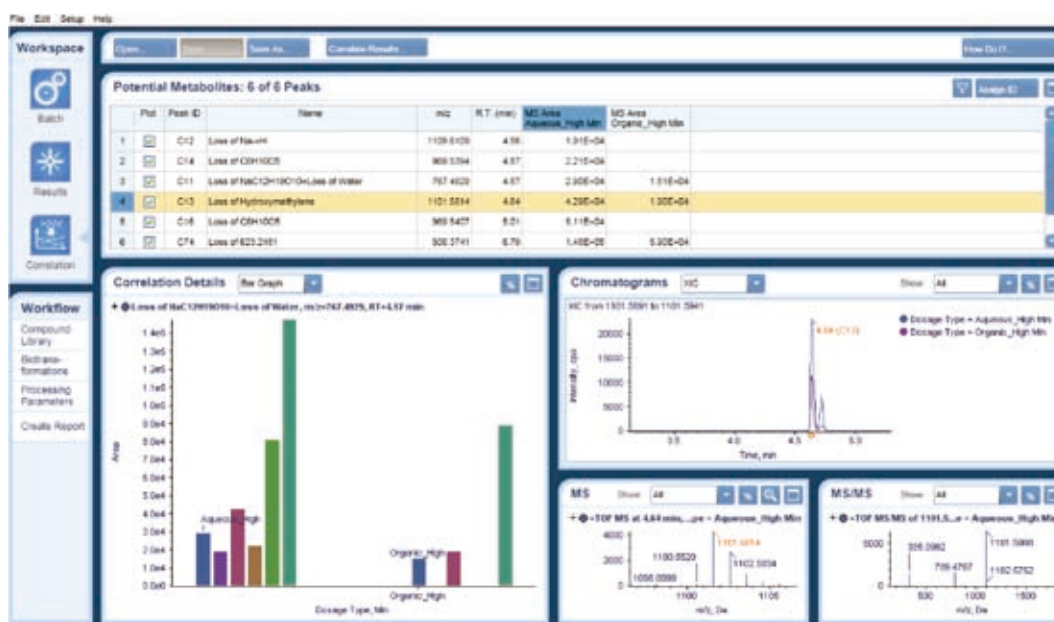


图8. MetabolitePilot™1.5软件比较大鼠灌胃人参醇提液和水提液后血浆样品中代谢物差异的相关性分析结果界面。可同时显示不同给药处理后多个代谢物相对含量差异的柱状图/折线图、叠加或单独显示代谢物的提取离子流色谱图及其对应的一级、二级谱图

4. 结果与讨论

在大鼠血浆和结肠发现的人参皂苷及代谢物是不同的，见表1。在结肠：主要的代谢通路是脱糖，化合物K是主要的代谢物，其他脱糖的代谢物如PPD、PD、PPT、F1也有发现。肠道菌群分泌的羟化酶把人参提取液中的主要成分Rb1转化成其的脱糖形式，而在血浆中可以观测到CYP酶的活性把Rb1转化成单羟基化或双羟基化的代谢产物。

TripleTOF™ 5600在高扫描速度下依然保持高分辨率和高质量精度，且灵敏度不损失，MMDF实时在线IDA采集方法确保一针进样获得全部人参皂苷及其代谢物的二级谱图。配合MetabolitePilot™1.5软件强大直观的数据处理功能，是我们完成复杂中药成分体内代谢物鉴定以及代谢趋势变化，同时定性定量工作流程的强大技术平台。

表1. 大鼠灌胃人参提取液后鉴定的代谢物

编号	人参皂苷及代谢物	来源
1	Rc	血
2	K	血、肠
3	Rb1 oxidation	血
4	Rb1 dioxidation	血
5	Re	血
6	Rg1 oxidation	血
7	Rg1 dioxidation	血
11	Rg1	肠
12	Rg2	肠
8	Rd	血
9	PD	血
10	F2	血、肠
13	F1	血、肠
14	Rf	肠
15	PPT	肠
16	PPD	肠

中药代谢组学研究

背景

中药及其复方在疾病治疗中担当着重要角色，其具有多成分、多靶点、整体调节等特点，因此，中药药效评价强调人或实验动物对于药物干预体系的整体反应。目前，中药及其复方的研究方法随着认识和技术进步经历了“简单-复杂-系统”的发展历程，逐步进入了系统生物学研究阶段。随着代谢组学的发展，该技术越来越多地应用于评价药物在体内所产生的一系列代谢过程、作用机制和靶器官效应等方面。因此，将代谢组学技术应用到中药的整体药效评价及其在体内的作用机制研究，不仅可检测中药在体内的代谢变化过程，同时还可通过观察中药在体内所引起的内源性代谢物的变化，进而寻找或阐明药物作用的靶点或受体，发挥中药从整体和平衡上进行调节的治疗优势。中药代谢组学研究特点：样品多，组成复杂，差异大、浓度分布范围广，需要有能够完全满足高灵敏度、高分辨率、动态范围宽和高通量的无歧视性的代谢物分析平台。

应用实例 I：AB SCIEX 串联质谱在代谢组学研究中的解决方案

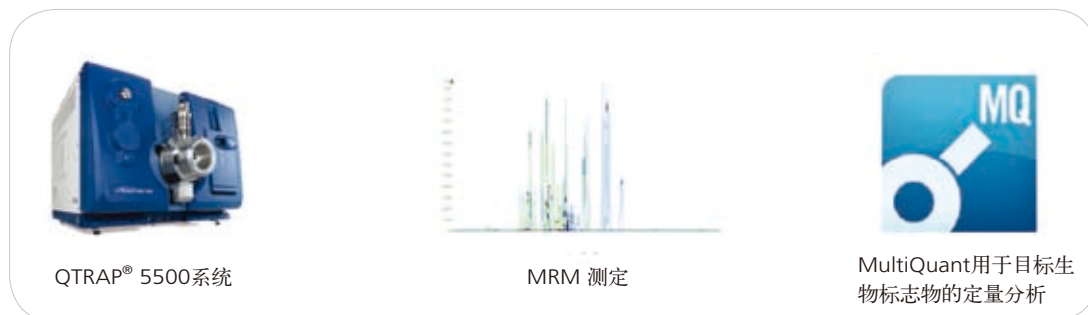
TripleTOF™ LC-MS/MS系统具有高分辨率、高扫描速度、高质量精度、高灵敏度以及动态范围宽的特点，并且具有智能信息关联采集（IDA）的采集方法，一次进样，可获得高质量的高分辨的TOF MS和TOF MS/MS，TOF MS全扫描用于发现鉴定潜在的生物标志物，利用高分辨和精确质量数二级质谱确定碎片组成，从而推断和确证生物标志物的结构。结合代谢组学分析软件MarkerView™、脂质组学分析软件LipidView™和质谱数据处理软件Peakview®进行分析，简化数据处理过程，并可得到可信的结果。从而一次进样可同时进行1) 非目标的代谢轮廓分析2) 靶向的代谢途径筛查3) 脂类代谢物研究。

同时QTRAP® 5500的高灵敏度和同时定性、定量的工作流程，可对感兴趣的已知的生物标志物进行定量分析。

发现和筛查



追踪和定量



实验与结果

1. 实验设计

以健康大鼠与血管损伤大鼠人参提取液治疗组与模型组为例，进行代谢组学研究。图1显示样品分组情况。

血浆样本的制备：大鼠血浆样品用1:3乙腈（0.1%甲酸）沉降蛋白，涡旋、离心后取上清液进行分析。质控样品通过取等体积的各样品后混合制备得到。

2. 数据采集：

LC/MS分析条件：质谱采用AB SCIEX TripleTOF™ 5600, DuoSpray™电喷雾离子源（ESI+），液相采用ACQUITY UPLC系统，色谱柱为Waters BEH C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm, 流动相A: 0.1%甲酸-水, 流动相B: 0.1%甲酸-乙腈。流速: 0.6 mL/min, 柱温: 50℃。

使用AB SCIEX TripleTOF™ 5600强大的动态背景扣除（DBS）触发信息关联采集模式（IDA）的方式，见图2。

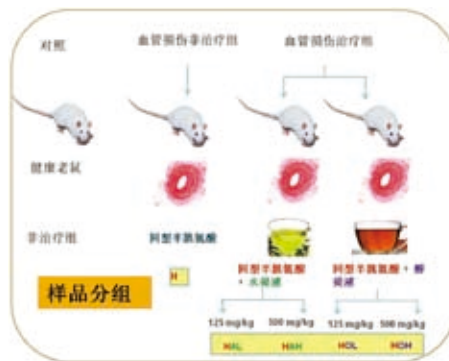


图1. 样品分组

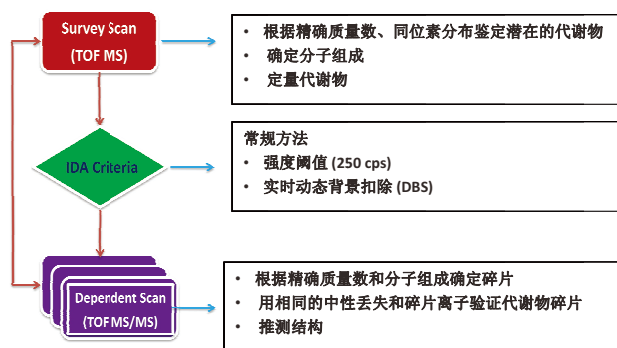


图2. 数据采集方法

3. 数据分析与结果

3.1 非靶向的全面代谢轮廓分析（Global Metabolite Profiling, GMP）

通过对比治疗组和对照组，寻找峰度有统计学意义的感兴趣的代谢物或潜在的生物标志物，数据经代谢组学分析软件MarkerView™先进的处理算法进行特征峰提取、化学计量学分析（PCA分析和t-检验）等，体现其有意义的生物学差异，见图3。

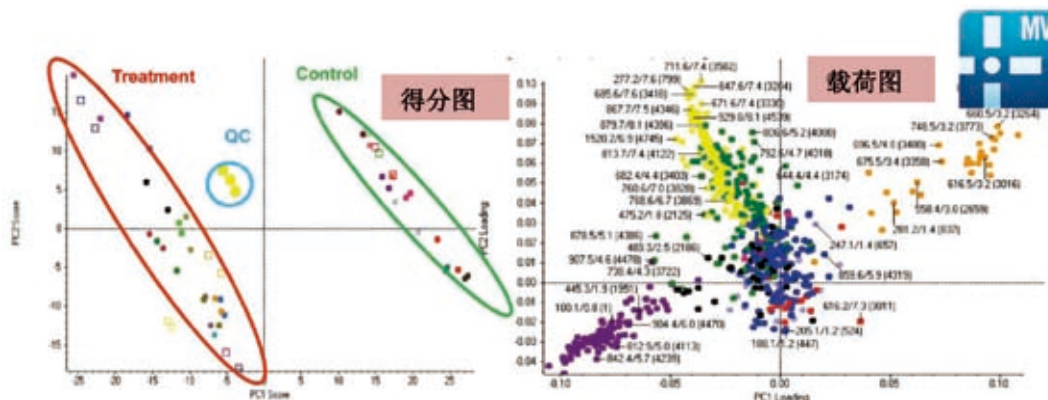


图3. 得分图中显示组别，对样品进行归类；载荷图反映组别差异的变量，高载荷值通常表明对分离具有显著作用

MarkerView™分析得到的差异离子,可同时自动关联到原始数据,一次进行分析得到的TOF MS和TOF MS/MS,通过Peakview®软件的Formula Finder可用于未知化合物鉴定,见图4。同时可根据对所预测的化合物的TOF MS/MS进行结构解析,见图5,进一步的验证。

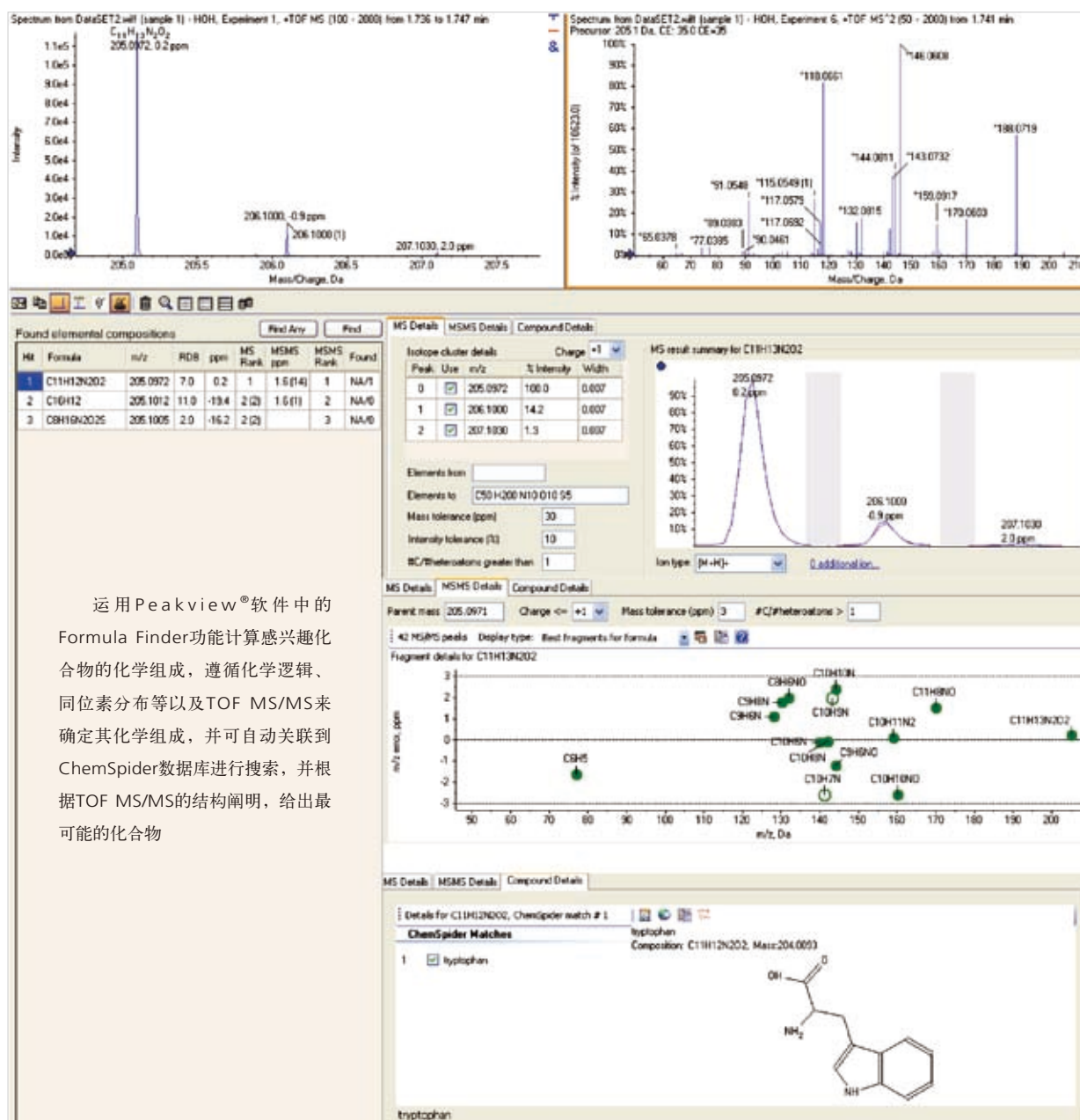


图4. 未知物的鉴定

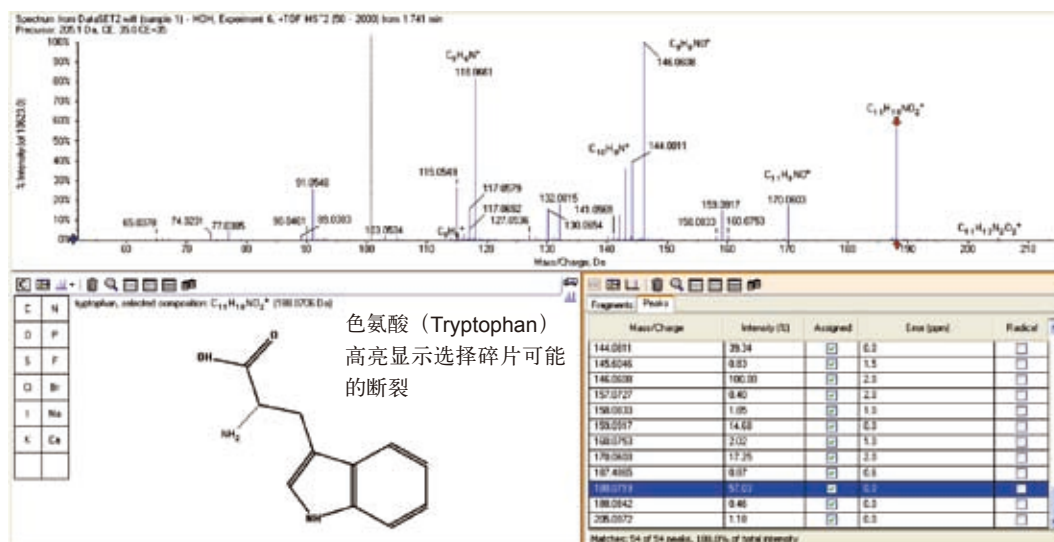


图5. Peakview®软件中根据TOF MS/MS进行结构解析

通过非靶向代谢轮廓分析，共分析鉴定了10个生物标志物，各化合物的质量准确度和p值见表1。

表1. 非靶向代谢轮廓分析鉴定到的生物标志物

Compound Name	Theoretical mass (m/z)	Error (ppm)	HOH/H		HAH/H	
			Log Fold difference	p value	Log Fold difference	P value
4-Guanidinobutanoic acid	146.0924	0.9	0.9	0.004	1.1	0.007
Tetracosanoic acid	369.3727	-1.3	-1.0	0.002	-1.1	0.05
Oleic acid	283.2631	-0.2	0.7	0.005	-0.27	0.004
Methyl Succinic acid	133.0495	2.9	-1.1	0.002	1.1	0.006
5-Methoxy indole acetic acid	206.0811	1.9	-1.0	0.008	0.9	0.005
Tryptophan	205.0971	2.6	-0.9	0.006	-1.9	0.05
Acyl carnitine	204.1230	-0.7	0.8	0.05	-1.1	0.003
Ephedrine	166.1226	0.1	0.9	0.002	-1.07	0.05
Cytidine	244.0928	3.1	-1.1	0.006	-0.9	0.002
Lipoic acid	207.0508	2.8	-0.75	0.007	-1.01	0.004

3.2 靶向代谢通路筛查 (Targeted Pathway Screening, TPS)

靶向代谢通路筛查是验证假设一个特定的途径是否是一个疾病状态或治疗或表型或基因型的有效方法。用TOF MS精确质量数和保留时间等信息进行鉴定，用TOF MS/MS质谱图进行匹配用于确证，本实验是与同型半胱氨酸代谢通路相关，进行有针对性的代谢通路筛查。可通过Peakview®软件中的XIC Manager插件进行数据分析。

同型半胱氨酸代谢通路上已知的代谢物通过XIC Manager加载并从TOF MS数据中产生各化合物的提取离子流色谱图(XIC)。根据精确质量数,同位素分布进行初步确证,依据数据库中有相关化合物信息,可通过保留时间和MS/MS碎片匹配度进一步确证(见图6)。该列表中的数据可直接导入到MarkerView™软件中,进行样本之间量的比较。

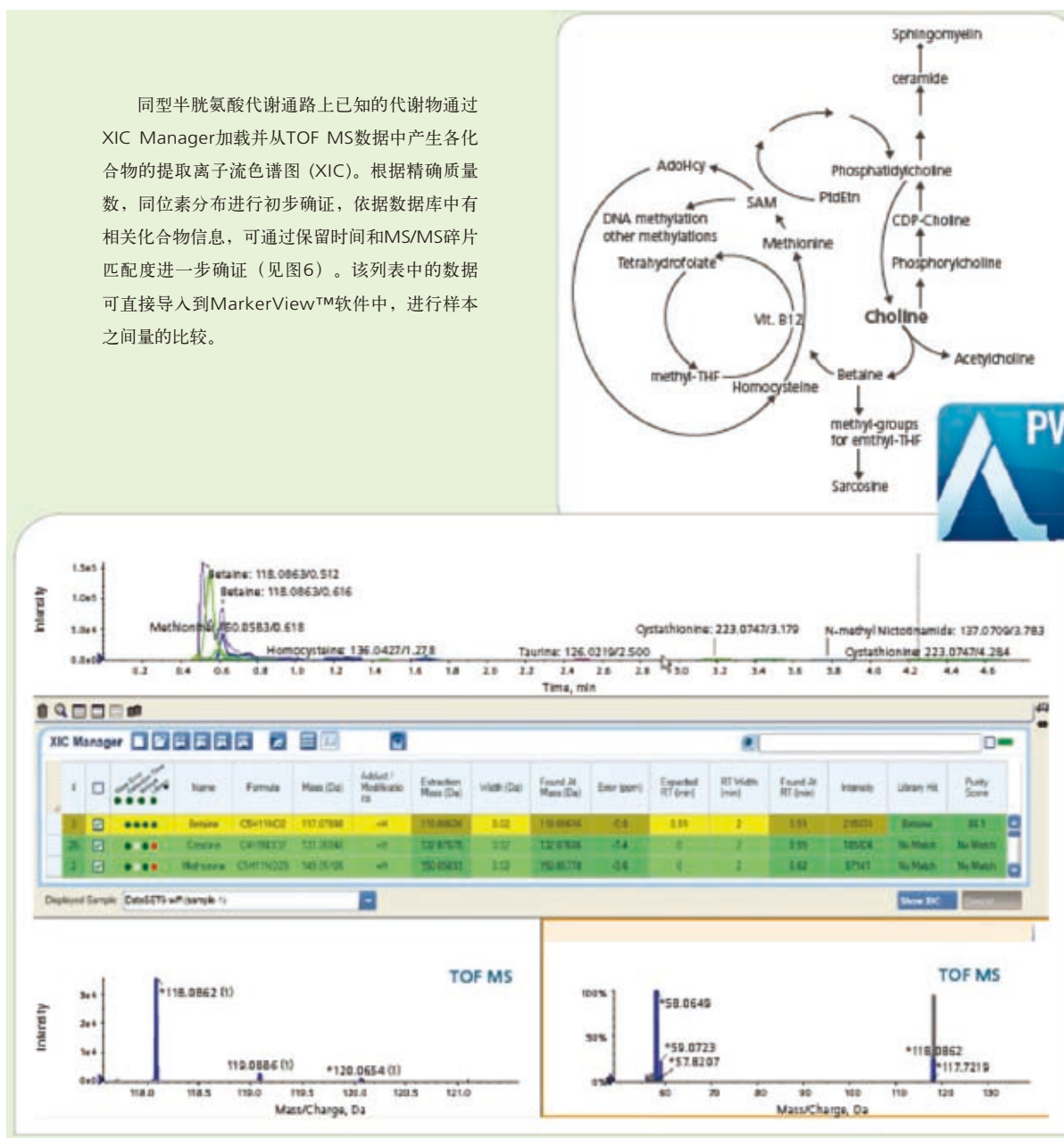


图6. XIC Manager查找到的同型半胱氨酸代谢通路相关代谢物的筛查及库检索,依据精确质量数、保留时间、同位素分布及库检索来进行确证

3.3 结论

AB SCIEX TripleTOF™ 5600系统的高扫描速度、高质量精度、高灵敏度和智能信息关联采集(IDA)的采集方法,一次进样,可发现潜在的生物标志物,并同时根据得到的TOF MS/MS进行确证。同时结合智能的数据分析软件MarkerView™和Peakview®非常适合于复杂基质、复杂成分中代谢组学的分析研究。

中药打假

背景

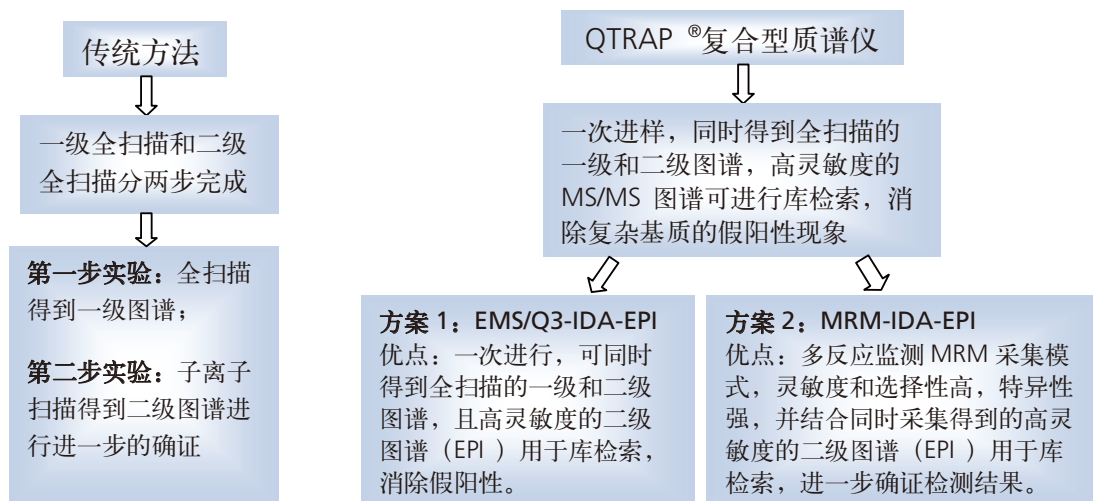
药品是关系到消费者健康甚至生命的特殊商品，部分生产商为了在短期内凸显中药的效果，获取超额经济利润，故意在产品掺杂中西药物违法添加化学物质，这些违禁化学物质会产生一定的副作用，尤其是长期服用会危及公众健康。因此建立违禁添加药物的同时检测方法和筛查方法，对于药品的质量监督，打击不法厂商的违法行为，规范中药及保健食品市场，保护消费者健康，具有十分重要的意义。目前在药物和保健品打假工作中，常见的检测项目有减肥药中成药、补肾壮阳类中成药、降压类中成药、安神类中成药、抗风湿类中成药、降糖类中成药、止咳平喘类中成药等，检测的违禁添加物有近60种。

由于中药本身成分繁多，导致检测样品基质复杂，存在基质效应和假阳性等问题，是一项困难的工作。在实际的检测工作中常常存在假阳性现象，即“出峰”未必一定含有此类违禁化学添加物，如果不进行确证，可能会造成检验结果的误判。因此，在进行违禁化学物质打假工作时，对检测仪器的要求除了灵敏度和重现性等基本性能外，更重要的是通过库检索，消除假阳性功能。

应用实例 I：QTRAP®系列复合型质谱仪在中药打假中的应用

解决方案

复合型质谱 QTRAP® LC-MS/MS在硬件上专利设计，使其具备复合扫描方式，EMS-IDA-EPI，Q3-IDA-EPI，MRM-IDA-EPI，真正意义上实现同时定量、定性，检测、确证同时进行的强大功能。因此，QTRAP® LC-MS/MS是进行违禁药物筛查的最佳工具，实现一针进样，检验、确证同时进行，消除了假阳性现象。本文以4000 QTRAP®质谱技术进行药物和保健品中违禁添加物为例，进行违禁药物和保健品的筛查工作。



实验与结果

（一）减肥中成药和降糖药中成药中非法添加物的检测

1. 仪器和质谱条件

质谱：AB SCIEX 4000 QTRAP® LC-MS/MS；

液相：Shimadzu UFLC 20AD XR

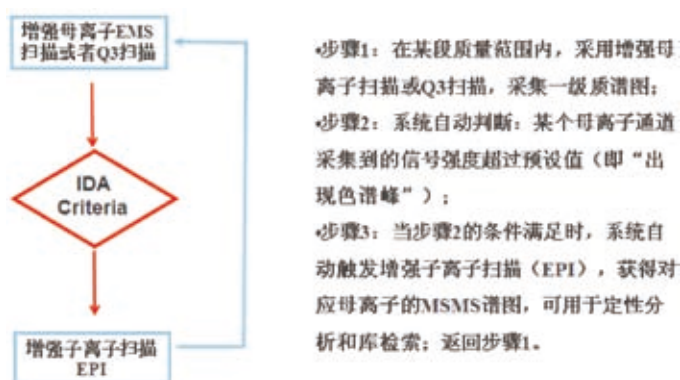
质谱条件：

CUR: 30 psi; IS: 5500 V; TEM: 550℃

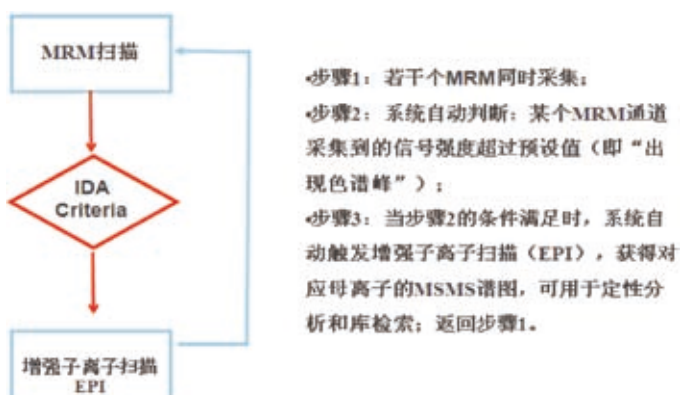
Gas1: 60 psi; Gas2: 60 psi; DP: 50 V

2. 4000 QTRAP®的实验设计

A. 利用EMS-IDA-EPI或Q3-IDA-EPI模式对样品进行测定，得到母离子Q1信息的同时，还可得到高灵敏度的二级谱图EPI，二级谱图可进行库检索，消除假阳性现象



B. 利用MRM-IDA-EPI模式对样品进行测定，MRM谱图可用于定量，还可得到高灵敏度的二级谱图EPI，二级谱图可进行库检索，消除假阳性现象



3. 实验结果

3.1 本次实验检测减肥类中成药5种违禁化学物质，分别为麻黄碱、咖啡因、芬氟拉明、西布曲明、酚酞。

A. 利用EMS-IDA-EPI模式对样品进行测定，图谱如图1所示：

一针进样，能够得到一级全扫描图（EMS）和二级增强子离子扫描图（EPI），在与全扫描提取离子流图相应保留时间的位置，EPI给出母离子所有的子离子信息，EPI进行库检索，得到匹配值，通过匹配值进行假阳性判断。

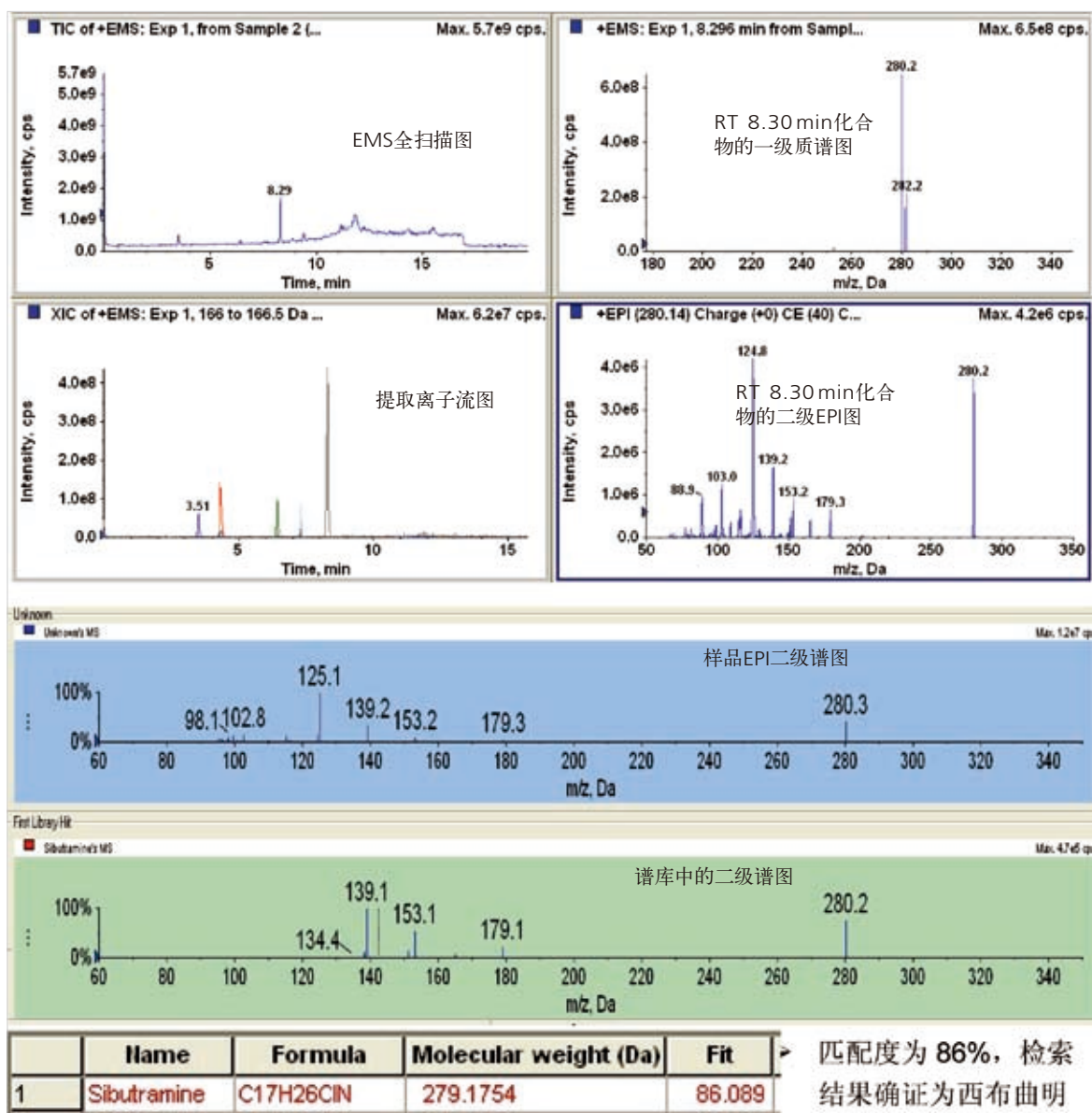


图1. EMS-IDA-EPI图谱和库检索结果

B. 利用MRM-IDA-EPI模式对样品进行测定，图谱如图2所示：

一针进样，能够得到MRM图和二级增强子离子扫描图，在与MRM相应保留时间的位置，EPI给出母离子所有的子离子信息，EPI进行库检索，得到匹配值，通过匹配值进行假阳性判断。

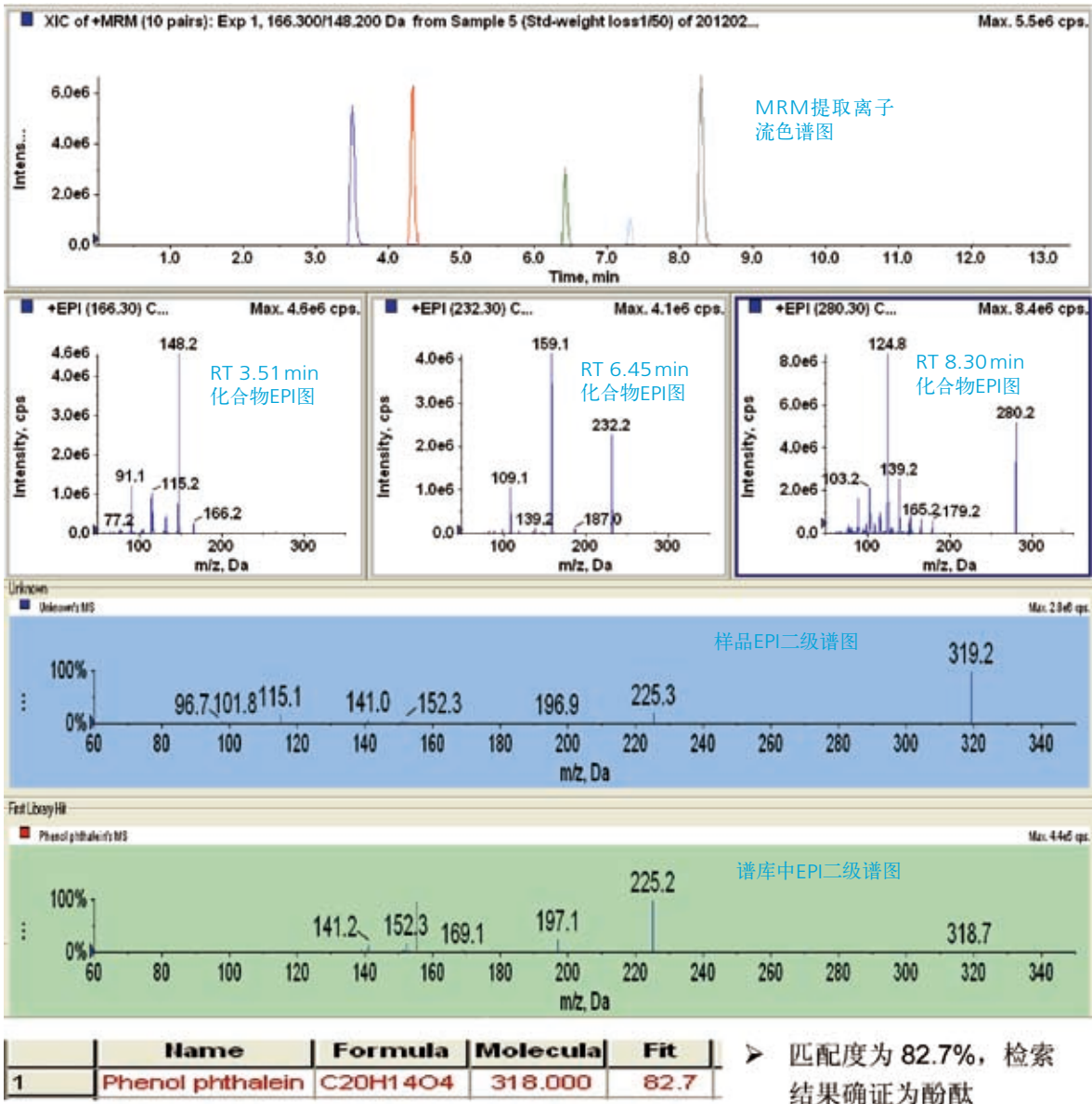


图2. MRM-IDA-EPI图谱

3.2本次实验检测降糖类中成药11种违禁化学物质，甲苯磺丁脲、格列苯脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列美脲、马来酸罗格列酮、瑞格列奈、盐酸吡格列酮、盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍。

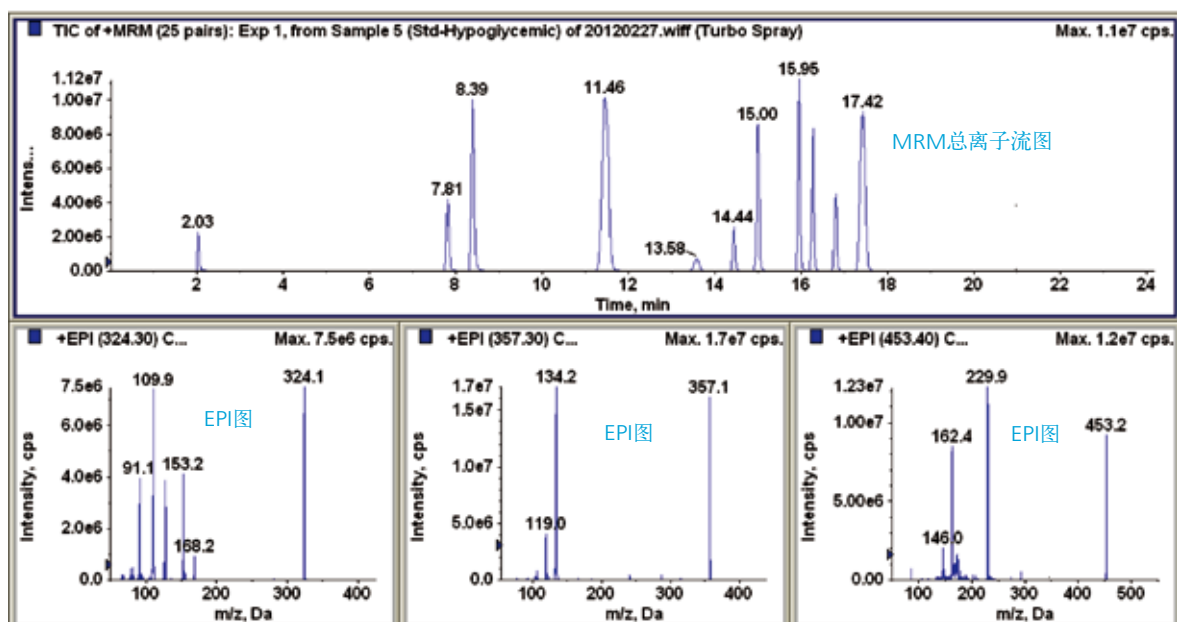


图3. 降糖类11种物质MRM-IDA-EPI图谱

4、讨论

4.1 由于TurboV™离子源最高能够承受3.0 mL/min的流速，因此本实验采用液相常用的1.0 mL/min的大流速。使用大流速的优点是质谱方法可以和液相方法无缝连接，无需分流，可快速实现液相方法的移植，有利于提高方法摸索的效率。

4.2 QTRAP®复合型质谱独有的EMS/Q3-IDA-EPI、MRM-IDA-EPI复合扫描方式，一次进样，既可以得到检出物质图谱，同时又可得到检出物质所有的高灵敏度的二级EPI谱图，EPI谱图可进行库检索，因此可快速进行判断，使结果更准确。

(二) 中成药中各类违禁非法添加物的筛查

1. 仪器和质谱条件

质谱：AB SCIEX 4000 QTRAP® LC-MS/MS；

液相：Shimadzu UFLC 20AD XR

质谱条件

CUR: 20psi; IS: 5500 V; TEM: 550℃

Gas1: 50psi; Gas2: 50psi; DP: 50V

2. 4000 QTRAP®的实验设计

利用MRM -IDA-EPI模式对样品进行筛查

MRM检测，MRM离子对信息见下表。

Q1	Q3	Time (msec)	ID	DP	EP	CE	CXP
355.2	144.1	5	Yohimbin	106	10	43	10
390.2	169.1	5	Tadalafil	86	10	55	12
390.2	107.1	5	Xanthoantrafil	46	10	77	6
391.3	269.1	5	Aminotadalafil	66	10	17	10
438.3	297.1	5	Piperidinohongdenafil	121	10	53	8
453.3	311.1	5	Carbodenafil	106	10	47	8
453.3	113.1	5	Demethylhongdenafil	121	10	45	8
460.3	151.1	5	Pseudovardenafil	106	10	65	12
460.3	299.2	5	Norneosildenafil	121	10	55	8
467.3	151.2	5	Acethylvaridenafil	126	10	63	12
467.3	111.2	5	Hongdenafil	121	10	43	8
475.2	100.1	5	Sildenafil	121	10	43	6
483.3	127	5	Hydroxyhongdenafil	116	10	43	10
489.3	113.1	5	Dimethylsildenafil	116	10	43	8
489.3	151.2	5	Vardenafil	121	10	65	10
489.3	113	5	Homosildenafil	121	10	43	8
491.3	299.1	5	Thiosildenafil	111	10	55	8
505.2	283.1	5	Hydroxyhomosildenafil	116	10	57	26
505.2	151.1	5	Hydroxyvaridenafil	121	10	73	10
505.3	299.1	5	Dimethylthiosildenafil	146	10	55	6
517.3	283.1	5	Udenafil	116	10	61	6
532.3	296.1	5	Mirodenafil	136	10	55	6
551.3	377.1	5	Benzylsildenafil	136	10	41	10
677.3	369.1	5	Icariin	86	10	43	10

3. 实验数据

筛查MRM总图如图4所示：

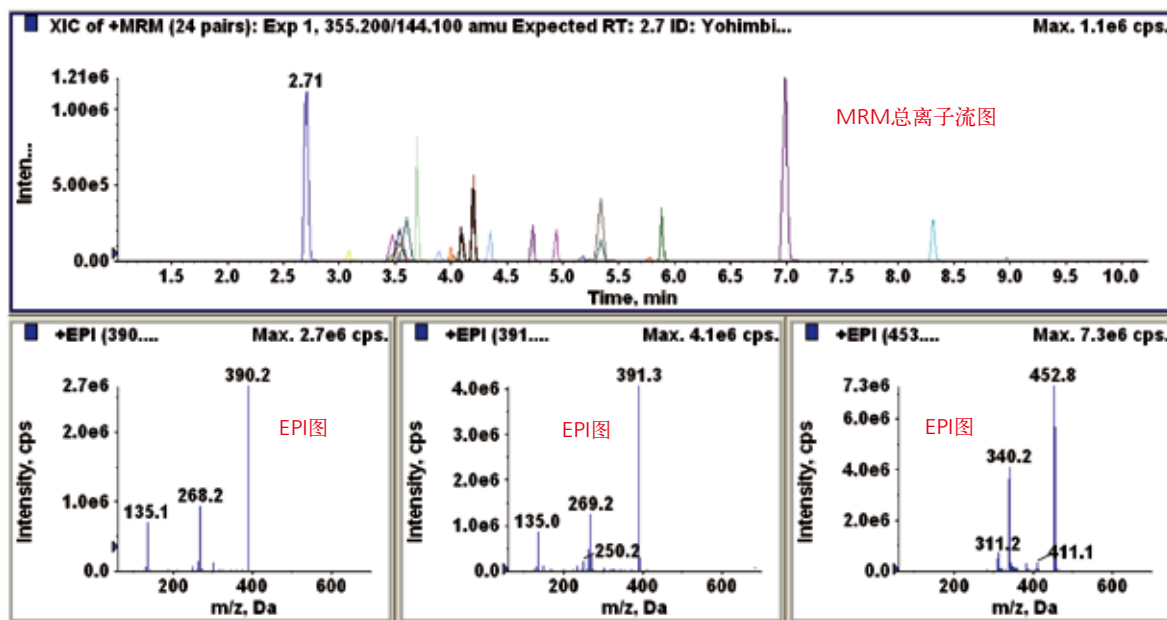


图4. 违禁物质MRM-IDA-EPI图谱

4. 结果与讨论

4.1 与三重四极杆不同，QTRAP®系列质谱仪得到的是高灵敏度的EPI谱图（比普通的MS/MS高两个数量级），数据库检索结果准确，可靠，特别适合复杂基质中违禁化合物的检测。

4.2 使用QTRAP®系列质谱仪进行筛查，一个方法可进行药品和保健品中不同种类的违禁化合物的筛查，一针进样，得到样品中可能添加的所有违禁物质，简便快捷，方便实用。

筛查中药中的农药残留和霉菌毒素

背景

中药质量的好坏直接影响到中成药和保健品的质量和患者的安全、疗效，因此，中药质量越来越受到各国政府和公众的关注。世界卫生组织曾在制定植物药的一般检验方法和质量标准时，提出了农药残留量测定问题。中国也规定在新药报批时报批材料的质量标准中必须含农药残留测定结果。但目前中国尚未制订中药中农药残留检测限量的国家标准。许多中药因重金属、农药残留和霉菌毒素超标在国外频频遭禁，大大限制了中药在世界上的推广且损坏了中国传统中医药的声誉。中药的农药残留问题已严重影响中药国际化发展和中药现代化进程。

中药中农药和毒素筛查是复杂和困难的一项工作，是实现中药现代化及中药质量控制的关键所在。及时有效地对中药中所残留的农药成分和毒素进行准确筛查和定量，对中药产品质量标准及中药用药安全有着十分重要的意义。

应用实例 I：应用QTRAP® 类型串联质谱仪筛查中药中的农药残留和霉菌毒素

解决方案

QTRAP® LC-MS/MS系列质谱仪是新一代液质联用串联质谱技术，其独特之处在于同时具备了完整的三重四极杆的质谱特点，以及线性离子阱的功能，在离子阱模式下，QTRAP®的MS/MS谱的灵敏度比常规的三重四极杆型高出二个数量级以上，同时还结合两者的扫描功能，实现“串联四极杆-线性离子阱”的快速切换。在MRM或Scheduled MRM™ 扫描等来发现中药中的农药和毒素残留的同时，获得丰富的MS/MS定性数据进行标准EPI谱库检索比对。因此，QTRAP®系列质谱仪兼有定性和定量分析的功能，使得QTRAP®串联质谱仪成为中药中农药和毒素残留成分筛查中强有力的工具。人参是常用中药之一，本文应用4000QTRAP®质谱技术研究了人参中农药和毒素残留的筛查和定量。

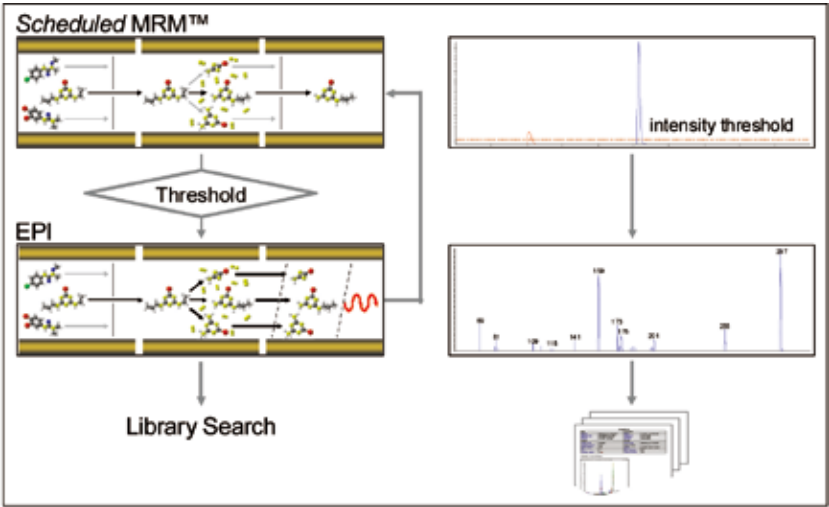


图1. Scheduled MRM™-IDA-EPI的实际工作流程

实验与结果

1. 样品前处理

称取1g 人参，加入4mL 乙腈：水（80:20）提取，离心取上清，上清以等体积的乙腈：水（80:20）稀释，进样10 μ L LC-MS/MS分析。

2. 仪器与试验方法

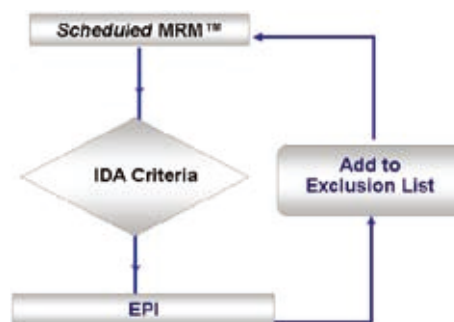
2.1该试验在AB SCIEX 4000 QTRAP[®]质谱上完成，液相为Agilent 1100。

2.2质谱条件

离子化方式：ESI

数据采集：Scheduled MRM[™]-IDA-EPI

- 步骤1. Scheduled MRM[™]分段采集若干个MRM；
- 步骤2. 系统自动判断：某个MRM通道采集到的信号强度超过预设值（即“出现色谱峰”）；
- 步骤3. 当步骤2的条件满足时，仪器自动切换为线性离子阱模式，进行增强子离子扫描（EPI），获得对应MRM通道之母离子的高品质的MSMS谱图。



3. 结果和讨论

3.1 结果

方案1：霉菌/真菌毒素及其代谢产物的快速筛查

20 μ g/kg 黄曲霉 B1, B2 & G1 和赭曲霉毒素A加至研磨的鲜人参中，按照上述的样品前处理方法提取。

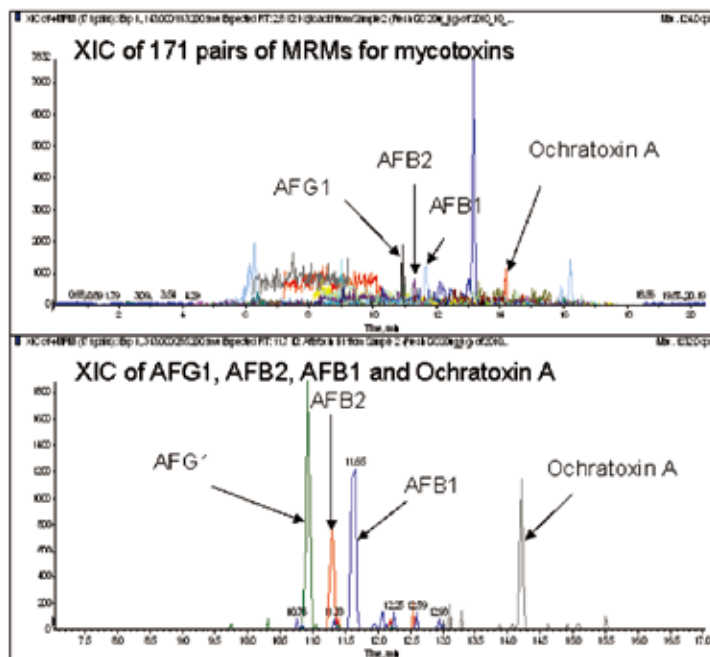


图2. 筛查美国鲜人参中添加黄曲霉和赭曲霉毒素的色谱图（信噪比均>10，LLOQ < 20 μ g/kg）

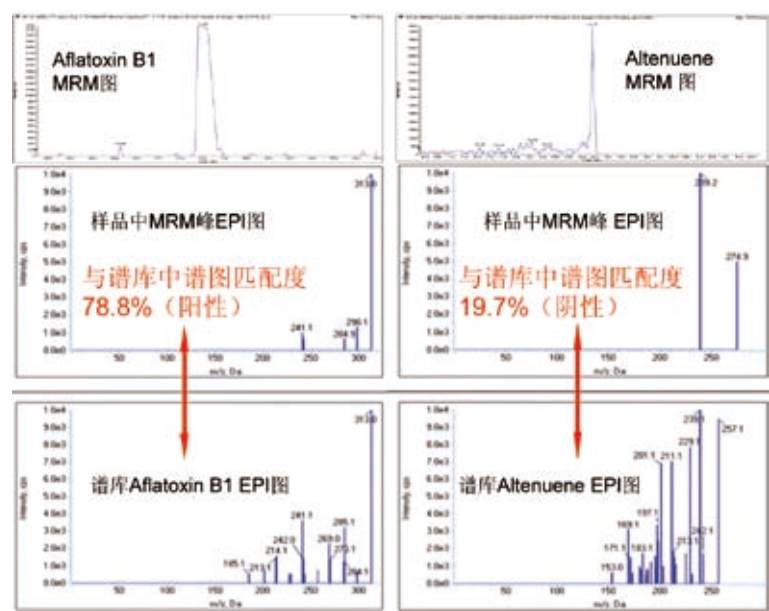


图3. Aflatoxin B1和Alternene MRM色谱图、EPI 谱图以及标准库检索结果
(Aflatoxin B1 阳性筛查结果，Alternene阴性筛查结果)

方案2: 农药残留筛查

100 µg/kg的多种农药标准品加入到磨碎的高丽干白参中，按照上述样品前处理进行提取。

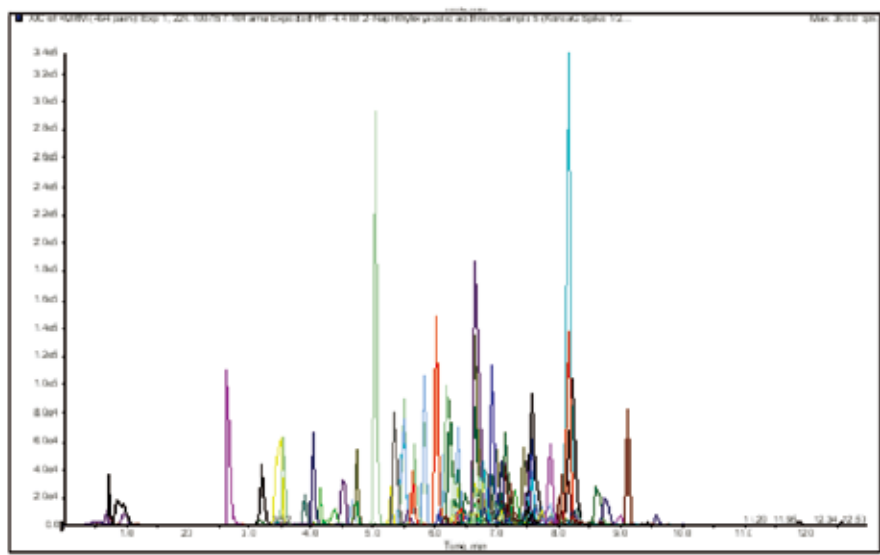


图4. 筛查高丽干白参中添加多种农药的色谱图（大部分农药LLOQ < 10 µg/kg pirimicarb和 piperonyl-butoxide LLOQ <1 µg/kg，基于Scheduled MRM™分段扫描，一次进样检测494对MRM）。

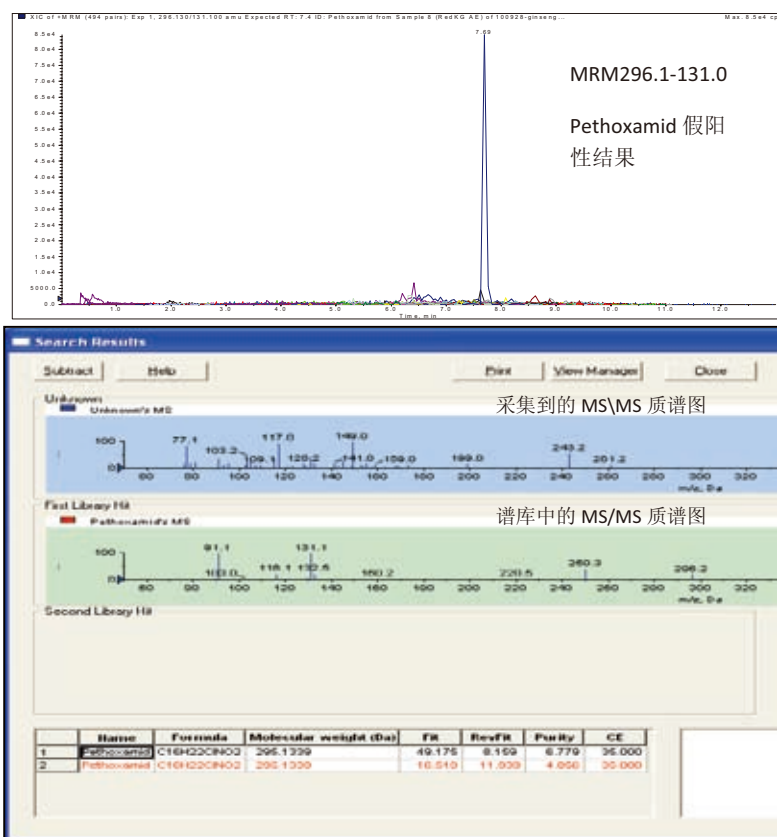


图5. 美国人参中Pethoxamid (m/z 296.1>131) 的MRM色谱图，显示为阳性结果，但通过EPI数据库检索排除了MRM假阳性结果

3.2 结论

如何及时有效地对中药中所残留的农药成分和毒素进行准确筛查和定量，是极具挑战性的工作，同时对中药产品质量标准及中药用药安全有着十分重要的意义。本文采用AB SCIEX 4000 QTRAP®质谱仪可检测人参中494种农药残留和171种毒素并通过谱库检索进行筛查。实验结果表明：QTRAP®系列质谱仪可同时获得定性和定量数据，十分适合于中药中农药残留和毒素的筛查。

应用实例 II：应用高分辨串联质谱筛查中药中的农药残留和霉菌毒素

解决方案

TripleTOF™系列质谱仪可在超快速的扫描速度获得高质量准确度、高分辨率、极高的灵敏度，并可同时进行高灵敏度定量分析的LC-MS/MS系统，保证其定量水平与高性能的串联四极杆质谱系统的定量能力一致。一次进样，用高分辨一级质谱，快速液相定量分析样品中的所有化合物，并基于IDA功能同时获得高分辨准确质量数二级质谱定性确证化合物，配合Peakview®软件中高性能的筛查工具XIC manager可在很短的时间内对样品中的农药残留等进行快速筛查并进行谱库检索验证。另外，TripleTOF™系列质谱仪的高扫描速度，高灵敏度和高分辨率保证了一次进样可采集到定性定量分析所需要的几乎所有数据，数据溯源性强，可对已采集的数据深入研究，深度挖掘。人参是常用中药之一，本文应用TripleTOF™ 5600质谱技术研究了人参中农药和毒素残留的筛查和定量。



图1. TripleTOF™ 5600在筛查领域的工作流程

实验与结果

1. 样品前处理

人参样品采用QuEChERS方法进行前处理，适当倍数稀释

2. 仪器

2.1 AB SCIEX TripleTOF™ 5600 LC-MS/MS 系统，液相系统 Shimadzu UFLCXR

2.2 质谱方法

TOF MS-IDA-MS/MS（高分辨MS全扫描并同时触发采集高分辨MS/MS）

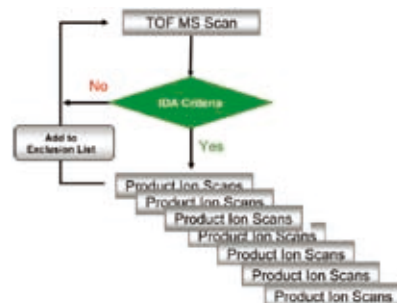
— ESI 正离子模式

— TOF MS—m/z 100-1000

– TOF MS/MS–10 MS/MS, m/z 50-1000

– 动态背景扣除 (DBS) 开启

带有XIC Manager插件的Peakview®和MultiQuant™软件进行数据处理



3. 结果和讨论

3.1 结果

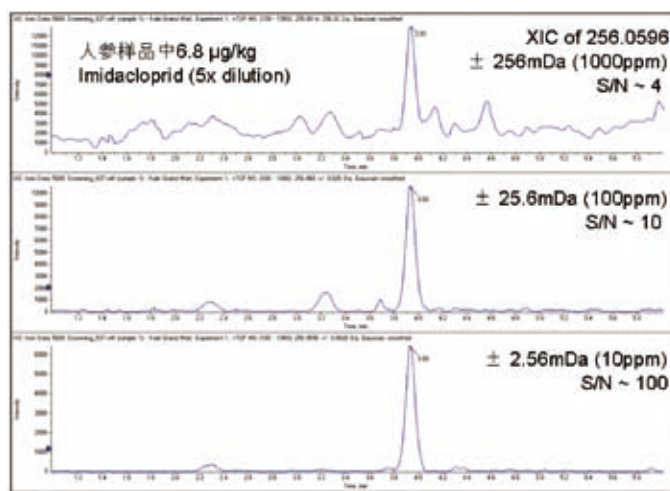


图2. 人参样品中6.8µg/kg Imidacloprid TOF MS离子误差窗口越小可明显改善信噪比和基质干扰

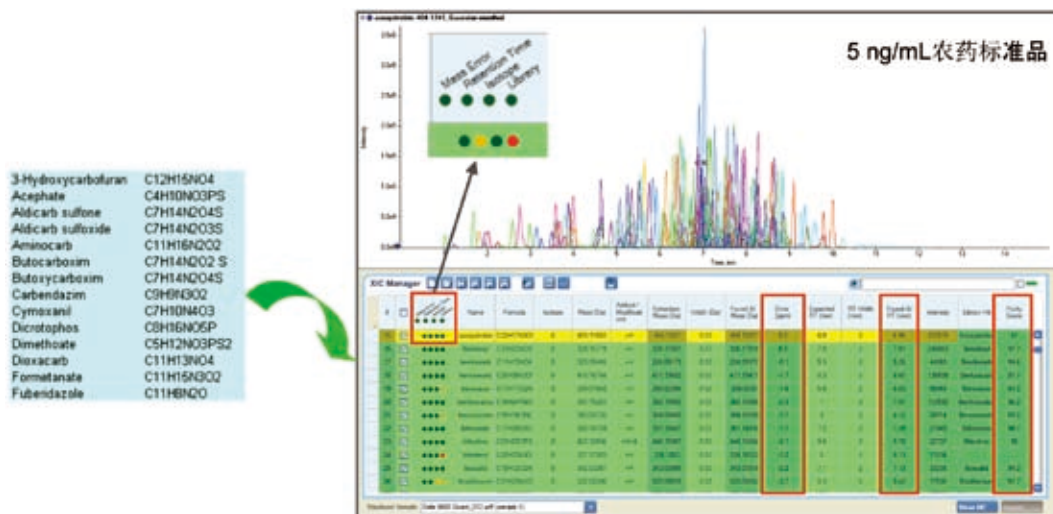


图3. 导入感兴趣的农药化合物分子式借助Peakview®软件和XIC manager以及标准谱库检索，可对人参中的300多种农药残留等进行快速而准确地筛查。

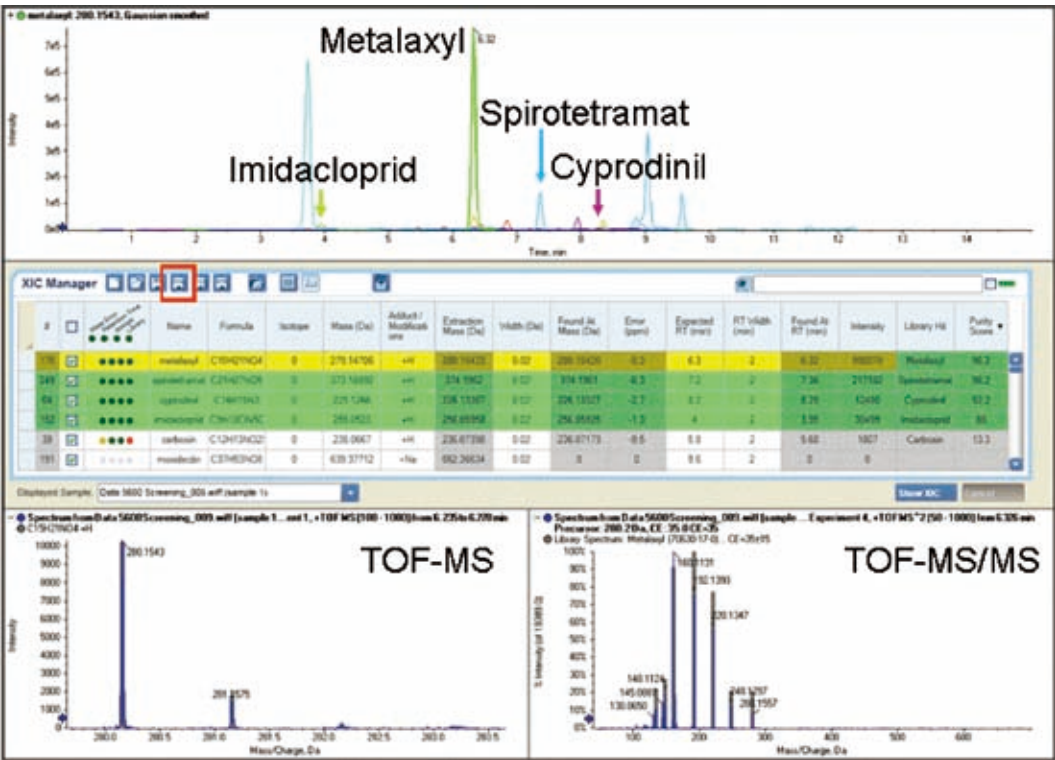


图4. XIC manager可简单而快速获得感兴趣化合物高质量准确度的一级TOF MS和二级TOF MS/MS质谱图及其与谱库的吻合程度。

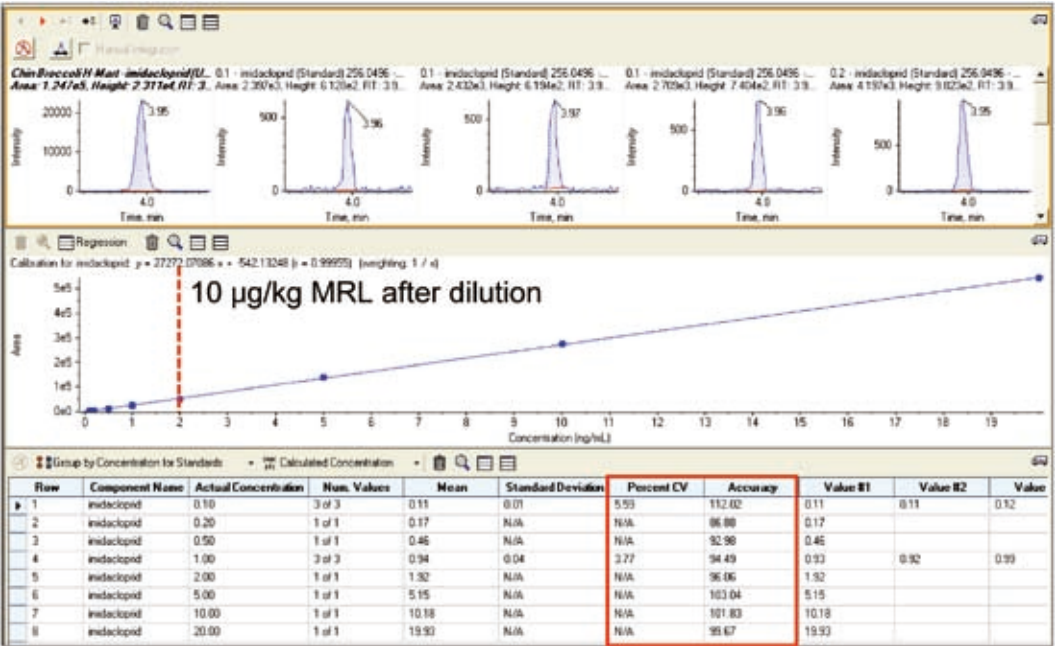


图5. 人参样品中 0.1-20 µg/kg Imidacloprid定量线性关系及重现性结果

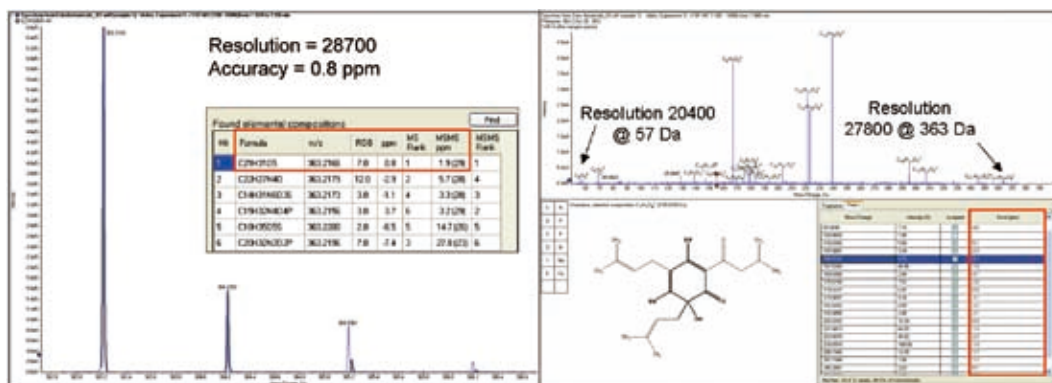


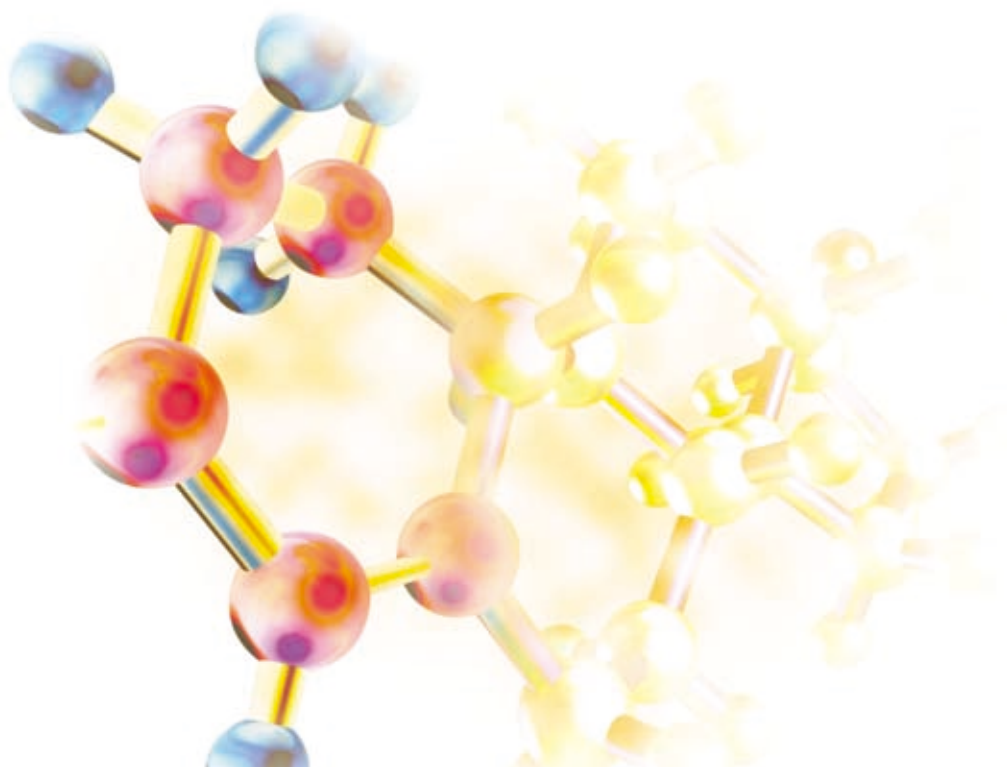
图6. 使用Peakview®软件 Formula Finder工具可对获得的高质量准确度的TOF MS和TOF MS/MS进行谱图解析，辅助推测化合物的结构信息。

3.2 结论

TripleTOF™ 5600兼具高质量准确度和高分辨率，并可同时进行高灵敏度定量分析的LC-MS/MS系统，其定量水平与高性能的串联四极杆质谱系统的定量能力相当。在保证高分辨率的前提下具有超快速的扫描速度（100张图谱/秒），一次进样，可同时获得高分辨、高质量准确度的一级TOF MS质谱图和二级TOF MS/MS质谱图，高性能的筛查工具XIC manager配合标准谱库检索可在短时间内对300多种农药残留等进行快速筛查。另外，Peakview®软件Formula Finder可对获得的高质量准确度的TOF MS和TOF MS/MS进行谱图解析，辅助推测未知化合物的结构信息。TripleTOF™ 5600系统的超快扫描速度结合高分辨和高灵敏度性能可以实现全面的定性鉴定筛查和定量工作。

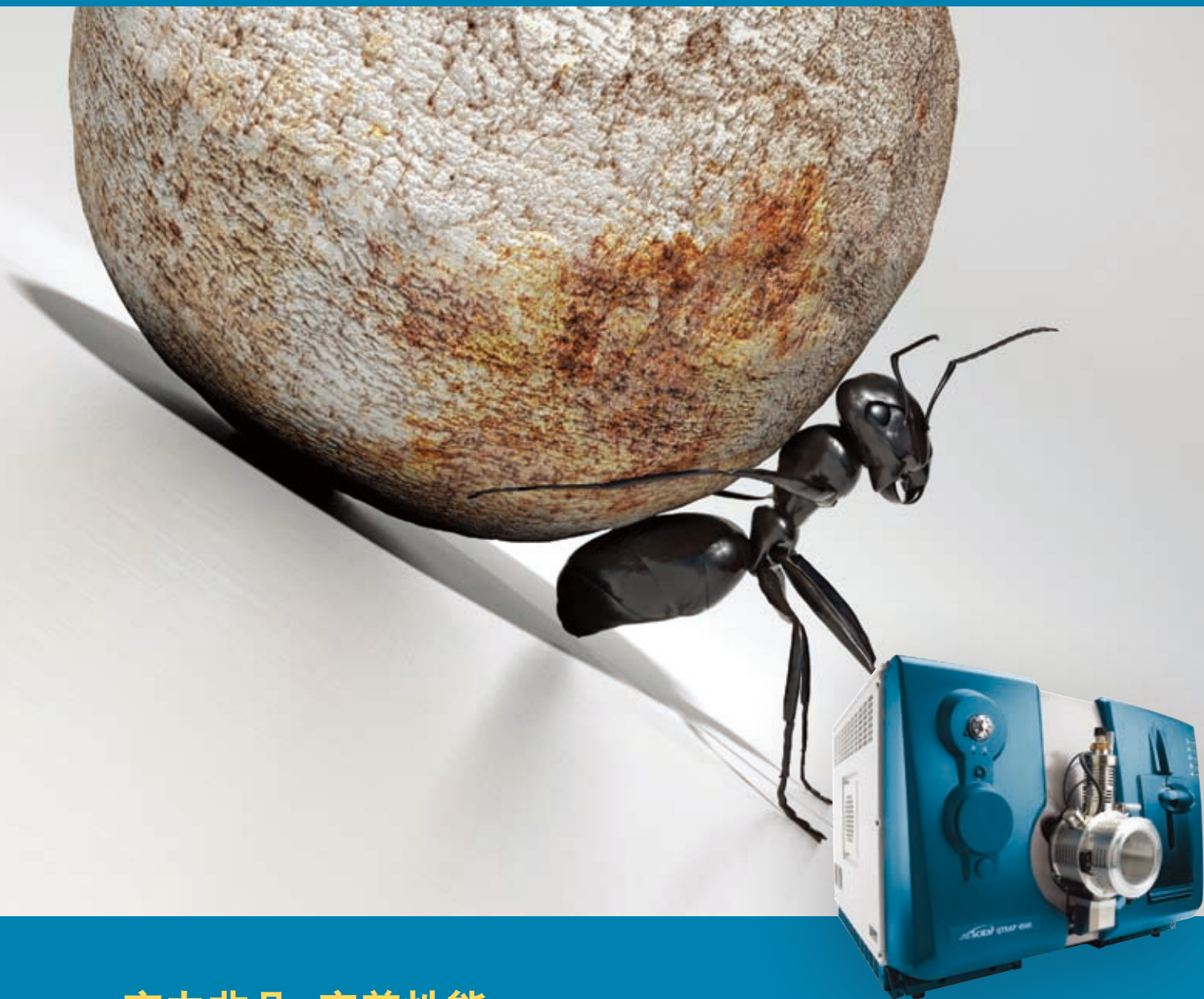
致 谢

本专辑部分数据由国内中药研究领域老师提供，在此向各位老师对本公司的支持和帮助表示衷心的感谢。



最新优化设计的主力LC/MS/MS

AB SCIEX 4500系列



实力非凡 完美性能

- 比同档次的三重四极杆质谱仪，4500系统灵敏度提高了10倍
- QTRAP®技术的全扫描灵敏度比常规的三重四极杆质谱提高了100倍
- 具备同时定量分析和谱库检索的世界领先的解决方案

AB SCIEX

极致灵敏，无限精准

AB SCIEX 6500™ 系列质谱产品



定量分析具有超高灵敏度和耐用性

- 和高端三重四极杆质谱相比，MRM灵敏度提高10倍
- 检测器动态范围增加20倍，实现6个数量级动态范围
- 质量范围达到2,000m/z
- 新的IonDrive™ Turbo V离子源增加仪器的耐用性
- 高达20,000 Da/sec的扫描速度充分发挥UHPLC的性能



AB SCIEX

高分辨主力质谱系统

AB SCIEX TripleTOF™ 4600质谱仪



- 在主力平台上实现精确质量分析
- 高分辨MS、MS/MS仅在一个实验中就可以快速实现定量和定性
- 无论是临床研究、法医毒理学样品筛查、还是药物代谢、生物制剂或蛋白质组学，都能一键式提高分析效率

AB SCIEX



震撼的突破



AB SCIEX TripleTOF™ 5600+

具备三重四极杆性能的跨界高分辨质谱平台

- 在同一平台上集成了定性探索、全貌解析和高分辨定量的三种工作流程
- 每秒100张谱图，与超高压液相完美匹配
- 定量能力可以与高性能三重四极杆相媲美



AB SCIEX中国各办事处

北京办事处：北京市朝阳区酒仙桥路14号 兆维大厦1001室

上海办事处：上海市田林路888号 科技绿洲一号楼102室

广州办事处：广州市体育西路109号 高盛大厦15C室

全国免费垂询电话：8008203488

网址：www.absciex.com www.absciex.com.cn

电话：010-5808 1388

电话：021-2419 7200

电话：020-8510 0200

传真：010-5867 1950

传真：021-2419 7333

传真：020-3876 0835