

CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术对生脉注射液成分的分析

Analysis of Components in Shengmai Injection by CESI-MS/MS and LC-MS/MS

王文涛¹, 司丹丹¹, 陈泓序¹, 余河水²

Wang Wentao¹, Si Dandan¹, Chen Hongxu¹, Yu Heshui²

¹ SCIEX, 中国; ² 天津中医药大学药学院;

¹ SCIEX, China; ² Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy;

Keywords: Shengmai Injection; CESI-MS/MS; LC-MS/MS; MasterView™ software;

1. 前言

中草药成分复杂, 如何对其有效成分进行分析和质量控制一直是研究的难点。中药活性成分以往主要采用传统提取分离的方法, 从复杂体系中分离提取单一化学成分, 再利用光谱和质谱等分析技术进行鉴定。液相色谱质谱联用技术(LC-MS)、毛细管电泳质谱联用技术(CE-MS)等技术的引入, 避免了这种冗杂的操作步骤, 可以在成分达到有效分离的基础上, 给出丰富的化学结构信息, 不仅可以对已知化合物进行分析, 而且可以结合同类已知结构化合物的裂解规律对未知成分进行直接分析, 这对中药化学成分的分析鉴定起到了重要的作用。生脉注射液是在我国传统中医中“益气复脉”的著名古方“生脉散”的基础上用现代科学技术研制成功的中药制剂¹, 主要成分为人参、麦冬、五味子(如图1)等, 其有效成分具有多种药理作用, 具有良好的扩张血管、保护心肌、增加冠状动脉血流量、调节血压、抗病毒等作用。因此, 对于其中药成分的分析对于研究生脉注射液的临床应用非常重要。

CESI-MS/MS技术采用无鞘液接口技术将CE的高效分离特性与MS的强大鉴定功能相结合。CESI-MS/MS技术有效提高离子化效率, 减少离子抑制效应, 并显著提升检测灵敏度, 特别适合中药中性活性成分的分析, 是LC-MS/MS技术的强有力补充。本文展示了CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术的联合使用对生脉注射液中活性成分的分析, 并对其分离结果进行了比较。CESI-MS/MS技术与LC-MS/MS技术可实现有效的互补, 共检测到178种活性组分, 其中

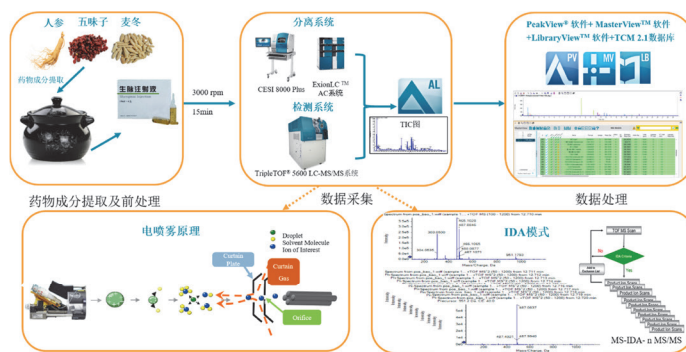


图1. CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术对生脉注射液成分的分析流程。

CESI-MS/MS单独可以检测到23种, LC-MS/MS单独可以检测到136种, 两种技术共同检测到19种活性成分, 并且CESI-MS/MS技术表现了更好的分离效果。

2. 实验材料

2.1. 仪器与试剂

CESI 8000 Plus (SCIEX), NanoSpray® III离子源 (SCIEX), ExionLC™ AC系统 (SCIEX), Kinetex C18 色谱柱 (Phenomenex), TripleTOF® 5600 LC-MS/MS系统 (SCIEX, 数据处理软件: PeakView®软件2.2、MasterView™软件1.0和LibraryView™软件1.1), OptiMS熔融石英毛细管卡盒 (91 cm × 30 μm ID, SCIEX)。冰醋酸 (HAc, 质谱纯, Sigma-Aldrich); 二次去离子水 (Millipore); 甲醇 (MeOH, 质谱纯, Merck)。背景电解质 (BGE): 10% HAc (含30% MeOH), 导电液 (CL): 10% HAc。

OptiMS熔融石英毛细管卡盒初次使用时，需进行如下预冲洗：MeOH 100 psi 10 min，正向；MeOH 100 psi 3 min，反向；Water 100 psi 10 min，正向；Water 100 psi 3 min，反向；0.1 M NaOH 100 psi 10 min，正向；0.1 M HCl 100 psi 10 min，正向；Water 100 psi 10 min，正向；BGE 100 psi 10min，正向；CL 100 psi 3 min，反向。每针样品分析间的冲洗：0.1 M NaOH 100 psi 2.5 min，正向；0.1 M HCl 100 psi 2.5 min，正向；Water 100 psi 4 min，正向；BGE 100 psi 4 min，正向；CL 75 psi 3 min，反向。

2.2. 样品及前处理

生脉注射液（市售某品牌），4 °C保存；

取1 mL生脉注射液样品，3000 rpm 离心15 min，取上清无需稀释直接进样；

3. CESI-MS/MS和LC-MS/MS方法设置

3.1. CESI-MS/MS条件

CESI条件设置		MS条件设置	
CE 类型	CESI 8000 Plus	质谱型号	Triple TOF® 5600 LC-MS/MS系统
CE 卡盒	OptiMS 熔融石英毛细管卡盒 (30 µm ID × 90 cm)	扫描范围	200~2000 m/z
BGE	10% HAc (含30%MeOH)	数据采集方法	信息依赖采集 (IDA) 每个循环选择12个最强的离子进行MS/MS
CL	10% HAc	极性	正/负离子模式检测
毛细管温度	25 °C	Gas 1	0
样品温度	10 °C	Gas 2	0
分离条件	+/- 25 kV, 60 min with 2.0 psi	Curtain Gas	5
进样	压力进样: 5 psi 60 s	ISVF	+1650 V/-1650 V
		Temperature	50 °C
		DP	100
		CE	+40/-40

3.2. LC-MS/MS条件

LC条件设置		MS条件设置	
LC 型号	ExionLC™ AC系统	质谱型号	TripleTOF® 5600 LC-MS/MS系统
色谱柱	Kinetex C18色谱柱 (100 × 2.1mm, 2.6 µm)	扫描范围	100-1300 m/z
A相	水 (5 mM 甲酸铵-0.05%甲酸)	数据采集方法	信息依赖采集 (IDA) 每个循环选择12个最强的离子进行MS/MS
B相	50% 甲醇- 50% 乙腈 (5mM甲酸铵)	极性	正/负离子模式检测
进样盘温度	15 °C	Gas 1	60
流速	0.30 ml/min	Gas 2	60
柱温	40 °C	Curtain Gas	35
		ISVF	+4500 V/- 4500 V
		Temperature	600 °C
		DP	60
		CE	+/-10

4. 结果与分析

中药材的有效成分中有亲水性的极性物质，也有疏水性的非极性物质。从技术原理上考虑，CE技术更适合于亲水性和强极性化合物的分离，而LC技术则更适合于非极性和疏水性化合物的分离。两种技术的有效结合，有助于帮助广大的中药研究工作者提高对中药材中活性成分的深度分析。

本文联合使用了高灵敏度的CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术，对生脉注射液中成分进行了深度分析。采用SCIEX公司的MasterView™软件进行数据处理和鉴定。首先，利用SCIEX MS/MS高分辨质谱中药数据库对生脉注射液中的化合物进行鉴定。其次，在MasterView™软件中导入人参、麦冬、五味子的已知化合物列表进行峰的提取，将结构式与二级图谱匹配，进行化合物结构鉴定，用于中药数据库中不存在的化合物的鉴定。使用以上两种

鉴定方法，通过CESI-MS/MS与LC-MS/MS技术的有效互补，生脉注射液中共检测到178种活性组分（图2为CESI-MS/MS技术正离子模式下鉴定到的部分化合物的提取离子流图），可实现对生脉注射液的深度分析。所有化合物的质量误差均在5 ppm以下，结果均经过数据库匹配和理论碎裂与实测MS/MS匹配进行鉴定，鉴定结果准确可靠。

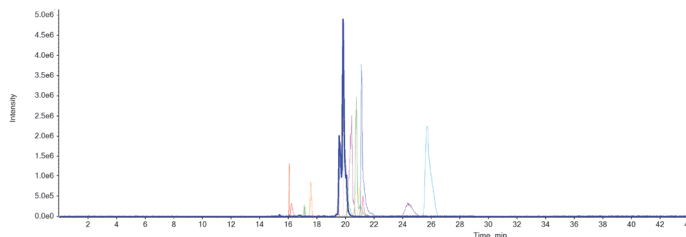


图2. CESI-MS/MS技术正离子模式下鉴定到的部分化合物的提取离子流图。

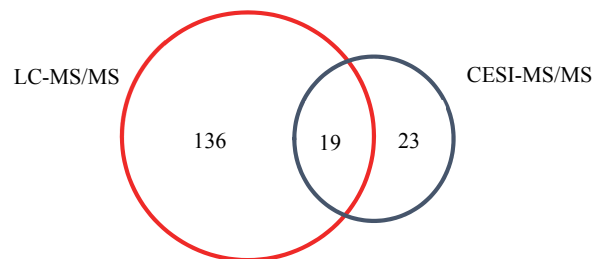


图3. CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术对生脉注射液分析结果的对比图。

利用CESI-MS/MS方法可以额外单独检测出23种极性化合物（如表1），包括氨基酸、生物碱、有机酸、糖类化合物。证明了CESI-MS/MS方法可检测到部分LC-MS/MS检测不到的极性化合物，为LC-MS/MS方法提供了强有力的补充。

表1. CESI-MS/MS单独鉴定到的化合物列表。

序号	类型	名称	分子式	理论质量	加和物	精确质量	CESI-MS/MS			
							实际质量	质量偏差	强度	保留时间
1	氨基酸	D-苏氨酸	C ₄ H ₉ NO ₃	119.0582	+H	120.0655	120.0659	2.9	2967286	20.75
2	氨基酸	L-丝氨酸	C ₃ H ₇ NO ₃	105.0426	+H	106.0499	106.0504	5	2509169	20.4
3	氨基酸	L-天门冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	133.0375	+H	134.0448	134.0447	-0.5	338031	24.43
4	氨基酸	L-缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.079	+H	118.0863	118.0864	1.4	2315438	19.67
5	氨基酸	谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	147.0532	+H	148.0604	148.0603	-0.7	537881	21.44
6	氨基酸	瓜氨酸	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.0957	+H	176.103	176.1023	-3.9	516128	21.24
7	氨基酸	精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.1117	+H	175.119	175.1189	-0.4	14394433	16.14
8	氨基酸	组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.0695	+H	156.0768	156.0761	-4.2	326311	16.24
9	醇酯类	琥珀酸甲酯	C ₅ H ₈ O ₄	132.0423	+H	133.0495	133.0497	1	25932	31.36
10	二萜类	银杏内酯B	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	470.1424	+NH ₄	488.1768	488.1773	1.1	34418	18.35
11	二萜类	银杏内酯C	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₁	440.1319	+NH ₄	458.1662	458.1674	2.6	33823	26.8
12	酚类	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317	+H	139.039	139.0389	-0.4	18310	31.04
13	黄酮类	胡薄荷酮	C ₁₀ H ₁₆ O	152.1201	+H	153.1274	153.1276	1	15969	15.04
14	黄酮类	左旋香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	150.1045	+H	151.1117	151.1117	-0.5	11139	15.17
15	嘌呤类	次黄嘌呤	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.0385	+H	137.0458	137.0457	-0.7	71331	26.07
16	其他	维生素C	C ₆ H ₈ O ₆	176.0321	-H	175.0248	175.0244	-2.6	3105	23.4
17	其他	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	152.1201	+H	153.1274	153.1276	1	15969	15.04
18	三萜类	秦皮苷	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	370.09	+NH ₄	388.1244	388.1244	0.1	17777	8.29
19	生物碱	左旋肉碱	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161.1052	+H	162.1125	162.1126	0.9	344644	16.95
20	糖类	D-氨基葡萄糖	C ₆ H ₁₃ NO ₅	179.0794	+H	180.0867	180.0865	-1	3381708	17.6
21	有机酸	γ-氨基丁酸	C ₄ H ₉ NO ₂	103.0633	+H	104.0706	104.0711	4.7	2855767	15.51
22	有机酸	四氢嘧啶	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	142.0742	+H	143.0815	143.0813	-1.8	26463	19.09
23	有机酸	异柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	192.027	-H	191.0197	191.019	-3.6	210896	32.16

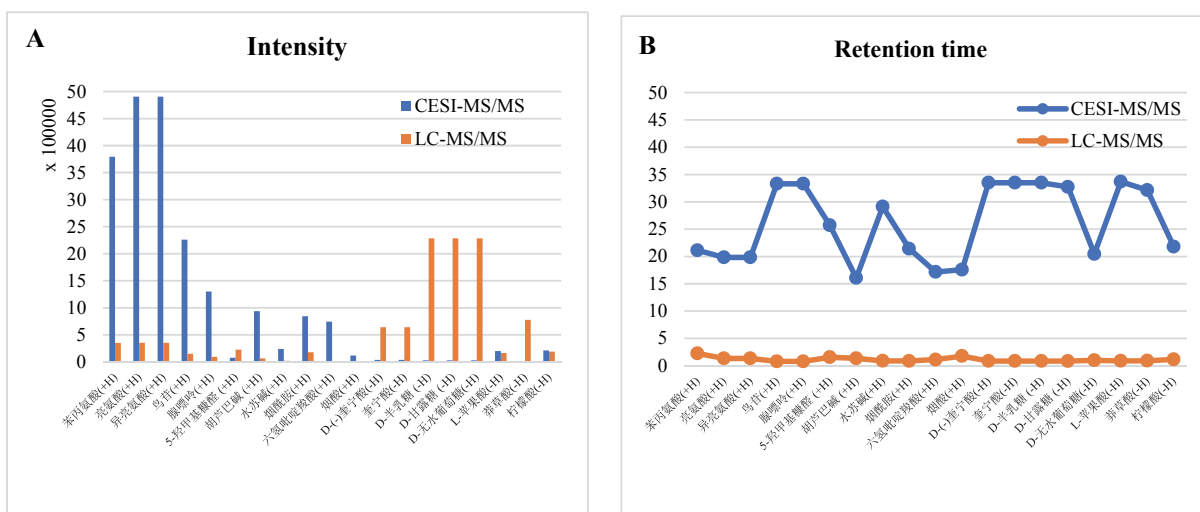


图4. CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术共同检测到的化合物峰强度和保留时间的比较图。

此外，为了更好地分析CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术对中药活性成分分析的差别，对这两种技术共同检测到的19种化合物的峰强度和保留时间也进行了比较，如图4所示。从峰强度来看，在正离子模式下，CESI-MS/MS所得信号峰强度远高于LC-MS/MS的结果；在负离子模式下，LC-MS/MS所得峰强度高于CESI-MS/MS得到的结果（如图4-A）。从保留时间来看，这些化合物在LC色谱柱上的保留都较弱，分离效果较差，而在CESI-MS/MS分析中，这些极性化合物具有较长的分离时间，分离效果较好（如图4-B）。通过两种技术分析结果的对比可以发现：CESI-MS/MS方法更适合于对极性化合物的分析；在两种技术共同检测到的化合物中，对于正离子模式下检测的化合物，CESI-MS/MS技术表现了更高的灵敏度和更优异的分​​离效果，可以提高对于一些低含量活性成分的分析能力；对于负离子模式下检测的化合物，LC-MS/MS的灵敏度更高，但CESI-MS/MS具有更好的分离效果。

5. 结论

本文利用高灵敏度的CESI-MS/MS和LC-MS/MS技术对生脉注射液中的活性成分进行了深入分析，通过两种技术的有效结合，

可充分保证低含量化合物获得最佳的MS/MS质谱数据，并结合MasterView™软件和MS/MS中药数据库可对分析物进行更加准确的鉴定。通过两种技术的结果对比发现：

- 1) CESI-MS/MS可检测到部分LC-MS/MS检测不到的极性化合物。
- 2) 在两种技术共同检测到的化合物中，对于正离子模式下检测的化合物，CESI-MS/MS技术表现了更高的灵敏度和更优异的分​​离效果；对于负离子模式下检测的化合物，LC-MS/MS的灵敏度更高，但CESI-MS/MS具有更好的分离效果。

结果证明，CESI-MS/MS技术兼具了CE对极性化合物高分​​离效率和无鞘液接口高灵敏度优势，在中药中氨基酸、生物碱、有机酸、糖类极性化合物的分析中，为LC-MS/MS技术提供了强有力的补充。

参考文献

1. Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Part 1, Vol 15 (卫生部药品标准一部第十五册). 1998. 170.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在​​美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11123-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)